DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijmapr.2013.2921

فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۲۸، شمارهٔ ٤، صفحهٔ ۷۱۹-۷۰۹ (۱۳۹۱)

بررسی فعالیت ضدمیکروبی اسانس و عصاره آبی و آلی برگ اکالیپتوس بر باکتری *Pseudomonas tolaasii* در شرایط *In vitro* و *In vivo*

ندا انصاری دزفولی[1*]، نادر حسن‌زاده[2] و محمدباقر رضایی[3]

۱*- نویسنده مسئول، دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران
پست الکترونیک: enad1387@yahoo.com
۲- دانشیار، گروه بیماری‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران
۳- استاد، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور

تاریخ دریافت: فروردین ۱۳۹۰ تاریخ اصلاح نهایی: تیر ۱۳۹۰ تاریخ پذیرش: مرداد ۱۳۹۰

چکیده

یکی از رویکردهای نوین برای کنترل بیولوژیک بیماری لکه قهوه‌ای قارچ تکمه‌ای *Pseudomonas tolaasii* استفاده از اسانس‌های گیاهیست. در این ارتباط اثر ضدمیکروبی اسانس و عصاره آبی و آلی حاصل از برگ گیاه اکالیپتوس (*Eucalyptus camaldulensis*) بر روی باکتری مذکور در شرایط *In vitro* و *In vivo* مورد ارزیابی قرار گرفت. عصاره‌گیری از گیاه با حلال‌های آب، متانول، استون و اتانول به روش ماسراسیون به مقدار ۰/۳گرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. استخراج اسانس از اندام هوایی با روش تقطیر با آب (Hydro-distillation) انجام گردید. روش بیوسنجش با اسانس در رقت‌های (بدون رقت، ۰/۱، ۰/۰۱، ۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۰۱ mg/ml) روی دو محیط کشت نوترینت آگار (NA) و کینگس (B KB) با ایجاد چاهک در شرایط آزمایشگاه صورت گرفت. با جداسازی و شناسایی اجزای اصلی موجود در اسانس به‌وسیله دستگاه گاز کروماتوگراف (GC/MS) مشخص گردید که از بین ترکیب‌های شناخته شده ضدمیکروبی اسانس اکالیپتوس، دو ترکیب ۸،۱-سینئول (۵۸/۱٪) و آلفا-فلاندرن (٦٪) از درصد بالایی برخوردار بودند. در بررسی تأثیر اسانس و عصاره اکالیپتوس مشخص گردید که اسانس خالص اکالیپتوس با تشکیل ۱۷mm قطر هاله بازدارندگی روی محیط کشت KB و عصاره متانولی گیاه فوق در محیط کشت NA با قطر هاله بازدارندگی ۸mm به‌ترتیب دارای بیشترین اثر ضدباکتریایی علیه *Pseudomonas tolaasii* بودند که در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسین، پنی‌سیلین و جنتامایسین در محدوده غلظت ۰/۱mg/ml و ۰/۰۱ قطر هاله عدم رشد بیشتر ولی در مقایسه با تتراسایکلین، عصاره متانولی قطر هاله کوچکتری را نشان داد. همچنین نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسین و پنی‌سیلین در غلظت‌های ۱۰-۵-۱mg/ml قدرت مهارکنندگی اسانس و عصاره متانولی بیشتر ولی در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین و جنتامایسین عصاره متانولی قدرت مهارکنندگی پایین‌تری را نشان داد. در آزمون مربوط به مدیریت بیماری در شرایط *In vivo*، اسانس و عصاره متانولی اکالیپتوس در دو رقت ۰/۱mg/ml و ۰/۰۱ در مقایسه با نمونه تلقیح‌شده با باکتری دارای بازدارندگی بود. با این تفاوت که در رقت ۰/۱mg/mlهمزمان با گیاه‌سوزی کلاهک قارچ خوراکی بود که به‌ترتیب در اسانس و عصاره متانولی بیشتر بود، ولی در رقت ۰/۰۱mg/mlگیاه‌سوزی اسانس نسبت به عصاره متانولی خیلی کمتر مشاهده شد. بنابراین چنین به نظر می‌رسد که غلظت مطلوب برای مدیریت این بیماری برای اسانس اکالیپتوس رقت ۰/۰۱mg/ml می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: اکالیپتوس، فعالیت ضدمیکروبی، قارچ تکمه‌ای، *Pseudomonas tolaasii*.

مقدمه

کشت قارچ‌های خوراکی یکی از مهمترین محصولات باغبانی در جهان محسوب می‌شود. علت توجه جهانی به قارچ خوراکی را باید در ارزش غذای آن جستجو کرد. مقدار پروتئین در قارچ خوراکی در حدود ٦-٢ درصد وزن تر و ٤٥-٢٥ درصد وزن خشک آن می‌باشد که در مقایسه با سایر غذاها پروتئین قارچ تازه ۲ برابر پروتئین سبزیجات و حبوبات است. اما نکته بسیار مهم اینجاست که حدود ۹۰٪ پروتئین قارچ جذب می‌شود و این قضیه در مورد پروتئین حیوانی ۱۵-۱۰ درصد می‌باشد.

یکی از بیماریهای مهم قارچ خوراکی (*Agaricus bisporus*)، لکه قهوه‌ای باکتریایی (Brown blotch) است و در تمام مناطق عمده کشت قارچ جهان وجود دارد که بعد از بیماریهای ویروسی از مهمترین عوامل بیمارگر محسوب می‌شود (Cole & Skellerup, 1986).

بیماری‌زایی باکتری *P. tolaasii* روی قارچ *Agaricus bisporus* در اثر تولید توکسین‌لیپودپسی پپتید به نام تولاسین می‌باشد (Malcolm, 1981).

این بیماری خسارت قابل‌توجهی روی قارچ‌های خوراکی *A. bisporus*، *A. compestris*، *A. arvensis*، *A. bitorquis*، *Pleurotus* sp و *P. osteratus* ایجاد می‌کند. عامل لکه قهوه‌ای باکتریایی قارچ خوراکی *Pseudomonas tolaasii* است. علائم این بیماری با ظهور لکه‌های قهوه‌ای روشن در سطح کلاهک قارچ آغاز می‌شود. این لکه‌ها با گذشت زمان توسعه یافته و به رنگ قهوه‌ای شکلاتی تیره در می‌آید. در شرایط یخچال نیز آلودگی به‌تدریج گسترش یافته و باعث تیره شدن، پلاسیدگی، لزجی و یا چسبندگی سطوح کلاهک و پایه شده و کاهش بازارپسندی محصول را در پی دارد (Wells *et al*., 1996).

در ایران این بیماری اولین بار از مازندران گزارش شد (رحیمیان و همکاران، ١٣٧٤). استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها ازجمله پنی‌سیلین و اریترومایسین علاوه بر مقرون به‌صرفه نبودن موجب بروز مقاومت در جمعیت‌های باکتری شده و در کشورهای اروپایی اجازه مصرف ندارند (Lacobellis *et al*., 2005).

در مورد معایب ترکیب‌های مسی نیز می‌توان به تأثیر پایین و مشکلات گیاه‌سوزی آنها اشاره نمود. همچنین این ترکیب‌ها پایدار بوده و در چرخه‌های اکولوژیک وارد می‌شوند. مصرف این ترکیب‌ها باعث تجمع مس در خاک و منابع آبی می‌شود. بنابراین استفاده از گیاهان دارویی در درمان بیماریها و ممانعت از رشد باکتریهای بیماری‌زا بیش از پیش اهمیت یافته و امروزه نیز اثر ضدقارچی و ضدباکتریایی بسیاری از ترکیب‌های گیاهی به اثبات رسیده‌است (Hammer *et al*., 1999).

یکی از شیوه‌های جدید مدیریتی استفاده از اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی می‌باشد (Singh *et al*., 1980). تنها گزارش مستدل در مورد مدیریت بیماری لکه قهوه‌ای قارچ تکمه‌ای، اسانس‌های آویشن (*Thymus vulgaris*)، نعناع (*Mentha spicata*)، مریم‌گلی (*Salvia officinalis*)، بابونه (*Matricaria chamommilla*)، ریحان (*Ocimum basilicum*) و مرزنجوش (*Origanum vulgare*) بر باکتری بیماری‌زای *Pseudomonas tolaasii* می‌باشد (Sokovic & Griensven, 2006). اما با توجه به ارزیابی‌های اولیه و مشاهده اثر بازدارندگی مؤثر اسانس، عصاره آبی و آلی اکالیپتوس از این گیاه برای ادامه تحقیق استفاده شد.

بیش از ٤٠٠ گونه اکالیپتوس وجود دارد که تنها چند گونه آن طی سده اخیر به ایران وارد شده‌است و در مناطق

مختلف نظیر نواحی شمال و جنوب ایران که زمستان سرد ندارند، کاشته شده‌است. بسیاری از گونه‌های جنس اکالیپتوس نظیر *E. smithii* از نظر اسانس با ارزش هستند. گونه *Eucalyptus microtheca* در آبادان کاشته می‌شود و در مقابل شوری خاک حساسیت کمتری از سایر گونه‌ها نشان می‌دهد. گونه *Eucalyptus globulus* مقاومت آن به سرما کم است؛ در استرالیا و تاسمانی از بلندترین اکالیپتوس‌ها بوده، با ارتفاع حدود ۱۰۰ متر که در ایران به علت نامساعد بودن شرایط اقلیمی به ارتفاع مذکور نمی‌رسد. گونه *Eucalyptus camaldulensis* مترادف آن *E. rostrata* ارتفاع آن ۲۰ تا ۳۰ متر و در خاک‌های اسیدی- خنثی و قلیایی می‌روید. در شمال ایران در اوایل مرداد شکوفه می‌کند و گل‌های آن لیمویی رنگ است و در خوزستان کاشته می‌شود. نام عمومی آن در انگلیسی Red river gum است. قدرت رویش آن بالاست و تا ۸ ماه می‌تواند دوره خشکی را تحمل کند. صمغی قرمز رنگ بنام صمغ کینو از دو گونه اخیر تهیه می‌شود که دارای خواص ضدباکتری است.

عصاره برگ گیاه اکالیپتوس دارای خواص ضدسرطانی، ضدالتهابی، ضددرد، آنتی‌اکسیدان، ضد ازدیاد قند خون، ضد مالاریایی و ضدویروسی است. این گیاه منبع غنی از پلی‌فنل‌ها و ترپنوئیدهاست و ترکیب اصلی برگ آن سینئول (۵۰٪ تا ۸۰٪) به فرمول $C_{10}H_{18}O$ می‌باشد که به نام‌های اوکالیپتول و کاژه پوتول نیز گفته می‌شود (صمصام و معطر، ۱۳۷۰). سینئول مایعی است بی‌رنگ یا کمی زردرنگ که نقطه جوش ۱۷٦ درجه سانتی‌گراد دارد و بوی کافور می‌دهد، این ماده از طریق اسانس‌گیری بدست می‌آید. مهمترین مواد مؤثر بدست آمده از عصاره‌گیری گیاه مذکور Tannins، Saponins و Cardiac Glycosides می‌باشند (Ayepola & Adeniyi, 2008).

در حال حاضر با توجه به این که اکالیپتوس در شکلهای مختلف در فارماکوپه‌های دارویی جهان و ایران وارد شده‌است، استفاده از این گیاهان در مدیریت بیماریهای گیاهی بسیار مؤثر خواهد بود.

مواد و روشها

شناسایی و جمع‌آوری گیاه

برگ درخت اکالیپتوس (*Eucalyptus camaldulensis*) در مردادماه سال ۱۳۸۹ از منطقه شهران تهران جمع آوری گردید و توسط هرباریوم مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور مورد تأیید قرار گرفت. گیاه در سایه و دمای مناسب خشک شد، سپس توسط آسیاب پودر گردید. استخراج اسانس‌ها از روش تقطیر با آب به مدت ٤ ساعت با دستگاه کلونجر (cleveneger apparatus) انجام شد (جایمند و رضایی، ۱۳۸۵).

حدود ۵۰ گرم از برگ‌های پودر شده گیاه مورد نظر را در داخل بالن دستگاه ریخته و ۲۵۰ میلی لیتر آب به آن اضافه شد. بعد از اتمام این مدت اسانس ها به‌دلیل پایین بودن چگالی در سطح آب قرار گرفته و با خارج نمودن آب از شیر تحتانی دستگاه به آسانی جداسازی شدند. برای تهیه مقادیر بیشتر اسانس برای هر گیاه چند بار این عمل تکرار شد. اسانس‌ها در ظروف با رنگ تیره به منظور جلوگیری از اکسید شدن و در یخچال دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

همچنین برای عصاره‌گیری از گیاه از روش ماسراسیون و حلال‌های مختلفی مانند آب، متانول، اتانول و استون استفاده گردید. بدین منظور مقدار ۳ گرم از برگ خرد

شده را با ترازو به‌طور دقیق توزین و در داخل یک ارلن ۱۰ میلی‌لیتر از هر حلال اضافه و این محلول‌ها را با کاغذ صافی واتمن شماره ۱ فیلتر و عصاره‌های فیلتر شده در دمای اتاق در جریان ثابت هوا قرار داده شد.

تهیه باکتری بیماری‌زای *P. tolaasii*

ایزوله مورد استفاده از مراکز کشت و پرورش قارچ تکمه‌ای (*Agaricus bisporus*) استان تهران براساس علائم بیماری‌زایی جداسازی و خالص‌سازی شد و بعد خصوصیات تشخیصی و بیماری‌زایی جدایه‌ها تعیین شد و عامل بیماری‌زای قارچ خوراکی *Pseudomonas tolaasii* تشخیص داده شد (Schaad *et al*., 2001).

بررسی اثر ضد باکتریایی اسانس و عصاره در شرایط *In vitro*

از کشت ۲٤ ساعته باکتری *Pseudomonas tolaasii* سوسپانسیونی با غلظت ۱۰٤ CFU ml-1 تهیه شد.

به‌منظور بررسی اثر ضدمیکروبی ۵ رقت (بدون رقت، ۰/۱، ۰/۰۱، ۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۰۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) اسانس رقیق شده با توئین ۸۰ به نسبت ۱:۱ و عصاره‌های گیاهی (۰/۳g/ml) نیز در ٤ حلال (آبی، استونی، متانولی و اتانولی) علیه باکتری بیماری‌زای گیاهی بر روی محیط کشت‌های NA، KB طی ٤ تکرار مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان بازدارندگی اسانس و عصاره علیه باکتری به روش زیست‌سنجی aromatogram انجام گردید. بر روی محیط کشت‌ها ٤ چاهک با قطر ٤ میلی‌متر ایجاد و بعد در داخل هر چاهک مقدار ۱۰ میکرولیتر عصاره/اسانس گیاه اکالیپتوس افزوده شد. برای تیمار شاهد آب مقطر استریل به‌عنوان شاهد منفی و از آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین، جنتامیسین، اریترومایسین و تتراسایکلین در محدوده غلظتی mg/ml ۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۵ و ۱۰ در محیط کشت NA به مثابه باکتری‌کش استاندارد برای کنترل مثبت استفاده گردید. پس از ۲-۱ ساعت انکوباسیون و جذب کامل عصاره و اسانس توسط محیط کشت، سوسپانسیون مکدر باکتری در غلظت حدود ۱۰٤ CFU ml^{-1} روی محیط کشت به‌طور یکنواخت پاشش شد. پس از پایان کار پتری‌ها به مدت ٤۸ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. قطر هاله‌های بازدارنده رشد اطراف چاهک برای کلیه تیمارها اندازه‌گیری و ثبت شد (Cowan, 1999).

بررسی در شرایط گلخانه‌ای

بررسی اثر اسانس و عصاره با غلظت‌های ذکر شده در روش فوق در شرایط گلخانه‌ای نیز صورت گرفت. قارچ تکمه ای پس از شستشو با آب مقطر استریل به اندازه‌های ۲×۲ در پلیت‌های ۹cm قرار داده شد، سپس ۲۰ میکرولیتر از عصاره/اسانس در رقت‌های ذکر شده در سطح کلاهک قارچ خوراکی به‌صورت نقطه‌ای افزوده شد. پس از ۵ دقیقه ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری با غلظت ۱۰٤ CFU ml-1 در محل مذکور تلقیح شد. دو شاهد مثبت (باکتری و اسانس و عصاره) و دو شاهد منفی (آب مقطر استریل ومتانول) برای این آزمایش در نظر گرفته شد. ارزیابی اثر بازدارندگی اسانس و عصاره پس از ۱۵ دقیقه، ۱ ساعت، ۲ ساعت، ۲٤ و ٤۸ ساعت مورد بررسی قرار گرفت (Cantore & Lacobellis, 2004). تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از برنامه آماری Mstatc و مقایسه میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون دانکن انجام شد و برای رسم شکل از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

تجزیه اسانس اکالیپتوس

بعد از انجام آزمایش‌های مربوط به تعیین خواص ضدباکتریایی، به منظور شناسایی ترکیب‌های اسانس که

دارای خواص ضدعفونی‌کننده می‌باشند از دستگاه‌های کروماتوگرافی گازی و کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنجی استفاده شد. ابتدا نمونه‌های آماده شده به دستگاه کروماتوگرافی گازی تزریق شد و مناسبترین برنامه‌ریزی دمایی ستون برای جداسازی کامل ترکیب های اسانس بدست آمد. همچنین درصد ترکیب‌های تشکیل‌دهنده هر نمونه اسانس و شاخص بازداری هر ترکیب محاسبه گردید. سپس اسانس‌ها به دستگاه گاز کروماتوگراف متصل به طیف‌نگار جرمی نیز تزریق شده و طیف جرمی ترکیب‌ها بدست آمد. شناسایی ترکیب‌های اسانس با استفاده از شاخص بازداری و بررسی طیف‌های جرمی و مقایسه با طیف‌های جرمی پیشنهادی توسط کتابخانه‌های کامپیوتر دستگاه کروماتوگراف متصل به طیف‌سنج جرمی انجام شد.

مشخصات دستگاه‌های مورد استفاده

کروماتوگراف گازی (GC)

کروماتوگراف گازی مجهز به دتکتور F.I.D. (یونیزاسیون توسط شعله هیدروژن) و داده‌پرداز با نرم‌افزار Chrom-card۲۰۰٦، ستون Ph-٥ که ستونی غیرقطبی است و برنامه‌ریزی حرارتی ستون، از ٦۰ تا ۲۸۵ درجه سانتی گراد با سرعت افزایش دمای ۳ درجه سانتی گراد در دقیقه، در مدت زمان ۵/۸ دقیقه انجام می گیرد. گاز حامل، هلیوم و فشار آن در ابتدای ستون برابر ۳ کیلوگرم بر سانتی‌متر مربع، نسبت شکافت برابر ۱: ۱۰۰، برای رقیق کردن نمونه، دمای قسمت تزریق ۲۸۰ درجه سانتی گراد و دمای آشکارساز ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم گردید.

کروماتوگراف گازی متصل به طیف‌سنج جرمی (GC/MS)

دستگاه کرماتوگراف گازی مدل Varian۳٤۰۰، متصل شده به دستگاه طیف‌سنج جرمی با نرم‌افزار Saturn II، ستون همانند ستون دستگاه GC می‌باشد، فشار گاز سرستون Psi ۳۵، انرژی یونیزاسیون معادل ۷۰ الکترون ولت، برنامه‌ریزی حرارتی ستون از ٤۰ تا ۲۵۰ درجه سانتی گراد با سرعت افزایش ٤ درجه سانتی گراد در دقیقه، درجه حرارت محفظه تزریق ۲٦۰ درجه سانتی‌گراد و دمای ترانسفر لاین ۲۷۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم گردید. شناسایی طیف‌ها با استفاده از طیف‌های جرمی ترکیب‌های استاندارد و اطلاعات موجود در کتابخانه دستگاه GC/MS انجام شد.

نتایج

شناسایی باکتری بیماری‌زای *P. tolaasii*

از بین چند ایزوله باکتری که از قارچ های تکمه ای (*Agaricus bisporus*) با علائم لکه قهوه‌ای جداسازی شده بود ایزوله شماره t13 برای ادامه این تحقیق استفاده شد.

اثر ضدباکتریایی اسانس و عصاره در شرایط *In vitro*

نتایج حاصل از غربالگری خواص ضدباکتریایی نشان داد که اسانس گیاه مورد آزمایش بدون رقت بیشترین قدرت مهارکنندگی رشد باکتری را در محیط کشت KB با قطر هاله بازدارندگی ۱۷ mm نشان داد. همچنین در این بین مشخص گردید که عصاره حاصل از حلال متانول نسبت به سایر عصاره‌ها ازجمله آب و حلال‌های آلی اتانول و استون با غلظت ۰/۳g/ml، خاصیت آنتی‌باکتریایی بیشتری با قطر هاله بازدارندگی ۸mm نشان داد. این نتایج در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسین، پنی‌سیلین و جنتامایسین در

محدوده غلظت ۰/۱mg/ml و ۰/۰۱ قدرت مهارکنندگی بیشتر ولی در مقایسه با تتراسایکلین و عصاره متانولی بازدارندگی کمتری را نشان داد. همچنین نسبت به آنتی بیوتیک‌های اریترومایسین و پنی‌سیلین در غلظت‌های ۱mg/ml–۵–۱۰ قدرت مهارکنندگی اسانس بیشتر و در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین و جنتامایسین قدرت مهارکنندگی عصاره متانولی کمتر بود (جدول ۱ و شکل ۱).

جدول ۱- نتایج مقایسه میانگین اثر ضدباکتریایی اسانس و عصاره *Eucalyptus camaldulensis* و آنتی‌بیوتیک علیه باکتری *Pseudomonas tolaasii*

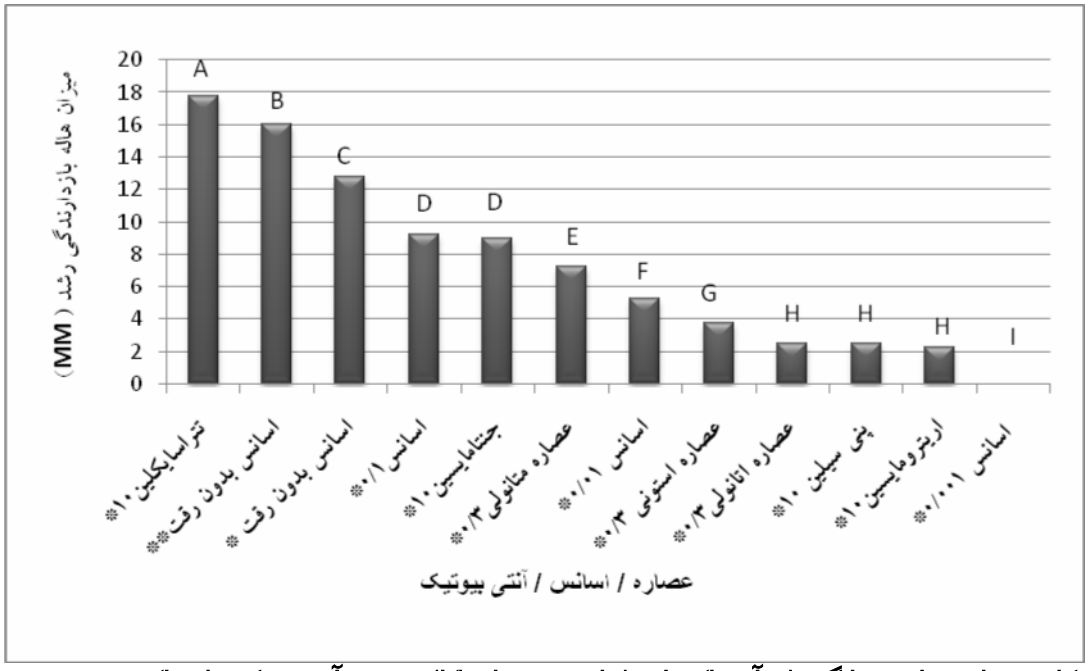
نوع محیط کشت		Nutrient Agar(NA)				KB
رقت(mg/ml) اسانس		بدون رقت	۰/۱	۰/۰۱	۰/۰۰۱	بدون رقت
میانگین قطر هاله عدم رشد	۲٤ ساعت	۱۲ e	۱۰f	٦ j	۰op	۱۷bc
(mm)	٤۸ ساعت	۱۰ f	۱۰f	٦ j	۰op	۱٦/۵c
عصاره (۰/۳g/ml)		آبی	استونی	اتانولی	متانولی	–
میانگین قطر هاله عدم رشد	۲٤ ساعت	۰op	٤k	۲/۵lm	۷/۵h	–
(mm)	٤۸ ساعت	۰op	٤k	۲/۷۵l	٦/۵i	–
آنتی‌بیوتیک (mg/ml)		پنی‌سیلین	اریترومایسین	جنتامایسین	تتراسایکلین	–
۰/۰۱		۰op	۰op	۰op	۱۰f	–
۰/۱		۰op	۰op	۲lm	۱۳/۲۵d	–
۱		۱/۷۵mn	۱no	٦/۵ i	۱۷bc	–
۵		۱/۷۵mn	۱/۷۵mn	۸/۷۵ g	۱۷/۵b	–
۱۰		۲/۷۵l	۲/۵lm	۱۰ f	۱۹a	–

میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند، فاقد اختلاف معنی‌دار براساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵ می‌باشند.

*: محیط کشت نوترینت آگار (NA) **: محیط کشت کینگس B (KB)

نتایج آزمون در شرایط *In vivo*

نتایج مشهودی از بازدارندگی رشد باکتری با اسانس و عصاره در ۲-۱ ساعت اول مشاهده نشد. ولی پس از ۲٤ و ٤۸ ساعت مشخص گردید که نمونه برش قارچ تلقیح‌شده با اسانس و عصاره در غلظت‌های ۰/۱mg/ml و ۰/۰۱ در مقایسه با برش قارچ تلقیح‌شده با شاهد مثبت باکتری کنترل رشد باکتری بهتری نشان داد. همزمان با اثر بازدارندگی، اثر گیاه‌سوزی اسانس و عصاره نیز مطالعه شد. بدین ترتیب در ۲-۱ ساعت اول گیاه‌سوزی شدید اسانس و عصاره خالص و شاهد متانول دیده شد و شدت گیاه‌سوزی به‌ترتیب در رقت‌های ۰/۱mg/ml و ۰/۰۱ بیشتر مشاهده گردید. در این آزمون مشخص گردید که اسانس با غلظت ۰/۰۱mg/ml در مقایسه با عصاره متانولی با غلظت ۰/۱mg/ml و ۰/۰۱ می‌تواند در کنترل بیماری لکه قهوه‌ای با توجه به عارضه گیاه‌سوزی نقش مؤثرتری داشته باشد (شکل ۲).



شکل ۱- نتایج مقایسه میانگین اثر آنتي‌باکتریایي اسانس و عصاره اکالیپتوس و آنتي‌بیوتیک علیه باکتري *P. tolaasii* در شرایط *In vitro*

شکل ۲- نتایج اثر ضدباکتریایی اسانس و عصاره متانولی اکالیپتوس در شرایط *In vivo*

نتایج تجزیه اسانس

براساس نتایج بدست آمده از تجزیه اسانس، ۱۹ ترکیب از اسانس استخراج شده که ۹۷/۳٪ اسانس را شامل گردید. طبق جدول ۲، دو ترکیب ۸،۱–سینئول (۵۸/۱٪) و آلفا–فلاندرن (٦٪) به‌عنوان ترکیب‌های اصلی اسانس شناخته شدند که بنا بر منابع موجود هر دو ترکیب به‌عنوان عناصر ضدمیکروبی اسانس مطرح می‌باشند (جدول ۲).

جدول ۲- ترکیب‌های شیمیایی و مقادیر آنها در اسانس گیاه *Eucalyptus camaldulensis*

ردیف	ترکیب	شاخص بازداری	میزان ترکیب (٪)
۱	α-pinene	۹٤۰	۳/۳
۲	myrcene	۹۵۸	۳
۳	α-phellandrene	۱۰۱۰	٦
٤	1,8-cineol	۱۰۳۰	۵۸/۱
۵	terpinolene	۱۰۸۱	۲/۹
٦	myrcenol	۱۱۱۳	۲/۱
۷	trans-pinocarveol	۱۱۵۱	۰/۷
۸	pinocarvone	۱۱٦۵	۰/۵
۹	trans-carveol	۱۲۰۹	۲/۸
۱۰	neo-isodihydro carveol	۱۲۲۳	۳/٦
۱۱	isobornyl acetate	۱۲۸۳	۱/۱
۱۲	neo-verbanol acetate	۱۳۲۱	۰/٦
۱۳	germacrene A	۱۵۰٦	۱/۵
۱٤	trans-calamenene	۱۵۲۹	۱/۵
۱۵	spathulenol	۱۵٦۵	۰/۸
۱٦	α-eudesmol	۱٦۵۰	۳/۲
۱۷	dihydro-eudesmol	۱٦٦٤	۲/۸
۱۸	caryophyllene acetate	۱۷۰٦	۰/۵
۱۹	Z-nuciferol acetate	۱۸۲۹	۲/۳

بحث

یکی از مشکلات اصلی در کشت قارچ تکمه‌ای، باکتری بیماری‌زای *Pseudomonas tolaasii* می‌باشد (Boiko *et al*., 2009). این عامل منجر به کاهش کیفیت و بازدهی محصول می‌شود. روشهای کنترل عوامل بیماری‌زای قارچ خوراکی شامل سموم شیمیایی، باکتریهای آنتاگونیست، مدیریت بهداشت در مزرعه و آب حاوی کلر می‌باشد. در سال‌های اخیر توجه به اسانس‌ها

به‌عنوان راهکار جایگزین برای مدیریت مؤثر عوامل بیماری‌زای گیاهی توصیه شده‌است. با توجه به ویژگی‌های قارچ خوراکی و طریقه مصرف آن در صورت استفاده از سموم شیمیایی احتمال بر جای ماندن سموم بر روی محصول وجود دارد، از این جهت تاکنون هیچ سمّی برای کنترل عوامل بیماری‌زای قارچ دکمه‌ای معرفی نشده‌است و همچنین مدیریت بهداشت در صورت کشت وسیع قارچ بسیار دشوار می باشد و استفاده از کلرین نیز ممکن است موجب گیاه‌سوزی کلاهک قارچ‌ها گردد. بنابراین عصاره و روغن گیاهان می‌تواند به‌عنوان یک رویکرد جدید از نظر کنترل مؤثر و بی‌خطر مطرح باشد. در خصوص مدیریت بیماری لکه قهوه‌ای قارچ تکمه‌ای *Agaricus bisporus* با عامل باکتریایی *Pseudomonas tolaasii* با استفاده از اسانس گیاهان تنها یک مقاله وجود دارد که در شرایط *In vitro* و با استفاده از اسانس گیاهان آویشن (*Thymus vulgaris*)، نعناع (*Mentha spicata*)، مریم‌گلی (*Salvia officinalis*)، بابونه (*Matricaria chamommilla*)، ریحان (*Ocimum basilicum*) و مرزنجوش (*Origanum vulgare*) بررسی شده‌است (Sokovic & Griensven, 2006). مدیریت این بیماری برای اولین بار با استفاده از اسانس و عصاره اکالیپتوس در دو شرایط *In vitro* و *In vivo* انجام شد. گیاه اکالیپتوس در مقایسه با اسانس ترخون، بابونه و عصاره فلفل قرمز و فلفل سیاه انجام شده در این مطالعه اثر آنتی‌باکتریایی بیشتری را از خود نشان داد؛ بنابراین برای ادامه کار از اسانس و عصاره اکالیپتوس استفاده گردید. مکانیسم عمل این بازدارندگی به نوع و مقدار ترکیب‌های موجود در اسانس اکالیپتوس بستگی دارد (Sokovic *et al*., 2009)، که آنالیز انجام شده در تحقیق حاضر نشان داد که میزان مواد تشکیل‌دهنده ضدمیکروبی اسانس اکالیپتوس دو ماده ۸،۱-سینئول و آلفا-فلاندرن به‌ترتیب ٥٤٪ و ٦٪ می‌باشد که در مقایسه با آنالیزهای مشابه در خارج از کشور مقادیر اعلام شده ۸،۱-سینئول (۱۳/۹٪)، پارا-سیمن (٤۳/۷) و آلفا-پینن (۳/٥٪) (Sahin basak & Candan, 2010) که مقدار ۸،۱-سینئول سه برابر بوده‌است و در مقایسه با نتایج تحقیقات (Owlia *et al*., 2009) مقادیر ۸،۱-سینئول (٦٤٪) و آلفا-پینن (۹/٦٪) به‌طور تقریبی مشابه بود.

درخصوص اثر بازدارندگی اسانس اکالیپتوس بر روی *P. tolaasii* تحقیقی تاکنون انجام نشده است، اما بررسی مشابه روی باکتری *Pseudomonas aeroginosa* نشان داده‌است که قطر هاله بازدارندگی ناشی از آن (۱۲ ± ۱/۷mm) بوده‌است (Owlia *et al*., 2009) که با نتایج این تحقیق که مقدار آن ۱۲mm روی NA و ۱۷mm روی KB مطابقت دارد.

درخصوص اثر بازدارندگی عصاره متانولی اکالیپتوس روی *Pseudomonas aeroginoza* مقدار آن ۱٥mm گزارش شده است (Ayepola & Adeniyi, 2008). در مقایسه نتایج این تحقیق روی *P. tolaasii* نشان داد که قطر هاله بازدارندگی ۸mm می‌باشد که این اولین گزارش از اثر بازدارندگی عصاره متانولی اکالیپتوس روی *P. tolaasii* می‌باشد. این میزان اثر بازدارندگی در عصاره آبی اکالیپتوس و دیگر حلال‌ها مشاهده نگردید، زیرا عصاره آب فاقد هاله بازدارندگی و حلال‌های اتانولی و استونی به‌ترتیب ۳mm و ٤ بوده‌است. از طرفی، نتایج مقایسه قدرت بازدارندگی اسانس و عصاره با آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در این پژوهش نشان داد که در دوزهای ۱۰mg/ml و ۱/٥ آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین با

هاله بازدارندگی به‌ترتیب ۲۰mm، ۱۸، ۱۹ و جنتامایسین با هاله بازدارندگی ۱۰mm، ۹ و ۷ به‌طور تقریبی مشابه با اسانس خالص (۱۷mm)/عصاره متانولی (۸mm) بوده‌است. بنابراین استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها به‌دلیل مصرف مستقیم قارچ‌ها و عارضه مقاومت توصیه نمی‌شود.

در ارتباط با نتایج آزمون *In vivo* مشخص گردید که اسانس و عصاره متانولی در رقت‌های ۰/۰۱mg/ml و ۰/۱ نسبت به شاهد باکتری دارای بازدارندگی رشد باکتری بودند. تنها معضل این مرحله از تحقیق مشاهده بروز عارضه گیاه‌سوزی در رقت ۰/۱mg/ml نسبت به ۰/۰۱mg/ml اسانس و عصاره که شدت آن در رقت ۰/۱mg/ml اسانس خیلی کمتر بود.

با توجه به نتایج حاصل از پژوهش حاضر و پژوهش‌های مشابه که در مورد اثر ضدباکتریایی برخی از گیاهان با اسانس و عصاره به‌طور تقریبی مشابه انجام شده‌است، استفاده از اسانس و عصاره این گونه می‌تواند به‌عنوان یک ماده آنتی‌سپتیک در علوم کشاورزی، پزشکی و صنایع غذایی مورد توجه و بررسی قرار گیرد.

منابع مورد استفاده

- جایمند، ک. و رضایی، م.ب.، ۱۳۸۵. اسانس، دستگاه‌های تقطیر، روشهای آزمون و شاخص‌های بازداری در تجزیه اسانس. انتشارات انجمن گیاهان دارویی ایران، تهران، ۳۵۰ صفحه.
- رحیمیان، ح.، زراعی، ع. و اخوتیان، ح.، ۱۳۷٤. لکه قهوه‌ای باکتریایی قارچ خوراکی. دوازدهمین کنگره گیاه‌پزشکی، کرج، ۱۱-٦ شهریور: ۲۸۱-۲۷۰.
- صمصام شریعت، ه. و معطر، ف.، ۱۳۷۰. گیاهان وداروهای طبیعی. انتشارات مشعل، اصفهان، ٤۳۲ صفحه.
- Ayepola, O.O. and Adeniyi, B.A., 2008. The antibacterial activity of leaf extracts of *Eucalyptus camaldulensis* (Myrtaceae). Journal of Applied Sciences Research, 4(11): 1410-1413.
- Boiko, O.A., Melnichuk , M.D. and Ivanova, T.V., 2009. Spread, diagnosis, and prevention of diseases of the button mushroom. Journal Plant Protection, 35(2): 23-24.
- Cantore, P. and Lacobellis, N.S., 2004. First report of brown discoloration of *Agaricus bisporus* caused by *Pseudomonas agarici* in southern Italy. Phytopathologia Mediterranea, 43: 35-38.
- Cowan, M.M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews, 12(4): 576-582.
- Cole, A.L.J. and Skellerup, M., 1986. Ultrastructure of interaction of *Agaricus bisporus* and *Pseudomonas tolaasii*. Transactions of the British Mycological Society, 87(2): 314-316.
- 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: 985-990.
- Iacobellis, N., Locantore, S. and Capasso, P., 2005. Antibacterial activity of *Cuminum cyminum* L. and *Carum carvi* L. essential oils. Journal Agricultural and Food Chemistry, 53: 57-61.
- Malcolm, H.D., 1981. A toxin associated with bacterial blotch of mushrooms. The International Society for Mushroom Science, 11(2): 324-330.
- Owlia, P., Saderi, H., Rasooli, I. and Sefidkon, F., 2009. Antimicrobial characteristics of some herbal oils on *Pseudomonas aeruginosa* with special reference to their chemical compositions. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 8(2): 107-114.
- Sahin Basak, S. and candan, F., 2010. Chemical Composition and *In vitro* antioxidant and antidiabetic activities of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. essential oil. Journal of the Iranian Chemical Society, 7(1): 216-226.
- Schaad, N.W., Jones, J.B. and Chun,W., 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. APS Press, 373p.
- Singh, A.K., Dikshit, A., Sharma, M.L. and Dixit, S.N., 1980. Fungitoxic activity of some essential oils. Economic Botany, 34(2): 186-190.
- Sokovic, M. and Griensven, L.J.L.D., 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.
- Sokovic, M.D., Vukojevic, J., Marin, P.D., Brkic, D.D., Vajs, V. and Griensven, L.J.L.D., 2009. Chemical composition of essential oils of thymus and mentha species and their antifungal activities. Journal of Molecules, 14: 238-249.
- Wells, J.M., Sapers, G.M., Fett, W.F., Butterceld, J.E., Jones, J.B., Bouzar, H. and Miller, F.C., 1996. Postharvest discoloration of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* caused by *Pseudomonas tolaasii*, *P. reactans*, and *P. gingeri*. Phytopathology, 86(10): 1098-1103.

Antimicrobial activity of essential oil and extracts of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. on *Pseudomonas tolaasii* under *In vitro* & *In vivo* conditions

N. Ansari[1*], N. Hasanzadeh[2] and M.B. Rezaee[3]

1*- Corresponding author, Msc. Student, Department of Agariculture, Sciences and Research Unit, Islamic Azad University, Tehran, Iran, E-mail: enad1387@yahoo.com
2- Departement of Pathology, Agariculture, Sciences and Research Unit, Islamic Azad University, Tehran, Iran
3- Research Institude of Forests and Rangelands, Tehran, Iran

Received: April 2011 Revised: July 2011 Accepted: July 2011

Abstract

One of the modern methods for biological control of button mushroom (*Agaricus bisporus*) brown blotch disease is using plant's essential oil. Therefore, antimicrobial properties of essential oil and extracts obtained from *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. leaves were evaluated against the plant pathogenic bacterium *Pseudomonas tolaasii* both *In vitro* and *In vivo* conditions. 0.3 g/ml of each leaf samples was macerated in water and organic solvents (acetone, methanol and ethanol) to obtain the relevant extracts. The extraction of essential oil from leaves was performed Hydro-distillation method using Clevenger apparatus. Bioassays for inhibition activities of EO were carried out in five concentrations (0/1, 0/01, 0/001, 0/0001 and pure mg/ml) on two agar media of NA and KB. According to the isolation and identification of the main components in essential oils by gas chromatography (GC-MS), Cineol (58.1%) and α-phellandrene (6%) were identified as the main components. The most efficient *In vitro* results obtained by pure essential oil of *Eucalyptus* with 17 mm inhibition zone on KB and methanol extract with 8mm on NA. These were more pronounced when compared to inhibition effects of antibiotics erythromycin, penicillin and gentamycin and not with tetracycline in both concentrations of 0.1 and 0.01 mg/ml. This was reversed by subsequent increase of the antibiotics tetracycline and gentamicin to the level of 1, 5 and 10 mg/ml. *In vivo* assays were conducted in order to evaluate the efficacy of essential oil and methanol extract in two dilutions of 0/1 and 0/01 mg/ml. 20µl of each plant extracts was pre-treated on mushroom caps and after 24 h, the bacterial suspension at ca 105 cfu/ml was inoculated the same pre-treated sites. After a two day incubation period at 25°C, the 0/01 concentration of both extracts showed a satisfactory result.

Key words: *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh., antibacterial activity, button mushroom, *Pseudomonas tolaasii*.