نشریه علمی ترویجی فناوری گیاهان دارویی ایران
دوره۳- شماره ۲- پیاپند ۵- پاییز و زمستان ۱۳۹۹

بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره آبی بومادران و پوست انار روی چند باکتری بیمارگر محصولات کشاورزی

Investigation of antimicrobial effect of aqueous extract of yarrow and pomegranate peel on some pathogenic bacteria of agricultural crops

فاطمه یوسفی کوپائی[۱]

۱. استادیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران ، (نگارنده مسئول)

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۵/۰۴ - شناسانهٔ برنمود رقمی:10.22092/mpt.2021.353953.1072

چکیده

یوسفی کوپایی، ف.، . بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره آبی بومادران و پوست انار روی چند باکتری بیمارگر محصولات کشاورزی
نشریه علمی ترویجی فناوری گیاهان دارویی ایران، دوره ۳ - شماره ۲- پیاپند ۵-پائیز و زمستان ۱۳۹۹ صفحه: ۸۴-۷۲

با توجه به اثرات سوء آفت‌کش‌های شیمیایی بر محیط و سلامت انسان، استفاده از عصاره‌های گیاهی برای سنتز ترکیبات ضدمیکروبی زیستی اهمیت ویژه ای دارد. در تحقیق حاضر اثر ضدباکتریایی عصاره آبی بومادران و پوست میوه انار روی *Bacillus cereus* و چند باکتری بیمارگر مهم محصولات کشاورزی شامل *Agrobacterium tumefaciens*، *Xanthomonas citri* subsp. *citri* و *Pseudomonas tolaasii* مورد بررسی قرار گرفت. عصاره‌گیری به روش خیساندن و بررسی خاصیت ضدباکتریایی به روش نشت از چاهک و در چهار غلظت متفاوت انجام گرفت. از آب‌مقطر و دیسک آنتی‌بیوتیک جنتامایسین به ترتیب به عنوان شاهد منفی و شاهد مثبت استفاده شد. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی و با چهار تکرار و مقایسه میانگین با روش حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال پنج درصد انجام شد. مقایسه میانگین قطر هاله بازدارنده از رشد در تیمارهای مختلف نشان داد که هر دو عصاره توانایی قابل توجهی در بازداری از رشد دو باکتری *B. cereus* و *A. tumefaciens* داشتند. عصاره بومادران روی *P. tolaasii* خاصیت بازدارندگی داشت که با افزایش غلظت عصاره، قدرت بازدارندگی آن نیز بیشتر می‌شد. هیچ یک از عصاره‌ها در غلظت‌های مورد بررسی روی *X. citri* subsp. *citri* اثر بازدارنده نداشتند. براساس نتایج حاصل، عصاره‌ی آبی گیاه بومادران و پوست میوه انار پتانسیل استفاده برای کنترل *A. tumefaciens* و *B. cereus* را داشته و بنابراین گزینه مناسبی برای بررسی‌های بعدی جهت سنتز ترکیبات ضدباکتریایی ایمن یا نگهدارنده طبیعی مواد غذایی می‌باشند.

واژه های کلیدی: اثر ضدباکتریایی، شانکر آسیایی مرکبات، گال طوقه، لکه باکتریایی قارچ خوراکی

آدرس پست الکترونیکی نگارنده مسئول: Email: yousefi@sku.ac.ir

مقدمه

در دهه‌های گذشته مشکلات زیست‌محیطی ناشی از استفاده بیش از حد از سموم آفت‌کش و به‌ویژه اثرات سوء آن‌ها روی سلامت انسان به چالش مهم بخش کشاورزی تبدیل شده و بنابراین استفاده از آفت‌کش‌های ایمن مورد توجه محققین قرار گرفته است. بیمارگرهای باکتریایی از عوامل مهم کاهش عملکرد بسیاری از محصولات کشاورزی هستند. محدود بودن تعداد ترکیبات باکتری‌کش در دسترس و محدودیت استفاده از آن‌ها به علت کارایی پایین در شرایط مزرعه و اثرات سوء روی محیط و سلامت انسان و حیوان کنترل بیماری‌های باکتریایی را مشکل کرده است. استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها به علت احتمال ظهور جمعیت‌های باکتریایی مقاوم و نیز امکان انتقال ژن‌های مقاومت به باکتری‌های بیماریزای انسانی و دامی محدود است. در مورد سموم مسی، علاوه بر مساله بروز مقاومت، آلودگی محیط زیست نیز مشکل‌ساز است و سبب محدودیت استفاده آنها می‌شود. بنابراین کنترل بیماری‌های باکتریایی گیاهان بیشتر بر پیشگیری و عملیات زراعی تکیه دارد (Iacobellis *et al*., 2005) و کشف و سنتز ترکیبات ضدباکتریایی ایمن امری بسیار ضروری است. استفاده سنتی از اسانس و عصاره‌های گیاهی برای درمان بیماری‌ها نشان می‌دهد که این ترکیبات پتانسیل استفاده برای سنتز ترکیبات ضدمیکروبی جدید را دارند (Hammer *et al*., 1999). مزیت استفاده از ترکیبات ضد میکروبی گیاهی نسبت به ترکیبات شیمیایی نداشتن اثرات جانبی سوء است (Van Wyk & Gericke, 2000). به علاوه گزارشی از بروز مقاومت به ترکیبات ضدمیکروبی گیاهی ثبت نشده است که احتمالا به خاطر مکانیسم عمل چندگانه آنها است که مانع از انتخاب سویه‌های باکتریایی مقاوم می‌شود (Upadhyay *et al*., 2014). در تحقیق حاضر تاثیر دو عصاره گیاهی روی *Bacillus cereus* و سه باکتری بیمارگر مهم محصولات کشاورزی شامل عوامل مولد بیماری‌های گال طوقه، شانکر آسیایی مرکبات و لکه باکتریایی قارچ خوراکی بررسی گردید.

باکتری *Bacillus cereus* یک باکتری گرم مثبت و اسپوردار است. این باکتری انتروتوکسین‌های مولد اسهال و تهوع ایجاد می‌کند و به عنوان عامل مسمومیت غذایی شناخته شده است (Murray *et al*., 2015). جهت جلوگیری از آلودگی مواد غذایی روشهای مختلف از جمله حرارت و اشعه‌دهی استفاده می‌شود. محققین صنایع غذایی به دنبال راهکارهای جدید برای حذف و ممانعت از رشد میکروبهای مضر، بدون تاثیر سوء روی کیفیت مواد غذایی هستند و به همین دلیل در پی ایجاد تکنولوژی‌های غیرحرارتی هستند (Severino *et al*., 2014). بنابراین معرفی ترکیبات ضدمیکروبی ایمن برای استفاده در مواد غذایی آماده، به‌خصوص محصولاتی که طعم و مواد مغذی آنها با حرارت بالا نحت تاثیر قرار می گیرد، بسیار مفید و کارآمد است.

Agrobacterium tumefaciens یک باکتری گرم منفی میله‌ای شکل و خاکزاد است و عامل گال طوقه در بسیاری از گیاهان است. گال طوقه

با ممانعت انتقال آب به بخشهای فوقانی منجر به ضعف و زوال گیاه و خسارت اقتصادی می‌شود. همچنین حساسیت گیاهان آلوده به سایر عوامل بیمارگر و تنش‌های محیطی افزایش می‌یابد (Escobar & Dandekar, 2003). کنترل این بیمارگر مشکل و بیشتر بر مبنای پیشگیری است (Yangui *et al*., 2008).

باکتری *Xanthomonas citri* subsp. *citri* نیز یکی از بیمارگرهای مهم از خانواده زانتوموناداسه است. این بیمارگر سبب بروز بیماری شانکر آسیایی مرکبات می‌شود. علائم بیماری شامل تشکیل زخمهای برجسته و تاول مانند روی بخشهای هوایی شامل ساقه، برگ و میوه است. ریزش پیش از موعد برگ‌ها و میوه‌ها، خشکیدگی سرشاخه ها و کاهش بازارپسندی میوه‌ها منجر به خسارت اقتصادی این بیماری می‌شود (Schubert *et al*., 2001). برای کنترل این بیماری استفاده از سموم مسی توصیه می شود که مساله بروز مقاومت به سموم مسی، سنتز و کشف ترکیبات ضدمیکروبی جدید را لازم ساخته است.

بیماری لکه قهوه‌ای قارچ خوراکی با عامل *Pseudomonas tolaasii* یکی از مهم‌ترین عوامل خسارت‌زا در مراکز پرورش قارچ خوراکی است. علائم این بیماری به صورت لکه های نامنظم زرد، قهوه ای تا سیاه روی کلاهک و ساقه قارچ مشاهده می شود (Gill, 1995). با توجه به مصرف تازه‌خوری و ماندگاری کوتاه مدت قارچ خوراکی، جهت تولید محصول سالم و ارگانیک سنتز ترکیبات ضدمیکروبی زیستی که بقایای مسموم روی محصول به جا نمی‌گذارند، ضروری است.

گیاه بومادران (*Achillea millefolium*) از گیاهانی است که از قدیم در طب سنتی استفاده می‌شده است. اثر ضدمیکروبی اسانس و عصاره‌های مختلف این گیاه روی انواع بیمارگرهای انسانی به اثبات رسیده است (Stanojković *et al*., 2005) ولی درمورد تاثیر آن در بازداری از بیمارگرهای گیاهی بررسی کمتری صورت گرفته است. پوست انار (*Punica granatum*) غنی از تانن، فلاونوئید و سایر ترکیبات فنلی است. ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی پوست انار در شرایط آزمایشگاهی بررسی شده است (Negi & Jayaprakasha, 2003)؛ با این حال تاکنون اثر پوست انار بر بیمارگرهای گیاهی مورد بررسی قرار نگرفته است. لذا در تحقیق حاضر اثر ضدباکتریایی عصاره آبی بومادران و عصاره آبی پوست انار روی سه جنس مختلف بیمارگر محصولات کشاورزی شامل *A. tumefaciens*، *X. citri* subsp. *citri* و *P. tolaasii* و نیز روی باکتری گرم مثبت *B. cereus* بررسی می‌شود.

مواد و روشها

تهیه جدایه‌های باکتریایی

جدایه‌های باکتریایی *A. tumefaciens* و *B. cereus* از کلکسیون میکروبی گروه گیاهپزشکی دانشگاه شهرکرد تهیه شدند. باکتری *P. tolaasii* از قارچ‌های خوراکی دارای علائم لکه باکتریایی جمع‌آوری شده از مراکز پرورش قارچ دگمه‌ای شهرستان شهرکرد جداسازی شد. باکتری *X. citri* subsp. *citri*

نیز از بافتهای لیموترش آلوده به شانکر آسیایی مرکبات جمع‌آوری شده از باغات استان کرمان جداسازی شد. جداسازی باکتریهای مذکور طبق روش‌های معمول جداسازی باکتری‌ها از بافتهای گیاهی انجام شد.

شناسایی جدایه‌های باکتریایی

به منظور شناسایی دو باکتری *P. tolaasii* و *X. citri* subsp. *citri* آزمون‌های فنوتیپی، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز[1] با جفت آغازگرهای اختصاصی مربوط به هر باکتری و آزمون بیماری‌زایی انجام گرفت. آزمونهای فنوتیپی طبق روش‌های استاندارد باکتری‌شناسی انجام شد (Schaad *et al*., 2001). واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای جدایه‌های مولد لکه باکتریایی قارچ خوراکی با جفت آغازگر اختصاصی Pt1A/1D (Lee *et al*., 200) و برای جدایه‌های مولد شانکر مرکبات با جفت آغازگر اختصاصی (Coletta-Filho *et al*., 2006) Xac01/02 صورت گرفت. استخراج دی‌ان‌ای به روش جوشاندن انجام شد (Queipo-Ortuño *et al*., 2008). برنامه دمایی مورد استفاده شامل چهار دقیقه واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس و به دنبال آن ۳۵ چرخه شامل سه مرحله ی واسرشت سازی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، هم جوشی برای جفت آغازگر Pt1A/1D در دمای ۶۳ و برای جفت آغازگر Xac01/02 در دمای ۶۰ درجه سلسیوس و گسترش در دمای ۷۲ درجه سلسیوس هرکدام به مدت یک دقیقه و درنهایت ۱۰ دقیقه گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس بود (Coletta-Filho *et al*., 2006; Lee *et al*., 2002).

آزمون بیماری‌زایی *P. tolaasii* و *X. citri* subsp. *citri*

در آزمون بیماری‌زایی از کشت تازه هر دو باکتری در آب‌مقطر سوسپانسیونی با غلظت تقریبی تقریبا 10^8 CFU/ml تهیه شد. مایه‌زنی *P. tolaasii* بدون ایجاد زخم و با پخش کردن ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری روی سطح کلاهک انجام شد (Khabbaz-Jolfaee & Rahimian,200).

کلاهک‌های مایه‌زنی شده در یک ظرف سترون حاوی پنبه مرطوب و درکیسه‌ی نایلونی قرار داده شدند و تا ۴۸ ساعت بعد از نظر ظهور علائم بررسی شدند. مایه‌زنی *X. citri* subsp. *citri* روی برگ نهال یک ساله لیمو ترش انجام شد. بدین منظور پنبه آغشته به سوسپانسیون باکتری بدون ایجاد زخم روی سطح برگ کشیده شد. نهال‌ها در شرایط گلخانه نگهداری شدند و تا دو ماه بعد از مایه زنی از نظر بروز علائم تحت نظر قرار گرفتند. در مورد هر دو باکتری مایه‌زنی نمونه‌های شاهد با آب‌مقطر سترون انجام شد. لازم به ذکر است جدایه آگروباکتریوم مورد استفاده در تحقیق حاضر قبلا روی گوجه‌فرنگی و گل رز مایه‌زنی و بیماری‌زایی آن (تشکیل گال در محل مایه‌زنی) تایید شده بود.

تهیه عصاره‌های گیاهی

تهیه عصاره به روش خیساندن در آب انجام شد. بخش‌های هوایی گیاه بومادران و پوست میوه انار (رقم محلی ترش پوست قرمز) در سایه خشک و با آسیاب پودر و از الک ۵۰ مش عبور داده شدند. جهت تهیه عصاره آبی ۱۰ گرم از

[1] Polymerase Chain Reaction (PCR)

پودر خشک هر گیاه به ۱۰۰ میلی‌لیتر آب‌مقطر اضافه و به مدت ۶۰ ساعت روی شیکر با سرعت ۱۶۰دور در دقیقه قرار داده شد. پس از عبور مخلوط از کاغذ صافی، عصاره حاصل به منظور تغلیظ به مدت دو روز در آون در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس با عبور دادن از فیلتر ۰/۴۵ میکرون سترون شد. عصاره‌ها تا زمان استفاده در یخچال نگهداری شدند.

تعیین مقدار ماده خشک عصاره‌ها

جهت تعیین مقدار ماده خشک موجود در هر عصاره، برای هر عصاره سه لوله آزمایش تمیز به طور جداگانه وزن شد. یک میلی‌لیتر عصاره به هر لوله اضافه شد. لوله‌ها تا زمان خشک شدن عصاره‌ها در ۶۰ درجه سلسیوس نگهداری و مجددا وزن شدند. با کم کردن وزن لوله حاوی عصاره خشک شده از وزن لوله خالی وزن ماده خشک موجود در هر میلی‌لیتر عصاره تعیین شد. میانگین سه تکرار به عنوان مقدار ماده خشک در هر میلی‌لیتر درنظرگرفته شد (Goudarzi *et al.*, 2006).

بررسی اثر ضدباکتریایی عصاره‌ها

آزمایش به روش نشت از چاهک انجام شد (Balouiri *et al.*, 2016). از هر عصاره با توجه به مقدار ماده خشک آن، غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تهیه شد. محیط کشت آگار غذایی تهیه و در پتری‌های ۱۰ سانتی‌متری به میزان مساوی توزیع شد. از کشت تازه باکتری‌های مورد نظر، سوسپانسیونی با جذب نوری ۰/۳ در ۶۰۰ نانومتر تهیه شد. در هر پتری ۲۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری با میله L شکل، به طور یکنواخت پخش شد. بعد از خشک شدن سطح محیط چاهکهایی به قطر ۰/۵ سانتی‌متر و تقریبا به فاصله دو سانتی‌متر از یکدیگر ایجاد و در هر چاهک ۵۰ میکرولیتر عصاره ریخته شد. بعد از تخلیه چاهک، پتری‌ها تا زمان رشد باکتری‌ها در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شدند. این آزمایش به صورت اسپلیت پلات-فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی و با چهار تکرار انجام شد. در هر مورد قطر هاله‌ی بازدارنده از رشد اندازه‌گیری و داده‌ها با نرم‌افزار SAS 9.1.3 تجزیه شد. جهت تجزیه واریانس، نرمال کردن داده ها با آزمون کولموگرو-اسمیرنو صورت گرفت. مقایسه میانگین با روش حداقل اختلاف معنی‌دار[۲] (LSD) در سطح پنج درصد انجام شد. از آب‌مقطر و دیسک آنتی‌بیوتیک حاوی ۱۰ میکروگرم جنتامایسین به ترتیب به عنوان شاهد منفی و شاهد مثبت استفاده شد.

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی عصاره ها

حداقل غلظت بازدارندگی[۳] و حداقل غلظت کشندگی[۴] عصاره ها درمورد باکتری‌هایی که عصاره ها روی آنها اثر بازدارندگی داشتند، تعیین شد. به این منظور ابتدا از هر دو عصاره در محیط کشت مایع مغذی[۵] در لوله های آزمایش سری رقت دو برابری به حجم نهایی دو میلی لیتر تهیه شد. به هر لوله ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری (OD_{600}=۰/۳) اضافه شد. محیط کشت حاوی باکتری و بدون عصاره

۲Least Significant Difference (LSD)
۳Minimum Inhibitory Concentration (MIC)
٤Minimum Bactericidal Concentration (MBC)
٥ Nutrient Broth (NB)

به عنوان شاهد مثبت و محیط کشت حاوی مخلوط عصاره و محیط کشت بدون باکتری به عنوان شاهد منفی استفاده شدند. پس از ۲۴ ساعت نگهداری در دمای ۲۸ درجه سلسیوس، لوله ها از نظر کدورت ناشی از رشد باکتری به طور چشمی ارزیابی شدند. کمترین رقتی از عصاره که در لوله‌ی مربوط به آن کدورتی مشاهده نشد یعنی باکتری رشد نکرده بود، به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی ثبت شد. جهت تعیین حداقل غلظت کشندگی از رقت هایی که کدورتی در آنها مشاهده نشده بود، حدود ۵۰ میکرولیتر محلول کشت داده شد. بعد از ۲۴ ساعت نگهداری در دمای ۲۸ درجه سلسیوس، کمترین رقتی که از کشت آن هیچ باکتری رشد نکرد؛ به عنوان حداقل غلظت کشندگی گزارش شد (Balouiri *et al*., 2016).

نتایج و بحث

شناسایی جدایه‌های باکتریایی

سویه‌های جدا شده از قارچ خوراکیِ دارای علائم لکه باکتریایی سفید رنگ، گرم منفی، هوازی اجباری و قادر به تولید رنگدانه فلورسنت روی محیط King's B بودند. در آزمون‌های فوق حساسیت، اکسیداز، آرژنین دی‌هیدرولاز و لهانیدن ورقه‌های سیب‌زمینی واکنش مثبت و در آزمون لوان واکنش منفی نشان دادند. این سویه‌ها در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با جفت‌آغازگر Pt1A/1D که ژن مربوط به تولید توکسین تولاسین را در باکتری *P. tolaasii* تکثیر می‌کند (Lee *et al*., 2002)، ردیابی شدند. در آزمون بیماری‌زایی روی قارچ خوراکی نیز باعث ایجاد لکه‌های قهوه‌ای روی سطح کلاهک شدند. این سویه‌ها با توجه به تطابق ویژگی‌های فنوتیپی با *P. tolaasii* (Schaad *et al*., 2001) ، ردیابی با آغازگر اختصاصی این باکتری و بروز علائم بیماری لکه قهوه‌ای در واکنش بیماری‌زایی، به عنوان *P. tolaasii* شناسایی شدند.

سویه‌های جداشده از بافتهای آلوده به شانکر مرکبات گرم منفی، کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی و هوازی اجباری بودند. دارای پرگنه زرد کرم رنگ بودند و روی محیط King's B رنگدانه فلورسنت ایجاد نکردند. این جدایه‌ها در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با جفت‌آغازگر Xac01/02 که به طور اختصاصی سویه‌های *X. citri* subsp. *citri* را ردیابی می‌کنند (Coletta-Filho *et al*., 2006)، قطعه‌ی ۵۸۱ جفت‌بازی مورد انتظار را تکثیر نمودند. در آزمون بیماری‌زایی نیز علائم تیپیک شانکر شامل زخم‌های برجسته با هاله زرد رنگ را ایجاد نمودند. این سویه‌ها با توجه به تطابق ویژگی‌های فنوتیپی با ویژگیهای توصیف شده برای *X. citri* (Schaad *et al*., 2001) ، ردیابی با آغازگر اختصاصی و همچنین بروز علائم بیماری شانکر در آزمون بیماری‌زایی به‌عنوان *X. citri* subsp. *citri* شناسایی شدند.

بررسی اثر ضدباکتریایی عصاره‌ها

تجزیه واریانس داده‌های حاصل از اندازه‌گیری قطر هاله بازدارنده از رشد چند باکتری در مقابل غلظتهای مختلف دو عصاره‌ی گیاهی مورد بررسی بیانگر اثر معنی‌دار نوع عصاره، غلظت عصاره، نوع باکتری و اثر متقابل آنها در سطح یک درصد بود. مقایسه میانگین قطر هاله بازدارنده از رشد حاصل از عصاره‌ها

در غلظتهای مختلف (جدول ۱) نشان داد که بیشترین اثر بازدارندگی مربوط به غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر هر دو عصاره روی *B. cereus* و *A. tumefaciens* است که در هر دو عصاره در این غلظت قطر هاله بازدارنده از رشد هر دو باکتری با اندازه تقریبا هشت میلی‌متر، به طور معنی‌دار بیشتر از قطر هاله بازدارنده در مقابل آنتی‌بیوتیک جنتامایسین بود.

در *A. tumefaciens* هر دو عصاره در دو غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثر بازدارندگی معنی‌دار داشتند؛ درحالی‌که در *B. cereus* عصاره بومادران در غلظتهای ۱۰۰ و ۲۰۰ و عصاره پوست انار فقط در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثر بازدارندگی داشت. در مورد *P. tolaasii* عصاره‌ی آبی پوست انار در غلظتهای به کار رفته اثر بازدارندگی نداشت ولی عصاره بومادران در دو غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثر بازدارندگی معنی دار داشت. هیچ کدام از عصاره‌ها در غلظتهای مورد بررسی روی *X. citri* subsp. *citri* اثر بازدارنده نداشتند. قابل ذکر است که قطر هاله بازدارنده از رشد این باکتری در مقابل جنتامایسین نیز به طور معنی‌داری کمتر از سایر باکتری‌ها بود. مقایسه میانگین اثر متقابل عصاره و باکتری (جدول ۲) نشان داد که بین عصاره انار و بومادران در تاثیر روی *A. tumefaciens* تفاوت معنی‌دار وجود ندارد ولی تاثیر عصاره بومادران روی *P. tolaasii* و *B. cereus* به طور معنی‌دار بیشتر از عصاره انار است.

حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی

جدول ۱- مقایسه میانگین قطر هاله بازدارنده از رشد حاصل از غلظت‌های مختلف عصاره آبی پوست انار و بومادران (سانتی‌متر) در باکتری‌های مختلف

نوع عصاره و آنتی‌بیوتیک	غلظت	میانگین			
		A. tumefaciens	*X. citri* subsp. *citri*	*P. tolaasii*	*B. cereus*
انار	صفر	۰/۰h	۰/۰h	۰/۰h	۰/۰h
	۲۵ mg/ml	۰/۰h	۰/۰h	۰/۰h	۰/۰h
	۵۰ mg/ml	۰/۰h	۰/۰h	۰/۰h	۰/۰h
	۱۰۰ mg/ml	۰/۴۸۷ef	۰/۰h	۰/۰h	۰/۰h
	۲۰۰ mg/ml	۰/۸۶۲a	۰/۰h	۰/۰h	۰/۸۷۵a
بومادران	صفر	۰/۰h	۰/۰h	۰/۰h	۰/۰h
	۲۵ mg/ml	۰/۰h	۰/۰h	۰/۰h	۰/۰h
	۵۰ mg/ml	۰/۰۷۵h	۰/۰h	۰/۱۰h	۰/۰h
	۱۰۰ mg/ml	۰/۵۶۲de	۰/۰h	۰/۳۲۵g	۰/۴۷۵ef
	۲۰۰ mg/ml	۰/۸۰ab	۰/۰h	۰/۵۸cde	۰/۸۳۷a
جنتامایسین	۱۰ µg	۰/۶۷۵cd	۰/۳۷۵fg	۰/۸۳۷a	۰/۷۰bc

میانگین‌های دارای حروف مشابه بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنیدار ندارند.

دیسک جنتامایسین به عنوان کنترل مثبت استفاده شده است.

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر متقابل عصاره و باکتری بر قطر هاله بازدارنده از رشد باکتری‌های مورد بررسی

نوع عصاره (و آنتی‌بیوتیک)	میانگین			
	A. tumefaciens	*X. citri* subsp. *citri*	*P. tolaasii*	*Bacillus cereus*
انار	۰/۲۷d	۰/۰f	۰/۰f	۰/۱۷۵e
بومادران	۰/۲۸۷d	۰/۰f	۰/۲۰۲e	۰/۲۶۲d
جنتامایسین	۰/۶۷۵b	۰/۳۷۵c	۰/۸۳۷a	۰/۷۰b

میانگین‌های دارای حروف مشابه بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنیدار ندارند.

عصاره انار برای *B. cereus* به ترتیب ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و برای *A. tumefaciens* به ترتیب ۱۲/۵ و ۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تعیین شد. حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره بومادران برای *P. tolaasii* به ترتیب ۱۲/۵ و ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و برای *A. tumefaciens* به ترتیب ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تعیین شد. حداقل غلظت بازدارندگی عصاره بومادران برای *B. cereus* 50 میلی‌گرم در میلی‌لیتر و حداقل غلظت کشندگی آن بیش از ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تعیین شد.

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که عصاره آبی بومادران و پوست انار از نظر خاصیت ضدباکتریایی با یکدیگر تفاوت معنی‌دار دارند. باکتری‌های مورد بررسی نیز از نظر حساسیت به عصاره‌ها متفاوت بودند. بنابراین برای کاربرد یا معرفی هر عصاره گیاهی برای هر نوع بیمارگر، انجام آزمایشات غربالگری الزامی است. عصاره‌ها در غلظت ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر روی هیچ کدام از باکتری‌ها اثر بازدارنده‌ی معنی‌دار نداشتند که با توجه به مصرف ۵۰ میکرولیتر عصاره در هر چاهک، این نتیجه مربوط به کم بودن مقدار ماده خشک عصاره (۱/۲۵ و ۲/۵ میلی‌گرم در هر چاهک) است که قطعا غلظت ترکیب موثره هر عصاره از این مقدار نیز کمتر است.

هر دو عصاره مورد استفاده در تحقیق حاضر قدرت بازداری از باکتری *B. cereus* را داشتند. براین اساس هر دو عصاره گزینه‌های مناسبی جهت بررسی‌های بعدی به منظور استفاده به عنوان نگهدارنده‌ی طبیعی درصنایع غذایی هستند. تاثیر عصاره پوست انار روی *B. cereus* در مطالعات قبلی نیز بررسی و تایید شده است. بر این اساس گزارش شده که عصاره آبی پوست انار روی باکتری‌های گرم مثبت مانند *B. cereus* و *Staphylococcus aureus* و نیز باکتری‌های گرم منفی مانند *Klebsiella pneumonia* و *Pseudomonas aeruginosa* و *Escherichia coli* اثر بازدارندگی دارد. بالاترین اثر بازدارندگی به ترتیب مربوط به *B. cereus*، *S. aureus* و *K. pneumonia* بوده است (Dahham *et al*., 2010). در مورد بررسی تاثیر عصاره آبی بومادران روی *B. cereus* گزارشی مشاهده نشد ولی تاثیر عصاره متانولی گل و برگ این گیاه در بازداری از *B. cereus* و *S. aureus* موفق گزارش شده است (Amjad *et al*., 2011).

در کنترل *A. tumefaciens* نیز هر دو عصاره مورد بررسی توانایی قابل توجهی نشان دادند. در یک مطالعه با بررسی تاثیر عصاره‌های مختلف چند گیاه از خانواده کاسنیان به روش نشت از دیسک، عصاره آبی و اتانولی بومادران و عصاره اتانولی و اتیل استات *Helychrysum arenarium* به عنوان موثرترین ترکیبات در بازداری از رشد *A. tumefaciens* گزارش شدند (Stanojković *et al*., 2009). نتیجه تحقیق حاضر در مورد موثر بودن عصاره آبی بومادران در کنترل باکتری مولد گال طوقه با این گزارش تطابق دارد. گزارشی در مورد بررسی تاثیر عصاره پوست انار روی این باکتری وجود ندارد.

با توجه به اینکه باسیلوس گرم مثبت و آگروباکتریوم گرم منفی است؛ تاثیر عصاره بومادران و عصاره پوست انار روی این دو باکتری نشان می‌دهد که احتمالا نحوه عمل این عصاره‌ها مستقل از تاثیر روی دیواره سلولی یا غشای خارجی است و می‌تواند بیانگر حضور یک متابولیت ضدمیکروبی عمومی در این عصاره‌ها باشد.

در مورد *P. tolaasii* عصاره پوست انار در غلظت‌های مورد بررسی قدرت بازدارندگی نداشت؛ ولی اثر عصاره بومادران در دو غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر معنی دار بود و با افزایش غلظت قدرت بازدارندگی آن افزایش نشان داد. در یک مطالعه دیگر با بررسی تاثیر بازدارندگی ۱۷ عصاره گیاهی علیه *P. tolaasii*، عصاره‌های گل‌اروانه، بومادران و چز به عنوان موثرترین ترکیبات معرفی شدند (Nourbakhsh Shourabi *et al*., 2020) که نتیجه تحقیق حاضر درمورد اثر بازدارندگی بومادران روی این باکتری را تایید می‌کند.

در مورد *X. citri* subsp. *citri* هیچ کدام از عصاره‌ها در غلظت‌های مورد بررسی تاثیر بازدارندگی نداشتند. این نکته قابل توجه است که قطر هاله بازدارنده از رشد این باکتری در مقابل جنتامایسین نیز به طور معنی داری کمتر از سایر باکتری‌ها بود که بیانگر مقاومت بیشتر این باکتری به ترکیبات ضدمیکروبی مورد استفاده است. با توجه به اینکه این باکتری دارای پلی‌ساکارید خارج سلولی زانتان می‌باشد؛ ممکن است علت مقاومت آن به ترکیبات مورد استفاده، کم بودن نفوذپذیری سلول نسبت به ترکیبات ضدمیکروبی در مقایسه با سایر باکتری‌ها باشد. البته این احتمال وجود دارد که کاربرد غلظتهای بالاتر عصاره‌ها روی این باکتری موثر باشند. در مورد بررسی تاثیر عصاره بومادران و پوست انار روی این باکتری گزارشی مشاهده نشد.

فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی مربوط به نوع و غلظت ترکیبات ضدمیکروبی در آنهاست (Soković & Van Griensven, 2006). این نکته نباید نادیده گرفته شود که غلظت و نوع ترکیبات هر گونه گیاهی تحت تاثیر مرحله رشدی گیاه و شرایط رشد گیاه است (Gillitzer *et al*., 2012). در باکتری‌های مورد بررسی در تحقیق حاضر، اثر ضدباکتریایی بومادران بیشتر از پوست انار بود. در مطالعات مختلف اثر ضدمیکروبی اسانس و عصاره‌های گونه‌های مختلف بومادران نسبت به چندین بیمارگر مختلف مورد بررسی و تایید قرار گرفته است. اثر بازدارندگی عصاره الکلی و

آبی بومادران روی *S. aureus*، *P. aeruginosa* و *E. coli* بررسی شده است. براساس نتایج، عصاره بومادران روی هر سه باکتری مذکور تاثیر بازدارنده داشته است ولی حساسیت *S. aureus* بیشتر از بقیه بوده است. درضمن، اثر بازدارندگی عصاره الکلی و آبی با یکدیگر اختلاف معنی‌دار نداشته است (Tajik & Shokouhi Sabet Jalali, 2009). اثرات ضدمیکروبی مختلف این گیاه احتمالا به علت حضور انواع مختلف متابولیت‌های ثانویه از جمله فلاونوئیدها، اسیدهای فنولیک، کومارین‌ها، ترپنوئیدها (مونوترپن‌ها، سسکوئی‌ترپن‌ها، دی‌ترپن‌ها و تری‌ترپن‌ها) و استرول‌هاست که مکررا از انواع گونه‌های بومادران گزارش شده‌اند (Saeidnia *et al*., 2011).

پوست انار به علت وجود تانن‌ها و انواع ترکیبات پلی‌فنلی از جمله گالیک اسید، پونیکالاژین و مشتقات الاژیک اسید خاصیت ضدباکتریایی، ضدالتهابی و ضدویروسی دارد (Sorrenti *et al*., 2019). تاثیر آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی پوست انار روی انواع باکتری‌های گرم مثبت و منفی و قارچهای بیمارگر جانوری تایید شده است (Negi & Jayaprakasha, 2003). با مقایسه تاثیر بازدارندگی عصاره پوست انار، دانه و آب انار روی چند باکتری بیماری‌زای گرم مثبت و منفی، بیشترین خاصیت ضدمیکروبی مربوط به پوست انار نسبت داده شده است که احتمالا به علت فراوان‌تر بودن ترکیبات فنلی در پوست انار است (Dahham *et al*., 2010). عصاره متانولی پوست انار روی چند باکتری غذایی مانند *Listeria monocytogenes*، *S. aureus*، *E. coli* و *Yersinia enterocolitica* اثر بازدارندگی نشان داده است (Al-Zoreky, 2009). بر اساس اطلاعات نگارنده تحقیق حاضر اولین بررسی درمورد تاثیر عصاره پوست انار روی باکتری‌های بیمارگر گیاهی است. در این مطالعه، عصاره آبی پوست انار روی باکتری بیمارگر گیاهی *A. tumefaciens* و باکتری *B. cereus* اثر بازدارندگی قابل توجهی نشان داد.

یافته‌های ترویجی

خطرات زیست‌محیطی حاصل از استفاده از آفت‌کش‌های شیمیایی و افزایش بروز مقاومت به آفت‌کش‌ها باعث شده سنتز آفت‌کش‌های جدید به خصوص آفت‌کش‌های زیستی ایمن برای انسان و محیط زیست ضرورت فعلی بخش کشاورزی باشد براساس نتایج تحقیق حاضر عصاره‌ی آبی گیاه بومادران و پوست میوه انار پتانسیل استفاده برای کنترل *A. tumefaciens* و *B. cereus* را دارند. عصاره‌ی بومادران توانایی بازداری از *P. tolaasii* را نیز دارد. بنابراین، این دو عصاره گزینه مناسبی برای بررسی توانایی کنترل باکتری‌های مذکور در شرایط زنده (*in vivo*) و بررسی‌های بعدی جهت سنتز ترکیب ضدباکتریایی ایمن می‌باشند. با توجه به اینکه پوست انار بخش غیرخوراکی است و از ضایعات کارخانه‌های تهیه نوشیدنی محسوب می‌شود، لذا استفاده از آن به عنوان ترکیب ضدمیکروبی در کشاورزی، صنایع غذایی و پزشکی صرفه اقتصادی دارد.

سپاسگزاری

از دانشگاه شهرکرد به خاطر تامین هزینه‌های

این تحقیق قدردانی می گردد.

References:

Al-Zoreky, N., 2009. Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. International Journal of Food Microbiology, 134(3): 244-248.

Amjad, L., Mohammadi Kamalabadi, M., and Mohammadi Sichani, M., 2011. Antibacterial activity of methanol extract of *Achillea Wilhelmsii* C. koch flower and leaf. Qom University of Medical Sciences Journal, 5(3): 50-56.

Balouiri, M., Sadiki, M., and Ibnsouda, S. K., 2016. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. Journal of Pharmaceutical Analysis, 6(2): 71-79.

Coletta-Filho, H., Takita, M., De Souza, A., Neto, J., Destefano, S., Hartung, J., and Machado, M., 2006. Primers based on the rpf gene region provide improved detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in naturally and artificially infected citrus plants. Journal of Applied Microbiology, 100(2): 279-285.

Dahham, S.S., Ali, M.N., Tabassum, H., and Khan, M., 2010. Studies on antibacterial and antifungal activity of pomegranate (*Punica granatum* L.). American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences, 9(3): 273-281.

Escobar, M.A., and Dandekar, A.M., 2003. *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease. Trends in plant science, 8(8): 380-386.

Gill, W.M., 1995. Bacterial diseases of *Agaricus* mushrooms. Reports of the Tottori Mycological Institute, 33:34-55

Gillitzer, P., Martin, C., Kantar, M., Kauppi, K., Dahlberg, S., Lis, D., Kurle, J., Sheaffer, C., and Wyse, D., 2012. Optimization of screening of native and naturalized plants from Minnesota for antimicrobial activity. Journal of Medicinal Plants Research, 6(6): 938-949.

Goudarzi, M., Satari, M., Najar, P.S., Goudarzi, G.R., and Bigdeli, M., 2006. Antibacterial effects of aqueous and alcoholic extracts of Thyme on enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Yafte, 8(3): 63-69

Hammer, K.A., Carson, C.F., and Riley T.V., 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. Journal of Applied Microbiology,

86(6): 985-990.

Iacobellis, N.S., Lo Cantore, P., Capasso, F., and Senatore, F., 2005. Antibacterial activity of *Cuminum cyminum* L. and *Carum carvi* L. essential oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(1): 57-61.

Khabbaz-Jolfaee, H., and Rahimian, H., 2002. Brown blotch disease of cultivated mushroom (*Agaricus bisporus*) in Iran. Iranian Journal of Plant Pathology, 38: 1-10

Lee, H.I., Jeong, K.S., and Cha, J.S., 2002. PCR assays for specific and sensitive detection of *Pseudomonas tolaasii*, the cause of brown blotch disease of mushrooms. Letters in Applied Microbiology, 35(4): 276-280.

Murray, M.P.P., Rosenthal, K., and Pfaller, M., 2015. Medical Microbiology. Elsevier. 848pp.

Negi, P., and Jayaprakasha, G., 2003. Antioxidant and antibacterial activities of *Punica granatum* peel extracts. Journal of Food Science, 68(4): 1473-1477.

Nourbakhsh Shourabi, S.F., Yousefi Kopaei, F., and Mohammadi Eshkaftaki, R., 2020. Screening of plant extracts for antibacterial activity against *Pseudomonas tolaasii* and *Ewingella americana*, the bacterial pathogens of cultivated button mushroom. Journal of Crop Protection, 9(3): 367-380.

Queipo-Ortuño, M.I., Colmenero J.D.D., Macias, M., Bravo, M.J., and Pilar, M., 2008. Preparation of bacterial DNA template by boiling and effect of immunoglobulin G as an inhibitor in real-time PCR for serum samples from patients with brucellosis. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 15(2): 293-296.

Saeidnia, S., Gohari, A., Mokhber-Dezfuli, N., and Kiuchi, F., 2011. A review on phytochemistry and medicinal properties of the genus *Achillea*. DARU Journal of Pharmaceutical Sciences, 19(3): 173-186.

Schaad, N.W., Jones, J.B., and Chun, W., 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. American Phytopathological Society Press. 373 pp.

Schubert, T.S., Rizvi, S.A., Sun, X., Gottwald, T.R., Graham, J.H., and Dixon, W.N., 2001. Meeting the challenge of eradicating citrus canker in Florida—again. Plant Disease, 85(4): 340-356.

Severino, R., Vu, K.D., Donsì, F., Salmieri, S., Ferrari, G., and Lacroix, M., 2014. Antimicrobial effects of different combined non-thermal treatments against *Listeria monocytogenes* in broccoli florets. Journal of Food Engineering, 124: 1-10.

Soković, M., and Van Griensven, L.J., 2006. Antimicrobial activity of essential oils

and their components against the three major pathogens of the cultivated button mushroom, *Agaricus bisporus*. European Journal of Plant Pathology, 116(3): 211-224.

Sorrenti, V., Randazzo, C.L., Caggia, C., Ballistreri, G., Romeo, F. V., Fabroni, S., Timpanaro, N., Raffaele, M., and Vanella, L., 2019. Beneficial effects of pomegranate peel extract and probiotics on pre-adipocyte differentiation. Frontiers in Microbiology, 10: 660.

Stanojković, A., Pivić, R., Jošić, D., and Stanojković, A., 2009. The possibility of using plant extracts in control of *Agrobacterium tumefaciens* (Schmit and Townsend) Conn. 44th Croatian & 4th International Symposium on Agriculture, 16-20 February, Opatija, Croatia. 96-103.

Tajik, H., and Shokouhi Sabet Jalali, F., 2009. Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of aqueous and alcoholic extracts of yarrow against pathogenic microorganisms. Journal of Urmia University of Medical Science, 19(4): 302-309.

Upadhyay, A., Upadhyaya, I., Kollanoor-Johny, A., and Venkitanarayanan, K., 2014. Combating pathogenic microorganisms using plant-derived antimicrobials: a minireview of the mechanistic basis. BioMed Research International. Available from: https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1155/2014/761741 [accessed 13Jan 2021]

Van Wyk, B.-E., and Gericke, N., 2000. People's plants: A guide to useful plants of Southern Africa. Briza publications. 352pp.

Yangui, T., Rhouma, A., Gargouri, K., Triki, M.A., and Bouzid, J., 2008. Efficacy of olive mill waste water and its derivatives in the suppression of crown gall disease of bitter almond. European Journal of Plant Pathology, 122(4): 495-504.

Investigation of antimicrobial effect of aqueous extract of yarrow and pomegranate peel on some pathogenic bacteria of agricultural crops

Fatemeh Yousefi Kopaei[1]

1. Associate professor, Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, IRAN . (Corresponding author)

Received: March 2021 Accepted: July 2021 - DOI: 10.22092/mpt.2021.353953.1072

Abstract

Yousefi Kopaei, F., Investigation of antimicrobial effect of aqueous extract of yarrow and pomegranate peel on some pathogenic bacteria of agricultural crops
Iranian Medicinal Plants Technology, Vol 3, No. 2, 2020-21 11-12: 72-84(in Persian)

Abstract:

Regarding to the adverse side effects of chemical pesticides to the environment and human health, use of plant extracts has considerable significance for synthesis of bio-antimicrobial compounds. In the present study, the antibacterial effect of aqueous extract of yarrow (*Achillea millefolium*) and pomegranate peel was investigated on *Bacillus cereus* and some important pathogenic bacteria of agricultural crops, including *Agrobacterium tumefaciens*, *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and *Pseudomonas tolaasii.* The extraction was performed by maceration method. Antibacterial effect of extracts was evaluated using agar well diffusion method at four concentrations. Distilled water and Gentamycin disc were used as negative and positive control groups, respectively. The experiment was set up as factorial in completely randomized design (CRD) with four replications and mean comparison was performed by LSD at the probability level of 5%. Mean comparison of the growth inhibition zone diameter in different treatments reveled that both extracts had considerable

Email address of the corresponding author: yousefi@sku.ac.ir

inhibitory activity against *B. cereus* and *A. tumefaciens*. On *P. tolaasii,* the extract of yarrow showed antibacterial activity and its inhibitory activity was improved with an increase in its concentration. None of the extracts at tested concentrations showed antibacterial activity against *X. citri* subsp. *citri.* According to the results, the aqueous extracts of yarrow and pomegranate peel have the potential to be used in control of *A. tumefaciens* and *B. cereus.* Consequently, they are good candidates for further assays in order to synthesis safe antibacterial compounds or natural food preservative.

Key words. Antibacterial effect, Asiatic citrus canker, Crown gall, Bacterial blotch of mushroom