فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ٢٤، شمارهٔ ١، صفحهٔ ٦٥-٥٦ (١٣٨٧)

مطالعه خاصیت ضد میکروبی و ترکیب شیمیایی اسانس لعل کوهستان (*Oliveria decumbens* Vent.)

محدثه محبوبی[1*]، محمدمهدی فیض‌آبادی[2]، قاسم حقی[3] و حسین حسینی[4]

١- کارشناس ارشد میکروب شناسی، بخش میکروب شناسی شرکت داروسازی باریج اسانس، کاشان، پست الکترونیک: mahboubi@Barijessence.com
٢- دانشیار میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
٣- کارشناس ارشد شیمی، بخش فیتوشیمی و تجزیه دستگاهی، شرکت داروسازی باریج اسانس، کاشان
٤- کارشناس کشاورزی، بخش تحقیقات کشاورزی شرکت داروسازی باریج اسانس، کاشان
* نویسنده مسئول مقاله

تاریخ دریافت: مرداد ١٣٨٦ تاریخ اصلاح نهایی: آذر ١٣٨٦ تاریخ پذیرش: دی ١٣٨٦

چکیده

گیاه لعل کوهستان (*Oliveria decumbens* Vent.)، گیاهی است بوته‌ای از خانواده چتریان (Umbelliferae) که معمولاً در مناطق جنوبی ایران یافت می‌شود. مردم این منطقه به‌طور گسترده‌ای از قسمتهای هوایی این گیاه در درمان بیماریهای عفونی استفاده می‌کنند. هدف از این مطالعه، ارزیابی خاصیت ضد میکروبی اسانس حاصل از اندام هوایی این گیاه بر طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها شامل باکتریهای گرم منفی و مثبت، قارچهای رشته‌ای و مخمرها با استفاده از روشهای دیسک دیفیوژن و میکروبراث دایلوشن در شرایط آزمایشگاه بوده است. شناسایی اجزای اصلی موجود در اسانس به‌وسیله دستگاه گاز کروماتوگراف (GC) انجام شد. ترکیبهای شناسایی شده در اسانس شامل تیمول (٢٦/٩٪)، کارواکرول (٠/٢٥٪)، پاراسیمن (١٣/٣٪) و گاما-ترپینن (١١٪) بود. اسانس حاصل از اندام هوایی با میانگین قطر هاله عدم رشد ٣٤/٨٦ میلی‌متر و MIC کوچکتر از ٠/٢٥µl ml^{-1} اثر ضد قارچی خوبی در مقابل قارچهای رشته‌ای و مخمر نشان داد. اثر ٢ میکرولیتر از اسانس بر قارچها با قطر هاله عدم رشد بزرگتر از ٢٧/٣ میلی‌متر از اثر آمفوتریسین B با قطر هاله عدم رشد کوچکتر از ١٧ میلی‌متر بیشتر بود. باکتریهای گرم مثبت نسبت به باکتریهای گرم منفی در مقابل اسانس لعل کوهستان حساس‌تر بودند (٢١/٩ در برابر ١٨/٤ میلی‌متر). باکتریهای تشکیل‌دهنده اسپور (جنس باسیلوس) نسبت به اسانس مقاوم بوده و اسانس لعل کوهستان در مقابل باسیلوس‌ها دارای اثر مهاری بود. پسودوموناس آئروجینوزا با قطر هاله عدم رشد کمتر از ٨ میلی‌متر از سایر میکروارگانیسم‌ها نسبت به اسانس مقاوم‌تر بود. میکروارگانیسم‌ها از نظر مقاومت نسبت به اسانس گیاهی متفاوت بوده و باکتریها (گرم مثبت و منفی) نسبت به قارچها و باکتریهای گرم منفی نسبت به باکتریهای گرم مثبت مقاوم‌تر بودند. این اثر به ترکیبهای فنلی اسانس، به‌ویژه تیمول آن مربوط می‌شود. مطالعات بیشتری لازم است تا کارآیی این اسانس به‌عنوان یک عامل ضد میکروبی ارزیابی گردد.

واژه‌های کلیدی: فعالیت ضد میکروبی، لعل کوهستان (*Oliveria decumbens* Vent.)، باکتری، قارچ، مخمر، تیمول.

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

استفاده از گیاه در درمان بیماریها به‌ویژه بیماریهای عفونی در سالهای اخیر روند رو به افزونی پیدا کرده است. استفاده بی‌رویه از داروهای شیمیایی جهت درمان بیماریهای عفونی منجر به ظهور ایزوله‌های مقاوم میکروبی گردیده که هر روزه بر تعداد آنها افزوده می‌گردد (Dupont *et al*., 1996; Ayliffe *et al*., 1997). ظهور سویه‌های مقاوم به داروهای شیمیایی، تلاش برای یافتن عوامل ضد میکروبی جدید را ضروری می‌نماید. گیاهان و ترکیبهای آنها شامل اسانسها و عصاره‌های گیاهی دارای توان بالقوه جهت جایگزینی با داروهای شیمیایی هستند (Srinivasan *et al*., 2001). این در حالی است که عوارض جانبی این ترکیبها در مقایسه با داروهای شیمیایی کمتر است (Cowan, 1999). استفاده از اسانسهای گیاهی در صنایع دارویی، مواد غذایی، طب مکمل و درمانهای گیاهی براساس خاصیت ضد میکروبی اسانسهای گیاهی در مقابل ارگانیسم‌های مختلف استوار است (Nascimento *et al*., 2000; Rana *et al*., 1997).

از جمله گیاهان بومی ایران، می‌توان از گیاه لعل کوهستان نام برد. جنس *Oliveria* متعلق به خانواده Umbelliferae در ایران یک گونه با نام *O. decumbens* دارد که به‌طور محلی به آن "دن" یا "دنک" یا "موشکورک" می‌گویند و در مناطق گرمسیری استانهای کرمانشاه، خوزستان و ایلام می‌روید و علاوه بر ایران در جنوب شرق آناتولی، سوریه و عراق نیز پراکنده است (مظفریان، ۱۳۸۲). در طب سنتی ایران از این گیاه جهت درمان سوء هاضمه، اسهال و دردهای شکمی و رفع تب استفاده می‌شود. مطالعات مختلفی روی ترکیب شیمیایی اسانس حاصل از گلهای گیاه انجام گرفته است (Sajadi & Hosseini, 2002؛ نجف‌پور نوایی و میرزا، ۱۳۸۱؛ Amin *et al*., 2005) و تاکنون تنها یک مطالعه روی خاصیت ضد میکروبی آن انجام شده است (Amin *et al*., 2005). در آن مطالعه، بازده اسانس استخراج شده از گلهای جمع‌آوری شده از جنوب شیراز ٦٪ گزارش شده است. این اسانس دارای ٤٧٪ تیمول، ۲۳٪ کارواکرول، ۸/۷٪ پاراسیمن و ۱۸٪ گاما-ترپینن بوده و اثرهای ضد میکروبی اسانس حاصل از گلهای گیاه لعل کوهستان در مقابل تعداد محدودی میکروارگانیسم (۳ باکتری گرم مثبت، ۳ باکتری گرم منفی، ۱ قارچ رشته‌ای و یک مخمر) بررسی شده است. Amin و همکاران (۲۰۰۵) گزارش نموده‌اند که اسانس، فعالیت ضدمیکروبی وسیعی در مقابل همه ارگانیسم‌های مطالعه شده نشان می‌دهد و این اثر با اثر آنتی‌بیوتیکهای تجاری قابل مقایسه می‌باشد. همچنین حداقل غلظت مهارکننده رشد (MIC) اسانس حاصل از گلهای گیاه بر باکتریهای گرم مثبت و منفی نشان می‌دهد که میزان حساسیت باکتریهای گرم مثبت و منفی به یک اندازه می‌باشد و این مقدار از حداقل غلظت مهار کننده رشد برای قارچ و مخمر مطالعه شده در آن تحقیق کوچکتر است. این بدین معنی است که باکتریها در مقایسه با قارچها نسبت به اسانس حساس‌ترند. همچنین قطر هاله عدم رشد برای باکتریهای گرم مثبت و قارچها یکسان می‌باشد. بازده اسانس استخراج شده از گلهای گیاه لعل کوهستان از منطقه کرمانشاه حدود ۰/۱٪ بوده است که دارای ۲۸٪ تیمول، ۲۹٪ کارواکرول، ۱۵/٤٪ پاراسیمن، ۲۰/۵٪ گاما-ترپینن می‌باشد (نجف‌پور نوایی و میرزا، ۱۳۸۱). تحقیق دیگری که روی اسانس لعل کوهستان انجام شده نشان داده که اسانس حاصل از گلهای گیاه دارای ۳۷/۲٪ تیمول، ۲۲/۱٪ کارواکرول، ۱۱/۸٪ پاراسیمن

Archive of SID

www.SID.ir

و ۱۲/۸٪ گاما-ترپینن است (Sajadi & Hosseini, 2002). باتوجه به مطالعات فوق، ترکیبهای شیمیایی و اثر ضد میکروبی اسانس حاصل از اندام هوایی گیاه لعل کوهستان بر ۱۸ میکروارگانیسم مختلف بررسی گردید و نتایج بدست آمده با مطالعات گذشته مقایسه گردید.

مواد و روشها

شناسایی و جمع‌آوری گیاه

اندامهای هوایی گیاه لعل کوهستان (در مرحله کامل گلدهی) در اردیبهشت ماه سال ۱۳۸٦ از منطقه کازرون در استان فارس جمع‌آوری گردید. پس از خشک کردن گیاه در سایه و خرد کردن آن به قطعات کوچک، از اندام هوایی گیاه به روش تقطیر با آب به مدت ٦ ساعت با دستگاه کلونجر (Clevenger apparatus) اسانس‌گیری به‌عمل آمد و پس از جداسازی اسانس از سطح آب، توسط سولفات سدیم آب‌گیری و در شیشه‌های تیره و در بسته نگهداری شد. مقدار۳/٤ میلی لیتر اسانس به ازای ۱۰۰ گرم وزن خشک گیاه حاصل شد (٪۳/٤V/W).

تجزیه اسانس لعل کوهستان

نظر به این که در مراجع (Sajadi & Hosseini, 2002؛ نجف‌پور نوایی و میرزا ۱۳۸۱؛ Amin *et al.*, 2005) اجزاء اسانس این گیاه بوسیله GC/MS شناسایی شده بود، در این تحقیق، اجزای عمده اسانس با استفاده از GC جداسازی و با روش نرمالیزاسیون، درصد آنها مشخص گردید. آنالیز اسانس با استفاده از دستگاه گاز کروماتوگراف، الگوی Varian CP-3800 طبق شرایط زیر انجام شد. ستون مورد استفاده CP Sil 8CB به طول ٦۰ متر و قطر ۰/۳۲ میلی‌متر، ضخامت لایه فاز ساکن ۰/۲۵ میکرومتر، گاز حامل نیتروژن و فشار گاز سر ستون ۷ psi بود. برنامه‌ریزی حرارتی عبارت بود از^{o}C ۲۳۰-۵۰ با افزایش دمای ^{o}C ۳ در دقیقه، درجه حرارت محفظه تزریق ^{o}C ۱۱۷ در دمای ترانسفرلاین ^{o}C ۲۵۰ تعیین شد. سپس µl ۱ از اسانس لعل کوهستان به دستگاه تزریق شد و درصد نسبی اجزای اصلی اسانس با استفاده از مواد استاندارد و مقایسه زمان بازداری شناسایی شد.

میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه

از بین باکتریهای گرم مثبت *Bacillus subtilis* ATCC6051، *Bacillus cereus* ATCC1247، *Listeria monocytogenes* ATCC7644، *Staphylococcus aureus* ATCC25923، *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 و *Staphylococcus saprophyticus* ATCC13518 و از بین باکتریهای گرم منفی *Shigella flexeneri* (Clinical isolate)، *Escherichia coli* ATCC8739، *Salmonella typhimorium* ATCC14028، *Klebsiella pneumoniae* ATCC10031، *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027، *Shigella dysantri* PTCC118، *Proteus vulgaris* RI 231، *Vibrio cholera* Inaba و *Enterobacter aeruginosa* ATCC10006 و قارچ *Aspergillus flavus* (field isolate) و *Aspergillus niger* ATCC 16404 و مخمر *Candida albicans* ATCC 10231 انتخاب گردید.

تعیین خاصیت ضد میکروبی اسانس با استفاده از روش دیسک دیفیوژن

سویه‌های باکتریایی روی نوترینت آگار و سویه‌های قارچ و مخمر روی سابورودکستروز آگار در دمای ^{o}C ۳۷ رشد داده شدند. ۳-۲ کلنی از کشت شبانه هر سویه میکروبی به سرم فیزیولوژی استریل افزوده شده و

Archive of SID

www.SID.ir

کدورت آنها با ۰/۵ مک فارلند تنظیم گردید. سوسپانسیون باکتریایی (معادل 1×10^{8} CFU ml^{-1}) آماده بر روی مولر هینتون آگار و سوسپانسیون قارچی (10^{5} CFU ml^{-1}) روی سابورودکستروز آگار تلقیح گردیده سپس دیسکهای کاغذی استریل (قطر ٦ میلی‌متر) حاوی ۲ µl اسانس که در ۲۰ میکرولیتر DMSO (dimethylsulfoxide) حل شده است بر روی محیط‌های کشت شده قرار داده شد. دیسک حاوی DMSO و دیسک آنتی‌بیوتیکی به‌عنوان کنترل روی کشت قرار داده شد (Mahboobi *et al.*, 2006) کشت‌های باکتریایی و قارچی به‌ترتیب ۲٤ و ٤۸ ساعت در دمای ۳۷ ^{o}C انکوبه گردیدند. سپس قطر هاله عدم رشد (بر اساس میلی‌متر) اندازه‌گیری گردید.

تعیین حداقل غلظت مهار کننده رشد با استفاده از روش میکروبراث دایلوشن

در این روش سری دو برابر رقت از اسانس لعل کوهستان در DMSO ۱۰٪ با غلظت ml^{-1} µl ۲-۰/۰۱۲۵ تهیه شد (NCCLS, 2006). سپس ۱۰۰ µl از هر رقت به هر چاهک از پلیت ۹٦ تایی افزوده شد. استاندارد تهیه شده (معادل با ۰/۵ مک فارلند) در مرحله قبل رقیق گردید، به نحوی که غلظت سوسپانسیون میکروبی برای باکتریها 10^{5} CFU ml^{-1} و برای قارچها 10^{4} CFU ml^{-1} تنظیم گردید و در مورد باکتریها از محیط مولر هینتون براث و در قارچها ومخمرها از محیط RPMI 1640 که pH آن با مورفولین پروپان سولفونیلیک اسید (MOPS) ۰/۱٦۵ مولار به ۷/۲ رسیده استفاده گردید و ۱۰۰ µl از سوسپانسیون میکروبی به هر چاهک افزوده شد و پلیتها در دمای ۳۷ به‌مدت ۲٤ ساعت برای باکتریها و به‌مدت ٤۸ ساعت برای قارچها انکوبه گردیدند. اولین چاهک که در آن هیچ رشدی مشاهده نمی‌شود به‌عنوان MIC یا حداقل غلظت مهارکننده رشد تعیین گردید. سپس ۱۰ µl از رقت MIC و چند رقت بالاتر از آن روی محیط کشت منتقل شده و اولین رقت که در آن رشدی مشاهده نشد به‌عنوان MBC یا حداقل غلظت کشنده رشد تعیین گردید.

نتایج

اسانس حاصل از اندام هوایی گیاه لعل کوهستان به رنگ زرد و دارای بویی نافذ شبیه به بوی اسانس آویشن بود. بازده اسانس حاصل از اندام هوایی گیاه ۳/٤٪ بدست آمد. نظر به اینکه در مراجع اجزای اسانس به‌وسیله GC/MS شناسایی شده بودند، اجزای اسانس به‌وسیله GC جداسازی و به روش نرمالیزاسیون درصد آنها مشخص شد. اجزای غالب آن تیمول ۲٦/۹ ٪، پاراسیمن ۱۳/۳٪ و گاما ترپینن ۱۱٪ تعیین گردید. میزان کارواکرول موجود در اسانس نیز ۰/۲۵٪ بود. اثر اسانس بر میکروارگانیسم‌های مختلف نشان داد که اسانس لعل کوهستان بر باکتریهای گرم مثبت، منفی، قارچها و مخمر مؤثر است اما میزان اثربخشی آن بسته به نوع ارگانیسم متفاوت است (جدولهای ۳-۱). براساس روش دیسک دیفیوژن قارچها در مقایسه با سایر میکروارگانیسم‌ها، نسبت به اسانس لعل کوهستان حساس‌تر می‌باشند (قطر هاله عدم رشد ٤۵/۳-۲۷/۳ میلی‌متر). مخمر کاندیدا آلبیکانس با قطر هاله عدم رشدی معادل ۳۲ میلی‌متر، نظیر باکتریهای گرم مثبت (۳۰/٦-۱۳ میلی‌متر) نسبت به این اسانس حساسیت نشان می‌دهد. با توجه به میانگین اثر اسانس لعل کوهستان بر میکروارگانیسم‌های مختلف، قارچهای رشته‌ای و مخمر کاندیدا آلبیکانس در مقایسه با باکتریهای گرم مثبت در درجه اول قرار دارند (۳٤/۸٦ در مقابل ۲۱/۹ میلی‌متر) (جدولهای ۱ و ۳). قارچ

Archive of SID

www.SID.ir

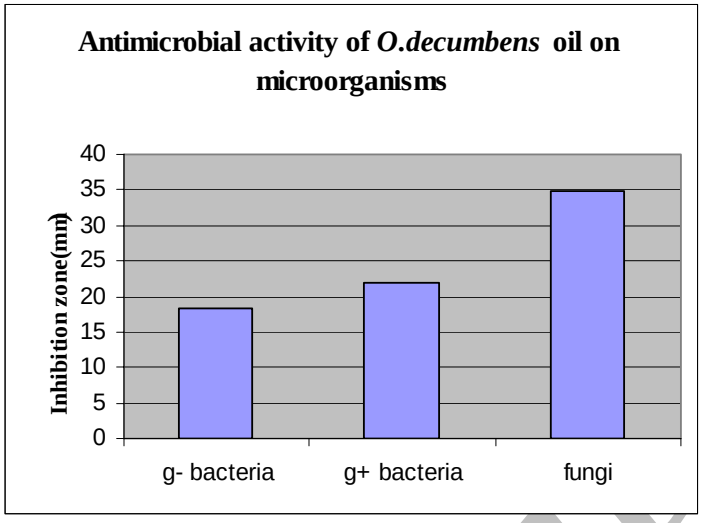
آسپرژیلوس نایجر با MIC کوچکتر و قطر هاله عدم رشد بزرگتر از مخمر کاندیدا نسبت به اسانس لعل کوهستان حساس‌تر می‌باشد. حداقل غلظت کشندگی (MBC) قارچها ٤ برابر بیشتر از MIC آن می‌باشد (جدول ٣). در بین باکتریهای گرم مثبت، استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس کوچکترین قطر هاله عدم رشد را نشان می‌دهد (١٣ میلی‌متر) (جدول ١). اثر اسانس لعل کوهستان بر باکتریهای گرم منفی در مقایسه با سایر میکروارگانیسم‌ها کمتر است (میانگین قطر هاله عدم رشد ١٨/٤ میلی‌متر) و پسودوموناس آئروجینوزا کوچکترین قطر هاله عدم رشد را در بین میکروارگانیسم‌های مطالعه شده نشان می‌دهد (٨ میلی‌متر). کلبسیلا پنومونیا (قطر هاله عدم رشد برابر با ٣٠ میلی‌متر)، ویبریوکلرا (٢٨/٦ میلی‌متر) و پروتئوس ولگاریس (٢٨/٦) نسبت به سایر باکتریهای گرم منفی حساس‌تر می‌باشند. (جدول ٢) استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس از سایر استافیلوکوک‌ها (براساس حداقل غلظت مهار کننده رشد (MIC) و باسیلوس سرئوس از باسیلوس سوبتیلیس حساس‌تر می‌باشد (قطر هاله عدم رشد بزرگتر و MIC کوچکتر). MBC باسیلوس‌ها نسبت به سایر باکتریهای مورد مطالعه بزرگتر است (MBC>2 µl ml $^{-1}$) (جدول شماره ١). در بین باکتریهای گرم منفی بجز پسودوموناس آئروجینوزا و ویبریوکلرا حداقل غلظت مهارکنندگی رشد و حداقل غلظت کشندگی رشد برابر است و نشان می‌دهد که اسانس لعل کوهستان دارای اثر باکتری‌کشی است.

جدول١- بررسی اثر ضد میکروبی اسانس لعل کوهستان بر باکتریهای گرم مثبت

سویه باکتری	میانگین قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر)	انحراف معیار	MIC (µl/ml)	MBC (µl/ml)
B. subtilis	١٨	١/٦٣	٠/٥	>٢
B. cereus	٢٦/٣	١/٧	٠/٢٥	>٢
S. saprophyticus	٢٢	٠	٠/١٢٥	٠/٢٥
S. aureus	٣٠/٦	١/٤٩	٠/٢٥	٠/٢٥
S. epidermidis	١٣	٠/٨	٠/٢٥	٠/٥
L. monocytogenes	٢٢	٢/١٦	٠/٢٥	٠/٢٥
میانگین اثر بر گرم مثبت‌ها	٢١/٩	٥/٤٤		

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- مقایسه اثر اسانس لعل کوهستان بر میکروارگانیسم‌های مختلف

جدول ۲- بررسی اثر ضد میکروبی اسانس لعل کوهستان بر باکتریهای گرم منفی

سویه باکتری	میانگین قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر)	انحراف معیار	MIC (µl/ml)	MBC (µl/ml)
Sh. flexeneri	١٤/٦	٠/٩٤	٠/٥	٠/٥
S. typhi	١٠	٠	٠/٥	٠/٥
E. coli	١٢	٠	٠/٥	٠/٥
P. aeruginosa	٨	٠	٠/٥	١
K. pneumoniae	٣٠	٠	٠/٠٦٢٥	٠/٠٦٢٥
Sh. dysantri	١٢/٦	٠/٩٤	٠/٥	٠/٥
E .aeruginosa	١٢	٠	٠/٥	٠/٥
V. cholerae	٣٨/٣	٣/٨	٠/٢٥	٠/٥
P. vulgaris	٢٨/٦	٣/٤	٠/٥	٠/٥
میانگین اثر بر گرم منفی‌ها	١٨/٤	١٠/٢		

جدول ۳- بررسی اثر ضد میکروبی اسانس لعل کوهستان بر قارچها

سویه قارچ	میانگین قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر)	انحراف معیار	amphotricinB 100U/disc	MIC (µl/ml)	MBC (µl/ml)
A. niger	٤٥/٣	٢/٤	١٠	٠/٠٦٢٥	٠/٢٥
A. flavus	٢٧/٣	٤/٩	٨	٠/٠٦٢٥	٠/٢٥
C. albicans	٣٢	٠/٨١	١٧	٠/٢٥	٠/٥
میانگین اثر بر قارچها	٣٤/٨٦	٧/٤			

Archive of SID
www.SID.ir

بحث

نگاهی اجمالی به نتایج بدست آمده در این مطالعه، نشان می‌دهد که اسانس استخراج شده از اندام هوایی گیاه لعل کوهستان در مقایسه با اسانس استخراج شده از گلهای گیاه (Sajadi &Hosseini, 2002؛ نجف‌پور نوایی و میرزا ۱۳۸۱؛ Amin *et al.*, 2005) دارای درصد کمتری تیمول ۲۶/۹٪، کارواکرول ۰/۲۵٪ و گاما-ترپینن ۱۱٪ و درصد بیشتری پاراسیمن (۱۳/۳٪) می‌باشد. همچنین بازده اسانس گزارش شده در مطالعات متعدد متفاوت است. گاما-ترپینن و پاراسیمن پیش‌ساز زیستی تیمول و پاراسیمن پیش‌ساز تیمول و کارواکرول در گیاه است و تیمول ایزومری از کارواکرول است. تغییر در میزان اجزای اسانس به عوامل مختلفی از جمله شرایط کشت، زمان جمع‌آوری و اندام مورد استفاده بستگی دارد و ممکن است بر خاصیت ضد میکروبی آن اثر گذار باشد. مقایسه اثر ضد میکروبی اسانس حاصل از اندام هوایی گیاه با اثر ضد میکروبی اسانس حاصل از گلهای گیاه (Amin *et al.*, 2005) نشان می‌دهد هر دو نوع اسانس دارای فعالیت ضد میکروبی خوبی در مقابل طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها هستند، اما تغییر در میزان اجزای اسانس بر فعالیت ضد میکروبی آن در برابر ارگانیسم‌های مختلف اثر می‌گذارد. نتایج حاصل از تحقیقات ما، نشان می‌دهد که اسانس لعل کوهستان، دارای اثر ضد قارچی بسیار مطلوبی است، به‌نحوی که اثر ۲ µl از این اسانس از اثر آمفوتریسین B بر مخمر و قارچهای مطالعه شده و باکتری‌های گرم مثبت و منفی به مراتب بیشتر است. در حالی که نتایج مطالعه قبلی (Amin *et al.*, 2005) نشان می‌دهد که میزان حساسیت باکتریهای گرم مثبت و منفی (حداقل غلظت مهارکنندگی رشد) نسبت به اسانس حاصل از گلهای گیاه برابر است و از حداقل غلظت مهار کننده رشد برای قارچ و مخمر مطالعه شده کوچکتر است، این بدین معنی است که باکتریها در مقایسه با قارچها نسبت به اسانس حاصل از گل حساس‌ترند. مقایسه اجزای دو اسانس نشان می‌دهد که درصد کارواکرول در اسانس حاصل از اندام هوایی بسیار ناچیز است، اما این مقدار در اندام گل از ۲۹٪-۲۲٪ گزارش شده است. تیمول مهمترین جزء اسانس در اندام هوایی گیاه است. ماده مزکور با ادامه حیات و تشکیل هیف‌های قارچی تداخل می‌نماید و در غشای سلول کاندیدایی و متابولیسم آن اثر می‌گذارد و احتمالاً بر دیواره سلول قارچی نیز مؤثر است (Braga *et al.*, 2007).

گاما-ترپینن و پاراسیمن فاقد اثرهای ضد میکروبی هستند (Cosentino *et al.*, 1999)، در حالی که تیمول و کارواکرول از ترکیبات فنلی، دارای اثرهای ضد میکروبی بسیار خوبی می‌باشند (Botelho *et al.*, 2007). با توجه به نکات ذکر شده، به نظر می‌رسد که اثر قارچ‌کشی اسانس حاصل از اندام هوایی گیاه مربوط به محتوی تیمول آن است که مطابق با نتایج دیگر محققان است (Zambonelli *et al.*, 2004). نتایج نشان می‌دهد که هر چقدر میزان تیمول در اسانس بیشتر باشد اثر قارچ‌کشی آن بیشتر است.

کاهش میزان کارواکرول در اسانس حاصل از اندام هوایی و افزایش میزان پاراسیمن میزان اثربخشی اسانس را بر باکتریهای گرم منفی کاهش می‌دهد. علت این تفاوت شاید به‌خاطر تفاوت در ساختار دیواره سلولی باکتریهای گرم منفی است. در باکتریهای گرم منفی به‌علت وجود لیپوپلی‌ساکاریدهای دیواره سلولی و انتشار عوامل ضد میکروبی به خارج سلول (Mckeegan *et al*, 2002) اثر

Archive of SID
www.SID.ir

ضد میکروبی اسانس کمتر می‌شود (Rossel, 1991). لیپوپلی‌ساکاریدهای موجود در دیواره سلولی مانع از رسیدن ترکیبهای فعال به غشای سیتوپلاسمی باکتریهای گرم منفی می‌شود. تیمول و کارواکرول هر دو به غشای بیرونی باکتریهای گرم منفی آسیب می‌زنند و قابلیت نفوذپذیری غشای سلولی را افزایش می‌دهد و منجر به تراوش ATP می‌گردد. کارواکرول دارای اثر ممانعت از ATP_{ase} می‌باشد. کارواکرول در *E. coli* $O_{157}H_7$ تولید HSP60 را القاء می‌نماید و از سنتز فلاژلین ممانعت می‌کند (Burt *et al*., 2007). اثر سینرژیسمی بین تیمول و کارواکرول در مورد بعضی باکتریها گزارش شده است (Didry *et al*., 1993). کارواکرول به‌عنوان یک ترکیب باکتریوسید عمل می‌کند و عملکرد آن به غلظت و زمان تماس آن با میکروارگانیسم بستگی دارد. کارواکرول با غشای سلولی از طریق تغییر در نفوذپذیری کانالهای H^+/K^+ واکنش می‌دهد. تغییر در شیب یونی منجر به توقف و اختلال عملکردهای اساسی سلول و مرگ آن می‌گردد (Ultee *et al*., 1999). کاهش پاراسیمن در اسانس حاصل از گل اثر ضد باکتریایی آن را افزایش می‌دهد، زیرا پاراسیمن و اجزای فنلی (تیمول و کارواکرول) دارای اثرهای آنتاگونیستی بر روی میکروارگانیسم‌ها می‌باشند، به‌طوری که افزایش در میزان پاراسیمن همراه با ترکیبهای فنلی، اثر ضد باکتریایی اسانس را کاهش می‌دهد (Cosentino *et al*., 1999). به‌همین دلایل، اثر ضد باکتریایی اسانس حاصل از اندام هوایی گیاه کاهش می‌یابد درحالی که افزایش تیمول همراه با کارواکرول در اسانس حاصل از گل، منجر به افزایش فعالیت ضد باکتریایی آن گردیده است. اگرچه اجزای اسانس به تنهایی ممکن است فاقد اثر ضد میکروبی باشند، اما مطالعات نشان می‌دهد که گاهی ترکیب اجزای اصلی اسانس اثر ضد میکروبی کمتری نسبت به ترکیب کل اسانس دارند (Lattaoui & Tantaoui-Elaraki, 1994). بنابراین، حضور سایر اجزاء در میزان کم می‌تواند بر اثر ضد میکروبی اسانسها اثر گذار باشد. به‌طور کلی، در این مطالعه مشخص گردید که میکروارگانیسم‌ها، بسته به اینکه چه ساختاری دارند، از نظر مقاومت یا حساسیت نسبت به یک اسانس خاص و یا اجزای آن با یکدیگر تفاوت دارند. باکتریهای اسپوردار نسبت به سلولهای رویشی و باکتریهای گرم منفی نسبت به باکتریهای گرم مثبت نسبت به اسانس لعل کوهستان مقاوم‌ترند. اسانس لعل کوهستان بر روی تعدادی از میکروارگانیسم‌ها اثر مهاری و تعدادی دیگر، اثر باکتری‌کشی دارد. با توجه به اثرهای ضد میکروبی این اسانس بر طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها، لازم است مطالعات بیشتری پیرامون اثربخشی این اسانس بر سویه‌های بالینی میکروبی انجام پذیرد و توانایی این ترکیب به‌عنوان یک ترکیب ضد میکروب در مدلهای حیوانی بررسی گردد.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از جناب آقای مهندس حسین حجازی مدیر عامل محترم شرکت داروسازی که همواره پشتیبان تحقیقات بوده‌اند و همچنین از خانم نسترن کاظم‌پور و آقای مهندس محسن بذرافشان قدردانی می‌نمایند.

منابع مورد استفاده

- مظفریان، و.، ۱۳۸۲. فلور خوزستان. مرکز تحقیقات منابع طبیعی و امور دام استان خوزستان، ۲۸۳ صفحه.

Archive of SID
www.SID.ir

- نجف‌پور نوایی، م. و میرزا، م.، ۱۳۸۱. بررسی ترکیبات شیمیایی اسانس *Oliveria decumbens*. تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، ۱۵: ۲۳-۲۹.

- Amin, G.H., Salehi sourmaghi, M.H., Zahedi, M., Khanavi, M. and Samadi, N., 2005. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Oliveria decumbens*. Fitoterapia; 76(7-8): 704-707.

-Ayliffe, G.A., Green, W., Livingston, R. and Lowburry, E.J.L., 1997. Antibiotic resistant *staphylococcus aureus* in dermatology and burn wards. Journal of Clinical Pathology, 30: 40-44.

-Botelho, M.A., Nogueira, N.A.P., Bastos, G.M., Fonseca, S.G.C., Lemos, T.L.G., Matos, F.J.A., Montenegro, D., Heukelbach, J., Rao, V.S. and Brito, G.A.C., 2007. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, Carvacrol and thymol against oral pathogens. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 40: 349-356.

-Braga, P,C.,,Alfieri ,M.,Culici ,M, and Dalsasso ,M., 2007. Inhibitory activity of thymol against the formation and viability of Candida albicans hyphae, Mycoses, 50(6):502-6.

-Burt, S.A., Zee, R.V.D., Koets, A.P., Graaff, A.M.D., Knapen, F.V., Gaastra, W., Hagsman, H.P. and Veldhuizen, E.J.A., 2007. Carvacrol Induces Heat Shock Protein 60 and Inhibits synthesis of flagellin in Escherichia coli O157:H7. Applied and Environmental Microbiology, 73(14): 4484-4490.

-Cowan, M.M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Review, 12: 564-582.

-Cosentino, S., Tuberoso, C.I.G., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E. and Palmas, F., 1999. *In-vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. Letters in Applied Microbiology, 29: 130-135.

-Didry, N., Dubreuil, L. and Pinkas, M., 1993. Antimicrobial activity of thymol, Carvacrol and cinnamaldehyde alone or in combination. Pharmazie, 48: 301-304.

-Dupont, B.F., Dromer, F. and Improvisi, L., 1996. The problem of resistance to azoles in Candida. Journal of Medical Mycology, 6(II): 12-19.

- Lattaoui, N. and Tantaoui-Elaraki, A., 1994. Individual and combined antibacterial activity of the main components of three thyme essential oils. Revista Italinica EPPOS, 13:13-19.

-Mahboobi, M., Shahcheraghi, F. and Feizabadi, M.M., 2006. Bactericidal effects of essential oils from Clove, Lavander and geranium on multi-drug resistant isolates of *P.aeruginosa*. Iranian journal of Biotechnology, 4(2): 137-140.

-Mckeegan, K.S., Borges-Walmsley, M.I. and Walmsley, A.R., 2002. Microbial and viral drug resistance mechanisms. Trends in Microbiology, 10: 85-145.

- Nascimento, G.G.F., Locatelli, J., Freitas, P.C. and Silva, G.L., 2000. Antibacterial activity of extracts and phytochemicals on antibiotic resistant bacteria. Brazilian Journal of Microbiology, 31(4): 245-256.

-NCCLS, National Committee for Clinical laboratory Standards, 2006. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; 7th Ed, Approved Standard M7-A7, Wayne, Pennsylvania.

-Rana, B.K., Singh, U.P. and Taneja, V. 1997. Antifungal and kinetics of inhibition by essential oil isolated from leaves of *Aegle marmelos*. Journal of Ethnopharmacology, 57(1): 29-34.

-Rossel, A.D., 1991. Mechanisms of bacterial resistance to non_antibiotics: food additives and pharmaceutical preservatives. Applied microbiology, 71: 191-201.

- Sajadi, S.E. and Hoseini, S.A., 2002. Essential oil constituents of *O.decumbens* Vent. Journal of Essential Oil Research, 14(3): 220-221.

-Srinivasan, D., Nathan, S., Suresh, T. and Perumalsamy, P.L., 2001. Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in Folkloric medicine. Journal of Ethnopharmacology, 74: 217-220.

-Ultee, A., Kets, E.P.W. and Smid, E.J., 1999. Mechanism of action of carvacrol on the food borne pathogen *Bacillus cereus* .Applied and Environmental Microbiology, 65(10): 4606-4610.

-Zambonelli, A., D'Aulerio, A.Z., Severi, A., Benvenuti, S., Maggi, L. and Bianchi, A., 2004. Chemical composition and Fungicidal activity of commercial essential oils of *Thymus vulgaris* L. Journal of Essential Oil Research, 16(1): 69-74.

Archive of SID

www.SID.ir

Antimicrobial activity and chemical composition of essential oil from *Oliveria decumbens* Vent.

M. Mahboubi[1*], M.M. Feizabadi[2], G. Haghi[3] and H. Hosseini[4]

1- Department of Microbiology, Barij Essence Pharmaceutical Company, Kashan, Iran, Email: Mahboubi@barijessence.com
2- Department of Microbiology, Faculty of Medical Sciences, University of Tehran, Iran.
3- Department of Phytochemistry, Barij Essence Pharmaceutical Company, Kashan, Iran.
4- Department of Agriculture, Barij Essence Pharmaceutical Company, Kashan, Iran.

Abstract

Oliveria decumbens Vent. (Umbelliferae) is a shrub commonly found in the South East of Iran. Its aerial part is extensively used in herbal medicine. In this study, the antimicrobial activity of *O. decumbens* essential oil extracted from aerial parts of plant against a panel of microorganisms including gram positive, gram negative bacteria, yeast and fungi were assessed by disc diffusion method and micro broth dilution assay**.** The chemical constitutes of this oil was analyzed by GC. The main components of essential oil are thymol (26.9%), carvacrol (0.25%), p-cymene (13.3%) and γ-terpinene (11%). This oil exhibited strong antifungal activity against filamentous fungi and yeast with average of inhibition zone (AIZ) 34.86 and MIC≤0.25µl ml $^{-1}$. The effect of 2 µl of essential oil (IZ≥27.3 mm) is larger than Amphotricin B (IZ≤17) against fungi. The gram positive bacteria are more sensitive than gram-negative bacteria (21.9 Vs 18.4). Spore forming bacteria (*Bacillus* sp.) are resistant to essential oil and the effect of oil against *Bacillus* sp. had inhibitory effect (MIC>2 µl ml^{-1}). *Pseudomonas aeruginosa* were more resistant than others (IZ<8 mm). Thus, microorganisms differ in their resistance to *O. decumbens* oil, i.e. bacteria are more resistant than fungi and gram negative bacteria are more resistant than gram positive bacteria. These effects are more concerned to phenol components especially thymol. Therefore, further studies are required to evaluate *in vivo* efficacy.

Key words: Antimicrobial activity, *Oliveria decumbens* Vent., bacteria, fungi, yeast, thymol.

Archive of SID

www.SID.ir