

بررسی اثر ضد میکروبی سه گونه از گیاهان تیره نعناع (کاکوتی، مریم گلی و نعناع) بر ۱۵ سویه باکتری بیماریزای روده‌ای و عامل مسمومیت غذایی

دکتر صدیقه مهربان - زهرا ملاباشی - دکتر احمد مجد

دانشگاه تربیت معلم، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

خلاصه:

در این بررسی مجموعه خواص ضدباکتریایی ۳ گونه گیاهان تیره نعناع شامل کاکوتی، مریم گلی و نعناع مورد مطالعه قرار گرفته است. این بررسی به طور عمده روی عصاره‌های متانولی، استنی و آبی انجام گرفت. عصاره گیری با دستگاه سوکسله انجام شد و عصاره‌ها یا غلظتهای یکسان روی ۱۲ سویه بیماریزای و ۳ سویه فرصت طلب بیماریزا مقیم روده مطالعه گردید.

میکروارگانیزم‌های مورد مطالعه که اغلب از مدفوع بیماران و تعدادی از مواد غذایی آلوده جداسازی شده بود، بعد از خالص نمودن مورد مطالعه بیوشیمیایی و سرم‌شناسی قرار گرفتند. این سوشها عبارتند از (سالمونلا پاراتیفی A، سالمونلا پاراتیفی B، سالمونلاتیفی، شیگلادیسانتري، شیگلایکسونی، شیگلایککتری، اشرشیاکلی O₁₅₇H₇، اشرشیاکلی O₁₅₇H₅، اشرشیاکلی O₁₅₇H₄، استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرنوس، کلبسیلا اکسی‌توکا، آنروبا کترانروژنوزا و پروتئوس میرابیلیس). مطالعه اثر ضد میکروبی مطابق روش Kirby & Bauer و با اندازه گیری قطر هاله مهار رشد انجام شد. آنتی‌بیوتیک آمیکاسین به عنوان استاندارد استفاده شد. هر آزمایش سه مرتبه تکرار شد. از بررسی قطر هاله‌های عدم رشد نتایج زیر گرفته شد.

- ۱- همه عصاره‌های مورد نظر اثر ضد باکتریایی دارند.
- ۲- از بین سه نمونه به ترتیب مریم گلی، کاکوتی و نعناع میزان

تأثیر ضد میکروبی گونه‌ها افزایش می‌یابد.

- ۳- مؤثرترین مواد ضد میکروبی حلال متانولی بدست آمد و حلالهای دیگر به ترتیب استنی و آبی بودند.
- ۴- حساس‌ترین میکروارگانیزم‌ها نسبت به عصاره‌های مورد مطالعه عبارتند از:

۱) شیگلادیسانتري (۲) کلبسیلاکسی‌توکا

۳) باسیلوس سرنوس (۴) سالمونلاتیفی

۵- بطور کلی هیچکدام از عصاره‌های مورد مطالعه بر پروتئوس میرابیلیس تأثیری نداشتند.

۶- گونه مریم گلی قویترین اثر ضد باکتریایی را بر شیگلادیسانتري نشان داد.

کلمات کلیدی کاکوتی، مریم گلی، نعناع، سالمونلا، شیگلا، اشرشیاکلی

مقدمه:

گیاهان تیره نعناع از زمانهای گذشته در طب سنتی مورد استفاده بوده، بطور معمول در درمان عفونتهای دستگاه گوارش یا دل‌درد بکار می‌رود. امروزه از گیاهان تیره نعناع بصورت ادویه و چاشنی در رستورانها و منازل همراه با غذا استفاده می‌شود. بهمین علت در این بررسی باکتریهای بیماریزا و فرصت طلب‌های روده‌ای و عامل مسمومیت غذایی به عنوان موضوع مطالعه در نظر

چاهک ۰/۰۵ میلی‌لیتر می‌باشد و از ستانول و استن و نیز آنتی‌بیوتیک آمیکاسن بعنوان شاهد استفاده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد در گرمخانه قرار گرفت. قطر هاله عدم رشد مطابق روش (Kirby & Bauer) اندازه‌گیری شد.

نتایج:

۱- بررسی اثر ضد میکروبی هر سه گونه گیاه از تیره نعناع بر ۱۵ باکتری مورد آزمایش نشان می‌دهد که گیاهان مزبور دارای اثر ضد میکروبی می‌باشند. این اثر در مورد عصاره آبی گیاه تازه و عصاره آبی گیاه خشک شده یکسان بوده و عصاره آبی بر بعضی از باکتریها مؤثر نبود. جدول شماره ۱ و ۲ و ۳

۲- مؤثرترین مواد ضد میکروبی توسط حلال متانولی بدست آمد و حلالهای دیگر به ترتیب عبارتند از استنی و آبی. هیستوگرام شماره ۱ و ۲ و ۳

۳- در مقایسه جداول شماره ۱ و ۲ و ۳ این نتیجه حاصل می‌شود که گیاهان مریم‌گلی و کاکوتی اثر ضد میکروبی بیشتری نسبت به گیاه نعناع بر باکتریهای مورد آزمایش داشته‌اند.

۴- حساس‌ترین میکروارگانسیم‌ها نسبت به عصاره‌های مورد مطالعه عبارتند از (۱) شیگلادیسانتتری (۲) کلبسیلا اکسی‌توکا (۳) باسیلوس سرنوس (۴) سالمونلا تیفی. هیستوگرام ۱ و ۲ و ۳

۵- بطور کلی اثر ضد میکروبی عصاره گیاهان این تیره بر باکتریهای گرم مثبت و منفی تقریباً یکسان بود. (جداول ۱ و ۲ و ۳)

۶- قویترین اثر ضد میکروبی مربوط به گیاه مریم‌گلی و بر روی باکتری شیگلادیسانتتری مشاهده گردید. هیستوگرام (۱).

۷- بطور کلی هیچکدام از عصاره‌ها بر پروتئوس میرابیلیس تأثیری نداشتند و هاله عدم رشد مشاهده نگردید. هیستوگرام ۱ و ۲ و ۳

۸- نتایج حاصل از اثر ضد میکروبی عصاره‌های متانولی و استنی و آبی گیاهان مزبور بر باکتریهای مورد آزمایش باکتری کش (باکتریوسید) بوده است.

۹- عصاره‌های تهیه شده از گیاهان مزبور با غلظت ۱۰ mg/ml به وسیله سرنگ استریل وارد چاهک می‌کنیم باید دقت شود تا عصاره‌ها کاملاً خل چاهک مزبور ریخته شوند مقدار عصاره به کار رفته در هر

شدند. آزمایش‌های بیوشیمیایی مختلفی از جمله (گلوکز، β گالاکتوزیداز سترات، هیدروژن سولفور، اندل، لیزین، حرکت، فنیل آلانین، آوره‌آز، Vp) برای تشخیص دقیق و تفکیک گروههای مختلف انجام شد. علاوه بر مطالعات بیوشیمیایی مذکور آزمایشات کامل سرولوژی به روش آگلوتیناسیون روی لام نیز بعمل آمد و فرمول آنتی‌ژنهای سالمونلا مطابق روش Leminor و تابلوی (Kauffman and White) تعیین شد. سوشهای استافیلوکوکوس اورنوس، باسیلوس سرنوس، باسیلوس سوبیلیس از مواد غذایی آلوده با کشت در روی محیط‌های انتخابی و انجام بعضی از آزمایشها از جمله لسیتماز، کواگولاز، تست آمیدون جداسازی و خالص شد.

۴- تأثیر دادن عصاره‌های تهیه شده روی میکروارگانسیم‌های مورد آزمایش:

الف - تهیه سوسپانسیون میکروبی: از کشت ۲۴ ساعته و خالص هر یک از ۱۵ میکروارگانسیم‌های مورد مطالعه با سواب استریل در کنار شعله برداشت کرده و در محیط نوترینت برات استریل می‌بریم و مدت ۶-۸ ساعت در گرمخانه قرار داده تا از یک کدورت نسبی برخوردار شوند.

حال سوسپانسیون میکروبی مورد نظر را از لحاظ کدورت مطابق روش Mac far land مورد بررسی قرار می‌دهیم. با سنجش کدورت محیط تعداد میکروارگانسیم‌ها حدود ۱۰^۸ در هر میلی‌لیتر تخمین زده شد.

ب - کشت دادن میکروارگانسیم‌ها روی پلیت: بعد از تهیه سوسپانسیون میکروبی استاندارد با سواب استریل اقدام به کشت هر یک از ۱۵ سوسپانسیون میکروبی بطور جداگانه در روی محیط مولر هیتون می‌نماییم. عمل کشت دادن را بدقت و در سه جهت متفاوت تکرار می‌کنیم تا تمام نقاط پلیت کشت داده شود. حال این پلیت‌ها برای کندن چاهک و ریختن دارو آماده می‌باشند.

ج - تأثیر دادن عصاره‌های تهیه شده روی میکروارگانسیم‌ها: روی هر پلیت به قطر داخلی ۶ میلی‌متر چاهک ایجاد می‌کنیم. از عصاره‌های تهیه شده (با غلظت ۱۰ mg/ml) به وسیله سرنگ استریل وارد چاهک می‌کنیم باید دقت شود تا عصاره‌ها کاملاً خل چاهک مزبور ریخته شوند مقدار عصاره به کار رفته در هر

اسانس گونه‌های مختلف گیاهان انجام شد. قسمتهای مختلف گیاهان از جمله برگ و ساقه *Salvia officinalis* و *Caraway (carum carvi)* میوه *officinalis* و گل *cuminum* و گل *Syzygium armaticum* برگهای *thymus vulgaris* را بر سه باکتری گرم منفی (پسودوفلوئورسانس، اشرفیشیا کلی و سراشیامارسه سنس) و ۴ باکتری مثبت استافیلوکوکوس اورنوس - میکروکوکوس SPP، *SPP* و باسیلوس سوبتیلیس و باکتری مقاوم اسید میکروبی *Micobacterium Pheli* و یک مخمر ساکارو سرونیزیه (*Saecharomyees serviziae*) حداقل ماده $0/25-12 \text{ mg/ml}$ تعیین نمودند و اعلام کردند که باکتریهای مثبت حساستر از باکتریهای گرم منفی می‌باشد. در مقایسه با بررسی ما شاید به علت کم بودن تعداد باکتری گرم مثبت که باکتری گرم منفی بود. اثرات ضد میکروبی تقریباً یکسان گردید. اما همه گونه‌های گیاهی اثر ضد میکروبی نشان دادند تقریباً با نتایج ما همسوئی دارد.

کاکوتی، مریم گلی و نعناع) بر ۱۵ باکتری بیماریزا و فرصت طلب بیماریزای روده‌ای و عامل مسمومیت غذایی نشان داد هر سه گونه گیاه دارای خاصیت ضد میکروبی می‌باشد. پژوهشگرانی از جمله (Biondi, D. 1993) اثر ضد میکروبی دو گونه از گیاهان تیره نعناع را بر باکتریهای باسیلوس سوبتیلیس، استافیلوکوکوس اورنوس و اشرفیشیا کلی و پروتئوس و لگاریس بررسی نموده، این گیاهان بر باکتریهای مورد آزمایش اثر ضد میکروبی داشته نتایج پژوهشهای ما نیز با این کارها همسوئی دارد (Biondi, D.) در ادامه پژوهشهای خود نشان داده‌اند که این اثر ضد میکروبی به ترکیبات فنولی موجود در عصاره مربوط می‌باشد.

در پژوهشهایی که ما انجام دادیم بیشترین اثر مربوط به حلالهای متانولی و استنی بوده و عصاره آبی اثر کمتری داشته است. در بررسیهای Ulubelen, A. 1994، از عصاره استنی ریشه، ساقه، برگ و گل *Salvia selarea* مواد ضد میکروبی را انول ترپنوئیدها معرفی نموده و جداسازی کردند. مواد مزبور علیه پروتئوس و لگاریس. استافیلوکوکوس اورنوس و کاندیدا آلبیکاناس مؤثر بوده است. شاید مواد ضد میکروبی از جمله ترپنوئیدها در آب بخوبی حل نمی‌شوند بهمین دلیل در پژوهش ما نتایج اثر ضد میکروبی عصاره آبی کمتر می‌باشد.

بررسیهای ما نشان داد گیاهان مریم گلی و کاکوتی نسبت به گیاه نعناع اثر ضد میکروبی بیشتری دارد. در این زمینه تحقیقات زیادی روی جنس سالویا انجام شده از جمله در مصر Sabri-N-N 1990 و همکارانش اثرات ضد میکروبی و ضد سرطانی قوی در ریشه گونه *Salvia aegratica* گزارش نمودند اثر ضد میکروبی گیاه مزبور را بر *پسودوموناس اثر و ژینوزا*، استافیلوکوکوس اورنوس، کاندیدا آلبیکاناس و باسیلوس سوبتیلیس مشاهده نمودند که با نتایج کار ما مشابه می‌باشد. این پژوهشگران با استفاده از روش کروماتوگرافی ستونی و لایه نازک دو باند رنگی را که وابسته به ترکیبات تانن دار می‌باشند شناسایی نمودند. ساختمان این ترکیبات را بوسیله اسپکتروفتومتر مشخص نموده و بوسیله اشعه X نیز تأیید کردند. اختلاف اثر ضد میکروبی جنسهای مختلف تیره نعناع مربوط به ساختمان شیمیایی آنها می‌باشد. در پژوهش دیگری که توسط Farag-R-1989 و همکارانش در مصر در روی

References

1- Biondi- D, Cianci- P; Geraci- c, Robveto- G, Piattelli- M (1993). Enterobacteriaceae 4th Edition de la Tourelle, 5 Rue Guynemer 5941. st Mana.
Antimicrobial activity and chemical composition of essential oils from Sicilian aromatic Plants. Flavour-and Fragrance journal; 8:6, 331-337.

2- Edward. P. R. and Ewing, W. H (1962) Burgess publ co Mineapolis 15 Minnesora Identification of Enterobacteriaceae. 2nd Edition. Burgess publ. Co Mineapolis 15 minnesota.

3- Farge - Rs Salem - H; Bader - Azma, Hassanein - DE (1989). Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oil. Journal of food Protection; 52:9, 665-667.

4- Kirby W. M. & Bavgar, A. W. (1959). Disk antibiotic sensitivity testing to staphylococci: An Analysis of Technique and results, Arch, Intern. Med, 104, 208-16.

5- Leon Leminor (1972). Le Diagnostic de laboratoire de

6- Pereda-Miranda-R Hernandez-L, Lopez-R. (1992). A Novell antimicrobial abietane - type diterpene from salvia albocaerulea. planta - Medica; 58: 2, 223-224.

7- Sabri - NN. Abou Donia - AA; Ghezly - NM; Assed - AM; (1989). Two new rearranged abientane diterpene quinones from salvia aegyptiaca. journal - of - organic chemistry; 59: 17, 4097-4099.

8- Ulubelen - A. Topcu - G, Eris - C; Somez - U, Kartal - M; Kurvcu - S; Bozok - Johanson - c (1994). Terpenoids from salvia sclarea phytochemistry; 36: 4, 971-974.

9- Vichkanova - SA. Izosimova - SB; Adgina - UV; Shipulina - LD (1979). prospects of a search for antimicrobial substances among quinones of plant orgin. Rastitel nye - Resursy; 15: 2, 167 - 177.

11	18	25	Salmonella paratyphi A
18	16	18	Salmonella paratyphi B
10	13	15	Salmonella anatum
13	18	20	Klebsiella oxytoca
0	0	0	Proteus mirabilis
13	13	13	Shigella sonnei
13	13	13	Bacillus cereus
10	13	13	Bacillus subtilis

تأثیر ضدباکتریایی عصاره‌های مختلف مریم‌گلی (*Salvia*) بر باکتری‌های بیماری‌زا
و فرصت‌طلب بیماری‌زای روده‌ای و عوامل مسمومیت غذایی

MICROORGANISMS	METHANOL	ACETON	WATER
<i>Ecoli O¹¹¹B⁴</i>	11.2 ±0	11 ±0	0
<i>Ecoli O²¹⁵B¹⁵</i>	22 ±0.38	18 ±0.2	10 ±0
<i>Ecoli O¹²⁷B⁸</i>	16 ±0.8	14 ±0	12 ±0
<i>Shigella dysentriac</i>	30 ±0	28 ±0	21 ±0
<i>Shigella flexneri</i>	17.2 ±6.58	16 ±0.72	16 ±0.92
<i>Shigella sonnei</i>	16 ±0	26 ±0	12 ±0
<i>Salmonella typhi</i>	23 ±0.58	17 ±0.88	12 ±0.82
<i>Salmonella paratyphi A</i>	24 ±0	19 ±0	12 ±0
<i>Salmonella paratyphi B</i>	18 ±0.5	16 ±0.2	18 ±0
<i>Aerobaeter aerogense</i>	21 ±0.5	15 ±0	10 ±0
<i>Kelebsiella oxytoca</i>	28 ±0.29	20 ±0.2	15 ±0
<i>Proteus mirabilis</i>	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	21 ±0.5	25 ±0.29	12 ±0
<i>Bacillus cereus</i>	23 ±0.06	25 ±0.03	12 ±0
<i>Bacillus subtilis</i>	23 ±0	21 ±0	20 ±0

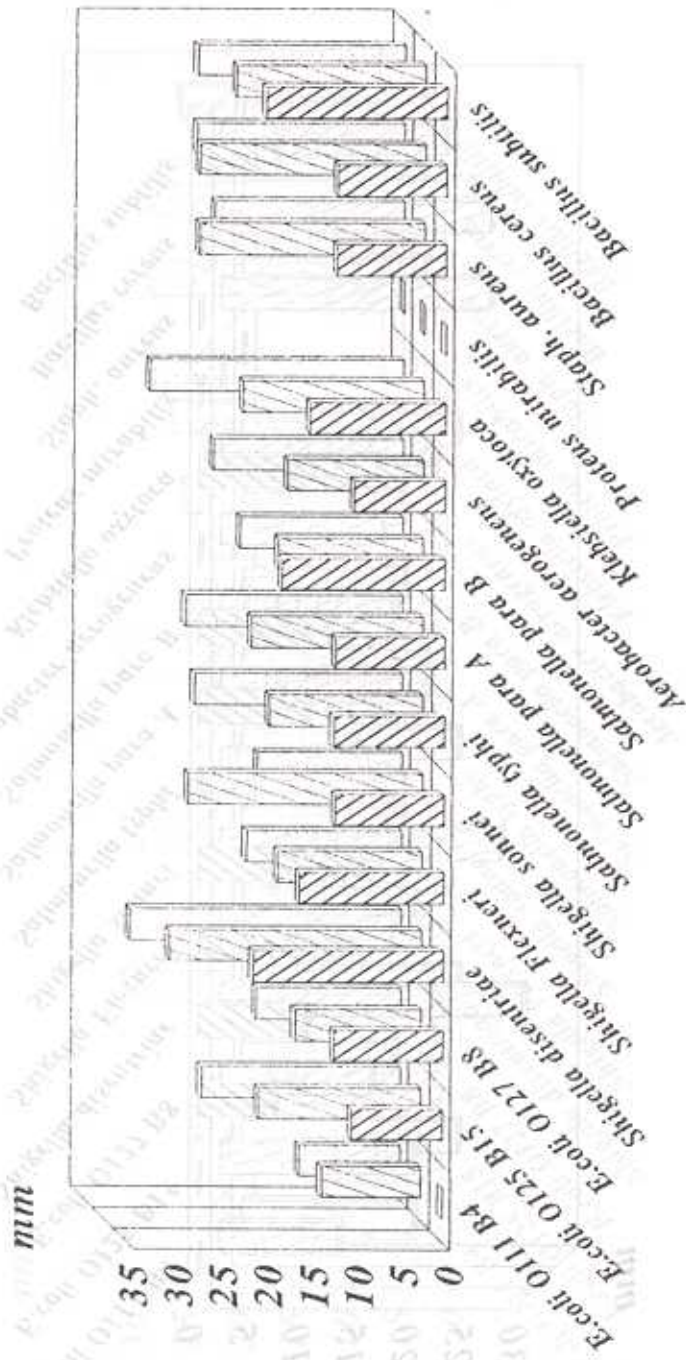
تأثیر ضدباکتریایی عصاره‌های مختلف نعناع (*Spearmint*) بر باکتریهای بیماریزا
و فرصت طلب بیماریزای روده‌ای و عوامل مسمومیت غذایی

MICROORGANISMS	METHANOL	ACETON	WATER
Ecoli O ¹¹¹ B ⁴	16 ±0	7 ±0.2	0
Ecoli O ²¹⁵ B ¹⁵	20 ±0	8 ±0	0
Ecoli O ¹²⁷ B ⁸	14 ±0.5	8 ±0	7 ±0
Shigella dysentriac	20 ±0	17 ±0	10 ±0
Shigella flexneri	16 ±0.5	19 ±0.2	13 ±0
Shigella sonnei	15 ±0	20 ±0.5	15 ±0
Salmonella typhi	20 ±0	15 ±0	0 ±0
Salmonella paratyphi A	17 ±0	14 ±0	10 ±0.2
Salmonella paratyphi B	15 ±0.62	14 ±0.2	12 ±0
Aerobaeter aerogense	15 ±0.5	12 ±0	0
Kelebsiella oxytoca	20 ±0	18 ±0.5	19 ±0
Proteus mirabilis	0	0	0
Staphylococcus aureus	17 ±0	14 ±0	0
Bacillus cereus	21 ±0.3	20 ±0.3	0 ±0
Bacillus subtilis	12 ±0	16 ±0.1	7 ±0

تأثیر ضدباکتریایی عصاره‌های مختلف کاکوتی (*Ziziphora*) بر باکتریهای بیماریزا
و فرصت‌طلب بیماریزای روده‌ای و عوامل مسمومیت غذایی

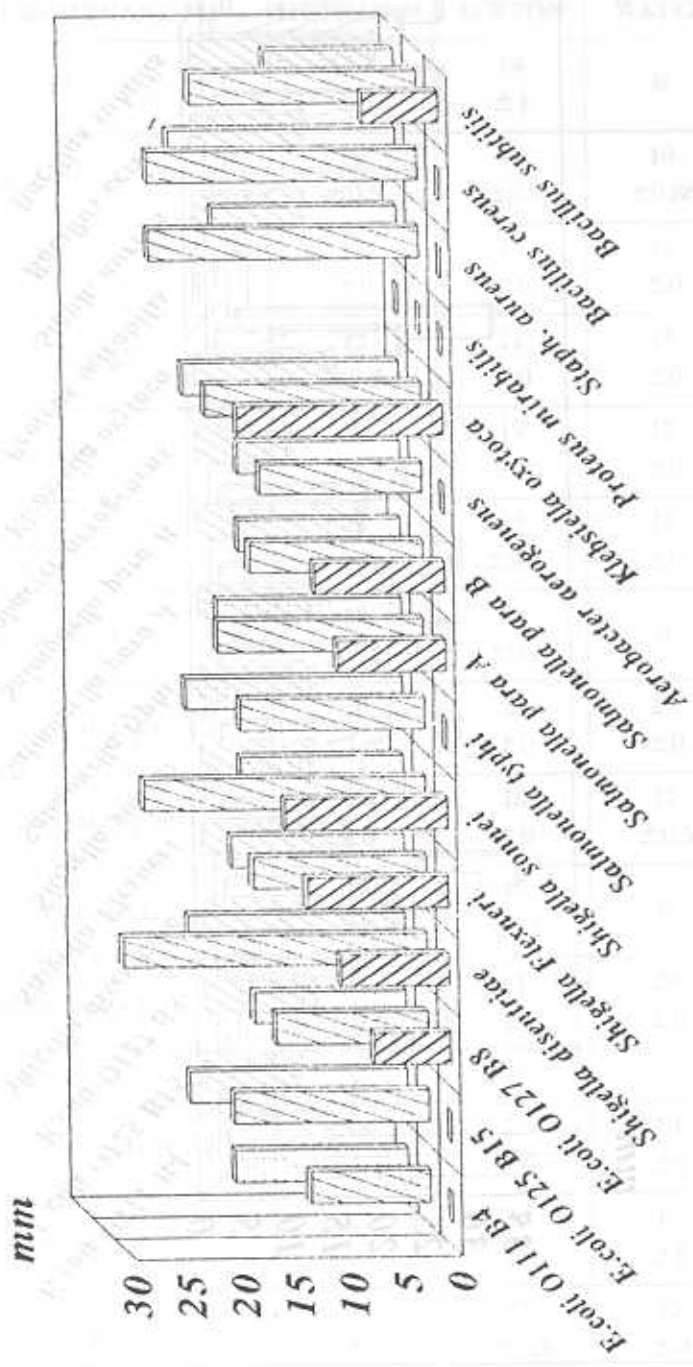
MICROORGANISMS	METHANOL	ACETON	WATER
<i>Ecoli O¹¹¹B⁴</i>	16.2 ±0	14 ±1	0
<i>Ecoli O²¹⁵B¹⁵</i>	19 ±0.5	16 ±0.5	10 ±0.86
<i>Ecoli O¹²⁷B⁸</i>	15 ±0	14 ±0	14 ±0
<i>Shigella dysentriae</i>	25 ±0.8	21 ±0	15 ±0
<i>Shigella flexneri</i>	19 ±0.5	19 ±0	12 ±0
<i>Shigella sonnei</i>	22 ±0	25 ±0.8	15 ±0
<i>Salmonella typhi</i>	19 ±0	20 ±0.2	0
<i>Salmonella paratyphi A</i>	26 ±1.86	25 ±0	15 ±0
<i>Salmonella paratyphi B</i>	17 ±0	16 ±0	15 ±0.5
<i>Aerobaeter aerogense</i>	20 ±0	15 ±0.5	0
<i>Kelebsiella oxytoca</i>	21 ±0.5	21 ±0	20 ±0
<i>Proteus mirabilis</i>	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	18 ±0.5	22 ±0	10 ±0
<i>Bacillus cereus</i>	22 ±0.69	25 ±0	12 ±0
<i>Bacillus subtilis</i>	20 ±0	21 ±0.28	15 ±0

Effects of Different Salvia Extracts on Enteric Pathogens, Opportunistics and Food Poisoning Bacteria



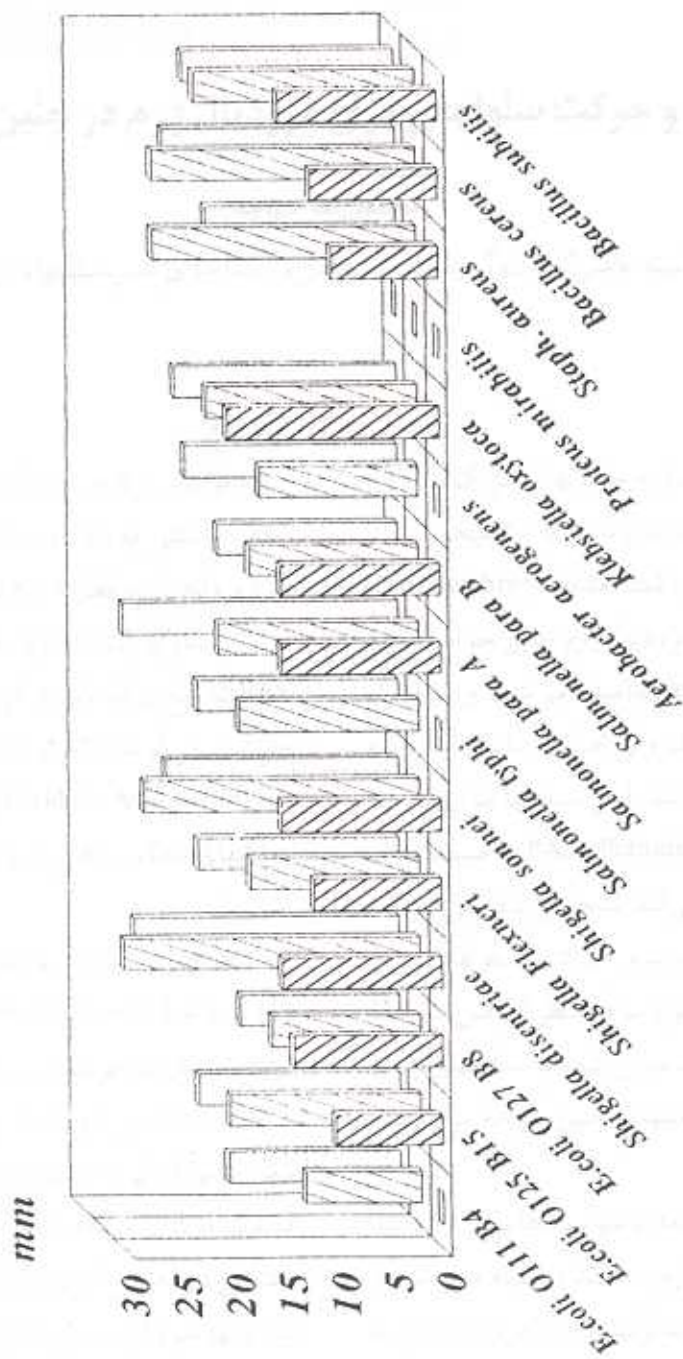
Methanol	11.2	22	16	30	17.2	16	23	24	18	21	28	0	21	23	23
Acetone	11	18	14	28	16	26	17	19	16	15	20	0	25	25	21
Water	0	10	12	21	16	12	12.2	12	18	10	15	0	12	12	20

Effects of Different Spearmint Extracts on Enteric Pathogens, Opportunistics and Food Poisoning Bacteria



Methanol	16	20	14	20	16	15	20	17	15	15	20	0	17	21	12
Acetone	11	18	14	28	16	26	17	19	16	15	20	0	25	25	21
Water	0	0	7	10	13	15	0	10	12	0	19	0	0	0	7

Effects of Different Ziziphora Extracts on Enteric Pathogens, Opportunistics and Food Poisoning Bacteria



Methanol	16.2	19	15	25	19	22	19	26	17	20	21	0	18	22	20
Aceton	11	18	14	28	16	26	17	19	16	15	20	0	25	25	21
Water	0	10	14	15	12	15	0	15	15	0	20	0	10	12	15

شناسائی و حرکت سلولهای پری مرویدال ژرم در جنین جوجه مرغ

محمدرضا خواجه

دانشگاه شهید باهنر کرمان، گروه زیست‌شناسی، رنگ‌آمیزی پاس، سلولهای پری مرویدال

مقدمه:

سلولهای پری مرویدال (PGCs) سلولهای بزرگ کروی و یا گلابی شکلی به اندازه ۱۰ تا ۲۰ میکرون هستند. هسته آنها گرد و دانه‌دار به قطر ۸-۱۲ میکرون می‌باشد.

این سلولها ابتدا حاوی مقدار زیادی زرده هستند ولی به PAS تدریج زرده ناپدید شده توسط ذرات چربی و گلیکوژن جانشین می‌گردد (۳، ۴، ۱۱) که این نوار با رنگ‌آمیزی رنگ در (Periodic Acid Schiff) شفاف می‌گردد (۷). ویژگیهای مذکور یکی از راههای تشخیص PGCs پرنندگان است.

قبلاً تصور بر این بود که « PGCs در جنین مرغ از آندودرم (۱) که «خط germinal crescent نامیده می‌شود در طول مرحله اولیه خود از مهاجرت این سلولها در راحل بعدی به طرف جلو و عقب ایجاد می‌شود (۸). ولی امروزه ثابت شده است که منشاء آنها از اپی‌پلاست و به طور دقیق‌تر او اختصاصی‌تر از قسمت مرکزی منطقه شفاف می‌باشد (۵). با شروع مرحله ۱۰ تکاملی در بعضی از پرنندگان تمام سلولهای PGCs در فضای بین رگها نفوذ کرده ولی تا زمانی که قلب شروع به ضربان ننماید وارد جریان خون نمی‌شوند. این سلولها در خون باقی خواهند ماند و وقتی که جنین ۳ روز (مرحله ۱۸ یا ۱۹) (۸). عمر دارد از مویرگها خارج شده و وارد ناحیه بافت زاینده می‌شوند (۶ و ۲).

چکیده:

سلولهای پری مرویدال ژرم سلولهای بزرگ کروی، تخم‌مرغی و یا گلابی شکلی به اندازه ۱۰ تا ۲۰ میکرون و تا منشاء گنادها در جوجه مرغ می‌باشند. مدت آنها (Chick embryo) تصور بر آن بود سلولهای پری مرویدال ژرم جنین جوجه « مرغ از آندودرم که «germinal crescent نامیده می‌شود و در طول مرحله خط اولیه بوجود می‌آیند. ولی امروزه ثابت شده که منشاء آنها اپی‌پلاست می‌باشد. این سلولها با روش که رنگ‌آمیزی Periodic Acid Schiff (PAS) ذخیره‌های گلیکوژن سیتوپلاسم را رنگ می‌کند تشخیص داده می‌شوند. در این تحقیق زمان مهاجرت و حرکت سلولهای پری مرویدال ژرم و تعداد آنها در خون با در نظر گرفتن مرحله تکوینی جنین جوجه مرغ و همچنین تعداد سلولهای پری مرویدال در ارتباط با تعداد سوماتهای جنین جوجه مرغ تعیین گردید.

نتایج نشان داد، هنگامی که تعداد سوماتها برابر ۳۰ باشد تعداد سلولهای پری مرویدال ژرم به حد بیشینه می‌رسد و همچنین در مرحله ۱۶ تکوینی سلولهای پری مرویدال ژرم به بیشترین میزان دیده می‌شوند و از این مرحله به بعد این سلولها در گنادها مستقر شده و در مرحله ۱۹ کامل می‌گردند.