✓ پژوهش و سازندگی، شماره ۴۹، زمستان ۱۳۷۹

ترکیب و تاثیر ضد میکروبی روغنهای فرار پونه وگلپر بر S. aureus و E. coli

● ایرج رسولی، عضو هیات علمی دانشگاه شاهد ● محمدباقر رضایی، عضو هیات علمی موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع

تاریخ دریافت: بهمن ماه ۱۳۷۸ تاریخ پذیرش: فروردین ماه ۱۳۷۹

چکیده

تاثیر ضدباکتریایی روغنهای فرار پونه و گلپر بر روی باکتریهای *E. coli* و *S. aureus* مطالعه شد. گیاهان مورد مطالعه با روش تقطیر با بخار آب اسانس‌گیری شدند و تاثیر ضد میکروبی اسانس آنها با روش دیسک پلیت در رقتهای مختلف و در چهار مرحله مختلف زمانی مطالعه گردید. روغنهای فرار موثر در رقتهای مختلف در برابر سه رقت مختلف سوسپانسیون باکتریال قرار گرفتند تا MBC و MIC آنها را تعیین نماییم. اسانس پونه و گلپر به صورت رقیق نشده به ترتیب خاصیت باکتریسیدال و باکتریواستاتیک داشتند. از نظر زمانی اسانسها در مدت ۳۰ دقیقه بهترین تاثیر خود را نشان دادند. ترکیبات اسانسها با دستگاه گاز کروماتوگراف/ طیف‌سنج جرمی (GC/MS) شناسایی شد و هر دو اسانس در ۷ ترکیب با درصدهای متفاوت مشترک بودند. تاثیر ضدمیکروبی Limonene، ۱۳/۷۳ درصد ترکیبات اسانس پونه و ß-pinene، ۷ درصد ترکیبات اسانس گلپر را تشکیل می‌دهند و با فرض تاثیر گذاری هر دو ترکیب، تاثیر Limonene محتملتر به نظر می‌رسد. نتایج به دست آمده نشان می‌دهند که روغنهای اسانسی مذکور فعالیت ضد میکروبی خوبی داشته و باکتری گرم منفی *E. coli* تاثیرپذیری بیشتری از آنها داشته است. با عنایت به محدودیتهای روزافزون استفاده از مواد شیمیایی ضد میکروب به نظر می‌رسد روغنهای فرار جایگزین بهتری برای مواد فوق باشند.

کلمات کلیدی: پونه، گلپر، خاصیت ضدمیکروبی، روغنهای فرار، *E. coil* و *S. aureus*

✓ Pajouhesh & Sazandegi, No 49 PP:130-135

Composition and antimicrobial properties of essential oils of *Mentha longifolia* and *Heracleum persicum* on *E. coil* and *S. aureus*

By: I., Rasooli, Shahed university P.O.Box 15875-5794; Rezaei, M.B., Research Institute of Forsets and Rangelands

Antimicrobial effects of essential oils of *Mentha longifolia* and *Heracleum persicum* on *E. coli* and *S.aureus* were studied. Disc diffusion method was conduced to evaluate the zone of microbial growth inhibition at various concentrations of the essential oils. The antimicrobial effect was also studied against three different concentrations of microbial suspension to find out MIC (Mininmal Inhibitory Concentration) and MBC (Minimal Bactericidal Concentration). The essential oils from *Mentha longifolia* and *Heracleum persicum* were bactericidal and bacteriostatic respectively against both the micro organisms. Gram negative bacteria, *E.coli*, was readily affected as compared to *S.aureus*. Chemical composition of the essential oils were analyzed by Gas Chromatography and Mass Spectrometry (GC and GC/MS) Seven common chemical compounds at various concentrations were found in both the oils. Limone of *Mentha Longifolia* was at the highest level of 13.73 percent, while ß-pinene of *Heracleum persicum* contributed to 7 percent in the common compounds. Antimicrobial effect of Limonene seems to be more probable than ß-pinene. With a view to the increasing limitations of the use of chemical antimicrobial agents and development of drug resistance, it seems necessary to switch on to a new harmless antimicrobial agents from natural sources.

Key words: Antimicrobial property, Essential oils, *Mentha longifolia*, *Heracleum persicum*, *E. coli*, *S. aureus*.

مقدمه

کنترل بیماری‌های میکروبی انسان، حیوان و گیاهان بوسیله روغنهای اسانسی و استفاده آنتی‌اکسیدانها از منابع طبیعی برای افزایش عمر محصولات غذایی و پیشرفت ثبات چربیها و روغنهای غنی از نظر اسیدهای چرب اشباع نشده، مورد توجه پژوهشگران است و در بین مردم نیز مقبولیت بیشتری می‌یابد. قسمتهای مختلف بسیاری از گیاهان حاوی روغنهای اسانسی یا روغنهای فرار بوده که یکی از مهمترین مواد موثر در گیاهان دارویی هستند. بسیاری از فرآورده‌های خام گیاهان دارویی به علت داشتن روغن فرار به طور مستقیم در پزشکی مصرف می‌شوند ولی در بیشتر موارد روغن‌های فرار را از مواد خام جدا نموده و به عنوان دارو به کار می‌برند. این مواد برخلاف بسیاری از داروها از پوست سالم نیز جذب می‌شوند. روغنهای فرار علاوه بر این از نظر اقتصادی نیز نقش بزرگی در داروسازی و صنعت ایفا می‌نمایند. درمان بیماریهای میکروبی (۳ و ۱) و غیر میکروبی (۴ و ۶) با عصاره‌های گیاهی مورد توجه و تحقیق بوده است. خواص ضد میکروبی روغنهای اسانسی از زمانهای قدیم شناخته شده و مطالعات زیادی روی گونه‌های مختلف گیاهی و تاثیر اسانس یا عصاره‌های آنها روی میکروارگانیسمها انجام شده است (۱۱ و ۷). می‌دانیم که روغنهای اسانسی بیشتر روی باکتریها و مخمرها موثرند (۱۴ و ۱۲). البته این بیان قارچها را مصون از تاثیر ضدمیکروبی روغنهای فرار نمی‌کند (۷ و ۱۵). Bastide و همکاران (۱۶) خواص ضدمیکروبی ترکیبات روغنهای فرار را روی *E.coil* و *S.aureus* مورد مطالعه قرار دادند. Chalchat و همکارانش (۱۷) گزارش کردند که فعالیت‌های ضد میکروبی روغنهای اسانسی حاصله از *Pinus sylvestris*، *Picea abies* و *Pseudotsuga menziesii* بر روی *E. coli* متغیر است. آنها همچنین فرایند گذشت زمان به طور طبیعی یا ساختگی را در افزایش تاثیر ضدمیکروبی موثر دانستند. Digrat و Bagci (۸) پس از مطالعه اثرات ضدمیکروبی انواع روغنهای اسانسی، آنها را به سه دسته بی‌تاثیر، کم تاثیر و بسیار موثر طبقه‌بندی نمودند. در مطالعه آنها *E. coli* کمترین تاثیرپذیری را داشت.

عفونتهای میکروبی تهدید جدی برای سلامتی، خصوصاً در افراد با بنیه ایمنی ضعیف بوده و لذا نیاز برای یافتن مواد ضد میکروبی ارزان و موثر را ایجاب می‌کند.

جدول شماره ۱- تأثیر ضد میکربی حلالهای مختلف بر روی باکتریهای *E. coli* و *S. aureus* با روش دیسک پلیت

نام باکتری	قطر هاله بر حسب میلی متر						
	شاهد	پنتان	اتر	استون	متانول	اتانول	بوتانول
E.coli	-	۲۲	-	-	-	-	۷
S.aureus	-	۷	-	-	-	-	۸

جدول شماره ۲- قطر هاله‌های عدم رشد بر حسب میلی‌متر در آزمایشات دیسک پلیت تأثیر رقتهای مختلف اسانسها بر *E. coli (E.c)* و *S. aureus (S.a)* در چهار مرحله زمانی مختلف پس از اسانس‌گیری

ردیف	نام گیاه و زمان مطالعه	۱/۱۶		۱/۸		۱/٤		۱/۲		۱	
		Sa	*Ec*	*Sa*	*Ec*	*Sa*	*Ec*	*Sa*	*Ec*	*Sa*	*Ec*
۱	اسانس نعناع تازه	۸	R	۱۲	R	۲۰	۸	۲۱	۹	۲۳	۱۲
	اسانس نعناع یک ماه پس از اسانس گیری	۸	R	۱۲	R	۱۸	۸	۲۰	۹	۲۲	۱۲
	اسانس نعناع دو ماه پس از اسانس گیری	۷	R	۱۰	R	۱۵	۷	۱۸	۸	۲۰	۱۱
	اسانس نعناع سه ماه پس از اسانس گیری		R	۱۰	R	۱۵	R	۱۷	۸	۱۹	۱۰
۲	اسانس گلپر تازه	R	R	R	R	R	R	۷	۷	۱٤	۱۰
	اسانس گلپر یک ماه پس از اسانس گیری	R	R	R	R	R	R	۷	۷	۱٤	۱۰
	اسانس گلپر دو ماه پس از اسانس گیری	R	R	R	R	R	R	R	R	۱۲	۹
	اسانس گلپر سه ماه پس از اسانس گیری	R	R	R	R	R	R	R	R	۱۱	۹

جدول شماره ۳- قطر هاله عدم رشد میکربی بر حسب میلی‌متر، حداقل غلظتهای مهارکنندگی (MIC) وکشندگی (MBC) اساسنهای تازه بر *E. coli (E.c)* و *S. aureus (S.a)* حاوی 10^7 میکروارگانیسم در هر میلی لیتر سوسپانسیون میکربی

نام گیاه	آزمایش	۱/۱۶		۱/۸		۱/٤		۱/۲		۱	
		Sa	*Ec*	*Sa*	*Ec*	*Sa*	*Ec*	*Sa*	*Ec*	*Sa*	*Ec*
نعناع	آنتی بیوگرام	۸	R	۱۲	R	۲۰	۸	۲۱	۹	۲۳	۱۲
	MIC	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	MBC	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
گلپر	آنتی بیوگرام	R	R	R	R	R	R	۷	۷	۱٤	۱۰
	MIC	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	MBC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ تاثیر گذاری
- عدم تاثیر
R مقاوم
اعداد قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی متر

هدف این مطالعه ارزیابی تاثیر ضدباکتریایی روغنهای فرار پونه‌وگلپر به عنوان گیاهان پرمصرف ایرانی می‌باشد.

مواد و روشها

دستگاهها

تقطیر کلونجر، وسایل آزمایشگاهی میکروبیولوژیکی، لامینارفلو، انکوباتور، کلنی کانتر و اسپکتروفتومتر (Spectronic -20)، گاز کروماتوگراف مدل Shimadzu-9A، گاز کروماتوگرافی کوپل با طیف‌سنج مدل Varian 3400، آسیاب برقی.

مواد

الکل اتیلیک، متانول، استن، پنتان نرمال، اتر و محیط‌های کشت میکروبی مانند مولر هینتون، نوترینت آگار، نوترینت برات. کلیه مواد مصرفی از کارخانه مرک آلمان می‌باشند.

سویه‌های میکروبی

E. coil ATCC No 25922
S. aureus ATCC No 25923

جمع‌آوری و خشک کردن گیاهان

گونه‌های مورد نظر پس از شناسایی دقیق در آزمایشگاه گیاهان دارویی موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع، جمع‌آوری شدند. اندام انتخابی برای اسانس‌گیری در سایه و یا توسط دستگاه خشک‌کن برقی در حرارت معمولی (۳۵-۳۰ درجه سانتیگراد) خشک گردید. پس از خشک شدن اندامهای گیاهی با آسیاب برقی پودر شدند.

نمونه‌های گیاهی

برگ پونه و گلپر جمع‌آوری و اسانس‌گیری شد.

روش تقطیر با بخار آب

اندام خشک شده را در مخزن مخصوص دستگاه تقطیر با بخار آب قرار داده توسط جریان بخار آب اسانس‌گیری شد.

نگهداری اسانسها

کلیه اسانسها بلافاصله پس از استخراج در آزمایشات اولیه به عنوان اسانس تازه مورد استفاده قرار گرفت و سپس در ویالهای سربسته ریخته با فویل آلومینیوم پوشانده شده در داخل یخچال نگهداری شدند و با گذشت یک، دو و سه ماه مجدداً مورد آزمایش قرار گرفتند.

جداسازی و شناسایی توسط GC و GC/MS

به منظور جداسازی و شناسایی ترکیبات موجود در اسانس، اسانس هر نمونه به دستگاه GC و GC/MS تزریق گردید. پس از تزریق اسانس به دستگاه GC و GC/MS و مشاهده طیف کروماتوگرام که حضور تعداد زیادی ترکیب را نشان می‌دهد، با استفاده از زمان بازداری (Rt) اندیس کواتس (KI)، طیف جرمی و مقایسه با ترکیبهای استاندارد موجود در کتابخانه اطلاعاتی کامپیوتری، شناسایی ترکیبات اسانس و تعیین درصد کمی در آنها انجام گردید (جدول ۴). قابل ذکر است که به منظور اطمینان از نتایج حاصله، شناسایی ترکیبات، توسط هر دو دستگاه انجام شده و تطبیق طیف‌های به دست آمده، صحت نتایج را ثابت نمود.

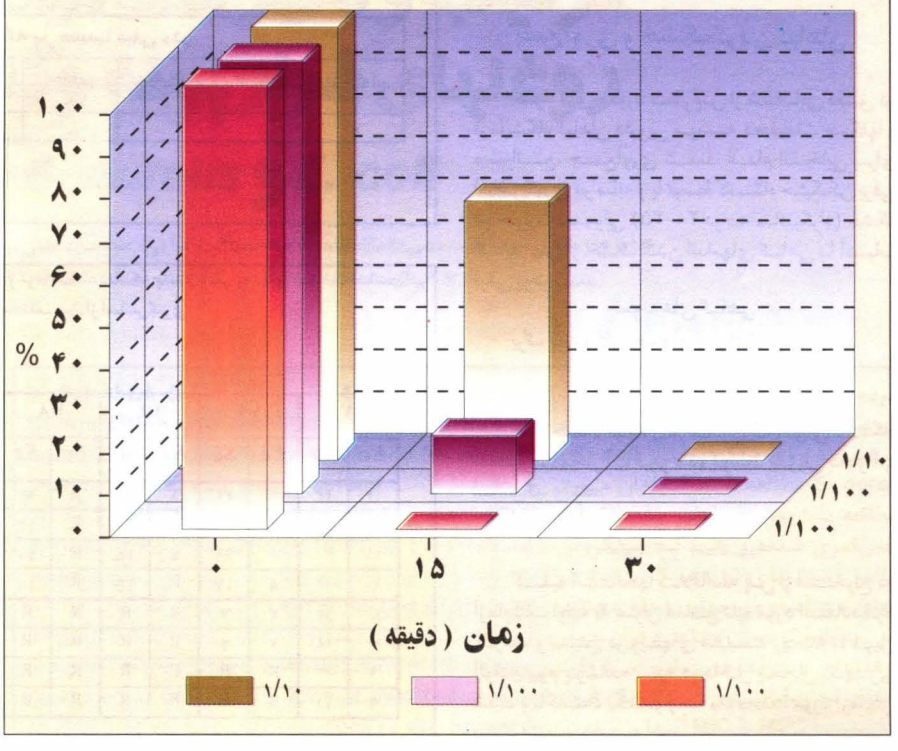
روشهای میکروبیولوژیکی

روشهای استاندارد از مراجع معتبر مورد استفاده قرار گرفتند و نتیجه ثبت شده هر کدام میانگین پنج بار آزمایش می‌باشد (۱۸ و ۱۹).

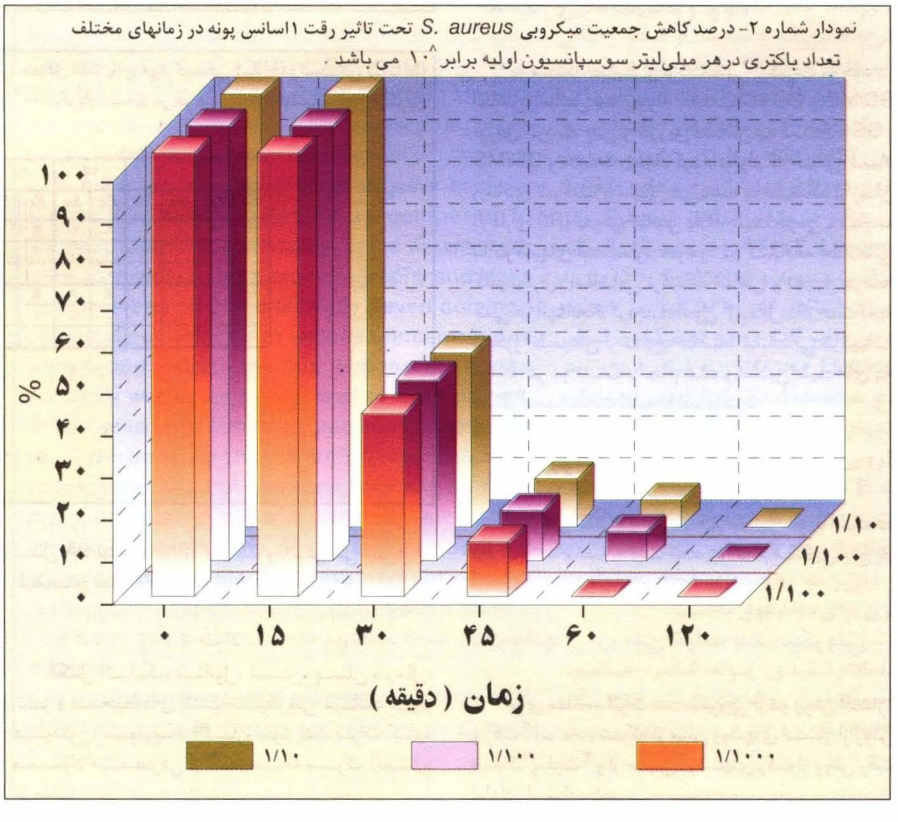
روشهای بررسی اثرات ضد میکروبی

برای مطالعه اثرات ضدمیکروبی از دو روش انتشار[1] و رقت[2] استفاده شد که از میان روشهای انتشار از روش دیسک پلیت[3] و از میان روشهای رقت از روش رقت لوله‌ای استفاده شد.

نمودار شماره ۱- درصد کاهش جمعیت میکروبی *E. coli* تحت تاثیر رقت ۱اسانس پونه در زمانهای مختلف
تعداد باکتری درهر میلی‌لیتر سوسپانسیون اولیه برابر 10^8 می باشد .



نمودار شماره ۲- درصد کاهش جمعیت میکروبی *S. aureus* تحت تاثیر رقت ۱اسانس پونه در زمانهای مختلف
تعداد باکتری درهر میلی‌لیتر سوسپانسیون اولیه برابر 10^8 می باشد .



در روش دیسک از کاغذ واتمن شماره ۱ که نوعی کاغذ صافی جاذب است دیسکهایی به قطر ۶ میلیمتر تهیه شد. از محیط کشت مولر هینتون آگار جهت این روش استفاده گردید که با روش استاندارد و به مقدار مناسب در پلیتها تهیه گردیده بود. غلظت سوسپانسیون میکروبی توسط دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین و بر همان اساس رقت‌های مختلف تهیه گردیدند. بعد از کشت میکروب مورد نظر به صورت چمنی در سطح پلیت حاوی محیط کشت مولرهینتون آگار دیسکهای استریل شده را توسط پنس استریل روی سطح پلیت آلوده میکروب قرار داده و بعد از تماس کامل با محیط کشت، با فاصله مناسب از یکدیگر و از لبه پلیت با میکروپیپت استریل مقدار مشخص اسانس گیاهی ($10\ \mu l$) گیاهی روی دیسکها ریخته شد.

بعد از انجام مراحل فوق پلیتها را در داخل انکوباتور و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده و بعد از ۱۸ تا ۲۴ ساعت، قطر مناطق عدم رشد توسط کولیس اندازه‌گیری شدند.

روش رقت لوله‌ای

این روش یکی از دقیق‌ترین روشها برای تعیین حساسیت باکتریها نسبت به مواد ضدمیکروبی به شمار می‌رود. با کمک این روش حداقل غلظت مهارکنندگی[4] و حداقل غلظت کشندگی ماده ضد میکروبی[5] تعیین می‌گردد. مقدار $50\ \mu l$ اسانس با رقتهای مشخص در ۵ ml سوسپانسیون میکروبی ریخته و پس از هم زدن در انکوباتور به مدت ۲۴-۱۸ ساعت قرار داده شد و سپس به وسیله اسپکتروفتومتر جمعیت میکروبی تعیین و در نتیجه MIC مشخص گردید سپس از هر کدام از لوله‌ها که رشد جمعیت نشان نداده بودند ۰/۱ml روی پلیت حاوی نوترینت آگار کشت داده شد تا MBC مشخص گردد.

آزمایش تاثیر حلالها بر میکرو ارگانیسمهای مورد مطالعه

حلالهای مختلف که در اسانس‌گیری یا رقیق‌سازی اسانسها مورد استفاده قرار می‌گیرند قبلاً در رقتهای مختلف تهیه و تاثیر آنها را روی میکروبهای مورد مطالعه با روشهای انتشار و رقت آزمایش شد.

تهیه رقتهای مختلف اسانسها

کلیه رقتها با حلالی که در آزمایشات تاثیر حلالها بر میکروارگانیسمها تاثیر باکتریسیدی یا باکتری استاتیکی نداشت (متانول) به نسبتهای ۱/۱۶، ۱/۸، ۱/۴، ۱/۲ و ۱ (خالص) تهیه شدند.

گروه شاهد

در کلیه مراحل آزمایشات از آب مقطر به عنوان شاهد مواد ضدمیکروبی استفاده شد.

مطالعه زمان باکتریسیدی اسانسها

پس از تعیین MBC رقتهای ۱/۱۰، ۱/۱۰۰،

جدول شماره ۴- ترکیبات شیمیایی اسانسها

No.	Heraclum persicum Compounds	%	No.	Mentha longifolia Compounds	%
1	β-caryophyllene	0.5	1	β-Caryophyllene	3.79
2	β-elemene	0.2	2	β-Elemene	0.77
3	α-Humulene	<0.2	3	α-Humulene	0.40
4	α-pinene	0.7	4	α-pinene	0.57
5	β-pinene	7	5	β-pinene	0.03
6	Limonene	1.5	6	Limonene	13.73
7	Myrcene	0.9	7	Myrcene	1.59
8	γ-Bisabolene	0.3	8	Cis-Piperitol	9.34
9	γ-Elemene	4	9	Germacrene B	0.79
10	α-Farnesene	2	10	Germacrene D	2.40
11	β-sesquiephllandrene	0.6	11	Isopiperitenone	0.95
12	α-Zingiberene	3.89	12	Linalool	0.05
13	Cis-β-Farnesene	<0.2	13	Menthol	0.13
14	Cis-Anethole	2.5	14	Menthone	0.28
15	Cis-Ocimene	2	15	Piepritone	43.96
16	Estragole	0.5	16	Piperitenone	2.94
17	Germacrene-D	0.8	17	Piperitenone oxide	0.31
18	Ionol	<0.2	18	Sabinene	0.53
19	γ-Terpinene	0.9	19	Terpinene-4-ol	0.05
20	O-Cymene	<0.2	20	Trans-Carveol	0.61
21	Trans-Ocimene	4.7	21	Trans-Piperitol	12.92
22	Terpinolene	2.5			
23	Trans-Anethole	61			
24	Unknown	2			

۱/۱۰۰۰ از سوسپانسیون‌های میکروبی محتوی 10^6 باکتری تهیه و مقدار $50\mu l$ اسانس در 5ml سوسپانسیون ریخته و در فواصل زمانی ۱۵، ۳۰، ۴۵، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه، مقدار $10\mu l$ از هر لوله برداشته پس از رقیق‌سازی به نسبت‌های ۱/۱۰، ۱/۱۰۰، ۱/۱۰۰۰ روی سطح محیط نوترینت آگار قرار داده با میله شیشه‌ای استریل به طور یکنواخت گسترده شدند. پلیتها را به مدت ۲۴ ساعت داخل انکوباتور گذاشته و سپس تعداد کلنی‌ها با کلنی کانتر شمارش شده با ضرب عکس رقت در تعداد کلنی‌ها تعداد باکتریهای زنده در هر میلی‌لیتر سوسپانسیون تعیین و در محاسبات نموداری به صورت درصد ثبت شد.

روش آماری

آنالیز واریانس دوطرفه برای مطالعات آماری مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج

نتایج درجداول ۸-۱ و نمودارهای ۱ و ۲ آمده است.

بحث و نتیجه گیری

در راستای ارزیابی تاثیر ضد باکتریایی روغنهای فرار، اسانس پونه و گلپر مورد مطالعه قرار گرفتند. چون لازمه تهیه رقتهای مختلف اسانسها استفاده از حلال می‌باشد ضروری است که تاثیر ضدمیکروبی حلال‌های مورد نظر، مطالعه، و از حلال‌هایی استفاده شود که خواص میکروبی در غلظتها یا رقتهای انتخابی را نشان ندهند. در این راستا پنتان نرمال و بوتانول تاثیر ضدمیکروبی در روش دیسک پلیت نشان دادند (جدول ۱) و از فهرست حلال‌های مورد استفاده حذف شدند جهت حصول اطمینان، تاثیر مهارکنندگی (MIC) و کشندگی (MBC) سایر حلال‌ها در غلظتهای مختلف مورد بررسی قرار گرفت و در غلظتهای انتخابی ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸، ۱ و ۲ درصد (حجم در حجم) تاثیر بر رشد میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه نداشتند.

اسانس اندام هوایی پونه و گلپر استخراج، و در ابتدا تاثیر ضدمیکروبی آنها با روش دیسک پلیت در رقتهای مختلف و در چهار مرحله زمانی متفاوت به صورت اسانس تازه و یک تا سه ماهه مطالعه شد. نتایج مطالعات اولیه (جدول ۲) تفاوت عمده‌ای را در تاثیر عمده‌ای را در تاثیر اسانسها نسبت به یکدیگر و نسبت به دو میکروارگانیسم *S. aureus* و *E.coil* نشان داد. همانگونه که Chalchat و همکاران (۱۷) با سایر روغنهای فرار گزارش کردند و در این مطالعه نیز تائید شد. فعالیتهای ضدمیکروبی روغنهای اسانسی بر روی *E. coil* متغیر است. آنالیز واریانس دو طرفه مبتنی بر اندازه قطر هاله‌های عدم رشد میکروبی نشان داد که گذشت زمان در اکثر موارد در قدرت ضدمیکروبی اسانسها، تاثیر دارد. از آنجایی که اندازه قطر هاله‌های عدم رشد دقیقاً نمی‌تواند بیانگر MIC یا MBC باشد، ایجاب می‌نماید که آزمایشات تعیین حداقل غلظت‌های مهارکنندگی (MIC) و کشندگی (MBC) با روغنهای اسانسی تازه در رقتهای مختلف انجام و بررسی شوند.

روغنهای فرار تازه در رقتهای مختلف در برابر سوسپانسیون باکتریال محتوی 10^6 میکروارگانیسم در میلی‌لیتر قرار گرفتند تا MBC و MIC آنها را تعیین نماییم (جدول ۳). بدین ترتیب اسانس‌های پونه و اسانس گلپر در رقت ۱ در خصوص هر دو میکروب به ترتیب تاثیر کشندگی و مهارکنندگی داشتند. آنالیز واریانس دو طرفه تاثیر رقت اسانسها را نیز تایید کرد. براساس اندازه قطر هاله‌ها در رقتها و زمانهای مختلف اسانس تازه رقیق نشده پونه با قطر ۱۲ میلی‌متری هاله ممانعت رشد در خصوص *E. coli* و قطر ۲۳ میلی‌متری در خصوص *S. aureus* تا یکماه پس از اسانس‌گیری خاصیت باکتریسیدال دارد. این اختلاف تاثیر روغنهای فرار بر عوامل بیماریزا نشان دهنده ترکیبات شیمیایی موثر متفاوت و خاص آنها نسبت به یکدیگری و نسبت به عوامل بیماریزا است. تجزیه و شناسایی ترکیبات اسانسهای پونه و گلپر (جدول ۴) نشان می‌دهد که هر دو اسانس در هفت ترکیب Myrcene، β-caryophyllene

جدول شماره ۵- حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) رقتهای مختلف اسانس تازه نعناع بر روی رقتهای مختلف سوسپانسیون محتوی 10^8 باکتری *E. coli* در میلی لیتر

رقتهای سوسپانسیون باکتریایی	MIC و MBC	رقتهای اسانس				
		۱	۱/۲	۱/٤	۱/۸	۱/۱۶
۱/۱۰	MIC	+	+	-	-	-
۱/۱۰	MBC	+	-	-	-	-
۱/۱۰۰	MIC	+	+	-	-	-
۱/۱۰۰	MBC	+	-	-	-	-
۱/۱۰۰۰	MIC	+	+	-	-	-
۱/۱۰۰۰	MBC	+	+	-	-	-

جدول شماره ۶- حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) رقتهای مختلف اسانس تازه نعناع بر روی رقتهای مختلف سوسپانسیون محتوی 10^8 باکتری *S. aureus* در میلی لیتر

رقتهای سوسپانسیون باکتریایی	MIC و MBC	رقتهای اسانس				
		۱	۱/۲	۱/٤	۱/۸	۱/۱۶
۱/۱۰	MIC	+	+	-	-	-
۱/۱۰	MBC	+	-	-	-	-
۱/۱۰۰	MIC	+	+	-	-	-
۱/۱۰۰	MBC	+	-	-	-	-
۱/۱۰۰۰	MIC	+	+	-	-	-
۱/۱۰۰۰	MBC	+	+	-	-	-

جدول شماره ۷- حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) رقتهای مختلف اسانس تازه گلپر بر روی رقتهای مختلف سوسپانسیون محتوی 10^8 باکتری *E. coli* در میلی لیتر

رقتهای سوسپانسیون باکتریایی	MIC و MBC	رقتهای اسانس				
		۱	۱/۲	۱/٤	۱/۸	۱/۱۶
۱/۱۰	MIC	+	-	-	-	-
۱/۱۰	MBC	-	-	-	-	-
۱/۱۰۰	MIC	+	-	-	-	-
۱/۱۰۰	MBC	-	-	-	-	-
۱/۱۰۰۰	MIC	+	-	-	-	-
۱/۱۰۰۰	MBC	+	-	-	-	-

β-pinene، Limonene، β-elemene، α-Humulene و α-pinene مشترک هستند (جدول ۴) که در میان آنها β- elemene و β-caryophyllene جزو ترکیبات سزکوئی‌ترپن و بقیه جزو مونوترپنها هستند. از میان این ترکیبات Limonene از اسانس پونه و β-pinene از اسانس گلپر به ترتیب با ۱۳/۷۳ و ۷ درصد بالاترین مقدار را در بین هفت ترکیب مشترک هر کدام از اسانسهای فوق دارا هستند. اگر فرض بر توانایی میکرب‌کشی هر یک از دو ترکیب بالا باشد احتمال تاثیر باکتریسیدی Limonene بیشتر است زیرا اسانس پونه خاصیت باکتریسیدی را از خود نشان داد. ترکیبات دیگری که در اسانس گلپر بیشتر بودند عبارتند از (۶۱٪) Trans-Anethole و (۴/۷ درصد) Trans-Ocimene. ترکیبات عمده اسانس پونه عبارتند از (۱۲/۹۲ رصد) Trans-Piperitone که می‌توان تاثیر آنها را بر *E.coli* و *S.aureus* در خصوص پونه و گلپر به ترتیب باکتریسیدال و باکتریوستاتیک محتمل دانست.

رقتهای مختلف از هر کدام از روغنهای فرار تازه در برابر سه رقت مختلف سوسپانسیون باکتریال قرار داده شدند تا درصد میکروبکشی آنها در زمانهای مختلف (نمودارهای ۱ و ۲) و MIC و MBC آنها بدست آید (جداول ۸-۵) در اکثر موارد رقت سوسپانسیون باکتریال (تعداد باکتری) در تاثیر ضد میکروبی روغنهای فرار موثر نبودند. اسانس پونه در رقت ۱/۲ قدرت کشندگی خود را در برابر رقت ۱/۱۰۰۰ سوسپانسیون باکتریایی نشان داد و در همین رقت قدرت مهارکنندگی کلیه رقتهای سوسپانسیون باکتریایی را دارا بود. مطالعه تاثیر ضد میکروبی روغنهای فرار گیاهان فوق، زمان تاثیرگذاری آنها در رقتهای بدست آمده بر سه رقت از 10^8 باکتری در هر میلی‌لیتر سوسپانسیون میکروبی نشان می‌دهد که از نظر زمانی تاثیر ضدمیکروبی اسانسها کوتاهتر بوده (نمودارهای ۱ و ۲) و هرچه تعداد باکتری کمتر باشد زمان میکرب‌کشی کوتاهتر است (جداول ۸-۵).

نتایج به دست آمده نشان می‌دهند که فعالیت ضد میکروبی روغنهای اسانسی در غلظت‌های مختلف متفاوت بوده و باکتری گرم منفی *E. coli* تاثیرپذیری بیشتری داشته است. Bagci و Digrak (۸) در مطالعه اسانس گونه‌های Abies (Fir) ترکیه *E.coli* را مقاوم گزارش کرده‌اند. نتایج نشان می‌دهند که روغنهای فرار به سه دسته غیرفعال، تقریباً فعال و بسیار فعال از نظر قابلیت ضدمیکروبی تقسیم می‌شوند. چنین تقسیم‌بندی در مطالعات Bagci و Digrak (۸) نیز مشاهده می‌شود. در این مطالعه اسانس پونه *E.coli* را آسانتر از *S.aureus* تحت تاثیر میکروب‌کشی خود قرار داد. مطالعات Roussis و همکارانش (۲۰) نیز تاثیرپذیری *E. coli* و مقاومت *S. aureus* را در برابر روغنهای‌اسانسی *Lamium garganicum* نشان داد. افزایش غلظت اسانسها تاثیر مستقیم بر قدرت ضدمیکروبی آنها دارد. بنابراین می‌توان عنوان کرد که یک ارتباط مستقیم بین غلظت و فعالیت ضدمیکروبی اسانسها علیه میکروارگانیسمهای مورد آزمایش وجود دارد. البته لازم به تاکید است که تعداد میکروارگانیسمها نیز تاثیر دارد بدین ترتیب که با افزایش تعداد

جدول شماره ۸- حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC و حداقل غلظت کشندگی MBC) رقتهای مختلف اسانس تازه گلپر بر روی رقتهای مختلف سوسپانسیون محتوی 10^8 باکتری *S. aureus* در میلی لیتر

رقتهای سوسپانسیون باکتریایی	MIC و MBC	رقتهای اسانس				
		۱	۱/۲	۱/٤	۱/۸	۱/۱۶
۱/۱۰	MIC	+	-	-	-	-
۱/۱۰	MBC	-	-	-	-	-
۱/۱۰۰	MIC	+	-	-	-	-
۱/۱۰۰	MBC	-	-	-	-	-
۱/۱۰۰۰	MIC	+	-	-	-	-
۱/۱۰۰۰	MBC	+	-	-	-	-

میکروارگانیسمها، زمان برای میکروب‌کشی بوسیله اسانسها نسبتاً طولانی‌تر می‌شود.

با عنایت به محدودیتهای روزافزون استفاده از مواد شیمیایی ضدمیکروب به نظر می‌رسد روغنهای فرار جایگزین بهتری برای مواد فوق در حفظ مواد خوراکی، کنترل بیماریهای انسانی و حیوانی باشند.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت و شورای پژوهشی دانشگاه شاهد که با تامین بودجه امکان عملی شدن این طرح را میسر ساختند اعلام می‌داریم. همچنین از زحمات کارشناسان آزمایشگاه بیولوژی آقایان محمد حبیبی و حسین اسمعیل‌زاده نامی و ماشین‌نویس محترمه سرکار خانم مریم رمضانی تشکر می‌نمائیم.

پاورقی‌ها

1- Diffusion test
2- Dilution test
3- Disc-plate method
4- Minimal Inhibitory Concetration
5- Minimal Bacteriricidal Concetration

منابع مورد استفاده

1- Scaglion F.; Lund B.; 1995. Efficacy in the treatment of common cold of a preparation containing an echinacea extract. International Journal of Immunotherapy. 11(4) : 163-166.

2- Dorn M., Knick E.; Lewith G.; 1997. Placebo controlled, double blind study of *Echinaceae pallidae* radix in upper respiratory tract infections. Complementary Therapies in Medicine. 5(1) 40-42.

3- Milhau G.; A. Valentin; F. Benoit; M. Mallie; Bastide; Y. Pelissier and J. Bessiere, 1997. In vitro antimicrobial activity of eight essential oils. J. Essent. Oil Res., 9: 329-333.

4- Chrubasik S.; Zimpfer C., Schutt U.; Ziegler R.; 1996. Effectiveness of *Harpagophytum procumbens* in treatment of acute low back pain. Phytomedicine 3(1): 1-10m.

5- Budeiri D.; Poalw I.S.; Dornan J.C.; 1986. Evening primrose oil of value in the treatment of premestrual syndrome. Controlled Clinical Trials. 17 (1): 60-68.

6- Neil H.; Silagy. C.A.; Lancaster T.; Hodgeman J.; Vos K.; Moore J.W.; Jones L.; Gahill J.; Fowler G.H.; 1996. Garlic powder in the treatment of moderate hyper-lipidaemia-a controlled trial and meta analysis. J.R. Coll. Phys. Lond 30(4): 329-334.

7- Sharma G.P.; N.K. Jain and B.D. Gray; 1977. Antifungal activity of some essential oils. J. Ind. Drugs, 78:21-23.

8- Eyup Bagci and Mentin Digrak, 1996. antimicrobial actvity of essential oils some Abies (Fir) species from Turkey Flav. Fragr. J.11: 251-256.

9- Benoit F.; A. Valentin; Y. Pelissier; C. Marion; Z. Dakuyo; M. Mallie and J. M. Bastide, 1993. Antimicrobial activity *in vitro* of *Cochlospermun linctorium* tubercle extracts Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 89; 217-218.

10- I.J. Udeinya, 1993. Antimicrobial activity of Nigerain neem leaves. Trans. Roy. Soc. Trop. MEd. Hyg. 87:471.

11- Tiziana Baratta M.; H.J. Damien Dorman; S.G. Deans; A. Cristina Figueiredo J.G.; Barroso and Giuseppe Ruberto, 1998. antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. Flavour and Fragr. J., 13:235-244.

12- Kivanc M. and A. Akgul; 1986. Antibacterial activities of essential oils from Turkish spices and citrus. Flavour Fragr. J. 1: 175-179.

13- M.S. James; 1973. modern food microbiology, Van Nostrand Reinhold New York.

14- M. Digrak and G. Bagci; 1996. Firat University of science and engineering 6:2, 1994 Cited: Eyup Bagci and Metin Digrak antimcrobial actvity of essential oil of some Abies (Fir) species from Turkey Flav. Fragr. J.11: 251-256.

15- Singh H.B. and A.K. Handique; 1997. Antifungal activity of the essential oil of *Hyptis suaveolens* and its efficacy in biocontrol measures in combination with *Trichoderma harzianum* J. essent. Oil Res., 9: 683-687.

16- Bastide P.; Malhuret: J.C. Chalchat; P.H. Garry and A. Michet; 1996. Plantes Medicinales et phytotherapie 21:209, 1987 Cited : Eyup Bagci and Metin Digrak antimicrobial actvity of essential oils of some Abies (Fir) species from Turkey Flav. Fragr. J.11: 251-256.

17- Chalchat J.C.; R. Ph. Garry; A. Michet, P. Bostide and R. Malhuret; 1996. Plantes medicinales et phytotherapie 21:218,1987 Cited: Eyup Bagci and Metin Gigrak antimicrobial actvity of essential oils of some Abies (Fir) species from Turkey Flav. Fragr. J. 11:251-256.

18- Walters N.J.; B.H. Estridge; A.P. Reynolds; 1996. Basic medical laboratory techniques, Delmar publishers Inc., III Ed. pp. 475-529.

19- Wistriech G.A.; 1997. Microbiology laboratory, Prentice Hall, pp. 319-325.

20- V. Roussis; 1996. Identification and bacteriostatic activity of the essential oil of *Lamium garganicum* L. SSP, *Laevigatum arcangeli* J.Essent. Oil Res., 8:291-293.