Archive of SID

مطالعه اثرات توأم مونولورین و اسانس‌های پونه (*Mentha pulegium* L.) و نعناع (*Mentha spicata* L.) روی *باسیلوس سرئوس* و *اشریشیاکولای* $O_{157}:H_7$ در شرایط آزمایشگاهی

مسلم نیریز نقدهی[1*]، سید مهدی رضوی روحانی[2]، گیتی کریم[3]، ودود رضویلر[3]، امیر زینالی[4]، رضا دلشاد[5]

۱. دانش‌آموخته بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران
۲. گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۳. گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران
٤. دانشجوی سال پنجم دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه، ارومیه، ایران
۵. کارشناس علوم آزمایشگاهی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه، ارومیه، ایران
* نویسنده مسئول مکاتبات: *mnn.uiau@yahoo.com*

(دریافت مقاله: ۸۸/۷/۱۸، پذیرش نهایی: ۸۹/۳/۸)

چکیده

مونولورین و اسانس‌های نعناع و پونه هر کدام دارای فعالیت‌های ضد باکتریایی مختلف روی اجرام میکروبی هستند. تشدید فعالیت ضد باکتریایی روی *باسیلوس سرئوس* ATCC ۱۱۷۷۸ و *اشریشیاکولای* $O_{157}:H_7$ و نیز پی بردن به اثرات توأم آنها از اهداف این تحقیق بودند. مواد و روش به‌کار رفته در این تحقیق مشتمل بر تهیه مونولورین، تهیه اسانس گیاهان مورد مطالعه و آنالیز ترکیب شیمیایی آنها با روش GC/MS، تهیه میزان تلقیح باکتریایی، انجام آزمایشات تعیین حساسیت ضد میکروبی به روش Broth micro dilution MIC testing و بالاخره تحلیل آماری نتایج با نرم افزار SPSS بودند. حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) اسانس پونه، اسانس نعناع، مونولورین، ترکیب مونولورین با اسانس پونه و ترکیب مونولورین با اسانس نعناع روی *باسیلوس سرئوس* و *اشریشیاکولای* $O_{157}:H_7$ معنی‌دار بودند ($p<0.01$). MIC ترکیب اسانس پونه با مونولورین و نیز ترکیب اسانس نعناع با مونولورین روی *باسیلوس سرئوس* در مقایسه با MIC اسانس‌های پونه و نعناع به‌صورت جداگانه معنی‌دار بودند ($p<0.01$). ترکیب مونولورین با اسانس نعناع اثر مهاری سینرژیستی روی *اشریشیاکولای* $O_{157}:H_7$ نشان داد. مؤثرترین عوامل ضد میکروب روی *باسیلوس سرئوس*، مونولورین، ترکیب مونولورین با اسانس پونه و ترکیب مونولورین با اسانس نعناع، و کم تأثیرترین عامل روی آن، اسانس نعناع بودند. همچنین مؤثرترین عامل ضد میکروب روی *اشریشیاکولای* $O_{157}:H_7$ اسانس پونه و کم تأثیرترین عامل روی آن، مونولورین بود. با توجه به این که MIC ترکیب مونولورین با اسانس پونه و نیز ترکیب آن با اسانس نعناع روی *اشریشیاکولای* $O_{157}:H_7$ در مقایسه با MIC مونولورین به‌صورت جداگانه معنی‌دار نبود، لذا برای تأثیر قابل توجه روی *اشریشیاکولای* $O_{157}:H_7$ و نیز سایر باکتری‌های گرم منفی، ترکیب مونولورین با عوامل شلاته کننده و نیز سایر عوامل ضد میکروب طبیعی پیشنهاد می‌گردد.

مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، ۱۳۸۸، دوره ۳، شماره ۴، ۶۶۶-۶۵۷.

کلمات کلیدی: مونولورین، اسانس پونه، اسانس نعناع، *اشریشاکولای* $O_{157}:H_7$، *باسیلوس سرئوس*

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

باسیلوس سرئوس در خاک و گیاهان گسترده بوده و بیش از ۴۰ سال است که به‌عنوان یکی از عوامل شناخته شده بیماری‌های حاصل از مواد غذایی محسوب می‌شود. *باسیلوس سرئوس* دو نوع مسمومیت یکی با علامت استفراغ و دیگری با نشانه اسهال ایجاد می‌کند که توسط دو نوع آنتروتوکسین تولید شده توسط این باکتری حاصل می‌شود (۱). *اشریشیاکولای* $O_{157}:H_7$ از سروتیپ‌های معروف گروه EHEC (Enterohaemorrhagic E. coli) بوده که عامل دو نوع بیماری کولیت خونریزی دهنده و سندرم HUS (Haemolytic Uraemic Syndrome) در انسان می‌باشد. حیوانات از جمله گاو و شاید طیور، گوسفند و خوک به‌عنوان مخزن *اشریشیاکولای* $O_{157}:H_7$ مطرح هستند (۱). همچنین *باسیلوس سرئوس* *واشریشیاکولای* علاوه بر بیماری‌زایی برای انسان، به‌عنوان عوامل فساد در شیر و فرآورده‌های آن نیز مطرح هستند (۱۷). مونولورین یک مونواستر متشکل از اسید لوریک بوده که دارای اثرات ضد ویروس و ضد باکتریائی می‌باشد (۱۰) علاوه بر این، گزارش شده است که تعدادی از قارچ‌ها، مخمرها و انگل‌های پروتوزوآیی نیز به‌وسیله مونولورین غیرفعال می‌گردند (۱۰) روغن نارگیل و برخی از محصولات نارگیل حاوی تقریبا ۵۰ درصد اسیدلوریک و تقریبا ۷-۶ درصد اسید کاپریک هستند (۱۰) اطلاعات واضح و مشخصی در ارتباط با اینکه واقعاً چه مقدار مونولورین در صورت مصرف اسیدلوریک در بدن انسان تولید می‌شود، وجود ندارد. با این وجود، مدارکی نیز موجود است که بیانگر تولید مقداری از آن در بدن انسان هستند (۱۰). اسید لوریک (C_{12}) در مقایسه با سایر اسیدهای چرب با زنجیره متوسط از جمله اسید کاپریلیک (C_8)، اسید کاپریک (C_{10}) یا اسید میریستیک (C_{14}) دارای اثرات ضد ویروس و ضد باکتری بیشتری می‌باشد (۱۰) از نظر بیولوژیکی، مونولورین در از بین بردن ویروس‌ها و باکتری‌ها چند برابر بیشتر از اسید لوریک فعال می‌باشد (۱۰) در حالت کلی، مونولورین بر علیه باکتری‌های گرم مثبت از جمله *استافیلوکوکوس آرئوس*، *استرپتوکوکوس آگالاکتیه*، *استرپتوکوکوس های* گروه A، B، F و G *ولیستریا مونوسایتوجنز* بسیار مؤثر بوده و در میان باکتری‌های گرم منفی، *هلیکوباکتر پیلوری* و *هموفیلوس آنفولانزا* به‌وسیله مونولورین غیرفعال شده و روی سایر باکتری‌های گرم منفی در صورت توأم شدن با عوامل شلاته کننده (Chelator) مؤثر می‌باشد (۱۰) مونولورین اثرات ویروس‌کشی و باکتری‌کشی خود را از طریق حل نمودن لیپیدها و فسفولیپیدهای موجود در پوشش پاتوژن‌ها اعمال می‌کند که در نهایت موجب گسیختگی پوشش آنها می‌گردد (۱۰) اسانس‌ها یا روغن‌های اساسی یا EOs (Essential oils) که روغن‌های اتری یا فرار هم نامیده می‌شوند، در واقع مایعات روغنی آروماتیک هستند که از گیاهان به‌دست می‌آیند. بیشترین مصرف EOs در اتحادیه اروپا در غذاها (به‌عنوان طعم دهنده)، عطرها و داروها می‌باشد. ترکیبات فنلی عمدتاً عامل خصوصیات ضدباکتریایی اسانس‌ها محسوب می‌گردند. تعدادی از ترکیبات EOs از جمله کارواکرول، تیمول، اوژنول، پریل آلدهید، سینام آلدهید و اسید سینامیک به‌عنوان ضد باکتری‌های مؤثر شناسایی شده‌اند (۴). مطالعات در شرایط آزمایشگاهی اثرات ضدباکتریایی اسانس‌ها را در *برابر لیستریا مونوسایتوجنز*، *سالمونلا تایفی موریوم*، *اشریشیاکولای* $O_{157}:H_7$، *شیگلا دیزانتریه*، *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس آرئوس* اثبات نموده است (۴). همچنین باکتری‌های گرم منفی اندکی کمتر از باکتری‌های گرم مثبت نسبت به اسانس‌ها حساس هستند (۴). یکی از معیارهایی که به‌وسیله بیشتر محققین جهت اندازه‌گیری فعالیت ضد باکتریایی عوامل ضد میکروب استفاده می‌گردد، اندازه‌گیری حداقل غلظت مهارکنندگی رشد یا MIC (Minimum inhibitory concentration) می‌باشد (۸). مطالعات متعددی در ارتباط با تعیین MIC عوامل ضد میکروب طبیعی

www.SID.ir

Archive of SID

از جمله نایسین، لیزوزیم، مونولورین، لاکتوفرین و اسانس گیاهان متعدد روی اجرام میکروبی انجام شده است. با توجه به این که عوامل ضد میکروب هر کدام دارای اثرات متفاوت روی میکروارگانیسم‌ها می‌باشند، لذا برای تشدید فعالیت، توأ م نمودن این عوامل با یکدیگر و نیز پی‌بردن به اثرات توأم آنها مدنظر محققین قرار گرفته است. تحقیق حاضر نیز با این هدف و برای اولین بار جهت پی بردن به اثرات توأم مونولورین و اسانس‌های پونه و نعناع در شرایط آزمایشگاهی انجام شد.

مواد و روش‌کار

۲-۱- تعیین میزان تلقیح باکتریایی:

ابتدا باکتری‌های مورد مطالعه که شامل *اشریشیاکولای* $O_{157}:H_7$ (اهدائی دکتر داریوش خاشابی، مؤسسه سلامت و ایمنی غذا، اتریش) و *باسیلوس سرئوس* ATCC ۱۱۷۷۸ بودند، از بخش میکروب‌شناسی مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه شدند. باکتری‌ها در آبگوشت مغذی خوندار و در شرایط یخچال نگهداری شده و در فواصل زمانی سه الی چهار هفته، برای حفظ فعالیت، تجدید کشت می‌شدند. برای بدست آوردن پرگنه‌های تک از سوسپانسیون باکتری‌ها، در محیط آگار مغذی کشت خطی داده شدند. در مرحله بعد، سه پرگنه تک، از هر کدام از باکتری‌ها برداشت نموده و در لوله‌های آزمایش محتوی ۵ میلی‌لیتر آبگوشت مغذی کشت داده شدند. پس از ۱۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در ۳۵ درجه سانتی‌گراد، جذب نوری (Optical densit y) کشت‌های باکتری‌ها، با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Apel PD-303S در طول موج ۶۰۰ نانومتر تعیین شدند. هم‌زمان جهت به‌دست آوردن تعداد تقریبی باکتری‌ها در کشت‌های ۱۸ ساعته، رقت‌های ۱۰ برابر تا 10^{-7} تهیه و به مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از رقت‌های 10^{-5} ، 10^{-6} و 10^{-7} به روش سطحی کشت داده شدند. پلیت‌ها در ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. سپس پلیت‌هایی که دارای ۲۵۰-۲۵ CFU (Colony forming units) بودند، جهت شمارش انتخاب شدند. تعداد تقریبی باکتری‌های *باسیلوس سرئوس* و *اشریشیاکولای* $O_{157}:H_7$ در آبگوشت ۱۸ ساعته به ترتیب 10^7 و 10^9 CFU/ml تعیین شدند. در مرحله بعد، از کشت‌های ۱۸ ساعته باکتری‌ها، مقادیر مختلفی به کووت‌های (Cuvette) حاوی یک میلی‌لیتر آبگوشت مغذی منتقل و با خواندن جذب نوری و انجام شمارش باکتریایی، کووت‌های حاوی 10^6 CFU/ml جهت تلقیح به چاهک‌ها انتخاب شدند.

۲-۲- آماده سازی مونولورین:

مونولورین از شرکت Med-Chem Laboratories آمریکا تهیه شد. برای تهیه محلول ذخیره مونولورین، ۰/۵ گرم از پلت‌های مونولورین به لوله آزمایش محتوی ۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درجه افزوده و با شیکر لوله به هم زده شد تا به‌طور کامل حل شود. سپس محلول مونولورین، با فیلتر سرنگی به قطر منافذ ۰/۴۵ میکرومتر سترون گشته و در یک لوله آزمایش سترون درپوش‌دار نگه‌داری شد به‌طوری‌که محلول ذخیره تهیه شده، محتوی ۱۰۰۰۰۰ میکروگرم مونولورین در هر میلی‌لیتر بود. با توجه به اینکه مونولورین روی باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی اثرات ضدمیکروبی بیشتری دارد، لذا در آزمایش روی *باسیلوس سرئوس* ابتداء رقت ۰/۱ از محلول ذخیره تهیه شد، سپس رقت‌های دو برابر (two fold) تا ۸ رقت، یعنی از ۱۰۰۰۰ تا ۷۸ µg/ml در لوله‌های آزمایش محتوی آبگوشت مغذی تهیه شدند. همچنین با توجه به اثرات ضد میکروبی کمتر مونولورین روی باکتری‌های گرم منفی، در آزمایش روی *اشریشیاکولای* $O_{157}:H_7$، از محلول ذخیره مونولورین، رقت‌های دو برابر تا ۷۸۰ µg/ml تهیه شدند (۱۵).

۲-۳- آماده سازی اسانس‌ها:

اسانس‌های مورد مطالعه که شامل اسانس‌های استاندارد پونه (*Mentha pulegium* L.) و نعناع (*Mentha spicata* L.) بودند، از شرکت باریج اسانس کاشان تهیه شدند. برای حل

www.SID.ir

Archive of SID

نمودن اسانس‌ها از محلول ۱۰ درصد دی متیل سولفوکساید یا DMSO (Dimethylsulfoxide) استفاده شد، به این صورت که ابتدا به میزان ۰/۱ گرم از اسانس‌های مورد مطالعه به لوله‌های آزمایش محتوی ۱ میلی‌لیتر از محلول ۱۰ درصد DMSO افزوده شد و با استفاده از شیکر لوله آزمایش تا ایجاد یک سوسپانسیون شیری رنگ تکان داده شدند. در مرحله بعدی محلول اسانس‌ها، با استفاده از فیلتر سرنگی با قطر منافذ ۰/۴۵ میکرومتر سترون و در یک لوله آزمایش درپوش‌دار سترون ریخته شدند. به‌طوری‌که هر کدام از محلول‌ها، محتوی ۱۰۰۰۰۰µg/ml یا ۱۰۰ mg/ml از اسانس‌های پونه و نعناع بودند. سپس از محلول‌های اسانس‌ها، رقت‌های دو برابر تا ۸ رقت یعنی از ۱۰۰۰۰۰ تا ۷۸۰ µg/ml در لوله‌های آزمایش محتوی آبگوشت مغذی تهیه شدند (۱۹).

۲-٤- آنالیز ترکیب‌های تشکیل دهنده اسانس‌ها:

ترکیبات تشکیل دهنده اسانس‌های گیاهان مورد مطالعه با همکاری پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی شناسایی شدند. اسانس‌های گیاهان مورد نظر پس از آماده سازی به دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی (GC/MS) تزریق گردیدند تا نوع ترکیب‌های تشکیل دهنده آنها مشخص شود. دستگاه گاز کروماتوگرافی استفاده شده از نوع Agilent مدل ۶۸۹۰ با ستون به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه ۰/۲۵ میکرومتر از نوع HP-5MS بود. برنامه دمایی ستون به این نحو تنظیم گردید: دمای ابتدائی آون ۵۰ درجه سانتی‌گراد و توقف در این دما به مدت ۵ دقیقه، گرادیان حرارتی ۳ درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه، افزایش دما تا ۲۴۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۵ درجه در هر دقیقه، افزایش دما تا ۳۰۰ درجه و ۳ دقیقه توقف در این دما، دمای اتاقک تزریق ۲۹۰ درجه سانتی‌گراد بود و از گاز هلیوم به عنوان گاز حامل با سرعت جریان (فلو) ۰/۸ میلی‌لیتر در دقیقه استفاده گردید. طیف‌نگار جرمی مورد استفاده از نوع Agilent مدل ۵۹۷۳ با ولتاژ یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت، روش یونیزاسیون EI و دمای منبع یونیزاسیون ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد بود. شناسایی طیف‌ها به کمک شاخص بازداری آنها و مقایسه آن با شاخص‌های موجود در کتب مرجع (۲) و مقالات (۱۱، ۱۸ و ۲۰) و با استفاده از طیف‌های جرمی ترکیبات استاندارد و استفاده از اطلاعات موجود در کتابخانه کامپیوتری صورت گرفت.

۲-۵- تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC):

ارزش MIC اسانس‌ها و مونولورین، هم به‌صورت جداگانه و هم به‌صورت توأم روی باکتری‌های مورد نظر مطالعه شدند. برای دستیابی به این هدف از روش Broth micro dilution MIC testing استفاده شد. در این روش از پانل پلی‌استیرن حاوی ۹۶ چاهک استفاده می‌گردد. در مطالعه حاضر نیز از میکروپلیت‌های استریل ۹۶ چاهکی ته پهن با حجم چاهک ۳۶۰ میکرولیتر استفاده گردید (۸).

۲-۵-۱- تعیین MIC مونولورین و اسانس‌های پونه و نعناع به‌صورت جداگانه روی *اشریشیاکولای* $O_{157}:H_7$ و *باسیلوس سرئوس*:

ابتدا به میزان ۱۶۰ میکرولیتر از آبگوشت مغذی، سپس به میزان ۲۰ میکرولیتر از غلظت‌های تهیه شده مونولورین و یا اسانس‌های پونه و نعناع و در نهایت به میزان ۲۰ میکرولیتر باکتری از کووت‌های حاوی تعداد تقریبی 10^6 CFU/ml به چاهک‌های میکروپلیت افزوده شدند. بدین ترتیب حجم محتویات در چاهک‌ها به ۲۰۰ میکرولیتر رسیده و با توجه به ایجاد رقت ۰/۱ در چاهک‌ها، غلظت مونولورین و اسانس‌ها در چاهک‌ها ۱۰ برابر رقیق شده و تعداد تقریبی باکتری‌ها هم در چاهک‌ها به 10^5 CFU/well خواهند رسید. برای کنترل مثبت (استریلیتی) ۲۰۰ میکرولیتر آبگوشت مغذی و برای کنترل منفی (رشد باکتری‌ها)، ۱۸۰ میکرولیتر آبگوشت مغذی همراه با ۲۰ میکرولیتر از تلقیح‌های باکتریایی به چاهک‌ها افزوده شدند. میکروپلیت‌ها پس از درپوش گذاری به مدت ۲۰ ثانیه در سرعت ۳۰۰ rpm در دستگاه ترموشیکر میکروپلیت تکان داده

www.SID.ir

Archive of SID

شده سپس به مدت ۲۴ ساعت در ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شدند. پس از ۲۴ ساعت، میکروپلیت‌ها از گرمخانه خارج شده و چاهک‌ها به‌صورت چشمی یا Visual از نظر ایجاد یا عدم ایجاد کدورت بررسی شدند. سپس برای تأیید، به میزان ۱۰ میکرولیتر از اولین چاهک شفاف، همراه با یک چاهک شفاف و کدر مجاور آن برداشت نموده و پس از رقت سازی، به‌صورت سطحی در آگار مغذی کشت داده شدند. MIC پایین‌ترین غلظت یک ماده ضد میکروب که موجب کاهش ۹۰ درصد یا بیشتر تلقیح اولیه گردد، تعریف گردید (۷). همچنین حداقل غلظت کشندگی یا MBC (Minimum bactericidal concentration) پایین‌ترین غلظت ماده ضد میکروب که موجب کاهش ۹۹/۹ درصد یا بیشتر تلقیح اولیه گردد، تعریف شد (۵ ،۶و ۷).

۲-۵-۲- تعیین MIC مونولورین و اسانس‌های پونه و نعناع به‌صورت توام روی *اشریشیاکولای* $O_{157}:H_7$ و *باسیلوس سرئوس* :

ابتدا به میزان ۱۴۰ میکرولیتر از آبگوشت مغذی، ۲۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف مونولورین و ۲۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف اسانس‌های پونه و نعناع ولی یکسان با غلظت مونولورین و در نهایت ۲۰ میکرولیتر باکتری از کووت‌های حاوی تعداد تقریبی 10^6 CFU/ml به چاهک‌های میکروپلیت ریخته شدند که در مجموع حجم چاهک‌ها به ۲۰۰ میکرولیتر خواهند رسید. کنترل‌های مثبت و منفی و همچنین سایر مراحل همانند تعیین MIC مونولورین و اسانس‌های پونه و نعناع به‌صورت جداگانه بودند.

۲-٦- تحلیل آماری نتایج:

آزمایشات در سه بار تکرار انجام و نتایج حاصل میانگین هر سه تکرار می‌باشد. تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نسخه ۱۵ برنامه آماری SPSS انجام شد. بررسی تأثیر انواع عوامل ضد میکروب روی *باسیلوس سرئوس* و *اشریشیاکولای* $O_{157}:H_7$ توسط آنالیز واریانس انجام شد. بررسی اختلاف شاخص‌ها هم توسط آزمون‌های توکی و دانکن در $p<0.05$ و $p<0.01$ انجام گرفتند.

نتایج

نتایج حاصل از آنالیز ترکیبات تشکیل دهنده اسانس‌های مورد مطالعه با استفاده از روش GC/MS در جدول ۱ همچنین مقایسه میانگین نتایج MIC مربوط به سه تکرار مونولورین و اسانس‌های پونه و نعناع به‌صورت جداگانه و توأم روی *باسیلوس سرئوس* و *اشریشیاکولای* $O_{157}:H_7$ در جداول ۲ آمده است.

جدول ۱- ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس‌های نعناع (*Mentha spicata* L.) و پونه (*Mentha pulegium* L.)

ردیف	نام ترکیب	اسانس نعناع (٪)	اسانس پونه (٪)	اندیس بازداری (RI)
۱	α-Thujene	۰/۰۴	-	۹۳۱
۲	α-Pinene	۱/۲۷	۰/۰۳	۹۳۹
۳	Camphene	-	۰/۷۶	۹۵۳
۴	Sabinene	۰/۶۲	۰/۰۴	۹۷۶
۵	β-Pinene	۲/۳۴	۰/۰۸	۹۸۰
۶	3-Octanone	۰/۰۳	-	۹۸۴
۷	β-Myrcene	۰/۸۸	۰/۰۳	۹۹۱
۸	3-Octanol	۰/۵۲	۰/۰۸	۹۹۳

www.SID.ir

Archive of SID

۹	3-Carene	۰/۰۷	-	۱۰۱۱
۱۰	α-Terpinene	۰/۰۷	-	۱۰۱۸
۱۱	*p*-Cymene	۰/۶۹	-	۱۰۲۶
۱۲	Limonene	۲۳/۸۸	-	۱۰۳۱
۱۳	Eucalyptol	-	۵/۰۱	۱۰۳۳
۱۴	*cis*-Ocimene	۰/۰۵	-	۱۰۴۰
۱۵	*trans*-Ocimene	۰/۱۹	-	۱۰۵۰
۱۶	γ-Terpinene	۰/۲۴	-	۱۰۶۲
۱۷	α-Terpinolene	۰/۱۳	-	۱۰۸۸
۱۸	Linalool	۰/۰۹	۰/۱۹	۱۰۹۸
۱۹	*trans*-Pinocarveol	-	۰/۰۴	۱۱۳۹
۲۰	*cis*-Sabinol	-	۰/۰۹	۱۱۴۰
۲۱	Isopulegol	۰/۱۵	-	۱۱۴۵
۲۲	Cis-β-Terpineol	۰/۱۵	-	۱۱۴۴
۲۳	Menthone	۱/۷۹	۳/۳۹	۱۱۵۴
۲۴	Borneol	-	۱/۶۸	۱۱۶۵
۲۵	Menthol	۳/۳۸	-	۱۱۷۳
۲۶	Terpinen-4-ol	۰/۳۹	۰/۵۴	۱۱۷۷
۲۷	α-Terpineol	۰/۲۱	۵/۵۲	۱۱۸۹
۲۸	*cis*-Dihydrocarvone	۰/۹	۰/۱۸	۱۱۹۳
۲۹	*trans*-Ddihydrocarvone	۰/۰۹	-	۱۲۰۰
۳۰	*trans*-Carveol	۰/۲۵	-	۱۲۱۷
۳۱	Pulegone	۰/۰۷	۲/۶۸	۱۲۳۷
۳۲	Carvone	۵۵/۸۷	۰/۸۹	۱۲۴۲
۳۳	Piperitone	-	۳۳/۶۰	۱۲۵۲
۳۴	Geraniol	۱/۱۷	-	۱۲۵۵
۳۵	*trans*-Anethole	-	۰/۰۳	۱۲۸۳
۳۶	Bornyl acetate	-	۰/۹۳	۱۲۸۵
۳۷	Thymol	۰/۱۳	۰/۲	۱۲۹۰
۳۸	Carvacrol	-	۰/۰۸	۱۲۹۸
۳۹	*trans*-Carvyl acetate	۰/۱۲	-	۱۳۳۷
۴۰	Pipeirtenone	۰/۰۵	۲۸/۷۱	۱۳۴۲
۴۱	*cis*-Carvone oxide	۰/۰۶	-	۱۳۶۳
۴۲	Piperitenone oxide	-	۳/۹۴	۱۳۶۹
۴۳	β-Elemene	۰/۰۵	-	۱۳۷۵
۴۴	Geranyl acetate	۰/۱۶	۰/۲۸	۱۳۸۳
۴۵	β-Bourbonene	۰/۶	-	۱۳۸۴

www.SID.ir

Archive of SID

۴۶	β-Cubebene	۰/۰۶	-	۱۳۹۰
۴۷	Cis-Jasmone	۰/۰۵	-	۱۳۹۴
۴۸	β-Caryophyllene	۰/۴۲	۰/۴۶	۱۴۱۸
۴۹	Geranyl acetone	-	۰/۱۷	۱۴۵۳
۵۰	β-Farnesene	۰/۱۳	-	۱۴۵۸
۵۱	Germacrene D	۰/۰۵	-	۱۴۸۰
۵۲	γ-Cadinene	-	۰/۰۶	۱۵۱۳
۵۳	Caryophyllene oxide	۰/۰۶	۰/۷۶	۱۵۸۱
۵۴	Viridiflorol	۰/۰۴	-	۱۵۹۰
	درصد کل ترکیبات شناسایی شده	۹۷/۱۹	۹۰/۵۱	

جدول ۲- مقایسه میانگین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) مربوط به سه تکرار مونولورین و اسانس‌های پونه و نعناع به‌صورت جداگانه و توأم (µg/ml)

میکروارگانیسم عوامل ضد میکروب	*باسیلوس سرئوس*	*اشریشیاکولای* $O_{157}:H_7$
مونولورین	^{a} ۲۶	^{c} >۱۰۰۰۰
اسانس پونه	^{b} ۵۰۰۰	^{a} ۴۱۶۶
اسانس نعناع	^{c} >۱۰۰۰۰	^{b} ۱۰۰۰۰
مونولورین + اسانس پونه	^{a} ۲۶	^{b} ۸۳۳۳
مونولورین + اسانس نعناع	^{a} ۳۱	^{ab} ۶۶۶۶

حروف مشترک نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار است.

بحث و نتیجه‌گیری

Hadjiakhoondi و همکاران در سال ۲۰۰۰ ترکیب شیمیایی اسانس نعناع (*Mentha spicata* L.) را با روش GC/MS تعیین نمودند. ۲۸ ترکیب که شامل ۹۰/۱۴ درصد از کل ترکیبات اسانس می‌شدند، شناسایی شدند. عمده ترکیبات تشکیل دهنده عبارت بودند از: کاروون (۲۲/۴۰ درصد)، لینالوول (۱۱/۲۵ درصد) و لیمونن (۱۰/۸۰ درصد). Mahboubi و Haghi در سال ۲۰۰۸ فعالیت ضد میکروبی و ترکیب شیمیایی اسانس پونه (*Mentha pulegium* L.) را با استفاده از روش GC/MS تعیین نمودند. عمده ترکیبات تشکیل دهنده عبارت بودند از: پیپریتون (۳۸ درصد)، پیپریتنون (۳۳ درصد)، آلفا ترپینئول (۴/۷ درصد) ۱،و ۸ سینئول (۴ درصد)، اکسید پیپریتون (۳/۴ درصد)، منتون (۳/۱ درصد)، بورنئول (۴/۹ درصد) و پولگون (۲/۳ درصد). Mohsenzadeh در سال ۲۰۰۷ اثر ضد باکتریایی غلظت‌های مختلف (۰/۰۱ تا ۱۵ درصد) اسانس‌های آویشن (*Thymus vulgaris*)، نعناع فلفلی (*Mentha piperita* L.)، زیره (*Carum carvi*)، رازیانه (*Foeniculum vulgar*)، پونه (*Mentha pulegium*) و ترخون (*Artmesia dracunculus*) را روی *استافیلوکوکوس آرئوس* و *اشریشیاکولای* در محیط آبگوشت مغذی مطالعه نمود. ارزش

www.SID.ir

Archive of SID

MIC اسانس‌های نعناع فلفلی، رازیانه، آویشن، پونه، زیره و ترخون روی *اشریشیا کولای* به‌ترتیب ۰/۰۳ ± ۰/۵، ۰/۰۳ ± ۱ ، ۰/۰۱ ± ۰/۳ ۰/۰۳ ± ۰/۷ ۰/۰۲ ± ۰/۶ و ۰/۱۳ ± ۲ درصد بودند.

Razavi-Rohani و Griffiths در سال ۱۹۹۴ فعالیت ضد باکتریایی مونولورین و تری گلیسرول ۱و۲ لورات را به‌صورت تنها و به‌صورت ترکیب با سه عامل شلاته کننده در pH های مختلف و غلظت‌های مختلف NaCl مطالعه نمودند. فعالیت این عوامل در برابر ۱۶ باکتری (۷ گرم مثبت و ۹ گرم منفی) به منظور تعیین MIC با استفاده از روش Spiral gradient end point مطالعه شد. مونولورین در برابر تمام باکتری‌های گرم مثبت مورد مطالعه مؤثر بود، ولی در برابر باکتری‌های گرم منفی فقط در حضور EDTA اثر کرد مهار باکتریایی در pH پائین و غلظت‌های بالای NaCl در بیشترین میزان بود. Razavi-Rohani و Griffiths در سال ۱۹۹۶ فعالیت ضد میکروبی ترکیبات لیزوزیم، مونولورین، تری گلیسرول ۱و۲ لورات و بوتیلیتد هیدروکسی آنیزول (Butylated hydroxylanizole) را در برابر ۷ باکتری گرم مثبت و ۸ باکتری گرم منفی در pH و غلظت‌های مختلف NaCl و EDTA با استفاده از روش Spiral gradient end point مطالعه نمودند. اثر مهاری لیزوزیم درحالت ترکیب با مونولورین روی باکتری‌های گرم مثبت اندکی بیشتر از باکتری‌های گرم منفی بود ولی اثر توأم آنها، به‌طور قابل توجهی بیشتر از اثر مونولورین به تنهایی نبود. در مورد باکتری‌های گرم مثبت، ترکیب مونولورین و BHA اثر مهاری بیشتری از اثر هر کدام به تنهایی داشتند. با این وجود، مونولورین اثرات ضد میکروبی BHA را در برابر باکتری‌های گرم منفی کاهش داد. Branen و Davidson در سال ۲۰۰۴ با استفاده از روش Microtiter plate اثر متقابل اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (Ethylenediaminetetraacetic acid) و لاکتوفرین را با نایسین، لیزوزیم و مونولورین در برابر *لیستریا مونوسایتوجنز*، *اشریشیاکولای*، *سالمونلا آنتریتیدیس* و *پزودوموناس فلورسنس* مطالعه نمودند. EDTA به‌صورت سینرژیست، فعالیت نایسین، مونولورین و لیزوزیم را در Tryptic soy broth روی دو سویه آنتروپاتوژن *اشریشیاکولای* تشدید نمود. علاوه بر این، ترکیبات مختلف نایسین، لیزوزیم و مونولورین با EDTA نسبت به بعضی از باکتری‌های گرم منفی کشنده بوده درحالی‌که هیچکدام از این مواد ضد میکروب به تنهایی در برابر این باکتری‌های گرم منفی باکتریسید نبودند.

Preuss و همکاران در سال ۲۰۰۵ اثرات مهاری و کشندگی اسانس پونه کوهی و چند اسانس دیگر را همراه با مونولورین به روش Macro-broth-dilution روی *استافیلوکوکوس آرئوس*، *باسیلوس آنتراسیس*، *اشریشیاکولای*، *کلبسیلا پنومونیه*، *هلیکوباکتر پیلوری* و *مایکوباکتریوم تره* (*Mycobacterium terrae*) مطالعه نمودند. اسانس پونه کوهی به غیر از *باسیلوس آنتراسیس* روی سایر ارگانیسم‌های مورد آزمایش دارای اثر کشندگی بود. مونولورین روی *استافیلوکوکوس آرئوس* و *مایکوباکتریوم تره* دارای اثر کشندگی بود ولی روی *اشریشیاکولای* و *کلبسیلا پنومونیه* فاقد اثر بود. در مقابل، *هلیکوباکتر پیلوری* نسبت به مونولورین بسیار حساس بود. همانند اسانس پونه کوهی، مونولورین هم روی *باسیلوس آنتراسیس* اثرات مهاری داشت.

در تحقیق حاضر در آنالیز GC/MS عمده ترکیبات تشکیل دهنده اسانس نعناع عبارت بودند از: کاروون (۵۵/۸۷ درصد) ، لیمونن (۲۳/۸۸ درصد)، منتول (۳/۳۸ درصد)، بتاپینن (۲/۳۴ درصد)، منتون (۱/۷۹ درصد)، آلفا پینن (۱/۲۷ درصد) و ژرانیول (۱/۱۷ درصد)، همچنین عمده ترکیبات تشکیل دهنده اسانس پونه عبارت بودند از: پیپریتنون (۳۳/۶۰ درصد) ، پیپریتون (۲۸/۷۱ درصد)، آلفا ترپینئول (۵/۵۲ درصد)، اکالیپتول (۵/۰۱ درصد) اکسید پیپریتنون (۳/۹۴ درصد)، منتون (۳/۳۹ درصد)، پولگون (۲/۶۸ درصد)، بورنئول (۱/۶۸ درصد) سایر ترکیبات تشکیل دهنده اسانس‌های نعناع و پونه که مقادیر آنها

www.SID.ir

Archive of SID

کمتر بودند در جدول شماره ۱ فهرست شده است. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که MIC اسانس پونه، اسانس نعناع، مونولورین، ترکیب مونولورین با اسانس پونه و ترکیب مونولورین با اسانس نعناع از لحاظ تأثیر روی *باسیلوس سرئوس* اختلاف معنی‌دار دارند ($p<0.01$). همچنین در آزمون دانکن گروه‌بندی حاصله به این صورت بود که گروه یک (کمترین MIC) شامل مونولورین، ترکیب مونولورین با اسانس پونه و ترکیب مونولورین با اسانس نعناع، گروه دو شامل اسانس پونه و گروه سه (بیشترین MIC) شامل اسانس نعناع می‌شدند. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که MIC اسانس پونه، اسانس نعناع، مونولورین، ترکیب مونولورین با اسانس پونه و ترکیب مونولورین با اسانس نعناع روی *اشریشیاکولای* $O_{157}:H_7$ اختلاف معنی‌دار دارند ($p<0.01$). همچنین در آزمون دانکن گروه‌بندی حاصله به این شکل بود که گروه یک (کمترین MIC) شامل اسانس پونه، ترکیب مونولورین با اسانس نعناع، گروه دو شامل ترکیب مونولورین با ااسانس نعناع، ترکیب مونولورین با اسانس پونه و اسانس نعناع، و گروه سه (بیشترین MIC) شامل مونولورین می‌شدند. علاوه بر این، در اثر ترکیب مونولورین با اسانس نعناع اثرات مهاری سینرژیستی روی *اشریشیاکولای* $O_{157}:H_7$ مشاهده شد.

مقایسه میانگین MIC عوامل ضد میکروب با آزمون توکی نشان داد که میانگین MIC ترکیب مونولورین با اسانس پونه و ترکیب مونولورین با اسانس نعناع روی *باسیلوس سرئوس* در مقایسه با میانگین MIC مونولورین به تنهایی معنی‌دار نمی‌باشد ($p>0.05$). همچنین میانگین MIC ترکیب اسانس پونه با مونولورین و ترکیب اسانس نعناع با مونولورین روی *باسیلوس سرئوس* به ترتیب در مقایسه با میانگین MIC اسانس پونه و اسانس نعناع به‌صورت جداگانه معنی‌دار بودند. از سوی دیگر نتایج آزمون توکی نشان داد که میانگین MIC ترکیب مونولورین با اسانس پونه و ترکیب مونولورین با اسانس نعناع روی *اشریشیاکولای* $O_{157}:H_7$ در مقایسه با میانگین MIC مونولورین به تنهایی معنی‌دار نمی‌باشد. همچنین میانگین MIC ترکیب اسانس پونه با مونولورین و ترکیب اسانس نعناع با مونولورین روی *اشریشیاکولای* $O_{157}:H_7$ به ترتیب در مقایسه با میانگین MIC اسانس پونه و اسانس نعناع به‌صورت جداگانه معنی‌دار نبودند.

بنابراین از تحقیق حاضر می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که مؤثرترین عوامل ضد میکروب روی *باسیلوس سرئوس*، مونولورین، ترکیب مونولورین با اسانس پونه و ترکیب مونولورین با اسانس نعناع بوده و کم تأثیرترین عامل روی آن، اسانس نعناع می‌باشد. همچنین می‌توان نتیجه گرفت که مؤثرترین عامل روی *اشریشیاکولای* $O_{157}:H_7$، اسانس پونه بوده و کم تأثیرترین عامل روی آن، مونولورین می‌باشد.

بنابراین یافته‌های تحقیق کنونی با نتایج Preuss و همکاران، همچنین Razavi-Rohani و Griffiths در بی‌تأثیر بودن مونولورین به تنهایی روی عمده باکتری‌های گرم منفی به‌خصوص *اشریشیاکولای* و *کلبسیلا* همخوانی دارد.

با توجه به اینکه MIC ترکیب مونولورین و اسانس‌های نعناع و پونه روی *اشریشیاکولای* $O_{157}:H_7$ در مقایسه با MIC استفاده جداگانه هر کدام معنی‌دار نبودند لذا برای تأثیر قابل توجه روی عمده باکتری‌های گرم منفی ترکیب مونولورین با عوامل شلاته کننده و همچنین سایر عوامل ضد میکروب طبیعی پیشنهاد می‌گردد.

تشکر و قدردانی

نویسنده مسئول وظیفه خود می‌داند از جناب آقای دکتر آخوندزاده، دکتر مرادی، مسئولین محترم شرکت باریج اسانس کاشان، مسئولین محترم پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی، جناب آقای مهربانی مسئول محترم بخش میکروب شناسی دانشکده دامپزشکی واحد علوم و تحقیقات تهران تشکر نماید.

www.SID.ir

Archive of SID

فهرست منابع

۱. رضویلر، و. (۱۳۸۷) میکروب‌های بیماری‌زا در مواد غذایی و اپیدمیولوژی مسمومیت‌های غذائی، چاپ اول، انتشارات دانشگاه تهران، صفحات: ۹۰-۸۴ و ۱۵۶-۱۵۳.

2. Adams, R.P. (1995): Identification of Essential Oils by Gas Chromatography/ Mass Spectroscopy. Allured Publ. Crop., Carol Stream, IL.
3. Branen, J.K. and Davidson, P.M. (2004): Enhancement of nisin, lysozyme, and monolaurin antimicro bial activities by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferin. International Journal of Food Microbiology, 90: 63-74.
4. Burt, S. (200 4): Essential oils: their antibacterial properties and potential application in foods-a review. International Journal of Food Microbiology, 94: 223-253.
5. Canillac, N. and Mourey, A. (2001): Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on Listeria, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. International Journal of Food Microbiology, 18: 261-268.
6. Carson, C.F., Hammer, K.A. and Riley, T.V. (1995): Broth microdilution method for determining the susceptibility of Escherichia coli and Staphylococcus aureus to the essential oil of Melaleuca alternifolia (tea tree oil). Microbios, 82: 181-185.
7. Cosentino S, Tuberoso CI, Pisano B, Satta M, Mascia V, Arzedi E, et al. (1999): In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. Letters in Applied Microbiology, 29: 130-135.
8. Coyle, M.B. (2005): Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing, American Society for Microbiology, pp: 53-62.
9. Hadjiakhoondi, A., Aghel, N., Zamanzadeh-Nadgar, N. and Vatandoost, H. (2000): Chemical and biological study of *Mentha spicata* L. essential oil from Iran. Journal of Daru, 8: 19-21.
10. Lieberman, S., Enig. M.G. and Preuss, H.G. (2006): A review of monolaurin and lauric acid: Natural virucidal and bactericidal agents. Alternative and Complementary Therapies, 12(6): 310-314.
11. Lorenzo, D. (200 2): Essential oils of *Mentha pulegium* and *Mentha rotundifolia* from Uruguay. Brazilia n Archives of Biology and Technology, 45(4): 519-524.
12. Mahboubi, M. and Haghi, G. (2008): Antimicrobial activity and che mical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. Journal of Ethnopharmacol., 119: 325-327.
13. Mohsenzadeh, M. (2007): Evaluation of antibacteria l activity of selected Iranian essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in nutrient broth medium. Pakistan Journal of Biological Sciences, 10(20): 3693-3697.
14. Preuss HG, Echard B, Enig M, Brook I, Elliott TB. (2005): Minimum inhibitory concentrations of herbal essential oils and monolaur in for gram-positive and gram-negative bacteria. Molecullar and Cellular Biochemistry, 272: 29-34.
15. Razavi-Rohani, S.M. and Griffits, M.W. (1994): The effect of mono and pol yglycerol laurate on spoilage and pathogenic bacteria associated with foods. Journal of Food Safety, 14: 131-151.
16. Razavi-Rohani, S.M. and Griffits, M.W. (1996): Inhibition of spoilage and pathogenic bacteria associated with foods by combinations of antimicrobial agents. Journal of Food Safety, 16: 87-104.
17. Robinson, R.K. (2002): Dairy microbiology handbook. 3rd ed., John Wiley and Sons, Inc., New York, pp: 103, 563.
18. Sacchetti, G. (2005): Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. Food Chemistry, 91: 621-632.
19. Sharififar, F. (2007): In vitro evaluation of antibacteria l and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic Zataria multiflora Boiss. Journal of Food Control., 18: 800-805.
20. Soković MD, Vukojević J, Marin PD, Brkić DD, Vajs V, van Griensven LJ. (2009): Chemical composition of essential oils of Thymus and Mentha species and their antifungal activities. Molecules, 14: 238-249.
21. Yesil Celiktas, O. (2007): Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. Journal of Food Chemistry, 100: 553-559.

www.SID.ir