

مقاله تحقیقی

بررسی اثر برخی از اسانس های گیاهی روی رشد و تولید بیوفیلیم باکتری های *Pectobacterium atrosepticum* و *carotovorum*

میلاذ آئینی^۱، حسین میرزایی نجفقلی^۲، فاطمه دریگوند^۲، میترا خادمی^۳، ندا روحانی^۲

۱- گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۲- گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران

۳- گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران

مسئول مکاتبات: میلاذ آئینی، ایمیل m.aeini@scu.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۱۰

۹(۲)۱۳۵-۱۵۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۸/۱۸

چکیده

این تحقیق با استفاده از برخی ترکیبات طبیعی برای مدیریت بیماری های پوسیدگی نرم باکتریایی با عامل *Pectobacterium* sp. انجام شد. اسانس گیاهان به لیمو (*Lippia citriodora*)، پونه کوهی (*Origanum vulgare*)، گوش بره (*Phlomis fruticosa*)، مرزه (*Satureja spicigera*) و میخک (*Syzygium aromaticum*) با روش تقطیر با آب، استخراج و اثر بازدارندگی آن ها در برابر بیمارگرهای باکتریایی عامل پوسیدگی نرم *Pectobacterium atrosepticum* و *Pectobacterium carotovorum* در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد. اثرات ضد میکروبی اسانس های گیاهان دارویی به روش نشت در آگار نشان داد که تمامی اسانس های مورد مطالعه دارای اثرات بازدارندگی معنی داری ($P \leq 0.01$) در جلوگیری از رشد بیمارگرهای باکتریایی بودند. اثر حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) اسانس ها بر تشکیل بیوفیلیم دو عامل بیمارگر، نشان داد که در غلظت بالای MIC اسانس، یعنی در غلظت ۱۲۵ پی پی ام بیوفیلیم تشکیل نشده، اما در غلظت های کمتر مثل ۱۵/۶۲ پی پی ام، بیوفیلیم تشکیل شد. محاسبه غلظت بازدارنده افتراقی (شاخص FIC) حاکی از این بود که ترکیب های اسانس مرزه با به لیمو علیه باکتری *P. carotovorum* فاقد اثر بودند. تجزیه و تحلیل عناصر سازنده اسانس ها با کروماتوگرافی گازی-طیف سنجی جرمی (GC-MS) نشان داد که سیس-توجون (۱۷/۴۷٪)، ایزوژرانول (۲۳٪)، سیس-پیپریتون (۲۹/۵٪)، کارواکرول (۸۸/۵٪) و اوژنول (۹۸/۷٪) به ترتیب ترکیبات فعال اصلی در اسانس های فرار گوش بره، به لیمو، پونه کوهی، مرزه و میخک بودند. نتیجه این که اسانس های مورد مطالعه دارای اثرات ضد میکروبی بر باکتری های مذکور بوده و از بین اسانس های مورد بررسی اسانس های به لیمو و گوش بره قوی تر بودند. براساس تحقیقات حاضر به نظر می رسد ماده مؤثره این دو اسانس در کنترل بیماری باکتریایی مورد نظر قابل استفاده باشد. همچنین توصیه می شود تاثیر این دو اسانس برای کنترل باکتری های بیماری زای دیگر بررسی گردد.

واژه های کلیدی: گیاهان دارویی، بازدارندگی، به لیمو، پونه کوهی، گوش بره، مرزه، میخک

مقدمه

آن ها کاهش یابد. یکی از دلایل لزوم کاهش استفاده از سموم و آنتی بیوتیک ها، امکان ظهور سویه های بیماری زا مقاوم به آن محصولات ضد میکروبی و خطر انتقال ژن های مقاوم به آنتی بیوتیک به سایر باکتری هاست. از طرف دیگر، تجمع این ترکیبات شیمیایی ممکن است منجر به اثرات

بیماری های گیاهی عامل زیان اقتصادی مهم در کشاورزی و بروز مشکلات بهداشتی هستند. سموم شیمیایی و آنتی بیوتیک ها از روش های مهار عوامل باکتریایی هستند. با این حال، به دلایل متعددی توصیه شده است که استفاده از

2006). اگر بیمارگر موفق به نفوذ به گیاه شود، شروع به ترشح آنزیم‌های تخریب‌کننده دیواره سلولی گیاه مانند پکتات لیاز (Pel)، پلی گالاکتروناز (Peh)، پروتاز (Prt) و سلولاز (Cel) از طریق سیستم ترشح نوع II (T2SS) می‌کند. این آنزیم‌ها مسئول خیساندن بافت گیاهی و ایجاد بیماری هستند (Davidsson et al., 2013). اگرچه کنترل مؤثری برای مدیریت بیماری پوسیدگی نرم وجود ندارد، اما استراتژی‌های مختلفی از جمله تیمارهای شیمیایی مصنوعی، استفاده از مواد گیاهی غیرآلوده و استفاده از عوامل زیستی برای کنترل بیماری با درجات مختلف موفقیت توصیه شده‌اند (Charkowski, 2015; Gerayeli et al., 2018). یکی دیگر از جایگزین‌های بی‌خطر از نظر زیست‌محیطی استفاده از محصولات گیاهی با فعالیت ضد میکروبی مانند اسانس‌ها (Eos) است که می‌تواند راه حلی امیدوارکننده برای کنترل بیماری‌های باکتریایی مخرب گیاهی باشد (Mari et al., 2016; Omidi Nasab & Aeni, 2020). عصاره‌های گیاهی و اسانس‌ها حاوی بسیاری از مواد فعال زیستی از جمله آلکالوئیدها، گلیکوزیدهای سیانوژنیک، گلوکوزینولات‌ها، لیپیدها، فنول‌ها، تری‌ن‌ها، پلی استیلن‌ها و پلی تینیل‌ها هستند که به طور مؤثر بیمارگرهای باکتریایی گیاهی را مهار می‌کنند (Borges et al., 2018). اسانس‌های مشتق شده از گیاه به‌عنوان مواد کم‌هزینه‌ای در نظر گرفته می‌شوند که در غلظت‌های بسیار پایین مؤثر هستند و برای سلامت انسان و حیوانات مضر نیستند (Ghalem et al., 2016). مطالعات مختلفی روی فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های گیاهی (Bhardwaj & Laura, 2008; Zaidi- Yahiaoui et al., 2008; Paradza et al., 2012; EL- Hefny et al., 2017; Kalu et al., 2018) فرار (Jeong et al., 2009; Nissen et al., 2010; Mehrsorosh et al., 2014; Ikeura Kobayashi, 2015; Gebarowska et al., 2017)، به‌عنوان رویکردهای سازگار با محیط‌زیست در برابر پکتوباکتری‌ها در شرایط آزمایشگاهی صورت گرفته است. با توجه به اهمیت و کاربرد گیاهان معطر و دارویی بومی مناطق مختلف کشور به‌عنوان بازدارنده‌های رشد بیمارگرها از جمله باکتری‌های

نامطلوب برای محیط‌زیست شود، زیرا می‌تواند به باقی‌مانده‌های سمی تبدیل شوند که تجزیه زیستی آن‌ها دشوار بوده؛ بنابراین، استراتژی‌های جدیدی برای کنترل باکتری‌های بیماری‌زا گیاهی مورد نیاز است (Ahmadi et al., 2021). از این نظر، علاقه به مطالعه خواص ضد میکروبی اسانس‌ها افزایش یافته است. اسانس‌ها مخلوط‌ها یا مواد پیچیده‌ای؛ مانند ترپنوئیدها، ترکیبات فنلی، الکل‌ها، آلدئیدها، آلکالوئیدها و غیره هستند که از قسمت‌های مختلف گیاهان استخراج شده و برخی از آن‌ها فعالیت ضد میکروبی، ضد ویروسی و یا ضد قارچی دارند. اسانس‌ها محصولات ایمن و تجزیه‌پذیر در نظر گرفته می‌شوند، در نتیجه، به‌عنوان عوامل ضد میکروبی طبیعی بالقوه مورد بررسی قرار می‌گیرند. از جمله محصولات مهم اقتصادی، سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum*) است که در فرایند تولید و نگهداری می‌تواند توسط آفات و بیماری‌های مختلف آسیب ببیند. باکتری‌های بیماری‌زای *Pectobacterium* و *Pectobacterium carotovorum* باعث ایجاد بیماری‌های پوسیدگی نرم و ساق سیاه (غده‌ها) در این محصول می‌شوند (Mantsebo et al., 2014). این باکتری‌ها از طریق روزنه‌های طبیعی (عدسک) یا زخم وارد میزبان شده و بافت گیاه را بدون ایجاد علائم یا علائم آشکار بیماری تا زمانی که شرایط محیطی (آب آزاد، بی‌هوای و دما) برای پیشرفت بیماری مساعد شود، کلونیزه می‌کنند (Charkowski et al., 2015). در بین تمامی گونه‌های پکتوباکتریوم، *P. carotovorum* وسیع‌ترین طیف گیاهان میزبان را در سراسر جهان دارد و هر ساله منجر به خسارات مالی زیادی در صنعت سیب‌زمینی می‌شود (Pinhero & Yada, 2016). این گونه که باعث پوسیدگی غده سیب‌زمینی می‌شود، بر کیفیت سیب‌زمینی تأثیر منفی می‌گذارد و عامل شایع پوسیدگی نرم باکتریایی در شرایط نگهداری فله در ایران است (Baghaee-Ravari et al., 2011, 2013) که می‌تواند بیش از یک سال در خاک و اندام میزبان آلوده زنده بماند (Cariddi & Sanzani, 2013). گسترش بیماری معمولاً در شرایط بی‌هوای و دماهای بالا تسریع می‌شود (Olsen et al.,

درجهٔ سلسیوس در یخچال نگهداری شدند (Ramezani et al., 2016).

بررسی اثر ضدباکتری اسانس‌ها

بررسی خواص ضدباکتریایی اسانس‌ها به روش نش‌ت در آگار

جدایه‌های باکتریایی روی محیط کشت آگار مغذی کشت و در دمای ۲۸ درجهٔ سلسیوس نگهداری شدند. از هر جدایه باکتری غلظت 10^7 واحد تشکیل دهنده پرگنه بر میلی لیتر تهیه شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری روی محیط کشت آگار غذایی به‌صورت چمنی کشت گردید. سپس دیسک‌های کاغذی سترون (با قطر شش میلی‌متر) محتوی ۵۰ میکرولیتر اسانس گیاهی روی محیط کشت قرار داده شد و مجموعاً ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجهٔ سلسیوس قرار داده شد. سپس قطر هالهٔ عدم رشد اندازه‌گیری شد. آزمایش به‌صورت فاکتوریل بر اساس طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. مقایسهٔ میانگین قطر هالهٔ بازدارنده از رشد باکتری‌ها با روش دانکن محاسبه شد.

تعیین حداقل غلظت بازدارنده (Minimum Inhibitory Concentration) و حداقل غلظت

کشنده (Minimum Bactericidal Concentration)

حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشنده (MBC) با استفاده از روش رقیق‌سازی اسانس‌ها در پلیت تعیین گردید. تهیه سریال رقت با استفاده از پلیت ۹۶ خانه انجام شد. بدین منظور، هفت سطح شامل غلظت‌های ۱۲۵، ۲۵۰، ۶۲/۲۵۰، ۳۱/۲۵، ۱۵/۶۲، ۷/۸ و ۳/۹ پیکومول از اسانس‌های گیاهی در حجم نهایی ۲۰۰ میکرولیتر تهیه شد و سوبیه‌های باکتریایی *P. atrosecticum* و *P. carotovorum* در آن‌ها تلقیح شد و رشد باکتری‌های مورد بررسی قرار گرفت. یک چاهک به‌عنوان شاهد منفی (فقط محیط کشت) و یک چاهک به‌عنوان شاهد مثبت (محیط کشت تلقیح شده با باکتری) در نظر گرفته شد. سپس به همه چاهک‌ها مقدار ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری با غلظت 10^7 واحد تشکیل دهنده پرگنه بر میلی لیتر اضافه و به

بیماری‌زای گیاهی، این تحقیق انجام شده است. به این منظور استخراج اسانس پنج گیاه به‌لیمو (*Lippia citriodora*)، پونهٔ کوهی (*Origanum vulgare*)، گوش بره (*Phlomis fruticosa*)، مرزه (*Satureja spicigera*)، میخک (*Syzygium aromaticum*) به روش تقطیر با آب و شناسایی ترکیبات فرار موجود در آنها انجام شد. سپس اثرات ضدباکتریایی و اثرات سینرژیستی اسانس‌ها بر باکتری‌های *P. carotovorum* و *P. atrosecticum* مطالعه گردید.

مواد و روش‌ها

تهیه و کشت سوبیه‌های باکتریایی

جدایه‌های باکتریایی *P. carotovorum* و *P. atrosecticum* از بخش گیاه‌پزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز تهیه شدند. جدایه‌های باکتریایی روی محیط کشت لوریا برتانی (LB) آگار کشت و تشک‌های پتری در دمای ۲۸ درجهٔ سلسیوس نگهداری شدند.

مادهٔ گیاهی

در پژوهش حاضر پنج گونهٔ گیاهی شامل به‌لیمو (*Lippia citriodora*)، پونهٔ کوهی (*Origanum vulgare*)، گوش بره (*Phlomis fruticosa*)، مرزه (*Satureja spicigera*) و میخک (*Syzygium aromaticum*) از مناطق مختلف رویشگاهی استان خوزستان جمع‌آوری شدند. تمامی گیاهان توسط بخش گیاه‌شناسی دانشگاه شهید چمران اهواز مورد شناسایی قرار گرفتند. خشک کردن گیاهان در دمای اتاق طی هفت روز و به دور از نور مستقیم انجام شد.

روش اسانس‌گیری

اسانس گیاهان مورد مطالعه به روش تقطیر با آب توسط دستگاه کلونجر طی سه ساعت انجام شد. به این صورت که ۱۰۰ گرم از بافت گیاهی خشک شده در بالن ریخته و سپس ۹۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون به آن اضافه شد. اسانس تهیه شده توسط سدیم سولفات آب‌گیری و تا زمان آنالیز اسانس و آزمون بیولوژیک در ظروف شیشه‌ای تیره در دمای چهار

نیم تا یک باشد به‌عنوان افزایشی، بین یک تا چهار به‌عنوان بر همکنش بدون اثر و در صورتی که شاخص بزرگ‌تر از چهار بود، به‌عنوان تاثیر آنتاگونیستی در نظر گرفته شد.

سنجش تشکیل بیوفیلیم

بر اساس روش (O'Toole 2011) اثر اسانس‌ها (EOs) بر توانایی چسبندگی باکتری در پلیت‌های ۹۶ چاهکی ارزیابی شد. به‌طور خلاصه، EOs در غلظت‌های زیر MIC با سوسپانسیون‌های باکتریایی ۲۴ ساعته (10^6) واحد تشکیل دهنده پرگنه بر میلی لیتر) در حجم نهایی ۲۲۰ میکرولیتر مخلوط شدند. سینی‌ها به مدت ۴۸ ساعت بدون هم زدن در دمای ۲۸ درجه سلسیوس رها شدند. پس از انکوباسیون، چاهک‌ها به آرامی دو بار با آب دیونیزه شسته شدند تا سلول‌های غیرمتصل باقیمانده حذف شوند. بیوفیلیم‌ها با محلول کریستال ویولت به همان حجم کشت‌ها به مدت ۱۵ دقیقه رنگ‌آمیزی و سپس چاهک‌ها سه بار با آب شستشو شدند تا محلول رنگ اضافی حذف شود. برای تعیین کمیت زیست‌توده، ۲۲۰ میکرولیتر اسیداستیک ۳۰٪ به چاهک‌های رنگ‌آمیزی شده اضافه و پس از ۱۰ دقیقه، جذب در طول موج ۵۵۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. این آزمون سه بار تکرار شد.

تجزیه و تحلیل Eos

تجزیه و تحلیل گاز کروماتوگرافی-طیف‌سنجی جرمی (GC-MS) به‌منظور شناسایی و تعیین کمیت ترکیب شیمیایی دقیق EOs انجام شد. برای تجزیه و تحلیل GC-MS، یک کروماتوگرافی گازی مدل شیمادزو GC-17A (کیوتو، ژاپن) همراه با طیف‌سنج جرمی Quadruple-MS مدل QP5050 Shimadzu استفاده شد. ترکیبات روی یک ستون موئین سیلیکا ذوب شده ۳۰ متر \times ۰/۲۲ میلی‌متر که با فیلم ۰/۲۵ میکرومتر (Shimadzu) BP-5 و یک انژکتور بدون شکاف با یک لایه شیشه‌ای با قطر داخلی ۱ میلی‌متر پوشانده شده بود، جدا شدند. هلیوم فوق‌خالص به‌عنوان گاز حامل با ولتاژ یونیزاسیون ۷۰ eV استفاده شد. دمای انژکتور و رابط به ترتیب ۲۸۰ و ۳۰۰ درجه سلسیوس بود. ترکیبات

مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس قرار داده شدند. سپس چاهک‌ها از نظر کدورت ناشی از رشد باکتری تلقیح شده، بررسی گردیدند. با مشاهده ایجاد کدورت در هر چاهک، چاهک قبلی به‌عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) در نظر گرفته شد. همچنین کمترین رقتی که می‌تواند تمامی باکتری‌ها را بکشد، به‌عنوان رقت (MBC) در نظر گرفته شد. برای هر باکتری این آزمایش در سه تکرار اجرا شد.

تعیین اثر سینرژیست اسانس‌ها با روش غلظت مهاری کسری (Fractional Inhibitory Concentration)

به‌منظور بررسی بر همکنش ضد میکروبی اسانس‌های مورد مطالعه، غلظت مهاری کسری (FIC) تعیین گردید. در واقع غلظت مهاری کسری از غلظت ماده مهارکننده در حال ترکیب، نسبت به زمانی که همان ماده به‌تنهایی استفاده می‌شود، را نشان می‌دهد. برای تعیین FIC، اسانس‌های گیاهان دارویی مورد نظر از روش مرسوم چکر بورد استفاده شد (Pillai et al., 2005). ترکیبات آزمایش شده در برابر باکتری‌های *P. atrosepticum* و *P. carotovorum* در یک محدوده غلظت MIC ۱/۴ تا MIC ۲ مورد بررسی قرار گرفت. غلظت‌های مختلف از هر اسانس گیاهی در برابر سوسپانسیون بیماگرهای باکتریایی با تهیه رقت با استفاده از پلیت ۹۶ خانه در حجم نهایی ۲۰۰ میکرولیتر آزمایش انجام شد. سوسپانسیون‌های باکتریایی (10^8) واحد تشکیل دهنده پرگنه بر میلی‌لیتر) به هر چاهک به جز شاهد اضافه و پلیت در دمای ۲۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. هر آزمایش سه بار انجام شد شاخص غلظت مهاری کسری (FIC) به شرح زیر محاسبه شد:

$$FIC = \frac{MIC \text{ of extract plant 1 and plant 2 in the combination}}{\frac{MIC \text{ of extract plant 1 alone}}{MIC \text{ of extract plant 1 and plant 2 in the combination}} + \frac{MIC \text{ of extract plant 2 alone}}{MIC \text{ of extract plant 1 and plant 2 in the combination}}}$$

شاخص FIC به شرح زیر تفسیر شد (Pillai et al., 2005): هم‌افزایی $0/5 < FIC \leq 1.0$ ، اثر افزودنی $FIC \leq 0/5$ ، بی‌تفاوتی $1 \leq FIC \leq 4$ و آنتاگونیسم $FIC > 4$

شاخص FIC کمتر از نیم به‌عنوان بر همکنش دو ترکیب به‌عنوان اثر هم‌افزایی (سینرژیست) شناخته شد. شاخص بین

حاصل از ارزیابی فعالیت ضد میکروبی اسانس‌های گیاهی نشان داد که اسانس به‌لیمو و گوش بره اثر ضدباکتری بالاتری نسبت سایر اسانس‌ها داشت. همان‌طوری که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، اثر متقابل باکتری \times نوع اسانس گیاهی در کنترل رشد باکتری‌ها اثر معنی‌داری ($P \leq 0.01$) داشت. مقایسه میانگین اثر اسانس‌های گیاهی روی دو گونه باکتری به روش انتشار در آگار نشان داد که باکتری *P. atrosepticum* بیشترین حساسیت را نسبت به اسانس‌ها داشته، درحالی‌که باکتری *P. carotovorum* حساسیت کمتری نسبت به اسانس‌های مورد مطالعه داشت (شکل ۱). شکل ۲ نشان می‌دهد که بالاترین اثرات بازدارندگی در سنجش دیسک توسط اسانس به‌لیمو دارای فعالیت ضدباکتریایی قابل قبولی با ناحیه مهار ۲/۲۰ سانتی‌متر و اسانس گوش بره با ناحیه مهار ۱/۸۱ سانتی‌متر در برابر سویه‌های باکتریایی *P. atrosepticum* و *P. carotovorum* به ترتیب مشاهده شد. همچنین قدرت مهارکنندگی اسانس گیاه مرزه نسبت به سایرین کمترین میزان بازدارندگی علیه هر دو باکتری داشت (شکل ۲).

اسانس با استفاده از محاسبه شاخص‌های نگه‌داری آن‌ها در شرایط برنامه‌ریزی شده دما برای n-آلکان‌ها (C8-C20) و روغن روی ستون DB-5 تحت شرایط کروماتوگرافی یکسان شناسایی شدند. شناسایی ترکیبات با استفاده از مقایسه طیف جرمی آن‌ها با طیف جرمی کتابخانه مرجع داخلی (NIST08 و Wiley 9.0) انجام شد.

تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از (SPSS (version 22) اجرا شد. تفاوت بین گروه‌ها با استفاده از آزمون تحلیل واریانس اندازه‌گیری شد. اختلاف $P \leq 0.01$ معنی‌دار در نظر گرفته شد و میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن تفکیک شدند. همه آزمایش‌ها حداقل دو بار با نتایج مشابه انجام شدند و یک کارآزمایی نماینده از هر آزمایش ارائه شده است.

نتایج

سنجش فعالیت ضدباکتریایی

به‌منظور بررسی اثرات ضد میکروبی اسانس‌های گیاهان دارویی مورد مطالعه، به میزان ۵۰ میکرومول از هر اسانس روی دو باکتری بیمارگر مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج

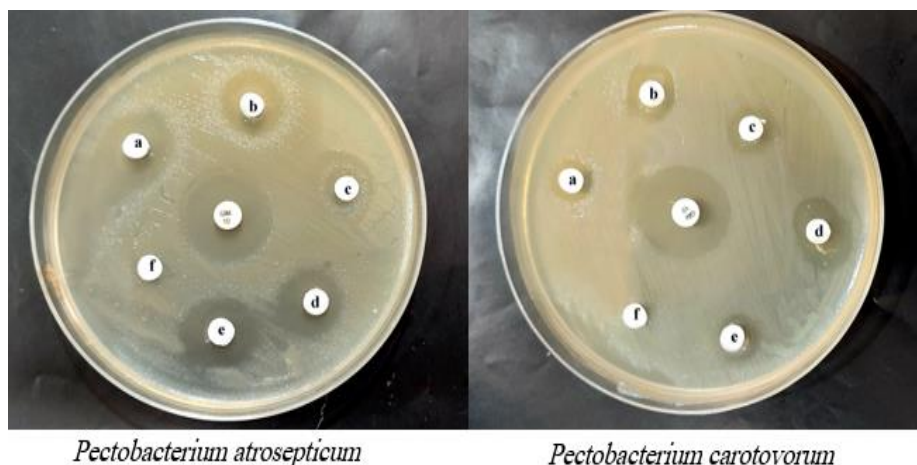
جدول ۱- تجزیه واریانس اثر اسانس به‌لیمو، مرزه، گوش بره، میخک و پونه بر روی دو گونه باکتری‌های بیمارگر

Pectobacterium atrosepticum و *Pectobacterium carotovorum*.

Table 1. Analysis of variance the effect of *Lippia citriodora*, *Origanum vulgare*, *Phlomis fruticose*, *Satureja spicigera* and *Syzygium aromaticum* Eos on the *Pectobacterium carotovorum* and *Pectobacterium atrosepticum*.

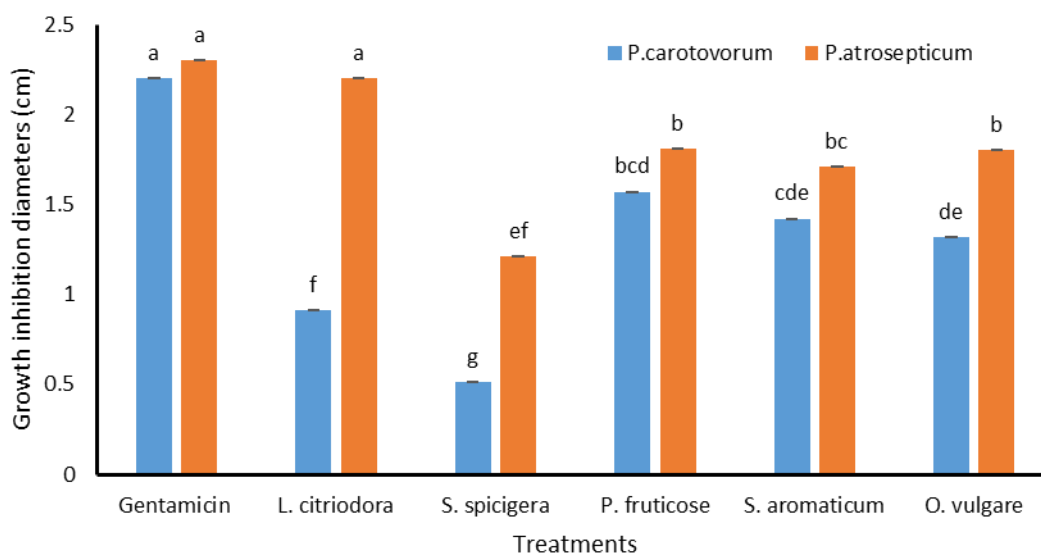
Source of variation	df	Mean squares
Plant	5	1.173**
Bacteria	1	2.43**
Plant \times Bacterium	5	0.27**
Error	24	0.002
CV		0.54%

**Significance level at 1%



شکل ۱- تشکیل هاله عدم رشد باکتری‌های *Pectobacterium carotovorum* و *Pectobacterium atrosepticum* در اثر تیمار پنج اسانس گیاهی، آنتی‌بیوتیک جنتامایسین (۱۰ نانوگرم) به‌عنوان شاهد مثبت، a: اسانس به‌لیمو، b: اسانس مرزه، c: اسانس گوش بره، d: اسانس میخک، e: اسانس پونه، f: Tween 20 به‌عنوان شاهد منفی.

Fig. 1. Inhibition zone of *Pectobacterium carotovorum* and *Pectobacterium atrosepticum* under the treatments of five Eos. Gentamicin antibiotic as positive control. a: *Lippia citriodora* Eo, b: *Satureja spicigera* Eo, c: *Phlomis fruticosa* Eo, d: *Syzygium aromaticum* Eo, e: *Origanum vulgare*, Eo, f: Tween 80 as negative control.



شکل ۲- نتایج مربوط به انتشار دیسک آگار و غلظت‌های زیر MIC مواد آزمایشی در برابر جدایه‌های *Pectobacterium carotovorum* و *Pectobacterium atrosepticum*.

ستون دارای حروف مشترک در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

Fig. 2. Agar disk diffusion results and MIC below concentration of Eos against *Pectobacterium carotovorum* and *Pectobacterium atrosepticum*.

Values within a column followed by the same letter do not differ at 5% level.

حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت باکتری کشی (MBC)

کمترین اثر بازدارندگی روی رشد باکتری‌های مورد مطالعه داشت. همچنین محیط درون چاهک شاهد منفی به صورت کاملاً شفاف بود و در چاهک شاهد مثبت کدورت کافی حاصل از رشد باکتری مشاهده شد (جدول ۲). در بررسی حداقل غلظت باکتری کشی (MBC)، کمترین غلظت در باکتری *P. carotovorum* متعلق به گونه گوش بره به میزان ۶۲/۵ میکومول بوده در حالی که این شاخص در باکتری *P. atrosepticum* متعلق به گونه به لیمو به میزان ۳۱/۲۵ میکومول است.

نتایج حاصل از حداقل غلظت بازدارندگی اسانس‌های گیاهی در جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج به دست آمده از داده‌ها MIC روی باکتری‌های نشان داد که بیشترین اثر ضد باکتریایی اسانس‌ها علیه باکتری *P. atrosepticum* بود و MIC اسانس‌ها در محدوده ۶۲/۵-۱۵/۶۲ میکومول بود، در حالی که باکتری *P. carotovorum* با محدوده MIC، ۳۱-۱۲۵ میکومول مقاومت بیشتری در مقابل اسانس‌ها از خود نشان داد. شایان ذکر است که اسانس گیاهی مرزه،

جدول ۲- حداقل غلظت مهار کنندگی و حداقل غلظت کشندگی اسانس‌های به لیمو، مرزه، گوش بره، میخک و پونه علیه باکتری *Pectobacterium atrosepticum* و *Pectobacterium carotovorum*

Table 2. Minimum inhibitory and bactericidal effects of *Lippia citriodora*, *Origanum vulgare*, *Phlomis fruticose*, *Satureja spicigera* and *Syzygium aromaticum* Eos against *Pectobacterium carotovorum* and *Pectobacterium atrosepticum*

Plants	MIC and MBC (PPM)			
	<i>P. carotovorum</i>		<i>P. atrosepticum</i>	
	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>L.citriodora</i>	125a	250a	15.62b	31.25b
<i>S. spicigera</i>	125a	250a	62.5b	125b
<i>P.fruticose</i>	31.25c	62.5c	31.25d	62.5d
<i>S. aromaticum</i>	62.5b	125b	31.25b	62.5b
<i>O.vulgare</i>	62.5b	125b	31.25c	62.5c

اسانس میخک با گوش بره، اسانس گیاهی پونه با گوش بره، اسانس گیاهی میخک با پونه و اسانس گیاهی پونه با گوش بره علیه باکتری‌های *P. atrosepticum* و *P. carotovorum* اثر هم‌افزایی داشت و ترکیب‌های اسانس مرزه با به لیمو علیه باکتری *P. carotovorum* فاقد اثر هم‌افزایی یا افزایشی بود. سایر ترکیبات از اسانس‌های مورد مطالعه دارای اثرات افزایشی علیه دو باکتری *P. atrosepticum* و *P. carotovorum* بودند.

مقایسه شاخص FIC گیاهان دارویی مورد مطالعه

به طور کلی نتایج حاصل از این بخش نشان می‌دهد بر اساس شاخص FIC، ترکیب اسانس‌ها با یکدیگر علیه باکتری‌ها دارای اثرات مختلفی از نوع هم‌افزایی، افزایشی و بی‌اثر (بی‌تفاوت) بودند (جدول ۳). با مقایسه شاخص FIC یا حداقل غلظت بازدارنده افتراقی مشخص شد بین ترکیب‌های دوتایی اسانس گیاهان دارویی گیاه به لیمو با سایر اسانس‌های گیاهان دارویی مورد مطالعه علیه باکتری *P. atrosepticum* اثر هم‌افزایی وجود داشت. همچنین ترکیب

جدول ۳: نتایج شاخص حداقل غلظت بازدارنده افتراقی (FIC) اسانس‌های گیاهان دارویی به‌لیمو، مرزه، گوش بره، میخک و پونه

علیه دو باکتری *Pectobacterium atrosepticum* و *Pectobacterium carotovorum*

Table 3. Fractional inhibitory concentration index of *Lippia citriodora*, *Origanum vulgare*, *Phlomis fruticose*, *Satureja spicigera* and *Syzygium aromaticum* Eos against *Pectobacterium atrosepticum* and *Pectobacterium carotovorum*.

Eos	<i>Pectobacterium carotovorum</i>					<i>Pectobacterium atrosepticum</i>				
	<i>L.citriodora</i>	<i>S.spicigera</i>	<i>P.fruticose</i>	<i>S. aromaticum</i>	<i>O.vulgare</i>	<i>L.citriodora</i>	<i>S.spicigera</i>	<i>P.fruticose</i>	<i>S. aromaticum</i>	<i>O.vulgare</i>
<i>L.citriodora</i>	-					-				
<i>S.spicigera</i>	I	-				S	-			
<i>P.fruticose</i>	A	A	-			S	A	-		
<i>S.aromaticum</i>	A	A	S	-		S	A	S	-	
<i>O.vulgare</i>	A	A	S	S	-	S	A	S	S	-

The three divisions of interactions of Eos are summarized with the following signs: S: synergistic, I: indifferent, A: additive.

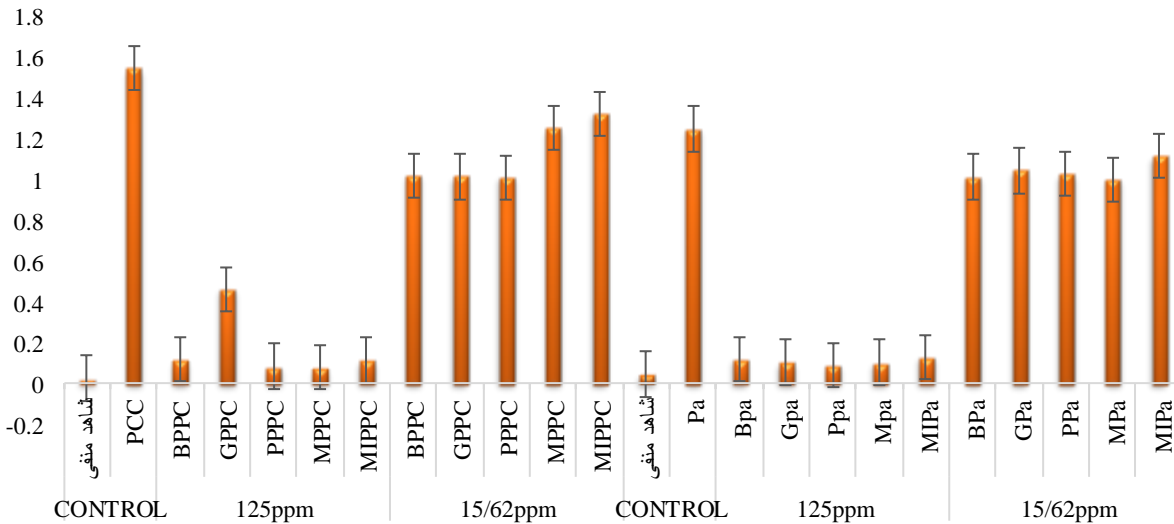
کامفور (۱۵/۴۲٪)، اکسیدپیریتون (۱۱/۷٪)، سیس-اکسیدپیریتون (۹/۴٪) و اکالیپتول (۷/۶٪) بود. اسانس به لیمو شامل ترکیبات اصلی ایزوژرانینول (۲۳٪)، نرال (۱۹/۳٪) و لیمونن (۱۰/۳٪) بود. روغن پونه کوهی نیز دارای عناصر شیمیایی سیس-اکسید پیریتون (۲۹/۵٪) و اکسید پیریتون (۲۱/۹٪) بود. روغن مرزه سرشار از کارواکرول (۸۸/۵٪) است و در نهایت روغن میخک که دارای ترکیب اصلی اوژنول (۹۸/۷٪) بود که دارای خواص ضدباکتریایی قوی است. به‌طور کلی، ترکیبات شیمیایی اسانس‌ها به دو گروه مختلف طبقه‌بندی می‌شوند. هیدروکربن‌هایی که تقریباً به طور کامل از ترپن‌ها (مونوترپن‌ها، دی‌ترپن‌ها و سسکوی‌ترپن‌ها) و همچنین ترپنوئیدهای بدون اکسیژن، معمولاً الکل‌ها، فنل‌ها، آلدئیدها، کتون‌ها، استرها و اکسیدها تشکیل شده‌اند (Moghaddam & Mehdizadeh, 2017). در اینجا، مونوترپن‌های اکسیژن‌دار به‌عنوان گروه سازنده اصلی در هر پنج روغن فرار شناخته شدند (جدول ۴ و شکل ۴).

اثرات اسانس‌ها بر توسعه بیوفیلم باکتری‌ها

نتایج این آزمایش نشان داد که باکتری‌ها در غلظت بالای MIC اسانس، یعنی در غلظت ۱۲۵ پی‌پی‌ام بیوفیلم تشکیل ندادند، اما در غلظت‌های کمتر مثل ۱۵/۶۲ پی‌پی‌ام، بیوفیلم تشکیل دادند. نتایج نشان داد که EOs باعث اختلال در توسعه بیوفیلم باکتری‌ها در مقایسه با تیمار شاهد شد. در واقع، توانایی تشکیل بیوفیلم در سویه‌های *Pectobacterium* و *Pectobacterium carotovorum* در غلظت بالای MIC مهار شد. میزان چگالی نوری در آزمایش مهار تشکیل بیوفیلم مربوط به دو غلظت بیشترین MIC و کمترین مقدار MIC مربوط به پنج اسانس مورد آزمایش در شکل ۳ نشان داده شده است.

شناسایی ترکیبات شیمیایی تشکیل دهنده اسانس‌ها

ترکیبات شیمیایی اسانس‌ها در مجموع ۹۳/۸۱٪، ۹۴/۴۲٪، ۹۵/۱۸٪، ۹۸/۷٪ و ۹۹/۹۱٪ از اسانس گوش بره، به‌لیمو، پونه، مرزه و میخک به ترتیب شامل ۴۴، ۴۲، ۴۱، ۲۳ و ۷ ترکیب مختلف شناسایی شدند. مواد شیمیایی غالب موجود در اسانس گوش بره شامل سیس-توجون (۱۷/۴۷٪)،



شکل ۳- میزان چگالی نوری در آزمایش مهار تشکیل بیوفیلم توسط اسانس‌های به‌لیمو، مرزه، گوش بره، میخک و پونه در غلظت‌های بیشترین و کم‌ترین MIC.

Fig. 3. Optical density in biofilm inhibition test in relation to five plant species Eos in the highest and lowest MIC concentrations.

PCC: *Pectobacterium carotovorum*, BPPC: *Lippia citriodora* and *Pectobacterium carotovorum*, GPPC: *Pectobacterium carotovorum* and *Phlomis fruticose*, PPPC: *Origanum vulgare* and *Pectobacterium carotovorum*, MPPC: *Pectobacterium carotovorum* and *Satureja spicigera*, MIPPC: *Pectobacterium carotovorum* and *Syzygium aromaticum*, Pa: *Pectobacterium atrosepticum*, BPa: *P. atrosepticum* and *Lippia citriodora*, GPa: *Pectobacterium atrosepticum* and *Phlomis fruticose*, PPa: *Pectobacterium atrosepticum* and *Origanum vulgare*, MPa: *P. atrosepticum* and *Satureja spicigera*, MIPa: *Pectobacterium atrosepticum* and *Syzygium aromaticum*. Positive control: bacteria culture without Eos, and negative control: sterile water.

جدول ۴- نتایج GC-MS برای اسانس به‌لیمو (*Lippia citriodora*)، پونه کوهی (*Origanum vulgare*)، گوش بره (*P. fruticosa*)، مرزه (*Satureja spicigera*)، میخک (*Syzygium aromaticum*) اجزای اصلی موجود در EOها با فونت پررنگ نشان داده می‌شوند.

Table 4. GC-MS analysis for Eos of *Lippia citriodora*, *Origanum vulgare*, *P. fruticosa*, *Satureja spicigera* and *Syzygium aromaticum*. Their Eos major constituents are bolded.

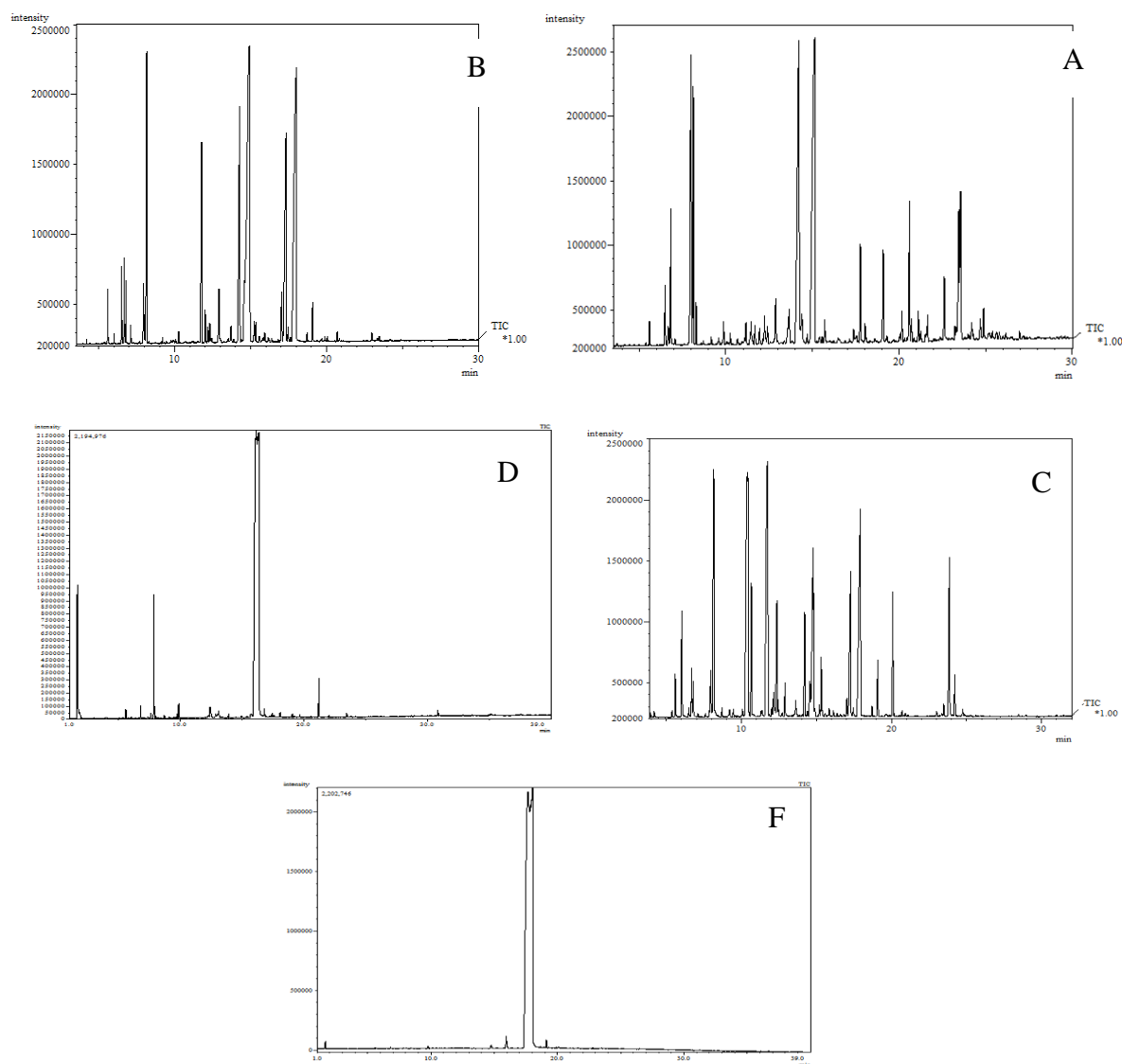
<i>Phlomis fruticosa</i>			<i>Lippia citriodora</i>		
Compound	RI	Amount (%)	Compound	RI	Amount (%)
<i>cis</i> -Salvene	852	0.05	ALPHA.-PINENE	939	0.5
(E)-2-Hexenal	854	0.1	Sabinene	976	1.3
alpha.-Thujene	931	0.1	1 OCTEN 3 OL	978	0.5
ALPHA.-PINENE	939	0.7	5-Hepten-2-one	985	3
Camphene	953	1.9	3-Octanol	993	0.1
Sabinene	976	0.1	Limonene	1031	10.3
beta.-pinene	980	0.9	Eucalyptol	1033	5.4
Myrcene	991	0.6	trans-.beta.-Ocimene	1050	0.7
3-Octanol	993	0.07	gamma.-Terpinen	1062	0.05
ALPHA. TERPINENE	1018	0.06	<i>cis</i> -Sabinenehydrate	1068	0.1
<i>p</i> -Cymene	1026	0.1	Perillen	1100	0.08
Limonene	1031	1.2	Linalool	1098	0.4
Eucalyptol	1033	7.6	CYCLOCITRAL	1125	0.2
gamma.-Terpinen	1026	0.1	CIS-LIMONENE OXIDE	1134	0.1
Linalool oxide	1074	0.04	Citronellal	1153	0.2
<i>cis</i> -Sabinenehydrate	1068	0.2	Carane, 4,5-epoxy-, trans	1179	0.4
ALPHA.-TERPINOLENE	1088	0.1	ALPHA.-ERPINEOL	1190	0.1
<i>cis</i>-Thujone	1102	17.47	NEROL	1228	1.5
<i>trans</i> -Thujone	1114	2.6	Neral	1240	19.3
Camphor	1159	15.42	Piperitone	152	0.2
Isomenthone	1164	0.1	Isogeraniol	1273	23
ALPHA.-TERPINEOL	1190	0.8	Thymol	1306	0.5
Bornyl formate	1217	2.9	ε-Isopropenyl-1- methyl- cyclohexanediol	1342	0.4
Carvenone	1252	0.04	Geranyl acetate	1386	2.4
Geranial	1255	0.06	BOURBONENE	1385	0.5
Pulegone	1257	2.4	Caryophyllene	1404	2.5
CIS PIPERITONE OXIDE	1263	9.4	BETA.-GURJUNENE	1432	0.1
Isopiperitenone	1272	0.2	Humulene	1460	0.2
Bornyl acetate	1285	1.4	trans-.beta.-Farnesene	1458	0.7
Thymol	1306	0.2	Ar-Curcumene	1479	3.7
Carvacrol	1322	0.1	GERMACRENE-D	1480	0.5
<i>exo</i> -2-Hydroxycineole acetate	1344	0.05	bicyclogermacrene	1494	0.7
ALPHA.-TERPINENYL ACETATE	1374	0.4	Himachalene	1500	0.3
Piperitenone	1347	5.4	gamma.-Cadinene	1513	0.2
PIPERITENONE OXIDE	1363	11.7	Geraniol butyrate	1562	0.09
Caryophyllene	1404	1.1	Nerolidol	1564	1.6
Humulene	1460	2.9	Germacrene	1580	0.3
Valencene	1474	0.05	Spathulenol	1576	4.5
GERMACRENE-D	1480	0.1	Caryophyllene oxide	1594	5.2
LEDEN	1493	0.1	Cedrenol	1615	0.1
Chamigrene	1500	0.04	Carotol	1615	0.4
Spathulenol	1576	0.06	alpha.-Cadinol	1653	0.9
Caryophyllene oxide	1594	0.2			
Veridiflorol	1590	7.4			

<i>Origanum vulgare</i>			<i>Satureja spicigera</i>		
Compound	RI	Amount (%)	Compound	RI	Amount (%)
(E)-2-Hexenal	854	0.06	alpha.-Pinene	939	0.3
ALPHA.-PINENE	939	0.7	Camphene	953	0.06
Camphene	953	0.1	beta.-Myrcene	991	0.4

Sabinene	976	1.2	alpha.-Terpinene	1018	0.1
beta.-pinene	980	1.3	para – cymene	1026	4.5
Myrcene	991	0.9	D-Limonene	1031	0.1
3-Octanol	993	0.3	beta.-Phellandrene	1031	0.04
Limonene	1031	1.2	gamma.-Terpinen	1062	0.09
beta.-Phellandrene	1031	0.1	p-Isopropenyltoluene	1103	0.1
Eucalyptol	1033	7.8	Linolool	1098	0.6
cis-Sabinenehydrate	1068	0.1	Borneol	1171	0.1
Linalool	1098	0.08	Terpinen-4-ol	1177	0.9
1 OCTEN 3 YL ACETATE	1110	0.05	alpha.-Terpineol	1189	0.3
Nonanal	1102	0.08	Benzene, 1-methoxy-4-methyl-2-(1-methylethyl)	1244	0.1
3-OCTANYL ACETATE	1124	0.1	Thymol	1290	0.4
Sabinol	1140	0.05	Carvacrol	1317	88.5
Menthone	1154	5.3	Eugenol	1373	0.1
Isomenthone	1164	0.6	Thymyl acetate	1366	0.07
ALPHA.- TERPINEOL	1190	0.3	Caryophyllene	1427	0.1
Bornyl formate	1217	0.5	Geranyl acetone	1457	0.1
Cuminic aldehyde	1239	0.4	Ar-Curcumene	1483	0.04
Carvenone	1252	0.08	beta.-Bisabolene	1509	1.5
Pulegone	1257	8.9	Caryophyllene oxide	1581	0.2
CIS PIPERITONE OXIDE	1263	29.5			
Isopiperitenone	1272	0.4			
Bornyl acetate	1285	0.4			
Geraniol formate	1300	0.1			
Nonanol acetate	1312	0.1			
Barosma camphor	1304	0.07			
Thymol	1306	0.2			
Carvyl acetate	1337	0.06			
exo-2-Hydroxycineole acetate	1344	0.05			
ALPHA.- TERPINENYL ACETATE	1345	1.3			
Piperitenone	1347	9.3			
5-Allyl-2-methoxyphenol	1362	0.1			
PIPERITENONE OXIDE	1363	21.9			
Caryophyllene	1404	0.8			
Dihydropseudoionone	1456	0.1			
Humulene	1460	0.2			
GERMACRENE-D	1480	0.2			
Caryophyllene oxide	1594	0.2			

Syzygium aromaticum

Compound	RI	Amount (%)
alpha.-Pinene	939	0.03
-5-Hepten-2-one, 6-methyl	988	0.05
Phenol, 2-methoxy	1101	0.07
4-(2-Propenyl)phenol	1254	0.17
Carvacrol	1317	0.69
Eugenol	1380	98.7
Caryophyllene	1427	0.2



شکل ۴- کروماتوگرام اسانس‌های استخراج شده مرتبط به گونه‌های: A: به لیمو، B: پونه، C: گوش بره، D: مرزه، F: میخک

Fig. 4. Chromatogram of Eos related to: A: *Lippia citriodora*, B: *Origanum vulgare*, C: *Phlomis fruticose*, D: *Satureja spicigera*, F: *Syzygium aromaticum*

بحث

استفاده می‌شوند. بیوفیلیم‌ها توانایی باکتری را در آلودگی بافت میزبان، تکثیر، بقا در مزرعه و محیط‌های مختلف را افزایش داده و همچنین به‌عنوان مانع نفوذ برای عوامل ضد میکروبی عمل می‌کنند (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). فعالیت‌های اختلال در رشد و ضد تشکیل بیوفیلیم چندین اسانس از گیاهان مختلف روی باکتری‌های بیماری‌زا در پژوهش‌های مختلف پزشکی و علوم غذایی و گیاه پزشکی گزارش شده است (Gursoy *et al.*, 2009; Kerekes *et al.*, 2013; Packiavathy *et al.*, 2014; Szczepanski & iLipski, 2014; Kim *et al.*, 2016, Mirzaei-

اسانس‌های گیاهی مورد استفاده در این مطالعه، گیاهان دارویی بومی ایران با ساختارهای شیمیایی متنوع هستند و نتایج اولیه ما نشان می‌دهد که دارای فعالیت باکتری کشی در برابر باکتری‌های *P. atrosepticum* و *P. carotovorum* غلظت‌های پایین هستند. اسانس‌ها از طریق فروپاشی غشا، حیات سلولی را تهدید می‌کنند (Hyldgaard *et al.*, 2012). برای حذف چنین اثراتی، روغن‌ها در مقادیر کمتر کننده برای از بین بردن اثرات باکتریواستاتیک یا باکتری کش

شیرازی، *Fortunella* sp و ترکیبات اصلی آن‌ها شامل سیترال، لینالول، سیترونال، ژرانیول، آلفا-ترپینئول و لینالیل استات دارای اثرات ضد باکتریایی علیه جدایه بیماریزای Xcc-KVXCC1 بودند. لیموترش شیرازی و ترکیب سیترال به ترتیب بیشترین بازدارندگی را داشتند (Mirzaei-Najafgholi et al., 2017). در پژوهشی فعالیت ضد میکروبی اسانس‌های گیاهی چهار گیاه زیره، زیره سبز، مرزه، لیمو زرد و نعناع ارزیابی شد و نتایج نشان داد که تمام اسانس‌ها دارای اثر مهارکنندگی و ضدباکتریایی هستند؛ اما اسانس نعناع اثر بهتری را در مقایسه با دیگر اسانس‌ها نشان داد؛ بنابراین تمام گونه‌های گیاهی مورد مطالعه خواص ضدباکتریایی دارند؛ اما سطح مهار رشد باکتری ناشی از مواد گیاهی به منبع گیاهی و جدایه باکتری بستگی دارد (Zaker et al., 2014). در پژوهشی اثر اسانس میخک روی گونه‌های باکتریایی *Agrobacterium tumefaciens*، *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*، *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*، *Xanthomonas campestris* pv. *p. elargonii*، *Ralstonia solanacearum* و همچنین باکتری‌های گرم مثبت *Rhodococcus fascians* و *Streptomyces* spp. بررسی شد و مشخص شد که *R. solanacearum* بیشترین حساسیت را به اسانس میخک دارد (Huang & Lakshman, 2010). در بررسی انجام شده توسط میرزایی نجفقلی و همکاران در سال ۱۴۰۱ به مطالعه اثر ضدباکتریایی اسانس پونه و پروتئین‌های نو ترکیب در ماسپتین B1 شرایط آزمایشگاهی در برابر پنج باکتری عامل بیمارگر گیاهی پرداخته شد. نتایج نشان داد که پپتیدهای نو ترکیب در ماسپتین B1 می‌توانند به تنهایی یا در ترکیب با اسانس پونه برای کنترل بیماری‌های باکتریایی موثر باشد (Mirzaei et al., 2022). ژئونگ و همکاران (Jeong et al., 2009)، تاثیر اسانس به لیمو را روی چند میکروارگانیزم بیمارگر باکتریایی مطالعه کرده و نتایج نشان داد که این اسانس قادر به مهار رشد باکتری در یک الگوی وابسته به غلظت است. استفاده از محصولات گیاهی به‌عنوان روش پیشنهادی سودمند است؛ زیرا این ترکیبات در غلظت‌های پایین مؤثر بوده و همچنین می‌توانند آسیب‌های ناشی از بیماری‌های گیاهی را کاهش دهند. ترکیبات

(Najafgholi, 2021). نتایج ما همچنین با تحقیقی که در آن کاهش چسبندگی باکتری تحت تیمار با غلظت‌های زیر کشنده کارواکرول در *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* در سیستم حد نصاب (quorum sensing) شده بود، مطابقت دارد (Gutierrez-Pacheco et al., 2018). علاوه بر این، نتایج ما این نکته را تقویت می‌کند که اسانس‌های آزمایش شده دارای فعالیت ضد بیوفیلم بر روی جمعیت زیر MIC از باکتری‌ها هستند. این یافته‌ها با گزارش قبلی Kavanagh و Ribbeck (2012) مطابقت دارد که در آن روغن‌های *Thymus aromaticum* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مهم کولیسین و جتتامایسین اثر بیشتری در از بین بردن بیوفیلم‌های *Pseudomonas* spp و *Staphylococcus* داشتند. به نظر می‌رسد که کاربرد اسانس‌ها منجر به افزایش تحرک در سلول‌های تیمار شده می‌شود که به فرار از اثرات سمی این مواد کمک می‌کند. این رفتار با کاهش چسبندگی سطحی سبب کاهش رشد بیوفیلم باکتری می‌شود. به‌طور کلی، کاهش تشکیل بیوفیلم و ازدست‌دادن قابلیت ترشح آنزیم‌های هیدرولیتیک به ویژه پلی‌گالاکتروناز (Peh)، که در مراحل اولیه آلودگی ضروری است و در تخریب پکتین نقش دارد، ممکن است باعث کاهش شدت بیماری‌زایی شود. تحقیقات نشان داده است که گیاهان معطر متعلق به تیره‌های نعناعیان، کاسنی و چتریان از ترکیبات ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی برخوردار هستند (Carson et al., 2006; Zivanovic et al., 2006; Emiroglu et al., 2010). استفاده از این گروه ترکیبات ضد میکروبی طبیعی با مفهوم کشاورزی پایدار مطابقت دارد، زیرا بیشتر آن‌ها در طی فرایند تجزیه از چرخه‌های طبیعی از بین رفته و سبب کاهش اثرات مخرب زیست‌محیطی می‌شوند. در پژوهشی تأثیر چند اسانس گیاهی علیه بیمارگر (Xcc) *Xanthomonas citri* subsp. *Citri* صورت گرفت و تنوع گسترده‌ای در خواص ضدباکتریایی اسانس‌های گیاهی و ترکیبات آن‌ها در برابر سویه Xcc-KVXCC1 مشاهده شد. نتایج این تحقیق نشان داد که اسانس‌های نارنج، لیموترش

جایگزین‌های بالقوه برای باکتری‌کش‌های مصنوعی در نظر گرفته می‌شوند و از این رو امید وجود دارد که شاهد ظهور ترکیبات ضدباکتریایی از منابع طبیعی در زمینه مدیریت یکپارچه بیماری‌های گیاهی در آینده باشیم.

سپاس‌گزاری

بدین وسیله از حمایت‌های مالی و امکانات معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز (گرت شماره SCU.AP1400.33951) تشکر و قدردانی می‌گردد.

اسانس‌ها بسیار متنوع هستند و فعالیت ضدباکتریایی آن‌ها به مکانیسم خاصی محدود نمی‌شود و استفاده از این مواد گیاهی می‌تواند کاندیدای مناسبی برای استفاده به‌عنوان عوامل ضدباکتری طبیعی باشد. با این وجود، مطالعات بیشتری در این زمینه باید انجام شود تا مکانیسم‌های احتمالی اسانس‌های گیاهی روی بیمارگرها و پایداری آن‌ها در طبیعت مشخص شود. در این تحقیق نشان داده شد که پنج اسانس به لیمو، پونه کوهی، گوش بره، مرزه، میخک دارای خواص ضدباکتریایی بالقوه‌ای بر رشد عوامل بیمارگر مورد آزمایش هستند. بنابراین، این اسانس‌ها به‌عنوان

References

- Ahmadi, A., Mirzaei Najafgholi, H., Aeni, M. & Kakolvand, K. 2021. Isolation and Identification of Othello, Atlantis, and Puma Super Herbicide-resistant Bacteria Isolated from the Soil of Wheat Farms. *Biological Journal of Microorganism*, 10(37): 67–77.
- Baghaee-Ravari, S., Moslemkhani, K. & Khodaygan, P. 2013. Assessment of genetic variability of prevalent pectinolytic bacteria causing potato tuber soft rot in eastern Iran. *Journal of Plant Pathology*, 95: 107–113.
- Baghaee-Ravari, S., Rahimian, H., Shams-Bakhsh, M., Lopez-Solanilla, E., Antúnez-Lamas, M. & Rodríguez-Palenzuela, P. 2011. Characterization of *Pectobacterium* species from Iran using biochemical and molecular methods. *European Journal of Plant Pathology*, 129(3): 413–425.
- Bhardwaj, S.K. & Laura, J.S. 2008. Antibacterial activity of some plant extracts against pathogenic bacteria *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Potato Journal*, 35:1–2.
- Borges, D.F., Lopes, E.A., Moraes, A.R.F., Soares, M.S., Visôto, L.E., Oliveira, C.R. & Valente, V.M.M. 2018. Formulation of botanicals for the control of plant-pathogens: A review. *Crop Protection*, 110: 135–140.
- Cariddi, C. & Sanzani, S.M. 2013. A severe outbreak of bacterial lettuce soft rot caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* in Apulia (Italy). *Journal of Plant Pathology*, 95: 441–446.
- Carson, C.F., Hammer, K.A. & Riley, T.V. 2006. *Melaleuca lternifolia* (Tea Tree) oil: Review antimicrobial and other medicinal properties. *Journal of Microbiology*, 19: 50–62.
- Charkowski, A.O. 2015. Biology and control of *Pectobacterium* in potato. *American Journal of Potato Research*, 92(2): 223–9.
- Davidsson, P.R., Kariola, T., Niemi, O. & Palva, T. 2013. Pathogenicity of and plant immunity to soft rot pectobacteria. *Frontiers in Plant Science*, 4: 191.
- EL-Hefny, M., Ashmawy, N.A., Salem, M.Z.M. & Salem, A.Z.M. 2017. Antibacterial activities of the phytochemicals-characterized extracts of *Callistemon viminalis*, *Eucalyptus camaldulensis* and *Conyza dioscoridis* against the growth of some phytopathogenic bacteria. *Microbial Pathogenesis*, 113: 348–356.
- Emiroglu, Z. K., Yemis, G.P., Coskun, B.K. & Candogan, K. 2010. Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. *Meat Science*, 86(2): 283–288.
- Pillai, S.K., Moellering, R.C. & Eliopoulos, G.M. 2005. Antimicrobial Combinations. In: Lorian, V., Ed., *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 5th Edition, the Lippincott Williams & Wilkins Co., Philadelphia, 365–440.
- Gebarowska, E., Politowicz, J. & Szumny, A. 2017. Chemical composition and antimicrobial activity of *Geranium robertianum* L. Essential oil. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 74(2): 699–705.
- Gerayeli, N., Baghaee-Ravari, S. & Tarighi, S. 2018. Evaluation of the antagonistic potential of *Bacillus* strains against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and their role in the induction of resistance to potato soft rot infection. *European Journal of Plant Pathology*, 150(4): 1049–1963.
- Ghalem, B.R. 2016. Essential oils as antimicrobial agents against some important plant pathogenic bacteria and fungi. In: Choudhary, D.K., Varma, A., Tuteja, N. (Eds.), *Eds.) Plant-Microbe Interaction: An Approach to Sustainable Agriculture*. Springer, Singapore, 271–296.
- Gursoy, U.K., Gursoy, M., Gursoy, O.V., Cakmakci, L., Könönen, E. & Uitto, V.J. 2009. Anti-biofilm properties of *Satureja hortensis* L. Essential oil against periodontal pathogens. *Anaerobe*, 15(4): 164–167.

- Gutierrez-Pacheco, M.M., Gonzalez-Aguilar, G.A., Martinez-Tellez, M.A., LizardiMendoza, J., Madera-Santana, T.J. & Bernal-Mercado, A.T. 2018. Carvacrol inhibits biofilm formation and production of extracellular polymeric substances of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum*. *Food Control*, 89: 210-218.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W. & Stoodley, P. 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2): 95.
- Darvishnia, M., Mirzaei-najafgholi, H., Aeni, M. & Joshaghani, A. 2021. Identification and genotypic characteristics of *Erwinia amylovora* isolates, the causal agents of fire blight on pome fruit trees in Hamadan province. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, 43(4): 19-34.
- Huang, Q. & Lakshman, D.K. 2010. Effect of clove oil on plant pathogenic bacteria and bacterial wilt of tomato and geranium. *Journal of Plant Pathology*, 92: 701-707.
- Hyldgaard, M., Mygind, T. & Meyer, R.L. 2012. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, 3: 12.
- Ikeura, H. & Kobayashi, F. 2015. Antimicrobial and antifungal activity of volatile extracts of 10 herb species against *Glomerella cingulata*. *Journal of Agricultural and Food Science*, 7(9): 77.
- Jeong, M.R., Park, P.B., Kim, D.H., Jang, Y.S., Jeong, H.S. & Choi, S.H. 2009. Essential oil prepared from *Cymbopogon citrates* exerted an antimicrobial activity against plant pathogenic and medical microorganisms. *Mycobiology*, 37(1): 48-52.
- Kalu, C.M., Kanu, S.A., Gangireddygar, V.S.R. & Ntushelo, K. 2018. Effect of *Solanum mauritianum* leaf extract on the growth and morphology of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *P. carotovorum* subsp. *brasiliense* and *Bacillus subtilis*. *South African Journal of Botany*, 115: 289.
- Kavanaugh, N.L. & Ribbeck, K. 2012. Selected antimicrobial essential oils eradicate *Pseudomonas* spp. And *Staphylococcus aureus* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 778: 4057-61.
- Kerekes, E.B., Deák, É., Takó, M., Tserennadmid, R., Petkovits, T., Vágvölgyi, C. & Krisch, J. 2013. Anti-biofilm forming and anti-quorum sensing activity of selected essential oils and their main components on food-related micro-organisms. *Journal of Applied Microbiology*, 115(4): 933-942.
- Kim, Y.G., Lee, J.H., Gwon, G., Kim, S.I., Park, J.G. & Lee, J. 2016. Essential oils and eugenols inhibit biofilm formation and the virulence of *Escherichia coli* O157: H7. *Scientific Reports*, 6: 36377.
- Mantsebo, C.C., Mazarura, U., Goss, M. & Ngadze, E. 2014. The epidemiology of *Pectobacterium* and *Dickeya* species and the role of calcium in postharvest soft rot infection of potato (*Solanum tuberosum*) caused by the pathogens: a review. *African Journal of Agricultural Research*, 9(19):1509-15.
- Mari, M., Bautista-Baños, S. & Sivakumar, D. 2016. Decay control in the postharvest system: role of microbial and plant volatile organic compounds. *Postharvest Biology and Technology*, 122: 70-81.
- Mehrsorosh, H., Gavanji, S., Larki, B., Mohammadi, M.D., Karbasian, A. & Bakhtari, A. 2014. Essential oil composition and antimicrobial screening of some Iranian herbal plants on *Pectobacterium carotovorum*. *Global Nest Journal*, 16: 240-250.
- Moghaddam, M. & Mehdizadeh, L. 2017. Chemistry of Essential Oils and Factors Influencing Their Constituents. In: *Soft Chemistry and Food Fermentation*, 379-419.
- Mirzaei-Najafgholi, H., Tarighi, S., Golmohammadi, M. & Taheri, P. 2017. The effect of citrus essential oils and their constituents on growth of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Molecules*, 14: 22(4):591.
- Mirzaei-Najafgholi, H., Aeni, M., Tarighi, S. & Golmohammadi, M. 2021. Comparing bacterial properties in relation to the virulence factors of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* strains and evaluating resistance of subtribe Citrinae cultivars to the most virulent strain. *Journal of Plant Pathology*, 103: 449-460.
- Mirzaei, H., Khademi, M., Nazarian_Firouzabadi, F. & Derikvand, F. 2022. Evaluation of the synergistic effect of dermasptin B1 recombinant proteins and essential oils against gram-negative phytopathogens using fractional Inhibitory Concentration Index (FIC). *Biological Journal of Microorganism*, (Accepted paper).
- Nissen, L., Zatta, A., Stefanini, I., Grandi, S., Sgorbati, B., Biavati, B. & Monti, A. 2010. Characterization and antimicrobial activity of essential oils of industrial hemp varieties (*Cannabis sativa* L.). *Fitoterapia*, 81(5): 413-419.
- O'Toole, G.A. 2011. Microtiter dish biofilm formation assay. *Journal of Visualized experiments*: 47.
- Omidi Nasab, M. & Aeni, M. 2020. Composition and antibacterial activity of the chemical essential oil of *Foeniculum vulgare* and *Eucalyptus* to control some important plant pathogenic bacteria. *Journal of Microbial World*, 12(4): 393-399.
- Olsen, N., Miller, J. & Nolte, P. 2006. *Diagnosis & Management of Potato Storage Diseases*. University of Idaho extension publication CIS 1131.
- Packiavathy, I.A.S.V., Priya, S., Pandian, S.K. & Ravi, A.V. 2014. Inhibition of biofilm development of uropathogens by curcumin—an anti-quorum sensing agent from *Curcuma longa*. *Food Chemistry*, 148: 453-460.
- Paradza, V.M., Icishahayo, D. & Ngadze, E. 2012. Efficacy of botanical extracts from garlic and neem on controlling potato soft rot pathogens. *UNISWA J Agric* 16, 1-10. Pinhero, G.P., Yada, R.Y., 2016.

- Postharvest storage of potatoes. In: Singh, J., Kaur, L. (Eds.), *Advances in Potato Chemistry and Technology*. Academic Press, London, 283–314.
- Pinhero, G.P. & Yada, R.Y. 2016. Postharvest storage of potatoes. In: Singh, J., Kaur, L. (Eds.), *Advances in Potato Chemistry and Technology*. Academic Press, London, pp. 283–314.
- Ramezani, A., Azadi, M., Mostowfizadeh-Ghalanfarsa, R. & Saharkhiz, M.J. 2016. Effect of *Zataria multiflora* Boiss and *Thymus vulgaris* L. Essential oils on black rot of 'Washington Navel' orange fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 112: 152–158.
- Szczepanski, S. & Lipski, A. 2014. Essential oils show specific inhibiting effects on bacterial biofilm formation. *Food Control*, 36(1): 224–229.
- Zaidi-Yahiaoui, R., Zaidi, F. & Bechar, S. 2008. Effect of *Olea europaea* L and *Salvia officinalis* leaves phenolics extracts on potato tubers soft rot disease. *Planta Medica*, 74 (09):PE9.
- Zaker, S., Gavanji, S., Sayedipour, S., Bakhtari, A., Shirani Bidabadi, E., Larki, B. & Golestannejad, Z. 2014. The effect of some herbal essential oils on pathogenic bacteria. *Ethno-Pharmaceutical Products*, 1(2): 23–34.
- Zivanovic, S., Chi, S. & Draughon, A.F. 2006. Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. *Journal of Food Science*, 70: 45–51.

Effects of some essential oils against growth and biofilm production of two plant pathogenic bacteria, *Pectobacterium carotovorum* and *Pectobacterium atrosepticum*

Milad Aeini¹, Hossein Mirzaei Najafgholi², Fatemeh Derikvand², Mitra Khademi³, Neda Rouhani²

1. Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

2. Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Lorestan university, Khorram Abad, Iran.

3. Production engineering and plant genetics department, Faculty of Agriculture, Lorestan university, Khorram Abad, Iran.

Corresponding authors: Milad Aeini, email: m.aeini@scu.ac.ir

Received: Nov., 09, 2022

9(2) 135–151

Accepted: Mar., 01, 2023

Abstract

Plant-derived essential oils (EOs) are a major group of environments-friendly compounds with antibacterial properties that have been used during the last decade. This study aimed to identify the chemical composition and evaluate the antimicrobial activity of EOs from *Lippia citriodora*, *Origanum vulgare*, *Phlomis fruticosa*, *Satureja spicigera*, and *Syzygium aromaticum* against two soft rot-including bacteria, *Pectobacterium carotovorum* and *Pectobacterium atrosepticum*. Plants were collected from Khuzestan province, and their essential oil composition was determined from gas-chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis. The antibacterial effect of Eos was measured by the disk diffusion method. The effect of EOs on biofilm formation was also assayed. In addition, minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were calculated accordingly. The interaction among the EOs was calculated according to the fractional inhibitory concentration (FIC) index using the Modified Dilution Checkboard method. The result showed that all Eos inhibited bacterial growth. The highest MIC (31/25) was attributed to *P. fruticosa* against *P. carotovorum* while the lowest MIC (125) belongs to *L. citriodora* and *S. spicigera* against *P. carotovorum*. FIC index showed that *L. citriodora* and *S. spicigera* are neutral to *P. carotovorum*. Analysis of GC-MS chromatogram indicated that the major constituents of *P. fruticosa*, *L. citriodora*, *O. vulgare*, *S. spicigera*, and *S. aromaticum* were *cis*-Thujone (17.47%), Isogeraniol (23%), *cis* Piperitone oxide (29.5%), Carvacrol (88.5%), Eugenol (98.7%), respectively. According to the results, in high MIC of Eos (125 ppm), bacteria were not able to form biofilm. Our results indicate that these five plant species have antimicrobial activity against *Pectinbacterium* species. Among all Eos used, *L. citriodora* and *P. fruticosa* showed the highest activity which, therefore, can be recommended for further applications.

Keywords: Disk diffusion, medicinal plant, inhibition, pathogenesis.