استخراج، شناسایی ترکیبات شیمیایی و ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی اسانس نازبو بنفش بر باکتری‌های بیماری‌زا با منشاء غذایی و مقایسه آن با آنتی‌بیوتیک‌های ونکومایسین و جنتامایسین

افسانه سمیعی[۱]، فریده طباطبایی یزدی[۲*]، بهروز علیزاده بهبهانی[۳]، مصطفی مظاهری طهرانی[۲]

۱-دانش آموخته دکتری، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۲- استاد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

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

(تاریخ دریافت: ۹۸/۰۵/۱۹ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۷/۲۰)

چکیده

هدف از این پژوهش، استخراج اسانس از برگ نازبو بنفش، شناسایی ترکیبات و اجزا تشکیل دهنده اسانس و بررسی فعالیت ضدباکتریایی آن به روش‌های مختلف کیفی و کمی بر تعدادی از باکتری های شاخص بیماری زا غذا و در نهایت مقایسه آن با آنتی‌بیوتیک های ونکومایسین و جنتامایسین در شرایط آزمایشگاهی بود. اجزای تشکیل دهنده اسانس توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی شناسایی شدند. اثر ضد میکروبی اسانس نازبو بنفش به روش چاهک در آگار تعیین شد و حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس نیز با استفاده از میکرودایلوشن براث و معرف تری فنیل تترازولیوم کلراید تعیین گردید. نتایج نشان داد که ۲۸ ترکیب شناسایی شده در مجموع ۹۹/۲۸ درصد ترکیبات اسانس را تشکیل می دهند. p-Allylanisole با ۵۱/٦٤ بیشترین ترکیب شناسایی شده اسانس بود، و به تنهایی بیش از ۵۰ درصد از ترکیب اسانس را شامل می‌شد. ترکیبات اصلی دیگر شامل n-Tricosane (۲٤/۸۳٪) و Linalool (۱٤/۸۱٪) بود. متوسط قطر هاله عدم رشد در روش چاهک در آگار بر باکتری های گرم مثبت ۱۵/۹ میلی‌متر و برای باکتری های گرم منفی ۱۱/۱۵ میلی‌متر بود. حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس نازبو بنفش برای باکتری‌های بیماری‌زا در محدوده ٤/٦ تا ۳٦/۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. حداقل غلظت کشندگی اسانس نیز در رنج ٤/٦ تا ۷۳/٦ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. به طور کلی می‌توان گفت که اسانس نازبو بنفش بر باکتری های گرم مثبت در غلظت‌های پایین‌تر موثر بود و توانست از رشد آن‌ها جلوگیری کند.

کلید واژگان: نازبو بنفش، فعالیت ضدمیکروبی، جنتامایسین، ونکومایسین، رقیق‌سازی در مایع.

*مسئول مکاتبات: tabatabai@um.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-10-03]

۱- مقدمه

بیماری‌های ناشی از غذا سالانه ۳۰٪ جمعیت در کشورهای توسعه یافته را درگیر می‌سازد [۱]. امروزه کیفیت و اطمینان از سالم بودن محصولات غذایی از نگرانی های اصلی در صنعت غذاست [۲]. جلوگیری از رشد باکتری‌های عامل فساد و مسمومیت غذایی و به تاخیر انداختن فساد میکروبی محصولات غذایی، فاکتورهایی هستند که به صورت قابل ملاحظه‌ای می‌توانند زمان ماندگاری را افزایش دهند [۳و ٤].

اهمیت استفاده از گیاهان دارویی و طبیعی در پیشگیری از بیماری‌ها، درمان و ممانعت از رشد باکتری‌های بیماری‌زا به خوبی شناخته شده است. با وجود تنوع و گسترش بسیار زیادی که گیاهان دارویی در ایران و سایر کشورهای جهان دارند پژوهش‌های فروانی در زمینه بررسی اثر ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی این گیاهان همچنان ادامه دارد [۵]. در حال حاضر مقاومت باکتری‌های بیماری‌زا نسبت به آنتی‌بیوتیک های رایج درمانی به یک مشکل بزرگ، اساسی و تهدید کننده در سرتاسر جهان تبدیل شده است به طوری که شعار سال ۲۰۱۱ سازمان جهانی بهداشت "مقاومت به داروهای ضد میکروبی یک تهدید جهانی" می‌باشد.

ترکیبات ضدمیکروبی گیاهان دارویی یکی از منابع با ارزشمند و حائز اهمیت در علم پزشکی، صنعت داروسازی و صنایع غذایی به شمار می‌آیند. با توجه به گسترش بیماری‌های ناشی از عفونت و مسمومیت غذایی و مقاومت میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا، شناسایی هر چه بیشتر گیاهان دارویی و طبیعی در کنترل و درمان بیماران موثر خواهد بود [٦].

افزون بر ۵۰ سال است که از مصرف آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی برای درمان و کنترل میکروارگانیسم‌های عامل عفونت و مسمومیت می‌گذرد، ولی استفاده‌های مکرر و بدون تجویز پزشک باعث بروز پدیده مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها شده و درمان این گونه از سویه‌های بیماری‌زا را با مشکل مواجه ساخته است [۷].

نازبو بنفش یا ریحان بنفش یکی از گیاهان دارویی ارزشمند می باشد که به سبب دارا بودن مقدار زیادی اسانس در سلول های رویشی کاربرد فراوانی در طب سنتی دارد. نازبو بنفش از خانواده نعناعیان می‌باشد. نازبو بنفش به طور طبیعی در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری رشد می کند. نازبو در ایران در تمامی نقاط کشت می‌شود. برگ گیاه نازبو در دو نوع سبز و بنفش دیده می-شود که به دلیل وجود آنتوسیانین ظاهری بنفش رنگ به برگ‌ها می‌دهد [۹و ۸]. نازبو از ایام قدیم و به طور سنتی جهت درمان بیماری‌های سردرد، سرفه، اسهال، زگیل، انگل و ناراحتی کلیوی استفاده می‌شده است. به طور سنتی در برخی از مناطق ایران همانند کازرون (استان فارس) و دشتستان (استان بوشهر) از این گیاه برای التیام زخم دهان، کاهش تب و تقویت کننده معده مورد استفاده قرار می‌گیرد [۱۰].

با توجه به بومی بودن گیاه نازبو بنفش در ایران، دسترسی آسان، ارزان و مصرف غذایی و دارویی این گیاه از زمان‌های دور در ایران این پژوهش می‌تواند مقدمه‌ای جهت استفاده عملی از اسانس این گیاه در صنایع غذایی باشد. هدف از این پژوهش، استخراج اسانس از برگ نازبو بنفش، شناسایی ترکیبات و اجزا تشکیل دهنده اسانس و بررسی فعالیت ضدباکتری آن به روش های مختلف کیفی و کمی بر تعدادی از باکتری های شاخص بیماری‌زا غذا و در نهایت مقایسه آن با تعدادی از آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی در شرایط آزمایشگاهی بود.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد شیمیایی، محیط کشت میکروبی و دستگاه‌های مورد استفاده

مواد شیمیایی، محیط‌های کشت میکروبی و دستگاه‌های مورد استفاده در این پژوهش شامل: پپتون واتر (BDH Chemicals Ltd., England)، محلول رینگر (Merck, Germany)، کاغذ واتمن (WhatmanNo. 3 filter paper, Whatman

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-10-03]

Ltd., England)، فیلتر سر سرنگی ۰/۲ میکرومتر، پلیت ۹٦ خانه، محیط کشت مولر هینتون براث و مولر هینتون آگار (ساخت DEFCO Laboratories, USA)، آسیاب آزمایشگاهی (مدل Warning ساخت آلمان)، ترازوی دیجیتال (EK 300i با دقت ۰/۰۱)، انکوباتور (Flash shaker)، انکوباتور جهت نگهداری کشت‌ها در شرایط مناسب، اتوکلاو (مدل Memmert)، اسپکتروفتومتر Sigma، بن‌ماری (مدل Memmert)، آون یا فور (مدل Memmert)، سمپلر متغیر ۱۰ تا۱۰۰۰ میکرولیتر (اپندروف) و آنتی‌بیوتیک‌های ونکومایسین و جنتامایسین (پادتن طب) بود.

۲-۲- تهیه سویه‌های میکروبی و فعال‌سازی آن‌ها

در این پژوهش دو گونه باکتری گرم مثبت کوکسی (*استافیلوکوکوس اورئوس* و *استرپتوکوکوس پیوژنز*) و دو گونه باکتری گرم منفی باسیل (*اشرشیا کلی* و *سودوموناس ائروژینوزا*) مورد بررسی قرار گرفت. لوله حاوی باکتری‌ها در شرایط کاملا استریل باز شد، سپس توسط پی‌پت پاستور از ترکیبات سوسپانسیون باکتری‌ها به محیط کشت‌های مایع و جامد مولر هینتون که از قبل آماده شده بود تلقیح گردید و باکتری‌ها بـه مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. جهت فعال‌سازی باکتری‌ها ۲٤ ساعت قبل از انجام آزمایش‌های ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی، به کمک آنس استریل از کشت ذخیره (مادر) به محیط کشت مولر هینتون تلقیح انجام شد. از محلول رینگر جهت برابر شدن کدورت رشد میکروارگانیسم با استاندارد نیم مک‌فارلند استفاده شد. در این حالت میزان باکتری‌ها برابر با (Colony Forming Unit/mL $۱/۵\times۱۰^{۸}$) بود [۱۱].

۲-۳- جمع آوری نازبو بنفش و استخراج اسانس

برگ نازبو بنفش از مشهد (خراسان رضوی) خریداری شد. مقدار ۵۰ گرم از نازبو بنفش همراه با ۷۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر به دستگاه کلونجر شیشه‌ای ساخت شرکت آداک که اساس کار آن تقطیر آبی است منتقل و به مدت ۳ ساعت با سرعت یک میلی‌لیتر در دقیقه عمل اسانس‌گیری انجام گرفت. اسانس با سولفات سدیم، آبگیری و در ظرف استریل، دور از نور و در یخچال نگهداری شد [۱۲]. در شکل ۱، نمونه‌ای از گیاه نازبو بنفش نشان داده شده است.

Fig 1 Purple basil.

۲-٤- شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس نازبو بنفش

شناسایی ترکیبات اسانس نازبو بنفش در پژوهشکده علوم گیاهی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام شد. اسانس استخراج شده با تزریق ۰/۲ میکرولیتر به دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف نگار جرمی مدل TRACE MS (شرکت سازنده: ThermoQuest-Finnigan) حاوی ستونDB-5 طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی متر و ضخامت فاز ساکن ۰/۲۵ میکرومتر متصل به طیف سنج جرمی مدل Quadrupole انجام پذیرفت. دمای ستون از ٤۰ درجه سانتی‌گراد تا ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۲/۵ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه افزایش یافت. از گاز هلیم با سرعت ۱/۱ میلی لیتر در دقیقه و از انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون استفاده شد [۱۳].

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-10-03]

۲-۵- محاسبه شاخص بازداری و شناسایی ترکیب ها

برای محاسبه اندیس‌های بازداری ترکیبات، آلکان های نرمال C9 –C22 تزریق گردید. شناسایی ترکیب‌ها با مطالعه طیف‌های جرمی و مقایسه با طیف جرمی ترکیب‌های استاندارد، با استفاده از اطلاعات موجود کتابخانه در کامپیوتر و به کمک شاخص‌های بازداری محاسبه شد. مقایسه آن‌ها با شاخص‌های بازداری استاندارد که در منابع مختلف منتشر گردیده، انجام شد. محاسبات کمی (درصد هر ترکیب) به روش نرمال کردن سطح [1] انجام شد.

۲-٦- آزمون بررسی فعالیت ضدمیکروبی به روش ایجاد چاهک

ابتدا باکتری‌های مورد بررسی، به کمک محلول رینگر تا برابر شدن با کدورت استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند، رقیق شد. توسط سواپ استریل از باکتری‌ها برداشته شد و روی محیط کشت مولر هینتون آگار، توسط میله‌ی شیشه‌ای L مانند در سطح پتری‌دیش ۸ سانتی متر کشت داده شد. توسط خلا و پیپت پاستور استریل، چاهک‌هایی به قطر ٦ میلی‌متر روی محیط کشت ایجاد گردید. انتهای چاهک‌ها بـا ۱۰ میکرولیتر محیط کشت پر شد تا از نفوذ احتمالی اسانس نازبو بنفش به کف پتری جلوگیری و از بروز هر گونه خطا پیشگیری شود. داخل هر چاهک با سمپلر۲۰ میکرولیتر از رقت‌های ۱، ۱/۱،٤/۲، ۱/۸، ۱/۱٦، ۱/۳۲ و ۱/٦٤ اسانس ریحان در محلول دی متیل سولفوکساید به طور جداگانه قرار داده شد. در هر پتری دیش یک چاهک در وسط به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. پلیت‌های کشت شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲٤ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. قطر هاله‌های عدم رشد با استفاده از خط‌کش به طور دقیق اندازه‌گیری شد. از دیسک‌های آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین و ونکومایسن استفاده گردید و قطر هاله عدم رشد آنتی‌بیوتیک‌ها در مورد هر میکروارگانیسم مشخص گردید و با نتایج به دست آمده مقایسه شد [١٤].

۲-۷- آزمون بررسی فعالیت ضدمیکروبی به روش تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی از رشد

برای این منظور از سویه‌های باکتری‌های استاندارد بیماری‌زا یک کشت ۲٤ ساعته در محیط کشت مولر هینتون براث تهیه شد. سریال‌های رقت متوالی از اسانس نازبو بنفش تهیه و ۱۰۰ میکرولیتر از اسانس نازبو به میکروپلیت‌های ۹٦ خانه‌ای که قبلا حاوی ۱۰ میکرولیتر باکتری با کدورت نیم مک‌فارلند بود اضافه شد. آزمایش‌های مشابه برای کنترل مثبت (محیط کشت مولر هینتون براث حاوی باکتری بدون اسانس) و کنترل منفی (محیط کشت مولر هینتون براث بدون باکتری) نیز انجام شد. پلیت ۹٦ خانه‌ای به مدت ۲٤ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از گذشت ۲٤ ساعت محلول تری فنیل تترازولیوم کلراید تهیه شده و به هر خانه ۱۰ میکرولیتر از این معرف اضافه شد. در خانه‌هایی که رشد میکروبی اتفاق افتاده باشد ظرف کم‌تر از نیم ساعت، رنگ قرمز تیره یا ارغوانی ایجاد می‌شود. اولین غلظتی که در آن رشد باکتری روی نداده و رنگ قرمز تشکیل نشد به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی گزارش شد [۱۵].

۲-۸- حداقل غلظت کشندگی اسانس نازبو بنفش

تعیین حداقل غلظت کشندگی اسانس نازبو بنفش در ادامه تعیین حداقل غلظت بازدارنده و مکمل آن می‌باشد. برای تعیین حداقل غلظت کشندگی همه چاهک‌های فاقد تغییر رنگ، بر سطح محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد. محیط کشت حاوی باکتری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲٤ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. اولین پلیتی که هیچ کلنی در آن رشد نکرده باشد به عنوان حداقل غلظت کشندگی گزارش شد [٦].

1. Normalization method

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-10-03]

۲-۹- آنالیز آماری

تمامی آزمایش‌ها در سه تکرار انجام پذیرفت، برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از نرم افزار SPSS نسخه ۱۸ استفاده شد. سطح معنی‌دار بودن ۵ درصد در نظر گرفته شد.

۳- نتایج و بحث

استفاده از گیاهان دارویی به منظور درمان بیماری‌های در انسان سابقه‌ای بس طولانی دارد، پیش بینی‌ها و برآوردهای انجام شده سازمان بهداشت جهانی نشان می‌دهد که حدود ۸۰ درصد جمعیت جهان از گیاهان دارویی و طبیعی برای جنبه‌های مراقبت-های بهداشتی خود استفاده می‌نمایند.

نتایج آنالیز اسانس نازبو بنفش توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی در جدول ۱، آورده شده است. بیست و هشت ترکیب شناسایی شده در مجموع ۹۹/۲۸ درصد ترکیبات اسانس نازبو بنفش را تشکیل داد.

p-Allylanisole با ٥١/٦٤ بیشترین ترکیب شناسایی شده در اسانس ریحان بود، و به تنهایی بیش از ۵۰ درصد از ترکیب اسانس را شامل می شد. در پژوهش‌های مشابه نیز درصد این ترکیب بین ۳۰ تا ۷۰ درصد گزارش شده بود لازم به ذکر می‌باشد که این ترکیب دارای اسامی مختلفی همچون estragol، methoxy-4-(2-propenyl)-benzene، estragon و ... می‌باشد. علاوه بر این ترکیبات اصلی دیگر شامل n-Tricosane (٪٢٤/٨٣) و Linalool (٪١٤/٨١) بود. اعداد مندرج در ستون عمودی کروماتوگرام مقدار فروانی ترکیبات تشکیل دهنده اسانس نازبو بنفش را نشان می‌دهد و ستون افقی زمان جداسازی و شناسایی هر یک از ترکیبات اسانس در ستون را بیان می‌کند (شکل ۲). در مطالعه‌ای که توسط پور بزرگی و همکاران (١٣٨٦)، انجام پذیرفت، مشخص گردید که بیش از ۵۰ ترکیب مختلف در اسانس ریحان وجود دارد و بیشترین ترکیب اسانس را استراگول به خود اختصاص داده است، لازم به ذکر می‌باشد که این پژوهشگران ترکیبات شیمیایی گیاه نازبو بنفش و سبز را مورد بررسی قرار داده بودند [۱۰و ١٦]. نتیجه پژوهش حاضر با نتایج سایر پژوهشگران تا حدود زیادی همخوانی داشت، نکته حائز اهمیت آن است که ساختار شیمیایی اسانس هر گیاه تحت تاثیر عواملی محیطی و شرایط آب و هوایی متفاوت می‌باشد.

Table 1 Chemical compounds of the purple basil essential oil

No	Compound name	KI[a]	%
1	α-Pinene	933	0.09
2	Sabinene	972	0.03
3	β-Pinene	977	0.06
4	6-Methyl-5-hepten-2-one	984	0.08
5	β-Myrcene	988	0.04
6	Limonene	1027	0.05
7	1,8-Cineole	1030	0.57
8	Z-β-Ocimene	1035	0.03
9	E-β-Ocimene	1045	0.13
10	cis-Linalool oxide	1071	0.1
11	trans-Linalool oxide	1088	0.09
12	Linalool	1101	14.81
13	Menthol	1175	0.11
14	Terpineol<alpha->	1194	0.12
15	p-Allylanisole	1204	51.64
16	Neral	1242	0.31
17	Geranial	1271	0.46
18	trans-caryophyllene	1422	0.32
19	Bergamotene<alpha-trans->	1437	0.59
20	trans-β-Farnesene	1457	0.3
21	Germacrene D	1484	0.12
22	(E)-α-Bisabolene	1544	1.32
23	n-Octadecane	1797	0.12
24	n-Nonadecane	1897	0.32
25	n-Eicosane	1997	0.43
26	n-Docosane	2197	0.88
27	n-Tricosane	2300	24.83
28	n-Tetracosane	2397	1.33

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-10-03]

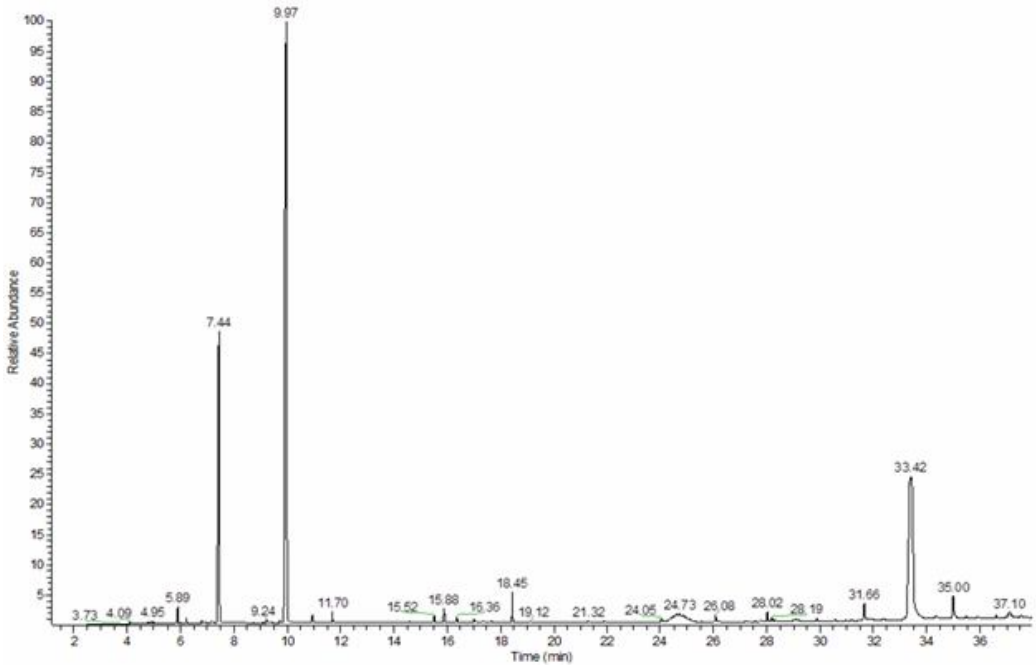

Fig 2 The chromatogram of purple basil essential oil.

اثر اسانس نازبو بنفش بر میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه در جداول ۲ و ۳، آورده شده است. نتایج این مطالعه نشان داد که اسانس نازبو به خوبی از رشد باکتری‌های بیماری‌زا جلوگیری کرده و اثر آن بر باکتری‌های کوکسی گرم مثبت به مراتب بیشتر از باسیل‌های گرم منفی بود. یکی از ویژگی‌های مهم اسانس گیاهان دارویی مربوط به خاصیت آبگریزی آن می‌باشد، در این حالت اسانس گیاه می‌تواند با پیوند روی لایه لیپیدی غشای سلولی و میتوکندری باکتری‌ها باعث شکاف غشای سلولی و خروج مولکول‌ها و یون‌های باکتری به خارج از سلول و در نهایت مرگ باکتری گردد. فعالیت ضدباکتریایی اسانس‌ها علیه طیف گسترده‌ای از میکروارگانیسم‌های شاخص بیماری‌زا و عامل مسمومیت و عفونت، از جمله باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی اثبات شده است. فعالیت‌های ضدمیکروبی اسانس‌ها، به تعدادی از ترکیبات ترپنوئیدی و فنلی و گروه‌های فعال موجود در اسانس‌ها و انفعالات بین آن‌ها، نسبت داده می‌شود [۱۷].

اهمیت استفاده از گیاهان دارویی و طبیعی در پیشگیری از بیماری‌ها، درمان و ممانعت از رشد باکتری‌های بیماری‌زا به خوبی شناخته شده است. در مطالعه‌ای که بورت (۲۰۰٤)، انجام داد بیان نمود که باکتری های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی حساسیت بیشتری نسبت به ترکیبات اسانس گیاهی دارند. با توجه به اینکه باکتری‌های گرم منفی دارای یک لایه خارجی در اطراف دیواره سلولی خود می‌باشند و به عنوان یک سد نفوذ ناپذیر عمل نموده و دسترسی ترکیبات آبگریز را محدود می‌نماید لذا دارای حساسیت کم‌تری می‌باشد [۱۸]. هلندر و همکاران (۱۹۹۸)، گزارش دادند که ترکیبات فنولی رشد باکتری-های گرم منفی را با تخریب غشای بیرونی سلول، مهار می نمایند. شاید بتوان علت این پدیده را این گونه توجیه نمود که وزن مولکولی پایین اسانس‌ها اجازه می‌دهد تا این ترکیبات به غشای داخلی باکتری‌های گرم منفی نفوذ نمایند و از رشد آن‌ها جلوگیری نماید [۱۷]. یکی از ترکیباتی ترپنوئیدی مهم که دارای اثر ضدمیکروبی و قارچی می باشد و در اسانس نازبو بنفش نیز یافت شد، لینالول بود. فعالیت ضد میکروبی بیشتر ترپنوئیدها از جمله لینالول به گروه‌های عملگر ارتباط دارد.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-10-03]

Table 2 Average diameter (mm) of microbial free zone area of the purple basil essential oil on *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes* (well diffusion agar method).

	Purple basil essential oil						
Microorganism	**1**	**1.2**	**1.4**	**1.8**	**1.16**	**1.32**	**1.64**
P. aeruginosa	10.40 ± 0.54[a]	9.20±0.28[a]	8.00 ±0.52[a]	7.10±0.54[a]	6.10±0.37[a]	00.00±0.17[a]	00.00±0.11[a]
E. coli	11.90±0.52[a]	11.10 ±0.50[a]	10.00±028[a]	8.20±0.56[b]	7.30±0.49[b]	6.40±0.29[b]	00.00±0.10[b]
S. aureus	13.90 ±0.28[a]	12.90 ±0.28[a]	11.00 ±0.53[b]	9.40 ±0.24[c]	8.20 ±0.39[c]	7.40 ±0.57[c]	6.20±0.27[c]
S. pyogenes	17.90±0.52[a]	16.20±0.53[b]	14.00±0.51[c]	12.20±0.36[d]	10.00±0.48[e]	9.10±0.41[e]	7.70±0.42[f]

Values are means ± standard deviations

به طور کلی نتایج نشان داد که اسانس نازبو بنفش بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی موثر است اما میزان اثر بخشی آن بسته به نوع میکروارگانیسم متفاوت است (جدول ۲). نتایج مربوط به روش چاهک در آگار در جدول ۲، آورده شده است. این نتایج نشان داد که به طور کلی متوسط قطر هاله عدم رشد در باکتری-های گرم مثبت بیشتر است. متوسط قطر هاله عدم رشد در روش چاهک در آگار بر باکتری‌های گرم مثبت ۱۵/۹ میلی‌متر و برای باکتری‌های گرم منفی ۱۱/۱۵ میلی‌متر بود. متوسط قطر هاله عدم رشد بر باکتری‌های گرم مثبت برای آنتی‌بیوتیک ونکومایسین ۱۱/۸ میلی‌متر و برای باکتری‌های گرم منفی برای آنتی‌بیوتیک جنتامایسین ۱۵ میلی‌متر بود.

لیکسا و همکاران (۲۰۰۷)، اسانس نازبو را بر تعدادی از باکتری‌ها و قارچ‌های بیماری‌زا در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قراردادند. میکروارگانیسم‌های این مطالعه شامل *باسیلوس سرئوس*، سالمونلا، *پروتئوس ولگاریس*، *کاندیدا آلبیکنس* و ... بود. نتایج این مطالعه نشان داد که اسانس نازبو به خوبی از رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا جلوگیری کرد [۱۹]، نتایج این پژوهشگران با یافته‌های مطالعه حاضر همخوانی داشت. نتایج مربوط به تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی اسانس نازبو بنفش در جدول ۳، آورده شده است. این نتایج نشان داد به طور کلی حداقل غلظتی از اسانس نازبو بنفش که باعث ممانعت از رشد و کشندگی می‌شود برای باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی کم‌تر است.

نمای حساسیتی میکروارگانیسم‌ها در برابر اسانس نازبو بنفش نشان داد که حساس‌ترین و مقاوم‌ترین سویه بیماری‌زا به ترتیب *استرپتوکوکوس پیوژنز* و *سودوموناس ائروژینوزا* بود (جداول ۲ و ۳).

اسانس گیاه نازبو به طور کلی از ترکیبات خاص فنولی تشکیل شده است. در مطالعه‌ای که توسط جوانمردی و همکاران (۲۰۰۲)، در مورد ترکیبات فنولی، ویژگی‌های شیمیایی و ساختاری ۲۳ نمونه جمع آوری شده نازبو در ایران انجام شد مشخص گردید که گونه‌هایی از نازبو وجود دارد که از نظر میزان، نوع ترکیبات فنولی و کیفیت اسانس در کشاورزی دارای اهمیت می‌باشد[۲۰].

Table 3 Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of the purple basil essential oil on *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*

Microorganism	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
P. aeruginosa	36.8	73.6
E. coli	18.4	36.8
S. aureus	4.6	9.2
S. pyogenes	4.6	4.6

رقیق کردن اسانس نازبو بنفش باعث ضعیف‌تر شدن اثر ضد-میکروبی آن شد، به نحوی که در غلظت‌های۱/۳۲ و ۱/٦٤ برای باکتری گرم منفی *سودوموناس ائروژینوزا* و در غلظت ۱/٦٤ برای باکتری *اشرشیا کلی* هاله عدم رشد مشاهده نشد. در مورد باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استرپتوکوکوس پیوژنز* در تمامی غلظت‌های اسانس هاله عدم رشد مشاهده شد (جدول ۲).

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-10-03]

نتایج نشان داد که حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس نازبو بنفش بر باکتری‌های مورد مطالعه در محدوده ٤/٦ تا ٣٦/٨ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. حداقل غلظت کشندگی اسانس نیز در رنج ٤/٦ تا ٧٣/٦ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. به طور کلی می‌توان گفت که اسانس نازبو بنفش بر باکتری‌های گرم مثبت در غلظت‌های پایین‌تر موثرتر از باکتری‌های گرم منفی بود.

٤- نتیجه‌گیری

اسانس نازبو بنفش توانست به خوبی از رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا جلوگیری کند. قطر هاله عدم رشد برای باکتری‌های گرم مثبت از آنتی‌بیوتیک وانکومایسین بیشتر بود. ٢٨ ترکیب در اسانس نازبو بنفش شناسایی شد که بیش از ٥٠ درصد آن را استروگول تشکیل داده بود. جهت مشخص کردن مکانیسم دقیق اسانس نازبو بنفش بر باکتری‌های بیماری‌زا نیاز به پژوهش‌های بیشتری می‌باشد. لذا پیشنهاد می‌شود میزان دوز مصرفی در شرایط درون‌تنی مورد ارزیابی واقع شود.

٥- تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می دانند که از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد جهت تامین اعتبار هزینه‌های مالی، صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

٦- منابع

[1] Cao L, Si JY, Liu Y. 2009. Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant properties of Moslachinensis Maxim. Food Chemistry, 115: 801–805.

[2] Perez-Perez C, Regalado-Gonzalez C, Rodriguez-Rodriguez CA, Barbosa-Rodríguez J and Villasenor-Ortega F. 2006. Incorporation of antimicrobial agents in food packaging films and coatings. Advances in Agricultural and Food Biotechnology, 11:193-216.

[3] Petrou S, Tsiraki M, Giatrakou V, Savvaidis I. 2012. Chitosan dipping or oregano oil treatments, singly or combined on modified atmosphere packaged chicken breast meat. International Journal of Food Microbiology, 156(3):264-271.

[4] Giatrakou V, Ntzimani A, Savvaidis I. 2010. Effect of chitosan and thyme oil on a ready to cook chicken product. Food Microbiology, 27 (1):132-136.

[5] Igbinosa O, Igbinosa E, Aiyegoro O. 2009. Antimicrobial activity and phytochemical screening of stem bark extracts from Jatropha curcas (Linn). African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 3(2): 58-62.

[6] Alizadeh- Behbahani B and Tabatabaei-Yazdi F. 2015. In vitro study of antibacterial activity of *Mangle negro* extracts against selected pathogens from Enterobacteriaceae and Bacillaceae families. Zahedan Journal of Research in Medical Sciences, 17(12): 1-4.

[7] Tabatabaei Yazdi F, Alizade Behbahani B, Heidari Sureshjani M. 2014. The comparison of antimicrobial effects of Chevil (Ferulago angulata) extract with a variety of common therapeutic antibiotics in vitro. Arak University of Medical Sciences Journal. 17 (3) :35-46.

[8] Omidbaigi R. Production and Processing of medicinal plants. 2008. Astan'e Qods'e Razavi publication. Vol 3. Tehran-Iran. 2008, 397 pp.

[9] Omidbaigi R. Approaches to Production and Processing of medicinal plants. 1997. Tarahane'e Nashr publication. Vol 2. Tehran-Iran. 1997, 424 pp.

[10] Ziaei M, Sharifi M, Naghdi Badi H, Tahsili J, Ghorbani Nohooji M. A Review on Ocimum basilicum L. Medicinal Plant with a Focus on the most Important Secondary Compounds and its Medicinal and Agronomic Properties. Journal of Medicinal Plants. 2014; 4 (52) :26-40.

[11] Golshani Z, Davoodi V. 2013. In vitro antimicrobial effect of Rosmarinus officinalis leaf extract against some pathogens. Arak University of Medical Sciences Journal. 16 (8) :78-84.

[12] Zandi-Sohani, N., Hojjati, M., & Carbonell-Barrachina, A.A. 2013. Insecticidal and Repellent Activities of the Essential Oil of *Callistemon citrinus* (Myrtaceae) against *Callosobruchus maculatus* (F.) *(Coleoptera: Bruchidae*). Neotropical Entomology, 42: 89-94.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-10-03]

[13] Seyedalipour B, Hasani A, Ebrahimzadeh M A, Mohseni M. 2016. Identification of the Chemical Composition of Essential Oil and Evaluation of Antibacterial Activity of Methanolic Extracts from the Aerial Parts of Ballota Platyloma Rech. f. Arak University of Medical Sciences Journal.; 18 (11) :34-43.

[14] Kolahi Marand *S*, Tabatabaei Yazdi F, Mortazavi SA, Beig Babaei A. 2016. Inhibitory and bactericidal effects of artichoke (*Cynara scolymus*) on pathogenic strains and their comparison with antibiotics in vitro. Qom University Medical Science J,10(2):32-42.

[15] Sadrnia M, Arjomandzadegan M. 2014. Comparative Study on the Effects of Aloe Vera Extract in Clinical Strains of Staphylococcus Aureus, Klebsiella, Staphylococcus Epidermidis and Escherichia Coli Compared to Antibiotics of Choice. Arak University of Medical Sciences Journal. 17 (6) :39-46.

[16] Poorbozorgi R.N and Sharifi M. Quality and quantity studying of essential oils and comparison of Chavicol O-methyl transferase gene expression between Iranian Basil (*Ocimum basilicum* L.) cultivars. Ms.C thesis, Tarbiat Modares University, 2Department of Biology, Faculty of Sciences.1386.

[17] Helander, I.M., Alakomi, H.-L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, L., Smid, E.J., Gorris, L.G.M., and von Wright, A., 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram negative bacteria. Journal Agriculture Food Chemistry. 46, 3590–3595.

[18] Burt, S., 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods-A review. International Journal of Food Microbiology. 94:223−253.

[19] Lexa, G., matasyoh, J., Matasyoh, C. 2007. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of ocimum gratissimum L. growing in Eastern Kenya. African Journal of Biotechnology. 6(6), 760-765.

[20] Javanmardi J, Khalighi A, Khashi A, Bais HP and Vivanco JM. 2002. Chemichal characterisation of Basil (*Ocimum basilicum* L.) found in local accessions and used in traditional medicins in Iran, Journal Agriculture Food Chemistry. 50: 5878 - 83.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-10-03]

Extraction, identification of chemical compounds and antimicrobial activity of purple basil essential oil on food-born pathogenic bacteria and its comparison with vancomycin and gentamicin antibiotics

Samiei, A. [1], Tabatabaei Yazdi, F. [2*], Alizadeh Behbahani, B. [3], Mazaheri Tehrani, M.[2]

1. Ph. D, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
2. Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
3. Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran

(Received: 2019/08/10 Accepted:2019/10/12)

The objective of this study was to extract the essential oil of purple basil leaf, to identify its compounds and to investigate its antimicrobial effects on some food-borne pathogenic bacteria through different qualitative and quantitative methods, and eventually, to compare it with some antibiotics including vancomycin and gentamycin in vitro. The essential oil components were identified with GC/MS. The antimicrobial effect of basil essential oil was measured through well diffusion agar (WDA), and finally, the minimum inhibitory concentration (MIC) of the essential oil was determined using microdilution broth and triphenyl tetrazolium chloride. The results revealed that 28 identified compounds constituted 99.28% of the whole essential oil compounds. p-Allylanisole (51.64%) was the most abundant component of the essential oil. In addition, other main components such as n-Tricosane (24.83%) and Linalool (14.81%). In the wall in agar method, the mean free zone diameter was equal to 15.9 mm in the case of Gram-positive bacteria and 11.15 mm in the case of Gram-negative ones. The minimum MIC of purple basil essential oil ranged from 4.6 to 36.8 mg/ml in the case of pathogenic bacteria. Moreover, its minimum bactericidal concentration varied from 4.6 to 73.6. in conclusion, it can be said that purple basil essential oil was effective on Gram-positive bacteria at lower concentrations and could inhibit their growth.

Keywords: Purple basil, Antimicrobial activity, Gentamicin, Vancomycin, Broth microdilution.

* Corresponding Author E-Mail Address: tabatabai@um.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-10-03]