نشریه پژوهش در نشخوارکنندگان
جلد هشتم، شماره سوم، ۱۳۹۹
http://ejrr.gau.ac.ir
۶۳-۷۸
DOI: 10.22069/ejrr.2020.17749.1740

اثر اسانس اسطوخودوس و مرزنجوش بر باکتری‌های مهم عامل ورم پستان در آزمایشگاه

رضا راه‌چمنی[1]*، سمیرا نوری[2] و جواد بیات کوهسار[1]

[1] استادیار و [2] دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران

تاریخ دریافت: ۹۸/۱۲/۵؛ تاریخ پذیرش: ۹۹/۷/۱۲

چکیده

سابقه و هدف: درمان بیماری‌های باکتریایی توسط آنتی‌بیوتیک‌ها مشکلاتی نظیر مقاومت آنتی‌بیوتیکی و عوارض جانبی دارد و اسانس‌های گیاهان دارویی با توجه به داشتن اثر ضدباکتریایی جایگزین مناسبی برای آنتی‌بیوتیک‌ها هستند. اسطوخودوس (*Lavandula stoechas*) و مرزنجوش (*Origanum majorana*) دو گیاه از خانواده نعناعیان هستند که اثرات ضدباکتریایی علیه بعضی باکتری‌ها نشان داده‌اند باکتری‌های *اشریشیاکلی*، *استافیلوکوک آرئوس* و *استرپتوکوک آگالاکتیه* از عوامل اصلی بیماری ورم پستان گاو هستند لذا این مطالعه به‌منظور بررسی اثر ضدباکتریایی اسانس اسطوخودوس و مرزنجوش بر این باکتری‌ها و مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین و آموکسی‌سیلین/کلاولونات انجام شد.

مواد و روش‌ها: اسانس‌ها به روش گازکروماتوگرافی متصل به طیف نگار جرمی آنالیز شدند. رقت سازی لوله‌ای به روش ماکرودایلوشن برای تعیین حداقل غلظت مهاری و حداقل غلظت کشندگی اسطوخودوس و مزنجوش و آنتی‌بیوتیک لینکواسپکتینومایسین به‌عنوان کنترل مثبت و اندازه‌گیری قطرهاله عدم رشد اسانس‌ها و آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین و آموکسی‌سیلین/کلاولونات به روش دیسک دیفیوژن انجام شد. علاوه بر آن تعداد باکتریها در حضور اسانس‌ها در ساعت‌های ۰، ۶، ۱۰ و ۲۴ محاسبه و منحنی رشد باکتری‌ها بر اساس لگاریتم تعداد باکتریها در ساعت رسم شد.

یافته‌ها: مهم‌ترین ترکیبات اسطوخودوس ۱۷- پنتاتری آکونتن (۴۲/۱۵ درصد)، لینالیل استات (۲۶/۸۲ درصد)، اکالیپتول (۱۸/۸۷ درصد)، لینالول (۵/۷ درصد) و مرزنجوش ۳-سیکلوهگزان-۱-ال-متیل (۴۴/۸۴ درصد)، آلفا ترپینئول (۶/۸۳ درصد) و پی-سایمن (۶/۷۵ درصد) بودند. محدوده حداقل غلظت مهاری و حداقل غلظت کشندگی برای اسطوخودوس و مرزنجوش به ترتیب ۰/۶۲ -۰/۱۵ درصد و ۱/۲۵-۰/۶۲ درصد و برای آنتی بیوتیک لینکواسپکتینومایسین به ترتیب ۰/۳۱-۰/۰۷ درصد و ۰/۶۴-۰/۱۵ درصد بود. هر دو اسانس اسطوخودوس و مرزنجوش بیشترین تأثیر را بر باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* داشتند و حداقل غلظت مهاری و کشندگی به ترتیب ۰/۱۵ درصد و ۰/۳۱ درصد بودند. آنتی‌بیوتیک لینکواسپکتینومایسین نیز بیشترین تأثیر را بر باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* با حداقل غلظت مهاری ۰/۰۷ درصد و حداقل غلظت کشندگی ۰/۱۵ درصد داشت. از نظر منحنی رشد، اسانس اسطوخودوس و مرزنجوش باعث کاهش معنی‌دار تعداد باکتری‌ها در ساعت ۲۴ شدند. اثر ضدباکتریایی هر

*نویسنده مسئول: Rahchamani@gonbad.ac.ir

دو اسانس در دیسک دیفیوژن علیه *استافیلوکوک آرئوس* با جنتامایسین و آموکسی‌سیلین/کلاولونات و علیه *اشریشیاکلی* با جنتامایسین تفاوت معنی‌داری نداشت ولی در مورد *استرپتوکوک آگالاکتیه* بطور معنی‌داری کمتر از آنتی‌بیوتیک‌ها بود.

نتیجه‌گیری : هر دو اسانس اسطوخودوس و مرزنجوش اثر ضدباکتریایی علیه *استافیلوکوکوس آرئوس*، *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* و *اشریشیاکلی* به شکل آزمایشگاهی (*In vitro*) داشتند و این اثر علیه *استافیلوکوک آرئوس* با هر دو آنتی‌بیوتیک و علیه *اشریشیاکلی* با جنتامایسین تفاوت معنی‌داری نداشت که نشان دهنده اثر قابل قبول اسانس‌هاست و مطالعات بالینی برای اثر درمانی در بیماری‌های مختلف از جمله ورم پستان توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: بیماری باکتریایی، گیاهان دارویی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، ورم پستان

مقدمه

درمان بیماری‌های باکتریایی با داروهای شیمیایی باعث ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی، سویه‌های مقاوم و عوارض جانبی می‌شود و مطالعات فراوانی برای یافتن جایگزین‌های مناسب انجام می‌شود طبیعت منبع غنی ترکیبات دارویی است و استفاده درست و منطقی از این ترکیبات ساده‌تر و کم هزینه‌تر از داروهای شیمیایی است. از بین این ترکیبات، روغن‌های اسانسی اثرات بیولوژیک متعددی از جمله اثر ضدباکتریایی دارند و از مناسب‌ترین جایگزین‌ها هستند (٤). اسانس‌ها در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌ها دارای اثر وسیع الطیف علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی هستند و باعث ایجاد مقاومت دارویی نمی‌شوند (۱۸). اسانس‌ها ترکیبی از مواد فرار هستند که به عنوان متابولیت‌های ثانویه تولید شده و در گیاه نقش حفاظتی در برابر شکارچیان، میکروارگانیسم‌ها و شرایط سخت آب و هوایی دارند. مهمترین ترکیبات اسانس‌ها شامل ترپن‌ها (مونوترپن‌ها و سزکوئی‌ترپن‌ها)، ترپنوئیدها و ترکیبات آروماتیک (آلدئیدها مثل سینامالدئید، فنل‌ها و...) است. مونوترپن‌ها (کارواکرول، تیمول، لیمونن، کارون، لینالول، ...) حدود ۹۰ درصد اکثر اسانس‌ها را تشکیل داده و دارای فعالیت ضدباکتریایی قوی هستند هر اسانس دارای دو یا سه ترکیب اصلی (ترپن‌ها و ترپنوئیدها: ۷۰-۲۰ درصد) که عامل فعالیت‌های بیولوژیک اسانس هستند و مقدار کمی ترکیبات با مقادیر خیلی کم (ترکیبات آروماتیک) است (١٤،١٢).

اسطوخودوس[1] گیاهی از خانواده نعناعیان است که اسانس آن بیشتر برای مقاصد درمانی استفاده می‌شود و در مطالعات اثرات ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی آن نشان داده شده است (۳،٦،۱۷). مرزنجوش[2] یکی دیگر از گیاهان نعناعیان به عنوان یک گیاه دارویی مدت‌های طولانی در درمان بیماری‌های گوارشی و تنفسی استفاده شده است و در مطالعات فارماکولوژیک اثرات ضدباکتریایی، ضدقارچی و ضدپروتوزوایی نشان داده است (۵). در یک بررسی اسانس مرزنجوش اثر ضدباکتریایی خوبی علیه *اشریشیاکلی*، *استافیلوکوک آرئوس* و *کلبسیلا پنومونیه* نشان داد (۲۷). در پژوهشی دیگر حساسیت *استافیلوکوک آرئوس* جدا شده از گوشت مرغ به اسانس مرزنجوش نشان داده شد (۱۹).

باکتری‌های *اشریشیاکلی*، *استافیلوکوک آرئوس* و *استرپتوکوک آگالاکتیه* هر کدام باعث بیماریهایی در انسان و دام می شوند ولی هر سه باکتری از عوامل اصلی بیماری ورم پستان گاو هستند باکتریها، ویروس‌ها، قارچها و جلبک‌ها قادر به ایجاد این بیماری هستند ولی مهمترین عامل باکتریها هستند

1. *Lavandula stoechas* (Lavender)
2. *Origanum majorana* (Marjoram)

اشریشیاکلی از عوامل ورم پستان محیطی و دو باکتری دیگر از عوامل ورم پستان مسری هستند این بیماری عامل بیشترین خسارت‌های اقتصادی در گاوداری است (۲۲،۲۵) و با توجه به مطالعات بسیار کم در مورد اثر اسانس این گیاهان بر باکتری *استرپتوکوک آگالاکتیه* این پژوهش با هدف بررسی ترکیبات شیمیایی اسانس اسطوخودوس و مرزنجوش و اثر ضدباکتریایی این اسانس‌ها علیه این سه باکتری انجام شد تا از نتایج این مطالعه بتوان در مطالعات آینده در درمان بیماریها از جمله ورم پستان گاو استفاده کرد.

مواد و روش‌ها

جداسازی و شناسایی ترکیبات شیمیایی: اسانس هر نمونه به دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف نگار جرمی[1] (Model 5977A, Agilent Technologies, USA) تزریق گردید. مشخصات ستون عبارت بود از: ستون موئینه به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۲۵۰ میکرومتر با ضخامت فیلمی ۰/۲۵ میکرون و برنامه دمایی ۵۰ تا ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد با میزان ٤ درجه در دقیقه و دمای ۲٦۰ درجه سانتی‌گراد انژکتور، گاز حامل هلیوم. پس از تزریق اسانس و مشاهده طیف کروماتوگرام که حضور تعداد زیادی ترکیب را نشان می‌داد، با استفاده از زمان بازداری[2]، اندیس کواتس[3]، طیف جرمی و مقایسه با ترکیب‌های استاندارد موجود در کتابخانه اطلاعات کامپیوتری، شناسایی ترکیبات اسانس و تعیین درصد کمی در آن‌ها انجام گردید.

تهیه اسانس و باکتری: اسانس اسطوخودوس از شرکت باریج اسانس و اسانس مرزنجوش از شرکت گیاه اسانس تهیه گردید و باکتری‌های موردبررسی شامل *استافیلوکوکوس آرئوس* (*Stapylococcus aureus* 1113 ATCC 9144)، *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* (*Streptococcoccus agalactiae* 1768 ATCC 13813) و *اشریشیاکلی* (*Escherichia coli* 1399 ATCC 25922) از مرکز تحقیقات و پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. ابتدا کشت لیوفلیزه باکتری‌ها به مدت ٢٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در محیط تریپتیک سوی براث (Biolife, Milano, Italy) کشت داده شد. سپس کشت مجدد از کشت اول داده شد و به مدت ٢٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. از کشت دوم برای تهیه استوک به نسبت ۱ به ۵ با گلیسرین استریل مخلوط شد و در حجم‌های ۱۰۰ میکرولیتر در میکروتیوب‌های استریل در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

تهیه میزان تلقیح باکتری: جهت میزان تلقیح باکتری از کشت استوک به داخل محیط تریپتیک سوی آگار (Biolife, Milano, Italy) برده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٢٤ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. سپس از کشت اول کشت مجددی داده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ٢٤ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. از کشت دوم به کووتی که حاوی ۳ میلی‌لیتر محیط کشت استریل بود، تا مادامی انتقال داده شد که میزان جذب نوری با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Libra S12, Biochrom Ltd., Cambridge, London) در طول موج ٦۰۰ نانومتر، به ۰/۱ برسد سپس با انتقال ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتریایی، به لوله حاوی ۹ میلی‌لیتر آب پپتونه ۰/۰۱درصد، رقت‌های متوالی تا 10^{-7} تهیه شد. از طریق انتقال ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت به پلیت‌های حاوی محیط کشت تریپتیک سوی آگار از رقت‌های تهیه شده، کشت داده شد. پلیت‌ها به‌مدت ٢٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. کل آزمایش ۲ مرتبه تکرار شد و میانگین تعداد باکتری در کووت با جذب

1. GC/MS
2. Retention time
3. KI

نوری ۰/۱ برای باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* معادل cfu/ml ^{10}۱۰×۳/٤، *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* معادل cfu/ml ^{11}۱۰×۱/٦٤ و *اشریشیاکلی* معادل cfu/ml ^{11}۱۰×۲/٤ تعیین شد (۲۱).

تهیه ترکیب رقیق شده اسانس‌ها: در بررسی اثرات ضدمیکروبی مواد برای رقیق نمودن یک ترکیب، باید از ماده‌ای به نام امولیسفایر استفاده شود که علاوه بر همگن کردن فازهای مختلف، خاصیت ضدمیکروبی نیز نداشته باشد و تعداد باکتری‌ها را تغییر ندهد. در این مطالعه ماده دی متیل سولفوکساید[1] به‌عنوان ماده امولسیفایر انتخاب شد و از رقتی استفاده شد که خاصیت ضدمیکروبی نداشته باشد.

تعیین حداقل غلظت مهاری و کشندگی به روش ماکرو دایلوشن: جهت انجام آزمایشات کمی برای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی رشد[2] (مهاری) و حداقل غلظت کشندگی[3]، در حجم کلی ۱۰۰ سی‌سی محیط کشت تریپتیک سوی براث حاوی ۵ درصد دی متیل سولفوکساید تهیه شد. محیط کشت در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱۲۱ به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شد. ۲۰۰ میکرولیتر اسانس به طور سریالی در هفت لوله رقت تهیه شد به‌نحوی که غلظت اسانس درهر لوله دو برابر غلظت همان اسانس در لوله بعدی بود. بدین ترتیب غلظت‌های ۱۰، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵، ۰/٦۲، ۰/۳۱، ۰/۱۵، ۰/۰۷ درصد بدست آمد، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی (با غلظت نهایی مشخص با طول موج ٦۰۰ نانومتر و جذب ۰/۱ برای هر باکتری) به هر لوله تلقیح و به مدت ۲٤ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور نگهداری شدند. برای هرکدام از اسانس‌ها آخرین رقتی که در آن هیچ گونه کدورتی مشاهده نگردید (عدم رشد) به‌عنوان حداقل غلظت بازدارندگی در نظر گرفته شد و از تمام لوله‌های بدون کدورت در محیط تریپتیک سوی آگار کشت داده شد. پس از گذشت مدت ۲٤ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد آخرین غلظتی از اسانس‌ها که قادر به مرگ ۹۹ درصد از باکتری‌های زنده اولیه بود به‌عنوان حداقل غلظت کشندگی گزارش شد. همچنین در تعیین حداقل غلظت مهاری و کشندگی از آنتی‌بیوتیک لینکواسپکتینومایسین (لینکومایسین ۵ ٪ + اسپکتینومایسین ۱۰٪) (لینکوجکت، رویان دارو، سمنان، ایران) به‌عنوان کنترل مثبت استفاده و هر آزمایش ۲ بار تکرار شد (۱۳).

بررسی اثر اسانس روی نمودار رشد: در این مرحله اثر غلظت تحت حداقل غلظت مهاری[4] از اسانس‌ها روی باکتری‌های مورد مطالعه در طی ۲٤ ساعت و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مورد ارزیابی قرار گرفت. ابتدا محیط کشت حاوی ۵ درصد دی متیل سولفوکساید و استریل تهیه و غلظت اسانس مورد نظر به آن اضافه شد. حجم این محلول طوری تنظیم شد که مقدار اسانس و محیط کشت برای هر ساعت ۱ میلی‌لیتر بود. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی (با غلظت نهایی مشخص با طول موج ٦۰۰ نانومتر و جذب ۰/۱ برای هر باکتری) به هر لوله اضافه و حجم محلول برای هر ٤ ساعت در یک لوله کلی تهیه شد. لوله‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری و در ساعت‌های صفر، ٦، ۱۰ و ۲٤ با انتقال یک میلی‌لیتر از ترکیب فوق به لوله حاوی ۹ میلی‌لیتر نرمال سالین استریل رقت‌های متوالی تا $^{-9}$۱۰ در زمان‌های فوق تهیه شد. سپس با انتقال ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت به پلیت حاوی محیط کشت آگاردار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲٤

1. DMSO
2. Minimum inhibitory concentration) (MIC)
3. Minimum bactericidal concentration (MBC)
4. Sub-MIC

ساعت گرمخانه‌گذاری شد سپس شمارش تعداد کلونی انجام و تعداد باکتری‌ها در ساعات مورد نظر محاسبه و این آزمایشات ۲ بار تکرار شد (۱۵).

اثر ضدباکتری اسانس‌ها به روش انتشار از دیسک: از روش انتشار در آگار به صورت دیسک دیفیوژن به شیوه کربی بائر[1] استفاده شد. از سوسپانسیون میکروبی (با غلظت نهایی مشخص با طول موج ٦۰۰ نانومتر و جذب ۰/۱ برای هر باکتری) به وسیله سوآپ پنبه‌ای استریل بر روی محیط کشت ترپیتیک سوی آگار کشت و سپس دیسک‌های کاغذی استریل بلانک (پادتن طب - تهران-ایران) به قطر ٦ میلی‌متر تهیه و ۲۰ میکرولیتر از رقت‌های ۱ (رقیق نشده) و ۰/۵ (رقیق‌شده با نسبت ۱:۱ با دی متیل سولفوکساید) اسانس روی دیسک‌ها اضافه شد. دیسک‌ها به مدت ۲۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری شدند سپس دیسک‌گذاری توسط پنس استریل و کنار شعله انجام شد پلیت‌ها به مدت ٢٤ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از سپری شدن این زمان، قطرهاله عدم رشد با کولیس اندازه‌گیری شد. همچنین از دیسک‌های آنتی‌بیوتیک آموکسی‌سیلین/ کلاوولانات با غلظت ۲۰/۱۰ میکروگرم/دیسک، شماره ۲۰۱۰۳ و جنتامایسین با غلظت۱۰ میکروگرم/دیسک ، شماره ۲۰۳۰۹ (پادتن طب- تهران- ایران) به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. نتایج حاصل از آنتی‌بیوتیک‌ها با جداول موسسه استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی[2] مقایسه گردید. این آزمایش‌ها برای هر باکتری ۲ بار تکرار شد (۱۵).

تجزیه و تحلیل آماری: تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS 22 for windows و مقایسه داده‌ها با آزمون آنالیز واریانس یک طرفه انجام شد اختلاف میانگین‌ها توسط آزمون توکی موردبررسی قرار گرفت و در سطح ۵ درصد از لحاظ آماری معنی‌دار تلقی شد.

نتایج و بحث

ترکیبات شیمیایی اسانس اسطوخودوس و مرزنجوش: جداول زیر نتیجه آنالیز ترکیبات اسانس اسطوخودوس (جدول۱) و مرزنجوش (جدول۲) مورد استفاده با دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف نگار جرمی را نشان می‌دهد.

در پژوهش حاضر ۹ ترکیب در اسانس اسطوخودوس شناسایی شد که مهم‌ترین ترکیبات اسطوخودوس ۱۷- پنتاتری آکونتن (٤۲/۱۵ درصد)، لینالیل استات (۲٦/۸۲ درصد)، اکالیپتول (۱و۸- سینئول) (۱۸/۸۷ درصد) و لینالول (۵/۷ درصد) بودند. در یک مطالعه روی پنج تحت گونه اسطوخودوس در تایلند ترکیب هر تحت گونه متفاوت از بقیه بود. حدود ٤٤-۳۳ ترکیب در تحت گونه‌ها شناسایی و فنچون و کامفور فراوانترین ترکیبات بودند (۱۷). در یک مطالعه دیگر ترکیبات اصلی در اسطوخودوس رشدیافته در مراکش فنچون، کامفور، ترپینئول گزارش شد (٦). در دو پژوهش از ایران اصغری و همکاران (۲۰۱۷) کامفور، ۱و۸- سینئول، لینالول، برنئول و همچنین ماشاک و همکاران (۲۰۱٦)، ۱و۸-سینئول، برنئول، کامفور و لینالول را به عنوان اجزای اصلی تشکیل دهنده اسانس اسطوخودوس معرفی کردند (۳،۲۰). همانطور که اشاره شد ترکیبات اصلی مطالعه ما متفاوت از مطالعات سایر کشورها و تا حدی شبیه ترکیبات گزارش شده از ایران بود که در مطالعات دیگر هم اشاره شده است که ترکیبات اصلی اسطوخودوس مناطق مختلف بسیار متغیر است از جمله کامفور (٤۹-۰ درصد) و فنچون (٦٦-۰ درصد) (۱۰).

1. Kirby Bauer
2. CLSI

جدول ۱- ترکیبات شیمیایی اسانس اسطوخودوس درآنالیز GC/MS

Table 1. GC-MS analysis of chemical composition of *Lavandula stoechas* essential oil

%	زمان بازداری (دقیقه) Retention time (m)	نام ترکیب Composition
42.15	3.63	17-Pentatriacontene
0.73	4.11	1R-α-Pinene
1.73	5.90	M-Cymene
2.4	6.02	D-Limonene
18.87	6.09	Eucalyptol
5.7	7.66	Linalool
1.11	9.76	P-Menth-1-en-4-ol, (R)-(-)-
26.82	11.57	Linalyl acetate
0.48	12.43	Lavandulol acetate

جدول۲ - ترکیبات شیمیایی اسانس مرزنجوش درآنالیز GC/MS

Table 2. GC-MS analysis of chemical composition of *Origanum majorana* essential oil

%	زمان بازداری (دقیقه) Retention time (m)	نام ترکیب Composition
1.39	4.11	Bicyclo[3.1.1]hept-2-ene, 3,6,6-trimethyl-
1.5	4.83	Sabinen
1.63	5.73	Terpinolen
6.75	5.90	P-Cimene
1.55	6.01	D-Limonene
2.58	6.08	Eucalyptol
4.96	6.67	γ-Terpinene
2.17	6.96	Bicyclo[3.1.0]hexan-2-ol, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-, (1α,2α,5α)-
5.12	7.66	Linalool
4.58	7.72	Terpineol, cis-β-
1.97	8.31	2-Cyclohexen-1-ol, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-, cis-
1.41	8.76	4-Isopropyl-1-methylcyclohex-2-enol
44.84	9.79	3-Cyclohexen-1-ol, 4-methyl-1-(1-methylethyl)-, (R)-
6.83	10.14	α-Terpineol
3.45	11.54	Linalyl acetate
1.5	12.20	trans-Ascaridol glycol
1.46	12.67	1,4-dihydroxy-p-menth-2-ene
1.46	13.43	4,4-Dimethylpent-2-enal
2.03	15.97	Caryophyllene
1.42	19.75	1H-Cycloprop[e]azulen-7-ol, decahydro-1,1,7-trimethyl-4-methylene-, [1ar-(1aα,4aα,7β,7aβ,7bα)]-
1.38	19.873	Caryophyllene oxide

در مطالعه حاضر در اسانس مرزنجوش ۲۱ ترکیب مشاهده شد و فراوانترین ترکیبات ۳-سیکلوهگزان-۱-ال-متیل (٤٤/٨٤ درصد)، آلفا ترپینئول (٦/٨٣ درصد) و پی-سایمن (٦/٧٥ درصد) بودند. در یک مطالعه از ایتالیا ترپینن-٤-ال، دلتا-۲-کارن، کامفن و آلفا-پینن به عنوان اجزای اصلی مرزنجوش گزارش شد (٢٦). در پژوهشی دیگر ترپینن-٤-ال، آلفا-ترپینن و ترپینئول ترکیبات اصلی مرزنجوش در

مراکش بودند (۱). در مرزنجوش پرورش یافته در هلند نیز ترپینن-٤-ال، سابینن هیدرات و آلفا-ترپینن ترکیبات اصلی بودند (۱۸). طهماسبی و همکاران (۲۰۱٤) اجزای اصلی مرزنجوش را ترپینئول-٤-ال، گاما و آلفا ترپینن از ایران گزارش کردند (۲۸). تفاوت در ترکیبات شیمیایی گیاهان در مطالعات مختلف می‌تواند به عللی مثل زمان و فصل جمع آوری گیاه، نوع اندام مورد استفاده گیاه، شرایط جغرافیایی و آب و هوایی، سن گیاه، مرحله رشد، وضعیت تغذیه‌ای گیاه، شرایط خشک کردن و نگهداری بعد از جمع‌آوری، تنوع ژنتیکی، روش استخراج اسانس، متغیرهای فیزیولوژیک وابسته به خاک و همچنین استرس‌های مرحله رشد و بلوغ باشد (۲۲،۱٦).

نظرات مختلفی در مورد اینکه کدام ترکیب یا ترکیبات عامل اثرات ضدباکتریایی هستند بیان شده است در بعضی پژوهش‌ها عنوان شده است که فقط ترکیبات اصلی عامل اثر ضدباکتریایی اسانس‌ها نیستند و اثر ضدباکتریایی به علت تمام ترکیبات است و وجود ترکیبات با مقدار کم هم برای اثرات ضدباکتریایی ضروی بوده و اثر سینرژیست دارند و اثر کل اسانس بیشتر از اثر انفرادی ترکیبات اصلی است (٦،۲۳) هر چند اثرات ضدباکتریایی بعضی از ترکیبات اصلی اسطوخودوس (اکالیپتول، لینالول) و مرزنجوش (پی-سایمن، آلفاترپینئول) مطالعه ما در سایر مطالعات نشان داده شده است (۲۹،۹). اسانس‌ها با مکانیسم‌های مختلفی شامل افزایش نفوذپذیری غشاهای سلولی، دپولاریزاسیون غشاء سیتوپلاسمی، اختلال در تنفس سلولی، انعقاد مواد سیتوپلاسمی، تخلیه ATP سلول و واکنش با پروتئین‌های غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی اثر ضدباکتریایی خود را اعمال می‌کنند (۸).

حداقل غلظت مهاری و رشد اسانس اسطوخودوس و مرزنجوش: هر دو اسانس اسطوخودوس و مرزنجوش بیشترین تأثیر را بر باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* داشتند و حداقل غلظت مهاری و رشد به ترتیب ۰/۱۵ درصد و ۰/۳۱ درصد بودند. آنتی‌بیوتیک لینکواسپکتینومایسین نیز بیشترین تأثیر را بر باکتری *استافیلوکوکوس آرئوس* با حداقل غلظت مهاری ۰/۰۷ درصد داشت (جدول ۳).

جدول۳- حداقل غلظت (درصد) مهاری و کشندگی اسانس اسطوخودوس و مرزنجوش بر باکتری‌ها

Table 3- MIC and MBC (%) of lavender and marjoram essential oil against bacteria

	باکتری Bacteria		حداقل غلظت مهاری MIC	حداقل غلظت کشندگی MBC
اسطوخودوس Lavender	*استافیلوکوکوس آرئوس*	*S. aureus*	0.15	0.31
	اشریشیا کلی	*E. coli*	0.62	1.25
	استرپتوکوس آگالاکتیه	*S. agalactie*	0.62	1.25
مرزنجوش Marjoram	*استافیلوکوکوس آرئوس*	*S. aureus*	0.15	0.31
	اشریشیا کلی	*E. coli*	0.62	1.25
	استرپتوکوس آگالاکتیه	*S. agalactie*	0.31	0.62
لینکواسپکتینومایسین Lincospectinomycin	*استافیلوکوکوس آرئوس*	*S. aureus*	0.07	0.15
	اشریشیا کلی	*E. coli*	0.15	0.31
	استرپتوکوس آگالاکتیه	*S. agalactie*	0.31	0.64

در ایـــن پـــژوهش حـــداقل غلظـــت مهـــاری اسطوخودوس و مرزنجوش علیه باکتری‌ها ۰/۱۵ تا ۰/٦۲ درصد و حداقل غلظت کشندگی ۰/۳۱ تا ۱/۲۵ درصد بدست آمد. در مطالعات مختلف مقادیر متفاوتی ذکر شده است. در یک مطالعه از کشور تایلند روی پنج تحت گونه از اسطوخودوس، سه تحت گونه علیه *اشریشیاکلی* هیچ فعالیت ضدباکتریایی نشان ندادند و حداقل غلظت مهاری دو تحت گونه دیگر ۰/۰۲ درصد و ۰/۰۰۷ درصد بود. علیه *استافیلوکوک آرئوس* نیز ۲ تحت گونه هیچ فعالیت ضدباکتریایی نداشتند و سه تحت گونه دیگر حداقل غلظت مهاری ۰/۰۵ درصد، ۰/۰۱ درصد و ۰/۰۰٦ درصد نشان دادند (۱۷). در یک مطالعه دیگر از کشور مراکش، حداقل غلظت مهاری اسانس اسطوخودوس علیه *اشریشیاکلی* ۰/۵ درصد و علیه *استافیلوکوک آرئوس* ۲-۰/۵ درصد اعلام شد (٦).هاجلو و همکاران (۲۰۱٦) حداقل غلظت مهاری و کشندگی مرزنجوش علیه اشریشیا کلی را به ترتیب ۷/۸ درصد و ۱۵/٦ درصد و علیه *استافیلوکوک آرئوس* به ترتیب ۱/۹ درصد و ۷/۸ درصد اعلام کردند (۱٦). در پژوهشی دیگر حداقل غلظت مهاری و کشندگی ۲۰ جدایه *استافیلوکوک آرئوس* از گوشت به ترتیب ۰/۰۰٦-۰/۱ درصد و ۰/۰۵-۰/۱ درصد گزارش شد (۱۹). تفاوت در مقادیر گزارش شده در مطالعات مختلف می تواند به علت ترکیبات متفاوت اسانس‌ها و همچنین حساسیت مختلف سویه‌های استفاده شده باشد. نسبت حداقل غلظت کشندگی/ مهاری[1] برای ارزیابی قدرت ضدباکتریایی اسانس‌ها استفاده می‌شود اگر این نسبت بزرگتر از ٤ باشد اسانس باکتریواستاتیک و اگر کمتر یا مساوی ٤ باشد باکتریسید در نظر گرفته می‌شود (۱٦). این نسبت برای اسانس‌های مطالعه ما دو بود که طبق این تقسیم‌بندی اثر باکتریسیدی نشان دادند و از نظر حداقل غلظت مهاری و کشندگی اثر ضدباکتریایی اسطوخودوس و مرزنجوش علیه *استافیلوکوک آرئوس* و *اشریشیاکلی* مشابه هم و در مورد *استرپتوکوک آگالاکتیه* اثر مرزنجوش قویتر بود.

انتشار از دیسک: در جدول ٤ نتایج آزمایش دیسک دیفیوژن اسانس‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها نشان داده شده است. طبق جداول موسسه استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی هر سه باکتری به آنتی‌بیوتیک‌ها حساس بودند. اثر اسانس‌ها غیر از غلظت ۰/۵ مرزنجوش بر *استافیلوکوک آرئوس* تفاوت معنی‌داری با آموکسی سیلین/کلاولونات و جنتامایسین نداشت و اثر غلظت ۰/۵ مرزنجوش به طور معنی‌داری کمتر از آنتی‌بیوتیک‌ها بود. در مورد *اشریشیاکلی* اثر هر دو غلظت مرزنجوش تفاوت معنی‌داری با آنتی‌بیوتیک‌ها نداشت ولی اثر هر دو غلظت اسطوخودوس به‌طور معنی‌داری کمتر از آموکسی سیلین/کلاولونات بود. اثر اسانس‌ها بر *استرپتوکوک آگالاکتیه* کمتر از آنتی‌بیوتیک‌ها بود و آموکسی‌سیلین اثر معنی‌دار بیشتری از جنتامایسین داشت.

در مطالعه حاضرهاله عدم رشد *استافیلوکوک آرئوس* و *اشریشیاکلی* بعد از استفاده از ۲۰ میکرولیتر/دیسک اسانس اسطوخودوس به‌ترتیب ۱۳/۵۲ و ۱۱/۱۳ میلی‌متر و اسانس مرزنجوش به‌ترتیب ۲۱/۷۹ و ۲٤/۹۲ میلی‌متر بود. اثر ضدباکتریایی هر دو اسانس علیه *استافیلوکوک آرئوس* با جنتامایسین و آموکسی‌سیلین/کلاولونات و علیه *اشریشیاکلی* با جنتامایسین تفاوت معنی‌داری نداشت که نشان‌دهنده اثر قابل ملاحظه و مشابه اسانس‌ها با آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه بود. در یک مطالعه با استفاده از ۳۰ میکرولیتر اسانس پنج تحت گونه اسطوخودوس علیه *اشریشیاکلی* در سه تحت گونه‌هاله مشاهده نشد و در مورد دو تحت گونه دیگر ۸/۲۷ و ۱۰/۸ میلی‌متر و برای *استافیلوکوک آرئوس*

1. MBC/MIC

فقط در سه تحت گونه وهاله‌های ۸/۲۳، ۷/۱۷ و ۱۲/٤ میلی‌متر مشاهده شد (۱۷). مرزنجوش باعث ایجادهاله عدم رشد ١٦ میلی‌متر برای *استافیلوکوک آرئوس* (کمتر ازهاله عدم رشد ۱۰میکروگرم/دیسک آمپی‌سیلین) و ۱۵ میلی‌متر برای *اشریشیاکلی* (کمتر از ازهاله عدم رشد ۸میکروگرم/دیسک پیپراسیلین) شد (۲۷). در مطالعه دیگری در مورد اسانس مرزنجوش، غلظت ۲۰ میکروگرم‌هاله عدم رشد ٢٤/٣ میلی‌متر برای *استافیلوکوک آرئوس* (بیشتر از ٦ میلی‌متر جنتامایسین) و ۲۰ میلی‌متر برای *اشریشیاکلی* (بیشتر از ١٤/٧ میلی‌متر جنتامایسین) نشان داد (۱). اختلاف‌هاله عدم رشد در مطالعات مختلف می‌تواند به علت سویه‌های مختلف باکتری، اختلاف مقدار و غلظت اسانس و آنتی‌بیوتیک‌ها در هر دیسک و همچنین اختلاف در ترکیب شیمیایی اسانس‌ها باشد. مقایسه داده‌های مطالعات مختلف درباره اثرات ضدباکتریایی اسانس‌های گیاهی از جمله اسطوخودوس چالش برانگیز است. در این مطالعات روش‌های گوناگونی استفاده شده است ولی معمولترین روشها دیسک دیفیوژن و براث دایلوشن است این روشها در اصل برای ارزیابی مواد هیدروفیل ابداع شده‌اند درصورتی که اسانس‌های روغنی نامحلول در آب، فرار و کمپلکسی از مواد گوناگون هستند و روشهای ساده فوق شاید برای اسانس‌ها کاملا مناسب نباشند تفاوت در روشها شامل مقدار تلقیح، محیط کشت مورد استفاده، استفاده از پوشاننده‌های محیط کشت[1] و استفاده از سوفکتانت‌ها یا حلالهایی مثل توین، دی متیل سولفوکساید و اتانول است به عنوان مثال در یک مطالعه حداقل غلظت مهاری گیاه لاوندولا انگوستیفولیا[2] و لینالول علیه قارچها با پوشاندن محیط کشت در مدت انکوباسیون برای جلوگیری از تبخیر اجزای اسانس ٤-۲ برابر کاهش یافت. بنابراین نیاز است تا در مورد اسانس‌ها روشهای استانداردتری ابداع شود و این اشکال، مقایسه مستقیم نتایج مطالعات مختلف را غیر ممکن می‌سازد (۱۱). با توجه به اینکه باکتری‌های گرم منفی دارای غشای خارجی هستند که از نفوذ اسانس‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها به داخل سلول ممانعت می‌کند و علاوه بر آن آنزیمهای موجود در ناحیه پری‌پلاسم گرم منفی‌ها ممکن است مواد ضدباکتریایی اسانس‌ها را غیر فعال کند (۲) انتظار این است که اثر ضدباکتریایی اسانس‌ها بر باکتری‌های گرم مثبت (*استافیلوکوک آرئوس* و *استرپتوکوک آگالاکتیه*) نسبت به باکتری گرم منفی *اشریشیاکلی* قوی‌تر باشد که در نتایج حداقل غلظت مهاری و کشندگی اثر ضدباکتریایی علیه گرم منفی‌ها مساوی یا کمتر از گرم مثبت‌ها بود و در نتایج انتشار از دیسک‌هاله عدم رشد اسطوخودوس علیه گرم مثبت‌ها بیش از گرم منفی بود ولی در مورد مرزنجوش بر خلاف انتظار ما بود.

منحنی رشد باکتری‌ها درحضور اسانس اسطوخودوس و مرزنجوش: در ساعت ٦ و ۱۰ رشد باکتری *اشریشیاکلی* در گروه شاهد و اسانس‌ها اختلاف معنی‌داری نداشت ولی در ساعت ٢٤ اسانس‌ها باعث کاهش معنی‌دار تعداد باکتری شدند (P<۰/۰۵) (شکل ۱). اثر اسانس‌ها بر منحنی رشد *استافیلوکوک آرئوس* هم مشابه *اشریشیاکلی* بود و در ساعت ٢٤ اسانس‌ها تعداد باکتری را به طور معنی‌داری کاهش دادند (شکل ۲). شکل ۳ رشد باکتری *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* را نشان می‌دهد. در ساعت ۱۰ رشد باکتری در گروه شاهد کاهش معنی‌داری (P<۰/۰۵) را نسبت به اسانس مرزنجوش نشان داد ولی از ساعت ۱۰ به بعد رشد باکتری در گروه شاهد افزایش یافت به طوری که در ساعت ٢٤ افزایش معنی‌داری را نسبت به دو اسانس نشان داد. هر دو اسانس ٢٤ ساعت بعد باعث کاهش معنی‌دار تعداد هر سه باکتری (حدود نصف عدد لگاریتمی تعداد باکتریها) شدند (P<۰/۰۵).

1. Sealant
2. *Lavandula angustifolia*

جدول٤- مقایسه میانگین‌هاله عدم رشد (میلی‌متر) باکتری‌ها تحت تاثیر غلظت‌های مختلف اسانس‌ها (۱ و ۰/۵) و آنتی‌بیوتیک‌ها

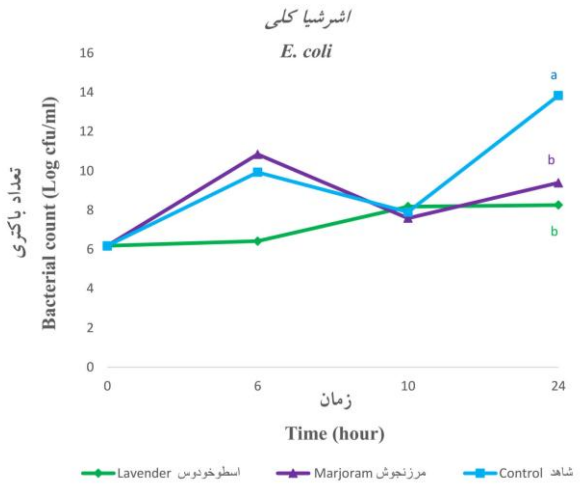
Table 4. Inhibition zone (mm) of bacterial growth of lavender and marjoram oils against bacteria by disc diffusion method

باکتری Bacteria	تیمار Treatment							سطح معنی‌داری P-value	میانگین استاندارد SEM
	اسطوخودوس ۱ Lavender 1	اسطوخودوس ۰/۵ Lavender 0.5	مرزنجوش ۱ Marjoram1	مرزنجوش ۰/۵ Marjoram0.5	جنتامایسین Gentamycin	آموکسی سیلین/ کلاولونات Amoxicillin/ clavulanate			
استافیلوکوک آرئوس *S.aureus*	13.52^{ab}	15.36^{ab}	21.79^{ab}	10.09^{b}	18.87^{ab}	24.09^{a}		0.00	1.36
اشریشیاکلی *E.coli*	11.13^{b}	10.55^{b}	24.92^{ab}	10.42^{ab}	17.60^{ab}	22.60^{a}		0.02	1.36
استرپتوکوک آگالاکتیه *S. agalactiae*	13.45^{c}	13.57^{c}	13.09^{c}	9.43^{c}	19.76^{b}	25.44^{a}		0.00	0.96

^{abcde}حروف نامشابه در هر ردیف نشان دهنده تفاوت معنی‌دار است.

$^{a-c}$Values that are significantly (P<0.05) different within the same row are indicated by different letters.

اسانس اسطوخودوس و مرزنجوش ٢٤ ساعت بعد اثر معنی‌داری در کاهش تعداد باکتری‌ها در منحنی رشد داشتند. که این فاصله زمانی می‌تواند به علت غلظت مورد استفاده (تحت حداقل غلظت مهاری) باشد و طبق نتایج انتشار دیسک مطالعه ما با افزایش غلظت اسانس مرزنجوش اثر ضدباکتریایی آن افزایش یافت و در صورت استفاده از غلظت‌های بالاتر مثل حداقل غلظت کشندگی این فاصله زمانی احتمالاً کاهش خواهد یافت.

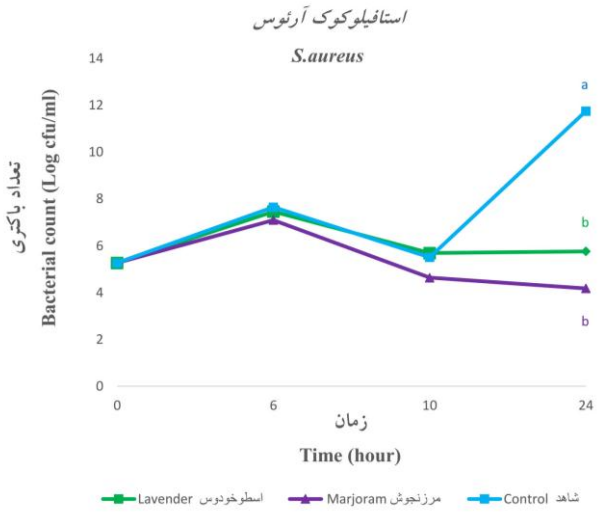


شکل ۱- اثر غلظت‌های صفر (کنترل، آبی) و MIC اسانس اسطوخودوس (سبز) و مرزنجوش (بنفش) بر منحنی رشد باکتری *اشریشیاکلی*

Figure 1. The effect of 0% (control, blue) and MIC concentrations of lavender (green) and marjoram (violet) essential oils on *Escherichia coli* growth curve

حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار (P<۰/۰۵) در هر زمان می‌باشد.

$^{a-c}$Values that are significantly (P<0.05) different within the same time are indicated by different letters.

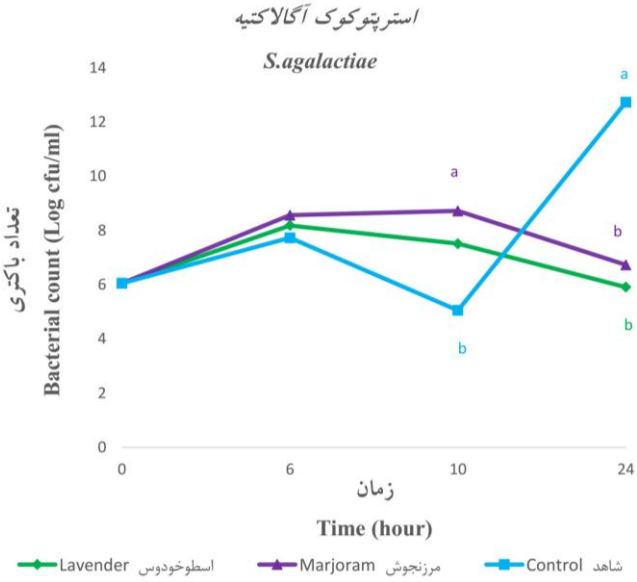


شکل ۲- اثر غلظت‌های صفر (کنترل، آبی) و MIC اسانس اسطوخودوس (سبز) و مرزنجوش (بنفش) بر منحنی رشد باکتری *استافیلوکوک آرئوس*.

Figure 2. The effect of 0% (control, blue) and MIC concentrations of lavender (green) and marjoram (violet) essential oils on *Staphylococcus aureus* growth curve.

حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار (P<۰/۰۵) در هر زمان می‌باشد.

[a-c]Values that are significantly (P<0.05) different within the same time are indicated by different letters.



شکل ۳- اثر غلظت‌های صفر (کنترل، آبی) و MIC اسانس اسطوخودوس (سبز) و مرزنجوش (بنفش) بر منحنی رشد باکتری *استرپتوکوک آگالاکتیه*.

Figure 3. The effect of 0% (control, blue) and MIC concentrations of lavender (green) and marjoram (violet) essential oils on *Streptococcus agalactiae* growth curve.

حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار (P<۰/۰۵) در هر زمان می‌باشد.

[a-c]Values that are significantly (P<0.05) different within the same time are indicated by different letters.

لازم به ذکر است اثرات ضدباکتریایی مشاهده شده فوق در محیط آزمایشگاه بوده و ممکن است اثرات ضدباکتریایی در داخل بدن متفاوت با این نتایج باشد. محیط داخل بدن پیچیده‌تر از شرایط آزمایشگاه بوده و علاوه بر عامل دارو و باکتری عامل دیگری به نام میزبان هم وجود دارد. در داخل بدن عوامل مختلفی از قبیل احتمال تغییر وضعیت متابولیک باکتری، توزیع متفاوت دارو در بافت‌های مختلف، وضعیت داخل سلولی یا خارج سلولی باکتری و قدرت ماده ضدباکتریایی در نفوذ به داخل سلول، تغییر فعالیت ضدباکتریایی یک ماده به علت اتصال به پروتئین‌ها، فسفولیپیدها، یا مواد ضدالتهابی، نحوه جذب و توزیع دارو در بدن، در فعالیت ضدباکتریایی یک ماده موثرند (۷). لذا برای ارزیابی دقیق‌تر، این اسانس‌ها باید در داخل بدن علیه عوامل ورم پستان مطالعه شوند.

نتیجه‌گیری نهایی

هر دو اسانس اسطوخودوس و مرزنجوش اثر ضدباکتریایی علیه سه باکتری موردمطالعه داشتند و این اثر علیه *استافیلوکوک آرئوس* با هر دو آنتی‌بیوتیک و علیه *اشریشیاکلی* با جنتامایسین تفاوت معنی‌داری نداشت که نشان دهنده اثر قابل قبول اسانس‌هاست و مطالعات بالینی برای اثر درمانی در بیماریهای مختلف از جمله ورم پستان توصیه می‌شود.

سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه گنبد کاووس انجام شده است که نویسندگان بدین وسیله مراتب تشکر و قدردانی خود را اعلام می دارند.

تعارض منافع: بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

منابع

1. Amor, G., Caputo, L., La Storia, A., De Feo, V., Mauriello, G. and Fechtali, T. 2019. Chemical composition and antimicrobial activity of *Artemisia herba-alba* and *Origanum majorana* essential oils from Morocco. Molecules. 24(22):4021-4033.
2. Ananda Baskaran, S., Kazmer, G.W., Hinckley, L., Andrew, S.M. and Venkitanarayanan, K. 2009. Antibacterial effect of plant-derived antimicrobials on major bacterial mastitis pathogens *in vitro*. Journal of Dairy Science. 92(4):1423-1429.
3. Arantes, S.,Candeias, F., Lopes, O., Lima, M., Pereira, M., Tinoco, T., Cruz-Morais, J. and Martins, M.R. 2016. Pharmacological and toxicological studies of essential oil of *Lavandula stoechas* subsp. Luisieri. Planta Medica. 82(14):1266-1273.
4. Asghari, J., Sadani, S., Ghaemi, E. and Mazaheri Tehrani, M. 2016. Investigation of composition and antimicrobial properties of *Lavandula stoechas* essential oil using disk diffusion and broth microdilution. Journal of Medical Laboratory. 10(3):53-58.
5. Bina, F. and Rahimi, R. 2017. Sweet marjoram: A review of ethnopharmacology, phytochemistry, and biological activities. Journal of Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 22(1):175–85.
6. Bouyahya, A., Et-Touys, A., Abrini, J., Talbaoui, A., Fellah, H., Bakri, Y. and Dakka, N. 2017. *Lavandula stoechas* essential oil from Morocco as novel source of antileishmanial, antibacterial and antioxidant activities. Journal of Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 12:179-184.
7. Brooks, G.F., Carroll, K.C., Butel, J.S. and Morse, S.A. 2007. Jawetz, Melnick& Adelberg's Medical Microbiology. 24 Edition. Mc Graw Hill. 819Pp.
8. Budri, P.E., Silva, N.C.C., Bonsaglia, E.C.R., Fernandes, A., Araújo, J.P., Doyama, J.T., Gonçalves, J.L., Santos, M.V., Fitzgerald-Hughes, D. and Rall.

V.L.M. 2015. Effect of essential oils of *Syzygium aromaticum* and *Cinnamomum zeylanicum* and their major components on biofilm production in *Staphylococcus aureus* strains isolated from milk of cows with mastitis. Journal of Dairy Science, 98(9):5899-5904.

9. Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. International Journal of Food Microbiology. 94:223-253.
10. Carrasco, A., Ortiz-Ruiz, V., Martinez-Gutierrez, R., Tomas, V. and Tudela, J. 2015. *Lavandula stoechas* essential oil from Spain: Aromatic profile determined by gas chromatography-mass spectrometry, antioxidant and lipoxygenase inhibitory bioactivities. Industrial Crops and Products. 73: 16-27.
11. Cavanagh, H.M.A. and Wilkinson, J.M. 2002. Biological activities of lavender essential oil. Phytotherapy Research. 16(4):301–308.
12. Cobellis, G., Trabalza-Marinucci, M. and Yu, Z. 2016. Critical evaluation of essential oils as rumen modifiers in ruminant nutrition: A review. Science of the Total Environment. 545:556-568.
13. CLSI. 2015. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. CLSI Document M100-S25, Wayne, USA, 240Pp.
14. Freires, I.A., Denny, C., Benso, B., De Alencar, S.M. and Rosalen, P.L. 2015. Antibacterial activity of essential oils and their isolated constituents against cariogenic bacteria: A systematic: A review. Molecules. 20(4):7329-7358.
15. Fu, Y.J., Zu, Y.G., Chen, L.Y., Shi, X.G., Wang, Z., Sun, S. and Efferth, T. 2007. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. Phytotherapy Research. 21(10):989-994.
16. Hajlaoui, H., Mighri, H., Aouni, M., Gharsallah, N. and Kadri, A. 2016. Chemical composition and *in vitro* evaluation of antioxidant, antimicrobial, cytotoxicity and anti-acetylcholinesterase properties of Tunisian *Origanum majorana* L. essential oil. Microbial Pathogenesis. 95:86-94.
17. Insawang, S., Pripdeevech, P., Tanapichatsakul, C., Khruengsai, S., Monggoot, S., Nakham, T., Artrod, A., D'Souza, P.E. and Panuwet, P. 2019. Essential Oil Compositions and Antibacterial and Antioxidant Activities of Five *Lavandula stoechas* Cultivars Grown in Thailand. Journal of Chemistry and Biodiversity. 16(10): e1900371
18. Kot, B., Wierzchowska, K., Piechota, M., Czerniewicz, P. and Chrzanowski, G. 2019. Antimicrobial activity of five essential oils from lamiaceae against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. Natural Product Research. 33(24):3587-3591.
19. Marques, J de L., Volcão, L.M., Funck, G.D., Kroning, I.S., da Silva, W.P., Fiorentini, Â.M. and Ribeiro, G.A. 2015. Antimicrobial activity of essential oils of *Origanum vulgare* L. and *Origanum majorana* L. against *Staphylococcus aureus* isolated from poultry meat. Industrial Crops and Products. 77:444-450.
20. Mashak, Z., Fayazfar, S. and Cheraghi, N. 2016. Antimicrobial effect of Chitosan film incorporated with *Lavandula stoechas* on some food-borne bacteria. Journal of Food Microbiology. 3(1):55-62. (In Persian)
21. Misaghi, A. and Basti, A.A. 2007. Effects of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil and nisin on *Bacillus cereus* ATCC 11778. Food Control. 18(9):1043-1049.
22. Mohammadhosseini, M., Sarker, S.D. and Akbarzadeh, A. 2017. Chemical composition of the essential oils and extracts of Achillea species and their biological activities: A review. Journal of Ethnopharmacology. 199:257-315.
23. Moosavi-Nasab, M., Saharkhiz, M.J., Ziaee, E., Moayedi, F., Koshani, R. and Azizi, R. 2016. Chemical compositions and antibacterial activities of five selected aromatic plants essential oils against food-borne pathogens and spoilage bacteria. Essential Oil Research. 83(3):607-613.
24. Mordmuang, A. and Voravuthikunchai, S.P. 2015. *Rhodomyrtus tomentosa*

(Aiton) Hassk. leaf extract: An alternative approach for the treatment of staphylococcal bovine mastitis. Research in Veterinary Science. 102:242-246.

25. Mushtaq, S., Shah, A.M., Shah, A., Lone, S.A., Husain, A., Hassan, Q.P. and Ali, M.N. 2018. Bovine mastitis: An appraisal of its alternative herbal cure. Microbial Pathogenesis . 114:357–361.
26. Pepa, T.D., Elshafie, H.S., Capasso, R., De Feo, V., Camele, I., Nazzaro, F., Scognamiglio, M.R. and Caputo, L. 2019. Antimicrobial and phytotoxic activity of *Origanum heracleoticum* and *O. majorana* essential oils growing in cilento (Southern Italy). Molecules. 24(14):1-16.
27. Ramos, S., Rojas, L.B., Lucena, M.E., Meccia, G. and Usubillaga, A. 2011. Chemical Composition and Antibacterial Activity of *Origanum majorana* L. Essential Oil from the Venezuelan Andes. Journal of Essential Oil Research, 23(5):45-49.
28. Tahmasebi, S., Majd, A., Mehrafarin, A. and onoubi, P. 2014. Qualitative and Quantitative Assessment of the Essential Oils of *Origanum vulgare* and *Origanum majorana* in Iran. Journal of Medicinal Plant. 13(50):163-172. (In Persian)
29. Tajkarimi, M.M., Ibrahim, S.A. and Cliver, D.O. 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. Food Control. 21(9):1199-1218.

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
J. of Ruminant Research, Vol. 8(3), 2020
http://ejrr.gau.ac.ir

Effect of *Lavandula stoechas* (Lavender) and *Origanum majorana* (Marjoram) oils on major mastitis-causing bacteria *in vitro*

***R. Rahchamani[1], S. Noori[2] and J. Bayat Kouhsar[1]**
[1]Assistant Prof., and [2]M.Sc. Graduated, Dept. of Animal Science, College of Agriculture and Natural Resources, University of Gonbad Kavous, Gonbad Kavous, Iran
Received: 02/24/2020; Accepted: 10/03/2020

Abstract

Background and objectives: Treatment of bacterial diseases with antibiotics has problems such as antibiotic resistance and side effects. Essential oils of medicinal plants have antibacterial effects and are suitable alternatives. *Lavandula stoechas* and *Origanum majorana* are two members of lamiaceae family that have shown antibacterial effect against some bacteria. *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus agalactiae* are major bovine mastitis-causing bacteria. Therefore, this study examined the antimicrobial activity of *Lavandula stoechas* (lavender) and *Origanum majorana* (marjoram) essential oil against these bacteria in comparison with gentamycin and amoxicillin/clavulanate antibiotics.

Materials and methods: Chemical compositions of essential oils were determined by GC/MS. Broth dilution testing using macrodilution was performed to determine minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of essential oils and licospectinomycin as positive control and the inhibition zones of oils, gentamycin and amoxicillin/clavulanate antibiotics were assayed by disk diffusion method. The effect of sub-MIC concentrations of essential oils on tested bacterial count was obtained at 0, 6, 10 and 24 hours and growth curve were plotted as log cfu/ml.

Results: Main components of the *Lavandula stoechas* and *Origanum majorana* oils were 17-pentatriacontene (42.15%), linalyl acetate (26.82%), eucalyptol (18.87%), linalool (5.7%), and 3-cyclohexene-1-ol,4-methyl-1-(1-methylethyl)-,(R)-(44.84%), α-terpineol (6.83%), P-cymene (6.75%), respectively. MIC and MBC values ranged from 0.15 - 0.62% for lavender and 0.62 - 1.25% for marjoram. MIC and MBC of licospectinomycin antibiotic were 0.07 - 0.31% and 0.15 - 0.64%, respectively. The lavender and marjoram essential oils had the most effect against *S. aureus* and MIC and MBC values were 0.15% and 0.31%, respectively. Also, the most effect of Lincospectinomycin antibiotic was against *S. aureus* and MIC and MBC values were 0.07% and 0.15%, respectively. The *Lavandula stoechas* and *Origanum majorana* oils at sub-MIC concentrations significantly reduced the bacterial population at 24 h. The inhibition zone of lavender and marjoram essential oils had no significant difference against *S. aureus* with gentamycin and amoxicillin/clavulanate antibiotics and against *E. coli* with gentamycin but against *S. agalactiae* were significantly lower than gentamycin and amoxicillin/clavulanate.

Conclusion: Essential oils of *Lavandula stoechas* and *Origanum majorana* had antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, and *Escherichia coli* bacteria *in vitro*. This effect had no significant difference against *S. aureus* with gentamycin and amoxicillin/clavulanate and against *E. coli* with gentamycin that show satisfactory effects of oils. Clinical studies on therapeutic effects of *Lavandula stoechas* and *Origanum majorana* oils on different diseases such as bovine mastitis are recommended.

***Keywords*:** Antibiotic resistance, Bacterial disease, Mastitis, Medicinal plant

*Corresponding author; Rahchamani@gonbad.ac.ir