Original Article

Investigation of Chemical Compounds and Antibacterial Activity of Tarragon (Artemisia dracunculus) Essential Oil on Some Pathogenic Bacteria In Vitro

Behrooz Alizadeh Behbahani[1], Farideh Tabatabaei Yazdi[1*], Fakhri Shahidi[1], Seyed Ali Mortazavi[1], Mohebbat Mohebbi[1]

[1]*Department of Food Science & Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.*

[*]***Corresponding Author:*** **Farideh Tabatabaei Yazdi**, Department of Food Science & Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran;

Email: tabatabai@um.ac.ir

Received: 16 Jul, 2016

Accepted: 9 Aug, 2016

Abstract

Background and Objectives: Tarragon (*Artemisia dracunculus*) as a valuable medicinal plant is extensively used in traditional medicine. Bacterial resistance to antimicrobial agents, is one of the important problems in medicine. The aim of this study was to identify the chemical compounds of *Artemisia dracunculus* essential oil and evaluation of its antibacterial activity on *Listeria innocua*, *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella typhi*, and *Enterobacter aerogenes* in vitro.

Methods: In this experimental study, the *Artemisia dracunculus* essential oil, was extracted using hydrodistillation method. The components of the essential oil, were identified by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) device. Disk diffusion method was used to measure the diameter of the inhibition zone, and broth microdilution method was used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC). The minimum bactericidal concentration (MBC), was determined using tubes or wells, where no color change was observed.

Results: In this investigation, 18 compounds, were identified in *Artemisia dracunculus* essential oil. The major compound of the essential oil was p-Allylanisole. The diameter of inhibition zone for bacteria *Listeria innocua, Staphylococcus epidermidis, Salmonella typhi, and Enterobacter aerogenes,* were obtained 11.2, 14.2, 9.80 and 8.10 mm, respectively. MBC *of Artemisia dracunculus* essential oil for *Staphylococcus epidermidis* and *Listeria innocua*, was 9.2mg/ml and for *Salmonella typhi* and *Enterobacter aerogenes*, was 36.8 and 73.6mg/ml, respectively.

***Conclusion*:** According to the results of this study, the *Artemisia dracunculus* essential oil has antibacterial effect, which is lower in comparison with antibacterial effect of vancomycin and gentamicin antibiotics. Therefore, further researches are required for clinical application of the essential oil.

***Keywords*:** Anti-infective Agents; *Artemisia*; Chemical composition; Oils, Volatile.

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره یازدهم، شماره نهم، آذر ۹۶
صفحه ۴۲ الی ۵۱

مقاله پژوهشی
(Original Article)

بررسی ترکیبات شیمیایی و فعالیت ضدمیکروبی اسانس ترخون، بر برخی از باکتری‌های بیماری‌زا در شرایط برون‌تنی

بهروز علیزاده بهبهانی[۱]، فریده طباطبایی یزدی[۱*]، فخری شهیدی[۱]، سیدعلی مرتضوی[۱]، محبت محبی[۱]

[۱]گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: ترخون (*Artemisia dracunculus*) به‌عنوان یک گیاه دارویی ارزشمند، در طب سنتی استفاده فراوانی دارد. افزایش مقاومت باکتری‌ها به عوامل ضدمیکروبی، یکی از مشکلات مهم در پزشکی است. این مطالعه با هدف شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس ترخون و ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی اسانس بر باکتری‌های *لیستریا اینوکوا*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، *سالمونلا تیفی* و *انتروباکتر آئروژینوزا* در شرایط برون‌تنی انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، اسانس ترخون به روش تقطیر با آب استخراج گردید. اجزای تشکیل‌دهنده اسانس به‌وسیله دستگاه GC/MS شناسایی شدند. روش انتشار در آگار به کمک دیسک (برای اندازه‌گیری هاله عدم رشد) و روش میکرودایلوشن براث (جهت تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد) به کار برده شد. جهت تعیین حداقل غلظت کشندگی، از خانه‌ها یا چاهک‌هایی که تغییر رنگی در آن مشاهد نشد، استفاده گردید.

یافته‌ها: در این بررسی، ۱۸ ترکیب در اسانس ترخون شناسایی شد. p-Allylanisole، عمده‌ترین ترکیب اسانس حاصله بود. قطر هاله عدم رشد برای باکتری‌های *لیستریا اینوکوا*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، *سالمونلا تیفی* و *انتروباکتر آئروژینوزا* به ترتیب ۱۱/۲، ۱۴/۲، ۹/۸۰ و ۸/۱۰ میلی‌متر به دست آمد. MBC اسانس ترخون برای *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و *لیستریا اینوکوا*، ۹/۲ و برای *سالمونلا تیفی* و *انتروباکتر آئروژینوزا* به ترتیب ۳۶/۸ و ۷۳/۶ میلی گرم برمیلی‌لیتر بود.

نتیجه‌گیری: طبق نتایج این مطالعه، اسانس ترخون دارای اثر ضدباکتریایی بوده که در مقایسه با اثر ضدباکتریایی آنتی‌بیوتیک‌های وانکومایسین و جنتامایسین، تأثیر کمتری دارد. لذا به‌منظور کاربرد بالینی اسانس، انجام تحقیقات بیشتر ضروری است.

کلید واژه‌ها: مواد ضدعفونی‌کننده؛ ترخون؛ ترکیبات شیمیایی؛ روغن فرّار.

*نویسنده مسئول مکاتبات:
فریده طباطبایی یزدی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:
tabatabai@um.ac.ir

تاریخ دریافت:۱۳۹۵/۴/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۵/۱۸

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Alizadeh Behbahani B, Tabatabaei Yazdi F, Shahidi F, Mortazavi SA, Mohebbi M. Investigation of chemical compounds and antibacterial activity of tarragon (Artemisia dracunculus) essential oil on some pathogenic bacteria in vitro. Qom Univ Med Sci J 2017;11(9):42-51. [Full Text in Persian]

مقدمه

از مشکلات اساسی و مهم در صنعت داروسازی و علم پزشکی، افزایش مقاومت میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا به عوامل ضدمیکروبی می‌باشد (۱). ایران از لحاظ شرایط آب و هوایی و موقعیت جغرافیایی در زمینه پرورش گیاهان دارویی، یکی از مهم‌ترین کشورهای جهان به شمار می‌آید. جایگاه گیاهان دارویی در طب سنتی کشور، تمایل مردم به استفاده از این گیاهان جهت درمان و منابع غنی گیاهی در دسترس، از یک‌سو و مشکلات موجود ازجمله مسئله مقاومت آنتی‌بیوتیکی و هزینه‌های درمان از سوی دیگر، دلیلی برای بررسی دقیق‌تر و هرچه بیشتر پژوهشگران و محققان در زمینه استفاده از این گیاهان است (۲). با توجه به مشخص شدن عوارض جانبی و آثار متعدد و زیان‌بخش داروهای شیمیایی، امروزه مسئله به‌کارگیری و جایگزین کردن داروها با منشأ گیاهی و طبیعی مورد توجه قرار گرفته است، همچنین استفاده از عصاره‌های تام گیاه به جای یک ماده خالص جداشده از گیاه، مدنظر پژوهشگران واقع شده است (۳). مطالعات حاکی از آن است که گیاهان به‌عنوان منابع غنی از ترکیبات ضدمیکروبی، حاوی مقادیر قابل‌توجهی متابولیت‌های ثانویه شامل ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها، آلکالوئیدها و فلاونول‌ها نیز می‌باشند که به‌صورت پیش‌سازهای غیرفعال ذخیره‌شده در بافت‌های گیاهی قرار دارند (۴).

گیاه ترخون یا تلخون با نام علمی *Artemisia dracunculus* از تیره کاسنی یا گل ستاره است. برحسب شرایط اقلیمی و موقعیت جغرافیایی، حدود ۴۰۰-۲۰۰ گونه آن در سرتاسر جهان یافت می‌شود. براساس پژوهش‌های انجام‌شده در زمینه شناسایی گونه‌های مختلف ترخون، تاکنون در ایران ۳۴ گونه از این گیاه یافت شده است (۵). بسیاری از گونه‌های ترخون، معطر و غنی از اسانس هستند که این عطر ناشی از وجود مونوترپن‌ها (Monoterpene) و سزکویی‌ترپن‌ها (Sesquiterpene) بوده و دلیل کاربرد آنها در طب سنتی نیز می‌باشد. ترخون در مناطق دارای آب و هوای گرم و آفتابی، رشد می‌کند. ترخون تازه دارای ۷۰-۶۰٪ استراگول (Estragole)، ۲۰-۱۵٪ اوسیمن (Ocimene) و متیل کاویاکول (Methylchaviacol) می‌باشد.

همچنین مقداری تانن در ترخون یافت می‌شود (۶،۵). با توجه به شرایط آب و هوایی و موقعیت جغرافیایی ایران، اکنون پرورش این گیاه در تمام نقاط کشور معمول است. ترخون در معطر کردن غذا و نوشیدنی‌ها نیز کاربرد دارد. به‌طورسنتی از این گیاه در درمان رماتیسم، دردهای مفصل و تقویت معده استفاده می‌شود (۵،۶). گونه‌های مختلف ترخون، عملکرد ضدالتهابی و تب‌بر داشته و اثر ضدباکتریایی، ضدویروسی، ضدمالاریایی، ضدقارچی و آنتی‌اکسیدانی دارند (۷).

با توجه به بومی بودن گیاه ترخون در ایران، دسترسی آسان و ارزان، همچنین مصرف غذایی و دارویی از زمان‌های دور؛ این مطالعه می‌تواند مقدمه‌ای جهت استفاده عملی از اسانس این گیاه در صنایع دارویی و غذایی باشد تا بدین طریق هم امکان استفاده از یک منبع سهل‌الوصول و مقرون به‌صرفه فراهم گردد و هم از هدر رفتن محصول و خسارت‌های ناشی از آن جلوگیری شود تا در نهایت، گامی جهت اعتلای بهداشت و ایمنی غذایی جامعه برداشته شود. لذا این پژوهش با هدف شناسایی ترکیبات و اجزا تشکیل‌دهنده اسانس ترخون و بررسی فعالیت ضدباکتری اسانس آن بر تعدادی از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در شرایط برون‌تنی *in vitro* انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی، ابتدا شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس ترخون در پژوهشکده علوم گیاهی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی در سال ۱۳۹۴ انجام گرفت، سپس به ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی اسانس ترخون در آزمایشگاه میکروب‌شناسی صنعتی دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد پرداخته شد. گیاه ترخون از بازار محلی مشهد (خراسان رضوی)، خریداری شد. تعیین جنس و گونه گیاه توسط گیاه‌شناس پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد (به شماره نامه ۱۳۸) شناسایی گردید و با نام علمی *Artemisia dracunculus* مورد تأیید قرار گرفت و جهت انجام آزمایش‌ها به آزمایشگاه میکروب‌شناسی صنعتی، منتقل و پس از یک شست‌وشوی ساده و آبکشی (جهت رفع گرد و خاک موجود در سطح گیاه)، در سایه خشک شد. به‌منظور تهیه اسانس ترخون، گیاه به‌وسیله آسیاب آزمایشگاهی

(مدل Waring) خرد شده و برای یکنواختی اندازه ذرات، برگ‌های پودرشده از الک آزمایشگاهی عبور داده شدند، سپس ۱۰۰ گرم از پودر گیاه خشک پس از توزین با ترازوی دیجیتال به‌وسیله دستگاه کلونجر به مدت ۳ ساعت با سرعت تقطیر ۱ میلی‌لیتر در دقیقه اسانس‌گیری شد. در ادامه، اسانس با سولفات سدیم بدون آب، آبگیری و در ظرف دربسته استریل تیره‌رنگ، دور از نور و در یخچال نگهداری شد (۸).

شناسایی ترکیبات اسانس استخراج‌شده با تزریق ۰/۲ میکرولیتر از اسانس ترخون به دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف‌نگار جرمی (GC/MS) مدل TRACE MS (ساخت شرکت ThermoQuest-Finnigan) دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی (حاوی ستونDB-5 طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت فاز ساکن ۰/۲۵ میکرومتر متصل به طیف‌سنج جرمی مدل Quadrupole) انجام شد. دمای ستون از ۴۰ درجه سانتیگراد تا ۲۵۰ درجه سانتیگراد با سرعت ۲/۵ درجه سانتیگراد دردقیقه افزایش یافت. از گاز هلیم با سرعت ۱/۱ میلی‌لیتر در دقیقه و از انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون استفاده گردید. شناسایی نوع ترکیبات اسانس با کمک طیف نرمال آلکان‌ها و به دست آوردن شاخص بازداری آنها (شاخص کواتز) و مراجعه به فرهنگ ترکیبات طبیعی شناسایی گردید (۴).

سویه‌های میکروبی شامل *لیستریا اینوکوا* ATTC 33090، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* PTCC 1435، *سالمونلا تیفی* PTCC 1609 و *انتروباکتر آئروژینوزا* PTCC 1221 بود. جهت فعال‌سازی میکروارگانیسم‌ها، ابتدا سوسپانسیون میکروبی به‌صورت تازه از هر سوش میکروبی تهیه گردید، و ۲۴ ساعت قبل از انجام آزمایش به کمک آنس استریل، از کشت ذخیره (مادر) به محیط کشت شیب‌دار Muller Hinton Agar برای باکتری تلقیح انجام شد. سپس سوسپانسیون غلیظ میکروبی با استفاده از محلول رینگر (پس از رشد میکروارگانیسم بر سطح شیب‌دار آگار آن) تهیه گردید. درادامه، کدورت سوسپانسیون میکروبی حاصل به‌وسیله اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۲۵ نانومتر اندازه‌گیری شد و تا برابر شدن کدورت آن با کدورت محلول استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند به‌وسیله محلول رینگر رقیق شد (۹). به‌منظور تعیین وجود یا عدم وجود فعالیت ضدمیکروبی اسانس ترخون، از روش دیسک و اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد استفاده شد. در این روش ابتدا باکتری‌های مورد پژوهش در محیط کشت مولر هینتون آگار (مرک آلمان) به میزان $1/5\times10^{8}$CFU/ml تلقیح، سپس یک دیسک کاغذی استریل به قطر ۶ میلی‌متر و ضخامت ۱ میلی‌متر در سطح پتری قرار داده شد و میزان ۱۰ میکرولیتر از اسانس ترخون بر روی دیسک قرار گرفت. فاصله دیسک‌ها از دیواره پتری، حداقل ۲۰ میلی‌متر و از یکدیگر حداقل ۲۵ میلی‌متر تعیین گردید. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت از زمان انکوبه‌گذاری، قطر هاله‌های عدم رشد با خط‌کش به‌طور دقیق اندازه‌گیری و برحسب میلی‌متر گزارش شد. تمامی آزمایش‌ها ۳ بار تکرار شد (۱۰). از دیسک حاوی حلالDMSO، به‌عنوان کنترل استفاده گردید.

روش Micro dilution broth (مطابق روش به کار گرفته‌شده در مطالعه کلاهی مرند و همکاران و مهربان و همکاران) جهت تعیین و ارزیابی حداقل غلظت ممانعت‌کننده از رشد (MIC)، به کار برده شد. در این روش ابتدا کشت تازه از هر میکروارگانیسم معادل $1/5\times10^{8}$CFU/ml (معادل استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند) تهیه و میزان ۲۰ میکرولیتر به هر چاهک تلقیح شد. از پلیت ۹۶ خانه‌ای جهت بررسی استفاده گردید. غلظت‌های مختلف اسانس با رقیق‌سازی محلول اصلی تهیه شدند. محلول اصلی با غلظت ۱۴۷/۲ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر دی‌متیل سولفوکساید، تهیه و غلظت‌های مختلف اسانس ترخون با استفاده از آن به دست آمد. غلظت‌ها شامل ۴/۶، ۹/۲، ۱۸/۴، ۳۶/۸، ۷۳/۶ و ۱۴۷/۲ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر بود. همچنین از چاهک‌های کنترل مثبت (محیط کشت باکتری، بدون اسانس) و کنترل منفی (محیط کشت بدون باکتری) به‌عنوان شاهد استفاده شد. پس از آن پلیت ۹۶ خانه‌ای در انکوباتور (با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت) گرمخانه‌گذاری شد.

پس از طی مدت گرمخانه‌گذاری، محلول تری فنیل تترازولیوم کلراید (Triphenyltetrazolium chloride) با غلظت ۵ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر تهیه شد و به هر خانه ۲۵ میکرولیتر از این معرف افزوده گردید (در خانه‌هایی که رشد میکروبی اتفاق می‌افتد ظرف کمتر از نیم‌ساعت، رنگ قرمز تیره یا ارغوانی ایجاد می‌شود.)

اولین غلظتی که در آن رشد باکتری مشاهده نشد و رنگ قرمز تشکیل نگردید، به‌عنوان MIC گزارش شد (۱۲،۱۱).

شکل شماره ۱: تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی از رشد اسانس ترخون، با استفاده از پلیت ۹۶ خانه‌ای و معرف تری فنیل تترازولیوم.

از خانه‌هایی که در آن رشد باکتری و در نتیجه تغییر رنگ مشاهده نشد، برای تعیین (MBC) استفاده گردید. در این روش، ۵ میکرولیتر از خانه‌های فاقد رنگ، بر محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد، سپس محیط کشت حاوی باکتری بعد از ۲۴ ساعت، انکوبه‌گذاری شد. حداقل غلظتی از اسانس که باکتری در آن رشد نکرده بود، به‌عنوان حداقل غلظت کشندگی (MBC) در نظر گرفته شد (۱۳).

تمامی آزمایش‌ها در سه تکرار انجام گرفت، برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۸ و واریانس یک‌طرفه استفاده شد.

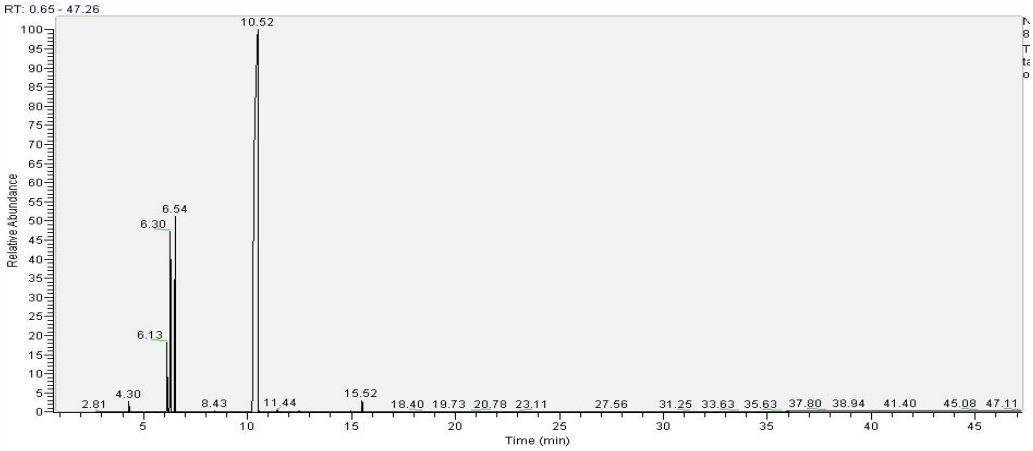
یافته‌ها

نتایج آنالیز اسانس ترخون به‌وسیله دستگاه GC-MS در جدول شماره ۱ آورده شده است. ۱۸ ماده فرّار شیمیایی که در مجموع، ۹۹/۹۸٪ ترکیبات اسانس ترخون را تشکیل می‌دادند، شناسایی شدند. ترکیب عمده اسانس را p-Allylanisole (۸۴٪) تشکیل می‌داد. علاوه بر این، ترکیبات اصلی دیگری شامل Ocimene (E)-beta (۷/۴۶٪)، Ocimene (Z)-beta (۶/۲۴٪)، p-Cymene و Limonene (۱/۴۲٪)، ترکیب غالب بودند.

راندمان اسانس ترخون برابر با ۱/۲v/w و رنگ آن متمایل به زرد بود. اعداد مندرج در ستون عمودی کروماتوگرام (شکل شماره ۲)، مقدار فراوانی ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس ترخون را نشان می‌دهد و ستون افقی، زمان جداسازی و شناسایی هریک از ترکیبات اسانس در ستون را بیان می‌کند. برای تأیید شناسایی‌های انجام‌شده توسط طیف‌های جرمی، از شاخص بازداری کواتس که نتایج آن در جدول شماره ۱ آورده شده است، استفاده گردید.

جدول شماره ۱: ترکیبات شناسایی‌شده اسانس ترخون

ردیف	درصد	ترکیب شناسایی‌شده	شاخص کوارتز
۱	۰/۲۱	α-Pinene	۹۳۳
۲	۰/۰۱	Sabinene	۹۷۲
۳	۰/۰۱	β-Pinene	۹۷۷
٤	۰/۰۱	β-Myrcene	۹۸۸
۵	۰/۰۲	α-Phellandrene	۱۰۰۶
٦	۱/۴	Limonene	۱۰۲۸
۷	۶/۲	Ocimene<(Z)-beta->	۱۰۳۶
۸	۷/۴	Ocimene<(E)-beta->	۱۰۴۶
۹	۰/۰۲	α-Terpinolene	۱۰۸۸
۱۰	۰/۰۱	Linalool	۱۰۹۹
۱۱	۰/۰۲	allo-Ocimene	۱۱۲۸
۱۲	۸۴/۰۰	p-Allylanisole	۱۲۱۳
۱۳	۰/۰۸	Carvone	۱۲۴۷
١٤	۰/۰۳	l-Bornyl acetate	۱۲۸۷
۱۵	۰/۰۳	Methyl cinnamate<E->	۱۳۸۴
١٦	۰/۳۸	Methyleugenol	۱۴۰۵
۱۷	۰/۰۲	Spathulenol	۱۵۸۰
۱۸	۰/۰۱	Dillapiole	۱۶۲۶



شکل شماره ۲: کروماتوگراف اسانس ترخون.

بیشترین قطر هاله عدم رشد مربوط به باکتری *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و کمترین قطر هاله در این غلظت مربوط به باکتری گرم منفی *انتروباکتر آئروژینوزا* بود. میانگین قطر هاله عدم رشد برای باکتری‌های گرم مثبت برابر با ۱۲/۷ و برای آنتی‌بیوتیک وانکومایسین، ۱۴/۲ میلی‌متر برآورد شد.

میانگین قطر هاله عدم رشد برای باکتری‌های گرم منفی برابر با ۸/۹۵ و برای آنتی‌بیوتیک جنتامایسین، ۱۴ میلی‌متر به دست آمد (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۲: میانگین قطر هاله عدم رشد به روش انتشار در آگار به کمک دیسک (دیفوژن آگار) بر باکتری‌های مورد مطالعه (برحسب میلی‌متر)

نوع ماده/ باکتری	*استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*	*لیستریا اینوکوا*	*سالمونلا تیفی*	*انتروباکتر آئروژینوزا*
اسانس ترخون	۱۴/۲±۰/۵[a]	۱۱/۲±۰/۵[a]	۹/۸ ±۰/۵[a]	۸/۱±۰/۵[a]
وانکومایسین	۱۶/۰۰±۰/۵[b]	۱۲/۴±۰/۵[a]	–	–
جنتامایسین	–	–	۱۵/۲±۰/۵[b]	۱۲/۸±۰/۵[b]

حروف مشابه در یک ستون، نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار (سطح ۵٪) می‌باشد.

حروف غیرمشابه در یک ستون، نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار (سطح ۵٪) می‌باشد.

حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس ترخون برای باکتری‌های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، لیستریا اینوکوا، سالمونلا تیفی* و *انتروباکتر آئروژینوزا* به ترتیب برابر ۴/۶، ۹/۲، ۱۸/۴ و ۳۶/۸ بود. حداقل غلظت کشندگی اسانس ترخون برای باکتری‌های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، لیستریا اینوکوا، سالمونلا تیفی* و *انتروباکتر آئروژینوزا* به ترتیب ۹/۲، ۹/۲، ۳۶/۸ و ۷۳/۶ به دست آمد (جدول شماره ۳)

جدول شماره ۳: نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) وحداقل غلظت کشندگی (MBC) اسانس ترخون به روش میکرودایلوشن براث و معرف تری فنیل تترازولیوم، بر میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه

باکتری	MIC	MBC
استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس	۴/۶	۹/۲
لیستریا اینوکوا	۹/۲	۹/۲
سالمونلا تیفی	۱۸/۴	۳۶/۸
انتروباکتر آئروژینوزا	۳۶/۸	۷۳/۶

بحث

طبق بررسی‌ها و داده‌های جمع‌آوری‌شده، تاکنون در مورد ترکیبات متشکله از اسانس ترخون تهیه‌شده در شهرستان مشهد، اطلاعاتی وجود ندارد. با توجه به اینکه گیاهان دارویی در کشور ایران پراکندگی وسیعی داشته و ایران از لحاظ آب و هوایی نیز یکی از بهترین مناطق جهت پرورش گیاهان دارویی می‌باشد، مطالعات روی این گیاهان از نظر شناسایی ترکیبات تشکیل‌دهنده و ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی آنها، زمینه مناسبی را فراهم می‌کند تا بتوان از نتایج این بررسی‌ها در شرایط آزمایشگاهی جهت جایگزین کردن داروهایی با منشأ طبیعی برای کنترل و درمان عفونت‌های میکروبی استفاده کرد که این امر می‌تواند موجب کاهش مصرف داروهای شیمیایی و عوارض ناشی از آن شود (۱۴).

نتایج ترکیبات شناسایی‌شده اسانس ترخون در پژوهش حاضر با نتایج سایر مطالعات تا حدودی همخوانی داشت. با توجه به نوع واریته و شرایط آب و هوایی، مرحله رشد یا زمان جمع‌آوری گیاه و رویشگاه ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس متفاوت است. این نکته از آن جهت حایز اهمیت است که ترکیبات شناسایی‌شده در گیاهان در مناطق مختلف با یکدیگر متفاوتند. در مطالعه حاضر، ترکیب عمده اسانس ترخون را p-Allylanisole (۸۴٪) تشکیل می‌داد. علاوه بر این، ترکیبات اصلی دیگر شامل Ocimene (E)-beta (۷/۴۶٪)، Ocimene (Z)-beta (۶/۲۴٪)، p-Cymene و Limonene (۱/۴۲٪)، ترکیب غالب بودند. در مطالعه‌ای‌که توسط Kalemba در ترکیه انجام شد، مشخص گردید (Z)- anethole (۸۱٪) و limonene (۳/۱٪)، ترکیبات عمده اسانس ترخون را تشکیل می‌دهند (۱۵). میزان ترکیب‌های موجود در اسانس گیاهان ناشی از تفاوت‌های اکولوژیک مانند طول و عرض جغرافیایی، ارتفاع، دما، رطوبت، اقلیم و خاک؛ مسیرهای متابولیکی و بیوسنتز مواد مؤثره در این گیاهان را تحت‌تأثیر قرار داده و در نتیجه، متابولیت‌های ثانویه متنوعی تحت شرایط محیطی متفاوت بیوسنتز می‌شود. استفاده صحیح از گیاهان دارویی، مستلزم اطلاعات دقیق علمی و شناخت ترکیبات شیمیایی موجود در آنها می‌باشد؛ زیرا وجود ترکیبات شیمیایی است که باعث اثر درمانی در گیاه می‌شود (۱۶). با توجه به اینکه درمان با آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی، همواره نگرانی عوارض جانبی دارو را به همراه دارد.

گیاهان دارویی با دارا بودن فواید متعدد از قبیل ارزان و قابل‌دسترس بودن جهت درمان بیماری‌ها ازجمله بیماری‌های عفونی مورد توجه قرار گرفته‌اند. لینالول نوعی ترکیب مونوترپنی است که در طب سنتی استفاده‌های فراوانی داشته و در اسانس ترخون نیز یافت می‌شود. این ترکیب دارای اثرات ضدباکتریایی و ضدقارچی قابل‌ملاحظه‌ای نیز می‌باشد (۱۷). نتایج نشان داد بیشترین قطر هاله عدم رشد مربوط به باکتری *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و کمترین قطر هاله در این غلظت مربوط به باکتری گرم منفی *انتروباکتر آئروژینوزا* بوده است. چالشتری و همکاران با بررسی اثر ضدمیکروبی اسانس ترخون بر *لیستریا مونوسایتوژنز*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سراشیا مارسسنس*، *شیگلا دیسانتری* و *الکالیژنز فکالیس* به روش میکرودایلوشن براث، نشان دادند حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس ترخون بر باکتری‌های مورد بررسی در محدوده ۲۵۰ -۳/۸ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر می‌باشد. بیشترین اثر ضدمیکروبی نیز بر باکتری *شیگلا دیسانتری* مشاهده گردید (۱۸). نصیرپور و همکاران، اثر ضدباکتریایی عصاره آبی *Artemisia aucheri*، *Artemisia sieberi* و *Hyssopus officinalis* بر باکتری‌های *اشرشیاکلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا مونوسایتوژنز* مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد عصاره هر سه گیاه مورد آزمون دارای اثر ضدباکتریایی قوی‌تری علیه باکتری‌های گرم مثبت نسبت به گرم منفی‌ها می‌باشد (۷). براساس تحقیقات انجام‌شده، باکتری‌های گرم مثبت نسبت به عصاره و اسانس‌ها، حساس‌تر از باکتری‌های گرم منفی هستند. به دلیل وجود غشاهای خارجی احاطه‌کننده دیواره سلولی در باکتری‌های گرم منفی، این باکتری‌ها در برابر اثر ضدباکتریایی اسانس‌ها، حساسیت کمتری از خود نشان می‌دهند. این غشای خارجی، انتشار مواد آبگریز از میان این لایه پوشاننده لیپوپلی ساکاریدی را محدود می‌کند. در باکتری‌های گرم مثبت، تماس مستقیم ترکیب‌های آبگریز با این فسفولیپید دولایه‌ای صورت می‌گیرد. در نتیجه، این ترکیب‌ها اثر خود را برجای می‌گذارند. این اثر یا به‌صورت افزایش نفوذپذیری یون‌ها و یا نشت ترکیب‌های حیاتی سلولی رخ می‌دهد (۱۹،۲۰).

طباطبایی یزدی و همکاران با بررسی اثر ضدمیکروبی *Mespilus germanica* بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *اشرشیاکلی* در شرایط آزمایشگاهی، نشان دادند میزان قطر هاله عدم رشد بر باکتری *اشرشیاکلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* به‌طور معنی‌داری کمتر از باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* است، همچنین نتایج نشان داد کمترین اثر بازدارندگی بر باکتری گرم منفی *سودوموناس آئروژینوزا* بوده؛ درحالی‌که بیشترین اثر بازدارندگی بر باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* مشاهده گردید (۳). نتایج این پژوهش نشان داد حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس ترخون برای باکتری‌های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، *لیستریا اینوکوا*، *سالمونلا تیفی* و *انتروباکتر آئروژینوزا* در محدوده ۳۶/۸ -۴/۶ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر می‌باشد، همچنین نتایج حداقل غلظت‌کشندگی نشان داد رِنج کشندگی اسانس ترخون بر باکتری‌های مورد مطالعه، ۷۳/۶ -۹/۲ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر بوده است. به‌طورکلی می‌توان نتیجه گرفت حداقل غلظت‌کشندگی همواره برابر یا بزرگتر از حداقل غلظت مهارکنندگی است. مطالعات متعددی نشان می‌دهد اثر ضدباکتری عصاره‌ها و اسانس‌ها بر باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از باکتری‌های گرم منفی می‌باشد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج مطالعه حاضر، اسانس ترخون دارای اثر ضدمیکروبی مناسبی بر میکروارگانیسم‌های مورد بررسی بوده و اثر ضدمیکروبی بر باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از باکتری‌های گرم منفی است. معمولاً اثر ضدمیکروبی گیاهان به یک نوع خاص متابولیت ثانویه نسبت داده نمی‌شود؛ بلکه به همکاری ترکیبات موجود در گیاه مربوط است. با توجه به اهمیت گیاه ترخون در طب سنتی و موارد استعمال فراوان آن، نتایج حاصل از این تحقیق، می‌تواند مقدمه‌ای برای معرفی این گیاه جهت درمان بیماری‌های عفونی باشد.

References:

1. Arzhang M, Dakhili M, Farahani F. Investigation of chemical compounds and anti-microbial activity of essential oil of Melissa officinalis L. Qom Univ Med Sci J 2015;9(1):7-13. [Full Text in Persian]

2. Afarin H, Dakhili M, Zofaghari MR. Comparison of the antimicrobial effect of Vitex agnuscastus essential oil with common antibiotics in vitro. Qom Univ Med Sci J 2015;9(3):12-19. [Full Text in Persian]

3. Tabatabaei Yazdi F, Alizadeh Behbahani B, Alghooneh A, Zanganeh H. Optimization of extraction of Mespilus germanica by mixture design and investigation of its effect on Infectious Microorganisms “in vitro”. Iranian J Food Sci Technol 2016;13(52):133-147. [Full Text in Persian]

4. Zarali M, Hojjati M, Tahmouzi Didehban S, Jooynadeh H. 2016. Evaluation of chemical composition and antibacterial activities of Echinophora cinerea Boiss and Stachys lavandulifolia Vahl essential oils in vitro. Iranian J Food Sci Technol 2016;13(52):1-12. [Full Text in Persian]

5. Ayoughi F, Marzegar M, Sahari M, Naghdibadi H. Chemical compositions of essential oils of Artemisia dracunculus L. and endemic Matricaria chamomilla L. and an evaluation of their antioxidative effects. J Agri Sci Technol 2010;13:79-88.

6. Sengul M, Ercisli S, Yildiz H, Gungor N, Kavaz A, Çetin B. Antioxidant, antimicrobial activity and total phenolic content within the aerial parts of Artemisia absinthum, Artemisia santonicum and Saponaria officinalis. Iran J Pharma Rese 2011;10(1):49-56.

7. Nasirpour M, Yavarmanesh M, Mohhamadi Sani A, Mohamdzade Moghadam M. Antibacterial effect of aqueous extract of Artemisia aucheri, Artemisia sieberi and Hyssopus officinalis L. on the food borne pathogenic bacteria. Iran J Food Sci Technol 2015;12(46):73-84. [Full Text in Persian]

8. Kalemba D, Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Curr Med Chem 2003;10(10):813-29.

9. Alizadeh Behbahani B, Tabatabaei Yazdi F, Mortazavi A, Zendeboodi F, Gholian MM, Vasiee A. Effect of aqueous and ethanolic extract of Eucalyptus camaldulensis L. on food infection and intoxication microorganisms “in vitro”. J Param Sci 2013;4(3):89-99.

10. Bogdadi HAA, Kokoska L, Havlik J, Kloucek P, Rada V, Vorisek K. In-vitro antimicrobial activity of some Libyan medicinal plant extracts. Pharm. Biol 2007;45(5):386-91.

11. Kolahi Marand S, Tabatabaei Yazdi F, Mortazavi SA, Beig Babaei A. Inhibitory and bactericidal effects of Artichoke (Cynara scolymus) on pathogenic strains and their comparison with antibiotics in vitro. Qom Univ Med Sci J 2016;10(2):32-42. [Full Text in Persian]

12. Mehraban A, Haddad Khodaparast MH, Mehraban Sang Atash M. Evaluation of Inhibitory and Lethal effects of aqueous, ethanolic and hydroalcoholic extracts of aerial parts of salvia chorassanica against some gram-negative and gram-positive bacteria in vitro. Qom Univ Med Sci J 2016;10 (2):2-11. [Full Text in Persian]

13. Alizadeh Behbahani B, Tabatabaei Yazdi F, Shahidi F, Mohebbi M, Zanganeh H. Investigation of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of the Aqueous and Ethanolic avicennia marina extracts on gram positive and gram negative bacteria “in vitro”. Sadra Med Sci J 2014;2(2):123-34.

14. Khanahmadi M, Rezazadeh S, Shahrezaei F, Taran M. Study on chemical composition of essential oil and anti-oxidant and anti-microbial properties of Artemisia haussknechtii. J Med Plants 2009;8 (31):132-41.

15. Kalemba, D, Kusewicz D, Swiader K. Antimicrobial properties of the essential oil of Artemisia asiatica Nakai. Phytother Res 2002,288-91.

16. Rahimi-Nasrabadi M, Gholivand MB, Niasarv M, Vatanara A. Chemical composition of the essential oil from aerial parts of echinophora platyloba dc from Iran. J Med Plants 2010;9(6):53-6.

17. Chun KH, Kosmeder JW, Sun S, Pezzuto JM, Lotan R, Hong WK, et al, Effects of deguelin on the phosphatidylinositol 3- kinase/Akt pathway and apoptosis in premalignant human bronchial epithelial cells. J Natl Cancer Inst 2003;95(4):291-302.

18. Sharafati-Chaleshtori R, Rokni N, Razavilar V, Rafieian-Kopaei M. The Evaluation of the antibacterial and antioxidant activity of tarragon (Artemisia dracunculus L.) Essential oil and its chemical composition. Jundishapur J Microbiol 2013;6(9):1-5.

19. Tabatabaei Yazdi F, Alizadeh Behbahani B, Vasiee A, Mortazavi SA, Yazdi FT. An investigation on the effect of alcoholic and aqueous extracts of Dorema aucheri (Bilhar) on some pathogenic bacteria in vitro. J Param Sci 2015;6(1):58-64.

20. Alizadeh-Behbahani B, Tabatabaei-Yazdi F, Noorbakhsh H, Riazi F, Jajarmi A, Tabatabaei-Yazdi F. Study of the antibacterial activity of methanolic and aqueous extracts of Myrtus communis on pathogenic strains causing infection. Zahedan J Res in Med Sci 2016;18(2):1-7.