

مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir



مقاله علمی پژوهشی

بررسی گروههای عاملی، ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی، فعالیت آنتیاکسیدانی و ضدمیکروبی انسانس اسطوخودوس لارستانی: یک مطالعه آزمایشگاهی

مینا علادی^۱، محمد امین مهرنیا^{۲*}، حسن برزگر^۳، بهروز علیزاده ببهانی^۴

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاٹانی، ایران.

۲- استادیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاٹانی، ایران.

۳- دانشیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاٹانی، ایران.

چکیده

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۱۹

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۴/۲۶

كلمات کلیدی:

انسانس روغنی،

استوخودوس لارستانی،

فعالیت ضدمیکروبی،

گروههای عاملی.

استوخودوس لارستانی با نام علمی *Lavandula stricta Del* از خانواده نعنائیان یکی از گیاهانی است که در طب سنتی ایران مورد استفاده قرار می‌گیرد. هدف از این پژوهش تعیین گروههای عاملی و شناسایی کیفی، میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی، فعالیت آنتیاکسیدانی و ضدمیکروبی انسانس اسطوخودوس لارستانی بود. گروههای عاملی انسانس به وسیله طیف سنجی تبدیل فوریه فروسرخ (FTIR) در محدوده طول موج $4000-500 \text{ cm}^{-1}$ تعیین گردید. میزان فنول و فلاونوئید کل و فعالیت آنتیاکسیدانی به ترتیب به روش‌های فولین سیوکالچو، رنگ سنجی آلومنیوم تری کلراید و روش‌های مهار رادیکال آزاد ABTS و DPPH تعیین گردید. پیک‌های مشاهده شده در انسانس اسطوخودوس لارستانی مؤید حضور گروههای عاملی C-O، C-C، C=O، C-H، O-H و C-O ترکیبات زیست فعال بود. مقدار فنول و فلاونوئید کل انسانس به ترتیب برابر با $68/60 \pm 0/68 \text{ mg GAE/g}$ و $19/10 \pm 0/52 \text{ QE/g}$ تعیین شد. فعالیت آنتیاکسیدانی نیز بر اساس درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH و ABTS به ترتیب برابر با $59/0 \pm 0/63$ و $67/68 \pm 0/53$ به دست آمد. فعالیت ضدمیکروبی انسانس نیز به چهار روش دیسک دیفیوژن، چاهک آگار، حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشنده‌گی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی به دو روش دیسک دیفیوژن و چاهک آگار نشان داد که باکتری گرم مثبت استافیلکوکوکوس اورئوس حساس‌ترین سویه به انسانس اسطوخودوس لارستانی بود. حداقل غلظت مهارکنندگی انسانس برای باکتری‌های سالمونلا تیفی، سودوموناس آئروژنیوز، لیستریا اینوکوا، استافیلکوکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی برابر با $3/125 \text{ mg/ml}$ و برای باسیلوس سرئوس برابر با $6/25 \text{ mg/ml}$ بود. حداقل غلظت کشنده‌گی برای باکتری‌های لیستریا اینوکوا، سودوموناس آئروژنیوز و سالمونلا تیفی به ترتیب برابر با 100 mg/ml ، 200 mg/ml و 400 mg/ml برای باکتری‌ها (استافیلکوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس و اشرشیاکلی) بیشتر از 400 mg/ml بود.

DOI: 10.52547/fsct.18.119.61

*مسئول مکاتبات:

Mehrnia@asnrukh.ac.ir

عنوان گیاه دارویی استفاده می‌شده است. اسانس روغنی اسطوخودوس برای بسیاری از مشکلات از جمله استرس، اضطراب، خستگی، تحیرک‌پذیری، سردرد، میگرن، بی‌خوابی، افسردگی، هضم غذا، نفخ شکم، ناراحتی معده، مشکلات کبد و کیسه صفراء، عصبی شدن و بی‌اشتهاجی مفید است. به عنوان دهان‌شویه و خوشبوکننده دهان نیز استفاده می‌شود [۸]. اخیراً در تولید مواد غذایی نیز به عنوان طعم‌دهنده طبیعی کالاهای پخته شده، نوشیدنی‌ها و شیرینی‌ها مورد استفاده قرار گرفته است [۹]. اسانس اسطوخودوس ماده‌ای فرار و فعال از نظر زیست‌شناسی و یک محصول جانبی از گل‌های اسطوخودوس با رایحه‌ای خاص است. از نظر شیمیابی، این اسانس مخلوطی از ترکیبات ترپن‌نوئیدی (مونوترين‌ها، سیکوئن‌ها و مشتقان اکسیزن آن‌ها) است که بر اساس واحدهای ایزوپرونوئید مشخص می‌شود. ترکیبات اسانس اسطوخودوس شامل هیدروکربن‌ها (میرسن^۱، α -پینن^۲، کاریوفیلن^۳، الکل‌ها (لینالول^۴، α -ترپنول^۵، بورنیول^۶، کتون‌ها (کامفور^۷، کارون^۸، یوکارون^۹، استرها (استات‌لینالول، لاوندو لیل استات^{۱۰}، استات‌ژرانیل^{۱۱})، آلدیدها (نرا^{۱۲})، اکسیدها (اکسید کاریوفیلن^{۱۳}) و اترها (اوکالیپتو^{۱۴}) می‌باشد. علاوه بر این ترکیبات، کومارین‌ها و اسیدهای آلی نیز در اسانس اسطوخودوس یافت می‌شود. طبق مطالعات انجام شده، اسانس اسطوخودوس دارای خواص ضدبакتری، ضدقارچ، ضدویروس، آنتی‌اکسیدان، ضددرد، ضدالتهاب و ضدآپاسم است [۱۰، ۱۱].

احمدی اسب چین و همکاران (۲۰۱۲)، اثر ضدبacteriایی اسانس اسطوخودوس را بر روی باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت مورد تایید قرار دادند [۱۲]. حیدری و همکاران (۲۰۲۰)، گزارش کردند که پوشش حاوی ۲ درصد اسانس اسطوخودوس ویژگی‌های کیفی گوشت شترمرغ و مدت ماندگاری آن را افزایش داده

1. Myrcene
2. α -pinene
3. Caryophyllene
4. Linalool
5. α -terpineol
6. Borneol
7. Camphor
8. Carvone
9. Eucarvone
10. Lavandulyl acetate
11. Geranyl acetate
12. Neral
13. Caryophyllene oxide
14. Eucalyptol

۱- مقدمه

گیاهان معطر و دارویی و اسانس‌های حاصل از آن‌ها منبع غنی از مولکول‌های فعال بیولوژیکی هستند. اخیراً استفاده از اسانس‌های گیاهی به دلیل وجود ترکیبات ضدمیکروبی طبیعی، سمیت کم و ایمن بودن، پذیرش عمومی بیشتر نسبت به مواد افزودنی سنتزی و همچنین نیاز به داروهای جایگزین به دلیل کاهش حساسیت و افزایش مقاومت در برابر آنتی بیوتیک‌ها که توسط بسیاری از عوامل بیماری‌زا ایجاد می‌شود، مورد توجه زیادی قرار گرفته است. اسانس‌های گیاهی طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های بیولوژیکی نشان می‌دهند، بنابراین دارای پتانسیل کاربردی گسترده‌ای در صنایع دارویی، آرایشی، بهداشتی و غذایی می‌باشند و به دلیل خاصیت ضدمیکروبی به عنوان داروهای طبیعی و همچنین نگهدارنده‌های زیستی مورد استفاده قرار می‌گیرند. اسطوخودوس گیاهی از جنس *Lavandula* و از خانواده نعناعیان (Lamiaceae) است، دارای ۳۹ گونه، ۳۰ زیرگونه و ۱۷ گونه هیبریدی است [۱، ۲]. در ایران دو گونه چند ساله آن به *Lavandula* و *Lavandula stricta Del* و *sublepidota Rech* وجود دارد که بومی ایران هستند و در مناطق جنوبی ایران می‌رویند [۳]. اسطوخودوس لارستانی با نام علمی *Lavandula stricta Del* یک گیاه معطر بوته‌ای و چند ساله به ارتفاع ۴۵–۲۰۰ سانتی‌متر با گل آذین‌هایی به رنگ بنفش است و به صورت خودرو در منطقه کوهستانی گنو و رودان در استان هرمزگان، جنوب ایران رشد می‌کند. در فارسی به آن اسطوخودوس راست، افراشته و شاهی نیز می‌گویند. همچنین *coronopifolia Poir* دارای نام‌های علمی مترادف *Isinia laristanica* می‌باشد. قسمت‌های *Lavandula* هوایی آن معمولاً در طب سنتی و به طور عامیانه برای درمان سرماخوردگی، گرفتگی و دردهای عضلانی در بین افراد بومی استفاده می‌شود [۴، ۵].

برگ‌ها و گل‌های گیاه اسطوخودوس غنی از آنتی‌اکسیدان‌های پلی‌فنول است [۶]. گل‌های اسطوخودوس حاوی حداقل ۳ درصد اسانس هستند که ترکیب کیفی و کمی آن‌ها متغیر است و به ژنتیک، شرایط آب و هوایی، نحوه تولید مثل و خصوصیات ریخت‌شناسی گیاه بستگی دارد [۷]. از اسطوخودوس قرن‌ها به-

ABTS⁹، DPPH⁸ و (مرک آلمان)، رادیکال آلمان)، میتوان اول (سیگما آلداریچ) با گردید آزمایشگاهی تهیه گردید.

۲-۲- تهیه اسانس اسطوخودوس لارستانی

گیاه اسطوخودوس لارستانی با نام علمی *Lavandula stricta* خردباری شد. سپس گیاه اسطوخودوس توسط آسیاب آزمایشگاهی پودر شده و ۵۰ گرم پودر گیاه به دستگاه کلونجر شیشه‌ای ساخت شرکت آدک تجهیز کشور ایران حاوی ۷۵۰ میلی لیتر آب مقطر منتقل و عمل اسانس‌گیری بر اساس روش تقطیر با آب (با سرعت ۱ میلی‌متر بر دقیقه) به مدت ۳ ساعت انجام شد. سپس اسانس به دست آمده در ظروف شیشه‌ای در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد [۱۷].

۳-۲- شناسایی، کیفی، و گروههای عاملی، ترکیبات

اسانس با تکنیک طیف سنجی تبدیل فوریه فروسرخ

از آنالیز طیف سنجی تبدیل فوریه فروسرخ (FTIR)^{۱۰} برای تعیین گروههای عاملی ترکیبات شیمیایی و شناسایی کیفی انسانس استخواندوس لارستانی استفاده شد. ابتدا عصاره پودر شده با بروماید پتاسیم ترکیب و سپس به وسیله پرس کردن به فرصن تبدیل شد. طیف FTIR انسانس در محدوده طول موج cm^{-1} ۴۰۰–۵۰۰ نمایندگان FTIR، Thermo Nicolet^{۱۱}

Avatar 370، ساخت آمریکا) ثبت گردید [۱۸].

۴-۲- اندازه‌گیری میزان فنول کل

از روش فولین سیوکالچو^{۱۱} برای اندازه گیری میزان فنول کل اسنس اسطوخودوس لارستانی استفاده شد. به این صورت که میکرولیتر از اسنس اسطوخودوس لارستانی را با ۵۰ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۷/۵ درصد و ۵/۵ میلی‌لیتر معرف فولین سیوکالچو ترکیب نموده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد، سپس میزان جذب در طول موج ۷۶۵ نانومتر به وسیله دستگاه اسپیکتروفوتومتر (Biochrom WPA، Lightwave UV/VIS S2000، انگلیس) قرائت شد. مقدار

8. 2,2-di phenyl-1-picryl hydrazyl

9. 2,2'-azinobis(3-ethyl benzo thiazoline-6-sulfonic acid)

10. Fourier transform infra red

11. Folin-Ciocalteu

است [۱۳]. این پژوهشگران در مطالعه‌ای دیگر نیز فعالیت ضدمیکروبی انسانس اسطوخودوس فلس‌دار را به اثبات رسانیده‌اند [۱۴]. ربانی و همکاران (۲۰۱۵)، اثر ضدمیکروبی انسانس اسطوخودوس را بر دو باکتری زانتوموناس کمپستریس^۱ و اشرشیاکلی^۲ در شرایط آزمایشگاهی اثبات نمودند [۱۵]. طاطبایی و یزدی و همکاران (۲۰۱۴)، اثر ضدمیکروبی عصاره‌های آبی و *Rosmarinus officinalis L.* و *Lavandula stoechas L.* اتابولی گیاهان را بر باکتری‌های لیستریا مونوستیروژنر^۳، پاسیلوس سرئوس^۴، انتروكوکوس فکالیس^۵، انتروباکتر آنزوژنر^۶ و سالمونلا تیفی^۷ در شرایط آزمایشگاهی به اثبات رساندند [۱۶]. مشاک و همکاران (۲۰۱۶)، اثر ضدمیکروبی فیلم‌های کیتوزان حاوی انسانس اسطوخودوس را مورد بررسی قرار دادند. این پژوهشگران گزارش کردند که فیلم‌های کیتوزان حاوی ۴ درصد انسانس اسطوخودوس دارای اثرات ضدمیکروبی می‌باشد [۱۷].

پژوهش حاضر با هدف تعیین گروههای عاملی و شناسایی کیفی ترکیبات زیست فعال اسانس اسطوخودوس لارستانی، میزان فنول و فلاونوئید کل، فعالیت آنتیاکسیدانی و بررسی اثر ضد-باکتریایی آن بر ۳ سویه گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا اینوکوا، باسیلوس سرئوس و ۳ سویه گرم منفی اشرشیاکلی، سودوموناس آنروزینوزا و سالمونلا تیفی صورت یذیر فت.

۲- مواد و روش‌ها

۱-۲- تهیه مواد شیمیایی و میکروبی

محیط‌های کشت میکروبی مولر هیتوون آگار و مولر هیتوون برات (مرک آلمان)، تری فنیل ترازوژولیوم کلراید (مرک آلمان)، دیسک آنتی‌بیوتیک جنتامایسین (پادتن طب)، دیسک بلانک (پادتن طب)، دی متیل سولفوکساید (مرک آلمان)، فولین سیو کالچو (مرک آلمان)، نیتریت سدیم (مرک آلمان)، آلومنینیوم تری کلرید (مرک آلمان)، سود ۱ مولار (مرک آلمان)، پتاسیم سولفات (مرک

1. *Xanthomonas campestris*
 2. *Escherichia coli*
 3. *Listeria monocytogenes*
 4. *Bacillus cereus*
 5. *Enterococcus faecalis*
 6. *Enterobacter aerogenes*
 7. *Salmonella typhi*

۷ میلی مولار از ABTS تهیه شده و با افزودن پتاسیم سولفات غلظت آن تا ۲/۴۵ میلی مولار رقیق گردید. سپس محلول حاصل به مدت ۱۶ ساعت در مکان تاریک و در دمای ۲۵ درجه سانتی-گراد قرار داده شد. در ادامه، رقیق سازی محلول کاتیونی رادیکال ABTS توسط متابول تارسیدن به جذب ۰/۷ در طول موج ۷۳۴ نانومتر انجام شد. در نهایت، ۳۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف انسانس به ۳/۹ میلی لیتر از محلول رادیکال ABTS اضافه و بعد از ۶ دقیقه، جذب آن در دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت و ثبت گردید. فعالیت مهارکنندگی بر اساس فرمول زیر محاسبه گردید.

$$\text{[۲۲]} \quad [A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}] / A_{\text{control}} \times 100 = \text{درصد فعالیت مهارکنندگی}$$

۷-۲- تهیه سویه‌های میکروبی استاندارد و سوسپانسیون میکروبی

در این پژوهش از ۳ سویه گرم مشیت استافیلکوکوس اورئوس، لیستریا اینوکوا، باسیلوس سرئوس و ۳ سویه گرم منفی اشرشیاکلی، سودوموناس آنروزینوزا و سالمونلا تیفی موجود در آزمایشگاه میکروبیولوژی مواد غذایی، دانشکده علوم دامی و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان استفاده گردید. جهت انجام تمامی آزمون‌های میکروبی، ۲۴ ساعت قبل از شروع آزمون از کشت ذخیره، تلقیح صورت پذیرفت. سپس جهت تهیه سوسپانسیون باکتریایی با کدورتی معادل استاندارد نیم مک فارلن از دستگاه اسپکتروفتومتر با طول موج ۶۲۰ نانومتر (با جذب بین ۱۳-۰/۰۸) استفاده گردید. در این حالت یک سوسپانسیون باکتریایی حاوی ^۱ CFU/ML _{۱۰۸} $\times 1/۵$ ایجاد گردید [۲۳].

در این پژوهش جهت بررسی فعالیت ضد میکروبی انسانس اسطوخودوس لارستانی، از چهار روش ضد میکروبی شامل دیسک دیفیوژن، چاهک آگار، حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشنندگی به شرح زیر استفاده گردید.

۸-۲- روش دیسک دیفیوژن آگار

جهت انجام این آزمون ابتدا انسانس اسطوخودوس لارستانی از فیلتر سر سرنگی ۰/۲۲ میکرونی عبور داده شد و در طرف

فنول کل اسانس اسطوخودوس لارستانی بر حسب میلی گرم گالیک اسید در هر گرم اسانس گزارش گردید [۱۹].

۲-۵- اندازه‌گیری میزان فلاوونوئید کل

برای اندازه‌گیری ترکیبات فلاوونوئیدی اسانس اسطوخودوس لارستانی از روش Zhishen و همکاران (۱۹۹۹)، استفاده شد. طبق این روش ابتدا ۱ میلی لیتر اسانس اسطوخودوس با ۱/۲۵ میلی لیتر آب مقطر ترکیب شده، سپس ۷۵ میکرولیتر محلول نیتریت سدیم (۱:۲۰) به آن اضافه گردید. پس از گذشت ۵ دقیقه، ۱۵۰ میکرولیتر محلول ۱۰ درصد آلمینیوم تری کلراید به آن افزوده شد. در نهایت ۱ میلی لیتر سود ۱ مولار به محلول اضافه شده و بعد از ۶ دقیقه در طول موج ۵۱۰ نانومتر جذب آن اندازه-گیری و ثبت شد. میزان فلاوونوئید کل اسانس اسطوخودوس لارستانی بر حسب میلی گرم کوئرستین در هر گرم اسانس گزارش گردید [۲۰].

۲-۶- تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس اسطوخودوس لارستانی

جهت تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس اسطوخودوس لارستانی از ۲ روش مهار رادیکال آزاد DPPH و رادیکال آزاد ABTS استفاده گردید.

از روش Brighente و همکاران (۲۰۰۷)، برای تعیین ظرفیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH، استفاده شد. طبق این روش یک میلی لیتر از اسانس اسطوخودوس لارستانی با ۲ میلی لیتر از محلول رادیکال DPPH (۰/۰۰۴ درصد) مخلوط شده و به مدت ۳۰ دقیقه در مکان تاریک، در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس میزان جذب به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر، در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت گردید. از متابول و محلول اسانس به عنوان شاهد (Abs_{blank}) و از محلول DPPH و متابول به عنوان کنترل (Abs_{control}) استفاده گردید. در نهایت، درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی (AA%) طبق فرمول زیر محاسبه گردید [۲۱].

$$\text{AA\%} = 100 - \{[(\text{Abs}_{\text{sample}} - \text{Abs}_{\text{blank}}) \times 100] / \text{Abs}_{\text{control}}\}$$

جهت ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس اسطوخودوس لارستانی با مهار رادیکال آزاد ABTS، ابتدا محلول آبی با غلظت

1. Colony Forming Unit/ Milliliter

۱۰-۲- تعیین حداقل غلظت بازدارنگی از رشد ^۱(MIC)

جهت تعیین حداقل غلظت بازدارنگی از رشد انسنس اسطوخودوس لارستانی، از روش میکرودایلوشن براث با استفاده از پلیت ۹۶ خانه‌ای استریل استفاده شد. برای انجام این آزمون ابتدا از انسنس اسطوخودوس لارستانی استریل شده، یک محلول پایه با غلظت ۴۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر تهیه شد. سپس رقت‌های متواالی ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۳/۱۲۵، ۶/۲۵ و ۰/۷۸ میلی گرم بر میلی لیتر از محلول پایه تهیه گردید. در ادامه به وسیله سمپلر میزان ۲۰ میکرولیتر از رقت‌های تهیه شده و ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون‌های میکروبی استاندارد تهیه شده به هر یک از خانه‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای اضافه شدند. یک خانه یا چاهک حاوی محیط کشت و سوسپانسیون میکروبی به عنوان کنترل مثبت و یک خانه حاوی محیط کشت و انسنس به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. سپس پلیت ۹۶ خانه‌ای در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمانخانه‌گذاری شد. بعد از ۲۴ ساعت گرمانخانه‌گذاری به تمام خانه‌ها میزان ۱۰ میکرولیتر معرف تری فنیل تترازولیوم کلراید ۵ درصد اضافه شد و مجدداً به مدت نیم ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمانخانه‌گذاری شد. اولین خانه یا چاهکی که پس از نیم ساعت گرمانخانه‌گذاری تغییر رنگ نداد و رنگ قرمز یا ارغوانی مشاهده نشد، به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) در نظر گرفته شد و بر حسب میلی گرم بر میلی لیتر گزارش گردید [۲۶].

۱۱-۲- تعیین حداقل غلظت کشندگی ^۲(MBC)

جهت انجام این آزمون ابتدا محیط کشت مولر هیتوون آگار تهیه و به پتربی دیش‌های استریل اضافه گردید. سپس به وسیله سمپلر میزان ۱۰۰ میکرولیتر از تمام غلظت‌هایی که در مرحله قبل به عنوان MIC تعیین شد و غلظت‌های بیشتر از آن (چاهک‌هایی که در آنها تغییر رنگ قرمز یا ارغوانی مشاهده نشد)، به پتربی دیش‌های حاوی محیط کشت مولر هیتوون آگار اضافه شده و با اسپریدر استریل در سطح پتربی دیش پخش شد. پتربی دیش‌های تلقیح شده در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت تلقیح شد.

استریل ریخته شد. محیط کشت مولر هیتوون آگار نیز تهیه و به پتربی دیش‌های استریل اضافه گردید. در ادامه یک لوب از کشت پایه هر باکتری که از ۲۴ ساعت قبل آماده شد را در پتربی دیش-های حاوی محیط کشت مولر هیتوون آگار تلقیح و سپس ۳ دیسک کاغذی استریل (۲ دیسک برای انسنس و یک دیسک فاقد انسنس نیز به عنوان شاهد در نظر گرفته شد) با فاصله معین از یکدیگر در سطح این پتربی دیش‌ها قرار داده شد. میزان ۲۰ میکرولیتر از انسنس اسطوخودوس استریل به ۲ دیسک کاغذی مقایسه اثر ضد میکروبی انسنس اسطوخودوس لارستانی با آنتی-بیوتیک‌های رایج درمانی استفاده گردید و دیسک‌های جنتامایسین به وسیله یک پنس استریل در سطح پتربی دیش‌های حاوی محیط کشت مولر هیتوون آگار تلقیح شده، قرارداده شد. درنهایت، تمام پتربی دیش‌های تلقیح شده در انکوباتور (Model Brunswick Scientific, G25 & R25) با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمانخانه‌گذاری شدند، سپس قطر هاله عدم رشد به وسیله خط کش بر حسب میلی متر اندازه گیری شد. [۲۴].

۹-۲- روش چاهک آگار

در این روش پس از پخش محیط کشت مولر هیتوون آگار به صورت مذاب به میزان ۲۵ میلی لیتر، در هر پتربی دیش ۸ سانتی-متری به وسیله انتهای پیپت پاستور استریل، چاهک‌هایی با قطر ۶ میلی متر و با فاصله یکسان در پتربی دیش‌ها ایجاد گردید. سپس به منظور جلوگیری از نفوذ انسنس به کف پتربی دیش‌ها، ته آنها با محیط کشت مذاب استریل، مسدود گردید. سپس به وسیله سمپلر میزان ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های باکتریایی استاندارد تهیه شده برداشته و در سه نقطه از پتربی دیش‌ها پخش شد. در انتهای ۲۰ اسپریدر در تمامی سطح پتربی دیش‌ها پخش شد. در انتهای ۲۰ میکرولیتر از انسنس اسطوخودوس استریل به وسیله سمپلر به هر چاهک اضافه شد. یک چاهک فاقد انسنس نیز به عنوان شاهد لحاظ شد. تمامی پتربی دیش‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوباتور گذاری شدند. بعد از طی زمان مذکور هاله‌های بازدارنگی با خط کش بر حسب میلی متر اندازه گیری و ثبت گردید [۲۵].

1. Minimum Inhibitory Concentration
2. Minimum Bactericidal Concentration

کششی پیوند $C=O$ در ساختار آلدیدها، کتون‌ها، استرها و اسیدهای کربوکسیلیک است. پیک با عدد موجی $1643/80\text{ cm}^{-1}$ نیز احتمالاً به دلیل وجود باندهای $C=C$ یا $C=O$ در ساختار ترکیبات اسانس می‌باشد. در گستره عدد موجی 1500 cm^{-1} ترکیبات اسانس می‌باشد. در حلقه آروماتیک ترکیبات فنولی و گروههای عاملی $O-C-C$ در حلقه آروماتیک ترکیبات فنولی و گروههای عاملی H در ترکیبات فنولی است. پیکهای مشاهده شده در محدوده عدد موجی $1172/16, 1249/67\text{ cm}^{-1}$ ($1050-1300\text{ cm}^{-1}$) [۲۸]، نیز بیانگر حضور گروه عاملی $C-O$ در ساختار اترها، استرها، الکل‌ها و اسیدهای کربوکسیلیک اسانس می‌باشد.

[۲۸]

در مطالعه صورت گرفته توسط محمد پناه و همکاران (۲۰۲۰)، در طیف مادون قرمز اسانس اسطوخودوس پیک‌های $3360/41, 3363/04, 2955/84, 2925/89, 1463/88, 1374/89$ و $982/51\text{ cm}^{-1}$ که به ترتیب مربوط به گروههای عاملی $O-H$ ، ارتعاش کششی پیوند $P-O-C$ و $P=O$ ، CH_2CH_3 ، $C=O$ ، $C=C$ ، $C-H$ ، $O-H$ ، $C-O$ و $C-C$ می‌باشند، مشاهده گردید [۲۹]. در پژوهش حاضر نیز با توجه به نمودار FTIR به دست آمده در شکل ۱ پیک‌های شاخص زیادی در طیف FTIR اسانس مشاهده گردید که مؤید حضور گروههای عاملی $O-H$ ، $C=O$ ، $C-H$ ، $C-C$ و $C-O$ می‌باشد.

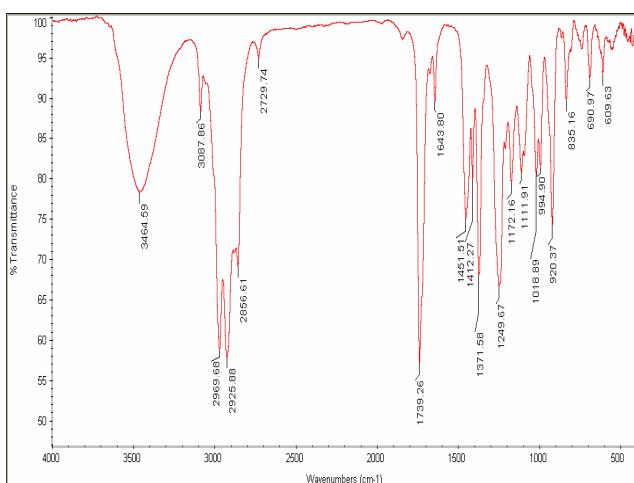


Fig 1 FTIR diagram of *Lavandula stricta* essential oil.

گرمانه‌گذاری شدند. اولین پلیتی که بعد از ۲۴ ساعت گرمانه‌گذاری هیچ کلی در آن مشاهده نشد به عنوان حداقل غلظت کشنندگی (MBC) در نظر گرفته شد و بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش گردید [۲۷].

۱۲-۲- آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌های حاصل توسط نرم افزار SPSS انجام شد. از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون چند دامنه‌ای دانکن برای تجزیه و تحلیل داده‌ها در سطح معنی‌داری ۹۵ درصد استفاده گردید.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- آنالیز طیف FTIR اسانس اسطوخودوس لارستانی

در این پژوهش گروههای عاملی ترکیبات زیست فعال اسانس اسطوخودوس لارستانی به وسیله طیف سنج تبدیل فوریه فروسرخ تعیین شد. طیف FTIR اسانس اسطوخودوس لارستانی در شکل ۱ آورده شده است. در آن میزان جذب بر حسب عدد موج برای پیوندهای شیمیایی بوده و عدد موج هر پیک معرف یک گروه عاملی خاص است. شدت پیک‌ها نیز متناسب با میزان جذب نور توسط پیوندهاست که هر چه قطبی‌تر باشد، ارتفاع پیک بلندتر خواهد بود. همانطور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، پیک $3464/59\text{ cm}^{-1}$ در محدوده عدد موجی $3360-3464\text{ cm}^{-1}$ [۳۲۰] ایجاد شده که مؤید حضور گروههای هیدروکسیل در ساختار ترکیبات الکلی و فنولی اسانس است. پنج پیک ایجاد شده محدوده عدد موجی $2729/74, 2856/61, 2925/88, 2969/68, 3087/86\text{ cm}^{-1}$ در کششی پیوندهای $C-H$ است. همچنین پیک‌های موجود در محدوده عدد موجی $(1340-1470\text{ cm}^{-1})$ و $(690-900\text{ cm}^{-1})$ نیز نشان دهنده وجود گروههای آلیفاتیک $C-H$ در آلانها و حلقه آروماتیک ترکیبات فنولی می‌باشد. پیک مشاهده شده با عدد موجی $1739/26\text{ cm}^{-1}$ در طیف FTIR، نیز مربوط به ارتعاشات

فلاوونوئید گزارش شده در پژوهش حاضر می‌باشد. این تفاوت در محتوای فنول و فلاوونوئید کل گونه‌های مختلف را می‌توان به تفاوت زننده بین گونه‌ها همراه با عوامل محیطی نسبت داد [۳۲].

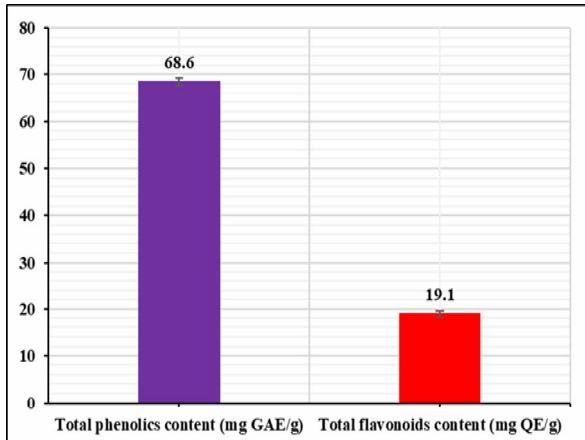


Fig 2 Total phenolics and flavonoids content of *Lavandula stricta* essential oil.

۳-۳ ارزیابی فعالیت آنتیاکسیدانی اسانس اسطوخودوس لارستانی

نتایج فعالیت آنتیاکسیدانی اسانس اسطوخودوس لارستانی در شکل ۳ آورده شده است. فعالیت آنتیاکسیدانی اسانس بر اساس درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH و ABTS تعیین گردید. درصد فعالیت آنتیاکسیدانی اسانس اسطوخودوس لارستانی به ۲ روش مهار رادیکال آزاد DPPH و ABTS به ترتیب برابر با 59.50 ± 0.73 و 67.78 ± 0.53 می‌باشد.

اخیراً اسانس‌های گیاهی و ترکیبات زیست فعال موجود در آن‌ها از نظر بیولوژیکی مورد توجه قرار گرفته‌اند. گزارش شده است که برخی از اسانس‌های استخراج شده از گیاهان از طریق رادیکال‌های مهارکننده و القای آنزیم‌های آنتیاکسیدانی، دارای فعالیت آنتیاکسیدانی می‌باشند [۳۳]. فعالیت آنتیاکسیدانی اسانس‌های گیاهی به ترکیب شیمیایی، غلط و ساختار مولکول‌های دارای خاصیت آنتیاکسیدانی و در واقع به محتوای فنول کل بستگی دارد. عمدتاً فعالیت آنتیاکسیدانی پلی‌فنول‌ها به

۲-۳-۳ میزان فنول و فلاوونوئید کل اسانس اسطوخودوس لارستانی

نتایج مقدار فنول و فلاوونوئید کل اسانس اسطوخودوس لارستانی در شکل ۲ آورده شده است. در این پژوهش مقدار فنول و فلاوونوئید کل اسانس اسطوخودوس لارستانی به ترتیب به روش‌های فولین سیوکالچو و رنگ سنجی آلومینیوم تری کلرايد اندازه گیری شد. مقدار فنول کل برابر با 68.60 ± 0.78 میلی‌گرم گالیک اسید در هر گرم اسانس و میزان فلاوونوئید کل آن نیز برابر با 19.10 ± 0.52 میلی‌گرم کوئرستین در هر گرم اسانس تعیین شد.

ترکیبات فنولی و فلاوونوئیدی دارای خواص آنتیاکسیدانی بالایی هستند و اثرات بیولوژیکی متعددی از جمله فعالیت‌های ضد-التهابی، ضدآلرژی، ضدپریوس و ضد سرطان دارند [۳۰]. در پژوهش صورت گرفته توسط علیزاده و همکاران (۲۰۱۶)، محتوای فنول کل دو جمعیت مختلف عصارمهای متابولی *L. stricta* با استفاده از معروف Folin-Ciocalteu گردید و محتوای فنول کل در مناطق Genow و Rodan را به ترتیب 64.45 و 61.05 میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک گزارش نمودند [۴]. در پژوهش حاضر نیز با اندکی اختلاف نتایج مشابهی با نتایج این پژوهش به دست آمد. در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۴، Adaszynska و همکاران محتوای فلاوونوئید کل گل و ساقه‌های برگ‌دار دو واریته اسطوخودوس *Blue river* و *Ellegance purple* محتوای فلاوونوئید کل ساقه‌های برگ‌دار را در دو گیاه مذکور به ترتیب 341 و 352 و محتوای فلاوونوئید کل گل‌های این دو گیاه را به ترتیب 91 و 86 میلی‌گرم در 100 گرم کوئرستین گزارش نمودند [۳۱]. Messaoud و همکاران (۲۰۱۲)، نیز سه گونه *Lavandula multifida*، *Lavandula stoechas* و *coronopifolia* اسطوخودوس را مورد مطالعه قرار دادند. محتوای فنول و فلاوونوئید کل در بین گونه‌های مورد مطالعه به طور قابل توجهی متفاوت بود. *Lavandula coronopifolia* بالاترین محتویات فنولی و فلاوونوئیدی (به ترتیب 31.3 mg GAE/g و 16.7 mg RE/g) را در بین سه گونه مورد مطالعه داشت. که این میزان کمتر از محتوای فنول و

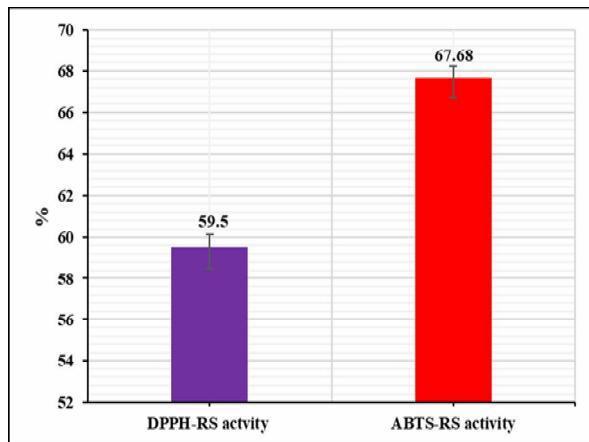


Fig 3 Antioxidant activity of *Lavandula stricta* essential oil.

۴-۳- ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی اسانس به روش دیسک دیفیوژن

نتایج ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی اسانس اسطوخودوس لارستانی به روش دیسک دیفیوژن بر باکتری‌های بیماری‌زا در جدول ۱، نشان داده شده است. نتایج نشان داد که اسانس اسطوخودوس لارستانی بیشترین تأثیر را بر باکتری گرم مثبت استافیلوكوکوس اورئوس با قطر هاله بازدارنگی از رشد $8/80 \pm 0.57$ میلی‌متر داشته است و کمترین تأثیر را بر باکتری‌های گرم منفی (سودوموناس آئروژینوزا و سالمونلا تیفی) داشت. نتایج حاصل از مقایسه آنتی‌بیوتیک جنتامایسین بر باکتری‌های مورد مطالعه نشان داد که آنتی‌بیوتیک جنتامایسین نیز بیشترین تأثیر را بر باکتری گرم مثبت استافیلوكوکوس اورئوس با قطر هاله بازدارنگی از رشد $25/20 \pm 0.40$ میلی‌متر داشته است. در مقایسه دو تایی صورت گرفته بین نتایج اثر ضدمیکروبی اسانس اسطوخودوس لارستانی به روش دیسک دیفیوژن با آنتی‌بیوتیک جنتامایسین، مشخص گردید میان باکتری‌های گرم منفی (اشرشیا کلی، سودوموناس آئروژینوزا و سالمونلا تیفی) با آنتی‌بیوتیک جنتامایسین و همچنین میان باکتری‌های گرم مثبت (استافیلوكوکوس اورئوس، لیستریا اینزکوا و باسیلوس سرئوس) با آنتی‌بیوتیک جنتامایسین، اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد وجود دارد. با توجه نتایج حاصله، آنتی‌بیوتیک جنتامایسین نسبت به اسانس اسطوخودوس لارستانی تأثیر بیشتری بر باکتری‌های مورد پژوهش داشت. به طوری که با توجه به جدول ۱، قطر هاله

دلیل توانایی آن‌ها در نقش اهدا کننده هیدروژن، عوامل کاهش دهنده و مهار کننده رادیکال آزاد است [۳۴، ۳۵]. ترکیبات مختلفی که در اسانس اسطوخودوس وجود دارند شامل α -پین، α -فلاندرن، اوژنول، کارواکرول، تیمول، فنچون، تریبنول، α -تریبن، γ -تریبن و تریبن-۴-آل و ۱،۸-سینثول دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی هستند. علاوه بر این، گزارش شده است که ۱،۸-سینثول فعال‌ترین ترکیب در کاهش تولید اکسیژن فعال نسبت به سایر مونوتربن‌ها است و همانند ترکیبات فنولی قادرند رادیکال‌های آزاد را با اهدای هیدروژن به آن‌ها از بین ببرند [۳۷، ۳۶].

Sayout و همکاران (۲۰۲۰)، با ارزیابی پتانسیل آنتی‌اکسیدانی اسانس قسمت‌های مختلف (گل، برگ و ساقه) گیاه *Lavandula tenuisecta* گزارش نمودند که پتانسیل آنتی-اکسیدانی اسانس به دست آمده از گل‌ها نسبت به برگ و ساقه آن بیشتر است [۳۴].

در مطالعه‌ای دیگر Al-Badani و همکاران (۲۰۱۷)، گزارش کردند که اسانس *L.pubescens* دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی با مقدار $75/0.8$ IC₅₀ میکروگرم در میلی‌لیتر به روش مهاری DPPH بوده است و عنوان کردند که این فعالیت آنتی-اکسیدانی احتمالاً ناشی از محتوای بالای کارواکرول موجود در آن می‌باشد [۳۸]. همچنین گزارش شده است که میزان فعالیت آنتی-اکسیدانی اسانس‌های گیاهی ممکن است در درجه اول به غلظت اجزای فنولی آن‌ها مانند کارواکرول، تیمول متیل اتر و کارواکرول متیل اتر نسبت داده شود [۳۹]. سطح ظرفیت آنتی‌اکسیدانی با توجه به عصاره‌ها و گونه‌ها متفاوت است. علاوه بر این ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به ساختار شیمیایی ترکیبات و همچنین اثر هم-افزایی ترکیبات موجود در آن‌ها بستگی دارد بنابراین تفاوت در میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی بین گونه‌های *Lavandula* ممکن است به دلیل تفاوت در محتوای پلی فنولیک و ترکیب آن‌ها، روش‌های مختلف ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی، مکانیسم‌های مختلف از جمله جلوگیری از تجمع مستمر هیدروژن، تجزیه پراکسید و اتصال کاتالبزورهای یونی واسطه‌گر باشد. عواملی مثل تفاوت ژنتیکی گونه‌ها، فصل برداشت، منشأ جغرافیایی و روش استخراج نیز می‌تواند تأثیرگذار باشد [۳۲، ۳۷].

دادند که این اسانس در غلظت‌های مختلف از ۱/۱۲۸ تا ۱/۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در برابر باکتری‌های مورد بررسی به ویژه سویه‌های گرم مثبت فعال است و فعالیت ضدبакتریایی چشمگیر آن را در برابر باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس گزارش کردند [۴۲]. در مطالعه‌ای دیگر بهبهانی و همکاران (۲۰۱۳)، با بررسی اثر ضدمیکروبی اسانس اسطوخودوس و رزماری به روش انتشار دیسک گزارش نمودند که اسانس اسطوخودوس تأثیر بیشتری بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به اشرشیاکلی دارد. این پژوهشگران بیان کردند که اسانس اسطوخودوس بیشترین تأثیر را بر باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس دارد [۴۳]. همچنین Bouzouita و همکاران (۲۰۰۵) و El Idrissi و همکاران (۲۰۱۶) نیز به ترتیب فعالیت ضدبакتریایی اسانس *Lavandula stoechas* از تونس و مراکش را در برابر شش باکتری مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که در میان سویه‌های مورد پژوهش، استافیلوکوکوس اورئوس سویه حساس‌تری است [۴۴، ۴۵]. در پژوهش حاضر نیز اسانس اسطوخودوس لارستانی در میان باکتری‌های مورد پژوهش بیشترین تأثیر را بر باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس داشت.

Table 1 Mean inhibition zone diameter (mm) of *Lavandula stricta* essential oil on pathogenic bacteria by disk diffusion method

Bacteria Antimicrobial	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Listeria innocua</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>Lavandula stricta</i>	8.30±0.35	8.10±0.55	7.90±0.66	8.80±0.57	8.20±0.35	8.60±0.21
Gentamicin	23.10±0.45	22.00±0.57	24.30±0.43	25.20±0.40	20.15±0.30	24.20±0.29

Values are expressed as mean ± standard deviations

حساس‌ترین باکتری به اسانس اسطوخودوس لارستانی بود. مقاوم‌ترین باکتری به اسانس نیز باکتری گرم منفی سودوموناس آئروژینوزا با قطر هاله بازدارنگی از رشد $8/40 \pm 0/7$ میلی‌متر بود. در شکل ۴، نمایی از اثر ضدمیکروبی اسانس اسطوخودوس لارستانی بر سودوموناس آئروژینوزا به روش چاهک آگار نشان داده شده است. به طور کلی با توجه به نتایج ارائه شده از روش چاهک (جدول ۲)، اسانس اسطوخودوس لارستانی بیشترین تأثیر

بازدارنگی از رشد آن برای تمام باکتری‌های مورد پژوهش، بیش از دو برابر بیشتر از قطر هاله بازدارنگی از رشد به روش دیسک دیفیوژن بوده است. مطالعات مختلفی در مورد فعالیت ضدمیکروبی اسانس اسطوخودوس انجام شده است که تا حدودی با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارند. نتایج حاصل از بررسی اثر ضدبакتریایی اسانس اسطوخودوس بر باکتری‌های غذازد توسط برخی پژوهشگران، حاکی از اثر معنی‌دار اسانس اسطوخودوس بر کاهش تعداد باکتری‌های غذازد بوده است [۲، ۹].

با توجه به مطالعات انجام شده، اسانس‌های گیاهی دارای مواد طبیعی با عملکرد محافظتی در برابر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا مضر هستند [۴۰]. مکانیسم فعالیت ضدمیکروبی اسانس‌های گیاهی و اجزای مونوتربینوئید آنها به طور کامل مشخص نشده، اما گزارش شده است که آنها در درجه اول غشای سلولی را بی‌ثبات کرده و عملکردهای مرتبط با غشا مانند نفوذپذیری، انتقال غشایی، تولید انرژی، سیگنانیگ سلول و غیره را مختل می‌کنند [۴۱].

در پژوهشی خاورپور و همکاران (۲۰۱۹)، با بررسی فعالیت ضدبакتریایی غلظت‌های مختلف اسانس *L.stoechas* نشان

۳-۵-۳- ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی اسانس به روش چاهک آگار

نتایج فعالیت ضدمیکروبی اسانس اسطوخودوس لارستانی به روش چاهک آگار بر باکتری‌های بیماری‌زا در جدول ۲ آورده شده است. در این روش نیز همانند روش دیسک دیفیوژن در میان باکتری‌های مورد مطالعه، باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس با قطر هاله بازدارنگی از رشد $11/10 \pm 0/44$ میلی‌متر،

کامفور، ۱،۸-سینثول، فنچون، لینالول، کارواکرول، اوژنول، پریل آلدید، ترپین-۴-آل، اکسید کاریوفیلن، اسپاتولنول، بورنثول و میرتال گزارش شده است [۴۷،۳۶]. همچنین ثابت شده است که لینالول به عنوان فراوانترین ماده تشکیل‌دهنده انسانس، مسئول اصلی اثر ضدمیکروبی است، اگر چه تعاملات هم‌فزا ای بین سایر ترکیبات موجود در انسانس مثل استات‌لینالیل نیز باید در نظر گرفته شود. مطالعات پژوهش‌های پیشین نشان داد که لینالول و استات‌لینالیل، غشای سلول‌های باکتریایی را هدف قرارداده، ساختار و عملکرد آنها را مختل می‌کند، در نتیجه سیالیت و نفوذبازیری آنها افزایش یافته و باعث نشت مواد داخل سلولی می‌شود که منجر به آسیب سلول و در نهایت مرگ آن می‌گردد [۴۸،۴۶،۲].

Table 2 Mean inhibition zone diameter (mm) of *Lavandula stricta* essential oil on some pathogenic bacteria by agar well method

Bacteria Antimicrobial	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Listeria innocua</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>Lavandula stricta</i>	8.80±0.69	8.40±0.70	9.10±0.52	11.10±0.44	10.60±0.62	10.50±0.41

۶- بررسی میزان MIC و MBC انسانس اسطوخودوس لارستانی

نتایج حاصل از بررسی اثر ضدمیکروبی انسانس اسطوخودوس لارستانی به منظور تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشنندگی (MBC) آن به ترتیب در شکل ۵ و جدول ۳، مشخص شده است. نتایج نشان داد که حداقل غلظت مهارکنندگی رشد انسانس اسطوخودوس لارستانی برای باکتری‌های سالمونلا تیفی، سودوموناس آئروژنیوزا، لیستریا اینوکوا، استافیلکوکوس اورئوس و اشرشیاکلی برابر با ۳/۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و برای باکتری باسیلوس سرئوس برابر با ۷/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. حداقل غلظت کشنندگی آن برای باکتری‌های لیستریا اینوکوا، سودوموناس آئروژنیوزا و سالمونلا تیفی به ترتیب برابر با ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده و سایر باکتری‌های مورد مطالعه (استافیلکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس و اشرشیاکلی) دارای حداقل غلظت کشنندگی بیشتر از ۴۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر می‌باشند. به طور کلی بر

را بر باکتری‌های گرم مثبت (استافیلکوکوس اورئوس، لیستریا اینوکوا و باسیلوس سرئوس) و کمترین تأثیر را بر باکتری‌های گرم منفی (سالمونلا تیفی، اشرشیاکلی و سودوموناس آئروژنیوزا) داشته است. محققان در پژوهش‌های مختلفی علت این امر را به تفاوت در ساختار دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی و باکتری‌های گرم مثبت نسبت دادند. به نظر می‌رسد علت مقاومت باکتری‌های گرم منفی وجود غشای فسفولیپیدی خارجی در آنها می‌باشد [۲۶،۱۶]. همچنین تفاوت در میزان حساسیت میکروارگانیسم‌ها به انسانس‌ها را می‌توان به تغییر در میزان نفوذ ماده تشکیل‌دهنده انسانس از طریق دیواره سلول و ساختارهای غشای سلولی نسبت داد [۴۶]. در پژوهش‌های زیادی فعالیت ضدبacterی برخی از ترکیبات انسانس اسطوخودوس از جمله

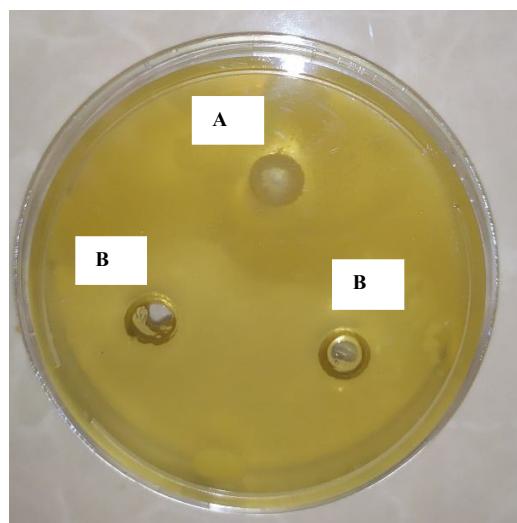


Fig 4 Antimicrobial effect of *Lavandula stricta* essential oil on *Pseudomonas aeruginosa* by agar well method
A) Control sample
B) Samples containing essential oil

۳۰/۷۰±۰/۴۰ و ۱۰/۱۰±۰/۶۸ میلی‌متر به ترتیب حساس‌ترین و مقاوم‌ترین باکتری‌ها نسبت به این انسانس بودند. حداقل غلظت بازدارندگی برای باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا، استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس و اشرشیاکلی به ترتیب برابر با ۳۲، ۸، ۱۶ و ۱۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. حداقل غلظت کشنده‌گی انسانس نیز برای تمام سویه‌ها بیشتر از ۵۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود [۱۴].

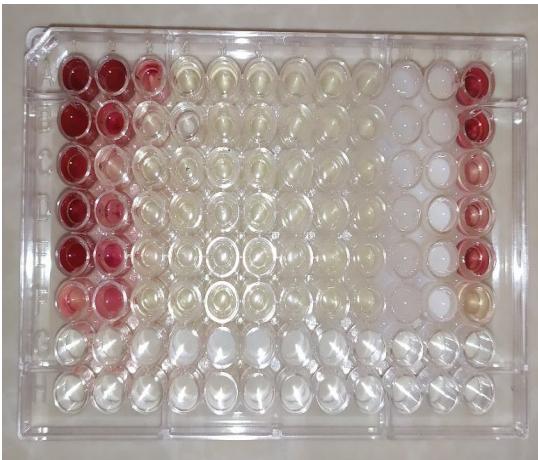


Fig 5 Minimum inhibitory concentration (MIC) of *Lavandula stricta* essential oil by broth microdilution method

Table 3 minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) of the *Lavandula stricta* essential oil on some pathogenic bacteria

Bacterial strains	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
<i>Salmonella typhi</i>	3.125	400
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3.125	200
<i>Listeria innocua</i>	3.125	100
<i>Staphylococcus aureus</i>	3.125	>400
<i>Escherichia coli</i>	3.125	>400
<i>Bacillus cereus</i>	6.25	>400

ABTS و DPPH، نشان دهنده پتانسیل آنتی‌اکسیدانی بالای این انسانس و توانایی آن در مهار رادیکال‌های آزاد می‌باشد. نتایج حاصل از بررسی فعالیت ضدمیکروبی حاکی از اثر ضدمیکروبی آن علیه تمام باکتری‌های مورد مطالعه داشت که این اثر ضدمیکروبی را می‌توان به دلیل اثرات هم‌افزایی ترکیبات زیست فعال موجود در انسانس نسبت داد. نتایج حاصل از بررسی فعالیت ضدمیکروبی به روش دیسک دیفیوژن و چاهک آکار نشان داد که

اساسن نتایج ارائه شده در جدول ۳، برای تمام باکتری‌های مورد مطالعه، حداقل غلظت کشنده‌گی انسانس اسطوخودوس لارستانی بیشتر از حداقل غلظت مهارکنندگی آن بود. در شکل ۵، نمایی از تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی انسانس اسطوخودوس لارستانی به روش میکرودایلوشن براث، نشان داده شده است.

در پژوهشی لشگری چرمی و همکاران (۲۰۲۰)، اثر ضدمیکروبی انسانس اسطوخودوس (*Lavandula angustifolia*) و نمک طعام (NaCl) را بر کنترل رشد اشرشیاکلی تلقیح شده به گوشت چرخ شده گوساله طی زمان نگهداری مورد بررسی قرار دادند. این پژوهشگران، حداقل غلظت مهارکنندگی و کشنده‌گی انسانس اسطوخودوس بر باکتری اشرشیاکلی را به روش ماکرودایلوشن براث به ترتیب برابر با ۰/۶۲۵ و ۱/۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش کردند. نتایج بدست آمده از این پژوهش نشان داد که اثر مهارکنندگی نمک طعام بر باکتری اشرشیاکلی بیشتر از انسانس اسطوخودوس بود و حالت ترکیبی انسانس و نمک دارای بیشترین اثر مهارکنندگی بر باکتری اشرشیاکلی بود [۴۹].

حیدری و همکاران (۲۰۱۹)، نیز با بررسی اثر ضد میکروبی انسانس اسطوخودوس فلیس دار بر باکتری‌های بیماری‌زا، گزارش نمودند که در میان سویه‌های مورد مطالعه، استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا با قطر بازدارندگی

۴- نتیجه گیری

در این پژوهش بر اساس طیف FTIR و مقدار ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی به دست آمده از انسانس اسطوخودوس لارستانی مشخص گردید که انسانس اسطوخودوس دارای ترکیبات زیست فعال قابل ملاحظه‌ای می‌باشد. همچنین نتایج حاصل از ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی بر اساس درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد

- [4] Alizadeh A, Aghaee Z. Essential oil constituents, phenolic content and antioxidant activity of *Lavandula stricta Delile* growing wild in southern Iran. Natural Product Research. 2016; 30(19):2253-2257.
- [5] Nouri Dashlibroon H, Khorasaninejad S, Mousavizadeh SJ, Mirjalili MH. Effects of colchicine treatment and polyploidy induction on yield components and some morphological and biochemical characteristics of *Lavandula stricta Delile*. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research. 2020; 36(4):572-589. [Full text in Persian].
- [6] Blažeković B, Vladimir-Knežević S, Brantner A, Štefan MB. Evaluation of antioxidant potential of *Lavandula x intermedia* Emeric ex Loisel.'Budrovka': a comparative study with *L. angustifolia* Mill. Molecules. 2010; 15(9):5971-5987.
- [7] Prusinowska R, Śmigielski KB. Composition, biological properties and therapeutic effects of lavender (*Lavandula angustifolia* L). A review. Herba Polonica. 2014; 60(2):56-66.
- [8] Hui L, Hi L, Huan L, Xiaolan L, Aiguo Z. Chemical composition of lavender essential oil and its antioxidant activity and inhibition against rhinitisrelated bacteria. African Journal of Microbiology Research. 2010; 4(4): 309-313.
- [9] Tardugno R, Serio A, Pellati F, Damato S, Chaves Lopez C, Bellardi MG, Benvenuti S. *Lavandula x intermedia* and *Lavandula angustifolia* essential oils: phytochemical composition and antimicrobial activity against foodborne pathogens. Natural Product Research. 2019; 33(22): 3330-3335.
- [10] Adaszyska-Skwirzyńska M, Szczerbińska D. The effect of lavender (*Lavandula angustifolia*) essential oil as a drinking water supplement on the production performance, blood biochemical parameters, and ileal microflora in broiler chickens. Poultry Science. 2019; 98(1):358-365.
- [11] Tang S, Shi J, Liu C, Jiang R, Zhao W, Liu X, Xiang N, Chen Y, Shen Q, Miao M, Liu Z. Three new phenylpropanoids from *Lavandula angustifolia* and their bioactivities. Natural Product Research. 2017; 31(12):1351-1357.
- [12] Ahmady Asbchin S, Nasrolahi omran A, Jafari N, Mostafapour MJ, Kia M.

در میان باکتری‌های مورد پژوهش، استافیلوکوکوس ارئوس حساس‌ترین باکتری نسبت به انسانس اسطوخودوس لارستانی بود. نتایج حاصله حاکی از حساسیت بیشتر باکتری‌های گرم مثبت به انسانس اسطوخودوس لارستانی نسبت به باکتری‌های گرم منفی بوده که علت آن می‌تواند وجود غشاء فسفولیپیدی خارجی اطراف دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی باشد. با توجه به نتایج ارائه شده در این پژوهش، می‌توان این گیاه را به عنوان یک منبع بالقوه از ترکیبات زیست فعال جهت تولید داروها، افروندنی‌ها و نگهدارنده‌های غذایی معرفی نمود. البته پیشنهاد می‌گردد مطالعات بیشتری جهت آزمون‌های تکمیلی برای استفاده در این زمینه صورت پذیرد.

۵- تقدير و تشکر

مقاله حاضر مستخرج از پایان نامه کارشناسی ارشد می‌باشد. لذا نویسنده‌گان این مقاله بر خود لازم می‌دانند که از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان تشکر و قدردانی نمایند.

۶- منابع

- [1] Sayout A, Ouarhach A, Rabie R, Dilogui I, Soraa N, Romane A. Evaluation of Antibacterial Activity of *Lavandula pedunculata* subsp. *atlantica* (Braun-Blanq.) Romo Essential Oil and Selected Terpenoids against Resistant Bacteria Strains Structure Activity Relationships. Chemistry & Biodiversity. 2020; 17(1):e1900496.
- [2] Blažeković B, Yang W, Wang Y, Li C, Kindl M, Pepelnjak S, Vladimir-Knežević S. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of essential oils of *Lavandula x intermedia* 'Budrovka' and *L. angustifolia* cultivated in Croatia. Industrial Crops and Products. 2018; 123:173-82.
- [3] Shafaghat A, Salimi F, Amani Hooshyar V. Phytochemical and antimicrobial activities of *Lavandula officinalis* leaves and stems against some pathogenic microorganisms. Journal of Medicinal Plants Research. 2012; 6(3):455-460.

- [20] Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*. 1999; 64(4):555-559.
- [21] Brighente IM, Dias M, Verdi LG, Pizzolatti MG. Antioxidant activity and total phenolic content of some Brazilian species. *Pharmaceutical Biology*. 2007; 45(2):156-61.
- [22] Afoulous S, Ferhout H, Raoelison EG, Valentin A, Moukarzel B, Couderc F, Bouajila J. *Helichrysum gymnocephalum* essential oil: chemical composition and cytotoxic, antimalarial and antioxidant activities, attribution of the activity origin by correlations. *Molecules*. 2011; 16(10):8273-8291.
- [23] Behbahani BA, Yazdi FT, Vasiee A, Mortazavi SA. *Oliveria decumbens* essential oil: Chemical compositions and antimicrobial activity against the growth of some clinical and standard strains causing infection. *Microbial pathogenesis*. 2018; 114:449-452.
- [24] Noshad M, Hojjati M, Alizadeh Behbahani B. *Black Zira* essential oil: Chemical compositions and antimicrobial activity against the growth of some pathogenic strain causing infection. *Microbial Pathogenesis*. 2018; 116: 153-157.
- [25] Behbahani BA, Shahidi F, Yazdi FT, Mortazavi SA, Mohebbi M. Use of *Plantago major* seed mucilage as a novel edible coating incorporated with *Anethum graveolens* essential oil on shelf life extension of beef in refrigerated storage. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017; 94:515-526.
- [26] Behbahani BA, Noshad M, Falah F. Cumin essential oil: Phytochemical analysis, antimicrobial activity and investigation of its mechanism of action through scanning electron microscopy. *Microbial Pathogenesis*. 2019; 136:103716.
- [27] Yesli Celiktas O, Haes Kocabas EE, Bedir E, Vardar Sukan F, Ozek T, Baser KHC. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry*. 2007; 100:553-559.
- [28] Sosani Gharibvand Z, Alizadeh Behbahani B, Noshad M, Jooyandeh H. Investigation of Antibacterial effects of *Lavandula Stoechas* Essential Oil, on Gram Positive and Negative Bacteria In Vitro. *Medical Laboratory Journal*. 2012; 6 (2):35-41. [Full text in Persian].
- [13] Heydari S, Jooyandeh H, Alizadeh Behbahani B, Noshad M. The impact of Qodume Shirazi seed mucilage-based edible coating containing lavender essential oil on the quality enhancement and shelf life improvement of fresh ostrich meat: An experimental and modeling study. *Food Science & Nutrition*. 2020; 8(12):6497-6512.
- [14] Heydari S, Jooyandeh H, Alizadehbehbahani B, Noshad M. Invitro Determination of Chemical Compounds and Antibacterial Activity of *Lavandula* Essential oil against some Pathogenic Microorganisms. *Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences*. 2019; 27(4):77-89. [Full text in Persian].
- [15] Rabani M, Rezaeian Doloei R, Jabari Noghabi M. Antibacterial effect of lavender essential oils on *Xanthomonas campestris* and *Escherichia coli*. *Modern Science of Sustainable Agriculture Journal*. 2015; 2(2):33-43. [Full text in Persian].
- [16] Tabatabaei Yazdi F, Alizadeh Behbahani B, Mortazavi A. Investigating the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of the *Lavandula stoechas* L. and *Rosmarinus officinalis* L. extracts on pathogen bacterias "in vitro". *Journal of Paramedical Sciences*. 2014; 5(2):2008-4978.
- [17] Mashak Z, Fayazfar S, Cheraghi, N. Antimicrobial effect of Chitosan film incorporated with *Lavandula stoechas* on some food borne bacteria. *Journal of Food Microbiology*. 2016; 1(3):55-62. [Full text in Persian].
- [18] Behbahani BA, Noshad M, Falah F. Study of chemical structure, antimicrobial, cytotoxic and mechanism of action of *Syzygium aromaticum* essential oil on foodborne pathogens. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*. 2019; 13(1):875-883.
- [19] Javanmardi J, Stushnoff C, Locke E, Vivanco JM. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. *Food Chemistry*. 2003; 83(4):547-550.

- L.*: composition, chemical variability, and in vitro biological properties. *Chemistry & Biodiversity*. 2011; 8(5):937-53.
- [37] Insawang S, Pripdeevech P, Tanapichatsakul C, Khruengsai S, Monggoet S, Nakham T, Artrod A, D'Souza PE, Panuwet P. Essential oil compositions and antibacterial and antioxidant activities of five *Lavandula stoechas* cultivars grown in Thailand. *Chemistry & Biodiversity*. 2019; 16(10):e1900371.
- [38] Al-Badani RN, da Silva JK, Mansi I, Muhamar BA, Setzer WN, Awadh Ali NA. Chemical composition and biological activity of *Lavandula pubescens* essential oil from Yemen. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 2017; 20(2):509-15.
- [39] Chia-Wen L, Chia-Wen Y, Sung-Chuan W, Kuang-Hway Y. DPPH free-radical scavenging activity, total phenolic contents and chemical composition analysis of fourty-two kinds of essential oils. *Journal Food Drug Analysis*. 2009; 17(5):386-95.
- [40] Zeng Z, Zhang S, Wang H, Piao X. Essential oil and aromatic plants as feed additives in non-ruminant nutrition: a review. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 2015; 6(1):1-10.
- [41] Swamy MK, Akhtar MS, Sinniah UR. Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: an updated review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2016; 1-21.
- [42] Khavarpour M, Vahdat SM, Kazemi S, Moghadamnia AA, Hasanzadeh O, Salimi Z, Rahmanpour N. Chemical Composition, Antibacterial and Analgesic Activity of *Lavandula stoechas* Flowers from North of Iran. *International Journal of Engineering*. 2019; 32(8):1065-1073.
- [43] Behbahani BA, Tabatabaei-Yazdi F, Shahidi F, Mortazavi A. Antimicrobial effects of *Lavandula stoechas* L. and *Rosmarinus officinalis* L. extracts on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Scientific Journal of Microbiology*. 2013; 2(1):15.
- [44] Bouzouita N, Kachouri F, Hamdi M, Chaabouni MM, Aissa RB, Zgoulli S, Thonart P, Carlier A, Marlier M, Lognay GC. "Volatile constituents and antimicrobial activity of the Functional Groups of Bioactive Compounds, Radical Scavenging Potential, Antimicrobial Activity and Cytotoxic Effect of *Callistemon Citrinus* Aqueous Extract on Cell Line HT29: A Laboratory Study. *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences*. 2020; 19(5):463-84. [Full text in Persian].
- [29] Mohammadpanah M, Mojodi E, Haghirsadat F, Ehsani R. The Synthesis and Characterization of Liposomal Nano-Carriers Loading *Lavandula angustifolia* Essential Oil to Affect Breast Cancerous Cell-Lines. *Journal of Lorestan University of Medical Sciences*. 2020; 22(1):84-95. [Full text in Persian].
- [30] Zhao J, Xu F, Huang H, Ji T, Li C, Tan W, Chen Y, Ma L. Evaluation on bioactivities of total flavonoids from *Lavandula angustifolia*. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015; 28(4).
- [31] Adaszynska-Skwirzynska M, Swarczewicz M, Dobrowolska A. The Potential of Use Lavender from Vegetable Waste as Effective Antibacterial and Sedative Agents. *Medicinal Chemistry*. 2014; 4(11): 734-737.
- [32] Messaoud C, Chograni H, Boussaid M. Chemical composition and antioxidant activities of essential oils and methanol extracts of three wild *Lavandula L.* species. *Natural Product Research*. 2012; 26(21):1976-84.
- [33] Kozics K, Srancikova A, Sedlackova E, Horvathova E, Melusova M, Melus V, Krajcovicova Z, Sramkova M. Antioxidant potential of essential oil from *Lavandula angustifolia* in in vitro and ex vivo cultured liver cells. *Neoplasma*. 2017; 64(4):485-93.
- [34] Sayout A, Ouarhach A, Romane A. Antioxidant Properties and Chemical Composition of *Lavandula tenuisecta*, An Endemic Species of Morocco. *Chemistry of Natural Compounds*. 2020; 56(6):1148-50.
- [35] Truong TM, Fumie N, Nguyen VC. Antioxidant activities and hypolipidemic effects of an aqueous extract from flower buds of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr. and Perry. *Journal of Food Biochemistry*. 2009; 33(6):790-807.
- [36] Benabdelaqader T, Zitouni A, Guitton Y, Jullien F, Maitre D, Casabianca H, Legendre L, Kameli A. Essential oils from wild populations of Algerian *Lavandula stoechas*

- composition of essential oil from *Lavandula tenuisecta* Coss. ex Ball. an endemic species from Morocco. European Journal of Integrative Medicine. 2020; 33:101017.
- [48] Trombetta D, Castelli F, Sarpietro MG, Venuti V, Cristani M, Daniele C, Saija A, Mazzanti G, Bisignano G. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2005; 49(6):2474-2478.
- [49] Lashgari Charmi M, Mohsenzadeh M, Azizzadeh M, Maleki M. Antimicrobial effect of *Lavandula angustifolia* essential oil and NaCl on growth control of *Escherichia coli* O157:H7 inoculated into minced beef during storage. Food Science and Technology. 2020; 17(101): 145-153. [Full text in Persian].
- Lavandula stoechas* L. oil from Tunisia". Journal of Essential Oil Research. 2005; 17(5):584-586.
- [45] El Idrissi M, El Amrani K, Choukrad M, Lhoussain L. "Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Lavandula Stoechas* L. from Morocco". World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2016; 5(9):316-324.
- [46] Silva KV, Lima MI, Cardoso GN, Santos AS, Silva GS, Pereira FO. Inibitory effects of linalool on fungal pathogenicity of clinical isolates of *Microsporum canis* and *Microsporum gypseum*. Mycoses. 2017; 60(6):387-393.
- [47] Sayout A, Ouarhach A, Dilagui I, Sora N, Romane A. Antibacterial activity and chemical

Iranian Journal of Food Science and Technology

Homepage: www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Investigation of functional groups, phenolic and flavonoid compounds, antioxidant and antimicrobial activity of *Lavandula stricta* essential oil: An “*in vitro*” study

Aladi, M. ¹, Mehrnia, M. A. ^{2*}, Barzegar, H. ³, Alizadeh Behbahani, B. ²

1. M.Sc Student, Department of Food Industry Science and Engineering, Faculty of Animal Sciences and Food Industry, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.
2. Assistant Professor, Department of Food Industry Science and Technology, Faculty of Animal Sciences and Food Industry, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.
3. Associate Professor, Department of Food Industry Science and Engineering, Faculty of Animal Sciences and Food Industry, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.

ARTICLE INFO**ABSTRACT****Article History:**

Received 2021/05/09
Accepted 2021/07/17

Keywords:

Essential oil,
Lavandula stricta,
Antimicrobial activity,
Functional groups.

DOI: [10.52547/fsct.18.119.61](https://doi.org/10.52547/fsct.18.119.61)

*Corresponding Author E-Mail:
Mehrnia@asnrukh.ac.ir

Lavender with the scientific name *Lavandula stricta* Del from the mint family is one of the herbs used in traditional Iranian medicine. The aim of this study was to determine the functional groups and qualitative identification, the amount of phenolic and flavonoid compounds, antioxidant and antimicrobial activity of *Lavandula stricta* essential oil. Essential factor groups were determined by Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy in the wavelength range of 500–4000 cm⁻¹. Total phenols and flavonoids were measured by Folin-Ciocalteu and aluminum trichloride colorimetry, respectively. Antioxidant activity was also determined by two methods of free radical scavenging DPPH and ABTS. The peaks observed in *Lavandula stricta* essential oil confirmed the presence of O-H, C-H, C=O, C=C, C-C and C-O functional groups of bioactive compounds. The amount of phenol and flavonoids in total essential oil was 68.60 ± 0.68 mg GAE/g and 19.10 ± 0.52 mg QE/g, respectively. Antioxidant activity was also obtained based on the percentage of free radical scavenging DPPH and ABTS equal to 59.50 ± 0.63 and 67.68 ± 0.53 , respectively. The antimicrobial activity of essential oil was evaluated by four methods: disk diffusion, agar well, minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration. The results of measuring the antimicrobial activity of essential oil by disk diffusion and agar well showed that Gram-positive bacterium *Staphylococcus aureus* is the most sensitive strain to *Lavandula stricta* essential oil. The minimum inhibitory concentration of essential oil for *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* was equal to 3.125 mg/ml and for *Bacillus cereus* it was equal to 6.25 mg/ml. The minimum bactericidal concentrations for *Listeria innocua*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhi* was equal to 100, 200 and 400 mg/ml, respectively, and for other bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*) it was more than 400 mg/ml.