بررسی اثر ضد باکتریایی و خاصیت سینرژیستی عصاره اتانولی آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*)، مریم گلی بنفش (*Salvia verticillata*) و اناریجه (*Froriepia subpinnata*) بر باکتری‌های عامل پوسیدگی سبزیجات

لیلا بندیان[1]، محمد مقدم[2*]، معصومه بحرینی[3]

۱. دانشجوی دکتری، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد.

۲. دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد.

۳. استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد.

***نویسنده مسئول:** *m.moghadam@um.ac.ir*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۲/۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۳/۰۹

چکیده

با توجه به ضایعات بالای پس از برداشت سبزیجات و محدودیت استفاده از قارچکش‌ها و آنتی‌باکتریال‌های شیمیایی، استفاده از ترکیبات طبیعی به‌عنوان جایگزین مواد سنتزی اهمیت زیادی یافته است. از این رو هدف از مطالعه حاضر، بررسی خاصیت ضدمیکروبی عصاره‌های اتانولی سه گیاه آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*)، مریم گلی بنفش (*Salvia verticillata*) و اناریجه (*Froriepia subpinnata*) بر روی ۲ سویه باکتری *Pectobacterium carotovorum* و *Pseudomonas aeruginosa* بود که عامل اصلی پوسیدگی باکتریایی می‌باشند. اثر ضدمیکروبی عصاره‌ها با استفاده از تکنیک میکرو براث دایلوشن و با تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC)، حداقل غلظت کشندگی (MBC) و همچنین خاصیت سینرزیستی آنها با استفاده از روش رقت ردیابی اصلاح شده (Checkerboard Dilution Modified) (FIC) بررسی شد. حداقل غلظت بازدارندگی برای عصاره آویشن شیرازی علیه باکتری‌های مورد بررسی بین ۳/۱۲ تا ۶/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، عصاره مریم گلی بنفش بین ۳/۱۲ تا ۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، و برای عصاره اناریجه ۱۲/۵ تا ۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بدست آمد. بین دو عصاره آویشن شیرازی و مریم گلی بنفش در حالت ترکیبی در باکتری *P. carotovorum* خاصیت آنتاگونیستی و در باکتری *P. aeruginosa* اثر افزایشی مشاهده شد. نتایج کاربرد توأم عصاره آویشن شیرازی و اناریجه و بررسی روش رقت ردیابی اصلاح شده (FIC) نشان داد که در باکتری *P. carotovorum* بین این دو عصاره اثر افزایشی و در باکتری *P. aeruginosa* خاصیت آنتاگونیستی وجود دارد. کاربرد توأم عصاره مریم گلی بنفش و اناریجه نشان داد که در باکتری‌های مورد بررسی بین این دو عصاره اثر افزایشی ($0.5<FIC>4$) وجود دارد. بررسی نتایج اثرات بازدارندگی عصاره‌ها نشان داد که در مجموع عصاره آویشن شیرازی خاصیت ضد باکتریایی قوی‌تری نسبت به عصاره مریم گلی بنفش و اناریجه داشت و باکتری پکتوباکتریوم حساسیت بیشتری نسبت به سودوموناس از خود نشان داد. بررسی FIC نشان داد که در باکتری‌های مورد بررسی کاربرد توأم عصاره مریم گلی بنفش و اناریجه نتایج بهتری را از سایر عصاره‌های ترکیبی داشت.

کلیدواژه‌ها: پکتوباکتریوم، اناریجه، آویشن، MIC، MBC.

مقدمه

باکتری‌های گیاهی (فیتوپاتوژن‌ها) یکی از عوامل اصلی بیماری‌های گیاهی را شامل می‌شوند، به طوری که در بسیاری از محصولات کشاورزی باعث بروز بیماری‌هایی در مراحل رشدی و یا پس از برداشت آنها می‌شوند (Shuping and Eloff, 2017). این پاتوژن‌ها شامل طیف وسیعی از گونه‌های باکتریایی و قارچی می‌باشند که با ایجاد تلفات در سبزیجات، عمر نگهداری سبزی‌ها را کاهش داده و به شکل معنی‌داری باعث زیان اقتصادی برای کشاورزان و تولیدکنندگان محصولات گیاهی می‌شوند (Ariaii et al., 2015). در سالهای اخیر ایجاد مقاومت در گونه‌های باکتری‌های بیماری‌زا به دلیل استفاده بی‌رویه از باکتری‌کش‌های شیمیایی و آنتی-بیوتیک‌ها برای کنترل بیماری‌های گیاهی در دوره پس از برداشت به معضل بزرگی تبدیل شده است (Shuping and Eloff, 2017). آلودگی مواد غذایی و بیماری‌های مرتبط به آن یکی از چالش‌های بسیار مهم

در حوزه سلامت عمومی به شمار می‌روند امروزه استفاده از ترکیباتی با منشاء طبیعی به عنوان رویکردی اثربخش و بی‌خطر برای جلوگیری از رشد باکتری‌ها و بهبود ماندگاری مواد غذایی مورد توجه قرار گرفته است (Sandri et al., 2007). هدف نهایی پس از برداشت انواع محصولات حفظ کمیت و کیفیت آنها تا زمانی است که توسط مشتری خریداری می‌شود. در سال‌های اخیر همزمان با پیشرفت صنعت غذا تقاضا برای تولید و مصرف محصولات غذایی ارگانیک، با حداقل فرآیند و با کیفیت تغذیه‌ای و ماندگاری بالا رو به افزایش است. بنابراین ارائه روش‌های جایگزین سنتی برای ضدعفونی کردن در تولید سبزی‌ها و میوه‌ها با کیفیت ماندگاری بالا از اهمیت خاصی برخوردار است (بک محمدپور و همکاران، ۱۳۹۴). در نتیجه استفاده از یک گندزدای مناسب جهت شستشوی سبزیجاتی که بار آلودگی بالایی دارند، ضروری است (یاراحمدی و همکاران، ۱۳۹۰). با توجه به ضایعات بالای پس از برداشت سبزیجات و محدودیت استفاده از قارچکش‌ها و آنتی‌باکتریال‌های شیمیایی، ارائه راهکارهای مناسب جهت کنترل عوامل بیماریزای پس از برداشت از ضرورت برخوردار است (Song, 2017). یکی از مهمترین محصولات طبیعی حاصل از گیاهان، عصاره‌های گیاهی می‌باشند که دارای خواص بیولوژیکی متنوعی هستند که کاربردهای دارویی و غذایی دارند (Shuping and Eloff, 2017). عصاره‌های گیاهی به دلیل دارا بودن ترکیبات ضدمیکروبی، ضداکسایشی و عوامل حذف کننده رادیکال آزاد، توانایی بالایی برای به‌کارگیری به عنوان یک نگهدارنده طبیعی را دارا هستند (Asgar et al., 2015; Tajkarimi et al., 2010). عصاره‌های گیاهی فعالیت مهارکنندگی بالایی در برابر بسیاری از قارچها و باکتری‌های مولد پوسیدگی و بیماری در دوره پس از برداشت داشته و از دیرباز برای کنترل پوسیدگی و افزایش عمر انبارداری محصولات گیاهی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. در عین حال، به صورت مرسوم نیز بسیاری از عصاره‌ها و ترکیبات گیاهی به عنوان عامل طعم‌دهنده در تولید و فرآوری محصولات غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند؛ از این روی، عصاره‌های گیاهی گزینه ایده‌الی برای کنترل بیماری‌های پس از برداشت محصولات زراعی و باغی قلمداد می‌شوند (Sales et al., 2016).

اناریجه (*Froriepia subpinnata*) از خانواده چتریان، از جمله گیاهانی است که حاوی اسانس با فعالیت ضدمیکروبی بالا می‌باشد. پژوهش‌ها حاکی از آن است که گیاه اناریجه به دلیل دارا بودن خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی می‌تواند برای کنترل برخی از باکتری‌ها و قارچها مورد استفاده قرار گیرد (پلنگیان و همکاران، ۱۳۹۴). آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) متعلق به خانواده نعناعیان که برگ‌های آن حاوی تیمول، کارواکرول و اسید رزمارینیک می‌باشد که جزو مواد اصلی تشکیل دهنده این گیاه محسوب می‌شوند و اثرات ضد باکتریایی، ضد ویروسی، آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی آنها به اثبات رسیده است (Moosavy et al., 2008). مومین و همکاران (۲۰۱۷) نیز اثرات ضدمیکروبی اسانس آویشن علیه تعدادی از پاتوژن‌های باکتریایی را گزارش کردند. مریم گلی بنفش (*Salvia verticillata*) گیاهی علفی چندساله، از تیره نعناعیان است که از دیرباز خواص دارویی آن شناخته شده است. ترکیب‌های بسیاری از این گیاه جداسازی شده است که از آن جمله می‌توان ترپنوئیدها و مشتقات فنلی را نام برد (Sangclic, 2003).

Pseudomonas aeruginosa و *Pectobacterium caratovorum* دو عامل اصلی پوسیدگی باکتریایی محسوب می‌شوند (Nguyen and Prunier, 1989)، که دارای فعالیت‌های پکتینی و پروتئولیتیک هستند (Lee et al., 2013). *Pseudomonas aeruginosa* از عوامل مهم پوسیدگی است که از روی سبزی‌ها و میوه‌ها جدا شده است (Gram et al., 2002). *Pectobacterium caratovorum* از جمله باکتری-هایی است که در تعداد زیادی از گونه‌های گیاهی باعث

ایجاد بیماری و خسارات اقتصادی می‌شود. از ویژگی‌های مهم این باکتری‌ها تولید تعداد زیادی از آنزیم‌های خارج سلولی مانند سلولاز، گالاکتوروناز، پروتئاز، آمیلاز و ... است و از عوامل مهم بیماریزایی محسوب می‌شود که منجر به فساد می‌گردد (Toth, 2003). یکی از مهمترین عوامل بیماریزای سبزیجات, باکتری‌های وابسته به جنس *P. caratovorum* است. از ویژگیهای مهم این گروه از باکتری‌ها، قدرت لهانیدن و تخریب فراوان بافت-های نرم و پر آب است و بیماری پوسیدگی نرم و ساق سیاه را در گیاهان به وجود می‌آورد (بشاش و همکاران، ۱۳۹۴).

این پژوهش با هدف جایگزینی عصاره طبیعی گیاهان و بررسی کاربرد آنها در کاهش بار میکروبی به منظور دستیابی به روشی است که قادر باشد با کمترین میزان استفاده عصاره‌های گیاهی بالاترین خاصیت ضدباکتریایی را ایجاد کند. اثر ضد باکتریایی عصارها به روش‌های متفاوتی مورد بررسی قرار می‌گیرند. با توجه به تأثیر عصارها بر خواص ارگانولپتیکی مواد غذایی، تعیین دقیق حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) آنها و همچنین بررسی وجود خاصیت سینرژیستی بین عصاره-ها با استفاده از تکنیک میکرودایلوشن به منظور به حداقل رساندن میزان مصرف این مواد و همچنین غلبه بر مقاومت باکتریایی مورد توجه می‌باشد. بنابراین هدف از این تحقیق بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره سه گیاه دارویی آویشن شیرازی، اناریجه و مریم‌گلی بنفش و همچنین ارزیابی اثر سینرژیستی آنها برای مهار دو باکتری *P. caratovorum* و *P. aeruginosa* می‌باشد.

روش کار

این تحقیق به صورت آزمایشگاهی (*in vitro*) در قالب طرح تصادفی انجام شد. در این آزمایش خاصیت ضد باکتری عصاره‌های گیاهی شامل آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*)، مریم گلی بنفش (*Salvia verticillata*)، اناریجه (*Froriepia subpinnata*) و اثرات سینرژیستی آنها مورد بررسی قرار گرفت. نمونه-های گیاهی آویشن شیرازی، مریم گلی بنفش از شهرستان درگز و اناریجه از مازندران در سال ۱۳۹۷ جمع‌آوری شدند. نمونه‌های تهیه شده در معرض هوای آزاد و سایه، خشک شدند. شناسایی نمونه‌ها در پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد صورت گرفت که به ترتیب با کدهای هرباریومی ۳۱۱۴۹، ۳۱۱۲۱، ۳۱۲۹۸ به ثبت رسیده‌اند. عصاره نمونه‌های خشک گیاهی به روش خیساندن با حلال اتانول ۷۰ درصد تهیه شد. بدین منظور پودر خشک اندام‌های ذکر شده به مدت ۲۴ ساعت در اتانول ۷۰ درصد خیسانده و شیک شدند و سپس با استفاده از کاغذ صافی، جدا شدند. عصاره‌های حاصل با دستگاه روتاری اواپراتور (R-100 Buchi) تغلیظ شدند. همه عصاره‌ها تا زمان انجام آزمون در ظروف استریل غیرقابل نفوذ به هوا و نور، در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

۲ نوع باکتری مورد استفاده شامل *Pectobacterium carotovorum* (ATCC25922) و *Pseudomonas aeruginosa* (PTCC 1558) از گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه و در محیط کشت نوترینت آگار (مرک) کشت شدند. پتری‌ها برای مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار گرفتند و برای اطمینان از خلوص باکتری از رنگ آمیزی گرم استفاده شد. پس از اطمینان از خلوص، باکتری‌ها را در محیط کشت مولر هینتون براث (مرک) کشت نموده و برای مدت ۱۸ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده و سپس از آن‌ها سوسپانسیونی معادل ۰/۵ مک‌فارلند تهیه شد.

تعیین کمترین غلظت بازدارندگی (MIC)

بررسی فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌ها با استفاده از روش رقت‌سازی (میکرو براث دایلوشن) مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا جهت تهیه استوک مادر برای عصاره‌ها، غلظتی برابر با ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (۰/۲ گرم عصاره در ۲۰۰ میکرولیتر دی‌متیل سولفواکسید

(DMSO) و ۸۰۰ میکرولیتر آب مقطر حل شد) تهیه و با استفاده از فیلتر میکروبی ۰/۴۵ میکرون استریل گردیدند. در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای مقادیر ۱۰۰ میکرولیتر از هر یک از غلظت‌های عصاره تهیه شده و ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت مولر هینتون براث و ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری معادل نیم مک فارلند در هر میکروپلیت ریخته شد. غلظت‌های نهایی برای عصاره آویشن شیرازی، مریم گلی بنفش و اناریجه مقادیر ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲ و ۱/۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. پس از پر کردن چاهک‌های میکروپلیت، پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و پس از این مدت جذب کدورت پلیت‌ها در طول موج ۶۳۰ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر (Stat Fax 2100, AWARNESS Tech. Inc., USA) خوانده شد (NCCLS, 2001).

تعیین کمترین غلظت کشندگی (MBC)

از خانه‌هائی که در آنها کدورتی مشاهده نشد، ۵ میکرولیتر برداشته و روی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت نقطه‌ای داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. اولین غلظتی که در آن هیچ رشدی مشاهده نشد به عنوان حداقل غلظت کشندگی در نظر گرفته شد (NCCLS, 2001).

بررسی اثر ضد باکتریایی و خاصیت سینرژیستی عصاره‌ها با توجه به اینکه در طب سنتی ایران گیاهان دارویی به صورت مخلوط نیز مورد استفاده قرار می‌گیرند (زرگری، ۱۳۸۳) فعالیت ضد باکتریایی ترکیب عصاره‌ها با یکدیگر نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. واکنش متقابل عصاره این سه گیاه با استفاده از روش رقت ردیابی اصلاح شده (Checkerboard Dilution Modified) (FIC) انجام شد.

FIC index = FIC of drug A + FIC of drug B
FIC of drug A = MIC of drug A in combination/MIC of drug A alone
FIC of drug B = MIC of drug B in combination/MIC of drug B alone

FIC_{Index} برای عصاره‌های (آویشن شیرازی + مریم گلی بفش، آویشن شیرازی + اناریجه، مریم گلی بنفش + اناریجه) محاسبه گردید. مقادیر کوچکتر از ۰/۵ نشان‌دهنده اثر سینرژیستی، مقادیر مابین ۰/۵ تا ۴ مؤید اثر افزایشی و مقادیر بیشتر از ۴ ناشی از وجود اثر آنتاگونیستی بین این دو عصاره در نظر گرفته شد. ابتدا غلظت‌های متوالی دوتایی از عصاره‌ها به طور جداگانه همانند بخش قبل، تهیه شد. در هر ردیف به ترتیب از چپ به راست ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت مولر هینتون براث، ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آویشن شیرازی از ۴، ۲، ۱، ۱/۲، ۱/۴ برابر غلظت MIC در هر میکروپلیت ریخته شد. به همین ترتیب در هر ستون به ترتیب از بالا به پایین ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت مولر هینتون براث، ۱۰۰ میکرولیتر عصاره اناریجه از ۴، ۲، ۱، ۱/۲، ۱/۴ برابر غلظت MIC در هر میکروپلیت ریخته شد. در ادامه به هر چاهک ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری معادل نیم مک فارلند اضافه شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس به تمامی چاهک‌ها ۵۰ میکرولیتر از معرف تری فنیل تترازولیوم کلراید (TTC) با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اضافه شد و دوباره به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری گردید. یک غلظت بالاتر از آخرین غلظتی که رنگ قرمز تترازولیوم را به خود گرفت به عنوان MIC باکتری در نظر گرفته شد (Eliopoulos and Moellering, 1996).

در بررسی حاضر نتایج حاصل از آزمایش‌ها با استفاده از طرح تصادفی، در سه تکرار با استفاده از نرم افزارSPSS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند.

نتایج

نتایج حاصل از بررسی MIC و MBC بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره‌های آویشن شیرازی، مریم گلی بنفش و اناریجه علیه باکتری‌های مورد بررسی در این تحقیق در جدول ۱ آورده شده است.

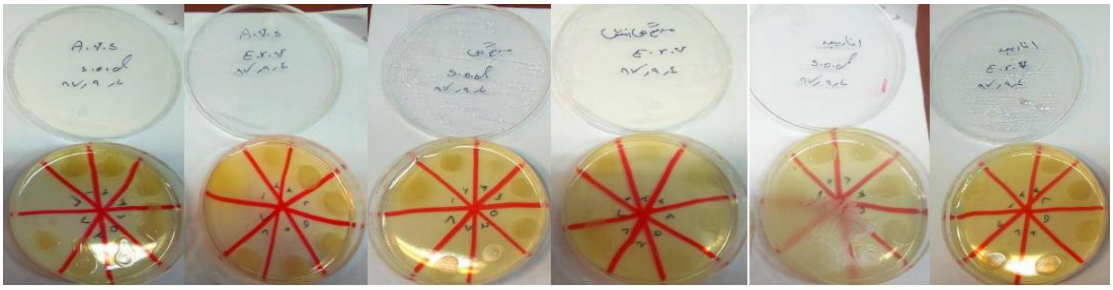
جدول ۱: فعالیت ضد باکتریایی (MIC و MBC) عصاره آویشن شیرازی، مریم گلی بنفش و اناریجه به روش میکرودایلوشن

پاتوژن	واکنش گرم	آویشن شیرازی		مریم گلی بنفش		اناریجه	
		MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)
P. carotovorum	-	3.12 ± 1	50	3.12 ± 0.9	50	25 ± 3.3	100
P. aeruginosa	-	6.25 ± 1.5	-	25 ± 3.2	-	12.5 ± 2.4	-

MIC: حداقل غلظت بازدارندگی، MBC: حداقل غلظت کشندگی

حداقل غلظت بازدارندگی عصاره آویشن شیرازی علیه *P. carotovorum*، ۳/۱۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و برای *P. aeruginosa* ۶/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، در مورد عصاره مریم گلی بنفش برای *P. carotovorum* ۳/۱۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و *P. aeruginosa* ۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، در مورد عصاره اناریجه برای *P. carotovorum* ۱۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و برای *P. aeruginosa* ۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بدست آمد. نتایج نشان داد که عصاره آویشن شیرازی خاصیت ضد باکتریایی قوی‌تری نسبت به عصاره مریم گلی بنفش و اناریجه دارد و باکتری سودوموناس مقاومت بیشتری در برابر عصاره‌ها نشان داد.

همچنین حداقل غلظت کشندگی عصاره آویشن شیرازی ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر برای *P. carotovorum* و ۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر برای *P. aeruginosa*، در مورد عصاره مریم گلی بنفش نیز ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر برای *P. carotovorum* و ۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر برای *P. aeruginosa* و در خصوص عصاره اناریجه ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر برای *P. carotovorum* و ۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر برای *P. aeruginosa* محاسبه شد. از بین باکتری‌های مورد بررسی *P. aeruginosa* مقاومت بیشتری نشان داد، زیرا هیچ یک از عصاره‌ها قادر به کشتن سودوموناس نبودند (شکل ۱)



شکل ۱: MBC عصاره آویشن شیرازی، مریم گلی بنفش و اناریجه

در این تحقیق مقادیر غلظت بازدارندگی افتراقی (FIC) به روش رقت ردیابی اصلاح شده مورد بررسی قرار گرفت. مقادیر FIC بدست آمده در جداول ۲، ۳، ۴ خلاصه شده است. بررسی FIC نشان داد که در باکتری *P. carotovorum* بین این دو عصاره خاصیت آنتاگونیستی (FIC>4) و در باکتری *P. aeruginosa* اثر افزایشی (0.5<FIC>4) مشاهده شد. نتایج نشان می‌دهند که استفاده ترکیبی عصاره آویشن شیرازی و مریم گلی بنفش (جدول ۲) علیه باکتری سودوموناس خاصیت آنتی‌باکتریال بیشتری نسبت به کاربرد انفرادی هر عصاره به تنهایی دارد. نتایج کاربرد توأم عصاره آویشن شیرازی و اناریجه در جدول ۳ آمده است. بررسی FIC نشان داد که در باکتری *P. carotovorum* بین این دو عصاره اثر افزایشی (0.5<FIC>4) و در باکتری *P. aeruginosa* خاصیت آنتاگونیستی (FIC>4) وجود دارد.

جدول ۲: اثر برهمکنش عصاره آویشن شیرازی و مریم گلی بنفش بر باکتری‌های مورد مطالعه

پاتوژن	واکنش گرم	MIC ترکیبی (mg/mL)		FIC آویشن شیرازی	FIC مریم گلی بنفش	FIC* شاخص
		ZM	SV	FIC_{ZM}	FIC_{SV}	FIC index
P. carotovorum	-	12.5 ± 1.2.	12.5 ± 1.5	4 ± 1	4 ± 1	8 ± 1.5
P. aeruginosa	-	3.12 ± 0.9	6.25 ± 1	1 ± 0.08	0.2 ± 0.07	1.2 ± 0.64

*FIC کمتر از ۰/۵ نشان‌دهنده اثر سینرژیستی، *FIC بین ۰/۵ تا ۴ نشان‌دهنده اثر افزایشی و *FIC بیشتر از ۴ نشان‌دهنده اثر آنتاگونیستی می‌باشد.

جدول ۳: اثر برهمکنش عصاره آویشن شیرازی و اناریجه بر باکتری‌های مورد مطالعه

پاتوژن	واکنش گرم	MIC ترکیبی (mg/mL)		FIC آویشن شیرازی	FIC اناریجه	FIC شاخص
		ZM	FS	FIC_{ZM}	FIC_{SV}	FIC index
P. carotovorum	-	6.25 ± 1.5	50 ± 10	2 ± 0.8	2 ± 0.8	4 ± 1
P. aeruginosa	-	12.5 ± 2	50 ± 11.2	2 ± 0.6	4 ± 1.1	6 ± 1.4

*FIC کمتر از ۰/۵ نشان‌دهنده اثر سینرژیستی، *FIC بین ۰/۵ تا ۴ نشان‌دهنده اثر افزایشی و *FIC بیشتر از ۴ نشان‌دهنده اثر آنتاگونیستی می‌باشد.

نتایج کاربرد توأم عصاره مریم گلی بنفش و اناریجه در جدول ۴ آمده است. بررسی FIC نشان داد که در باکتری‌های مورد بررسی بین این دو عصاره اثر افزایشی (0.5<FIC>4) وجود دارد.

جدول ۴: برهمکنش عصاره مریم گلی بنفش و اناریجه

پاتوژن	واکنش گرم	MIC ترکیبی (mg/mL)		FIC مریم گلی بنفش	FIC اناریجه	FIC شاخص
		SV	FS	FIC_{SV}	FIC_{SV}	FIC index
P. carotovorum	-	3.12 ± 1	25 ± 2.3	1 ± 0.32	1 ± 0.32	2 ± 0.74
P. aeruginosa	-	6.25 ± 2	12.5 ± 1.3	0.2 ± 0.03	1 ± 0.4	1.2 ± 0.4

*FIC کمتر از ۰/۵ نشان‌دهنده اثر سینرژیستی، *FIC بین ۰/۵ تا ۴ نشان‌دهنده اثر افزایشی و *FIC بیشتر از ۴ نشان‌دهنده اثر آنتاگونیستی می‌باشد.

بحث

آویشن شیرازی و بسیاری از گیاهان متعلق به خانواده نعناعیان به دلیل دارا بودن مقادیر بالایی از تیمول و کارواکرول قدرت بالایی در مهار پاتوژن‌های گیاهی از قارچ‌ها و باکتری‌های مولد بیماری‌های از خود نشان می‌دهند (Saeidi et al., 2019). در تایید یافته‌های پژوهش حاضر، پیش از این رمضانیان و همکاران (۲۰۱۶) گزارش کردند که بکارگیری عصاره آویشن شیرازی بدلیل نداشتن خطر برای سلامتی انسان، قدرت آنتی‌اکسیدانی بالا، بهبود کیفیت محصولات و افزایش دوره ماندگاری میوه و سبزیجات، راهکار مناسبی برای مقابله با مشکلات پس از برداشت است. عصاره متانولی و اتانولی آویشن اثر ضد باکتریایی قابل توجهی در برابر سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس دارد (Messaoudi et al., 2019). در تحقیقی که پیش از این در رابطه با تاثیر عصاره‌های گشنیز، زیره، آویشن و رزماری بر کنترل رشد پکتوباکتریوم انجام شد، مشخص گردید که عصاره گیاه آویشن قوی‌ترین اثر ضدمیکروبی را در بین عصاره‌های مورد بررسی دارد (Hosseini et al., 2012) که این یافته با نتایج بدست آمده از تحقیق حاضر همخوانی دارد. بازیک (۲۰۱۷) نیز گزارش نمود

که عصاره آویشن تاثیر معنی‌داری بر رشد استرین‌های وحشی و آزمایشگاهی پکتوباکتریوم دارد. این نتایج و یافته‌های بدست آمده در تحقیق حاضر بیانگر قدرت بالای عصاره آویشن در جلوگیری از رشد باکتری پکتوباکتریوم می‌باشد. در مطالعه دیگری کارامن و همکارانش (۲۰۰۱) اثرات ضد باکتریایی قوی اسانس آویشن را بر روی باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی نشان دادند. مهرگان و همکاران (۲۰۰۸) در خصوص عصاره متانولی آویشن بیان کردند که این عصاره روی باکتری-های گرم مثبت اثر مثبتی داشته است. قابلیت بالای این گیاه در کنترل رشد باکتری‌ها به وجود متابولیت‌های ثانویه با قدرت ضدباکتریایی بالا که در عصاره و اسانس این گیاه وجود دارد نسبت داده شده است (Momin et al., 2017). پیش از این نیز اثرات ضدمیکروبی اسانس آویشن شیرازی بر استافیلوکوکوس‌های مقاوم به آنتی-بیوتیک‌هایی مانند تتراسایکلین و اریترومایسین گزارش شده است (سلطان دلال و همکاران، ۱۳۹۳). در پژوهش هاشمی و همکاران (۱۳۸۹) عصاره متانولی حاصل از آویشن شیرازی را به عنوان جایگزینی مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها جهت کنترل سویه‌های سودوموناس آئروژیوس معرفی کرد. در پژوهش ما نیز عصاره آویشن شیرازی از قدرت مهار رشدی باکتریایی بالایی برخوردار بود.

عصاره گیاه *Salvia* با دارا بودن مواد فلاونوئیدی، فنلی و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی نقش مهمی را در کنترل *Pectobacreium carotovorum* دارد. در مطالعه‌ای که با هدف بررسی تاثیر عصاره سه گونه مریم گلی بر *P. carotovorum* انجام شد، مشخص شد که مریم گلی تاثیر معنی‌داری بر کنترل رشد پکتوباکتریوم مولد پوسیدگی نرم سیب زمینی دارد که این یافته‌ها با نتایج بدست آمده در تحقیق حاضر همخوانی دارد (بشاش و همکاران، ۱۳۹۴). پیش از این گزارش شده است که عصاره مریم گلی تاثیرگذاری بیشتری روی باکتری‌های گرم مثبت دارد اما تأثیر کمتری بر باکتریهای گرم منفی ندارد که این امر بی‌ارتباط با وجود لیپید در غشای سلولی این دسته از باکتری‌ها نیست (Kazemizadeh et al., 2010). در تحقیقی عصاره اتانولی مریم گلی اثر مهارکنندگی ضعیفی روی باکتری‌های *P. aeruginosa* و *E. coli* داشت (Al Bahtiti, 2012). که این نتایج با تحقیق حاضر همسو هستند. محمودی و همکاران (۱۳۸۸) در بررسی اثر ضدباکتریایی اسانس و عصاره آبی گیاهان دارویی بر روی باکتری سودوموناس و عامل لکه برگی نشان دادند که اسانس گیاه مریم‌گلی در کنترل باکتری سودوموناس تاثیری بسیار پایینی داشته ولی در مورد باکتری عامل لکه برگی در گروه گیاهان با بیشترین میزان تاثیر قرار می‌گیرد. کوکوسکوا و همکاران (۲۰۰۵) نیز اثر بازدارندگی بالای اسانس مریم‌گلی روی باکتری سودوموناس و خاصیت بازدارندگی ضعیف آن را روی باکتری *Erwinia chrysanthemi* گزارش کردند. مقایسه خواص ضدباکتریایی اسانس چهار گونه مریم گلی بر روی باکتری‌های اشرشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه نشان داد که تمامی اسانس‌ها بر روی این باکتری‌ها اثر ممانعت کننده داشته‌اند و بیشترین اثر مربوط به غلظت ۵ درصد اسانس‌ها بود (سلیم پور و همکاران، ۱۳۹۲). عصاره آبی گیاه اناریجه، با میزان بالای فنل و فلاونوئید، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی از خود نشان می‌دهد (Ebrahimzadeh et al., 2010).

اثر عصاره‌ها و اسانس‌ها بصورت افزایش نفوذپذیری یـون‌هـا و یـا نشت ترکیبات حیاتی سلولی رخ می‌دهد و یا اینکه بصـورت نـاتوانی سیستم آنزیمی باکتریایی بروز می‌کند (Sandri et al., 2007). برخی از محققین ارتباط بین ساختارهای شیمیایی برخی از اجزاء غالب موجود در اسانس‌ها را با فعالیت ضد باکتریایی آنها گزارش نموده‌اند (Friedman, 2002). در پژوهش سلمانیان و همکاران (۱۳۹۲) عصاره متانولی اناریجه از فعالیت ضد رادیکالی و عصاره استونی از فعالیت‌های احیاءکنندگی و آنتی‌اکسیدانی کل بهتری برخوردار بود که نشان‌دهنده اثر ضد باکتریایی آن است. مکانیسم

عمده ترکیبات فنلی و فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌های گیاهی، تخریب دیواره سلولی و نشت محتوای درون سلولی که مرگ سلول باکتری را در پی دارد. در مطالعه آریایی و همکاران (۲۰۱۳)، فیلم‌های خوراکی حاوی اسانس اناریجه، فعالیت ضدباکتریایی معنی‌داری را در برابر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نشان دادند. وردین ریزی (۲۰۰۸) گزارش کرد که اسانس اناریجه در دوزهای مختلف اثرات بازداری خوبی در برابر ۵ سویه باکتریایی از خود نشان داد. در مطالعه دیگری نشان داده شد که اختلاف در مقاومت باکتری‌های گرم مثبت مانند مقاومت سودوموناس و لیستریا نسبت به اسانس اناریجه در برابر اثرات اسانس‌ها ممکن است در نتیجه مقاومت بین سویه‌های مختلف باشد (Gómez-Estaca et al., 2010). در مجموع، مطالعه ما همسو با نتایج این محققان بوده و آثار مهارکنندگی خوب تا متوسطی روی باکتری پکتوباکتریوم و سودوموناس در نتیجه استفاده از عصاره‌های گیاهی مشاهده کردیم. تاکنون بررسی‌های زیادی در مورد اثر سینرژیستی اجزای مختلف اسانس‌های گیاهی در مواد غذایی مختلف جهت افزایش قدرت ضدمیکروبی آنها انجام شده است به طور مثال تأثیر ضد میکروبی توأم دو جزء کارواکرول و تیمول موجود در اسانس آویشن شیرازی بیش از تأثیر هر یک از آنها به تنهایی گزارش شده است (Rasooli et al., 2002). عسگری و همکاران (۲۰۰۹) گزارش نمودند در اسانس‌های دو گونه مختلف اناریجه که بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی بررسی شد مهمترین ترکیب لیمونن بود و مشخص شد که باکتری‌های گرم مثبت به اثرات ضد میکروبی اسانس اناریجه حساس‌تر بودند. لیمونن جزء مونوترپنهاست. ترپن‌ها قادر هستند که به غشای سلولی صدمه بزنند و در ساختار لیپید دیواره سلولی باکتری‌ها نفوذ کنند که این امر به دناتوراسیون پروتئین‌ها و از هم پاشیدن ساختار سلولی و تراوش سیتوپلاسم در نهایت مرگ سلول می‌شود (Oussalah, 2007).

عوجعلیان و همکاران (۲۰۱۰) اثرات سینرژیستی بین اسانس زیره سیاه و زیره سبز را گزارش نمودند و اظهار نمودندکه مصرف توام چند گیاه دارویی که در نسخه‌های سنتی مشاهده می‌شود اثراتی به مراتب بیشتر از مصرف هر گیاه به تنهایی دارد. بسیاری از گیاهان دارویی اثر سودمند خود را به صورت سینرژیستی یا افزایشی بر یک یا چند محل هدف نشان می‌دهند. این نتایج همچنین مبنای علمی اثر ضد باکتریایی گیاهان مورد استفاده در طب سنتی به خصوص استفاده همزمان دو یا چند گیاه را نشان داد. در تحقیقاتی که اخیرا انجام گرفته، مشخص شده است که استفاده همزمان از عصاره‌های گیاهی و یا حتی ترکیب عصاره‌های گیاهی با داروهای مدرن می‌تواند راهکاری برای توسعه آنتی‌بیوتیک‌های قدرتمند باشد (Cheesman et al., 2017). هر چند مکانیسم دقیق نحوه تاثیرگذاری ترکیب عصاره‌های گیاهی به درستی مشخص نشده است؛ اما ترکیب عصاره‌های گاهی و یا مواد موثره موجود در آنها نه تنها باعث افزایش قدرت ضد میکروبی می‌شود؛ بلکه این امکان را فراهم می‌آورد تا با دوز پایین‌تری بتوان به سطح مطلوبی از اثرات ضدباکتریایی دست یافت (Sonam et al., 2017).

در مطالعه‌های متعددی نشان داده شده است که غلظت عصاره تاثیر قابل ملاحظه‌ای بر آثار ضدمیکروبی آن داشته است؛ به طوری که در غلظت‌های پایین، عصاره‌های گیاهی تاثیر زیادی بر جلوگیری از رشد باکتری‌ها ندارند. به عبارت دیگر بین غلظت عصاره گیاهی و اثرات بازدارندگی آن بر رشد باکتری‌ها یک رابطه مثبت وجود دارد. این امر می‌تواند توجیهی برای مشاهده اثرات ضعیف ضد میکروبی در غلظت‌های پایین عصاره‌های گیاهی باشد (Cimanga et al., 2002). یافته‌های گزارش شده توسط سایر محققان نیز نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر را تایید می‌کند. به عنوان مثال در تحقیقی که راجع به اثرات ضدمیکروبی تعدادی از عصاره‌های گیاهی برای باکتری‌های مسموم‌کننده مواد

غذایی انجام شد، محققان گزارش کردند که با افزایش غلظت عصاره گیاهی، اثر ضدمیکروبی به شکل معنی-داری افزایش پیدا می‌کند (Mostafa et al., 2018). به همین ترتیب، بازیک و همکاران (۲۰۱۷) نیز افزایش قدرت ضد میکروبی در اثر افزایش غلظت عصاره گیاهی جهت کنترل باکتری‌های بیماری‌زا را گزارش کرده‌اند که این یافته‌ها با نتایج بدست آمده در پژوهش حاضر همخوانی دارد. براساس این نتایج می‌توان ترکیب نمودن عصاره اناریجه و مریم گلی بنفش را به صورت همزمان که علیه باکتری‌های مورد مطالعه اثر افزایشی دارند را توصیه نمود. این تحقیق اثبات نمود که سه گونه مورد بررسی دارای فعالیت ضد باکتریایی قابل توجه بوده و قابلیت استفاده به عنوان ترکیبات آنتی-باکتریال را دارند.

نتیجه‌گیری کلی

براساس نتایج بدست آمده در این تحقیق به نظر می‌رسد که در مجموع عصاره آویشن شیرازی خاصیت ضد باکتریایی قوی‌تری نسبت به عصاره مریم گلی بنفش و اناریجه دارد و باکتری پکتوباکتریوم حساسیت بیشتری نسبت به سودوموناس دارد. بررسی FIC نشان داد که در باکتری‌های مورد بررسی کاربرد توأم عصاره مریم گلی بنفش و اناریجه نتایج بهتری را از سایر عصاره‌های ترکیبی دارند. نتایج بدست آمده در این تحقیق بار دیگر اثرات مثبت کاربرد عصاره‌های گیاهی بر جلوگیری از رشد باکتری‌های پاتوژن را به اثبات رساند. با در نظر گرفتن این واقعیت که استفاده از ترکیبات آنتی‌بیوتیکی شیمیایی اثرات مضری بر سلامت غذایی داشته و از سوی دیگر باعث بروز مشکلاتی چون ظهور نژادهای مقاوم به آنتی‌بیوتیک شده‌اند، لذا کاربرد عصاره گیاهان دارویی می‌تواند رویکرد مناسب، مقرون به صرفه و بی‌خطر برای محیط زیست جهت کنترل فعالیت‌های میکروبی در حوزه صنایع غذایی به شمار رود. در این راستا، یافته‌های بدست آمده در تحقیق حاضر می‌تواند دارای رهنمودهای کاربردی برای تولیدکنندگان، سیاست‌گذاران و کلیه فعالان صنایع غذایی باشد تا با استفاده از ترکیباتی با منشاء گیاهی بتوانند استراتژی‌های جدیدی برای کنترل فساد مواد غذایی را طراحی نمایند.

منابع

۱. بشاش، المیرا.، شیرزاد، اکبر.، فلاح‌زاده ممقانی، وحید و هاشم پور، حسین. (۱۳۹۴). بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره سه گونه مختلف گیاه .*Salvia* sp بر علیه *Pectobacterium carotovorum* عامل پوسیدگی نرم سیب‌زمینی. پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد. دانشگاه شهید مدنی آذربایجان.

۲. بک‌محمدپور، مصطفی.، پیغمبردوست، سیدهادی و علیرضالو، کاظم. (۱۳۹۴). فرآوری سبزی ریحان با ماندگاری بالا با استفاده از روش نوین ضدعفونی .پژوهش های صنایع غذایی، سال بیست و پنجم، شماره ۳، صفحه ۵۱۶-۵۰۳.

۳. پلنگیان، سحر.، زابلی، فاطمه و فتاحی، اسماعیل. (۱۳۹۶) بررسی خاصیت ضد میکروبی اسانس گیاه اناریجه بر روی برخی از میکروارگانیسم های مولد توکسین در مواد غذایی، اولین همایش ملی نقش گیاهان دارویی در اقتصاد مقاومتی، فریدونشهر.

۴. زرگری، علی. (۱۳۶۸). گیاهان دارویی. جلد چهارم، انتشارات دانشگاه تهران، ۱۳۰ صفحه.

۵. سلطان دلال، محمدمهدی.، یزدی، محمدحسین و آقامیری، سولماز. (۱۳۹۳). ارزیابی اثر ضدمیکروبی اسانس‌های گیاهی آویشن شیرازی و رزماری بر سویه-های استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به آنتی‌بیوتیک ایزوله شده از مواد غذایی. فصلنامه گیاهان دارویی. سال ۱۳، شماره ۵۲، صفحه ۴۵-۳۵.

۶. سلمانیان، شهلا.، صادقی ماهونک، علیرضا.، اعلمی، مهران و قربانی، محمد. (۱۳۹۲). ارزیابی ترکیبات تام فنولی، فلاونوئیدی، آنتوسیانینی و فعالیت ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی عصاره استونی میوه ولیک. مجله علمی

دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، شماره ۱۳، صفحه ۶۶-۵۳.

۷. سلیم‌پور، فهیمه.، مازوجی، علی.، مظهر، سیده فلور و برزین، گیتی. (۱۳۹۲). مقایسه خواص ضد باکتریایی اسانس چهار گونه گیاه دارویی مریم گلی .*Salvia* L پژوهش در پزشکی، شماره ۴، صفحه ۲۱۰-۲۰۵.

۸. محمودی، هادی.، رهنما، کامران و عرب خانی، محمدعلی. (۱۳۸۸). بررسی اثر ضدباکتریایی اسانس و عصاره آبی گیاهان دارویی بر باکتریهای عامل شانکر و لکه برگی درختان میوه هسته‌دار. فصلنامه گیاهان دارویی، سال ۹، دوره ۴، شماره ۳۶. صفحه ۲۱-۱۳.

۹. هاشمی، علی.، شمس، سعید.، براتی، محمد و صمدانی، عزیزه. (۱۳۸۹). بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره متانولی گیاهان آویشن شیرازی، مورد و اسپند برروی سوش های استاندارد و ایزوله های بالینی پسودوموناس آئروژینوزا حاوی بتالاکتاماز با طیف وسیع. مجله دانشگاه علوم پزشکی اراک، سال ۱۴، شماره ۴، صفحه ۱۱۲-۱۰۴.

10. Al Bahtiti N.H. 2012. *Teucrium polium* extract Jordanian Ja'adeh. Asian Journal of Agriculture Sci. 4:379-382.

11. Ariaei, P., Tavakolipour, H., Rezaei, M and Elhamirad, A. 2013. Antimicrobial activity of methyl cellulose based edible film enriched with *Pimpinella affinis* oil on the *Hypophthalmichthys molitrix* fillet under refrigerator storage condition. Electronic J Food Processing and Preservation. 5:13-26.

12. Ariaei, P., Tavakolipour, H., Rezaei, M., Elhamirad, A.H and Bahram, S. 2015. Effect of methylcellulose coating enriched with *Pimpinella affinis* oil on the quality of silver carp fillet during refrigerator storage condition. J Food Processing and Preservation. 39:1647-1655.

13. Asgar, A., Wei, Y.Z and Mustafa, M.A. 2015. Exploiting propolis as an antimicrobial edible coating to control post-harvest anthracnose of bell pepper. Packaging Technol and Sci. 28:173-179.

14. Askari, F., Sefidkon, F., Teimouri, M and Youser Nanaei, S. 2009. Chemical composion and antimicrobial activity of the essential oil of *Pimpinella puberula* (DC). Boiss. Agriculture Sci Technol. 11:431-438.

15. Božik, M., Nový, P and Klouček, P. 2017. Chemical composition and antimicrobial activity of cinnamon, thyme, oregano and clove essential oils against plant pathogenic bacteria. Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis. 65:1129-34.

16. Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. International J Food Microbiol. 94:223-253.

17. Cheesman M. J, Ilanko A, Blonk B and Cock I. E. 2017. Developing new antimicrobial therapies: are synergistic combinations of plant extracts/compounds with conventional antibiotics the solution?. Pharmacognosy reviews, 11(22), 57.

18. Cimanga, K., Kambu, K., Tona, L., Apers, S., De Bruyne, T. 2002. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. J Ethnopharmacol. 79:213-20.

19. Dennis, C. 1983. Post-Harvest Pathology of Fruits and Vegetables, New York: Academic Press. 219–257.

20. Ebrahimzadeh, M.A., Nabavi, S.M., Nabavi, S.F., Eslami, S and Bekhradnia, A.R. 2010. Mineral elements and antioxidant activity of three locally edible and medicinal plants in Iran. Asian J Chemist. 22: 57-62.

21. Eliopoulos, G.M., Moellering, R.C and Lorian, V. 1996. Antibiotics in Laboratory Medicine. The Williams & Wilkins Co., Baltimore. 432-492.

22. Friedman, M., Henika, P and Mandrell, R. 2002. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenese*, and *Salmonella enterica*. J Food Protection. 65:1545–1560.

some pathogenic bacteria. Biological Sci. 41:1-11.

32. Mojab F., Poursaeed M., Mehrgan H and Pakdaman S. 2008. Antibacterial activity of *Thymus daenensis* methanolic extract. Pakistan J Pharmaceutical Sci. 21:210-213.

33. Momin S., Irfan S., Ahmad S., Manzoor M and Irfan H. 2017. Comparison of antimicrobial activities, herb and essential oil production of *Thymus vulgaris* L. and *T. serpyllum* L. in balochistan, Pakistan. Pakistan J Weed Sci Research. 23:112-117.

34. Moosavy M, Basti A, Misaghi A, Salehi T, Abbasifar R, Mousavi H and Alipour M. 2008. Effect of *Zataria multiflora* Boiss essential oil and nisin on *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in a food model system and on the bacterial cell membranes. Food Research Inter. 41:1050-1057.

35. Mostafa A, Al-Askar A, Almaary K, Dawoud T and Sholkamy E. 2018. Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases. Saudi Journal of Biological Sciences. 25:361-366.

36. NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2001. Performance Standards for Anti-microbial Susceptibility Testing: Eleventh Informational Supplement. Document M 100-S11. National Committee for Clinical Laboratory Standard, Wayne, PA, USA.

37. Nguyen C and Prunier J.P. 1989. Involvement of *Pseudomonads* in deterioration of ready-to-use salads. Inter J Food Sci Technol. 24:47-58.

38. Oroojalianm F., Kasra-Kermanshahi, R., Azizi, M. and Bassami M.R. 2010. Phytochemical composition of the essential oils from three Apiaceae species and their antibacterial effects on food-borne pathogens. Food Chemistry. 120:766-770.

39. Oussalah M, Caillet S, Saucier K and Lacroix M. 2007. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: E coli 0157:H7,

23. Gómez-Estaca, J., De Lacey, A.L., López-Caballero, M.E., Gómez-Guillén, M.C and Montero, P. 2010. Biodegradable gelatine-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. Food Microbiol. 27:889-896.

24. Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J.B., Christensen, A.B and Givskov, M. 2002. Food spoilage interactions between food spoilage bacteria. Inter J Food Microbiol. 78:79-97.

25. Holley, R.A and Patel, D. 2005. Improvement in shelf life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. Food Microbiol. 22(4):273-292.

26. Hosseini Nezhad, M., Alamshahi, L and Panjehkeh, N. 2012. Biocontrol efficiency of medicinal plants against *Pectobacterium carotovorum*, *Ralstonia solanacearum* and *Escherichia coli*. In The Open Conference Proceedings Journal. 3:109-117.

27. Karaman, S., Digrak, M., Ravid, U and Ilcim, A. 2001. Antibacterial and antifungal activity of the essential oils of *Thymus revolutus* celak from Turkey. J Ethnopharmacol. 76:183-186.

28. Kazemizadeh, Z., Yousefzadi, M., Ashabi, M.A and HeidariRikan, M. 2010. Chemical composition and antibacterial properties of the essential oils in *Salvia macrochlamys* Boiss. and Kotschy from West Azerbaijan. J Med Plants. 1:75-81.

29. Kokoskova, B and Pavela, R. 2006. Effectivity of essential oils against pectinolytic *Erwinia chrysanthemi* and *Pseudomonas marginalis*. Mitteilungen-Biologischen Bundesanstalt Fur Land Und Forstwirtschaft. 408:72.

30. Lee, D.H., Kim, J.B., Kim, M., Roh, E., Jung, K., Choi, M., Oh, C., Choi, J., Yun, J and Heu, S. 2013. Microbiota on spoiled vegetables and their characterization. J Food Protection. 76:1350-1358.

31. Messaoudi, M., Benreguieg, M., Merah, M and Messaoudi, Z. 2019. Antibacterial effects of *Thymus algeriensis* extracts on

Salmonella typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. Food Control. 18:414-420.

40. Ramezanian A, Azadi M, Mostowfizadeh-Ghalamfarsa R and Saharkhiz M. 2016. Effect of Zataria multiflora Boiss and Thymus vulgaris *L*. essential oils on black rot of 'Washington Navel'orange fruit. Postharvest Biology and Technology. 112: 152-158.

41. Rasooli, I and Mirmostafa, S.A. 2002. Antibacterial properties of *Thymus pubescens* and *Thymus sepylum* essential oils. Fitotrapia. 73:244-50.

42. Saeidi S, Mohsenbeygi M, Roustakhiz J, Javadian F and Hassanshahian M. 2019. Antimicrobial and anti-biofilm effects of Mentha piperita and Zataria multiflora on Pathogenic Bacteria. J Mei Bacterio. 8: 37-44.

43. Sales M, Costa H, Fernandes P, Ventura J and Meira D. 2016. Antifungal activity of plant extracts with potential to control plant pathogens in pineapple. Asian Pacific J Trop Biomed. 6: 26-31.

44. Sandri, I.G., Zacaria, J., Fracaro, F., Delamare, A.P. and Echeverrigaray, S. 2007. Antimicrobial activity of the essential oils of Brazilian species of the genus *Cunila* against foodborne pathogens and spoiling bacteria. Food Chemistry. 103:823-828.

45. Sangclic, O. 2003. Sensitivity of four pathogenic bacteria to Turkish thyme and oregano. Wissenchaft Und. Technologic. 36:467-473.

46. Shuping D and Eloff J. 2017. The use of plants to protect plants and food against fungal pathogens: A review. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines. 14:120-127.

47. Sonam K. S and Guleria S. 2017. Synergistic antioxidant activity of natural products. Annal. Pharmacol. Pharm. 2: 1, 6.

48. Song, Z., Li, F., Guan, H., Xu, Y., Fu, Q and Li, D. 2017. Combination of nisin and ε-polylysine with chitosan coating inhibits the white blush of fresh-cut carrots. Food Control. 74:34-44.

49. Tajkarimi, M.M., Ibrahim, S.A and Cliver, D.O. 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. Food Control. 21:1199-1218.

50. Tepe, B., Donmez, E., Unlu, M., Candan, F., Daferera, D., Vardar-Unlu, G., Polissiou, M and Sokmen, A. 2004. Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha* (Montbret et Aucher ex Benth.) and *Salvia multicaulis* (Vahl.). Food Chemist. 84:519-525.

51. Toth, I.K., Bell, K.S., Holeva, M.C. and Birch, P.R. 2003. Soft rot erwiniae: from genes to genomes. Molecular Plant Pathol. 4:17-30.

52. Ultee, A., Bennik, M.H and Moezelaar, R.J. 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen Bacillus cereus. Appl Environ Microbiol. 68:1561-1568.

53. Verdian-Rizi, M. 2008. Chemical composition and antimicrobial activity of *Pimpinella affinis* ledeb. essential oil growing in Iran. Inter J Green Pharm. 3:913-915.

۵۴. یاراحمدی، مریم.، یونسیان، مسعود.، موبدی، ایرج.، پورمند، محمد.، شاهسونی، عباس.، نعمانپور، بیژن و ندافی، کاظم. (۱۳۹۰). بررسی کارایی گندزدایی کاهو بر اساس روش متداول در ایران. مجله تحقیقات نظام سلامت، سال هفتم، شماره ۶، صفحه ۱۰-۱.

Investigate the antimicrobial activity and synergistic effects of *Zataria multiflora, Salvia verticillata,* and *Froriepia subpinnata* ethanolic extracts on bacterial vegetable decay

Bandian L[1], Moghaddam M[1*], Bahreini M[2]

1. Department of Horticultural, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad.
2. Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad.

***Corresponding Author:** *m.moghadam@um.ac.ir*

Received: 28 February 2020 Accepted: 29 May 2020

Abstract

According to the high post-harvest waste vegetables and limit the use of fungicides and anti-bacterial chemical, the use of natural compounds as a substitute for synthetic substances with fewer side effects are becoming increasingly important. This study aimed to investigate the antimicrobial activity of three medicinal plants ethanolic extract namely *Zataria multiflora, Salvia verticillata*, and *Froriepia subpinnata* on two bacteria including *Pectobacterium carotovorum* and *Pseudomonas aeruginosa.* An experimental study was conducted in the *in vitro* condition. The extracts of the above plants were prepared by the maceration method. The antimicrobial activities were investigated using the micro broth dilution method and by determining the minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC), and also their synergistic properties. Variables included extract types, different concentrations of extracts, and bacterial strains. The minimum inhibitory concentration of *Z. multiflora* varied between 3.12 to 6.25 mg/mL; that of *S. verticillata* extract was between 12.3 and 25 mg/mL, and for the *F. subpinnata* extract was 12.5 to 25 mg/mL. The combined use of the extract of *Z. multiflora* and *S. verticillata* showed that there was an antagonistic effect between the two extracts in the case of *P. carotovorum* and the synergic effect for *P. aeruginosa*. The results of the combined use of extracts of *Z. multiflora* and *F. subpinnata* and checkerboard dilution Modified (FIC) assay showed a synergic effect on *P. carotovorum* and an antagonistic effect on *P. aeruginosa*. The combined use of the *S. verticillata* and *F. subpinnata* showed a synergic effect on both bacterial strains (0.5 <FIC> 4). A comparison of the results of inhibitory effects revealed that *Z. multiflora* extract had more potent antibacterial activity than *S. verticillata* and *F. subpinnata*. *P. carotovorum* was more sensitive than *P. aeruginosa*. FIC analysis showed that in the studied bacteria the combined application of *S. verticillata* and *F. subpinnata* extracts had better results than other combined extracts.

Keywords: *Pectobacterium*, *Froriepia subpinnata*, *Zataria multiflora*, MIC, MBC.