

بررسی کمی و کیفی گهرمایه *Calendula officinalis* L. و اثرات ضد باکتریایی آن

محمد مقتدر^{۱*}، حسن سالاری^۲، حسین مظفری^۲ و آرمینا فرهمند^۱

^۱ کرمان، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، پژوهشکده علوم محیطی، گروه تنوع زیستی

^۲ کرمان، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، پژوهشکده علوم محیطی، گروه اکولوژی

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۲/۴ تاریخ پذیرش: ۹۴/۷/۱۲

چکیده

جهت شناسایی ترکیب‌های ثانویه و بررسی اثرات ضد باکتریایی اسانس گل همیشه بهار *Calendula officinalis* L.، گل‌های این گیاه از رویشگاه آن در تیر ماه ۱۳۹۲ از روستایی در استان کرمان جمع‌آوری شد. نمونه‌ها تمیز شده و پس از خشک کردن در سایه، اسانس‌گیری به روش تقطیر با آب انجام شد. ترکیب‌های موجود در اسانس با استفاده از کروماتوگرافی گازی تجزیه‌ای (GC) و گاز کروماتوگراف متصل به طیف‌سنج جرمی (GC/MS) شناسایی شدند. همچنین جهت مطالعه اثرات ضد باکتریایی اسانس گل‌های گیاه مذکور، اسانس حاصل بر محیط رشد شش سوش باکتری شامل دو نوع باکتری گرم مثبت: استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استرپتوکوکوس فکالینس و چهار نوع باکتری گرم منفی: سودوموناس آئروجینوزا، شیگلا فلکسنری، کلبسیلا پنومونی و اشرشیا کلی تیمار داده شد و سپس قطر هاله عدم رشد باکتریها اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که بازده اسانس حاصل از گل‌های این گیاه ۰/۲۵ درصد بود. از مجموع ۱۹ ترکیب شناسایی شده در اسانس گل‌های این گیاه با ۹۸/۵۶ درصد، ترکیب‌های دلتا کادینن با ۲۵/۶۷ درصد، آلفا کادینول با ۲۱/۳۷ درصد، اپی آلفا مورولولبا با ۱۲/۴۵ درصد و گاما کادینن با ۸/۲۲ درصد بیشترین درصد اسانس را تشکیل می‌دهند. تأثیر اسانس گل‌های این گیاه بر عدم رشد باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و باکتریهای گرم منفی کلبسیلا پنومونی و اشرشیا کلی مورد آزمایش بیش از تأثیر آنتی بیوتیک تتراسایکلین است. بنابراین می‌توان گفت که اسانس گل‌های همیشه بهار جمع‌آوری شده در این مطالعه، دارای اثرات ضد باکتری قابل توجهی در مقایسه با آنتی بیوتیک‌های معمول می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: *Calendula officinalis* L.، دلتا کادینن، اثر ضد باکتریایی، اسانس، GC/MS.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۳۴-۳۳۷۷۶۶۱۱، پست الکترونیکی: moghtader18@yahoo.com

مقدمه

پوشیده از کرک، با کناره‌های موجدار و به رنگ سبز، مایل به قهوه‌ای روشن دارد، روی ساقه منشعب آن کاپیتولهای درشت و زیبا ظاهر می‌شود که به تناسب گرما و رطوبت محیط زندگی، به طور منظم صبحها در فاصله ساعت ۹ تا ۱۰ شکفته و سپس در بعد از ظهرها بین ساعات ۴ تا ۵ جمع می‌گردد. کاپیتولهای آن دارای دو نوع گل یکی لوله‌ای و دیگر زبانه‌ای به رنگ زرد مایل به نارنجی و واقع در

گل همیشه بهار با نام علمی *Calendula officinalis* L. از خانواده Asteraceae است. گیاهی علفی و پایا با ساقه هوایی افراشته منشعب و دارای پرزهای غده‌ای گل آن زردرنگ و بومی منطقه مدیترانه می‌باشد. گل همیشه بهار در ایران از جمله در بلندیهای بالای ۲۵۰۰ متر می‌روید و به راحتی در شرایط مساعد رشد می‌کند. دارای ساقه‌ای به طول ۲۰ تا ۵۰ سانتیمتر است، برگ‌هایی ساده بیضوی، دراز،

حاشیه نهنج است. میوه فندقه و قهوه‌ای رنگ و سطح آن ناصاف می‌باشد (۳).

گل همیشه بهار در طب قدیم با اثرات ضد میکروبی استفاده می‌شده است (۱۹). از خواص دارویی این گیاه ضد نفخ معده و روده، تحریک کننده کار کلیه‌ها، افزایش دهنده جریان خون و فعالیتهای قلبی می‌باشد. عصاره هیدروالکلی گیاه همیشه بهار کوهی در درمان التهاب اثربخشی قابل ملاحظه‌ای اعمال می‌کند. امروزه، گل همیشه بهار برای استفاده از مواد غذایی در ایالات متحده آمریکا تأیید شده و به نظر می‌رسد در مواد غذایی و لیست دارو از GRAS به عنوان ترکیب بی‌ضرر به رسمیت شناخته شده است. در گذشته نه چندان دور به عنوان یک دارو برای درمان التهاب و زخمهای پوستی (۹) استفاده می‌شده است.

باکتریها از نظر شکل ظاهری به ۳ گروه کوسمی، باسیل و اسپیروکت تقسیم می‌شوند. بعضی از باکتریها هم دارای شکل متغیر هستند که پلئومورفیک به معنی چند شکلی نامیده می‌شوند. شکل باکتریها با دیواره سخت و محکمشان شناخته می‌شود. این شکلهای ظاهری اهمیت بسیاری در شناسایی انواع باکتریها توسط میکروسکوپ دارد. باکتریها متنوع‌ترین و مهم‌ترین میکروارگانیسم‌ها هستند. تعداد کمی از آنها در انسان و حیوانات و گیاهان بیماری‌زاست. به طور کلی بدون فعالیت آنها، حیات بر روی زمین مختل می‌گردد. نظر به اینکه باکتریها ساختمان ساده‌ای داشته و می‌توان به آسانی بسیاری از آنها را در شرایط آزمایشگاه کشت داد و تحت کنترل درآورد، میکروب‌شناسان مطالعه وسیعی درباره فرآیندهای حیاتی آنها انجام داده‌اند. اسانسها ترکیبات معطری هستند که در اندامهای مختلف گیاهان یافت می‌شوند. به علت تأخیر در اثر مجاورت هوا در حرارت عادی آنها را روغنهای فرار یا اتری یا اسانسهای روغنی می‌نامند. اسانسها به طور کلی بی‌رنگ هستند، به خصوص هنگامی که تازه تهیه شده

باشند ولی در اثر مرور زمان به علت اکسیداسیون و رزینی شدن، رنگ آنها تیره می‌شود. برای جلوگیری از این تغییرات باید اسانسها را در مکان خنک، خشک و در ظرف های سربسته از جنس شیشه نگهداری کرد. اسانسها در الکل محلول و به میزان کمی در آب حل می‌شوند. اسانسها بسته به نوع خانواده های گیاهی ممکن است در اندامهای ترشعی، گلبرگها، برگها و یا تمام سلولهای گیاه موجود باشند. اسانسها ممکن است دارای خاصیت دورکنندگی حشرات باشند و بدین وسیله از خراب شدن گلها و برگها جلوگیری کنند یا ممکن است به عنوان جلب کننده حشرات عمل کنند و بدین وسیله عمل گرده افشانی را تسهیل سازند. اسانسها که به وسیله گونه های مختلف گیاهان تولید و در اندامهای مختلف ذخیره می‌شوند رابطه مستقیمی با بیوسنتز، متابولیسم و فعالیتهای بیولوژیکی گیاه دارند که تابع شرایط اقلیمی محیط زیست گیاه هستند. عوامل مختلفی مانند زمان برداشت محصول، نحوه جمع آوری، طریقه خشک کردن و بسته بندی و نگهداری در انبار در کیفیت و کمیت اسانسهای گیاهی مؤثرند. مقایسه ترکیبات اسانس گل گیاه همیشه بهار در نمونه جمع آوری شده از منطقه کوهپایه استان کرمان با دیگر تحقیقات نشان دهنده وجود کموتایپ مختلف را در این گونه نشان می‌دهد. در تحقیق حاضر، ترکیبهای دلتا کادینن و آلفا کادینول بیشترین درصد اسانس را تشکیل دادند در حالی که در تحقیق Okoh از آفریقا در سال ۲۰۰۸ اسانس استخراج شده از برگها و گلهای تازه گیاه همیشه بهار به روش تقطیر با آب بازده اسانس به ترتیب ۰/۰۶ و ۰/۰۹ درصد گزارش شده است (۱۹). تجزیه اسانس با GC-MS به ترتیب ۳۰ و ۲۴ ترکیب شناسایی گردید. سزکویی ترپنها در برگهای تازه ۵۹/۵ درصد و در گلها ۲۶ درصد گزارش گردید. ترکیبات غالب در اسانس برگهای تازه شامل α -thujene (19.2%) و dcadinene (11.8%) بود در حالی که ترکیبات غالب در اسانس گلهای تازه شامل α -thujene (19.2%) و d-cadinene (13.1%) بودند (۱۹). در مطالعه

دقیقه تا ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد افزایش یافته و به مدت ۲۰ دقیقه در همین دما باقی ماند. دمای محفظه تزریق و دکتور مورد استفاده (FID) ۲۷۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد و از گاز نیتروژن با سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه به عنوان گاز حامل استفاده شد.

مشخصات و برنامه دمایی دستگاه (GC/MS): جهت آنالیز و شناسایی ترکیبات تشکیل دهنده اسانس از دستگاه گاز کروماتوگراف متصل به طیف سنج جرمی مدل Hewlett Packard-5973 استفاده شد (۲). شرایط آنالیز و مشخصات دستگاه GC/MS به صورت زیر بود:

ستون مویینه HP-5MS به طول ۶۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه ۰/۲۵ میکرومتر، دمای اولیه ستون به مدت ۳ دقیقه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد، سپس ۲۲۰-۶۰ درجه سانتی‌گراد با شیب ۶ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه، سپس ۳ دقیقه در ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد، گاز حامل نیتروژن، سرعت حرکت گاز ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه، انرژی یونیزاسیون ۷۰eV و دمای منبع یونیزاسیون ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد بکار رفت. سری آلکانهای نرمال C۸-C۱۷ نیز تحت شرایط یکسان با تزریق اسانس، جهت محاسبه اندیس بازداری (RI) اجزاء اسانس به دستگاه تزریق گردید. اندیس بازداری اجزاء نمونه با استفاده از برنامه کامپیوتری محاسبه شد. در نهایت اجزاء اسانس با استفاده از مقایسه طیفهای جرمی به دست آمده با طیفهای جرمی استاندارد موجود در کتابخانه الکترونیکی و نرم افزار کامپیوتر دستگاه GC/MS و محاسبه اندیس بازداری استاندارد بر اساس سری آلکانهای C۸-C۱۷ و مقایسه آنها با اعداد استاندارد موجود در مراجع شناسایی شدند (۴).

بررسی اثرات ضد باکتریایی اسانس گل همیشه بهار: فعالیت ضد باکتریایی اسانس گل همیشه بهار مورد مطالعه، بر روی ۶ باکتری شامل ۲ باکتری گرم مثبت، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* (PTCC=۱۴۳۶) و *استرپتوکوکوس فکالیس* (PTCC=۱۲۳۷) و ۴ باکتری گرم

دیگر ترکیب اصلی اسانس گل همیشه بهار کشت شده در فرانسه که با استفاده از تقطیر با بخار آب استخراج شده بود، α -cadinol گزارش شده است (۲۱). در تحقیق دیگر بررسی ترکیبات اسانس در گونه *Calendula arvensis* ترکیبات d-cadinene و a-cadinol ترکیبات اصلی بودند (۲۰). هدف از این تحقیق، بررسی ترکیبات شیمیایی و اثر ضد باکتریایی اسانس این گیاه بر روی باکتریهای پاتوژن در استان کرمان بوده است.

مواد و روشها

مواد گیاهی و اسانس گیری: گلهای گیاه همیشه بهار از رویشگاه طبیعی آن در تیر ماه ۱۳۹۲ در مرحله تمام گلدهی از روستای کوهپایه در استان کرمان با موقعیت جغرافیایی N303157 E5711417 جمع آوری شد و بعد از شناسایی توسط متخصص گیاه شناسی دانشگاه شهید باهنر کرمان، تمیز و شسته شدند و در شرایط سایه به دلیل جلوگیری از هیدرولیز ترکیبهای موجود در گیاهان، در دمای محیط خشک شدند و ۱۵۰ گرم از نمونه خرد شده به روش تقطیر با آب مقطر با کمک دستگاه کلونجر به مدت سه ساعت اسانس‌گیری شد (۱) و اسانس پس از آب‌گیری با سولفات سدیم بدون آب به دستگاه گاز کروماتوگراف (GC) تزریق شد تا مناسب‌ترین برنامه‌ریزی حرارتی ستون، جهت دستیابی به بهترین جداسازی به دست آید. سپس اسانس مورد آزمایش به دستگاه گاز کروماتوگراف متصل به طیف سنج جرمی (GC/MS) تزریق شد و طیفهای جرمی و کروماتوگرامهای مربوطه به دست آمد.

مشخصات دستگاه کروماتوگراف گازی (GC): در این تحقیق از گاز کروماتوگراف مدل HP-439 مجهز به ستون CP Sil 5CB به طول ۲۵ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر که ضخامت لایه فاز ساکن آن ۰/۳۹ میکرومتر می‌باشد، استفاده شد. برنامه حرارتی ستون ۲۰ دقیقه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد و بعد از آن به مقدار ۷ درجه سانتی‌گراد بر

۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد. آزمایش تعیین اثر ضد باکتریایی با ۳ تکرار انجام شد و متوسط فعالیت ضد باکتریایی گزارش شده است. برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) از روش چاهک‌های آگار (Agar Well) استفاده شد. برای مقایسه فعالیت ضد باکتریایی اسانس همچنین از دیسک‌های حاوی دی‌متیل‌سولفوکساید و تتراسایکلین (آنتی‌بیوتیک ضد باکتری گرم مثبت و گرم منفی است) به عنوان شاهد منفی و مثبت استفاده شده است.

نتایج

نتایج نشان داد که بازده اسانس حاصل از گل‌های این گیاه ۰/۲۵ درصد بود. از مجموع ۱۹ ترکیب شناسایی شده در اسانس گل‌های این گیاه با ۹۸/۵۶ درصد، ترکیب‌های دلتا کادینن با ۲۵/۶۷ درصد، آلفا کادینول با ۲۱/۳۷ درصد، اپی آلفا مورولول با ۱۲/۴۵ درصد و گاما کادینن با ۸/۲۲ درصد بیشترین درصد اسانس را تشکیل می‌دهند (جدول ۱).

منفی شامل، سودوموناس آئروجینوزا (PTCC=۱۴۳۰)، شیگلا فلکسنری (PTCC=۱۷۱۶)، کلبسیلا پنومونی (PTCC=۱۰۵۳) و اشرشیا کلی (PTCC=۱۵۳۳) تعیین شد. باکتری‌های مورد آزمایش از مرکز کلکسیون قارچها و باکتری‌های سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران (IROST) تهیه شدند. بدین منظور از روش انتشار در آگار (Disc diffusion method) استفاده شد. از باکتری‌های کشت داده شده به مدت ۲۴ ساعت بر روی محیط مولر هیتتون آگار سوسپانسیونی با رقت ۰/۵ مک فارلند در محیط کشت مولر هیتتون برات تهیه شد سپس ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون هر کدام از باکتری‌ها با استفاده از سوپ استریل به شکل یکنواخت به روش Spread plate method کشت داده شد و دیسک‌های استریل بلانک حاوی ۳۰ میکرولیتر از رقت ۱/۵ هر اسانس که با دی‌متیل‌سولفوکساید (DMSO) که فاقد فعالیت ضد باکتریایی است، رقیق شده بود بر روی محیط کشت قرار گرفت (۲۶). سپس قطر هاله ممانعت‌کننده از رشد پس از

جدول ۱- ترکیب‌های شناسایی شده در اسانس گل‌های گیاه همیشه بهار. *Calendula officinalis*L.

Compound Name	Restrictive Index(RI)	(%) Percentage
α -copaene	1365	0.85
α -ionone	1421	1.75
α -humulene	1444	0.49
Geranylacetone	1452	3.63
γ -muurolene	1472	1.42
β -ionone	1484	2.65
Ledene	1488	4.39
α -muurolene	1497	3.53
γ -cadinene	1512	8.22
δ -cadinene	1524	25.67
α -cadinene	1536	1.25
α -calacorene	1542	3.15
Caryophyllene oxide	1546	0.78
β -oploenone	1574	1.56
Viridiflorol	1587	2.41
Ledol	1594	1.62
Epi- α -muurolol	1639	12.45
α -cadinol	1656	21.37
Cadalene	1671	1.37
Total		98.56

شاخص‌های بازداری با تزریق مخلوط هیدروکربن‌های نرمال (C₈-C₁₇) به ستون HP-5MS محاسبه شده است

ترتیب ۲۶ و ۱۴ میلی‌متر و باکتریهای گرم منفی سودوموناس آئروجینوزا، شیگلا فلکسنری، کلبسیلا پنومونی و اشرشیا کلی قطر هاله بازدارندگی رشد به ترتیب ۲۰، ۱۶، ۱۹ و ۲۱ میلی‌متر ایجاد کرده‌است (جدول ۲).

نتایج بررسی تأثیر ضد باکتریایی اسانس گل گیاه همیشه بهار نشان داد که تیمار اسانس این گیاه در محیط کشت باکتریهای گرم مثبت استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استرپتوکوکوس فکالیس، قطر هاله بازدارندگی رشد به

جدول ۲- نتایج اثرات ضد باکتریایی اسانس گل گیاه همیشه بهار

باکتری	قطر هاله بازدارندگی رشد (میلی متر)	تتراسایکلین
+	۲۶	۲۱
+	۱۴	۱۶
-	۲۰	۲۲
-	۱۶	۱۹
-	۱۹	۱۴
-	۲۱	۱۲

- باکتری گرم منفی

+ باکتری گرم مثبت

بحث

گیاه از جمله گل همیشه بهار به اثبات رسیده است (۱۱). نمونه های گل گیاه همیشه بهار از باغ کالج داروسازی شهر بغداد جهت فعالیت ضد باکتری جمع آوری شد. اثر عصاره اتانولی از گل‌های گیاه همیشه بهار در غلظت‌های مختلف به دست آمده در شرایط آزمایشگاهی برای مهار رشد هشت نوع باکتری مورد آزمایش و بررسی قرار گرفت. فعالیت ضد باکتریایی عصاره گل‌های گیاه همیشه بهار به وضوح برای تمام باکتریها به ویژه باکتری سودوموناس آئروجینوزا از باکتریهای گرم منفی، و استافیلوکوکوس اورئوس از باکتریهای گرم مثبت، کاملاً به اثبات رسید. این نتایج، فعالیت ضد باکتریایی گل همیشه بهار به ویژه در طب سنتی در درمان عفونتهای باکتریایی را تأیید کرد (۱۶). در پژوهشی که در کشور هند انجام شده بخشهای مختلف (ریشه، برگ و گل) از گل همیشه بهار برای فعالیت بالقوه ضد باکتری در برابر برخی از سویه های مهم باکتریایی، یعنی اشرشیاکلی، سالمونلا تیفی، کلبسیلا پنومونیه، انتروباکتر ائروجنز و آگروباکتریوم تومه فاشینس غربالگری شدند. فعالیت ضد باکتریایی در آب، الکل، کلروفرم و اتر با استفاده از روش انتشار دیسک آگار تعیین شد. اگر چه تمام قسمتهای گیاه فعالیت ضد میکروبی قابل توجهی را

نتایج تجزیه اسانس گل گیاه همیشه بهار در مقایسه با نتایج دیگر محققان در ایران و سایر کشورها شباهتها و تفاوت‌هایی مشاهده می‌گردد (۸). در گزارش دیگر ترکیبات شیمیایی و فعالیت‌های ضد میکروبی گل همیشه بهار بررسی گردید. پنج ترکیب شاخص در برگها و گلها که اثرات ضد میکروبی داشتند استخراج و مورد شناسایی قرار گرفت. فعالیت ضد میکروبی از عصاره آبی- متانول برگ و گل گیاه گل همیشه بهار بر روی سه سوش باکتری و دو سوش قارچ به روش دیسک سلولزی مورد بررسی قرار گرفت. فعالیت ممانعت از رشد زیاد، در برابر پنج میکروارگانسیم به دست آمد. این مطالعه می‌تواند اطلاعات مفید برای صنعت جهت تولید عصاره بالقوه زیست فعال ارائه دهد (۲۳). ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی چندین گیاه از جمله گل‌های گیاه گل همیشه بهار بر روی باکتریهای بی‌هوازی و باکتریهای پرپودنتال هوازی گوناگون مورد بررسی قرار گرفت. عصاره متانولی از گل همیشه بهار فعالیت ضد باکتری بر روی تمامی باکتریهای مورد آزمایش از خود نشان داد (۱۷). در تحقیق دیگر اثرات ضد باکتری چندین

نشان داد اما بیشترین فعالیت ضد باکتری موجود در عصاره استخراج شده با اتر، از برگ‌های خشک در برابر کلبسیلا پنومونیه مشاهده شد (۶). در پژوهش دیگری که در بیمارستان شهر بلفاست انجام شده هدف از تحقیق، بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره متانولی و اتانولی عصاره گل همیشه بهار بر روی پاتوژنهای بالینی از جمله باکتریها و قارچ با استفاده از روش Disc Diffusion انجام شد. عصاره متانولی گل همیشه بهار در مقایسه با عصاره اتانولی، بر روی بیشتر باکتریهای مورد آزمایش فعالیت بازدارندگی بهتری از خود نشان داد (۱۲). در تحقیق دیگر اثرات ضد میکروبی گل همیشه بهار بر روی میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای انسانی به اثبات رسیده است (۱۴). بررسی اثرات ضد میکروبی در کشور هند نشان داد که عصاره استخراج شده از برگ‌های خشک شده از گل همیشه بهار با استفاده از دستگاه سوکسله جهت فعالیت‌های ضد باکتری و ضد قارچی آن با استفاده از روش انتشار در آگار غربال شدند. میکروارگانیسم‌های مورد استفاده برای اثرات ضد باکتریایی و ضد قارچی شامل باسیلوس سوبتیلیس، استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیا کلی، کلبسیلا پنومونیه، کاندیدا آلبیکنس و اسپرژیلوس نایجر بودند. آنتی بیوتیک جتتامایسین ۵ میکروگرم بر میلی لیتر به عنوان استاندارد مورد استفاده قرار گرفت. عصاره استخراج شده از گل همیشه بهار، فعالیت ضد باکتریایی از خودش نشان داد (۷). در پژوهشی دیگر بخش‌های مختلف (برگ، ریشه، ساقه، گل) گل همیشه بهار برای فعالیت ضد میکروبی در برابر برخی از سویه‌های میکروبی بیماری‌زا مهم از جمله باکتری اشریشیا کلی، سودوموناس آئروجینوزا، سوش انتروکوکوس، سوش استافیلوکوکوس، کاندیدا آلبیکنس انجام شد. فعالیت ضد میکروبی عصاره آبی، اتانولی، کلروفورم و اتر گل همیشه بهار با استفاده از روش انتشار در آگار ژل تعیین شد. تمام قسمت‌های گیاه فعالیت ضد میکروبی قابل توجهی را نشان داد اما بیشترین فعالیت ضد میکروبی در عصاره اتر از بخش ساقه گل

همیشه بهار در برابر باکتری اشریشیا کلی مشاهده شد (۱۸). در گزارش دیگری فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های متانولی، کلروفورمی و استونی گل همیشه بهار علیه باکتریهای اشریشیا کلی، ویبریو کلرا و کاندیدا آلبیکنس بررسی شد. عصاره متانولی تنها در برابر باکتری کاندیدا آلبیکنس تأثیر قابل توجهی از خود نشان داد. عصاره کلروفورمی، فعالیت ضد میکروبی در برابر تمامی باکتریها داشت در حالی که عصاره استونی تنها در برابر باکتری اشریشیا کلی مشاهده شد (۲۵). هشتاد و یک گیاه از منطقه مدیترانه اسپانیا از جمله گل همیشه بهار به عنوان عامل ضد میکروبی در طب عامیانه شناسایی شده است. فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های کلروفورمی و متانولی در شرایط آزمایشگاهی از این گیاهان با استفاده از روش رقت در آگار بر روی شش میکروارگانیسم مورد بررسی قرار گرفت و فعالیت ضد باکتری گل همیشه بهار به اثبات رسید (۲۴). فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌های الکلی و آبی دو گیاه از جمله گل همیشه بهار بر روی باکتریهای جدا شده از عفونت‌های دستگاه ادراری انسان انجام شد (اشریشیا کلی، کلبسیلا، پروتئوس و سودوموناس). عصاره آبی گل همیشه بهار بالاترین قطر هاله عدم رشد بر روی باکتری اشریشیا کلی را نشان داد (۵). بررسیها نشان داد که اثرات ضد میکروبی گل گیاه همیشه بهار شناخته شده است (۱۳). ترکیب شیمیایی اسانس گل همیشه بهار فعالیت ضد میکروبی آن بر روی باکتریها به اثبات رسیده است (۱۵). در تحقیق دیگر اثرات ضد باکتریایی اسانس گل گیاه همیشه بهار بر روی دو سوش باکتری اشریشیا کلی ثابت گردیده است (۲۷). در تحقیق دیگر اثرات ضد باکتریایی اسانس گل گیاه همیشه بهار به اثبات رسیده است (۱۰).

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل، نشان از قدرت مهارکنندگی و میکروب‌کشی بالای اسانس گل گیاه همیشه بهار دارد. اثرات ضد باکتریایی اسانس گل گیاه همیشه بهار را می‌توان به وجود

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته کرمان انجام شده است. بنابراین مجری و همکاران مراتب سپاس و قدردانی خود را اعلام می‌دارند.

مقادیر قابل توجه ترکیب‌های کادینن و کادینول در اسانس گیاه در استان کرمان نسبت داد که اثرات ضد باکتریایی این ترکیبها به اثبات رسیده است. لذا با توجه به اثرات ضد باکتریایی اسانس این گیاه در مقایسه با آنتی بیوتیک تتراسایکلین، می‌توان از این اسانس به عنوان ترکیبی با اثرات ضد باکتریایی و با منشأ طبیعی استفاده کرد.

منابع

- ۱- دهقان، زینب. سفیدکن، فاطمه. امامی سید مهدی. کلوندی، رمضان. ۱۳۹۳. تأثیر شرایط اقلیمی بر بازده و کیفیت اسانس *Ziziphora clinopodioides* subsp. *Rigida* (Boiss.) Rech.f. در ریشگاه های مختلف استان همدان. مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران). جلد ۲۷. شماره ۱. صفحات ۶۱-۷۱.
- ۲- رجبیان، طیبه. رحمانی، نصرت. سلیمی، اعظم. شهری طبرستانی، فاطمه. ۱۳۹۳. بررسی اجزای شیمیایی روغن اسانسی
- ۳- زرگری، علی، (۱۳۷۴)، گیاهان دارویی، چاپ پنجم، جلد چهارم، انتشارات دانشگاه تهران
- 4- Adams, R.P., 2001. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy, 4th ed.; Illinois Allured Publication Corporation: Carol Stream, IL, USA.
- 5- Altaai, N.A.A. 2014. The inhibitory effect of *Calendula Officinalis* and *Salvia Officinalis* on growth of some bacterial isolates from urinary tract infections. *International Journal of Advanced Research*. 2(4): 316-322.
- 6- Bissa, S. Bohra, A. 2011. Antibacterial potential of pot marigold. *Journal of Microbiology and Antimicrobials*. 3(3): 51-54.
- 7- Chakraborty G, S. 2008. Antimicrobial activity of the leaf extracts of *Calendula officinalis* (Linn.). *J Herbal Med Tox*. 2(2):65-66.
- 8- Chalchat, J. C.; Garry, R. P.H.; Michet, A., 1991. Chemical composition of essential oil of *Calendula officinalis* L. (Pot Marigold). *Flavour and Fragrance Journal*. 6(3): 189-192.
- 9- Della-Loggia, R.; Tubaro, A.; Sosa, S.; Becke, R. H.; Saar, S. T.; Isaac, O., 1994. The role of triperpenoids in the topical antiinflammatory activity of *Calendula officinalis* flowers. *Planta Med.*, 60(6): 516-520.
- 10- Dorman, H.J.D., and S.G. Deans., 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*. 88(2): 308-316.
- 11- Dumenil G, Chemli R, Balansard C, Guiraud H, Lallemand M. 1980. Evaluation of antibacterial properties of marigold flowers (*Calendula officinalis* L.) and mother homeopathic tinctures of *C. officinalis* L. and *C. arvensis* L. (author's transl). *Annales Pharmaceutiques Françaises*. 38(6):493-499.
- 12- Efstratiou E, Hussain A. I, Nigam P.S, Moore J. E, Ayub M.A, Rao J. R. 2012. Antimicrobial activity of *Calendula officinalis* petal extracts against fungi, as well as Gram-negative and Gram-positive clinical pathogens. *Complementary Therapies in Clinical Practice* 18:173-176
- 13- Ellen, J.B. and Sydney, M.F. 1990. Baily and Scott diagnostic microbiology .8th ed., USA, Missouri.p.543.Evan WC.1996.Trease and Evans Pharmacognosy .14th ed. London,England:W.B.Sounders company limited.p545-546.
- 14- Goyal M, Mathur R. 2011. Antimicrobial effects of *Calendula officinalis* against human pathogenic microorganisms. *J Herbal Med Tox*. 5(1):97-101.
- 15- Janssen AM, Chin NL, Scheffer JJ, Baerheim Svendsen A. 1986. Screening for antimicrobial activity of some essential oils by the agar overlay technique. *Pharm Weekbl Sci*. 8(6): 289-292.

- 16- Hamad, M.N. Mohammed, H.J. Merdaw, M.A. 2011. Antibacterial Activity of *Calendula Officinalis* Flowers in Vitro. *ibn al- haitham j. for pure & appl. sci.* 24(3): 117-124.
- 17- Iauk, L., Lo Bue AM, Milazzo I, Rapisarda A, Blandino G. 2003. Antibacterial activity of medicinal plant extracts against periodontopathic bacteria. *Phytother Res.* 17(6):599-604.
- 18- Mathur, Rashmi and Mamta Goyal, 2011. Antimicrobial and phytochemical estimation of *Calendula officinalis* against human pathogenic microorganisms. *International Journal of Innovations in Biosciences.* 1:1-10.
- 19- Okoh, O.O, Sadimenko, A.P, Asekun O.T and Afolayan A.J. 2008. The effects of drying on the chemical components of essential oils of *Calendula officinalis* L. *African Journal of Biotechnology* 7(10):1500-1502.
- 20- Paolini, J, Barboni, T, Desjobert, J.M, Djabou, N, Muselli, A, Jean Costa, J, 2010. Chemical composition, intraspecies variation and seasonal variation in essential oils of *Calendula arvensis* L. *Biochemical Systematics and Ecology.* 38: 865-874.
- 21- Radulescu, V.; Doneanu, C.; Loloiu, T., 2000. Investigation of chemical composition of *Calendula officinalis*. *Rev. Roum. Chim.*, 45:271-275.
- 22- Ramos A, Edreira A, Vizoso A, Betancourt J, López M, Décalo M. 1988. Genotoxicity of an extract of *Calendula officinalis* L. *J Ethnopharmacol.* 61:49-55.
- 23- Rigane, G., Ben Younes, S., Ghazghazi, H. and Ben Salem, R. 2013. Investigation into the biological activities and chemical composition of *Calendula officinalis* L. growing in Tunisia. *International Food Research Journal* 20(6): 3001-3007.
- 24- Rios JL, Recio MC, Villar A. 1987. Antimicrobial activity of selected plants employed in the Spanish Mediterranean area. *J Ethnopharmacol.* 21(2):139-152.
- 25- Safdar, W. Majeed, H. Naveed, I. Kayani, W. Ahmed, H. Hussain, S. Kamal, A. 2010. pharmacognostical study of the medicinal plant *calendula officinalis* L. (family *compositae*). *International Journal of Cell & Molecular Biology.* 1(2):108-116.
- 26- Sefidkon, F., L. Sadeghzadeh, M. Teimouri, F. Asgari, and Sh. Ahmadi. 2007. Antimicrobial effects of the essential oils of two *Satureja* species (*S. khuzistanica* Jamzad and *S. bachtiarica* Bunge) in two harvesting time. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research.* 23(2):176-182.
- 27- Shahidi Bonjar, G.H., 2004. Screening for antibacterial Properties of some Iranian Plants Against Two Strains of *Escherichia coli*. *Asian J. of Plant Sciences* 3(3):310-314.

Evaluation the qualitative and quantitative essential oil of *Calendula officinalis* and its antibacterial effects

Moghtader M.¹, Salari H.², Mozafari H.² and Farahmand A.¹

¹ Biodiversity Dept., Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, I.R. of Iran

² Ecology Dept., Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, I.R. of Iran

Abstract

To identify chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Calendula officinalis*, the flowers of this plant which grows in a village in Kerman Province in July 2013 were collected. The samples were cleaned and then drying in the shade, making essential oil hydro distillation method was performed. Essential oil was analyzed by capillary gas chromatography (GC) using flame ionization (FID) and capillary gas chromatography coupled mass spectrometry (GC/MS) for detection. Also antibacterial activity of essential oil this plant was determined against gram negative and gram positive bacteria in this study by diameter of inhibition zone. The main oil content from the plants of *Calendula officinalis* was 0.25%. The nineteen compounds were identified in the essential oil of *Calendula officinalis* that concluded 98.56% of the total oil. The major components were δ -cadinene (25.67%), α -cadinol (21.37%), Epi- α -muurolol (12.45%) and γ -cadinene (8.22%). For study of antibacterial activity of the oil sample, the essential oil tested against six bacteria by disc diffusion method. The antibacterial effects of this essential oil was determined against gram positive bacteria *Staphylococcus epidermidis* (PTCC=1436) and *Streptococcus faecalis* (PTCC=1237) and gram negative bacteria *Pseudomonas aeruginosa* (PTCC=11430), *Shigella flexneri* (PTCC=1716), *Klebsiella pneumoniae* (PTCC=1053) and *Escherichia coli* (PTCC=1533). Effect of essential oil of *Calendula officinalis* on gram positive bacterium *Staphylococcus epidermidis*, gram negative bacterium *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* were examined and compared with tetracycline antibiotic. The results showed the essential oil of *Calendula officinalis* had antibacterial effects in comparison to common antibiotics.

Key words: *Calendula officinalis* L., δ -cadinene, antibacterial activity, essential oil, GC/MS.