بررسی ترکیب شیمیایی و خواص ضد باکتریایی اسانس رزماری بر روی اشرشیاکلی و تعیین سینتیک آن

نویسندگان: محمد ملکوتیان[۱] بهنام حاتمی[۲]

۱.نویسنده مسئول: استاد مرکز تحقیقات بهداشت محیط وگروه بهداشت محیط، دانشگاه علوم پزشکی کرمان

Email: m.malakootian@yahoo.com

۲. دانش آموخته کارشناس ارشد مهندسی بهداشت محیط ، دانشگاه علوم پزشکی کرمان

طلوع بهداشت

فصلنامهٔ علمی پژوهشی دانشکده بهداشت یزد

سال دوازدهم

شماره: اول

بهار ۱۳۹۲

شماره مسلسل: ۳۸

تاریخ وصول: ۹۱/۶/۲۸

تاریخ پذیرش: ۹۱/۹/۸

چکیده

مقدمه: به علت مقاومت میکروارگانیسمها در برابر آنتی بیوتیک ها، استفاده از گیاهان دارویی جهت دستیابی به ترکیبات جدید و غلبه بر آنها، امری مهم و ضروری می باشد. هدف از انجام این مطالعه، بررسی ترکیبات موثر و خواص ضد باکتریایی اسانس رزماری بر روی اشرشیاکلی، به عنوان یکی از شایعترین باکتریهای بیماریزا و تعیین سینتیک اثر آن می باشد.

روش بررسی: پس از جداسازی گیاه رزماری از دیگر گیاهان اقلیم شهر کرمان و خشک نمودن آن، استخراج اسانس به روش تقطیر با آب انجام گردید. اسانس بدست آمده، بوسیله گازکروماتوگرافی جرمی آنالیز و ترکیبات موجود در آن شناسایی شد.جهت تعیین خواص ضد باکتریایی، از روشهای استاندارد انتشار دیسک، تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی و تعیین حداقل غلظت کشندگی استفاده شد. ضمنا سینتیک اثر اسانس بر روی باکتری نیز تعیین گردید.

یافته ها:درآنالیز اسانس رزماری، ۲۰ ترکیب شناسایی شد که ۸۲/۰۹ درصد این ترکیبات شامل 1,8 Cineole، Borneo، α-pinen، Camphor، Linalool، Camphene، limonene و Verbenone می باشد. قطر هاله عدم رشد بدست آمده در غلظت µg/Disc ۳۲ اسانس، از قطر هاله عدم رشد آنتی بیوتیک های جنتامایسین، پنی سیلین، استرپتومایسین و اریترومایسین بیشتر می باشد. همچنین حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد(MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) در این مطالعه به ترتیب برابر $\frac{\mu g}{ml}$ ۳۰۰۰ و $\frac{\mu g}{ml}$ ۳۲۰۰ حاصل شد. زمان مورد نیاز برای نابودی کامل اشرشیاکلی نیز ۲۵ دقیقه بدست آمد.

نتیجه گیری: بررسی های انجام گرفته در این مطالعه نشان داد اسانس گیاه رزماری جمع آوری شده از شهر کرمان دارای خاصیت ضدباکتریایی بسیار خوبی بر علیه اشرشیاکلی بوده، بطوریکه نسبت به برخی آنتی بیوتیکهای دارویی رایج، این خاصیت را در غلظت کمتری، نشان می دهد.

واژه های کلیدی: رزماری، اسانس، اشرشیاکلی، میکروارگانیسم، ضدمیکروبی

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

با وجود اکتشافات متعدد پزشکی در زمینه های مختلف دارویی و روشهای پیشرفته درمان، آمار نشان دهنده افزایش تعداد بیماریهای عفونی(Infectious Diseases) در کشورهای در حال توسعه می باشد(۱). بسیاری از این بیماریهای عفونی بواسطه میکروارگانیسم های بیماریزا مانند باکتری ها، ویروسها، قارچها، پروتوزوا و انگلها ایجاد می شوند و قابلیت انتقال از یک شخص به شخص دیگر را دارا می باشند(۲). در این میان، بخش عمده ای از شیوع بیماری و مرگ و میر در انسانها به بیماریهای ناشی از باکتری ها، نسبت داده می شود که می توانند از طرق مختلف مانندآب آشامیدنی، تنفس و مواد غذایی وارد بدن انسان شوند(۲,۳). یکی از شایعترین باکتریهای بیماریزا اشرشیاکلی (Escherichia coli) بوده که از طریق آب آلوده و غذاهای ناپخته باعث مسمومیت، اختلالات گوارشی و در موارد حاد باعث مرگ و میر می شود(۲). تاکنون شیوع بیماریهای مختلفی ناشی از حضور اشرشیاکلی در آبهای آشامیدنی و مواد غذایی در نقاط مختلف جهان گزارش شده که می توان به والکرتون(Walkerton) در کانادا، هایلند(Highland) در اسکاتلند و اوساکا(Osaka) در ژاپن اشاره نمود(۴,۵). همچنین حضور و رشد میکروارگانیسم ها در مواد غذایی ممکن است باعث فساد و در نتیجه کاهش کمیت و کیفیت آن نیز گردد(۶,۷). کنترل فساد مواد غذایی و میکروارگانیسم های بیماریزا عمدتا بوسیله عوامل شیمیایی انجام می شود. اما به علت خواص سرطان زایی، ناقص زایی و طولانی بودن زمان تجزیه، استفاده از عوامل شیمیایی محدود می باشد(۸).

از دیرباز تا کنون، گیاهان دارویی به واسطه خواص دارویی موجود در ترکیبات آنها، به طور گسترده در طب سنتی و پزشکی نوین استفاده می شوند(۹). به علت اثرات جانبی آنتی بیوتیک ها و افزایش مقاومت میکروارگانیسمها در برابرآنها، گیاهان دارویی از محبوبیت زیادی در بهبود عفونتهای باکتریایی برخوردار می باشند(۲). از این رو محققان، به بررسی ترکیبات فعال استخراج شده از گونه های مختلف گیاهی جهت از بین بردن میکروارگانیسم های بیماریزا علاقمند می باشند(۱۰). متابولیت های ثانویه گیاه مانند اسانسها(Essential Oils) و فلاوونوئیدها(flavonoids) به علت خواص ضد میکروبی، ضد باکتریایی، ضد قارچی و آنتی اکسیدانی به طور گسترده مورد استفاده قرار گرفته اند (۳,۱۱,۱۲,۱۳,۱۴,۱۵,۱۶).

گیاه رزماری(Rosmarinus officinalis) متعلق به خانواده نعناعیان(Lumiaceae) به علت خواص ضد میکروبی، ضد جهش زایی و عامل پیشگیری کننده شیمیایی، در صنایع دارویی و پزشکی به عنوان یک گیاه دارویی با ارزش شناخته شده است(۹,۱۲,۱۷,۱۸,۱۹). رزماری حاوی مقدار زیادی اسانس (بیش از ۱٪) بوده که به عنوان طعم دهنده در مواد غذایی در صنایع آرایشی و هم چنین در ترکیبات گندزداها و حشره کشها استفاده می شود(۹,۱۱,۱۲,۲۰). اسانس گیاه رزماری، گردش خون در عضوهای بدن را افزایش داده، دارای اثرات ضد روماتیسمی بوده و دردهای عصبی را کاهش می دهد(۱۷). این گیاه منبعی غنی از ترکیبات فنلی با خاصیت ضد میکروبی بالا علیه باکتری های گرم مثبت و گرم منفی می باشد(۹). مطالعات گوناگونی بر روی خواص ضد میکروبی گونه های مختلف

Archive of SID

www.SID.ir

رزماری و ترکیبات تشکیل دهنده آن انجام شده است. از جمله مطالعه Keskin و همکارانش در ترکیه که خواص ضد میکروبی گیاهان گوناگون از جمله رزماری را بر روی باکتریهای پاتوژن مختلف بررسی نمودند و یا مطالعه Pintore و همکارانش که خواص ضد میکروبی رزماری روئیده شده در دو منطقه آب و هوایی متفاوت ایتالیا را مورد بررسی قرار دادند(۶,۱۱,۲۱). اگرچه خاصیت ضد میکروبی رزماری توسط محققین در نقاط مختلف مورد بررسی قرار گرفته است، اما با توجه به عوامل تاثیر گذار بر ترکیب اسانس و در نتیجه خاصیت ضد میکروبی، مطالعه خاصیت اسانس رزماری در مکانهای متفاوت با آب و هوای متفاوت ضروری به نظر می رسد(۱۸). هدف از این مطالعه، تعیین خواص ضد میکروبی اسانس استخراج شده از رزماری جمع آوری شده در شهرکرمان بر روی اشرشیاکلی و همچنین تعیین سینتیک مرگ باکتری بوسیله اسانس از طریق رسم منحنی رشد می باشد.

روش بررسی

گیاه رزماری از قسمتهای مختلف شهر کرمان جمع آوری و پس از انجام آزمونهای گیاه شناسی بر اساس فارماکوپه گیاهی ایران بر روی آن، با هرباریوم دانشکده داروسازی نیز مطابقت داده شد. گیاه پس از شستشوی اولیه، جهت جلوگیری از اثر دمای بالا بر روی ترکیبات آن، به مدت یک هفته در دمای محیط خشک شده و سپس آسیاب گردید. استخراج به روش تقطیر با آب(Hydrodistillation) بوسیله دستگاه کلونجر(Clevenger) انجام شد. ۲۵۰ گرم گیاه خشک شده در۱۶۰۰ میلی لیتر آب تقطیر شده به مدت سه ساعت عملیات استخراج انجام گردید. پس از عبور مخلوط حاصل از صافی واتمن(Whatman) شماره ۲، اسانس بوسیله دکانتور از آب جدا و در شیشه های تیره رنگ ریخته و تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شد. جهت انجام آزمایشات جداسازی ترکیبات رزماری، ابتدا اسانس استخراج شده طبق روش Celiktas و همکارانش بوسیله دستگاه گازکروماتوگراف مدلHewlett–PackardHP6890 مجهز به ستون سیلیکای DB-5 (۶۰m× ۰/۲۵ mm ، ضخامت فیلم ۰/۲۵ µm) و دتکتور از نوع یونیزاسیون شعله (FID) تعیین مقدار گردید. از نیتروژن به عنوان گاز حامل با میزان $\frac{ml}{min}$ ۰/۹ تا ۱/۲ طبق برنامه استفاده گردید. دمای آون در مدت یک دقیقه به ۶۰ درجه سانتیگراد رسیده و به تدریج با سرعت $\frac{C}{min}$ ۴ به دمای ۲۲۰ درجه رسید و به مدت ۱۰ دقیقه در این دما نگه داشته شد، سپس با سرعت $\frac{c}{min}$ ۱ به ۲۴۰ درجه سانتیگراد رسید. جهت آنالیز، یک میلی لیتر از نمونه (حل شده در هگزان به نسبت حجمی ۲۰٪) به دستگاه تزریق گردید(۶). سپس جهت تعیین ترکیبات تشکیل دهنده از دستگاه گازکروماتوگرافی جرمی مدل Hewlett–Packard G 1800A مجهز به ستون سیلیکای DB-5 (۶۰m× ۰/۲۵ mm ، ضخامت فیلم ۰/۲۵ µm) استفاده گردید. ازهلیوم به عنوان گاز حامل با میزان $\frac{ml}{min}$ ۰/۷ استفاده شد . واحدهای جرمی از $\frac{m}{z}$ ۳۵ تا ۴۲۵ در ۷۰ ev گزارش شد. برنامه دمایی طبق برنامه ارائه شده در بالا برای آنالیز گازکروماتوگرافی اعمال گردید. ترکیبات بر اساس مقایسه زمان ماند و طیف جرمی کتابخانه willey شناسایی شدند(۶).

تعیین خواص ضد میکروبی :

باکتری اشرشیاکلی ATCC 8739 از مرکز منطقه ای کلکسیون قارچها و باکتریهای صنعتی ایران به صورت آمپولهای

Archive of SID

www.SID.ir

لیوفیلیزه(lyophiliz)، تهیه گردید. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد، باکتری های رشد یافته در محیط کشت مک کانگی را در شرایط کاملاً استریل با کمک لوپ آزمایشگاهی در یک لوله استریل حاوی ۵ میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل، کاملا مخلوط نموده تا سوسپانسیون یکنواختی از باکتری حاصل شود. این لوله را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه قرار داده تا کدورتی مشابه استاندارد ۰/۵ مک فارلند($۱/۵ \times ۱۰^{۸} \frac{cfu}{ml}$) ایجاد نماید(۱۵). تعیین خواص ضد میکروبی اسانس به روش انتشار دیسک و بر اساس استاندارد NCCls 2000a انجام گردید(۲۲). اسانس رزماری به صورت پودر خشک شده را در حلال دی متیل سولفاکساید(DMSO)حل نموده و پس از تهیه غلظتهای مختلفی از ۲۵ تا ۶۴۰۰ µg/ml از آن، با عبور از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر استریل گردید. در زیر هود از سوسپانسیون باکتریایی، ۱۰۰ میکرولیتر بر روی پلیت های حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار (Muller Hinton Agar) ریخته، به طوری که سطح پلیت از یک لایه میکروبی یکنواخت پوشیده شود . سپس دیسک های ۶ میلیمتری که هر کدام آغشته به ۲۰ میکرولیتر از غلظتهای متفاوت عصاره بود، با فواصل مناسب بر روی سطح پلیت قرار داده شد. جهت جذب کامل دیسکها بر روی پلیت، تمامی پلیتها قبل از انکوباسیون به مدت ۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، قطر هاله عدم رشد به میلیمتر اندازه گیری گردید. از دیسکهای آنتی بیوتیک استاندارد به عنوان نمونه شاهد و از دیسک حاوی DMSO به عنوان نمونه اصلی استفاده شد. تمامی آزمایش ها با سه بار تکرار انجام و نتایج به صورت میانگین گزارش گردید. همچنین تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد اسانس (Minimum : MIC Inhibitory Concentration)به روش رقیق سازی لوله ای و با استفاده از استاندارد NCCLS2000b انجام شد(۲۳). بدین صورت که با حل نمودن پودر رزماری در DMSO، ده غلظت مختلف از اسانس (۲۵ تا۶۴۰۰µg/ml) تهیه شد. سپس ۲۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون میکروبی حاوی$۱۰^{۶} \frac{cfu}{ml}$ به همراه ۱۶۰ میکرو لیتر از محیط کشت مولر هینتون براث به هر یک از لوله های حاوی ۲۰ میکرو لیتر حاوی اسانس اضافه گردید. یک لوله حاوی محیط کشت و باکتری به عنوان نمونه شاهد و لوله دیگر حاوی محیط کشت و DMSO به عنوان نمونه اصلی در نظر گرفته شد. تمامی لوله های آزمایش به مدت ۲۴ ساعت در ۳۵ درجه انکوباسیون گردیدند. سپس لوله ها از نظر کدورت ناشی از رشد باکتری بررسی شده و کمترین غلظتی که در آن باکتری رشد نکرده بود به عنوان MIC در نظر گرفته شد. جهت تعیین حداقل غلظت کشندگی(minimum bactericidal concentration:MBC)، از لوله هایی که در مرحله اول در آنها عدم رشد باکتری مشاهده شده بود ، ۵ میکرو لیتر برداشته و در محیط کشت نوترینت آگار به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه کشت داده شد. کمترین غلظت از اسانس رزماری که سبب نابودی بیشترین تعداد باکتری گردید به عنوان MBC در نظر گرفته شد.

تعیین سینتیک اثر رزماری بر روی رشد باکتری:

سینتیک اثر رزماری بر روی رشد باکتری، بر اساس رسم منحنی رشد، تحت شرایط استاندارد تعیین شد. ابتدا از باکتریها در فاز رشد لگاریتمی، سوسپانسیون میکروبی $۱۰^{۶} \frac{cfu}{ml}$ با PH=۷/۳

Archive of SID

www.SID.ir

آماده گردید(۱۱). سپس ۵۰ میکرولیتراز غلظت اسانس که برابر مقدار MBC بود، به لوله آزمایش حاوی باکتری و ۵ میلی لیتر محیط کشت BHI(Brain Heart Infusion) مایع اضافه و در ۳۷ درجه مورد انکوباسیون قرار گرفت(۱۰).

یک لوله حاوی محیط کشت و باکتری به عنوان نمونه شاهد در نظر گرفته شد. در زمانهای صفر، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵،۳۰، ۴۵ و ۶۰ دقیقه ۰/۱ میلی لیتر از هر لوله برداشته، با بافر فسفات استریل شستشو و به مدت یک دقیقه با شدت(۱۰۰۰ RPM) سانتریفیوژ گردید و مجددا در بافر فسفات حل و بر روی BHI آگار کشت داده شد. سپس به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه انکوباسیون گردید. تعداد باکتریهای زنده مانده در هر زمان، بوسیله شمارش کلنی پس از ۲۴ ساعت بدست آمد و به صورت لگاریتم گزارش شد(۱۰).

یافته ها

با مطالعه صورت گرفته در این پژوهش نتایج آنالیز گاز کروماتوگرافی جرمی اسانس رزماری جمع آوری شده از گیاهان اقلیم شهر کرمان و ترکیبات شیمیایی بدست آمده در جدول ۱ مشاهده می شود. نتایج مربوط به قطر هاله عدم رشد اسانس رزماری در غلظت های مختلف و همچنین قطر هاله عدم رشد آنتی بیوتیک های استاندارد استفاده شده در این مطالعه در جدول ۲ ذکر شده است. در جدول ۳ نیز حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد اسانس رزماری جمع آوری شده از گیاهان اقلیم شهر کرمان بر روی اشرشیاکلی ذکر گریده است.

نتایج مربوط به تعیین سینتیک نابودی باکتری بوسیله اسانس و مواجه اشرشیاکلی با غلظت ۳۲۰۰ µg/ml از اسانس که به صورت میانگین از سه بار تکرار آزمایش حاصل شده، درنمودار ۱ مشاهده می شود.

جدول ۱: ترکیب شیمیایی اسانس رزماری جمع آوری شده جمع آوری شده از گیاهان اقلیم شهر کرمان

شماره	نام ترکیب	درصد	شماره	نام ترکیب	درصد
۱	α-Thujene	۰ / ۲	۱۱	P-Cymenene	۰/۱
۲	α-pinen	۱۸/۷	۱۲	Linalool	۱۲/۳۳
۳	Camphene	۵/۱۹	۱۳	Camphonelal	۰/۳
۴	Verbenone	۰/۸	۱۴	Camphor	۱۲/۹
۵	B-Pinen	۰/۳۴	۱۵	Cis-Verbenole	۰/۲
۶	Myrcene	۱/۰۷	۱۶	Iso-Pinocamphone	۰/۱
۷	3-Carene-	۰/۰۴	۱۷	Borneol	۴/۸۶
۸	limonene	۴/۶	۱۸	Myrtenole	۱/۲
۹	1,8 Cineole	۲۱/۳	۱۹	Verbenone	۲/۲۱
۱۰	-Trephine	۰/۱	۲۰	α-Humulene	۰/۱

Archive of SID

www.SID.ir

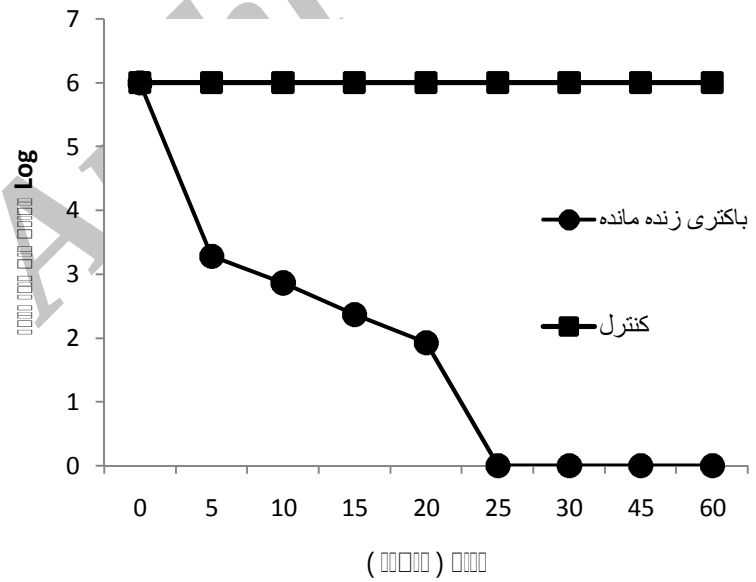
جدول ۲ : قطر هاله عدم رشد اسانس رزماری جمع آوری شده از گیاهان اقلیم شهر کرمان در غلظت های مختلف و آنتی بیوتیک های استاندارد بر حسب میلی متر

غلظت اسانس µg/Disc	۴	۸	۱۶	۳۲	۶۴	۱۲۸
قطر هاله	۸±۱/۱	۱۱/۵±۰	۱۳±۱/۱۹	۱۶±۱/۰۷	۱۷±۲/۳	۱۸±۱/۶۶
آنتی بیوتیک ۳۰µg/Disc	جنتامیاسین	کلرامفنیکول	اریترومایسین	تتراسایکلین	پنی سلین	استرپتومایسین
قطر هاله	۱۶	۲۸	۱۶/۸	۲۷/۸	۱۳/۸	۱۵/۸

جدول ۳ : نتایج مربوط به حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد(MIC) اسانس رزماری جمع آوری شده از گیاهان اقلیم شهر کرمان

مرحله اول	غلظت µg/ml	۲۵	۵۰	۱۰۰	۲۰۰	۴۰۰	۸۰۰	۱۶۰۰	۳۲۰۰	۶۴۰۰	۱۲۸۰۰
	رشد	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−
مرحله دوم	غلظت µg/ml	۱۶۰۰	۱۸۰۰	۲۰۰۰	۲۲۰۰	۲۴۰۰	۲۶۰۰	۲۸۰۰	۳۰۰۰	۳۲۰۰	
	رشد	+	+	+	+	+	+	+	−	−	

+ رشد باکتری مشاهده شده − رشد باکتری مشاهده نشده



نمودار۱ : سینتیک نابودی اشرشیاکلی بوسیله اسانس رزماری در اثر گذر زمان

Archive of SID

www.SID.ir

بحث و نتیجه گیری

ترکیبات تشکیل دهنده رزماری:

اسانسها ترکیبی از استرها، آلدئیدها، الکلها، کتونها و ترپن ها بوده که در دو گروه ترکیبات اصلی و فرعی طبقه بندی می شوند(۲۴). ترکیبات اصلی حدود ۸۵ درصد اسانس را تشکیل می دهند که کمیت و کیفیت آنها در اسانس با توجه به آب و هوا، ترکیب خاک وسن گیاه می تواند متغیر باشد(۶,۲۵). با توجه به جدول ۱، در این مطالعه از آنالیز اسانس رزماری، ۲۰ ترکیب شناسایی شد.در مطالعه Zaouali و همکارانش در کشور تونس(۱۵) نیز از آنالیز اسانس گیاه رزماری، ۲۵ ترکیب به دست آمد که به دلیل تشابه آب و هوایی و بافت خاک این کشور با کرمان می باشد. همچنین زمان و مرحله چیدن گیاه، بخش مورد استفاده گیاه، روش تقطیر و طول زمان تقطیر نیز می تواند برروی ترکیب اسانس و خاصیت ضد میکروبی آن تاثیرگذار باشد(۸). به عنوان مثال از دست دادن و تجزیه برخی ترکیبات فرار به علت زمان استخراج طولانی، تجزیه برخی ترکیبات غیر اشباع یا استرها به علت اثر گرما می تواند بر روی ترکیبات بدست آمده از روش تقطیر با آب اثر بگذارد(۱۲,۲۴). ۸۲/۰۹ درصد ترکیبات رزماری روئیده شده در منطقه کرمان شامل 1,8 Cineole، α-pinen، Camphor، Linalool، Camphene، Borneo، limonene و Verbenone می باشد که در میان این ترکیبات، بیشترین درصد مربوط به 1,8 Cineole با ۲۱/۳ درصد می باشد. در مطالعه Okoh و همکارانش درآفریقای جنوبی(۱۲)، Verbenone به عنوان ترکیب اصلی گیاه رزماری معرفی شد که می تواند به علت اثرات آب و هوایی بر روی ترکیب گیاه باشد. مقایسه ترکیبات بدست آمده در این مطالعه با نتایج Linares و همکارانش در اسپانیا(۱۹)، santoyo و همکارانش در اسپانیا (۲۶) و Angioni و همکارانش در ایتالیا (۲۷) نشان می دهد اکثر ترکیبات موثره اسانس که خاصیت ضد میکروبی دارند، در اسانس رزماری جمع آوری شده از شهر کرمان وجود دارند.

خواص ضد باکتریایی رزماری:

ترکیبات عمده ای که خواص ضد میکروبی اسانس رزماری به آنها نسبت داده می شود شامل 1,8 Cineole، α-pinen، Camphor، Verbenone می باشد(۱۴,۲۴)که میان این ترکیبات ممکن است سه حالت اتفاق بیفتد : حالت همکاری (Synergetic)، حالت مخالف(Antagonist) و حالت تشدید کننده (Additive). وقوع هر کدام از این حالات، بر روی خاصیت ضد میکروبی اسانس تاثیرگذار می باشد(۱). اگرچه شواهد زیادی وجود دارد که ترکیبات فرعی اسانس نیز از طریق ایجاد اثرات سینرژیستی بین ترکیبات اصلی و انتقال آسانتر آنها به درون سلول باکتری نقش مهمی در خواص آنتی میکروبی اسانس دارند(۱,۹,۲۸). نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان می دهد 1,8 Cineole، α-pinen نسبت به سایر ترکیبات نقش موثرتری در خاصیت ضد باکتریایی رزماری دارند در حالی که Has-Szymanczuk و همکارانش در هلند، این خاصیت را به Verbenone و 1,8 Cineole نسبت دادند(۲۹). این موضوع موید این مطلب می باشد که خواص آنتی میکروبی رزماری و ترکیب موثر اسانس در مناطق گوناگون و در مطالعات مختلف، تنوع زیادی داشته و ناشی از تفاوت ترکیب شیمیایی اسانس در هر منطقه، شرایط و محیط کشت، مشخصات گیاه، زمان برداشت، روشهای استخراج

Archive of SID

www.SID.ir

اسانس و غلظت اسانس مورد استفاده می باشد(۱۵,۲۹,۳۰). یکی از روشهای مهم جهت تعیین اثر ضد میکروبی اسانسها، استفاده از روش قطر هاله عدم رشد می باشد که در آن، اسانس به باکتری ها اجازه رشد در اطراف خود را نمی دهد. با افزایش غلظت اسانس در هر دیسک، قطر هاله عدم رشد در اطراف آن نیز بیشتر شده و خاصیت ضد میکروبی قوی تر می گردد که نشان دهنده ارتباط مستقیم غلظت اسانس، قطر هاله عدم رشد و خاصیت ضد میکروبی می باشد. همانطور که در جدول۲ مشاهده می شود، در غلظت µg/Disc ۳۲ اسانس رزماری، قطر هاله عدم رشد برابر ۱/۰۷±۱۶ میلی متر حاصل گردیده که برابر یا کمتر از قطر بدست آمده توسط آنتی بیوتیک های جنتامایسین، پنی سیلین، استرپتومایسین و اریترومایسین می باشد. این بدان معناست که اسانس رزماری اقلیم کرمان می تواند در غلظت یاد شده، قدرت یکسان و یا بیشتری نسبت به این آنتی بیوتیک ها در برابر اشرشیاکلی نشان دهد و قابل جایگزینی با آنها می باشد. طی مطالعه Gachkar و همکارانش در ایران(۱۰) نیز قطر هاله عدم رشد برابر ۱۶/۶۷ میلیمتر بدست آمد که با نتایج این مطالعه مطابقت دارد. همچنین مقایسه نتایج این مطالعه با نتایج Bosnic و همکارانش در کشور بوسنی(۳۱) که قطر۱۳ میلیمتر را بدست آوردند نشان می دهد اسانس رزماری متعلق به اقلیم کرمان، در غلظت برابر خاصیت ضد میکروبی قوی تری دارد. از دیگر روشهای مهم جهت تعیین خاصیت ضد میکروبی اسانسها، تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی و حداقل غلظت کشندگی اسانس می باشد. عملکرد اسانس بر روی باکتری ممکن است به دو طریق باشد: فقط از رشد باکتری جلوگیری نماید (Bacteriostatic) و یا تعدادی از سلولهای باکتری را از بین ببرد(Bactericide) که خاصیت متوقف کنندگی اسانس قابل برگشت بوده و سلول باکتری می تواند مجددا خود را بازسازی نماید. برخلاف خاصیت کشندگی که سلول بطور کلی نابود می شود(۳۲). در این مطالعه، حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد باکتری اشرشیاکلی برابر µg/ml ۳۰۰۰ (جدول ۳) و حداقل غلظت کشندگی باکتری اشرشیاکلی µg/ml۳۲۰۰ به دست آمد. با توجه به اینکه در میان آنتی بیوتیکها، حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد جنتامایسین برای اشرشیاکلی به طور استاندارد برابر µg/ml ۶۲۵۰ می باشد، بنابراین اسانس رزماری می تواند در غلظت بسیار کمتری، جایگزین طبیعی مناسبی برای این آنتی بیوتیک باشد. Celiktas و همکارانش در ترکیه (۶) حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد باکتری اشرشیاکلی را برابر µg/ml ۱۰۰۰۰، Pintore و همکارانش در ایتالیا(۱۱) µg/ml ۴۰۰۰و Zizovic و همکارانش(۳۳) ۳۲۰۰ تا µg/ml ۱۲۸۰۰ برای گونه های مختلف رزماری گزارش نموده اند .

سینتیک نابودی اشرشیاکلی:

در اکثر گیاهان، متابولیت های ثانویه جهت محافظتشان در برابر ویروسها، باکتریها و قارچها به وجود می آید(۳۴) که از طریق چند مکانیسم فعالیت میکروارگانیسم ها را متوقف می سازند. مهمترین مکانیسم بوسیله ترکیبات فنلی موجود در اسانس بوده که با توجه به خاصیت آب گریزی آنها را قادر می سازد از طریق اتصال به گروههای آمین و هیدروکسیل آمین پروتئینها نقش موثری درتجزیه لیپیدهای غشاء سلولی و میتوکندری و تغییر نفوذپذیری غشاء و درنتیجه مرگ سلول باکتری داشته باشند(۹,۳۱). پس از مواجهه باکتری اشرشیاکلی با حداقل

Archive of SID

www.SID.ir

غلظت اسانس رزماری جهت نابودی باکتری (MBC)، تعداد باکتریهای زنده مانده در زمانهای مختلف ثبت گردید که در نمودار ۱ مشاهده می شود. بر اساس این نمودار، اسانس رزماری می تواند پس از ۲۵ دقیقه تمامی باکتریهای اشرشیاکلی را از بین ببرد . این نتیجه با نتایج Gachkar و همکارانش در ایران مطابقت دارد(۱۰). همچنین در مطالعه ای که Pintore و همکارانش در ایتالیا با استفاده از اسانس رزماری روی استافیلوکوک آئورس انجام دادند به زمان ۳۰ دقیقه جهت نابودی ۸۰ درصد باکتری دست یافتند(۱۱).

با توجه به مطالعات متعددی که در سایر نقاط انجام شده ، مطالعه حاضر برای اولین بار ترکیب شیمیایی اسانس رزماری در کرمان را مورد بررسی قرار داده است. نتایج حاصل نشان می دهد که با توجه به قرار گرفتن کرمان در منطقه آب و هوایی خشک و نیمه معتدل، اسانس بدست آمده از گیاه رزماری در این منطقه تمامی ترکیبات موثر را با درصد بالاتی در خود داشته و نسبت به مطالعات انجام شده در سایر نقاط، خاصیت ضد باکتریایی بسیار خوبی در غلظتهای پایین از خود نشان می دهد و از آنجا که درمقادیر بسیار کمتری نسبت به برخی آنتی بیوتیک های دارویی می تواند اشرشیاکلی را از بین ببرد، بنابراین قابلیت جایگزینی با این آنتی بیوتیکها را دارا می باشد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه در قالب طرح تحقیقاتی در مرکز تحقیقات بهداشت محیط دانشگاه علوم پزشکی کرمان و با حمایت مالی معاونت تحقیقات و فن آوری این دانشگاه انجام شده است. محققین از همکاری سرکار خانم مهندس نرگس مشهدی و سرکار خانم مهندس مریم طاهری کارشناسان مهندسی بهداشت محیط قدردانی و تشکر می نمایند.

References

1- Marzouk Z, Neffati A, Marzouk B, et al. Chemical composition and antibacterial and antimutagenic activity of Tunisian Rosmarinus officinalis L. oil from Kasrine. Journal of Food, Agriculture & Environment2006;4(3&4):61-5.

2- Morgananthan G,Pabbithi S. Antimicrobial constituents from plants. international research journal of pharmacy2012;3(1):5-9.

3- Abdel-Massih R, Eabdou, Baydoun E, et al. Antibacterial Activity of the Extracts Obtained fromRosmarinus officinalis, Origanum majorana, andTrigonella foenum-graecum on Highly Drug-Resistant GramNegative Bacilli. Journal of Botany2010:1-8

4- Murphy H, Payne S ,Gagnon G. Sequential UV-and chlorine-based disinfection to mitigate Escherichia coli in drinking water biofilms. Water research2008;42(8):2083-92.

5- Tosa K ,Hirata T, Photoreactivation of enterohemorrhagic Escherichia coli following UV disinfection. Water research 1999; 33(2):361-6.

Archive of SID

www.SID.ir

6- Celiktas OY, Kocabas E E H, Bedir E, et al. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of Rosmarinus officinalis, depending on location and seasonal variations. Food Chemistry2007;100:553-9.

7- Abramovic H, Terpinc P, Generalic I, et al. Antioxidant and antimicrobial activity of extracts obtained from rosemary (Rosmarinus officinalis) and vine (Vitis vinifera) leaves. Croat Journal of Food Science Technology2012;4(1):1-8.

8- Warnke P, Becker S, Podschun R, et al.The battle against multi-resistant strains: Renaissance of antimicrobial essential oils as a promising force to fight hospital-acquired infections. Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery2009;37:392-7.

9- Tavassoli S, Mousavi S M, Emam-Djomeh Z, et al. Comparative Study of the Antimicrobial Activity of Rosmarinus officinalis L. Essential Oil and Methanolic Extract. Middle-East Journal of Scientific Research2011;9(4):467-71.

10- Gachkar L, Yadegari D, Rezaei M B, et al. Chemical and biological characteristics of Cuminum cyminum and Rosmarinus officinalis essential oils. Food Chemistry2007;102:898-904.

11- Pintore G, Usai M, Bradesi P, et al. Chemical composition and antimicrobial activity of Rosmarinus officinalis L. oils from Sardinia and Corsica. Flavour and fragrance journal 2007;17: 15-19.

12- Okoh OO, Sadimenko A P , Afolayan A J. Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of Rosmarinus officinalis L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. Food Chemistry2010;120:308-12.

13- Celiktasa OY, Nartopb P, Gurelb A, et al. Determination of phenolic content and antioxidant activity of extracts obtained from Rosmarinus officinalis' calli. Journal of Plant Physiology.2007; 164:1536-42.

14- Oluwatuyi M, Kaatz G W ,Gibbons S, Antibacterial and resistance modifying activity of Rosmarinus officinalis. Phytochemistry2004;65:3249-54.

15- Zaouali Y, Bouzaine T and Boussaid M, Essential oils composition in two Rosmarinus officinalis L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. Food and Chemical Toxicology 2010;48:3144-52.

Archive of SID

www.SID.ir

16- Zhang H, Kong B, Youling L, et al. Antimicrobial activities of spice extracts against pathogenic bacteria in modified atmosphere packaged fresh pork and vacuum packaged ham slices stored at 4C. Meat Science 2009;81:686-92.

17- Luqman S, Dwivedi G R, Darokar M R, et al. Potential of rosemary oil to be used in druge-resistant infections Alternative therapies 2007;13(5):54-9.

18- Perez M B, Caldero N L , Croci C A, Radiation-induced enhancement of antioxidant activity in extracts of rosemary (Rosmarinus officinalis L.). Food Chemistry2007;104:585-92.

19- Linares B, Arráez-Román D, Herrero M, et al., Comparison of different extraction procedures for the comprehensive characterization of bioactive phenolic compounds in Rosmarinus officinalis by reversed-phase high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray time-of-flight mass spectrometry. Journal of Chromatography2011;1218:7682- 90.

20- Mangena T , Muyima N Y O Comparative evaluation of the antimicrobial activity of essential oils of Artemisia afra , pteronia incana and Rosmarinus officinalis on selected bacteria and yeast strains. Letters in applied Microbiology1999;28:291-6.

21- Keskin D, Oskay D , Oskay M, Antimicrobial Activity of Selected Plant Spices Marketed in the West Anatolia. international journal of agriculture & biology2010;12:916-20.

22-Nccls (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Performance standards for antimicrobial disc susceptibility tests, Approved Standard.M2-A7.2000a

23-Nccls (National Committee for Clinical Laboratory Standards).Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, Approved Standard.M7-A5.2000b

24- Okoh OO, Chemical Transformations and Phytochemical Studies of Bioactive Components from Extracts of Rosmarinus Officinalis L 2010: University of Fort Hare.

25- Senatore F, Influence of harvesting time on yield and composition of the essential oil of thyme. (Thymus pulegioides L.) growing wild in Compania. Journal of Agricultural and Food chemistry1996;44(21):1327-33.

26- Santoyo S, Cavero S, Jaime S, et al., Chemical composition and antimicrobial activity of Rosmarinus officinalis essential oil obtained via supercritical fluid extraction. Journal of Food Protection2005;68(4):790-5.

Archive of SID

www.SID.ir

27- Angioni A, Barra A, Cereti A, et al. Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungalactivity investigation of the essential oil of Rosmarinus officinalis L. Journal of Agricultural and Food Chemistry2004;52(11):3530-35.

28- Burt S, Essential oils: their antibacterial properties and potential application in foods - A review. International Journal of Food Microbiology2004;94:223-53.

29- Has-Szymanczuk E, Lipinska E and Stasiuk M, The effect of Rosemary preparations on the microbial quality and tbars value of model pork batters. ACTA Scientiarum Polonorum Technol. Aliment2011;10(2):165-74.

30- Lopez P, Sanchez P, Batlle C, et al. Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. Journal of Agricultural and Food Chemistry2005;53(8):6939-46.

31- Bosnic T, Softic D , Vasic J G, Antimicrobial Activity of Some Essential Oils and Major Constituents of Essential Oils. Acta Medica Academica 2006;35:19-22.

32-. Bloomfield S, Denyer S , Hugo W .Mechanisms of action of chemical biocides. Their study and exploitation. Methods for Assessing antimicrobial activity.Technical series of the Society for Applied Bacteriology Oxford: UK Blackwell Scientific Publications;1991:40

33- Zizovic I, Misic D, Asanin R, et al., Antibactrial activity of essential oils of some Lamiaceae family species isolated by different methods. Zbornik radova Tehnoloskog fakulteta u Leskovcu 2009;19:20-26.

34- Faixova Z, Faix S, Biological effects of Rosemary (Rosmarinus Officinalis L) essential oils (A review). foliav eterinaria 2008;52(3-4):135-9.

Archive of SID

www.SID.ir

Survey of Chemical Composition and Antibacterial Activity of Rosmarinus Officinalis Essential oils on Escherichia Coli and Its Kinetic

Malakootian M (PhD)[1] Hatami B (MSc)[2]

1.Corresponding Author:Professor Environmental Health Research Center and Department of Environmental Health , Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
2.MSc in Environmental Health Engineering, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

Abstract

Background: due to the resistance of microorganisms against antibiotics, using medicinal plants to achieve the new compounds and overcome them is essential. In this study the effective compounds and antibacterial effects of rosemary essential oil on Escherichia coli, as one of the most common pathogenic bacteria was investigated and its kinetics was determined.

Methods: After collecting plant from grown plants in Kerman's climate and drying it, the extraction of essential oil was done by hydrodistillation method. GC analysis was performed for Essential oil and compounds were identified. The antimicrobial activities were tested by the disc diffusion technique and were determined by minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentrations (MBC). The kinetic of the essential oil on bacteria was determined.

Results: Twenty compounds were identified in the rosemary essential oils, 82.09% of which contained 1,8 Cineole, Borneo, α-pinen, Camphor, Linalool, Camphene, limonene and Verbenone. The diameters of the inhibition zones obtained by 32 µg/Disc concentration of essential oil, was more than diameters of the inhibition zones of antibiotics gentamicin, penicillin, streptomycin and erythromycin. The MIC and MBC in the study were obtained as 3000 $\frac{\mu g}{ml}$ and 3200 $\frac{\mu g}{ml}$ respectively. Complete death time for destruction of E. coli was also 25 minutes.

Conclusion: Rosemary essential oil collected from Kerman with some pharmaceutical antibiotics revealed to have very good antibacterial properties against Escherichia coli.

Keywords: Rosmarinus officinalis, Essential oil**,** Escherichia coli, Microorganism, Antibacterial

Archive of SID

www.SID.ir