تعیین ترکیبات شیمیایی و اثر ضدباکتریایی اسانس اسطوخودوس فلس دار بر تعدادی از میکروارگانیسم های بیماری زا در شرایط برون تنی

سمانه حیدری[۱]، حسین جوینده*[۱]، بهروز علیزاده بهبهانی[۱]، محمد نوشاد[۱]

۱) گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۲/۱۴ **تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۳/۱۱**

چکیده

مقدمه: گیاه اسطو خودوس جزء پرمصرف ترین گیاهان دارویی در ایران می باشد که از گذشته تاکنون در طب سنتی مورد استفاده قرار گرفته است. هدف از این پژوهش تعیین ترکیبات شیمیایی و فعالیت ضدباکتریایی اسانس اسطوخودوس فلس دار(گونه انحصاری ایران) بود.

مواد و روش ها: در این پژوهش، ترکیبات شیمیایی اسانس اسطوخودوس فلس دار توسط کروماتوگرافی گازی تعیین شد. هاله عدم رشد میکروبی اسانس اسطوخودوس فلس دار برای باکتری های سودوموناس آئروژینوزا، استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس و اشرشیاکلی در چهار غلظت ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر به روش های انتشار دیسک و انتشار چاهک تعیین شد. از آنتی بیوتیک های رایج درمانی شامل آمپی سیلین، انتروفلوکساسین، جنتامایسین و کانامایسین جهت مقایسه با هاله عدم رشد میکروبی استفاده شد. حداقل غلظت بازدارندگی(رقیق سازی در مایع) و حداقل غلظت کشندگی برای میکروارگانیسم های مذکور تعیین گردید.

یافته های پژوهش: در مجموع ۹۹/۴۱ درصد از ترکیبات موجود در اسانس توسط کروماتوگرافی گازی مشخص گردید. Linalool با ۴۳/۳ درصد دارای بیشترین مقدار در میان ترکیبات شناسایی شده بود. حساس ترین و مقاوم ترین باکتری ها نسبت به اسانس اسطوخودوس فلس دار به ترتیب، استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا با قطر بازدارندگی ۳۰/۷۰±۰/۴۰ و ۱۰/۱۰±۰/۶۸ میلی متر در در غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر بود. حداقل غلظت بازدارندگی برای باکتری های سودوموناس آئروژینوزا، استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس و اشرشیاکلی به ترتیب برابر با ۳۲، ۸، ۱۶ و۱۶ میلی گرم بر میلی لیتر بود.

بحث و نتیجه گیری: نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که اسانس اسطوخودوس فلس دار دارای اثر ضد میکروبی قابل قبولی بر میکروارگانیسم های بیماری زا داشت. در این میان، اثر ضدباکتریایی اسانس بر باکتری های گرم مثبت بیشتر از باکتری های گرم منفی بود. در هر حال، به منظور کاربرد بالینی اسانس اسطوخودوس فلس دار، انجام آزمون های تکمیلی پیشنهاد می گردد.

واژه های کلیدی: اسطوخودوس فلس دار، اسانس روغنی، آنتی بیوتیک رایج درمانی، کروماتوگرافی گازی، اثر ضدمیکروبی

* نویسنده مسئول: گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

Email: hosjooy@asnrukh.ac.ir

Copyright © 2019 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

مقدمه

استفاده از گیاهان دارویی از زمان های گذشته تا به حال در کشورهای مختلف به ویژه ایران رایج بوده است. این گیاهان در موارد زیادی برای درمان بیماری ها و عفونت های میکروبی مورد استفاده قرار گرفته اند. در اوایل قرن بیستم پیشرفت های علم شیمی و کشف سیستم های سنتز ترکیبات آلی، سبب توسعه صنعت داروسازی و جایگزین شدن داروهای شیمیایی به جای داروهای گیاهی شد. هم زمان با این پیشرفت به تدریج اثر مضر داروهای شیمایی و آنتی بیوتیک ها مشخص گردید؛ از دهه ۱۹۵۰ باکتری های بیماری زای متعددی نسبت به آنتی بیوتیک ها از خود مقاومت نشان دادند که این مقاومت هم چنان در حال افزایش می باشد. در سالیان اخیر امکان استفاده از داروهای گیاهی به عنوان جایگزین داروهای شیمیایی و آنتی بیوتیک های رایج درمانی مورد بررسی قرار گرفته است. داروهای گیاهی و اسانس های حاصل از آن ها علاوه بر دارا بودن اثر ضدباکتریایی، ضدقارچی و ضدویروسی گسترده، بر خلاف آنتی بیوتیک های شیمیایی و سنتزی سبب مقاومت دارویی در عوامل بیماری زا نمی شوند(۱).

یکی از گیاهان مورد استفاده در طب سنتی ایرانی گیاه اسطوخودوس می باشد. گیاه اسطوخودوس جز پر مصرف ترین گیاهان دارویی در ایران می باشد. گیاه اسطوخودوس از گذشته تاکنون در طب سنتی مورد استفاده قرار می گیرد. این گیاه از جنس Lavandula، از خانواده نعناعیان می باشد. جنس اسطوخودوس دارای ۳۹ گونه می باشد. در ایران دو گونه چند ساله آن به نام های Lavandula strica و Lavandula sublepidota وجود دارد. گونه انحصاری ایرانی اسطوخودوس فلس دار با نام علمی L. sublepidota می باشد.

اسطوخودوس فلس دار در مناطق جنوبی ایران، جنوب عربستان و شمال آفریقا رشد می کند(۲). از اسانس های روغنی این گیاه جهت مصارف درمانی و آرایشی استفاده می شود. این گیاه دارای اثر آنتی بیوتیکی، ضد قارچی، شل کنندگی، آرام بخشی و ضد افسردگی می باشد. در طب سنتی از این گیاه جهت التیام سوختگی و نیش حشرات استفاده می شود(۳).

اسانس اسطوخودوس که جزء اسانس های با بوی مطبوع طبقه بندی می شود، از تقطیر گل و سرشاخه های گلدار این گیاه به دست می آید. پژوهش های مختلف نشان داده است، قسمت های هوایی گیاه اسطوخودوس نسبت به سایر بخش های گیاه اثر ضدمیکروبی قوی تری دارد(۴). برخی از پژوهش های پیشین ویژگی های درمانی و آرومایی اسطوخودوس را عمدتاً به مونوترپن های آن نسبت می دهند. مونوترپن ها ترکیبات آلی فرار هستند که بخش عمده اسانس اسطوخودوس را تشکیل می دهند. از این مونوترپن ها می توان به لیانول، لیانول استات و کامفور اشاره نمود(۵).

یکی از مهم ترین و معمول ترین میکروارگانیسم هایی که می توانند سبب بروز عفونت ها و بیماری شوند، باکتری ها می باشند. از این میان می توان به باکتری های: اشرشیاکلی، سودوموناس آئروژینوزا، استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس اشاره نمود(۶). اشرشیاکلی باسیل گرم منفی از خانواده آنتروباکتریاسه است و به طور شایع در روده جانوران خونگرم وجود دارد. اشرشیاکلی یکی از باکتری هایی است که می تواند سبب عفونت و اسهال گردد(۷). استافیلوکوکوس اورئوس، کوکسی گرم مثبتی است که از طریق تکثیر و انتشار گسترده در بافت ها و تولید مواد خارج سلولی ایجاد بیماری می کند(۸). سودوموناس آئروژینوزا باکتری گرم منفی و یکی از میکروارگانیسم های مهم در بروز بیماری های عفونی همانند مجاری ادراری، سیستم تنفسی، عفونت های بافت های نرم، عفونت های معده و روده است(۹). باسیلوس سرئوس باکتری گرم مثبت از خانواده باسیلاسه می باشد که می تواند موجب مسمومیت شود(۱۰).

Ahmady-Asbchin و همکاران(۲۰۱۲)، اثر ضد باکتریایی گیاه اسطوخودوس را بر باکتری های گرم منفی و مثبت در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که اسانس تهیه شده از این گیاه دارای اثر ضدباکتریایی مطلوبی بر باکتری های

مورد بررسی داشت. این پژوهشگران بیان کردند که، اسطوخودوس می تواند جایگزین مناسبی برای داروهای شیمیایی به منظور درمان عفونت های میکروبی باشد(۱۱). نتایج حاصل از مطالعه صورت گرفته توسط Zohra و همکاران(۲۰۱۱)، روی اثر ضد میکروبی اسانس اسطوخودوس گونه Lavandula stoechas به روش انتشار دیسک نشان داد که این اسانس توانایی ایجاد هاله اطراف باکتری های اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا را دارد(۱۲). Goran و همکاران(۲۰۱۳)، اسانس گیاه اسطوخودوس را در مهار چند گونه باکتریایی مورد بررسی قرار دادند که سبب حذف و مهار تمامی باکتری های موجود در محیط کشت گردید(۱۳).

هدف از این پژوهش، تعیین ترکیبات شیمیایی و ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی اسانس اسطوخودوس فلس دار(Lavandula sublepidota) بر باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا، استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس و اشرشیاکلی در شرایط برون تنی بود.

مواد و روش ها

این پژوهش تجربی، از آبان ماه ۱۳۹۷ تا اسفندماه ۱۳۹۷در آزمایشگاه های میکروبیولوژی و شیمی گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان صورت پذیرفت.

تهیه مواد شیمایی و محیط های کشت میکروبی: محیط کشت های میکروبی برین هارت اینفوشن براث (مرک آلمان)، مولر هینتون آگار(کیولب کانادا)، مولر هینتون براث(کیولب کانادا)، اتانول ۹۶ درصد(مرک آلمان)، تری فنیل تترازولیوم کلراید(سیگما آلدریچ)، دیسک های حاوی آنتی بیوتیک های آمپی سیلین (۱۰µg)، انتروفلوکساسین(۱۰ µg)، جنتاماسیسن (۱۰µg) و کانامایسین(۳۰ µg)(پادتن ایران) همگی با گرید آزمایشگاهی تهیه شد.

اسانس گیری از گیاه اسطوخودوس فلس دار: بعد از تهیه و تعیین اسم علمی گیاه، عمل اسانس گیری به روش تقطیر با آب و با دستگاه کلونجر انجام پذیرفت. به طور خلاصه، میزان ۵۰ گرم از گیاه اسطوخودوس فلس دار به ۷۵۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه شد. پس از ۳ ساعت عمل اسانس گیری(مکانیسم استخراج اسانس تقطیر بود) شیر دستگاه کلونجر باز شد و اسانس اسطوخودوس فلس دار جمع آوری شد. از سولفات سدیم نیز جهت حذف آب استفاده شد. اسانس تهیه شده تا زمان انجام آزمون های شیمیایی و میکروبیولوژیکی در شیشه تیره رنگ پوشانیده شده با فویل آلومینیومی در دمای یخچال نگهداری شد(۱۱).

بررسی ترکیبات شیمیایی اسانس اسطوخودوس فلس دار: برای تعیین ترکیبات شیمیایی اسانس اسطوخودوس فلس دار از دستگاه کروماتوگرافی گازی (مدل Agilent Technologies 7890 A، آمریکا) و کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی (مدل Agilent Technologies 5975 C، آمریکا) استفاده شد. یک میکرولیتر از اسانس اسطوخودوس فلس دار به دستگاه GC/MS تزریق شد. دمای قسمت تزریق نمونه ۲۸۰ درجه سانتی گراد و گاز مورد استفاده هلیم(۹۹/۹۹ درصد خلوص) با سرعت جریان یک میلی متر در دقیقه بود. سیستم در حالت تقسیم نسبت ۱:۱۰۰ تنظیم شده بود. ستون دستگاه(مدل Agilent Technologies Inc., HP-5 MS، آمریکا) از نوع مویینه با طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی متر و ضخامت ۰/۲۵ میکرومتر بود. دمای ستون، با سرعت ۳ درجه سانتی گراد در دقیقه، از ۶۰ درجه سانتی گراد به ۲۱۰ درجه سانتی گراد افزایش یافت. بلافاصله پس از آن با سرعت ۲۰ درجه سانتی گراد در دقیقه به دمای ۲۵۰ درجه سانتی گراد رسانده شد. پس از انجام تزریق اسانس به دستگاه و به دست آوردن کروماتوگرام، شناسایی و تعیین مقدار هر یک از ترکیبات با استفاده از طیف جرمی استاندارد مشخص گردید(۱۴).

تهیه میکروارگانیسم های بیماری زا و آماده سازی سوسپانسیون آن ها: اشرشیاکلی ATCC ۲۵۹۲۲، سودوموناس آئروژینوزا ATCC ۲۷۸۵۳، استافیلوکوکوس اورئوس ATCC ۲۵۹۲۳ و باسیلوس سرئوس ATCC ۱۴۵۷۹ از کلکسیون میکروبی گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان تهیه شد. از آمپول لیوفیلزه نمونه ها ابتدا کشت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه

سانتی گراد در محیط کشت برین هارت اینفوشن براث انجام شد. سپس کشت میکروبی بر محیط کشت جامد مولر هینتون آگار کشت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انجام گرفت. از استاندارد نیم مک فارلند جهت استاندارد کردن سوسپانسیون میکروبی استفاده شد. استاندارد نیم مک فارلند معادل با($۱/۵\times۱۰^{۸}$ CFU/mL)، باکتری بود(۱۵).

ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی اسانس اسطوخودوس فلس دار: از ۴ آزمون ضدمیکروبی برای بررسی فعالیت ضدباکتریایی اسانس اسطوخودوس فلس دار استفاده شد. این ۴ آزمون شامل: روش های انتشار دیسک و انتشار چاهک برای تعیین هاله عدم رشد میکروبی، روش رقیق سازی در مایع به منظور تعیین حداقل غلظت بازدارندگی(MIC) و هم چنین حداقل غلظت کشندگی(MBC) بود.

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی اسانس اسطوخودوس فلس دار: این آزمون با روش ریز رقت صورت گرفت. به منظور آماده سازی غلظت ها، از روش رقت سازی دو برابری استفاده شد. در این روش ابتدا ۵/۱۲ گرم اسانس اسطوخودوس فلس دار با استفاده از فیلتر میکروبی با قطر منافذ ۰/۴۵ میکرون استریل گردید. اسانس مذکور با ۹/۵ میلی لیتر محیط کشت مولر هینتون براث و ۰/۵ میلی لیتر توئین ۸۰ مخلوط شد. بعد از آن ۵ میلی لیتر از این محلول با ۵ میلی لیتر محیط کشت مولر هینتون براث، درون یک شیشه استریل مخلوط شد. به این ترتیب غلظت سازی ها ادامه داده شد تا غلظت ها نصف گردید. غلظت های متوالی ۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴، ۱۲۸ و ۲۵۶ میلی گرم بر میلی لیتر تهیه شد. از پلیت ۹۶ خانه استریل استفاده شد. پس از آماده سازی رقت ها به هر خانه ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت های تهیه شده ریخته و در نهایت ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی(نیم مک فارلند) اضافه شد. از خانه های حاوی محیط کشت و سوسپانسیون میکروبی فاقد اسانس به عنوان کنترل مثبت، و خانه های حاوی اسانس و محیط کشت به عنوان کنترل منفی استفاده شد. پس از آن انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت صورت گرفت. سپس ۲۰ میکرولیتر معرف تری فنیل تترازولیوم کلراید ۵ درصد به عنوان شاخص رشد میکروبی به هر خانه اضافه گردید و به مدت ۱۵ دقیقه مجدداً گرم خانه گذاری شد. اولین غلظتی که در آن رشد میکروبی انجام نشده باشد و رنگ قرمز تشکیل نشده بود به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی رشد در نظر گرفته شد(۱۶).

تعیین حداقل غلظت کشندگی اسانس اسطوخودوس فلس دار: تعیین حداقل غلظت کشندگی برای هر یک از سویه های میکروبی مورد بررسی قرار گرفت. در این روش با توجه به نتایج آزمون حداقل غلظت بازدارندگی رشد میکروبی از چاهک های فاقد رنگ قرمز ۱۰۰ میکرولیتر برداشته شد و روی پلیت های حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار به روش پورپلیت کشت انجام گرفت. غلظت هایی که فاقد میکروارگانیسم بودند به عنوان حداقل غلظت کشندگی اسانس اسطوخودوس فلس دار میکروارگانیسم های شاخص در نظر گرفته شدند(۱۷).

بررسی قطر هاله بازدارندگی(قطر هاله عدم رشد) اسانس اسطوخودوس فلس دار بر میکروارگانیسم های بیماری زا

روش انتشار دیسک: اساس این آزمایش بر پایه روش کربی-بائر(۱۹۶۶)، می باشد. به این منظور بعد از تهیه محیط کشت مولر هینتون آگار و ریختن آن درون پلیت های ۸ سانتی متری به میزان ۲۵ میلی لیتر، از سوسپانسیون های میکروبی که به صورت استاندارد، برابر با غلظت معادل نیم مک فارلند تهیه شدند ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و روی پلیت های حاوی محیط کشت مذکور به وسیله یک اسپریدر L شکل کاملاً پخش گردید. برای بررسی اثر ضد میکروبی از دیسک های استریل بلانک با قطر ۶ میلی متر استفاده شد. دیسک های بلانک به مدت ۳۰ دقیقه در غلظت های ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر خیسانده شدند؛ سپس دیسک ها با فاصله معین از لبه پلیت قرار گرفتند. بعد از آن تمامی پلیت های حاوی محیط های کشت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. از دیسک های بلانک بدون اسانس به عنوان شاهد استفاده شد(۱۸). برای مقایسه نتایج حاصل از

آزمایش ها و مقایسه تاثیر اسانس بر باکتری های مورد مطالعه، دیسک های آماده حاوی آنتی بیوتیک های رایج درمانی شامل آمپی سیلین، انتروفلوکساسین، جنتامایسین و کانامایسین روی محیط کشت مولر هینتون آگار استفاده شد. نتایج این آزمایش بر اساس میلی متر گزارش گردید.

انتشار در چاهک آگار: در این روش همانند روش انتشار دیسک غلظت های ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر تهیه شد. برای این روش هم از محیط کشت مولر هینتون آگار استفاده گردید. پس از پخش یکسان محیط کشت ها به صورت مذاب به میزان ۲۵ میلی لیتر در هر پلیت ۸ سانتی متری، به وسیله انتهای پیپت پاستور استریل چاهک هایی با قطر ۶ میلی متر و با فاصله یکسان در پلیت ها ایجاد شدند. سپس به منظور جلوگیری از نفوذ اسانس به کف پلیت ها، ته آن ها با محیط کشت مذاب استریل مسدود گردید. از رقت های باکتریایی استاندارد ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و در سه نقطه از پلیت ها ریخته شد. با استفاده از اسپریدر رقت های ریخته شده در تمامی سطح پلیت ها پخش گردیدند. در انتها ۲۰ میکرولیتر از غلظت های آماده شده به وسیله سمپلر در هر چاهک ریخته شد. تمامی پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. بعد از طی زمان مذکور هاله های بازدارندگی با خط کش اندازه گیری شد و به صورت میلی متر گزارش گردید(۱۶).

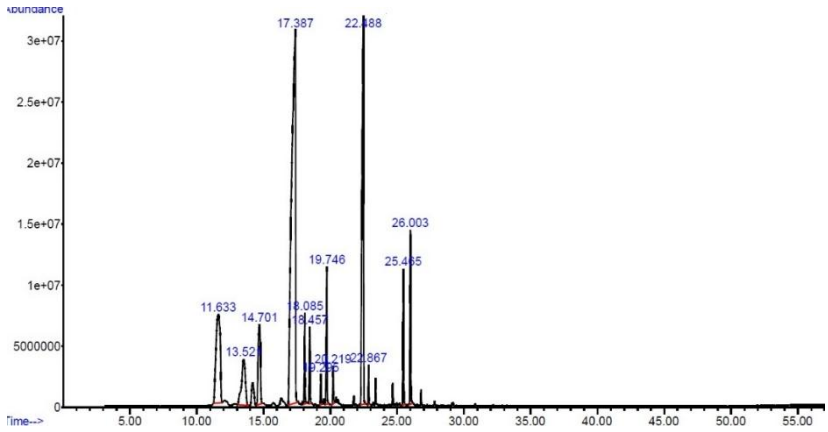
آنالیز آماری: تمامی آزمون ها در سه تکرار انجام گرفت. به منظور مقایسه میانگین بین گروه ها از آنالیز واریانس یک طرفه، و از آزمون چند دامنه دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد جهت مقایسه میانگین ها استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل داده ها از SPSS نسخه ۲۰ استفاده شد.

یافته های پژوهش

بر اساس نتایج کروماتوگرافی گازی اسانس اسطوخودوس فلس دار، ۱۲ ترکیب شناسایی شد که در مجموع ۹۹/۴۱ درصد اجزای سازنده اسانس را تشکیل می داد. در این میان، Linalool با ۴۳/۳ درصد بیشترین مقدار در میان ترکیبات شناسایی شده بود. Linalyl acetate، β-Myrcene، D-limonene و 1,3,6-Octatriene، به ترتیب با درصدهای ۱۹/۱، ۱۱/۶۱، ۵/۴۳ و ۵/۳۱ در جایگاه های بعدی بودند (جدول شماره ۱). کروماتوگرام اسانس اسطوخودوس فلس دار در شکل شماره ۱، نشان داده شده است.

جدول شماره ۱. نتایج حاصل از تعیین ترکیبات شیمیایی اسانس اسطوخودوس فلس دار

ردیف	درصد	ترکیب شناسایی شده
۱	۱۱/۶۱	β- Myrcene
۲	۵/۴۳	D-limonene
۳	۵/۳۱	1,3,6-Octatriene
۴	۴۳/۳	Linalool
۵	۲/۰۲	Alloocimene
۶	۱/۴۶	Camphor
۷	۰/۶۹	Borneol
۸	۳/۵	Terpinen-4-ol
۹	۰/۷۷	α-terpineol
۱۰	۱۹/۱	Linalyl acetate
۱۱	۲/۵۶	Neryl acetate
۱۲	۳/۶۶	Octadien
مجموع	۹۹/۴۱ درصد	



شکل شماره ۱. کروماتوگرام اسانس اسطوخودوس فلس دار

نتایج حاصل از تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی اسانس اسطوخودوس فلس دار بر میکروارگانیسم های اشرشیاکلی، سودوموناس آئروژینوزا، استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس در جدول شماره ۲، نشان داده شده است. بیشترین غلظت بازدارندگی مربوط به باکتری گرم منفی سودوموناس ائروژینوزا با غلظت ۳۲ میلی گرم بر میلی لیتر و کمترین غلظت بازدارندگی مربوط به باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس با غلظت ۸ میلی گرم بر میلی لیتر بود. حداقل غلظت کشندگی برای تمامی سویه ها بیشتر از ۵۱۲ میلی گرم بر میلی لیتر مشاهده شد.

جدول شماره ۲. نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی اسانس اسطوخودوس فلس دار بر سودوموناس ائروژینوزا، اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس بر حسب میلی گرم بر میلی لیتر

سویه های بیماری زا	حداقل غلظت مهارکنندگی	حداقل غلظت کشندگی
سودوموناس آئروژینوزا	۳۲	≥۵۱۲
اشرشیاکلی	۱۶	≥۵۱۲
استافیلوکوکوس اورئوس	۸	≥۵۱۲
باسیلوس سرئوس	۱۶	≥۵۱۲

نتایج حاصل از بررسی مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد به روش چاهک آگار مشابه روش انتشار دیسک بود. بیشترین تاثیر اسانس بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس با قطر هاله ۳۰/۷±۰/۴۰ میلی متر بود. کمترین تاثیر بر باکتری سودوموناس آئروژینوزا با قطر هاله ۱۰/۱۰±۰/۶۸ میلی متر مشاهده شد. در سایر غلظت های مشابه نیز میانگین قطر هاله باکتری سودوموناس آئروژینوزا نسبت به استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس و اشرشیاکلی کمتر بود(جدول شماره ۳).

نتایج حاصل از انتشار دیسک در جدول شماره ۳، نشان داده شده است. این نتایج بیانگر تاثیر مثبت اسانس اسطوخودوس فلس دار بر باکتری های مورد مطالعه بود. نتایج نشان داد که بیشترین تاثیر اسانس بر باکتری استافیوکوکوس اورئوس با قطر بازدارندگی ۲۷/۶۰±۰/۴۲ میلی متر در غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر بود. کمترین تاثیر مربوط به باکتری سودوموناس آئروژینوزا با قطر بازدارندگی ۸/۲±۰/۳۵ در میلی متر در غلظت مشابه ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر بود.

نتایج حاصل از مقایسه تاثیر آنتی بیوتیک های رایج درمانی با اسانس اسطوخودوس فلس دار علیه باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، اشرشیاکلی و سودوموناس آئروژینوزا نشان داد که تمامی آنتی بیوتیک ها در مقایسه با بیشترین غلظت مورد استفاده اسانس(۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر) تاثیر کمتری بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس داشتند(جدول شماره ۳). برای باکتری اشرشیاکلی تنها آنتی بیوتیک کانامایسین تاثیر کمتری نسبت به استفاده از غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر داشت(جدول شماره ۳).

جدول شماره ۳. فعالیت ضد میکروبی(قطر هاله عدم رشد) اسانس اسطوخودوس فلس دار و دیسک های آنتی بیوتیک رایج درمانی بر میکروارگانیسم های بیماری زا در شرایط آزمایشگاهی بر حسب میلی متر

غلظت	میکروارگانیسم			
	سودوموناس ائروژینوزا	اشرشیاکلی	استافیلوکوکوس اورئوس	باسیلوس سرئوس
اسانس اسطوخودوس	چاهک آگار(میلی متر)			
۱۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر	–	–	b۰/۵۰±۸/۲۰	a۰/۷۶±۶/۵۰
۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر	a۰/۷۹±۶/۳۰	a۰/۸۳±۷/۰۰	b۰/۶۲±۱۲/۰۰	a۰/۸۰±۷/۳۰
۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر	b۰/۹۵±۷/۹۰	b۰/۵۰±۸/۹۰	c۰/۹۱±۱۷/۳۰	b۰/۴۶±۹/۱۰
۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر	c۰/۶۸±۱۰/۱۰	c۰/۵۰±۱۱/۰۰	d۰/۴۰±۳۰/۷۰	c۰/۵۰±۱۳/۲۰
اسانس اسطوخودوس	دیسک دیفیوژن آگار(میلی متر)			
۱۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر	–	-	a۰/۶۰±۷/۲۰	–
۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر	–	-	b۰/۵۵±۱۱/۵۰	a۰/۶۰±۶/۲۰
۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر	a۰/۸۵±۷/۳۰	a۰/۹۳±۸/۱۰	c۰/۵۰±۱۵/۱۰	b۰/۳۹±۸/۹۰
۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر	a۰/۳۵±۸/۲۰	a۰/۳۳±۹/۴۰	d۰/۴۲±۲۷/۶۰	b۰/۲۸±۱۰/۰۰
دیسک های آنتی بیوتیک	کربی-بوئر(میلی متر)			
آمپی سیلین	-	-	a۰/۵۰±۶/۵۰	-
انتروفلوکساسین	a۰/۵۰±۱۴/۰۰	a۰/۴۲±۱۳/۵۰	b۰/۸۷±۱۵/۶۰	a۰/۶۹±۱۰/۳۰
جنتامایسین	b۰/۴۰±۲۰/۲۰	b۰/۶۱±۲۱/۰۰	c۰/۵۵±۲۰/۲۰	b۰/۵۰±۲۱/۱۰
کانامایسین	c۰/۵۰±۶/۸۰	c۰/۵۵±۹/۳۰	d۰/۵۰±۱۰/۰۰	b۰/۳۵±۲۰/۱۰

نتایج حاصل از میانگین سه تکرار(آزمون آماری دانکن) در سطح معنی داری($P\leq0.05$) است و داده ها به صورت میانگین±انحراف معیار آورده شده است.
حروف غیرمشابه در یک ستون نشان دهنده تفاوت معنی داری در سطح ۵ درصد می باشد.
(–) هاله عدم رشد مشاهده نشد.

بحث و نتیجه گیری

با توجه به افزایش موارد مقاومت دارویی در میکروارگانیسم ها، راه حل مناسب در این موضوع جایگزینی کردن موادی با عملکرد مناسب و متفاوت علیه میکروب ها می باشد. از جمله مواد دارویی که می توانند مورد مصرف انسان قرار گیرند و دارای حداقل اثر جانبی باشند، اسانس های گیاهی می باشند. اسانس ها به دلیل دارا بودن ترکیبات منحصر به فرد خود توانایی مقابله بر طیف گسترده ای از میکروارگانیسم ها را دارا می باشند(۱۹). این مطالعه نیز با توجه به موارد گفته شده و با هدف بررسی تعیین ترکیبات شیمیایی و فعالیت ضد میکروبی اسانس اسطوخودوس فلس دار روی سویه های باکتریایی اشرشیاکلی، سودوموناس آئروژینوزا، استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس صورت گرفت. نتایج شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس اسطوخودوس فلس دار در پژوهش حاضر نشان داد که Linalool با ۴۳/۳ درصد دارای بیشترین مقدار در میان ترکیبات شناسایی شده بود. Dimitra و همکاران(۲۰۰۰)، ترکیبات شیمیایی تعدادی از گیاهان دارویی از جمله گونه ای از گیاه اسطوخودوس را از لحاظ ترکیبات شیمیایی مورد بررسی قرار دادند. نتایج پژوهش این محققین نشان داد که عمده ترین ترکیبات موجود در اسانس، مربوط به Linalool (۴۴/۵ درصد) و Linalyl acetate (۳۲/۷ درصد) بود(۲۰). Falk و همکاران (۲۰۰۹)، بیشترین اجزای موجود در اسانس

اسطوخودوس را به ترتیب Linalool (۲۲/۸ درصد)، Myrcene (۲۰/۸ درصد)، Limonene (۱۱/۷ درصد) و Linalyl acetate (۸/۴ درصد) گزارش دادند(۲۱). نتایج پژوهش های De Rapper و همکاران(۲۰۱۶)، نشان داد که Linalyl acetate (۳۶/۷ درصد) و Linalool (۳۱/۴ درصد) ترکیبات اصلی در اسانس اسطوخودوس هستند(۲۲). نتایج حاصل از این مطالعات با نتایج حاصل از این پژوهش هم خوانی داشت. تفاوت موجود در درصدهای گزارش شده در مطالعات مختلف می تواند مربوط به تفاوت در نوع گونه، شرایط اقلیمی رشد، زمان برداشت، مدت زمان نگهداری و نحوه اسانس گیری مرتبط باشد(۱۶).

مطالعات متفاوتی ارتباط میان ساختار شیمیایی و اجزای موجود در اسانس را با فعالیت ضد میکروبی اسانس نشان می دهند. در واقع اسانس ها دارای خواص ضد میکروبی وسیعی هستند اما ساز و کار دقیق آن ها در مقابله با رشد میکروبی به طور واضح مشخص نشده است. شواهدی وجود دارد که نشان می دهد اسانس ها اثر خود را از طریق تغییر ساختار غشاء روی میکروارگانیسم می گذارند. می توان گفت که اسانس ها نفوذپذیری غشا را افزایش داده و اجزای اسانس بعد از ورود به غشا آن را متورم کرده و فعالیت آن را کاهش می دهند که این امر نهایتاً منجر به مرگ سلول می گردد(۲۳).

در روش چاهک آگار اسانس اسطوخودوس فلس دار در غلظت ۱۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر بر باکتری های سودوموناس آئروژینوزا و اشرشیاکلی تاثیر نداشت اما بر باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس دارای تاثیر بود. در سطح $P\leq0.05$ اختلاف معنی داری در استفاده از غلظت های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر اسانس برای باکتری سودوموناس آئروژینوزا مشاهده شد. برای باکتری استافیلوکوکوس اورئوس نیز در سه غلظت مشابه تفاوت معنی دار بود؛ اما با غلظت های مشابه در باکتری سودوموناس آئروژینوزا تفاوت معنی داری نداشت. استفاده از چهار سطح غلظت علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس تفاوت معنی دار در هر سطح غلظت را نشان داد؛ این تفاوت معنی دار در باکتری باسیلوس سرئوس نیز مشاهده گردید. استفاده از غلظت های ۱۲/۵ و ۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر برای باکتری باسیلوس سرئوس تفاوت معنی داری نداشت(جدول شماره ۳).

در روش دیسک آگار، اسانس اسطوخودوس فلس دار در غلظت ۱۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر تنها بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس تاثیرگذار بود، که نشان دهنده حساسیت بیشتر این باکتری نسبت به اسانس اسطوخودوس نسبت به سایر سویه ها بود. نتایج حاصل از آزمون دانکن نشان داد که از لحاظ آماری استفاده از غلظت های ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر اسانس با غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر اسانس در باکتری های سودوموناس آئروژینوزا، اشرشیاکلی و باسیلوس سرئوس در سطح $P\leq0.05$ معنی دار نبوده است؛ اما غلظت های مذکور برای باکتری استافیلوکوکوس اورئوس دارای تفاوت معنی دار در سطح $P\leq0.05$ بودند. هم چنین استفاده از اسانس علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در تمامی غلظت ها دارای اختلاف معنی داری بود.

تمامی آنتی بیوتیک های مورد مطالعه به جز آنتی بیوتیک انتروفلوکساسین که تاثیر کمتری نسبت به استفاده از غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر اسانس داشت، نسبت به اسانس اسطوخودوس تاثیر بیشتری بر باکتری باسیلوس سرئوس داشتند. در خصوص باکتری سودوموناس آئروژینوزا در غلظت های ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر تاثیر بیشتر اسانس نسبت به آنتی بیوتیک های انتروفلوکساسین و جنتامایسین مشاهده شد. نتایج حاصل از مقایسه آنتی بیوتیک ها بر باکتری ها همانند روش های دیسک و چاهک بیشترین و کمترین تاثیر را به ترتیب بر باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا نشان داد(جدول شماره ۵).

Tabatabaei Yazdi و همکاران(۲۰۱۴)، حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی دو گونه اسطوخودوس و رزماری را در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که، میزان حداقل غلظت بازدارندگی اسانس اسطوخودوس بر سویه های سالمونلاتیفی، لیستریا مونوسیتوژنز،

باسیلوس سرئوس، انتروکوکوس فیکالیس و انترو باکتر ائروژنز به ترتیب برابر با ۸، ۲، ۴، ۴ و ۱۶ میلی گرم بر میلی لیتر بود. حداقل غلظت کشندگی برای باکتری های مذکور نیز برابر با ۳۲، ۴، ۱۶، ۱۶ و ۳۲ میلی گرم بر میلی لیتر بود(۲۴). Alizadeh Behbahani و همکاران(۲۰۱۸)، تفاوت دیواره باکتری های گرم مثبت در قیاس با باکتری های گرم منفی را دلیل اصلی حساسیت بیشتر باکتری های گرم مثبت نسبت به عصاره ها و اسانس های گیاهی ذکر کردند. زیرا باکتری های گرم مثبت در دیواره سلولی خود دارای ترکیب موکوپپتید بوده، در حالی که باکتری های گرم منفی فقط لایه نازکی از موکوپپتید دارند و قسمت اعظم ساختمان دیواره در آن ها لیپوپروتئین و لیپوپلی ساکارید است، به همین علت در مقابل مواد ضدباکتریایی مقاوم ترند(۲۵). Tardugno و همکاران(۲۰۱۸)، اثر اسانس حاصل از دو گونه Lavandula intermedia و Lavandula angustifolia گیاه اسطوخودوس را بر باکتری های لیستریا مونوسیتوژنوز و سالمونلا اینتریکا مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران اثر بازدارندگی این اسانس ها را بر باکتری های مورد مطالعه تایید کرد(۲۶). نتایج حاصل از مطالعه حاضر نیز با پژوهش های قبلی صورت گرفته هم خوانی داشت. بررسی حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی اسانس اسطوخودوس علیه میکروارگانیسم های مورد مطالعه نشان داد که، باکتری های گرم منفی سودوموناس ائروژینوزا و اشرشیاکلی نسبت به باکتری های گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس میزان MIC بیشتری دارند. Mashak و همکاران(۲۰۱۶)، اثر ضدمیکروبی فیلم های تهیه شده از کیتوزان حاوی اسانس اسطوخودوس روی برخی از باکتری های بیماری زا شامل لیستریا مونوسیتونز، استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلی، باسیلوس سرئوس و ویبریو پاراهمولیتیکوس را مورد بررسی قرار دادند. نتایج این محققان نشان داد که اسانس اسطوخودوس دارای اثرات ضدمیکروبی روی تمامی باکتری های مورد مطالعه است. در بین باکتری های مورد مطالعه این اسانس بیشترین تاثیر بر باکتری ویبریوپاراهمولیتیکوس و کمترین تاثیر بر باکتری اشرشیاکلی مشاهده شد(۲۷).

Bayrak و همکاران(۲۰۱۷)، اثر ضدباکتریایی عصاره های اتانولی و متانولی حاصل از برگ و گل های گیاه اسطوخودوس گونه Lavandula stoechas را روی شش میکروارگانیسم باسیلوس سابتلیس، استافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلاتیفی موریوم، انتروکوکوس فیکالیس، اشرشیاکلی، لیستریا مونوسیتوژنز، یرسینیا انتروکولیتیکا و کاندیدا آلبیکنس مورد بررسی قرار دادند. نتایج این محققین نشان داد که عصاره های اتانولی و متانولی حاصل از گل های گیاه اسطوخودوس بر باکتری های باسیلوس سابتلیس، استافیلوکوکوس اورئوس، یرسینیا انتروکولیتیکا و لیستریا مونوسیتوژنز تاثیرگذار بوده است(۲۸). Moghadami و همکاران(۲۰۱۲)، اثر ضد میکروبی عصاره های آبی و الکلی گیاه اسطوخودوس گونه Lavandula angustifolia را بر باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس و استرپتوکوکوس پیوژنز مورد بررسی قرار دادند. نتایج این محققین نشان داد که بیشترین اثر ضد میکروبی مربوط به استفاده از عصاره الکلی برگ در غلظت ۱۵ میلی گرم بر میلی لیتر برای باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و ۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر برای باکتری استرپتوکوکوس پیوژنز بود. هم چنین این پژوهشگران بیان کردند که عصاره الکی تاثیر بیشتری نسبت به عصاره آبی دارد و این تاثیر در برگ ها بیشتر از گل ها بود که با مطالعه قبلی متفاوت می باشد. دلیل این امر احتمالاً به دلیل متفاوت بودن دو گونه اسطوخودوس می باشد. میزان MIC و MBC برای استافیلوکوکوس اورئوس در هر دو نوع عصاره آبی و الکلی برگ و گل ۱۵ میلی گرم بر میلی لیتر و میزان MIC و MBC برای باکتری استرپتوکوکوس پیوژنز برابر با ۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر برای عصاره الکلی و ۲۰ و ۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر برای عصاره آبی گزارش شد(۲۹). Shirugumbi و همکاران(۲۰۱۰)، اثر اسانس حاصل از گونه Lavandula bipinnata گیاه اسطوخودوس را مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که، این اسانس دارای اثر ضد میکروبی بر باکتری های اشرشیاکلی، سودوموناس

آئروژینوزا، شیگلا دیسانتری، انتروکوکوس فیکالیس، استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سابتلیس دارد. قطر هاله بازدارندگی برای باکتری های مورد نظر به ترتیب برابر با ۱۰، ۷، ۱۱، ۱۰، ۱۳ و ۱۳ میلی متر گزارش شد. میزان MIC برای این باکتری ها به ترتیب برابر ۰/۵، ۲، ۱، ۲، ۱ و ۱ میلی گرم بر میلی لیتر بود(۳۰). نتایج حاصل از بررسی انتشار دیسک و انتشار چاهک و مقایسه آن با آنتی بیوتیک های رایج درمانی نیز دلالت بر اثر ضد میکروبی وسیع این اسانس علیه میکروارگانیسم ها بود. این نتایج نشان داد که با افزایش غلظت اسانس قطر هاله بازدارندگی افزایش می یابد. تغییر خاصیت ضد میکروبی اسانس ها در رقت های مختلف می تواند به دلیل تغییر مقدار ترکیبات فلاونوئیدی یا اشکال فعال آن ها باشد(۱۶).

به طور کلی نتایج این پژوهش نشان داد که در میان باکتری های مورد مطالعه، حساس ترین باکتری نسبت به اسانس اسطوخودوس فلس دار باکتری استافیلوکوس اورئوس بود؛ به طوری که حتی کمترین میزان اسانس سبب جلوگیری از رشد و ایجاد هاله بازدارندگی در این میکروارگانیسم گردید. مقاوم ترین باکتری نسبت به اسانس اسطوخودوس فلس دار باکتری سودوموناس آئروژینوزا بود که کمترین قطر در روش انتشار دیسک و چاهک را به خود اختصاص داد. نتایج حاصل از روش انتشار دیسک و چاهک نیز همانند آزمون حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی تاثیر بیشتر اسانس بر باکتری های گرم مثبت را نشان داد. نتایج نشان داد که Linalool با ۴۳/۳ درصد بیشترین مقدار در میان ترکیبات شناسایی شده اسانس بود. در هر حال، به منظور کاربرد بالینی اسانس اسطوخودوس فلس دار، انجام آزمون های تکمیلی پیشنهاد می‌گردد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله بر خود لازم می دانند که از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان بابت حمایت های مادی و معنوی صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند. لازم به ذکر است مقاله حاضر مستخرج از پایان نامه کارشناسی ارشد و دارای کد ۱۴۴۷۹۷۵ در پژوهشگاه علوم و فناوری اطلاعات ایران(ایرانداک) می باشد.

References

1.Sotelofelix J, Martinezfong D, Muriel P, Santillan R, Castillo D, Yahuaca P. Evaluation of the effectiveness of Rosmarinus officinalis Lamiaceae in the alleviation of carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in the Rat. J Ethnopharmacol 2002;81:145-54. doi: 10.1016/s0378-8741(02)00090-9

2.Golfakhrabadi F, Yousefbeyk F, Hassanzadeh A, Sadat Hamedi S. [Lavender in Iranian traditional medicine and new studies]. J Islam Iranian Trad Med2017;8:161-72. (Persian)

3.Alishtayeh M, Yaghmour RMR, Faidi Y, Salem K, Alnuri M A. Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian area. J Ethnopharmacol1998;60:265-71.

4.Roberts RM, Gilbert JC, Rodewald LB, Wingrove AS. An introduction to modern experimental organic chemistry. 2th ed. Holt Rinehart Winston New York Publication. 1969;P.24-8.

5.Adsersen A, Gauguin B, Gudiksen L, Jager AK. Screening of plants used in Danish folk medicine to treat memory dysfunction for acetylcholinesterase inhibitory activity. J Ethnopharmacol 2006;104:418-22. doi: 10.1016/j.jep.2005.09.032

6.Tabatabaieyazdi F, Alizadehbehbahani B, Heidarisureshjani M, Mortazavi SA. [The in vitro study of antimicrobial effect of Teucrium polium extract on infectious microorganisms]. J Hamadan Uni Med Sci 2014;21:16-24. (Persian)

7.Shinobu K, Massika M. Inactivation of Escherchia coli and Streptococcus mantus by ultrasound at 500 KHz. J Ultrason Sonochem 2009;16:655-9. doi.org/10.1021/jp2038653

8.Piyasena P, Mohareb E. Inactivation of microbes using ultrasound. J Food Microbiol 2003; 87:207-16. doi: 10.1016/s0168-1605(03)00075-8

9.Imanifooladi AA, Riazipour M, Sattari M. [Molecular and serological detection of

enterotoxigenic Staphylococcus aureus from traditionally dairy products]. J Kurdistan Uni Med Sci 2010; 11:19-26. (Persian) doi: 10.22102/20.5.74
10.Lay JL, Bahloul H, Serino S, Jobin M, Schmitt PH. Reducing activity glucose metabolism and acid tolerance response of Bacillus cereus grown at various pH and oxydo-reduction potential levels. Food Microbiol 2015;46:314-321. doi: 10.1016/j.fm.2014.07.007
11.Ahmadyasbchin S, Nasrolahiomran A, Jafari N, Mostafapour MJ, Kia M. [Antibacterial effects of Lavandula stoechas essential oil on gram positive and negative bacteria invitro]. Med Lab J2012;6: 35-41.(Persian)
12.Zohra M, Atik F. Antibacterial activity of essential oils from Cistus Ladaniferus L and Lavandula stoechas L.Int J PharmTech Res 2011;3:484-487.
13.Goran A, Mozafari A, Ghaderi N. Effect of antimicrobial compounds in grapes Vitis.vinifera L surface sterilized explants invitro. Con Agr Res 2013;6:1-4.
14.Mohamadisani M, Esmaeilpour M, Behnam M. [Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil from Shirazi Turnip root Brasica rappa L invitro conditions]. J Food Microbiol2017;4:31-40. (Persian)
15.Mcfarland J. Nephelometer an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. J Am Med Ass1907;14: 1176-8.doi:10.1001/jama.1907.25320140022001f
16.Alizadehbehbahani B, Shahidi F, Tabatabaeiyazdi F, Mortazavi S, Mohebbi M. Use of Plantago major seed mucilage as a novel edible coating incorporated with Anethum graveolens essential oil on shelf lifeextension of beef in refrigerated storage. Int J Biolo Macromole 2017;94:51526. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.10.055
17. Lee S. Minimum inhibitory concentration of chlorhexidine and Cetylpyridinium chloride against a mixture of two species of oral Streptococci. J Adv Microbiol 2018;8:1-6. doi: 10.9734/JAMB/2018/38780
18. Niasati S, Pourhaji F. [Antibacterial effects of Allium jesdianum extracts on some infectious microorganisms invitro]. Iranian J Inf Dis Trop Med2018;22:23-32. (Persian)
19. Kalemba D, Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Curr Med Chem2003;10:813-29. doi: 10.2174/0929867033457719
20. Dimitra J, Basil N, Moschos G. GCMS analysis of essential oils from some Greek romatic plants and their fungitoxicity on Penicillium digitatum. J Agr Food Chem2000;48:2576 -81.
21. Falk L, Biswas K, Boeckelmann A, Lane A, Mahmoud S. An efficient method for the micropropagation of lavenders regeneration of a unique mutant. J Essen Oil Res2009;21:225-8. doi: 10.1080/10412905.2009.9700154
22. Rapper S, Viljoen A, Vuuren S. The invitro antimicrobial effects of Lavandula angustifolia essential oil in combination with conventional antimicrobial agents. Evid Bas Comp Alt Med 2016.doi: 10.1155/2016/2752739
23. Holly RA, Patal D. Improvement in shelf life and safely of perishable food by plant essential oil and smoke antimicrobials. Food Chem 2005;22:273-92. doi: 10.1016/j.fm.2004.08.006
24. Tabatabaeiyazdi F, Alizadehbehbahani B, Mortazavi, S. Investigating the minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of the Lavandula stoechas L and Rosmarinus officinalis L extracts on pathogen bacterias invitro. J Paramed Sci 2014;5:91-101.doi: 10.22037/jps.v5i2.5926
25.Alizadehbehbahani B, Tabatabaeiyazdi F, Vasiee A, Mortazavi SA. Oliveria decumbens essential oil chemical compositions and antimicrobial activity against the growth of some clinical and standard strains causing infection. Microb Path 2018;114:449-52. doi: 10.1016/j.micpath.2017.12.033.
26.Tardugno R, Serio A, Pellati F, Damato S, Lopez C, Bellardi M, et al. Lavandula x intermedia and Lavandula angustifolia essential oils phytochemical composition and antimicrobial activity against foodborne pathogens. Nat Prod Res2018;21:1-6. doi: 10.1080/14786419.2018.1475377
27.Mashak Z, Fayazfar S, Cheraghi, N. [Antimicrobial effect of Chitosan film incorporated with Lavandula stoechas on

some food borne bacteria]. J Food Microbiol2016;3:55-62. (Persian)
28.Bayrak D, Okmen G, Arsalan A. The biological activities of Lavandula stoechas L against food pathogens. Int J Second Metab 2017;4:270-9. doi: 10.21448/ijsm.372221
29.Moghadami F, Dolatabadi S, Nazem, H. [Antimicrobial activity of alcohol and aqueous extract of Lavandula angustifolia leaves and flowers on Staphylococcus pyogenes and Staphylococcus aureus]. J Zanjan Uni Med Sci 2012;20:52-62. (Persian)
30.Shirugumbihanamanthagouda M, Bhimashyakakkalameli S, Madhavanaik P, Nagella P, Seetharamareddy H, Niranjana H. Essential oils of Lavandula bipinnata and their antimicrobial activities. Food Chem 2010;118:836-9. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.05.032

Invitro Determination of Chemical Compounds and Antibacterial Activity of Lavandula Essential oil against some Pathogenic Microorganisms

*Heydari S[1], Jooyandeh H[*1], Alizadehbehbahani B[1], Noshad M[1]*

(Received: May 4, 2019 Accepted: June 1, 2019)

Abstract

Introduction: The lavender is one of the most widely used medicinal plants in Iran, which has been used in traditional medicine since the past. This study aimed to identify the chemical compounds and antibacterial activity of Lavandula sublepidota essential oil which is an endemic species in Iran.

Materials & Methods: In this study, chemical compounds of Lavandula sublepidota essential oil were identified using gas chromatography. The inhibition zone diameter of the Lavandula sublepidota essential oil on Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, and Escherichia coli was identified on a concentration of 12.5, 25, 50, and 100 mg/ml, respectively, by disk and well diffusion methods. Common antibiotics, including Ampicillin, Enrofloxacin, Gentamicin, and Kanamycin were used to compare the microbial inhibition zone diameters. Moreover, minimum inhibitory concentration (MIC) (diluted in liquid) and minimum bactericidal concentration of the aforementioned microorganisms were determined in this study.

Findings: In total, 99.41% of the essential oil compounds were identified using gas chromatography. Linalool was found to be the most abundant among the identified compounds (43.3%). The most sensitive and resistant bacteria to Lavandula sublepidota essential oil were S. aureus and P. aeruginosa with inhibition zone diameter of 30.70±0.40 and 10.10±0.68 in a concentration of 100 mg/ml, respectively. Moreover, the MICs of P. aeruginosa, S. aureus, B. cereus, and E. coli were estimated at 32, 8, 16, and 16 mg/ml, respectively.

Discussion & Conclusions: The results of this study revealed that Lavandula sublepidota essential oil has an acceptable antibacterial activity against the pathogenic microorganisms. However, gram-positive bacteria obtained higher antimicrobial activity of the essential oil, compared to gram-negative bacteria. It is recommended that further studies be conducted to investigate the clinical application of Lavandula sublepidota essential oil.

Keywords: Antimicrobial activity, Common therapeutic antibiotics, Gas chromatography, Essential oil, Lavandula sublepidota

1.Dept of Food Sciences and Technology, Faculty of Animal Sciences and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran
**Corresponding author Email: hosjooy@asnrukh.ac.ir*