فعالیت ضد میکروبی اسانس گیاه مرزه (*Satureja laxiflora G. koch*) قبل و بعد از گلدهی

مریم تیموری[1]، زهرا باهرنیک[1] و مهدی میرزا[1]

چکیده

کمیت و کیفیت اسانس مرزه در دو مرحله قبل و بعد از گلدهی و نیز اثرات ضد میکروبی آنها بر روی باکتریهای سودوموناس آئروژینوزا، اشرشیا کلی و استافیلوکوکوس اروئوس بررسی و با اثرات بازدارندگی دیسک آنتی‌بیوتیکهای جنتامایسین و تتراسایکلین مقایسه شد. نتایج نشان دادند که اثرات ممانعت کننده اسانس در مرحله قبل از گلدهی بر روی استافیلوکوکوس اروئوس و اشرشیا کلی بیش از اثر آن بر روی سودوموناس آئروژینوزا بوده است، در حالی که اسانس در مرحله پس از گلدهی اثرات بازدارنده بیشتری بر روی سودوموناس آئروژینوزا داشته است.

کلمات کلیدی

مرزه، اسانس، اثر ضد میکروبی و *Satureja laxiflora* G. koch، *Staphylococcus areous*، *Esherchia coli* و *Psudomonus aeraginosa*.

۱- عضو هیئت علمی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع ، صندوق پستی ۱۱۶-۱۳۱۸۵، تهران.

مقدمه

مشکل نگهداری مواد غذایی روز به روز پیچیده‌تر می‌شود و نیاز به موادی که نیمه عمر طولانی‌تری داشته و مانع از فساد میکروبی مواد غذایی شوند بسیار اهمیت دارد. از طرف دیگر تقاضا برای فرآورده‌های غذایی جدید و نیز محصولاتی با کیفیت بالاتر زیاد شده است. امروزه استفاده از ترکیبهایی که در ضمن داشتن خواص ضد میکروبی برای سلامتی انسان نیز مضر نباشند برای کنترل بیماریهایی با منشاء میکروبی به ویژه در صنایع غذایی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Tiziana و همکاران، ۱۹۸۹). خصوصیات ضد میکروبی اسانسهای گیاهی سالهاست که شناخته شده‌اند (Deans و Ritchie، ۱۹۸۷) اما وجود آنها در فرآورده‌های مختلف غذایی، آرایشی و دارویی بیشتر به دلیل بو یا طعمی است که ایجاد می‌کنند و نه خصوصیات نگهدارندگی آنها (Hodgson و همکاران ۱۹۹۸).

مرزه (*Satureja laxiflora*) گیاهی است از رده دو لپه‌ایها و تیره *Labiatea* علفی، یکساله به ارتفاع ۳۰-۱۰ سانتی‌متر، با ساقه‌های منشعب، ظاهری سبز متمایل به خاکستری و برگهای باریک خطی دراز، نوک تیز که سطح آن دارای نقاط ریز و فراوان محتوی اسانس است. انتشار آن در ایران در مناطق غرب (آذربایجان) و شمال (فیروزکوه) می‌باشد (Rechinger، ۱۹۸۲). این گیاه در اکثر مزارع سبزی در نقاط مختلف کشور در سطح قابل ملاحظه‌ای کاشته می‌شود و در طب سنتی ایران از آن برای درمان ناراحتی‌های معده و روده استفاده می‌شده است. میزان اسانس تولیدی این گیاه بالا بوده و از آن در صنایع غذایی، تولید نوشابه‌های غیرالکلی و عطرسازی استفاده می‌شود (زرگری، ۱۳٦۹ و میرحیدر، ۱۳۷٤).

مرزه دارای تانن، مواد چرب، قندهای مختلف و اسانسی به مقدار حدود ۰/۲٪ است که رنگ آن زرد یا قهوه‌ای روشن با ثقلی معادل ۰/۹٥٤-۰/۸۷٥ (در دمای ۲٥ درجه سانتیگراد) و روتیشن ٤+ تا ٥+ درجه (در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد) و انکسار

۱/۵۰۵-۱/٤۸٦ (در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد) است. فنلها بـه صـورت کـارواکرول بـه میزان ۵۷-۲۰٪ و قابلیت صابونی شدن در سطح حداکـثر ٦ و قـابلیت انحـلال ۸۰٪ در اتانول است. میزان تولید فرآورده‌های ثانویه و مـواد تشـکیل‌دهنده آنـها در گیاهـان بـه عوامل مختلفی از قبیل شرایط محیطی و مرحله رشـد گیـاه بسـتگی دارد (Lawrence، ۱۹۸۱). در این مقاله اثرات مراحل مختلف رویشی (قبل و پس از گلدهی) بر کمیـت و کیفیت اسانس مرزه و هم‌چنین اثرات ضد میکروبی احتمالی آنها بـر روی سـه بـاکتری سودوموناس آئروژینوزا، اشرشیا کلی و استافیلوکوکوس اروئوس با روش *Paper disc Diffusion* مورد تحقیق قرار گرفته است.

باهر و همکاران (۲۰۰۲) اثر تنش آبی را بر کمیت و کیفیـت اسـانس مـرزه قبـل و بعد از گلدهی بررسی کردند.

اجزاء تشکیل‌دهنده اسانس مرزه و فعالیت ضدمیکروبی آنها را بـر روی ۱۰ بـاکتری مختلف نشان داد که اسانس مرزه و هر کدام از اجزای تشـکیل دهنـده آن دارای اثـرات ضد میکروبی به میزان متفاوت بودند. ایـن اجـزا شـامل مونوتـرپن‌هـای تـک حلقـه‌ای (کارواکرول، آلفا-ترپینول و تیمول)، مونوترپن‌های دو حلقه‌ای (سینئول و بتا-پـاینن) و ترکیبهای دیگر بودند (Deans و Svoboda، ۱۹۸۹). Akgul و Kivanc (۱۹۸۹) تحقیـق دیگری در مورد حساسیت قارچهای آسپرژیلوس نیجر، موکور، ریزوپوس و پنی‌سـیلیوم کریزوژنوم که از طریق مواد غذایی منتقل می‌شـوند، انجـام دادنـد. Savolvoda و Hay *(۱۹۹۰)* در مورد ترکیبهای تشکیل‌دهنده اسانس مرزه مطالعه‌ای را انجام دادند. براسـاس نتایج تحقیق آنها کمیت و کیفیت اسانس در طول فصل رویشی تغییر می‌کند.

مواد و روشها

۱- کشت بذر در مزرعه

آزمایش مزرعه‌ای در مجتمع تحقیقاتی البرز، واقع در جنوب کرج وابسته به مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع در سال ۱۳۷۹ انجام گرفت. در اسفند ماه بعد از آماده‌سازی زمین، بذرها، که از بانک ژن منابع طبیعی، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع تهیه شده بودند بر روی پشته‌ها کشت گردیدند. آبیاری از فروردین ماه صورت گرفت. به منظور آبیاری مزرعه اقدام به لوله‌کشی و نصب کنتور در مزرعه گردید. بدین منظور یک کنتور اصلی در محل ورودی آب نصب شد. آبیاری بذرها از هنگام رویش تا مرحله ۸-۶ انشعاب فرعی در حد ظرفیت زراعی ۵ بار در هفته به مقدار ۳۶ لیتر در متر مربع به مدت ۱ ساعت انجام گرفت. طرح در قالب بلوکهای کامل تصادفی در چهار تکرار انجام شده است.

۲- استخراج اسانس از نمونه‌های مزرعه‌ای در دو مرحله قبل و بعد گلدهی

سرشاخه‌های هوایی گیاه به شکل تصادفی در مراحل قبل و بعد از گلدهی جمع‌آوری و ۲۴ ساعت پس از زمان جمع‌آوری توسط قیچی خرد شده و بعد توزین گردیدند. نمونه‌های ۲ گرمی جهت محاسبه درصد رطوبت انتخاب و در آون ۷۵ درجه سانتی‌گراد بمدت ۴۸ ساعت خشک شدند. نمونه‌های خرد شده در داخل دستگاه تقطیر با بخار آب ریخته شده و اسانس‌گیری به مدت ۱ ساعت انجام گرفت. اسانسهای استخراج شده از نظر کمی توزین گردیدند. ۱ میلی‌لیتر از اسانس فوق توسط دی‌اتیل‌اتر رقیق و جهت مقایسه‌های کیفی به دستگاه GC/MS تزریق گردید.

دستگاه GC-MS استفاده شده با نام: VARIAN SATURN، مدل ۳۴۰۰، و ستون، DB-1 ابعاد: ۶۰m، در درجه حرارت،: ۲۶۰-۵۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت افزایش

دما، ٤ درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه و درجه حرارت تزریق، ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد و دارای گاز حامل، هلیوم و طیف سنجی جرمی. SATURN بود.

۳- اثرات آزمون ضدمیکروبی

اثر ضد میکروبی بر روی سه باکتری اشرشیا کلی، سودوموناس آئروژینوزا (باکتری گرم منفی) و استافیلوکوکوس اروئوس (باکتری گرم مثبت) بررسی شد. ۲۰۰ میکرولیتر از مایه تلقیح استاندارد از هر کدام میکروارگانیسمها (معادل استاندارد شماره ۱ مک فارلند) بر روی محیط کشت جامد نوترینت آگار (ساخت شرکت مرک) کشت شد. برای تهیه مایه تلقیح استاندارد از کشت ۱۸ ساعته باکتریها در محیط کشت غنی کننده (حاوی پپتون، عصاره مخمر و کلرید سدیم) استفاده شد. از روش Paper Disc Diffusion برای سنجش فعالیت ضد میکروبی هر کدام از اسانسها استفاده شد. اسانسها به نسبت یک به پنج با الکل اتانول خالص رقیق شدند (الکل اتانول خالص فاقد فعالیت ضد میکروبی بود). ۱۰ میکرولیتر از هر کدام از اسانسهای رقیق شده بر روی دیسکهای کاغذی استریل قرار داده شده و این دیسکها بر روی محیط کشت نوترینت آگار تلقیح شده با میکروارگانیسمها قرار داده شدند. پلیت‌ها در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲٤ ساعت نگهداری شد و پس از این مدت قطر هاله ممانعت از عدم رشد (برحسب میلی‌متر) اندازه‌گیری گردید. برای هر کدام از میکروارگانیسمها آزمون چهاربار تکرار شده و در واقع میانگین هاله ممانعت از عدم رشد تعیین گردید. قطر هاله ممانعت از رشد ایجاد شده توسط دیسک جنتامایسین (۱۰ میلی‌گرمی) بر روی دو باکتری اشرشیا کلی و سودوموناس آئروژینوا و دیسک تتراسایکلین (۳۰ میلی‌گرمی) بر روی استافیلوکوکوس اروئوس اندازه‌گیری و با هاله ممانعت از رشد ایجاد شده توسط اسانس مرزه مقایسه شد (Barry، ۱۹۸۹).

نتایج و بحث

اسانس مرزه در مزرعه حاوی ۱۵ ترکیب مختلف بود که می‌توان از ترکیبهای α-thujene، β-germaceren، β-bisabolene، α-terpinene، P-cymene، limonene، γ-terpinene ، carvocrol، α-pinene، sabinene، β-pinene، thyml acetate ، α-phellandrene، caryophyllene و myrcene نام برد (جدول شماره ۱).

تمام اسانسهای مورد مطالعه دارای فعالیت ضدمیکروبی بودند. قطر هاله ممانعت از رشد ایجاد شده توسط اسانسها بر روی استافیلوکوکوس اروئوس بیش از ۲۰ میلیمتر و در مورد اشرشیا کلی و سودوموناس آئروژینوزا ۲۰-۱۰ میلیمتر بود (جدول شماره ۲). اثرات ممانعت کننده دیسکهای جنتامایسین و تتراسایکلین کمتر از اثرات بازدارنده اسانسها بود. نتایج نشان می‌دهند که گرم منفی و یا مثبت بودن باکتریها تأثیر کمی بر روی میزان اثرات ممانعت کننده از رشد اسانسها داشته است. در واقع هر ۳ باکتری مورد آزمایش به اسانسها حساس بودند، اما میزان حساسیت آنها متفاوت بوده است. نتایج نشان دادند که حساسیت اشرشیا کلی و استافیلوکوکوس اروئوس به اسانس بدست آمده از مرحله قبل از گلدهی بیشتر از حساسیت سودوموناس آئروژینوزا است، در حالی که سودوموناس آئروژینوزا به اسانس مرحله پس از گلدهی حساس‌تر بوده است. به نظر می‌رسد که اثرات ممانعت کننده اسانس بر علیه باکتریهای اشرشیا کلی و استافیلوکوکوس اروئوس بیشتر به مقدار ترکیب گاما- ترپینن بستگی دارد، اما در مورد سودوموناس آئروژینوزا اثرات ممانعت کننده به میزان ترکیب کارواکرول در اسانس وابسته است. نتایج مربوطه به سنجش فعالیت ضدمیکروبی نشان دهنده امکان استفاده از این پدیده به عنوان یک بیوساید طبیعی است.

جدول ١- ترکیب اجزاء تشکیل دهنده اسانس مرزه در مراحل قبل و بعد از گلدهی

شماره ترکیب	نام ترکیب	شاخص کواتس	درصد ترکیبها قبل از گلدهی	درصد ترکیبها بعد ازگلدهی
١	α–Thujene	٩٣٦	١/٥	١/٤
٢	α–Pinene	٩٤٢	١/٤	١/٣
٣	Sabinene	٩٧٢	٠/٢	٠/٢
٤	β–Pinene	٩٧٦	٠/٩	٠/٧
٥	Myrcene	٩٨٦	١/٩	١/٧
٦	α–Phellandrene	٩٩٩	٠/٤	٠/٣
٧	γ–Terpinene	١٠١٠	٥/١	٤/٩
٨	P –Cymene	١٠١٣	٢/٤	٢/٢
٩	Limonene	١٠٢٢	٠/٦	٠/٦
١٠	Trans-β- Ocimene	١٠٣٧	٠/١	٠/١
١١	Γ-Terpinene	١٠٤٩	٤٤/٠	٤٠/٩
١٢	Carvacrol	١٢٧٢	٣٨/٠	٤١/٣
١٣	Thyml acetate	١٣٣٩	١/٥	١/٧
١٤	β- Caryophyllene	١٤١٤	١	١/٧
١٥	Bicilogermacrene	١٤٨٨	٠/٢	٠/١
١٦	β-Bisabolene	١٤٩٨	٠/٧	٠/٩

جدول شماره ٢- قطر هاله ممانعت از رشد ایجاد شده (mm) توسط اسانس مرزه در مرحله قبل و بعد از گلدهی و مقایسه آن با دیسکهای تتراسیکلین و جنتامایسین.

نام باکتری	مرحله قبل از گلدهی	مرحله بعد از گلدهی	دیسک جنتامایسین	دیسک تتراسیکلین
اشرشیا کلی	١٧/٥	١٦/٥	١٤	–
سودوموناس آئروژینوزا	١٥	١٧/٥	١٢	–
استافیلوکوکوس اروئوس	٣٠	٢٨/٥	–	٢٢/٥

منابع

زرگری، علی، ۱۳٦۹. گیاهان داروئی ایران (جلد چهارم). انتشارات دانشگاه تهران، ٤۹۳ صفحه.

میرحیدر، حسین، ۱۳۷٤. معارف گیاهی. جلد اول، دفتر نشر و فرهنگ اسلامی، ٥۳۹ صفحه.

Akgul, A. and M. Kivanc. 1989. Sensivity of four foodborn molds to essential oils from Turkish species, herbs and *citrus peel*. J. Sci. food Agric. 47: 129-132.

Baher, Z. F., M., Mirza, M. Ghorbanli, and MB, Rezaii. 2002. Influnence of water stress on yeild and essential oil of *Satereja hortensis*. Flavour and Fragrance Journal, 17: 275-237.

Barry, A.L. 1989. The antimicrobial suceptibility test. Principles and Practices. Lea and Febiger, Rphiladelphia.

Deans, S. and G. Ritchie. 1987. Antibacterial properties of plants essential oils. International J. food Microbiol, 5: 165-180.

Deans, S. and G. Savoboda. 1989. Antibacterial activity of summer savory (*Satureja hortensis L*) essential oil and its constituents. Journal of Horticultural Science. 64 (2): 205-21.

Hodgson, I., J. Stewart, and L. Fyfe. 1998. Inhibition of bacteria and yeasts by oil of fennel and paraben: development of synthetic antimicrobial combination. J. Essent Oil Res., 10: 293-297.

Lawrence, B. M. 1981. Progress in essential oils. Savory oil. Pref. Flav., 6(4): 73-78.

Rechinger, K. H. 1982. Flora of Iranica. Acadeemische Drucnu Uerlbagsantalf, Graz- Austria.

Svoboda, K. P. and R . K. M. Hay. 1990. Growing summer savory (*Satureja hortensis*) in Scotland: quantitative and qualitative analysis of the volatile oil and factors influencing oil productiom. J. Sci. Food Agric, 52: 193-202.

Tiziana Baratta, M.,H.G. Damian Dorman, S.G. Deans, D.M. Biondi and G. Ruberto. 1989. Chemical composition, antimicrobial and antioxidative activity of Laurel, Sage, Rosemary, Oregano and Coriander essential oils. J. Essent. Oil Res., 10: 618-627.

Antimicrobial activty of essential oil of *Satureja laxiflora* G. koch befor and after flowering

M. Teimouri[1], Z. Baher Nik[1] and M. Mirza[1]

Abstract

Quantity and quality of essenial oil of *Satureja laxiflora* G. koch was studied before and after flowering stages. Their antimicrobial activities investigated against *Psudomonas aeruginosa, Esheirchia coli and Staphylococcus areous* and compared with Gentamicin and Tetracycline discs. Results indicated that the inhibitory effect of essential oil of plant before flowering stage was more active against *Esherchia coli* and *Staphylococcus areous* than *Psudomonas aeruginosa*. The essential oil after flowering stage had more activity on *Psudomonas aeruginosa*.

Key words

Satureja laxiflora G. koch, Antimicrobial activity and Essential oil, *Staphylococcus areous, Esherchia coli* and *Psudomonus aeraginos.*

1- Research Institute of Forests and Rangelands, P.O.Box 13185-116, Tehran, Iran.