

اثر ضد میکروبی اسانس رزماری و برهمکنش آن با آنتی بیوتیک های رایج درمانی بر تعدادی از باکتری های گرم مثبت و گرم منفی

محسن ابراهیمی همتی کیخا^۱، حسین جوینده*^۲، بهروز علیزاده بهبهانی^۳، محمد نوشاد^۲

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملائانی، ایران

۲- دانشیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملائانی، ایران

۳- استادیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملائانی، ایران

*نشانی برای مکاتبه: hosjooy@asnrkh.ac.ir

پذیرش برای چاپ: بهمن نود و هشت

دریافت مقاله: آذر نود و هشت

چکیده

سابقه و هدف: رزماری از دیرباز به عنوان یکی از عوامل ضد میکروبی در طب سنتی مورد توجه قرار گرفته است. امروزه به دلیل افزایش مقاومت سویه های میکروبی نسبت به آنتی بیوتیک ها، مشکلات متعددی در علوم پزشکی و داروسازی به وجود آمده است. این پژوهش به منظور تعیین فعالیت ضد میکروبی اسانس رزماری بر برخی از باکتری های مهم بیماری زای انسان انجام گرفت.

روش کار: پنج سویه باکتریایی بیماری زا شامل باکتری های اشرشیا کلی، سودوموناس آئروژینوزا و سالمونلا تیفی به عنوان باکتری های گرم منفی و استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا اینوکوا به عنوان باکتری های گرم مثبت انتخاب گردید. فعالیت ضد میکروبی اسانس رزماری بر این سویه ها در شرایط برون تنی با روش های انتشار در آگار به کمک دیسک، انتشار در آگار به کمک چاهک، تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد و تعیین حداقل غلظت کشندگی تعیین گردید. به علاوه، میزان برهمکنش اسانس رزماری با آنتی بیوتیک های رایج درمانی تعیین شد.

یافته ها: نتایج نشان داد قطر هاله بازداری رشد اسانس رزماری به روش انتشار در آگار به کمک دیسک برای باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلا تیفی، لیستریا اینوکوا، اشرشیا کلی و سودوموناس آئروژینوزا به ترتیب ۱۴/۶۰، ۱۰/۳۰، ۱۲/۵۰، ۱۲/۱۰ و ۱۲/۲۰ میلی متر بود. در هنگام به کارگیری تلفیق اسانس رزماری و آنتی بیوتیک کلرامفنیکل، اثر هم افزایی بر باکتری های سالمونلا تیفی، لیستریا اینوکوا و سودوموناس آئروژینوزا مشاهده شد، در حالی که برخلاف آن بر باکتری های اشرشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس اثر آنتاگونیسمی مشاهده گردید. به علاوه، در حالت ترکیب اسانس رزماری با آنتی بیوتیک جنتامایسین، اثر برهم کنش سینرژیستی بر تمامی باکتری های مورد بررسی مشاهده شد و قطر هاله عدم رشد به روش انتشار در آگار به کمک دیسک برای باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلا تیفی، لیستریا اینوکوا، اشرشیا کلی و سودوموناس آئروژینوزا به ترتیب ۲۰/۱۰، ۱۸/۶۰، ۲۰/۲۰، ۱۸ و ۱۹/۱۰ میلی متر تعیین شد. حداقل غلظت مهار کننده رشد اسانس رزماری برای تمامی باکتری های مورد مطالعه در این تحقیق ۱۲/۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر بود.

نتیجه گیری: براساس یافته های این پژوهش مشخص گردید که اسانس رزماری دارای فعالیت ضد باکتریایی قابل قبولی در برابر سویه های بیماری زای مورد بررسی می باشد. بنابراین می توان از این اسانس به عنوان نگهدارنده طبیعی در مواد غذایی جهت کنترل رشد میکروارگانیسم های بیماری زا استفاده نمود.

واژگان کلیدی: اسانس رزماری، اثر ضد میکروبی، باکتری های گرم مثبت و گرم منفی، برهمکنش

مقدمه

اشاره نمود. بیش از هزار سال است که گیاه رزماری برای اهداف آشپزی و دارویی مورد استفاده قرار می گیرد. اسانس و عصاره این گیاه به دلیل داشتن محتوای فنلی آن شناخته شده است. اسانس رزماری دارای اثر ضدسرطانی و ضد میکروبی می باشد و در جلوگیری از رشد میکروارگانیسم های مواد غذایی بسیار موثر است. اسانس رزماری حاوی بسیاری از ترکیبات فعال زیستی مهم مانند هیدروکربن های مونوترپن (کامفن، آلفا پینن، بتا پینن، لیمونن) و مونوترپن های اکسیژندار (۸، سینئول، لینالول، کامفور، بورنول) است (۸، ۷، ۱۰).

میکروارگانیسم ها به خصوص باکتری ها رایج ترین عامل ایجاد مسمومیت و عفونت های غذایی هستند. اشرشیا کلی باکتری گرم منفی و از خانواده انتروباکتریاسه است که می تواند عامل ایجاد بیماری های عفونی شود (۱۱). استافیلوکوکوس اورئوس باکتری گرم مثبت، کوکسی شکل و از مهمترین باکتری های بیماری زا و فرصت طلب می باشد. این باکتری از طریق مواد غذایی آلوده باعث بیماری در انسان می گردد (۱۲). سودوموناس آئروژینوزا از باکتری های گرم منفی می باشد که سبب ایجاد عفونت در قسمت های مختلف بدن از جمله عفونت مجاری ادراری، سیستم تنفسی و غیره می شود (۱۳). لیستریا باکتری گرم مثبت و بی هوازی اختیاری می باشد. لیستریا مونوسیتوژنز عامل ایجاد بیماری لیستریوز می باشد که از مهمترین بیماری های مشترک بین انسان و دام می باشد. با توجه به شرایط بیماری زایی بالای این سوبه میکروبی در این مطالعه از سوبه لیستریا اینوکوا استفاده گردید (۱۴). سالمونلا باکتری گرم منفی و از خانواده انتروباکتریاسه و عامل بیماری حصبه در انسان است (۱۵).

هدف از این پژوهش تعیین فعالیت ضد میکروبی اسانس رزماری با استفاده از روش های انتشار در آگار به کمک دیسک، چاهک آگار، حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (میکروداپلوشن برات)، حداقل غلظت کشندگی و همچنین برهمکنش آن با آنتی بیوتیک های رایج درمانی در شرایط برون تنی بود.

به رغم پیشرفت های متعدد در علم پزشکی، بیماری های عفونی یکی از دغدغه های اصلی این علم به شمار می رود. آمارهای سازمان بهداشت جهانی نشان می دهد که در چندین دهه گذشته بیماری های عفونی در کشورهای کمتر توسعه یافته و در حال توسعه روز به روز در حال افزایش است (۱). یکی از دلایل عمده افزایش عفونت ها و مسمومیت های غذایی ناشی از مقاومت میکروارگانیسم های بیماری زا به عوامل ضد- میکروبی است. در حال حاضر ممانعت از رشد میکروارگانیسم های بیماری زا و به تاخیر انداختن عوامل فساد میکروبی در مواد غذایی معمولاً از طریق افزودن مواد شیمیایی به دست می آید. صنعت غذا به بررسی راه کارهایی برای کاهش استفاده از مواد نگهدارنده شیمیایی سنتی می پردازد. مواد شیمیایی و سنتزی با کنترل رشد میکروارگانیسم های بیماری زا، باعث افزایش عمر ماندگاری محصولات غذایی می شوند، مصرف طولانی مدت و بی رویه از نگهدارنده شیمیایی و سنتزی باعث مقاومت میکروارگانیسم ها و خطرات بهداشتی ناشی از مصرف آن ها می گردد (۲).

گیاهان دارویی از زمان های بسیار قدیم مورد توجه جوامع بشری بوده است. استفاده از گیاهان دارویی به عنوان یکی از قدیمی ترین علوم در کشورهایی مانند چین، یونان، مصر و هند شناخته شده است. در ایران باستان، گیاهان معمولاً به عنوان دارو و مواد ضد عفونی کننده مورد استفاده قرار می گرفته اند (۳). به طور کلی استفاده از گیاهان دارویی برای معالجه و درمان بیماری ها به تاریخ زندگی انسان بر می گردد، یعنی از آنجایی که انسان در محیط اطراف خود به دنبال راهی برای بهبودی بیماری خود بوده است و استفاده از گیاهان تنها انتخاب آن ها بود است (۴). بیش از یک دهم از گونه های گیاهی (بیش از ۵۰۰۰۰ گونه)، در محصولات دارویی، صنایع غذایی و آرایشی و بهداشتی مورد استفاده قرار می گیرند. اما به طور کلی، توزیع گیاهان دارویی در سراسر جهان به صورت یکنواخت نیست (۵ و ۶). با توجه به شرایط آب و هوایی و موقعیت جغرافیایی خاص، کشور ایران دارای تنوع زیاد گونه های گیاهی با خواص دارویی و معطر می باشد. به همین جهت در چند دهه اخیر پژوهش های زیادی در جهت ارزیابی خواص ضد میکروبی گیاهان دارویی انجام گرفته است (۷).

از گیاهان دارویی ارزشمند در ایران می توان به گیاه رزماری *Rosmarinus officinalis* L که گیاهی همیشه سبز و معطر، از خانواده نعناعیان *Labiatae* و چندین ساله

روش کار

اسانس رزماری استفاده شده در این پژوهش از شرکت جوهره طعم مشهد خریداری گردید و در ظروف شیشه‌ای تیره رنگ و درب بسته بدون تماس با محیط و هوای آزاد، به آزمایشگاه میکروبیولوژی مواد غذایی، دانشکده علوم دام و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان منتقل گردید.

مواد شیمیایی مورد استفاده در این پژوهش شامل: توئین ۸۰ (مرک آلمان)، دی متیل سولفوکساید (یونی چم)، تری فیل تترازولیوم کلراید (سیگما)، دیسک‌های بلانک (پادتن طب)، دیسک‌های آنتی‌بیوتیک جنتامایسینو کلرامفنیکل (پادتن طب)، تهیه شدند. محیط‌های کشت‌های مورد استفاده از شرکت مرک آلمان خریداری گردید. محیط‌های کشت شامل: مولر هینتون آگار و مولر هینتون براث بود. در این پژوهش از ۵ سویه‌ی میکروبی استاندارد موجود در آزمایشگاه میکروبیولوژی مواد غذایی، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان استفاده گردید. سویه‌های میکروبی شامل ۳ سویه گرم منفی (اشرشیا کلی، سودوموناس آروژینوزا و سالمونلا تیفی) و ۲ سویه گرم مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا اینوکوا) بودند. برای تهیه و آماده‌سازی سوسپانسیون‌های میکروبی ابتدا برای فعال‌سازی هر کدام از سویه‌های باکتریایی از نمونه‌های لیوفیلیزه، عمل تلقیح در محیط کشت مولر هینتون براث انجام گردید. پس از گذشت یک شبانه روز از عمل تلقیح و نگهداری محیط‌های کشت میکروبی در دمای ۳۷ درجه - سانتی‌گراد از محیط‌های کشت مایع که در اثر رشد میکروبی حاوی کدورت بودند، برای خالص‌سازی روی محیط کشت مولر هینتون آگار به صورت خطی کشت داده شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت از کلنی‌های خالص و ایزوله شده، به منظور تهیه سوسپانسیون استاندارد میکروبی مطابق نیم‌مک فارلند استفاده گردید. در این روش مطابق با استاندارد نیم‌مک فارلند کدورت سوسپانسیون میکروبی توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۲۵ نانومتر اندازه‌گیری شد (جذب ۰/۸ تا ۰/۱۳) و تا برابر شدن کدورت میکروبی با کدورت استاندارد نیم‌مک فارلند

توسط محلول سرم فیزیولوژی استریل رقیق گردید. در این طول موج میزان سوسپانسیون میکروبی مطابق با استاندارد نیم‌مک فارلند برابر با $10^8 \times 1/5$ CFU/ml بود (۱۶). طی آزمون انتشار در آگار به کمک دیسک (کربی-بوئر) ابتدا درون هر یک از ظروف میکروبی (پتری دیش) با محیط مولر هینتون آگار مذاب به میزان ۲۰ میلی‌لیتر پر شدند. پس از سرد شدن و بسته شدن محیط کشت در درون پتری دیش‌ها از سوسپانسیون میکروبی استاندارد به روش سطحی به میزان ۱۰۰ میکرولیتر روی محیط کشت مولر هینتون آگار ریخته شد و به وسیله اسپیدر ال شکل استریل پخش گردید. برای بررسی اثر ضد میکروبی، دیسک‌های کاغذی بلانک به قطر ۶ میلی‌متر به وسیله پنس استریل با فاصله معین از یکدیگر و از لبه پلیت روی محیط کشت مولر هینتون آگار قرار داده شد. در نهایت ۲۰ میکرولیتر از اسانس رزماری که به وسیله فیلتر سر سرنگی با قطر منفذ ۰/۴۵ میکرون استریل گردیده بود توسط سمپلر به آرامی روی دیسک‌های بلانک ریخته شد. ظروف میکروبی حاوی دیسک‌ها برای انجام عمل پیش انتشار به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری شدند. همچنین برای مقایسه اثر ضد میکروبی اسانس رزماری از دیسک‌های آنتی‌بیوتیک جنتامایسین و کلرومفنیکل استفاده گردید. پس از انجام عمل پیش انتشار عمل انکوباسیون گذاری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد صورت پذیرفت. در نهایت پس از گذشت ۲۴ ساعت از عمل انکوباسیون گذاری، قطر هاله عدم رشد باکتری‌ها مشاهده شده در اطراف دیسک‌ها به وسیله خط‌کش اندازه‌گیری و بر حسب میلی‌متر گزارش گردید (۱۷). بعد از ریختن میزان مشخصی از محیط کشت مولر هینتون آگار (۲۰ میلی‌لیتر)، در درون پتری دیش‌ها پس از سرد و بسته شدن آن‌ها، تعداد ۳ چاهک به وسیله انتهای پی‌پت پاستور استریل به قطر ۶ میلی‌متر در سطح هر محیط کشت ایجاد شد. سپس انتهای چاهک‌ها برای جلوگیری از نفوذ و گسترش اسانس به کف پتری دیش‌ها به وسیله آگار مذاب مسدود گردید. از کشت‌های تازه (۲۴ ساعته) به منظور تهیه سوسپانسیون‌های باکتریایی با کدورتی معادل نیم‌مک فارلند در سرم فیزیولوژی استریل استفاده شد. در این روش با استفاده از سمپلر ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی معادل نیم‌مک فارلند در چندین نقطه از سطح محیط کشت مولر هینتون آگار ریخته شد، سپس توسط اسپریدر ال شکل بر سطح محیط کشت پخش گردید.

بودند، ۱۰۰ میکرولیتر بر پلیت های حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار ریخته و به کمک اسپیدر ال شکل کشت سطحی داده شد، سپس محیط های کشت در دمای ۳۷ درجه سانتی-گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوباسیون گذاری شدند. بعد از مدت زمان ذکر شده اولین غلظتی که در پلیت آن هیچ کلنی میکروبی مشاهده نشده باشد به عنوان حداقل غلظت کشندگی اسانس رزماری در نظر گرفته و ثبت گردید (۱۶).

برای تعیین اثر ترکیبی میان اسانس رزماری و دیسک های آنتی بیوتیک از روش برهمکنش اسانس با دیسک های آنتی-بیوتیک استفاده شد. ارزیابی اثرات هم افزایی و کاهش دگی اسانس بر آنتی بیوتیک معمولاً با استفاده از غلظت تحت مهاری (sub-MIC)، صورت می گیرد که این روش برابر با رقت ۱:۲ و ۱:۴ MIC است. در ابتدا اسانس رزماری به همراه محیط کشت مولر هینتون آگار با استفاده از فرمول $X = \text{Sub} - \text{MIC} \times (19 + 1)$ با یکدیگر مخلوط گردیدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتریایی دارای غلظت $10^8 \times 1/5$ (معادل نیم مک فارلند)، روی محیط کشت مولر هینتون آگار حاوی غلظت های تحت مهاری اسانس رزماری ریخته شد و به کمک اسپیدر ال شکل به صورت سطحی کشت داده شد، در نهایت دیسک های آنتی بیوتیک جنتامایسین و کلرامفنیکل با کمک پنس استریل روی سطح محیط کشت مولر هینتون آگار قرار داده شدند، سپس قطر هاله مهاری پس از انکوباسیون گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی-گراد به مدت ۲۴ ساعت ثبت شدند (۱۸ و ۱۹).

تجزیه و تحلیل داده های این پژوهش به روش تجزیه واریانس یک طرفه و با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ انجام گردید. برای مقایسه میانگین ها از روش آزمون چند دامنه ای دانکن و در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد.

یافته ها

اسانس رزماری قادر به مهار رشد میکروارگانیزم های بیماری زا بر سطح محیط کشت می باشد. در روش انتشار در آگار به کمک دیسک قطر هاله عدم رشد اسانس رزماری برای باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلا تیفی، لیستریا اینوکوا، اشرشیا کلی و سودوموناس ائروژینوزا به ترتیب ۱۴/۶۰، ۱۰/۳۰، ۱۲/۵۰، ۱۲/۱۰ و ۱۲/۲۰ میلی متر بود. مقایسه دوتایی میان داده های حاصل از اسانس رزماری با آنتی بیوتیک جنتامایسین نشان داد در سطح معنی داری ۵ درصد برای تمامی سویه های مورد بررسی اختلاف معنی دار

در مرحله بعدی، درون ۲ عدد از چاهک ها با سمپلر، ۲۰ میکرولیتر از اسانس رزماری خالص استریل شده توسط فیلتر سر سرنگی ۰/۴۵ میکرون ریخته شد. چاهک وسط نیز به-عنوان چاهک شاهد در نظر گرفته شد. محیط های کشت باکتریایی در دمای ۳۷ درجه سانتی-گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوباسیون گذاری شدند، در نهایت هاله بازدارندگی در محیط اطراف چاهک ها با در نظر گرفتن قطر چاهک توسط خط کش اندازه گیری و به صورت میلی متر ثبت شدند (۱۶).

با استفاده از روش رقت سازی در چاهک حداقل غلظت مهار کنندگی اسانس رزماری به کمک معرف تری فنیل تترازولیوم کلراید تعیین گردید. ابتدا از اسانس محلول مادر غلظتی برابر با ۴۰۰ mg/ml تهیه شد. رقت های متوالی تهیه شده شامل ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲، ۱/۵۶، ۰/۷۸ میلی-گرم بر میلی لیتر بود. به منظور تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی رشد از روش رقت سازی در مایع در میکروپلیت ۹۶ خانه ای استریل استفاده شد. ۱۰۰ میکرولیتر از رقت های تهیه شده اسانس رزماری به هر یک از چاهک ها اضافه شدند. سپس ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی (معادل نیم مک فارلند)، که حاوی هر یک از میکروارگانیزم های بیماری زا بودند به چاهک های میکروپلیت اضافه شدند. دو چاهک آخر که یکی حاوی سوسپانسیون میکروبی و محیط کشت می باشد به عنوان کنترل مثبت و چاهک دیگر حاوی محیط کشت و اسانس رزماری به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شدند. سپس انکوباسیون گذاری میکروپلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی-گراد انجام شد. پس از انکوباسیون-گذاری ۱۰ میکرولیتر معرف تری فنیل تترازولیوم کلراید ۵ درصد به عنوان شاخص رنگی رشد میکروبی به هر یک از چاهک ها اضافه شد. سپس به مدت نیم ساعت درون انکوباتور قرار داده شدند. در خانه هایی که رشد میکروبی اتفاق افتاده باشد، پس از گذشت مدت زمان ذکر شده رنگ قرمز تیره یا ارغوانی ایجاد می شود. اولین خانه ای که در آن رشد میکروبی روی نداده و رنگ قرمز تشکیل نشده باشد، به عنوان حداقل غلظت مهار کنندگی رشد گزارش و ثبت شد (۱۶).

تعیین میزان حداقل غلظت کشندگی رشد با توجه به نتایج حاصل از حداقل غلظت مهار کنندگی رشد انجام گردید. برای این منظور از چاهک هایی که فاقد رنگ قرمز تیره یا ارغوانی

اثر رزوموناس ائروژینوزا حالت هم افزایی (سینرژیستی) مشاهده شد، اما در حالت ترکیبی این اسانس و آنتی بیوتیک کلرامفنیکل برای باکتری های اشرشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس آنتاگونیسمی مشاهده شد. به علاوه، در حالت ترکیب اسانس رزماری با آنتی بیوتیک جنتامایسین، اثر برهم کنش هم افزایی برای تمامی باکتری های مورد بررسی مشخص شد. نتایج یافته های مربوط به برهم کنش اسانس رزماری با آنتی بیوتیک جنتامایسین برای باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلا تیفی، لیستریا اینوکوا، اشرشیا کلی و سودوموناس ائروژینوزا به ترتیب ۲۰/۱۰، ۱۸/۶۰، ۲۰/۲۰، ۱۸/۰۰ و ۱۹/۱۰ میلی متر بود. در شکل ۱، نمونه ای از برهم کنش اسانس رزماری با آنتی بیوتیک های جنتامایسین و کلرامفنیکل بر باکتری لیستریا اینوکوا نشان داده شده است.

مشاهده شد. مقایسه دوتایی میان میانگین حاصل از داده های ضد میکروبی اسانس رزماری با آنتی بیوتیک کلرامفنیکل نشان داد در سطح احتمال ۵ درصد میان تمامی باکتری های مورد مطالعه به جز باکتری گرم منفی سالمونلا تیفی اختلاف معنی داری مشاهده گردید (جدول ۱).

نتایج یافته های مربوط به برهم کنش اسانس رزماری با آنتی بیوتیک کلرامفنیکل برای باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلا تیفی، لیستریا اینوکوا، اشرشیا کلی و سودوموناس ائروژینوزا به ترتیب ۲۰/۱۴، ۶۰/۱۶، ۲۰/۱۴، ۱۰/۱۶ و ۱۱/۱۰ و ۱۶/۵۰ میلی متر بود. یافته ها نشان داد که در حالت ترکیب اسانس رزماری با آنتی بیوتیک کلرامفنیکل برای باکتری های سالمونلا تیفی، لیستریا اینوکوا و سودوموناس

جدول ۱- بررسی اثر اسانس رزماری و آنتی بیوتیک های جنتامایسین و کلرامفنیکل بر تعدادی از باکتری های گرم مثبت و گرم منفی بیماری زا به

روش دیسک دیفیوژن

میکروارگانیسم	اسانس رزماری	آنتی بیوتیک جنتامایسین	آنتی بیوتیک کلرامفنیکل
لیستریا اینوکوا	۱۲/۵۰±۰/۴۰ ^a	۷/۸۰±۰/۲۹ ^b	۱۰/۳۰±۰/۳۶ ^c
استافیلوکوکوس اورئوس	۱۴/۶۰±۰/۴۱ ^a	۱۷/۲۰±۰/۱۴ ^b	۲۴/۴۰±۰/۵۳ ^c
اشرشیا کلی	۱۲/۱۰±۰/۵۰ ^a	۱۷/۱۰±۰/۱۱ ^b	۲۲/۳۰±۰/۶۱ ^c
سالمونلا تیفی	۱۰/۳۰±۰/۳۶ ^a	۱۲/۵۰±۰/۳۰ ^b	۱۰/۲۰±۰/۱۹ ^a
سودوموناس ائروژینوزا	۱۲/۲۰±۰/۳۳ ^a	۱۴/۰۰±۰/۴۱ ^b	۸/۰۰±۰/۱۰ ^c

• حروف غیر مشابه در یک سطر نشان دهنده تفاوت معنی داری در سطح ۵ درصد می باشد.



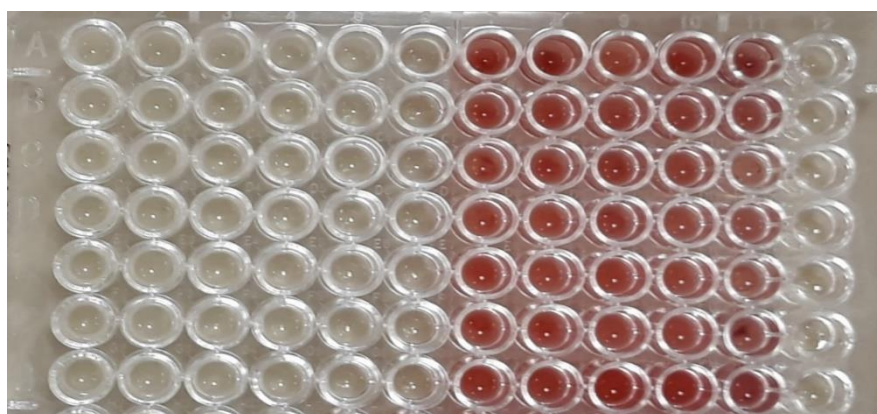
شکل ۱- شمایی از برهم کنش اسانس رزماری با آنتی بیوتیک های جنتامایسین و کلرامفنیکل بر لیستریا اینوکوا.

سودوموناس ائروژینوزا بودند، ۱۲/۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر بود. یافته های حاصل از حداقل غلظت کشندگی برای تمامی سویه های استفاده در این پژوهش نیز بزرگتر از ۴۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر مشاهده شد. به طور کلی حداقل غلظت کشندگی اسانس رزماری برای تمام باکتری های عفونتزا این پژوهش بیشتر از حداقل غلظت مهار کننده رشد بود (جدول ۲). در شکل ۲، نمایی از تعیین حداقل غلظت مهار کننده رشد اسانس رزماری بر باکتری های بیماریزا نشان داده شده است.

قطر هاله عدم رشد برای تمامی سویه های عفونتزا به جز باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا تیفی بیشتر از روش انتشار در آگار به کمک دیسک بود. در این روش میانگین قطر هاله عدم رشد برای باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلا تیفی، لیستریا اینوکوا، اشرشیا کلی و سودوموناس ائروژینوزا به ترتیب ۱۰/۵۰، ۱۲/۱۰، ۱۳/۵۰، ۱۴/۳۰ و ۱۲/۳۰ میلی متر بود. حداقل غلظت مهار کننده رشد اسانس رزماری برای تمامی باکتری های این پژوهش که شامل لیستریا اینوکوا استافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلا تیفی و

جدول ۲- بررسی فعالیت ضدباکتریایی اسانس رزماری به روش های چاهک آگار، حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی بر تعدادی از سویه های بیماریزا

میکروارگانیسم	چاهک آگار (mm)	حداقل غلظت مهارکنندگی (mg/mL)	حداقل غلظت کشندگی (mg/mL)
لیستریا اینوکوا	۱۳/۵۰±۰/۶۳	۱۲/۵	بزرگتر از ۴۰۰
استافیلوکوکوس اورئوس	۱۰/۵۰±۰/۴۸	۱۲/۵	بزرگتر از ۴۰۰
اشرشیا کلی	۱۴/۳۰±۰/۱۱	۱۲/۵	بزرگتر از ۴۰۰
سالمونلا تیفی	۱۲/۱۰±۰/۱۵	۱۲/۵	بزرگتر از ۴۰۰
سودوموناس ائروژینوزا	۱۲/۳۰±۰/۵۰	۱۲/۵	بزرگتر از ۴۰۰



بحث

همان گونه که نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد، اسانس رزماری دارای فعالیت ضدباکتریایی می باشد و میزان این فعالیت بسته به نوع و جنس میکروارگانیسمها متفاوت می باشد. درباره تاثیر اسانسها بر میکروارگانیسمهای گرم مثبت و گرم منفی گزارش های زیادی دریافت شده است. اکثر محققان دلیل حساسیت های بیشتر باکتری های گرم مثبت نسبت به باکتری های گرم منفی را اختلاف در دیواره سلولی این میکروارگانیسمها بیان نموده اند (۲۰ و ۲۱). در مطالعه ای که

توسط آنژیونی و همکاران در سال (۲۰۰۴)، انجام پذیرفت، اثرات ضد میکروبی اسانس یک گونه از رزماری (Sardinian rosemary)، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از پژوهش آنها نشان داد که این نوع از رزماری اثر ضدباکتریایی قابل توجهی بر باکتری های اشرشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس ندارد (۲۲). در پژوهش دیگر فو و همکاران (۲۰۰۷)، اثر ضد-باکتریایی اسانس رزماری را روی سویه های میکروبی مختلف مورد مطالعه قرار دادند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که میزان قطر هاله عدم رشد اسانس رزماری بر باکتری

دلال و همکاران (۱۳۹۰)، اثر ضد میکروبی اسانس رزماری روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین را مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از پژوهش آن‌ها نشان داد که اثر ضدباکتریایی اسانس رزماری روی سویه‌های غذایی و بالینی دارای خاصیت یکسانی می‌باشد و قطر هاله عدم رشد آن‌ها در حدود ۲۰ میلی‌متر می‌باشد (۳۱). قاسمی و همکاران (۱۳۹۴)، اثرات ضد میکروبی عصاره رزماری را به تنهایی و در ترکیب با نایسین بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در گوشت چرخ کرده گاو در طول مدت نگهداری در یخچال مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از تحقیق آن‌ها نشان داد که عصاره رزماری به تنهایی دارای خاصیت ضد میکروبی بالایی نسبت به زمانی است که در ترکیب با نایسین می‌باشد (۳۲). ذاکرین و همکاران (۱۳۹۴) تاثیر شرایط اکولوژیک رویشگاه بر اثرات آنتی باکتریال گیاهان دارویی را مورد بررسی قرار داد. در این تحقیق سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس آئروژینوزا و اشرشیا کلی مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج حاصل از پژوهش آن‌ها نشان داد که گیاه دارویی رزماری دارای خواص ضدباکتریایی است (۳۳). طباطبایی یزدی و همکاران (۲۰۱۴)، فعالیت ضد میکروبی عصاره رزماری را در شرایط آزمایشگاهی مورد تایید قرار دادند (۳۴).

تاکنون پژوهش‌های مشابهی در زمینه بررسی فعالیت ضد میکروبی اسانس و عصاره رزماری بر باکتری‌های بیماری‌زا در شرایط آزمایشگاهی انجام شده است اما در مورد برهمکنش اسانس رزماری با آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی مطالعه چندانی انجام نگردیده است. به نظر می‌رسد با توجه به نتایج این پژوهش می‌توان از ترکیب اسانس رزماری با آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی برای به دست آوردن فعالیت ضد میکروبی قوی‌تر بهره برد.

نتیجه‌گیری

با توجه به یافته‌های پژوهش حاضر و این که اسانس رزماری دارای خاصیت مهارکنندگی و کشندگی بر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا بود، استفاده از اسانس رزماری به‌عنوان یک ماده ضد میکروب طبیعی به جای مواد نگهدارنده شیمیایی و آنتی-بیوتیک‌های سنتزی مورد استفاده یک امر مفید و مؤثر به نظر می‌رسد.

استافیلوکوکوس اورئوس برابر با ۱۸ میلی‌متر و مقدار MIC آن ۰/۱۲۵ وزنی/وزنی بود (۲۳). سدیم و همکاران (۲۰۰۶)، گزارش دادند که رزماری دارای خاصیت ضد میکروبی بر باکتری‌های بیماری‌زا استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس است (۲۴). کلانسنیک و همکاران (۲۰۰۹)، تاثیر فعالیت ضد میکروبی عصاره رزماری را مورد بررسی قرار داد. نتایج حاصل از پژوهش آن‌ها نشان داد که خاصیت ضد-میکروبی عصاره‌ها بستگی به میزان ترکیبات فنولی آن‌ها دارد و هرچقدر میزان کارنوزول و کارنوزیک اسید در عصاره‌ها بیشتر باشد، قدرت ضد میکروبی آن‌ها نیز بیشتر خواهد بود (۲۵). اوکو و همکاران (۲۰۱۰)، اثر ضد میکروبی اسانس رزماری را روی باکتری‌های بیماری‌زا مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از پژوهش آن‌ها نشان داد که اسانس رزماری دارای اثرات ضد میکروبی قابل توجهی بر باکتری‌های مورد مطالعه داشت (۲۶). گلشنی و داوودی (۲۰۱۳)، فعالیت ضدباکتریایی عصاره گیاه رزماری را علیه برخی از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد عصاره متانولی گیاه رزماری دارای خاصیت ضد میکروبی می‌باشد و می‌تواند از رشد باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیا کلی و سودوموناس آئروژینوزا جلوگیری نماید (۲۷). مصطفی ابوزید و همکاران (۲۰۱۳)، تاثیر اسانس رزماری را علیه برخی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی را ارزیابی نمودند. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که اسانس رزماری بر باکتری های گرم مثبت مانند استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سوبتیلیس دارای خاصیت ضد میکروبی است و هیچ گونه تاثیری علیه باکتری‌های گرم منفی سودوموناس آئروژینوزا و اشرشیا کلی ندارد (۲۸). لیموز و همکاران (۲۰۱۵)، تاثیر شرایط آب و هوایی محل کشت بر نوع و میزان ترکیبات اسانس رزماری و فعالیت بیولوژیکی آن را مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از تحقیق آن‌ها نشان داد با افزایش دمای منطقه، میزان ترکیبات کامفور موجود در اسانس کاهش یافته و میزان کارنوسیک اسید آن افزایش می‌یابد و در نهایت اثر مهاری اسانس نیز روی استافیلوکوکوس اورئوس متعاقباً افزایش می‌یابد (۲۹). رئیسی و همکاران (۲۰۱۷)، اثر ضدباکتریایی اسانس رزماری را بر باکتری‌های بیماری‌زا اشرشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از پژوهش آن‌ها نشان داد که این اسانس باعث کاهش رشد باکتری‌های مذکور می‌شود (۳۰). سلطان

تشکر و قدردانی

مادی و معنوی معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم
کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان صمیمانه تشکر و قدردانی
نمایند.

مقاله حاصل مستخرج از پایان نامه کارشناسی ارشد مصوب در
دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان می باشد،
نویسندگان مقاله بر خود لازم می دانند که از حمایت های

REFERENCES

- 1- Marzouk, Z., Neffati, A., Marzouk, B., Chraief, I., Fathia, KH., Ghedira, L. CH. and Boukef, K. 2006. Chemical composition and antibacterial and antimutagenic activity of Tunisian *Rosmarinus officinalis* L. oil from Kasrine. *Journal of Food, Agriculture and Environment*. 4(3and4):61-5.
- 2-Pisoschi, A.M., Pop, A., Georgescu, C., Turcus, V., Olah, N.K., and Mathe, E., 2018. An overview of natural antimicrobials role in food. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 143: 922–935.
- 3-Hamilton, A.C. 2004. Medicinal plants, conservation and livelihoods. *Biodivers Conserv*. 13(8):1477-517.
- 4-Halberstein, R. A. 2005. Medicinal plants: historical and cross-cultural usage patterns. *Annals of Epidemiology*. 15(9):686-99.
- 5-Huang, H. 2011. Plant diversity and conservation in China: planning a strategic bioresource for a sustainable future. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 166(3):282-300.
- 6-Rafieian-Kopaei, M. 2012. Medicinal plants and the human needs. *Journal of Herbmед Pharmacology*. 1(1):1-2.
- 7-Ayatollahi-Moosavi, S. A., Abdollahi, H., and Kazemipour, N. 1996. Study of anti-dermatophyte effect of ten her balmethanolic extract. *Journal of Kerman University of Medical Sciences*. 3(3):115-122.
- 8-Brewer, M. S. 2011. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 10(4): 718 221–247.
- 9- Ribeiro-Santos, R., Carvalho-Costa, D., Cavaleiro, C., Costa, H. S., Albuquerque, T. G., Castilho, M. C., Ramos, F., Melo, N. R., and Sanches-Silva, A. 2015. A novel insight on an ancient aromatic plant: The rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Trends in Food Science and Technology*. 45(2): 355–368.
- 10-Giorgio, S., Pintore, M.U., Pascale, B., Bradesi, K., Claudia, Y., Juliano, N. 1997. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. *Flavor and Fragrance Journal*. 17: 15 -19.
- 11-Kiaei, E., Mazandarani, M., Ghaemi, E. 2010. Antibacterial Activity of 7 Species of Medicinal Plants on Bacteria Isolated from UTI Patients in Golestan Province. *Journal of medicinal Plants* .2 (34) :74-83. [Full Text in Persian].
- 12-Paton, J. C., Paton, A. W. 1998. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clinical Microbiology Reviews*. 11 (3): 450–79.
- 13-Nwanze, P. I., Nwaru, L.M., Oranusi, S., Dimkpa, U., Okwu, M. U. and Babatunde, B. B. 2007. Urinary tract infection in Okada village: Prevalence and antimicrobial susceptibility pattern. *Scientific Research and Essays*. 2(4): 112 - 6.

- 14-Balcht, A., Smith, R. 1994. *Pseudomonas aeruginosa: Infections and Treatment*. Informa Health Care. 83-84.
- 15- Devi, K. P., Nisha, S., Sakthivel, R., and Pandian, S. K. 2010. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *Journal of Ethnopharmacology*. 130:107-15.
- 16-Alizadeh Behbahani, B., Tabatabaei Yazdi, F., Shahidi, F., Mortazavi, S. A., 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):42-51. (Full Text in Persian).
- 17-Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C. and Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*. 6: 493-495
- 18-Daneshmandi, S., Soleimani, N., Pourfathollah, A. A., & Sattari, M. 2010. Evaluation of the drug synergistic and antibacterial effects of *cuminumcyminum* essential oil. *Journal of Arak University of Medical Sciences*. 13(2): 75-82. (Full Text in Persian).
- 19-Barzegar, H., Alizadeh Behbahani, B., Mehrnia, M. A. 2019. Identification of the chemical compounds and antibacterial activity of *Ocimum basilicum* essential oil and the effects of its interaction with tetracycline and chloramphenicol antibiotics on some pathogenic microorganisms causing infection and food poisoning. *Journal of Food Science and Technology*. 90 (16): 113-124. (Full Text in Persian).
- 20-Yeganegi, M. 2016. Comparison methods for the extraction of *Equisetum telmateia* Ehrh. Extract using supercritical fluid extraction and Maceration, evaluation of its Antimicrobial activity against food infective and intoxication microorganisms. MSc Thesis. Ferdowsi University of Mashhad. (Full Text in Persian).
- 21-Kamkar, A., Jebeli Javan, A., and Jamshidi R. 2009. Antioxidant capacity of essential oil and extract of Iranian *Mentha spicata*. 1 (1):69-77.
- 22-Angioni, A., Barra, B., Cereti, E. and Arlorio, M. 2004. Chemical composition plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of rosemary. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52 (11): 35-41.
- 23-Seydim, A.C., Sarikus, G. 2006. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. *Food Research International*. 39(5):639-44.
- 24-Fu, Y., Zu, Y., Chen, L. Y., Shi, X.G., Wang, Z., Sun, S., Efferth, T. 2007. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. *Phytotherapy Research*. 21: 989-994.
- 25-Klancnik, A., Guzej, B., Kolar, M. H., Abramovic, H. and Mozina, S.S. 2009. In vitro antimicrobial and antioxidant activity of commercial rosemary extract formulations. *Journal of Food Protection*. 72(8): 1744- 1752.
- 26-Okoh, O. O., Sadimenko, A. P., and Afolayan, A. J. 2010. Comparative evaluation of the antimicrobial activities of the essential oils of rosemary. *Journal Food Chemistry*. 120: 308-312.
- 27-Golshani, Z., and Dawoodi, V. 2013. In vitro study of antimicrobial effects of rosemary leaf extract against some pathogens. *Journal of Arak University of Medical Sciences*. 16 (77): 82- 89.
- 28-Abozid, M. M., Asker, M. M. S. 2013. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil of the thyme and rosemary. *International Journal of Academic Research*. 5(3): 186-195.
- 29-Lemos, M.F., Pacheco, H. P., Endringer, D.C., Scherer, R. A. 2015. Seasonality modifies rosemary's composition and biological activity. *Industrial Crops and Products*. 70: 41-47.
- 30-Raeisi, M., Ebrahimi, M., Hashemi, M., Aminzare, M., Khoshbakht, R. Sadeghi, A. R. and Raeisi, V. 2017. Comparison of Chemical Components and Antibacterial Activity of Rosemary Essential Oil grown in Various Regions of Iran against Foodborne Pathogenic Bacteria. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 9(10):1725-1730.

- 31-Soltan Dallal, M. M., Ghorbanzade Mashkani, M., Yazdi, M. H., Agha Amiri, S., Mobasseri, G., Paymeneh Abedi Mohtasab, T., Amin Harati, F. 2011. Antibacterial effects of *Rosmarinus officinalis* on Methicillin -resistant *Staphylococcus aureus* isolated from patients and foods. *Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences*. 16(1): 73-80. (Full Text in Persian).
- 32-Ghasemi, Zh., Mahasti, P., Nouri Saeedlou, S. 2016. Study on antibacterial effect of rosemary extract in combination with nisin against *staphylococcus aureus* in minced meat during refrigerated temperature. *Journal of Fluid Mechanics*. 6(2): 37-49. (Full Text in Persian).
- 33-Zakerin, A. R., Ahmadi, E., Fasihi-Ramandi, M., Abdollahi, S., Molazadeh A. R., Molazadeh, A. R., Jafari, S., Allahverdi, Gh., Kouhpayeh S. A., Meshkibaf, M. H. 2015. The Effects of Ecologic Condition on Antimicrobial Activity of Endemic Herbal Extracts in Fars Province. *Journal of Fasa University of Medical Sciences*. 5(1):111-119. (Full Text in Persian).
- 34-Tabatabaei yazdi F, Alizadeh behbahani B, Mortazavi, S. Investigating the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of the *Lavandula stoechas* L. and *Rosmarinus officinalis* L. extracts on pathogen bacterias “in vitro. *Journal of Paramedical Sciences*. 2014; 5 (2): 91-101.