● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ هفتم، شمارهٔ ۴، ص ۱۸۱-۱۷۳، ۱۳۷۹

مقالهٔ پژوهشی

بررسی فعالیت ضد میکروبی و ترکیبات شیمیایی اسانس گلهای اسطوخدوس و مریم گلی

دکتر ایرج رسولی[۱] و دکتر محمدباقر رضایی[۲]

خلاصه

روغن‌های اسانسی گل‌های اسطوخدوس *(Lavandula angustifolia)* و مریم گلی *(Salvia officinalis)* با روش تقطیر با بخار استخراج و تأثیر آن‌ها بر روی باکتری‌های *S. aureus* و *E.coli* مطالعه شد. تأثیر ضد میکروبی اسانس‌ها با روش دیسک پلیت در رقت‌های ۱/۲،۱/۴،۱/۸ و ۱/۱۶ و در چهار مرحله زمانی صفر (روغن تازه)، یک، دو و سه ماه پس از اسانس‌گیری مطالعه شد. روغن‌های قرار مؤثر در رقت‌های مختلف در برابر سه رقت 10^5، 10^6 و 10^7 در میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتریال قرار گرفتند تا حداقل غلظت‌های بازدارندگی (MIC) و کشندگی (MBC) آنها تعیین شود. هر دو اسانس به صورت رقیق نشده باکتریسیدال بودند. اسانس گل اسطوخدوس تأثیر ضدمیکروبی بیشتری بر روی *E.coli* و اسانس گل مریم گلی تأثیر ضد میکروبی بیشتری بر روی *S.aureus* نشان داد. تجزیه و شناسایی ترکیبات اسانس‌ها با دستگاه گازکروماتوگراف /طیف سنج جرمی (GC/MS) نشان می‌دهد که هر دو اسانس در دوازده ترکیب β-pinene, α-pinene, α-Humulene, p-Cymene, Linalol, cis-β-ocimene, α-Thujene, β-Caryophyllene, Camphor, Camphene, 1,8-Cineole و Terpinene مشترک هستند. Linalol با ۳۶/۹ درصد بیشترین مقدار را در بین دوازده ترکیب مشترک و در بین کل ترکیبات اسانس گل اسطوخدوس دارد. ترکیبات اصلی اسانس گل اسطوخدوس عبارت بودند از: Linalol (۳۶/۹٪)، 1,8-Cineole (۱۶٪) (۱۱/۵٪) β-Orneol (۴/۲٪)، Camphor (۴/۱۹٪)، Terpinene-4ol. ترکیبات اصلی اسانس گل مریم گلی شامل (۱۶٪) β-pinene (۹/۴٪)، Berneol (۹/۳٪)، Glubulol (۸/۴٪)، α-Humulene (۶/۴٪) α-Thujene (۵/۵٪) α-pinene و (۵٪) Camphene می‌شوند. به نظر می‌رسد ترکیبات مونوترپنی باعث خاصیت ضد میکروبی روغن‌های اسانسی می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: اسطوخدوس، مریم گلی، اثر ضدمیکروبی، روغن‌های اسانسی

۱ـ استادیار میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شاهد تهران ۲ـ دانشیار شیمی، مؤسسه تحقیقات و جنگل‌ها و مراتع

مقدمه

یکی از مهم‌ترین مواد مؤثر گیاهان دارویی را روغن‌های اسانسی یا روغن‌های فرار تشکیل می‌دهند. این مواد در قسمت‌های مختلف بسیاری ازگیاهان دارویی وجود دارند. بسیاری از فرآورده‌های خام‌گیاهان 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 (۱۵). خواص ضد میکروبی روغن‌های اسانسی از زمان‌های قدیم شناخته شده و مطالعات زیادی روی گونه‌های مختلف گیاهی و تأثیر اسانس یا عصاره‌های آنها بر روی میکروارگانیسم‌ها گزارش شده است (۵,۶,۸,۱۰,۱۶,۱۷). Bastide و همکاران (۱۹۸۷) خواص ضدمیکروبی ترکیبات روغن‌های فرار را روی *E. coli* و *S. aureus* مورد مطالعه قرار دادند (۲). Chalchat و همکارانش (۱۹۸۷) فعالیت‌های ضد میکروبی روغن‌های اسانسی حاصله از Pinus sylvestris, Picea abies و Pseudostuga menziesii بر روی *E.coli* را متغیر گزارش کردند (۴). آنها همچنین فرایند گذشت زمان به طور طبیعی یا ساختگی را در افزایش تأثیر ضد میکروبی مؤثر دانستند. Bagci و Digrak پس از مطالعه اثرات ضدمیکروبی انواع روغن‌های اسانسی، آنها را به سه دسته بی‌تأثیر، کم‌تأثیر و بسیار مؤثر طبقه‌بندی نمودند. در مطالعه آنها *E.coli* کمترین تأثیرپذیری را داشت (۱). مطالعات Roussis (۱۹۹۶) تأثیرپذیری *E.coli* و مقاومت *S.aureus* را در برابر روغن‌های اسانسی Lamium garganicum نشان داد (۱۴). ترکیبات اصلی روغن‌های فرار گیاهانی که بر روی میکروب‌های معینی اثر کشندگی داشتند، توسط Lis-Balchin و همکارانش (۱۹۹۸) مقایسه شده‌اند (۸). عفونت‌های میکروبی تهدیدی جدی برای سلامتی، مخصوصاً در افرادی با بنیه ایمنی ضعیف بوده و لذا نیاز برای یافتن مواد ضدمیکروبی ارزان و مؤثر را ایجاب می‌کند. به علاوه استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی برای افزایش طول عمر محصولات غذایی و پیشرفت ثبات چربی‌ها و روغن‌های غنی از نظر اسیدهای چرب اشباع نشده، مقبولیت بیشتری می‌یابد. به منظور ارزیابی تأثیرات ضدباکتریایی روغن‌های اسانسی گل‌های اسطوخدوس (*Lavandula angustifolia*) و مریم‌گلی (*Salvia officinalis*) که به طور سنتی در ایران استفاده می‌شوند و نظر به تفاوت تأثیرات روغن‌های اسانسی گیاهان نسبت به یکدیگر و نیز مشاهده این تفاوت در داخل یک واریته به دلیل تفاوت در شرایط اقلیمی (۱۱,۱۳)، لازم دانستیم با تجزیه و شناسایی ترکیبات شیمیایی گونه‌های کشت شده در باغ ملی گیاه‌شناسی ایران که تا به حال این گونه بررسی‌ها بر روی آنها انجام یا گزارش نشده است، تحقیق حاضر را طراحی نماییم.

مواد و روش‌ها

مواد

الکل اتیلیک، متانول، استون، پنتان نرمال، محیط‌های کشت میکروبی مانند مولر هینتون، نوترینت آگار، نوترینت براث کلیه مواد مصرفی از کارخانه مرک آلمان می‌باشند.

سویه‌های میکروبی

E. coli ATCC No 25922 *S.aureus ATCC No 25923*

جمع‌آوری و خشک کردن نمونه‌های گیاهی

گونه‌های مورد نظر پس از جمع‌آوری از باغ ملی گیاه‌شناسی ایران در اواخر بهار و ابتدای تابستان، در آزمایشگاه گیاهان دارویی مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع دقیقاً شناسایی شدند. اندام انتخابی (گل) برای اسانس‌گیری در سایه و یا توسط دستگاه خشک‌کن برقی در حرارت معمولی (۳۵°-۳۰) خشک و سپس با آسیاب برقی پودر شدند.

روش تقطیر

۵۰۰ گرم اندام خشک شده گیاهان در مخزن مخصوص دستگاه تقطیر با بخار آب قرار گرفت و توسط جریان بخار آب به مدت دو ساعت اسانس‌گیری شد. بازده اسانس اسطوخدوس و مریم‌گلی به ترتیب ۳/۳ و ۰/۶ درصد نسبت به وزن گیاه بود.

نگهداری اسانس‌ها

کلیه اسانس‌ها بلافاصله پس از استخراج در آزمایشات اولیه به عنوان اسانس تازه مورد استفاده قرار گرفتند و سپس در ویال‌های سربسته ریخته و با فویل آلومینیوم پوشانده شدند و در داخل یخچال نگهداری شده 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 اسانسی، اسانس هر نمونه به دستگاه گاز کروماتوگراف (GC) مدل Shimadzu-9A و گاز کروماتوگرافی کوپل با طیف‌سنج (GC/MS) مدل Varian 3400 تزریق گردید. مشخصات ستون عبارت بودند از: DB-1, 60mmX0.25 mm fused silica capillary column با ضخامت

فیلمی ۰/۲۵ میکرون و برنامه دمایی ۵۰ تا ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد با میزان ۴ درجه در دقیقه و دمای ۲۶۰ درجه سانتی‌گراد انژکتور، گاز حامل هلیوم. پس از تزریق اسانس به GC و GC/MS و مشاهده طیف کروماتوگرام که حضور تعداد زیادی ترکیب را نشان می‌داد، با استفاده از زمان بازداری (Rt)، اندیس کواتس (KI)، طیف جرمی و مقایسه با ترکیب‌های استاندارد موجود درکتابخانه اطلاعات کامپیوتری، شناسایی ترکیبات اسانس و تعیین درصد کمی در آنها انجام گردید (جدول ۳). قابل ذکر است که به منظور اطمینان از نتایج حاصله، شناسایی ترکیبات توسط هر دو دستگاه انجام شد و تطبیق طیف‌های به دست آمده، صحت نتایج را ثابت نمود.

بررسی اثرات ضد میکروبی

برای مطالعه اثرات ضد میکروبی از دو روش انتشار (Diffusion test) و رقت (Dilution test) استفاده شد که از میان روش‌های انتشار از روش دیسک پلیت (Disk-plate) و از میان روش‌های رقت از روش رقت لوله‌ای استفاده شد (۹).

در روش دیسک پلیت از کاغذ واتمن شماره ۱، دیسک‌هایی به قطر ۶ میلی‌متر تهیه شد. غلظت سوسپانسیون میکروبی توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (طول موج ۵۸۰nm) اندازه‌گیری و با روش شمارش کلنی از رقت‌های سوسپانسیون اولیه، جمعیت میکروبی به ازای دانسیته اپتیکال (OD_{580} Optical Density) ثبت شده در دستگاه اسپکتروفتومتر، تعیین گردید. از جمعیت اولیه باکتریال، سوسپانسیون محتوی 10^8 باکتری در هر میلی‌لیتر تهیه و سپس رقت‌های ۱/۱۰، ۱/۱۰۰ و ۱/۱۰۰۰ از آن تهیه گردیدند. بعد از کشت میکروب مورد نظر به صورت چمنی در سطح پلیت حاوی محیط کشت مولر ـ هینتون ـ آگار، دیسک‌های استریل تهیه شده را توسط پنس استریل با فاصله مناسب از یکدیگر و از لبه پلیت، روی سطح پلیت آلوده به میکروب قرار داده و بعد از تماس کامل با محیط کشت، با میکروپیپت استریل مقدار ۱۰μL از رقت‌های اسانس 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

برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (Minimal Inhibitory concentration) و حداقل غلظت کشندگی (Minimal Bactericidal concentration)، از روش رقت لوله‌ای استفاده شد (۹). مقدار ۵۰μL اسانس با رقت‌های ۱/۲، ۱/۴، ۱/۸، ۱/۱۶ و ۱/۳۲ در 5mL سوسپانسیون میکروبی محتوی 10^7mL باکتری ریخته شد و بدین ترتیب نسبت‌های $\frac{1}{100}$، $\frac{1}{200}$، $\frac{1}{400}$، $\frac{1}{800}$ و $\frac{1}{1600}$ اسانس در هر میلی‌لیتر سوسپانسیون میکروبی به دست آمد. پس از هم زدن به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در انکوباتور قرار داده شد و سپس به وسیله اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۸۰nm جمعیت میکروبی تعیین و در نتیجه MIC مشخص گردید. سپس از هرکدام از لوله‌ها که رشد جمعیت نشان نداده بودند، ۰/۱mL روی پلیت حاوی نوترینت آگار کشت داده شد تا MBC مشخص گردد.

تأثیر حلال‌ها بر میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه

تأثیر حلال‌های مختلف که در رقیق‌سازی اسانس‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند، بدون رقیق‌سازی خود آنها و بر روی میکروب‌های مورد مطالعه با روش‌های انتشار و رقت آزمایش شد. کلیه رقت‌ها با حلالی که در آزمایشات تأثیر حلال‌ها بر میکروارگانیسم‌ها تأثیر باکتریسیدی یا باکتری استاتیکی نداشت (متانول)، تهیه شدند. در کلیه مراحل آزمایشات از متانول به عنوان شاهد مواد ضد میکروبی استفاده شد.

تهیه رقت‌های مختلف اسانس‌ها

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

مطالعه زمان باکتریسیدی اسانس‌ها

رقت‌های ۱/۱۰، ۱/۱۰۰ و ۱/۱۰۰۰ از سوسپانسیون‌های میکروبی محتوی 10^8 باکتری تهیه و مقدار ۵۰μL اسانس در 5μL سوسپانسیون ریخته شده و در فواصل زمانی ۱۵، ۳۰، ۴۵، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه، مقدار ۱۰μL از هر لوله برداشته پس از رقیق‌سازی به نسبت‌های ۱/۱۰، ۱/۱۰۰ و 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 ثابت شد.

روش آماری

آنالیز واریانس دو طرفه برای مطالعات آماری مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج

اسانس گل‌های اسطوخدوس *(Lavandula angustifolia)* و مریم گلی *(Salvia officinalis)* با روش تقطیر با بخار استخراج شدند و فعالیت ضدمیکروبی آنها بر *E.coli* و *S.aureus* مورد مطالعه قرار گرفت. به دلیل لزوم استفاده از حلال برای تهیه رقت‌های مختلف اسانسی، تأثیر ضدمیکروبی حلال‌های مختلف مطالعه و متانول به دلیل عدم تأثیر ضدمیکروبی به عنوان حلال مطلوب انتخاب شد. تأثیر ضدمیکروبی اسانس‌ها با روش دیسک پلیت در رقت‌های مختلف و در چهار مرحله زمانی متفاوت به صورت اسانس تازه و یک تا سه ماهه مطالعه و اسانس‌ها نسبت به یکدیگر و نسبت به دو میکروارگانیسم *S.aureus* و *E.coli* تفاوت‌هایی نشان دادند (جدول ۱). روغن‌های فرار تازه در رقت‌های ۱، ۱/۲، ۱/۴، ۱/۸ و ۱/۱۶ در برابر سوسپانسیون باکتریال محتوی 10^7 میکروارگانیسم در میلی‌لیتر قرار گرفتند و MIC و MBC آنها تعیین گردید (جدول ۲). اسانس رقیق نشده گل اسطوخدوس مانع رشد *E.coli* و *S.aureus* با ایجاد هاله عدم رشد به ترتیب به قطرهای ۱۶ و ۲۰ میلی‌متر گردید و تا یک ماه پس از اسانس‌گیری خاصیت باکتری سیدال خود را حفظ نمود و اسانس مریم گلی با ایجاد ۱۱ و ۲۳ میلی‌متر هاله عدم رشد به ترتیب در *S.aureus* و *E.coli* به صورت تازه باکتریسیدال بود. اسانس مریم گلی در رقت ۱/۲ در برابر تراکم میکروبی $\frac{10^7}{ml}$ سوسپانسیون *S.aureus* فقط قدرت مهارکنندگی داشت (جدول‌های ۱ و ۲). MIC و MBC اسانس تازه گل اسطوخدوس بر باکتری‌های *S.aureus* و *E.coli* و اسانس تازه مریم گلی بر باکتری *E.coli* مشابه یکدیگر و در تمام غلظت‌های سوسپانسیون میکروبی برابر با ۱ می‌باشد. اسانس تازه مریم گلی در رقت ۱ در برابر کلیه غلظت‌های سوسپانسیون میکروبی باکتریسیدال بوده و در رقت اسانس ۱/۲ و تراکم میکروبی 10^7/ml باکتریوستاتیک و در تراکم‌های میکروبی 10^6/ml و 10^5/ml باکتریسیدال بود. این اسانس در رقت ۱/۴ در برابر کلیه غلظت‌های میکروبی باکتریوستاتیک بود.

جدول ۱: تأثیر رقت‌های مختلف اسانس‌های گل اسطوخدوس *(Lavandula angustifolia)* و گل مریم گلی *(Salvia officinalis)* بر *E.coli* و *S.aureus*

ردیف	رقت / نام گیاه و زمان مطالعه	۱/۱۶		۱/۸		۱/۴		۱/۲		۱	
		Sa	*Ec*	*Sa*	*Ec*	*Sa*	*Ec*	*Sa*	*Ec*	*Sa*	*Ec*
۱	اسانس گل اسطوخدوس تازه	۱۰	R	۱۱	۹	۱۲	۱۰	۱۴	۱۳	۲۰	۱۶
	اسانس گل اسطوخدوس یک ماه پس از اسانس‌گیری	۱۰	R	۱۱	۹	۱۲	۱۰	۱۴	۱۳	۱۹	۱۵
	اسانس گل اسطوخدوس دو ماه پس از اسانس‌گیری	۹	R	۱۰	۹	۱۱	۱۰	۱۳	۱۲	۱۷	۱۴
	اسانس گل اسطوخدوس سه ماه پس از اسانس‌گیری	۹	R	۸	۷	۱۰	۹	۱۲	۱۲	۱۶	۱۴
۲	اسانس مریم‌گلی تازه	۸	R	۱۰	R	۱۵	R	۱۸	۸	۲۳	۱۱
	اسانس مریم‌گلی یک ماه پس از اسانس‌گیری	۷	R	۱۰	R	۱۴	R	۱۷	۸	۲۱	۱۰
	اسانس مریم‌گلی دو ماه پس از اسانس‌گیری	R	R	۹	R	۱۲	R	۱۵	۷	۲۰	۹
	اسانس مریم‌گلی سه ماه پس از اسانس‌گیری	R	R	۷	R	۱۱	R	۱۴	۷	۱۹	۹

اعداد قطر هاله عدم رشد برحسب میلی‌متر را نشان می‌دهند.

E.c=E.coli

Sa=S.aureus

R = مقاوم

جدول ۲: حداقل غلظت‌های مهارکنندگی (MIC) و کشندگی (MBC) اسانس‌های تازه گل اسطوخدوس (*Lavandula angustifolia*) و گل مریم‌گلی (*Salvia officinalis*) بر *E.coli* و *S.aureus* حاوی 10^7 میکروارگانیسم در هر میلی‌لیتر سوسپانسیون میکروبی

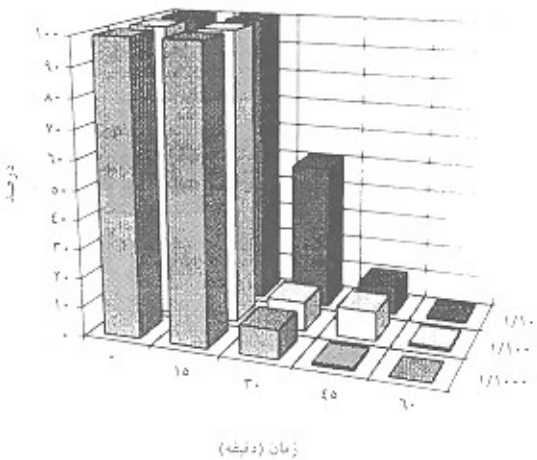
نام گیاه	رقت / آزمایش	۱/۱۶		۱/۸		۱/۴		۱/۲		۱	
		Sa	*Ec*	*Sa*	*Ec*	*Sa*	*Ec*	*Sa*	*Ec*	*Sa*	*Ec*
اسطوخدوس	آنتی‌بیوگرام	۱۰	R	۱۱	۹	۱۲	۱۰	۱۴	۱۳	۲۰	۱۶
	MIC	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	MBC	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
مریم گلی	آنتی‌بیوگرام	۸	R	۱۰	R	۱۵	R	۱۸	۸	۲۳	۱۱
	MIC	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	MBC	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

E.c=E.coli *Sa=S.aureus* R= مقاوم

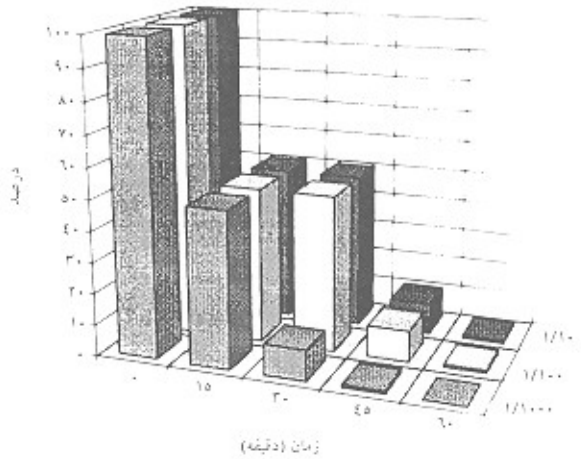
اعداد قطر هاله عدم رشد برحسب میلی‌متر را نشان می‌دهد. - = تأثیرگذاری - = عدم تأثیر

جدول ۳: ترکیبات شیمیایی اسانس‌ها

شماره	ترکیبات اسانس گل اسطوخدوس	درصد	شماره	ترکیبات اسانس گل مریم گلی	درصد
۱	β-Caryophyllene	۰/۴۷	۱	β-Caryophyllene	۱/۶
۲	α-Humulene	۳/۱	۲	α-Humulene	۸/۴
۳	α-pinene	۰/۶۹	۳	α-pinene	۵/۵
۴	β-pinene	۱/۱۴	۴	β-pinene	۱۶
۵	α-Thujene	۰/۰۶	۵	α-Thujene	۶/۴
۶	1,8-Cineole	۱۶	۶	1,8-Cineole	۲
۷	Camphene	۰/۲۷	۷	Camphene	۵
۸	Camphor	۴/۲	۸	Camphor	۲/۹
۹	cis-β-ocimene	۱/۷۴	۹	cis-β-ocimene	۰/۶
۱۰	Linalol	۳۶/۹	۱۰	Linalol	۰/۱
۱۱	P-Cymene	۰/۲۸	۱۱	P-Cymene	۰/۳
۱۲	Terpinene-4-ol	۴/۱۹	۱۲	Terpinene-4-ol	۰/۲۵
۱۳	β-Orneol	۱۱/۵	۱۳	Berneol	۹/۴
۱۴	Linyl acetate	۳/۷	۱۴	Glubulol	۹/۳
۱۵	trans-β-ocimene	۰/۷۴	۱۵	Bernyl acetate	۴/۲
۱۶	Myrcene	۰/۵۸	۱۶	γ-Murolene	۳/۱
۱۷	α-terpineole	۰/۲۷	۱۷	Limonene	۱/۷
۱۸	Geroniol	۰/۱۱	۱۸	β-Gurjunene	۱/۴
			۱۹	Armadendrone	۱/۳
			۲۰	α-Gurjunene	۱/۲
			۲۱	β-Oubene	۰/۸
			۲۲	α-Murolene	۰/۷
			۲۳	γ-Terpinene	۰/۶
			۲۴	Micane	۰/۵
			۲۵	Thujene	۰/۴
			۲۶	trans-Sabinene hydrate	۰/۳
			۲۷	Tricyclene	۰/۳
			۲۸	α-Terpinene	۰/۲
			۲۹	cis-Sabinene hydrate	۰/۲
			۳۰	Octane-3-ol	۰/۲
			۳۱	Terpinolene	۰/۲



نمودار ۱: تأثیر رقت ۱ اسانس تازه گل اسطوخدوس (*Lavandula angustifolia*) بر غلظت‌های مختلف *S.aureus*
تعداد باکتری در هر میلی‌لیتر سوسپانسیون اولیه برابر 10^8 می‌باشد.



نمودار ۲: تأثیر رقت ۱ اسانس تازه گل مریم گلی (*Salvia officinalis*) بر غلظت‌های مختلف *S.aureus*
تعداد باکتری در هر میلی‌لیتر سوسپانسیون اولیه برابر 10^8 می‌باشد.

رقت‌های باکتریسیدال هر کدام از روغن‌های فرار تازه در برابر سه رقت 10^7، 10^6 و 10^5 در میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتریال قرار داده شدند تا درصد میکروب‌کشی آنها در زمان‌های مختلف به دست آید. هر دو اسانس به صورت رقیق نشده رقت‌های مختلف سوسپانسیون *E.coli* را بطور مشابه و در عرض ۱۵ دقیقه کشتند ولی نسبت به *S.aureus* تفاوت‌هایی نشان دادند (نمودارهای ۲ و ۱). تجزیه و شناسایی ترکیبات اسانس‌ها، ۱۸ ترکیب از اسانس گل اسطوخدوس و ۳۱ ترکیب از اسانس گل مریم گلی را نشان داد (جدول ۳).

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه اسانس گل اسطوخدوس تأثیر ضد میکروبی بیشتری بر روی *E.coli* نسبت به اسانس گل مریم گلی داشت و مریم گلی نیز تأثیر ضدمیکروبی بیشتری بر روی *S.aureus* نسبت به اسانس گل اسطوخدوس داشت. متغیر بودن فعالیت‌های ضد میکروبی روغن‌های اسانسی بر روی *E.coli* را Chalchat و همکارانش (۱۹۸۷) با سایر روغن‌های فرار گزارش کرده‌اند (۴) و مطالعه حاضر نیز نتیجه‌گیری آنان را تأیید می‌کند. اختلاف اسانس‌ها در اندازه قطر هاله‌های ممانعت رشد میکروب‌ها، علاوه بر متغیر بودن تأثیر اسانس‌ها بر میکروارگانیسم‌های مختلف، تأثیر عوامل دیگری مانند اندازه ملکولی و نفوذپذیری مواد ضدمیکروبی را تأیید می‌کند (۳،۱۸). گذشت زمان تأثیر ضدمیکروبی اسانس‌ها را کاهش می‌دهد. آنالیز واریانس دوطرفه مبتنی بر اندازه قطر هاله‌های عدم رشد میکروبی (جدول ۱) نیز نشان داد که گذشت زمان در قدرت ضدمیکروبی اسانس‌ها تأثیر دارد. از آنجایی که اندازه قطر هاله‌های عدم رشد دقیقاً نمی‌تواند بیانگر MIC و MBC باشد، پس ایجاب می‌نماید که آزمایشات تعیین حداقل غلظت‌های مهارکنندگی (MIC) و کشندگی (MBC) با روغن‌های اسانسی تازه در رقت‌های مختلف انجام و بررسی شوند. مقایسه اثر ضد باکتریایی، اسانس گل مریم گلی در برابر سوسپانسیون *S.aureus* را مؤثرتر از اسطوخدوس نشان داد در حالی که در تأثیر ضد مالاریایی روغن‌های فرار اسطوخدوس مؤثرتر از مریم گلی گزارش شده است (۱۰). این اختلاف تأثیر روغن‌های فرار بر عوامل بیماری‌زا، نشان دهنده ترکیبات شیمیایی متفاوت و خاص آنها نسبت به یکدیگر و نسبت به عوامل بیماری‌زا است.

مطالعه تأثیر ضدمیکروبی روغن‌های فرار گیاهان فوق و زمان تأثیرگذاری آنها بر سه رقت از 10^8 باکتری در هر میلی‌لیتر سوسپانسیون میکروبی نشان می‌دهد که از نظر زمانی خاصیت ضدمیکروبی اسانس‌ها سریع بوده و در عرض ۳۰ دقیقه پس از مواجهه با میکروب‌ها، باعث مرگ آنها می‌شوند (نمودارهای ۲ و ۱). افزایش رقت اسانس‌ها از تأثیر ضدمیکروبی آنها در برابر *S.aureus* می‌کاهد که این موضوع ارتباط مستقیم بین غلظت و فعالیت ضدمیکروبی اسانس‌ها علیه میکروارگانیسم‌های مورد آزمایش را توجیه می‌کند. این اختلاف بر اساس غلظت میکروبی قابل توجیه است. King و همکارانش

(۱۹۷۲) نشان دادند که آنتی‌بیوتیک بیشتری در برابر غلظت میکروبی زیاد، لازم است (۷). این موضوع با روغن‌های اسانسی نیز نشان داده شده است (۱۲) و مطالعه حاضر نتایج فوق را تأیید می‌کند. به دلیل اختلاف ساختاری در دیواره باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی، به نظر می‌رسد که باکتری گرم منفی *E.coli* تأثیرپذیری بیشتری نسبت به باکتری گرم مثبت *S.aureus* در مواجهه با اسانس‌ها دارد که می‌تواند در ارتباط با ترکیبات شیمیایی روغن‌های فرار باشد. تجزیه و شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس‌ها (جدول ۳) نشان می‌دهد که هر دو اسانس در دوازده ترکیب β-pinene, α-Humulene, β-Caryophyllene Camphor, 1,8-Cineole, α-Thujene, α-pinene, Linalol, Terpinene-4-ol, p-Cymene, cis-β-ocimene, Camphene, مشترک هستند که از این میان p-Cymene و Terpinene-4-ol جزو ترکیبات آروماتیک، β-Caryophyllene جزو سزکوئی‌ترپن‌ها و مابقی از مونوترپن‌ها هستند. بدین ترتیب بیش از ۷۰ درصد ترکیبات اسانس گل اسطوخدوس با ترکیبات اسانس گل مریم گلی از نظر نوع ترکیب مشابه هستند. Linalol که یک ترکیب مونوترپنی اکسیژنه می‌باشد، با ۳۶/۹ درصد نه تنها بیشترین مقدار در بین دوازده ترکیب مشترک فوق بلکه در بین کل ترکیبات اسانس گل اسطوخدوس را دارد. β-pinene با ۱۶ درصد نه تنها بالاترین مقدار از ترکیبات مشترک اسانس گل مریم گلی بلکه بالاترین مقدار نسبت به ترکیبات مونوترپنی دیگر و نیز بیشترین مقدار از مجموع ۳۲ ترکیب اسانس گل مریم گلی را داراست. ترکیبات عمده اسانس گل مریم گلی عبارت بودند از (۱۶٪) β-pinene (۹/۴٪)، Berneol (۹/۳٪)، Glubulol (۸/۴٪)، α-Humulene (۶/۴٪) α-Thujene (۵/۵٪) α-pinene و (۵٪) Camphene. ترکیبات عمده اسانس گل اسطوخدوس عبارت بودند از (۳۶/۹٪) Linalol، (۱۶٪) 1,8-Cineole، (۱۱/۵٪) β-Orneol (۴/۲٪) Camphor و (۴/۱۹٪) Terpinene-4-ol. به نظر می‌رسد که تأثیر میکروب‌کشی اسانس‌ها در ارتباط با ترکیبات مونوترپنی باشد. تحقیقات Lis-Balchin و همکارانش (۱۹۹۸) نشان می‌دهد که 1,8-Cineole قدرت میکروب‌کشی نداشته و از طرف دیگر خاصیت ضد میکروبی گیاهان حاوی α-pinene را تأیید می‌کند (۸). در این مطالعه نیز اسانس اسطوخدوس حاوی ۱۶٪ 1,8-Cineole بوده و اسانس مریم گلی ۵/۵ درصد α-pinene و ۱۶٪ β-pinene دارد، در مقابل اسانس اسطوخدوس دارای ۳۶/۹٪ Linalol می‌باشد و با توجه به خاصیت تقریباً یکسان ضد میکروبی هر دو اسانس می‌توان استنباط نمود که نسبت‌های متفاوت ترکیبات شیمیایی اسانس‌ها، خاصیت ضد میکروبی یکدیگر را به تعادل مساوی رسانده است.

با توجه به محدودیت‌های روزافزون استفاده از مواد شیمیایی ضدمیکروبی مانند عوارض جانبی و ایجاد مقاومت‌های دارویی و نظر به قابلیت کاربردی مؤثر استفاده از مواد طبیعی با منابع غنی موجود در داخل کشور، به نظر می‌رسد روغن‌های فرار، زمینه بسیار مناسبی برای مطالعه به عنوان جایگزین بهتر مواد فوق در حفظ مواد خوراکی، کنترل بیماری‌های انسانی و حیوانی باشند.

سپاسگزاری

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

Summary

A Study on Antimicrobial Activity and Chemical Compositions of Essential Oils from Flowers of *Lavandula angutifolia and Salvia Officinalis*

I. Rasooli, PhD[1]., and MB. Rezaei, PhD.[2]

1. Assistant Professor of Microbiology, Biology Dept. Shahed University, 2. Assistant Professor of Chemistry, Institute for Research in Forrests and Rangelands, Tehran, Iran

*Chemical composition and antimicrobial effects on **E.coli** and **S.aureus** of essential oils from **Lavandula angustifolia** and **Salvia officinalis** were studied. Disk diffusion method was conducted to evaluate the zone of microbial growth inhibition at 1, 1:2, 1:8 and 1:16 dilutions of the essential oils at four stages of zero (fresh oil), 1,2 and 3 months post-exreaction. The antimicrobial effect was also studied*

against 10^7/ml, 10^6/ml and 10^5/ml concentrations of microbial cells to find out Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and Minimal Bactericidal Concentration (MBC). The essential oils were bactericidal against both the micro organisms. Comparatively, Gram negative bacterium. ***E.coli,*** *was readily affected by the essential oil of* ***Lavandula angustifolia*** *and* ***S.aureus*** *was redily affected by the essential oil of* ***Salvia officinalis.*** *Chemical composition of the essential oils were analyzed by Gas Chromatography and Mass Spectrometry (GC and GC/MS). Twelve common chemical compounds of* ***α-Humulene, α-pinene, β-pinene, α-Thujene, 1,8-Camphene, Camphor, Cis-β-ocimene, Linalool, p-Cymene*** *and* ***Terpinene-4-ol*** *were found at various concentrations in both the oils, most of which were monoterpenes. Major components of essential oil of* ***Salvia officinalis*** *were* ***β-pinene*** *(16%),* ***Berneol*** *(9.4%),* ***Glubulol*** *(9.3%),* ***α-Humulene*** *(8.4%),* ***α-Thujene*** *(6.4%),* ***α-pinene*** *(5.5%),* ***Camphene*** *(5%), and those of* ***Lavandula angustifolia*** *were* ***Linalol*** *(36.9%),* ***1,8-Cineole*** *(16%),* ***β-Orneol*** *(11.5%),* ***Camphor*** *(4.2%) and* ***Terpinene-4-ol*** *(4.19%). It seems that monoterpenes give antibacterial property to the essential oils.*

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2000; 7(4): 173-181
Key Words: Lavandula angustifolia, Salvia officinalis, *Antimicrobial, Essential oils*

References

1. Bagci E and Digrak M. Antimicrobial activity of essential oils of some Abies (Fir) species from Turkey. *Flav and Fragr J* 1996; 11: 251-256.
2. Bastide P, Malhuret R, Chalchat JC, Garry Ph and Michet A.Correlation composition ebimique/activite antimicrobienne. II. Activite de trois builes essentielles de resineux visa-a-vis de deux souches bacteriennes. *Plant Med Phytother* 1987; 21: 209-217.
3. Black JG: Microbiology, Principles and Applications. 3rd ed., Prentice Hall International Editions, 1996; pp366-369.
4. Chalchat JC, Garry R. Ph, Michet A, Bastide P and Malhuret R. Plantes Medicinales et Phytotherapie. 1987; 21: 218.
5. Chalchat JC, Garry RP, Menut C, Lamaty G, Malhuret R and Chopineau J. Correlation between chemical composition and antimicrobial activity VI. Activity of some African essential oils. *J Essent Oil Res* 1997; 9: 67-75.
6. Chao SC, Young DG and Oberg CJ. Effect of a diffused essential oil blend on bacterial bioaerosols. *J Essent Oil Res* 1998; 10: 517-523.
7. King AD, Bayne HG, Jurd L and Case C. Antimicrobial properties of natural phenols and related compounds: Obtusastyrene and dihydroobtusastyrene. *Antimicrobial agents and Chemotherapy* 1972; 1: 263-267.
8. Lis Balchin M, Deans SG and Eaglesham E. Relationship between bioactivity and chemical composition of commercial essential oils. *Flav and Fragr J* 1998; 13: 98-104.
9. McKane L and Kandel J: Microbiology, essentials and Applications. 2nd ed., McGraw Hill, 1996; pp397-403.

10. Milhau G, Valentin A, Benoit F, *et al. In* oils. *J Essent Oil Res* 1997; 9: 329-333.
11. Piccaglia R, Marotti M and Galletti GC. Characterization of essential oil from a Satureja montana L. Chemotype grown in northern Italy. *J Essent Oil Res* 1991; 3: 147-152.
12. Remmal A, Tantaoui Elaraki A, Bouchikhi T, Rhayour K and Ettayebi M. New developments in methodology to study essential oils antimicrobial activity in agar medium. *J Essent Oli Res* 1993; 5: 179-184.
13. Rhyu HY. Gas chromatographic characterization of sages of various geographic origins. *J Food Sci* 1979; 44: 758-762.
14. Roussis V. Identification and bacteriostatic activity of the essential oil of Lamium garganicum L. ssp Laevigatum Arcangeli. *J Essent Oil Res* 1996; 8: 291-293.
15. Sharma K and Aanand P. Photochemical and biochemical changes in wheat seedlings exposed to supplementary U.V. radiation. *Plant Science* 1998; 132: 21-30.
16. Singh HB and Handique AK. Antifungal activity of the essential oil of Hyptis suaveolens and its efficacy in biocontrol measures in combination with Trichoderma harzianum. *J Essent Oil Res* 1997; 9: 683-687.
17. Tiziana Baratta M, Damien Dorman HJ, Deans SG, Cristina Figueiredo A, Barroso JG and Giuseppe Ruberto. Antimicrobial and antioxidant properties of some commerical essential *Oils. Flav and Fragr J* 1998; 13: 235-244.
18. Wistriech GA: Microbiology Laboratory. Prentice Hall, 1997; pp319-325.