مقایسه و بررسی ترکیب شیمیایی و اثر ضدمیکروبی اسانس زوفا (*Hyssopus officinalis*) و اسانس کندر (*Boswellia carteri*) علیه تعدادی از میکروارگانیسم‌های شاخص عفونت و مسمومیت غذایی در شرایط آزمایشگاهی

مطهره پیرنیا [1]، فریده طباطبایی یزدی [2]، سیدعلی مرتضوی [3]*، محبت محبی [4]

1- دانشجوی دکتری میکروبیولوژی مواد غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد
2- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد
3- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد
4- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

(تاریخ دریافت: 98 /10/16 تاریخ پذیرش: 99/04/01)

چکیده

زوفا (*Hyssopus officinalis*) و کندر (*Boswellia carteri*) به‌عنوان دوگیاه دارویی ارزشمند، در طب دارویی سنتی کاربرد فراوانی دارند. با توجه به افزایش مقاومت میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا به آنتی‌بیوتیک‌ها و افزایش هزینه‌های درمان، توجه به ترکیبات با منشا طبیعی توسعه یافته است. در این پژوهش، اسانس زوفا و کندر به صورت جداگانه به روش تقطیر با آب استخراج گردیدند. اجزای تشکیل دهنده اسانس به وسیله GC/MS شناسایی شدند. تعیین قطر هاله عدم رشد و حداقل غلظت بازدارندگی رشد به ترتیب با روش‌های انتشار دیسک در آگار و رقت‌سازی در مایع انجام شد. جهت تشخیص حداقل غلظت کشندگی، از خانه‌هایی که فاقد تغییر رنگ بودند، استفاده شد. در این مطالعه، به ترتیب 24 و 22 ترکیب در اسانس زوفا و کندر شناسایی شد. ترکیب عمده اسانس زوفا را، cis-3-pinanone (28/2%) تشکیل می‌داد. و عمده‌ترین ترکیب اسانس کندر α–pinene (22%) بود. هر دو اسانس زوفا و کندر دارای بالاترین تاثیر علیه باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس* بودند، و کمترین میزان قطر هاله عدم رشد مربوط به باکتری‌های گرم منفی *اشرشیاکلی* و *سودوموناس ائروژینوزا* بود. از سویی در این تحقیق مشخص شد که مخمر *کاندیدا آلبیکنس* حساس‌تر از کپک *آسپرژیلوس نیجر* در برابر هر دو اسانس بود ($p<0.05$). نتایج نشان داد که گیاهان از نظر فرآورده‌های ثانویه مثل ترپنوئیدها، آلکالوئیدها و فلاوونوئیدها بسیار غنی هستند که بیشتر آن ها دارای اثرات ضدمیکروبی می‌باشند.

کلید واژگان: گیاه زوفا، گیاه کُندر، ترکیب شیمیایی، اثر ضدمیکروبی.

*مسئول مکاتبات::morteza@um.ac.ir

1- مقدمه

با توجه به استفاده بی‌رویه از آنتی بیوتیک‌ها و افزایش مقاومت در باکتری‌ها، یافتن جایگزین‌های مناسب برای آنتی بیوتیک‌ها امری ضروری است. به همین دلیل، مطالعات گسترده‌ای در مورد پتانسیل استفاده از ترکیبات ضدمیکروبی موجود در اسانس و عصاره گیاهان در کنترل و درمان عوامل بیماری‌زا صورت گرفته است [1]. اسانس‌های گیاهی، مایعات روغنی معطری هستند که از اندام‌های مختلف گیاهان به دست می آیند و به‌عنوان طعم دهنده‌های غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند [2]. از گذشته محصولات طبیعی برای درمان انواع مختلف بیماری‌ها، شامل عفونت‌های ناشی از میکروارگانیسم‌ها استفاده می‌شوند [3].این حقیقت مهم است که مواد شیمیایی جدا شده از گیاهان همیشه توسط صنعت داروسازی به عنوان مدل‌هایی برای سنتز داروهای جدید یا به عنوان عوامل فعال بیولوژیکی مانند ترکیبات ضدمیکروبی کشف و بررسی شده‌اند [4]. اثر ضدمیکروبی اسانس‌ها و اجزای شیمیایی‌شان توسط چندین محقق شناسایی شده است. تعداد در حال رشد گروه‌های تحقیقی که مطالعاتشان بر روی اسانس‌های روغنی و اجزای شیمیایی آن‌ها به منظور کشف فعالیت ضدباکتریایی و مدولاسیون آنتی‌بیوتیک‌ها در برابر پاتوژن‌های انسانی مختلف متمرکز شده است، قابل توجه است [5].

زوفا[1] گیاهی چندساله از خانواده ***Lamiaceae*** است. شامل 10 تا 12 گونه بوده و بومی قفقاز، شمال غربی ایران، ترکیه، منطقه دریای سیاه، شمال شرقی و جنوب آناتولی می‌باشد. در حال حاضر این گیاه به طور گسترده در شمال و مرکز اروپا و همچنین در فرانسه، روسیه، اسپانیا، ایران و ایتالیا وجود دارد [6]. زوفا در عفونت‌های ویروسی مانند سرماخوردگی، سرفه، گلودرد، برونشیت و آسم استفاده می‌شود. همچنین حاوی مواد ضدالتهابی و ضد اسپاسم بوده و در درمان فشار خون و دیابت موثر است [7]. پژوهش ها نشان می‌دهد اسانس زیرگونه‌های مختلف گیاه زوفا دارای اثر ضدباکتریایی و ضدقارچی نیز می‌باشند [8]. نجف پور نوایی (1380) بیشترین اجزای تشکیل‌دهنده اسانس گیاه زوفا جمع‌آوری شده از استان البرز را ایزوپینوکافمن، پینوکافمن، بتاپینن و پینوکارون معرفی کرد[9]. Marino و همکاران (2010) تاثیر سه جز اصلی اسانس زوفا را بر 6 گونه باکتری گرم مثبت و 9 گونه باکتری گرم منفی مطالعه کردند[10].

کندر یک صمغ رزین گیاهی است که از تنه درختان بوسولیا[2] که در هندوستان، شمال آفریقا و خاورمیانه می‌رویند، به‌دست می‌آید. این گیاهان متعلق به خانواده بورسراسه[3] از راسته افراها می‌باشند. این جنس دارای 25 گونه متفاوت است که عمده‌ترین گونه‌های تولیدکننده کندر شامل ***B.carteri*** و ***B.serrata*** است. صمغ رزینی کندر ترکیب پیچیده‌ای شامل 9-5% اسانس روغنی، 85-65% رزین محلول در الکل و مقداری صمغ قابل حل در آب می‌باشد [11]. گونه‌های کندر معطر و غنی از اسانس هستند که این عطر ناشی از وجود مونو و سزکوئی ترپن‌ها است. مطالعات متعدد انجام شده پیرامون خواص بیولوژیکی کندر حاکی از آثار مثبت این اولئوگم رزین در زمینه فعالیت‌های ضدسرطانی، بهبود سیستم ایمنی، بیماری‌های قلبی و عروقی، مهار رادیکال‌های آزاد و تحریک فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌باشد [12]. غربالگری فیتوشیمیایی گونه ***B.papyrifera*** توسط Garba و همکاران (2013)، وجود ترکیباتی مانند فلاونوئید، ترپنوئید، استروئید، تانن، ساپونین و کومارین‌ها را در این اولئوگم رزین مشخص نموده است[13]. ساختار شیمیایی، خواص آنتی اکسیدانی، ضدقارچی و ضدآفلاتوکسینی اسانس کندر (***B.carterii***) مورد بررسی قرار گرفته است [14]. در سال‌های اخیر، با توجه به افزایش آگاهی مصرف‌کنندگان به جنبه‌های کیفیت و ایمنی مواد غذایی، مواد ضدمیکروب طبیعی مورد توجه قرار گرفته‌اند. اسانس و دیگر ترکیبات گیاهی به‌دلیل طبیعی بودن و نداشتن اثرات سمی مشابه با ترکیبات شیمیایی، بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. با توجه به بومی بودن گیاه زوفا و کندر در ایران، سهل‌الوصول و ارزان بودن و همچنین مصرف دارویی از زمان‌های دور؛ این تحقیق می‌تواند مقدمه‌ای جهت استفاده عملی از اسانس این گیاهان در صنایع دارویی و غذایی باشد. لذا هدف کلی این پژوهش، شناسایی ترکیبات و اجزای تشکیل‌دهنده اسانس زوفا و کندر و بررسی فعالیت ضدمیکروبی اسانس این دو بر تعدادی از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و عامل مسمومیت غذایی در شرایط آزمایشگاهی (***in vitro***) بود.

2- مواد و روش‌ها

2-1- مواد

گیاه زوفا و کندر از بازار محلی شهرستان جیرفت (استان کرمان) خریداری و در مرکز هرباریوم و گیاه شناسی دانشگاه علوم

1. *Hyssopus officinalis L*

2. Boswellia
3. Burseraceae

پزشکی مشهد تعیین جنس و گونه گردید، امولسیفایر توئین 80 ، گلیسرول، هگزان نرمال و سولفات سدیم (شرکت مرک، آلمان)، محیط کشت‌های میکروبی مختلف (مرک، آلمان) و میکروارارگانیسم‌های مورد آزمایش که در جدول 1 آورده شده‌اند و از دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مشهد تهیه شدند.

Table 1 microorganisms and culture medium of test

Culture medium	Strains	Microorganisms
MHA[1]/BHIB[2]	ATCC 27853	*Bacillus cereus*
MHA/BHIB	ATCC 6538	*Staphylococus aureus*
MHA/BHIB	*E.coli* O157:H7	*Escherichia coli*
MHA/BHIB	ATCC11778	*Bacillus cereus*
SDA[3]/TSB[4]	PTCC 5027	*Candida albicans*
SDA/TSB	PTCC 5021	*Aspergillus niger*

2-2- روش‌ها

2-2-1- تهیه اسانس زوفا و کندر

پس از تعیین جنس و گونه، به منظور تهیه اسانس زوفا (*Hyssopus officinalis L*) و کندر (*Boswellia carteri*)، گیاه خشک‌شده به وسیله آسیاب آزمایشگاهی (مدل Waring) خرد و برای یکنواختی اندازه ذرات از الک آزمایشگاهی عبور داده شدند، اسانس‌گیری به روش تقطیر با آب و با استفاده از دستگاه کلونجر صورت گرفت [15]. بدین منظور جهت استحصال مقدار یکسانی از هر دو اسانس، به ترتیب 600 و 100 گرم گیاه زوفا و کندر به بالن 2 لیتری انتقال یافت و مقدار 1/5 لیتر آب دوبار تقطیر به آن اضافه شد. اسانس‌گیری به مدت 5 ساعت بعد از زمان به جوش آمدن آب ادامه یافت. در انتها، به اسانس‌های به‌دست آمده مقدار مشخصی هگزان نرمال اضافه شد تا فاز آبی و آلی از هم جدا شود. اسانس حاصل با سدیم سولفات بدون آب رطوبت‌زدایی شد.

2-2-2- محاسبه راندمان استخراج اسانس زوفا و کندر

اسانس به علت وجود ترکیبات شیمیایی موجود معمولا دارای وزن حجمی کمتر از آب بوده، و به همین دلیل روی آب قرار می‌گیرد. طول زمان اسانس‌گیری 5 ساعت بود که درصد زیادی از اسانس در ساعات اولیه حاصل شد. برای محاسبه راندمان اسانس گیری، در ابتدا شیشه خالی مخصوص نگهداری اسانس وزن گردید، در نهایت شیشه حاوی اسانس بدست آمده مجددا توزین شد و پس از کسر وزن ظرف خالی از پر مقدار بازده اسانس به دست آمد [9].

2-2-3- شناسایی ترکیبات ثانویه تشکیل‌دهنده اسانس

اسانس گیاه زوفا و کندر پس از آماده‌سازی به دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی تزریق شد. دستگاه کروماتوگرافی از نوع Agilent 6890 با ستون به طول 30 متر، قطر داخلی 0/25 میلی‌متر و ضخامت لایه 0/25 میلی‌متر از نوع HP-5MS بود. برنامه دمایی ستون با دمای ابتدایی آون 50 درجه سانتی‌گراد و توقف در این دما به مدت 5 دقیقه، گرادیان حرارتی 3 درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه، افزایش دما تا 240 درجه سانتی‌گراد با سرعت 15 درجه در هر دقیقه، افزایش دما تا 300 درجه سانتی‌گراد و سه توقف در این دما. دمای اتاقک تزریق 290 درجه سانتی‌گراد بود و از گاز هلیوم به عنوان گاز حامل با سرعت جریان 0/8 میلی‌لیتر در دقیقه استفاده گردید. طیف‌نگار جرمی (MS) مورد استفاده مدل Agilent با ولتاژ یونیزاسیون70 الکترون ولت، روش یونیزاسیون EI و دمای منبع یونیزاسیون 220 درجه سانتی‌گراد بود [5].

2-2-4- آماده‌سازی سوسپانسیون میکروبی 0/5 مک-فارلند

همانگونه که در جدول 1 آمده است در این پژوهش به‌منظور بررسی اثر ضدمیکروبی از 4 سویه باکتریایی و 2 سویه قارچی (مخمر و کپک) استفاده شد. برای تهیه سوسپانسیون میکروبی به کشت 24 ساعته از هر باکتری نیاز است. بنابراین 24 ساعت قبل از آزمایش، از کشت ذخیره به محیط کشت شیب‌دار Muller Hinton Agar (برای باکتری) و محیط کشت Sabraud Dexterose Agar (برای قارچ‌ها) تلقیح انجام شد. سپس سوسپانسیون غلیظ میکروبی با استفاده از محلول رینگر تهیه شد. در ادامه، کدورت سوسپانسیون میکروبی حاصل به‌وسیله اسپکتروفتومتر در طول موج 625 نانومتر اندازه گیری و تا برابر شدن کدورت آن با کدورت محلول استاندارد 0/5 مک‌فارلند به‌وسیله محلول رینگر رقیق شد به نحوی که غلظت باکتری‌ها در

1. Muller Hinton Agar
2. Brain Heart Infusion Broth
3. Sabraud Dexterose Agar
4. Tripton Soy Broth

حدود 1×10^8 CFU/ml و غلظت قارچ‌ها 1×10^5 CFU/ml باشد [16 و 17].

2-2-5- ارزیابی اثر ضدمیکروبی اسانس زوفا و کندر

در این روش از 6 دیسک کاغذی (ساخت پادتن طب) در اطراف و یک دیسک در مرکز پلیت به عنوان شاهد منفی استفاده شد. در دیسک‌های محیطی 20 میکرولیتر به ترتیب از شش رقت مختلف (0/25 ، 0/5 ، 1 ، 2 ، 4 و 8 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) اسانس‌های زوفا و کُندر که با فیلتر سرنگی با قطر منافذ 0/45 میکرون استریل شده بودند، در محلول دی متیل سولفوکساید[1] افزوده شده و سپس پلیت‌های حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار در حرارت 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 24 ساعت (باکتری) و پلیت‌های حاوی محیط کشت سابروز دکستروز آگار در دمای 25 درجه سانتی‌گراد به مدت 48 ساعت (قارچ) گرم‌خانه‌گذاری شدند. بعد از طی مدت انکوباسیون، منطقه بازدارندگی یا عدم رشد[2] در محیط اطراف دیسک‌ها با در نظر گرفتن قطر دیسک (6mm) توسط خط‌کش اندازه‌گیری و به صورت میلی‌متری گزارش شد. تمامی آزمایش‌ها 3 بار تکرار شد [18].

حداقل غلظت مهار کنندگی اسانس‌های زوفا و کُندر با روش رقت‌سازی در چاهک[3] مطابق با روش Rodrigues-tudela و همکاران (2008) و مهربان و همکاران (2016) تعیین شد [19 و 20]. در این روش ابتدا کشت تازه از هر میکروارگانیسم معادل استاندارد 0/5 مک‌فارلند تهیه و میزان 20 میکرولیتر به هر چاهک تلقیح شد. از پلیت 96 خانه‌ای جهت بررسی استفاده گردید. غلظت‌های مختلف اسانس با رقت‌سازی سریالی از محلول اصلی تهیه شدند. محلول مادر با غلظت 512 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه و غلظت‌های مختلف اسانس زوفا و کندر با استفاده از آن به‌دست آمد. غلظت‌ها شامل 0/125، 0/25، 0/5، 1، 2، 4، 8، 16، 32، 64، 128 و 256 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. از چاهک حاوی محیط کشت و سوسپانسیون میکروبی فاقد اسانس به عنوان کنترل مثبت و چاهک حاوی اسانس و محیط کشت به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. پس از گرم‌خانه گذاری در دمای 37 درجه سانتی گراد به مدت 24 ساعت برای باکتری‌ها و 25 درجه سانتی‌گراد به مدت 48 ساعت برای قارچ‌ها، محلول تری فنیل تترازولیوم کلراید[4] 5% تهیه شد و به هر چاهک 25 میکرولیتر از این معرف افزوده گردید (در چاهک‌هایی که رشد میکروبی اتفاق می‌افتد ظرف کمتر از نیم ساعت، رنگ قرمز تیره یا ارغوانی ایجاد می‌شود). اولین غلظتی که در آن رشد باکتری رویت نشد و رنگ قرمز تشکیل نگردید، به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) گزارش شد. از خانه‌هایی که در آن رشد باکتری و در نتیجه تغییر رنگ مشاهده نشد، برای تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC) استفاده گردید. اولین غلظتی که در آن رشدی بر روی محیط کشت جامد ایجاد نشد به عنوان MBC در نظر گرفته شد؛ در این روش 10 میکرولیتر از چاهک‌های فاقد رنگ، بر محیط کشت باکتری و قارچ کشت داده شد و سپس هر کدام در شرایط متفاوت گرم‌خانه گذاری شدند.

2-2-6- برهم کنش اسانس زوفا و کُندر در فعالیت ضدباکتریایی به روش بازدارنده افتراقی

: ارزیابی نوع برهم کنش‌های ضدمیکروبی بین فاکتورهای ضدمیکروبی مختلف به چهار شکل احتمالی خود را نشان می‌دهد؛ هم افزایی[5]، افزایشی[6]، عدم تاثیر[7] و یا کاهش اثر[8]. تعیین نوع برهم کنش با استفاده از روش Check board و بر اساس غلظت بازدارنده افتراقی یا شاخص FIC[9] انجام شد. طبق پروتکل EUCAST 2000 و تفسیر آن به 4 حالت امکان پذیر است. اگر ($FIC < 0.5$) حالت هم افزایی، ($0.5 \leq FIC \leq 1$) حالت افزایشی، ($1 \leq FIC \leq 4$) حالت عدم تاثیر و در نهایت ($FIC > 4$) حالت کاهش اثر می‌باشد [21].

$$FIC_{12}=(MIC_1 \text{ combination}/MIC_1 \text{ alone})+(MIC_2 \text{ combination}/MIC_2 \text{ alone})$$

1: اسانس کُندر 2: اسانس زوفا

2-2-7- تجزیه و تحلیل آماری

: تمامی آزمایش‌ها در سه تکرار و به صورت مقدار میانگین با انحراف استاندارد گزارش شدند. مقایسه میانگین توسط آزمون

1. Dimethyl sulfoxide
2. Inhibition Zone
3. Microdilution broth

4. Triphenyltetrazolium chloride
5. Synergistic
6. Additive
7. Indifferent
8. Antagonistic
9. Fractional Inhibitory Concentration

دانکن و در سطح معنی‌داری $p<0.05$ انجام شد. آنالیز واریانس نتایج نیز با استفاده از نرم افزار SPSS version 24 صورت گرفت.

3- نتایج و بحث

3-1- نتایج راندمان استخراج اسانس زوفا و کندر

نوع روش به کار رفته جهت استخراج ترکیبات فعال گیاهی به عواملی مانند ساختار گیاهی، نوع ماده آنتی اکسیدانی و مقاومت ماده استخراج شده به دمای فرایند بستگی دارد؛ به طوریکه با انتخاب روشی مناسب جهت استخراج می‌توان تا حد زیادی از تخریب ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجود در بافت‌های گیاهی ممانعت کرد [22]. با تعیین راندمان اسانس زوفا و کُندر مشخص شد که پس از گذشت 5 ساعت از اسانس‌گیری با مقدار مشخصی از هر دو گیاه به ترتیب درصد راندمان اسانس زوفا و کندر برابر با 0/59 و 1/5 درصد بود، که این نتیجه کاملا طبیعی و منطقی می‌باشد چرا که در مطالعه ربیعی و همکاران (1382) بر روی 4 گونه از واریته گیاه درمنه، چهار درصد راندمان اسانس متفاوت بدست آمد [23]. نجف پور نوایی (1380) درصد راندمان استخراج اسانس گیاه زوفا جمع‌آوری شده از استان البرز را 0/62 درصد گزارش کرد [9]. لذا این مطالعه نشان داد که راندمان استخراج اسانس گیاه زوفا جمع‌آوری شده از استان البرز بسیار نزدیک به راندمان استخراج اسانس گیاه زوفا جمع‌آوری شده از منطقه جنوبی کرمان می‌باشد.

3-2- نتایج آنالیز اسانس زوفا و کندر به‌وسیله دستگاه GC-MS

نتایج آنالیز اسانس زوفا در جدول شماره 2 آورده شده است. با توجه به نتایج جدول مجموعا 24 ترکیب مختلف قابل جداسازی و شناسایی بود. ترکیب عمده اسانس زوفا را cis-3-pinanone (28/2%) تشکیل می‌داد. علاوه بر این ترکیبات اصلی دیگر مانند carvocrol (21/5%)، Trans-3-pinanone (13/2%)، Thymol (12/92%)، o-cymene (3/94%) و myrtenol (3/65%) ترکیب غالب بودند. اعداد مندرج در ستون عمودی کروماتوگرام (شکل 1)، مقدار فراوانی ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس زوفا را نشان می‌دهد و ستون افقی، زمان جداسازی و شناسایی هر یک از ترکیبات اسانس در ستون را بیان می‌کند. Dzamic و همکاران (2013) در مطالعه‌ای ترکیب شیمیایی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدقارچی گیاه زوفا زیر گونه ***pilifer*** را بررسی کردند. این محققان مجموعا 30 جزء را در اسانس شناسایی نمودند که به ترتیب بیشترین اجزا شامل 1.8-cineole (36/43%)، β-pinene (19/55%)، isopinocamphone (15/32%) و trans-pinocamphone (6/39%) بودند [24]. ساختار شیمیایی اسانس‌ها با توجه به موقعیت جغرافیایی، محل رشد گیاه (نوع خاک، آب و هوا، ارتفاع از سطح دریا و میزان آب موجود) می‌تواند متفاوت باشد. حتی فصل، به عنوان مثال پیش یا پس از گل‌دهی و ساعتی که در آن چینش انجام می‌شود بر ساختار شیمیایی اسانس‌ها اثرگذار است. عامل مهم اثرگذار دیگر ساختار ژنتیکی گیاه است، از این رو تمام عوامل مشتمل بر ژنتیکی یا محیطی بر بیوسنتز اسانس‌ها در یک گیاه خاص اثر می‌گذارد. و به طور کلی گوناگونی در ساختار شیمیایی منجر به ایجاد تنوع در ترکیبات شیمیایی می‌شود [25].

نتایج حاصل از بررسی و شناسایی ترکیبات اسانس کُندر با روش کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی در جدول 3 گزارش شده است. همچنین کروماتوگرام طیف اسانس کُندر نیز در شکل 2 آورده شده است. همانگونه که ملاحظه می‌شود، مجموعا 22 جزء شناسایی شده است که بیشترین ترکیبات تشکیل دهنده اسانس به ترتیب شامل هیدروکربن‌های ترپنوئیدی مانند α-pinene (22%)، trans-β-Ocimene (17/6%)، Hepten trimethyl (16/3%) و cis-verbenol (10/9%) می‌باشند. علاوه بر این، ترکیبات فنولی (تیمول، فنل دی‌متیل و بوتیل فنل) و الکل‌های مونو و دی‌ترپن همچون اتانول، اوکالیپتول و متانول در اسانس کُندر در مقادیر مشخصی یافت می‌شود. اسانس روغنی صمغ کُندر ترکیبی از مونو، دی وسزکویی‌ترپن‌ها است.

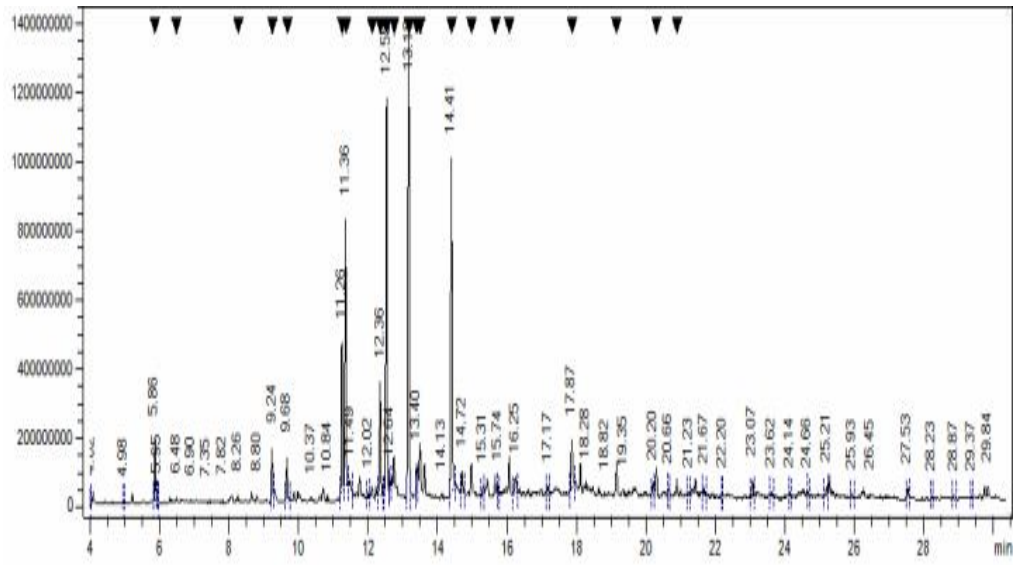

Fig 1 Chromatogram of *Hyssop* oil

Table 2 Chemical composition of *Hyssop* oil

RT[1]	components	(Feriquency%)	Row
8.28	1R-α-pinene	0.51	1
9.86	β-pinene	2.75	2
10.16	β-myrcene	0.48	3
10.56	n-decane	0.34	4
11.32	α-terpinene	0.17	5
11.64	o-cymene	3.94	6
11.83	D-limonene	0.42	7
11.91	β-phellandrene	0.28	8
11.97	Cineole	0.15	9
13.01	ϒ-terpinene	0.52	10
14.78	β-linalool	1.54	11
17.68	Trans-3-pinanone	13.2	12
18.49	cis-3-pinanone	28.2	13
19.22	myrtenol	3.65	14
21.02	o-methylthymol	1.61	15
23.43	Thymol	12.92	16
23.88	carvocrol	21.5	17
26.57	Carvacryl acetate	0.64	18
27.49	β-bourbonene	0.79	19
34.24	Hedycaryol	1.38	20
35.40	(-)-spathulenol	1.24	21
35.62	Caryophyllene oxide	0.57	22
37.51	Selinenol	0.97	23
38.40	α-eudesmol	2.24	24

1. Retention time

به طور کلی اغلب ترکیبات شناسایی شده در اسانس کُندر ترپن‌ها هستند که جزئی از ترکیبات فنولیک فعال طبیعی محسوب می‌شوند. Sharma و همکاران (2009)، ترکیبات فنولیک و یک الکل دی‌ترپن به نام سراتول را در اسانس *B.serrata* گزارش کرده‌اند [26]. در مطالعه‌ای محمدی و عربشاهی دلویی (1396) بیشترین ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس *B.serrata* را به ترتیب α- پینن (29/8%)، α- توژن (5/92%) ، β-پینن (3/41%) و p- سیمن (3/16%) گزارش کردند [27]، که این یافته‌ها تا حدود زیادی با نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر مشابهت دارد.

Table 3 Chemical composition of *Boswellia carteri* oil

(RT)	Component	) Feriquenc (y%	Row
5.86	thymol	2	1
6.48	m-Cymen-8-ol	0.1	2
8.27	Benzenemethanol	0.2	3
9.25	8-Hydroxycarvotanacetone	1.6	4
9.68	Phenol, 3,5-bis(1,1-dimethylethyl)-	1.9	5
11.26	cyclopentane	6.2	6
11.37	Cis-verbenol	10.9	7
12.12	Ethanol, 1-(1-cyclohexenyl)	0.6	8
12.36	(trans-Linalool oxide) furanoid	5.7	9
12.54	Trans- β- Ocimene	17.6	10
12.75	Isopinocarveol	1.3	11
13.18	α-pinene	22	12
13.40	Nonadecane	0.8	13
13.50	L-α-Terpineol	2.6	14
14.41	Hepten-trimethyl	16.3	15
14.98	2,4-Di-tert-butylphenol	1.5	16
15.66	Eucalyptol	0.7	17
16.07	Tridecanedial	1.4	18
17.87	trans-Carveol	2.6	19
19.15	Pentanoic acid, 10-undecenyl ester	1.5	20
20.30	Sobrerol 8-acetate	1.3	21
20.89	Isopinocarveol	0.8	22

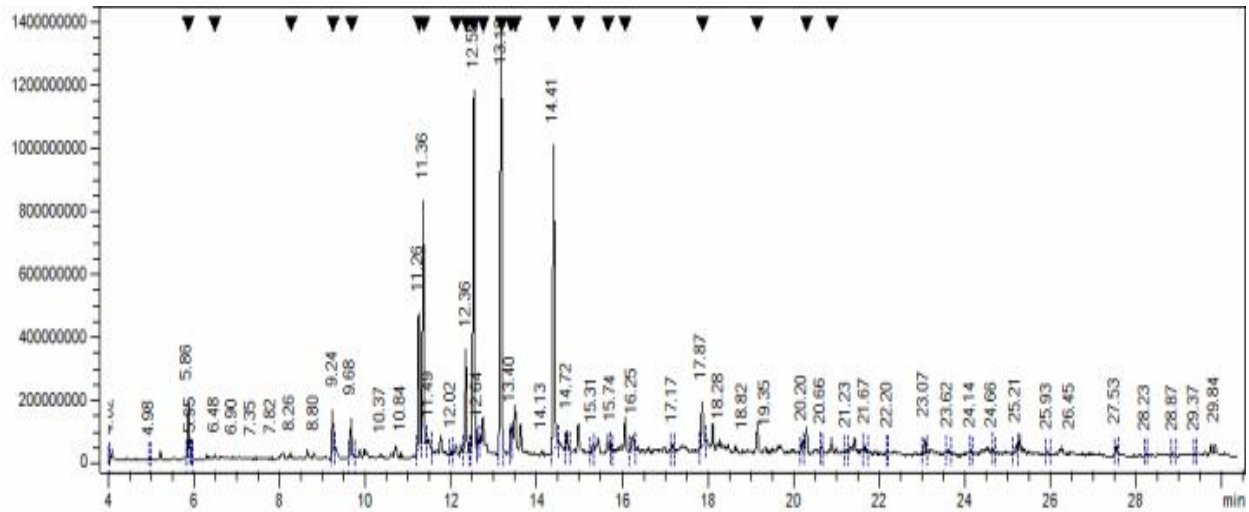

Fig 2 Chromatogram of *Boswellia carteri* oil

3-3- نتایج بررسی اثر ضدمیکروبی اسانس زوفا و کندر به روش انتشار دیسک در آگار

نتایج ارزیابی اثر ضدمیکروبی اسانس زوفا و کندر به روش انتشار دیسک در آگار با تعیین قطر هاله ممانعت‌کنندگی یا عدم رشد در شکل 3 و 4 ارائه شده است. همانطور که در شکل نیز قابل مشاهده است اسانس زوفا حتی در غلظت‌های پایین توانسته است تمامی باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت را تحت تاثیر قرار دهد، هر چند که در غلظت‌های بالاتر اسانس قطر هاله بازداری برای تمامی میکروارگانیسم‌ها به طور معنی‌داری افزایش یافت.

نتایج همچنین نشان داد که در غلظت‌های پایین، بیشترین قطر هاله عدم رشد مربوط به باکتری‌های گرم مثبت همچون *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس* و کمترین میزان قطر هاله عدم رشد مربوط به باکتری‌های گرم منفی *اشرشیاکلی* و *سودوموناس ائروژینوزا* بود، به طوری که در غلظت 0/5 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بیشترین قطر هاله مربوط به باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* با مقدار 0/1± 9/8 میلی‌متر و کمترین قطر هاله مربوط به باکتری *اشرشیاکلی* با مقدار 0/12± 7/47 میلی‌متر بود. لازم به ذکر است که قطر دیسک‌های حاوی غلظت‌های مختلف اسانس 6 میلی‌متر در نظر گرفته شد.

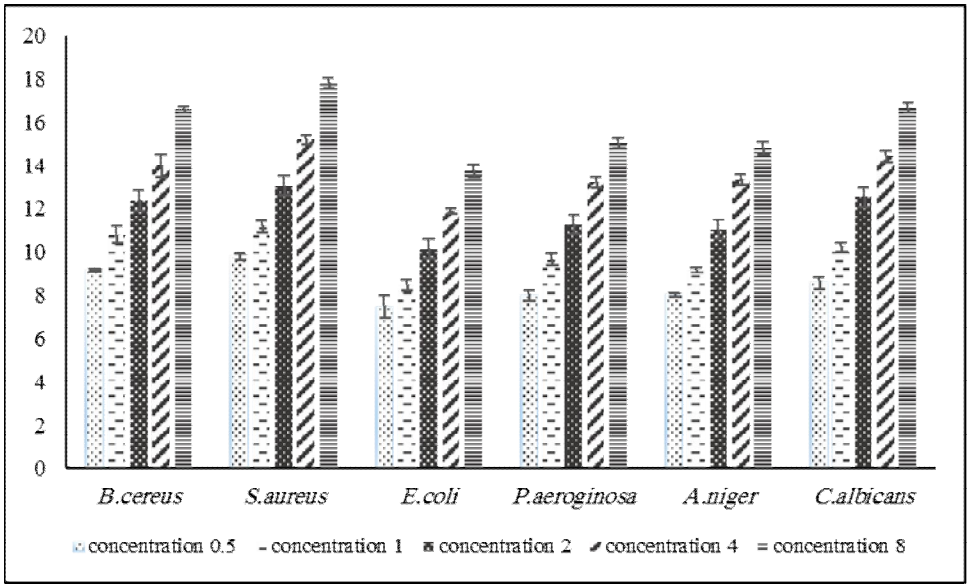

Fig 3 the mean diameter of inhibition zone of different concentrations of *Hyssop* oil against microorganisms using disk diffusion agar method

مشخص است که با افزایش غلظت اسانس به طور معنی‌داری بر میانگین قطر هاله بازدارندگی افزوده شده است. همچنین اسانس زوفا با مهار رشد قارچ‌های چون *کاندیدا آلبیکنس* و *آسپرژیلوس نیجر* دارای فعالیت ضدقارچی نیز بود هر چند که در مقایسه با ***A.niger*** ، قطر هاله عدم رشد ***C.albicans*** بیشتر بود که نشانگر تاثیر بیشتر اسانس زوفا بر این مخمر است. بر اساس نتایج بدست آمده از شکل فوق ترتیب حساسیت میکروارگانیسم‌های فوق در برابر غلظت‌های مختلف اسانس زوفا شامل:

S.aureus>B.cereus>C.albicans>P.aeroginosa>A.niger>E.coli

نصیرپور و همکاران (1394)، طی مطالعه‌ای اثر ضدباکتریایی عصاره آبی گیاه زوفا را علیه برخی از باکتری‌های بیماری‌زا با منشا غذایی مورد آزمون قرار دادند. آنها بیان کردند که گیاه زوفا اثر ضدباکتریایی قوی‌تری علیه باکتری‌های گرم مثبت نسبت به گرم منفی‌ها داشت. و حساس‌ترین باکتری در برابر عصاره آبی زوفا ***L.monocytogenes*** و مقاوم‌ترین باکتری ***E.coli*** بود، که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد [7]. علاوه بر سایر اجزای شیمیایی موجود در اسانس زوفا، فعالیت ضدمیکروبی

زوفا می‌تواند ناشی از وجود دو ترکیب تیمول[1] و کارواکرول[2] باشد چنین ترکیباتی می‌توانند اثر هم‌افزایی[3] داشته باشند کارواکرول و تیمول غشاء خارجی میکروارگانیسم‌ها را تخریب کرده و سبب خروج لیپوساکاریدها و افزایش تراوش پذیری غشاء سیتوپلاسمی به ATP می‌شود. خروج ATP منجر به تمام شدن ذخیره انرژی سلول و مرگ سلول می‌گردد [28]. اسانس‌ها به طور معنی‌داری ($p<0/05$) در برابر باکتری‌های گرم مثبت موثرتر از باکتری‌های گرم منفی بودند که علت این امر تفاوت ساختار دیواره سلولی این دو نوع باکتری است. ترکیب اصلی دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت پپتیدوگلیکان به همراه مقدار کمی پروتئین است؛ اما دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی با وجود ضخامت کمتر، پیچیدگی بیشتری داشته، و علاوه بر پپتیدوگلیکان حاوی پلی ساکاریدهای مختلف، پروتئین‌ها و لیپیدها می‌باشد [29]. همچنین دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی دارای غشاء خارجی است که سطح خارجی دیواره را می‌پوشاند [30]. مجموعه این عوامل سبب افزایش مقاومت باکتری‌های گرم منفی نسبت به باکتری‌های گرم مثبت می‌شود. درباره چگونگی تاثیر اسانس‌ها بر مخمرها و کپک‌ها و دلیل اینکه اسانس‌ها تاثیر بازدارندگی بیشتری بر مخمرها در مقایسه با کپک دارند، تحقیقات متعددی صورت گرفته، اما هنوز ساز و کار آن به طور دقیق مشخص نشده است. مخمرها، میکروارگانیسم‌هایی هوازی هستند که در سطح محیط کشت رشد می‌کنند، از سویی دیگر مکانیسم جذب اسانس‌ها به دو صورت جذب مستقیم و به صورت بخار توسط میکروارگانیسم و یا به شکل غیرمستقیم از طریق محیط کشت، اسانس را جذب می‌کنند، لذا همانگونه که قبلا ذکر شد مخمرها عمدتا در سطح محیط کشت رشد می‌نمایند، بنابراین به اثر مستقیم بخار حاصل از اسانس حساس‌تر می‌باشند، در حالی‌که اثر ضدمیکروبی بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی وابسته به تجمع بخار اسانس درون محیط کشت است که عوامل دیگری همچون نوع محیط کشت، pH، غلظت و غیره نیز بر آن موثر می‌باشد. نتایج کاملا مشابهی در مورد اثر ضدمیکروبی اسانس کُندر بر روی میکروارگانیسم‌های مذکور بدست آمد که در شکل 4 قابل نمایش است. ذکر این نکته ضروریست که در غلظت 0/5 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اسانس کُندر، میانگین قطر هاله بازدارندگی برای *استافیلوکوکوس اورئوس* 9/03±0/15 و برای *اشرشیاکلی* 6/5±0/5 میلی‌متر بود. که با توجه به نتایج بدست آمده، اثر مهارکنندگی بیشتر اسانس زوفا را در مقایسه با کُندر در غلظت برابر یادآور می‌شود.

در پژوهشی محمدی و همکاران (1385) اثر ضدقارچی اسانس کندر (*Boswellia serrata*) را بررسی و دریافتند که اسانس علیه تمامی ایزوله‌های مقاوم و حساس *کاندیدا آلبیکنس* به فلوکونازول موثر بود [31]. اثر اسانس سه گونه ***Boswellia*** علیه طیفی از باکتری‌های گرم‌مثبت و منفی توسط Mothana و همکاران (2011) بررسی و آنها برای تمامی اسانس‌ها اثر ضدمیکروبی خصوصا علیه باکتری‌های گرم‌مثبت گزارش کردند [32]. به طور کلی بررسی‌ها نشان داده است که گیاهان از نظر فرآورده‌های ثانویه مثل ترپنوئیدها، آلکالوئیدها و فلاوونوئیدها بسیار غنی هستند که بیشتر آنها دارای اثرات ضدمیکروبی می‌باشند [33] از آنجایی که هر دو اسانس زوفا و کُندر دارای مقادیر قابل ملاحظه‌ای از ترکیبات نامبرده فوق می‌باشند؛ از اینرو می‌توان اثر ضدمیکروبی اسانس را به این اجزاء نسبت داد. مکانیسم عمل سمیّت فنول‌ها در برابر میکروارگانیسم‌ها از طریق مهار آنزیمی ترکیب اکسیدشده و یا از طریق واکنش غیراختصاصی با گروه‌های سولفیدریل پروتئین‌ها می‌باشد [34].

1. Thymol
2. Carvacrol
3. Synergistic effect

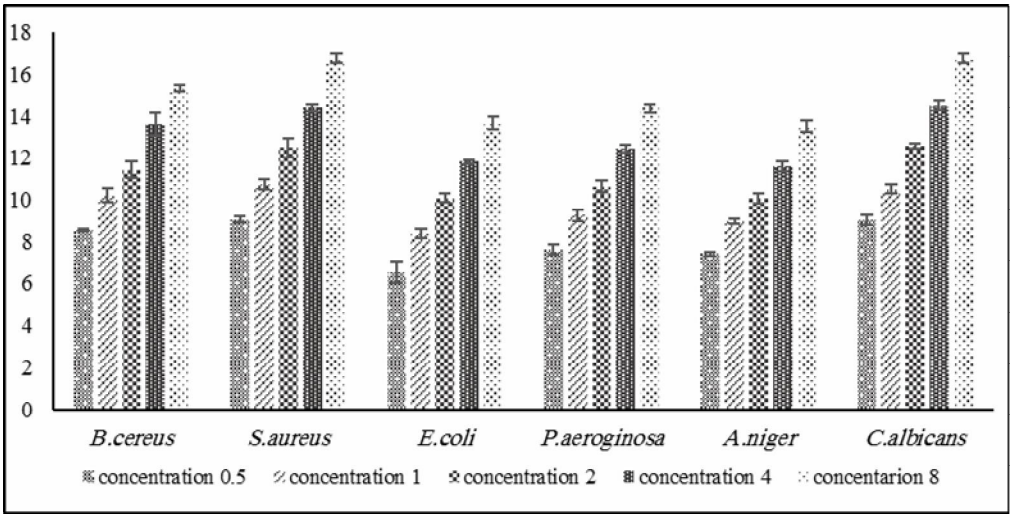

Fig 4 the mean diameter of inhibition zone of different concentrations of *Boswellia carteri* oil against microorganisms using disk diffusion agar method

4-3- نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) اسانس زوفا و کندر به روش رقت‌سازی در چاهک[1]

نتایج مربوط به حداقل غلظت بازدارندگی از رشد به روش رقت‌سازی در چاهک در جدول 4، آورده شده است. همانگونه که قابل رویت است دامنه حداقل غلظت بازدارندگی از رشد اسانس زوفا بر میکروارگانیسم‌های شاخص بین 0/5 تا میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و بسته به نوع میکروارگانیسم متفاوت بود. در مورد اسانس زوفا اشرشیاک*لی* با حداقل غلظت مهارکنندگی برابر با 2 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مقاوم‌ترین و *استافیلوکوکوس اورئوس* و *کاندیدا آلبیکنس* با حداقل غلظت مهارکنندگی رشد برابر با 0/5 حساس‌ترین میکروارگانیسم‌ها بودند. در مورد اسانس کُندر نیز *اشرشیاکلی* با حداقل غلظت مهارکنندگی برابر با 4 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مقاوم‌ترین و *استافیلوکوکوس اورئوس* با حداقل غلظت مهارکنندگی رشد برابر با 0/5 حساس‌ترین میکروارگانیسم بود.

به طور کلی نتایج تحقیقات صورت گرفته نشان می‌دهد، باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با انواع گرم منفی در برابر اسانس‌های گیاهی مقاومت کمتری نشان می‌دهند که این مسئله احتمالا به دلیل ساختار غشا باکتری‌های گرم مثبت است. به نظر می‌رسد که علت مقاومت بیشتر باکتری‌های گرم منفی به روغن-های اساسی گیاهی احتمالا پیچیدگی بیشتر غشای مضاعف سلولی این ارگانیسم‌ها در مقایسه با غشای یگانه گلیکوپروتئینی/ تکوئیک اسید[2] باکتری‌های گرم مثبت است. همچنین به نظر می-رسد مقاومت سلول‌های میکروبی به سرعت و میزان حل پذیری مواد ضدمیکروبی در بخش لیپیدی غشای سلولی بستگی دارد. اگرچه این مسئله نمی‌تواند توضیح کاملی برای شرح اختلاف در حساسیت باکتری‌های گرم مثبت و منفی باشد به همین علت اختلاف در آبگریزی سطح غشای سلول نیز به عنوان یک عامل موثر پیشنهاد شده است [35]. تحقیقات مشابه از جمله پیرنیا و همکاران (1394)، علیزاده بهبهانی و همکاران (1396)، Alizadeh Behbahani و همکاران (2015)، Jouki و همکاران (2014) و موارد متعدد دیگر که در مورد اثرات ضدمیکروبی عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهان دارویی مختلف علیه گستره زیادی از میکروارگانیسم‌های شاخص عفونت و مسمومیت غذایی انجام شده است، موید این یافته‌ها می‌باشد [36 -38].

1. Microdilution broth

2. Techoeic acid

Table 4 Results related on MIC of *Hyssop* and *Boswellia* oils against microorganisms using microdilution broth

Microorganism	*Hyssop* oil	*Boswellia* oil
S.aureus	0.5	0.5
B.cereus	0.5	1
E.coli	2	4
P.aeroginosa	1	2
Aspergillus niger	1	2
Candida albicans	0.5	1

3-5- فعالیت ضدمیکروبی اسانس زوفا و کُندر و برهم‌کنش آن‌ها

نتایج مربوط به اثر متقابل تیمارها (اسانس زوفا و اسانس کُندر) و تاثیر نهایی این برهم‌کنش‌ها بر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در جدول 5 آورده شده است. کمترین اعداد مربوط به حداقل غلظت بازدارندگی افتراقی اسانس کُندر (A) در بهترین حالت ترکیبی با اسانس زوفا (B) بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس* و مخمر *کاندیدا آلبیکنس* بود. به عبارت دیگر کمترین شاخص غلظت بازدارنده رشد مربوط به اثر مشترک اسانس کُندر با اسانس زوفا بر سه میکروارگانیسم دیگر بدون تاثیر بود.

Table 5 Interaction of between *Hyssop* and *Boswellia* oils using FIC method

Microorganism	FIC_A	FIC_B	FIC_{AB}	Interaction
S.aureus	0.5	0.5	1	Additive
B.cereus	0.5	0.5	1	Additive
E.coli	2	1	3	Indifferent
P.aeroginosa	1	1	2	Indifferent
Aspergillus niger	2	2	4	Indifferent
Candida albicans	0.5	0.5	1	Additive

تحقیقات محدودی به بررسی اثر برهم‌کنش بین ترکیبات طبیعی با منشا گیاهی پرداخته‌اند. Tawab و همکاران (2015) فعالیت ضدمیکروبی عصاره اتانولی گیاه رزماری را با 5 آنتی‌بیوتیک رایج (اکسی‌تتراسایکلین، آموکسی‌سیلین، سفکوئینوم، سولفاکوئینوگزالین و دانوفلاکساسین) علیه 5 سویه از *استافیلوکوکوس اورئوس* بررسی کردند. نتایج‌شان نشان داد اثرات هم‌افزایی تعیین شده با شاخص FIC بین 0/006 و 0/00038 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر رزماری به ترتیب با 0/125 و 4 میکروگرم بر میلی‌لیتر سفکوئینوم و سولفاکوئینوم بود [21]. در مطالعه دیگری Van vuuren و همکاران (2009)، پروفایل برهم‌کنش بین اسانس‌های روغنی (رزماری و نعناع فلفلی) با آنتی‌بیوتیک سیپروفلاکساسین را علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* آنتاگونیستی (کاهشی) گزارش کردند [39]. از فرضیات توصیف کننده حالت آنتاگونیسمی مکانیسم بازدارندگی رقابتی[1] است. زمانی که دو ترکیب ضدمیکروبی دارای محل اثر یکسانی در ساختار سلول باشند، اتصال یک ترکیب به جایگاه، از اتصال ترکیب دیگر ممانعت به عمل آورده و اثر آنتاگونیسمی مشاهده می‌شود. از سوی دیگر ممکن است حضور یک ترکیب با ایجاد تغییراتی در ساختار سلول، اتصال ترکیب دیگر را به جایگاه تسریع و تسهیل نماید در چنین مواردی اثر هم‌افزایی (سینرژیستی) بروز می‌کند [40].

3-6- نتایج حداقل غلظت کشندگی (MBC) یا (MFC) اسانس زوفا و کندر

نتایج مربوط به حداقل غلظت کشندگی اسانس زوفا، اسانس کُندر و اسید آسکوربیک در جدول 5، آورده شده است. نتایج نشان داد که حداقل غلظت کشندگی همه میکروارگانیسم‌ها بیشتر از حداقل غلظت بازدارندگی از رشد است. دامنه حداقل غلظت کشندگی رشد اسانس زوفا علیه میکروارگانیسم‌های شاخص بین 1 تا 4 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و بسته به نوع میکروارگانیسم متفاوت می‌باشد. این فاکتور برای اسانس کُندر بین 1 تا 8 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود.

1. Competitive Inhibitory Mechanism

Table 4 Results related on MBC and MFC of *Hyssop* and *Boswellia* oils against microorganisms using microdilution broth

Microorganism	*Hyssop* oil	*Boswellia* oil
S.aureus	1	1
B.cereus	2	2
E.coli	4	8
P.aeroginosa	2	4
Aspergillus niger	2	4
Candida albicans	1	2

اساسا، مکانیسم عملکردی اسانس‌ها در ارتباط با ترکیب شیمیایی و فعالیت ضدمیکروبی آن‌ها بوده، ولی در تمامی موارد از مکانیسم مشابهی برخوردار نیستند، با وجود این در اغلب موارد تاثیر اسانس‌های گیاهی بر ساختار دیواره سلولی تایید شده است [40]. ویژگی آب‌گریزی اسانس‌ها سبب نفوذ آن‌ها در لیپید غشای سلولی و افزایش نفوذپذیری می‌گردند [41]. اثرات سمی روی ساختار و عملکرد غشاء به‌طور کلی توجیه‌کننده فعالیت ضدمیکروبی اسانس‌های گیاهی و ترکیب‌های مونوترپنیدی آن‌ها می‌باشد [42].

4- نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج مطالعه اخیر، اسانس زوفا و کندر دارای اثر ضدمیکروبی مناسبی بر میکروارگانیسم‌های مورد آزمایش بوده و اثر ضدمیکروبی بر باکتری‌های گرم مثبت و مخمر *کاندیدا آلبیکنس* بیشتر از باکتری‌های گرم منفی و کپک *آسپرژیلوس نیجر* است. بی‌شک یکی از اهداف مهم صنایع غذایی تولید مواد غذایی با رویکرد افزایش ایمنی و ارزش غذایی است که علاوه بر رفع نیاز جامعه در حفظ سلامت جامعه نیز موثر می‌باشد. بررسی و مرور مطالعات انجام‌شده در ایران و سایر کشورها، ویژگی‌های ضدمیکروبی، ضدقارچی، ضدویروسی، ضدانگلی، و آنتی‌اکسیدانی اسانس‌های گیاهی را تایید نمودند و برخی از اسانس‌ها نیز در محافظت مواد غذایی مورد استفاده قرار گرفته‌اند که این موارد می‌تواند سهم بزرگی در صنایع غذایی و افزایش مدت زمان ماندگاری مواد غذایی به عهده گیرد. البته هم‌چنان مطالعات گسترده‌تری در زمینه بررسی تاثیرات ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی اسانس‌ها لازم و ضروری به‌نظر می‌رسد.

5- سپاسگزاری

بدینوسیله از زحمات سرکار خانم مهندس شهناز افشاریان و سرکار خانم مهندس فرشته فلاح که در انجام آزمایش‌ها ما را یاری نمودند، صمیمانه قدردانی می‌شود. مقاله علمی – پژوهشی حاضر مستخرج از پایان نامه مقطع دکتری با عنوان فیلم ضدمیکروبی- خوراکی دولایه بر پایه ژلاتین- صمغ کندر (*Boswellia carteri*) در ترکیب با اسیدآسکوربیک و اسانس زوفا (*Hyssopus officinalis L*) جهت افزایش زمان ماندگاری فیله شترمرغ در دمای یخچال با کد 47102 در گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد می‌باشد. لذا نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند که از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد جهت یاری رساندن در انجام طرح صمیمانه سپاسگزاری نمایند.

6- منابع

[1] Panacek A, Kvitek L, Prucek R, Kolar M, Vecerova R, Pizurova N, Sharma VK, Nevecna T, Zboril R. 2006. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. The Journal of Physical Chemistry B, 110(33): 16248-53.

[2] Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. International Food Microbiology, 94: 225-253.

[3] da Costa, J.G.M., Campos, A.R., Brito, S.A., Pereira, C.K.B., Souza, E.O. and Rodrigues, F.F.G., 2010. Biological screening of araripe basin medicinal plants using *Artemia salina* Leach and pathogenic bacteria. Pharmacognosy magazine, 6(24), p.331.

[4] dos Santos, J.F.S., Rocha, J.E., Bezerra, C.F., do Nascimento Silva, M.K., de Matos,

[13] Garba S., Andrew K., Justina U., 2013, Antioxidant Activities of total flavonoids extracted from *Boswellia papyrifera* and Parkia biglobosa Topclass. *Journal of Herbal Medicine* 2,244-247.

[14] Prakash, B., Mishra, P.K., Kedia, A., Dubey, N.K., 2014. Antifungal, antiaflatoxin and antioxidant potential of chemically characterized *Boswellia carterii* Birdw essential oil and its in vivo practical applicability in preservation of *Piper nigrum* L. fruits. LWT-Food Sci. Technol. 56, 240–247.

[15] Azizian, S.O., Taherizadeh, M., Valizadeh, M. and ZabolI, A., 2018. Investigation of antioxidant and antimicrobial activities and phytochemical compounds of essential oil and different extracts of *cymbopogon olivieri* (*boiss*.) bor. from sistan and baluchestan province. Sabzevar Medical University Journal. 25(2): 99-111.

[16] Alizadeh Behbahani, B., Tabatabaee Yazdi, F., Mortazavi, S.A., Zendeboodi, F., Gholian, M., Vasiee, A. 2013. Effect of aqueous and ethanolic extract of *Eucalyptus camaldulensis L*. on food infection and intoxication microorganisms "in vitro". *Journal of Paramedical Science*. 4(3): 89-99.

[17] Rajkovic, K., Pekmezovic, M., Barac, A., Nikodinovic-Runic, J. and Arsenijević, V.A., 2015. Inhibitory effect of *thyme* and *cinnamon* essential oils on *Aspergillus flavus*: Optimization and activity prediction model development. Industrial Crops and Products, 65, pp.7-13.

[18] Portillo, A., Vila, R., Freixa, B., Adzet, T. and Cañigueral, S., 2001. Antifungal activity of Paraguayan plants used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, *76*(1), pp.93-98.

[19] Rodriquez-Tudela, J.L., Donnelly, J.P., Arendrup, M.C., Arikan, S., Barchiesi, F., Bille, J., Chryssanthou, E., Cuenca-Estrella, M., Dannaoui, E., Denning, D. and Fegeler, W., 2008. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST Technical Note on the method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for Y.M.L.S., de Freitas, T.S., dos Santos, A.T.L., da Cruz, R.P., Machado, A.J.T., Rodrigues, T.H.S. and de Brito, E.S., 2018. Chemical composition, antifungal activity and potential anti-virulence evaluation of the *Eugenia uniflora* essential oil against Candida spp. Food chemistry, 261, pp.233-239.

[5] Rodrigues, F.F.G., Colares, A.V., Nonato, C.D.F.A., Galvão-Rodrigues, F.F., Mota, M.L., Braga, M.F.B.M. and da Costa, J.G.M., 2018. In vitro antimicrobial activity of the essential oil from *Vanillosmopsis arborea* Barker (Asteraceae) and its major constituent, α-bisabolol. Microbial pathogenesis, 125, pp.144-149.

[6] Kazazi, H., Rezaei, K., Ghotb-Sharif, S.J., Emam-Djomeh, Z. and Yamini, Y., 2007. Supercriticial fluid extraction of flavors and fragrances from *Hyssopus officinalis L*. cultivated in Iran. Food Chemistry, 105(2), pp.805-811.

[7] Nasirpour, M., Yavarmanesh, M., Mohhamadi Sani, A. and Mohamdzade Moghadam, M., 2014. Antibacterial effect of aqueous extract of *Artemisia aucheri*, *Artemisia sieberi* and *Hyssopus officinalis L*. on the food borne pathogenic bacteria. Journal of Food Science & Technology (2008-8787), 12(46).[Persian]

[8] Najafpour, N.M. and Mirza, M., 2002. Camparative study on the essential oil Composition of The leaves of *Hyssopus Officinalis L*. In Field And Wild Growing.

[9] Najafpour, N.M., 2001. Compound recognition in essential oil of *Hyssopus officinalis*.

[10] Marino, M., Bersani, C., Comi, G. 2001. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiaceae* and *Compositae*. International Journal of Food Microbiology. 67:187–195.

[11] Ghasemidehkordi, N. 2002. Iranian herbal pharmacopoeia. First edition. Ministry of health and medical education Tehran. Pp: 647-54.

[12] Shen T and Lou HX. Bioactive Constituents of Myrrh and Frankincense, Two Simultaneously Prescribed Gum Resins in Chinese Traditional Medicine. Chem. Biodivers 2008; 5: 540 - 53.

[28] Cosentino, L. and Heddle, J.A., 1999. Effects of extended chronic exposures on endogenous and transgenic loci: Implications for low□dose extrapolations. Environmental and molecular mutagenesis, 34(2□3), pp.208-215.

[29] Pranoto, Y., Salokhe, V.M. and Rakshit, S.K., 2005. Physical and antibacterial properties of alginate-based edible film incorporated with garlic oil. *Food research international*, *38*(3), pp.267-272.

[30] Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R. and De Feo, V., 2013. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. Pharmaceuticals, *6*(12), pp.1451-1474.

[31] Mohammadi, R., Yadgari, M., Moatar, F. and Shams, M. 2006. Antifungal activity of *Boswellia serrata* essential oil against fluconazole-resistant and susceptible isolates of *candida albicans*. 24(82): 30-34

[32] Mothana, R.A., Hasson, S.S., Schultze, W., Mowitz, A. and Lindequist, U., 2011. Phytochemical composition and in vitro antimicrobial and antioxidant activities of essential oils of three endemic *Soqotraen Boswellia* species. Food chemistry, 126(3), pp.1149-1154.

[33] Cowan, M. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews, 12(4): 546-582.

[34] Dholwani, K., Slaluja, A., Gupta, A., Shah, D. 2008. A review on plant-derived natural products and their analogs with anti-tumor activity. *Indian Journal of Pharmacology*, 40(2): 49.

[35] Gill, A.O. and Holley, R.A., 2006. Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus* sakei cellular membranes by plant oil aromatics. International journal of food microbiology, *108*(1), pp.1-9.

[36] Pirnia, M., Edalatian Dovom, M.R., Tabatabaee Yazdi, F. and Shahidi, F., 2015. The antibacterial effects of the aqueous and Ethanolic extracts of *Cordia myxa L.* fruit on *Staphylococcus aureus*, Bacillus Cereus, *Escherichia coli*, and *salmonella typhi*. Qom University of Medical Sciences Journal, *9*(4), pp.39-48.[Persian]

conidiaforming moulds. Clin Microbiol Infect, *14*, pp.982-984.

[20] Mehraban, A., Dovom, E., Haddad Khodaparast, M.H. and Mehraban Sang Atash, M., 2016. 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 University of Medical Sciences Journal, 10(2), pp.2-11.

[21] Tawab, A. A., El-Hofy, F.I., Mobarez, E. A., Taha, H. S., Tawakol, N. Y. 2015. Synergistic effect between some antimicrobial agents and rosemary (*rosmarinus officinalis*) toward *staphylococcus aureus – in-vitro*. *Benha Veterinary Medical Journal*. 28(2): 195-201.

[22] Suhaj, M. 2006. Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: A review. *Journal of Food Composition Anal*ysis, 19, 531-7.

[23] Rabiei, M., Jalili, A. and ghamari, Z.A., 2003. Studying on ploidy level of fiveartemisia species from the north of Iran. 11(4): 429-441.[Persian]

[24] Džamić, A.M., Soković, M.D., Novaković, M., Jadranin, M., Ristić, M.S., Tešević, V. and Marin, P.D., 2013. Composition, antifungal and antioxidant properties of *Hyssopus officinalis L.* subsp. *pilifer* (Pant.) Murb. Essential oil and deodorized extracts. *Industrial Crops and Products*, 51, pp.401-407.

[25] Reid, M.L., Sekhon, J.K. and LaFramboise, L.M., 2017. Toxicity of monoterpene structure, diversity and concentration to mountain pine beetles, *Dendroctonus ponderosae*: beetle traits matter more. *Journal of chemical ecology*, *43*(4), pp.351-361.

[26] Sharma, A., Ghodekar, S. N., Bhatia, S., Kharya, M. D., Gajbhiye,V., Mann, A. S., Namdeo, A. G. and Mahadik, K. R. 2009. Phytochemical and Pharmacological investigations on *Boswellia serrata*. *Pharmacognocy Reviews*, 3, 206-215.

[27] Mohammadi, A. and Arabshahi, S., 2016. Evaluation of active components and antioxidant activity of essential oil of Boswellia serrata. Food Science and Technology, 14(63), pp.107-117.[Persian]

conventional antimicrobials. Wiley Online Library, 48(4):440-446.

[40] Chou, T. C. 2006. Theoritical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies, *Pharmacological Reviews*. 58(3): 621-681.

[41] Sadeghi, E., Dargahi, A., Mohammadi, A., Asadi, F., Sahraee, S. 2016. Antimicrobial effect of essential oils. A review. Journal of food hygiene. 5(2): 1-26. [Persian]

[42] Palmer, A.S., Steward, J. and Fyfe, L. 2001. The potential application of plant essential oils as natural preservatives in soft cheese. Journal Food Microbiology, 18: 463-470.

[43] Morris, J.A,. Khettry, A,. Seitz Ew.1979. Antimicrobial activity of aroma chemicals and essential oils. Journal of the American Oil Chemists's Society, 56(5): 595-603.

[37] Alizadeh Behbahani, B., Tabatabaei Yazdi, F., Fakhri, S., Mortazavi, S.A. and Mohebbi, M., 2017. Investigation of Chemical Compounds and Antibacterial Activity of Tarragon (*Artemisia dracunculus*) Essential Oil on Some Pathogenic Bacteria *In Vitro*. Qom University of Medical Sciences Journal, 11(9), pp.42-51.[Persian]

[38] Jouki, M., Yazdi, F.T., Mortazavi, S.A., Koocheki, A. Khazaei, N. 2014. Effect of quince seed mucilage edible films incorporated with *oregano* or *thyme* essential oil on shelf life extension of refrigerated rainbow trouts fillets. International journal of food microbiology, 174: 88-97.

[39] Van Vuuren, S.F., Suliman, S., Viljoen, A.M. 2009. The antimicrobial activityof four commercial essential oils in combination with

Comparison and survey of chemical composition and antimicrobial effect *Hyssopus officinalis* and Frankincense (*Boswellia carteri*) oils against some of food infectious and spoiling microorganisms *In Vitro*

Pirnia, M. [1], Tabatabaee Yazdi , F. [2], Mortazavi, S. A. [3*], Mohebbi, M. [4]

1. Phd Student of Food Microbiology, Department Of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad-Iran.
2. Professor in Food Microbiology, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad –Iran.
3. Professor in Food Science and technology, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad –Iran.
4. Professor in Food Science and technology, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad –Iran.

(Received: 2019/07/01 Accepted: 2020/06/21)

Hyssopus officinalis and frankincense (*Boswellia carteri*), as valuable medicinal herbs, are widely used in traditional medicine. Due to the increased resistance of pathogenic microorganisms to antibiotics and increasing of treatment costs, attentions has been focused to compounds of natural origin. In this study, *Hyssop* and Frankincense oils were extracted separately by water distillation. The essential oils components were identified by GC/MS. Determination of inhibition zone diameter and minimum inhibitory concentration were performed by disk agar diffusion and macro dilution methods, respectively. Wells with no discoloration were used to detect the minimum bactericidal (fungicidal) concentration. In this research, 24 and 22 compounds were identified in *Hyssop* and Frankincense, respectively. The main component of *Hyssop* oil was cis-3-pinanone (%28.2), and the main component of Frankincense oil was α- pinene (%22). Both *Hyssop* and Frankincense oils had the highest effect on *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*, and the lowest growth zone diameter was related on *Escherichia coli* and Pseudomonas *aeruginosa*. Also, it was found that the *Candida albicans* was more sensitive than *Aspergillus niger* against both essential oils ($p<0.05$). The results showed that plants are rich in secondary products such as terpenoids, alkaloids and flavonoids, most of which have antimicrobial activity

Keywords: *Hyssopus officinalis*, *Boswellia carteri* , Chemical composition, Antimicrobial effect.

[*] Corresponding Author E-Mail Address: morteza@um.ac.ir