اثر ضدمیکروبی اسانس رزماری و برهمکنش آن با آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی بر تعدادی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی

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

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران
۲- دانشیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران
۳- استادیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

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

دریافت مقاله: آذر نود و هشت پذیرش برای چاپ: بهمن نود و هشت

چکیده

سابقه و هدف: *رزماری از دیرباز به‌عنوان یکی از عوامل ضدمیکروبی در طب سنتی مورد توجه قرار گرفته است. امروزه به‌دلیل افزایش مقاومت سویه‌های میکروبی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها، مشکلات متعددی در علوم پزشکی و داروسازی به وجود آمده است. این پژوهش به منظور تعیین فعالیت ضدمیکروبی اسانس رزماری بر برخی از باکتری‌های مهم بیماری‌زای انسان انجام گرفت.*

روش کار: پنج سویه باکتریایی بیماری‌زا شامل باکتری‌های *اشرشیا کلی*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *سالمونلا تیفی* به‌عنوان باکتری‌های گرم منفی و *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا اینوکوا* به‌عنوان باکتری‌های گرم مثبت انتخاب گردید. فعالیت ضدمیکروبی اسانس رزماری بر این سویه‌ها در شرایط برون‌تنی با روش‌های انتشار در آگار به کمک دیسک، انتشار در آگار به کمک چاهک، تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد و تعیین حداقل غلظت کشندگی تعیین گردید. به‌علاوه، میزان برهمکنش اسانس رزماری با آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی تعیین شد.

یافته ها نتایج نشان داد قطر هاله بازداری رشد اسانس رزماری به روش انتشار در آگار به کمک دیسک برای باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سالمونلا تیفی*، *لیستریا اینوکوا*، *اشرشیا کلی* و *سودوموناس ائروژینوزا* به ترتیب ۱۴/۶۰، ۱۰/۳۰، ۱۲/۵۰، ۱۲/۱۰ و ۱۲/۲۰ میلی‌متر بود. در هنگام به‌کارگیری تلفیق اسانس رزماری و آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل، اثر هم‌افزایی بر باکتری‌های *سالمونلا تیفی*، *لیستریا اینوکوا* و *سودوموناس ائروژینوزا* مشاهده شد، درحالی‌که برخلاف آن بر باکتری‌های *اشرشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* اثر آنتاگونیسمی مشاهده گردید. به‌علاوه، در حالت ترکیب اسانس رزماری با آنتی‌بیوتیک جنتامایسین، اثر برهم‌کنش سینرژیستی بر تمامی باکتری‌های مورد بررسی مشاهده شد و قطر هاله عدم رشد به روش انتشار در آگار به کمک دیسک برای باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سالمونلا تیفی*، *لیستریا اینوکوا*، *اشرشیا کلی* و *سودوموناس ائروژینوزا* به ترتیب ۲۰/۱۰، ۱۸/۶۰، ۲۰/۲۰، ۱۸ و ۱۹/۱۰ میلی‌متر تعیین شد. حداقل غلظت مهار کننده رشد اسانس رزماری برای تمامی باکتری‌های مورد مطالعه در این تحقیق ۱۲/۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. .

نتیجه گیری: *براساس یافته‌های این پژوهش مشخص گردید که اسانس رزماری دارای فعالیت ضدباکتریایی قابل قبولی در برابر سویه-های بیماری‌زای مورد بررسی می‌باشد. بنابراین می‌توان از این اسانس به‌عنوان نگهدارنده طبیعی در مواد غذایی جهت کنترل رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا استفاده نمود.*

واژگان کلیدی: **اسانس رزماری، اثر ضدمیکروبی، باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی، برهمکنش**

مقدمه

به رغم پیشرفت‌های متعدد در علم پزشکی، بیماری‌های عفونی یکی از دغدغه‌های اصلی این علم به شمار می‌رود. آمارهای سازمان بهداشت جهانی نشان می‌دهد که در چندین دهه گذشته بیماری‌های عفونی در کشورهای کمتر توسعه یافته و در حال توسعه روز به روز در حال افزایش است(۱). یکی از دلایل عمده افزایش عفونت‌ها و مسمومیت‌های غذایی ناشی از مقاومت میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا به عوامل ضد-میکروبی است. در حال حاضر ممانعت از رشد میکروارگانیسم-های بیماری‌زا و به تاخیر انداختن عوامل فساد میکروبی در مواد غذایی معمولاً از طریق افزودن مواد شیمیایی به‌دست می‌آید. صنعت غذا به بررسی راه کارهایی برای کاهش استفاده از مواد نگهدارنده شیمیایی سنتی می‌پردازد. مواد شیمیایی و سنتزی با کنترل رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا، باعث افزایش عمر ماندگاری محصولات غذایی می‌شوند، مصرف طولانی مدت و بی‌رویه از نگهدارنده شیمیایی و سنتزی باعث مقاومت میکروارگانیسم‌ها و خطرات بهداشتی ناشی از مصرف آن‌ها می‌گردد(۲).

گیاهان دارویی از زمان‌های بسیار قدیم مورد توجه جوامع بشری بوده است. استفاده از گیاهان دارویی به‌عنوان یکی از قدیمی‌ترین علوم درکشورهایی مانند چین، یونان، مصر و هند شناخته شده است. در ایران باستان، گیاهان معمولاً به‌عنوان دارو و مواد ضدعفونی کننده مورد استفاده قرار می‌گرفته-اند(۳). به طور کلی استفاده از گیاهان دارویی برای معالجه و درمان بیماری‌ها به تاریخ زندگی انسان بر می‌گردد، یعنی از آنجایی که انسان در محیط اطراف خود به دنبال راهی برای بهبودی بیماری خود بوده است و استفاده از گیاهان تنها انتخاب آن‌ها بود است(۴). بیش از یک دهم از گونه‌های گیاهی (بیش از ۵۰۰۰۰ گونه)، در محصولات دارویی، صنایع غذایی و آرایشی و بهداشتی مورد استفاده قرار می‌گیرند. اما به طور کلی، توزیع گیاهان دارویی در سراسر جهان به صورت یکنواخت نیست(۵و۶). با توجه به شرایط آب و هوایی و موقعیت جغرافیایی خاص، کشور ایران دارای تنوع زیاد گونه-های گیاهی با خواص دارویی و معطر می‌باشد. به همین جهت در چند دهه اخیر پژوهش‌های زیادی در جهت ارزیابی خواص ضدمیکروبی گیاهان دارویی انجام گرفته است(۷).

از گیاهان دارویی ارزشمند در ایران می‌توان به گیاه رزماری Rosmarinus officinalis L که گیاهی همیشه سبز و معطر، از خانواده نعناعیان Labiatae و چندین ساله اشاره نمود. بیش از هزار سال است که گیاه رزماری برای اهداف آشپزی و دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرد. اسانس و عصاره این گیاه به دلیل داشتن محتوای فنلی آن شناخته شده است. اسانس رزماری دارای اثر ضدسرطانی و ضدمیکروبی می‌باشد و در جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌های مواد غذایی بسیار موثر است. اسانس رزماری حاوی بسیاری از ترکیبات فعال زیستی مهم مانند هیدروکربن‌های مونوترپن (کامفن، آلفا پینن، بتا پینن، لیمونن) و مونوترپن‌های اکسیژندار (۱،۸سینئول ، لینالول، کامفور، بورنول) است(۷،۸، ۱۰).

میکروارگانیسم‌ها به خصوص باکتری‌ها رایج‌ترین عامل ایجاد مسمومیت و عفونت‌های غذایی هستند. اشرشیا کلی باکتری گرم منفی و از خانواده انتروباکتریاسه است که می‌تواند عامل ایجاد بیماری‌های عفونی شود(۱۱). استافیلوکوکوس اورئوس باکتری گرم مثبت، کوکسی شکل و از مهمترین باکتری‌های بیماری‌زا و فرصت طلب می‌باشد. این باکتری از طریق مواد غذایی آلوده باعث بیماری در انسان می‌گردد(۱۲). سودوموناس آئروژینوزا از باکتری‌های گرم منفی می‌باشد که سبب ایجاد عفونت در قسمت‌های مختلف بدن از جمله عفونت مجاری ادراری، سیستم تنفسی و غیره می‌شود(۱۳). لیستریا باکتری گرم مثبت و بی هوازی اختیاری می‌باشد. لیستریا مونوسیتوژنز عامل ایجاد بیماری لیستزیوز می‌باشد که از مهمترین بیماری‌های مشترک بین انسان و دام می‌باشد. با توجه به شرایط بیماری‌زایی بالای این سویه میکروبی در این مطالعه از سویه 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 ضدمیکروبی اسانس رزماری با استفاده از روش‌های انتشار در آگار به کمک دیسک، چاهک آگار، حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (میکرودایلوشن براث)، حداقل غلظت کشندگی و همچنین برهمکنش آن با آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی در شرایط برون‌تنی بود.

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 فنیل 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 آئروژینوزا و سالمونلا تیفی) و ۲ سویهگرم 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 $1/5\times10^8$ 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 مولرهینتون آگار ریخته شد و به وسیله اسپیدر ال شکل استریل پخش گردید. برای بررسی اثر ضدمیکروبی، 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 ضدمیکروبی اسانس رزماری از دیسک‌های آنتی‌بیوتیک جنتامایسین و کلرومفنیکل استفاده گردید. پس از انجام عمل پیش انتشار عمل انکوباسیون‌گذاری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد صورت پذیرفت. در نهایت پس از گذشت ۲۴ ساعت از عمل انکوباسیون‌گذاری، 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 نیم مک فارلند در چندین نقطه از سطح محیط کشت مولر هینتون آگار ریخته شد، سپس توسط اسپریدر ال شکل بر سطح محیط کشت پخش گردید.

در مرحله بعدی، درون ۲ عدد از چاهک‌ها با سمپلر، ۲۰ میکرولیتر از اسانس رزماری خالص استریل شده توسط فیلتر سر سرنگی ۰/۴۵ میکرون ریخته شد. چاهک وسط نیز به‌عنوان چاهک شاهد در نظر گرفته شد. محیط‌های کشت باکتریایی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوباسیون‌گذاری شدند، در نهایت هاله بازدارندگی در محیط اطراف چاهک‌ها با در نظر گرفتن قطر چاهک توسط خط‌کش اندازه‌گیری و به صورت میلی‌متر ثبت شدند(۱۶).

با استفاده از روش رقت‌سازی در چاهک حداقل غلظت مهار کنندگی اسانس رزماری به کمک معرف تری فنیل تترازویلیوم کلراید تعیین گردید. ابتدا از اسانس محلول مادر غلظتی برابر با mg/ml ۴۰۰ تهیه شد. رقت‌های 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 مهارکنندگی رشد از روش رقت‌سازی در مایع در میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای استریل استفاده شد. ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های تهیه شده اسانس رزماری به هر یک از چاهک‌ها اضافه شدند. سپس ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی (معادل نیم‌مک فارلند)، که حاوی هر یک از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا بودند به چاهک‌های میکروپلیت اضافه شدند. دو چاهک آخر که یکی حاوی سوسپانسیون میکروبی و محیط کشت می‌باشد به‌عنوان کنترل مثبت و چاهک دیگر حاوی محیط کشت و اسانس رزماری به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شدند. سپس انکوباسیون‌گذاری میکروپلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. پس از انکوباسیون-گذاری ۱۰ میکرولیتر معرف تری فنیل تترازولیوم کلراید ۵ درصد به‌عنوان شاخص رنگی رشد میکروبی به هر یک از چاهک‌ها اضافه شد. سپس به مدت نیم ساعت درون انکوباتور قرار داده شدند. در خانه‌هایی که رشد میکروبی اتفاق افتاده باشد، پس از گذشت مدت زمان ذکر شده رنگ قرمز تیره یا ارغوانی ایجاد می‌شود. اولین خانه‌ای که در آن رشد میکروبی روی نداده و رنگ قرمز تشکیل نشده باشد، به‌عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی رشد گزارش و ثبت شد(۱۶).

تعیین میزان حداقل غلظت کشندگی رشد با توجه به نتایج حاصل از حداقل غلظت مهارکنندگی رشد انجام گردید. برای این منظور از چاهک‌هایی که فاقد رنگ قرمز تیره یا ارغوانی بودند، ۱۰۰ میکرولیتر بر پلیت‌های حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار ریخته و به کمک اسپیدر ال شکل کشت سطحی داده شد، سپس محیط‌های کشت در دمای ۳۷ درجه سانتی-گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوباسیون‌گذاری شدند. بعد از مدت زمان ذکر شده اولین غلظتی که در پلیت آن هیچ کلنی میکروبی مشاهده نشده باشد به‌عنوان حداقل غلظت کشندگی اسانس رزماری در نظر گرفته و ثبت گردید(۱۶).

برای تعیین اثر ترکیبی میان اسانس رزماری و دیسک‌های آنتی‌بیوتیک از روش برهمکنش اسانس با دیسک‌های آنتی-بیوتیک استفاده شد. ارزیابی اثرات هم‌افزایی و کاهندگی اسانس بر آنتی‌بیوتیک معمولاً با استفاده از غلظت تحت مهاری (sub-MIC)، صورت می‌گیرد که این روش برابر با رقت ۱:۲و۱:۴ MIC است. در ابتدا اسانس رزماری به همراه محیط کشت مولر هینتون آگار با استفاده از فرمول X=Sub-MIC×(19+1) با یکدیگر مخلوط گردیدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسون باکتریایی دارای غلظت CFU/ml $۱/۵\times۱۰^{۸}$ (معادل نیم مک‌فارلند)، روی محیط کشت مولر هینتون آگار حاوی غلظت‌های تحت مهاری اسانس رزماری ریخته شد و به کمک اسپیدر ال شکل به‌صورت سطحی کشت داده شد، در نهایت دیسک‌های آنتی‌بیوتیک جنتامایسین و کلرامفنیکل با کمک پنس استریل روی سطح محیط کشت مولر هینتون آگار قرار داده شدند، سپس قطر هاله مهاری پس از انکوباسیون‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت ثبت شدند(۱۸ و ۱۹).

تجزیه و تحلیل داده‌های این پژوهش به روش تجزیه واریانس یک طرفه و با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ انجام گردید. برای مقایسه میانگین‌ها از روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن و در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد.

یافته‌ها

اسانس رزماری قادر به مهار رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا بر سطح محیط کشت می‌باشد. در روش انتشار در آگار به کمک دیسک قطر هاله عدم رشد اسانس رزماری برای باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلا تیفی، لیستریا اینوکوا، اشرشیا کلی و سودوموناس ائروژینوزا به ترتیب ۱۴/۶۰، ۱۰/۳۰، ۱۲/۵۰، ۱۲/۱۰ و ۱۲/۲۰ میلی‌متر بود. مقایسه دوتایی میان داده‌های حاصل از اسانس رزماری با آنتی‌بیوتیک جنتامایسین نشان داد در سطح معنی‌داری ۵ درصد برای تمامی سویه‌های مورد بررسی اختلاف معنی‌دار

مشاهده شد. مقایسه دوتایی میان میانگین حاصل از داده‌های ضدمیکروبی اسانس رزماری با آنتی‌بیوتیک 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 یافته‌های مربوط به برهمکنش اسانس رزماری با آنتی-بیوتیک کلرامفنیکل برای باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلا تیفی، لیستریا اینوکوا، اشرشیا کلی و سودوموناس ائروژینوزا به ترتیب ۱۴/۲۰، ۱۶/۶۰، ۱۶/۲۰، ۱۱/۱۰ و ۱۶/۵۰ میلی‌متر بود. یافته‌ها نشان داد که در حالت ترکیب اسانس رزماری با آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل برای باکتری‌های سالمونلا تیفی، لیستریا اینوکوا و سودوموناس ائروژینوزا حالت هم‌افزایی (سینرژیستی) مشاهده شد، اما در حالت ترکیبی این اسانس و آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل برای باکتری‌های اشرشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس آنتاگونیسمی مشاهده شد. به‌علاوه، در حالت ترکیب اسانس رزماری با آنتی‌بیوتیک جنتامایسین، اثر برهم‌کنش هم‌افزایی برای تمامی باکتری‌های مورد بررسی مشخص شد. نتایج یافته‌های مربوط به برهمکنش اسانس رزماری با آنتی‌بیوتیک جنتامایسین برای باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلا تیفی، لیستریا اینوکوا، اشرشیا کلی و سودوموناس ائروژینوزا به ترتیب ۲۰/۱۰، ۱۸/۶۰، ۲۰/۲۰، ۱۸/۰۰ و ۱۹/۱۰ میلی‌متر بود. در شکل ۱، نمونه‌ای از برهمکنش اسانس رزماری با آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین و کلرامفنیکل بر باکتری لیستریا اینوکوا نشان داده شده است.

جدول ۱- بررسی اثر اسانس رزماری وآنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین و کلرامفنیکل بر تعدادی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی بیماری‌زا به روش دیسک دیفیوژن

میکروارگانیسم	اسانس رزماری	آنتی‌بیوتیک جنتامایسین	آنتی‌بیوتیک 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}

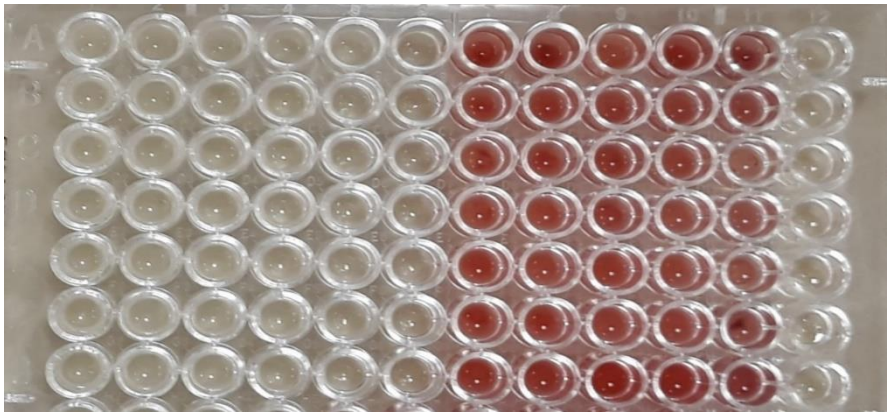
- حروف غیرمشابه در یک سطر نشان دهنده تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد می‌باشد.

شکل ۱- شمایی از برهمکنش اسانس رزماری با آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین و کلرامفنیکل بر لیستریا اینوکوا.

قطر هاله عدم رشد برای تمامی سویه‌های عفونت‌زا به جز باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا تیفی بیشتر از روش انتشار در آگار به کمک دیسک بود. در این روش میانگین قطر هاله عدم رشد برای باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلا تیفی، لیستریا اینوکوا، اشرشیا کلی و سودوموناس ائروژینوزا به ترتیب ۱۰/۵۰، ۱۲/۱۰، ۱۳/۵۰، ۱۴/۳۰ و ۱۲/۳۰ میلی‌متر بود. حداقل غلظت مهار کننده رشد اسانس رزماری برای تمامی باکتری‌های این پژوهش که شامل لیستریا اینوکوا استافیلوکوکوس اورئوس، ، سالمونلا تیفی و سودوموناس ائروژینوزا بودند، ۱۲/۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. یافته‌های حاصل از حداقل غلظت کشندگی برای تمامی سویه‌های استفاده در این پژوهش نیز بزرگتر از ۴۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد. به طور کلی حداقل غلظت کشندگی اسانس رزماری برای تمام باکتری‌های 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 باکتری‌های بیماری‌زا نشان داده شده است.

جدول ۲- بررسی فعالیت ضدباکتریایی اسانس رزماری به روش‌های چاهک آگار، حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی بر تعدادی از سویه‌های 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 می‌باشد و میزان این فعالیت بسته به نوع و جنس میکروارگانیسم‌ها متفاوت می-باشد. درباره تاثیر اسانس‌ها بر میکروارگانیسم‌های گرم مثبت و گرم منفی گزارش‌های زیادی دریافت شده است. اکثر محققان دلیل حساسیت‌های بیشتر باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی را اختلاف در دیواره سلولی این میکروارگانیسم‌ها بیان نموده‌اند(۲۰و۲۱). در مطالعه‌ای که توسط آنژیونی و همکاران در سال (۲۰۰۴)، انجام پذیرفت، اثرات ضدمیکروبی اسانس یک گونه از رزماری (Sardinian rosmary)، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از پژوهش آن‌ها نشان داد که این نوع از رزماری اثر ضدباکتریایی قابل توجهی بر باکتری‌های اشرشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس ندارد(۲۲). در پژوهش دیگر فو و همکاران (۲۰۰۷)، اثر ضد-باکتریایی اسانس رزماری را روی سویه‌های میکروبی مختلف مورد مطالعه قرار دادند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که میزان قطر هاله عدم رشد اسانس رزماری بر باکتری

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 ضدمیکروبی بر باکتری‌های بیماری‌زا استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس است(۲۴). کلانسنیک و همکاران (۲۰۰۹)، تاثیر فعالیت ضدمیکروبی 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 ضدمیکروبی آن‌ها نیز بیشتر خواهد بود(۲۵). اوکو و همکاران (۲۰۱۰)، اثر ضدمیکروبی اسانس رزماری را روی باکتری‌های بیماری‌زا مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از پژوهش آن‌ها نشان داد که اسانس رزماری دارای اثرات ضدمیکروبی قابل توجه‌ای 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 ضدمیکروبی می‌باشد و می‌تواند از رشد باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیا کلی و سودوموناس آئروژینوزا جلوگیری نمایید(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)، تأثیر 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 دلال و همکاران (۱۳۹۰)، اثر ضدمیکروبی 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 ضدمیکروبی 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 ضدمیکروبی 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 داری خواص ضدباکتریایی است(۳۳). طباطبایی یزدی و همکاران (۲۰۱۴)، فعالیت ضدمیکروبی عصاره رزماری را در شرایط آزمایشگاهی مورد تایید قرار دادند(۳۴).

تاکنون پژوهش‌های مشابه‌ای در زمینه بررسی فعالیت ضدمیکروبی 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 انجان 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 ضدمیکروبی 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 ضدمیکروب طبیعی به جای مواد نگهدارنده شیمیایی و آنتی-بیوتیک‌های سنتزی مورد استفاده یک امر مفید و مؤثر به نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

مقاله حاصل مستخرج از پایان نامه کارشناسی ارشد مصوب در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان می‌باشد، نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند که از حمایت‌های مادی و معنوی معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

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 Herbmed 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 andantibacterial activity of Ocimumbasilicumessential oil and the effects of its interactionwith 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 an intoxication microorganisms. MSc Thesis. Ferdowsi University of Mashhad. (Full Text in Persian).
21-Kamkar, A,. JebeliJavan, A,. and Jamshidi R. 2009. Antioxidant capacity of essential oil and extract of Iranian Mentha spicat. 1 (1):69-77.
22-Angioni, A., Barra, B., Cereti, E. and Arlorio, M. 2004. Chemical composition plant gentic 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 rosemaryInternational. 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.