

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 کاظمی تبار^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 منشأ 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٪) می باشد. 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 ناچارند جهت مبارزه با عوامل 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 دانه‌های 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. استراتژی‌های مدیریتی مختلفی از جمله روش‌های فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی برای کنترل بیماری‌های گیاهی استفاده شده است، اما هرکدام از این روش‌ها محدودیت‌های 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 گسترده‌ای 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 حدوداً بین ۵۰۰۰ تا ۲۰۰۰۰ متابولیت ثانویه منحصر به فرد تولید می‌کنند که البته اکثر این مواد به مقدار بسیار کم تولید می‌شوند و در آنالیز فیتوشیمیایی از آنها صرف نظر می‌شود. معمولاً 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 ضد میکروبی 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 روده‌ای، ضد ویروسی و خواص ضدپیری می‌باشد (Vaishnav and Demain; 2011). افزایش وقوع مقاوم شدن میکروارگانیسم‌ها به

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.

آنتی‌بیوتیک‌ها به طور مستمر، به نگرانی جامعه علمی تبدیل شده است. اکثر دانشمندان جهان در حال انجام تحقیقات روی گیاهان هستند تا بتوانند ترکیبات ضد میکروبی 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، فلاونوئید، گلیکوزید و ساپونین است و این متابولیت‌های ثانویه به عنوان مکانیسم دفاعی علیه بیشتر میکروارگانیزم‌ها، 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

مواد و روش‌ها

۱- تهیه مواد گیاهی و پاتوژن‌ها

نمونه‌های 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 اندام‌های 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 جدول ۲ ذکر شده است.

جدول ۱- نمونه‌های گیاهی مورد مطالعه در این تحقیق و اندام مورد استفاده آنها

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

جدول ۲- پاتوژن‌های مورد مطالعه در این تحقیق و عامل بیماری ناشی از آنها

Strains	عامل بیماری	Origin
---------	-------------	--------

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 خشک شده گیاهان مذکور، جهت عملیات اسانس‌گیری استفاده شد و سپس اسانس‌های حاصله پس از رطوبت زدایی با سولفات سدیم انیدرید، در شیشه‌های تیره رنگ ریخته شد و تا زمان انجام آزمایش در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. 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 $10^8 \times 1/5$ 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 - ۰/۰۸ معادل نیم

۵- کروماتوگرافی گازی- طیف سنج جرمی (GC-MS)

آنالیز اسانس توسط دستگاه گاز کروماتوگراف متصل به طیف نگار جرمی انجام شد. از دستگاه GC/MS ۶۸۹۰ ساخت شرکت Agilent آمریکا با ستون مویینه به طول ۳۷ متر و قطر داخلی ۲۲۷ میکرومتر و ضخامت لایه داخلی ۰.۲۵ 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 مدت ۳۷ دقیقه استفاده شد. دمای اتافک 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 بازدارندگی 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 9.1 تجزیه 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 سازهیل 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

مک‌فارلند برای باکتری‌ها 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 مک‌فارلند باشند.

۴- سنجش فعالیت ضد میکروبی

به منظور ارزیابی فعالیت ضدباکتری، به روش سنجش انتشار دیسک (Disc- Diffusion assay) ابتدا ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری (با غلظت نیم مک‌فارلند) بر روی پتری دیش ۸ سانتی‌متر حاوی محیط کشت با نام عمومی NAS (Nutrient Agar Socurose) کشت داده شد سپس دیسک‌های 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 دیجیتالی 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 غلظت‌های مختلف، نشان داد که بین گونه گیاهی، غلظت‌های اسانس مورد مطالعه، نوع باکتری و اثرات متقابل دوگانه و سه‌گانه از لحاظ اثر بازدارندگی تفاوت معنی‌داری در سطح یک درصد وجود دارد (جدول ۳).

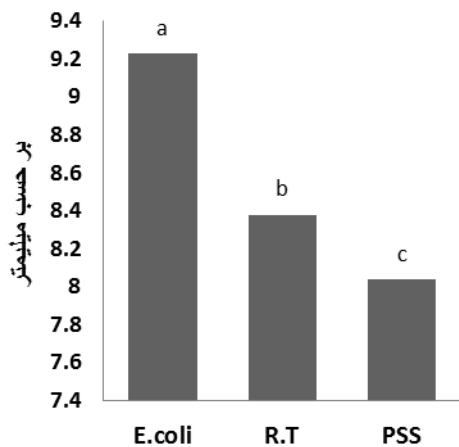
دارد (Shokrian et al; 2016). مقایسه میانگین قطر هاله در غلظت‌های مختلف نشان داد که غلظت ۱۰۰ درصد اسانس گیاهی با میانگین قطر هاله ۸/۸ میلیمتر به عنوان بهترین غلظت برای تست ضد میکروبی در این مطالعه بشمار می‌رود (نمودار ۳). با توجه به نتایج مقایسه میانگین قطر هاله ایجاد شده از اثر متقابل غلظت × باکتری می‌توان 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 می‌باشد (نمودار ۴).

بازدارندگی با میانگین قطر ۶/۱ میلیمتر می‌باشد (نمودار ۱). 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 (نمودار ۲). شکرپان 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

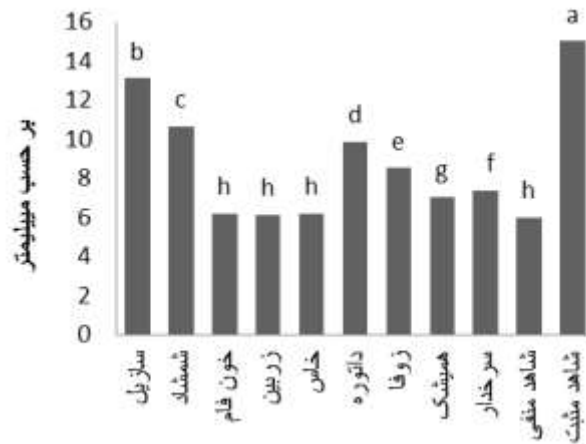
جدول ۳- تجزیه واریانس اثر ضد باکتری اسانس‌های گیاهان با غلظت‌های متفاوت بر اساس قطر هاله

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

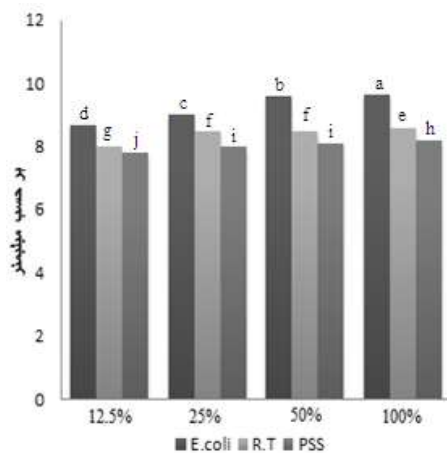
** : معنی دار در سطح احتمال یک درصد



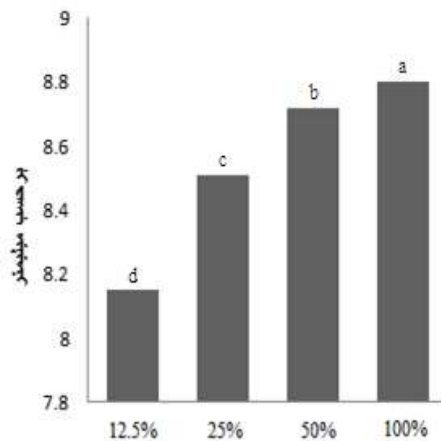
E.Coli: Escherichia coli, R.T: Rathayibacter tritici, PSS: Pseudomonas syringae. pv syringae
 نمودار ۲- میانگین قطر هاله بازدارندگی حاصل از اسانس‌های مورد مطالعه بر پاتوژن‌ها



نمودار ۱ - میانگین هاله بازدارندگی اسانس گیاهی



E.Coli: Escherichia coli, R.T: Rathayibacter tritici, PSS: Pseudomonas syringae. pv syringae
 نمودار ۴- نمودار میانگین قطر هاله ایجاد شده از اثر متقابل غلظت × باکتری



نمودار ۳- مقایسه میانگین قطر هاله‌ها در غلظت- های مختلف اسانس گیاهی

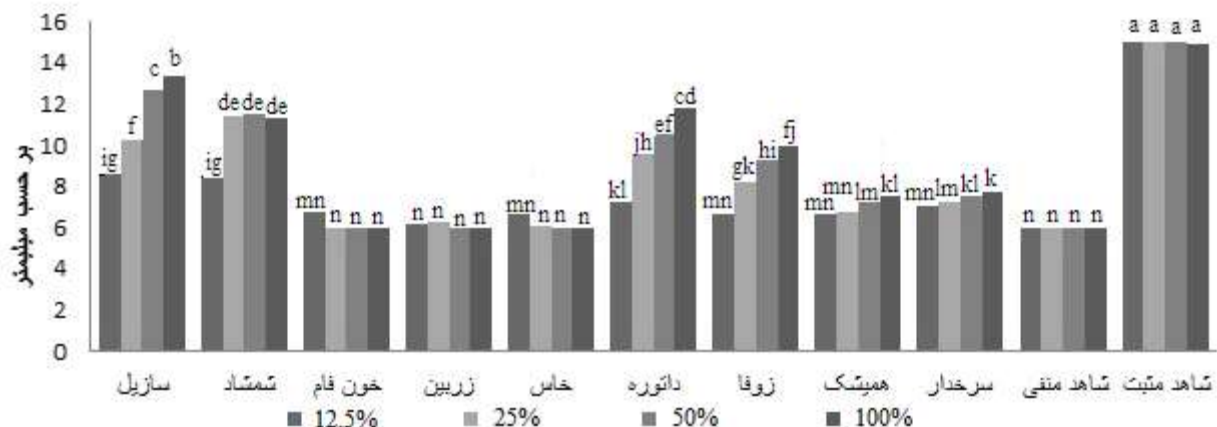
گیاهان و غلظت‌های دیگر بیشترین هاله را به خود اختصاص داده است (نمودار ۵) و همچنین مقایسه میانگین قطر هاله ایجاد شده از اثر متقابل باکتری × اسانس گیاهی نیز نشان داد که اسانس گیاه مذکور بر

با توجه به نتایج حاصل از میانگین قطر هاله ایجاد شده از اثر متقابل غلظت × اسانس گیاهی می‌توان بیان کرد که گیاه سبزیل با غلظت ۱۰۰ درصد، هاله‌ای بازدارنده با میانگین ۱۳/۳۴ میلی‌متر ایجاد کرده که در بین

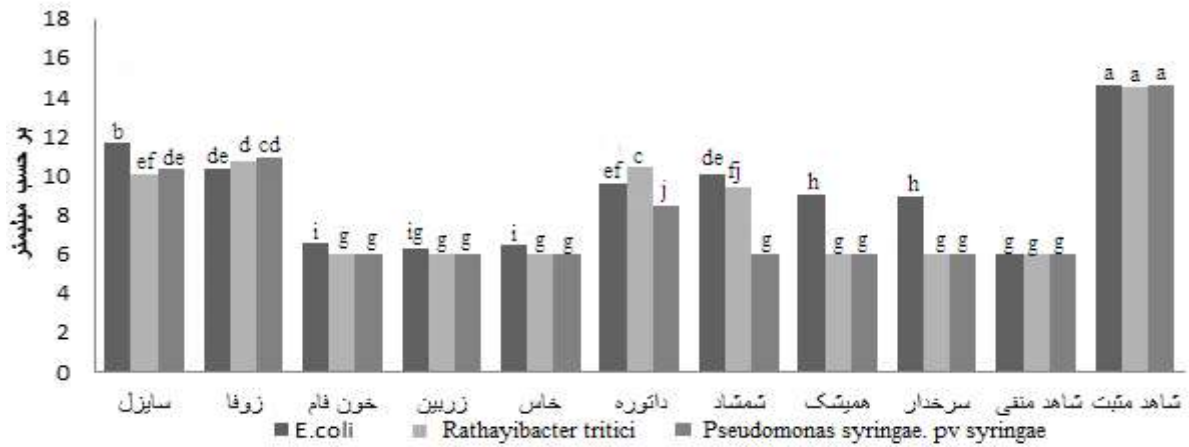
وجود دارد ولی در مورد باکتری *Rathayibacter tritici* هاله عدم رشد مشاهده نشد. همچنین قادری و همکاران در سال ۱۳۹۲ با بررسی اثر ضد باکتریای گیاه پنج انگشت علیه برخی باکتری‌های بیماریزای گیاهی دریافتند که عصاره گیاه پنج انگشت علیه سه باکتری *P.Syringae*، *X.campestris* و *R. tritici* به ترتیب میانگین قطر هاله بازدارندگی به میزان ۳۳/۱۶، ۹۴/۱۴ و ۷۹/۱۷ ایجاد کرده است (قادری و همکاران، ۱۳۹۲). دلیل تفاوت در یافته‌های 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 راه‌ها 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 می‌گیرند. گروهی دیگر نیز آنتی‌متابولیت‌ها هستند که به طور کلی جلوی تغذیه سلول را گرفته و رشدش را متوقف می‌کنند (Chouhan et al;2017).

باکتری *Escherichia coli* اثر ضد میکروبی معنی‌داری با میانگین هاله بازدارندگی ۱۱/۹۵ میلی‌متر ایجاد کرده است (نمودار ۶).

نتایج مقایسه میانگین قطر هاله بازدارندگی از اثرات متقابل سه‌گانه اسانس گیاهی × غلظت اسانس × باکتری نشان داد که بیشترین هاله بازدارندگی مربوط به پاتوزن گرم منفی با اسانس گیاه سازیل با غلظت ۱۰۰ درصد روی باکتری *E.coli* می‌باشد که میانگین قطر هاله بازدارندگی آن ۱۴/۱ میلی‌متر (نمودار ۷) و بعد از آن به ترتیب مربوط به غلظت ۱۰۰ درصد گیاه فوق بر باکتری *Rathayibacter* و *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae* *tritici* می‌باشد. طاهری و همکاران در سال ۱۳۹۲ با بررسی خاصیت آنتی‌باکتریایی عصاره گیاه دارویی به لیمو (*Lippia citriodora*) بر برخی سویه‌های باکتری گرم مثبت (*Rathayibacter tritici*) و منفی (*seudomonas syringae* pv. *Syringae*) بیان کردند که برای باکتری‌های *Escherichia coli* و *Pseudomonas syringae* pv. *syringe* خاصیت بازدارندگی عصاره به دلیل تشکیل هاله عدم رشد باکتری در اطراف دیسک کاغذی

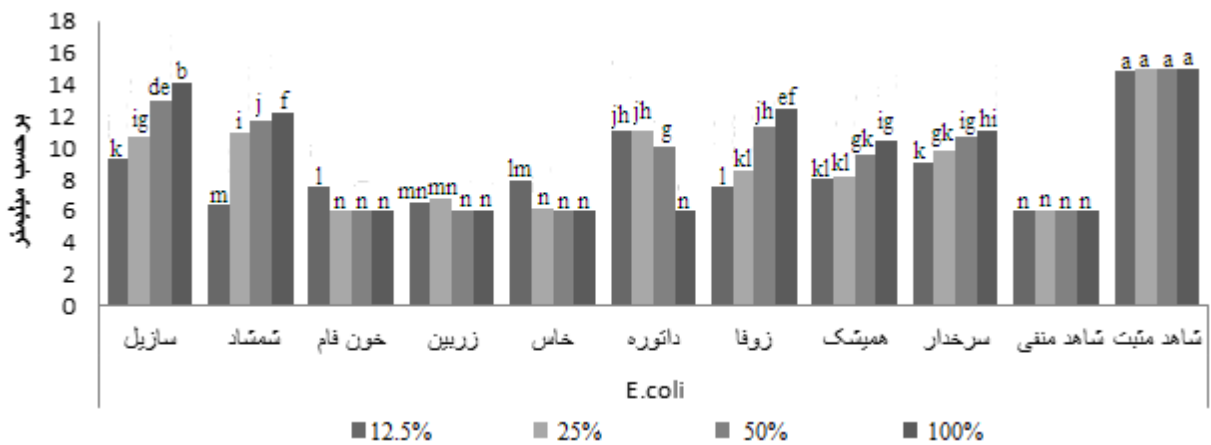


نمودار ۵- میانگین قطر هاله ایجاد شده از اثر متقابل غلظت × اسانس گیاهی

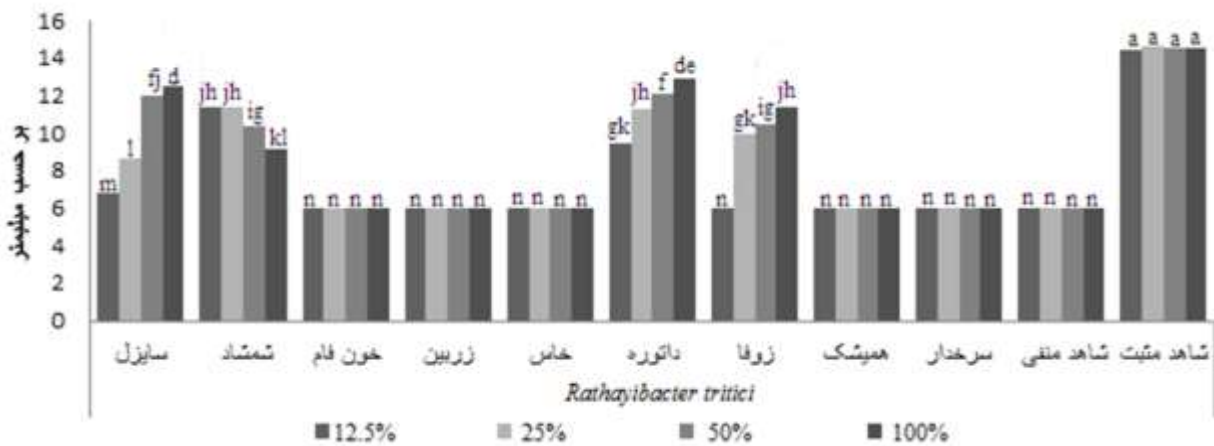


گیاهی

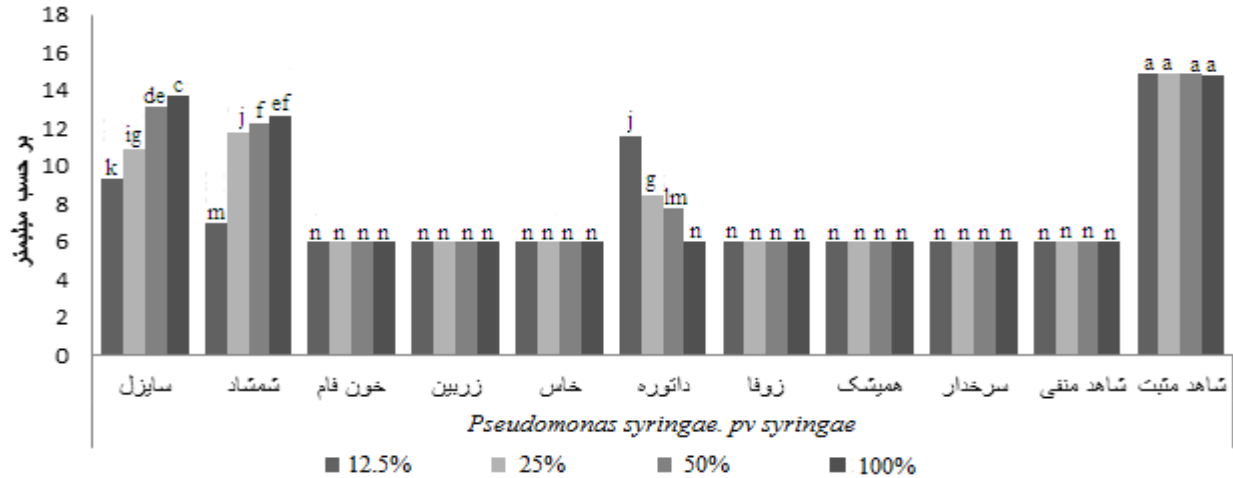
نمودار ۶- میانگین قطر هاله ایجاد شده از اثر متقابل باکتری × اسانس گیاهی



نمودار ۷- میانگین قطر هاله بازدارندگی از اثرات متقابل سه گانه اسانس گیاهی × غلظت اسانس × باکتری *E. coli*



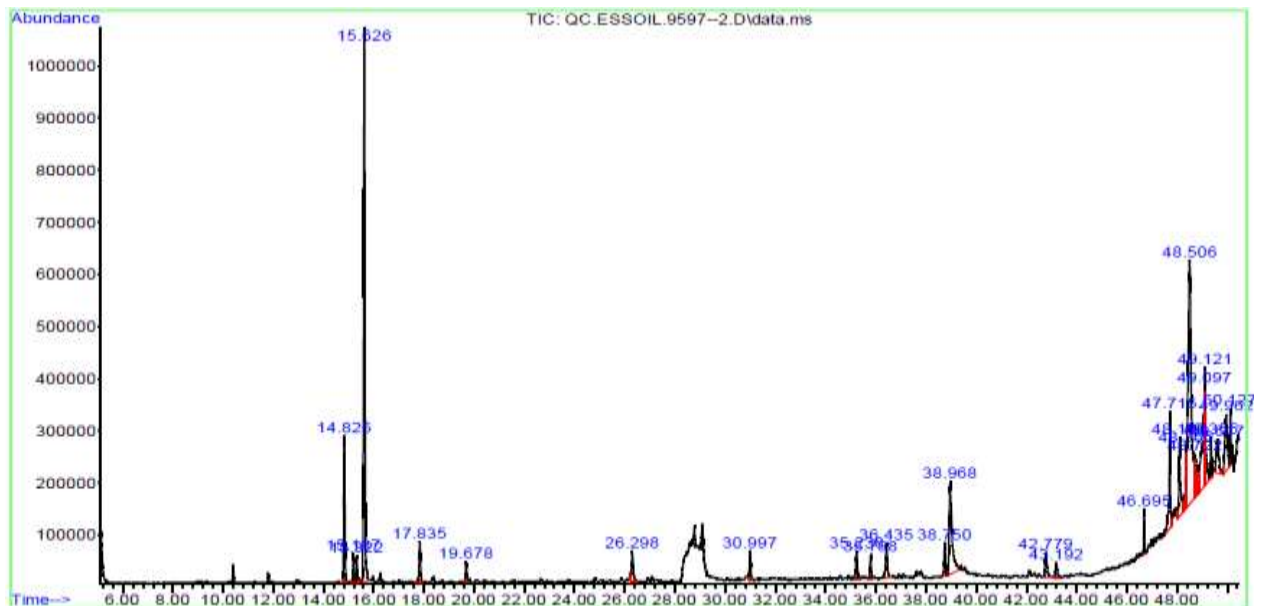
نمودار ۸- میانگین قطر هاله بازدارندگی از اثرات متقابل سه گانه عصاره گیاهی × غلظت عصاره × باکتری *Rathayibacter tritici*



نمودار ۹- میانگین قطر هاله بازدارندگی از اثرات متقابل سه‌گانه عصاره گیاهی × غلظت عصاره × باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae*

گیاه سبزی ۱۴ ترکیب شناسایی شد. فهرست اجزا موجود اسانس در جدول زیر ذکر شده است.

تجزیه کیفی و کمی اجزاء موجود در اسانس گیاه سبزی 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. نهایتاً برای



شکل ۱- تجزیه کیفی و کمی اسانس گیاه سبزی

جدول ۱۰- ترکیبات شناسایی شده از اسانس سبزی

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 ₆ H 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
Octadecamethyl-cyclononasiloxan	C ₁₈ H ₅₄ O ₉ Si 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-Ergosterol	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 Menthol, Menthone و Pulegone دارای خاصیت ضد میکروبی می‌باشند.

ضد مخمری دارد. کنترل عوامل بیماری‌زای گیاهی با استفاده از مواد گوناگون شیمیایی، و اثر نامطلوب آنها بر سلامت انسان و محیط زیست، انسان را بر آن داشت که به تولید آفت‌کش‌های طبیعی روی آورد (Rajeswari *et al*; 2012). بدین ترتیب یکی از روش‌های نوین در جهت کنترل آفات و بیماری‌های گیاهی به ویژه برای تولید محصولات ارگانیک 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 بیماری‌های گیاهی از جمله بیماری‌های قارچی، باکتریایی، ویروسی، نماتدها بسیار بارز و برجسته است. گیاهان دارویی منبع غنی از مواد ضد میکروبی می‌باشند (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 بالقوه

خاصیت ضد میکروبی اسانس گیاه نعناع توسط Sivropoulou و همکاران و Tassou و همکاران بررسی شد و نشان دادند که این خاصیت بعلت وجود منتول و کتون‌ها نظیر ایزومنتول و کاروون می‌باشند همچنین فریز و همکاران 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

۱۱ پاتوژن را داشته که نشان دهنده تایید اثر ضد میکروبی ترکیبات نام برده می‌باشد (سلطانی 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 دامنه‌داری 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 باکتریایی اسانس یک گیاه را تحت تأثیر قرار دهد، روش اسانس گیری و نوع حلال، زمان و مرحله رویشی، زیستگاه و منطقه جغرافیایی گیاه مورد استفاده می‌باشد. اسانس‌های که با روش‌ها و حلال‌های متفاوتی از یک گیاه گرفته شده، می‌توانند اثرات ضد باکتریایی متفاوتی بر روی یک باکتری خاص از خود نشان دهند. عامل دیگری که می‌تواند اثرات ضد یاکتری عصاره یا اسانس یک گیاه را تحت تأثیر قرار دهد، محیط کشت مورد استفاده جهت انجام آزمایشات ضد میکروبی می‌باشد که تفاوت در اثرات ضد میکروبی یک ماده در محیط کشت‌های گوناگون به اثبات رسیده است (Nostro et al; 2000).

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, Saïd Amzazi,

برای کنترل پاتوژن‌ها می‌باشند (Hu, 2010). مطالعه در زمینه وظایف این ترکیبات در گیاهان، یک موضوع جذاب و مهم برای بسیاری از پروژه‌های تحقیقاتی شده است و نقش‌های اکولوژیکی تعدادی از این ترکیبات مورد بررسی و تحقیق قرار گرفته است. از این رو بسیاری از کشورها با استفاده از فن‌آوری جدید تهیه و فرمولاسیون سموم غیر شیمیایی از جمله آفت‌کش‌های با پایه و منشا گیاهی مبادرت به کنترل تلفیقی بیماری‌های مهم گیاهی نموده‌اند. تقریباً ۲۰ درصد از گیاهان شناخته شده در جهان در عملیات‌های بیولوژیکی تست شده‌اند (Sufferdini et al; 2004).

گیاه سازیل دارای ترکیبات مهمی چون Menthone ، Menthol و Pulegone، می‌باشد که دارای خواص ضد میکروبی 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 ضد میکروبی روی

منابع

سلطانی، ف. شریفی، م. خواجه، خ. یوسف‌زادی، م. ۱۳۸۷. بررسی ترکیبات اسانس، فعالیت آنزیم منتون ردوکتاز و فعالیت ضد میکروبی گونه *Mentha piperita* در دو مرحله از رشد. مجله زیست‌شناسی ایران. جلد ۲۱، شماره ۵. ۶۲-۷۰.

- 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, Pfaller EJ, Tenoer M, Tenover FC, Tenover 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 of Rice under Field Condition of Bastar, Chhattisgarh. Journal of Agricultural Sciences. 2(2): 269-271
- Nostro A, Germano MP, Angelo VA, Marino A, Connatelli MA. 2000. Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. Lett Appl Microbiol. 30(5): 389-94
- Oumzil H, Ghoulemi S, Rhajaoui M, Ildrissi A, Fkih-Tetouani S, Faïd 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 microsome 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, Shokoheizadeh 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 Brazilian Amazon rainforest and Atlantic forest. *Brazilian 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 Wesolowski, 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

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

**Mojtaba Aghajani Ghara*¹, Ghorbanali Nematzadeh², Seyed Kama Kazemitabar³,
Seyed Mohamad Alavi⁴**

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