مجله زیست فناوری گیاهان دارویی

سال پنجم، شماره دوم، پاییز و زمستان ۱۳۹۸

بررسی اثر ضد باکتری برخی از اسانس‌های گیاهی بر *Pseudomonas syringae pv. Syringae* و *Rathayibacter tritici* در محیط آزمایشگاهی

مجتبی آقاجانی قراء[۱] *، قربانعلی نعمت‌زاده[۲]، سید کمال کاظمی‌تبار[۳]، سید محمد علوی[۴]

چکیده

امروزه از روش‌های نوین در جهت کنترل آفات و بیماری‌های گیاهی به ویژه برای تولید محصولات ارگانیک، استفاده از مواد و ترکیبات طبیعی با منشاء میکروبی و گیاهی است. در این مطالعه اثر ضد باکتری نه اسانس گیاه سازیل، داتوره، زوفا، زربین، خون فام، سرخدار، شمشاد، همیشک و خاس با غلظت‌های مختلف (۱۲/۵ درصد، ۲۵ درصد، ۵۰ درصد و ۱۰۰ درصد اسانس خالص) بر روی سه باکتری *Pseudomonas syringae pv. Syringae* عامل بیماری شانکر درختان میوه هسته دار، *Rathayibacter tritici* عامل خوشه صمغی گندم و *E.coli* به روش دیسک دیفیوژن در قالب طرح فاکتوریل کامل تصادفی با سه تکرار مورد بررسی قرار گرفت. ترکیبات موجود در اسانس با استفاده از کروماتوگرافی گازی متصل به شناساگر طیف نگار جرمی (GC-MS) شناسایی شد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که نوع گونه گیاهی، غلظت اسانس، نوع باکتری و اثرات دوگانه و سه گانه در سطح یک درصد معنی دار است. نتایج نشان داد که بیشترین اثر ضدباکتری مربوط به هاله بازدارنده اسانس سازیل با میانگین ۱۳/۳ میلی‌متر برای *E.coli* می باشد. بخشی از اسانس سازیل توسط GC-MS مورد آزمایش قرار گرفته و ۱۴ ترکیب شناسایی شد. بیشترین و کمترین میزان ترکیبات ضد باکتری به ترتیب مربوط به Menthol (۴۱%)، Menthone (۱۲%) و Pulegone (۸%) می‌باشد. با توجه به نتایج، اسانس گیاه سازیل می‌تواند به عنوان یک سم بیولوژیک برای کنترل بیماری‌های گیاهی مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: اثر ضد باکتری، اسانس گیاهی، GC-MS

---

[۱] * نویسنده مسئول. دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری. ایمیل: mojtaba.aghajanighara@gmail.com

[۲] استاد گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

[۳] دانشیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

[۴] دانشجوی دکتری میکروبیولوژی فردوسی مشهد و کارشناس آزمایشگاه میکروبیولوژی پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

مقدمه

امروزه امنیت غذایی یکی از مسائل مهم زندگی بشری است و به موازات این مساله موضوع سلامت غذا مورد توجه مصرف کنندگان قرار گرفته است. از طرفی جهت تامین غذا برای ساکنان گرسنه زمین، حفظ تولیدات کشاورزی از نابودی در اثر خسارات خشک‌سالی، آفات، بیماری‌ها مهم می‌باشد. کشاورزان ناچاراند جهت مبارزه باعوامل زنده از انواع آفت‌کش و سموم استفاده نمایند ولی این سموم نه تنها بر محصولات کشاورزی باقی می‌مانند بلکه به داخل به بافت میوه‌ها و حتی دانه‌هاي غلات نفوذ می‌کنند. استفاده بیش از حد از آفت‌کش‌ها منجر به بروز پدیده‌ای به نام بقایای سموم می‌شود که این پدیده به عنوان عامل خطر جدی برای سلامت مصرف کنندگان می‌باشد. در طی سالیان گذشته بشر با استفاده از کود و سم شیمیایی، نظم طبیعت را به هم زده و به آن ستم کرده و خواسته یا ناخواسته به تخریب آن پرداخته است. استراتژی‌هاي مدیریتی مختلفی از جمله روش‌هاي فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی برای کنترل بیماری‌هاي گیاهی استفاده شده است، اما هرکدام از این روش‌ها محدودیت‌هاي دارند (Saad and *et al*, 2012).

متابولیت اولیه ترکیبات ضروری گیاه برای رشد و متابولیسم بوده که شامل کربوهیدرات، پروتئین و لیپید هستند و از سوی دیگر متابولیت ثانویه ترکیباتی هستند که از متابولیت اولیه به وجود می‌آیند و جزء مکانیسم دفاعی گیاه شناخته می‌شوند. گیاهان طیف گسترده‌ایی از متابولیت ثانویه را تولید می‌کنند و این ترکیبات نقش بقا گیاه در اکوسیستم را بر عهده دارند، و همچنین در مقاومت گیاه به آفات و بیماری‌ها، جذب موجودات گردافشان، جذب میکروارگانیسم‌های همزیست درگیر می‌باشد (Kabera *et al*; 2014). مشخصه گیاهان این است که آنها قادر نیستند از پاتوژن دور شوند و یا این که سیستم ایمنی لازم برای مقابله با پاتوژن را ندارند بنابراین انواع زیادی از ترکیبات مولکولی با وزن مولکولی پایین به نام متابولیت ثانویه تولید می‌کنند. هر گیاه حدودا بین ۵۰۰۰ تا ۲۰۰۰۰ متابولیت ثانویه منحصر به فرد تولید می‌کنند که البته اکثر این مواد به مقدار بسیار کم تولید می شوند و در آنالیز فیتوشیمیایی از آنها صرف نظر می‌شود. معمولا از ترکیبات متعلق به ترپنوئیدها، آلکالوئیدها و فلاونوئیدها به عنوان دارو یا مکمل غذایی برای جلوگیری و یا معالجه انواع بیماری‌ها استفاده می‌شود و به ویژه بعضی از این ترکیبات برای جلوگیری و مهار انواع سرطان موثر می‌باشند. هر یک از خانواده‌های متابولیت ثانویه دارای ویژگی شیمیایی خاصی هستند که نشان میدهد روش‌های عصاره‌گیری و آنالیز باید برای مطالعه جزئیات هر یک از خانواده‌ها ایجاد شود (Trethewey; 2004). متابولیت‌های ثانویه بیشتر به دلیل داشتن کاربردهای ضدمیکروبی و استفاده دارویی مورد استقبال قرار گرفتند (Fazly Bazzaz *et al*; 2005). کاربردهای دیگر شامل خواص ضد توموری، کاهش دهنده کلسترول، سرکوب کننده سیستم ایمنی، ضد پروتوزوا، ضد کرم‌های روده‌ایی، ضدویروسی و خواص ضدپیری می‌باشد (Vaishnav and Demain; 2011).افزایش وقوع مقاوم شدن میکروارگانیسم‌ها به

آنتی‌بیوتیک‌ها به طور مستمر، به نگرانی جامعه علمی تبدیل شده است. اکثر دانشمندان جهان در حال انجام تحقیقات روی گیاهان هستند تا بتوانند ترکیبات ضدمیکروبی را کشف کنند و در این راستا، دانشمندان در صدد ایزوله کردن ترکیبات ثانویه گیاهی، خالص سازی و شناسایی آنها می‌باشند (Netam *et al*; 2011). غربالگری فیتوشیمیایی گیاهان مختلف نشان داد که اکثر ترکیبات زیستی فعال شامل آلکالوئید، تانین، فلاونئید، گلیکوزید و ساپونین است و این متابولیت‌های ثانویه به عنوان مکانیسم دفاعی علیه بیشتر میکروارگانیسم‌ها، حشرات و گیاه خواران به کار می‌روند (Carson and Hammer; 2014). به منظور مدیریت بیماری‌های گیاهی، مواد شیمیایی مختلفی در تمام دنیا مورد استفاده قرار می‌گیرند. اگرچه استفاده از سموم شیمیایی در کنترل بیماری‌های گیاهی و در بهبود تولید محصولات موفق بوده است ولی این مواد در بافت‌های حیوانی تجمع پیدا کرده و باعث به خطر انداختن سلامت انسانی می‌شوند و همچنین اثرات منفی بر روی محیط زیست دارند (Yazdani *et al*; 2011). امروزه کنترل زیستی عوامل بیماری‌زای گیاهی با هدف کاهش اثرات خطرناک آفت‌کش‌های شیمیایی از جمله تهدید سلامتی بشر، آلودگی محیط زیست و از بین بردن موجودات غیر هدف و پیدایش عوامل بیماریزای مقاوم یک اولویت است. در این راستا استفاده از پتانسیل ضد میکروبی متابولیت‌های گیاهی می‌تواند اثرات منفی سموم شیمیایی را به حداقل برساند. این مطالعه با هدف بررسی فعالیت ضدباکتری متابولیت‌های ثانویه برخی از اسانس گیاهی جهت دستیابی به اسانس موثر علیه برخی از باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

۱- تهیه مواد گیاهی و پاتوژن‌ها

نمونه‌هاي گیاهی در اردیبهشت سال ۱۳۹۴ از مناطق مرتعی و جنگلی استان مازندران جمع‌آوری گردید که مشخصات این گیاهان در جدول ۱ آمده است. سپس به آزمایشگاه انتقال داده شد و به دور از تابش مستقیم نور خورشید خشک گردید و سپس اندام‌هاي هوایی گیاهان به وسیله آسیاب پودر شده و پودر حاصله در ظرف شیشه‌ای دربسته، جهت آزمایشات بعدی در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. پاتوژن‌های مورد استفاده در این تحقیق از آزمایشگاه میکروبیولوژی پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان تهیه گردید که در جدول۲ ذکر شده است.

جدول۱- نمونه‌های گیاهی مورد مطالعه در این تحقیق و اندام مورد استفاده آنها

ردیف	نام گیاه	نام علمی	خانواده	اندام مورد استفاده
۱	داتوره	*Datura stramonium*	*Solanaceae*	برگ
۲	خاس	*Ilex aquifolium*	*Aquifoliaceae*	برگ
۳	زوفا	*Hyssopus officinalis L*	*Lamiaceae*	اندام هوایی
۴	همیشک	*Dana racemosa*	*Asparaginaceae*	برگ
۵	سازیل	*Juncus*	*Juncaceae*	برگ
۶	زربین	*Cupressus sempervirens*	*Cupressaceae*	برک
۷	خون فام	*Lythrum Salicaria*	*Lythraceae*	برگ
۸	سرخدار	*Taxus baccata*	*Taxaceae*	برگ
۹	شمشاد	*Euonymus japonicus*	*Celastraceae*	برگ

جدول۲- پاتوژن‌های مورد مطالعه در این تحقیق و عامل بیماری ناشی از آنها

Origin	عامل بیماری	Strains

۲- تهیه اسانس

به منظور تهیه اسانس از دستگاه کلونجر و به روش تقطیر با آب به مدت ۳/۵ ساعت مورد استفاده قرار گرفت و به این ترتیب که ۱۰۰ گرم از هر نمونه خشك شده گیاهان مذکور، جهت عملیات اسانس‌گیري استفاده شد و سپس اسانس‌هاي حاصله پس از رطوبت زدايي با سولفات سديم انيدريد، در شيشه‌هاي تيره رنگ ريخته شد و تا زمان انجام آزمايش در يخچال ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداري گرديد. سپس توسط حلال دی متیل سولفوکساید غلظت‌های ۱۲/۵ درصد، ۲۵ درصد، ۵۰ درصد و ۱۰۰ درصد از اسانس‌ها تهیه شد (Baj *et al*; 2015).

۳- تهیه استاندارد نیم مک فارلند

محیط نیم مک فارلند محیطی است که میزان کدر بودن نمونه‌ها با آن مقایسه می‌شود. این محیط حاوی $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ باکتری در هر سی سی بوده است. برای تهیه کدورت نیم مک فارلند، نیم میلی‌لیتر کلرید باریم ۰/۴۸ مولار را در ۹۹/۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۰/۳۶ نرمال مخلوط کرده که این محیط به مدت ۶ ماه در تاریکی و در ظرف دربسته قابل نگهداری است. اگر در هر زمان رسوبی در لوله مشاهده شود محیط غیر قابل استفاده خواهد بود. در طول موج ۶۲۵ نانومتر بر طبق تعریف OD بین ۰/۱ ـ ۰/۰۸ معادل نیم

مـــك فارلنـــد برای باکتري‌ها است و در ادامه مقداری از کلونی باکتری را از سطح محیط کشت جدا کرده و در ویال حاوی محیط کشت بدون آگار حل می‌شود تا رشد باکتری به حدی برسد که در زمان قرائت با اسپکتروفتومتر در محدوده نیم مک فارلند باشند.

۴- سنجش فعالیت ضد میکروبی

به منظور ارزیابی فعالیت ضدباکتری، به روش سنجش انتشار دیسک (Disc- Diffusion assay) ابتدا۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری (با غلظت نیم مک فارلند) بر روی پتری دیش ۸ سانتی‌متر حاوی محیط کشت با نام عمومی NAS (Nutrient Agar Socurose) کشت داده شد سپس دیسک‌هاي به قطر ۶ میلی‌متر با ۲۰ میکرولیتر از هر کدام از اسانس‌ها آغشته گردید و روی محیط مورد نظر قرار داده شدند. آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین به عنوان شاهد مثبت برای باکتری و حلال متانول به عنوان شاهد منفی آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۲۷ درجه سانتی‌گراد قطر هاله عدم رشد را از پشت پلیت با کولیس دیجیتال اندازه‌گیری کرده و نتایج حاصله برای مقایسه ثبت گردید. کلیه اندازه‌گیری‌های این تحقیق در سه تکرار انجام شد (Murray *et al*; 1999).

نتایج

نتایج تجزیه واریانس اثرات بازدارندگی اسانس‌ها در غلظت‌هاي مختلف، نشان داد که بین گونه گیاهی، غلظت‌هاي اسانس مورد مطالعه، نوع باکتری و اثرات متقابل دوگانه و سه‌گانه از لحاظ اثر بازدارندگی تفاوت معنی‌داری در سطح یک درصد وجود دارد (جدول۳).

۵- کروماتو گرافی گازی- طیف سنج جرمی(GC-MS)

آنالیز اسانس توسّط دستگاه گاز کروماتوگراف متّصل به طیف نگار جرمی انجام شد. از دستگاه۶۸۹۰ GC/MS ساخت شرکت Agilent آمریکا با ستون مویینه به طول ۳۷ متر و قطر داخلی ۲۲۷ میکرومتر و ضخامت لایه داخلی ۲۵/. میکرومتر با برنامه دمایی ۵۰ تا ۲۶۵ درجه سانتیگراد با افزایش تدریجی ۲/۵ درجه سانتیگراد در هر دقیقه و نگهداری ستون در ۲۶۵ درجه سانتیگراد به مدّت ۳۷ دقیقه استفاده شد. دمای اتاقک تزریق ۲۲۷ درجه سانتیگراد بود و از گاز حامل هلیم با سرعت ۱/۵ میلی متر در دقیقه استفاده گردید.

در نهایت با استفاده از شاخص بازداری و طیف‌های جرم اجزای اسانس در مقایسه با طیف مرجع، ترکیبات اسانس شناسایی شد. بدین ترتیب اسانس گیاهی که خاصیت ضدباکتری از خود نشان دادند، جهت تعیین ترکیبات تشکیل‌دهنده و تهیه پروفایل مربوطه، مورد بررسی قرار گرفتند. این تحقیق به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شده و در پایان داده‌های حاصله با نرم افزار SAS version 9.1تجزیه و تحلیل و میانگین‌ها با آزمون چند دامنه ای دانکن مقایسه شدند.

نتایج مقایسه میانگین اثر ضد باکتری اسانس‌های گیاهی مورد مطالعه

با توجه به نتایج، گیاه سازیل با میانگین ۱۳/۱ میلیمتر هاله بازدارندگی، دارای بیشترین اثر ضد باکتری بر پاتوژن‌های مورد مطالعه محسوب می‌شود و همچنین گیاه زربین در بین اسانس گیاهی دارای کمترین اثر

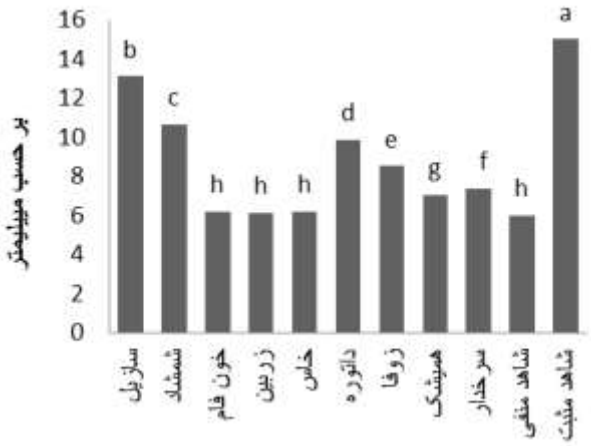
بازدارندگی با میانگین قطر ۶/۱ میلیمتر می‌باشد (نمودار۱).

نتایج مقایسه میانگین قطر هاله بازدارندگی حاصل از اثر ضد باکتری اسانس‌های مورد مطالعه نشان داد باکتری *E.coli* به عنوان حساس‌ترین پاتوژن(با میانگین قطر ۹/۲۳ میلیمتر) و *Pseudomonas syringae pv. Syringae* مقاوم‌ترین پاتوژن (با میانگین قطر ۸/۰۴ میلیمتر) در این تحقیق هستند (نمودار۲). شکریان و همکاران در سال ۱۳۹۴ با بررسی اسانس زنیان بر روی پاتوژن-های *Pseudomonas viridiflava*، *Pseudomonas syringae pv. Syringae* و *Escherichia coli* بیان کردند که بیشترین اثر ضد میکروبی بر روی *Escherichia coli* بوده است که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد(Shokrian *et al*; 2016). مقایسه میانگین قطر هاله در غلظت‌های مختلف نشان داد که غلظت ۱۰۰ درصد اسانس گیاهی با میانگین قطر هاله ۸/۸ میلیمتر به عنوان بهترین غلظت برای تست ضد میکروبی در این مطالعه بشمار می‌رود (نمودار ۳). با توجه به نتایج مقایسه میانگین قطر هاله ایجاد شده از اثر متقابل غلظت × باکتری می‌توان بیان کرد که بیشترین هاله تشکیل شده مربوط به غلظت ۱۰۰ درصد اسانس گیاهی بر باکتری *E.coli* می‌باشد که میانگین آن ۹/۶۴ میلیمتر بوده و کمترین هاله مربوط به غلظت ۱۲/۵ درصد اسانس گیاهی بر باکتری *Pseudomonas syringae. pv syringae* با میانگین ۷/۷۹ میلیمتر می باشد (نمودار۴).

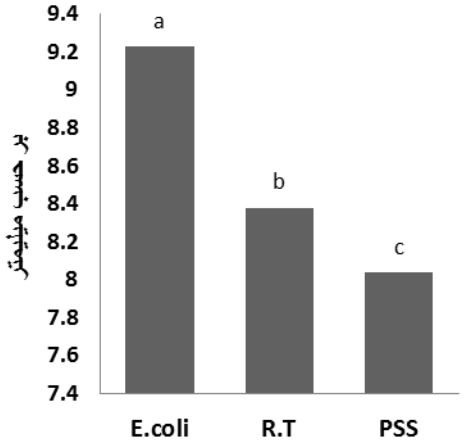
جدول۳- تجزیه واریانس اثر ضد باکتری اسانس‌های گیاهان با غلظت‌های متفاوت بر اساس قطر هاله

تیمارها	درجه آزادی	میانگین مربعات
اسانس گیاهی	۱۰	**۲۹۵/۹۳
باکتری	۲	**۴۹/۵۸
غلظت	۳	**۸/۲۷
باکتری × غلظت	۶	**۱۶/۰۳
اسانس گیاهی × غلظت	۳۰	**۱۱/۵۰
باکتری × اسانس گیاهی	۲۰	**۱/۰۰
باکتری × اسانس گیاهی × غلظت	۶۰	**۲/۵۵
خطا	۲۶۴	۰/۰۳
ضریب تغییرات		۲/۴۶

** : معنی دار در سطح احتمال یک درصد

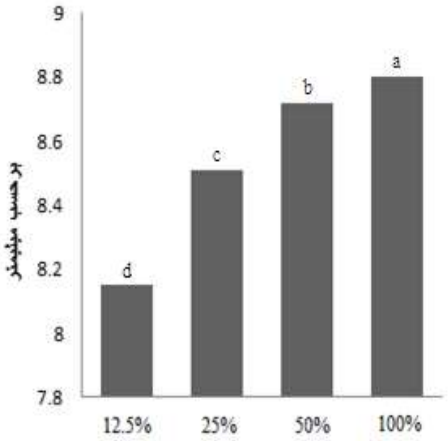


نمودار ۱ - میانگین هاله بازدارندگی اسانس گیاهی

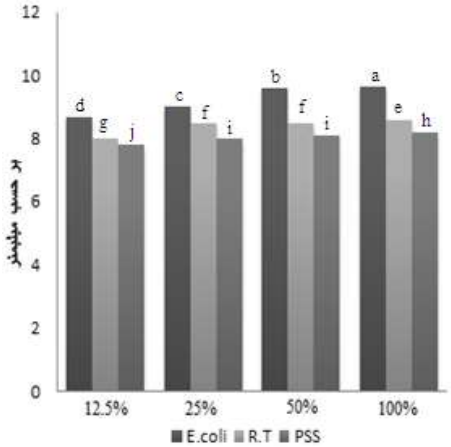


E.Coli: Escherichia coli, R.T: Rathayibacter tritici, PSS: Pseudomonas syringae. pv syringae

نمودار۲- میانگین قطر هاله بازدارندگی حاصل از اسانس‌های مورد مطالعه بر پاتوژن‌ها



نمودار۳- مقایسه میانگین قطر هاله‌ها در غلظت-های مختلف اسانس گیاهی



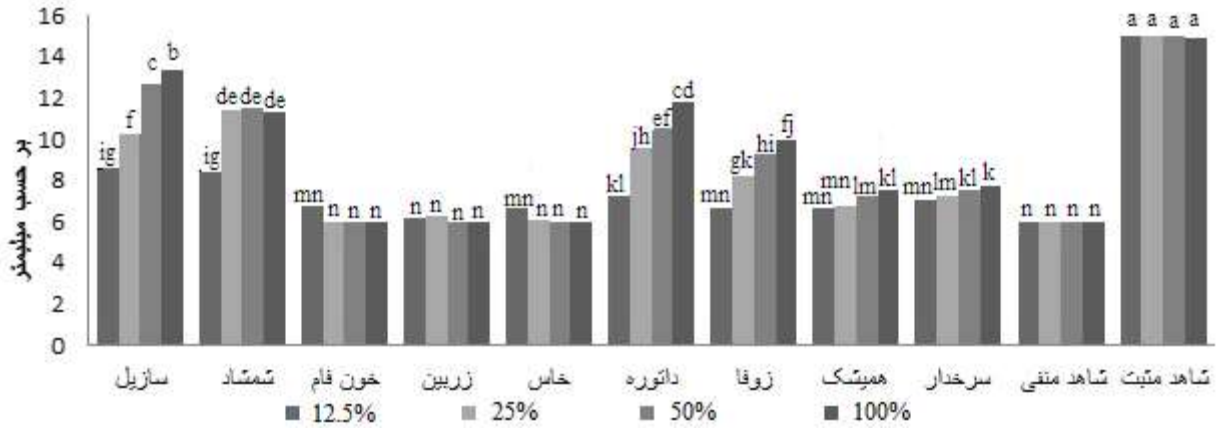
E.Coli: Escherichia coli, R.T:Rathayibacter tritici, PSS: Pseudomonas syringae. pv syringae

۴- نمودار میانگین قطر هاله ایجاد شده از اثر متقابل غلظت × باکتری

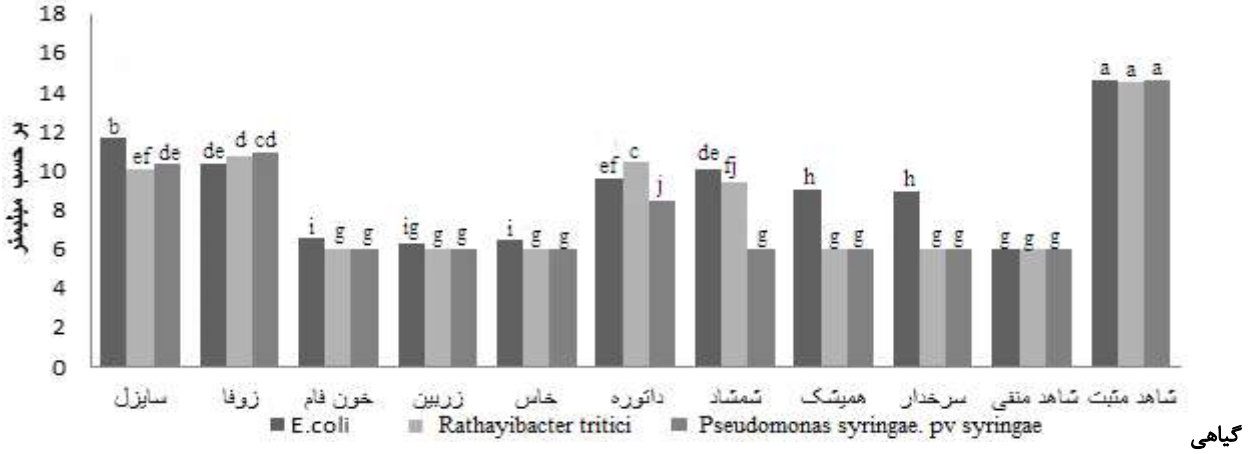
با توجه به نتایج حاصل از میانگین قطر هاله ایجاد شده از اثر متقابل غلظت × اسانس گیاهی می‌توان بیان کرد که گیاه سازیل با غلظت ۱۰۰ درصد، هاله‌ای بازدارنده با میانگین ۱۳/۳۴ میلیمتر ایجاد کرده که در بین گیاهان و غلظت‌های دیگر بیشترین هاله را به خود اختصاص داده است (نمودار۵) و همچنین مقایسه میانگین قطر هاله ایجاد شده از اثر متقابل باکتری × اسانس گیاهی نیز نشان داد که اسانس گیاه مذکور بر

باکتری *Escherichia coli* اثر ضد میکروبی معنی‌داری با میانگین هاله بازدارندگی ۱۱/۹۵ میلی‌متر ایجاد کرده است(نمودار۶).

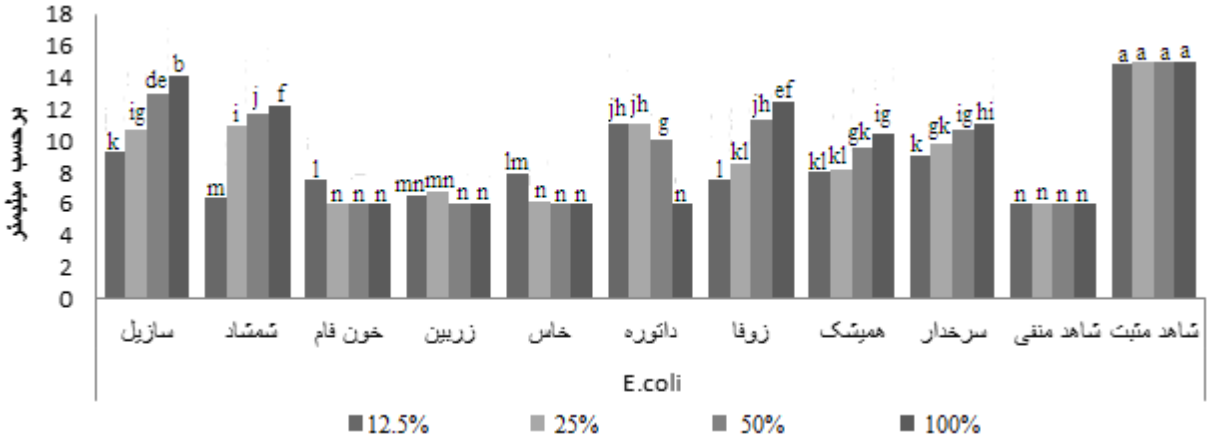
نتایج مقایسه میانگین قطر هاله بازدارندگی از اثرات متقابل سه‌گانه اسانس گیاهی× غلظت اسانس× باکتری نشان داد که بیشترین هاله بازدارندگی مربوط به پاتوژن گرم منفی با اسانس گیاه سازیل با غلظت ۱۰۰ درصد روی باکتری *E.coli* می‌باشد که میانگین قطر هاله بازدارندگی آن ۱۴/۱میلیمتر (نمودار۷) و بعد از آن به ترتیب مربوط به غلظت ۱۰۰ درصد گیاه فوق بر باکتری *Pseudomonas syringae pv. Syringae* و *Rathayibacter tritici* می‌باشد. طاهری و همکاران در سال ۱۳۹۲ با بررسی خاصیت آنتی باکتریایی عصاره گیاه دارویی به لیمو (*Lippia citriodora*) بر برخی سویه های باکتری گرم مثبت (*Rathayibacter tritici*) و منفی (*seudomonas syringae pv. Syringae*) بیان کردند که برای باکتری های *Escherichia coli* و *Pseudomonas syringae pv syringe* خاصیت بازدارندگی عصاره به دلیل تشکیل هاله عدم رشد باکتری در اطراف دیسک کاغذی وجود دارد ولی در مورد باکتری *Rathayibacter tritici* هاله عدم رشد مشاهده نشد. همچنین قادری و همکاران در سال ۱۳۹۲ با بررسی اثر ضد باکتریای گیاه پنج انگشت علیه برخی باکتری‌های بیماریزای گیاهی دریافتند که عصاره گیاه پنج انگشت علیه سه باکتری *P.Syringae*، *X.campestris* و *R. tritici* به ترتیب میانگین قطر هاله بازدارندگی به میزان ۳۳/۱۶ ، ۹۴/۱۴ و ۷۹/۱۷ ایجاد کرده است (قادری و همکاران، ۱۳۹۲). دلیل تفاوت در یافته های پژوهشی در مورد اثر اسانس و یا عصاره بر باکتری‌های گرم مثبت و منفی می‌تواند این باشد که متابولیت‌ها به چندین شیوه متفاوت با باکتری‌ها برهمکنش دارند تا آن‌ها را از بین برده یا حداقل، رشدشان را متوقف کنند. یکی از این راه ها از بین بردن DNA و دیگری تخریب دیواره سلولی است و همچنین برخی دیگر نیز غشای سیتوپلاسمی را تحت تاثیر قرار داده و یا جلوی سنتز پروتئین را می گیرند. گروهی دیگر نیز آنتی متابولیت‌ها هستند که به طور کلی جلوی تغذیه سلول را گرفته و رشدش را متوقف می کنند (Chouhan *et al*;2017).



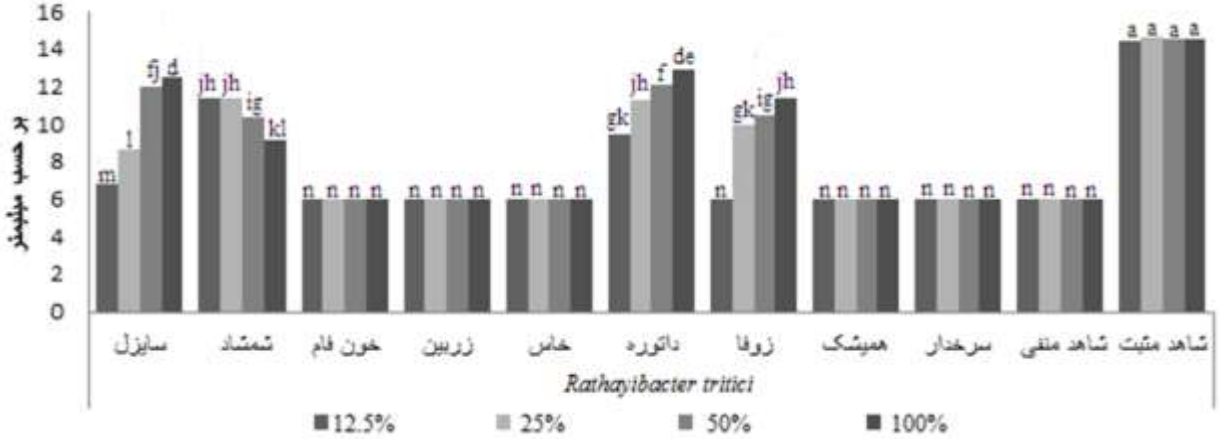
نمودار ۵- میانگین قطر هاله ایجاد شده از اثر متقابل غلظت × اسانس



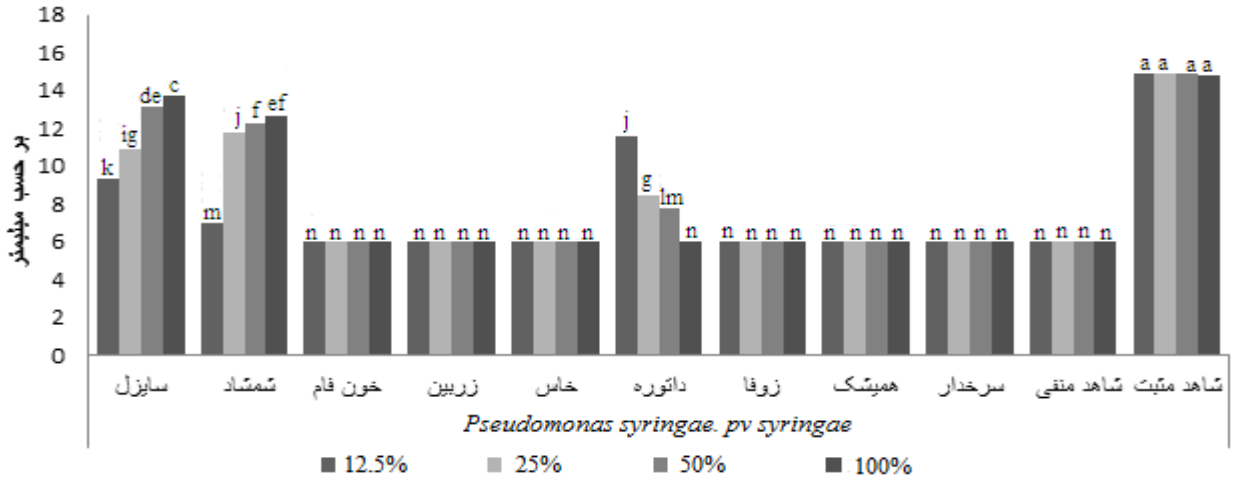
نمودار۶- میانگین قطر هاله ایجاد شده از اثر متقابل باکتری × اسانس گیاهی



نمودار۷- میانگین قطر هاله بازدارندگی از اثرات متقابل سه‌گانه اسانس گیاهی×غلظت اسانس× باکتری *E.coli*



نمودار۸- میانگین قطر هاله بازدارندگی از اثرات متقابل سه‌گانه عصاره گیاهی×غلظت عصاره× باکتری *Rathayibacter tritici*



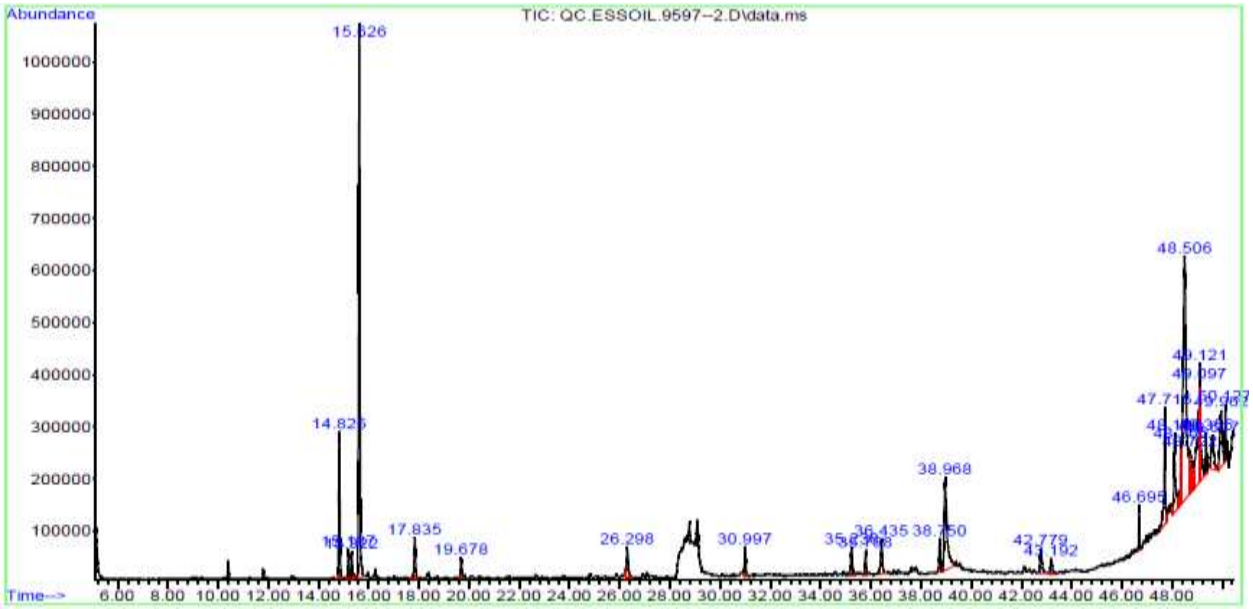
نمودار ۹- میانگین قطر هاله بازدارندگی از اثرات متقابل سه‌گانه عصاره گیاهی×غلظت عصاره× باکتری

Pseudomonas syringae pv. Syringae

تجزیه کیفی و کمی اجزاء موجود در اسانس گیاه سازیل

با توجه به آنالیز انجام شده و استفاده از کتابخانه موجود در کامپیوتر دستگاه GC-MS شناسایی ترکیبات حاصل از تزریق اسانس به دستگاه انجام شد. نهایتا برای گیاه سازیل ۱۴ ترکیب شناسایی شد. فهرست اجزا موجود اسانس در جدول زیر ذکر شده است.

.



شکل ۱- تجزیه کیفی و کمی اسانس گیاه سازیل

جدول ۱۰- ترکیبات شناسایی شده از اسانس سازیل

نام ترکیب	فرمول مولکولی	وزن مولکولی	%Area	Rt(min)	%Qual
p-Menthan-3-one	$C_{10}H_{18}$	154.24	4.76	14.82	98
Menthone	$C_{10}H_{18}O$	154.25	12.96	15.19	98
Cyclohexanol	$C_6H_{12}O$	100.15	0.90	15.324	90
Menthol	$C_{10}H_{20}O$	156.27	41.03	15.62	91
Pulegone	$C_{10}H_{16}O$	152.24	8.60	17.83	95
Carane	$C_{10}H_{18}$	138.25	0.71	19.67	94
MINT FURANONE	$C_{11}H_{16}O$	164.24	1.54	26.29	96
Octadeamethyl-cyclononasiloxan	$C_{18}H_{54}O_9Si_9$	667.38	1.09	35.23	91
Diisobutyl phthalate	$C_{16}H_{22}O_4$	278.35	1.74	36.43	90
Dibutyl phthalate	$C_{16}H_{22}O_4$	278.34	1.35	38.75	94
Hexadecanoic acid	$C_{16}H_{32}O_2$	256.42	7.53	38.96	99
Rhamnol	$C_{29}H_{50}O$	414.70	23.22	48.50	99
delta.5-Ergostenol	$C_{28}H_{44}O$	396.65	4.12	49.96	95
Tetracosamethyl-cyclododecasiloxan	$C_{24}H_{72}O_{12}Si_{12}$	889.84	1.26	50.13	91

ترکیبات Menthone، Menthol و Pulegone دارای خاصیت ضد میکروبی می‌باشند.

خاصيت ضد ميكروبي اسانس گياه نعناع توسط Sivropoulou و همكاران و Tassou و همكاران بررسي شد و نشان دادند كه اين خاصيت بعلت وجود منتول و كتون‌ها نظير ايزومنتول و كاروون مي‌باشند همچنين فريرز و همكاران در سال ۲۰۱۵ با بررسی فعالیت ضد باکتری ترکیبات جدا شده از اسانس، خواص ضد باکتری منتول را اثبات کردند. تلبائوی و همکاران در سال ۲۰۱۲، اندرسون و جانسن در سال ۱۹۸۴ و اومزیل و همکاران در سال ۲۰۰۲ و دیگر دانشمندان اثر ضد باکتری Pulegone را مورد بررسی قرار داده و خاصیت ضد میکروبی این ترکیب را گزارش کردند. ردی و همکاران در سال ۲۰۱۷ با بررسی فعالیت ضد میکروبی اسانس نعنا فلفلی بیان کردند که بیشتر سهم اسانس را منتول با % ۳۲/۴۲ و منتون با % ۴/۵۶ دارا بوده که خواص ضد باکتری (گرم مثبت و منفی)، ضد قارچی و ضد مخمری دارد. كنترل عوامل بيماريزاي گياهي با استفاده از مواد گوناگون شيميايي، و اثر نامطلوب آنها بر سلامت انسان و محيط زيست، انسان را بر آن داشت كه به توليد آفت‌كش‌هاي طبيعي روي آورد (Rajeswari *et al*; 2012). بدين ترتيب يكی از روش‌هاي نوين در جهت كنترل آفات و بيماری‌هاي گياهی به ويژه برای توليد محصولات ارگانيک استفاده از مواد و ترکیبات طبیعی یا سبز با منشا میکروبی و گیاهی است. در این بین نقش و اهمیت ترکیبات طبیعی گیاهان در کنترل انواع بيماری‌هاي گياهی از جمله بيماری‌هاي قارچی، باكتريايی، ويروسی، نماتدها بسيار بارز و برجسته است. گياهان دارويی منبع غنی از مواد ضدميكروبی می باشند (Lee *et al*; 2010). ترکیبات فعال بیولوژیکی موجود در گیاهان سازگارتر، قابل قبول‌تر و امن‌تر از ترکیبات مصنوعی به نظر می‌رسد و منبع غنی از عوامل باالقوه

برای کنترل پاتوژن‌ها می‌باشند (Hu, 2010). مطالعه در زمینه وظایف این ترکیبات در گیاهان، يك موضوع جذاب و مهم براي بسياري از پروژه‌هاي تحقيقاتي شده است و نقش‌هاي اكولوژيكي تعدادي از اين تركيبات مورد بررسي و تحقيق قرار گرفته است. از این رو بسیاری از کشورها با استفاده از فن‌آوری جدید تهیه و فرمولاسیون سموم غیر شیمیایی از جمله آفت‌کش‌هاي با پايه و منشا گیاهی مبادرت به کنترل تلفیقی بیماری‌هاي مهم گیاهی نموده‌اند. تقریبا ۲۰ درصد از گیاهان شناخته شده در جهان در عملیات‌هاي بیولوژیکی تست شده‌اند (Sufferdini *et al*; 2004).

گیاه سازیل دارای ترکیبات مهمی چون Menthone ، Menthol و Pulegone، می‌باشد که دارای خواص ضدمیکروبی می‌باشند و بیشترین اثر ضدباکتری را روی *E.coli* و باکتری *Pseudomonas syringae pv. Syringae* در غلظت ۱۰۰ درصد داشته است که هیچ اثر ضد میکروبی از این گیاه هنوز گزارش نشده است. سلطانی و همکاران در سال ۱۳۸۷ با بررسی منتون ردوکتاز در مراحل مختلف رشد اسانس گیاه *Mentha piperita* دریافتند که مراحل رویشی بیشترین ترکیب *Menthone*، Menthol و Pulegone را دارا می‌باشد و همچنین آنها گزارش کردند که این ترکیبات اثر ضدمیکروبی روی ۱۱پاتوژن را داشته که نشان دهنده تایید اثر ضد میکروبی ترکیبات نام برده می‌باشد (سطلانی و همکاران، ۱۳۸۷). به این ترتیب می‌توان گیاه سازیل را به عنوان یک منبع بلقوه برای استخراج ترکیبات ضد میکروبی قلمداد کرد. در ادامه لازم است مطالعات وسیعتر و دامنه‌داري در شرایط *in vivo* انجام شود تا دوز مؤثر این عصاره مشخص شود. یکی دیگر از یافته‌های این تحقیق این می‌باشد که بعضی از گیاهان اثر ضد میکروبی از خود نشان نداده اند که این امر به دلایل مختلف بستگی دارد. یکی از عواملی که ممکن است اثرات ضد باکتریايي اسانس يك گياه را تحت تأثير قرار دهد، روش اسانس گیری و نوع حلال، زمان و مرحله رویشی، زیستگاه و منطقه جغرافیایی گیاه مورد استفاده مي‌باشد. اسانس‌های که با روش‌ها و حلال‌هاي متفاوتي از يك گياه گرفته شده، مي‌توانند اثرات ضد باكتريايي متفاوتي بر روي يك باكتري خاص از خود نشان دهند. عامل ديگري كه مي تواند اثرات ضد ياكتري عصاره يا اسانس يك گياه را تحت تأثير قرار دهد، محيط كشت مورد استفاده جهت انجام آزمايشات ضد ميكروبي مي‌باشد كه تفاوت در اثرات ضد ميكروبي يك ماده در محيط كشت‌هاي گوناگون به اثبات رسيده است(Nostro *et al*; 2000).

منابع

سلطاني، ف. شريفي، م. خواجه، خ. يوسف‌زادي، م. ۱۳۸۷. بررسي تركيبات اسانس، فعاليت آنزيم منتون ردوكتاز و فعاليت ضد ميكروبي گونه *Mentha piperita* در دو مرحله از رشد. مجله زيست شناسي ايران. جلد ۲۱ ،شماره ۵. ۶۲- ۷۰.

طاهری عزیزآبادی ، ح. باقری، ن. بابائیان جلودار، ن. شریفی مهر، س. ۱۳۹۲. بررسی خاصیت آنتی باکتریایی عصاره گیاه دارویی به لیمو(*Lippia citriodora*) بر برخی سویه های باکتری گرم مثبت و منفی. همایش ملی گیاهان دارویی.۳. ۱- ۵

Ahmed Talbaoui, Naoual Jamaly, M’hamed Aneb, Abdelkader Idrissi, Mohammed Bouksaim, Said Gmouh, Saaïd Amzazi,

Properties. Journal of Pharmacy and Pharmacology;2:377-92.

Lee. TT, Huang CC, Shieh XH, Chen CL, Chen LJ and Yu B. 2010. Flavonoid, phenol and polysaccharide contents of Echinacea purpurea L. and its immunostimulant capacity in vitro. International Journal of Environment and Sustainable Development 1: 5–9.

Murray P, Baron R, Pfauer EJ, Tenoyer M, Yolken FC, Robert H, Editors. Manual of clinical Microbiology. 7th ed. Philadelphia: American Society for Microbiology; 1999.

Netam,R.S., A.N. Bahadur., U. Tiwari and R. K. S.Tiwari.2011. Efficacy of Plant Extracts for the Control of (Pyricularia grisea) Blast ofRice under Field Condition of Bastar, Chhattisgarh. Journal of Agricultural Sciences. 2(2): 269-271

Nostro A, Germano MP, Angelo VA, Marino A, Extraction methods and .Connatelli MA. 2000

bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. Lett Appl Microbiol. 30(5): 389-94

Oumzil H, Ghoulami S, Rhajaoui M, Ilidrissi A, Fkih-Tetouani S, Faid M, Benjouad A (2002). Antibacterial and antifungal activity of essential oils of Mentha suaveolens EHRH. Phytother. Res. 16:723-731.

Rajeswari.G, Murugan. M and Mohan. VR. 2012.GC-MS analysis of bioactive components of Hugonia mystax L. (Linaceae). Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 301-308.

Saad S, Taher M, Susanti D, Qaralleh H, Awang AFIB. 2012. In vitro antimicrobial activity of mangrove plant Sonneratia alba. Asian Pacific journal of tropical biomedicine;2(6):427-9

Shokrian T., Sadat Noori S.A., Nematzadeh G.A., Alavi S.M. 2016. Evaluating Antibacterial Activity of In Vitro Culture of Ajwain (Trachyspermum copticum) Extract and Comparison with Seed Extract and

Mohammed El Moussaouiti, Abdelaziz Benjouad, Youssef Bakri. 2012. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from six Moroccan plants. Journal of Medicinal Plants Research Vol. 6(31), pp. 4593-4600

Andersen PH, Jensen NJ (1984). Mutagenic investigation of peppermint oil in the Salmonella mammalian microsom test. Mutat. Res. 138:17- 20.

Carson, C.F. and K.A. Hammer, 2010. Chemistry and Bioactivity of Essential Oils. In: Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents, Thormar, H. (Ed.). John Wiley & Sons, New York, USA., ISBN-13: 9780470976678, pp: 203-238.

Desam Nagarjuna Reddy, Abdul Jabbar Al-Rajab, Mukul Sharma, Mylabathula Mary Moses, Gowkanapalli Ramachandra Reddy, Mohammed Albratty. 2017. Chemical constituents, in vitro antibacterial and antifungal activity of Mentha Piperita L. (peppermint) essential oils. Journal of King Saud University – Science.1-6

Fazly-Bazzaz BS, Khajehkaramadin M, Shokooheizadeh HR (2005). In vitro antibacterial activity of Rheum ribes extract obtained from various plant parts against clinical isolates of Gram-negative pathogens. Iranian J. Pharmacol. Res. 2:87-91.

Hu GF. 2001.Neomycin inhibits the angiogenic activity of fibroblast and epidermal growth factors. Biochem Biophys Res Commun;287:8704.

Irlan Almeida Freires, Carina Denny, Bruna Benso, Severino Matias de Alencar, Pedro Luiz Rosalen. 2015. Antibacterial Activity of Essential Oils and Their Isolated Constituents against Cariogenic Bacteria: A Systematic Review. Molecules, 20, 7329-7358; doi:10.3390

Kabera JN, Semana E, Mussa AR, He X. 2014. Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological

Essential Oils. Journal of Plant Molecular Breeding, 4(2): 41-46.

Sivropoulou, A., Papanikolaou, E., Nikolaou, C., Kokkini, S., Lanaras, T., and Arsenakis, M. 1996. Antimicrobial and cytotoxic activities of Origanum essential oils. Journal of agricultural and Food Chemistry, 44(5): 1202-1205.

Sonam Chouhan, Kanika Sharma and Sanjay Guleria. 2017. Antimicrobial Activity of Some Essential Oils—Present Status and Future Perspectives. Medicines, 4, 58; doi:10.3390

Sufferdini,J.B,Sader H.S, Goncalves, A.G, Reis, A.O, Gales, A.C, Varella, A.D, and Younes, R.N. 2004.Screening of antimicrobial extracts from plant native of the Brazillian Amazone rainforest and Atlantic forest. Brazillian Journal Medical Research,37:379-384.

Tassou, C., Koutsoumanis, K., and Nychas, G. J. 2000. Inhibition of Salmonella enteritidis and Staphylococcus aureus in nutrient broth by mint essential oil. Food Research International, 33(3): 273-280.

Tomasz Baj, Elwira Sieniawska, Radoslaw Kowalski, Marek Wesolowskp, Beata Ulewicz-Magulska.2015. Effectiveness of the Deryng and Clevenger-type apparatus in isolation of various types of components of essential oil from the Mutelina purpurea Thell. Flowers. Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research, Vol. 72 No. 3 pp. 507-515.

Trethewey. R. 2004. Metabolite profiling as an aid to metabolic engineering in plants. Curr Opin Plant Biol 7: 196–201

Vaishnav and A. L. Demain. 2011.Unexpected applications of secondary metabolites,Biotechnology Advances, vol. 29, no. 2, pp. 223–229

Yazdani, D. Y. H. Tan. , M. A. Zainal Abidin.and I. B . Jaganath .2011. A review on bioactive compounds isolated from plants against plant pathogenic fungi . Journal of Medicinal Plants Research Vol. 5(30), pp. 6584-6589

Journal of Medicinal Plants Biotechnology

Vol 5, No 2, Autumn & Winter 2020

In vitro antibacterial activity of some plant essential oils against *Pseudomonas syringae pv. Syringae* and *Rathayibacter tritici*

Mojtaba Aghajani Ghara*[1], Ghorbanali Nematzadeh[2], Seyed Kama Kazemitabar[3], Seyed Mohamad Alavi[4]

Abstract

Plants extracts can be a new sources for pest and disease controlling. In this research, the antibacterial effects of essential oil from 9 plants including, *Juncus*, *Euonymus japonicas*, *Taxus baccata*, *Dana racemose*, *Datura stramonium*, *Lythrum Salicaria*, *Cupressus sempervirens*, *Ilex aquifolium* and *Hyssopus officinalis* with different concentrations, means 12.5, 25, 50 and 100 % used for three bacteria such as *E.coli*, *Pseudomonas syringae. pv syringae*, *Rathayibacter tritici* through in the form of disc diffusion. The experimental was as completely randomized factorial design with three replications. At the end, qualitative and quantitative analysis of the components of the essential oil were analyzed by GC-MS. The results of variance analysis of the inhibitory effects in different concentrations showed that, plant species, the different concentrations of essential oil, the type of bacteria and mutual interaction have shown the significantly meaning, in terms of inhibitory effects ($P < 0.01$). The results indicated, the most antimicrobial activities related to the *Juncus* essential oil with the zone of 13.3 mm for *E.coli*. The part of *Juncus* essential oil so examined by GC-MS system and the result has shown 14 different compounds. The maximum and minimum substances were Menthol (41%), Menthone (12%) and Pulegone (8.62%), respectively. From this research, we conducted that the *juncus.s* essential oil putatively can be as a source of disease control agent.

Keywords: Plant oils, Antibacterial, GC-MS

[1] *Corresponding Author. Department of Agricultural Biotechnology.Faculty of Agricultural Sciences.University of Agricultural Sciences and Natural Resources.Sari.Iran Email: mojtaba.aghajanighara@gmail.com

[2] Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan (GABIT), Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Sari, Iran

[3] Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Sari, Iran

[4] Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan (GABIT), Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran