مقایسه اثر عصاره متانولی و اسانس گیاه زنیان بر اشریشیاکلی و انتروکوکوس فکالیس

هانیه احمدپور[1]، مجتبی معصومی[2]، فاطمه توحیدی[3]، پژمان فرهادی[4]*

1-کارشناسی ارشد رشته مهندسی شیمی-بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت الله آملی
2 -دکترای مهندسی شیمی، عضو هیات علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت الله آملی
3 -دکترای بیوتکنولوژی پزشکی، عضو هیات علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل
4-کارشناسی ارشد مهندسی شیمی. دانشگاه آزاد اسلامی واحدآیت الله آملی

***نشانی برای مکاتبه:** Farhadipejman593@yahoo.com ، 093996297863

دریافت مقاله: مرداد نود و هفت پذیرش برای چاپ: مهر نود و هفت

چکیده

سابقه و هدف: *گیاه زنیان ازخانواده چتریان می باشد. اسانس و عصاره ی دانه این گیاه حاوی ترکیباتی هستند که خاصیت های بیولوژیکی آن را نشان می دهد. این پژوهش با هدف مقایسه اثر ضدمیکروبی اسانس و عصاره متانولی گیاه زنیان انجام پذیرفت.*

روش کار: *ترکیبات شیمیایی این گیاه دارویی با GC-MS بررسی شد و 7 ترکیب مختلف که در مجموع 85 درصد کل وزن اسانس گیاه را تشکیل میدهند، شناسایی شدند و ترکیبات گروه های عاملی آن با استفاده از آنالیز FTIRبررسی شدند. سپس با استفاده از روش ماکرودایلوشن خاصیت ضدباکتریایی آن ها با تعیین حداقل غلظت بازدارندگی(MIC) و حداقل غلظت کشندگی(MBC) علیه باکتری های اشریشیاکلی(ATCC25922) و انتروکوکوس فکالیس(ATCC29212) بررسی شدند.*

یافته ها: *نتایج به دست آمده نشان داد که اسانس زنیان از اجزای اصلی زنیان تیمول(29٪)، لیمونن(21٪) و گاما ترپینن(18.675٪) تشکیل شده است. گروهای عاملی بدست آمده از پیک های حاصله FT-IR، حاکی از وجود ترکیبات فلانوئیدی در عصاره آن می باشد که خاصیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی آن به اثبات رسیده است. نتایج برای عصاره متانولی زنیان، (MIC) 15.62mg/ml، را علیه باکتری انتروکوکوس فکالیس و31.25mg/ml را علیه باکتری اشریشیاکلی نشان می دهد و (MBC) 125mg/ml، علیه انتروکوکوس فکالیس و62.5mg/mlعلیه باکتری اشریشیاکلی بدست آمده است. MIC و MBC اسانس این گونه علیه باکتری انتروکوکوس فکالیس 5mg/ml و علیه باکتری اشریشیاکلی0.625mg/mlیافت شدند.*

نتیجه گیری: *اسانس زنیان و عصاره متانولی آن نقش به سزایی در خاصیت ضدمیکروبی ایفا می کنند و اسانس آن به مراتب قوی تر از عصاره آن عمل می کند.*

واژگان کلیدی: زنیان، اسانس، عصاره، ضدمیکروبی

مقدمه

استفاده از گیاهان دارویی بر درمان بیماری ها قرن ها سابقه دارد. با وجود آن که بسیاری از داروها شیمیایی هستند اما دست کم یک سوم داروها منشا گیاهی دارند یا پس از استخراج از گیاه تغییر شکل یافته اند(1). عصاره ها و اسانس های گیاهی دارای ترکیباتی هستند که می توانند علیه بسیاری از میکروارگانیسم ها به کار روند که این آثار ضد میکروبی علیه باکتری ها، قارچ ها، مخمرها ی عامل بیماری و عفونت اثبات شده است که به متابولیت های ثانویه ی گیاهی، مرتبط می باشد(2).

ایران از لحاظ آب و هوا و موقعیت جغرافیایی در زمینه رشد گیاهان دارویی یکی از بهترین مناطق جهان محسوب می شود و از زمان های قدیم یکی از منابع تولید و مصرف گیاهان دارویی بوده است(3). گیاه زنیان (Trachyspermum capticum) گیاهی علفی، بدون کرک معطر با ساقه افراشته به ارتفاع 20 الی 50سانتی متر و چتری با تعداد 8-6 انشعاب است(4،5). میوه یا دانه زنیان کوچک، تخم مرغی شکل است و رنگ زرد تیره، معطر و بوی عطر تیمول دارد و دانه آن بصورت خشک و رسیده مصرف می شود، اندام دارویی این

گیاه را میوه یا دانه آن تشکیل می دهد(5،6). این گیاه در بعضی مناطق دنیا از جمله هند، پاکستان، مصر و جنوب شرقی ایران یافت می شود و از دانه های آن به عنوان ادویه استفاده می شود. در کشور هند، در پخت غذاها و تهیه بیسکوییت و نان علاوه بر طعم دار کردن، برای خاصیت دارویی از آن استفاده می شود(7،8). دانه های زنیان غنی از فیبر، مواد معدنی، ویتامین ها، آنتی اکسیدان ها می باشد(7). تیمول موجود در آن که عمده ترین ترکیب شیمیایی آن می باشد، به عنوان یک آنتی باکتریال، ضد اسپام و داروی ضد قارچ شناخته شده است. به همین علت است که در بعضی مناطق از جمله هند، مصر و خاورمیانه برای درمان عفونت های پوستی بکار می رود(9). روغن دانه ی این گیاه نیز در خمیر دندان و عطر و لوازم آرایشی استفاده می شود(7-9). گیاه زنیان در طب سنتی به عنوان باد شکن، ضد تهوع، ملین، کرم کش، کاهش دهنده کلسترول خون، خلط آور و تقویت کننده معده، اشتهاآور و از بین برنده بوی بد دهان استفاده می شود(10). مطالعات انجام شده در مورد خواص ضد میکروبی گیاهان خانواده چتریان نشان دهنده ی فعالیت ضد میکروبی متوسط تا قوی این گیاهان است. سینگ و همکاران خواص ضد باکتریایی اسانس گونه ای از خانواده چتریان را علیه باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس و باکتری گرم منفی اشریشیاکلی بررسی کردند و نتیجه گرفتند که اسانس زنیان بسیار موثر است(11). رانی وکوهلر نشان دادند که عصاره زنیان علیه باکتری گرم منفی سالمونلا تیفی بسیار موثر تر از عصاره زیره سبز است(12). اوسکویی و همکاران تاثیر دانه ی زنیان را برباکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس و باکتری گرم منفی اشریشیاکلی بررسی کردند و نتایج اثر مهارکنندگی گیاه زنیان علیه این دو باکتری و تاثیر بیشتر آن بر جلوگیری از رشد باکتری گرم مثبت را نشان دادند(13). EscherichiaColi(اشریشیاکلی) نوعی باسیل گرم منفی از خانواده انتروباکتریاسه است که برخی از سروتیپ های آن موجب مسمومیت غذایی و اسهال می شوند، اشریشیاکلی بزرگترین عامل عفونت های ادراری است و به عنوان شاخص آلودگی آب شهری به فاضلاب در نظر گرفته می شود(14). انتروکوک ها کوکسی های گرم مثبت و کاتالاز منفی هستند که قادرند در حضور 6.5 درصد نمک و 40 درصد املاح صفراوی رشد نمایند، این باکتری ها فلور طبیعی روده موجودات خونگرم از جمله انسان محسوب می شوند. شایع ترین انتروکوک های دخیل در عفونت های انسانی انتروکوکوس فکالیس(85-90 درصد) هستند که منجر به ایجاد عفونت های مجاری ادراری ، زخم ها و حتی اندوکاردیت می شود(15،16) به علت مقاومت این باکتری ها در برابر آنتی بیوتیک و شیوع عفونت از طریق این دو باکتری و تاثیر گیاهان دارویی بر جلوگیری از رشد باکتری ها به علت وجود متابولیت های ثانویه این پژوهش به شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس زنیان با GC-MS و بررسی و مقایسه اثر ضد میکروبی عصاره ی متانولی و اسانس گیاه زنیان علیه باکتری گرم مثبت و گرم منفی ذکر شده می باشد و برای تعیین گروه های عاملی آن، عصاره گیاه زنیان توسط آنالیز FTIR بررسی شد.

روش کار

این پژوهش در آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه علوم پزشکی بابل انجام پذیرفت و سویه های میکروبی مورد استفاده در این پژوهش شامل انتروکوکوس فکالیس (ATCC29212) و اشریشیاکلی(ATCC25922) بودند. دانه ی گیاه زنیان از مزرعه ی داروخانه ی گیاهی از شهرستان بابل جمع آوری گردید و بعد از شستشو با آب مقطر استریل برای عصاره گیری و اسانس گیری در آزمایشگاه صنایع غذایی دانشگاه آیت الله آملی در سایه خشک گردید و با آسیاب پودر شد. استخراج اسانس از روش تقطیر با آب به وسیله دستگاه کلونجر انجام گرفت(17). 100 گرم از پودر گیاه زنیان در داخل بالن دستگاه ریخته شده و 1000 میلی لیتر آب به آن اضافه شد. عمل گرمادهی 3 الی 4 ساعت انجام شد و اسانس تولید شده ازشیر تحتانی خارج شده و در میکروتیوب های 5 سی سی درجای تاریک و در دمای 4 درجه سانتی گراد نگهداری شدند. جهت تهیه ی عصاره از روش ماسراسیون استفاده شد. به این منظور یک نمونه 50 گرمی از پودر گیاه با مقدار 500 سی سی از حلال متانول مخلوط شد سپس 72 ساعت در دمای محیط و در 100 دور بر دقیقه درون شیکر انکوباتور قرار گرفته و پس از فیلتر و تغلیظ توسط روتاری(streoglass strike 202، ایتالیا)، در پلیت شیشه ای ریخته و برای خشک کردن در آون قرار داده شد و پس از آن در جایی فاقد نور و در یخچال نگهداری شد.

بیست و چهار ساعت پیش از انجام آزمایش باکتری های مد نظر با استفاده از محیط کشت مولر هینتون آگار تهیه شده ، کشت تازه داده شدند. پس از رشد باکتری ها با استفاده از محیط کشت مولر هینتون براث سوسپانسیون میکروبی تهیه و از نظر کدورت با محلول استاندارد نیم مک فارلند سنجیده

شد(18). برای تعیین فعالیت ضد میکروبی عصاره ها از روش حداقل غلظت بازدارندگی(MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) به روش ماکرودایلوشن یا رقت لوله ای استفاده شد. برای این کار بعد از آماده سازی محیط کشت مولر هینتون براث آن را به 13 لوله آزمایش، در لوله ی به میزان 2 میلی لیتر و در مابقی لوله ها به میزان یک میلی لیتر منتقل شد. در مرحله ی بعد برای بررسی تاثیر عصاره مقدار 500 میلی گرم از پودر عصاره زنیان و برای بررسی تاثیر اسانس 20 میکرولیتر(هم ارز با 20 میلی گرم) در داخل اولین لوله ریخته شد. 11 لوله برای تعیین رقت و 2 لوله جهت کنترل مثبت(حاوی محیط کشت و سوسپانسیون میکروبی) و کنترل منفی (مخلوط عصاره یا اسانس و محیط کشت، فاقد سوسپانسون میکروبی) استفاده شد(18). بعد از گذشت 24 ساعت از حضور لوله ها در انکوباتور، تمام لوله ها با لوپ استریل و در کنار شعله در پلیت مولر هینتون آگار کشت داده شدند و در دمای 37 درجه قرار گرفته وانکوبه شدند و پس از 24 ساعت برای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC)و حداقل غلظت کشندگی(MBC) جهت تاثیر عصاره و اسانس برباکتری ها بررسی شدند (19). پلیت هایی که کمتر از 5 کلنی باکتری در آنها رشد کرده بعنوان MBC و پلیت های با کلنی باکتری کمتر از 500 بعنوان MIC در نظر گرفته شدند(20).

برای تهیه و شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس ابتدا 1میکرولیتر از نمونه های آماده شده اسانس به دستگاه کروماتوگرافی گازی تزریق شد و مناسب ترین برنامه ریزی دمایی ستون برای جداسازی کامل ترکیبات اسانس به دست آمد. همچنین درصد ترکیبات تشکیل دهنده اسانس و زمان بازداری هر ترکیب محاسبه گردید. سپس اسانس به دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف نگار جرمی نیز تزریق شده و طیف جرمی ترکیبات به دست آمد. شناسایی ترکیبات اسانس با استفاده از زمان بازداری و بررسی طیف های جرمی هر یک از اجزا اسانس و مقایسه ی آنها با طیف های مرجع انجام شد. در این مطالعه دستگاه گاز کروماتوگرافی نوعAGILENT7890A ساخت آمریکا با ستون مویینه به طول 30متر، قطر داخلی250میکرون و ضخامت لایه ی داخلی0.15 میکرون با برنامه ی دمایی ستون در ابتدا با دمای 50درجه سانتی گراد و توقف به مدت 1.5 دقیقه در این دما سپس افزایش دما تا 250درجه سانتی گراد با سرعت 5درجه سانتی گراد بر دقیقه و افزایش دمای ستون تا 320درجه سانتی گراد به مدت 10 دقیقه استفاده شد. دمای اتاقک تزریق 300درجه سانتی گراد بود و از گاز هلیوم به عنوان گاز حامل با سرعت جریان 0.8میلی لیتر در دقیقه استفاده گردید.طیف نگار جرمی مورد استفاده با انرژی یونیزاسیون70 الکترون ولت و دمای منبع یونیزاسیون 230 درجه سانتی گراد بود. درصد نسبی هریک از ترکیبات تشکیل دهندۀ اسانس با توجه به سطح زیر منحنی هر یک از پیکهای کروماتوگرام دستگاه و مقایسۀ آن با سطح کل زیر منحنی تعیین شد.

برای شناسایی گروه های عاملی ترکیبات شیمیایی و تشخیص کیفی نوع پیوندهای عصاره ی تولید شده ی گیاه زنیان از آنالیز طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز استفاده شد. دستگاه استفاده شده برای این آنالیز ساخت شرکت RAYLEGH آمریکا در محدوده عدد موجیcm^{-1} 600تا 3900بوده است. آماده سازی نمونه برای آنالیز تبدیل فوریه مادون قرمز برای نمونه های مایع، جامد و گاز متفاوت است. از آن جا که نمونه مورد استفاده در این پژوهش به صورت پودری است از روش تهیه قرص KBR بهره گرفته شد. برای آماده سازی نمونه به روش قرص KBR نمونه جامد کاملا پودر شده و با برمید پتاسیم پودری مخلوط می شود، سپس تحت فشار این مخلوط به صورت قرص کوچک درآمدند. دلیل استفاده از برمید پتاسیم این است که هیچ قله ای در ناحیه $650cm^{-1}$تا 3900 ایجاد نمی کند. در نهایت نمونه را در مقابل تابش اشعه قرار داده و طیف حاصل از تبدیل فوریه بدست می آید(21).

یافته ها

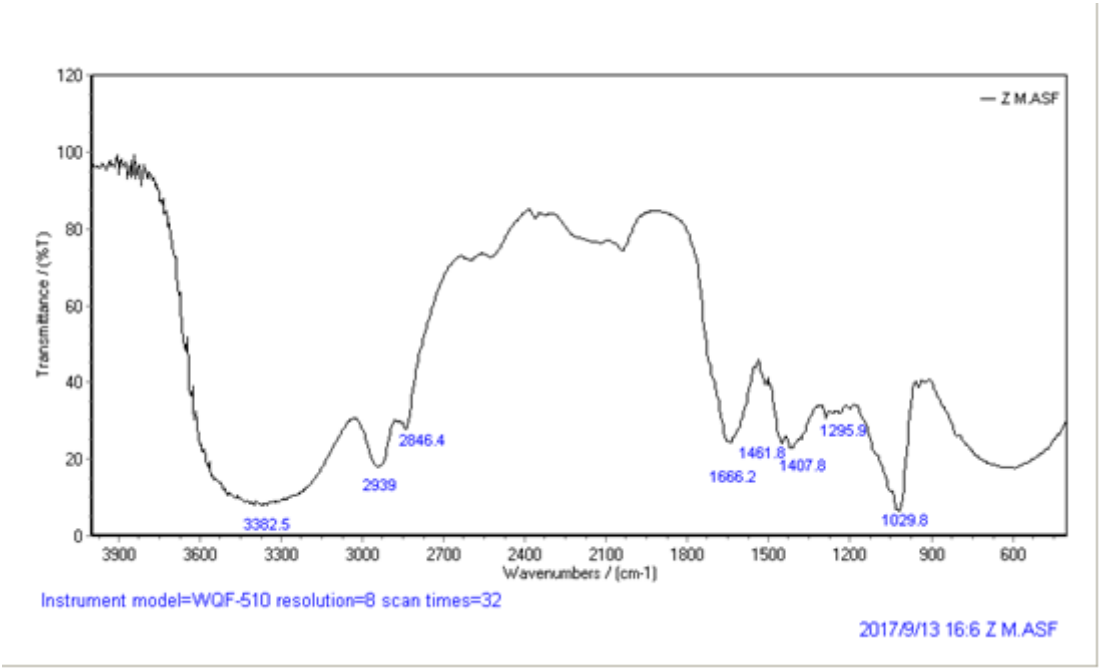
حداقل غلظت مهارکنندگی برای اشریشیاکلی و انتروکوکوفکالیس به ترتیب0/625 و 5 میلی گرم بر میلی لیتر از اسانس زنیان و 31/25 و 15/62 میلی گرم بر میلی لیتر از عصاره ی متانلی این گیاه محاسبه شد. حداقل غلظت کشندگی اسانس برای اشریشیاکلی و انتروکوکوفکالیس به ترتیب 0/625 و 5 میلی گرم بر میلی لیتر و برای عصاره ی متانلی زنیان به ترتیب 62/5 و 125 میلی گرم بر میلی لیتر بود.

در اسانس زنیان 7 ترکیب که درصد کل اسانس را تشکیل میدادند استخراج و شناسایی شد. عمده ترین ترکیبات شیمیایی تشکیل دهنده ی اسانس زنیان، تیمول (٪29)، لیمونن(٪21) و گاما ترپینن (٪18) بود(جدول 3).

جدول3: ترکیبات شناسایی شده اسانس زنیان

	زمان بازادری(دقیقه)	درصد
β-Pinene	9/5	2/1
Limonene	13/1	21/4
Cymene	14/4	17/8
gamma-terpinene	15/5	18/7
Thymol	25/7	29/7
β-selinene	29/5	5/6
5-hydroxyndole	36/5	1/9
o-propyphenol	38/1	2/8

با توجه به آنالیز FTIR (شکل1) عصاره متانولی زنیان مشاهده می شود که از طول موج $600cm^{-1}$ تا 3900 پیک هایی حاصل شدند که نشان از وجود گروه های عاملی و عنصر های متصل به ترکیبات شیمیایی عصاره متانولی زنیان هستند. همانطور که از منحنی پیداست و با مراجعه به کتاب پاویا(39) و نتایج سایر محققان پیک های حاصل تحلیل شدند. پیک های موجود نشان از وجود گروه های عاملی کربوکسیلیک اسیدی، ساختار O-H، C-O و C-N در طول موج های2939 ، 2846.4 ، 1029.8 و 3882.5 که متصل به ترکیبات الکلی(نوع اول) فنلی و آروماتیک می باشند(40). همچنین در پیک 1666.2 وجود گروه آلکنی(خمشی) را نشان می دهد که با توجه به آنالیز شیمیایی سایر محققین، متصل به ترکیبات ترپن ها که تشکیل دهنده ی عطر و بوی گل ها می باشند وجود دارد.



شکل1:منحنی حاصل از تست FT-IR عصاره ی متانلی زنیان

بحث

امروزه، یکی از مشکلات اصلی در رابطه با میکروارگانیسمهای بیماریزا، افزایش مقاومت آنها نسبت به آنتی بیوتیکها است .به لحاظ طبیعی بودن این ترکیبات، اثرات زیان بار سلامتی و محیط زیستی و یا مقاومت- های دارویی آنها نسبت به مواد نگهدارندۀ شیمیایی و آنتی- بیوتیکها بسیار کمتر است. علیرغم تحقیقات روزافزون در این زمینه، به مطالعات بیشتری دربارۀ فعالیت ضد میکروبی یا ترکیب شیمیایی گیاهان دارویی نیاز است. ازاینرو، این مطالعه با هدف بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره و اسانس زنیان بر روی دو باکتری بیماریزای مهم صورت گرفت. آنالیز اسانس زنیان با استفاده از GC-MS نشان داد که 7 ترکیب مختلف با 85٪ در آن وجود دارد. نشان داد که تیمول (29٪)، لیمونن(21٪) و گاما ترپینن (18٪) بیشترین ترکیبات تشکیل دهنده ی اسانس زنیان هستند. با توجه به نتایج فوق عمده ترین ترکیبات شناسایی شده دارای خواص آنتی باکتریایی مهم و قوی هستند که در نتایج سایر محققان هم به دست آمده اند. Sirvastana و همکاران در سال 1999 یازده ترکیب را در اسانس تشخیص دادند که کارواکرول و سیمنن بالاترین درصد ترکیبات این گیاه بودند(22). Khaje و همکاران(2004)، نشان دادند که اسانس استخراج شده از زنیان حاوی 8 ترکیب اصلی از جمله تیمول(49٪)، سیمنن(15.7٪)، گاما تریپنن(30.8٪) و بتا پینن(2.1٪) بود. اما اسانس استخراج شده از این گیاه با دی اکسید کربن به صورت حلال فوق بحرانی فقط حاوی سه ترکیب اصلی (تیمول، سیمنن و تریپنن) بود و میزان هر ترکیب بستگی به شرایط استخراج با حلال فوق بحرانی داشت(23). مقدم زاده و همکاران(2007) نشان دادند که زنیان دارای دو ترکیب تیمول و کارواکرول است(24). ساختمان شیمیایی هر اسانس برمیزان فعالیت ضدمیکروبی آن تاثیر مستقیم دارد. بررسی ها نشان داده اند که ترکیبات فنولیک نقش مهمی در خواص آنتی باکتریایی ادویه ها و گیاهان معطر ایفا می کنند. ترکیبات فنولیک خواص ضدمیکروبی خود را با روش های متفاوتی اعمال میکنند، برای مثال اسانس ها با تخریب دیواره ی سلولی باکتری ، پروتئین ها، تداخل در کار آنزیم های غشایی، اثر روی ساخت DNAو RNA و ... باعث نابودی میکروارگانیسم ها می شوند(25). اسانس ها و عصاره ها از گروه های شیمیایی متعدی تشکیل شده اند که این گروه ها مکانیسم متفاوتی در نابودی میکروارگانیسم ها دارند. مهم ترین خاصیت این گروه ها

هیدروفوب بودن آنها است. این مواد به لیپیدهای غشا سلول باکتری و میتوکندری وارد می شوند. این مساله سبب اختلال در ساختمان سلول ها و ایجاد نفوذ پذیری بیش تر آنها و در نتیجه خروج یون ها و دیگر محتویات سلولی اتفاق می افتد. اگرچه خروج مقادیر مشخصی از مواد داخلی باکتری می تواند برای سلول ها قابل تحمل باشد ولی خروج مقادیر زیاد محتویات سلولی سبب مرگ باکتری میشود(26). میتوان گفت با وجود مقادیر بالای ترکیبات شناسایی شده در این اسانس ها قدرت آنتی باکتریایی آنها نیز افزایش پیدا میکند، اسانس ها و عصاره هایی که دارای خواص آنتی باکتریایی قوی علیه باکتری های بیماری زا هستند، حاوی مقادیر زیادی ترکیبات تیمول، لیمونن، سیمنن، پینن می باشند.تحقیقات اخیر نشان داده است که اجزا موثر در فعالیت ضد میکروبی اسانس و عصاره گیاهان می باشد(27). نتایج بدست آمده نشان می دهد که عصاره ی متانولی و اسانس زنیان می توانند از رشد باکتری های *اشریشیاکلی* و *انتروکوکوس فکالیس* جلوگیری کنند. عصاره متانولی زنیان برای باکتری *اشریشیاکلی* در غلظت 31.25mg/mlدارای حداقل غلظت بازدارندگی و در 62.5mg/mlدارای حداقل غلظت کشندگی بود. اسانس زنیان در مقایسه با عصاره آن تاثیر چشمگیرتری داشته و در غلظت 0.625mg/mlدارای حداقل غلظت کشندگی و بازدارندگی بوده است. برای باکتری *انتروکوکوس فکالیس* در عصاره زنیان، غلظت 125mg/ml به عنوان حداقل غلظت کشندگی و غلظت 15.62mg/mlبه عنوان حداقل غلظت بازدارندگی بدست آمدند. بررسی تاثیر اسانس زنیان برروی *انتروکوکوس فکالیس* غلظت 5mg/mlرا به عنوان حداقل غلظت کشندگی و بازدارندگی نشان داد و در این مشاهده نیز اسانس زنیان تاثیر چشمگیرتری نسبت به عصاره ی آن داشته است. با توجه به نتایج به دست آمده تاثیر اسانس زنیان چشم گیر تر از تاثیر عصاره ی آن بوده زیرا در کمترین غلظت از آن تاثیر بهتری در جلوگیری از رشد باکتری های *اشریشیاکلی* و *انتروکوکوس فکالیس* داشت. عصاره متانولی زنیان تاثیر کشندگی بیشتر و بازدارندگی کمتری علیه باکتری *اشریشیاکلی* نسبت به باکتری *انتروکوکوس فکالیس* داشت و در مقایسه ی دو باکتری، اسانس زنیان در غلظت پایین تری از رشد *اشریشیاکلی* نسبت به *انتروکوکوس فکالیس* جلوگیری کرد. *اشریشیاکلی* و *انتروکوکوس فکالیس* باکتری های بیماری زا و عامل عفونت های ادراری می باشند، *اشریشیاکلی* به عنوان شاخص آلودگی آب و فاضلاب نیز در نظر گرفته می شود. ازبین بردن این دو باکتری به عنوان عامل آلودگی بهداشتی و عفونی حائز اهمیت است و با توجه به مقاومت به درمان و آنتی بیوتیک، بسیاری از متخصصین به دلیل اهمیت گیاهان در درمان بیماری ها، راه مناسب در درمان را استفاده از گیاهان دارویی می دانند(28). بدین منظور اسانس و عصاره ی گیاهان دارویی جایگاه قابل ملاحظه ای را به خود اختصاص داده است. وجود ترکیبات فعال بیولوژیکی مشتق از گیاهان جزو ترکیبات بی ضرر تلقی می شوند زیرا مواد حاصل از اسانس ها و عصاره های گیاهان را می توان جهت حفظ و نگهداری مواد غذایی در داروسازی به عنوان عامل درمانی جدید علیه بیماری ها و عفونت میکروبی به کاربرد(29،30). همانطور که در جدول 1 و 2 نشان داده شده است عصاره و اسانس گیاه زنیان دارای خاصیت ضدباکتریایی علیه باکتری های *اشرشیاکلی* و *انتروکوکوس فکالیس* می باشند. درمطالعه ی شفقت و همکاران در سال 1393 به بررسی اثرضدباکتریایی عصاره زنیان بررشد میکروارگانیسم *اشرشیاکلی* و استافیلوکوکوس اورئوس و پنوموکوک پرداخته شد در این مطالعه حداقل غلظت بازدارندگی برای باکتری های گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس وپنوموکوک به ترتیب 1.25mg/mlو 2.5mg/ml مشخص شد و این غلظت برای باکتری گرم منفی *اشرشیاکلی* 5mg/ml می باشد و با شناسایی ترکیبات، تیمول موجود در دانه این گیاه به عنوان یک ماده آنتی سپتیک و آنتی باکتریال معرفی شد(31). همچنین در مطالعه ی ذاکرین و همکاران در سال 1394 نشان داده شد که عصاره گیاه زنیان دارای حداقل غلظت بازدارندگی 31.25mg/mlبر روی باکتری *اشرشیاکلی* می باشد(32). که هم راستا با مطالعه ی حاضر می باشد. در مطالعه دیگر شفقت و همکاران در سال 1394 با توجه به روش تقطیر با آب و با دستگاه کلونجر اسانس گیاه زنیان تهیه شد و خاصیت ضدباکتریایی آن برروی باکتری *اشرشیاکلی* و استافیلوکوکوس اورئوس مشخص شد. حداقل بازدارندگی اسانس زنیان بر باکتری گرم مثبت 1.87mg/mlو علیه باکتری گرم منفی *اشرشیاکلی* 3.75mg/ml گزارش شد(33). در مطالعه ی بزرگی ماکرانی و همکاران خاصیت ضد باکتریایی گیاه زنیان و زیره برروی *انتروکوکوس فکالیس* بررسی شد و برای حداقل غلظت بازدارندگی100-50mg/ml و برای حداقل غلظت کشندگی 300-100mg/mlرا نشان داد(34). در مطالعه حاضر خاصیت ضدباکتریایی عصاره زنیان

علیه باکتری اشرشیاکلی کمتر از باکتری انتروکوکوس فکالیس می باشد که همسو با مطالعات شفقت و همکاران می باشد. خاصیت ضدباکتریایی اسانس زنیان بر باکتری اشرشیاکلی بیش تر از باکتری انتروکوکوس فکالیس می باشد که متفاوت با نتایج مطالعات شفقت و همکاران می باشد. در مطالعه ی شریفی و همکاران در سال 1393 اثرضد باکتریایی عصاره الکلی گیاه چویر بر باکتری گرم منفی و گرم مثبت مد نظر انجام شد.MIC برای انتروکوکوس فکالیس 50 mg/ml و MBC آن 100mg/mlو علیه باکتری اشرشیاکلی 25MICmg/mlو 200MBCmg/ml مشخص شد(35). که همراستا بامطالعه ی حاضر بوده و حساس بودن باکتری گرم مثبت را نسبت به باکتری گرم منفی در برابر عصاره گیاه چویر نشان می دهد. در مطالعه محبوبی و همکاران در سال 2012 خاصیت آنتی باکتریایی اسانس زنیان بر باکتری انتروکوکوس فکالیس و اشرشیاکلی بررسی شد و همچنین ترکیبات اسانس زنیان شناسایی شد. نتایج حاکی از حداقل غلظت بازدارندگی 2mg/ml برروی باکتری گرم مثبت و 0.5mg/mlبرروی باکتری گرم منفی می باشد(36). که همسو با مطالعه ی حاضر می باشد. طبق تحقیقات انجام شده ترکیب اصلی اسانس زنیان را تیمول (38 درصد) تشکیل می دهد(37). که یک ترکیب فلانوئیدی شناخته می شود و خاصیت آنتی اکسیدانی و آنتی باکتریایی دارد. طبق مطالعه حاضر بیشتر بودن معنادار تاثیر ضدباکتریایی اسانس زنیان نسبت به عصاره آن علیه باکتری گرم مثبت و گرم منفی، می تواند حاکی از بیشتر بودن ترکیب تیمول در اسانس آن باشد. آشکومار و همکارانش نیز نشان دادند که گروه های کاربردی اسید کربوکسیلیک، الکل، آلدئیدها، آمین ها، آمید ها، مشتقات گوگرد، هیدروکربن های آلی و هالوژن ها که مسئولیت خواص دارویی مختلف را نشان می دهند در اسانس و عصاره گیاهان مختلف به فراوانی وجود دارند(38). در این مطالعه پیک های متعدد حاصل از آنالیز FT-IR عصاره متانلی زنیان در طول موج های مختلف گواه بر وجود گروه های کاربردی عاملی و مشتقات دارویی بودند.

نتایج به دست آمده نشان می دهد که افراد در معرض بیماری های مرتبط با باکتری های مدنظر در صورت نشان دادن مقاومت به آنتی بیوتیک های موجود و بروز آلرژی و عوارض جانبی می توانند از فراورده های گیاهی مانند عصاره و اسانس زنیان به عنوان مکمل دارویی در سیکل درمانی و همچنین به عنوان یک ماده آنتی باکتریال در عفونت های ناشی از باکتری اشرشیاکلی و انتروکوکوس فکالیس استفاده گردد.

نتیجه گیری

در تحقیق حاضر اثر آنتی باکتریالی عصاره متانولی و اسانس گیاه زنیان بر باکتری اشرشیاکلی و انتروکوکوس فکالیس مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصل از تحقیق، اثر ضد باکتریایی بیشتر اسانس زنیان را نسبت به عصاره متانولی آن نشان داد و همچنین حساسیت بیشتر باکتری گرم مثبت را نسبت به باکتری گرم منفی در اثر گذاری عصاره زنیان نشان داد. این نتیجه برای اسانس زنیان به صورت عکس گزارش شد و خاصیت ضد باکتری اسانس زنیان برای باکتری اشرشیاکلی بیشتر از انتروکوکوس فکالیس می باشد. جهت رفع بیماری های عفونی و آلودگی هایی که باکتری مورد بحث، ایجاد کننده آن است می توان توجه بیشتر به گیاهان دارویی و روش های درمانی مبتنی بر آن را پیشنهاد کرد.

REFERENCES

1- Kermanshah H, Arami S, Mirsalehian A, Kamalinegad M, Karimi M, Ameli F. [In vitro evaluation of antibacterial carum copticum and Salvia officinalis extract against cariogenic microorganisms]. J Islam Dent Asso Iran, 2011; 23:10-14. (Persian)
2- Akhondzadeh Basti, A, Misaghi, A, Gheibi, S. Effect of Zataria multiflora Boiss essential oil on Log probability percentage of growth of Bacillus cereus in Brain & Heart Infusion Broth. J Med Plants. 2005; 4 (16): 48-55.
3- Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev. 1999; 12(4): 564-82.
4- Ghasemi N. Iranian herbal pharmacopée. Isfahan: Ministry of health and medical education;2002.
5- Hedge IC. Lamond JM. Trachyspermum. Flora Iranica 1987; 162: 336-8.
6- Zargari, A. Medicinal plants. Vol 3. Tehran: Tehran University Publications;. p. 513- 514. 1996.
7- Singh G, Maurya S, Catalan C, De Lampasona M P. Chemical, antifungal, antioxidative studies of Ajowan oil andits acetone extract.Journal Agricaltural Food Chemistry .2004; 52:3292-3296.
8- Shruti SH, Sachin, NH, Arun S. Aflatoxin inactivation using aqueous extract of Ajowan (Trachyspermumammi) seeds. Journal of Food Science 2005;70(1):29-34.
9- Shankaracharya N B, Nagalakshmi S, Naik J.P, Rao l J M. Studies on chemical and technological aspects of Ajowan (Trachyspermumammi) syn (Carum copticum) seeds. Journal of Food Science and Technologhy 2000; 37: 277-281.
10- Najafi, Sh. Medicinal plants, marandiz press, Mashhad,2011
11- Singh G, Kapoor IP, Pandey SK, Singh UK, Singh RK. Studies on essential oils: part 10; antibacterial activity of volatile oils of some spices. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives. 2002;16(7):680-2.
12- Rani P, Khullar N. Antimicrobial evaluation of some medicinal plants for their anti-enteric potential against multi-drug resistant Salmonella typhi. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives. 2004;18(8):670-3.
13- Kazemi Oskuee R, Behravan J, Ramezani M. Chemical composition, antimicrobial activity and antiviral activity of essential oil of Carum copticum from Iran. Avicenna Journal of Phytomedicine. 2011;1(2):83-90.
14- Shimi A. Veterinary bacteriology and bacterial diseases. Jahad Institute Press. 1997.p.185-297. (Persian)
15- Cetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG. Vancomycin-resistant enterococci. Clin Microbiol Rev13: 686–707.
16- Saeed AK, Mohamad SN, Ashraf AK, etal. Selective isolation of multi drugresistant Entrococcus spp. from poultry anddairy farms: Detection of virulence andvancomycin resistance gene markers byPCR. Molecular Cellular Probes. 2005,19:27-34.
17- Jaymand K, Rezaee M. Essential oil, Distillations Apparatuses, test Method of essential oil and Retention Indices in Essential oil Analysis. Iranian Society of Medicinal Plants. Tehran. 2007:106-8.
18- H. Ahmadpour, In vitro anti helicobacter pylori activity of alcoholic and aqueous extracts of medical plants, MSc thesis.2017, Islamic Azad University, Ayatollah Amoli Branch.

19- Kumar A, Shukla R, Singh P, Dubey NK. Chemical composition, antifungal and antiaflatoxigenic activities of Ocimum sanctum L. essential oil and its safety assessment as plant based antimicrobial. Food and Chemical Toxicology. 2010 1;48(2):539-43.
20- Malfertheiner P, Megraud F, O'morain CA, Atherton J, Axon AT, Bazzoli F, Gensini GF, Gisbert JP, Graham DY, Rokkas T, El-Omar EM. Management of Helicobacter pylori infection—the Maastricht IV/Florence consensus report. Gut. 2012 May 1;61(5):646-64.
21- Ahmadpour kacho H, Tohidi F, Masoumi M. Antibacterial effect of verbascum extract on standard EscherichiaColi and H. pylori bacteria isolated from patient tissue, Quarterly Journal of Food Processing and Production,2017.(6):45-52.
22- Srivastava M, Baby P, Saxena A. GC-MS investigation and antimicrobial activity of the essential oil of Carum copticum Benth & Hook. Acta Alimentaria. 1999;28(3):291-5.
23- Khajeh M, Yamini Y, Sefidkon F, Bahramifar N. Comparison of essential oil composition of Carum copticum obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods. Food chemistry. 2004;86(4):587-91.
24- Mohagheghzadeh A, Faridi P, Ghasemi Y. Carum copticum Benth. & Hook., essential oil chemotypes. Food Chemistry. 2007;100(3):1217-9.
25- Goldbeck JC, Victoria FN, Motta A, Savegnago L, Jacob RG, Perin G, Lenardao EJ, da Silva WP. Bioactivity and morphological changes of bacterial cells after exposure to 3-(p-chlorophenyl) thio citronellal. LWT-Food Science and Technology. 2014;59(2):813-9.
26- Yang XN, Khan I, Kang SC. Chemical composition, mechanism of antibacterial action and antioxidant activity of leaf essential oil of Forsythia koreana deciduous shrub. Asian Pacific journal of tropical medicine. 2015;8(9):694-700.
27- Nazzaro F, Fratianni F, De Martino L, Coppola R, De Feo V. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. Pharmaceuticals (Basel, Switzerland). 2013;6(12):1451-74.
28- Modaresichehardahe A, Ebrahim D, Farizasoliman SH, Abolhasani F. Evaluation effect of alcoholic extract of the plant Urticadioica. l on a number of grampositive and gram-negative bacteria. J Med Plant2012. 2012;42:98-104.
29- Benli M, Güney K, Bingöl Ü, Geven F. Antimicrobial activity of some endemic plant species from Turkey. African journal of biotechnology. 2007;6(15).
30- Mishra AK, Dubey NK. Evaluation of some essential oils for their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities. Applied and environmental microbiology. 1994;60(4):1101-5.
31- Shafeghat M, Sharifi-Mood B, Metanat M. The Antibacterial Activity of the Ajowan Extract, , IJIDTM Journal,2015, Vol 19 , No 67.
32- Zakerin, A., Ahmadi, E., Fasihi-Ramandi, M., Abdollahi, S., Molazadeh, A., Jafari, S. Meshkibaf, M. H. 2015. The Effects of Ecologic Condition on Antimicrobial Activity of Endemic Herbal Extracts in Fars Province.. JFUMS, 5(1), 111-119.
33- Shafeghat M, Najafi Sh, Razavi Zadeh R. ESSENTIAL OIL COMPOSITION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF OIL, FROM AJOWAN (CARUM COPTICUM) GROWN IN SISTAN- IRAN, IJIDTM Journal,2015. Vol 20 , No 68.37-40.
34- Bozorgi A, Namazi Kh, mojaveri S, Antimicrobial effects of hydroalcoholic extract of caraway and ajowan plants against Enterococcus faecalis. Eleventh Iranian Veterinary Students Congress,2017. Islamic Azad University, Babol Branch.
35- Sharifi A, Seifi T, Mohammadzadeh A, Hammoun Navard S, Pajohi-Alamoti MR. Antibacterial Activity of Alcoholic Extract of Ferulagoangolata. scientific journal of ilam university of medical sciences. 2015;23(4):202-8.
36- Mahboubi M, Kazempour N. Chemical composition and antimicrobial activity of Satureja hortensis and Trachyspermum copticum essential oil. Iranian journal of microbiology. 2011;3(4):194.
37-

38- Rasooli I, Fakoor MH, Yadegarinia D, Gachkar L, Allameh A, Rezaei MB. Antimycotoxigenic characteristics of Rosmarinus officinalis and Trachyspermum copticum L. essential oils. International journal of food microbiology. 2008 Feb 29;122(1-2):135-9.
39- Ashokkumar R, Ramaswamy M. Phytochemical screening by FTIR spectroscopic analysis of leaf extracts of selected Indian Medicinal plants. Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 2014;3(1):395-406.
40- D.L.Pavia, Lampan, G.S.Kriz, J.A. Vyvyan, Introduction to Spectoroscopy, Cengage Learning 2008.
41- Macdonald IDG, Smith WE ,Orientation of cytochrome C adsorbed on a citrate-reduced silver colloid surface. Langmuir, 1996 , 12:706–713.