بررسی فیتوشیمیایی و اثر مهاری عصاره گیاه افسنطین (*Artemisia absinthium* L.) و ترش‌واش (*Oxalis corniculata* L.) بر روی بیمارگرهای باکتریایی گوجه‌فرنگی

The inhibitory activity and phytochemical of *Artemisia absinthium* L. and *Oxalis corniculata* L. extracts against pathogens from tomato *in vitro*

محمدرضا مجید خوش خلق پهلویانی[1*] و علیرضا مسیحا [2]

دریافت: ۱۳۹۷/۶/۲۵ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۲۵

چکیده

گیاهان ترش‌واش و افسنطین به میزان زیادی در طب فولکلور ایران استفاده می‌شوند. این مطالعه باهدف ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی و تعیین ترکیب فیتوشیمیایی برگ این دو گونه گیاهی در شمال ایران در مقابل باکتری‌های بیماری‌زای گوجه‌فرنگی در شرایط آزمایشگاهی صورت گرفت. در این بررسی فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌های آبی و متانولی برگ دو گیاه بر روی ایزوله‌های گزانتوموناس، پسودوموناس و پکتوباکتریوم با استفاده از روش‌های انتشار دیسک در آگار و ماکرودایلوشن براث به‌منظور تعیین مقادیر MIC و MBC انجام شد. نتایج نشان داد که عصاره‌های گیاهی مورد استفاده دارای فعالیت ضد باکتریایی در محدوده مهاری ۹ تا ۱۹ میلی‌متر نسبت به آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین (۲۵ میلی‌متر) بودند. مقادیر MIC و MBC بر اساس روش میکرو دایلوشن براث به ترتیب ۳۲ تا ۵۱۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و ۶۴ تا ۵۱۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر ارزیابی شد. ترکیب هر دو عصاره نشان‌دهنده حضور ساپونین، ترکیبات فنلی، آنتراکینون، تانن، فلاونوئید ها، استروئید و ترپنوییدها، آلکالوئیدها، فلوباتانین و روغن‌های فرار بود. بیشترین اثر مهاری درنتیجه فعالیت هم‌افزایی عصاره آبی ترش‌واش و متانولی افسنطین دیده شد (۱۱ تا ۱۷ میلی‌متر). با توجه به نتایج حاصل، اثرات ترکیبی دو گیاه می‌تواند به عنوان یک عامل کاربردی در تهیه فرمولاسیون داروهای گیاهی سودمند باشد.

واژگان کلیدی: افسنطین، ترش‌واش، فعالیت ضد میکروبی، هم‌افزایی

۱ و ۲- مربی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاداسلامی واحد لاهیجان، لاهیجان، ایران

نویسنده مسئول مکاتبات: Khoshkholgh@liau.ac.ir

مقدمه

توجه به سلامت تغذیه در انسان و بهبود کیفیت محصولات کشاورزی از اهمیت زیادی برخوردار است. به‌طوری‌که استفاده از سموم و سایر مواد شیمیایی به‌منظور از بین بردن آفات و عوامل بیماری‌زای گیاهی باعث می‌شود که این ترکیبات از طریق آب، خاک و هوا وارد زنجیرهٔ غذایی شده و خطر جدی برای سلامت انسان ایجاد نماید (Ramachandra and Nagarathna, 2003). کنترل آفات و بیماری‌های گیاهی، یکی از چالش‌های مهم در کشاورزی بوده و میزان خسارت بیماری‌های حاصل از عوامل میکروبی در سیستم کشاورزی بسیار زیاد است. برای مثال، خسارت ناشی از آفات، بیماری‌ها و علف‌های هرز در کشور ما حدود ۳۰ تا ۳۵ درصد برآورد گردیده است که حدود ۸ تا ۱۰ درصد آن به خسارت ناشی از بیماری‌ها اختصاص دارد. بر اساس گزارش مشترک سازمان بهداشت جهانی و برنامه محیط‌زیست سازمان ملل، سالانه حدود ۲۲۰ هزار نفر در اثر مسمومیت حاد ناشی از آفت‌کش‌ها، کشته و حدود سه میلیون نفر هم دچار مسمومیت می‌شوند. کنترل این عوامل به طور معمول متکی بر استفاده از میکروب‌کش‌های شیمیایی و استفاده از ارقام مقاوم می‌باشد. با توجه به تأثیر سوء بهداشتی و زیست محیطی سموم شیمیایی، ایجاد جهش در میان عوامل بیماری‌زا و مقاومت به سموم مختلف، ادامه روند استفاده از سموم شیمیایی را نامطمئن می‌سازد (Islam et al., 2004). بر اساس نظرسنجی سازمان جهانی بهداشت در سال ۱۳۸۳، حدود ۸۵۰۰۰ نفر در کشورهای در حال توسعه دچار مسمومیت شده و به دلیل اثرات جانبی حاصل از کاربرد سموم کشاورزی، حدود ۸۵۰۰ نفر مرده‌اند. با این حال، افزایش نگرانی عمومی دربارهٔ مسائل زیست محیطی و همچنین افزایش مقاومت باکتری‌ها به سموم شیمیایی و آنتی‌بیوتیک‌ها، منجر به ایجاد سیستم‌های مدیریت جایگزین برای کاهش ترکیبات وابسته به سموم و استفاده از ترکیبات طبیعی ضد میکروبی گیاهی برای کنترل عوامل بیماری‌زا شده است (Mahajan and Das, 2003). مواد مؤثرهٔ گیاهان دارویی نقش ویژه‌ای در کنترل عوامل میکروبی به‌ویژه باکتری‌های فیتوبیمارگر دارند. بسیاری از گیاهان به علت خواص ضد میکروبی موجود در ترکیبات حاصل از متابولیسم ثانویهٔ گیاه، مورداستفاده قرارمی‌گیرند. به عنوان مثال گونه‌های گیاه آویشن به دلیل داشتن مقادیر زیادی از مونوترپن‌های فنلی و کاهش قابل ملاحظه بر روی باکتری‌ها، ویروس‌ها و قارچ‌ها، در میان ده گیاه مهم در دنیا دارای اهمیت می‌باشد (Rasooli *et al* 2006; Bouaichi *et al*., 2015; Elshafie *et al*., 2016). اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی دارای ترکیباتی با فعالیت‌های زیستی متفاوت هستند. با مطالعاتی که تاکنون صورت گرفته است، به نظر می‌رسد که متابولیت‌های ثانویه، به‌عنوان موادی طبیعی، نقش‌های اکولوژیکی مهمی در واکنش‌های دفاعی گیاهان دارند (Cowan,1999). شناخت و بررسی نقش این متابولیت‌ها در روند کنترل و پیشگیری از بروز آفات و زیان‌های اقتصادی و پیش‌گیری از بروز مقاومت انکارناپذیر می‌باشد (Azlan *et al*., 2003). در نتیجه بررسی اثرات مهاری عصاره گیاهان دارویی و بومی مناطق جغرافیایی در مقابل عوامل بیماری‌زای گیاهی می‌تواند گام مهمی در جهت به‌کارگیری و جانشین کردن سموم شیمیایی با عصاره‌های گیاهی باشد. افسنطین *Artemisia absinthium* از خانواده Asteraceae و زیر خانواده Asteroideae و از دسته گیاهان آروماتیک بومی کشور، به‌خصوص در نواحی شمالی و شرق ایران بوده و به نام‌های خاراگوش، گندواش، مروه و افسنطین (Afsantine) و در سایر کشورها نظیر انگلستان با نام چوب کرمی شکل (Worm Wood) معروف است (Zhang *et al*., 2004). این گیاه در شمال آمریکا، شمال و شرق آسیا و آفریقا، کشورهای حوزه مدیترانه، مناطق خشک و غیر قابل کشت و در خاک‌های نرم حاوی نیتروژن زیاد رشد می‌کند (Wright, 2002). این گیاه در ایران، در اطراف شهرهای تهران، آذربایجان، خراسان و گیلان یافت می‌شود. در پزشکی سنتی ایران، از دم‌کرده این گیاه برای درمان نارسایی کبد، گلو درد، عفونت گوش خارجی، یبوست و اسهال مزمن، التیام زخم‌ها و همچنین در داروی ضد کرم و ضدعفونی‌کننده‌ها استفاده می‌شود (زرگری، ۱۳۷۶). گیاه ترش-واش با نام علمی *Oxalis corniculata* متعلق به خانواده Oxalidaceae با حدود ۵۰۰ گونه می‌باشد که در آمریکا، آفریقا، اروپا و آسیا انتشار دارد. این گیاه بانام رایج creaping wood sorrel شناخته‌شده است (Anil, 2010). ترش‌واش گیاه علفی، کوچک، یکساله با ساقه‌های خزنده، پوشیده از کرک خاکستری و دارای دمبرگ دراز می‌باشد. مناطق

رویشی این گیاه استان گیلان بین شهرهای رشت و لاهیجان و سایر نقاط مرطوب شمالی ایران و مناطقی از خوزستان می‌باشد (Rechinger, 1967). در هندوستان از این گیاه جهت درمان آفت دهان استفاده می‌شود. برگ این گیاه حاوی ترکیبات معدنی، ویتامین و اسید اگزالیک می‌باشد. همچنین اثرات ضد میکروبی این گیاه برعلیه بیمارگرهای گیاهی Xanthomonas و Pseudomonas نشان داده شده است (عظیمی، ۱۳۸۵؛ Bisset, 1994) گوجه‌فرنگی یکی از مهم‌ترین گیاهان خانواده Solanaceae که از پرمصرف‌ترین محصولات غذایی امروز مردم دنیا محسوب می‌گردد، همواره در معرض آفات و بیماری‌های متعددی قرار دارد. از این‌رو پژوهش درزمینه شناخت علائم بیماری‌های شایع این محصول گیاهی در زمین‌های زراعی، گلخانه‌ها یا باغات، پرورش این محصول از زمان کاشت تا برداشت و ذخیره‌سازی آن و تلاش در جهت بهبود کیفیت و کمیت این محصول مهم از نظر اقتصادی اهمیت زیادی دارد، به‌طوری‌که طی چند دهه اخیر، کنترل بیولوژیکی آفات گوجه‌فرنگی بدون استفاده از مواد شیمیایی مضر با هدف مدیریت و جلوگیری از شیوع و اپیدمی بیمارگرهای باکتریایی عامل فساد همواره مورد توجه بوده است (Shahidi and Karimi Nik, Copping 2004; 2004) با توجه به مطالعات پیشین، تاکنون در خصوص مهار فعالیت ضد میکروبی عصاره این دو گیاه بر روی برخی از بیمارگرهای باکتریایی شایع گوجه‌فرنگی مطالعات چندانی صورت نگرفته است، لذا نتایج این پژوهش می‌تواند در این خصوص مفید واقع گردد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری گیاه مورد مطالعه

در این مطالعه تجربی برگ‌های تازه گیاهان شامل ترش واش و افسنطین در اردیبهشت ماه سال ۱۳۹۶ از لاهیجان و مناطق شهرهای اطراف تهیه گردید.

تهیه عصاره گیاهی

گونه‌های گیاهی جمع‌آوری‌شده در این مطالعه به‌طور مناسبی جهت خشک کردن در همان روز آماده شدند. برای این منظور برگ گونه‌های گیاهی در شرایط یکسان در دمای اتاق در مکانی تاریک و تمیز خشک شده و نگه‌داری شدند. با استفاده از روش استاندارد و به کمک حلال متانولی عصاره‌گیری نمونه‌ها انجام شد. به این ترتیب که مواد گیاهی پس از خشک شدن و ریز شدن در یک خردکن برقی کاملاً خرد شده و در یک هاون چینی استریل مجدداً کوبیده شدند. مقدار ۳۰۰ گرم از پودر گیاه درون کاغذ صافی در دستگاه سوکسیله قرار گرفت. سپس به مدت سه ساعت با ۳۰ میلی‌لیتر از حلال متانول عصاره‌گیری انجام شد. در ادامه عصاره‌های متانولی تهیه شده با دستگاه روتاری در دمای ۵۰ درجه سلسیوس تغلیظ و سپس در آون و در همان دما خشک شدند. صد میلی‌گرم از پودر حاصل در یک میلی‌لیتر از حلال DMSO برای انجام آزمایش حل گردید. عصاره‌ها توسط کاغذ صافی واتمن شماره ۱ صاف‌شده و سپس نمونه‌ها در دور ۵۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و پس از برداشت قسمت رویی و قرار دادن نمونه در دمای اتاق و کاهش حجم آن به ۱/۴ مقدار اولیه خود به دنبال تبخیر در دمای یخچال در ظروف شیشه‌ای دودی تا زمان استفاده نگهداری شدند. برای تهیه عصاره آبی از روش ماسراسیون (خیساندن) استفاده گردید. بدین منظور مقدار ده گرم از پودر خشک شده دو گیاه به صد میلی‌لیتر آب مقطراستریل اضافه گردید و به مدت ۲۴ ساعت بر روی شیکر به هم زده شد. سپس نمونه توسط کاغذ صافی واتمن شماره ۲ صاف شده و به منظور حذف کامل ذرات معلق با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. بعد از حذف حلال به دلیل حساسیت زیاد عصاره‌ها به نور، حرارت و اکسیژن درب آن‌ها بسته و تا زمان انجام آزمایش در یخچال نگهداری شدند (Zolfaghari, 2010).

جداسازی بیمارگر

در این مرحله، بافت گیاهی آلوده درون هاون استریل حاوی ۳-۱ میلی‌لیتر آب مقطر استریل کوبیده شد و پس از حدود ۱۵ الی ۲۰ دقیقه بعد، رسوب با سرم فیزیولوژی استریل با رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-4} تهیه شد. ۰/۱ میلی‌لیتر از هر یک از رقت‌ها در سطح محیط کشت‌های اختصاصی شامل Nutrient-Sucrose Agar Medium (NSA) برای *Pseudomonas syringae* ، Yeast Extract Dextrose Calcium CarbonateAgar (YDC) برای *Xanthomonas campestris* و Crystal Violet Pectate Medium (CVP) برای *Pectobacterium carotovorum* کشت داده شدند و سپس پلیت‌ها در دمای ۳۵-۳۳ درجه سلسیوس انکوبه گردیده و بعد از ۵-۳ روز مورد بررسی قرار گرفتند. باکتری‌های جداشده با استفاده از روش‌های استاندارد میکروبیولوژی شناسایی شدند (Hassanein *et al*., 2009).

نگهداری و ذخیره‌سازی

پس از تهیه کشت‌های خالص از باکتری‌های ایزوله، کشت‌های مجددی بر روی محیط‌های Nutrient-Sucrose Agar Medium (NSA) برای *P. syringae*، YDC برای *X. campestris* و CVP برای *P. carotovorum* به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس صورت گرفت و سپس ۴ تا ۵ کلنی باکتریایی از باکتری‌های ایزوله که بر روی محیط Brain heart infusion agar (BHIA) کشت داده شده بودند، به ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر در لوله درپوش‌دار استریل منتقل شد. به‌طور معمول برای هر ایزوله ۲ تا ۳ لوله برای این منظور استفاده شد. لوله‌ها سپس در تاریکی و در دمای اتاق (۲۵ درجه سلسیوس) ذخیره شدند (Schaad, *et al*., 2005; Brenner 1988).

تهیه سویه‌های استاندارد

در این تحقیق از سویه‌های خالص باکتری‌های *P. caratovorum* ATCC 495، *X. campestris* ATCC 33913، *P. syringae* ATCC 13458 استفاده گردید که همگی از مرکز کلکسیون باکتری‌ها و قارچ‌ها، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران خریداری شدند. آمپول لیوفیلیزه میکروارگانیسم‌های مورد استفاده زیر هود لامینارفلو و در شرایط استریل باز شده و به محیط کشت آبگوشت مولر هینتون تلقیح شدند. پس از مدت ۲۴ تا ۷۲ ساعت انکوباسیون در ۳۵ درجه سلسیوس، برای اثبات کلنی‌های خالص کشت در محیط آگار مولر هینتون صورت گرفت.

تهیه کنترل

در روش دیسک دیفیوژن از دیسک تلقیح شده با DMSO به‌عنوان کنترل منفی و از دیسک تلقیح شده با سولفات استرپتومایسین (1.0 mg/mL) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

بررسی اولیه فیتوشیمیایی

غربالگری فیتوشیمیایی کیفی اولیه عصاره‌های خام عبارت بودند از: روش مولیش به منظور بررسی کربوهیدرات‌ها، تست ایجاد کف برای ساپونین‌ها، تست ژلاتین برای تانن‌ها، تست شینودا برای تشخیص فلاوونوییدها، معرف واگنر برای آلکالوییدها، معرف نین هایدرین به‌جهت بررسی پروتئین و اسیدهای آمینه، روش لیبرمن برای شناسایی استرول و استرورییدها، تست فهلینگ برای قندهای احیاکننده، تعیین محتوی تام فنلی با استفاده از معرف فولین-سیوکالتو و محتوی تام فلاونوئیدی با معرف کلرید آلومینیوم، تست‌های کلروفرم و لگال برای گلیکوزیدها، فلوباتانین با جوشاندن در اسید کلریدریک ۱ درصد و تشکیل رسوب قرمز رنگ، واکنش با محلول سرب ۱۰٪ برای ساپونین‌های تری ترپنوییدی، آنتراکینون ترکیبی با تست اسید کلریدریک ۱۰ درصد یا بنتراگر و روغن‌های فرار با روش کلاوینجر (Trease and Evans, 1989; Harborne, 1984).

بررسی اثر ضد میکروبی عصاره‌ها به روش انتشار دیسک در آگار

جهت فعال‌سازی و ارزیابی فعالیت ضد میکروبی ابتدا سوسپانسیون میکروبی به‌صورت تازه از هر سوش میکروبی تهیه گردید. به‌طوری‌که ۲۴ ساعت قبل از انجام آزمایش، به کمک لوپ استریل از کشت ذخیره به محیط کشت شیب‌دار آگار مولر هینتون تلقیح شد. سوسپانسیون میکروبی موجود با استفاده از محلولDMSO رقیق گردید تا کدورت استاندارد ۰/۵ مک فارلند معادل با یک سوسپانسیون باکتری حاوی $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ CFU/ml ایجاد گردد (علیزاده بهبهانی و همکاران، ۱۳۹۳). سپس نمونه‌های میکروبی توسط سوآب های استریل بر روی سطح پلیت محیط آگار مولر هینتون کشت داده شدند، طوری که اطمینان حاصل گردد تمام سطح پلیت به‌طور یکدست با باکتری‌ها تلقیح شده است. سپس به دیسک‌های بلانک استریل به قطر ۶ میلی‌لیتر ۸۰ میکرو لیتر از عصاره‌ها آغشته شد و توسط پنس استریل بر روی پلیت‌های تهیه شده قرار گرفت و به مدت ۲۴ تا ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شد. پس از طی این مدت پلیت‌ها مورد بررسی قرار گرفتند و هاله‌های عدم رشد مشاهده شده در اطراف دیسک‌ها برحسب میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد. با توجه به قطر هاله‌های مهار رشد، میزان فعالیت ضد میکروبی عصاره‌ها به‌طور نیمه کمی ارزیابی شد. نتیجه در صورت حضور هاله مهاری رشد= ۱۰-۸ میلی‌متر= ضعیف، ۱۴-۱۱ میلی‌متر= متوسط ۲۴-۱۵ میلی‌متر= خوب، ۲۵≤ میلی‌لیتر = قوی ثبت گردید.

تعیین MIC

به‌منظور تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد از روش ماکرودایلوشن بر اساس دستورالعمل مؤسسه استانداردهای آزمایشگاهی بالینی (CLSI;M07-A) استفاده شد. در این مطالعه از آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین به‌عنوان شاهد مثبت استفاده شد. برای تعیین MIC برای هر عصاره از یک سری هفت‌تایی (رقت‌های متوالی بر مبنای دو) از عصاره حل‌شده در DMSO (۱۰٪w/v) لوله‌آزمایش استریل استفاده شد. لوله شاهد مثبت حاوی سوسپانسیون میکروبی و محیط مولرهینتون براث و لوله شاهد منفی حاوی سوسپانسیون میکروبی و آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین بود. سپس به هر لوله یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتریایی (نمونه‌های ایزوله و سویه‌های استاندارد) معادل استاندارد نیم مک فارلند ریخته شد ولوله‌ها شماره‌گذاری شدند. بلافاصله پس از کشت تمام لوله‌های آزمایش به مدت ۲۴ ساعت دردمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند. پس از انکوباسیون، کدورت حاصل از رشد باکتری‌های تلقیح شده در لوله‌ها به طور چشمی مورد بررسی قرار گرفت. پایین‌ترین غلظتی که در آن کدورتی مشاهده نگردید و کاملاً شفاف بود (در مقایسه با ردیف شاهد) به‌عنوان MIC در نظر گرفته شد.

تعیین میزان MBC

برای تعیین مقدار MBC از رقت آبگوشت لوله‌های MIC استفاده شد. به تعداد لوله‌های فاقد رشد آشکار، کشت مجدد در محیط‌های آگار فاقد عامل ضد میکروبی انجام گردید. بعد از انکوباسیون ۷۲-۱۸ ساعت از رقت‌های آبگوشت مورد نظر، کمترین غلظتی از عصاره که همراه با رشد کلنی در بستر آگار بود، به‌عنوان MBC ثبت گردید (Qaiyami, 2007; CLSI, 2011; NCCLS, 2007).

نتایج

غربالگری اولیه فیتوشیمیایی

غربالگری فیتوشیمیایی اولیه جهت تعیین ترکیبات فعال بیولوژیک برای عصاره‌های آبی و متانولی برگ دو گیاه ترش‌واش و افسنتین انجام گردید. نتایج این تحقیق حضور ترکیبات فیتوشیمیایی را نشان داد که می‌تواند ارزش این گیاه را از لحاظ علمی در کنترل فیتوبیمارگرهای شایع گوجه‌فرنگی توضیح دهد (جدول ۱). بر اساس این جدول، ترکیبات فیتوشیمیایی گیاه ترش‌واش شامل ترکیبات فنلی، آلکالوئید، فلاونوئید، آنتراکینون، فلوباتانین، روغن‌های فرار،

پروتئین، اسیدهای آمینه، کربوهیدرات‌ها، گلیکوزیدها و ترپنوئید بود. ترکیبات ساپونین و آنتراکینون در عصاره متانولی و آبی وجود نداشت و عصاره آبی این گیاه فاقد استروئید و تری ترپنوئید بود. آزمون‌های غربالگری فیتوشیمیایی در گیاه افسطنتین حاکی از حضور ترکیبات فنلی، گلیکوزید ها، پروتئین، تانن، ساپونین، استروئید، اسیدهای آمینه، فلاونوئید، قندهای احیاکننده و کربوهیدرات‌ها در هر دو نوع عصاره بود؛ اما ترکیبات آلکالوئید، فلوبوتانین و روغن فرار در هیچ‌کدام از عصاره‌ها وجود نداشت. لذا تری ترپنوئید در عصاره آبی این دو گیاه وجود نداشت.

جدول ۱- نتایج حاصل از غربالگری فیتو شیمیایی برگ گیاهان ترش‌واش و افسنطین

Table 1. Phytochemical analysis of leaves extracts of *Oxalis corniculata* and *Artemisia absinthium*

افسنطین *Artemisia absinthium*		ترش‌واش *Oxalis corniculata*		Test	روش آزمون	Plant type	نوع گیاه
آبی Aquatic	متانولی Methanolic	آبی Aquatic	متانولی Methanolic			Constituents	ترکیب عصاره
+	+	–	+	Libermann Test	آزمون لیبرمن	steroid	استروئید
–	+	–	+	Salkowski's Test	واکنش با معرف سالکوفسکی	Triterpenoids	تری ترپنوئید
+	+	+	+	Fehling's Test	تست فهلینگ	Regenerative sugar	قند احیاکننده
–	–	+	+	Wagner's Test	آزمون واگنر	Alkaloids	آلکالوئید
+	+	+	+	*Folin–Ciocalteu* reagent	معرف فولین- سیوکالتو	Phenolic compounds	ترکیبات فنلی
+	+	+	+	Gelatin Test	تست ژلاتین	Tannins	تانن
+	+	–	–	Froth test	تست ایجاد کف	Saponin	ساپونین
+	+	+	+	Molisch Test	مولیش	Carbohydrate	کربوهیدرات
+	+	+	+	Ammonia test	معرف کلرید آلومینیوم	Flavonoids	فلاونوئید
+	+	+	+	Ninhydrin Test	معرف نین هایدرین	Amino acid	آمینواسید
–	–	+	+	*Clevenger*-type *apparatus*	روش کلاوینجر	Volatile oil	روغن فرار
+	+	+	+	Biuret Reagent	معرف بیوره	Protein	پروتئین
+	+	–	–	Borntrager's test	تست اسید بنتراگر	Anthraquinone	آنتراکینون
–	–	+	+	HCl test۱٪	جوشاندن در اسیدکلریدریک ۱٪	Fluvobanin	فلوباتانین
+	+	+	+	Legal test	تست لگال	Glycosides	گلیکوزید

مطابق با جدول ۲ بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره گیاه ترش‌واش به روش انتشار دیسک در آگار نشان داد که قطر منطقه مهاری رشد برای عصاره‌های آبی و متانولی به ترتیب برای سویه‌های استاندارد و فیتوپاتوژن ایزوله بین ۹ تا ۱۶ میلی متر و ۱۱ تا ۱۶ میلی‌متر می‌باشد که این مقدار برای کنترل استرپتومایسین برای سویه‌ها و ایزوله‌های پاتوژن یکسان و معادل ۲۵ میلی‌متر بوده است. این مقادیر برای عصاره آبی و متانولی گیاه افسنطین مطابق با جدول شماره ۳ به ترتیب برای سویه استاندارد و جدایه های فیتوپاتوژن بین ۱۱/۵ تا ۱۹ میلی‌متر و ۹ تا ۱۵ میلی‌متر می‌باشد.

جدول ۲- فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌های برگ گیاه ترش‌واش (میلی‌متر)

Table 2. Antibacterial activity of methanolic and aquatic extracts of *Oxalis corniculata* (mm)

میکروارگانیسم Microorganism	Extract Fraction				نوع عصاره	
	Methanolic	متانولی	Aquatic	آبی	Control	شاهد
*Pectobacterium sp.**	9		12		25	
X. campestris	10		16		25	
P. syringae	12.5		10		25	
*P. carotovorum***	11		16		25	
X. campestris	12		15		25	
P. syringae	13		11		25	

C: Streptomycin; *: Bacterial isolate; * *: Standard strain

جدول ۳- فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌های برگ گیاه افسنطین (میلی‌متر)

Table 3. Antibacterial activity of methanolic and aquatic extracts of *Artemisia absinthium* (mm)

میکروارگانیسم Microorganism	Extract Fraction				نوع عصاره	
	Methanolic	متانولی	Aquatic	آبی	Control	شاهد
*Pectobacterium sp.**	11		9		25	
X. campestris	13		11		25	
P. syringae	15		12		25	
*P. carotovorum***	16		11.5		25	
X. campestris	18		14.5		25	
P. syringae	19		16		25	

C: Streptomycin; *: Bacterial isolate; * *: Standard strain

جدول شماره ۴ نشان داد که اثرات هم‌افزایی ترکیب عصاره آبی ترش واش و متانولی افسنطین قابل توجه بوده و در محدوده مهاری بین ۱۳ تا ۱۸ میلی‌متر در مقایسه با کنترل بوده است. بهترین میزان MIC برای عصاره‌های متانولی و آبی گیاهان تحت بررسی در مقابل سویه‌های پاتوژن و استاندارد به ترتیب بین ۳۲ تا ۲۵۶ و ۳۲ تا ۱۲۸ میکروگرم در میلی‌لیتر بوده است. در حالی‌که میزان MIC برای استرپتومایسین در هر حالت یکسان و معادل ۱۶ میکروگرم در میلی‌لیتر بود (جدول شماره ۵).

جدول ۴- اثرات سینرژیسمی عصاره‌های برگ گیاه ترش‌واش و افسنطین (بر حسب میلی‌متر)

Table 4. Synergistic effect of leaves extracts of *Oxalis corniculata* and *Artemisia absinthium*

میکروارگانیسم Microorganism	Parameters		متغیرها	
	Synergistic	برهم‌کنش	نتیجه	شاهد
Pectobacterium sp[1]	*OW*** + *AM**		13	25
X.campestris	*OW* + *AM*		17	25
P. syringae	*OW* + *AM*		11	25
P.carotovorum[2]	*OW* + *AM*		16	25
X.campestris	*OW* + *AM*		18	25
P. syringae	*OW* + *AM*		14	25

1: Bacterial isolate; 2: Standard strain; 3: Streptomycin

جدول ۵- حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره‌های متانولی و آبی گیاهان تحت بررسی (بر حسب میکروگرم در میلی‌لیتر)

Table 5. The MIC values (*µg*/ml) of *Oxalis corniculata* and *Artemisia absinthium* methanolic and aquatic extracts against selected bacteria

میکروارگانیسم Microorganism	افسنطین *Artemisia absinthium*		ترش‌واش *Oxalis corniculata*	
	آبی Aquatic	متانولی Methanolic	آبی Aquatic	متانولی Methanolic
Pectobacterium sp[1]	128	64	64	64
X. campestris	256	128	256	32
P. syringae	512	128	128	256
P. carotovorum[2]	256	64	64	32
X. campestris	256	64	128	64
P. syringae	256	64	32	128
Streptomycin[3]	16	16	16	16

1: Bacterial isolate; 2: Standard strain; 3: Control

جدول شماره ۶ نشان داد که بهترین میزان MBC برای عصاره‌های متانولی و آبی گیاه ترش‌واش علیه سویه‌های پاتوژن و استاندارد به ترتیب بین ۶۴ تا ۵۱۲ و ۳۲ تا ۲۵۶ و برای گیاه افسنطین به ترتیب بر علیه سویه‌های پاتوژن و استاندارد بین ۱۲۸ تا بیش از ۵۱۲ میکروگرم در میلی‌لیتر و ۲۵۶ تا ۵۱۲ میکروگرم در میلی‌لیتر و برای عصاره‌های متانولی و آبی در مقایسه با کنترل (۳۲ میکروگرم در میلی‌لیتر) بود.

جدول ۶- حداقل غلظت کشندگی عصاره‌های متانولی و آبی گیاهان تحت بررسی (بر حسب میکروگرم در میلی‌لیتر)

Table 6.The MBC values (*µg*/ml) of *Oxalis corniculata* and *Artemisia absinthium* methanolic and aquatic extracts against selected bacteria

میکروارگانیسم Microorganism	افسنطین *Artemisia absinthium*		ترش‌واش *Oxalis corniculata*	
	آبی Aquatic	متانولی Methanolic	آبی Aquatic	متانولی Methanolic
Pectobacterium sp[1]	256	128	128	64
X. campestris	512	256	512	128
P. syringae	>512	256	512	512
P. carotovorum[2]	512	256	64	32
X. campestris	512	256	256	128
P. syringae	512	256	256	64
Streptomycin[3]	32	32	32	32

1: Bacterial isolate; 2: Standard strain; 3: Control

بحث

یافته‌های به‌دست آمده در پژوهش حاضر بر اساس روش انتشار دیسک در آگار و ماکرودیلوشن براث نشان داد که فعالیت ضد میکروبی عصاره آبی گیاه ترش‌واش نسبت به اجزاء متانولی اثر مهارکنندگی قابل قبولی بـرای مدیریت سویه *Xanthomonas* دارد. این یافته‌ها با نتایج حاصله از آزمون ماکرودایلوشن براث تأیید گردید به‌طوری‌که طیف MIC عصاره آبی گیاه ترش‌واش به ترتیب در مقابل تمامی سویه‌های ایزوله و استاندارد برابر با ۳۲ تا ۲۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. در مطالعه فرناندز و همکاران (۲۰۰۸) بر روی فعالیت ضد میکروبی گیاهان دارویی درخت بهشت، کاجوپوت و افسنطین نشان داده شد که غلظت مهار (IC50) عصاره اتانولی افسنطین در ارتباط با استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیا کلی، کاندیدا آلبیکـنس و میکروسـپوروم کنیس بیـشتر از ۶۴ میکـروگرم در میلی‌لیتر بود (Fernández-Calienes Valdés *et al*., 2008). سنگولا و همکاران در مطالعه‌ای با استفاده از روش انتشار دیسک نشان دادند که اثر مهاری عصاره متانولی گیاه افسنطین بر روی باکتری‌ها و قارچ‌های مورد مطالعه بسیار بیشتر از عصاره آبی آن بوده و اثر آن بر قارچ‌ها نیز کمتر از باکتری‌ها بوده است. این مطالعه نشان داد که اثربخشی عصاره متانولی اندام‌های فوقانی گیاه افسنطین در مقایسه با عصاره آبی آن بر روی سویه‌های استاندارد گونه‌های باسیلوس، استافیلوکوکوس، پسودوموناس و استرپتوکوکوس ترموفیلوس در مقایسه با شاهد از بیشترین مقدار و علیه قارچ‌های پنی سیلیوم و تریکوتریشیوم از کمترین مقدار برخوردار بوده است (Sengula *et al*., 2011). در تمام مطالعات صورت گرفته به‌جز مطالعه فرناندز، ارزیابی اثر ضد میکروبی به روش انتشار دیسک انجام شده است درحالی‌که روش انتشار دیسک یک روش غربالگری برای تعیین حساسیت میکروارگانیسم‌ها نسبت به مواد بازدارنده می‌باشد و از آنجا که این روش تحت تأثیر میزان و سرعت انتشار مواد بازدارنده در محیط کشت قرار دارد، برای اندازه‌گیری دقیق فعالیت ضد میکروبی مناسب نیست (Almedia *et al*., 2006). از طرفی استفاده از روش‌های ارزیابی مختلف در تحقیقات مختلف، ممکن است به مشاهده یافته های متفاوت در اندازه‌گیری میزان اثر بازدارنده بی‌انجامد (Singh et al., 2005). علیرغم تفاوت گونه‌ای

ارگانیسم مورد آزمایش نتایج حاصل از این مطالعه و تحقیق اشـاره شده تا حدی با یکدیگر هم‌خوانی دارد. در مطالعه da Silva و همکاران طیف گسترده‌ای از اثرات مهاری عصاره‌های آبی ۱۲ گونه گیاهی علیه چهار باکتری فیتوبیمارگر از جـمله *Xanthomonas campestris* pv. Campestris. و *Anadenanthera colubrina* var. Cebil نـشـان داده شـد (da Silva et al, 2016). در بررسی اثرات سینرژیستیک عصاره آبی گیاه ترش‌واش و عصاره متانولی گیاه افسنطین (۱/۱) تفاوت قابل‌ملاحظه‌ای در مهار ایزوله‌ها دیده نشد. در این رابطه نیز اجزای فعال موجود در گیاهان متأثر از چند نوع فاکتور می‌باشد که می‌توان به سن گیاه، نوع حلال مورد استفاده، روش استخراج و زمان برداشت محصول گیاهی اشاره کرد (Okigbo and Ajalie, 2005; Okigbo et al, 2005; Amadioha and Obi,1999; Qasem, and Abu-Blan,1996). غربالگری فیتوشیمیایی وجود ترکیب‌های ثانویه مانند تانن، کربوهیدرات، ترکیبات فنلی، گلیکوزید و فلاونوئید را در عصاره حاصل از هر دو گیاه را تائید کرد که از این نظر با نتایج حاصل از مطالعه Srikanth و همکاران همخوانی دارد. این محققین در بررسی فیتوشمیایی عصاره‌های متانولی و اتانولی گیاه ترش‌واش حضور کربوهیدرات، گلیکوزیدها، تـرکیـبات فنلن، فلاونوئـیدها، پروتئیـن‌ها، اسیدهای آمینه و روغن‌هـای فـرار را تـــائید کردند (Srikanth *et al*., 2012). بررسی‌های kapoor و همکاران (۲۰۱۵) و Kumar و همکاران (۲۰۱۲) درزمینه فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های گیاهان علفی مختلف از جمله گیاه ترش‌واش، حضور متابولیت‌های ثانویه شامل آلکالوئیدها، استروئیدها، تانن‌ها و ترکیبات فنلی را در این گیاه نشان داد (Kapoor *et al*., 2015; Kumar *et al*., 2012). همچنین Javed و همکاران (۲۰۱۲) و Kumar و همکاران (۲۰۱۳) در بررسی پارامترهای فیزیکوشیمیایی و غربالگری اولیه فیتوشیمیایی گیاه افسنطین وجود فلاونوئیدها، پروتئین‌ها، کربوهیدرات، گلیکوزید، ساپونین، ترکیبات فنلی و تانن‌ها را در عصاره متانولی و هگزان را در این گیاه نشان دادند که از این نظر با نتایج مطالعه حاضر همخوانی داشت (Javed *et al*., 2012; Kumar Ashok and Upadhyaya, 2013). مشخص‌شده است که گونه‌های گزانتوموناس قادرند از طریق بذر بیماری را انتقال دهند لذا یکی از کاربردهای مهم استفاده از عصاره‌های گیاهی می‌تواند عملکرد بازدارندگی آن‌ها در ارتباط با بذر باشد. بر همین اساس مطالعات بیشتری در جهت غربالگری اثرات مهاری عصاره‌ها برای حفاظت بذور غلات مختلف موردنیاز است. متأسفانه غالب مطالعات بر روی اثربخشی ضد میکروبی این‌گونه گیاه با استفاده از عصاره‌های تهیه‌شده از قسمت‌های مختلف گیاه و به خصوص درزمینه مطالعات دارویی و بالینی معطوف شده است. لذا لازم است جهت بسط روش‌های مؤثرتر و کنترل بیماری‌های گیاهی شامل گیاه محبوب گوجه‌فرنگی تحقیقات دامنه‌داری صورت گیرد.

نتیجه گیری کلی

مطالعات پیشین و نتایج همین تحقیق نشان داده است که اثربخشی ضد میکروبی عصاره‌های گیاهی به فاکتورهایی نظیر ماده گیاهی مورد استفاده، روش به‌کار رفته، محیط رشد و مهم‌تر از همه میکروارگانیسم مورد آزمایش بستگی دارد و بنابراین عصاره‌های مختلف گیاهان با نتایج متفاوتی همراه بوده است. لذا لازم است برای حصول بهترین نتایج، فرآیند استخراج، نوع حلال و سایر شرایط بهینه گردد. از آنجایی که در این مطالعه اثربخشی ضد باکتریایی عصاره‌های آبی و متانولی دو گیاه ترش‌واش و افسنطین به تنهایی و در ترکیب با هم در مهار ایزوله‌های بیمارگر گیاهی قابل‌توجه بوده است، به دست آوردن اطلاعات جزئی‌تر از طریق غربالگری فیتوشیمیایی و ارزیابی فعالیت‌های بیولوژیک این دو گیاه می‌تواند در آینده منجر به کنترل فیتوپاتوژن های باکتریایی شایع در گیاه گوجه‌فرنگی گردد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از همکاری پرسنل محترم میکروبیولوژی، دانشکده کشاورزی و حوزه پژوهشی و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان جهت حمایت مالی تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع **References**

علیزاده بهبهانی، ب.، طباطبایی یزدی، ف.، شهیدی، ف.، محبی، م. و زنگانه، ح. ۱۳۹۳. بررسی اثر بازدارندگی عصاره‌های آبی و اتانولی برگ گیاه حرا (*Avicennia marina*) بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی در شرایط آزمایشگاهی. مجله علوم پزشکی صدرا ۲(۲): ۱۲۳-۱۳۴.

عطایی عظیمی، ع.، دلنواز هاشملویان، ب. و منصور غنایی، ع. ۱۳۸۵. اثر ضد قارچی عصاره‌های آبی، الکلی و فنلی دانه و برگ سورگوم بیکالر *Sorghum bicolor* (L.) Moench بر فوزاریوم سولانی و فوزاریوم پوآ. فصلنامه گیاهان دارویی ۱(۶): ۲۶-۳۲.

زرگری، ع. ۱۳۷۶. گیاهان دارویی، جلد۳، انتشارات دانشگاه تهران، تهران، ۹۳۰ صفحه.

Almedia, A. A. P., Farah, A., Silva, D. A. M., Nunan, E. A. and Beatriz, M. A. G. 2006. Antibacterial activity of coffee extracts and selected coffee chemical compounds against Enterobacteria. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54: 8738 -8743.

Anil, K., Kuntal Das, K., Manan, J. and Nishith, M. 2010. *Oxalis corniculata* Linn. The Plant of Indian subtropics. Herbal Tech Industry 7-11

Amadioha, A. C. and Obi, V. I. 1999. Control of Anthracnose disease of cowpea by Cymbopogoncitratusand *Ocimum gratissimum*. Acta Phytopathology and Entomology of Hungerica 34 (1-2): 85-89.

Azlan, G. J., Marziah, M., Radzali, M. and Johari, R. 2003. Accumulation of physalin in cell and tissues of *Physalis minima* L. III WOCAMP Congress on Medicinal and Aromatic Plants 676: 53–59.

Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley, J. T. and Garrity, G. M. 2005. Bergey's manual of systematic bacteriology (The Proteobacteria) part B (The Gammaproteobacteria), Vol 2. Springer, New York, 1203pp.

Bouaichi, A., Benkirane, R., Habbadi, K., Benbouazza, A. and Achbani, E. H. 2015. Antibacterial activities of the essential oils from medicinal plants against the growth of *Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi* causal agent of olive knot. Journal of Agriculture and Veterinary Sciences 8(12): 41-45.

da Silva, C. M. A., da Silva Costa, B. M., da Silva, A. G., de Souza, E. B., da Silva, M. V., da Silva, M. T. S. C., Anna, P. S. and de Menezes, L. V. L. 2016. Antimicrobial activity of several Brazilian medicinal plants against phytopathogenic bacteria. African Journal of Microbiology Research 10 (17): 578-583.

Copping, L. G. 2004. The World Manual of Bio Control Agents, 3d ed. British Crop Protection Council, Alton. 702 pp.

Cowan, M. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews 12(4): 564-582.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Twenty-First Informational Supplement. 2011. CLSI document M100-S21. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa, USA.

Elshafie, H. S., Sakr, S., Mang, S. M., Belviso, S., De Feo, V. and Camele, I. 2016. Antimicrobial activity and chemical composition of three essential oils extracted from Mediterranean aromatic plants. Journal of Medicinal Food 19(11): 1096-103.

Fernández-Calienes Valdés, A., Martínez, J. M., Lizama, R. S. Vermeersch, M., Cos, P. and Maes, L. 2008. In vitro anti-microbial activity of the Cuban medicinal plants Simaroubaglauca DC, *Melaleuca leucadendron* L. and *Artemisia absinthium* L. The Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 103 (6): 615 - 618.

Hassanein, W. A., Awny, N. M., El-Mougith, A. A. and Salah El-Dien, H. 2009. Characterization and Antagonistic Activities of Metabolite Produced by *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Applied Sciences Research 5 (4): 392-403.

Harborne, J. B. 1984. Phytochemical methods, 2nd ed. Chapman and Hall publications, London, Newyork. 288 pp.

Javed, A., Mir Showkat, R. and Naguvi, K. J. 2012. Preliminary Pharmacognostical Standardization of Aerial Parts of *Artemisia absinthium* LINN. International Research Journal of Pharmacy 3(1): 217-219.

Kapoor, A., Kaur, G. and Kaur, R. 2015. Antimicrobial activity of Different Herbal Plants Extracts: A Review. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 4(7): 422-459.

Kumar, A., Sapna Rani, N. and Sagwal, S. 2012. An Absolute Review on *Oxalis corniculata* Linn. International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences 3 (3): 1173-1188.

Kumar Ashok, P. and Upadhyaya, K. 2013. Preliminary Phytochemical Screening and Physico-Chemical Parameters of *Artemisia absinthium* and *Artemisia annua*. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 1(6): 229-235.

Islam, M. R., Hossain, M. K., Bahar, M. H. and Ali, M. R. 2004. Identification of the causal agent of leaf spot of betel nut, an in vitro evaluation of fungicides and plant extracts against it. Pakistan Journal of Biological Sciences 7: 1758-1761.

Mahajan, A. and Das, S. 2003. Plants and microbes-Potential source of pesticide for future use. Pesticides Information 28(4): 33-8.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) 2007. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Seventeenth informational supplement. NCCLS document M100-S17, Wayne, PA: Number1.

Singh, G., Marimuthu, P., Heluani, C. S. and Catalan, C. 2005. Chemical constituents and antimicrobial and antioxidant potentials of essential oil and acetone extract of Nigella sativa seeds Journal of the Science of Food and Agriculture 85: 2297-2306.

Okigbo, R. N. and Ajalie, A. N. 2005. Inhibition of some human pathogens with tropical plants extracts *Chromolinae naodorata* and *Citrus aurantifolia* and some antibiotics. International Journal of Molecular Medicine and Advance Sciences 1(1): 34-40.

Okigbo, R. N., Mbajuka, C. and Njoku, C. O. 2005. Antimicrobial potential of (UDA) *Xylopi aaethopica* and *Ocimum gratissimumL*. on some pathogens of man. International Journal of Molecular Medicine and Advance Sciences 1(4): 392 –397.

Qaiyami, S. 2007. Macro- and Microdilution methods of antimicrobial susceptibility Testing. Pp: 75-81. In: Schwalbe, R., Steele-Moore, L. and Goodwin, A. C. (eds.) Antimicrobial susceptibility testing protocols. Taylor & Francis Group, CRC press, Boca Raton London, New York, USA.

Qasem, J. R. and Abu-Blan, H. A. 1996. Fungicidal activity of some common weed extracts against different plant pathogenic fungi. Journal of Phytopathology 144: 157-161.

Rasooli, I., Rezaei, M. B. and Allameh, A. 2006. Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from *Thymus eriocalyx* and *Thymus x-porlock*. Food Control 17(5): 359-64.

Ramachandra, T. V. and Nagarathna, A. V. 2003. Eco-degradation, biodiversity and health. Book Reviews. Current Science 85(9): 1368-1369.

Rechinger, K. H. 1967. Oxalidaceae. In: Rechinger, K. H. (ed.) Flora Iranica, no. 40.–Graz

Sengula, M., Ercislib, S., Yildizb, H., Gungorc, N., Kavaza, A. and Çetina, B. 2011. Antioxidant, Antimicrobial Activity and Total Phenolic Content within the Aerial Parts of *Artemisia absinthium*, *Artemisia santonicum* and *Saponaria officinalis*. Iranian Journal of Pharmaceutical Research. 10(1): 49- 56.

Schaad, N. W. 1988. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. APS Press, St. Paul 1–15.

Shahidi, G. H. and Karimi Nik, A. 2004. Antibacterial activity of some medicinal plants of Iran against *Pseudomonas aeruginosa* and *P. fluorescens*. Asian Journal of Plant Sciences 3: 61-64.

Srikanth, M., Swetha, T. and Veeresh, B. 2012. Phytochemistry and Pharmacology of *Oxalis Corniculata* Linn.: A Review. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research 3(11): 4077-4085.

Trease, G. E. and Evans, W. C. 1989. Pharmacognosy, 13th ed. Bailliere Tindall, London, pp. 176-180.

Wright, C. W. 2002. Artemisia. Taylor and Francis Inc. New York. 344 pp.

Zhang, C. Y., Yam, K. L. and Chikindas, M. L. 2004. Effective control of *Listeria monocytogenes* by combination of nisin formulated and slowly released into a broth system. International Journal of Food Microbiology 90 (1): 15 - 22.

Zolfaghari, B. and Yegdaneh, A. 2010. Recent advances in extraction methods of medicinal plant components. Journal of Herbal Drugs 1: 51-55.

The inhibitory activity and phytochemical of *Artemisia absinthium*L. and *Oxalis corniculata* L. extracts against pathogens from tomato *in vitro*

M.R.M. Khoshkholgh Pahlaviani[1*] and A. Massiha[2]

Received: 16 Sep., 2018 Accepted: 14 Feb., 2019

ABSTRACT

Oxalis corniculata and *Artemisia absinthium* plants are widely used in Iranian folklore medicine. The aim of this study was to evaluate the antibacterial activity and determination of phytochemical composition of leaves of these two plant species in northern Iran against tomato pathogenic bacteria in vitro. In this study, the antibacterial activity of aquatic and methanolic extracts of leaves of two plants on Xanthomonas, Pseudomonas and Pectobacterium isolates was performed by disk diffusion methods on agar and macrodilution broth to determine MIC and MBC values. The results showed that the herbal extracts used had antibacterial activity in the inhibitory range of 9 to 19 mm relative to the streptomycin antibiotic (25 mm). MIC and MBC values were 32 to 512 mg/ml according to the microdilution method, respectively. The composition of both extracts indicated the presence of saponins, phenolic compounds, anthraquinone, tannins, flavonoids, steroids and terpenoids, alkaloids, phlobatannin and volatile oils. The highest inhibitory effect was seen as a result of the synergistic activity of the aquatic extract of *Oxalis corniculata* and methanol extract of *Artemisia absinthium* (11 to 17 mm). Based on the results obtained, the combined effects of the two plants can be useful as a practical component in the preparation of herbal drug formulations.

Key words: *Artemisia absinthium*, *Oxaliscorniculata*, Antimicrobial activity, Synergy

1 and 2.Instructor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Lahijan branch,Lahijan, Iran.

*** Corresponding author**: Khoshkholgh@liau.ac.ir