نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۸، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۳، ص. ۴۹۵-۴۸۷
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Journal of Horticultural Science
Vol. 28, No. 4, Winter 2015, P. 487-495
ISSN: 2008 - 4730

بررسی ترکیبات مؤثره و اثرات ضد باکتریایی اسانس کرفس کوهی (*Kelussia odoratissima* Mozaff) و کلپوره (*Teucrium polium*) بر برخی از پاتوژن‌های مواد غذایی

منصور مشرقی[۱]- مجید عزیزی[۲*]- فاطمه عروجعلیان[۳]- ناصر شاه طهماسبی[۴]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۱/۱۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۱/۰۱

چکیده

در این تحقیق اسانس کرفس کوهی (*Kelussia odoratissima* Mozaff) و کلپوره (*Teucrium polium*) به روش تقطیر با آب استخراج گردید. اسانس‌های بدست آمده با استفاده از دستگاه گاز کروماتوگراف (GC) و گاز کروماتوگراف متصل به طیف نگار جرمی (GC/MS) آنالیز شد و اجزای آن‌ها بر اساس شاخص بازداری و طیف جرمی تعیین گردید. سپس با استفاده از روش میکرودایلوشن (ریز رقت) و با استفاده از دستگاه خواننده الایزا خاصیت ضد باکتریایی اسانس‌های 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* O157H7 و *Salmonella enterica* و *Pseudomonas aeruginosa* بررسی شد. نتایج بدست آمده نشان داد که در کرفس کوهی اجزای مهم اسانس شامل (Z)-ligustilide، (Z)-3-butylidene-phthalide، α-phellandrene، limonene و germacrene B بود. اجزای مهم اسانس کلپوره شامل β-caryophylene، Germacrene D، γ-cadinene، (Z)- nerolidol، camphor، β-pinene، α- camphene، linalool و α-humulene بود. MIC اسانس کرفس کوهی بین ۰/۳۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (مربوط به استافیلوکوکوس اورئوس) تا ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (سالمونلا انتریکا) متغیر بود در حالی‌که MIC اسانس کلپوره برابر ۰/۱۶ (مربوط به استافیلوکوکوس اورئوس) تا ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (مربوط به سالمونلا انتریکا) بود. با توجه به نتایج بدست آمده به نظر می‌رسد استفاده از گیاهان دارویی بومی در راستای کنترل موثر پاتوژن‌های مواد غذایی به عنوان یک روش مکمل که در عین حال اثر نامطلوب کم‌تری بر خواص ارگانولپتیکی داشته باشند سودمند باشد.

واژه‌های کلیدی: کرفس کوهی، کلپوره، خواص ضد باکتریایی، روش ریز رقت

مقدمه

غذاهای آلوده به باکتری‌های پاتوژن و یا انتروتوکسین‌های تولید شده توسط باکتری‌های مهمی چون *E. coli*، *Staphylococcus aureus* و برخی قارچ‌ها مسوول عفونت دستگاه گوارش می‌باشند (۱۹). استفاده نامناسب از آنتی بیوتیک‌ها و عدم رعایت دوز توصیه شده منجر به گسترش مقاومت باکتریایی به آنتی بیوتیک‌ها گردیده است (۱۶). این امر نیاز به کشف و استفاده از ترکیبات طبیعی دارای خاصیت ضد میکروبی را دو چندان نموده است. استفاده از گیاهان دارویی بومی هر منطقه در درمان بیماری‌ها و هم‌چنین استفاده از آن‌ها در صنایع غذایی سابقه طولانی دارد بخصوص این‌که اثرات آنتی‌اکسیدانی گیاهان دارویی بومی ایران اثبات گردیده است (۹ و۱۰). اثرات ضد میکروبی متابولیت‌های ثانویه گیاهی مانند اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی نیز مورد بررسی قرار گرفته‌اند (۲۶) و مشخص شده است که اغلب اسانس‌های گیاهی استخراج شده از گیاهان دارای خواص حشره‌کشی، ضد قارچی، ضد انگل، ضد باکتری، ضد ویروس، آنتی اکسیدانت و سیتوتوکسیک می‌باشند (۱۵). بنابراین اسانس‌های گیاهی در زمینه‌های فارماکولوژیکی، داروشناسی گیاهی، میکروبیولوژی پزشکی و کلینیکی، فیتوپاتولوژی و نگهداری مواد غذایی غربالگری شده و مورد استفاده قرار گرفته اند (۴). از این مواد علاوه بر جلوگیری از رشد باکتری‌ها و کپک‌های آلوده کننده مواد

۱- دانشیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد
۲- استاد گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: Email: azizi@um.ac.ir)
۳- دانشجوی دکتری نانوبیوتکنولوژی گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران
۴- استاد گروه فیزیک، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد

غذایی، به منظور افزایش عمر نگهداری غذاهای فرایند شده در سیستم غذایی استفاده می‌شود (۳ و ۱۳).

کرفس کوهی (*Kelussia odoratissima* Mozaff) از تیره چتریان بوده و در زبان فارسی کلوس نامیده می‌شود. این گیاه چند ساله و بسیار معطر است. ساقه آن به ارتفاع ۱۲۰ تا ۲۰۰ سانتی‌متر می‌رسد و استوانه ای شکل با برگ‌های قاعده‌ای و بزرگ است (مظفریان، ۱۳۸۶). این گیاه در ارتفاعات و مناطق برف‌گیر ناحیه زاگرس مرکزی و با حداقل ارتفاع ۲۵۰۰ متر از سطح دریا و بارش سالیانه حدود ۴۰۰ میلی‌مترکه اغلب به صورت برف است، می‌روید. ازعمده ترین رویشگاه‌های طبیعی این گیاه می‌توان به ارتفاعات کوه‌های سه منطقه کوهرنگ, بازفت و دوآب صمصامی در استان چهار محال و بختیاری اشاره کرد. تحقیقات صورت گرفته نشان داده‌اند که کرفس کوهی در کاهش چربی خون و کاهش اسید معده (۲۳ و ۲۵)، تقویت نگهداری اطلاعات در حافظه در بیماران دیابتی (۲۱) مؤثر است. خواص ضد باکتریایی گیاهان دارویی خانواده کرفس نیز مورد تأکید قرار گرفته است (۱۹).

کلپوره (*Teucrium polium*) گیاهی معطر از خانواده نعنائیان است که در مناطق فقیر از نظر مواد غذایی و مواد آلی، سواحل سنگلاخی و ماسه‌زار نواحی مختلف اروپا، مدیترانه، شمال آفریقا و جنوب غربی آسیا از جمله ایران می‌روید. این گونه دارویی به صورت وحشی در بعضی مناطق ایران از جمله خراسان نیز مشاهده می‌شود. کلپوره دارای اسانس است و اسانس‌ها اغلب از خود خاصیت ضد باکتریایی نشان می‌دهند ولی دامنه تأثیر آن‌ها بستگی زیادی به اجزای اسانس دارد (۳). از این گیاه در درمان بیماری‌هایی مانند بیماری‌های گوارشی و سرماخوردگی استفاده می‌گردد. اثرات ضد میکروبی این گیاه بر مراحل رشد باکتری *E.coli* O157 :H7 به روش اسپکتروفتومتری مورد بررسی قرار گرفته است (۱۷).

اثرات ضد باکتریایی اسانس‌ها به روش‌های متفاوتی مورد بررسی قرار می‌گیرند. با توجه به احتمال تأثیر اسانس‌ها بر خواص ارگانولپتیکی مواد غذایی (۳)، تعیین دقیق MIC[1] آن‌ها با استفاده از روش ریز رقت به منظور به حداقل رساندن میزان مصرف این مواد در صنایع غذایی و هم‌چنین غلبه بر مقاومت باکتریایی مورد توجه می‌باشد. از طرف دیگر اجزای اسانس بر خواص باکترایی آن نیز تأثیر دارد لذا در این تحقیق اثرات ضد باکتریایی و اجزای اسانس دو گیاه دارویی فوق علیه برخی باکتری‌های آلوده کننده مواد غذایی رایج مانند *Staphylococcus aureus*، *Bacillus cereus*، *Listeria monocytogenes*، *Escherichia coli* O157:H7 و *Salmonella enterica* مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

پیکر رویشی کرفس کوهی و کلپوره بترتیب از مرکز تحقیقات کشاورزی اصفهان (مربوط به منطقه فریدن استان اصفهان) و دانشگاه فردوسی مشهد تهیه گردید و سپس نمونه‌های فوق در هرباریوم دانشگاه فردوسی مشهد تایید گردید و از هر گیاه یک نمونهٔ تایید شده در هرباریوم نگهداری شد.

سویه‌های باکتری‌های مورد آزمایش

در این تحقیق با توجه به عوامل مهم مسمومیت زای مواد غذایی از هر دو گروه باکتری گرم مثبت و گرم منفی استفاده گردید. از باکتری‌های گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس (PTCC 1431)، باسیلوس سرئوس (PTCC 1247)، لیستریا منوسایتوژنز (PTCC 1298) و از باکتری‌های گرم منفی ایشرشیا کولی O157H7 (ATTC 700728) و سالمونلا انتریکا (PTCC 1709) و سودوموناس آئروجینوزا (PTTC 1074) انتخاب شدند. باکتری‌های مورد نظر از ذخیره 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) کشت شدند و برای اثبات خلوص کلنی‌ها آزمایشات PCR انجام گردید.

استخراج اسانس

از هر نمونه گیاهی ۲۵۰ گرم بطور دقیق وزن شد و در یک آسیاب کاملاً خرد گردید و بر اساس روش توصیه شده در فارماکوپه بریتانیا (۱۹) و به روش تقطیر با آب با استفاده از دستگاه اسانس‌گیر[2]، طی ۴ ساعت اسانس‌گیری انجام شد. پس از خارج نمودن اسانس از کلونجر و جداسازی آب همراه آن با سورنگ شیشه‌ای با استفاده از سولفات سدیم خشک آبگیری و تا زمان استفاده در شیشه‌های تیره و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

آنالیز اسانس با استفاده از GC و GC/MS

ترکیبات موجود در اسانس‌ها با استفاده از دستگاه‌های گازکروماتوگراف (GC) و گاز کروماتوگراف متصل به طیف نگار جرمی (GC/MS) با مشخصات زیر شناسایی گردید.

گاز کروماتوگراف مدل شیماتزو مجهز به دتکتور FID و ستون BP5 با طول ۲۵ متر و قطر داخلی ۰/۲۲ میلی‌متر و ضخامت فیلم

1- Minimum inhibition concentration

2- Clevenger

۰/۲۵ میکرومتر بود. شرایط دستگاه شامل دمای آون ۶۰ تا ۲۶۰ درجه سانتی‌گراد با دامنه ۸ درجه در دقیقه، دمای تزریق ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد، نسبت اختلاط ۱ به ۱۰، گاز حامل ازت و دمای دتکتور ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد بود. کروماتوگراف متصل به طیف نگار جرمی مدل Varian شامل یک گاز کروماتوگراف Varan Star 3400 مجهز به ستون‌های مویینه DB5 با قطر داخلی ستون ۰/۲۵ میلی‌متر، ضخامت فیلم ۰/۲۵ میکرومتر و طول ستون ۳۰ متر و شرایط دستگاه شامل دمای آون از ۶۰ تا ۲۴۰ در جه سانتی‌گراد با سرعت ۳ میلی‌متر در دقیقه، دمای تزریق ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد، نوع تزریق کننده اسپلیت با گاز حامل هلیم با سرعت ۲ میلی‌لیتر در دقیقه بود. طیف نگار جرمی مدل EI ، پتانسیل یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت، دمای منبع یون ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد، جریان یونیزاسیون ۱۰۰۰ میکرو آمپر با رزولوشن ۱۰۰۰ و دامنه جرمی ۴۰ تا ۳۰۰ بود (۱).

تشخیص اجزای اسانس

اجزای اسانس با کمک شاخص بازداری بدست آمده در مقایسه با تزریق یک سری از آلکان‌ها (Sigma, UK) با ستون DB5 ، مقایسه با طیف‌های ترکیبات استاندارد، تشخیص طیف جرمی و الگوی شکست گزارش شده در منابع معتبر و مقایسه کامپیوتری اطلاعات جرمی به کمک بانک اطلاعاتی (ساترن ویرایش ۴) صورت گرفت (۱). درصد نسبی هر یک از اجزای متشکله اسانس با روش سطح زیر منحنی تعیین شد.

تعیین خاصیت ضد باکتریایی

سنجش میزان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) با استفاده از روش ریز رقت[1]

مقادیر حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) بر اساس منابع (۶ و ۲۱) تعیین گردید. برای این منظور از سویه‌های باکتریایی 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 ذخیره از اسانس‌ها و مواد استاندارد ضد میکروب مانند آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل و اسید آلی آسکوربیک اسید در DMSO[2] تهیه شد.

سریال‌های رقت از اسانس‌های کرفس کوهی و کلپوره با استفاده از محیط کشت مولر هینتون براث از ۱۰ میلی‌گرم در میلی لیتر تا ۰/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تهیه شدند و ۷۰ میکرولیتر از آن‌ها به میکروتیترپلیت‌های ۹۶ خانه‌ایی که قبلاً حاوی ۷۰ میکرولیتر محیط کشت MHB بودند اضافه گردید. سپس ۷۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی معادل استاندارد ۰/۵ مک فارلند که حاوی 10^8 باکتری در هر میلی‌لیتر[3] بود، به میکروتیترپلیت‌ها اضافه گردید. 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 منفی (شامل MHB، DMSO و اسانس مورد آزمایش) صورت گرفت. نمونه ها به مدت ۲۲-۲۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در گرم‌خانه نگهداری شدند. سپس میکروتیترپلیت‌ها با استفاده از دستگاه قرائت گر الایزا در طول موج ۶۳۰ نانومتر بررسی و اولین چاهک بدون کدورت به عنوان حداقل غلظت بازدارنده (MIC) ، به صورت میلی‌گرم بر میلی‌لیترگزارش شد. تمام آزمایشات حداقل برای سه با تکرار گردید و داده‌های بدست آمده، به عنوان نتایج MIC ارائه گردید (جدول ۳).

سنجش میزان حداقل غلظت کشندگی[4] (MBC)

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

نتایج

بررسی اجزای اسانس

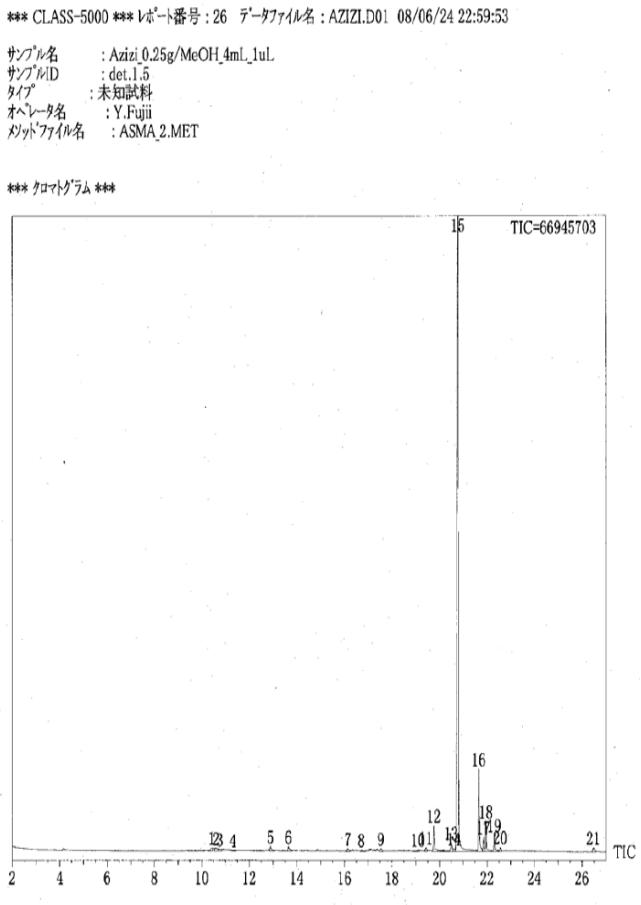
اجزای اسانس کرفس کوهی: نتایج حاصل از استخراج اسانس نشان داد که پیکر رویشی این گیاه حاوی ۰/۶۷ تا ۰/۷۵ درصد (حجمی به وزنی) اسانس است. در آنالیز اسانس کرفس کوهی به روش GC/MS (شکل ۱) ۲۳ ترکیب تشخیص داده شد که معادل ۸۹/۶۴ درصد کل اسانس بود (جدول ۱). در بین این ترکیبات بیش‌ترین سهم برابر ۵۴/۱۱ درصد و مربوط به (Z)-ligustilide بود. این در حالی بود که میزان (E)-ligustilide بسیار کم‌تر و برابر ۰/۵۷ درصد از اسانس بود. دومین ترکیب مهم در اسانس این گیاه (Z)-3-butylidene-phthalide است که بیش از ۱۴ درصد حجم اسانس را تشکیل داد. مشتقات فتالئید که مجموع این سه ترکیب می‌باشند برابر ۶۸/۶۸ درصد بدست آمد. در اسانس کرفس کوهی مجموع اجزای βphellandrene+ limonene نزدیک به ۶/۵ درصد حجم اسانس را تشکیل دادند که این دو از نظر درصد در رتبه سوم

1- Microdilution assay
2- Dimethyle sulfoxide

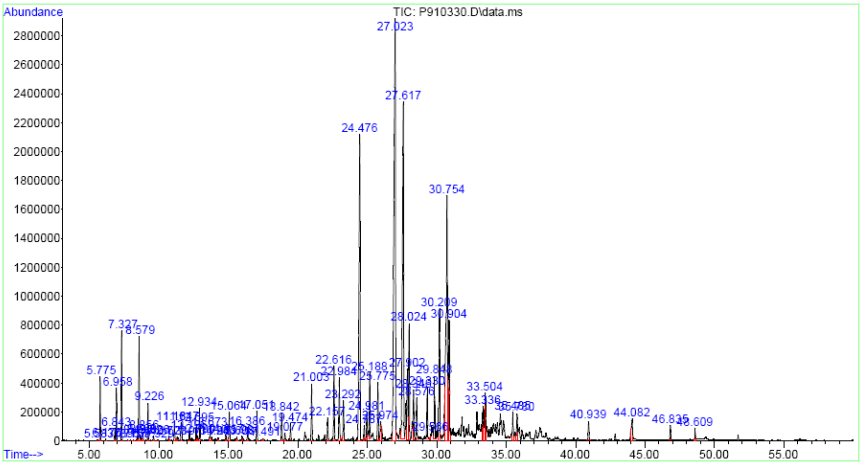
3 -108 colony forming units (cfu/ml) (according to Mc Farland turbidity standards)
4 - Minimum bactericidal concentration

قرار داشتند. میزان germacrene B در اسانس این گیاه نزدیک به ۲/۵ درصد بدست آمد.

اجزای اسانس کلپوره: نتایج حاصل از بررسی اجزای اسانس کلپوره در شکل ۲ و جدول ۲ آورده شده است. این جدول نشان می‌دهد که در مجموع ۳۲ ترکیب در اسانس کلپوره تشخیص داده شده است که در مجموع ۹۴ درصد اسانس بود.



شکل ۱- کروماتوگرام اسانس کرفس کوهی. درصد قابل توجهی از اسانس (Z)-ligustilide (پیک شماره ۱۵) است.



شکل ۲ - کروماتوگرام اسانس کلپوره. ترکیبات اصلی اغلب در زمان ۲۰ تا ۳۵ دقیقه از ستون خارج شده‌اند.

جدول ۱- اجزای اسانس کرفس کوهی به همراه شاخص کواتس و درصد نسبی هر یک از اجزا با استفاده از ستون DB5

ردیف	نام ترکیب[a]	شاخص کواتس[b]	میزان (درصد)
۱	α-thujene	۹۳۱	۰/۲۳
۲	β-felchene	۹۴۶	۰/۱۰
۳	thuja-2,4(10)-diene	۹۵۰	۰/۱۰
۴	*para*-mentha-1(7),8-diene	۱۰۰۱	۰/۳۵
۵	β-phellandrene	۱۰۰۴	۰/۱۴
۶	ocymene	۱۰۲۲	۰/۲۰
۷	limonene +α-phellandrene	۱۰۲۷	۶/۳۶
۸	α-terpinene	۱۰۵۴	۰/۱۱
۹	*n*-pentyl isobutyrate	۱۰۵۶	۰/۶۱
۱۰	Citronellol	۱۲۲۷	۰/۷۶
۱۱	α-cubebene	۱۳۴۷	۰/۲۲
۱۲	citronellyl acetatet	۱۳۵۳	۰/۶۱
۱۳	α-muurolene	۱۴۸۰	۱/۸۲
۱۴	Unknown	۱۵۲۳	۰/۹۷
۱۵	germacrene B	۱۵۵۶	۲/۸۰
۱۶	Unknown	۱۶۵۱	۲/۴۵
۱۷	(*Z*)-3-butylidene-phthalide	۱۶۷۲	۱۴/۳۷
۱۸	Khusinol	۱۶۸۲	۰/۴۸
۱۹	Unknown	۱۷۱۵	۱/۴۷
۲۰	(*E*)-3-butylidene-phthalide	۱۷۲۶	۰/۵۵
۲۱	(*Z*)-ligustilide	۱۷۳۸	۵۴/۱۱
۲۲	14-hydroxy-α-muurolene	۱۷۶۵	۰/۲۶
۲۳	(*E*)-ligustilide	۱۷۹۴	۰/۵۷
	Total		۸۹/۶۴

a ترکیبات لیست شده بترتیب خروج از ستون DB5 ردیف شده‌اند

b اندیکس کواتس نسبت به آلکان‌های نرمال C9 تا C24 از ستون DB5 محاسبه شده‌اند

در این بین β-caryophylene (۷/۹۴ درصد)، Germacrene D (۷/۳۶ درصد)، γ-cadinene (۶/۲۶ درصد)، (Z)- nerolidol (۶/۲۳ درصد)، camphor(۶/۲۱ درصد)، β-pinene (۶/۰۹ درصد)، α- camphene (۵/۷۳ درصد)، linalool (۴/۷۵ درصد) و α- humulene (۴/۴۰ درصد) نزدیک به ۵۵ درصد اسانس را به خود اختصاص دادند.

خاصیت ضد باکتریایی اسانس‌ها

در این تحقیق خاصیت ضدباکتریایی اسانس گیاهان کرفس کوهی و کلپوره در شرایط درون شیشه‌ای علیه چندین باکتری پاتوژن مواد غذایی یاد شده، با استفاده از روش ریزرقت مورد آزمایش قرار گرفت. خواص ضدباکتریایی اسانس‌های مورد بررسی با تعیین مقادیر MIC و MBC گزارش شد. نتایج این بخش از تحقیق در جدول ۳ آورده شده است. این نتایج نشان می‌دهند که بین اسانس‌های مورد آزمایش اختلاف قابل توجهی از نظر خاصیت ضدباکتریایی وجود دارد.

حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) اسانس کرفس کوهی علیه باکتری‌های گرم مثبت مورد بررسی در این تحقیق بین ۰/۳۸تا ۱/۲۵ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر بدست آمد در حالی‌که MIC این اسانس برای باکتری‌های گرم منفی بین ۰/۶۲ تا ۲/۵ میلیگرم در هر میلی‌لیتر بود. حساس‌ترین باکتری در بین باکتری‌های مورد آزمایش در این تحقیق به اسانس کرفس کوهی *S. aureus* با MIC برابر ۰/۳۱ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر و مقاوم‌ترین باکتری به این اسانس *S. enterica* با MIC برابر ۲/۵ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر حاصل شد. حداقل غلظت کشندگی (MBC) اسانس کرفس کوهی علیه باکتری‌های گرم مثبت بین ۰/۶۲تا ۱/۲۵ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر و برای باکتری‌های گرم منفی بین ۰/۷۵ تا ۲/۵ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر حاصل شد.

جدول ۲- اجزای اسانس کلپوره به همراه شاخص کواتس و درصد نسبی هر یک از اجزا با استفاده از ستون DB5

ردیف	نام ترکیب[a]	شاخص کواتس[b]	میزان (درصد)
۱	(E)-2-hexenal	۸۵۲	۰/۲۳
۲	α-pinene	۹۲۹	۲/۵۲
۳	α- camphene	۹۵۲	۵/۷۳
۴	Sabinene	۹۶۵	۰/۶۴
۵	1-octene-3-ol	۹۷۸	۲/۹۷
۶	3-octanal	۹۸۲	۳/۲۹
۷	β-pinene	۹۸۷	۶/۰۹
۸	Myrcene	۹۹۵	۲/۶۱
۹	p- cymene	۱۰۲۵	۳/۲۵
۱۰	1,8-cineol	۱۰۳۲	۳/۶۰
۱۱	Limonene	۱۰۳۶	۱/۸۹
۱۲	(E)- β- Ocimen	۱۰۵۰	۱/۲۱
۱۳	Camphor	۱۰۹۲	۶/۲۱
۱۴	Linalool	۱۱۲۷	۴/۷۵
۱۵	α-terpineol	۱۱۳۹	۰/۳۳
۱۶	Bornyl acetate	۱۱۴۲	۱/۳۴
۱۷	Terpinene-4-ol	۱۱۹۸	۰/۱۹
۱۸	Carvacrol	۱۲۷۲	۰/۲۳
۱۹	β-myrcene	۱۲۹۶	۰/۴۵
۲۰	Camphene	۱۳۸۵	۰/۲۷
۲۱	β-caryophylene	۱۴۲۱	۷/۹۴
۲۲	α-humulene	۱۴۳۷	۴/۴۰
۲۳	γ-cadinene	۱۴۷۸	۶/۲۶
۲۴	Germacrene D	۱۴۸۲	۷/۳۶
۲۵	Bicyclogermacrene	۱۴۹۴	۲/۰۲
۲۶	Elemol	۱۵۱۹	۳/۲۶
۲۷	(Z)- nerolidol	۱۵۳۴	۶/۲۳
۲۸	Spathulenole	۱۵۵۲	۳/۳۰
۲۹	Caryophyllene oxide	۱۵۷۸	۳/۶۹
۳۰	α- cadinol	۱۷۰۲	۱/۶۸
۳۱	Hexadecanoic acid	۱۸۹۶	۰/۷۵

a ترکیبات لیست شده بترتیب خروج از ستون DB5 ردیف شده‌اند

b اندیکس کواتس نسبت به آلکان‌های نرمال C9 تا C24 از ستون DB5 محاسبه شده‌اند

حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) اسانس کلپوره علیه باکتری‌های گرم مثبت مورد بررسی در این تحقیق بین ۰/۱۶تا ۰/۳۸ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر بدست آمد در حالی‌که MIC این اسانس برای باکتری‌های گرم منفی بین ۰/۳۸تا ۱/۲۵ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر متغیر بود. مشابه اسانس کرفس کوهی حساس‌ترین باکتری در بین باکتری‌های مورد آزمایش در این تحقیق به اسانس کلپوره *S. aureus* با MIC برابر ۰/۱۶ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر و مقاوم‌ترین باکتری به این اسانس *S. enterica* با MIC برابر ۱/۲۵ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر بدست آمد. حداقل غلظت کشندگی (MBC) اسانس کلپوره علیه باکتری‌های گرم مثبت بین ۰/۳۱تا ۰/۷۵ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر و برای باکتری‌های گرم منفی بین ۰/۷۵ تا ۱/۲۵ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر حاصل شد (جدول ۳).

بحث و نتیجه‌گیری

بررسی منابع نشان داد که اگرچه برخی محققین در زمینه خواص درمانی کرفس کوهی تحقیقاتی را انجام داده‌اند (۲۱ و ۲۳) ولی تحقیقات منتشر شده در خصوص میزان و اجزای اسانس کرفس کوهی نادر است.

جدول ۳- فعالیت ضدباکتریایی (MIC و MBC بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) اسانس زیره کرفس کوهی و کلپوره به روش میکرودایلوشن

پاتوژن	واکنش گرم	نژاد	کرفس کوهی		کلپوره		کلرامفنیکل	اسید آسکوربیک
		PTCC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MIC
S. aureus	+	۱۴۳۱	۰/۳۱	۰/۶۲	۰/۱۶	۰/۳۱	۰/۲۴	۱/۲۵
B. cereus	+	۱۲۴۷	۱/۲۵	۱/۲۵	۰/۶۲	۰/۶۲	۰/۰۶	۱/۲۵
L. monocytogenes	+	۱۲۹۸	۰/۶۲	۰/۶۲	۰/۳۱	۰/۶۲	۰/۱۲	۱/۲۵
E. coli O157:H7	-	ATCC700728	۱/۲۵	۱/۲۵	۰/۶۲	۰/۶۲	۰/۲۴	۲/۵
S. enterica	-	۱۷۰۹	۲/۵	۲/۵	۱/۲۵	۱/۲۵	۰/۳۶	۵
Ps. aeruginosa	-	۱۰۴۷	۰/۶۲	۰/۶۲	۰/۳۱	۰/۶۲	۰/۲۴	۲/۵

PTCC :Persian Type Culture Collection
ATCC:American Type Culture Collection

سلیمی و همکاران (۲۲) با مقایسه سه اکوتیپ کرفس کوهی از استان چهار محال و بختیاری نیز نتایج مشابه این تحقیق را گزارش نمودند. آن‌ها ترکیبات ligustilide و -(*Z*)-3-butylidene phthalide را از ترکیبات مهم این گیاه گزارش نمودند که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد (۲۲). بگسی و همکاران (۲) نیز در اسانس گونه دیگری از این جنس ترکیبات Caryophylene، Germacrene D و γ-cadinene را به عنوان ترکیبات مهم گزارش نمودند (۲).

مقایسه MIC اسانس گیاهان مورد بررسی با MIC کلرامفنیکل و اسید آسکوربیک (جدول ۳) نشان می‌دهد که اثرات ضد باکتریایی اسانس کلپوره علیه *S. aureus* قوی تر از کلرامفنیکل است در حالی‌که اثرات ضد باکتریایی اسانس کرفس کوهی با اسید آسکوربیک قابل قیاس می‌باشد.

در مجموع اسانس کلپوره با داشتن MIC پایین‌تر علیه پاتوژن‌های مورد بررسی خاصیت ضد باکتریایی قوی تر از خود نشان داد. اثرات ضد باکتریایی بیش‌تر اسانس کلپوره را می‌توان به اجزای آن نسبت داد. همان‌گونه که در جدول ۲ آورده شده است ترکیباتی مانند پاینن، کامفور، لینالول، کادینن، کاریوفیلن و جرماکرن در اسانس کلپوره تشخیص داده شدند ولی در اسانس کرفس کوهی دو ترکیب Ligustilide و (*Z*)-3-butylidene-phthalide بیش از ۶۸ درصد اسانس را به خود اختصاص داده‌اند.

مطالعات قبلی در مورد خواص ضد میکروبی گیاهان خانواده کرفس حاکی از فعالیت ضد باکتریایی متوسط تا قوی این گیاهان است. گاککار و همکاران (۸) گزارش دادند که اسانس زیره سبز علیه *E. coli* O157H7، *S. aureus* و *L. monocytogenes* مؤثرتر از اسانس اکلیل کوهی است. یاکوبلیس و همکاران (۱۲) خاصیت ضد باکتریایی متوسط زیره سبز را علیه برخی از باکتری‌های پاتوژن گیاهی گزارش نمودند. سینگ و همکاران (۲۵) خواص ضد باکتریایی اسانس ۷ گونه از گیاهان خانواده کرفس را علیه *Corynebacterium diphtheriae, Staphylococcus aureus, Streptococcus haemolyticus, E. coli, Klebsiella* spp., *Proteus vulgaris* مورد آزمایش قرار دادند و گزارش نمودند که اسانس زنیان بسیار مؤثر است. رانی و خولر (۲۰) نشان دادند که عصاره زنیان علیه *Salmonella typhi* بسیار مؤثرتر از زیره سبز است (۲۰). روش ریزرقت نتایج قابل قبولتری را نسبت به دیگر روش‌ها در اختیار محققین قرار می‌دهد زیرا مشرقی و همکارانش در بررسی اثرات ضد میکروبی بعضی از گیاهان به روش اسپکتروفتومتری تفاوت معنی‌داری بین اثرات غلظت‌های مختلف عصاره‌های گیاهی بر باکتری *E.coli* O157:H7 مشاهده ننموده‌اند (۱۷ و ۱۸).

بر اساس تحقیقات صورت گرفته باکتری‌های گرم مثبت نسبت به اسانس‌ها حساس‌تر از باکتری‌های گرم منفی هستند. 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. 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 لایه‌ایی 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 و یا این‌که بصورت ناتوانی سیستم آنزیمی باکتریایی بروز می‌کند (۲۴). برخی از محققین ارتباط بین ساختارهای شیمیایی برخی از اجزاء غالب موجود در اسانس‌ها را با فعالیت ضد باکتریایی آن‌ها گزارش نموده‌اند. اسانس‌ها دارای ترکیبات فنولی خاصیت ضد باکتریایی بیش‌تری دارند که در این تحقیق نیز این موضوع اثبات گردید (۳). فعالیت ضد باکتریایی بیش‌تر کلپوره نسبت به کرفس کوهی به دلیل زیاد بودن ترکیباتی مانند پاینن، کامفور، لینالول، کادینن، کاریوفیلن و جرماکرن است.

اگرچه اغلب بروز فعالیت ضد باکتریایی 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. مکانیزم عمل اسانس‌ها افزایش نفوذپذیری غشاء است. اجزای اسانس با نفوذ در غشاء منجر به متورم شدن غشاء گردیده و فعالیت آنرا تحت تأثیر قرار می‌دهند (کاهش می‌دهند) و در نهایت منجر به مرگ سلول خواهند شد (۱۱). اجزای اسانس نیز اثرات ضد باکتریایی متفاوتی دارند، Ulte و همکاران (۲۷) اظهار نمودند که گروه هیدروکسیل موجود در ملکول اجزای اسانس مانند کارواکرول، تیمول، لینالول، سایمن و منتول برای بروز خاصیت ضد باکتریایی آن‌ها بسیار مهم است (۲۷). اخیرا برای غلبه بر موانع و محدودیت‌های استفاده از اسانس‌ها به عنوان مواد ضد میکروبی در صنایع غذایی مانند فرایند اکسیداسیون، تبخیر شدن، مشکلات انحلال، واکنش دادن با مواد دیگر و تغییر رایحه و خواص ارگانولپتیکی مواد غذایی روش انکپسولیشن اسانس‌ها مورد بررسی قرار گرفته است لذا در تحقیقات آینده بررسی این موضوع پیشنهاد می‌گردد. هم‌چنین با توجه به این‌که اثرات سینرژیستی بین اسانس برخی گیاهان دارویی از نظر اثرات ضد باکتریایی مشخص شده است (۱۹) و هم‌چنین با توجه به این‌که نتایج این تحقیق قدرت ضد باکتریایی پایین‌تر اسانس کرفس کوهی را نشان داد پیشنهاد می‌گردد اثرات سینرژیستی این دو اسانس با تعیین مقادیر غلظت بازدارندگی افتراقی[1](FIC) به روش Modified dilution checkboard مورد بررسی قرار گیرد.

سپاسگزاری

نویسندگان بدینوسیله از جناب آقای پروفسور Y. Fujii استاد دانشگاه توکیو به خاطر مساعدت در آنالیز اسانس تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

1-Adams R.P. 2001. Identification of essential oil components by Gas Chromatography and Mass Spectrometry. Allured: Carol Stream IL.

2-Bagci E., Yazgın A., Hayta S., and Cakılcıoglu U. 2010. Composition of the essential oil of *Teucrium chamaedrys* L. (Lamiaceae) from Turkey. Journal of Medicinal Plants Research, 4(23):2588–2590.

3- Burt S. 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. International Journal of Food Microbiology, 94: 223–253.

4-Celiktas O.Y., Hames Kocabas E.E., Bedir E., Vardar Sukan F., Ozek T., and Baser K.H.C. 2007. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of Rosmarinus officinalis, depending on location and seasonal variations. Food Chemistry, 100:553-559.

5-Daferera D.J., Ziogas B.N., and Polissiou M.G. 2000. GC–MS Analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on Penicillium digitatum. Journal of Agricultural Food Chemistry, 48:2576–2581.

6-Demirci F., Guven K., Demirci B., Dadandi M.Y., and Baser K.H.C. 2008. Antibacterial activity of two Phlomis essential oils against food pathogens. Food Control, 19:1159–1164.

7-D'Mello J.P.F. 2003. Food Safety: Contaminants and Toxins. Oxford: CABI Publications.

8-Gachkar L., Yadegari D., Rezaei M.R., Taghizadeh M., Alipoor Astaneh Sh., and Rasooli I. 2007. Chemical and biological characteristics of Cuminum cyminum and *Rosmarinus officinalis* essential oils. Food Chemistry, 102:898-904.

9-Haghiroalsadat F., Bernath F., Kalantar M., Sheikhha M.H., Hokmollahi F., Azimzadeh M., Hori M. 2011. The indigenous *Bunium persicum* L. of yazd province: chemical assessment and evaluation of its antioxidant effects. Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, 18(4):284-291.

10-Haghiroalsadat F., Vahidi A., Sabour M., Azimzadeh M., Kalantar M., and Sharafadini M. 2011. The indigenous *Cuminum cyminum* L. of yazd province: chemical assessment and evaluation of its antioxidant effects. Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, 19(4):472-81.

11-Holly R.A., and Patal D. 2005. Improvement in shelf life and safetey of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. Food Chemistry, 22: 273-292.

12-Iacobellis N.S., Cantore P.L., Capasso F., and Senatore F. 2005. Antibacterial activity of *Cuminum cyminum* and *Carun carvi* essential oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53: 57-61.

13-Kalemba D., and Kunicka A. 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Current Medicinal Chemistry,10: 813–829.

14-Karim A., Pervez M., and Bhatty M.K. 1997. Studies on the essential oils of the Pakistani species of the familie Umbelliferae, part 10. *Bunium persicum* Boiss. (Sah Zira) seed oil. Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research, 20(2): 106-108.

15-Kordali S., Kotan R., Mavi A., Cakir A., Ala A., and Yildirim A. 2005. Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of Artemisia dracunculus and of the antifungal and antibacterial activities

1- Fractional inhibitory concentration

of Turkish *Artemisia absinthium*, A. dracunculus, *Artemisia santonicum*, and *Artemisia spicigera* essential oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53: 9452–9458.

16-Kotzé M., and Eloff J.N. 2002. Extraction of antibacterial compound from *Combretum microphyllum* (Combretaceae). South African Journal of Botany, 68: 62–67.

17-Mashreghi M., and Niknia S. 2012. The effect of Peganum harmala and *Teucrium polium* alcoholic extracts on growth of Esherichia coli O157:H7. Jundishapur Journal of Microbiology. April, Volume 5, Issue 3(Supl): In press.

18-Mashreghi M., Molaei S., Gholami Z., and Tavalaei S. 2007. Investigation of effect of alcoholic extract of three plants in Khorasan on different growth phases of E.coli 0157: H7 by spectrophotometric method. Komesh, 23(3):145-153.

19-Oroojalian F., Kasra-Kermanshahi R., Azizi M., Bassami M.R. 2010. Phytochemical composition of the essential oils from three Apiaceae species and their antibacterial effects on food-borne pathogens. Food Chemistry, 120:765-770.

20-Rani P., and Khullar N. 2004. Antimicrobial evaluation of some medicinal plants for their anti-enteric potential against Multi-drug resistant Salmonella typhi. Phytotheraphy Research, 18: 670-673.

21-Roghani M., Baluchnejadmojarad M., and Ramazani M. 2008. The effect of chronic oral feeding of aerial part of *Apium graveolens* L. on blood levels of glucose and lipids of streptozotocin-diabetic rats. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 23(4): 458-467.

22- Salimi M., Ebrahimi A., Shojaee Asadieh Z., and Saei Dehkordi SS. 2010. Essential oil composition of *Kelussia odoratissima* Mozaff. Iranian Journal of Medical and Aromatic Plants, (26)2:147-156.

23-Shahrani M., Pilehvarian A., Khayri S., Asgahri A., Farokhi E., Parvin N., and Rafieian M. 2009. Effects of *Kelussia odoratissima* Mozaffarian (KOM) extract on blood lipid in Balb/c mice. Journal of Shahrekord University of Medical Sciences, 8(4): 88-95.

24-Sandri I. G., Zacaria J., Fracaro F., Delamare A.P.L., and Echeverrigaray S. 2007. Antimicrobial activity of the essential oils of Brazilian species of the genus Culina against foodborne pathogens and spoiling bacteria. Food Chemistry, 103: 823-828.

25-Singh G., Kapoor I.P.S., Pandey S.K., Singh U.K., and Singh R.K. 2002. Studies on essential oils: Part 10; Antibacterial activity of volatile oils from some species, Phytotherapy Research, 16:680-682.

26-Tepe B., Donmez E., Unlu M., Candan F., Daferera D., and Vardar-Unlu G. 2004. 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, 84:519–525.

27-Ulte A., Bennik M.H.J., and Moezelaar R. 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food pathogen *Bacillus cereus*. Applied and Environmental Microbiology, 68:1561-1568.