مجله بوم‌شناسی گیاهان زراعی
جلد ۱۱، شماره ۳، صفحات ۶۸- ۵۷
(پاییز ۱۳۹۴)

اثر اسانس زیره سبز، اسیدیته، سطح تلقیح و دمای نگهداری بر رشد باکتری *Xanthomonas campestris*

نازنین میری
دانش‌آموخته کارشناسی ارشد
گروه زراعت و اصلاح نباتات
واحد مشهد
دانشگاه آزاد اسلامی
مشهد، ایران
نشانی الکترونیک ✉:
nazy.miri@gmail.com

رویا رضائیان دلویی*
استادیار گروه زراعت و اصلاح
نباتات
واحد مشهد
دانشگاه آزاد اسلامی
مشهد، ایران
نشانی الکترونیک ✉:
royarezaeian@mshdiau.ac.ir
(مسئول مکاتبات)

رضا صدر آبادی حقیقی
استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات
واحد مشهد
دانشگاه آزاد اسلامی
مشهد، ایران
نشانی الکترونیک ✉:
rsadrabadi@mshdiau.ac.ir

چکیده باکتری‌های جنس *زانتوموناس* از عوامل بیماریزای محصولات زراعی بوده که باعث فساد پس از برداشت می‌شوند. خسارت اقتصادی محصولات کشاورزی در نتیجه گسترش سریع باکتری تحت شرایط مطلوب، عدم جوانه‌زنی بذر آلوده، مرگ گیاهچه و انسداد آوندی در گیاه بالغ رخ می‌دهد. این پژوهش به صورت آزمایش فاکتوریل با چهار غلظت اسانس زیره سبز (۰، ۰/۲، ۰/۴ و ۰/۸٪)، سه سطح اسیدیته (۵، ۶ و ۷)، دو سطح تلقیح باکتری (10^3 و 10^5 سلول باکتری در میلی‌لیتر) و دو دما (۲۶ و ۲۸ درجه سلسیوس) در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. رشد یا عدم رشد باکتری براساس کدورت قابل مشاهده طی ۳۰ روز قرائت و ثبت گردید. حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی اسانس بترتیب معادل ۱ و ۲٪ تعیین گردید. اسانس پی- کومینالدئید ماده اصلی تشکیل دهنده اسانس با ۵/۳۰٪ بود. عصاره زیره سبز دارای اثر ضد میکروبی بود. همچنین اسیدیته محیط کشت از عوامل موثر بر رشد باکتری بود. با افزایش اسیدیته، فاصله زمانی تلقیح تا رسیدن به رشد باکتری کاهش و سرعت رشد باکتری افزایش و در نتیجه دوره بازدارندگی رشد باکتری کاهش یافت. اثرات متقابل بین تیمارهای غلظت اسانس زیره سبز، اسیدیته محیط کشت، دما و دز تلقیح باکتری معنی‌دار بود. در مجموع، از عصاره زیره سبز به عنوان ترکیبی موثر علیه باکتری *زانتوموناس کمپستریس* می‌توان استفاده کرد.

شناسه مقاله:
نوع مقاله: **تحقیقی**
تاریخ پژوهش: **۱۳۹۳**
تاریخ دریافت: **۹۴/۰۲/۰۱**
تاریخ پذیرش: **۹۴/۰۷/۱۲**

واژه‌های کلیدی:
- ***Cuminum cyminum***
- **حداقل غلظت بازدارندگی**
- **حداقل غلظت کشندگی**
- **فعالیت ضدباکتریایی**
- **زمان رسیدن به رشد**

مقدمه اعضای جنس *Xanthomonas* در گیاهان بیماریزا می‌باشند.[۸] گونه *X. campestris* دامنه میزبانی وسیعی داشته ولی بیشتر در گیاهان خانواده چلیپاییان ایجاد بیماری می‌کند. در حال حاضر پاتوارهای آبرانس[۱]، آرموراکیا[۲]، کمپستریس[۳]، رافانی[۴]، باربارییا[۵] و ایکانیا[۶] برای این گونه شناسایی شده‌اند.[۸] این باکتری عامل پوسیدگی سیاه بوده و پاتوارهای[۷] این گونه علایم لکه برگی در گیاهان ایجاد می‌کنند.[۳۰] گزارش‌های متعددی از رخداد بیماری‌های ناشی از زانتوموناداها در گیاهان زراعی مانند گندم، برنج، چغندر قند، پنبه و نیز مریم گلی، نعناع، کلم در ایران وجود دارد و اهمیت این محصولات، پراکندگی جغرافیایی و دامنه میزبانی وسیع و سرعت خسارت بالای این باکتری پیشگیری و مهار این باکتری را دو صد چندان کرده است.[۳] کمک به مهار این باکتری‌ها در کاهش سهم دور ریز محصولات کشاورزی پس از برداشت نقش به سزایی خواهد داشت. این باکتری به ویژه در شرایط آب و هوایی گرم و مرطوب به خوبی گسترش می‌یابد و از فصلی به فصل دیگر در بذر آلوده، خاک و حتی به مدت بیشتر در بقایای گیاهی در خاک باقی می‌ماند و به آسانی از طریق آب باران به گیاهان مجاور منتقل می‌شود.[۱۵] وجود این باکتری در خاک نه تنها در شرایط مساعد باعث ایجاد بیماری در گیاه می‌شود بلکه می‌تواند منجر به بیماری‌های پس از برداشت و فساد در محصول و زیان اقتصادی شود.[۷]

از راه‌های مهار این باکتری می‌توان به استفاده از ارقام مقاوم، پیشگیری از آلودگی خاک، استفاده از سموم شیمیایی و سوزاندن بقایای آلوده اشاره کرد، این روش‌ها مناسب بوده و تا حدودی مشکلات را مرتفع ساخته، اما مشکلاتی از جمله افزایش شیوع بیماری‌های گوارشی، تنفسی، انواع سرطان‌ها، از بین بردن جانداران غیرهدف، افزایش مقاومت عوامل بیماریزا دربرابر مواد شیمیایی، گیاه‌سوزی، تجزیه‌ناپذیری یا تجزیه دیرهنگام سموم، آلودگی محیط زیست و غیره را به همراه آورده است. بروز این مشکلات نیاز به جایگزینی روش‌های مناسب‌تر برای مهار عوامل بیماری‌زا را ضروری ساخته است؛ در این بین استفاده از مواد طبیعی جدا شده از گیاهان به عنوان منابع امیدبخشی در جهت جایگزینی با مواد سنتزی به شمار می‌آید و این مواد اثر سوء بر محیط و محصول زراعی ندارد.[۱۵] اسانس‌های گیاهی از بابت اثرات ضدمیکروبی مورد بررسی‌های متفاوت قرار گرفته‌اند و مشخص گردیده است که اغلب اسانس‌های گیاهی استخراج شده دارای خواص ضدقارچی، ضدانگلی، ضدویروسی و ضدباکتریایی می‌باشند.[۱۶،۲۳،۲۵] مکانیسم اثر اسانس ها بر روی باکتری متفاوت می باشد.[۲،۱۱،۲۸] بیشتر اسانس‌ها به علت داشتن گروه‌های فعال فنولی در ساختارشان با یکدیگر مشترک هستند. اسانس‌ها در واقع به صورت پیش‌سازهای غیر فعال ذخیره شده در بافت‌های گیاهی تولید می‌شوند و سپس در پاسخ به تنش‌های محیطی آزاد می‌گردند.[۱۹] فعالیت ضدباکتریایی اسانس‌های گیاهی عمدتاً به حضور ترکیبات ترپنوئیدی و فنلی از جمله تیمول[۸]، کارواکرول[۹] و اوژنول[۱۰] می‌باشد.[۹]

زیره سبز[۱۱] گیاهی از تیره چتریان[۱۲] کوچک و علفی به ارتفاع ۱۵ تا ۵۰ سانتی‌متر و دارای ریشه دراز، باریک، به رنگ سفید و ساقه‌ای راست و منشعب به تقسیمات دوتایی است. تکثیر آن توسط بذر صورت می‌گیرد. تاریخ کشت این

[1] abbrans
[2] armorachiae
[3] campestris
[4] raphanin
[5] barbarea
[6] incanae
[7] patovar

[8] tymol
[9] carvacrol
[10] eugenol
[11] *Cuminum cyminum*
[12] apiaceae

گیاه متفاوت است و به شرایط اقلیمی محل رویش گیاه بستگی دارد. میوه زیره سبز خاصیت دارویی دارد. اسانس زیره سبز با دارا بودن ترکیباتی همچون کومین‌آلدئید[1] آلدئید[1] و لیمونن[2] می‌تواند به عنوان جایگزینی طبیعی برای ترکیبات شیمیایی مضر، مضر، به منظور مهار بیماری‌ها استفاده شود. *مقتدر و همکاران (۲۰۰۹)* ترکیبات شیمیایی و اثر ضدمیکروبی اسانس زیره سیاه را علیه *استافیلوکوکوس اورئوس*[3] و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*[4] و باکتری‌های *سودوموناس آئروجینوزا*[5]، *شیگلا فلکسنری*[6]، *کلبسیلا پنومونی*[7]، *سالمونلا تیفی*[8]، *سراشیا مارسیسنس*[9] و دو سویه *اشرشیاکلی*[10] بررسی و نشان دادند اسانس زیره سیاه اثر ضدمیکروبی قابل توجهی داشت و جایگزین مناسبی برای آنتی بیوتیک‌ها است.[۱۸] *انصاری و همکاران (۲۰۱۳)* فعالیت ضدمیکروبی اسانس و عصاره آبی و الکلی برگ اکالیپتوس علیه *سودوموناس تولاسی*[11] را بررسی کردند. نتایج نشان داد که اسانس خالص اکالیپتوس با تشکیل ۱۷ میلی‌متر قطر هاله و عصاره متانولی اکالیپتوس با ۸ میلی‌متر قطر هاله عدم رشد به ترتیب دارای بیشترین اثر ضدباکتریایی بودند.[۵] عصاره زیره سبز دارای بیشترین اثر ضد باکتریایی روی باکتری‌های *کلاویباکتر میشیگاننسیس*[12]، *اگروباکتریوم تومیفیشنس*[13]، *رالستونیا*[14]، *زانتوموناس*، *اروینیا*[15]، *رودوکوکوس*[16] و *کارتوباکتریوم*[17] بوده و کمترین اثر روی باکتری *سودوموناس* مشاهده گردید. به طور کلی نتایج آن‌ها اثر ضدباکتریایی اسانس گیاهان را در مهار بیماری‌های باکتریایی به خوبی به اثبات رساند.[۱۴]

سنچولی و همکاران (۲۰۱۲) به بررسی اثرات ضدباکتریایی اسانس نعناع، رزماری، میخک هندی، زیره سبز و سماق را علیه باکتری‌های *ویبریو آلجینولیتیکوس*[18]، *لیستریا مونوسیتوژنز*[19] و *اشرشیاکلی* بررسی کردند.[۲۶] *ربانی و همکاران (۲۰۱۴)* به بررسی اثر ضدباکتریایی اسانس اسطوخودوس بر رشد باکتری‌های *اشرشیاکلی* و *زانتوموناس کمپستریس* پرداختند و نشان دادند که اسانس گیاه اسطوخودوس اثر معنی‌داری بر بازدارندگی از رشد باکتری داشته است.[۲۴] همچنین *نیکولیتا و آلینا (۲۰۱۲)* به بررسی اثر ضدباکتریایی سه اسانس میخک، آویشن باغی، پونه کوهی بر چهار باکتری بیماریزای *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیا کلی*، *سالمونلا ایترتیدیس*[20] و *باسیلوس سرئوس*[21] با روش کشت آگار پرداختند. بیشترین بازدارندگی مربوط به اسانس پونه کوهی علیه باکتری *اشرشیا کلی* بود.[۲۲]

مطالعه حاضر به منظور تعیین اثر عوامل مختلف شامل اسانس زیره سبز، اسیدیته محیط کشت، سطوح مختلف تلقیح باکتری و دمای گرمخانه‌گذاری به تنهایی و به صورت ترکیبی بر زمان رسیدن به رشد[22] باکتری *X. campestris* انجام گرفت.

[1] cuminaldehyde
[2] limonene
[3] *Staphylococcus aureus*
[4] *Staphylococcus epidermidis*
[5] *Pseudomonas aeroginosa*
[6] *Shigella flexneri*
[7] *Klebsiella pneumonia*
[8] *Salmonella typhi*
[9] *Serratia marcesence*
[10] *Escherichia coli*
[11] *Pseudomonas tolaasii*
[12] *Clavibacter michiganensis*
[13] *Agrobacterium tumefaciens*
[14] *Ralstonia*
[15] *Erwinia*
[16] *Rhodococcus*
[17] *Curtobacterium*
[18] *Vibrio alginolyticus*
[19] *Listeria monocytogenes*
[20] *Salmonella enteritidis*
[21] *Bacillus cereus*
[22] time-to-detection (TTD)

مواد و روش‌ها اسانس زیره سبز از شرکت گل قطره توس تهیه شد. به منظور شناسایی ترکیبات تشکیل دهنده اسانس از دستگاه گاز کروماتوگرافی[1] با ستونی به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه ۲۵ میکرومتر از نوع HP-5MS استفاده گردید. برنامه حرارتی ستون به این شکل تنظیم گردید که دمای ابتدایی آون ۵۰ درجه سلسیوس در نظر گرفته شد. توقف در این دما بـه مدت ۵ دقیقه بود. دما تا ۲۴۰ درجه سلسیوس با سرعت ۱۵ درجه سلسیوس در دقیقه و شیب حرارتی ۳ درجه سلسیوس در دقیقه افزایش یافت. افزایش دما تا ۳۰۰ درجه سلسیوس و ۳ دقیقه توقف در این دما در نظر گرفته شد. دمای اتاقک تزریق ۲۹۰ درجه سلسیوس بود و از گاز هلیوم به عنوان گاز حامل با سرعت جریان ۸ میلی‌لیتر در دقیقه استفاده گردید. طیف‌نگار جرمی مورد استفاده با ولتاژ یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت، روش یونیزاسیون و دمای منبع یونیزاسیون ۲۲۰ درجه سلسیوس بود. ترکیبات اسانس در مقایسه با شاخص های بازداری نسبی مربوط با موارد موجود در سایر مطالعات یا ترکیبات معتبر موجود در آزمایشگاه مربوطه شناسایی شدند. شناسایی طیف‌ها بر اساس بانک اطلاعات جرمی دستگاه کروماتوگرافی گازی، زمان بازداری ترکیبات، محاسبه اندیس کواتس[2] و الگوی شکست آنها در مقایسه با با طیف‌های استاندارد موجود در منابع مختلف انجام گرفت.[۴،۱۷،۲۷] درصد نسبی هر یک از ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس با توجه به سطح زیر منحنی هر یک از پیک‌های کروماتوگرام دستگاه و مقایسه آن با سطح کل زیر منحنی تعیین گردید.[۱]

در این مطالعه از سویه باکتری *X. campestris* (PTCC: 1673) تهیه شده از مرکزمنطقه‌ای کلکسیون قارچ ها و باکتری‌های صنعتی ایران، به عنوان استاندارد استفاده شد. به منظور آماده‌سازی باکتری جهت تلقیح به محیط کشت ابتدا در شرایط سترون از سویه استاندارد برداشته و روی پلیت حاوی محیط آگار مغذی[3] کشت داده شد. پلیت مذکور به مدت ۲۴ساعت در دمای ۲۶ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری گردید. سپس از پرگنه‌های تازه رشد کرده روی محیط کشت برداشته و سوسپانسیونی معادل استاندارد نیم مک فارلند[4] تهیه شد. در این کدورت معادل $۵/۱ \times ۱۰^{۸}$ سلول باکتری در میلی لیتروجود داشت. برای تهیه محیط کشت طبق توصیه شرکت سازنده[5] ۲۰ گرم از پودر محیط مایع مغذی[6] در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر لیتر آب مقطر حل کرده و سپس دی‌متیل‌سولفوکساید[7] به میزان ۰/۵٪ حجم کل محیط کشت به عنوان امولسیون کننده و از آگار به میزان ۰/۰۵٪ به عنوان تثبیت‌کننده امولسیون استفاده گردید. مخلوط حاصل حرارت داده شد تا کاملاً یکنواخت و شفاف گردد. پس از سرد شدن محیط برای تنظیم سطوح مختلف اسیدیته از اسید هیدروکلریک نرمال[8] استفاده گردید. گردید. محیط کشت تهیه شده به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس سترون گردید. بعد از رسیدن دمای محیط به ۴۵ درجه سلسیوس غلظت‌های مختلف اسانس به میزان لازم بر حسب حجم محیط به آن افزوده شد. حین افزودن اسانس محیط روی حرارت اندک قرار گرفت تا عمل انحلال کامل انجام گیرد. از محیط کشت آماده در لوله‌های شیشه‌ای سترون تقسیم گردید. به تمام لوله‌ها به جز لوله‌های شاهد منفی، مقادیر مورد نظر باکتری تلقیح گردید.

برای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی اسانس از روش سری دو برابر رقت لوله‌ای[9] در محیط کشت مغذی استفاده شد. برای این منظور غلظت‌های ۴٪، ۲٪، ۱٪،

[1] gas chromatography (Agilent technologies 7890 B, USA)
[2] Kovats index
[3] nutrient agar
[4] McFarland standards
[5] Merck, Germany
[6] nutrient broth
[7] dimethyl sulfoxide (DMSO)
[8] HCl
[9] macrobroth dilution

۰.۵٪، ۰.۲۵٪، ۰.۱۲۵٪، ۰.۰۶۲٪، ۰.۰۳۲٪، ۰.۰۱۶٪، ۰.۰۰۸٪ و ۰.۰۰۴٪ از اسانس در لوله‌های آزمایش سترون حاوی محیط کشت مغذی تهیه گردید. به منظور حلالیت مناسب اسانس در محیط کشت از محلول ۱۰٪ دی‌متیل‌سولفوکساید استفاده شد. سپس از باکتری مورد نظر به میزان 10^6 (سلول در میلی لیتر) به هر کدام از لوله‌ها تلقیح گردید. برای هر تکرار، یک لوله شاهد منفی فاقد باکتری و یک لوله شاهد مثبت و فاقد اسانس تهیه شد. تمامی لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۶ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شده و پس از طی این مدت، لوله‌ها از نظر کدورت حاصل از فعالیت و رشد باکتری مورد بررسی ماکروسکوپی قرار گرفتند. حداقل غلظت بازدارندگی رشد برای لوله‌ای در نظر گرفته شد که حاوی کمترین غلظت اسانس باشد و کدورت قابل ملاحظه‌ای در آن ایجاد نشده باشد. برای تعیین حداقل غلظت کشندگی باکتری از لوله‌هایی که در آنها کدورت قابل مشاهد دیده نشد روی محیط کشت جامد مولر هینتون آگار[1] کشت داده شد و پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۶ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری گردیدند. کمترین غلظتی که هیچ رشدی از باکتری در آن مشاهده نشد به عنوان حداقل غلظت کشندگی در نظر گرفته شد. پس از تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی، غلظت‌های مناسب و پایین‌تر از آن برای بررسی اثرات ضدباکتریایی اسانس انتخاب گردید. در این مطالعه چهار سطح اسانس ۰، ۲/۰، ۴/۰ و ۸/۰٪، سه سطح اسیدیته شامل ۵، ۶ و۷، دو سطح تلقیح (10^3 و 10^5 سلول در میلی‌لیتر) و دو شرایط دمایی مختلف (۲۶ و ۲۸ درجه سلسیوس) به تنهایی و یا به صورت ترکیبی روی باکتری *X. campestris* بررسی شد. وضعیت رشد یا عدم رشد باکتری در لوله‌ها به مدت ۳۰ روز قرائت و ثبت گردید. کلیه آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شد. داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار R[2] مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. مقایسه میانگین‌ها به روش حداقل اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ انجام گرفت.

نتایج و بحث

تجزیه اسانس زیره سبز

اسانس‌های گیاهی واجد ترکیبات ضدباکتریایی متفاوتی علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی می‌باشند.[۴] اسانس‌هایی که دارای ترکیبات فنولی مانند تیمول، کارواکرول، گاماترپینن[3] و پاراسیمن[4] هستند خاصیت ضدباکتریایی آن‌ها شدید گزارش شده است.[۱۶،۲۳،۲۵] اگر چه بروز فعالیت ضدباکتریایی اغلب آنها بسیار واضح است، ولی سازوکار عمل آن به طور کامل درک نشده است. شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد اسانس‌ها اثر ضد باکتریایی خود را از طریق تغییر ساختار و عمل غشای سلولی اعمال می‌کنند.[۲۸،۱۱،۲] اجزا اسانس با نفوذ در غشاء منجر به متورم شدن غشاء گردیده و فعالیت آن را کاهش می‌دهد و در نهایت منجر به مرگ سلول خواهد شد.[۱۲،۹] در این مطالعه ۱۹ جزء در اساسنس زیره سبز تشخیص داده شد که ۸/۸۳٪ اسانس را تشکیل می‌دادند (جدول ۱). اجزای اصلی اسانس شامل پی‌کومینالدئید[5] به میزان ۵/۳۰٪ و پی‌سایمن به میزان ۵/۱۴٪ بودند که با مطالعات قبلی مطابقت داشت.[۶]

حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی اسانس

حداقل غلظت بازدارندگی اسانس زیره سبز برای باکتری *X. campestris* معادل ۱٪ و حداقل غلظت کشندگی آن معادل ۲٪ تعیین گردید. در این غلظت‌ها باکتری هیچگونه رشد قابل مشاهده‌ای نداشت.

[1] Muller hinton agar
[2] R software (ver. 3.1.1)
[3] γ-terpinene
[4] p-cymene
[5] p-cuminaldehyde

گوران و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که کاربرد اسانس گیاه اسطوخودوس در کنترل چند گونه باکتریایی سبب حذف و مهار تماسی باکتری‌های موجود در محیط کشت گردید. نتایج حاصل از این تحقیق نیز بیانگر اثر اسانس اسطوخودوس در کنترل باکتری *زانتوموناس کمپستریس* می باشد.[۱۰] *سویلوم و همکاران (۲۰۱۰)* به منظور بررسی اثرات ضد قارچی اسانس‌های رزماری، اسطوخودوس و مرزنجوش را علیه *Botrytis cinerea* روی میوه گوجه فرنگی آزمایش کردند. نتایج آزمایش‌ها نشان داد اسانس مرزنجوش در غلظت ۰/۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر هوا به طور کامل از رشد قارچ جلوگیری نمود. اسانس‌های رزماری و اسطوخودوس در غلظت ۱/۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بازدارنده کامل رشد قارچ بودند.[۲۹]

آزمون زیست‌سنجی

غلظت اسانس زیره سبز اثر معنی‌داری در زمان رسیدن به رشد باکتری داشته است و با افزایش غلظت اسانس، طول دوره بازدارندگی به طور معنی‌داری افزایش یافت، به طوری که میانگین طول دوره بازدارندگی رشد باکتری از ۲۵/۱ روز (۳۰ ساعت) در کمترین غلظت به ۶۷/۱۵ روز (۳۷۶ ساعت) در بالاترین غلظت رسید (جدول ۲). *نخعی مقدم (۲۰۱۰)* در مطالعه‌ای گزارش کرد که با افزایش اسیدیته فعالیت ضد باکتریایی عصاره دانه جعفری روی باکتری *هلیکوباکتر پیلوری*[1] نیز کاهش پیدا کرده است. به نظر می رسد افزایش اسیدیته سبب رشد بیشتر این باکتری شده است که با نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر همخوانی دارد.[۲۱] بین سطوح مختلف تلقیح و دمای گرمخانه گذاری مورد استفاده در این مطالعه و زمان رسیدن به رشد باکتری *X. campestris* رابطه‌ی معنی‌داری وجود نداشت.در حالی که بین اثر متقابل غلظت اسانس و اسیدیته محیط کشت رابطه معنی داری وجود داشت. بیشترین زمان رسیدن به رشد باکتری در غلظت ۰/۸٪ اسانس، اسیدیته معادل ۵، سطح تلقیح $۱۰^{۳}$ سلول باکتری در میلی لیترو دمای نگهداری ۲۶ درجه سلسیوس و کمترین زمان رسیدن به رشد در سطح تلقیح $۱۰^{۵}$، اسیدیته معادل ۷، دمای ۲۸ درجه سلسیوس و بدون اسانس مشاهده گردید (جدول ۳). بدین ترتیب میانگین بیشترین زمان رسیدن به رشد ۱۹ روز و کمترین زمان رسیدن به رشد ۱۶ ساعت (۰/۶۷ روز) بود. نتایج به دست آمده با مطالعه *ربانی و همکاران* (۲۰۱۴) در رابطه با اثر ضد باکتریایی اسانس اسطوخودوس بر رشد باکتری‌های *اشرشیاکلی* و *زانتوموناس* همخوانی دارد.[۲۴]

اثر متقابل بین اسیدیته محیط کشت و سطح تلقیح باکتری در روند رسیدن به رشد باکتری *X. campestris* از رابطه معنی‌داری برخوردار نبود. بیشترین و کمترین بازدارندگی رشد باکتری به ترتیب ۳۱/۸ روز و ۵/۵ روز در تیمارهای با سطح تلقیح $۱۰^{۳}$، اسیدیته معادل ۵ و سطح تلقیح $۱۰^{۵}$و اسیدیته معادل ۷ بود (شکل ۱). *محمودی و نصرت پور (۲۰۱۳)* در مطالعه ای گزارش کردند که با افزایش غلظت اسانس آویشن باغی، بازدارندگی از رشد باکتری را به شدت افزایش داده است.[۲۰]

بین اسیدیته ۵ و اسیدیته‌های ۶ و ۷ محیط کشت و زمان رسیدن به رشد باکتری اختلاف معنی‌داری وجود داشت در حالی که بین اسیدیته ۶ و ۷ اختلاف معنی‌دار نبود. با افزایش اسیدیته طول دوره بازدارندگی باکتری *زانتوموناس کمپستریس* کاهش یافت (جدول ۲). در مطالعه‌ای که توسط *بهاتیا و شارما (۲۰۱۲)* روی اثر ضد باکتریایی اسانس‌های گیاهان براسیکا نیگرا[2] (موستارد) و گیاه زیره سبز روی چند باکتری گرم مثبت و گرم منفی صورت گرفت نشان داده شد که اسانس این گیاهان به طور مشخصی رشد باکتری‌هـــای

[1] *Hellicobacter pylori*

[2] *Brassica nigra*

جدول ۲) اثر غلظت اسانس، اسیدیته، دمای نگهداری و سطح تلقیح بر میانگین زمان رسیدن به رشد باکتری *X. campestris*

Table 2) Effect of *Cuminum cyminum* essential oil, pH, temperature and inoculums' level on time-to-detection of *X. campestris*

Factor	level	Mean ± SD	95% confidence interval	
			lower limit	upper limit
Concentration (٪)	0	1.25 ± 0.08[d*]	1.07	1.42
	0.2	4.7 ± 0.07[c]	4.53	4.88
	0.4	6.62 ± 0.08[c]	6.45	6.8
	0.8	15.67 ± 0.09[a]	15.49	15.84
pH	5	7.9 ± 0.07[b]	7.75	8.06
	6	7.22 ± 0.06[a]	7.07	7.37
	7	6.1 ± 0.08[a]	5.91	6.21
Inoculums' level	10^3	7.5 ± 0.06[a]	7.38	7.62
	10^5	6.62 ± 0.08[a]	6.5	6.75
Temperature (°C)	26	7.29 ± 0.06[a]	7.17	7.42
	28	6.83 ± 0.08[a]	6.71	6.96

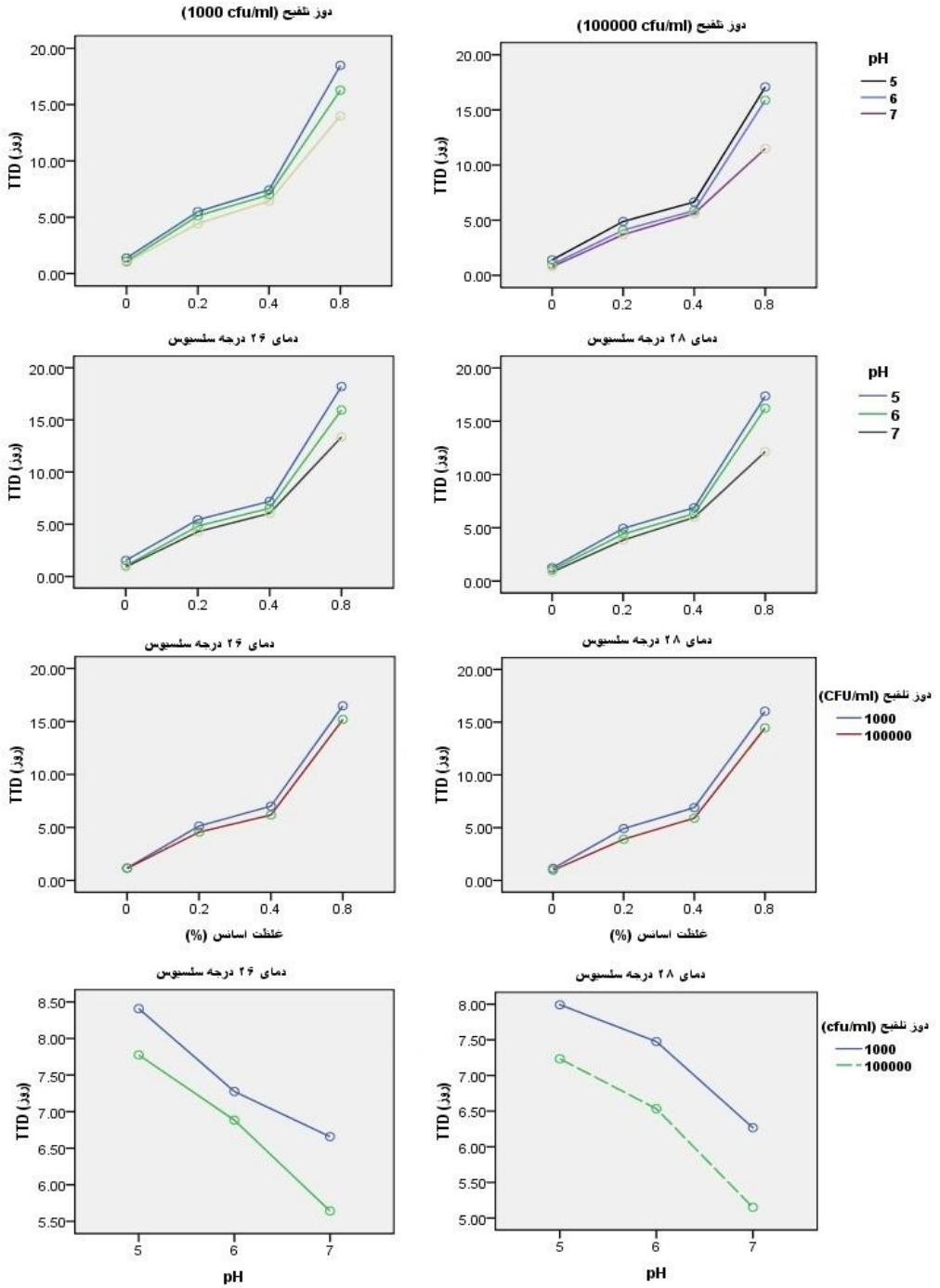
* مقادیری که با حروف یکسان نشان داده شده‌اند در سطح ۵٪ معنی دار نیستند.

* Values shown with the same letter(s) are not significant at $p<0.05$.

جدول ۳) اثر متقابل غلظت اسانس، اسیدیته، سطح تلقیح و دمای نگهداری در میانگین فاصله زمانی تلقیح تا رسیدن به رشد باکتری *X. campestris*

Table 3) The TTD (days) of *X. campestris* in NB broth as affected by pH, EO concentration, inoculums' level (IL) and temperatures (T).

Factors			EO concentration levels (%)			
T (ºC)	IL (CFU/ml)	pH	0	0.2	0.4	0.8
26	10^5	5	1.58	5	7	17.5
		6	1.17	4.5	6.5	16.5
		7	1	4	6	12
	10^3	5	1.92	6	7.5	19
		6	1.3	5.5	7.5	16
		7	1	4.5	6.5	15
28	10^5	5	1	4.5	6.5	17
		6	1.1	4	6	15.5
		7	0.67	3.5	5.5	11
	10^3	5	1.5	5.5	7	18
		6	0.75	5	7	17
		7	0.83	4.5	6.5	13.5



شکل ۱) اثر متقابل غلظت اسانس زیره سبز ، اسیدیته و سطح تلقیح بر میانگین زمان رسیدن به رشد باکتری *X. campestris* در دماهای ۲۶ و ۲۸ درجه سلسیوس

Figure 1) Effect of *Cuminum cyminum* concentration, acidity and inoculum level in combination on average time to detection of *X. campestris* at 26 and 28°C

متقابل بین اسیدیته محیط کشت و سطح تلقیح باکتری در روند رسیدن به رشد باکتری *X. campestris* از رابطه معنی‌داری برخوردار نبود. کمترین بازدارندگی رشد باکتری به ترتیب ۳۱/۸ روز و ۵/۵ روز در تیمارهای با سطح تلقیح 10^3، اسیدیته معادل ۵ و سطح تلقیح 10^5و اسیدیته معادل ۷ بود (شکل ۱). *محمودی و نصرت پور (۲۰۱۳)* در مطالعه ای گزارش کردند که با افزایش غلظت اسانس آویشن باغی، بازدارندگی از رشد باکتری را به شدت افزایش داده است.[۲۰] بین اسیدیته ۵، ۶ و ۷ محیط کشت و زمان رسیدن به رشد باکتری اختلاف معنی‌داری وجود داشت در حالی که بین اسیدیته ۶ و ۷ اختلاف معنی‌دار نبود. با افزایش اسیدیته طول دوره بازدارندگی باکتری *زانتوموناس کمپستریس* کاهش یافت (جدول ۲). در مطالعه‌ای اثر ضدباکتریایی زیره سبز روی چند باکتری گرم مثبت و گرم منفی ثابت شده که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد.[۶] بررسی ارتباط بین سطح تلقیح و دمای نگهداری نیز نشان داد که بیشترین بازدارندگی رشد مربوط به سطح تلقیح 10^3 و دمای ۲۶ درجه سلسیوس و به مدت ۷۱/۷ روز می‌باشد (شکل ۱). اثر متقابل هر چهار عامل غلظت اسانس، اسیدیته، سطح تلقیح باکتری و دمای نگهداری در روند رسیدن به رشد باکتری در جدول ۳ نشان داده شده است. کمترین و بیشترین زمان رسیدن به رشد به ترتیب از ۱۶ ساعت تا ۱۹ روز (۴۵۶ ساعت) گزارش شد. بررسی ارتباط بین سطح تلقیح و دمای نگهداری نیز نشان داد که بیشترین بازدارندگی رشد مربوط به سطح تلقیح 10^3 و دمای ۲۶ درجه سلسیوس و به مدت ۷۱/۷ روز می‌باشد (شکل ۱).

کمترین و بیشترین زمان رسیدن به رشد به ترتیب از ۱۶ ساعت تا ۱۹ روز گزارش شد (جدول ۳). اثر بازدارندگی اسانس آویشن برابر *پکتوباکتریوم* ثابت شده است[۱۳] *سنچولی و همکاران (۲۰۱۲)* با بررسی اثر ضدباکتریایی اسانس نعناع، رزماری، میخک هندی، زیره سبز و سماق را علیه باکتری‌های *ویبریو آلجینولیتیکوس*، *لیستریا مونوسیتوژنز* و *اشرشیا کلی* اعلام کردند که اسانس میخک هندی عملکرد قوی‌تری داشته و باکتری‌ها نسبت به آن حساس‌تر بودند و اسانس رزماری ضعیف‌تر و باکتری‌ها نسبت به آن در مقایسه با سایر اسانس‌ها مقاوم‌تر بود.[۲۶]

غلظت‌های مختلف اسانس زیره سبز، اسیدیته مختلف محیط کشت، دوزهای مختلف تلقیح و دماهای مختلف نگهداری اثر معنی‌داری در روند رشد باکتری *زانتوموناس کمپستریس* داشت (جدول ۴).

نتیجه‌گیری کلی استفاده ترکیبی از اسانس‌های گیاهی با سایر عوامل محدود کننده رشد باکتری فوایدی همچون افزایش فعالیت، کاهش سمیت و به حداقل رساندن عوارض جانبی را در پی دارد. این روش کنترلی را می توان یک روش جایگزین مناسب و کم خطر برای کنترل نه تنها باکتری *زانتوموناس* بلکه برای تمامی عوامل بیماریزا مورد بررسی بیش‌تر قرار داد. با این حال مطالعات انجام شده در خصوص اثرات ضدباکتریایی اسانس‌ها بیشتر در محیط‌های کشت آزمایشگاهی بوده است. علاوه بر غلظت اسانس زیره سبز، عوامل دیگری چون اسیدیته محیط کشت و یا سطح تلقیح باکتری می‌توانند به طور اثربخشی از رشد باکتری جلوگیری به عمل آورند. با کاهش اسیدیته، فاصله زمانی تلقیح تا رسیدن به رشد باکتری افزایش می‌یابد.

جدول۴) تجزیه واریانس تیمارهای مختلف باکتری *X. campestris*

Table 4) Analysis of variance of different treatment on *X. campestris*

Treatment	Df	Mean squares	F	P
C[1]	3	1362.604	4.845	0.0001
pH	2	41.672	148.167	0.0001
D[3]	1	27.562	98.000	0.0001
T[2]	1	7.562	26.889	0.0001
C * pH	6	14.401	51.204	0.0001
C*D	3	2.104	7.481	0.0001
C* T	3	0.187	0.667	0.575
pH * D	2	0.609	2.167	0.120
pH *T	2	0.203	0.722	0.488
D*T	1	0.062	0.222	0.638
C* pH * D	6	1.241	4.315	0.001
C* pH * T	6	0.391	1.389	0.227
C* D *T	3	0.188	0.667	0.575
pH * T*D	2	0.203	0.722	0.488
C* pH * D* T	6	0.516	1.833	0.101
Error	96	0.281		

[1]C= Concentrations [2]T= Temperature [3]D= Inoculum level

References

1. Adams RP (1995) Identification of Essential Oils by Gas Chromatography-Mass Spectroscopy. Allured Publishing Crop: Carol Stream.
2. Aghel N, Moghimipour E, Ameri A (2007) Characterization of an antidermatophyte cream from *Zataria multiflora boiss*. Iranian Journal of Pharmacological Science 3:77–84.
3. Akhavan A, Bahar M, Saeidi G, Lak M (2009) Comparison of different methods for detection of *xanthomonas axonopodis* pv.*phaseoli* in bean seeds. Iranian Journal of Plant Pathology 45(1): 1-9.
4. Andrews JM (2001) Determination of minimum inhibitory concentrations. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 48: 5-16.
5. Ansari N, Hasanzadeh N, Rezaee MB (2013) Antimicrobial activity of essential oil and extracts of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. on *Pseudomonas tolaasii* under In vitro and In vivo conditions. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants 28(4): 709-719.
6. Bhatia M, Sharma A (2012) *Brassica nigra* and *Cuminum cyminum*: inhibitors of food borne pathogens. International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology 3(3):114-120.
7. Brath M, Hankinson TR., Zhuang H, Breidt F (2009) Microbiological spoilage of fruits and vegetables. In Sperber, WH; Doyle, MP (eds.). Compendium of a microbiological spoilage of dishes and beverages, Springer Science, Business Media, New York.
8. Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT (2005) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed., Vol.2, Part B: The Gammaproteobacteria, Springer.
9. Dufour M, Simmonds RS, Bremer PJ (2003) Development of a method to quantify in vitro the synergistic activity of "natural" antimicrobials. International Journal of Food Microbiology 85(3): 249-258.
10. Goran A, Mozafari A, Ghaderi N (2013) Effect of antimicrobial compounds in grapes *Vitis vinifera* L. surface sterilized explants in vitro. Congress of Agricultural Research University of Kurdistan. 6:1-4.
11. Hemaiswarya S, Kruthiventi AK, Doble M (2008) Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. Phytomedicine 15:639–652.
12. Holly RA, Patal D (2005) Improvement in shelf life and safely of perishable food by plant essential oil and smoke antimicrobials. Food Chemistry 22: 273-292.

13. Hosseini Nezhand M, Alamshahi L, Panjehkeh, N (2012) Biocontrol efficiency of medicinal plants against *Pectobacterium carotovorum, Ralstonia solanacearum* and *Escherichia coli*. The open conference proceedings journal 46-51.
14. Iacobellis NS, Locantore P, Senatore F, Capasso F (2005) Antibacterial Activity of *Cuminum cyminum* L. and *Carum carvi* L. Essential Oils. Journal of Agriculture and Food Chemistry 53: 57-61.
15. Jensen BD, Massomo SMS, Swai I S, Hockenhull J, Andersen SB (2005) Field evaluation for resistance to the black rot pathogen *Xanthomonas campestris pv. campestris* in cabbage (*Brassica oleracea*). European Journal of Plant Pathology 113: 297–308.
16. Kordali S, Kotan R, Mavi A, Cakir A, Ala A, Yildirim A (2005) Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculus* and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *A. dracunculus*, *Artemisia santonicum* and *Artemisia spicigera* essential oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53: 9452-9458.
17. Lorenzo D (2002) Essential oils of *Mentha pulegium* and *Mentha rotundifolia* from Uruguay. Brazilian Archives of Biology and Technology 45(4): 519-524.
18. Moghtader M, Iraj Mansori A, Salari H, Farahmand A (2009) Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Bunium persicum* Boiss. Seed. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants 25(1): 20-28.
19. Mohajerfar T, Hoseinzadeh A, Akhondzadeh-basti A, Khanjari A, Misaghi A, Gandomi nasrabadi H (2012) Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of *Zataria multiflora* Bioss. essential oil and lyzozym on *L. monocytogenes*. Journal of Medicinal Plants 11: 70-78.
20. Mahmoudi R, Nosratpour S (2013) *Teucrium polium* L. essential oil: Phytochemiacl component and antioxidant properties. International Food Research Journal 20: 1697-1702.
21. Nakhaei Moghadam M (2010) In vitro anti-bacterial activity of methanolic extract of *Apium petroselinum* L. seed against clinical isolates of *Helicobacter pylori* 87:63-70.
22. Nicolita P, Alina A (2012) Antibacterial profile of essential oils against pathogen bacteria. Bulletin UASVM agriculture.
23. Oorojalian F, Kasra-Kermanshhi R, Azizi M, Basami MR (2009) Synergistic antibacterial activity of the essential oils from three medicinal plants against some important food-borne pathogens by microdilution method. Iranian Journal of Medical and Aromatic Plants 26:133-146.
24. Rabani M, Rezaeian-Doloei R, Jabari-Noghabi M (2014) Antibacterial effect of lavender essential oils on Xanthomonas campestris and Escherichia coli. Modern Science of Sustainable Agriculture Journal 10(2): 33-42.
25. Rodriguez DJ, Castillo DH, Garcia RR, Sanchez LA (2005) Antifungal activity of *Aloevera* pulp and liquid fraction against plant pathogenic fungi. Industrial Crops and Products 21:81-87.
26. Sanchuli N, Ghaffari M, Gharaei A (2012) Antibacterial effect of some plant essential oils against *Vibrio alginolyticus*, *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. Journal of Comparative Pathobiology 3: 749-754.
27. Sokovic MD, Vukojevic J, Marin PD, Brkic DD., Vajs V, van Griensven LJ (2009) Chemical composition of essential oils of *Thymus* and *Mentha* species and their antifungal activities. Molecules 14: 238-249.
28. Soltandalal MM, Bayat M, Yazdi MH, Aghamiri S, Ghorbanzade-Meshkani M, Peimane-Abedimohtaseb T, Shojai-Saadi B (2012) Evaluation of antimicrobial effect of *Zataria multiflora* essential oil on antibiotic resistant *Staphylococcus aureus* isolates from food products. Journal of Kurdistan University of Medical Sciences 17: 21-29.
29. Soylum M, Kurt S, Soylu S (2010) *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of the essential oil of various plants againsttomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. International Journal of Food Microbiology 143: 183-189.
30. Zhao Y, Damicone JP, Demezas DH, Bender CL (2000) Bacterial leaf spot diseases of leafy crucifers in Oklahoma caused by pathovars of *Xanthomonas campestris*. Plant Disease 84: 1008–1014.

The effect of *Cuminum cyminum*, acidity, temperature and inoculums' level on the growth of *Xanthomonas campestris*

Agroecology Journal
Volume 11, Issue 3, pages: 57-68
autumn, 2015

Nazanin Miri
Master of seed science and technology
Department of Agronomy and Plant Breeding
Mashhad Branch
Islamic Azad University
Mashhad, Iran
Email ✉:
nazy.miri@gmail.com

Roya Rezaeian-Doloei * and Reza Sadrabadi Haghigh
Assistant professor and professor
Department of Agronomy and Plant Breeding
Mashhad Branch
Islamic Azad University
Mashhad, Iran
Emails ✉:
royarezaeian@mshdiau.ac.ir (corresponding author)
rsadrabadi@mshdiau.ac.ir

Received: 22 April 2015 **Accepted:** 04 October 2015

ABSTRACT The *Xanthomonas* genus is one of the most important groups of plant pathogenic bacteria that cause post-harvest spoilage. Substantial crop losses may result from the rapid spread of the bacteria under favorable conditions, lack of seed germination, seedling death and vascular obstruction of plant. The aim of this study was to investigate the combined effects of different concentrations of *Cuminum cyminum* essential oil (EO; including 0, 0.2, 0.4 and 0.8%), three levels of acidity (5, 6 and 7), two inoculums' level (10^3 and 10^5 CFU/ml) and two incubation temperatures (26 and 28˚C) on the growth of *X. campestris* in the nutrient broth medium in a completely randomized design with three replications. Growth was monitored by visible turbidity during a 30-day period. The minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of EO against *X. campestris* was 1 and 2% respectively. According to the results, P-cuminaldehyde was the main component, with a content of 30.5%. The statistical analysis of data showed that the maximum time to detection of bacteria (19 days) in the concentrations of 0.8% EO, pH of 5, the inoculum level of 10^3 CFU/ml and incubation temperature of 26˚C and the minimum time to detection (16 hours) in the inoculums level of 10^5 CFU/ml, pH of 7, 28 ˚C and no EO was observed. In addition to the concentration of *Cuminum cyminum* EO as an antimicrobial agent, acidity of medium is also considered the factors influencing the growth of *X. campestris*. By decreasing the pH, the time-to-detection of bacteria was increased. In conclusion, using a combination of different factors can inhibit the growth of bacteria, significantly.

Keyword:
- *Cuminum cyminum*
- minimum inhibitory concentration
- minimum bactericidal concentration
- antibacterial effect
- time-to-detection