مقاله کوتاه

اثر ضد باکتریایی عصاره اتانولی گیاهان آویشن و زیره سیاه بر عوامل مؤثر بر بیماری‌زایی باکتری *Pectobacterium carotovorum* subsp.*carotovorum*

فرانک رحیمی، ساغر کتابچی

گروه بیماری‌شناسی گیاهی و میکروبیولوژی، دانشکده علوم، کشاورزی و تکنولوژی‌های نوین، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز، شیراز، ایران

مسئول مکاتبات: ساغر کتابچی، ایمیل: ketabchis@gmail.com

تاریخ دریافت:۹۹/۰۷/۲۹ ۸(۱) ۱۶۵–۱۷۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۳/۲۹

چکیده

باکتری *Pectobacterium carotovorum* عامل بیماری پوسیدگی نرم سیب‌زمینی است. این تحقیق به‌منظور یافتن راهکار مؤثر و بی‌خطر جهت کاهش خسارت این بیماری انجام شده است. در این پژوهش اثر ضد باکتریایی عصاره اتانولی دو گیاه دارویی آویشن شیرازی و زیره سیاه برروی عوامل موثر بر بیماری‌زایی بیماری پوسیدگی نرم سیب‌زمینی در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد بررسی قرار گرفت و فاکتورهای قطر هاله، درصد بازدارندگی، میزان بیوفیلم، تأثیر عصاره‌های گیاهی بر درصد آبگریزی، میزان چسبندگی و حرکت باکتری، اندازه‌گیری و تجزیه و تحلیل شد. نتایج آزمایش نشان داد بیشترین میزان قطر هاله چاهک در اثر کاربرد عصاره گیاهان آویشن برابر با ۹/۶۶ میلی‌متر می‌باشد. همچنین عصاره آویشن تأثیر قابل ملاحظه‌ای بر درصد بازدارندگی *P. carotovorum* در غده سیب‌زمینی به میزان ۸۷/۴۶ درصد دارد و باعث کاهش علائم بیماری روی غده سیب‌زمینی شد. اثرات گیاه آویشن و زیره سیاه بر روی دیگر فاکتورهای بیماری‌زایی به یک اندازه بوده است و هر دو گیاه از نظر آماری با شاهد تفاوت معنی‌داری را نشان دادند. عصاره آویشن با داشتن خاصیت ضد باکتریایی بیشتر و مهار حرکت باکتری باعث کنترل معنی‌دار بیماری روی غده سیب‌زمینی شده است. با توجه به نتایج این تحقیق استفاده از ترکیبات موثر عصاره آویشن جهت کنترل بیماری پوسیدگی نرم غده سیب‌زمینی بویژه در دوران انبارداری توصیه می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: *Pectobacterium carotovorum*، اثرضدمیکروبی، عصاره الکلی، فاکتور ویرولانس، پوسیدگی نرم سیب‌زمینی

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 میوه‌ها و سبزیجات در طی انتقال و نگهداری وارد می‌کنند. مطالعات انجام شده نشان می‌دهد کاهش محصولات کشاورزی ناشی از این عوامل ۳۰ الی ۴۰ درصد و گاهی اوقات بیشتر می‌شود.

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 می‌شود. دامنه میزبانی باکتری *P. carotovorum* شامل سیب‌زمینی، کلم، هویج، پیاز، گوجه‌فرنگی، فلفل سبز و هم‌چنین گیاهان زینتی مانند داوودی، شیپوری، بگونیا، گل خیری و اوپونتیا است. کلیه واریته‌های سیب‌زمینی نسبت به‌این بیمارگر حساس می‌باشند

(Degebas, 2020). شاید استفاده از سموم شیمیایی به‌عنوان اثر بخش‌ترین و سریعترین راهکار برای مدیریت بیماری‌های گیاهی به‌شمار رود ولی بدلیل آلودگی‌های زیست‌محیطی و بحث باقیمانده سموم بیش از هر زمان دیگر، برگزیدن سیاست‌های سازگار با محیط زیست و راه‌حل‌هایی برای عرضه مواد غذایی سالم در پاسخگویی به تقاضای روز افزون جمعیت و در مسیری هماهنگ با ملاحظات زیست محیطی، احساس می‌شود (Ghorbani *et al*., 2009). همچنین برای کنترل بیماری‌های باکتریایی گیاهی مانند بیماری ناشی از باکتری‌های مولد پوسیدگی نرم، ترکیب شیمیایی اثر بخش در دسترس نمی‌باشد، لذا استفاده از ترکیبات ضد میکروبی طبیعی گیاهی در کنترل این بیماری کاربرد وسیعی پیدا کرده است (Moghadam & Haji maleki, 2019) و استفاده از اسانس گیاهان دارویی باعث کنترل بیماری پوسیدگی نرم سیب‌زمینی گشته و جهت کنترل بیماری دوره انبار داری سیب‌زمینی توصیه شده است (Joseph *et a.l*, 2008)

آویش شیرازی با نام علمی *Zataria multiflora* (Boiss) و در خانواده نعناعیان قرار دارد. از موثرترین ترکیبات ضد میکروبی آن می‌توان به تیمول و کارواکرول اشاره کردکه جزو ترکیبات فنلی می‌باشند. این دو ترکیب در الکل و حلال‌های آلی حل می‌شوند و عمدتاً در طی رشد گیاه در برگ‌های جوان ذخیره می‌گردند که در خاصیت ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی آن نقش به‌سزایی دارد (Capecka *et al*., 2005; Ahmadi *et al*., 2016). بررسی عصاره آویشن درشرایط آزمایشگاه وگلخانه‌ای نشان داد که از بین تمامی عصاره‌های مورد آزمایش، عصاره‌ی متانولی آویشن در غلظت ۱۰۰۰ پی پی ام با ۸۱/۲۵ درصد بازدارندگی از رشد میسلیومی، موثرترین تیمار علیه قارچ *Fusarium culmorum* و *F. graminearum* بود (Ehterami *et al*., 2019). اثرضد باکتریایی عصاره گیاهان آویشن، سیر و مورد در غلظت‌های مختلف نشان داد که عصاره‌های گیاهی مذکور کاهش دهنده تشکیل بیوفیلم درباکتری استافیلوکوکوس اورئوس می‌باشند و این امر نقش مهمی در کاهش بیماریزایی آن دارد (Sepehri *et al*., 2014).

زیره سیاه با نام علمی *Carum carvi* در خانواده چتریان قرار داشته و با داشتن ترکیب‌های غنی از ترپنوئیدومونوترپن‌ها مانندکومین آلدئید، گاماترپینن، پاراسیمن، بتا–پینن،آلفا–پینن، میرسنولیمونن‌ف دارای خواص آنتی باکتریال وآنتیاکسیدان شناخته شده‌ای است(Fazly bazzac & Harirzadeh, 2003). نتایج مطالعه‌ای نشان داد که اسانس زیره سیاه اثر ضد میکروبی قابل قبولی را نسبت به سویه‌های اشریشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس نشان داده است (Bonyadian & Karim, 2002) و حضور میزان بالای کاروون (Carvon) و معرفی آن به‌عنوان عامل ماده موثر اصلی وکومین آلدهید (Cumin aldehyde) در اسانس زیره سیاه می‌توانند با فعالیت ضد باکتریایی خود مانع رشد باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی شده‌اند (Iacobellis *et a.l*, 2005).

تحقیقات نشان داده است که ترکیبات طبیعی با تاثیر روی عوامل بیماری‌زا مانند ممانعت از حد نصاب حسگری و به دنبال آن کاهش بیوفیلم، ممانعت از چسبندگی و ممانعت از تحرک باعث کاهش قدرت بیماری‌زایی باکتری‌ها می‌شوند (Arab soleimani *et al*., 2014). لذا دانستن چگونگی تاثیر ترکیبات طبیعی، ضمن اینکه باعث انتخاب ترکیب مناسب می‌گردد، همچنین جهت مدیریت یک بیماری میتوان ترکیب ضد باکتریایی مناسب طراحی و ساخته شود (Alrahman & Alharbi 2014)

در این تحقیق سعی شده اثرات ضد باکتریایی عصاره اتانلی دو گیاه دارویی موجود در طبیعت ایران، آویشن شیرازی و زیره سیاه جهت تعیین میزان کارایی آن‌ها روی عوامل موثر بر بیماری‌زایی بیماری پوسیدگی نرم باکتریایی سیب‌زمینی، مورد بررسی قرار گیرد، تا نحوه تاثیر اثر ضد میکروبی این ترکیبات به‌صورت دقیق مشخص گردد و با استفاده صحیح از ترکیبات طبیعی در جهت تولید محصولات ارگانیک و کاهش مصرف سموم گام برداشته شود.

مواد و روش‌ها

تهیه باکتری و اثبات بیماری‌زایی

باکتری *P. carotovorum* (PTCC 1675) متعلق به مرکز کلکسیون سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. جهت اطمینان مجدد از فعالیت بیماری‌زایی آن چند برش همسان به قطر ۵ میلی‌متر از یک سیب‌زمینی در تشتک کشت که کف آن‌ها را با کاغذ صافی پوشانده قرار داده و به وسیله لوپ سوزنی استریل از باکتری مورد نظر برداشته شد و در چهار قسمت سیب‌زمینی مایه‌زنی گردید. در مرحله بعد، مقداری آب مقطر استریل در کف پلیت جهت تأمین رطوبت ریخته و در دمای ۲۷ درجه در انکوباتور به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شد. بعد از ۴۸ ساعت هاله آلودگی بر روی سیب‌زمینی مشاهده شد. پس از اثبات بیماری‌زایی جهت آزمایشات مورد استفاده قرار گرفت (Schaad *et al*., 2001).

گیاهان و استخراج عصاره‌ها

گیاهان مورد مطالعه شامل آویشن شیرازی *Zataria multiflora*s (Bioss) و زیره سیاه *Carum carvi* بوده که از مرکز کشت و عرضه گیاهان دارویی در شیراز در اردیبهشت ۱۳۹۷ جمع‌آوری شدند. به منظور استخراج عصاره‌های گیاهی، از برگ آویشن و بذر زیره سیاه استفاده شد. در ابتدا نمونه‌ها در دمای اتاق به مدت یک هفته دور از نور آفتاب خشک و آسیاب شدند. سپس گیاهان را به مدت ۴۸ ساعت در اتانول ۹۰ درصد خیسانده و بر روی شیکر با دور مناسب عصاره‌گیری شدند. همچنین به منظور حذف مواد ریز ناخواسته، عصاره گیاهی با استفاده از کاغذ صافی فیلتر شد. سپس در شرایط خلاء و در دمای کمتر از ۴۰ درجه سلسیوس با کمک دستگاه روتاری تمام مواد و حلال‌های آلی از عصاره‌ها حذف شدند. در پایان به‌مدت ۲۴ ساعت در آون به منظور غلیظ شدن کامل قرار گرفت (Mehrgan *et al*., 2008).

بررسی اثر ضد باکتری عصاره‌های گیاهی

بررسی اثر ضد میکروبی عصاره‌ها به روش چاهک

از باکتری *P. carotovorum* سوسپانسیون با غلظت (8< log CFU ml^{-1}) تهیه و به صورت چمنی در سه جهت روی پلیت حاوی مولر هینتون آگار کشت داده شد و به وسیله قسمت انتهایی یک پیپت پاستور استریل چاهک‌های یکسانی به قطر ۶ میلیمتر روی محیط موجود در پلیت ایجاد گردید. از غلظت ۶۰۰۰ µg/mL از عصاره‌های اتانلی آویشن شیرازی، زیره سیاه به میزان ۰/۱ میلی لیتر به چاهک‌ها اضافه شد. در چاهک شاهد ۰/۱ میلی‌لیتر اتانول (حلال بدون عصاره) اضافه گردید. به منظور نشت اولیه عصاره‌ها، پتری دیش‌ها به مدت چند دقیقه قبل از گرم‌خانه گذاری، در یخچال قرار داده شدند. سپس به منظور رشد باکتری پتری دیش‌ها در ۲۷ درجه سلسیوس به مدت ۱۶ تا ۲۰ ساعت انکوبه شدند و در نهایت قطر هاله عدم رشد به وسیله کولیس اندازه‌گیری شد (Lucas *et al*., 2012). درصد بازدارندگی عصاره گیاهان مختلف براساس فرمول ذیل محاسبه شد.

$$\text{درصد بازدارندگی} = \frac{\text{قطر هاله تیمار} - \text{قطر هاله شاهد}}{\text{قطر هاله شاهد}} \times ۱۰۰$$

اثر عصاره‌ها در ممانعت از آلودگی بر روی غده سیب‌زمینی

سیب زمینی‌ها از بازار محلی و در اندازه‌های تقریباً یکسان تهیه شدند، ابتدا آن‌ها را با آب تمیز کرده و سپس به مدت ۴۰ دقیقه با ماده ضدعفونی (سبزی)، شستشو داده شدند و در شرایط آزمایشگاه خشک شدند. در مرحله بعد، به وسیله چوب پنبه سوراخ کن (کرک بورر)، سوراخی به اندازه یک سانتی‌متر ایجاد شد. ابتدا ۰/۵ میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری با جمعیت (> 8 log CFU ml^{-1}) درون چاهک ریخته، سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از غلظت ۶۰۰۰ µg/mL به حفرات ایجاد شده در سیب‌زمینی اضافه شد. سیب‌زمینی‌ها در شرایط آزمایشگاهی در دمای ۲۷ درجه سلسیوس با رطوبت ۷۰ درصدی به مدت چهار روز نگهداری شدند و در نهایت میزان قطر مقدار لهیدگی در سیب‌زمینی بررسی شد. این آزمایش به‌صورت طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام گردید (El–Zemity *et al*., 2008).

بیوفیلم

برای بررسی میزان بیوفیلم تشکیل شده توسط باکتری، از روش میکروتیتر پلیت و رنگ سنجی با کریستال ویوله استفاده شد. ابتدا ۱۸۰ میکرولیتر از محیط کشت لوریال برتانی در چاهک‌های میکرو تیتر پلیت ۹۶ خانه ریخته شد. در چاهک اول محیط کشت بدون عصاره به‌عنوان شاهد مثبت در نظر گرفته شد. در چاهک‌های بعدی در هر کدام ۱۰۰ میکرولیتر ازعصاره و ۲۰ میکرولیتراز سوسپانسیون باکتری *Pectobacterium cartovorum* subsp. *caratovorum* با جمعیت $8 \log \text{CFU mL}^{-1}$ < اضافه گردید. یک چاهک نیز بدون عصاره و باکتری به‌عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شد سپس در انکوباتورشیکردار با دور ۵۰ و دمای۲۷ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شد. بعد از ۴۸ ساعت محتویات چاهک‌ها به آرامی خارج گردید و با بافر فسفات سه مرتبه شستشو داده شدند و جهت خشک شدن میکروپلیت در دمای اتاق قرار داده شد. پس از خشک شدن ، ۲۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۶٪ به چاهک-ها افزوده تا سلول‌ها تثبیت شوند. بعد از گذشت ۱۵ دقیقه اتانول خارج گردید ومجددا در دمای محیط آزمایشگاه قرار داده شدند تا پلیت‌ها خشک گردیدند. چاهک‌ها با ۲۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله ۱٪ به مدت ۵ دقیقه رنگ‌آمیزی شد. بعد از ۵ دقیقه به منظور خارج کردن کریستال ویله اضافی، چاهک‌ها با آب شستشو داده شدند به منظور سنجش میزان رنگ متصل شده به دیواره، به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک ۳۳٪ به عنوان حلال اضافه شد و با سمپلر بخوبی هم زده شد تا رنگ‌های متصل به دیواره در اسید حل شوند سپس جذب نوری چاهک‌های و در طول موج ۴۹۲ نانومتر، توسط دستگاه الیزا ریدر قرائت شد (Akhlagi *et al*., 2020, Namasivayam &Roy. 2013).

اثر عصاره بر حرکت

در بررسی اثر عصاره‌ها بر حرکت، دو نوع حرکت مورد سنجش قرار گرفت که عبارتند از سوئیمینگ (Swimmin) و توئیچینگ (Twinching) به منظور حرکت از نوع سوئیمینگ، پلیت حاوی یک درصد تریپتون، ۰/۵ درصد کلرید سدیم و ۰/۳ درصد آگار تهیه شد، سپس از عصاره‌های اتانولی با غلظت ۶۰۰۰ µg/mL سوسپانسیون باکتری تهیه شد و از هر سوسپانسیون مقدار ۵ میکرولیتر برداشته و بر روی محیط کشت ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۷ درجه انکوبه شد. پس از این مدت، مقدار حرکت باکتری‌ها در محیط کشت، با هاله‌ای که اطراف محل تلقیح نمایان شده بود، مشاهده شد (Cox *et al*., 2000, Hossain &Tsuyumu2006).

حرکت از نوع توئیچینگ، برای بررسی این نوع حرکت از پلیت حاوی محیط کشت لوریا برتونی براث (LB) استفاده شد. در این روش باکتری به صورت سوزنی تلقیح شد، با این تفاوت که نوک لوپ سوزنی به ته پتری دیش تماس پیدا کرد. سپس به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۷ درجه سلیسیوس گرم‌خانه گذاری شد، بعد از این مدت به آرامی محیط کشت جامد از درون پتری دیش خالی شد و به آرامی با آب مقطر شستشو داده شد. سپس ته پتری دیش با محلول کریستال ویوله یک درصد به مدت یک دقیقه رنگ آمیزی شد. بدین صورت هاله حرکت باکتری در سطح پتری دیش که حاصل حرکت از نوع توئیچینگ بود، رنگ گرفت (Hossain &Tsuyumu2006).

آبگریزی و چسبندگی باکتری به سطوح مختلف

برای بررسی آبگریزی، از زایلن به عنوان یک سطح مورد اتصال، استفاده شد. ابتدا از کشت ۲۴ ساعته باکتری *P. carotovorum* در لوله‌های محیط کشت لوریا برتونی براث کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۷ درجه سلیسیوس گرم‌خانه گذاری شد. سپس لوله‌های محیط کشت حاوی باکتری در سانتریفوژ با دور ۵۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه، سانتریفوژ گردید. سپس محیط کشت تخلیه شد و رسوب باکتری سه بار به آرامی با آب مقطر شستشو داده شد، سپس از هر عصاره با غلظت بدست آمده از آزمایش بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره‌ها به مقدار ۱ میلی‌لیتر به درون لوله‌های فالکون ریخته به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد، سپس لوله‌ها با دور ۵۰۰۰ به مدت ۵ دقیق سانتریفوژ وعصاره‌ها خارج و رسوب باکتری با آب شستشو داده شد.

سپس محلول بافرفسفات (pH 6.2) به رسوب باکتری‌ها اضافه وسوسپانسیون با غلظت ($> 8 \log CFU\ ml^{-1}$) تهیه شد سپس ۳ میلی‌لیتر از محلول بافر فسفات حاوی باکتری برداشته با یک میلی‌لیتر از زایلن مخلوط شدن و بعد از ۱۰ دقیقه که در هوای محیط قرار گرفتند به‌مدت ۲ دقیقه بر روی ورتکس قرار داده شد تا به‌صورت دو فاز در بیاید. فاز آبی تخلیه و میزان جمعیت باکتری‌های موجد در زایلن با دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه گرفته شد و درصد چسبندگی باکتری به زایلن با استفاده از فرمول ذیل محاسبه شد (Joe *et al*., 2015).

میزان آبگریزی = $\frac{1-A1}{A0} \times 100$

چسبندگی به غده سیب‌زمینی

ابتدا مانند مرحله قبل، از کشت ۲۴ ساعته باکتری *P. cartovorum* در لوله‌های محیط کشت لوریا برتونی براث کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۷ درجه سلیسیوس نگهداری شدند. لوله‌های محیط کشت حاوی باکتری در سانتریفوژ با دور ۵۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه، سانتریفوژ گردید. سپس محیط تخلیه شد و رسوب باکتری سه بار به آرامی با آب مقطر شستشو داده شد، سپس از غلظت ۶۰۰۰ µg/mL ، ۱ میلی‌لیتر به درون لوله‌های فالکون ریخته به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد، سپس لوله‌ها با دور ۵۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ وعصاره‌ها خارج ورسوب باکتری با آب شستشو داده شد.سپس محلول بافرفسفات (pH۶/۲) به رسوب باکتری‌ها اضافه وسوسپانسیون با غلظت ($> 8 \log CFU\ mL^{-1}$) تهیه شد. سپس سیب‌زمینی‌ها را به قطعه‌های یک گرمی تقسیم کرده و برای ضدعفونی در معرض اشعه UV قرار داده شدند. هر قطعه از سیب‌زمینی را در ته پتری دیش قرار داده و بر روی هر کدام ۱۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری در بافر فسفات اضافه گردید و به‌مدت دو ساعت در دمای محیط قرار داده شد. بعد از دو ساعت قطعه‌های سیب‌زمینی خارج شد و محلول بافر فسفات حاوی باکتری باقیمانده در ته تشتک‌ها خارج و جمعیت باکتری‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری و با فرمول زیر محاسبه شد (Joe *et al*., 2015).

۱۰۰× (جذب نوری سلول‌های کنترل/ جذب نوری سلول‌های کنترل– جذب نوری سلول‌های تیمار شده) = چسبندگی به غده سیب‌زمینی

محاسبات آماری

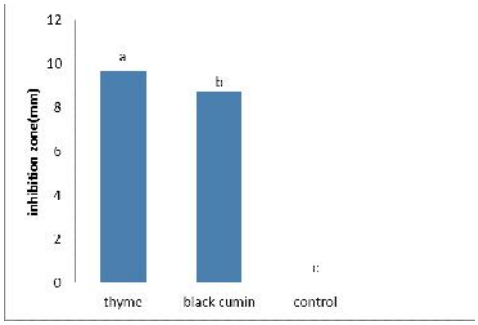
کلیه آزمایش‌های انجام شده دراین بررسی، به صورت طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد. تجزیه واریانس یک طرفه (ANOVA) در سطح معنی‌داری ۵ درصد با استفاده از نرم افزار SPSS V. 19 و مقایسه میانگین با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد. همچنین از نرم‌افزار Excel Ver. 2013 جهت ترسیم نمودارها استفاده گردید.

نتایج

شاخص‌های آزمایش

قطر هاله عدم رشد

نتایج مقایسه میانگین اثر عصاره گیاهان مختلف نشان داد که میزان قطر هاله عدم رشد در اثر کاربرد عصاره گیاهان آویشن و زیره سیاه به ترتیب برابر با ۹/۶۶ و۸/۷۳ میلی‌متر بوده و باهم و شاهد در سطح ۵ درصد اختلاف معنی داری رانشان دادند. عصاره آویشن بیشترین قطر هاله بازدازندگی را نشان داد (شکل۱).

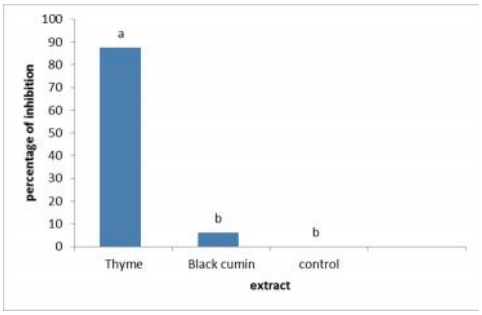


شکل ۱– قطر هاله عدم رشد عصاره اتانولی اندام گیاهی آویشن و زیره سیاه بر باکتری *Pectobacterium carotovorum* به روش انتشار در محیط کشت (چاهک)

Figure 1. Diameter of inhibition zone of the effect of Thyme and Black cumin ethanolic extract on *Pectobacterium carotovorum* by well diffiusion method

درصد بازدارندگی

نتایج مقایسه میانگین نشان داد کاربرد عصاره اندام گیاهی آویشن تأثیر قابل ملاحظه‌ای بر درصد بازدارندگی *P. carotovorum*در غده سیب‌زمینی داشت بطوری که استفاده از عصاره این گیاه باعث بیشترین درصد بازدارندگی (۸۷/۴۸ درصد) روی غده سیب‌زمینی شد و با عصاره گیاهان زیره سیاه که میزان بازدارندگی کمتر معادل ۶/۲۵ درصد داشت تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد را نشان داد. عدم کاربرد عصاره گیاهی (تیمار شاهد) هیچ گونه اثر بازدارنده‌ای بر باکتری پوسیدگی نرم سیب‌زمینی نداشت (شکل ۲).

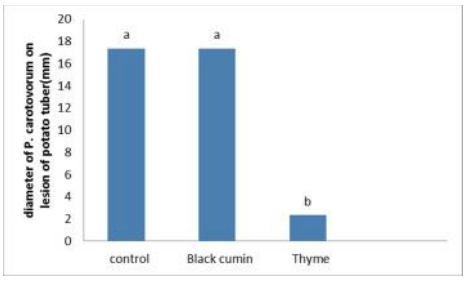


شکل ۲– تأثیر عصاره اتانولی اندام گیاهی آویشن و زیره سیاه بر درصد بازدارندگی باکتری *Pectobacterium carotovorum*

Figure 2. The effect of ethanolic extract ofThyme and Black cumin extract on the percentage of inhibition of *Pectobacterium carotovorum*

قطر آلودگی غده سیب‌زمینی

نتایج مقایسه میانگین نشان داد کاربرد عصاره اندام گیاهی آویشن تأثیر قابل ملاحظه‌ای بر شاخص قطر آلودگی غده داشت بطوری که استفاده از عصاره این گیاه باعث تولید کمترین قطر آلودگی غده شد که میزان این شاخص برابر با ۲/۳۳ میلی‌متر بود. عصاره زیره سیاه باعث تولید قطرآلودگی معادل ۱۷/۳۳ شد که با شاهد در یک گروه آماری قرار گرفت (شکل ۳).

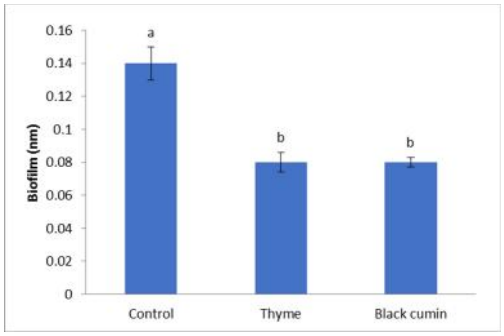


شکل ۳– تأثیر عصاره اتانولی اندام گیاهی آویشن و زیره سیاه بر قطر آلودگی *Pectobacterium carotovorum* در غده سیب‌زمینی (میلی‌متر)

Figure 3. The effect of ethanolic extract of Thyme and Black cumin on the diameter of *Pectobacterium carotovorum* on lesion of potato tuber (mm)

شاخص بیوفیلم

بر اساس نتایج مقایسه میانگین کاربرد عصاره دو گیاه آویشن و زیره سیاه تأثیر معنی‌داری در سطح ۵ درصد بر شاخص بیوفیلم نسبت به شاهد داشته و باعث کاهش بیوفیلم باکتری شدند بطوری که آویشن و زیره سیاه به ترتیب برابر با ۰/۰۸۷ و ۰/۰۸۶ نانومتر بوده است (شکل ۴).



شکل ۴– تأثیر عصاره اتانولی اندام گیاهی آویشن و زیره سیاه بر میزان بیوفیلم باکتری *Pectobacterium carotovorum*

Figure 4. The effect of ethanolic extract of Thyme and Black cumin on the biofilm of *Pectobacterium carotovorum*

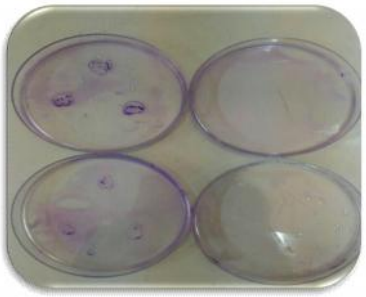
حرکت باکتری

نتایجی که در آزمایشگاه مشاهده گردید بیانگر این مطلب بود که عصاره گیاه آویشن شیرازی بطور کامل حرکت باکتری را کنترل کردند و مانع حرکت آن شدند اما

کاربرد عصاره زیره سیاه هیچ گونه اثری بر حرکت باکتری نداشت (شکل ۵ و ۶).

شکل ۵– حرکت سوئیمینگ باکتری *Pectobacterium carotovorum*

Figure 5. Swimming motion of *Pectobacterium carotovorum*

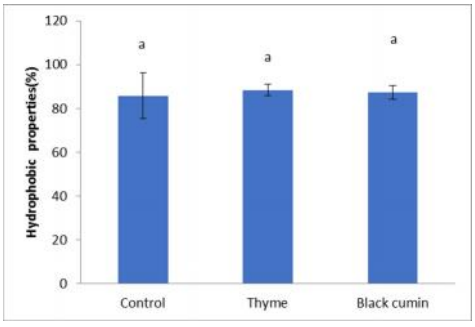


شکل ۶– حرکت توئیچینگ باکتری *Pectobacterium carotovorum*

Figure 6. Twitching motality of *Pectobacterium carotovorum*

آبگریزی

مقایسه میانگین دو عصاره آویشن و زیزه سیاه نشان داد که هردو گیاه تفاوت معنی‌داری با شاهد در میزان درصد آبگریزی نشان ندادند (شکل ۷).

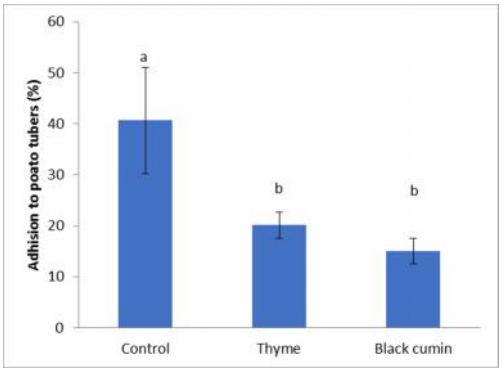


شکل ۷– تأثیر عصاره اتانولی اندام گیاهی آویشن و زیره سیاه بر خاصیت آبگریزی باکتری *Pectobacterium carotovorum*

Figure 7. The effect of ethanolic extract of Thyme and Black cumin on the hydrophobic properties *Pectobacterium carotovorum*

میزان چسبندگی به غده سیب‌زمینی

نتایج نشان داد عصاره آویشن و زیره سیاه باعث کاهش میزان چسبندگی باکتری به غده سیب‌زمینی شدند و با هم تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد نداشتند ولی با شاهد تفاوت معنی‌داری را نشان دادند (شکل ۸).



شکل ۸– تأثیر عصاره اتانولی اندام گیاهی آویشن و زیره سیاه بر میزان چسبندگی باکتری *Pectobacterium carotovorum* به غده سیب‌زمینی

Figure 8. The effect of ethanolic extract of Thyme and Black cumin on the adhesion of *Pectobacterium carotovorum* to potato tubers

بحث و نتیجه‌گیری

مطالعات انجام شده نشان داده است که بسیاری از گیاهان خانواده نعناعیان مانند آویشن شیرازی، کاکوتی، اسطوخودوس، رزماری، نعناع، مرزه، بادرنجبویه، زوفا، مرزنجوش و پونه دارای خاصیت ضد باکتریایی بوده‌اند (Kim *et al*., 2008; Ahmadi *et al*., 2016) گیاه دارویی زیره سیاه از خانواده چتریان بوده و دارای اثرات ضدمیکروبی می‌باشند (Fazly Bazzac & Harirzadeh, 2003) عصاره این گیاهان حاوی ترکیباتی مانند فنیل پروپانوئید گلوکوزید، پلی استیلن، دیترپن‌ها، است. این ترکیبات در فعالیت ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی دخالت دارند و از عصاره این گیاهان جهت کنترل بیماری‌های گیاهی استفاده شده است (Goudarzi *et al*., 2006).

در تحقیق حاضر نشان داده شد که عصاره‌های حاصل از گیاه آویشن شیرازی دارای اثر ضد میکروبی قابل قبولی بوده است. فعالیت ضد میکروبی عصاره آویشن و بویژه فعالیت ضد باکتریایی آن گزارش شده است .درتحقیقی با

تهیه یخ‌های حاوی عصاره اتانلی آویشن باعث افزایش ماندگاری ماهی شده‌اند (Oral *et al*., 2008). به دنبال آن درگزارش دیگر بر روی عصاره متانولی آویشن وبررسی خصوصات آن نشان داده شد که این عصاره روی باکتری‌های گرم منفی اثر داشته و بر باکتری‌های گرم مثبت بی‌تأثیر بوده است (Mehrgan *et al*., 2008). براساس تحقیقات انجام شده عصاره این گیاهان حاوی مقدار قابل توجهی تیمول و کارواکرول بوده که وجود این ترکیبات و نیز اثر سینرژیستی آن‌ها با سایر ترکیبات موجود در عصاره‌های این گیاهان، می‌تواند عامل فعالیت ضد میکروبی عصاره این گیاهان باشد (Dorman & Deans, 2000). ولی میزان و ترکیبات موثر و تاثیر آن بر باکتری‌ها از گونه‌ای به گونه دیگر گیاه آویشن متفاوت می‌باشد (Alrahman & Alharbi, 2014). میزان اثر ضد میکروبی اسانس و عصاره گیاهی به جایگاه گروه هیدروکسیل در ساختار فنولی آن‌ها برمی‌گردد. که در ترکیبات تیمول و کارواکرول که نقش ضدمیکروبی آن‌ها شناخته شده است و جزو ترکیبات موثر گیاه آویشن می‌باشند، وجود داشته و به آن نسبت داده شده است (Singh *et al*.,2002).

در این تحقیق کاربرد عصاره گیاهان آویشن شیرازی و زیره سیاه تأثیر معنی‌داری بر کاهش بیوفیلم داشتند به عبارت دیگر، عصاره این گیاهان مهارکننده تشکیل بیوفیلم توسط باکتری عامل پوسیدگی نرم سیب‌زمینی بودند. در گزارشی اثر ضد باکتریایی عصاره گیاهان آویشن، سیر و مورد در غلظت‌های مختلف دارای اثر ضد میکروبی و باعث کاهش بیوفیلم *Staphylococcus aureus* شده‌اند (Sepehri *et al*., 2014). غلظت‌های مختلف عصاره گیاهان آویشن، زنیان، سنجد و نوعی پنج انگشت مهار کننده تشکیل بیوفیلم در *E.coli* و باعث کاهش توان بیماری‌زایی آنان شده‌اند (Namasivayam & Roy, 2013) لذا عصاره‌های گیاهی می‌توانند با کاهش تشکیل بیوفیلم باکتری نقش مهمی در کاهش توان بیماری زایی باکتری بیمارگرها داشته باشند (Capecka & Mareczek, 2005).

دراین تحقیق کاربرد عصاره اندام گیاهی آویشن شیرازی و زیره سیاه تفاوت معنی‌داری در درصد آبگریزی با شاهد نشان ندادند. یکی از ویژگی‌های اسانس و عصاره‌های گیاهی، خاصیت هیدروفوبی یا آبگریزی آن‌ها است که این مواد را قادر می‌سازد در ساختار غشاهای لیپیدی یاخته‌های باکتریایی یا قارچی و میتوکندریایی نفوذ کنند و با اختلال در ساختار لیپیدی یاخته، باعث نفوذ پذیری و نشت مواد از غشاء می‌شوند (Burt, 2004). نشت گسترده مولکول‌های حیاتی و یون‌ها از یاخته‌های باکتریایی و اختلال در کار پمپ محرکه الکترونی، در پایان موجب مرگ آن‌ها می‌شوند (Akhlagi *et al*., 2014). باکتری‌های گرم منفی به‌علت وجود لایه لیپوپلی ساکاریدی در اطراف غشای سیتوپلاسمی مقاومت بیشتری نسبت به عصاره در مقایسه با قارچ‌ها و باکتری‌های گرم مثبت از خود نشان می‌دهند این لایه مانع برخورد ترکیبات آبگریز عصاره به غشای سیتوپلاسمی باکتری می‌شود لذا می‌توان نتیجه گرفت این دو اسانس با این شیوه از رشد باکتری *Pectobacterium caratovorum* ممانعت نکرده‌اند (Mogana *et al*., 2020).

نتایج این آزمایش نشان داد آویشن شیرازی و زیره سیاه باعث کاهش چسبندگی باکتری *P. caratovorum* به سیب‌زمینی شده‌اند. عصاره زردچوبه با ممانعت از تشکیل بیوفیلم *Streptococcus mutans* باعث کاهش چسبندگی باکتری به دندان شده است وجهت استفاده در دهانشویه‌ها به منظورکاهش عفونت دندانی توصیه شده است (Kim *et al*., 2008). در تحقیقی که روی باکتری *Erwinia amylovora* انجام شد نشان داده شد که گیاهان دارویی با تاثیر روی عوامل بیماری زای باکتری، مانع حرکت و چسبندگی و بدنبال آن کاهش بیماری زایی آن شده‌اند (Akhlagi *et al*., 2020). که ممانعت از بیان ژن‌های موثر در عوامل بیماری‌زایی باکتری یکی از دلایل کاهش قدرت بیماریزایی باکتری‌ها توسط ترکیبات طبیعی می‌باشد (Gharibeh *et al*., 2020).

گیاه آویشن شیرازی و زیره سیاه هردو باعث کاهش بیوفیلم، کاهش خاصیت آبگریزی و کاهش چسبندگی باکتری به غده سیب‌زمینی شدند ولی آویشن باعث ۸۷.۴۶ درصد کنترل بیماری بر روی غده سیب‌زمینی شد در حالی‌که زیره سیاه با توجه به اثر ضد باکتریایی بر روی باکتری

Pectobacterium caratovorum در شرایط آزمایشگاهی، روی کنترل بیماری در غده سیب‌زمینی ضعیف عمل کرد. لذا بنظر می‌آید با توجه به این‌که زیره سیاه تاثیری در مهار حرکت باکتری در شرایط آزمایشگاه نداشت فاکتور اصلی بیماری‌زایی *Pectobacterium caratovorum* توانایی حرکت و به‌عبارتی تاژک باکتری می‌باشد. با در نظر گرفتن طیف وسیع فعالیت‌های ضدمیکروبی عصاره آویشن مطابق یافته‌های این مطالعه و مطالعات سایر محققین، می‌توان از این عصاره جهت جلوگیری از رشد باکتری *Pectobacterium caratovorum* و کنترل بیماری پوسیدگی نرم در سیب‌زمینی استفاده نمود و حتی می‌توان به‌عنوان پوشش غدد در شرایط انبارداری در نظر گرفته شود، که البته این امر مستلزم انجام تحقیقات گسترده‌تر در خصوص شناسایی دقیق مکانیسم عمل هر یک از اجزای عصاره آویشن شیرازی در حوزه مولکولی و عملکرد این اجزا می‌باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان از دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز به جهت حمایت‌هایشان در انجام این تحقیق کمال تشکر را دارند. همچنین از موسسه آماری برازش، جناب آقای سید علیرضا تابعی به‌خاطر کمک‌های بی‌دریغشان در تجزیه وتحلیل آماری این تحقیق تشکر می نمایند.

References

Alrahman, I. & Alharbi, A.E. 2014. *Hibiscus sabdariffa* extract inhibits in vitro biofilm formation capacity of *Candida albicans* isolated from recurrent urinary tract infections. Asian Pacific Journal Tropical Biomedicine, 4: 104–108.

Arab Soleimani, N., Amini, Z. & Tajbakhsh, E. 2014. The study of attachment factor and biofilm formation of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from patient with urinary tract infection of Semnan Province, 18: 332–336.

Ahmadi, E., Abdollahi, A., Najafipour, S., Meshkibaf, M.H, Fasihi Ramandi, M. & Namdar, N. 2016. Surveying the effect of the Phenol Compounds on Antibacterial Activity of Herbal Extracts: In vitro Assessment of Herbal Extracts in Fasa–Fars Province. Journal of Fasa Univiversity Medical Science, 6: 210–220.

Akhlagi, M., Tarighi, S. & Taheri, P. 2020. Effect of plant essential oil on growth and virulence factors of *Erwinia amylovora*. Journal of Plant Pathology, 102: 409–419.

Bonyadian, M. & Karim, G. 2002. Study of the effect of some volatile oils of herbs (pennyroyal, peppermint, tarragon, caraway seed and Thyme) against *E. coli* and *S. aureus* in broth media. Journal of Veterinary Research. 57: 81–83

Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in food a review. International Journal of Food Microbiology, 94: 223–253.

Cox, S.D., Mann, C.M., Markham, J.L., Bell, H.C., Gustafson, J.E., Warmington, J.R. & Wyllie, S.G. 2000. The mode of antimicrobialaction of essential oil of *Melaleuca alternifola* (tea tree oil). Applied Microbiology, 88: 170–175.

Capecka, E., & Mareczek, A. Leja, M. 2005. Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some *Lamiaceae* species. Food Chemistry, 93:223–226.

Dorman, H.J.D. & Deans, S.G. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. Applied Microbiology, 88: 308–316.

Degebasa, A.C. 2020. Prospect and Challenges of postharvest losses of Potato (*Solanum Tuberosom* L.) in Ethiopia. Global Journal of Nutrition and food science, 2: 36–45.

Ehterami, P., Nematollahi, S. & Puzeshimiab, B. 2019. Application of methanolic extracts of thyme, pecan, cumin and mountain tea in the control of *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* in laboratory and greenhouse conditions. Applied research in phytomedicine, 8: 115–97.

El–Zemity, S.R., Radwan, M.A., Mohamed, S.A.E. & Sherby, S.M. 2008. Antibacterial screening of some essential oils, monoterpenoids and novel N methyl carbamates based on monoterpenoids against Agrobacterium tumefaciens and *Erwinia carotovora*. Phytopathology and Plant Protection, 41: 451–461.

Fazly Bazzaz., B.S. & Harirzadeh, G. 2003. Screening of Iranian plants for antimicrobial activity. Pharmceutical Biology, 41:573–583.

Goudarzi, M., Sattari, M., Najar piraieh, S., Goudarzi, G. & Bigdeli, M. 2006. Antibacterial effects of aqueous and alcoholic extracts of Thyme on enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Yafteh, 8: 63–69.

Gharaibeh, M., Khalifeh, M.S., Zattou, E.M. & Abu Qatouse, L.F. 2020. Potential antimicrobial effect of plant essential oil and virulence genes expression in methicillin resistance *Staphylococcus aureus* isolates.Veterinary Word, 13: 669–675.

Ghorbani R, Wilcockson S, Koocheki A & Leifert, C. 2009. Soil management for sustainable crop disease control: a review. In Organic farming, pest control and remediation of soil pollutants, 4: 177–201.

Hossain, M.M. & Tsuyumu, S. 2006. Flagella–mediated motility is required for biofilm formation by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. Journal of General Plant Pathology, 72: 34–9.

Iacobellis, N., Lo Cantore, P., Capasso, F., Senatore, F. 2005. Antibacterial activity of *Cuminumm cyminum* L. and *Carum carvi* L. essential oils Journal Agriculture Food Chemistry. 53: 57–61.

Joe, M.M., Benson, A., Saravanan, V.S. & Sa, T. 2015. In vitro antibacterial activity of nanoemulsion formulation on biofilm, AHL production, hydrolytic enzyme activity, and pathogenicity of *Pectobacterium carotovorum* sub sp. *carotovorum*. Physiological and Molecular Plant Pathology.

Joseph, B., Ahmad Dar, M & Kumar, V. 2008. Bioefficacy of plant extracts to control *Fusarium solani* f. sp. *melongenaeincitant* of Brinjal Wilt. Global Journal of Biotechnology, 3: 56–59.

Kim, J.E., Kim, H.E., Hwang, J.K., Lee, H.J., Kwon, H.k. & Kim, B.I. 2008. Antibacterial characteristics of *Curcuma xanthorrhiza* extract on *Streptococcus mutans* biofilm. The Journal of Microbiology, 46: 228–32.

Lucas, G.C., Alves, E., Pereira, R.B., Perina, F.J. & Magela de Souza, R. 2012. Antibacterial activity of essential oils on Xanthomonas vesicatoria and control of bacterial spot in tomato. Agricultural Tecnology, 47: 351–359.

Mehrgan., H., Mojabb., F., Pakdamanc, Sh. & Poursaeed, M. 2008. Antibacterial Activity of *Thymus pubescens* Methanolic Extract. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 7: 291–295.

Mogana, R., Adhikari, A., Tzar, M.N. 2020. Antibacterial activities of the extracts, fractions and isolated compounds from *Canarium patentinervium* Miq. Against bacterial clinical isolates. *BMC Complement Med Ther* 20**,** 55 .https://doi.org/10.1186/s12906–020–2837–5

Moghadam, M. & Haji maleki, H. 2019. Efficiency of essential oils against *Pectobacterium cartovorum* subsp *cartovorum* causing potato soft rot and their possible application as coating in storage.Postharvest Biology and Technology, 152.

Namasivayam. S.K. & Roy, E.A. 2013. Antibiofilm effect of medicinal plant extracts against clinical isolate of biofilm of Escherichia coli. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 5:486–489.

Oral, N., Murat, G., Leyla, V. & Abamuslum, G. 2008. Application of antimicrobial ice for extending shelf life of fish. Journal Food protection, 71: 218–222.

Schaad, N.W., Jones, J.B. & Chum, W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria (3rd ed.). American Phytopathological Society, Minnesota; USA. 373 p.

Sepehri, Z., Nasiri, A.A., Hesaraki, M., Javadian, F., Kiani, Z**.** & Fooladvand, Z. 2014. Antimicrobial properties of ethanolic extracts of thyme, case and garlic on the formation of *Staphylococcus aureus* biofilm, 2: 1027–1019.

Sepehri, G., Khazaee, M., Khaksari, M. & Gholamhoseinian Najar, A. 2014. The effect of water extract of *Zataria multiflora* on microvascular permaeability in Streptozocin induced Diabetic Rats. Annual Research and Review in Biology, 4: 3119–3127.

Antibacterial effect of ethanolic extract of *Zataria multiflora* and *Carum carvi* on factors affecting pathogenicity of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *caratovorum*

Faranak Rahimi, Saghar Ketabchi

Department of Plant Pathology, College of Science, Agriculture and Modern Technology, Islamic Azad University, Shiraz Branch, Shiraz, Iran

Corresponding author: Saghar Ketabchi, email: ketabchis@gmail.com

Received: Oct., 20, 2020 8(1) 165–175 Accepted: June, 19, 2021

Abstract

Pectobacterium carotovorum is the causative agent of potato soft rot. The aim of this study was to find an effective and safe solution to reduce the damage of this disease. The antibacterial effect of ethanolic extract of two medicinal plants *i.e.* thyme and black cumin on the pathogenic factors of *P. carotovorum* was investigated in a completely randomized design and the factors of inhibition zone diameter, inhibition percentage, biofilm, hydrophobic effect, adhesion on the potato tuber and motility of bacteria were measured and analyzed. The results showed that the maximum diameter of the inhibition zone due to the use of thyme extract was 9.66 mm. Also, thyme plant extract had a significant effect on the inhibitory percentage of *P. carotovorum* in the potato tuber by 87.46% and reduced the symptoms of the disease on the potato tuber. Effects of thyme and black cumin extracts on the other pathogenic factors were the same and both extracts showed statistically significant differences with the control. It seems that thyme extract had more antibacterial properties and because of inhibition of motility of bacteria caused significant control of the disease on the potato tubers. According to the results of this study, the use of effective compounds of thyme extract to control soft rot disease of potato tuber, especially during storage is recommended.

Keywords: *Pectobacterium cartovorum*, antimicrobial, alcoholic extract, virulence factor, potato soft rot