مجله دانش نوین کشاورزی پایدار
جلد ۱۰، شماره ۲(۲): ۴۲-۳۳
ویژه‌نامه محصولات باغی
(تابستان ۱۳۹۳)

اثر ضدباکتریایی اسانس اسطوخودوس بر باکتری *Xanthomonas campestris* و *Escherichia coli*

مریم ربانی
دانش‌آموخته کارشناسی ارشد
گروه زراعت و اصلاح نباتات
واحد مشهد
دانشگاه آزاد اسلامی
مشهد، ایران
نشانی الکترونیک ✉:
maryamrabani662@yahoo.com

رویا رضائیان دلویی*
استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات
واحد مشهد
دانشگاه آزاد اسلامی
مشهد، ایران
نشانی الکترونیک ✉:
royarezaeian@mshdiau.ac.ir
(مسؤل مکاتبات)

مهدی جباری نوقابی
استادیار گروه آمار
دانشگاه فردوسی مشهد
مشهد، ایران
نشانی الکترونیک ✉:
jabbarinm@math.um.ac.ir

چکیده استفاده از فرآورده‌های طبیعی به جای مواد شیمیایی و آنتی‌بیوتیک‌ها در مهار باکتری‌ها مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. این تحقیق با هدف تعیین اثر ضد باکتریایی اسانس اسطوخودوس بر دو باکتری *Xanthomonas campestris* و *Echerichia colis* در شرایط آزمایشگاهی انجام گرفت. فعالیت ضدباکتریایی اسانس در مقایسه با آنتی‌بیوتیک جنتامایسین با استفاده از روش نشر در آگار تعیین گردید. حداقل غلظت باکتری‌ایستایی اسانس با استفاده از روش سری دو برابر رقت لوله‌ای با تهیه غلظت‌های مختلف از ۰/۰۰۴ تا ۴٪ در محیط کشت آگار مغذی مشخص شد. حداقل غلظت کشندگی نیز با استفاده از روش کشت در محیط آگار مغذی تعیین گردید. همچنین ترکیبات شیمیایی اسانس اسطوخودوس با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی شناسایی گردید. میانگین قطر هاله عدم رشد در باکتری *X. campestris* از ۰/۳۵ ± ۳/۸۳ تا ۰/۷۷ ± ۱۸/۷ میلی‌متر به ترتیب در غلظت‌های ۰/۲۵ تا ۴٪ و در باکتری *E. coli* در غلظت‌های ۰/۱۲۵ تا ۴٪ از ۰/۷ ± ۴/۵ تا ۰/۹ ± ۱۷/۶ میلی‌متر متغیر بود. حداقل غلظت باکتری‌ایستایی و کشندگی اسانس اسطوخودوس علیه باکتری *X. campestris* به ترتیب معادل ۱ و ۲٪ و در مورد باکتری *E. coli* به ترتیب معادل ۰/۱۲۵و ۰/۲۵٪ بود. بیشترین ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس اسطوخودوس شامل لینالول (۴۴/۹۴٪) و ۸،۱-سینئول (۲۱/۵٪) بودند. نتایج این مطالعه نشان داد که می‌توان از اسانس اسطوخودوس به عنوان ترکیب ضدمیکروبی طبیعی در مبارزه با این دو باکتری بیماریزا استفاده نمود.

شناسه مقاله:
نوع مقاله: **پژوهشی**
تاریخ پژوهش: **۱۳۹۲**
تاریخ دریافت: **۹۳/۰۱/۲۳**
تاریخ پذیرش: **۹۳/۰۵/۱۳**

واژه‌های کلیدی:
- **آللوپاتی**
- **باکتری‌ایستایی**
- **باکتری‌کشی**
- **حداقل غلظت کشندگی**
- **حداقل غلظت مهارکنندگی**
- **فعالیت ضدباکتریایی**

مقدمه باکتری *Xanthomonas campestris* یک باکتری میله‌ای شکل، گرم منفی با یک تاژک قطبی متحرک، متعلق به خانواده سودوموناسه[1] و بیمارگر گیاهی بذرزاد است.[۲] باکتری *Escherichia coli* جزو خانواده انتروباکتریاسه[2] در روده انسان و حیوانات زندگی و در آب و فرآورده‌های کشاورزی دیده می‌شود. این باکتری یکی از شایع‌ترین عوامل باکتریایی است که از عفونت‌های انسانی جدا شده است.[۶]

امروزه استفاده از ترکیبات ضدمیکروبی طبیعی گیاهی در مهار عوامل بیمارگر و به ویژه باکتری‌ها کاربرد وسیعی پیدا کرده است.[۲۷،۱۶،۱۲] تا به حال حدود ۳۰۰۰ نوع اسانس گیاهی شناسایی شده است که ۳۰۰ نوع آنها از نظر تجارتی دارای اهمیت می‌باشند و عمدتاً به منظور ایجاد عطر و طعم مورد استفاده قرار می‌گیرند.[۲۱] اسانس گیاهی از سالیان دور به عنوان ترکیبات ضدمیکروبی طبیعی در رشته‌های داروشناسی، میکروب‌شناسی پزشکی، بیماری‌شناسی گیاهی و نگهداری مواد غذایی شناخته شده و برخلاف آنتی‌بیوتیک‌ها باعث ایجاد مقاومت دارویی در عوامل بیماریزا نمی‌شوند. اغلب اسانس‌های گیاهی استخراج شده دارای خواص ضدقارچی، ضدانگلی، ضدویروسی و ضدباکتریایی می‌باشند.[۲۶،۲۳،۱۷،۴] این ترکیبات با سازوکارهای مختلف روی باکتری‌ها اثر گذاشته و مانع رشد و تکثیر آنها می‌شوند.[۱،۱۳،۲۸] بیشتر اسانس‌ها در داشتن گروه‌های فعال فنولی در ساختارشان با یکدیگر مشترک هستند. اسانس‌ها در واقع به صورت پیش‌سازهای غیرفعال ذخیره شده در بافت‌های گیاهی تولید و در پاسخ به تنش‌های محیطی آزاد می‌گردند.[۲۰،۱۸] فعالیت ضدباکتریایی اسانس‌های گیاهی عمدتاً به واسطه حضور ترکیبات ترپنوئیدی و فنلی از جمله تیمول[3]، کارواکرول[4] و اوژنول[5] می‌باشد.[۱۰] خواص ضدباکتریایی اسانس‌های گیاهی و ترکیبات آنها به طور وسیعی علیه تعداد زیادی از باکتری‌های گرم منفی و مثبت بررسی شده است. باکتری‌های گرم منفی نسبت به گرم مثبت‌ها به خاطر داشتن غشای لیپوپلی‌ساکاریدی مقاومت بیشتری به اسانس‌های گیاهی نشان می‌دهند.[۸]

اسطوخودوس[6] گیاهی است دایمی با برگ‌های باریک که در درمان عفونت‌های ریه، مهبل، معالجه خروسک و آسم، سردرد، گزش حشرات، آماس مثانه، بهبود ناراحتی‌های معده استفاده می‌شود. اسانس اسطوخودوس از برگ‌ها و گل‌های گیاه به دست می‌آید و دارای ترکیبات مختلف شامل استات لینالیل[7]، اسید بوتریک[8]، اسید پروپیونیک[9]، اسید والریک[10]، لینالول[11] آزاد می‌باشد.[۲۱]

گوران و همکاران (۲۰۱۳) اسانس گیاه اسطوخودوس را در مهار چند گونه باکتریایی مورد بررسی قرار دادند که سبب حذف و مهار تمامی باکتری‌های موجود در محیط کشت گردید.[۱۱] *سویلوم و همکاران (۲۰۱۰)* به منظور بررسی اثرات ضدقارچی پیکره رویشی اسانس رزماری، اسطوخودوس و مرزنجوش علیه *Botrytis cinerea* روی میوه گوجه‌فرنگی آزمایش‌هایی را انجام دادند. نتایج آنها نشان داد بخار اسانس مرزنجوش در غلظت ۰/۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر هوا به طور کامل از رشد قارچ جلوگیری می‌نماید. اسانس رزماری و اسطوخودوس در غلظت ۱/۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بازدارنده کامل رشد قارچ بودند. در این مطالعه نشان داده شد که اسانس اسطوخودوس دارای خاصیت

[1] *Pseudomonaceae*
[2] Entrobactriaceae
[3] thymol
[4] carvacrol
[5] eugenol
[6] *Lavandula angustifolia* Mill.
[7] linalyl acetate
[8] butyric acid
[9] propionic acid
[10] Valeric acid
[11] Linalool

بازدارندگی کامل بر رشد قارچ *B. cinerea* می‌باشد.[۲۹] در مطالعه‌ای *رسولی و همکاران (۲۰۰۰)* نتیجه گرفتند که اسانس اسطوخودوس تأثیر ضدمیکروبی خوبی روی *E. coli* دارد.[۲۵] *دورمن و همکاران (۱۹۹۵)* اثرات ضدباکتریایی‌اسانس اسطوخودوس را روی گونه‌های متعدد باکتری‌ها مطالعه و نشان دادند که اسانس اسطوخودوس دارای اثرات ضدباکتریایی متفاوتی روی باکتری‌ها می‌باشد.[۹] *احمدی آب چین و همکاران (۲۰۱۲)* اثر ضدباکتریایی اسانس گیاه اسطوخودوس را روی باکتری‌های گرم منفی و مثبت بررسی و نشان دادند که اسانس اسطوخودوس می‌تواند جایگزین داروهای شیمیایی برای درمان عفونت‌های میکروبی گردد.[۳]

مطالعه حاضر با هدف تعین اثر بازدارندگی اسانس اسطوخودوس و تعیین حداقل غلظت باکتری ایستایی[۱] و حداقل غلظت کشندگی[۲] بر باکتری‌های *Xanthomonas campestris* و *Escherichia coli* به عنوان عوامل بیماریزا انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد گیاهی و باکتری‌ها

در این مطالعه از اسانس اسطوخودوس تهیه شده از شرکت باریج اسانس استفاده گردید. از سویه باکتری *X. campestris* (PTCC 1473) و باکتری *E. coli* (PTCC 1330) تهیه شده از مرکز منطقه‌ای کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران، به عنوان استاندارد استفاده شد. ابتدا سویه استاندارد در شرایط سترون روی ظرف پتری حاوی محیط آگار مغذی کشت داده شد. ظروف مذکور به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۶ و ۳۷ درجه سلسیوس به ترتیب برای *X. campestris* و *E. coli* گرمخانه‌گذاری گردید. سپس از پرگنه‌های تازه رشد کرده برداشته و سوسپانسیونی معادل استاندارد نیم مک فارلند[۳] (۱۰^۸ × ۱/۵ سلول باکتری بر میلی‌لیتر) تهیه شد.

شناسایی ترکیبات اسانس

به منظور شناسایی ترکیبات تشکیل دهنده اسانس از دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف‌سنج جرمی[۴] واجد ستون مویینه DB-5 با قطر داخلی ۲۵۰ میکرومتر، ضخامت فیلم ۰/۲۵ میکرومتر و طول ستون ۳۰ متر استفاده گردید. از گاز هلیوم به عنوان گاز حامل با سرعت ۲ میلی‌لیتر در دقیقه استفاده شد. بعد از تزریق ۱ میکرولیتر اسانس، کروماتوگرام[۵] حاصله و طیف‌های جرمی ترکیبات مختلف آن بررسی شد. ترکیبات اسانس در مقایسه با اندیس‌های بازداری نسبی[۶] مربوط به ان– آلکان‌ها[۷] با موارد موجود در سایر تحقیقات شناسایی شدند. شناسایی طیف‌ها بر اساس بانک اطلاعات جرمی دستگاه، زمان بازداری ترکیبات[۸]، محاسبه اندیس کواتس[۹] و الگوی شکست آنها در مقایسه با طیف‌های استاندارد انجام گرفت. درصد نسبی هر یک از ترکیبات تشکیل دهنده اسانس با توجه به سطح زیر منحنی هر یک از پیک‌های کروماتوگرام دستگاه و مقایسه آن با سطح کل زیر منحنی تعیین گردید.

روش نشر در آگار

خاصیت ضدباکتریایی اسانس اسطوخودوس بر اساس آزمون زیست‌سنجی به روش نشر در آگار تعیین گردید.[۵] بدین منظور سوسپانسیون باکتریایی در محلول

[1] minimal inhibitory concentration (MIC)
[2] minimal bactericidal concentration (MBC)
[3] McFarland standard
[4] GC-MS (Varian Star 3400 cx, USA)

[5] chromatogram
[6] relative retention indexes
[7] n-alkane
[8] retention time
[9] Kovats index

سرم فیزیولوژی سترون تهیه و ۰/۱ میلی‌لیتر از آن روی محیط آگار مغذی[1] و محیط مولر هینتون آگار[2] کشت داده و به وسیله میله شیشه‌ای به طور کامل روی محیط پخش شد. بعد از خشک شدن سطح محیط روی هر کدام از دیسک‌های کاغذی سترون به قطر ۶ میلی‌متر، ۱۵ میکرولیتر از هر کدام از غلظت‌های تهیه شده از اسانس اسطوخودوس (۰/۰۰۴، ۰/۰۰۸، ۰/۰۱۶، ۰/۰۳۲، ۰/۰۶۴، ۰/۱۲۵، ۰/۲۵٪، ۰/۵، ۱، ۲ و ۴٪) ریخته شد. از دیسک آنتی‌بیوتیک جنتامایسین (۱۰ میکروگرم) ساخت شرکت پادتن طب به عنوان شاهد مثبت و دیسک حاوی ۱۵ میکرولیتر آب مقطر سترون به عنوان شاهد منفی استفاده گردید. دیسک‌های حاوی اسانس، شاهدان مثبت و منفی در سه تکرار روی محیط کشت قرار داده شدند. تمامی ظروف پتری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۶ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شدند. فعالیت ضدباکتریایی بر مبنای اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک‌ها بر حسب میلی‌متر انجام گرفت.

حداقل غلظت باکتری‌ایستایی و کشندگی

برای تعیین حداقل غلظت باکتری ایستایی اسانس از روش سری دو برابر رقت لوله‌ای[3] در محیط کشت مغذی استفاده شد. برای این منظور یک سری ۱۱ عددی لوله آزمایش در نظر گرفته شد واز غلظت ۰/۰۰۴ تا ۴٪ (حجمی/حجمی) اسانس با محیط کشت تهیه گردید. سپس از باکتری‌های مورد نظر به غلظت 10^6 سلول باکتری بر میلی‌لیتر به هر کدام از لوله‌ها تلقیح گردید. تمامی آزمایش‌ها در سه تکرار انجام گرفت. برای هر تکرار، یک لوله شاهد منفی فاقد باکتری و یک لوله شاهد مثبت و فاقد اسانس تهیه شد. تمامی لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای مناسب گرمخانه‌گذاری شده و پس از طی این مدت، لوله‌ها از نظر کدورت حاصل از فعالیت و رشد باکتری مورد بررسی ظاهری قرار گرفتند. حداقل غلظت باکتری‌ایستایی رشد برای لوله‌ای در نظر گرفته شد که حاوی کمترین غلظت اسانس باشد و کدورت قابل ملاحظه‌ای در آن ایجاد نشده باشد. برای تعیین حداقل غلظت کشندگی باکتری از لوله‌هایی که در آنها کدورت قابل مشاهد دیده نشد روی محیط کشت جامد مولر هینتون آگار کشت داده شد. تمامی ظروف پتری به مدت ۲۴ ساعت در دمای متناسب با رشد هر یک از باکتری‌های مورد نظر گرمخانه گذاری گردید. کمترین غلظتی که هیچ رشدی از باکتری در آن مشاهده نشد به عنوان حداقل غلظت کشندگی در نظر گرفته شد. در تمامی آزمایش-های شرایط گرمخانه برای باکتری *X. campestris* دمای ۲۶ و برای *E. coli* دمای ۳۷ درجه سلسیوس بود.

داده‌های به دست آمده در این مطالعه با استفاده از نرم افزار SPSS ver. 16 تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از آزمون تجزیه واریانس یک طرفه شدند. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵٪ انجام شد.

نتایج و بحث اسانس‌های گیاهی از منابع بالقوه واجد ترکیبات ضد باکتریایی می‌باشند. مقایسه نتایج گزارش شده در خصوص اثرات ضدباکتریایی اسانس‌های مختلف بسیار مشکل می‌باشد. با توجه به روش‌های مختلف تهیه اسانس‌ها، روش‌های مختلف بررسی خواص ضدباکتریایی و باکتری‌های مورد استفاده، از مدل‌های مختلفی در بررسی خواص ضدباکتریایی اسانس‌ها استفاده شده است. در برخی از این روش‌ها از مدل‌های آزمایشگاهی چون محیط کشت و در برخی دیگر از مدل‌های غذایی برای بررسی اثرات ضد باکتریایی اسانس‌ها استفاده می‌شود.[۵] ارتباط ساختارهای شیمیایی برخی از اجزای غالب موجود در اسانس‌ها

[1] nutrient agar medium (Merck Co., Germany)
[2] Muller Hinton agar (Merck Co., Germany)
[3] macrobroth dilution

با فعالیت ضدباکتریایی آن‌ها گزارش شده و اسانس‌هایی که دارای ترکیبات فنولی مانند تیمول، کارواکرول، گاماترپینن[1] و پاراسیمن[2] هستند خاصیت ضدباکتریایی شدیدی در آن‌ها گزارش شده است. اگرچه بروز فعالیت ضدباکتریایی اغلب بسیار واضح است، ولی سازوکار عمل آن به طور کامل درک نشده است. شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد اسانس‌ها اثر ضد باکتریایی خود را از طریق تغییر ساختار و عمل غشای سلولی اعمال می‌کنند. بررسی‌های صورت گرفته در خصوص سازوکار عمل اسانس اثبات نموده که این ترکیب‌ها نفوذپذیری غشاء را افزایش می‌دهند. اجزای اسانس با نفوذ در غشا منجر به متورم شدن آن شده و فعالیت آن را کاهش می‌دهد و در نهایت منجر به مرگ سلول خواهد شد.[۱۴] پژوهشگران اظهار نمودند که گروه هیدروکسیل موجود در مولکول اجزای اسانس مانند کارواکرول، تیمول، پاراسیمن و منتول[3] برای بروز خاصیت ضد باکتریایی آنان بسیار مهم است. اسانس اسطوخودوس دارای حدود ۴۰٪ استات لینالول است. همچنین در آن ترکیباتی نظیر اسیدبوتریک، اسیدپروپیونیک، اسیدوالریک، لینالول آزاد وجود دارد.[۳۰] در مطالعه حاضر از محیط کشت آزمایشگاهی به عنوان بررسی خواص ضد باکتریایی اسانس اسطوخودوس استفاده گردید. با انجام آزمایش‌های کروماتوگرافی مشخص شد که گیاه اسطوخودوس دارای ۲۶ ماده مختلف می‌باشد که لینالول از جمله فراوان‌ترین مواد تشکیل‌دهنده اسانس اسطوخودوس می‌باشند. بیشترین اجزای تشکیل‌دهنده اسانس اسطوخودوس شامل لینالول با ۴۴/۹۴٪ و ۸،۱-سینئول با ۲۱/۵٪ می‌باشد که با مطالعات قبلی مطابقت دارد.[۱۹]

جدول ۱- ترکیبات شیمیایی اسانس گیاه اسطوخودوس

Table 1- Chemical analysis of lavender **essential oils**

Chemical agent	Kovats index	Percentage (%)
linalool	1095	44.94
1,8- cineol	1031	21.5
limonene	1029	0.8
roesfuran epoxide	1175	9.3
menthone	1150	4.2
isomenthol	1183	4.8
dihydrocarvone	1200	3.8
camphor	1147	5.6
p-cymene	1024	0.9
total	-	95.84

[1] γ-terpinene
[2] paracymene
[3] menthol

روش نشر در آگار

با افزایش غلظت اسانس خاصیت ضدباکتریایی آن نیز افزایش می‌یابد. قطر هاله عدم رشد در باکتری *X. campestris* در غلظت ۰/۲۵٪ معادل ۳/۸۳ و در غلظت ۴٪ معادل ۱۸/۷ میلی‌متر بود. در باکتری *E. coli* قطر هاله عدم رشد در غلظت ۰/۱۲۵٪ معادل ۴/۵ و در غلظت ۴٪ معادل ۱۹/۵ میلی‌متر بود. در غلظت‌های کمتر از ۰/۲۵٪ در *X. campestris* و ۰/۱۲۵٪ در باکتری *E. coli* هیچگونه هاله عدم رشدی مشاهده نگردید (جدول ۲). میانگین قطر هاله عدم رشد در باکتری *X. campestris* در غلظت ۴٪ اسانس تقریباً با قطر هاله عدم رشد در خصوص استفاده از آنتی‌بیوتیک جنتامایسین برابر بود. در حالی که میانگین قطر هاله عدم رشد در باکتری *E. coli* در غلظت ۴٪ اسانس از قطر هاله عدم رشد در جنتامایسین بیشتر بود. در *E. coli* اسانس اسطوخودوس نسبت به آنتی‌بیوتیک جنتامایسین دارای اثرات مشابه و یا قوی‌تری بود در حالی که اثرات اسانس در مقایسه با جنتامایسین در *X. campestris* ضعیف‌تر بود. در غلظت های ۰/۲۵ الی ۴٪ اسانس، هاله عدم رشد باکتری *X. campestris* وجود داشت. میانگین قطر هاله عدم رشد

جدول ۲- اثر ضد باکتریایی غلظت‌های مختلف اسانس اسطوخودوس علیه باکتری‌های *X. campestris* و *E.coli*

Table 2- Antibacterial effect of lavender **essential oils against *X. campestris* and E. coli**

concentration (v/v %)	*Xanthomonas campestris* (Mean ± SE)	*E.coli* (Mean ± SE)
0 (Negative control)	- a	- a
0.004	- a	- a
0.008	- a	- a
0.016	- a	- a
0.032	- a	- a
0.064	- a	- a
0.125	- a	4.5 ± 0.7 c
0.25	3.83 ± 0.35 b	7.5 ± 0.88 cd
0.5	6.4 ± 0.7 b	11.1 ± 0.85 de
1	11.9 ± 0.6 c	13.6 ± 0.85 ef
2	15.5 ± 0.88 cd	16.4 ± 0.45 fh
4	18.7 ± 0.77 def	19.5 ± 0.6 g
Gentamycin (10µg)	18.4 ± 0.71 ef	17.6 ± 0.9 fgh

(–) فعالیت ضدباکتریایی نداشت.

* مقادیری که با حروف یکسان نشان داده شده اند در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار نیستند.

(-) with no antibacterial activity.

* Values shown with the same letter(s) are not significant at $p < 0.05$.

در غلظت ۰/۲۵٪ اسانس معادل ۳/۸۳ و در غلظت ۴٪ معادل ۱۸/۷ میلی‌متر بود. همچنین قطر هاله عدم رشد در جنتامایسین معادل ۱۸/۴ میلی‌متر بود. در غلظت کمتر از ۰/۲۵٪ هیچگونه هاله عدم رشد مشاهده نگردید. بین گروه‌های مورد مطالعه در غلظت‌های بالاتر از ۰/۲۵٪ از لحاظ ایجاد هاله عدم رشد اختلاف معنی-داری در سطح ۰/۰۵ وجود داشت (جدول ۲). نتایج به دست آمده در این مطالعه با نتایج حاصل از مطالعه *احمدی آب چین و همکاران (۲۰۱۲)* همخوانی دارد. در این مطالعه خاصیت ضد باکتریایی اسانس گیاه اسطوخودوس روی باکتری‌های گرم منفی و مثبت در شرایط آزمایشگاه مورد بررسی و مشخص گردید که اسانس گیاه اسطوخودوس می‌تواند جایگزین داروهای شیمیایی برای درمان عفونت‌های میکروبی گردد.[۳]

همچنین اسانس اسطوخودوس در غلظت‌های بالاتر دارای اثرات باکتری‌ایستایی بیشتری بر باکتری *X. campestris* بود که با نتایج به دست آمده از مطالعه *رنجبر و همکاران (۲۰۰۸)* همخوانی دارد. ایشان در مطالعه‌ای اثر اسانس گل اسطوخودوس، بذر رازیانه[1] و بذر زیره سبز[2] و پیکره رویشی نعناع فلفلی[3] را روی قارچ‌های عامل پوسیدگی و کپک پس از برداشت میوه توت فرنگی به ترتیب *Aspergillus niger*، *Botrytis cinera* و *Rhizopus stolonifer* در محیط کشت بررسی گردید. اسانس‌های رازیانه و زیره سبز دارای فعالیت ضدقارچی بالایی بوده و اسانس زیره سبز به روش غوطه‌وری در مهار قارچ عامل پوسیدگی خاکستری میوه توت فرنگی بیشترین تأثیر را نشان داد و با قارچکش تیابندازول (۱/۵در هزار) به روش غوطه‌وری در یک گروه آماری قرار گرفت. در صورتی که اسانس زیره سبز به روش محلول پاشی روی میوه در مهار عامل بیماری ناشی از *R. stolonifer* موثرتر بود.[۲۴] *سویلوم و همکاران (۲۰۱۰)* به منظور بررسی اثرات ضد قارچی پیکره رویشی اسانس های رزماری، اسطوخودوس و مرزنجوش علیه *Botrytis cinera* روی میوه گوجه فرنگی آزمایش‌هایی را انجام دادند.

[1] *Foeniculum vulgare*
[2] *Cumminum cyminum*
[3] *Mentha piperita*

نتایج آنها نشان داد بخار اسانس مرزنجوش در غلظت ۰/۲ میکروگرم برمیلی‌لیتر هوا بطور کامل از رشد قارچ جلوگیری می‌نماید. اسانس‌های رزماری و اسطوخودوس در غلظت ۱/۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بازدارنده کامل رشد قارچ بودند. در شرایط استفاده اسانس روی بوته گوجه فرنگی مؤثرترین اسانس مرزنجوش بود که توانست بوته گوجه فرنگی را در برابر قارچ محافظت کند.[۲۴] *برومند و همکاران (۲۰۰۸)* در مطالعه‌ای اثر ضد میکروبی اسانس حاصل از بذرهای شوید و گشنیز بر سه عامل بیماری‌زای غذایی *Staphylococcus aureus*، *E. coli* O157:H7 و *Salmonella typhimurium* را بررسی و کمترین غلظت باکتری ایستایی و کشندگی آن‌ها را تعیین کردند. باکتری *S. aureus* حساس‌ترین و *S. typhimurium* مقاوم‌ترین باکتری به هر دو اسانس بودند. اسانس بذر گشنیز نسبت به اسانس بذر شوید بازدارندگی بیشتری بر باکتری‌های گرم منفی داشت.[۶] *حسین زاده و همکاران (۲۰۱۱)* حداقل غلظت باکتری ایستایی لیزوزیم[1] و آویشن شیرازی بر *E. coli* O157:H7 را بررسی کردند. بالاترین غلظت لیزوزیم نیز نتوانست مانع رشد باکتری مذکور گردد. استفاده توأم لیزوزیم و اسانس باعث کاهش حداقل غلظت باکتری ایستایی نشد اما ترکیب این دو ماده باعث افزایش فاز تأخیری شده که دارای اهمیت در میکروبیولوژی مواد غذایی است.[۱۵]

حداقل غلظت باکتری‌ایستایی و کشندگی

حداقل غلظت باکتری‌ایستایی اسانس اسطوخودوس برای باکتری *X. campestris* معادل ۱٪ و برای باکتری *E. coli* معادل ۰/۵٪ بود. در این غلظت‌ها هیچگونه رشد قابل مشاهده‌ای برای هیچکدام از باکتری‌ها وجود نداشت. حداقل غلظت کشندگی اسانس اسطوخودوس برای *X. campestris* معادل ۲٪ و برای *E. coli* معادل ۱٪ بود. در غلظت معادل حداقل غلظت باکتری ایستایی میانگین قطر هاله عدم رشد در باکتری *X. campestris* معادل ۱۱/۹ و در باکتری *E. coli* ۱۱/۱ میلی‌متر بود. *گوران و همکاران (۲۰۱۳)*اثرات ضدباکتریایی اسانس اسطوخودوس بر مهار چندین باکتری در محیط کشت را بررسی و اثر اسانس اسطوخودوس بر مهار باکتری *X. campestris* را گزارش نمودند[۱۱] نتایج این مطالعه نیز نشان داد که اسانس اسطوخودوس دارای اثرات ضد باکتریایی قابل‌توجهی بر *X. campestris* می‌باشد. *عروجعلیان و همکاران (۲۰۱۰)* حداقل غلظت باکتری‌ایستایی اسانس زنیان، زیره سبز و زیره پارسی روی *E. coli* را ۰/۰۳ تا ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر گزارش کردند. حداقل غلظت بازدارندگی اسانس زنیان علیه *Listeria monocytogenes* در محیط کشت آزمایشگاهی ۰/۰۲٪ برآورد گردید. *احمدی آب چین و همکاران (۲۰۱۲)* اثر ضد باکتریایی اسانس گیاه اسطوخودوس را روی باکتری‌های گرم منفی و مثبت در شرایط آزمایشگاه بررسی و نشان دادند که اسانس گیاه اسطوخودوس می‌تواند جایگزین داروهای شیمیایی برای عفونت‌های میکروبی گردد.[۳] اسانس زنیان نسبت به اسانس‌های دیگر مورد بررسی خاصیت ضدباکتریایی قوی‌تری داشت.[۲۲]

نتیجه گیری کلی اسانس اسطوخودوس اثر ضدباکتریایی درخور توجهی علیه باکتری‌های *E. coli* و *X. campestris* بوده و می‌توان از آن به عنوان یک ترکیب ضدباکتریایی طبیعی به جای سموم شیمیایی یا آنتی‌بیوتیک‌ها در مبارزه با باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی و یا انسانی استفاده کرد.

سپاسگزاری نویسندگان از دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد و مجتمع آموزشی گلبهار به خاطر حمایت مالی از اجرای این پروژه تحقیقاتی تشکر و قدردانی می‌کنند.

[1] lysozyme

References

1. Aghel N, Moghimipour E, Ameri A (2007) Characterization of an antidermatophyte cream from *Zataria multiflora boiss*. Iranian Journal of Pharmacological Science 3: 77–84.
2. Agrios GN (1997) Plant Pathology. 4th ed. Academic press. USA.635.
3. Ahmady-abchin S, Nasrolahi omran A, Jafari N, Mostafapour MJ, Kia M (2012) Antibacterial effects of *Lavandula Stoecha*s Essential Oil, on Gram Positive and Negative Bacteria In Vitro. Medical Laboratory Journal 6:2.35-41.
4. Akhondzadeh-Basti A, Razavilar V, Misaghi A, Radmehr B, Abbasifar R, Yazdani D ,Akhoundzadeh S (2004) Effect of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil on probability of growth initiation of *Staphylococcus aureus* in a brain heart infusion broth. Journal of Medicinal Plants 3: 53-61.
5. Andrews JM (2001) Determination of minimum inhibitory concentrations. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 48: 5-16.
6. Broomand A, Hamedi M, Emamjomeh Z, Razavi SH, Gholmakani MT (2008) Investigation on the antimicrobial effects of essential oils from dill and coriander seeds on *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimuruim*. Iranian Food Science and Technology Research Journal 4: 59-68.
7. Burt S (2004) Essential oils their antibacterial properties and potential applications in food a review. International Journal of Food Microbiology 94(3): 223–253.
8. Conner D.E (1993). Naturally occurring compounds In Davidson PM and Branen AL (Eds). Antimicrobials in Foods 2nd ed. Marcel Dekker Inc. New York 441–467.
9. Dorman D, Deans SG, Noble RC, Surai P (1995) Evaluation in vitro of plant essential oils as natural antioxidants. Journal essential Oil Research 7(6): 645-651.
10. Dufour M, Simmonds RS, Bremer PJ (2003) Development of a method to quantify in vitro the synergistic activity of "natural" antimicrobials. International Journal of Food Microbiology 85(3): 249 - 258.
11. Goran A, Mozafari A, Ghaderi N (2013) Effect of antimicrobial compounds in grapes *Vitis.vinifera* L. surface sterilized explants in vitro. Congress of Agricultural Research University of Kurdistan 6:1-4.
12. Hasanzadeh N (2005) Technological implication of natural products in plant diseases management with special emphasis on fireblight. Journal of agricultural sciences Islamic Azad University 1:53-67.
13. Hemaiswarya S, Kruthiventi AK, Doble M (2008) Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. Phytomedici E 15:639–652.
14. Holly RA, Patal D (2005) Improvement in shelf life and safely of perishable food by plant essential oil and smoke antimicrobials. Food Chemistry 22: 273-292.
15. Hoseinzadeh A, Mohajerfar T, Akhondzadeh basti A, Khanjari A, Gandomi nasrabadi H, Misaghi A, Sadeghi S (2011) Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of lysozyme and *Zataria multiflora* Bioss. essential oil on *E. coli* O157: H7. Journal of Medicinal Plants 11:208-217.
16. Karami-Osboo R, Khodaverdi M, Ali-Akbari F (2010) Antibacterial Effect of Effective Compounds of Satureja hortensis and *Thymus vulgaris* Essential Oils against *Erwinia amylovora*. Journal of Agricultural Science Techology,12(1): 35-45.
17. Kordali S, Kotan R, Mavi A, Cakir A, Ala A, Yildirim A (2005) Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of Artemisia dracunculus and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish Artemisia absinthium, A. dracunculus Artemisia santonicum and Artemisia spicigera essential oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53: 9452-9458.
18. Lo Cantore P, Iacobellis NS, De Marco A, Capasso F, Senatore F (2004) Antibacterial activity of *Coriandrum sativum* L. and *Foeniculum vulgare* Miller var. *vulgare* (Miller) essential oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52: 7862-7866.
19. Maberley DJ *(*1997) A portable dictionary of vascular plants. 2nd ed. Cambridge university press, 210-215.
20. Mohajerfar T, Hoseinzadeh A, Akhondzadeh basti A, Khanjari A, Misaghi A, Gandomi nasrabadi H (2012) Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of *Zataria multiflora* Bioss. essential oils and lysozim on *L. monocytogenes*. Journal of Medicinal Plants 11: 70-78.
21. Omidbeigi R (1995) Approaches to production and processing of medicinal plants. 2nd ed., Behnashr, Tehran.
22. Oroojalian F, Kasra-Kermanshahi R, Azizi M, Bassami MR (2010) Phytochemical composition of the essential oils from three Apiaceae species and their antibacterial effects on food-borne pathogens. Food Chemistry 120: 765-770.
23. Oorojalian F, Kasra-Kermanshhi R, Azizi M, Basami MR (2009) Synergistic antibacterial activity of the essential oils from three medicinal plants against some important food-borne pathogens by microdilution method. Iranian Journal of Medical and Aromatic Plants 26: 133-146.

24. Ranjbar H, Farzaneh M, Sharifii R, Hadian J, Mirjalili MH (2008) Classification of selected multi-cut Persian clover germplasm of National Plant Genebank based on agronomic traits. Pajouhesh and Sazandegi 81: 54-60
25. Rasoli A, Rezaie MB (2000). A study on antimicrobial activity and chemical compositions of essential oil from flowers of *Lavandula angutifolia* and *Salvia officinalis*. Journal of Kerman University of Medical Sciences 7: 173-181.
26. Rodriguez DJ, Castillo DH, Garcia RR, Sanchez LA (2005) Antifungal activity of *Aloe vera* pulp and liquid fraction against plant pathologenic fungi. Industrial Crops and Products 21:81-87.
27. Smid EJ, Gorris LGM (1999) Natural antimicrobials for food preservation. Handbook of Food Preservation. New York: Marcel Dekker 285–308.
28. Soltandalal MM, Bayat M, Yazdi MH, Aghamiri S, Ghorbanzade-Meshkani M, Peimane- Abedimohtaseb T, Shojai-Saadi B (2012) Evaluation of antimicrobial effect of *Zataria multiflora* essential oil on antibiotic resistant *Staphylococcus aureus* isolates from food products. Journal of Kurdistan University of Medical Sciences 17: 21-29.
29. Soylum M, Kurt S, Soylu S (2010) In vitro and in vivo antifungal activities of the essential oil of various plants againsttomato grey mould disease agent Botrytis cinerea. International Journal of Food Microbiology 143:183-189.
30. Ulte A, Bennik MHJ, Moezelaar R (2002) The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food pathogen *Bacillus cereus*. Applied and Environmental Microbiology 68: 1561-1568.

Antibacterial effect of lavender essential oils on *Xanthomonas campestris* and *Escherichia coli*

Modern Science of Sustainable Agriculture Journal

Special issue for horticultural crops

Vol. 10, No. 2(2), 33-42, Summer 2014

Maryam Rabani

Master of seed science and technology
Department of Agronomy and Plant Breeding
Mashhad Branch
Islamic Azad University
Mashhad, Iran

Email ✉:
maryamrabani662@yahoo.com

Roya Rezaeian-Doloei*

Assistant professor
Department of Agronomy and Plant Breeding
Mashhad Branch
Islamic Azad University
Mashhad, Iran

Email ✉:
royarezaeian@mshdiau.ac.ir
(Corresponding author)

Mehdi Jabari-Noghabi

Assistant professor
Department of Statistics,
Ferdowsi University of Mashhad
Mashhad, Iran

Email ✉:
jabbarinm@math.um.ac.ir

Received: 12 April, 2014 **Accepted:** 27 July, 2014

ABSTRAT Using of natural products instead of chemicals and antibiotics to control bacterial pathogens is interest of researchers. The aim of this study was to determine antibacterial effects of lavender essential oil against *Xanthomonas campestris* and *Escherichia coli* in laboratory condition. Chemical compounds of lavender essential oils were identified by GC-MS. Antibacterial activity of essential oils in comparison with gentamicin antibiotic was determined using agar diffusion method. The minimum inhibitory concentration (MIC) of lavender essential oils was evaluated by macrobroth dilution method by preparing different concentrations of 0.004 to 4% in nutrient broth medium. The minimum bactericidal concentration (MBC) was determined using culture method in nutrient agar medium. Zone of growth inhibition of *X. campestris* varied from 3.83 ± 0.35 to 18.7 ± 0.77 mm in concentration of 0.25 to 4% respectively and for *E. coli* in concentration 0.125 to 4 % from 4.5 ± 0.7 to 17.6 ± 0.9 mm. The MIC and MBC of lavender essential oils against *X. campestris* equal of 1 and 2% and about *E. coli* equal to 0.125 and 0.25%, respectively. The most constitutive compounds of lavender essential oils included of linalool (44.94%) and 1,8-cineol (21.5%). Lavender essential oils can be used as natural antimicrobial agents against pathogenic bacteria.

Keywords:

- allelopathy
- antibacterial activity
- bactericide
- bacteriostatic
- minimum bactericidal concentration
- minimum inhibitory concentration