خاصیت ضدباکتریایی گیاه صبر زرد علیه باکتری *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* عامل پوسیدگی نرم سیب‌زمینی

رضا رضایی[۱]، سلیمان جمشیدی[۱]، ابوالقاسم قاسمی[۲]

۱- باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد میانه، دانشگاه آزاد اسلامی، میانه، ایران

۲- مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

مسئول مکاتبات: سلیمان جمشیدی، پست الکترونیک: s.jamshidi@m-iau.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۴/۰۷/۰۶ ۴ (۱) ۵۳-۶۳ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۶/۲۳

چکیده

در این مطالعه اثر بازدارندگی عصاره‌ی اتانولی، متانولی، استونی و کلروفرمی بخش‌های مختلف برگ گیاه صبر زرد شامل بخش پارانشیمی، ژل و شیرابه بر باکتری عامل بیماری پوسیدگی نرم غده سیب‌زمینی *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* به‌روش نشر در آگار بررسی شد. همچنین اثر باکتری‌ایستایی و باکتری‌کشی عصاره‌های مذکور در شرایط آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار گرفت. تمام بخش‌های برگ گیاه صبر زرد حاوی ترکیبات ضدباکتریایی بودند. حلال متانول، عصاره‌هایی با بازدارندگی نسبتا بیشتری را ایجاد نمود. اثر باکتری‌ایستایی و باکتری‌کشی عصاره‌های کلروفرمی در قیاس با عصاره سایر حلال‌ها، ضعیف‌تر بود. اثر باکتری ایستایی و باکتری‌کشی ژل روی باکتری مورد مطالعه از سایر قسمت‌های برگی بیشتر بود. در کل، ۳۱ ترکیب از مواد گیاهی گیاه صبر زرد با روش کروماتوگرافی گازی استخراج شد که ۲۵ مورد آن در شیرابه‌ی گیاه یافت شد. مواد ضدباکتری چون سینامیک اسید، تترادکانوئیک اسید، ۲-هیدروکسی اتیل پروپیونیت، سیتوسترول، لوپئول و کاروون و ۱-هپتانول-۲-پروپیل و ۱و۲-بنزن دی‌کربوکسیلیک اسید در قسمت‌های مختلف برگ گیاه صبر زرد به‌عنوان مواد ضدباکتریایی وجود داشتند. با توجه به توان ضدباکتریایی عصاره‌های برگ گیاه صبر زرد، این خاصیت را می‌توان برای مهار باکتری پوسیدگی نرم باکتریایی سیب‌زمینی مد نظر قرار داد.

واژه‌های کلیدی: آلوئه ورا، کنترل طبیعی، باکتری‌کشی، باکتری‌ایستایی، مهار زیستی

مقدمه

سیب‌زمینی با داشتن مواد غذایی گوناگون نظیر مواد پروتئینی، نشاسته‌ای و املاح معدنی از غنی‌ترین منابع غذایی به‌شمار می‌رود و نیز به‌عنوان یکی از منابع تأمین برخی مواد شیمیایی صنعتی نیز مطرح می‌باشد. باکتری‌های جنس *Pectobacterium* با تولید آنزیم‌های پکتولیتیک، پوسیدگی‌های نرم در گیاهان مختلف از جمله سیب‌زمینی ایجاد می‌کنند (Permbelon *et al.*, 1979). باکتری *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* عامل بیماری پوسیدگی نرم غده سیب‌زمینی در انبار است (Azadvar *et al.*, 2007; Hooker, 1981). استفاده از ترکیبات شیمیایی برای مهار بیماری‌های گیاهی، علاوه بر آلودگی‌های زیست محیطی و بروز مقاومت به آفت‌کش‌های شیمیایی از سوی عوامل بیماری‌زا، سلامت بشر را تهدید می‌کند. بنابراین به کار بردن ترکیبات طبیعی در مهار بیماری‌های گیاهی، یکی از راهکارهای کاهش مخاطرات زیست محیطی است (Afzal *et al.*, 1997).

گیاهان منابعی غنی از مواد ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی هستند که از زمان روم باستان در طب سنتی و نیز تهیه مواد دارویی فرموله شده مورد استفاده قرار می‌گیرند (Hartwell, 1982). گیاه صبرزرد (*Aloe vera* (L.) Burm. F.) گیاهی زینتی - دارویی، پایا، مقاوم به خشکی با برگ‌های گوشتی و آبدار از تیره سوسنیان است که از اعصار قدیم با اهداف درمانی متنوع مورد استفاده بشر بوده و بررسی‌های نشان از وجود ترکیبات فعال در ژل و قسمت سبز برگ آن دارد (Mehrabian *et al*., 2012). برگ گیاه صبر زرد دارای ترکیبات فنلی متنوعی است که همگی به‌عنوان عوامل ضدمیکروبی قوی شناخته شده‌اند (Ammayappam & Jeyakodi Moses, 2009). اسید سالیسیلیک ترکیب دیگری در گیاه صبر زرد است که دارای خواص ضدباکتری بالایی است (Salar & Suchitra, 2009). همچنین ترکیباتی مثل تانن، ساپونین، فلاونوئید از این گیاه استخراج شده است (Arunkumar & Muthuselavam, 2009). ژل گیاه صبر زرد دارای بیش از ۲۰۰ نوع ترکیبات مختلف شامل ساکاریدها، آنزیم‌ها، استرول‌ها و طیف گسترده‌ای از اسیدهای آمینه و مواد معدنی می‌باشد و به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی مطرح است. همچنین اثر ضدمیکروبی ژل متانولی گیاه صبرزرد علیه چند قارچ و باکتری گرم مثبت و منفی گزارش شده است (Lawarence *et al*., 2009). طیف وسیع‌تری از فعالیت ضدمیکروبی عصاره برگی روی چند باکتری و قارچ بیماری‌زای انسانی نسبت به عصاره‌ی ژل گزارش شده است (Agarry *et al*., 2005). اثر عصاره‌های اتانولی و متانولی ژل گیاه صبر زرد در مهار باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی چشم‌گیر عنوان شده و ترکیباتی نظیر اسید پارا-کوماریک، اسکوربیک و سیانیک از آن‌ها استحصال شده است (Lawarence *et al*., 2009). عصاره‌ی استونی برگی مؤثرتر از عصاره‌ی آبی، اتانولی و متانولی علیه *Aspergillus niger* و *A. flavus* عنوان شده است (Arunkumar & Muthuselavam, 2009). فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی گیاه صبر زرد برابر سویه‌های باکتری *Escherichia coli* نیز ثابت شده و مواد مذکور به‌عنوان مؤثرترین حلال‌ها گزارش شده‌اند (Irshad *et al*., 2011). تجمع مواد ضدباکتری بیشتر در برگ‌های داخلی گیاه صبر زرد است (Salar & Suchitra 2009). این مطالعه برای ارزیابی اثر بازدارندگی، باکتری ایستایی و کشندگی عصاره‌های تهیه شده از بخش‌ای مختلف برگ و ژل و شیرابه گیاه صبر زرد با حلال‌های مختلف علیه باکتری *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* و نیز تعیین ترکیبات فنلی آن‌ها انجام گردید.

مواد و روش‌ها

جدایه‌ی بیماری‌زای باکتری *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* عامل پوسیدگی نرم سیب‌زمینی (جدایه استاندارد هلند، با کد ۱۳۴۹ جدا شده از سیب‌زمینی) از موسسه‌ی تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور دریافت شده و روی محیط کشت آگار مغذی (NA (Nutrient Agar))، خالص‌سازی و تا زمان استفاده، در یخچال با دمای ۴ درجه‌ی سلسیوس نگهداری گردید. پس از تهیه‌ی مایه‌ی تلقیح اولیه باکتری، تک کلونی برداشته شده و در سرم فیزیولوژی سترون حل شد. سوسپانسیون باکتری با روش مقایسه با استاندارد نیم مک‌فارلند در غلظت $۱/۵\times۱۰^{۸}$ سلول باکتری تنظیم شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری روی محیط کشت منعقد شده مولر هینتون آگار (Müller Hinton agar (Merck, Germany)) ساخت مرک آلمان (۳۴ گرم در لیتر) ریخته شده و با پیپت پاستور سترون روی آن پخش شد و برای مدت ۲۰ دقیقه زیر هود قرار گرفت تا محیط کشت کاملاً خشک شود. نمونه‌های برگی گیاه صبر زرد برداشت شده در شهریور ماه ۱۳۹۱ از مرکز جهاد دانشگاهی استان البرز تهیه و به آزمایشگاه انتقال یافت. برگ‌ها با آب مقطر شسته شده و با الکل ۷۰٪ ضدعفونی سطحی گردید. برای استخراج شیرابه (latex)، برگ‌های جوان گیاه صبر زرد از انتها به‌صورت عرضی برش داده شده و برگ‌ها به صورت سر و ته به‌مدت ۲۴ ساعت

داخل پتری دیش قرار شدند. شیرابه برگی به‌تدریج از برگ خارج شده و داخل پتری دیش جمع شد و ۰/۱ میلی‌لیتر از آن با ۱ میلی‌لیتر حلال خنثی دی‌متیل‌سولفوکساید (dimethyl sulfoxide (DMSO)) ترکیب شد (Mehrabian *et al.*, 2012). قسمت قاعده برگ (محل اتصال برگ به طوقه) و بخش پارانشیمی سبز رنگ فوقانی و زیرین آن برش داده شد و ژل (leaf gel) داخل یک ارلن تمیز انتقال داده شد. ژل گیاه صبر زرد در آون ۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت خشک شد و با استفاده از هاون دستی به پودر تبدیل شد. برگ گیاه صبر زردی عاری از ژل و نیز برگ کامل دارای ژل به قطعاتی به ابعاد حدود ۱ تا ۲ سانتی‌متری تقسیم شد و در دمای معمول آزمایشگاه به‌مدت چهار روز، در معرض هوا، خشک شده و در آون با دمای ۵۰ درجه‌ی به‌مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت و در نهایت با استفاده از مخلوط‌کن پودر شد. مقدار ۵ گرم از پودر ژل در ۱۰ میلی‌لیتر و مقدار ۲۰ گرم از پودر برگ بدون ژل و با ژل در ۱۰۰ میلی‌لیتر از پنج حلال متانول، اتانول، کلروفرم، استون (Merck Co., Germany) و آب در بالن ریخته شده و به‌مدت دو روز روی شیکر دورانی با سرعت ۱۱۰ دور در دقیقه قرار داده شد و سپس به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ (Hetich 22 R, Germany) گردید. برای جدا کردن حلال از عصاره و تغلیظ آن، از دستگاه روتاری به‌همراه پمپ خلاء (Heidolph, Germany) استفاده شد. عصاره‌ی غلیظ به‌دست آمده (عصاره‌ی خشک) در یخچال با دمای ۴ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شد. برای تهیه غلظت‌های مختلف از عصاره‌ی خشک، به‌ترتیب ۷، ۳۵ و ۰/۳ میلی‌گرم از عصاره‌ی غلیظ برگ کامل، برگ بدون ژل و ژل گیاه صبر زرد در یک میلی‌لیتر حلال دی‌متیل‌سولفوکساید حل شد (Agarry *et al.*, 2005; Mehrabian *et al.*, 2012). تمام عصاره‌های گیاهی به‌دست آمده از گیاه صبر زرد با استفاده از سرنگ فیلتر ۰/۲۲ میکرون سترون شد. برای آزمون زیست‌سنجی به روش نشر در آگار، ابتدا هر دیسک سترون ۶ میلی‌متری ساخت شرکت پادتن طب با ۱۵ میکرولیتر از عصاره به غلظت‌های ذکر شده از ژل، برگ و برگ کامل گیاه صبر زرد آغشته شده و به همراه دیسک‌های حاوی همین مقدار از استرپتومایسین ۱٪ به‌عنوان شاهد مثبت و حلال خنثی به‌عنوان شاهد منفی، به مدت ۱۰ دقیقه زیر هود خشکانده شد و سپس در فواصل معین حول یک دایره فرضی در وسط پتری‌دیش روی محیط کشت در سه تکرار قرار داده شدند. تشتک‌ها در دمای ۲۷ درجه‌ی سلسیوس نگهداری و قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر پس از ۲۴ ساعت اندازه‌گیری شد.

برای تعیین اثر باکتری‌ایستایی عصاره‌ها و شیرابه از روش تعیین حداقل غلظت باکتری‌ایستایی رشد (Minimum Inhibitory Concentration (MIC)) با روش رقت در آگار یا لوله‌های ترقیق حاوی محیط کشت مایع مولر هینتون براث (Müller Hinton broth) (۲۱ گرم در لیتر) استفاده شد. غلظت‌های اولیه عصاره‌ها طبق آزمون نشر در آگار تهیه شدند. از نُه لوله آزمایش حاوی ۱ میلی لیتر محیط کشت استفاده شد. یکی از لوله‌ها به‌عنوان شاهد مثبت حاوی باکتری با همان غلظت $۱/۵\times۱۰^{۸}$ سلول باکتری (شماره ۹) و دیگری حاوی حلال خنثی به‌عنوان شاهد منفی (شماره ۸) در نظر گرفته شد. یک میلی لیتر از عصاره‌های تهیه شده به‌تفکیک در لوله‌های شماره ۱ ریخته شده و به‌وسیله شیکر لوله یکنواخت شد. از لوله شماره ۱، ۱ میلی‌لیتر از عصاره به لوله شماره ۲ و از شماره ۲ به شماره ۳ تا الی آخر انتقال یافت و این کار تا لوله شماره ۷ تکرار شد و از لوله شماره ۷، ۱ میلی‌لیتر از محلول هموژن محیط کشت مایع و عصاره برداشته شده و به بیرون منتقل گردید. لوله‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند وکمترین رقتی که در مقایسه با شاهد، در آن رشدی از باکتری مشاهده نشد به‌عنوان حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد باکتری در نظر گرفته شد. برای تعیین حداقل غلظت کشنده

(Minimum Bactericidal Concentration (MBC))، از لوله‌هایی که رشدی در آن‌ها قابل مشاهده نبود، ۱۵ میکرولیتر محیط کشت مایع حاوی باکتری روی محیط کشت جامد مولر هینتون آگار منتقل شده و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۷ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شد. کمترین غلظتی که بعد از انتقال هیچ رشدی از باکتری مشاهده نشد به‌عنوان حداقل غلظت کشندگی در نظرگرفته شد (Irshad *et al.*, 2011). برای شناسایی ترکیبات شیمیایی موجود در مواد گیاهی حاصل از گیاه صبر زرد از دستگاه گاز کروماتوگرافی Hewlett-Packard 6890, USA استفاده شد. ستون مورد استفاده به‌طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر حاوی ۱۰۰٪ پلی دی متیل سیلوکسان (Polydimethylsiloxaan (PDMS)) بود که تحت اختلاف پتانسیل ۷۰ الکترون ولت قرار داشت. فاز متحرک آن گاز هلیوم با خلوص ۹۹/۹۹٪ با سرعت ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه و درجه‌ی حرارت تزریق‌کننده ۲۵۰ و حرارت منبع ۲۸۰ درجه‌ی سلسیوس بود. درجه حرارت آون از ۱۱۰ تا ۲۰۰ درجه‌ی سلسیوس با سرعت ۵ درجه‌ی سلسیوس افزایش در دقیقه برنامه‌ریزی شد به‌طوری که بعد از ۹ دقیقه به‌صورت ایزوترم (isoterm) به ۲۸۰ درجه‌ی سیلسیوس برسد. پیک‌های خروجی مواد بر اساس زمان بازداری استانداردها مورد شناسایی قرار گرفت و بر اساس سطح زیر منحنی آن‌ها تعیین مقدار شد. طرح آماری مورد استفاده در این آزمون‌ها از نوع طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار بود و نتایج با نرم‌افزار SPSS ver. 16 تجزیه و تحلیل شد تجزیه واریانس داده‌ها در سطح احتمال ۱ و ۵٪ بررسی و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ انجام شد.

نتایج

بازدارندگی گیاه صبر زرد بر باکتری *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*

تجزیه‌ی واریانس میانگین قطر هاله بازدارنده پرگنه *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* در اثر اعمال تیمارهای مختلف شامل عصاره‌های تهیه شده با حلال‌های مختلف از برگ کامل، بخش پارانشیمی برگ، ژل و شیرابه برگی گیاه صبر زرد و شاهدهای مثبت و منفی نشان داد که بین تیمارها در سطح احتمال ۱٪ اختلاف معنی‌داری وجود دارد و تیمارها از لحاظ ممانعت از رشد باکتری *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* در محیط کشت تفاوت معنی‌داری با هم داشتند. شاهد منفی شامل دیسک آغشته به حلال خنثی، هیچ نوع هاله‌ای بازدارنده‌ای اطراف خود ایجاد نکرد که این امر تأییدکننده بی اثر بودن حلال مورد استفاده از لحاظ ممانعت از رشد باکتری *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* بود. شاهد مثبت شامل آنتی‌بیوتیک استروپتومایسین، با ایجاد هاله‌ای با میانگین قطر ۱۱/۶۶ میلی‌متر، از لحاظ عددی بازدارنده‌ترین تیمار مورد استفاده بود. با این حال، تیمارهایی نظیر شیرابه، عصاره‌ی متانولی برگ کامل، کلیه‌ی عصاره‌های برگی استخراج شده با هر چهار حلال و عصاره متانولی و اتانولی ژل از لحاظ آماری توانستند اثر بازدارنده مشابهی بر رشد این باکتری بگذارند. ظاهراً حلال متانول از هر سه ماده گیاهی مورد استفاده برای عصاره‌گیری توانسته مقدار زیادی از مواد بازدارنده در برگ را آزاد نماید.

همچنین از نظر اثر ضدباکتریایی و بازدارندگی عصاره‌ی پوست برگ، تفاوتی بین نوع حلال مورد استفاده وجود نداشت. با این وجود، حلال‌های متانول و اتانول در عصاره‌گیری از ژل، موفق‌تر از استون و کلروفرم عمل نمودند و عصاره‌های استونی و کلروفرمی و اتانولی ژل با شاهد اختلاف معنی‌داری نشان ندادند. همچنین به‌نظر می‌رسد در عصاره‌گیری از برگ کامل، فقط متانول می‌تواند عصاره‌ای با قابلیت ممانعت‌کنندگی قابل توجه برابر باکتری *P. c.* subsp. *carotovorum* تولید نماید. عصاره‌های سایر حلال‌ها از برگ کامل، با هم‌دیگر و با شاهد اختلاف معنی‌داری نشان دادند. در عصاره بخش پارانشیمی برگ مقدار بیشتری از مواد بازدارنده

رشد علیه این باکتری با حلال‌های به‌کار رفته قابل استخراج بوده و اثر بیشتری بر ممانعت از رشد باکتری داشت (جدول ۱).

باکتری ایستایی و کشندگی گیاه صبر زرد بر باکتری *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*

تنها عصاره‌ی کلروفرمی برگ کامل نتوانست بر باکتری *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* اثر باکتری‌ایستایی داشته باشد. به‌عبارت دیگر به غیر از عصاره‌ی کلروفرمی برگ کامل، تمامی عصاره‌های استخراج شده از پارانشیمی برگ و ژل و برگ کامل با تمام حلال‌ها، توانستند اثر باکتری‌ایستایی داشته باشند. همچنین، تنها عصاره‌های کلروفرمی ژل و برگ کامل نتوانستند بر باکتری *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* کشنده باشند. مؤثرترین مواد باکتری ایستا مربوط به عصاره‌های ژل استخراج شده با استفاده از حلال‌های مختلف بود، که همه‌ی آن‌ها به یک اندازه بر باکتری *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* اثر باکتری‌ایستایی داشتند. همچنین عصاره‌های برگ کامل نیز به‌جز عصاره کلروفرمی به یک اندازه اثر باکتری‌ایستایی داشتند و این اثر بیشتر از اثر عصاره‌های پوست برگ و شیرابه بود. کم‌اثرترین عصاره از لحاظ اثر باکتری‌ایستایی بر باکتری *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* عصاره‌ی متانولی پارانشیم برگ بود. عصاره‌های برگی تهیه شده با سایر حلال‌ها به اندازه‌ی شیرابه باکتری‌ایستا بودند. عصاره‌های تهیه شده از ژل با حلال‌های متانول، اتانول و استون کشنده‌ترین ترکیبات تهیه شده از گیاه صبر زرد بودند. عصاره‌ی کلروفرمی ژل اثر کشنده بر این باکتری نشان نداد. کم اثر ترین عصاره از لحاظ کشندگی، عصاره‌ی متانولی پوست برگ بود. عصاره‌های برگ کامل نیز بعد از ژل اثر کشنده خوبی را نشان دادند. با دو برابر کردن غلظت بازدارنده عصاره‌های به‌دست آمده از پوست برگ و شیرابه، غلظت کشنده آن‌ها به‌دست آمد، در حالی که برای این منظور، غلظت ۱۰ برابر از ژل و ۴ برابر از برگ کامل بایستی تهیه شود (جدول ۲). در مجموع، کشندگی عصاره‌ی ژل به‌جز عصاره‌ی متانولی و کلروفرمی بیشتر از شیرابه و بخش پارانشیمی برگ بود.

ترکیبات شیمیایی استخراج شده از مواد گیاهی گیاه صبر زرد

در کل، ۳۱ ماده‌ی شیمیایی از مواد گیاهی صبر زرد با استفاده از روش کروماتوگرافی گازی استخراج شد. عصاره‌ی اتانولی برگ کامل ۳۰ مورد از این ترکیبات را به‌جز تترادکانوییک اسید (tetradecanoic acid = myristic acid) در خود داشت. این ماده در عصاره‌های استونی، اتانولی و متانولی برگ کامل و سایر عصاره‌های ژل و بخش پارانشیمی یافت نشد. به‌نظر می‌رسد که این ماده عمدتاً در شیرابه گیاه صبر زرد حضور داشته باشد. این ترکیب در عصاره‌ی کلروفرمی برگ کامل و به‌ویژه شیرابه به‌عنوان فراوانترین ماده حضور داشت. ظاهراً حلال‌های استون، متانول و اتانول در از بین رفتن آن در عصاره‌های مربوطه نقش داشته‌اند. تعداد ۲۵ نوع از ترکیبات شناسایی شده در شیرابه یافت شد. موادی چون ۲- هیدروکسی اتیل پروپیونیت، متیل فوران، سینامیک اسید، اسکوالن، سیتروسترول و لوپئول در شیرابه حضور نداشت. ترکیب ۲-هیدروکسی اتیل پروپیونیت این ماده در بخش پارانشیمی و با فراوانی بیشتر در ژل حضور داشت و می‌تواند یکی از عوامل ضدباکتری بودن این قسمت‌ها از برگ گیاه صبر زرد باشد، حلال کلروفرم در آزاد شدن ۲-هیدروکسی اتیل پروپیونیت در عصاره‌های برگ کامل، بخش پارانشیمی و ژل موفق‌تر از سایرین عمل نمود. متیل فوران نیز در بخش پارانشیمی برگ، ژل و برگ کامل به‌ویژه در عصاره‌های کلروفرمی حضور داشت. سینامیک اسید به‌عنوان یکی از شناخته‌شده ترین ترکیبات ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی با سمیّت اندک موجود در گیاهان با طیف وسیع فعالیت ضدمیکروبی شامل ضدقارچی، ضدباکتریایی و ضدویروسی است (Sova, 2012) که در تمامی عصاره‌های برگ و ژل یافت شد، اما در شیرابه وجود نداشت. این ترکیب

به‌ویژه در ژل به‌عنوان یکی از فراوانترین مواد یافت شد. اسکوالن نیز در کلیه عصاره‌های برگی و ژل به فراوانی یافت شد، اما در شیرابه وجود نداشت. ماده سیتروسترول و کاروون و لوپئول در ژل حضور نداشتند، اما در قسمت پارانشیمی برگ به مقدار زیاد موجود بودند. دو نوع ویتامین C و E یافت شد که ویتامین E در تمام بخش‌های برگی با تمام عصاره‌ها کم بیش استخراج شد، در حالی که ویتامین C در عصاره‌های بخش پارانشیمی حضور نداشت و تنها در عصاره‌های متانولی و اتانولی ژل و برگ کامل و نیز در شیرابه یافت شد. ماده ۱-هپتانول-۲-پروپیل که به‌عنوان یک ماده ضدمیکروب در برگ صبر زرد شناخته شده (Lakshmi & Rajalakshmi, 2011)، بیشتر در شیرابه و برگ کامل حضور داشت، ولی اثری از آن در هیچ یک از عصاره‌های ژل و بخش پارانشیمی مشاهده نشد. ماده ضدمیکروب دیگر، ۱و۲-بنزن دی‌کربوکسیلیک اسید بود (Lakshmi & Pa Rajalakshmi, 2011) که باز هم در شیرابه و عصاره‌های برگ کامل به جز عصاره‌ی کلروفرمی یافت شد. کمترین ترکیبات شناخته شده مربوط به عصاره‌های ژل بود که تنها ۱۳ یا ۱۴ ترکیب از ۳۱ ترکیب یافت شده، در عصاره‌های مختلف ژل یافت شد (جدول ۳).

جدول ۱- میانگین قطر هاله بازدارنده پرگنه *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* بر حسب میلی‌متر با اعمال عصاره‌های برگی، ژلی، برگ کامل و شیرابه‌ی گیاه صبر زرد.

Table 1. Inhibition zone diameter (mm) of *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* colony affected by the various extracts of leaf, gel, whole leaf and latex of *Aloe vera.*

Solvent	whole leaf	gel	rind	latex**	Streptomycin**	control**
Methanol	11.00^{ab*}	9.30^{a-d}	9.66^{a-d}	10.60^{abc}	11.66^{a}	6.00^{e}
Ethanol	6.66^{de}	8.66^{a-e}	8.66^{a-e}			
Acetone	8.33^{b-e}	7.66^{cde}	8.66^{a-e}			
Chloroform	8.00^{b-e}	8.00^{b-e}	10.00^{abc}			

* میانگین‌های دارای حرف مشترک، فاقداختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ می‌باشند. ** هیچ نوع حلالی در این موارد استفاده نشد.

*Means followed by same letter have no significant difference in 5% probability level. **No solvent was used in these cases.

جدول ۲- حداقل غلظت بازدارنده و کشنده‌ی عصاره‌های پوست برگ، ژل و برگ کامل و نیز شیرابه گیاه صبر زرد روی *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*.

Table 2. Minimal inhibitory (MIC) and bactericidal (MBC) concentrations of the various extracts of rind, gel, and whole leaf and latex of *Aloe vera.*

Plant materials	solvent	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)	MBC/MIC
Whole leaf	methanol	0.87	3.5	4
	ethanol	0.87	3.5	4
	acetone	0.87	3.5	4
	chloroform	-*	-**	-
Gel	methanol	0.03	0.3	10
	ethanol	0.03	0.3	10
	acetone	0.03	0.3	10
	chloroform	0.03	-	-
Rind	methanol	10	20	2
	ethanol	5	10	2
	acetone	5	10	2
	chloroform	5	10	2
Latex	-	5	10	2

* عدم مشاهده باکتری‌ایستایی ** عدم مشاهده باکتری‌کشی

* no bacteriostatic potential, ** no bactiocidal potential

جدول ۳- ترکیبات شیمیایی شناسایی شده از عصاره‌های مختلف و شیرابه‌ی برگ گیاه صبر زرد با کروماتوگرافی گازی.

Table 3. Identified chemical compounds of the various extracts of *Aloe vera* leaf by gas chromatography.

Compound	Retention time (min)	Rind				Gel				Whole leaf				
		chloroform	ethanol	methanol	acetone	chloroform	ethanol	methanol	acetone	chloroform	ethanol	methanol	acetone	latex
Para-xylene	3.10	6.1*	5.7	4.1	3.3	-	-	-	-	3.9	1.1	0.8	0.6	0.9
1,5-heptadien-4-one	3.86	3.3	5.2	2.8	2.5	-	-	-	-	2.5	0.9	1.2	1.0	1.8
Benzyl aldehyde	4.35	-	-	-	-	-	-	-	-	2.8	2.0	0.9	2.9	5.7
Undecan	5.40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.7	1.1	-	4.1
1-heptanol, 2-propyl	7.11	-	-	-	-	-	-	-	-	4.9	1.5	2.4	1.7	5.2
Tricyclene	7.86	1.8	1.1	0.8	1.0	2.6	2.1	2.3	2.4	2.8	1.1	0.9	1.5	1.1
Tridecane	8.33	3.2	4.6	2.9	2.1	-	-	-	-	4.3	2.5	1.2	0.9	5.7
2-hydroxy ethyl propionate	11.16	4.7	1.4	2.3	2.5	5.4	6.8	6.4	6.0	4.6	1.4	1.6	1.3	-
Hexadecane	12.05	-	-	-	-	2.4	2.0	2.3	2.7	2.7	0.9	2.0	1.0	3.3
8-methyl octahydrocumarin	12.95	1.8	1.2	1.0	1.8	-	-	-	-	1.9	1.3	1.1	1.8	2.1
Tetradecanoic acid	14.26	-	-	-	-	-	-	-	-	3.9	-	-	-	14.9
Hexadecanoic acid methyl ester	16.56	3.3	4.0	4.9	9.7	10.1	7.9	9.5	12.8	2.5	4.4	5.5	8.8	1.6
1,2-benzen dicarboxylic acid	17.40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.1	0.9	1.4	2.1
n-hexadecanoic acid	18.65	5.2	9.3	6.0	4.0	3.6	7.1	5.3	4.8	2.8	6.7	4.4	3.3	1.5
11,14-eicosadienoic acid methyl ester	19.26	3.9	0.8	0.9	1.2	-	-	-	-	3.9	1.0	1.6	2.2	5.1
7-tetradecan	19.92	6.7	1.0	0.7	1.4	-	-	-	-	5.3	0.8	1.1	1.6	4.0
Methyl furan	20.43	4.2	3.1	1.6	1.8	2.1	2.9	2.0	2.2	2.9	2.1	1.3	2.1	-
Pyrocatechol	21.15	4.6	1.4	1.2	1.4	11.2	11.4	9.2	13.7	3.6	2.6	2.0	3.8	3.5
Oleic acide	21.96	2.7	9.1	14.2	8.3	8.4	8.3	12.8	7.6	4.2	9.7	12.6	7.0	8.6
Cinamic acid	22.78	6.5	2.2	2.7	2.4	12.6	12.9	17.1	10.7	8.2	4.9	6.8	4.12	-
9,12,15-Ocatdecatrienoic acid methyl ester	23.66	1.8	3.3	3.6	5.2	-	-	-	-	3.3	6.3	7.1	10.9	10.8
Para-cumaric acid	24.82	3.2	5.1	2.5	3.7	22.8	21.3	18.2	19.6	4.5	11.4	6.6	8.0	4.3
Oxalic acid allyl hexadecyl ester	26.08	-	-	-	-	-	-	-	-	2.5	1.4	-	1.9	2.1
Didodecyl phgthlate	28.19	-	-	-	-	-	-	-	-	0.9	1.9	1.8	1.5	2.3
Squalene	31.67	4.3	4.8	6.9	8.3	6.4	4.2	4.0	7.4	1.8	3.2	4.1	6.2	-
Ascorbic acid (vitamin C)	32.36	-	-	-	-	-	4.8	6.1	-	-	1.7	2.1	-	3.0
Octadecan, 2-methyl ester	33.20	6.8	8.1	5.8	9.2	4..2	4.0	2.8	4.8	4.5	6.9	4.4	7.5	1.7
Vitamin E	35.82	1.1	0.7	0.9	1.0	1.7	1.7	1.6	2.3	2.2	1.6	1.3	1.6	2.0
Carvone	36.78	7.5	2.3	2.6	3.3	-	-	-	-	4.2	0.8	1.5	2.1	1.1
Sitosterol	39.20	6.9	18.3	21.2	16.5	-	-	-	-	3.6	10.8	15.1	8.2	-
Lupeol	40.62	4.1	6.5	7.1	6.2	-	-	-	-	2.5	3.8	4.2	3.2	-

بحث

نتایج به‌دست آمده از آزمون‌های زیست سنجی و نیز تعیین ترکیبات شیمیایی برگ گیاه صبر زرد نشان می‌دهد که تمام قسمت‌های برگ اعم از بخش پارانشیمی یا پوست برگ، ژل و شیرابه حاوی مواد ضدباکتریایی می‌باشند. با این حال، شدت بازدارندگی، باکتری‌ایستایی و کشندگی عصاره‌های به‌دست آمده از این قسمت‌ها با هم متفاوت است که به‌دلیل ماهیت مواد و میزان تجمع مواد ضدباکتریایی در بخش‌های مختلف برگی است. همچنین استفاده از حلال مناسب می‌تواند در آزاد شدن مقدار بیشتری از مواد ضدباکتریایی مؤثر باشد. در این راستا، لازم است حلال‌های دیگری نظیر دی اتیل اتر و هگزان نیز مورد آزمایش قرار گیرند. با وجودی که مقدار شیرابه در برگ بسیار کم است، اما تنها استفاده از یک میکرولیتر از این ماده توانست اثر ضدباکتری مناسبی را نتیجه دهد. همچنین خاصیت کشندگی و باکتری‌ایستایی برگ گیاه صبر زرد بیشتر به موادی مربوط می‌شود که در ژل حضور دارند، در حالی که سایر بخش‌های برگی نسبت به ژل از خاصیت باکتری‌ایستایی و به ویژه باکتری‌کشی ضعیف‌تری برخوردار می‌باشند.

لازم است ترکیبات شناسایی شده از بخش‌های مختلف برگی به‌طور خالص روی باکتری آزموده شود تا دقیقاً مشخص شود که کدام ماده در بازدارندگی و کشندگی باکتری مؤثر بوده است. این کار ممکن است به فرموله شدن ماده شناسایی شده و در نهایت کاربردی شدن و تجاری شدن فرآورده به‌دست آمده منتهی شود. تترادکانوییک اسید که عمدتاً در شیرابه یافت شد نوعی اسید چرب اشباع متداول در برخی گیاهان مثل روغن نارگیل است و در شیرابه برگ گیاه صبر زرد هم شناخته شده که آنتی اکسیدان و دارای فعالیت ضدسرطانی و نماتدکشی است (Lakshmi & Rajalakshmi, 2011). این ترکیب و برخی مشتقات آن به‌عنوان ماده ای با پتانسیل ضدباکتریایی در مقابل باکتری‌های گرم مثبت و منفی شناخته شده است و با توجه به فراوانی آن در شیرابه، ممکن است یکی از عوامل مهم مسؤول خاصیت ضدباکتریایی برگ گیاه صبر زرد باشد (Balasubramaniani *et al*., 2006). ترکیب ۲-هیدروکسی اتیل پروپیونیت ماده‌ای است که به‌عنوان باکتری‌کش به شامپوها اضافه می‌شود (De Jaham, 2003). همچنین، برخی از مشتقات متیل فوران نیز به‌عنوان مواد ضدباکتری شناخته شده‌اند (Siweka *et al*., 2009). اسکولون شناسایی شده از بخش‌های مختلف برگی گیاه صبر زرد مشخصاً به‌عنوان یک ماده ضدباکتری و آنتی‌اکسیدان شناخته شده است (Lakshmi & Pa Rajalakshmi, 2011). مواد موجود در بخش پارانشیمی مثل ماده سیتروسترول به‌عنوان ترمیم‌کننده زخم‌ها و ماده‌ای با پتانسیل ضدمیکروبی (Kiprono *et al*., 2000) و کاروون به‌عنوان افزایش دهنده ساز و کار دفاعی پوست و با پتانسیل ضدمیکروبی (Khan & Sastry, 2009) و لوپئول به‌عنوان یک ماده ضدسرطان و ضدباکتری (Suryati, 2011) احتمالاً موادی هستند که مسؤول خاصیت ضدباکتری در بخش پارانشیمی برگ می‌باشند. همچنین سینامیک اسید به‌عنوان یکی از قوی‌ترین ترکیبات ضد میکروبی به فراوانی در تمام بخش‌های برگی غیر از شیرابه موجود بود و می‌تواند در آینده به‌عنوان یکی از مواد احتمالی برای ارزیابی بیشتر علیه باکتری‌های بیماری‌زا مورد آزمون واقع شود (Sova, 2012). شیرابه به‌لحاظ برخورداری از مواد ضدمیکروبی متعدد می‌تواند به‌عنوان بخش مناسبی از برگ برای استفاده در تجاری سازی و فرموله کردن فرآورده گیاهی مدنظر قرار گیرد و با توجه به‌این که در استفاده از آن هیچ نوع حلالی هم استفاده نشد، از این دیدگاه می‌تواند اقتصادی هم باشد. با این حال، قسمت ژل مانند برگ، از مواد کشنده‌تر و باکتری ایستایی برخوردار بوده و مطالعه بیشتر برای تجاری‌سازی این بخش می‌تواند تحول قابل توجهی را سبب شود.

References

Afzal, A.M., Rahber-Bhatti, M.H. & Aslam, M. 1997. Antibacterial activity of plant diffusate against *Xanthomonas campestris* subsp. *citri.* International Journal of Pest Management, 43: 149-153.

Agarry, O.O., Olaleye, M.T. & Bello-Michoel, C.O. 2005. Comparative antimicrobial activates of *Aloe vera* gel and leaf. African Journal of Biotechnology, 4: 1413-1414.

Ammayappam, L. & Jeyakodi Moses, J. 2009. Study of antimicrobial activity of *Aloe vera*, chitosan, and curcumin on cotton, wool, and rabbit hair. Fibers and Polymers, 10: 161-166.

Arunkumar, S. & Muthuselavam, M. 2009. Analysis of phytochemical constituents and antimicrobial activities of *Aloe vera* L. against clinical pathogens. World Journal of Agricultural Sciences, 5: 572-576.

Azadvar, M., Najafinia, M. & Ershad, J. 2007. Survey on potato tuber rot in storages and fridge freezers in Jiroft region. Pazhuhesh va Sazandegi Journal, Agronomy & Horticulture, 75: 97-101. (In Persian with English summary)

Hartwell, J.L. 1982. Plants Used against Cancer: a Survey. Quarterman Publications, Lawrence.

Irshad, S., Butt, M. & Younus, H. 2011. *In vitro* antibacterial activity of *Aloe barbadensis* Miller (*Aloe vera*). International Research Journal of Pharmaceuticals, 1: 59-64.

Lawrence, R., Tripathi, P. & Jeyakumar, E. 2009. Isolation, purification and evaluation of antibacterial agents from *Aloe vera*. Brazilian Journal of Microbiology, 40: 906-915.

Mehrabian, S., Majd, A., Junubi, P. & Kheyri, A. 2012. Evaluation of latex and gel of *Aloe vera*'s various extracts properties by Ames test. Arak Medical University Journal, 15: 100-106. (In Persian with English summary)

Salar, R. & Suchitra, L. 2009. Evaluation of antimicrobial potential of different extracts of *Solanum xanthocarpum* Schrad. & Wendl. African Journal of Microbiology Research, 3: 97-100.

Lakshmi, P.T.V. & Rajalakshmi, P. 2011. Identification of phyro-components and its biological activities of *Aloe vera* through gas chromatography-mass spectrosmetery. International Research Journal of Pharmacy, 2: 247-249.

Balasubramanian, N., Vishnukant, M. & Avinash, D. 2006. Design, synthesis, antibacterial, and QSAR studies of myristic acid derivatives. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 16: 3023-3029.

de Jaham, C. 2003. Effects of an ethyl lactate shampoo in conjunction with a systemic antibiotic in the treatment of canine superficial bacterial pyoderma in an open-label, nonplacebo-controlled study. Veterinary therapeutics, 4: 94-100.

Siwek, A., Wujec, M, Stefańska, J. & Paneth, P. 2009. Antimicrobial properties of 4-Aryl-3-(2-methyl-furan-3-yl)-Δ2-1,2,4-triazoline-5-thiones. Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements, 184: 3149-3159.

Sova, M. 2012. Antioxidant and antimicrobial activities of cinnamic acid derivatives. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 12: 749-67.

Kiprono, P.C., Kaberia, F., Keriko, J.M. & Karanja, J.N.Z. 2000. The *in vitro* anti-fungal and anti-bacterial activities of beta-sitosterol from *Senecio lyratus* (Asteraceae). Naturforsch Section C, 55: 485-8.

Khan, M. & Sastry, V. 2009. Antibacterial activity of carvone containing essential oils. Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences, 2: 126-127.

Suryati, S., Hazli, N., Dachriyanus, D. & Haji Lajis, M. N. 2011. Structure elucidation of antibacterial compound from *Ficus deltoidea* Jack leaves. Indonesian Journal of Chemistry, 11: 67-70.

Antibacterial potential of *Aloe vera* against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* the causal agent of potato soft rot

Reza Rezaei[1], Soleiman Jamshidi[1], Aboulghasem Ghasemi[2]

1. Young Researchers and Elite Club, Miyaneh Branch, Islamic Azad University, Miyaneh Iran
2. Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

Corresponding author: Soleiman Jamshidi, email: s.jamshidi@m-iau.ac.ir

Received: Aug., 29, 2015 4 (1) 53-63 Accepted: Sept., 13, 2016

Abstract

In this study, the growth inhibiion potential of methanol, ethanol, acetone, and chloroform extracts of rind, gel, latex and whole leaf of *Aloe vera* was evaluated using agar diffusion disc method. The bacteriostatic and bactericidal activity were also tested by minimal inhibitive and bactericidal concentration methods. Results showed that all leaf parts of *A. vera* had antibacterial potential. Methanol could release more growth inhibitory substances than other solvents studied in disc diffusion method. Results also showed that chloroform released the lowest amount of bacteriostatic and bactericidal substances. Leaf gel showed more bacteriostatic and bactericidal activities than other leaf parts of the plant. In total, 31 chemicals were identified using gas chromatography, of which 25 were found in latex. Some antibacterial substances such as cinnamic acid, tetradecanoid acid, 2-hydroxy propionate, sitosterol, carvone, lupeol, 1-heptanol, 2-propyle, 1, 2-banzan di-carboxylic acid were found in different parts of *A. vera* leaf. Based on the overall results, the antibacterial activity of *A. vera* against the pathogenic bacteria can be considered as a biocontrol potential in the future.

Keywords: *Aloe vera*, natural control, antibacterials, bactericide, bacteriostatic, biocontrol