نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۴، شماره ۱، نیمسال اول ۱۳۸۹، ص. ۱۱۵-۱۰۹
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Journal of Horticultural Science
Vol. ۲٤, No. ۱, Spring-Summer ۲۰۱۰, P. ۱۰۹-۱۱۵
ISSN: ۲۰۰۸ - ٤۷۳۰

بررسی خواص فیتوشیمیایی و ضد باکتریایی اسانس بومادران شیرازی *Achillea eriophora* DC. به روش میکرودایلوشن (ریز رقت)

فاطمه عروجعلیان[۱*]- روحا کسری کرمانشاهی[۲]

تاریخ دریافت: ۸۸/۱۲/۲
تاریخ پذیرش: ۸۹/۳/۵

چکیده

اسانس گیاه دارویی بومادران شیرازی (*Achillea eriophora*) به روش تقطیر با آب و با استفاده از دستگاه کلونجر استخراج گردید. اسانس بدست آمده با استفاده از دستگاه گاز کروماتوگرف (GC) و گاز کروماتوگراف متصل به طیف نگار جرمی (GC/MS) آنالیز شد و اجزاء آنها بر اساس شاخص بازداری و طیف جرمی تعیین گردید. سپس با استفاده از تکنیک میکرودایلوشن (ریز رقت) و با استفاده از دستگاه خواننده الایزا خاصیت ضد باکتریایی اسانس مورد نظر با تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) علیه برخی از باکتریهای آلوده کننده مواد غذایی مانند *Staphylococcus aureus*، *Bacillus cereus*، *Listeria monocytogenes*، *Escherichia coli* O۱۵۷H۷ و *Salmonella enteritidis* بررسی شد. نتایج این تحقیق نشان داد که میزان اسانس استخراج شده از این گونه بسیار بیشتر از بقیه گونه‌های جنس بومادران میباشد. نتایج حاصل از بررسی اجزای اسانس به روش GC-MS تعداد ۳۶ ترکیب را در اسانس این گونه از بومادران اثبات کرد که کامفور(۲۸/۶۵ درصد)، ۱و۸ سینئول (۲۶/۹۵درصد)، کامفن (۵/۹۸ درصد)، بتا پینن (۴/۸ درصد)، آلفا پینن (۴/۲ درصد) و بورنئول(۴ درصد) ترکیبات عمده موجود در آن را تشکیل می دادند. MIC اسانس این گونه علیه باکتریهای گرم مثبت بین۰/۱۵ تا ۰/۷۵ میلیگرم در میلی لیتر و علیه باکتریهای گرم منفی بین ۱/۵ تا ۳ میلیگرم در میلی لیتر بدست آمد. حساسترین پاتوژن با اسانس این گونه *S. aureus* و مقاومترین پاتوژن *Salmonella enteritidis* تشخیص داده شد.

واژه‌های کلیدی: اسانس، خواص ضد باکتریایی، بومادران شیرازی، تکنیک میکرو دایلئشن (ریز رقت)

مقدمه

اخیرا متابولیتهای ثانویه گیاهان دارویی مانند اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی از نظر اثرات ضد میکروبی‌شان مورد بررسی قرار گرفته‌اند (۲۱) و مشخص شده استکه اغلب اسانس‌های گیاهی استخراج شده از گیاهان دارویی دارای خواص ضد قارچی، ضد انگل، ضد باکتری و ضد ویروس می‌باشند (۱۱). بنابراین اسانس‌های گیاهی در زمینه‌های فارماکولوژیکی، داروشناسی گیاهی، میکروبیولوژی پزشکی و کلینیکی، فیتوپاتولوژی و نگهداری مواد غذایی، میوه ها و سبزیها شدیدا غربالگری شده و مورد استفاده قرار گرفته اند(۵). اسانس‌ها ترکیبات روغنی و معطر هستند که از اندام‌های مختلف گیاهان دارویی و معطر بدست آمده و بطور گسترده‌ایی به عنوان طعم دهنده غذا مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۱). از این مواد علاوه بر جلوگیری از رشد باکتریهای و کپکهای آلوده کننده مواد غذایی به منظور افزایش عمر نگهداری غذاهای فرآیند شده در سیستم غذایی و نیز افزایش عمر نگهداری میوه ها و سبزیها مورد استفاده قرار گرفته اند(۳ و۱۰). انتروتوکسینهای تولید شده توسط برخی از باکتریها مانند *E. coli*، *Staphylococcus aureus* و گونه‌های *Salmonella*، *Yersinia* و *Clostridium* مسوول مسمومیت دستگاه گوارش و بروز علایم گوارشی ناشی از آن می‌باشند. افزایش استفاده از آنتی بیوتیکها و یا عدم رعایت دوز توصیه شده توسط بیماران منجر به گسترش مقاومت باکتریایی به آنتی بیوتیک ها گردیده است(۱۲). این امر منجر به افزایش تمایل به توسعه ترکیبات جدید آنتی میکروبی موثرتر و بدون سمیت شده است.

بومادران شیرازی (*Achillea eriophora*) یکی از گیاهان

۱- کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه اصفهان
۲- استاد میکروبیولوژی دانشگاه الزهرا تهران
(*- نویسنده مسئول: (Email: oroojalian@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

دارویی جنس بومادران و جزء گیاهان اندمیک[۱] ایران به حساب می‌آید. بیشترین پراکنش این گیاه در استانهای جنوبی خصوصا" استان فارس گزارش شده و این گونه در مقایسه با سایر گونه های این جنس از میزان اسانس بالاتری برخوردار می باشد. به جز این گونه ۶ گونه دیگر از این جنس بومی ایران هستند و دیگر گونه ها علاوه بر ایران در عراق، آناتولی، سوریه، قفقاز، لبنان، فلسطین، روسیه مرکزی، ترکمنستان، آسیای جنوب غربی و مرکزی نیز رویش دارند (۱۴و۱۷) از قدیم الایام از این گیاه در طب سنتی به عنوان مسکن، بادشکن و در درمان دل درد استفاده می شده است (۹ و ۱۸).

از نظر گیاهشناسی، بومادران شیرازی گیاهی پایا، با کرکهای نمدی، سبز کمرنگ، پر ساقه و انبوه است. برگها دارای کرکهای پشمی متراکم و به هم خوابیده، ضخیم، کوتاه و گلها زرد رنگ، مجتمع در کپه های بسیار کوچک هستند که در اردیبهشت تا خرداد بر روی بوته ها ظاهر می‌شوند (۱۴و۱۷).

بررسی منابع حاکی از این است که مطالعات کمی در مورد این گونه از بومادران صورت گرفته است. رحیم مالک و همکاران (۱۶) با مقایسه ۶ گونه از بومادران از جمله گونه *eriophora* جمع‌آوری شده از مازندران نشان دادند که ۴ کموتایپ از این جنس وجود دارد و گونه *eriophora* به کموتایپ Germacrene-D , borneol , bornyl acetate تعلق دارد. آنها میزان اسانس این گونه را ۰/۲ درصد گزارش نمودند و تعداد ۲۵ ترکیب را در آن تشخیص دادند. قاسمی و همکاران (۲۰۰۸) با مقایسه خواص ضد باکتریایی عصاره و اسانس این گونه از بومادران نشان دادند که خاصیت بازدارندگی اسانس این گیاه بسیار بیشتر از عصاره آن است بطوریکه میزان ۸ میکرولیتر از اسانس در هر دیسک کلیه پاتوژنهای مورد بررسی را کاملا کنترل نمود در حالی که ۸۴ میکرو گرم عصاره اتانولی در هر دیسک نتوانست هیچکدام از این پاتوژنها را کنترل نماید. آنها حساسترین پاتوژن را به اسانس این گیاه *Staphylococcus aureus* گزارش نمودند. آنها همچنین با بررسی اجزاء اسانس، تعداد ۳۲ ترکیب را در اسانس این گونه اثبات کردند. ویرستال [۲] و همکاران (۲۳) ۹۰ ترکیب را در اسانس بومادران شیرازی در منطقه باجگاه شیراز را شناسایی کردند. جایمند و همکاران (۹) اجزاء اسانس نمونه برگ و گل این گونه از بومادران را که با روشهای مختلف اسانس گیری (تقطیر با آب و تقطیر با بخار)شده بود مورد مطالعه قرار دادند. صابرآملی و همکاران (۱۸) ترکیبات موجود در اسانس این گونه از بومادران که از کرمان جمع‌آوری شده بود را مورد شناسایی قرار دادند. با این وجود تاکنون اطلاعاتی در مورد خواص ضد باکتریایی اسانس این گونه از بومادران در منابع داخلی و خارجی منتشر نشده است. در تحقیقی که توسط سکمن و همکاران صورت گرفت خاصیت ضدمیکروبی اسانس و عصاره ها ی آبی و متانولی گونه *sintenisii* با هم مقایسه شد. این تحقیق بر روی ۱۲ سویه باکتریایی و ۲ مخمرکاندیدا آلبیکنس و کاندیدا کروزی انجا م گرفت. در پژوهش مذکور هیچ فعالیت ضدمیکروبی در عصاره آبی مشاهده نشد در حالیکه عصاره الکلی و اسانس این گونه از بومادران دارای میزان قابل قبولی از خاصیت ضدمیکروبی بودند. در این پژوهش اسانس دارای خاصیت ضد میکروبی قویتری نسبت به عصاره الکلی بود. آنالیز GC-MS اسانس ۳۲ ترکیب (۹۰ درصد اسانس را تشکیل می داد) را شناسایی کردکه کامفور و اوکالیپتول دارای تاثیر مهاری قابل توجهی بر روی کاندیداآلبیکنس وکلستریدیوم پرفرنجنس بودند و بورنئول و پیپریتون نیز بیانگر فعالیت مهارکنندگی قابل توجه بودند.

با توجه به اهمیت گیاهان دارویی بومی هر منطقه و همچنین با در نظر گرفتن بروز مقاومتهای باکتریایی، در این تحقیق خواص ضد باکتریایی بومادران شیرازی به روش میکرودایلوشن مورد بررسی قرار گرفت. باکتری‌های مورد بررسی شامل *Staphylococcus aureus* ، *Escherichia coli* O۱۵۷:H۷ ، *Bacillus cereus* ، *Salmonella enteritidis* و*Listeria monocytogenes* بودند.

مواد و روش ها

تهیه نژادهای باکتریایی

استافیلوکوکوس ارئوس(ATCC ۲۵۹۲۳)، باسیلوس سرئوس , (ATCC ۱۱۷۷۸) لیستریا منوسایتوژنز (ATCC ۱۹۱۱۲) ، اشیرشیا کولی O۱۵۷H۷ (ATTC ۷۰۰۷۲۸) و سالمونلا انتریتیدیس (RITCC ۱۶۲۴) که از استوک گلیسیرول ۱۵ درصد در دمای ۸۵- درجه سانتیگراد خارج و در محیط مایع تریپتیکاز سویا (Merck, Darmstadt, Germany)، در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد احیا شدند. پس از آن باکتریها در محیط تریپتیکاز سویا آگار (Merck, Darmstadt, Germany) برای اثبات خلوص کلنی‌ها کشت شدند.

نمونه گیاهی

پیکر رویشی بومادران شیرازی *Achillea eriophora* در مرحله گلدهی کامل در اواسط تیرماه تهیه و در شرایط سایه و دمای ۲۵ درجه سانتیگراد خشک گردید. پس از خشک شدن جهت استخراج اسانس آماده سازی گردید.

استخراج اسانس

پس از خشک شدن نمونه ها، پیکر رویشی همراه با گل به روش تقطیر با آب، توسط دستگاه کلونجر(Clevenger) با استفاده از ۳ نمونه ۵۰ گرمی و ۳ ساعت بعد از جوش آمدن برای هر نمونه

۱- Endemic

۲- Weyerstahl

Archive of SID

www.SID.ir

اسانس‌گیری شد و بازده اسانس بر اساس وزن خشک نمونه محاسبه گردید. پس از آبگیری، اسانس تا زمان تزریق به دستگاه گاز کروماتوگرافی در یخچال (دمای ۴ درجه سانتیگراد) نگهداری شد (۲و ۹).

مشخصات دستگاه گازکروماتوگرافی- اسپکترومتری جرمی

به منظور شناسایی ترکیب ها، اسانس‌های به دست آمده به دستگاههای گازکروماتوگراف مویی (GC) و گاز کروماتوگراف متصل به طیف نگار جرمی (GC/MS) با مشخصات زیر تزریق گردیدند:

گاز کروماتوگراف مدل Varian Star ۳۴۰۰cx مجهز به ستون‌های موئینه DB۵ با قطر داخلی ستون ۰/۲۵ میلی متر، ضخامت فیلم ۰/۲۵ میکرومتر و طول ستون ۳۰ متر، گازحامل هلیوم با سرعت ۲ میلی متر در دقیقه.

در هر مورد پس از تزریق مقادیر بسیار جزئی اسانس، کروماتوگرام حاصله و طیفهای جرمی ترکیبات مختلف موجود در آن بررسی شد. شناسایی طیفها به کمک بانک اطلاعات جرمی، زمان بازداری، محاسبه اندیس کواتس، مطالعه طیفهای جرمی هر یک از اجزاء اسانس و بررسی الگوهای شکست آنها، مقایسه با طیف های استاندارد و استفاده از منابع معتبر صورت گرفت. همچنین با توجه به سطح زیر منحنی هر یک از پیک های کروماتوگرام GC و مقایسه آن با سطح کل زیر منحنی، درصد نسبی هر یک از اجزاء متشکله اسانس تعیین شد (۱و۱۳).

تعیین خاصیت آنتی باکتریایی

سنجش حداقل غلظت بازدارندگی[۱] (MIC) با استفاده از متد میکرودایلوشن[۲]

مقادیر حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) بر اساس مقالات منتشر شده تعیین گردید(۶، ۱۵و ۱۹). برای این منظور از نژادهای باکتریهای پاتوژن یاد شده یک کشت ۱۸-۲۴ ساعته(کشت شبانه) در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و در محیط مولر هینتون براث (MHB, Oxoid) تهیه شد. محلولهای استوک از اسانسها و مواد استاندارد ضد میکروب که در این آزمایش آنتی بیوتیک کلرامفنیکل و اسید آلی آسکوربیک اسید بودند در DMSO[۳] تهیه شدند.

سریالهای رقت با استفاده از محیط کشت مولر هینتون براث از ۱۰ میلیگرم در میلی لیتر تا ۰/۱ میلیگرم در میلی لیتر تهیه شدند و ۷۰ میکرو لیتر از آنها به میکروتیترپلیتهای ۹۶ خانه‌ایی که قبلا حاوی ۷۰ میکرو لیتر محیط کشت MHB بودند اضافه گردید. سپس ۷۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون باکتریایی معادل استاندارد ۰/۵ مک فارلند که حاوی 10^8 باکتری در هر میلی لیتر[۴] بود، به میکروتیترپلیتها اضافه شد(شکل ۱). در مجموع این آزمایش با حجم۲۱۰ میکرولیتر در هر چاهک انجام شد. آزمایشات مشابه برای کنترل مثبت (شامل MHB، DMSO و باکتری تحت تیمار) و کنترل استریلیتی یا کنترل منفی(شامل MHB، DMSO و اسانس مورد آزمایش) بود. نمونه ها به مدت ۲۲-۲۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در گرمخانه نگهداری شدند. اولین چاهک بدون کدورت به عنوان حداقل غلظت بازدارنده (MIC) ، به صورت mg/ml گزارش شد.

تمام آزمایشات حداقل برای سه با تکرار گردید و میانگین داده‌های بدست آمده، به عنوان نتایج MIC و MBC ارائه گردید (جدول ۲).

سنجش میزان حداقل غلظت کشندگی[۵] (MBC)

حداقل غلظت کشندگی (MBC) اسانسها با توجه به نتایج MIC تعیین شد. میزان ۵ میکرولیتر از چاهک هایی که رشد باکتری در آنها کاملا متوقف شده بود، به پلیت‌های حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار منتقل شد و به مدت ۲۲-۲۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در گرمخانه نگهداری شدند. غلظتهایی که فاقد رشد باکتری بودند، به عنوان مقادیر MBC گزارش شدند(۴).

نتایج

نتایج حاصل از بررسی میزان و اجزای اسانس

در این تحقیق میزان اسانس نمونه ها به روش تقطیر با آب بر اساس وزن خشک نمونه ۲/۲ درصد به دست آمد. اسانس بدست آمده دارای رنگ زرد شفاف (متمایل به سبز) بود. نتایج این تحقیق نشان داد که میزان اسانس استخراج شده از این گونه بسیار بیشتر از بقیه گونه‌های جنس بومادران می باشد و بنابراین از نظر کاربرد اقتصادی تر خواهد بود. نتایج حاصل از بررسی اجزای اسانس به روش GC-MS تعداد ۳۶ ترکیب را در اسانس این گونه از بومادران اثبات کرد که مهمترین ترکیبات شناسایی شده به همراه درصد و شاخص کواتس آنها در جدول شماره ۱ آورده شده است. از بین ترکیبات شناسایی شده، کامفور(۲۸/۶۵ درصد)، ۱و۸ سینئول (۲۶/۹۵درصد)، کامفن (۵/۹۸ درصد)، بتا پینن (۴/۸ درصد)، آلفا پینن (۴/۲ درصد) و بورنئول(۴ درصد) ترکیبات عمده موجود در آن را تشکیل می دادند. ترکیبات منتا-۲و۴(۸)-دی ان پارا، ایزو پنتیل ایزو والرات، کارون و لانسئول سیس نیز به میزان بسیار جزیی در اسانس این گونه

۱- Minimum Inhibition Concentration
۲- Micro-dilution assay
۳- Dimethyle sulfoxide

۴ - 10^8 colony forming units (cfu/ml) (according to Mc Farland turbidity standards)
۵ - Minimum Bactericidal Concentration

Archive of SID

www.SID.ir

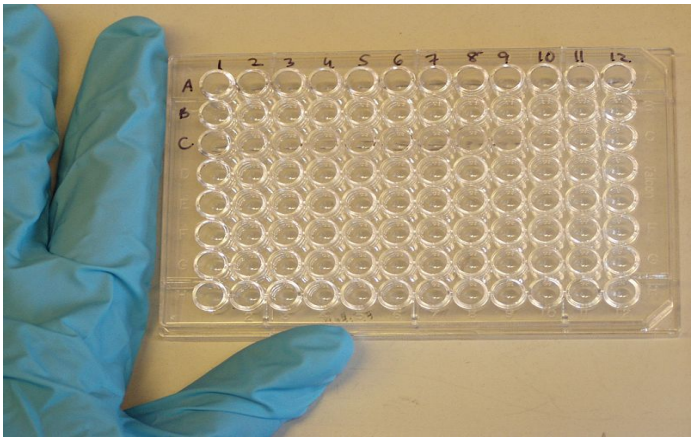
تشخیص داده شدند. غنی و همکاران (۷) نیز اجزای اصلی اسانس این گونه کشت شده در ایران را کامفور، ۱و۸ سینئول و کامفن گزارش نمودند. مقایسه نتایج این تحقیق با نتایج محققین دیگر نشان داد که اگرچه مقادیر اجزای مهم اسانس با توجه به مناطق مختلف تغییر میکند ولی در این گونه ترکیبان مهم موجود در اسانس ثابت است.

جدول ۱- مهمترین اجزاء اسانس بومادران شیرازی (*Achillea eriophora*) به روش GC/MS

ردیف	ترکیبات	مقادیر نسبی اجزای اسانس(درصد)	شاخص بازداری
۱	α-pinene	۴/۲	۹۳۷
۲	Camphene	۵/۹۸	۹۵۱
۳	Sabinene	۲/۶۲	۹۷۳
۴	β-Pinene	۴/۸	۹۷۷
۵	Myrcene	۰/۵۹	۹۸۸
۶	α-Terpinen	۰/۴۴	۱۰۱۴
۷	ρ-Cymene	۰/۵۵	۱۰۲۲
۸	۱،۸ cineole	۲۶/۹۵	۱۰۳۲
۹	γ-Terpinen	۰/۷۴	۱۰۵۸
۱۰	Camphenone ۶	۰/۳۵	۱۰۹۸
۱۱	Linalool	۰/۵۱	۱۰۹۹
۱۲	Camphor	۲۸/۶۵	۱۱۴۶
۱۳	Pinocarvone	۱/۳۳	۱۱۶۰
۱۴	Borneole	۴	۱۱۶۵
۱۵	Pinocamphone cis	۰/۲۴	۱۱۷۱
۱۶	Terpinen-۴-ol	۱/۹	۱۱۷۵
۱۷	Pinocarveol cis	۰/۴	۱۱۸۵
۱۸	α-Terpineol	۲/۵۴	۱۱۸۸
۱۹	Myrtenal	۱/۳۶	۱۱۹۲
۲۰	Myrtenole	۱/۴۳	۱۱۹۳
۲۱	Carveol trans	۰/۳۱	۱۲۱۵
۲۲	Sabinene hydrate acetate cis	۰/۴۸	۱۲۲۴
۲۳	Isobornil acetate	۲/۴۸	۱۲۸۲
۲۴	Thymol acetate	۰/۵۱	۱۳۵۲
۲۵	Jasmone trans	۰/۶۵	۱۳۹۱
۲۶	Methyl Eugenole	۱/۵	۱۳۹۹
۲۷	Caryophyllen Z	۰/۲۴	۱۴۱۱
۸	Germacrene B	۰/۴۴	۱۵۶۵
۲۹	Spathulenol	۰/۹۲	۱۵۷۲
۳۰	(E) nerolidol acetate	۰/۴۸	۱۷۲۰
۳۱	(E,E) Farnesol	۱/۳۳	۱۷۲۴
۳۲	(E)-β-Santalol	۰/۷۴	۱۷۳۹
	درصد اسانس(v/v)	۲/۲۵	-

Archive of SID

www.SID.ir



شکل۱- تصویر یک میکروتیتر پلیت ۹۶ خانه ای مورد استفاده در تکنیک میکرودایلوشن

نتایج حاصل از سنجش میزان حداقل غلظت بازدارندگی و غلظت کشندگی

نتایج حاصل از بررسی حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی اسانس این گونه از بومادران بر روی پاتوژنهای مورد بررسی به همراه خواص آنتی باکتریال دو ماده استاندارد کلرامفنیکل و اسید آسکوربیک در جدول شماره ۲ آورده شده است. این نتایج نشان میدهند که کمترین MIC علیه پاتوژنهای مورد بررسی برابر ۰/۱۵ میلیگرم به ازای هر میلی لیتر بود و علیه*S. aureus* که یک باکتری گرم مثبت است مشاهده شد. به بیان دیگر حساسترین پاتوژن در بین پاتوژنهای مورد بررسی *S. aureus* بود. MBC اسانس بومادران شیرازی علیه این پاتوژن دو برابر MIC آن (معادل ۰/۳ میلیگرم به ازای هر میلی لیتر) بدست آمد. این در حالی بود که بیشترین MIC در این تحقیق برابر ۳ میلیگرم به ازای هر میلی لیتر بوده و این MIC علیه *S. enteritidis* که یک باکتری گرم منفی است مشاهده شد. بنابراین مقاومترین پاتوژن به اسانس این گونه از بومادران *S. enteritidis* بود.MBC اسانس بومادران علیه *S. enteritidis* برابر MIC آن و همچنین برابر MIC اسید آسکوربیک بود.

MIC اسانس بومادران علیه باکتری گرم منفی *E. coli* O۱۵۷:H۷ برابر ۱/۵ میلیگرم به ازای هر میلی لیتر محاسبه شد و مقاومت*E. coli* O۱۵۷:H۷ در رتبه بعدی پس از *S. enteritidis* قرار داشت. MBC اسانس بومادران علیه این پاتوژن دو برابر MICآن یعنی معادل ۳ میلیگرم به ازای هر میلی لیتر بود. نکته قابل توجه در مورد *E. coli* O۱۵۷:H۷ این بود که MIC کلرامفنیکل علیه این پاتوژن برابر۰/۱۸میلیگرم به ازای هر میلی لیتر به دست آمد و اختلاف قابل توجهی با MIC اسانس بومادران علیه این پاتوژن داشت. در این تحقیق MIC کلرامفنیکل علیه هر دو باکتری گرم منفی *S. enteritidis* و *E. coli* O۱۵۷:H۷ برابر یکدیگر و معادل ۰/۱۸ میلیگرم در میلی لیتر بدست آمد.

MIC اسانس بومادران علیه باکتری گرم مثبت *L. monocytogenes* برابر ۰/۷۵ میلیگرم به ازای هر میلی لیتر محاسبه شد و مقاومت*L. monocytogenes* در رتبه بعدی پس از *E. coli* O۱۵۷:H۷ قرار داشت. MIC اسانس این گیاه علیه*B. cereus* که یک باکتری گرم مثبت است برابر ۰/۳۷ میلیگرم در میلی لیتر مشخص شد وحساسیت این پاتوژن در حد واسط بین *S. aureus* و*L. monocytogenes* قرار داشت. MBC اسانس بومادران علیه تمام باکتریهای گرم مثبت دو برابر MIC آنها بدست آمد. نتایج حاصل از بررسی تاثیر اسید آسکوربیک بر باکتریهای مورد بررسی نشان داد که MIC این ماده علیه تمام باکتریهای گرم مثبت (*B. cereus*، *S. aureus* و *L. monocytogenes*) برابر یک میلی گرم در هر میلی لیتر مشخص شد در حالیکه MIC این ماده علیه باکتریهای گرم منفی بالاتر از باکتریهای گرم مثبت و معادل ۳ میلیگرم در هر میلی لیتر محاسبه شد. در مجموع همانگونه که از جدول شماره ۲ بر می‌آید اگرچه بین MIC اسانس بومادران شیرازی علیه باکتریهای گرم مثبت اختلاف وجود دارد ولی MIC اسانس این گیاه علیه باکتریهای گرم منفی بالاتر از MIC آن علیه باکتریهای گرم مثبت بدست آمد.

بر اساس تحقیقات صورت گرفته باکتریهای گرم مثبت نسبت به اسانس‌ها حساستر از باکتریهای گرم منفی هستند (۳) نتایج به دست آمده در این تحقیق (بالاتر بودن MIC اسانس علیه باکتریهای گرم منفی نسبت به باکتریهای گرم مثبت) نیز حاکی از حساستر بودن باکتریهای گرم مثبت نسبت به باکتریهای گرم منفی بود. بدلیل وجود غشاءهای خارجی احاطه کننده دیواره سلولی در باکتریهای گرم منفی منطقی به نظر می‌رسد که این باکتریها در برابر اثرات ضد باکتریایی اسانس‌ها حساسیت کمتری از خود نشان دهند.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲- فعالیت ضد باکتریایی (MIC وMBC بر حسب mg/ml) اسانس بومادران شیرازی به روش میکرودایلوشن

پاتوژن	واکنش گرم	نژاد	بومادران شیرازی MIC	بومادران شیرازی MBC	کلرامفنیکل MIC	اسید آسکوربیک MIC
S. aureus	+	ATCC ۲۵۹۲۳	۰/۱۵	۰/۳	۰/۰۹	۱
B. cereus	+	ATCC ۱۱۷۷۸	۰/۳۷	۰/۷۵	۰/۰۲	۱
L. monocytogenes	+	ATCC ۱۹۱۱۲	۰/۷۵	۱/۵	۰/۱۲	۱
E. coli O۱۵۷:H۷	-	ATCC ۷۰۰۷۲۸	۱/۵	۳	۰/۱۸	۳
S. enteritidis	-	RITCC ۱۶۲۴ *	۳	۳	۰/۱۸	۳

*: RITCC : Razi Institute Type Culture Collection, Tehran, Iran

این غشاء خارجی انتشار مواد هیدروفوب از میان این لایه پوشاننده لیپوپلی‌ساکاریدی را محدود می‌کند. در باکتریهای گرم مثبت تماس مستقیم ترکیبات هیدروفوب اسانس‌ها با این فسفولیپید دو لایه ایی صورت می‌گیرد. این محل جایی است که این ترکیبات اثر خود را بر جای می‌گذارند. این اثر یا بصورت افزایش نفوذپذیری یونها و یا نشت ترکیبات حیاتی سلولی رخ می‌دهد و یا اینکه بصورت ناتوانی سیستم آنزیمی باکتریایی بروز می‌کند (۱۹). برخی از محققین ارتباط بین ساختارهای شیمیایی برخی از اجزاء غالب موجود در اسانس‌ها را با فعالیت ضد باکتریایی آنها گزارش نموده‌اند (۳). که در این تحقیق نیز این موضوع اثبات گردید. وجود مقادیر زیاد cineole ۱،۸ ، Camphor، β-Pinene ، α-pinene و Camphene در این تحقیق با خاصیت ضد باکتریایی این اسانس مرتبط است. اگرچه بروز فعالیت ضد باکتریایی اغلب بسیار واضح است ولی مکانیزم عمل آن بطور کامل درک نشده است. شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهند اسانس‌ها اثرات ضد باکتریایی خود را از طریق تغییر ساختار و عمل غشاء سلولی اعمال می‌کنند. بررسی‌های صورت گرفته در خصوص مکانیزم عمل اسانس‌ها اثبات نموده است که این ترکیبات نفوذپذیری غشاء را افزایش می‌دهند. اجزای اسانس با نفوذ در غشاء منجر به متورم شدن غشاء گردیده و فعالیت آنرا تحت تاثیر قرار می‌دهند (کاهش می‌دهند) و در نهایت منجر به مرگ سلول خواهند شد (۴) اجزای اسانس نیز اثرات ضد باکتریایی متفاوتی دارند، اولته و همکاران (۲۲) اظهار نمودند که گروه هیدروکسیل موجود در ملکول اجزای اسانس مانند کارواکرول، تیمول، سایمن و منتول برای بروز خاصیت ضد باکتریایی آنها بسیار مهم است. اخیرا برای غلبه بر موانع ومحدودیتهای استفاده از اسانسها به عنوان مواد ضد میکروبی در صنایع غذایی مانند فرآیند اکسیداسیون، تبخیر شدن، مشکلات انحلال، واکنش دادن با مواد دیگر و تغییر رایحه و خواص ارگانولپتیکی مواد غذایی تکنیک انکپسولیشن اسانسها مورد بررسی قرار گرفته است لذا در تحقیقات آینده بررسی این موضوع پیشنهاد می‌گردد.

منابع

۱- Adams R.P. ۲۰۰۱. Identification of Essential oil Components by Gas Chromatography/Quadropole Mass Spectroscopy Carol Stream IL :Allured Publishing Crop.. ٤٦٥p.

۲- Azadbakht M. Morteza-semnani K. and Khansari N. ۲۰۰۳. The essential oils composition of *Achillea wilhelmsii* C. Koch. Leaves and flowers. J. of Med. Plants. ۲: ۵۵ - ۵۹.

۳- Burt S. ۲۰۰٤. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. International Journal of Food Microbiology, ۹٤, ۲۲۳–۲۵۳.

٤- Celiktas O.Y., Hames Kocabas E.E., Bedir E., Vardar Sukan F., Ozek T. and Baser K.H.C. ۲۰۰۷. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of Rosmarinus officinalis, depending on location and seasonal variations, Food Chemistry, ۱۰۰:۵۵۳-۵۵۹.

۵- Daferera D.J., Ziogas B.N., and Polissiou M.G. ۲۰۰۰. GC–MS Analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on Penicillium digitatum. Journal of Agricultural Food Chemistry, ٤۸, ۲۵۷٦–۲۵۸۱.

٦- Demirci, F., Guven, K., Demirci, B., Dadandi, M. Y., & Baser, K. H. C. (۲۰۰۸). Antibacterial activity of two *Phlomis* essential oils against food pathogens. Food Control, ۱۹, ۱۱۵۹–۱۱٦٤.

۷- Ghani A., Azizi M., Hassanzadeh-Khayyat M. and Pahlavanpour A. A. ۲۰۰۹. Essential Oil Composition of Achillea eriophora, A. nobilis, A. biebersteinii and A. wilhelmsii from Iran. Journal of Essential oils Bearing Plants, ۵:٤٦۰-٤٦۷.

۸- Ghasemi Y., Khalaj A., Mohagheghzadeh A. and Khosaravi A. ۲۰۰۸. Composition and in vitro antimicrobial activity of the essential oils of Achillea eriophora. Chemistry of Natural Compounds, ٤٤(۵): ٦٦۳-٦٦۵. two Phlomis essential oils against food pathogens, Food Control, ۱۹ : ۱۱۵۹–۱۱٦٤.

Archive of SID

www.SID.ir

۹- Jaimand K. and Rezaee M.B. ۲۰۰٤. Essential oil analysis of Achilea eriophora DC. Iranian J. of Med. and Aromatic Plants Res. ۲۰(۱): ۸۹ -۹۸.

۱۰- Kalemba D., and Kunicka A. ۲۰۰۳. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Current Medicinal Chemistry, ۱۰, ۸۱۳–۸۲۹.

۱۱- Kordali S., Kotan R., Mavi A., Cakir A., Ala A., and Yildirim A. ۲۰۰۵. Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of Artemisia dracunculus and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish Artemisia absinthium, A. dracunculus, Artemisia santonicum, and Artemisia spicigera essential oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry, ۵۳: ۹۴۵۲–۹۴۵۸.

۱۲- Kotzé M. and Eloff J.N. ۲۰۰۲. Extraction of antibacterial compound from Combretum microphyllum (Combretaceae). South African Journal of Botany, ۶۸: ۶۲–۶۷.

۱۳- Mirza M. and Ahmadi L. ۲۰۰۰. Kovats Index calculation of essential oils constituents by DB۵ column. Medicinal and Aromatic Plants Research Technical Publication, , No.۵:۱۲۶-۱۴۹

۱۴- Mozaffarian V. ۲۰۰۴. A Dictionary of Iranian Plant Names. Farhange Moaser: Tehran. p۶۷۱.

۱۵- Oroojalian F., Kasra-Kermanshahi R. Azizi, M. and Bassami M.R. ۲۰۱۰. Phytochemical composition of the essential oils from three Apiaceae species and their antibacterial effects on food-borne pathogens. Food chemistry, ۱۲۰, ۷۶۵–۷۷۰.

۱۶- Rahimmalek M., Tabatabaei B. E. S., Etemadi N., Golid S. A. H., Arzania A., and Zeinalie H. ۲۰۰۹. Essential oil variation among and within six Achillea species transferred from different ecological regions in Iran to the field conditions. industrial crops and products, ۲۹:۳۴۸–۳۵۵.

۱۷- Rechinger KH. Flora Iranica, Akademische Druck-U.Vernagsanstalt, Graz –Austria .۱۹۸۶. No. ۱۵۸: ۵۳ - ۵۴.

۱۸- Saberi-ameli S.; Asadipour A.; Ghelichnia H.; Amanzadeh Y. and Kazemi-gourti M. ۲۰۰۸. Phytochemical analysis of Achillea eriophora DC from "Khebr" National Park of Kerman by GC-MS. Abstract Book of Third Conference on Medicinal Plants, Shahed University , Tehran, ۵۵۷p.

۱۹- Sandri I. G., Zacaria J., Fracaro F., Delamare A. P. L., and Echeverrigaray S. ۲۰۰۷. Antimicrobial activity of the essential oils of Brazilian species of the genus Culina against foodborne pathogens and spoiling bacteria. Food chemistry, ۱۰۳: ۸۲۳–۸۲۸.

۲۰- Sokmen A., Vardar-Unlu G., Polissiou M., Daferera D., Sokmen M., and Donmez E. ۲۰۰۳. Antimicrobial activity of essential oil and methanol extracts of Achillea sintenisii Hub. Phytoterapy Research, ۱۷(۹):۱۰۰۵–۱۰۲۵.

۲۱- Tepe B., Donmez E., Unlu M., Candan F., Daferera D., and Vardar-Unlu G. ۲۰۰٤. Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of Salvia cryptantha (montbret et aucher ex benth.) and Salvia multicaulis (vahl). Food Chemistry, ۸٤, ۵۱۹–۵۲۵.

۲۲- Ulte, A., Bennik, M. H. J., & Moezelaar, R. (۲۰۰۲). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food pathogen Bacillus cereus. Applied and Environmental Microbiology, ٦٨, ۱۵٦۱–۱۵٦٨.

۲۳- Weyerstahl P., Marshall H., Seelman I. and Rustaiyan A. ۱۹۹۷. Consituents of the essential oil of *Achillea eriophora* DC.Flavour and Fragarance Journal ۱۲:۷۱–۷۸.

Archive of SID

www.SID.ir