دوفصلنامه تحقیقات بیماری‌های گیاهی
سال سوم، شماره دوم، پاییز و زمستان 1394
صص 56-43

فعالیت ضد باکتریایی اسانس گیاه زنیان بر باکتری‌های *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* و *Escherichia coli* در محیط کشت آگار مغذی

سیما خسروی پور[1]، رویا رضائیان دلوئی[*2]

تاریخ دریافت: 93/10/13 تاریخ پذیرش:93/12/27

چکیده

با توجه به اثرات سوء سموم کشاورزی بر اکوسیستم های زیستی، کنترل عوامل بیماریزای گیاهی با استفاده از ترکیبات ضد میکروبی طبیعی از جمله اسانس و عصاره های گیاهان دارویی امری ضروری به نظر می رسد. اسانس زنیان غنی از ترکیبات ضد باکتریایی به ویژه تیمول می باشد. این تحقیق با هدف تعیین میزان حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی اسانس زنیان روی باکتری *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* به عنوان پاتوژن گیاهی و *Escherichia coli* به عنوان پاتوژن انسانی در محیط کشت مغذی انجام گرفت. در این مطالعه ترکیبات شیمیایی اسانس زنیان با استفاده از دستگاه GC-MS شناسایی گردید. اسانس زنیان با غلظت های 0/004 تا 4 درصد درمحیط کشت مغذی تهیه گردید. فعالیت ضد باکتری اسانس در مقایسه با دیسک آنتی بیوتیک جنتامایسین با استفاده از روش انتشار در آگار تعیین گردید. حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس با استفاده از روش سری دوبرابر رقت لوله ای و حداقل غلظت کشندگی اسانس با استفاده از روش کشت در محیط آگار مغذی تعیین گردید. قطر هاله عدم رشد در خصوص باکتری *پکتوباکتریوم کاروتوورم* از 0/14± 5/7 تا 0/95 ± 27/4 میلی مترو در رابطه با باکتری *اشریشیا کلی* از 0/55± 6/4 تا 0/95± 33/1 میلی متر در غلظت های 0/004 تا 4 درصد متغیر بود. حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی اسانس زنیان بر علیه باکتری های *پکتوباکتریوم کاروتوورم* به ترتیب معادل 0/5% و 1% و در مورد باکتری *اشریشیا کلی* به ترتیب معادل 0/125% و 0/25% بود. با توجه به نتایج این مطالعه به نظر می رسد که اسانس زنیان می تواند جایگزین مناسبی در مقایسه با ترکیبات شیمیایی در کنترل باکتریهای بیمارگر گیاهی و انسانی باشد.

واژه های کلیدی: حداقل غلظت مهارکنندگی، حداقل غلظت کشندگی، زنیان، *Escherichia coli*، *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*.

[1]- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران.
[2]- استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران.
[*]- نویسنده مسئول مقاله: royarezaeian@mshdiau.ac.ir

مقدمه

باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی نقش عمده‌ای در کاهش کمیت و کیفیت محصولات کشاورزی داشته و کنترل آنها از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد. این عوامل صدمات زیادی به میوه ها و سبزیجات در طی انتقال و نگهداری وارد می کنند. مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که کاهش محصولات‌کشاورزی ناشی از این عوامل 30 الی 40 درصد و گاهی اوقات بیشتر می شود (Claflin, 2001). از گیاهان دارویی در طب سنتی به منظور درمان بیماری‌ها استفاده زیادی می شود. امروزه از گیاهان دارویی و ترکیبات آنها به عنوان نگهدارنده‌های طبیعی در مواد غذایی و همچنین در کنترل آفات و عوامل بیماریزای گیاهی استفاده می‌شود. در سالهای اخیر مطالعات زیادی راجع به خواص ضد میکروبی، آنتی اکسیدانی و ضد التهابی اسانس‌های‌گیاهی انجام شده است (Tripathi and Kumar, 2007; Dordevic *et al.*, 2007; Patharakorn *et al.*, 2010). مطالعات انجام شده راجع به خواص ضد باکتریایی اسانس‌های گیاهی بر علیه عوامل بیماریزای انسانی از جمله *Escherichia coli* نسبت به عوامل بیماریزای گیاهی گسترده‌تر می‌باشد (Lo Cantore *et al.*, 2004; Karimi-Osboo *et al.*, 2010). *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* یک باکتری گرم منفی و میله‌ای شکل بوده که در تعداد زیادی از گونه‌های گیاهی باعث ایجاد بیماری و خسارات اقتصادی می شود (Schaad *et al.*, 2001). از ویژگی‌های مهم این باکتری تولید تعداد زیادی از آنزیم‌های خارج سلولی شامل پکتیناز، سلولاز، پروتئاز و پکتین لیاز می‌باشد که قادر است دیواره سلول‌های گیاهی را تخریب و باعث پوسیدگی بافت‌های‌گیاهی شود (Kotoujansky, 1987). گونه‌های مختلف جنس *Pectobacterium* عمدتاً باعث ایجاد بیماری پوسیدگی در بافت پارانشیمی گیاه میزبان می‌شوند که علائم اولیه در گیاهان در حال رشد متفاوت است. علائم این بیماری روی غده‌های سیب‌زمینی به صورت پوسیدگی نرم غده و در ساقه به صورت ساق‌سیاه بروز می‌کند (Schaad *et al.*, 2001).

روش‌های کنترل بیماری‌های باکتریایی گیاهی عمدتا شامل تناوب زراعی، ضد عفونی خاک و بکارگیری ارقام مقاوم به باکتری می باشد (Burt, 2004). بکارگیری ارقام مقاوم نقش مهمی در مدیریت تلفیقی بیماری‌های گیاهی دارد. استفاده از آفت‌کش‌های شیمیایی به عنوان اثر بخش ترین و سریع‌ترین استراتژی برای مدیریت بیماری‌های گیاهی به شمار می رود ولی ترکیب شیمیایی اثر بخش برای کنترل بیماری ناشی از باکتری‌های مولد پوسیدگی نرم در دسترس نمی باشد. لذا استفاده از ترکیبات ضد میکروبی طبیعی گیاهی در کنترل این بیماری کاربرد وسیعی پیدا کرده است (Smid and Gorris, 1999; Karami-Osboo *et al.*, 2010). خواص ضد میکروبی اسانس‌های گیاهی از سالیان دور به عنوان ترکیبات ضد میکروبی طبیعی در شاخه‌های داروشناسی، میکروب شناسی پزشکی، بیماری-شناسی گیاهی و نگهداری مواد غذایی شناخته شده است. این ترکیبات نسبت به آنتی بیوتیک‌ها باعث ایجاد مقاومت دارویی در عوامل بیماری‌زا نمی‌شود. فعالیت ضد باکتریایی اسانس‌های گیاهی عمدتا به حضور ترکیبات ترپنوئیدی و فنلی از جمله تیمول، کارواکرول و اوژنول می‌باشد (Dufour, 2002). خواص ضد باکتریایی اسانس‌های گیاهی و ترکیبات آنها به طور وسیعی بر علیه تعداد زیادی از باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت بررسی شده است. باکتری-های گرم منفی نسبت به باکتری‌های گرم مثبت به خاطر غشاء لیپوپلی ساکاریدی آنها مقاومت بیشتری نسبت به

اسانس‌های گیاهی دارند. در این باکتری‌ها انتشار مواد آب‌گریز از میان این لایه پوشاننده غشاء محدود می‌گردد (Burt *et al.*, 2004; Hayouni *et al.*, 2007; Sandri *et al.*, 2007). تا به حال‌حدود 3000 نوع اسانس گیاهی شناسایی شده است که 300 نوع آنها از نظر تجاری دارای اهمیت می‌باشند و عمدتا به منظور ایجاد عطر و طعم مورداستفاده‌قرار می‌گیرند (Burt, 2004). در بین روش‌های تهیه اسانس‌های گیاهی یکی از بهترین روش‌ها، روش تقطیر است. این روش برای تولید اسانس‌های گیاهی اولین بار در 2000 سال قبل توسط ایرانیان، مصریان و هندیان استفاده‌شده است. از جمله این اسانس‌های گیاهی می توان زنیان را نام برد. زنیان با نام علمی *Trachyspermum ammi* گیاهی است علفی و یک ساله از خانواده چتریان[1] که به نام *Carum copticum* هم معروف است (Sharafzadeh and Alizadeh, 2012). این گیاه در ایران، هند، پاکستان و مصر رشد می‌کند. در طب بومی ایران میوه‌ی این گیاه به عنوان عامل ضدنفخ، ضدتهوع و ادرارآور به کار می رود. دانه‌های رسیده‌ی این گیاه 2 تا 4 درصد اسانس دارند. اسانس این گیاه غنی از مونوترپن‌ها مثل تیمول است و به صورت گسترده به عنوان عامل ضد باکتری تجویز می شود. این اسانس در ترکیب داروها نیز به کار می رود (Rabiei *et al.*, 2014). بخش دارویی این گیاه را میوه تشکیل می دهد. اسانس میوه آن که آجوان[2] نام دارد زرد رنگ است و بوی عطر تیمول، از آن استشمام می شود. در تجزیه گیاه زنیان ایرانی ترکیبات تیمول، سایمن[3]، گاما ترپینن[4]، بتا پین[5] و سابینن[6] گزارش شده است (Sharafzadeh and Alizadeh, 2012).

این مطالعه با هدف بررسی اثر غلظت‌های مختلف اسانس زنیان در محیط کشت مغذی جهت تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی[7] و کشندگی[8] باکتری *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* به عنوان عامل بیماریزای‌گیاهی و و باکتری *E. coli* به عنوان عامل بیماریزای انسانی به روش سری دوبرابر رقت لوله ای انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه اسانس زنیان و شناسایی ترکیبات

اسانس‌زنیان (*Carum copticum* L.) استفاده شده در این مطالعه از شرکت‌کشت و صنعت نادر تهیه گردید. به منظور شناسایی ترکیبات تشکیل دهنده اسانس ازدستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف‌سنج جرمی (Varian star 3400 cx) واجد ستون موئینه DB-5 با قطر داخلی 250 میکرومتر، ضخامت فیلم 25.0 میکرومتر و طول ستون 30 متر استفاده گردید. از گاز هلیوم به عنوان گاز حامل با سرعت 2 میلی لیتردردقیقه استفاده شد. بعد از تزریق 1 میکرولیتر اسانس، کروماتوگرام حاصله و طیف‌های جرمی ترکیبات مختلف آن بررسی شد. ترکیبات اسانس در مقایسه با اندیس‌های بازداری نسبی مربوط به ان-آلکان‌ها با موارد موجود در سایر تحقیقات یا ترکیبات معتبر

[1]-Umbelliferae
[2] -Ajowan
[3]-Cymene
[4]-Gama trepinene
[5]-Bete pinene
[6]-Sabinene
[7]-Minimum Inhibitory Concentration (MIC)
[8]-Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

موجود در آزمایشگاه مربوطه شناسایی‌شدند. شناسایی طیف‌ها برا اساس بانک اطلاعات جرمی دستگاه GC-MS، زمان بازداری ترکیبات (Retention time)، محاسبه اندیس‌کواتس (Kovats index) و الگوی شکست آن‌ها در مقایسه با طیف‌های استاندارد انجام گرفت. درصد نسبی هر یک از ترکیبات تشکیل دهنده اسانس با توجه به سطح زیر منحنی هر یک از پیک‌های کروماتوگرام دستگاه و مقایسه آن با سطح کل زیر منحنی تعیین گردید. آنالیز ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس زنیان در جدول 1 آمده است. غلظت‌های اسانس زنیان بکار رفته در این مطالعه شامل 0/004%، 0/008%، 0/016%، 0/032%، 0/064%، 0/125%، 0/25%، 0/5%، 1%، 2% و 4% (v/v%) بودند (Mirza and Ahmadi, 2000; Adams, 2005).

آماده سازی باکتری جهت مایه‌زنی به محیط کشت

در این مطالعه از سویه استاندارد باکتری *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (PTCC 1675) و باکتری *Escherichia coli* (PTCC 1330) تهیه‌شده از مرکز منطقه‌ای کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های-صنعتی ایران، سازمان‌پژوهش‌های علمی‌وصنعتی ایران استفاده شد. ابتدا برای تهیه کشت مورد نیاز، در شرایط استریل از سویه استاندارد برداشته و بر روی پلیت حاوی محیط آگار مغذی کشت داده شد. پلیت‌های مذکور به مدت 24 ساعت در دمای 26 و 37 درجه سلسیوس به ترتیب برای *P. carotovorum* و *E. coli* گرمخانه‌گذاری گردید. سپس از پرگنه‌های تازه رشد کرده بر روی محیط‌کشت برداشته و سوسپانسیونی معادل استاندارد نیم مک فارلند تهیه شد. در این کدورت معادل 1.5×10^8 cfu/ml باکتری وجود داشت.

ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی

روش انتشار در آگار

خواص ضد باکتریایی اسانس‌زنیان بر اساس‌آزمون زیست‌سنجی به روش‌انتشاردرآگار توصیف شده به وسیله *آندریوس* (Andrews, 2001) انجام‌گردید. بدین‌منظورسوسپانسیون باکتریایی معادل استاندارد نیم مک فارلند در محلول سرم فیزیولوژی استریل تهیه‌گردید. سپس0/1 میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری حاوی 10^8 cfu/ml بر روی محیط آگار مغذی ومحیط مولر هینتون آگار (Muller Hinton Agar, Merck) کشت داده و به وسیله میله شیشه‌ای ال مانند به طور کامل بر روی محیط پخش شد. بعد از خشک شدن سطح محیط روی هر کدام از دیسک های کاغذی استریل به قطر 6 میلی متر (Whatman filter paper) مقدار 15 میکرولیتر از هرکدام از غلظت‌های تهیه شده از اسانس‌زنیان ریخته شد. از دیسک آنتی بیوتیک جنتامایسین (10 میکروگرم) ساخت شرکت پادتن طب به عنوان کنترل مثبت و دیسک حاوی 15 میکرولیتر آب مقطر استریل به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. دیسک‌های حاوی اسانس، کنترل مثبت و منفی در سه تکرار بر روی محیط کشت قرار داده شدند. تمامی پلیت‌ها به مدت 24 ساعت در دمای مناسب گرمخانه‌گذاری شدند. فعالیت ضد باکتریایی برمبنای اندازه گیری قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک‌ها بر حسب میلی متر انجام گرفت (Andrews, 2001).

تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC)

برای تعیین‌حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس از روش سری دو برابر رقت لوله‌ای (Macrobroth dilution) در محیط کشت مغذی استفاده شد. برای این منظور یک سری 11 عددی لوله آزمایش در نظر گرفته شد. در همه لوله‌ها از غلظت 0/004 درصد تا 4 درصد (%v/v) اسانس با محیط کشت تهیه‌گردید. سپس از باکتری‌های مورد نظر به میزان 10^6 cfu/ml به هر کدام از لوله ها تلقیح گردید. تمامی آزمایشات در 3 تکرار انجام گرفت. برای هر تکرار، یک لوله کنترل منفی فاقد باکتری ویک لوله کنترل مثبت و فاقد اسانس تهیه شد. تمامی لوله ها به مدت 24 ساعت در دمای مناسب گرمخانه‌گذاری شده و پس از طی این مدت، لوله‌هااز نظرکدورت حاصل از فعالیت ورشد باکتری مورد بررسی ماکروسکوپی قرار گرفتند. حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (Minimum inhibitory concentration) برای لوله ای در نظر گرفته شد که حاوی کمترین غلظت اسانس باشد و کدورت قابل ملاحظه‌ای‌در آن ایجاد نشده باشد. برای تعیین حداقل غلظت کشندگی (Minimum bactericidal concentration) باکتری از لوله هایی‌که در آن-ها کدورت قابل مشاهد دیده نشد بر روی محیط کشت جامد مولر هینتون آگار کشت داده شد. تمامی پلیت‌ها به مدت 24 ساعت در دمای متناسب با رشد هریک از باکتری‌های مورد نظر گرمخانه‌گذاری‌گردید. کمترین غلظتی که هیچ رشدی از باکتری در آن مشاهده نشد به عنوان حداقل غلظت کشندگی در نظر گرفته شد. در تمامی‌آزمایشات شرایط‌گرمخانه‌گذاری برای‌باکتری *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* دمای 26 درجه سلسیوس و برای *E. coli* دمای 37 درجه سلسیوس به مدت 24ساعت بود.

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های بدست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS ver. 16 مورد تجزیه و تحلیل‌آماری قرار گرفتند. داده‌ها با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) مورد بررسی قرار گرفتند. سطح معنی داری معادل $p < 0/05$ در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

آنالیز اسانس

اسانس‌های گیاهی از منابع بالقوه واجد ترکیبات ضد باکتریایی می‌باشند. مقایسه نتایج گزارش شده در خصوص اثرات ضد باکتریایی اسانس‌های مختلف بسیار مشکل می‌باشد. با توجه به روش‌های مختلف تهیه اسانس-ها، روش‌های مختلف بررسی خواص ضد باکتریایی و باکتری‌های مورد استفاده، از مدل‌های مختلفی در بررسی خواص ضد باکتریایی اسانس‌ها استفاده شده است. در برخی از این روش‌ها از مدل‌های آزمایشگاهی چون محیط کشت و در برخی دیگر از مدل‌های غذایی برای بررسی اثرات ضد باکتریایی اسانس‌ها استفاده می‌شود (Akhondzadeh-Basti *et al*., 2004). در مطالعه حاضر از محیط کشت آزمایشگاهی به عنوان بررسی خواص ضد باکتریایی اسانس زنیان استفاده گردید.

میوه گیاه زنیان با نام علمی *Trachyspermum ammi* که به نام *Carum copticum* هم معروف است حاوی 2درصد اسانس بوده که آجوان (Ajowan) نام دارد که زرد رنگ بوده و قسمت اعظم آن را تیمول تشکیل می دهد (Zargari, 1990).

در تجزیه گیاه زنیان ایرانی، ترکیبات تیمول، سایمن، بتـا پینن، گاما ترپینن و سابینن گزارش شده است. در مطالعه‌ی *خواجه و همکاران* (Khajeh *et al*., 2004) نیز تیمول (49%)، گاماترپینن (30/8%) و پاراسیمن (15/7%) بیشترین اجزاء تشکیل دهنده اسانس‌زنیان بودند. *گودرزی و همکاران* (Goudarzi *et al*., 2011) در مطالعه‌ای بیشترین اجزاء تشکیل دهنده اسانس زنیان را تیمول (36/7%)، گاماترپینن (36/5%) و پاراسیمن (21/1%) معرفی کردند.

نتایج حاصل از GC-MS اسانس گیاه زنیان در جدول 1 آمده است. از بـین 16 ترکیب به دست آمده به ترتیب تیمـول با 54/45 درصد، پاراسیمن با 22/15 درصد و گاماترپینن با 15/42 درصد بیشترین درصد اجزاء تـشکیل دهنـده اسانس بودند (جدول 1). با توجه به نتایج بدست آمده در این مطالعه مشخص گردید که تیمول ترکیب اصلی تشکیل دهنده اسانس زنیان است که در مقایسه با سایر مطالعات انجام شده از درصد بالاتری برخوردار است. اختلافات موجود در کمیت و کیفیت ترکیبات شناسایی شده در مطالعات مختلف میتواند ناشی از اختلافات ژنتیکی، شرایط محیطی و فصلی، زمان برداشت، سن گیاه، قسمت مورد استفاده‌ی گیاه، روش اسانس‌گیری و نوع حلال به کار رفته باشد (Azizi, 2009; Daferera *et al*., 2000; Nostro, 2000).

محققان فعالیت ضدباکتریایی اسانس‌ها را به ارتباط بین ساختارهای شیمیایی برخی از اجزاء غالب موجوددر آن‌ها نسبت داده اند. ترکیبات فنولی مانند تیمول، کارواکرول،گاما ترپینن و پاراسیمن موجود در اسانس‌ها دارای خاصیت ضد باکتریایی شدیدی هستند (Burt, 2004; Friedman 2002).

فعالیت ضد باکتریایی

نتایج بدست آمده از بررسی فعالیت ضدباکتریایی اسانس زنیان بر علیه باکتریهای *P. carotovorum* و *E. coli* با استفاده از روش انتشار در آگار در جدول شماره 2 نشان داده شده است. همانطورکه‌در جدول شماره 2 مشاهده می گردد با افزایش غلظت اسانس خاصیت ضد باکتریایی آن نیز افزایش می یابد. قطر هاله عدم رشد در رابطه با باکتری *P. carotovorum* در غلظت 0/064% معادل 0/41± 5/7 میلی متر و در غلظت 4% معادل 0/95% ± 27/4 میلی متربود. در رابطه با باکتری *E. coli* قطر هاله عدم رشد در غلظت 0/032 % معادل 0/55± 6/4 میلی متر و در غلظت 4% معادل 0/95± 33/1 میلی متر بود (جدول 2).

جدول 1- ترکیبات شیمیایی اسانس گیاه زنیان (*Carum copticum*)

ردیف	نام ترکیب شیمیایی	درصد (%)	شاخص RT
1	α –thujene	0/17	11/15
2	α –Pinene	0/31	11/32
3	β–Pinene	1/23	13/29
4	myrcene	0/55	14/12
5	α –terpinen	0/51	15/46
6	ρ-Cymene	22/15	16/11
7	Limonene	0/31	16/24
8	β_Phellandrene	0/45	16/54
9	γ–Terpinen	15/42	17/85
10	α – Terpinolen	0/12	18/84
11	terpinol	0/18	23/85
12	carvone	0/75	26/75
13	trans-anethole	1/15	28/65
14	thymol	54/45	29/65
15	carvacrol	0/45	29/94
16	apiol	0/36	41/85
	کل	98/56	-

نتایج حاصل از اثر غلظت‌های مختلف اسانس برروی باکتری *P. carotovorum* و قطر هاله عدم رشد نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف اسانس از 0/064 تا 4% وجود دارد (شکل 1). هیچکدام از تیمارهای مورد بررسی نتوانستند قطر هاله عدم رشد به اندازه آنتی بیوتیک جنتا مایسین (0/85 ± 31/3 میلی متر) که به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید، ایجاد کنند. قطر هاله عدم رشد در غلظت 4% اندکی کمتر از آنتی بیوتیک جنتامایسین و معادل 0/95 ± 27/4 میلی متر بود. نتایج حاصل از فعالیت ضد باکتریایی اسانس زنیان نشان داد که قطر هاله عدم رشد در رابطه با باکتری *اشریشیا کلی* در غلظت‌های 0/032 تا 4% اسانس از 0/55± 6/4 میلی متر تا 0/95 ± 33/1 میلی متر متغیر می باشد.

جدول 2- اثر ضد باکتریایی غلظت های مختلف اسانس زنیان بر علیه باکتریهای *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* و *E.coli*

غلظت اسانس (%v/v)	*P. carotovorum subsp. carotovorum*	*E.coli*
	میانگین ± انحراف معیار	میانگین ± انحراف معیار
0 (کنترل منفی)	-[a]	-[a]
0/004	-[a]	-[a]
0/008	-[a]	-[a]
0/016	-[a]	-[a]
0/032	-[a]	6/4 ± 0/55 [b]
0/064	5/7 ± 0/41[b]	12/7 ± 0/47 [c]
0/125	7/5 ± 0/56 [b]	15/4 ± 0/81 [c]
0/25	11/9 ± 0/7 [c]	17/4 ± 0/66 [cd]
0/5	13/7 ± 0/51 [c]	20/3 ± 0/75 [de]
1	17/3 ± 0/87 [cd]	24/5 ± 0/50 [f]
2	22/3 ± 0/97 [e]	27/6 ± 0/98 [fg]
4	27/4 ± 0/95 [f]	33/1 ± 0/95 [h]
جنتامایسین (10 میکروگرم)	31/3 ± 0/85 [fg]	22/5 ± 0/80[efi]

(-) عدم فعالیت ضد باکتریایی.

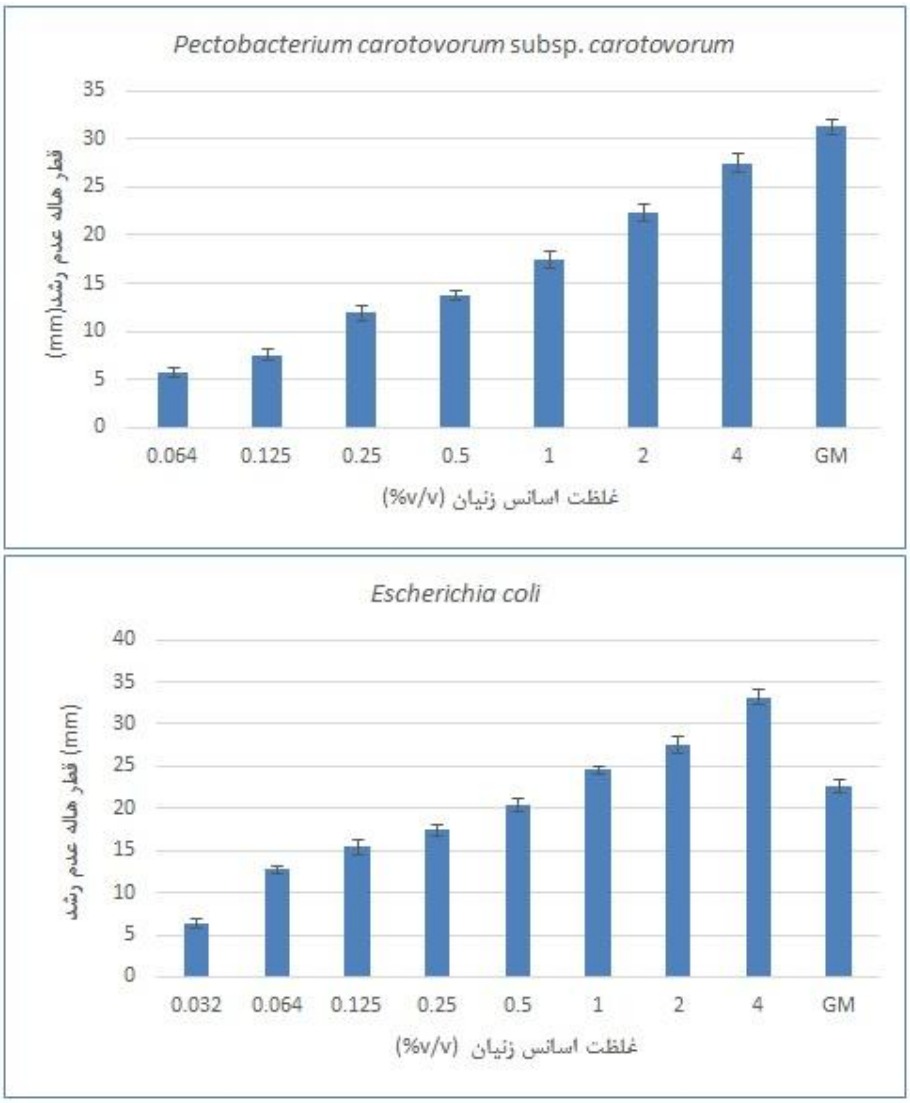
* مقادیری که با حروف یکسان نشان داده شده اند در سطح 0.05> p معنی دار نبودند.

در شکل 1 قطر هاله عدم رشد باکتری‌های *E. coli* و *P. carotovorum* دررابطه با غلظت‌های مختلف اسانس زنیان با دیسک آنتی بیوتیک جنتامایسین مقایسه شده است. همانطور که مشاهده می گردد در مورد اشرشیا کلی اثر اسانس نسبت به آنتی بیوتیک جنتامایسین قویتر و در مورد *P. carotovorum* این اثرات ضعیف‌تر می باشد. تجزیه و تحلیل داده های بدست آمده در این مطالعه نشان داد که بین اغلب تیمارهای مورد بررسی از بابت قطر هاله عدم رشد اختلاف معنی داری وجود داشت (p< 0/05).

محمودی و همکاران (2010) در مطالعه ای فعالیت ضد باکتریایی اسانس زنیان را بر علیه باکتری عامل شانکر هسته داران (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*) و لکه برگی (*Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*) مورد بررسی قراردادند. دراین مطالعه میانگین قطر هاله بازدارنده رشد در رابطه با باکتری عامل شانکر هسته داران معادل 0/16 ± 20/22 میلی مترو دررابطه با باکتری عامل لکه برگی معادل 0/25 ± 40/77 میلی متر بود.

گودرزی و همکاران (2011) در مطالعه‌ای اثر اسانس زنیان را بر روی تعدادی از باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه آنها قطر هاله عدم رشد را در خصوص باکتری *E. coli* معادل 21 میلی متر گزارش کردند که با مطالعه حاضر مطابقت دارد. همچنین حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی توسط آنها به

ترتیب معادل 0/031 و 0/062 گزارش گردید که اندکی کمتر از نتایج بدست آمده در این مطالعه است. آنها نتیجه گرفتند که اسانس زنیان به علت داشتن ترکیبات مونوترپن می تواند به عنوان یک ترکیب ضد باکتریایی طبیعی مورد استفاده قرار گیرد.



شکل 1- فعالیت ضد باکتریایی غلظت‌های مختلف اسانس زنیان برعلیه باکتری‌های *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (بالا) و *E.coli* (پایین) .

حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) اسانس زنیان

حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی اسانس‌زنیان بر علیه باکتریهای *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* و *E. coli* در جدول 3 نشان داده شده است. با توجه به نتایج بدست آمده حداقل غلظت مهارکنندگی

(MIC) اسانس زنیان برای باکتری *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* معادل 0/5 درصد و برای باکتری *E. coli* معادل 0/125 درصد بود. در این غلظت‌ها هیچگونه رشد قابل مشاهده ای برای هیچکدام از باکتریها وجود نداشت. حداقل غلظت کشندگی (MBC) اسانس زنیان برای *P. carotovorum* معادل 1 درصد و برای *E.coli* معادل 0/25 درصد بود (جدول 3). نتایج بدست آمده نشان داد که در غلظت معادل MIC قطر هاله عدم رشد در باکتری *P. carotovorum* معادل 0/51 ± 13/7 میلی متر و در باکتری *E. coli* معادل 0/81 ± 15/4 میلی متر بود.

جدول 3- حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) اسانس زنیان بر علیه باکتریهای *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* و *E.coli* .

باکتری	MIC (%v/v)	MBC (%v/v)
P. carotovora subsp. Carotovora	0/5	1
E. coli	0/125	0/25

نتایج بدست‌آمده در این مطالعه با نتایج بدست‌آمده توسط یاکوبلیس و*همکاران* (Iacobellis *et al.*, 2005) مطابقت دارد. آنها در مطالعه ای فعالیت ضد میکروبی اسانس زنیان را به روش نشت در آگار (Agar diffusion) بررسی کردند و اثرهای مهاری نسبتاً بالای آن را علیه باکتری‌های *Erwinia*، *Xanthomonas* و *Agrobacterium* مشاهده کردند. *پائول و همکاران* (Paul *et al.*, 2011) اثر اسانس زنیان (*Trachyspermum ammi*) را روی باکتری-های مختلف بیماریزای منتقله از طریق مواد غذایی مورد بررسی قرار دادند. حداقل غلظت ممانعت‌کننده اسانس برای باکتریهای مختلف از 12/5 تا 5/462 میکروگرم در میلی لیتر متغیر بود. نتایج حاصل از مطالعه ایشان نشان داد که حساسیت باکتری‌های گرم مثبت به اسانس زنیان از باکتری‌های گرم منفی بیشتر است.

ربیعی و همکاران (Rabiei *et al.*, 2014) در مطالعه ای نشان دادند که اسانس زنیان قادر است به طور معنی‌داری از رشد باکتری لیستریا مونوسیتوژنز جلوگیری‌کند. *محبوبی و کاظم پور* (Mahboubi and Kazempour, 2011) در مطالعه ای حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی اسانس زنیان بر علیه باکتری *E. coli* را 0/5 میکروگرم در میلی لیتر گزارش نمودند. *دیواسانکاراح و* همکاران (Devasankaraiah *et al.*, 1974)، *سینگ و همکاران* (Singh *et al.*, 2002)، *رانی وخولار* (Rani and Khullar, 2004)، ناوارو *و همکاران* (Navarro *et al.*, 1996) در مطالعات جداگانه ای فعالیت ضد باکتریایی اسانس زنیان را بررسی‌کرده و تاثیر آن را بروی تعدادی از باکتری‌های مقاوم به آنتی بیوتیک‌ها مورد بررسی قرار دادند.

عروجعلیان و همکاران (Oorojalian *et al.*, 2010) در مطالعه‌ای حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس‌های زنیان، زیره سبز و زیره پارسی را بر روی باکتری‌های مهم مواد غذایی از جمله *E. coli* در دامنه 0/03 تا 0/5 میلی‌گرم در میلی‌لیتر گزارش کردند. در این مطالعه حداقل غلظت بازدارندگی اسانس زنیان علیه لیستریا مونوسیتوژنز در محیط

کشت آزمایشگاهی را 0/02 درصد برآورد گردید. نتایج حاصل ازاین مطالعه نشان داد که اسانس‌زنیان نسبت به اسانس‌های دیگر مورد بررسی دارای خواص ضد باکتریایی قوی تری است.

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که اسانس زنیان در ممانعت از رشد باکتری‌های مورد بررسی بسیار موثر بوده و می‌تواند از رشد باکتری *P. carotovorum* عامل پوسیدگی نرم میوه ها و سبزی‌ها و *E.coli* به عنوان یکی از مهمترین عوامل بیماریزای انسانی جلوگیری نماید. با توجه به اینکه کشور ما دارای شرایط مساعد کشاورزی است وامکان تولیدگیاهان دارویی با هزینه نسبتا پایین وجود دارد، امکان استفاده از آنها در مبارزه با عوامل بیمارگر گیاهی در کنار سایر روش‌های کنترل می تواند از مصرف بی رویه آنتی بیوتیک‌ها و سموم کشاورزی جلوگیری نماید.

سپاسگزاری

نویسندگان از دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد و مجتمع آموزشی گلبهار به خاطر حمایت مالی از اجرای این پروژه تحقیقاتی تشکر وقدردانی می کنند.

References

1. Adams RP. 2005. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography-Quadropole Mass Spectroscopy. Journal of the American Society for Mass Spectrometry 16:1902-1903.
2. Akhondzadeh-Basti A, Razavilar V, Misaghi A, Radmehr B, Abbasifar R, Yazdani D and Akhoundzadeh S. 2004. Effect of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil on probability of growth initiation of *Staphylococcus aureus* in a brain heart infusion broth. Journal of Medicinal plants 3: 53–61.
3. Andrews JM. 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 48: 5-16.
4. Azizi M, Davareenejad G, Bos R, Woerdenbag HJ and Kayser O. 2009. Essential oil content and constituents of Black zira (*Bunium persicum* [Boiss.] B. Fedtsch.) from Iran during field cultivation (domestication). Journal of Essential Oil Research 21: 78–82.
5. Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in food a review. International Journal of Food Microbiology 94: 223–253.
6. Claflin L. 2001. Control of *Pseudomonas syringae* pathovars. pp. 423–430, *In* NS Iacobellis, A Collmer, SW Hutcheson, JW Mansfield, CE Morris, J Murillo, NW Schaad, DE Stead, G Surico and MS Ullrich, (eds). *Pseudomonas syringae* and Related Pathogens. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
7. Conner DE. 1993. Naturally occurring compounds. pp. 441–467 *In* PM Davidson and AL Branen (eds). Antimicrobials in Foods, 2nd ed. New York: Marcel Dekker, Inc.
8. Daferera DJ, Ziogas BN and Polissiou MG. 2000. GC-MS analysis of essential oils from Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillum digitatum*. Journal of Agricultural Food Chemistry 48: 2576–2581.
9. Devasankaraiah G, Hanin I, Haranath PS and Ramanamurthy PS. 1974. Cholinomimetic effects of aqueous extracts from *Carum copticum* seeds. British journal of Pharmacology 52: 613–614.
10. Dordevic S, Petrovic S, Dobric S, Milenkovic M, Vucicevic D, Zizic S and Kukic J. 2007. Antimicrobial, anti-inflammatory, anti-ulcer and antioxidant activities of Carlina acanthifolia root essential oil. Journal of Ethnopharmacology 109: 458–463.
11. Dufour M, Simmonds RS and Bremer PJ. 2003. Development of a method to quantify in vitro the synergistic activity of natural antimicrobials. International Journal of Food Microbiology 85: 249–258.
12. Fahy PC and Persley GJ. 1983. Plant Bacterial Disease: A Diagnostic Guide. Sydney, Australia: Academic Press. 393 p.
13. Friedman M, Henika, PR and Mandrell RE. 2002. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenese* and *Salmonella enterica.* Journal of Food Protection 65: 1545–1560.
14. Goudarzi GR, Saharkhiz MJ, Sattari M and Zomorodian K. 2011. Antibacterial activity and chemical composition of ajowan (*Carum copticum* Benth. & Hook) essential oil. Journal of Agricultural Science and Technology 13: 203–208.
15. Hayouni El, Abedrabba M, Bouix M and Hamdi M. 2007. The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. Food Chemistry 105: 1126–1134.

16. Hooker WJ 1981. Compendium of Potato Disease. St Paul (MN): American Phytopathological Association. 125 p.
17. Iacobellis NS, Lo Cantore P, Capasso F and Senatore F. 2005. Antibacterial activity of *Cuminum cyminum* L. and *Carum carvi* L. essential oils. Journal of Agricultural Food Chemistry 53: 57–61.
18. Karami-Osboo R, Khodaverdi M and Ali-Akbari F. 2010. Antibacterial effect of effective compounds of *Satureja hortensis* and *Thymus vulgaris* essential oils against *Erwinia amylovora*, Journal of Agricultural Science Technology 12: 35–45.
19. Khajeh M, Yamini Y, Sefidkon F and Bahramifar N. 2004. Comparison of essential oil composition of *Carum copticum* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods. Food Chemistry 86: 587–591.
20. Kotoujansky A. 1987. Molecular genetics of pathogenesis by soft-rot Erwinias. Annual Review of Phytopathology. 25: 405–430.
21. Lo Cantore P, Iacobellis NS, De Marco A, Capasso F and Senatore F. 2004. Antibacterial activity of *Coriandrum sativum* L. and *Foeniculum vulgare* Miller var. vulgare (Miller) essential oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52: 7862–7866.
22. Mahboubi M and Kazempour N. 2011. Chemical composition and antimicrobial activity of *Satureja hortensis* and *Trachyspermum copticum* essential oil. Iranian Journal of Microbiology 3: 194–200.
23. Mahmoudi H, Rahnama K and Arabkhani MA. 2010. Antibacterial effect essential oil and extracts of medicinal plant on the causal agents of bacterial canker leaf spot on the stone fruit tree. Journal of Medicinal Plants 4: 34–42.
24. Mirza M and Ahmadi L. 2000. Kovats index calculation of essential oils constituents by DB5 column. Medicinal and Aromatic Plants Research Technical Publication 5: 126–149.
25. Navarro V, Villarreal ML, Rojas G and Lozoya X. 1996. Antimicrobial evaluation of some plants used Mexican traditional medicine for the treatment of the infectious diseases. Journal of Ethnopharmacology 53: 143–147.
26. Nostro A, Germano MP, Dangelo V, Marino A and Cannatelli MA. 2000. Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. Letter of Applied Microbiology 30: 379–384.
27. Oroojalian F, Kasra-Kermanshahi R, Azizi M and Bassami MR. 2010. Phytochemical composition of the essential oils from three Apiaceae species and their antibacterial effects on food-borne pathogens. Food Chemistry 120: 765–770.
28. Patharakorn T, Arpornsuwan T, Wetprasit N, Promboon A and Ratanapo S. 2010. Antibacterial activity and cytotoxicity of the leaf essential oil of *Morus rotunbiloba* Koidz. Journal of Medicinal Plant Research 4: 837–843.
29. Paul S, Dubey RC, Maheswari DK and Kang SC. 2011. *Trachyspermum ammi* (L.) fruit essential oil influencing on membrane permeability and surface characteristics in inhibiting food-borne pathogens. Food Control 22: 725–731.
30. Rabiei S, Hosseini H and Rezaei M. 2014. The inhibitory Effect of black zira essential oil on *Listeria monocytogenes* growth in simulated broth culture models and fillet of kutum (*Rutilus frisii* kutum). Journal Iranian Food Science and Technology Research 10: 71–80.
31. Rani P and Khullar N. 2004. Antimicrobial evaluation of some medicinal plants for their anti-enteric potential against multi drug resistant *Salmonella typhi*. Phytotherapy Research 18: 670–673.

32. Sandri IG, Zacaria J, Fracaro F, Delamare APL and Echeverrigaray S. 2007. Antimicrobial activity of the essential oils of Brazilian species of the genus Culina against food-borne pathogens and spoiling bacteria. Food chemistry 103: 823–828.
33. Schaad NW, Jones JB and Chum W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria (3rd ed.). American Phytopathological Society, Minnesota, USA. 373 p.
34. Sharafzadeh S and Alizadeh O. 2012. Some medicinal plants cultivated in Iran. Journal of Applied Pharmaceutical Science 2: 134–137
35. Singh G, Kapoor IP, Pandey SK, Singh UK and Singh RK. 2002. Studies on essential oils: Part 10; Antibacterial activity of volatile oils of some spices. Phytotherapy Research 16: 680–682.
36. Smid EJ and Gorris LGM. 1999. Natural antimicrobials for food preservation. pp. 285–308, *In* MS Rahman (ed). Handbook of Food Preservation. New York: Marcel Dekker.
37. Tripathi NN and Kumar N. 2007. *Putranjiva roxburghii* oil- A potential herbal preservative for peanuts during storage. Journal of Stored Production Research 43: 435–442.
38. Zargari A. 1990. Medicinal Plants. Tehran: Tehran University Press. 248 p.

Antibacterial activity of *Carum copticum* essential oil against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and *Escherichia coli* in nutrient broth medium

S. Khosravipour[1], R. Rezaeian-Doloei*[2]

Abstract

Due to the adverse effects of agricultural pesticides on biological ecosystems, biological control of plant pathogens by using natural antimicrobial compounds such as essential oils and extracts of medicinal plants could be a necessity. Essential oil of *carum copticum*, is rich in antibacterial compounds particularly thymol. The aim of this study was to determine the minimum inhibitory and bactericidal concentration of *Carum copticum* essential oil against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* as a plant pathogen and *E. coli* as a human pathogen in nutrient broth medium. In this study chemical compounds of *Carum copticum* essential oil were identified by GC-MS. *Carum copticum* essential oil at concentrations including 0.004 to 4 % were prepared in nutrient broth medium. Antibacterial activity of essential oil in comparison with gentamicin antibiotic was determined by using 6 mm impregnated filter paper disks in agar diffusion method. The minimum inhibitory concentration (MIC) of *Carum copticum* essential oil against tested bacteria was determined by macrobroth dilution method. The MBC was determined by using cultivation method in nutrient agar medium. Zone of growth inhibition for *Pectobacterium carotovorum* varied from 5.7± 0.14 to 27.4 ± 0.95 mm while for *E. coli* it ranged from 6.4 ± 0.55 to 33.1 ± 0.95 mm in the order of increasing concentrations from 0.004 to 4%. The MIC and MBC of *Carum copticum* essential oil against *Pectobacterium carotovorum* and *E. coli* were recorded as 0.5% and 1% and 0.125% and 0.25%, respectively. Regarding the results of this research, plant essential oils can be a good alternative to chemical control of human and plant bacterial pathogens.

Key words: *Escherichia coli*, *Carum copticum*, Minimum Inhibitory Concentration, Minimum Bactericidal Concentration, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum*.

[1]- Former MSc Student, Department of Agronomy and Plant Breeding, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran.

[2]- Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran.

*Corresponding author: royarezaeian@mshdiau.ac.ir