بررسی اثر اسانس آویشن باغی روی رشد باکتری عامل گال طوقه مو و تاثیر آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین روی تاثیرگذاری اسانس

کیوان فری، مریم خضری*
گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه
*نویسنده مسئول: *m.khezri@urmia.ac.ir*

چکیده

با توجه به مشکلات زیست محیطی فراوانی که در نتیجه مصرف ترکیبات شیمیایی در کشاورزی ایجاد شده است، استفاده از ترکیبات طبیعی مانند اسانس‌های گیاهی در کاهش خسارت بیماری‌ها ضروری می‌باشد. در این تحقیق، تاثیر اسانس آویشن باغی و آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین در ممانعت از رشد باکتری *Agrobacterium tumefaciens* مورد بررسی قرار گرفت. غلظت‌های مختلف اسانس و آنتی‌بیوتیک جهت تعیین حداقل غلظت بازدارندگی از رشد باکتری مورد استفاده قرار گرفت. بر اساس نتایج این تحقیق، حداقل غلظت بازدارندگی اسانس ۲۵۰ میکرولیتر در لیتر و آنتی‌بیوتیک ۰/۰۰۱۸ میلی‌گرم در لیتر تعیین شد. جهت تعیین تاثیر آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین بر عملکرد اسانس آویشن باغی، محیط کشت نوترینت براث حاوی نصف غلظت حداقل بازدارندگی از رشد آنتی‌بیوتیک و غلظت‌های مختلف اسانس تهیه شد. حداقل غلظت بازدارندگی، مقدار ۱۲۵ میکرولیتر در لیتر تعیین شد. بر اساس شاخص تعریف شده، استرپتومایسین روی عملکرد اسانس اثر هم‌افزایی نشان داد. بر اساس نتایج این تحقیق، اسانس آویشن باغی قابلیت جلوگیری از رشد باکتری عامل گال طوقه انگور را دارد و در برنامه مدیریت این بیماری قابل استفاده می‌باشد.

کلمات کلیدی: اگروباکتریوم، اسانس، گیاهان دارویی، *Thymus vulgaris*.

مقدمه

باکتری *Agrobacterium tumefaciens* یک باکتری خاک‌برد، گرم منفی، متحرک و فاقد اندوسپور است که در گیاهان مختلف ایجاد گال می‌نماید (Schaad *et al.*, 2001). اولین گزارش این باکتری از تاکستان‌های فرانسه در سال ۱۸۵۳ است و به عنوان یک عامل محدودکننده کشت انگور در دنیا مطرح می‌باشد. در حال حاضر، گونه‌های دیگر جنس اگروباکتریوم از میزبان‌های مختلف در سراسر دنیا گزارش شده است. روش‌های مختلف در پیشگیری و کنترل بیماری جهت کاهش خسارت به محصولات کشاورزی ارائه شده است. برخی از این روش‌ها مبتنی بر کاربرد سموم مسی می‌باشند که روشی اثربخش و فراهم‌کننده سریع‌ترین راهکار در مدیریت بیماری است اما آلودگی‌های زیادی در اکوسیستم‌های کشاورزی و منابع طبیعی به همراه دارد (Talibi *et al.*, 2011). از جمله روش‌های ایمن‌تر در مدیریت بیماری‌های گیاهی، استفاده از اسانس‌ها، عصاره‌های آبی، استونی و متانولی گیاهان معطر می‌باشد. این گیاهان که غالبا از خانواده نعناعیان و چتریان می‌باشند، دارای خاصیت ضدمیکروبی، ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی قوی هستند (Patharakorn *et al.*, 2010). خاصیت ضدمیکروبی اسانس‌ها در علوم داروسازی و صنایع غذایی کاملا شناخته شده است. دانشمندان ویژگی ضدباکتریایی اسانس‌ها را به وجود ترکیباتی مانند کاروکرول، پاراسیمن، اوژنول و ترپن مربوط می‌دانند (Dufour, 2002; Friedman *et al.*, 2002; Burt, 2004).

در این تحقیق، تاثیر اسانس آویشن باغی در ممانعت از رشد باکتری اگروباکتریوم در آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفت و حداقل غلظت بازدارندگی از رشد باکتری توسط اسانس آویشن باغی و آنتی‌بیوتیک استرپتوماسین تعیین گردید. همچنین تاثیر متقابل اسانس و آنتی‌بیوتیک در بازدارندگی از رشد باکتری مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

سویه باکتری بیماری‌زا

IrHC2019

در این آزمایش، یک سویه باکتری بیماری‌زای گیاهی از گونه *A. tumefaciens*، جداسازی شده از گال‌های درخت گیلاس در باغی در اطراف ارومیه استفاده شد. شناسایی فنوتیپی باکتری با استفاده از کلیدهای معتبر شناسایی باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی انجام شد (Klement *et al.*, 1990; Schaad *et al.*, 2001). بیماری‌زایی باکتری با تلقیح سوسپانسیون ۱×۱۰^{۸} CFU/ml[1] باکتری به بوته ۵-۴ برگی گوجه‌فرنگی و ایجاد گال اثبات شد (Schaad *et al.*, 2001).

اسانس گیاهی

به منظور تهیه اسانس مورد استفاده در آزمایش، مقدار ۵۰ گرم اندام هوایی آویشن باغی (*Thymus vulgaris*) آسیاب شد و اسانس‌گیری با استفاده از سولفات سدیم بدون آب در دستگاه کلونجر به مدت ۳ ساعت انجام شد. سترون نمودن اسانس با استفاده از میکروفیلتر ۰/۲۲ میکرون انجام شد و اسانس در ظرف شیشه‌ای تیره در یخچال با دمای ۴ درجه سلسیوس تا زمان انجام آزمایش‌ها نگه‌داری گردید.

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی از رشد باکتری (MIC)[2]

جهت تعیین کمترین غلظت اسانس آویشن باغی و آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین سری رقت تهیه شد. سری رقت اسانس شامل ۸ غلظت ۳۲/۲۵ تا ۱۵۰۰ میکرولیتر در لیتر محیط نوترینت براث (NB)[3] بود. سری رقت آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین نیز شامل ۸ غلظت ۰/۰۱۵ تا ۰/۰۰۰۱۱ میلی‌گرم در لیتر محیط بود. سوسپانسیون ۱×۱۰^{۹} CFU/ml باکتری بیمارگر تهیه شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری به لوله‌های حاوی ۲ میلی‌لیتر محیط کشت مایع و اسانس یا محیط کشت مایع و آنتی‌بیوتیک اضافه شد. لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس نگه‌داری شدند. کمترین غلظت از اسانس و یا آنتی‌بیوتیک که در آن باکتری رشد نکرده بود، به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی از رشد باکتری در نظر گرفته شد (Talibi *et al.*, 2011).

تعیین غلظت کشندگی باکتری توسط اسانس و آنتی‌بیوتیک (MBC)[4]

مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف اسانس و آنتی‌بیوتیک که باکتری در آن‌ها رشد نکرده بود به لوله‌های حاوی ۲ میلی‌لیتر محیط کشت NB اضافه شد. در صورت عدم رشد باکتری در این لوله‌ها، غلظت تیمار مربوطه به عنوان غلظت کشندگی در نظر گرفته شد (Talibi *et al.*, 2011).

تعیین اثر متقابل آنتی‌بیوتیک بر بازدارندگی از رشد باکتری توسط اسانس (FIC)[5]

جهت تعیین شاخص FIC اسانس، غلظت نصف حداقل غلظت بازدارنده (MIC) آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین به غلظت‌های اسانس شامل ۳۲/۲۵ تا ۱۵۰۰ میکرولیتر در لیتر محیط NB اضافه شد. شاخص FIC اسانس آویشن باغی با استفاده از رابطه زیر تعیین گردید (Jarrar *et al.*, 2010).

FIC (اسانس) = MIC اسانس در ترکیب با آنتی‌بیوتیک / MIC فقط اسانس

اثر آنتی‌بیوتیک روی عملکرد غلظت‌های مختلف اسانس در بازدارندگی از رشد باکتری به صورت زیر تعیین شد (Jarrar *et al.* 2010):

- هم‌افزایی[6]: FIC ≤ ۱

[1] Colony forming unit/ milliliter
[2] Minimum inhibitory concentration
[3] Nutrient broth
[4] Minimum bactericidal concentration
[5] The fractional inhibitory concentration
[6] Synergistic

IrHC2019

- افزایشی[7]: FIC = ۱
- بی‌تاثیر[8]: ۱< FIC < ۲
- ضدیت[9]: FIC ≥ ۲

آزمایش‌ها در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شدند. برای هر تیمار چهار تکرار در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

در این تحقیق، از غلظت‌های مختلف اسانس آویشن باغی و آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین در بازدارندگی از رشد باکتری بیماری‌زای گیاهی *A. tumefaciens* استفاده شد. بر اساس نتایج این تحقیق، از بین ۸ غلظت اسانس شامل غلظت‌های ۳۲/۲۵ تا ۱۵۰۰ میکرولیتر در لیتر محیط، غلظت ۲۵۰ میکرولیتر در لیتر به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی از رشد باکتری توسط اسانس تعیین شد (جدول ۱).

جدول ۱- تاثیر غلظت‌های مختلف در سری رقت اسانس آویشن باغی بر رشد باکتری *A. tumefaciens*

غلظت اسانس آویشن‌باغی (µl/L)	۳۲/۲۵	۶۲/۵	۱۲۵	۲۵۰	۵۰۰	۷۵۰	۱۰۰۰	۱۵۰۰	شاهد
رشد سویه باکتری	+	+	+	MIC	−	−	−	−	+

در این تحقیق، همچنین تاثیر ۸ غلظت آنتی‌بیوتیک شامل ۰/۰۱۵ تا ۰/۰۰۰۱۱ میلی‌گرم در لیتر محیط روی رشد باکتری بیماری‌زا مورد ارزیابی قرار گرفت. از بین غلظت‌های مورد بررسی، غلظت ۰/۰۰۱۸ میلی‌گرم در لیتر به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی از رشد باکتری توسط آنتی‌بیوتیک تعیین شد (جدول ۲).

جدول ۲- تاثیر غلظت‌های مختلف آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین روی رشد باکتری بیماری‌زا

غلظت آنتی‌بیوتیک (mg/L)	۰/۰۰۰۱۱	۰/۰۰۰۲۳	۰/۰۰۰۴۶	۰/۰۰۰۹۲	۰/۰۰۱۸	۰/۰۰۳۷	۰/۰۰۷۵	۰/۰۱۵	شاهد
رشد سویه باکتری	+	+	+	+	MIC	−	−	−	+

در بخش دیگر، بازدارندگی از رشد باکتری بیماری‌زا توسط غلظت‌های مختلف اسانس آویشن‌باغی در ترکیب با غلظت نصف حداقل غلظت بازدارندگی آنتی‌بیوتیک (۰/۰۰۰۹۲ mg/L)، با هدف بررسی تاثیر متقابل اسانس و آنتی‌بیوتیک (FIC) انجام شد. بر اساس نتایج، مقدار حداقل غلظت بازدارندگی، غلظت ۱۲۵ میکرولیتر در لیتر تعیین شد (جدول ۳).

جدول ۳- تاثیر بازدارندگی از رشد باکتری بیماری‌زا توسط غلظت‌های مختلف اسانس آویشن‌باغی در ترکیب با آنتی‌بیوتیک

غلظت اسانس آویشن‌باغی (µl/L) در ترکیب با آنتی‌بیوتیک غلظت ۰/۰۰۰۹۲ (mg/L)	۳۲/۲۵	۶۲/۵	۱۲۵	۲۵۰	۵۰۰	۷۵۰	۱۰۰۰	۱۵۰۰	شاهد
رشد سویه باکتری	+	+	MIC	−	−	−	−	−	+

[7] Additive
[8] In different
[9] Antagonistic

IrHC2019

به دلیل اینکه عدد شاخص FIC بر اساس رابطه تعریف شده ۰/۵ می‌باشد، تاثیر آنتی‌بیوتیک روی عملکرد اسانس به صورت هم‌افزایی تعیین شد.

مطالعات مختلف اثر عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی را در کنترل رشد باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی نشان داده‌اند (Alsup, 2004). نتایج یک پروژه تحقیقاتی نشان داد عصاره سیر به خوبی قادر به کنترل رشد باکتری اگروباکتریوم می‌باشد (Cabrera, 2003). در مطالعه‌ای مشابه، تاثیر عصاره رزماری و آنتی‌بیوتیک سفاروکسیم بر رشد باکتری *Staphylococcus aureus* مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه، غلظت‌های برای عصاره رزماری ۵۰ تا ۰/۱۶۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و غلظت-های ۰/۰۱۶ تا ۰/۰۰۰۱۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر برای آنتی‌بیوتیک در نظر گرفته شد. نتایج نشان داد آنتی‌بیوتیک بر عملکرد اسانس اثر هم‌افزایی داشته است (Jarrar *et al.*, 2010).

از آنجایی که غالب اسانس‌های گیاهی استخراج شده از گیاهان معطر دارای خواص ضدباکتریایی، ضدویروسی، ضدقارچی و حشره‌کشی می‌باشند (Kordali *et al.*, 2005) و ریسک خطر استفاده از آن‌ها به مراتب کمتر از آنتی‌بیوتیک‌ها و سموم شیمیایی است، کاربرد آن‌ها در مدیریت بیماری‌های گیاهی می‌تواند به سلامت محیط زیست و موجودات زنده کمک شایان توجهی نماید.

منابع

Alsup, C. M. 2004. Screening for active ingredients in plant extracts that inhibit the growth of *Agrobacterium tumefaciens*. The Plant Health Instructor, American Phytopathological Society, DOI: 10.1094/PHI-I-2004-0226-01.

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

Cabrera, C. J. 2003. Can garlic prevent crown gall? California State Science Fair Project summary, Project number: J 1405, 7p.

Dufour, M., Simmonds, R. S. and Bremer, P. J. 2003. Development of a method to quantify *in vitro* the synergistic activity of natural antimicrobials. International Journal of Food Microbiology, 85: 249-258.

Friedman, M., Henika, P. R. and Mandrell, R. E. 2002. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenese* and *Salmonella enterica*. Journal of Food Protection, 65: 1545-1560.

Jarrar, N., Abu-Hijleh, A. and Adwan, K. 2010. Antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L. alone and in combination with cefuroxime against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 121-123.

Klement, Z., Mavridis, A., Rudolph, K., Vidaver, A., Perombelon, M. C. M. and Moore, L.W. 1990. Inoculation of plant tissues. In: Klement, Z., Rudolph, K. and Sands, D. C. (eds.), Methods in phytobacteriology. Akademiai Kiado.

Kordali, S., Kotan, R., Mavi, A., Cakir, A., Ala, A. and Yildirim, A. 2005. Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculus* and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *A. dracunculus*, *Artemisia santonicum* and *Artemisia spicigera* essential oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53: 9452-9458.

Patharakorn, T., Arpornsuwan, T., Wetprasit, N., Promboon, A. and Ratanapo, S. 2010. Antibacterial activity and cytotoxicity of the leaf essential oil of *Morus rotunbiloba* Koidz. Journal of Medicinal Plant Research, 4: 837-843.

Schaad, N. W., Jones, J. B. and Chun, W. 2001. Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria, Third Edition. American Phytopathological Society.

IrHC2019

Effect of thyme essential oil on the growth of bacterial agent of crown gall and the effect of streptomycin on essential oil activity

Kayvan Farri, Maryam Khezri*
Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia.
**Corresponding Author: m.khezri@urmia.ac.ir*

Abstract
Considering to the environmental problems as a result of using chemical compounds in agriculture, using of the natural compounds such as plant essential oils is necessary in disease damages reduction. In this study, the effect of thyme essential oil and streptomycin was investigated in preventing *Agrobacterium tumefaciens* growth. Different concentrations of essential oil and antibiotic were used to determine the minimum inhibitory concentrations. According the results, minimum inhibitory concentration of thyme essential oil was 250 μlL^{-1} and in case of antibiotic was 0.0018 mgL^{-1}. To determine the effect of streptomycin on thyme essential oil activity, nutrient broth supplemented with streptomycin at a concentration corresponding to 1/2 MIC with different concentrations of thyme essential oil were used. The minimum inhibitory concentration was 125 μlL^{-1}. Based on defined index, streptomycin showed synergistic effect on essential oil activity. Based on the results of this study, thyme essential oil has the ability to prevent bacterial agent of crown gall, and can be used in the disease management program.

***Keywords*:** Agrobacterium, Medicinal plants, Essential oil, Antibiotic

IrHC2019