خواص ضد باکتریایی اسانس ریحان (*Ocimum baslicum* L.) تحت تنش شوری

سارا نجفی قاقلستانی*[۱]، محمدعلی نجفی[۲]

۱- دانش‌آموخته دکتری زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
۲- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.

دریافت مقاله: ۱۱ آذر ۱۴۰۱، بازنگری: ۲ دی ۱۴۰۱، پذیرش نهایی: ۳ دی ۱۴۰۱

چکیده

نگهدارنده‌های شیمیایی اثرات زیان‌باری بر سلامت انسان دارند، به همین دلیل امروزه سعی شده تا ترکیبات طبیعی مانند اسانس‌ها به‌عنوان جایگزین مورد توجه قرار گیرند. تنش شوری ازجمله تنش‌های مهم محیطی است که بر اجزاء اسانس و خواص آن تأثیرگذار است. هدف از این تحقیق، ارزیابی اثر ضد باکتریایی اسانس ریحان به‌دست آمده تحت تأثیر تنش شوری است. در این پژوهش تنش شوری در ۵ سطح شامل کنترل (۰/۳ dc/m)، ۱/۵، ۳، ۵ و ۸ ds/m در شرایط گلخانه‌ای بر گیاه ریحان اعمال و اثر آن بر عملکرد وزن تر برگ و اسانس و نیز اجزاء اسانس بررسی گردید. همچنین، خواص ضد باکتریایی اسانس به دو روش چاهک و میکرودایلوشن در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا منوسیتوژنز*، *باسیلوس سرئوس*، *اشریشیاکلی*، *پسودوموناس آئروژنزا* و *سالمونلا انتریکا* ارزیابی شد. افزایش تنش شوری تا سطح ۸ ds/m باعث کاهش عملکرد وزن تر برگ در هر بوته (تا ۱۴۲/۲ درصد) و افزایش مقدار اسانس ریحان (تا ۵۴/۱ درصد) گردید ($p<0.05$). همچنین، با افزایش تنش شوری، برخی ترکیبات مانند لینالول (۴/۸ درصد) و جرماکرن (۴۴/۲ درصد) افزایش و اجزاء اوجنول (۴۰/۸ درصد) و آلفا-کادینول (۳۴/۷ درصد) کاهش یافتند. نمونه‌های اسانس ریحان در تمام سطوح شوری در برابر باکتری‌های هدف اثر ضد میکروبی نشان داد. این خصوصیت تحت تأثیر نوع باکتری و سطح شوری قرار داشت. *باسیلوس سرئوس* مقاوم‌ترین و *سالمونلا انتریکا* حساس‌ترین باکتری در برابر اثرات ضد میکروبی اسانس ریحان بودند. افزایش قدرت ضد باکتریایی اسانس ریحان در سطوح شوری ≤ ۳/۰ dc/m مشاهده گردید، که می‌تواند برای کاربرد مؤثرتر در برابر باکتری‌های بیماری‌زا لحاظ شود.

واژگان کلیدی: *اجزاء اسانس، رشد باکتری، عملکرد، میکرودایلوشن*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: saranajafi66@gmail.com

مقدمه

فساد میکروبی مواد غذایی یک مسأله اصلی در صنایع غذایی است که با کاهش ماندگاری، بروز انواع بیماری‌ها و ضرر اقتصادی همراه است. راهکار رایج در ممانعت از فساد میکروبی استفاده از ترکیبات نگهدارنده شیمیایی است که به دلیل اثرات سمی آن بر سلامت انسان با محدودیت‌هایی مواجه شده است. امروزه علاقه شدیدی به استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی به‌عنوان یک جایگزین مناسب پدید آمده است (۳). اسانس‌ها متابولیت‌های ثانویه گیاهان هستند که در اندام‌های گل، برگ، ساقه و ریشه، با فعالیت‌های بیولوژیکی متنوع از جمله ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی ساخته می‌شوند. این ترکیبات به دلیل زیست تخریب‌پذیری، کارآیی قوی و سمیت پایین برای پستانداران، از قابلیت گسترده‌ای به‌عنوان طعم‌دهنده، ضد میکروب و آنتی‌اکسیدان در مواد غذایی برخوردار هستند (۱۳). خواص اسانس تابع نوع و مقدار اجزاء آن است که خود تحت تأثیر منطقه جغرافیایی، واریته، تنش‌های محیطی و روش استخراج قرار دارد (۱، ۳، ۲۰). تنش شوری یک خطر جدی است. پیش‌بینی می‌شود تا اواسط قرن ۲۱ بیش از ۵۰ درصد زمین‌های کشاورزی شور خواهند شد که این موضوع برای کشور ایران با توجه به شرایط اقلیمی خاص خود، بسیار جدی‌تر است (۷، ۲۶). در فرآیند تنش شوری، غلظت نمک‌های مختلف مانند کلرید سدیم، سولفات کلسیم، سولفات منیزیم و بی‌کربنات‌ها در آب و خاک موجب اعمال استرس‌های اسمتیک به گیاه شده و در نتیجه با تغییر فعالیت‌های آنزیمی مسیرهای متابولیک سنتز، کمیت و کیفیت اسانس را تحت تأثیر قرار می‌دهند (۹). از سویی دیگر عملکرد برگ و اسانس نیز تحت تأثیر شوری قراردارد و معمولاً در سطوح شوری بالاتر از ds/m ۶ کاهش می‌یابد (۷، ۲۵). یکی از مهم‌ترین برنامه‌های پژوهشی در کشت گیاهان دارویی، به‌دست آوردن بهترین شرایط کشت برای تولید گیاهی با بیشترین درصد متابولیت‌های ثانویه است (۹، ۱۵).

از مشهورترین تیره‌های گیاهان دارویی، لامیاسه (Lamiaceae) است که دربرگیرنده ۲۳۶ سر رده و حدود ۶۰۰۰ جنس می‌باشد. جنس Ocimum از مهم‌ترین اعضاء این خانواده بوده و دربرگیرنده ۱۵۰ گونه متفاوت است (۱). ریحان (*Ocimum basilicum* L.) از گیاهان مهم خانواده نعناع است که برای سالیان طولانی به‌عنوان گیاه دارویی با هدف پیشگیری یا درمان اختلالات قلبی-عروقی، دیابت، گرفتگی قاعدگی، اختلالات گوارشی و عصبی، ضد اسپاسم، ضد التهاب و درد و همچنین تب‌بر کاربرد دارد. همچنین کاربرد وسیعی به‌عنوان ادویه و سبزی تازه‌خوری دارد (۲۱). گزارشات متعددی در خصوص اثر ضد میکروبی اسانس برگ ریحان در برابر باکتری‌های گرم مثبت و منفی در دسترس است (۱، ۱۴، ۱۹). گزارش شده که فعالیت ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی اسانس برگ ریحان عمدتاً ناشی از فعالیت گروه‌های مونوترپن، تری‌ترپن و فلاونوئیدی است (۱۳).

در این پژوهش سعی شده تا برای نخستین بار تأثیر تنش شوری بر اجزاء تشکیل‌دهنده و نیز خواص ضد میکروبی اسانس ریحان گونه *Ocimum basilicum* L. در شرایط گلخانه‌ای مورد بررسی قرار گیرد. تا بهترین و مؤثرترین سطح شوری آبیاری با هدف کاربرد اسانس به‌عنوان یک ترکیب ضد میکروبی معرفی گردد.

مواد و روش‌ها

بذر رقم ریحان (*Ocimum basilicum* L.)، پاکان بذر، اصفهان، ایران) در شرایط گلخانه‌ای به تاریخ ۱۰ آبان ماه ۱۴۰۰، درون گلدان‌هایی (دهانه ۴۰ cm، ارتفاع ۳۷ cm) حاوی مخلوط پیت ماس: شن: خاک مزرعه (۵۰: ۲۵: ۲۵) کشت شد. در هر گلدان تعداد ۱۰ بذر در عمق ۱ cm کشت و در مجموع هر تیمار در ۱۵ گلدان اجرا شد (۱۰). آبیاری بلافاصله پس از کشت تا مرحله شش برگی گیاه با تیمار کنترل (۰/۳ dc/m) انجام گردید. در طی رشد گیاه طی چند مرحله بوته‌ها تنک و در نهایت داخل هر گلدان تعداد سه بوته قرار گرفت. تیمارهای شوری در ۵ سطح شامل کنترل (۰/۳ dc/m)، ۱/۵، ۳، ۵ و ۸ ds/m اعمال

شدند. محلول‌های نمکی با افزودن مقادیر کافی NaCl به محلول کنترل، به گونه‌ای آماده شدند تا رسانایی الکتریکی مورد نظر حاصل شود. بوته‌ها پس از شش برگی شدن، تیمارهای شوری را هر ۵ روز به مقدار ۵۰۰ ml دریافت نمودند. تنش شوری حدود ۲۹ روز (زمانی که ۵۰ درصد بوته‌ها وارد مرحله‌ی گلدهی شدند) اعمال گردید. یک هفته پس از آخرین آبیاری، برگ‌ها جهت آزمون‌های بعدی برداشت شدند (۸).

عملکرد وزن تر برگ: بدین منظور تمامی برگ‌های هر تیمار جداگانه توزین و برحسب وزن تر برگ به ازای هر بوته (گرم) گزارش گردید (۸).

استخراج و عملکرد اسانس: برگ‌های برداشت شده بدون ذرات خارجی، پس از شستشو با آب، در دمای اتاق خشک و سپس توسط دستگاه آسیاب (Feller، چین) پودر شدند. مقدار ۳۰ گرم پودر همراه آب به نسبت (پودر: آب) ۱۰:۱ به درون بالن دستگاه کلونجر (شیمی آزماگستر، ایران) منتقل و برای مدت ۳ ساعت فرآیند استخراج ادامه یافت. اسانس به‌دست آمده به کمک قیف جداکننده از فاز آبی جدا و در ادامه پس از فیلتراسیون با کاغذ واتمن ۱ به کمک انیدرو سولفات سدیم (مرک، آلمان) خشک شدند. عملکرد اسانس برحسب مقدار اسانس استخراج شده (درصد) بر پایه وزن تر برگ گزارش گردید (۱۶).

شناسایی اجزاء اسانس: شناسایی ترکیبات اسانس ریحان با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی Agilent 7890A (آمریکا) متصل به طیف‌سنج جرمی Agilent 5975C و ستون DB-5 (طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۲۵۰ میکرومتر، ضخامت فاز ساکن ۰/۲۵ میکرومتر) انجام شد. گاز هلیوم با سرعت ml/min ۱/۱ به ستون با دمای متغیر ۳۰ تا ۲۵۰ °C (روند افزایشی ۲/۵°C/min) تزریق گردید. انرژی یونیزاسیون طیف‌سنج جرمی ۷۰ الکترون ولت بود. ترکیبات اسانس با بررسی طیف نرمال آلکان‌های C7 - C22 و مقایسه آنها با طیف جرمی ترکیبات استاندار و بهره‌گیری از فرهنگ ترکیبات طبیعی شناسایی شد (۱۶).

آزمون‌های میکروبی: اثر ضد میکروبی اسانس ریحان بر روی باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* PTCC 1337، *لیستریا منوسیتوژنز* (ATTC 19118)، *باسیلوس سرئوس* PTCC 1857، *اشریشیاکلی* PTCC 1763، *پسودوموناس آئروژنزا* PTCC 1074 و *سالمونلا انتریکا* PTCC 1709 مورد بررسی قرار گرفت. تمامی باکتری‌ها از آزمایشگاه میکروبی گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه زابل تهیه و برای فعال‌سازی، به محیط کشت نوترینت براث (سیگما آلدریچ، انگلستان) تلقیح و تحت دمای ۳۷ °C برای مدت ۲۴ h گرمخانه‌گذاری (پارس آزما، ایران) شدند. جهت تهیه کلنی‌های خالص بر روی محیط کشت نوترینت جامد (سیگما آلدریچ، انگلستان) کشت خطی انجام و پس از گرمخانه‌گذاری مجدد، کلنی‌های خالص جهت تکثیر به محیط کشت نوترینت براث (سیگما آلدریچ، انگلستان) منتقل و در شرایط مشابه به گرمخانه منتقل گردیدند. از کشت تازه ۲۴ h سوسپانسیون نیم مک‌فارلند ($\times 10^6$ CFU/ml ۱/۵ - ۱) تهیه و بلافاصله جهت آزمون‌های بعدی استفاده شد (۵).

آزمون ضد میکروبی به روش چاهک: در این روش ۱ ml از سوسپانسیون میکروبی تهیه شده به پلیت ۹ cm منتقل و ۱۵ ml از محیط کشت نوترینت آگار ذوب شده به آن اضافه گردید. سپس در هر پلیت چاهک‌هایی به قطر ۵ mm ایجاد و هرکدام با ۵۰ µl از اسانس گیاه با غلظت ۲۰ درصد پر شد. Tween 80 (۰/۵ v/v درصد) به‌عنوان کنترل منفی و اریترومایسین (E15، سیگما آلدریچ- انگلستان) به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شدند. سپس پلیت‌ها گرمخانه‌گذاری (دمای ۳۷ °C، ۴۸ h) گردیدند. اثر ضد میکروبی بر حسب میلی‌متر (mm) ناحیه بازداری گزارش شد (۱). تمامی آزمون‌ها در ۵ تکرار انجام گرفت.

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و کشندگی (MBC) اسانس ریحان: حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی

(MBC) اسانس ریحان به روش میکرودایلوشن و با استفاده از محیط کشت براث مغذی و پلیت ۹۶ خانه انجام شد. به هر چاهک مقدار ۱۰۰ µl سوسپانسیون میکروبی اضافه گردید. سپس به چاهک نخست مقدار ۱۰۰ µl اسانس اضافه و رقیق‌سازی سریالی تا خانه نهم ادامه یافت. محیط کشت حاوی میکروب هدف به‌عنوان کنترل مثبت و محیط کشت فاقد باکتری به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شدند. پلیت برای مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷°C گرمخانه‌گذاری و به لحاظ کدورت سنجی در طول موج ۶۲۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر (سسیل، انگلستان) بررسی گردید. کمترین غلظت اسانس که در آن باکتری رشد نکرد به‌عنوان MIC ثبت شد. همچنین از خانه‌هایی که فاقد رشد میکروبی بودند، ۵۰ میکرولیتر به محیط کشت نوترینت آگار تلقیح و برای ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری (۳۷°C) گردیدند، کمترین غلظتی که قادر به مرگ ۹۹/۹ باکتری هدف بود به‌عنوان MBC ثبت شد (۲۳).

تجزیه و تحلیل داده‌ها: در این تحقیق تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۲ و مقایسه میانگین داده‌ها توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن و در سطح اطمینان ۹۵ درصد انجام شد.

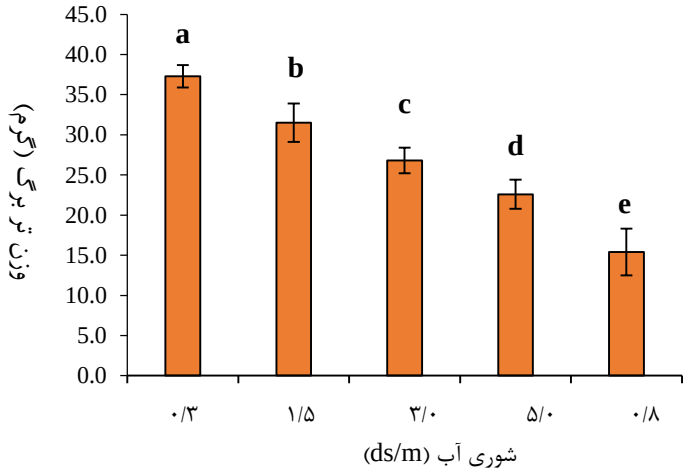
نتایج

عملکرد وزن تر برگ: آبیاری با آب شور بر صفت وزن تر برگ (شکل ۱) در سطح اطمینان ۹۵ درصد اثر معنی‌دار داشت. به‌طوری که افزایش سطح شوری موجب کاهش وزن تر برگ گردید. مقادیر وزن تر برگ بوته‌ها از ۱۵/۴ تا ۳۷/۳ g گرم متغیر بود که به‌ترتیب توسط تیمارهای شوری ۸/۰ ds/m و کنترل (۰/۳ ds/m) به‌دست آمد.

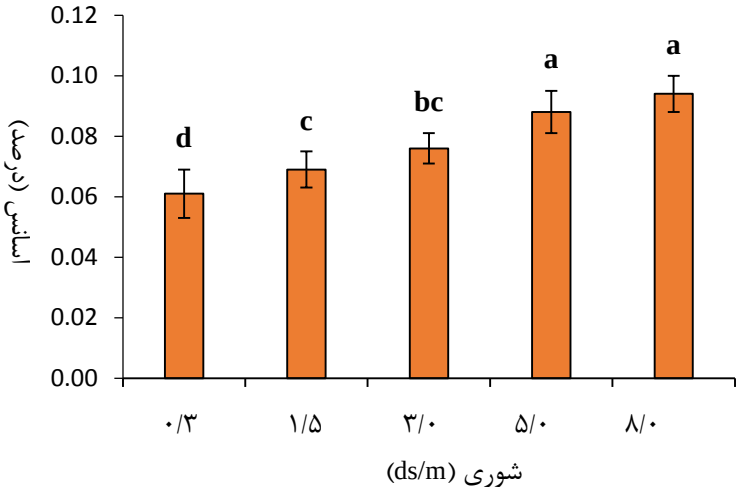
عملکرد اسانس: همان‌طور که شکل ۲ نشان می‌دهد افزایش سطح شوری موجب افزایش معنی‌دار مقدار اسانس برگ گردید ($p < ۰/۰۵$). بیشترین مقدار (۰/۰۹۳ درصد) در سطح شوری ۸ ds/m و کمترین (۰/۰۶۱ درصد) تحت شوری ۰/۳ ds/m ثبت شد.

ترکیبات شیمیایی اسانس: همان‌طور که جدول ۱ نشان می‌دهد ۳۵ ترکیب شیمیایی مختلف در نمونه‌های اسانس ریحان شناسایی شدند. در بین تمامی تیمارها به‌ترتیب ترکیبات لینالول (۵۶/۹۳-۵۴/۳۲ درصد) و اوجنول (۷/۹۱-۴/۶۸ درصد) بالاترین سهم را به خود اختصاص دادند. سایر ترکیباتی که به‌طور متوسط مقادیری بالاتر از ۳ درصد را ثبت نمودند به‌ترتیب ۵-ان-۴-آلفا-اول- مورل (۴/۸۲-۳/۹۵ درصد)، جرماکرن (۴/۱۸-۲/۹۶ درصد)، الفا-کادینول (۴/۲۷-۲/۷۹ درصد) و ۱و ۸- سینول (۳/۴۶-۲/۸۲ درصد) بودند.

اثر ضد میکروبی اسانس ریحان: اثر ضد میکروبی نمونه‌های اسانس ریحان در مقایسه با آنتی‌بیوتیک اریترومایسین در جدول ۲ آورده شده است. تمامی نمونه‌های اسانس ریحان در برابر باکتری‌های گرم مثبت (*لیستریا منوسیتوژنز*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس*) و گرم منفی (*سالمونلا انتریکا*، *اشریشیاکلی*، *پسودوموناس آئروژنزا*) اثر بازدارندگی داشتند. آنتی‌بیوتیک اریترومایسین در مقایسه با اسانس ریحان در برابر تمامی باکتری‌ها بجز *سالمونلا انتریکا* (۶/۷±۰/۷ mm) اثر ضد میکروبی قوی‌تری نشان داد. بالاترین اثر ضد میکروبی اسانس ریحان در برابر *سالمونلا انتریکا* (۶ /۱۶-۱۵/۷) و کمترین در برابر *باسیلوس سرئوس* (۸/۸-۸/۲ mm) ثبت شد. افزایش شوری تنها در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس* (۱۶/۶-۱۲/۳ mm) باعث تقویت اثر ضد میکروبی گردید حال آنکه بر سایر باکتری‌ها تأثیر نیرومندی نداشت.



شکل ۱- تأثیر سطح شوری بر عملکرد وزن تر برگ (گرم) گیاه ریحان. حروف کوچک بالای هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد است. داده‌ها : میانگین ± انحراف معیار



شکل ۲- تأثیر سطح شوری مقدار اسانس (درصد) گیاه ریحان. حروف کوچک بالای هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد است. داده‌ها : میانگین ± انحراف معیار

حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC) و کشندگی (MBC): نتایج حاصل از ارزیابی حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC) و کشندگی (MBC) نمونه‌های اسانس ریحان در برابر باکتری‌های هدف (جدول ۳) بیانگر اثرات متفاوت است. بالاترین مقادیر (۱۰۰ µg/ml) MIC و (۱۰۰ µg/ml) MBC در تمامی تیمارهای شوری در برابر *باسیلوس سرئوس* و کمترین مقادیر در غلظت اسانس ۶/۲۵ µg/ml برای *سالمونلا انتریکا* به‌دست آمد. با توجه به مقادیر MIC نمونه‌های اسانس، سطح شوری ۵ ds/m بر روی *لیستریا مونوسیتوژنز* و سطوح شوری ۳ و ۵ ds/m برروی *سالمونلا انتریکا* بیشترین تأثیرگذاری را داشتند.

جدول ۱- تأثیر غلظت‌های مختلف شوری (ds/m) بر ترکیبات اسانس ریحان (*Ocimum baslicum*. L) برحسب درصد

ردیف	ترکیب شیمیایی	RI	شوری (ds/m)				
			۰	۱	۲	۳	۴
	Monoterpene hydrocarbons						
۱	α- pinene	۹۳۲	۰/۳۲	۰/۲۸	۰/۱۹	۰/۱۳	۰/۰۹
۲	Camphen	۹۴۹	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۳	۰/۰۵	۰/۰۶
۳	Sabinene	۹۷۳	۰/۱۸	۰/۱۲	۰/۰۵	–	–
۴	β- pinene	۹۷۹	۰/۹۸	۰/۷۶	۰/۳۳	۰/۱۸	۰/۰۸
۵	Myrecen	۹۹۲	۰/۸۶	۰/۶۲	۰/۵۶	۰/۴۵	۰/۴۲
۶	α-phellandrene	۱۰۰۹	۰/۵۸	۰/۳۲	–	–	–
۷	limonen	۱۰۱۷	۰/۲۲	۰/۱۲	۰/۰۴	–	–
۸	1,8-Cineol	۱۰۳۰	۲/۸۲	۲/۹۶	۳/۱۵	۳/۲۸	۳/۴۶
۹	cis- β- ocimene	۱۰۴۳	۰/۵۹	۰/۳۹	۰/۲۱	۰/۱۶	۰/۱۲
۱۰	γ-Terpinene	۱۰۵۶	۰/۱۱	۰/۱۳	۰/۱۰	۰/۰۸	۰/۱۱
۱۱	α -Terpinene	۱۰۶۱	۱/۴۸	۱/۵۹	۱/۸۳	۲/۰۶	۲/۲۱
۱۲	Fenchone	۱۰۷۶	۰/۷۳	۰/۶۲	۰/۵۵	۰/۵۱	۰/۴۸
	Oxygenated Monoterpenes						
۱۳	Linalool	۱۰۸۳	۵۴/۳۲	۵۴/۴۹	۵۶/۵۷	۵۶/۷۱	۵۶/۹۳
۱۴	Camphor	۱۱۴۳	۰/۸۹	۰/۹۵	۱/۱۸	۱/۲۴	۱/۳۱
۱۵	Borneol	۱۱۶۶	۰/۴۵	۰/۳۹	۰/۳۱	۰/۲۸	۰/۲۳
۱۶	Terpinene-4-ol	۱۱۷۵	۰/۱۲	۰/۱۴	۰/۱۷	۰/۱۸	۰/۲۱
۱۷	Bornyl acetate	۱۲۷۳	۰/۶۶	۰/۷۳	۰/۷۹	۰/۸۰	۰/۸۷
۱۹	Eugenol	۱۳۵۸	۷/۹۱	۷/۳۴	۶/۲۹	۵/۵۷	۴/۶۸
۲۰	β- Caryophyllene	۱۴۵۴	۰/۱۶	۰/۱۹	۰/۲۴	۰/۲۹	۰/۳۱
۲۱	Germacrene D	۱۴۸۰	۲/۹۶	۳/۲۲	۳/۳۵	۴/۱۸	۴/۲۱
	Sesquiterpene Hydrocarbons						
۲۲	α -Copaene	۱۳۶۶	۰/۱۳	۰/۱۵	۰/۱۷	۰/۲۰	۰/۲۷
۲۳	β -Cubebene	۱۳۷۹	۰/۴۶	۰/۳۵	۰/۱۹	۰/۰۶	۰/۰۱
۲۴	β- Elemene	۱۳۸۴	۱/۶۳	۱/۵۲	۱/۳۶	۱/۲۸	۱/۲۱
۲۵	α - Z- Ergamotene	۱۴۴۱	۲/۳۷	۲/۱۱	۱/۷۵	۱/۴۳	۱/۱۷
۲۶	β- Farenesen	۱۴۶۱	۲/۱۵	۲/۲۶	۲/۴۵	۲/۶۷	۲/۸۷
۲۷	α - Amorphene	۱۴۹۳	۱/۲۱	۱/۱۹	۱/۰۸	۰/۸۵	۰/۳۶
۲۸	α - Selinene	۱۴۹۹	۰/۳۲	۰/۹۳	۱/۵۳	۱/۷۶	۲/۴۹
۲۹	δ – Cadinene	۱۵۱۲	۰/۸۳	۰/۹۵	۱/۸۲	۲/۰۵	۲/۲۵
۳۰	Δ- Cadinene	۱۵۲۸	۰/۱۲	۰/۱۹	۰/۲۳	۰/۴۱	۰/۵۷
۳۱	Bicyclogermacrene	۱۵۰۱	۰/۹۵	۰/۴۵	۰/۲۵	۰/۱۲	۰/۰۸
	Oxygenated Sesquiterpenes						
۳۲	Spathulenol	۱۵۷۶	۱/۲۵	۱/۰۳	۰/۸۲	۰/۷۵	۰/۶۲
۳۳	Caryophyllene oxide	۱۵۸۱	۰/۷۳	۰/۵۸	۰/۴۳	۰/۲۸	۰/۱۶
۳۴	Muurol-5-en-4- α-ol	۱۶۳۷	۳/۹۵	۴/۱۲	۴/۲۵	۴/۴۹	۴/۸۲
۳۵	α- Cadinol	۱۶۵۱	۴/۲۷	۴/۰۵	۳/۵۸	۳/۴۱	۲/۷۹
	کل		۹۶/۷۲	۹۵/۲۵	۹۵/۸۵	۹۵/۹۱	۹۵/۳۳

RI: زمان بازداری

جدول ۲- اثر ضد میکروبی اسانس ریحان (mm) بر روی باکتری‌های هدف به روش چاهک

	میکروارگانیسم	سطح شوری (ds/m) ۰/۳	۱/۵	۳/۰	۵/۰	۸/۰	اریترومایسین	Tween 80
گرم مثبت	*L. monocytogenes*	۱۱/۸±۰/۳	۱۱/۶±۰/۵	۱۲/۲±۰/۷	۱۲/۳±۰/۷	۱۲/۲±۰/۴	۲۱/۶±۰/۵	NE
	S. aureus	۱۲/۳±۰/۴	۱۲/۷±۰/۴	۱۲/۹±۰/۷	۱۴/۸±۰/۴	۱۴/۶±۰/۵	۱۶/۵±۰/۷	NE
	B. cereus	۸/۴±۰/۳	۸/۷±۰/۸	۸/۲±۰/۵	۸/۸±۰/۴	۸/۵±۰/۶	۱۹/۵±۰/۸	NE
گرم منفی	*S. enterica*	۱۶/۶±۰/۹	۱۶/۴±۰/۶	۱۶/۱±۰/۵	۱۵/۷±۰/۳	۱۶/۳±۰/۴	۶/۷±۰/۷	NE
	P. aeruginosa	۱۳/۱±۰/۴	۱۲/۸±۰/۳	۱۳/۴±۰/۳	۱۳/۶±۰/۶	۱۳/۳±۰/۵	۱۴/۸±۰/۱	NE
	E. coli	۱۴/۹±۰/۴	۱۴/۷±۰/۸	۱۴/۹±۰/۵	۱۴/۶±۰/۴	۱۴/۴±۰/۷	۱۲/۳±۰/۶	NE

NE: ناحیه بازدارندگی شناسایی نشد. داده‌ها: میانگین ± انحراف معیار

جدول ۳- حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و کشندگی (MBC) باکتریایی اسانس ریحان (µg/ml)، تحت تنش شوری به روش چاهک

	میکروارگانیسم	فعالیت ضد میکروبی	سطح شوری (ds/m) ۰/۳	۱/۵	۳/۰	۵/۰	۸/۰
گرم مثبت	*L. monocytogenes*	MIC	۲۵/۰	۲۵/۰	۲۵/۰	۱۲/۵	۲۵/۰
		MBC	۵۰/۰	۵۰/۰	۲۵/۰	۲۵/۰	۲۵/۰
	S. aureus	MIC	۱۲/۵	۱۲/۵	۱۲/۵	۱۲/۵	۱۲/۵
		MBC	۵۰/۰	۵۰/۰	۲۵/۰	۱۲/۵	۱۲/۵
	B. cereus	MIC	۱۰۰/۰	۱۰۰/۰	۱۰۰/۰	۱۰۰/۰	۱۰۰/۰
		MBC	۱۰۰/۰	۱۰۰/۰	۱۰۰/۰	۱۰۰/۰	۱۰۰/۰
گرم منفی	*S. enterica*	MIC	۱۲/۵	۱۲/۵	۶/۲۵	۶/۲۵	۱۲/۵
		MBC	۱۲/۵	۱۲/۵	۶/۲۵	۱۲/۵	۱۲/۵
	P. aeruginosa	MIC	۵۰/۰	۵۰/۰	۵۰/۰	۵۰/۰	۵۰/۰
		MBC	۱۰۰/۰	۱۰۰/۰	۱۰۰/۰	۵۰/۰	۱۰۰/۰
	E. coli	MIC	۱۲/۵	۱۲/۵	۱۲/۵	۱۲/۵	۱۲/۵
		MBC	۲۵/۰	۲۵/۰	۱۲/۵	۱۲/۵	۲۵/۰

نتایج نشان داد تیمار شوری بر مقدار MIC باکتری‌های *باسیلوس سرئوس*، *پسودوموناس آئروژنز*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیاکلی* بی‌تأثیر بود. افزایش غلظت شوری باعث کاهش مقدار MBC اسانس ریحان در برابر *لیستریا مونوسیتوژنز* (۸ ds/m –۳)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (۸ ds/m –۳)، *سالمونلا انتریکا* (۳ ds/m)، *پسودوموناس آئروژنزا* (۵ ds/m) و *اشریشیاکلی* (۳ ds/m و ۵ ds/m) در مقایسه با تیمار کنترل (۰/۳ ds/m) گردید.

بحث و نتیجه‌گیری

گیاه ریحان به‌خصوص برگ‌ها، در برابر غلظت شوری آب عکس‌العمل نشان داده و از نظر سطح و تعداد کاهش می‌یابند. این پدیده مربوط به کاهش تقسیم سلولی است. کوچک‌تر شدن سطح برگ به همراه کاهش پتانسیل اسمتیک، مقدار جذب ترکیبات محلول خاک را کاهش می‌دهد که نتیجه آن پایین آمدن مقدار وزن ماده خشک و سطح برگ گیاه است (۲۲). املاح و ترکیبات مغذی به‌طور مستقیم بر فتوسنتز متابولیت‌های اولیه (قند، آمینو

اسید و اسیدهای آلی) تأثیرگذار بوده و کاهش جذب، موجب کاهش وزن تر و از سویی افزایش تجمع برخی از متابولیت‌های ثانویه مانند اسانس می‌شود (۲۰). اثر تنش شوری بر اجزاء عملکرد از جمله ریحان (۲۰، ۸) و بادرنجبویه بررسی و نتایج مشابهی گزارش گردیده است (۲۵).

گزارشات متفاوتی از نوع و درصد اجزاء شیمیایی اسانس ریحان در دسترس است. آمور و همکاران (۲۰۲۱) بیشترین اجزاء اسانس ریحان را لینالول (۴۱/۳ درصد) و ۱و ۸- سینول (۹/۶ درصد) اعلام (۲) کردند در حالی که قاسمی و همکاران (۲۰۱۷) دو ترکیب متیل چاویکول (۴۹/۷) و لینالول (۱۰/۷) گزارش نمودند (۲۱). تفاوت نتایج مربوطه احتمالاً به اثر واریته، شرایط اقلیمی، عوامل مؤثر بر مرحله داشت (شامل میزان کوددهی، دور آبیاری)، زمان برداشت و روش استخراج اسانس بر فرایند سنتز ترکیبات اسانس ناشی شده است (۱۸). در این پژوهش تنش شوری تأثیرات متفاوتی بر کمیت اجزاء اسانس نشان داد. افزایش سطح استرس شوری موجب افزایش مقدار ترکیبات لینالول (۴/۸ درصد)، ۱و ۸- سینول (۲۲/۷ درصد)، جرماکرن (۴۲/۲ درصد) و ۵-ان-۴-آلفا-اول-مورل (۲۲/۲ درصد)، و کاهش اوجنول (۴۰/۸ درصد) و آلفا-کادینول (۳۴/۷ درصد) شد. سنتز متابولیت‌های ثانویه تحت تأثیر استرس‌های محیطی به‌عنوان یک مکانیسم دفاعی گیاه در برابر عوامل تنش‌زای محیطی (نمک، دما، کم‌آبی) عمل می‌کند. اجزای اصلی اسانس ریحان عمدتاً از دو مسیر بیوشیمیایی شیکیمیک اسید برای ترکیبات متیل چاویکول، اوژنول، متیل اوژنول و متیل سینامات، و دیگری مسیر اسید موالونیک برای اجزاء ترپنوئیدی مانند لینالول و ژرانیول ساخته می‌شوند (۲۶). این مسیرها با مسیرهای سنتز متابولیت اولیه در ارتباط بوده و تأثیر می‌پذیرند (۲۳). شوری همچنین با تأثیرگذاری بر فعالیت‌های آنزیماتیک متابولیسم‌های بیوسنتز منجر به تغییر محتویات اسانس و اجزاء آن می‌شود (۹). بسیاری از نویسندگان تغییر ترکیبات اسانس گیاهان در شرایط شور را گزارش نموده‌اند. عزیز و همکاران (۲۰۱۳) ترکیبات اسانس بادرشبو، را تحت تنش شوری (۰، ۱۵۰۰، ۳۰۰۰ و ۴۵۰۰ ppm NaCl) ارزیابی و گزارش نمود. مقادیر ژرانیل (۷۵/۲ – ۱۹/۶ درصد)، ژرانیل استات (۱۳/۰۶-۹/۱۴ درصد)، نرال (۵۱/۱ –۲۱/۲ درصد) و پس از آن ژرانیول (۳۱/۰-۹۹/۱ درصد) تغییر یافت (۴). در پژوهشی دیگر اثر شوری در غلظت‌های ۰ – ۹ ds/m بر اجزاء اسانس زیره سیاه بررسی و مشخص گردید افزایش سطح شوری تا مقدار ۶ ds/m، باعث افزایش آلفا- پینن (حدود ۵۹ درصد) و کاهش پی– سیمن (۳۹ درصد) شده است (۹).

فاکتور تعیین کننده بر اثرات ضد میکروبی اسانس، اجزاء شیمیایی، وجود گروه‌های عملگر و اثرات متقابل سینرژیستی آنان است. به‌طور کلی اسانس‌ها در برابر باکتری‌های گرم مثبت خاصیت مهارکنندگی بیشتری در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی دارند. دلیل مقاومت بیشتر باکتری‌های گرم‌منفی احتمالاً ناشی از ساختار سخت و غنی غشاء خارج سلولی از ترکیبات لیپوپلی‌ساکاریدی می‌باشد که موجب مقاومت بیشتر غشاء در برابر نفوذ ترکیبات آب‌گریز می‌گردد. با این حال ترکیبات آب‌دوست کوچک مولکول قادر به عبور از کانال‌های پروتئینی پورین می‌باشند اما همچنان مانعی برای درشت مولکول‌ها و ترکیبات آبگریز هستند (۲۱). اما غشاء خارجی باکتری‌های گرم‌مثبت توسط لایه‌ای از ترکیبات پپتیدوگلیکان پوشیده شده که در بسیاری موارد فاقد تراکم لازم به جهت ممانعت از نفوذ ترکیبات ضد میکروب کوچک مولکول می‌باشد (۷). در برخی از گزارشات اثر ضد میکروبی اسانس‌ها را ناشی از ماهیت چربی‌دوستی آنها دانسته‌اند که با تأثیرگذاری بر دیواره سلولی و غشای سیتوپلاسمی باعث برهم‌زدن نظم مولکولی ترکیبات پلی‌ساکاریدی، اسیدهای چرب و فسفولیپیدی شده و در نهایت موجب نفوذپذیری بیشتر می‌شوند. در باکتری‌ها، نفوذپذیری غشاها با از دست دادن یون‌ها و کاهش پتانسیل غشاء و نیز تخلیه ATP همراه است. آسیب به دیواره سلولی و غشاء می‌تواند منجر به

نشت ماکرومولکول‌ها و تجزیه شدن آنها شود. روغن‌های ضروری همچنین می‌توانند به ساختمان لیپیدها و پروتئین‌ها آسیب بزنند. به نظر می‌رسد سمیت سلولی شامل چنین آسیب غشایی باشد (۷، ۱۲، ۲۱). با این وجود نمی‌توان این موضوع را با قطعیت بیان داشت که تمامی باکتری‌های گرم‌منفی در مقایسه با باکتری‌های گرم‌مثبت در برابر اثرات ضد باکتریایی اسانس ریحان مقاوم‌تر هستند (۲۶). ترکیب اسانس یک پارامتر بسیار مهم برای ارزیابی کیفیت ریحان و کاربرد آن به‌عنوان ماده اولیه برای استفاده در شاخه‌های مختلف صنایع دارویی، غذایی و شیمیایی است. ترپنوئیدها مانند لینالول، اوسیمن، α-ترپینول، ۱و۸- سینئول، کامفور، α-پینن، جرماسین و همچنین سسکوئی‌ترپن‌ها اهمیت اکولوژیکی و بیولوژیکی زیادی دارند. سسکوئی‌ترپن‌ها متابولیت‌های ثانویه ضد قارچی بسیار قوی هستند که در میان آنها جرماسرین برجسته است. مونوترپن‌های ۱و۸- سین ال، کامفور، لینالول، α- ترپین ال و غیره اثر ضد باکتریایی قابل توجهی دارند. (۱۱). لازم به ذکر است اطلاعات کمی در مورد اثر تقابل بین اجزای تشکیل‌دهنده بر فعالیت ضد میکروبی وجود دارد که می‌تواند به‌صورت اثرات افزایشی و یا کاهشی بروز نماید. این خصوصیت احتمالاً ناشی از مهار متوالی یک مسیر بیوشیمیایی مشترک، مهار آنزیم‌ها (سنتز پروتئین، سنتز اسید نوکلئیک) و نیز متلاشی شدن غشای خارجی است (۲۶). کروز و همکاران (۲۰۲۰) اثر شوری بر خاصیت ضد میکروبی واریته‌های مختلف اسانس ریحان را در برابر باکتری‌های *لیستریا مونوسیتوژنز*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس*، *اشریشیاکلی*، *سالمونلا انتریکا* و *انتروباکتر کلاسه* بررسی نموده و ضمن اشاره به تأثیرگذاری سطح شوری بر خصوصیت ضد میکروبی نمونه‌های اسانس، بیان داشتند واریته‌های مختلف اثرات ضد میکروبی متفاوتی دارند (۸).

نتایج ما نشان داد افزایش سطح تنش شوری در گیاه ریحان موجب کاهش عملکرد وزن برگ تر و افزایش راندمان تولید اسانس می‌شود. تنش شوری موجب تغییراتی در غلظت ترکیبات سازنده اسانس ریحان گردید. همچنین موجب تغییرات مؤثری بر کنترل رشد باکتری‌های گرم‌منفی و مثبت در مقایسه با تیمار کنترل (۰/۳ ds/m) شد. این ویژگی تحت تأثیر سطح شوری و نوع میکروارگانیسم قرار داشت. بنابراین اعمال تنش شوری می‌تواند روش مناسب نوینی برای تولید اسانس‌های ریحان با کاربردهای خاص در صنایع غذایی و دارویی مطرح باشد. با این حال این ادعا نیاز به مطالعات دقیق‌تر اقتصادی، بالینی و در محیط واقعی غذایی دارد.

سپاسگزاری

این پژوهش با بهره‌گیری از گرنت شماره UOZ-GR-9955 اجرا گردیده است. نویسندگان مقاله مراتب سپاسگزاری خود را از آزمایشگاه علوم و صنایع غذایی دانشگاه زابل اعلام می‌دارند.

References

1- Ababutain IM. Antimicrobial Activity and Gas Chromatography-Mass spectrometry (GC-MS) analysis of Saudi Arabian *Ocimum basilicum* leaves extracts. *J Pure Appl Microbiol*. 2019; 13: 823-833.

2- Amor G, Sabbah M, Caputo L, Idbella M, De Feo V, Raffaele P, *et al.* Basil essential oil: Composition, antimicrobial properties, and micro-encapsulation to produce active chitosan films for food packaging. *Foods*. 2021; 10: 1- 16.

3- Alhaithloul HA, Soliman MH, Ameta KL, El-Esawi MA. Elkelish A. Changes in ecophysiology, osmolytes, and secondary metabolites of the medicinal plants of *Mentha piperita* and *Catharanthus roseus* subjected to drought and heat stress. *Biomolecules*. 2020; 10: 43-64.

4- Aziz EE, Hussein MS, Wahba HE, Razin AM. Essential oil constituents of Dracocephalum moldavica L. grown under salt Stress and different sources of soil amendment. *Middle East J Sci Res.*

2013; 16: 706-713.

5- Barzegar H, Alizadeh behbahani B, Mehrnia MA. Identification of the chemical compounds and antibacterial activity of *Ocimum basilicum* essential oil and the effects of its interaction with tetracycline and chloramphenicol antibiotics on some pathogenic microorganisms causing infection and food poisoning. *Journal of food science and technology (Iran).* 2019; 16: 113-125. [In Persian]

6- Caliskan O, Kurt D, Temizel Kadir E, Odabas MS. Effect of Salt Stress and Irrigation Water on Growth and Development of Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.). *Open Agric*. 2017; 2: 589–594.

7- Chouhan S, Sharma K, Guleria S. Antimicrobial activity of some essential oils-present status and future perspectives. *Medicines.* 2017; 4: 1-27.

8- Cruz LRO, Polyzos N, Fernandes A, Petropoulos SA, Gioia FD, Dias MI, *et al.* Effect of saline conditions on chemical profile and the bioactive properties of three red-colored basil cultivars. *J Agron*. 2020; 10: 1-17.

9- Davazdahemami S, Allahdadi M. Essential oil yield and composition of four annual plants (ajowan, dill, moldavian balm and black cumin) under saline irrigation. Food Therapy and Health Care. 2022; 4: 1- 9.

10- Ebrahimi M, Rezaerdinejad V, Besharat S, Abdi M. A study of evapotranspiration as well as crop coefficient in *Ocimum Basilicum* L. growth process in greenhouse. *Journal of Water and Irrigation Management*. 2018; 8: 1-13. [In Persian]

11- Gadisa E, Weldearegay G, Desta K, Tsegaye G, Hailu S, Jote K, Takele A. Combined antibacterial effect of essential oils from three most commonly used Ethiopian traditional medicinal plants on multidrug resistant bacteria. *BMC Complement Altern Med*. 2019; 19: 1-9.

12- Ghasemi Pirbalouti A, Malekpoor, Salimi A. Chemical composition and yield of essential oil from two Iranian species of basil (*Ocimum ciliatum* and *Ocimum basilicum*). *Trends Phytochem Res.* 2017; 1: 3–8.

13- Hamida NB, Martínez-Díaz RA, Hela M, Msaada K, Ouerghi Z, Andres MF, *et al.* Effect of salinity on the antiparasitic activity of hyssop essential oil. *J Essent. Oil Res*. 2020; 32: 74–83.

14- Ilic ZS, Milenkovic L, Sunic L, Tmusic N, Mastilovic J, Kevresan Z, *et al.* Efficiency of Basil essential oil antimicrobial agents under different shading treatments and harvest times. *J Agron*. 2021; 11: 1-12.

15- Isayenkov SV, Maathuis FJ. Plant salinity stress: many unanswered questions remain. *Front Plant Sci*. 2019; 10: 1-11.

16- Kalkhorani NM, Dadgar M, Rezaee MB, Mahboubi A, HeroAbadi F. Essential oils composition of *Ocimum basilicum* var. purpurascens from different ecological zone in Iran and antimicrobial activity against different bacterial species. *J medicinal plants by- products*. 2017; 2: 117-123.

17- Li ZH, Cai M, Liu YS, Sun PL, Luo SL. Antibacterial Activity and Mechanisms of Essential Oil from *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis*. *Molecules.* 2019; 24: 1-10.

18- Milenkovic L, Stanojevic J, Cvetkovic D, Stanojevic L, Lalevic D, Sunic L, Fallik E, Ilic ZS. New technology in basil production with high essential oil yield and quality. *Ind. Crops Prod*. 2019; 140: 111718.

19- Nabrdalik M, Grata K. Antibacterial activity of *Ocimum basilicum* L. essential oil against Gram-negative bacteria. *Post Fitoter*. 2016; 17: 80-86.

20- Najafi Ghaghelestani S, Khammari E, Ghanbari A, Dahmardeh M. Effect of additive intercropping series of Sunflower with Basil, under saline and fresh water irrigation regimes on their yield and advantage indices. *J Crop Improv*. 2022; 24: 311-323. [In Persian]

21- Purushothaman B, Prasanna Srinivasan R, Suganthi P, Ranganathan B, Gimbun J, Shanmugam KA. Comprehensive review on *Ocimum basilicum*. *J Nat Med*. 2018; 18: 71-83.

22- Sandra SS, da -Silva CPR, Oliveira FA, da Silva OM, Silva AC, Candido WS. Responses of basil cultivars to irrigation water salinity. Rev. *Bras. de Eng. Agricola e Ambient*. 2017; 21: 44-49.

23- Saravani Pak E, Najafi MA, Tavakoli M, Soltani Tehrani N. Evaluation antimicrobial effects of new edible film from Persian gum incorporated with Saffron extract and nisin, on chicken fillets under chilled conditions. *New Findings in Veterinary Microbiology*. 2021; 4: 23-36.

24- Sarri E, Termentzi A, Abraham EM, Papadopoulos GK, Baira E, Machera K, *et al.* Salinity stress alters the secondary metabolic profile of M. *sativa*, M. *arborea* and their hybrid (Alborea). *Int J Mol Sci.* 2021; 22: 1-19.

25- Shabankareh GH, Fakheri B, Mohammadpuor VR. Effects of different levels of salinity and drought stress on growth parameters and essential oil of lemon balm (*Melissa officinalis* L.). *Iran*

J Field Crop Sci. 2016; 46: 673-686. [In Persian]

26- Stanojevic LP, Marjanovic-Balaban ZR, Kalaba VD, Stanojevic JS, Cvetkovic DJ, Cakic MD. Chemical composition, antioxidant and anti-microbial activity of Basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil. *Essent Oil Bear Pl*. 2017; 20: 1557-156.

Antibacterial properties of basil essential oil (*Ocimum baslicum* L.) under salt stress

Sara Najafi Ghaqlestani[*1], Mohammad Ali Najafi[2]

1- Graduated PhD in Agriculture, Faculty of Agriculture, Zabol University, Zabol, Iran.
2- Associate Professor, Department of Food Science and Industry, Zabol University, Zabol, Iran.

Receive: December 2, 2022; Revise: December 23, 2022; Accept: December 24, 2022

Summary

Chemical preservatives have harmful effects on human health, for this reason, natural compounds such as essential oils (EOs) are being considered as alternatives. Salinity Stress (SS) is one of the important environmental stresses, which affects EOs components and its properties. The purpose of this research is to evaluate the antibacterial effect of basil (*Ocimum baslicum* L.) EO obtained under SS. salinity at 5 levels including control (0.3 dc/m), 1.5, 3, 5, and 8 ds/m was applied to basil plant in greenhouse conditions. Leaf weight and EO yield, and also the EO components were evaluated. Further, antibacterial properties of EO by agar-well diffusion and microdilution method were evaluated against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aerogenes* and *Salmonella enterica*. Increasing the salinity stress up to 0.8 ds/m level decreased the yield of leaf weight per plant (up to 142.2%) and increased the amount of EO content (up to 54.1%). Also, with the increase in SS level, some compounds such as linalool (4.8%) and germacrene (44.2%) increased, and eugenol (40.8%) and α-cadinol (34.7%) components decreased. Basil EOs showed antimicrobial effect against the target bacteria at all salinity levels. This characteristic was influenced by the type of bacteria and salinity level. *Bacillus cereus* was the most resistant and *Salmonella enterica* the most sensitive bacteria against the antimicrobial effects of basil EO. An increase in the antibacterial power of EOs was observed at salinity levels ≥ 0.3 dc/m, which can be considered for more effective use against pathogenic bacteria.

Key words: *Essential oil components, Bacterial growth, Yield, Microdilution*