بسم الله الرحمن الرحيم

مدیریت تحصیلات تکمیلی

دانشکده منابع طبیعی

گروه شیلات

پایان‌نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته شیلات

عنوان

اثرات ضد باکتریایی عصاره زیره سبز، میخک هندی، رزماری و نعناع بر باکتری های ویبریو آلجینولیتیکوس، لیستریا مونوسیتوژنز و اشرشیاکلی در محیط کشت

اساتید راهنما :

دکتر مصطفی غفاری

دکتر احمد قرایی

تهیه و تدوین :

نرجس سنچولی

مهر ۹۱

تقدیم به پدرم:

به استواری کوه

تقدیم به مادرم:

آنکه آفتاب مهرش در آستانه قلبم، همچنان پابرجاست و هرگز غروب نخواهد کرد.

تقدیم به همسرم:

که سایه مهربانیش سایه سار زندگیم می باشد، او که اسوه صبر و تحمل بوده و مشکلات مسیر را برایم تسهیل نمود.

تقدیم به برادرانم:

که همواره در طول تحصیل متحمل زحماتم بوده و تکیه گاه من در مواجهه با مشکلات، و وجودشان مایه دلگرمی من می باشد.

تقدیم به خواهرم:

که وجودش شادی بخش و صفایش مایه آرامش من است.

سپاسگزاری

سپاس مخصوص خداوند مهربان که به انسان توانایی و دانایی بخشید تا به بندگانش شفقت ورزد، مهربانی کند و در حل مشکلاتشان یاری شان نماید. از راحت خویش بگذرد و آسایش هم نوعان را مقدم دارد، با او معامله کند و در این خلوص انباز نگیرد و خوش باشد که پروردگار سمیع و بصیر است.

سپاس ایزد منان که به من این فرصت را داد تا به این مرحله از علم رسیده و از هیچ محبتی دریغ نکرد و در تمام مراحل زندگیم مراقوت قلب بود. از اساتید باکمالات و شایسته؛ جناب آقای دکتر مصطفی غفاری و جناب آقای دکتر احمد قرایی که در کمال سعه صدر، با حسن خلق و فروتنی، از هیچ کمکی در این عرصه بر من دریغ ننمودند و زحمت راهنمایی این رساله را بر عهده گرفتند؛ و از استاد فرزانه و دلسوز؛ جناب آقای دکتر جواد میردار که زحمت داوری این رساله را متقبل شدند؛ از استاد محترم، جناب آقای دکتر عین الله روحی مقدم، نماینده محترم تحصیلات تکمیلی، کمال تشکر و قدردانی را دارم. باشد که این خردترین، بخشی از زحمات آنان را سپاس گوید. از دوست عزیزم سرکار خانم سعیده سعیدی که در تمام مراحل کار یار و یاور من بوده، از مسئول محترم آزمایشگاه شیلات آقای مهندس حیدری، مسئول پژوهشکده زیست فناوری سرکار خانم خواجه، مسئول آزمایشگاه اداره دامپزشکی زابل، سرکار خانم سراوانی و مسئولین محترم آزمایشگاه های پژوهشکده تالاب بین المللی هامون نهایت تشکر و سپاس را دارم و آرزوی سربلندی و موفقیت را برای این عزیزان از درگاه خداوند منان خواستارم.

نرجس سنجولی

مهرماه ۹۱

چکیده

در این تحقیق اثرات ضد باکتریایی اسانس ۴ گیاه دارویی نعناع(*Mentha spicata*)، رزماری(*Rosmarinus officinalis*)، میخک هندی (*Eugenia caryophyllata*) و زیره سبز (*Cuminum cyminum*) بر ۳ سویه باکتریایی(*Escherchia coli, Listeria monocytogenes, Vibrio alginolyticus*) مورد مطالعه قرار گرفت. برای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) از روش استاندارد میکرودایلوشن(Broth Microdilution) استفاده شد و حداقل غلظت باکتری کشی(MBC) با استفاده از مقادیر MIC هر اسانس تعیین شد. نتایج نشان داد که کمترین میزان MIC برابر ۴ میلی گرم در میلی لیتر که مربوط به اسانسهای میخک هندی علیه باکتری های *V. alginolyticus* و *E. coli* و همچنین نعناع بر باکتری *V. alginolyticus* بوده ومقدار MBC این اسانس ها دو برابر مقدار MIC یعنی ۸ میلی گرم در میلی لیتر بدست آمد. بیشترین مقدار MIC مربوط به اسانس رزماری برابر با ۱۸ میلی گرم در میلی لیتر بر باکتری *L. Monocytogenes* و MBC این اسانس بر این باکتری ۳۶ میلی گرم بر میلی لیتر به دست آمد. نتایج نشان داد که از بین اسانس های مورد بررسی اسانس میخک هندی، عملکرد قوی تری داشته و باکتری ها نسبت به این اسانس حساستر بودند و اما اسانس رزماری، اثر ضد باکتریایی ضعیف تری داشته و باکتریها نسبت به آن در مقایسه با سایر اسانس ها مقاومتر بودند. حساس ترین و مقاوم ترین باکتری نسبت به اسانس های مورد مطالعه به ترتیب باکتری *V.alginolyticus* و *L.monocytogenes* بودند.

کلمات کلیدی: اسانس، اثرات ضد باکتریایی، میکرودایلوشن.

فهرست مطالب

عنوان صفحه

چکیده

فصل اول: مقدمه و کلیات

۱- ۱بیماری های باکتریایی آبزیان..... ۲

۱-۱-۱ خصوصیات باکتری های گرم منفی..... ۳

۱-۱-۲ خصوصیات باکتری های گرم مثبت..... ۴

۱-۱-۳ بیماری ویبریوزیز..... ۴

۱-۱-۴ بیماری لیستریوزیز..... ۵

۱-۲ اسانس های گیاهی..... ۶

۱-۲-۱ کاربرد اسانس ها..... ۶

۱-۲-۲ترکیبات موثر موجود در اسانس ها..... ۷

۱-۲-۳ فعالیت ضد میکروبی اسانس ها..... ۷

۱-۲-۴ مکانیسم عمل اسانس ها روی میکروارگانیسم ها..... ۹

۱-۲-۵ اثرات فعل و انفعال ترکیبات مختلف اسانس ها روی باکتری ها ۱۰

۱-۲-۶ مکانیسم اثرات فعل و انفعال ترکیبات مختلف اسانس ها روی باکتری ها ۱۱

۱-۳ باکتری های بالقوه بیماری زای آبزیان..... ۱۱

۱-۳-۱ خصوصیات باکتری های جنس ویبریو Vibrio spp..... ۱۱

۱-۳-۱-۱ باکتری ویبریو آلجینولیتیکوس *Vibrio alginolyticus*..... ۱۲

۱-۳-۱-۲ بیماری زایی باکتری ویبریو آلجینولیتیکوس *Vibrio alginolyticus*..... ۱۲

۱-۳-۱-۳ جداسازی باکتری ویبریو آلجینولیتیکوس *Vibrio alginolyticus*..... ۱۳

۱-۳-۲ خصوصیات باکتری لیستریا مونوسیتوژنز *Listeria monocytogenes* ۱۳

۱-۳-۲-۱بیماری زایی باکتری لیستریا مونوسیتوژنز *Listeria monocytogenes* ۱۴

۱-۳-۱ باکتری اشرشیاکلی *Escherchia coli*.....۱۵
۱-۳-۱-۱ بیماری زایی باکتری اشرشیاکلی *Escherchia coli* ۱۵
۱-۴ اسانس های گیاهی مورد مطالعه ۱۶
۱-۴-۱ اسانس زیره سبز *Cuminum cyminum*.....۱۶
۱-۱-۴-۱ ترکیبات شیمیایی با خاصیت ضد میکروبی در اسانس زیره سبز.....۱۷
۱-۴-۲ اسانس نعناع *Mentha spicata* ۱۷
۱-۲-۴-۱ ترکیبات شیمیایی با خاصیت ضد میکروبی در اسانس نعناع.....۱۸
۱-۲-۴-۱ مکانیسم عمل اسانس نعناع.....۱۸
۱-۴-۳ اسانس رزماری *.Rosmarinus officinalis L* ۱۹
۱-۳-۴-۱ ترکیبات شیمیایی با خاصیت ضد میکروبی در اسانس رزماری.....۱۹
۱-۴-۴ اسانس میخک هندی *Eugenia caryophyllata* ۲۰
۱-۴-۴-۱ ترکیبات شیمیایی با خاصیت ضد میکروبی در اسانس میخک هندی ۲۰
۱-۴-۴-۲ مکانیسم عمل اسانس میخک هندی روی باکتری ها ۲۱

فصل دوم: بررسی منابع

۲-۱ مطالعات انجام شده در ایران.....۲۴
۲-۲ مطالعات انجام شده در دنیا ۲۵

فصل سوم: مواد و روشها

۳-۱ تهیه اسانس های گیاهی ۳۰
۳-۲ تهیه باکتری ۳۰
۳-۲-۱ روش جداسازی باکتری *Vibrio alginolyticus* از میگوی *Litopeneus vannami* ۳۰
۳-۲-۱-۱-جمع آوری میگوها از استخرهای پرورش میگو ۳۰
۳-۲-۱-۲ کشت و جداسازی باکتری ۳۰
۳-۲-۱-۳ مورفولوژی و رشد باکتری ۳۱

۳-۳ محیط کشت های مورد استفاده و روش آماده سازی آنها ۳۳
۳-۳-۱ محیط کشت نوترینت براث (Nutrient broth) ۳۳
۳-۳-۲ محیط کشت نوترینت آگار(Nutrient Agar) ۳۳
۳-۳-۳ محیط بلاد آگار (Blood Agar) ۳۳
۳-۳-۴ محیط تریپتیک سوی اگار (TSA) ۳۴
۳-۴ بررسی اثرات بازدارندگی اسانس ها از رشد باکتری ها در شرایط آزمایشگاه (Invitro) ۳۴
۳-۴-۱ تعیین کمترین غلظت بازدارندگی و کمتر ین غلظت باکتری کشی ۳۴
۳-۴-۱-۱ روش میکرودیلوشن (Broth microdilotion) ۳۴
۳-۴-۱-۲ تعیین حداقل غلظت باکتری کشی (MBC) ۳۶

فصل چهارم: نتایج و بحث

۴-۱ فعالیت ضد باکتریایی اسانس نعناع بر ۳ باکتری اشرشیاکلی، لیستریا مونوسیتوژنز و ویبریو آلجینولیتیکوس..... ۳۸
۴-۲ فعالیت ضد باکتریایی اسانس میخک هندی بر ۳ باکتری اشرشیاکلی، لیستریا مونوسیتوژنز و ویبریو آلجینولیتیکوس..... ۳۹
۴-۳ فعالیت ضد باکتریایی اسانس زیره سبز بر ۳ باکتری اشرشیاکلی، لیستریا مونوسیتوژنز و ویبریو آلجینولیتیکوس..... ۴۰
۴-۴ فعالیت ضد باکتریایی اسانس رزماری بر ۳ باکتری اشرشیاکلی، لیستریا مونوسیتوژنز و ویبریو آلجینولیتیکوس..... ۴۱
۴-۵ نتایج حاصل از سنجش میزان حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی اسانس ها ۴۲
۴-۶ نتایج به دست آمده با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر پلیت ریدر(الیزا) ۴۳

بحث و نتیجه گیری ۵۰
منابع و ماخذ..... ۵۶
پیوست ها ۷۲

فهرست نمودارها

عنوان صفحه

نمودار۱-۴ اثر غلظت های مختلف اسانس نعناع بر میزان جذب باکتری لیستریا مونوسیتوژنز خوانده شده توسط دستاه اسپکتوفتومتر در زمان صفر و زمان ۲۴.....۴۴

نمودار۲-۴ اثر غلظت های مختلف اسانس نعناع بر میزان جذب باکتری اشرشیاکلی خوانده شده توسط دستگاه اسپکتوفتومتر در زمان صفر و زمان ۲۴ تلقیح ۴۴

نمودار۳-۴ اثر غلظت های مختلف اسانس نعناع بر میزان جذب باکتری ویبریو آلجینولیتیکوس خوانده شده توسط دستگاه اسپکتوفتومتر در زمان صفر و زمان ۲۴ تلقیح ۴۵

نمودار۴-۴ اثر غلظت های مختلف اسانس میخک هندی بر میزان جذب باکتری ویبریو آلجینولیتیکوس خوانده شده توسط دستگاه اسپکتوفتومتر در زمان صفر و زمان ۲۴ تلقیح ۴۵

نمودار۵-۴ اثر غلظت های مختلف اسانس میخک هندی بر میزان جذب باکتری لیستریا مونوسیتوژنز خوانده شده توسط دستگاه اسپکتوفتومتر در زمان صفر و زمان ۲۴ تلقیح ۴۶

نمودار۶-۴ اثر غلظت های مختلف اسانس میخک هندی بر میزان جذب باکتری اشرشیاکلی خوانده شده توسط دستگاه اسپکتوفتومتر در زمان صفر و زمان ۲۴ تلقیح ۴۶

نمودار۷-۴ اثر غلظت های مختلف اسانس زیره سبز بر میزان جذب باکتری ویبریو آلجینولیتیکوس خوانده شده توسط دستگاه اسپکتوفتومتر در زمان صفر و زمان ۲۴ تلقیح ۴۷

نمودار۸-۴ اثر غلظت های مختلف اسانس زیره سبز بر میزان جذب باکتری لیستریا مونوسیتوژنز خوانده شده توسط دستگاه اسپکتوفتومتر در زمان صفر و زمان ۲۴ تلقیح ۴۷

نمودار۹-۴ اثر غلظت های مختلف اسانس زیره سبز بر میزان جذب باکتری اشرشیاکلی خوانده شده توسط دستگاه اسپکتوفتومتر در زمان صفر و زمان ۲۴ تلقیح ۴۸

نمودار۱۰-۴ اثر غلظت های مختلف اسانس رزماری بر میزان جذب باکتری ویبریو آلجینولیتیکوس خوانده شده توسط دستگاه اسپکتوفتومتر در زمان صفر و زمان ۲۴ تلقیح ۴۸

نمودار۱۱-۴ اثر غلظت های مختلف اسانس رزماری بر میزان جذب باکتری لیستریا مونوسیتوژنز خوانده شده توسط دستگاه اسپکتوفتومتر در زمان صفر و زمان ۲۴ تلقیح ۴۹

نمودار۱۲-۴ اثر غلظت های مختلف اسانس رزماری بر میزان جذب باکتری اشرشیاکلی خوانده شده توسط دستگاه اسپکتوفتومتر در زمان صفر و زمان ۲۴ تلقیح.....۴۹

فهرست جداول

عنوان صفحه

جدول۱-۳ خصوصیات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی سویه ویبریو آلجینولیتیکوس جداسازی شده از همولنف میگوی سفید غربی ۳۲

جدول ۱-۴ فعالیت ضد باکتریایی اسانس نعناع بر باکتری های مورد مطالعه ۳۹

جدول ۲- ۴ فعالیت ضد باکتریایی اسانس میخک هندی بر باکتری های مورد مطالعه ۴۰

جدول ۳- ۴ فعالیت ضد باکتریایی اسانس زیره سبز بر باکتری های مورد مطالعه ۴۱

جدول۴-۴ فعالیت ضد باکتریایی اسانس رزماری بر باکتری های مورد مطالعه ۴۲

جدول۵-۴ فعالیت ضد باکتریایی(MIC و MBC بر حسب mg/ml) ۴ اسانس گیاهی به روش میکرودایلوشن..... ۴۳

فهرست اشکال

فصل اول

مقدمه و کلیات

۱-۱ بیماری های باکتریایی آبزیان

در بسیاری از شرایط، آبزیان پرورشی علیرغم حضور مداوم باکتری های بیماری زا، به طور طبیعی زندگی می کنند، با این حال، وقتی که استرس های محیطی رخ می دهد و تعادل به نفع بیماری بهم می خورد باکتری ها به شدت تکثیر و تزاید پیدا می کنند. اگر آبزیان نتوانند خود را با شرایط تطبیق دهد یا محیط آبی اصلاح نشود ممکن است بیماری رخ دهد.

بروز عفونت میکروبی معمولا می تواند دلیل بر وجود یک عامل استرس زای محیطی باشد و نشانگر این است که شرایط باید بهبود یابد. ممکن است امکان تشخیص اینکه عامل ایجاد بیماری یک مهاجم ثانویه ناشی از زخم، جزئی از یک باکتری گیاهی طبیعی[1] و یا آلودگی محیطی است، مشکل است. بسیاری از باکتری های بیماری زای ماهی به طور طبیعی در محیط آبی وجود دارند بنابراین جزء عوامل بیماری زای فرصت طلب[2] تلقی می شوند، یعنی این باکتری ها قادرند در شرایطی که سیستم ایمنی میزبان تضعیف شده است و یا شرایط به نفع عامل مهاجم تغییر کند، بیماری ایجاد کند. توانایی باکتری در حمله به میزبان، عامل اصلی در تعیین قابلیت بیماری زایی گونه های باکتری است. باکتری مهاجم را می توان به عنوان یک عامل بیماری زای اولیه ای که قادر به ایجاد بیماری در حیوانات سالم یا حیواناتی که در معرض حداقل عوامل استرس زا بوده اند و یا عامل بیماری زای ثانویه ای که قادر به ایجاد بیماری در حضور عامل بیماری زای اولیه می باشد، در نظر گرفت. با این حال عامل بیماری زای ثانویه می تواند به طور قابل ملاحظه در توسعه بیماری موثر باشد. تقریبا همه عوامل بیماری زای باکتریایی ماهی قادرند در خارج از بدن ماهی

1. Normal microflora

2. Opportunistics Pathogens

زندگی کنند اما به نظر می رسد تعداد کمی از آنها بیماری زای اجباری[1] باشند. بیشتر این گونه های باکتریایی قادرند بدون این که اثرات مضری داشته باشند، در بافت میزبان بقا یابند. شکل درمانگاهی بیماری فقط در شرایط پراسترس فیزیولوژیک و محیطی که سبب تضعیف سیستم ایمنی ماهی می شود رخ می دهد (پیغان و افتخار معنوی، ۱۳۸۹).

بیشتر آنتی بیوتیک ها اثرات طولانی مدت در کنترل بیماری های باکتریایی در آبزی پروری به ویژه بیماری های باکتریایی سیستمیک ماهی را ندارند و باعث افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی در بین باکتری های بیماری زا می شوند، بنابراین بیشتر کشورها استفاده از آنتی بیوتیک ها را در آبزی پروری به منظور اهمیت سلامت عمومی و در معرض خطر بودن محیط زیست توقیف کرده اند (Lee *et al*., 2009).

۱-۱-۱ خصوصیات باکتری های گرم منفی

باکتری های گرم منفی لایه پتیدوگلیکان[2] نازکی درست در کنار غشای سیتوپلاسمی دارند و در خارج از آن فضای پری پلاسمیک[3] وجود دارد که با لایه ضخیمی از لیپوپلی ساکارید[4](LPS) که غشای خارجی نامیده می شود دنبال می شود. لایه خارجی شامل اندوتوکسین ارگانیزم های گرم منفی است و پادگن O گفته می شود. LPS شامل لیپید A (ناحیه سمی) به علاوه یک هسته از ۵ قند و کربوهیدرات های مختلف به صورت زنجیره های جانبی است که در گونه ها و سویه های باکتری ها متفاوت است (پیغان و افتخار معنوی، ۱۳۸۹).

1. Obligatory pathogens
2. Peptidogelycan
3. Preplasmic
4. Lipo polysacarid

۲-۱-۱ خصوصیات باکتری های گرم مثبت

باکتری های گرم مثبت در خارج غشای سیتوپلاسمی لایه ضخیمی از پتیدوگلیکان دارند که شامل قندهایی به صورت خطی است. N-استیل گلوکزآمین و N- استیل مورامیک اسید که به طور متقاطع به ۴ پپتید وصل شده است هم چنین ممکن است تایکوئیک اسید به صورت متصل به مورامیک اسید به همراه کربوهیدرات ها و پروتئین ها وجود داشته است. باکتری های گرم مثبت فاقد پادگن O، نوع LSP هستند که در باکتری های گرم منفی مشترک است ولی ممکن است داری کپسول، مژه و پیلی باشند (پیغان و افتخار معنوی، ۱۳۸۹).

۳-۱-۱ بیماری ویبریوزیز

پرورش میگوهای پنائیده یکی از مهم ترین فعالیت های آبزی پروری در نقاط مختلف جهان محسوب می شود. تولید میگو مستقیما تحت تاثیر شیوع بیماری های عفونی قرار می گیرد. این بیماری ها بر اثر عوامل ویروسی، باکتریایی و به میزان کمتری ریکتزیاها، قارچ ها و انگل ها بروز می کند که در بعضی موارد تلفاتی حدود ۱۰۰ درصد ایجاد می نماید. ویبریوز رایج ترین بیماری باکتریایی عامل تلفات در هچری ها و مزارع پرورش میگو بعد از ویروس ها به شمار می رود. بیماری تاکنون از مزارع پرورش میگو در مناطق مختلف جهان چون تایلند، تایوان، چین، و اندونزی موجب خسارات سنگینی بر این صنعت شده است (Tyagi *et al*., 2007). گونه های موجود در جنس ویبریو گروه بزرگی از باکتری های بیماری زا هستند که در میگوهای پنائیده پرورشی ایجاد بیماری می کنند. با این حال عموما توافق بر این است که این باکتری ها بیماری زای فرصت طلب بوده ودر شرایط استرس ایجاد بیماری می کنند.

1. N-acetil glocozamin
2. N- acetil moramic acid
3. Ticoic acid

حضورباکتری های بیماری زا نه تنها برای میگو بلکه برای مصرف کننده آنها نیز ایجاد خطر می نماید (Vandenberghe *et al*., 1999 & Tyagi *et al*., 2007).

۴-۱-۱ بیماری لیستریوزیز[1]

لیستریوزیز بیماری است که در اثر مصرف محصولات غذایی آلوده به پاتوژن غذا زاد مانند باکتری لیستریا مونوسیتوژنز[2] در انسان به وجود می آید، در موارد اپیدمیک بیماری لیستریوزیز، میزان مرگ و میر ممکن است تا حد ۲۰ درصد ودر افراد مستعد تا حد ۷۰ درصد نیز برسد. باتوجه به اینکه باکتری به فراوانی در محیط های مختلف طبیعت یافت میشود به همین دلیل می تواند غذاهای گوناگون را آلوده نماید. و همچنین باکتری به راحتی می تواند در دمای یخچالی رشد و تکثیر نماید لذا نگهداری غذاهای آلوده در حرارت های پایین نیز خطر آلودگی را رفع نمی نماید (Hof and Rocourt, 1992). میزان مرگ و میر ناشی از لیستریوزی، دوز پایین باکتری جهت ایجاد عفونت، فراوانی آن در طبیعت، آلودگی بسیاری از غذاها و رشد باکتری در دماهای پایین باعث گردیده است تا تلاش های فراوانی به ویژه در کشورهای صنعتی برای کنترل باکتری در غذا انجام گیرد. تلاش های اخیر در جهت آن بوده است تا از مضرات بهداشتی و اقتصادی بیماری های ناشی از غذا که لیستریوزیز نیز یکی از آنها است کاسته شود. یکی از روش های کنترل میکروارگانیسم های بیماری زا استفاده از نگهدارنده های شیمیایی است. اما همواره استفاده از این گونه مواد شیمیایی ضد میکروبی ممکن است سلامتی آنها را تهدید کند. به همین دلیل استفاده از مواد طبیعی به جای مواد شیمیایی از اهمیت خاصی برخوردار بوده است. بدون شک استفاده از عصاره و اسانس گیاهان جایگزین بسیار مناسبی می تواند باشد.

1. Listeriosis diseases

2. *Listeria monocytogenes*

با توجه به محدودیت های استفاده از آنتی بیوتیک ها از جمله ایجاد مقاومت دارویی، مشکلات زیست محیطی و قیمت بالای برخی آنتی بیوتیک ها، گرایش به جایگزینی آنها با مواد طبیعی و ارزان تر را تقویت نموده است. از بین مواد مختلف جایگزین، اخیرا فرآورده هایی با منشاء گیاهی جایگاه ویژه ای یافته اند.

۲-۱ اسانس های گیاهی

اسانس های گیاهی ترکیباتی فرار و خوشبو و روغنی بوده که توسط گیاه تولید می شود و در دمای اتاق مایع بوده اگرچه تعداد کمی از آنها جامد یا صمغی می باشند، اسانس ها دامنه رنگی متفاوتی از زرد کمرنگ تا سبز زمردی و از آبی تا قهوه ای تیره و مایل به خرمایی دارند (Balz, 1999). اسانس ها از نظر شیمیایی حاوی حلقه های آروماتیک یا بنزنی و به طور عمده متشکل از مواد فنلی یا اکسیژن دار می باشند. اسانسهای طبیعی و اجزاء متشکله آنها موثرترین عوامل میکروبی هستند که به علت خلوص بالا در هنگام تهیه، نقش ارزنده ای در کنترل ریز جاندارها به عهده دارند (Marjorie, 1999).

اسانس ها توسط تمام قسمت های گیاه مانند جوانه، گل، برگ، ساقه، شاخه کوچک، دانه، ریشه، میوه، چوب و پوست درخت، تولید می شوند ودر سلول های ترشحی ، حفرات، کانالها، سلول های اپی درمیک و مویچه های غده ای ذخیره می شوند (Bakkali *et al*., 2008).

۱-۲-۱ کاربرد اسانس ها

مهم ترین کاربرد اسانس های طبیعی در صنایع غذایی به عنوان طعم دهنده و ایجاد رایحه در صنایع بهداشتی نیز در ساخت محصولات آرایشی و عطر و ادوکلن برای ایجاد رایحه و بالاخره به علت دارا بودن خواص دارویی و نیز پوشش بو و طعم بد بعضی از داروها در صنایع دارویی نیز مصرف می گردند.

۲-۲-۱ ترکیبات موثر موجود در اسانس ها

ترپن ها با فرمول عمومی $(C_5H_8)_n$ ترکیب غالب یا ماده موثره اکثر اسانس های گیاهی می باشند. ترپن ها خود به چندین گروه مونوترپن ها[۱] ($C_{10}H_{16}$)، سزکوئی ترپن ها[۲] ($C_{15}H_{24}$)، دی ترپن ها[۳] ($C_{20}H_{32}$)، تری ترپن ها[۴] ($C_{30}H_{48}$) و تترا ترپن ها[۵] ($C_{40}H_{64}$) تقسیم می شوند (Henri *et al*., 2012).

۲-۲-۱ فعالیت ضد میکروبی اسانس ها

بیشتر فعالیت ضد میکروبی اسانس ها در ترپنوئید های اکسیژن دار مثل ترپن فنولیک و الکلی دیده شده است در حالی که بعضی هیدروکربن ها هم اثرات ضد میکروبی دارند (Delaquis *et al*., 2002 & Koroch *et al*., 2007). در بیشتر حالات فعالیت ضد میکروبی ناشی از فعل و انفعالات پیچیده بین دسته های مختلف ترکیبات مثل فنل ها[۶]، آلدئید ها[۷]، کتون ها[۸]، الکل ها[۹]، استر ها[۱۰]، اتر ها[۱۱] و یا هیدروکربنات ها[۱۲] در اسانس ها می باشد (Lambert *et al*., 2001& Kim *et al*., 1995) اگرچه در برخی حالات، فعالیت زیستی اسانس ها به فعالیت ترکیبات اصلی اسانس محدود می شود (Juliani *et al*., 2002)

1. Monoterpenes
2. Sesquiterpenes
3.De terpenes
4. Three terpenes
5.Tetra terpenes
6. Phenols
7. Aldehydes
8. Ketones
9. Alcohols
10. Esters
11. Ethers
12. Hydrocarbons

گزارش شده است که اسانس های شامل آلدئید یا فنول مثل سینامالدئید[۱]، سیترال[۲]، کارواکرول[۳]، یوگنول[۴] و تیمول[۵] ترکیبات قوی نامیده شده که قوی ترین فعالیت ضد باکتریایی را نشان می دهند و بعد به دنبال این ترکیبات ترپن الکل قرار می گیرد و اسانس های دیگر شامل کتون و استر مثل بتا میریسین[۶]، آلفا توچن[۷] و یا گرانیل استات[۸] فعالیت ضد باکتریایی ضعیفی دارند و در حالی که ترکیبات معطر مثل ترپن هیدروکربنات ها معمولا غیر فعال هستند (Dorman and deans *et al*., 2000 & Inouye *et al*., 2001 & Barros *et al*., 2009 & Nostro *et al*., 2002 &. Carson and Riley 1995 & Griffin *et al*., 1999 & Sachetti *et al*., 2005 & Tajkarimi *et al*., 2010). فعل و انفعال بین ترکیبات اسانس می تواند ۴ نوع ممکن از اثرات را که شامل اثرات رقابتی ، تجمعی، سینرژیستی (کمک کننده) و غیر متفاوت تولید کند (Delgado *et al*., 2004 & Nychas, 1995).

مونو ترپن های فنلی[۹] و فنیل پروپانوئید ها[۱۰](که فعالیت ضد میکروبی قوی را نشان می دهند) در ترکیب با دیگر ترکیبات افزایش فعالیت زیستی مخلوط را موجب می شوند بیشتر مطالعات متمرکز شده روی فعل و انفعال مونوترپن های فنلی مانند تیمول و کارواکرول و فنیل پروپانوئید مثل یوگنول با گروه های دیگر از ترکیبات به ویژه با فنول ها و فنول پرو پانوئید های دیگر و با مونوترپن ها و ترپن های هیدروکربناته که استفاده کمتری دارند (Henri *et al*., 2012). بیشتر مطالعات اثرات سینرژستی[۱۱] و تجمعی[۱۲] را برای ترکیبات فنلی و الکلی نشان دادند به طور کلی ترکیباتی با ساختمان مشابه در معرض اثر تجمعی بیشتر از اثرات سینرژیستی قرار دارند و

1. Cinnamaldehyde
2. Citral
3. Carvacrol
4. Eugenol
5. Thymol
6. β-myrcene
7. α-thujone
8. Geranyl acetate
9. Phenolic monoterpenes
10. Phenylpropanoids
11. Synergistic effects
12. Additive

وقوع واکنش تجمعی برخی از اسانس ها مربوط به ترکیبات فنولی اصلی مانند تیمول و کارواکرول می باشد (De- Azeredo *et al*., 2011 & Bajpai *et al*., 2012).

فعالیت رقابتی[1] در اثر فعل و انفعال هیدرو کربن های مونوترپن اکسیژن دار و غیر اکسیژنی صورت می گیرد (Goni *et al*., 2009).

۴-۲-۱ مکانیسم عمل اسانس ها روی میکروارگانیسم ها

گزارشات کمی درباره مکانیسم عمل اسانس ها و یا ترکیبات خالص شده آنها روی میکروارگانیسم ها وجود دارد (Burt *et al*., 2007). با توجه به تنوع ترکیبات ضد میکروبی اسانس ها، مکانیسم مستقلی برای مجموعه فعالیت آنها متصور نیست. به طور قطع چندین مکانیسم به هم پیوسته فعالیت های ضد میکروبی آنها را تعیین می کنند. شاید علت کارایی چند ترکیب نسبت به یک ترکیب متاثر از پدیده فوق باشد. اما از آنجائیکه اسانس ها ماهیت آب گریزی دارند و به صورت یک کاتالیزور عمل می کنند در اثر فعالیت مشترک و هم پوشان ترکیبات مختلف، دیواره و غشاء سلولی پاتوژنها تخریب و نفوذ پذیری و نشت یونی سلول ها افزایش می یابد. درپی تجزیه لیپیدهای دیواره سلولی، میتوکندریها و پروتئین های غشاء و نیز لخته شدن سیتوپلاسم و تخلیه نیرو محرکه پروتون، سلول های آسیب دیده از اسانس دچار مرگ سلولی می شوند (Burt, 2004).

برخی مکانیسم های پذیرفته شده ضد میکروبی وجود دارد که سینرژیسم را تولید می کنند شامل ممانعت دائمی از مسیر فعالیت های بیوشیمیایی، ممانعت از تولید آنزیم های محافظ و استفاده از عوامل فعال دیواره سلول برای بالا بردن فعالیت ضد میکروبی آنها می باشد (Santiesteban-Lopez *et al*., 2007).

1. Antagonistic