فنآوری تولیدات گیاهی/ جلد بیست و یکم/ شمارهٔ اول/ صفحات ۱۴۷-۱۶۲/ بها و تابستان ۱۴۰۰
DOI: 10.22084/PPT.2021.22045.2002

بررسی اثر روش‌های مختلف عصاره‌گیری با حلال‌های آب، استون و هگزان روی برخی خصوصیات فیتوشیمیایی و ضدمیکروبی مریم‌گلی، زنیان، پونه و تفاله موم زنبورعسل در شرایط آزمایشگاهی

In Vitro Effect of Various Extracting Methods with Water, Acetone and Hexane Solvents, on some Phytochemical and Antimicrobial Properties of Ajowan, Mentha, Garden Sage and Beeswax Waste

الهه اسدی[۱]، نسیبه پورقاسمیان[۲*]، غلامحسین شهیدی بنجار[۳] و محبوبه باقری[۴]

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۵/۱۹ تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۲/۲۱
(مقاله پژوهشی)

چکیده

هدف از این مطالعه، بررسی اثر روش‌های مختلف عصاره‌گیری (سوکسله و خیساندن) با حلال‌های آب، استون و هگزان روی برخی خصوصیات فیتوشیمیایی و ضدمیکروبی مریم‌گلی، زنیان، پونه و تفاله موم زنبورعسل بود. در بررسی خصوصیات ضدمیکروبی مواد، برای هر میکروارگانیسم یک آزمایش جداگانه به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد. میکروارگانیسم‌های موردبررسی شامل، *Bacillus cereus*، *Proteus vulgaris*، *Fusarium oxysporum*، *Alternaria alternata*، *Pythium aphanidermatum* و *Verticillium dahlia* بودند. فاکتورهای مورد آزمایش شامل نوع ماده (برگ مریم‌گلی و پونه، دانه‌ی زنیان و تفاله موم زنبورعسل) و روش‌های مختلف عصاره‌گیری با حلال‌های مختلف (خیساندن با هگزان (غیرقطبی)، خیساندن با آب (قطبی) و خیساندن با استون (نیمه‌قطبی)، سوکسله با هگزان و سوکسله با استون) بود. روش خیساندن با حلال آب، در همه مواد کم‌ترین میزان فنل و فلاونوئید را استخراج کرد و قادر به استخراج هیچ ترکیب تاننی نبود. روش خیساندن با استون در تفاله موم زنبورعسل و روش سوکسله با استون در دیگر مواد، جزء روش‌های مؤثر در استخراج فنل و فلاونوئید بودند. در بخش میکروبی، نتایج نشان داد که هیچ‌یک از مواد و روش‌های عصاره‌گیری تأثیر بازدارندگی روی قارچ *Fusarium oxysporum* نداشت. در دیگر میکروارگانیسم‌های موردمطالعه، بیش‌ترین میزان قطر هاله در عصاره هگزانی زنیان با روش سوکسله بود. عصاره‌های مختلف تفاله موم زنبورعسل روی تمام میکروارگانسیم‌های موردبررسی به‌جز قارچ *Alternaria alternata*، تأثیر بازدارندگی داشت که نشان‌دهنده‌ی خاصیت ضدمیکروبی این پسماند دورریختنی می‌باشد. نتایج این تحقیق نشان داد که عصاره‌های آلی موردبررسی، توانایی کنترل عوامل بیماری‌زای مذکور را داشته و تفاوت در نوع قطبیت حلال‌ها و روش استخراج عصاره‌ها، تأثیر معنی‌داری بر مواد استخراج شده و درنتیجه خاصیت ضدمیکروبی عصاره‌ها دارند.

واژه‌های کلیدی: سوکسله، ضدقارچی، ضدباکتری، هاله عدم رشد، عصاره

۱ و ۲. به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی‌ارشد و دانشیار، گروه تولیدات گیاهی، مرکز آموزش عالی کشاورزی بردسیر، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران
۳. استاد، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران
۴. استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، مرکز آموزش عالی کشاورزی بردسیر، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران
*: نویسنده مسئول Email: n.pourghasemian@uk.ac.ir
مقاله مستخرج از پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد نویسنده اول به راهنمایی نسیبه پورقاسمیان می‌باشد.

مقدمه

با روند فعلی رشد جمعیت، کشاورزان و تولیدکنندگان برای تولید فرآورده‌های کشاورزی و هم‌چنین حفظ مواد غذایی با سختی و دشواری مواجه شده‌اند و نیاز به ارتقای تولیدات محصولات کشاورزی افزایش یافته است. حل این مشکلات و رسیدن به این هدف با افزایش سطح زیر کشت، افزایش عملکرد در واحد سطح و حفظ محصول امکان‌پذیر است. البته عوامل محدودکننده‌ی تولید را نباید از نظر دور داشت. یکی از مهم ترین عوامل محدودکننده‌ی تولید، آفات و بیماری‌های گیاهی هستند. از طرف دیگر استفاده از روش‌های شیمیایی به‌منظور کنترل آفات و بیماری‌های گیاهی مشکلات زیادی ازجمله تهدید سلامتی بشر و محیط‌زیست، از بین بردن موجودات غیرهدف و پیدایش آفات و عوامل بیماری‌زای مقاوم را ایجاد می‌کند (فروغی و همکاران، ۱۳۹۱). برای رفع این مشکلات روش‌های متفاوتی مانند کنترل بیولوژیک و استفاده از مواد طبیعی و اسانس و عصاره گیاهان دارویی که خاصیت ضدمیکروبی دارند، توصیه شده‌اند.

عصاره‌های گیاهی به‌دلیل پایین بودن هزینه تولید، تجزیه شدن در خاک، و حفظ سلامت محیط‌زیست می‌توانند به‌عنوان جایگزین مناسب سموم شیمیایی مطرح شوند (*قاسمی*[1] و همکاران، 2010). گیاهان دارویی دارای متابولیت‌های ثانویه متنوعی علیه آفات و بیماری‌های گیاهی می‌باشند. این متابولیت‌های ثانویه از قبیل ترپنوئیدها، آلکالوئیدها، پلی استیلن‌ها، اسیدهای آمینه و قندهای معمولی در طول دوره تکامل گیاهان برای دفع آفات و عوامل بیماری‌زای گیاهان تکامل یافته‌اند. این مواد که به مقادیر زیادی در طبیعت وجود دارند برای حفاظت گیاهان می‌توانند مورداستفاده قرار گیرند (منصوری جاجایی و جباری، ۱۳۸۸).

مطالعه در زمینه وظایف این ترکیبات در گیاهان، یک موضوع جذاب و مهم برای بسیاری از پروژه‌های تحقیقاتی شده است و نقش‌های اکولوژیکی تعدادی از این ترکیبات موردبررسی و تحقیق قرار گرفته است (*کاون*[2]، 1999). مریم‌گلی با نام علمی *Salvia officinalis* L. گیاهی علفی و پایا از خانواده نعنائیان[3] می‌باشد. دارای خواص درمانی متعدد بالینی است و از سال‌ها پیش به‌عنوان گیاه دارویی مورداستفاده قرار می‌گرفته است و دارای خواص آنتی‌اکسیدانی می‌باشد (احمدی و عبدالهی، ۱۳۹۱).

پونه با نام علمی *Mentha longifolia* L. از خانواده نعنائیان می‌باشد. دارای خاصیت ضدقارچی، ضدالتهابی، ضدمیکروبی، گندزدایی و ضدعفونی‌کنندگی و آنتی‌اکسیدانی است (*علی*[4] و همکاران، 2002؛ *کولیوپولوس*[5] و همکاران، 2010).

گیاه زنیان با نام علمی *Carum copticum* L. گیاهی است علفی، بدون کرک و معطر از خانواده چتریان[6] می‌باشد. از زنیان به‌صورت خوراکی به‌عنوان ضددرد، ضدآسم، ضدتهوع و خلط‌آور و به‌صورت موضعی در درمان دردهای روماتیسمی استفاده می‌شود (حقیرالسادات و همکاران، ۱۳۹۱).

یکی از محصولات فرعی و ارزان‌قیمت صنعت زنبورداری که پسماندی دورریختنی محسوب می‌شود، تفاله موم زنبورعسل است. مطالعات (پورقاسمیان و مرادی، ۱۳۹۷؛ پورقاسمیان و نوربخش، ۱۳۹۴) اندکی روی این ماده صورت گرفته است که تأییدکننده قدرت این ماده در جایگزینی با مواد آلی دیگر به عنوان بستر کشت در شرایط تنش خشکی و هم‌چنین مؤید قدرت برابر تفاله موم و بقایای یونجه در پتانسیل معدنی شدن کربن در سطح نیم درصد بقایا است. این مسئله از وجود ترکیبات با نیتروژن بالا در این ماده حکایت دارد. هم‌چنین در مطالعه دیگری توان عصاره تفاله موم در افزایش مقاومت به تنش خشکی در کنجد به اثبات رسید (*مرادی*[7] و همکاران، 2019). مشاهدات تجربی دیگر گویای توان تفاله موم در مقابله با برخی بیماری‌ها و کنترل علف هرز است.

در یک مطالعه به‌عمل‌آمده توسط قاسمی و همکاران (۱۳۹۴) عصاره آبی مریم‌گلی دارای اثر بازدارندگی ضعیفی روی قارچ *Alternaria solani* Fr. بود. خاصیت ضدقارچی عصاره زنیان روی قارچ *Candida albicans* B. بررسی شد (نطنزیان قهفرخی و همکاران، ۱۳۸۷). اثرات ضد قارچی عصاره خام ۳۲ گونه گیاهی از ۲۱ خانواده انتخاب شده از مناطق غرب کشور بر سه قارچ بیمارگر گیاهی ازجمله *Pythium aphanidermatum*، *Phytophthora drechsleri*، *Rhizoctonia solani* موردبررسی قرار دادند (*بهرامی‌نژاد*[8] و همکاران، 2013).

هم‌چنین در مطالعات گزارش شده پونه دارای خاصیت ضدقارچی، ضدالتهابی، ضدمیکروبی، گندزدایی و ضدعفونی کنندگی و آنتی‌اکسیدانی است (*علی*[9] و همکاران، 2002؛ *کولیوپولوس*[10] و همکاران، 2010). ولی تا این زمان هیچ

1. Ghesemi
2. Cowan
3. Lamiaceae
4. Ali
5. Koliopoulos
6. Apiaceae
7. Moradi
8. Bahraminejad
9. Ali
10. Koliopoulos

مطالعه‌ای روی خاصیت ضدمیکروبی تفاله موم زنبورعسل صورت نگرفته است.

استخراج با دستگاه سوکسله و روش خیساندن روش‌های رایجی هستند که به کمک حلال‌هایی با قطبیت‌های مختلف انجام می‌گیرد و باعث استخراج طیف وسیعی از مواد شیمیایی موجود در گیاه می‌شود (*پوکورنی*[1] و همکاران، 2001). فرآیند استخراج در روش سنتی سوکسله بر اساس پدیده نفوذ حلال از طریق منافذ سلول‌های گیاهی و انتشار ترکیبات قابل انحلال در اثر پدیده انتشار مولکولی از منافذ سلول به داخل حلال موردنظر است که منجر به طولانی شدن مدت‌زمان فرآیند استخراج می‌شود (نوروزی و همکاران، ۱۳۹۷).

خواص ضدمیکروبی عصاره به ترکیباتی که در حلال مورداستفاده حل گردیده و وارد شده بستگی دارد. ترپن‌ها یکی از عوامل ایجادکننده فعالیت ضدمیکروبی اسانس و عصاره می‌باشند (*امیدبیگی*[2] و همکاران، 2007؛ *شاهین*[3] و همکاران، 2005؛ *کیم*[4] و همکاران، 1995). در پژوهشی اثر حلال‌های مختلف (آب، استون، اتانول و هگزان) بر راندمان استخراج، محتوای فنلی کل و فعالیت ضداکسایشی عصاره غلاف نخودفرنگی موردبررسی قرار گرفته است و نتایج نشان داد بیش‌ترین میزان ترکیبات فنلی و فعالیت ضداکسایشی مربوط به عصاره استخراج شده با اتانول است (*قربانی*[5] و همکاران، 2017).

کومار[6] و همکاران (2008) گزارش کردند عصاره متانولی میوه هندوانه ابوجهل حاوی مقادیر قابل‌توجه ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی می‌باشد. بنابراین با توجه به این‌که خروج متابولیت‌های ثانویه و به‌دنبال آن قدرت ضدمیکروبی عصاره‌های گیاهی تحت تأثیر نوع عصاره‌گیر و روش عصاره گیری قرار می‌گیرد، این مطالعه با هدف بررسی اثر عصاره‌گیری با آب، استون و هگزان به روش‌های مختلف بر ارزیابی توان ضدمیکروبی مریم‌گلی، زنیان، پونه و تفاله موم زنبورعسل انجام شد.

مواد و روش‌ها

پایه طرح آزمایش

به‌منظور بررسی اثر حلال‌ها و روش‌های مختلف عصاره‌گیری بر خواص ضدقارچی و ضدباکتریایی برگ مریم‌گلی و پونه، دانه زنیان و تفاله موم زنبورعسل، ۵ آزمایش جداگانه صورت گرفت که هر آزمایش به‌صورت فاکتوریل در پایه طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار در شرایط آزمایشگاهی اجرا شد. در این مطالعه ۵ میکروارگانیسم که هرکدام در یک آزمایش موردبررسی قرار گرفتند شامل، سویه‌های قارچی *Fusarium oxysporum* S. (PTCC 5115)، *Alternaria alternate* (PTCC 5224)، *Verticillium dahliae* K. و اوومیست *Pythium aphanidermatum* E. (از کلکسیون بخش گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه باهنر کرمان) و باکتری‌های *Bacillus cereus.* (ATCC 11778) و *Proteus vulgaris* (PTCC 1079) *بودند.*

تهیه و روش عصاره‌گیری نمونه‌ها به روش خیساندن و سوکسله

فاکتور اول شامل گیاهان دارویی مریم‌گلی، زنیان، پونه و تفاله موم زنبورعسل و فاکتور دوم شامل عصاره‌گیری به روش خیساندن با حلال آب، عصاره‌گیری به روش خیساندن با حلال استون، عصاره‌گیری به روش خیساندن با حلال هگزان، عصاره گیری به روش سوکسله با حلال استون و عصاره‌گیری به روش سوکسله با حلال هگزان در نظر گرفته شد. فاکتور اول چهار ماده و فاکتور دوم پنج نوع بود. حلال‌های موردبررسی در سه گروه قطبی (آب)، نیمه‌قطبی (استون) و غیرقطبی (هگزان) قرار گرفتند.

نمونه‌های گیاهی و تفاله موم ابتدا توسط آسیاب برقی به‌صورت پودر درآورده شدند و سپس برای تهیه عصاره با روش خیساندن، به نسبت ۱ به ۷ (w/v) در حلال‌های موردنظر (آب، استون و هگزان) ریخته شدند و در دمای اتاق روی شیکر و به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند. به‌منظور جداسازی حلال آلی از عصاره‌ها، از دستگاه آون در دمای ۲۵-۳۰°C به‌مدت ۲۴ ساعت استفاده گردید. در ادامه رقت ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر با متانول و DMSO به نسبت ۱:۱ (v/v) این غلظت تهیه شد.

روش دوم عصاره‌گیری با استفاده از دستگاه سوکسله با دو حلال استون و هگزان، به نسبت ۱ به ۷ (w/v) در حلال‌های موردنظر انجام شد. در این روش مدت‌زمان عصاره‌گیری ۵ الی ۶ ساعت بود. در ادامه با استفاده از دستگاه روتاری حلال از عصاره جدا شد و برای خشک شدن کامل زیر هود شیمیایی قرار گرفت.

تهیه‌ی سوسپانسیون از اسپور قارچ‌ها

از کلنی‌های رشد کرده قارچ‌ها، سوسپانسیونی از اسپور قارچ تهیه شد. برای این کار از کلنی رشد کرده در محیط‌کشت

1. Pokorny
2. Omidbeygi
3. Shahin
4. Kim
5. Gohorbani
6. Kumar

(Potato dextrose agar) PDA برای قارچ‌های *F. oxysporum*، *A. alternata*، *V. dahliae* و محیط‌کشت CMA (Corn meal agar) برای اوومیست *P. aphanidermatum* استفاده شد. دو میلی‌لیتر توبین ۸۰ درصد اضافه می‌گردد و با ایجاد خراش های سطحی و ملایم در سطح میسلیوم، اسپور قارچ آزاد می‌شود. سپس مخلوط حاوی اسپور با سمپلر برداشته شده و در لوله‌های استریل ریخته می‌شود و از آن برای تهیه سوسپانسیونی با غلظت تقریبی 10^6 اسپور قارچی در هر میلی‌لیتر، با عدد جذب بین ۰/۰۸ تا ۰/۱ با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر UV_VIS در طول‌موج ۶۰۰ نانومتر استفاده شد. برای تائید از دوز اسپور در سوسپانسیون، شمارش اسپورها در زیر میکروسکوپ با استفاده از لام نئوبار نیز انجام گرفت (نبی‌پور و دوستی، ۱۳۹۷).

تهیه‌ی سوسپانسیون باکتری‌ها

باکتری‌های *Bacillus cereus* و *Proteus vulgaris* که در لوله های میکروسانتریفیوژ اپندرف استریل در حضور ۴۰ درصد گلیسرول در دمای ۲۰°C- نگهداری شده‌اند، دومرتبه به‌طور متوالی در محیط‌کشت براث BHI در دمای ۳۷°C به‌مدت ۱۸ ساعت کشت شدند تا باکتری‌ها به حالت فعال درآیند. سپس از این محلول سوسپانسیونی با دوز تقریبی 10^6 تک‌سلول باکتری با عدد جذب بین ۰/۰۸ تا ۰/۱ از دستگاه اسپکتروفتومتر UV_VIS در طول موج ۶۰۰ نانومتر استفاده شد و سپس برای اطمینان شمارش به روش تهیه رقت متوالی و کشت سطحی انجام گرفت (مصلح آرانی و همکاران، ۱۳۹۸؛ مزارعی و فهمیده، ۱۳۹۷).

بررسی خواص ضدمیکروبی عصاره‌ها

برای بررسی خواص ضدمیکروبی عصاره‌ها از روش انتشار چاهک استفاده شد. ابتدا محیط‌کشت‌های موردنظر PDA، NA و CMA آماده و در اتوکلاو به‌مدت ۲۰ دقیقه در فشار ۱/۵ اتمسفر استریل شدند. سپس درون هر تشتک پتری ۳۰ میلی‌لیتر از محیط‌کشت ریخته شد. تشتک‌های پتری‌دیش اوومیست، قارچ‌ها به‌مدت ۳ الی ۵ روز و باکتری‌ها به‌مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور به‌ترتیب، در دمای ۲۵°C و ۳۷°C انکوبه شدند و پس از این مدت معین کشت‌های میکروبی از نظر ایجاد قطر هاله عدم رشد بررسی گردیدند. جهت اندازه‌گیری قطر هاله مهاری، دو قطر عمود بر هم با استفاده از خط‌کش اندازه‌گیری و در پشت تشتک‌های پتری‌دیش رسم گردید و نتایج برحسب میلی‌متر ثبت شد. کلیه آزمون‌ها به‌صورت دوگانه انجام گرفته است و جهت تائید صحت مراحل، آزمون‌ها ۳ بار تکرار و نتایج بر اساس معدل هر موردمحاسبه شد.

اندازه‌گیری فیتوشیمیایی

برای اندازه‌گیری میزان فنل کل از روش فولین- سیکالتو و نمودار استاندارد گالیک اسید استفاده شد و نمونه را در مقابل بلانک در طول‌موج ۷۶۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد (*دجیریدانس*[1] و همکاران، 2006). اندازه‌گیری فلاونوئید کل از روش آلومینیوم کلرید و نمودار استاندارد کوئرستین استفاده شد و نمونه را در مقابل بلانک در طول‌موج ۴۲۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد (*بویاهیا*[2] و همکاران، 2018). اندازه‌گیری تانن با محلول وانیلین و هیدروکلریک اسید و نمودار استاندارد کتچین استفاده شد و نمونه را در مقابل بلانک در طول‌موج ۵۰۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد (*ربایا*[3] و همکاران، 2014).

داده‌های حاصل از آزمایش بر اساس طرح آماری مورداستفاده، توسط نرم‌افزار SAS (نسخه ۹/۴) مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفتند و از آزمون LSD در سطح احتمال ۱ درصد جهت مقایسه میانگین استفاده شد.

نتایج و بحث

فنل کل

در مطالعه حاضر بیش‌ترین و کم‌ترین میزان فنل، در بین تمام مواد موردمطالعه در گیاه زنیان مشاهده شد و به‌ترتیب در روش خیساندن با حلال آب (۴/۸۳) و روش سوکسله با حلال هگزان (۲۱۴/۷) گزارش شد. در گیاه مریم‌گلی و پونه بیش‌ترین میزان فنل در روش خیساندن با حلال هگزان و خیساندن با حلال استون و روش سوکسله با حلال استون مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری باهم نداشتند (جدول ۱). در تفاله موم زنبورعسل بیش‌ترین مقدار فنل کل در روش خیساندن با حلال استون (۱۳۷/۸۷) گزارش شد. ترکیبات فنلی موجود در گیاهان دارویی عمدتاً آب‌گریز هستند و در حلال‌های غیر قطبی مانند اتانول و هگزان و نیمه‌قطبی مانند استون نسبت به حلال‌های کاملاً قطبی مانند آب به مقدار بیش‌تری حل می‌شوند و به‌طور معمول خاصیت ضداکسایشی بیش‌تری را از خود نشان می‌دهند (*واناسوندرا و شهیدی*[4]، 2005). در تحقیق بشارتی و همکاران (۱۳۹۸) ترکیبات فنلی عصاره گیاه همیشه‌بهار با

1. Djeridance
2. Bouyahya
3. Rebaya
4. Wanasandara and shahidi

حلال‌های آب، اتانول و استون به روش خیساندن بررسی و گزارش شد که حلال اتانول بیش‌ترین مقدار ترکیبات فنلی را نشان داد و سپس حلال استون در مقام بعدی قرار گرفت. در تحقیق دیگری، گزارش شد، حلال‌های متانولی و استونی گیاه هندوانه ابوجهل، حلال‌های موثری در استخراج ترکیبات فنلی می‌باشند (اسمعیل‌زاده بهابادی و یوسف زائی، ۱۳۹۷). امروزه ترکیبات فنلی موجود در گیاهان دارویی به دلیل دارا بودن اثرات بیولوژیک منحصربه‌فرد و مهم از قبیل اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، ضدسرطانی و ضدمیکروبی، موردتوجه بسیاری از محققین در حوزه‌های علوم پزشکی و صنایع غذایی قرار گرفته‌اند (*دل ریو*[1] و همکاران، 2013؛ *بورتون- فری‌من*[2]، 2010). بااینحال، عوامل بسیار زیادی ازجمله گونه‌های گیاهی مختلف، شرایط آب‌وهوایی، روش‌های استخراج و حلال‌های مورداستفاده در استخراج مواد، در میزان متابولیت‌های ثانویه گیاهی ازجمله فنل کل دخالت دارند (میرزایی و همکاران، ۱۳۹۰). در مطالعه‌ای عصاره‌ی آبی گیاه مریم‌گلی به روش خیساندن ۴۲/۲ میلی‌گرم در گرم گزارش شد (عزیزی و خسروی، ۱۳۹۷). درحالی‌که، در مطالعه حاضر عصاره آبی این گیاه که به روش خیساندن تهیه شده بود، ۲۶ میلی‌گرم در گرم مشاهده شد. به نظر می‌رسد تفاوت در میزان این متابولیت‌ها علاوه بر روش عصاره‌گیری و حلال‌های مورداستفاده، به شرایط محیطی که گیاهان در آن رشد می‌کنند نیز مرتبط باشد.

فلاونوئید کل

با توجه به نتایج این تحقیق، بیش‌ترین مقدار فلاونوئید کل در تمام عصاره‌ها با حلال استون استخراج شد. در گیاه زنیان و مریم‌گلی روش سوکسله بهتر از روش خیساندن، مواد فلاونوئیدی را استخراج کرده بود ولی در تفاله موم زنبورعسل و پونه بین این دو روش تفاوت معنی‌داری وجود نداشت و هر دو روش با حلال استون بیش‌ترین مقدار ترکیبات فلاونوئیدی را نشان دادند (جدول ۱). بنابراین به نظر می‌رسد زمانی که استخراج فلاونوئید جزء اهداف اصلی مطالعه است، روش سوکسله به دلیل سرعت بالاتر و زمان کوتاه‌تر در عصاره‌گیری، روش قابل پیشنهادی است. *خراسانی اسمعیلی*[3] و همکاران (2015) نشان دادند که حلال‌های نیمه قطبی مانند استون، متانول و اتانول با نفوذ بر داخل سلول‌های گیاهان، ترکیبات طبیعی ثانویه بیش‌تری استخراج می‌کنند و این میزان برای حلال‌هایی نظیر آب، اتیل استات و کلروفرم کم‌تر است. که با نتایج مطالعه حاضر مشابه است و حلال نیمه‌قطبی استون بیش‌ترین ترکیبات فلاونوئیدی را استخراج کرده است و حلال آب کم‌ترین میزان ترکیبات فلاونوئیدی را در خود حل کرده است. در تحقیقی روی گیاه (*Artemesia absinthium*) عصاره‌های آبی، اتانولی و کلروفرمی به روش خیساندن تهیه شدند و میزان ترکیبات فلاونوئید به‌ترتیب ۵۵۰/۵۳، ۱۱۰۸/۱۵ و ۶۶۷/۴۰ گزارش شد که نشان داد حلال آب ترکیبات فلاونوئیدی کم‌تری را استخراج کرده است (*ساین*[4] و همکاران، 2012). در تحقیق دیگری عصاره‌های اتانولی، هگزانی و DCM گیاه (*Artemisia afra*) به روش خیساندن تهیه شد و گزارش دادند که عصاره اتانولی به‌عنوان یک حلال نیمه‌قطبی بیش‌ترین میزان فلاونوئید (۱۴۲/۵۳) را استخراج کرده است (*خان*[5] و همکاران، 2019).

تانن

در این تحقیق، در گیاه زنیان و تفاله موم زنبورعسل بیش‌ترین مقدار تانن به‌ترتیب با میزان ۳۹۱/۶۶ و ۱۲۴/۳۳ در روش عصاره‌گیری سوکسله با حلال هگزان مشاهده شد و در گیاه مریم‌گلی در روش سوکسله با حلال استون (۱۳۲/۵۵) بیش‌ترین میزان تانن گزارش شد. درحالی‌که، در گیاه پونه بیش‌ترین میزان تانن (۱۸۶/۲۲) در روش خیساندن با حلال استون، مشاهده شد (جدول ۱). به نظر می‌رسد تانن موجود در پونه نسبت به گرمای موجود از عصاره‌گیری با روش سوکسله حساس بوده ولی در سه ماده دیگر چنین حساسیتی وجود نداشته است. هم‌چنین حلال آب نتوانست در هیچ‌یک از مواد موردمطالعه ترکیبات تانن را استخراج کند. بنابراین به نظر می‌رسد حلال قطبی آب، حلال مناسبی برای استخراج ترکیبات تانن نمی‌باشد. در مطالعه‌ای که روی ترکیبات فیتوشیمیایی (استروئید، ترپنوئید، تانن، فلاونوئید و آلکالوئید) عصاره‌های مختلف آبی، اتیل استات و اتانول گیاه زنیان به روش خیساندن انجام شد گزارش دادند، که این عصاره‌ها فاقد تانن می‌باشند (حسن[6] و همکاران، 2016).

بیش‌ترین قطر هاله عدم رشد باکتری *B. cereus* (۳۷/۵ میلی‌متر) مربوط به گیاه زنیان، در شرایط عصاره‌گیری با سوکسله و در حضور هگزان مشاهده شد (شکل ۱). با این‌حال خیساندن زنیان در هگزان بدون تفاوت معنی‌دار با خیساندن آن

1. Del Rio
2. Burton-Freeman
3. KhorasaniEsmaeili
4. Singh
5. Kane
6. Hassan

در آب، قطر هاله عدم رشد را نسبت به عصاره‌گیری با سوکسله و در حضور هگزان، حدود ۲۴۶ درصد کاهش معنی‌دار داد.

در مطالعات قبلی نیز به فعالیت ضدمیکروبی عصاره متانولی گیاه زنیان به روش سوکسله در مقابل باکتری‌های *Staphyloccus aureus*، *B. cereus*، *Escherichia coli* (جعفری ثالث، ۱۳۹۷) و عصاره متانولی زنیان بر باکتری *B. pumilus* *زرشناس*[1] و همکاران (2014) اشاره شده است. با این‌حال در مطالعه حاضر به نظر می‌رسد که قدرت ضدمیکروبی این گیاه به‌شدت تحت تأثیر روش عصاره‌گیری قرار گرفت. به‌طوری‌که، عصاره‌گیری زنیان با سوکسله صرف‌نظر از نوع حلال، سبب افزایش قابل‌توجه در قدرت ضدمیکروبی زنیان بر *B. cereus* شد. جعفری ثالث و همکاران، (۱۳۹۷) قطر هاله عدم رشد عصاره متانولی زنیان که با روش سوکسله عصاره‌گیری شده بود را در مقابل باکتری *B. cereus* ۱۶ میلی‌متر گزارش کردند، درحالی‌که در مطالعه حاضر از عصاره گیر هگزان و با روش مشابه سوکسله استفاده شده است. میانگین قطر هاله عدم رشد حدود بیش‌تر از سه برابر افزایش یافته که می‌توان این تفاوت را در قدرت بیش‌تر استخراج مواد توسط حلال هگزان دانست. شاید بتوان بخشی از این تفاوت را به اکوتیپ‌های مختلف گیاه زنیان نسبت داد.

در رابطه با گیاه مریم‌گلی، کم‌ترین و بیش‌ترین میزان هاله عدم رشد باکتری *B. cereus* به‌ترتیب مربوط به خیساندن در آب (۱۲ میلی‌متر) و خیساندن در استون (۲۱ میلی‌متر) بود. وقتی از حلال هگزان استفاده شد روش سوسکله نسبت به روش خیساندن ۱۴/۷ درصد هاله عدم رشد را افزایش داد و زمانی که عصاره‌گیر استون مورداستفاده قرار گرفت، روش خیساندن نسبت به سوکسله، هاله عدم رشد را ۲۱/۵ درصد افزایش داد. (شکل ۱).

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر ماده، روش عصاره‌گیری و هم‌چنین اثر متقابل ماده در روش عصاره‌گیری بر قطرهاله عدم رشد باکتری *Bacillus cereus* در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۲).

آب به‌عنوان یک حلال قطبی توان استخراج مواد ضدمیکروبی کم‌تری را نسبت به بقیه حلال‌ها داشته است (جدول ۱). در مطالعه‌ای که توسط داوری‌نژاد و همکاران (۱۳۹۶)، به‌منظور بررسی اثر تیمار حلال‌های متانول، اتانول، استون و آب بر میزان استخراج متابولیت‌های ثانویه میوه عناب، گزارش کرده‌اند که آب از حداقل قابلیت استخراج متابولیت‌های ثانویه در بین سایر حلال‌ها برخوردار بود که با نتایج این تحقیق مشابه است. در مطالعه‌ی *پاپ*[2] و همکاران، (2016)، عصاره متانولی مریم‌گلی که به روش خیساندن تهیه شده بود دارای خاصیت ضدمیکروبی روی *B. cereus* با قطر هاله عدم رشد ۵۷/۱۱ میلی‌متر گزارش شده است که نشان‌دهنده‌ی خاصیت ضدمیکروبی مریم‌گلی روی این باکتری می‌باشد.

در هنگام استفاده از تفاله موم زنبورعسل کم اثرترین عصاره‌گیر، حلال هگزان بود به‌طوری‌که در شرایط سوکسله با هگزان، هاله عدم رشد تشکیل نشد (شکل ۱). بیش‌ترین میزان هاله مذکور (۲۱ میلی‌متر) در هنگام استفاده از موم به روش خیساندن در استون اختصاص یافت که دارای بیش‌ترین مقدار فنل و فلاونوئید کل می‌باشد (جدول ۱). روش خیساندن نسبت به روش سوکسله در خروج مواد ضدمیکروبی موم زنبورعسل برای مقابله با باکتری *B. cereus* موفق‌تر عمل کرد.

در روش خیساندن حلال به‌مدت چندین ساعت با عصاره‌گیر موردنظر در دمای اتاق در تماس است، به دنبال آن حلال نفوذ کرده و باعث استخراج مواد می‌شود، در روش سوکسله نیز به همین شکل عمل می‌شود ولی با این تفاوت که در دمای بالاتر و در زمان کوتاه‌تری این اتفاق می‌افتد. بالا بودن دما در بسیاری مواقع سبب آسیب به ترکیبات موجود در نمونه شده که همین مسئله باعث تمایل کم‌تر به استفاده از سوکسله در عصاره‌گیری می‌شود (*هاندا*[3] و همکاران، 2008). با توجه به این‌که تفاله موم زنبورعسل در دمای بالا تهیه می‌شود (عسکری راد و همکاران، ۱۳۸۳)، انتظار می‌رفت این ماده نسبت به دمای سوکسله حساس نباشد درحالی‌که، برخلاف انتظار عمل کرده و نسبت به روش خیساندن، ترکیبات ضدمیکروبی کم‌تری برای مقابله با باکتری *B. cereus* آزاد نموده است. شاید برتری روش خیساندن را بتوان به زمان بیش‌تر صرف شده برای عصاره‌گیری نسبت داد.

روش عصاره‌گیری و نوع حلال در پونه بر میزان هاله عدم رشد باکتری *B. cereus* تأثیر قابل‌توجه چندانی نداشت (شکل ۱). به‌طوری‌که، بین خیساندن با استون (۱۳ میلی‌متر)، سوسکسله با استون (۶/۱۴ میلی‌متر) و سوکسله با هگزان (۱۴ میلی‌متر) تفاوت معنی‌داری نبود و این سه مورد بیش‌ترین میزان هاله رشد را نشان دادند. هم‌چنین بین خیساندن با آب (۳/۱۰ میلی‌متر) و خیساندن با هگزان (۱۱ میلی‌متر) هم تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد و هردوی آن‌ها کم‌ترین میزان هاله عدم رشد را نشان دادند.

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر ماده، روش عصاره‌گیری و هم‌چنین اثر متقابل ماده در روش عصاره‌گیری بر

1. Zarshenas

2. Pop

3. Handa

قطر هاله عدم رشد باکتری *P. vulgaris* در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۲).

جدول ۱: اثر متقابل ماده (تفاله موم زنبورعسل، دانه‌ی زنیان، برگ مریم‌گلی و پونه) و روش عصاره‌گیری با حلال‌های مختلف (خیساندن با هگزان، آب، و استون، سوکسله با هگزان و استون) بر میزان فنل کل، فلاونوئید کل و تانن

Table 1: Interaction effect of material (beeswax waste, ajowan seed, mentha and garden sage leaves) and extraction method with various solvents (maceration with hexane, water and acetone, soxhlet with hexaneand acetone) on the total phenol, total flavonoids and tannins

ماده Material	روش عصاره‌گیری Extraction method	فنل کل (میلی‌گرم در گرم ماده خشک) Total phenol (mg g^{-1} DW)	فلاونوئید کل (میلی‌گرم در گرم ماده خشک) Total flavonoid (mg g^{-1} DW)	تانن (میلی‌گرم در گرم ماده خشک) Tannin (mg g^{-1} DW)
زنیان Ajowan	خیساندن با هگزان Maceration with hexane	35.54d	9.65c	154.33b
	خیساندن با آب Maceration with distilled water	4.83e	11.02c	0d
	خیساندن با استون Maceration with acetone	51.5c	19.7b	2d
	سوکسله با هگزان Soxhlet with hexane	214.7a	8.97c	391.66a
	سوکسله با استون Soxhlet with acetone	162.45b	78.16a	4.88c
مریم‌گلی Garden Sage	خیساندن با هگزان Maceration with hexane	193.54a	38.02c	12.88d
	خیساندن با آب Maceration with distilled water	26c	18.9d	0d
	خیساندن با استون Maceration with acetone	210.16a	66.83b	66.33c
	سوکسله با هگزان Soxhlet with hexane	145.16b	43.7c	107.22b
	سوکسله با استون Soxhlet with acetone	185.45a	127.86a	132.55a
تفاله موم زنبورعسل Beeswax	خیساندن با هگزان Maceration with hexane	62.75b	14.09b	102.55b
	خیساندن با آب Maceration with distilled water	6d	13.54b	0d
	خیساندن با استون Maceration with acetone	137.87a	18.29a	31.77c
	سوکسله با هگزان Soxhlet with hexane	12.95cd	6.29c	124.33a
	سوکسله با استون Soxhlet with acetone	26.5c	19.37a	2.11d
پونه Mentha	خیساندن با هگزان Maceration with hexane	128.29a	138.41b	57.44c
	خیساندن با آب Maceration with distilled water	31.58b	68.05c	0d
	خیساندن با استون Maceration with acetone	140.58a	147.7ab	186.22a
	سوکسله با هگزان Soxhlet with hexane	45.5b	125.97b	4.77d
	سوکسله با استون Soxhlet with acetone	127.41a	165.8a	86.44b

برای هر ماده، میانگین‌های داری حداقل یک حرف مشترک، اختلاف معنی داری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ۱ درصد ندارند

For each material, column means with the same letter are not significantly different by LSD test ($P \leq 0.01$)

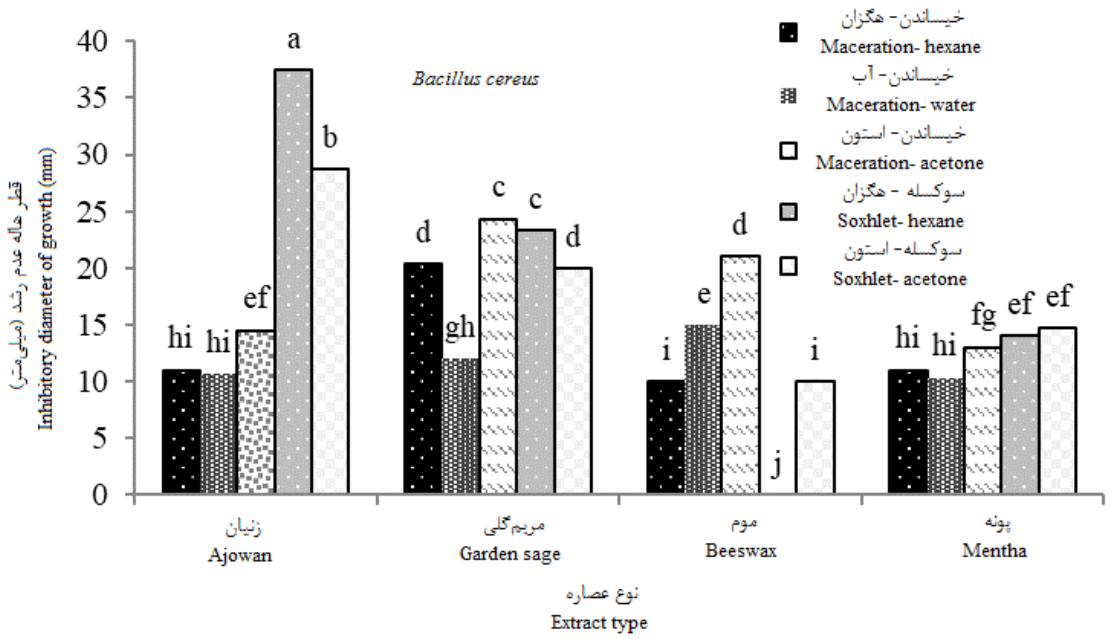
جدول ۲: تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثر تیمارهای مورد بررسی (ماده: تفاله موم زنبورعسل، دانه‌ی زنیان، برگ مریم‌گلی و پونه و روش عصاره‌گیری با حلال‌های مختلف: خیساندن با هگزان، آب، و استون، سوکسله با هگزان و استون) بر قطر هاله عدم رشد عصاره های متفاوت روی میکروارگانیسم‌های موردمطالعه

Table 2: Analysis of variance (mean square) of the effect of experimental treatments (material: beeswax waste, ajowan seed, mentha and garden sage leaves and extraction method with various solvents: maceration with hexane, water and acetone, soxhlet with hexaneand acetone) on inhibitory diameter of growth of different extracts on the studied microorganisms

منابع تغییرات Sources of variations	درجه آزادی df	میانگین مربعات MS				
		Bacillus cereus	*Proteus vulgaris*	*Alternaria alternata*	*Pythium aphanidermatum*	*Verticillium dahliae*
ماده Material (A)	3	352.6**	615.30**	1920.2**	1933.08**	2287.93**
روش عصاره‌گیری Extraction method (B)	4	126.42**	53.01**	253.59**	556.80**	623.43**
ماده × روش عصاره‌گیری A × B	12	189.23**	244.06**	94.03**	185.29**	317.69**
خطا Error	40	0.99	2.64	3.95	1.06	1.87
ضریب تغییرات CV		6.19	13.5	17.01	9.59	7.78

**: معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد

**: Significant at 1% probability level



شکل ۱: اثر متقابل ماده (تفاله موم زنبورعسل، دانه‌ی زنیان، برگ مریم‌گلی و پونه) و روش عصاره‌گیری با حلال‌های مختلف (خیساندن با هگزان، آب، و استون، سوکسله با هگزان و استون) بر قطر هاله عدم رشد *B. cereus*

Fig. 1: Interaction effect of material (beeswax waste, ajowan seed, mentha and garden sage leaves) and extraction method with various solvents (maceration with hexane, water and acetone, soxhlet with hexaneand acetone) on the inhibitory diameter of growth of *B. cereus*

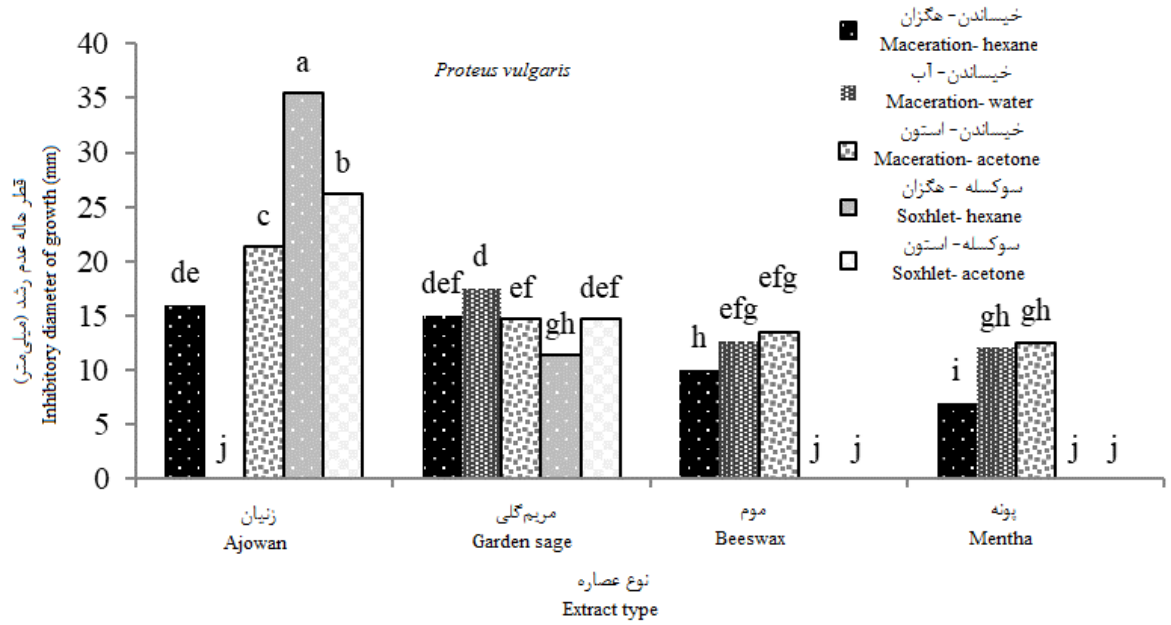
میانگین‌های دارای حروف مشترک، دارای اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد بر اساس آزمون LSD نمی‌باشد

Column means with the same letter are not significantly different by LSD test (P≤0.01)

اثر متقابل ماده و روش عصاره‌گیری برای باکتری *P. vulgaris* نشان می‌دهدکه بیش‌ترین قطر هاله عدم رشد مربوط به گیاه زنیان (۵/۳۵ میلی‌متر) می‌باشد که با روش سوکسله و عصاره‌گیر هگزان مشاهده شد (شکل ۲) و روش عصاره‌گیری سوکسله و خیساندن با حلال استون به‌ترتیب دارای قطر هاله عدم رشد ۱/۲۶ میلی‌متر و ۳/۲۱ میلی‌متر و در رتبه دوم و سوم قرار گرفته‌اند. هم‌چنین برای گیاه زنیان در روش عصاره‌گیری خیساندن با عصاره‌گیر آب، هاله عدم رشد مشاهده

نشد. به‌طورکلی روش سوکسله توانست مواد ضدمیکروبی بیش‌تری از گیاه زنیان استخراج کند و دمای بالا باعث تخریب این مواد نشد. و بر اساس نتایج مشیری و همکاران، (۱۳۹۷) اعمال دماهای بالا به‌راحتی می‌تواند اجزای گیاهی را تخریب کند و ترکیبات گیاهی به درون محیط وارد شوند. به همین دلیل با افزایش دما میزان ترکیبات فنلی استخراج شده روند صعودی دارد. با افزایش دما و زمان استخراج میزان انتقال جرم در فرآیند استخراج افزایش یافته و ترکیبات مؤثر در فعالیت آنتی‌اکسیدانی، بهتر از داخل سلول‌ها خارج می‌شوند، اما افزایش هم‌زمان هر دو پارامتر می‌تواند منجر به تخریب ترکیبات مؤثر شود. با این‌حال در مطالعه حاضر بالا بودن دما اثر منفی بر ترکیبات ضدمیکروبی موجود در زنیان نگذاشته و باعث خروج ترکیبات مؤثر بیش‌تری از عصاره شده است (جدول ۱). به‌نظر می‌رسد عدم همراهی دو پارامتر افزایش دما و زمان سبب خروج بهتر مواد و عدم آسیب به ترکیبات مؤثره ضدمیکروبی شده است.

در گیاه مریم‌گلی بیش‌ترین میانگین قطر هاله عدم رشد (۵/۱۷ میلی‌متر) مربوط به خیساندن با حلال آب می‌باشد و با روش‌های خیساندن با هگزان (۱۵ میلی‌متر)، خیساندن با استون (۶/۱۴ میلی‌متر) و سوکسله با استون (۶/۱۴ میلی‌متر) هیچ تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (شکل ۲).



شکل ۲: اثر متقابل ماده (تفاله موم زنبورعسل، دانه‌ی زنیان، برگ مریم‌گلی و پونه) و روش عصاره‌گیری با حلال‌های مختلف (خیساندن با هگزان، آب و استون، سوکسله با هگزان و استون) بر قطر هاله عدم رشد *P. vulgaris*

Fig. 2: Interaction effect of material (beeswax waste, ajowan seed, mentha and garden sage leaves) and extraction method with various solvents (maceration with hexane, water and acetone, soxhlet with hexaneand acetone) on the inhibitory diameter of growth of *P. vulgaris*

میانگین‌های دارای حروف مشترک، دارای اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد بر اساس آزمون LSD نمی‌باشد

Column means with the same letter are not significantly different by LSD test (P≤0.01)

کم‌ترین هاله عدم رشد مربوط به روش عصاره‌گیری سوکسله با حلال هگزان (۳/۱۱ میلی‌متر) بود که نسبت به بیش‌ترین میانگین قطر هاله عدم رشد ۴۲/۳۵ درصد باعث کاهش هاله عدم رشد شده است درحالی‌که در مطالعه‌ی یوسف محمد[1] و همکاران، (2019)، عصاره مریم‌گلی که با حلال هگزان و با روش سوکسله تهیه شده بود روی باکتری‌های *Staphylococcus aureus* و *Echerichia coli* تأثیر بهتری گذاشته‌اند نسبت به عصاره اتیل استات که با روش خیساندن تهیه شده بود. که با نتایج این تحقیق متفاوت می‌باشد که می‌توان این تفاوت را به نوع باکتری‌های مورد آزمایش نسبت داد.

در استفاده از تفاله موم زنبورعسل و گیاه پونه، روش خیساندن با حلال آب و استون، تفاوت معنی‌داری باهم روی باکتری *P. vulgaris* نداشت و به‌ترتیب دارای میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۳ میلی‌متر و ۲۵/۱۲ میلی‌متر بود (شکل ۲). در کل در گیاه پونه و تفاله موم زنبورعسل روش عصاره‌گیر سوکسله با حلال‌های مختلف هگزان و استون هیچ خاصیت ضدباکتریایی نداشته و هاله‌ی عدم رشد تشکیل نداده‌اند. با توجه به نتایج

1. Yousif Mohamad

به‌دست‌آمده روش سوکسله نتوانسته باعث استخراج مواد ضدمیکروبی شود و در روش خیساندن بهترین تأثیر روی این باکتری، به‌ترتیب مربوط به عصاره‌های تهیه شده با حلال‌های نیمه قطبی استون، قطبی آب و غیرقطبی هگزان بوده است.

عصاره گیاه زنیان با روش خیساندن در آب و عصاره پونه و تفاله موم زنبورعسل با روش سوکسله و با کمک حلال‌های هگزان و استون، خاصیت ضدمیکروبی در مقابل باکتری *P. vulgaris* نداشتند. به‌عبارتی در شرایط فوق هاله عدم رشد در این باکتری تشکیل نشد (شکل ۲).

می‌توان نتیجه گرفت، باکتری‌های گرم مثبت به نسبت حساس‌تر از باکتری‌های گرم منفی در مقابل عصاره‌ها هستند که این امر ناشی از تفاوت در ساختار سلول باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت هستند، چرا که باکتری‌های گرم مثبت موکوپپتید بیش‌تری در ترکیب دیواره سلولی خود دارند این در حالی است که باکتری‌های گرم منفی فقط یک‌لایه نازک از موکوپپتید دارند بنابراین باکتری‌های گرم منفی مقاوم‌تر هستند (جعفری ثالث و همکاران، ۱۳۹۷؛ *پارخ و کاندا*[1]، 2007). در مطالعه حاضر نیز باکتری گرم مثبت *B. cereus* نسبت به باکتری گرم منفی *P. vulgaris* مقاومت کم‌تری نشان داد.

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر ماده، روش عصاره‌گیری و هم‌چنین اثر متقابل ماده در روش عصاره‌گیری بر قطر هاله عدم رشد قارچ *A. alternata* در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۲).

قارچ بیماریزای *A. alternata* کم‌ترین مقاومت را در برابر عصاره زنیان از خود نشان داد و گیاه مریم‌گلی در رتبه دوم و پونه در مرتبه سوم قرار گرفت، درحالی‌که تفاله موم زنبورعسل نتوانست هیچ تأثیری روی این قارچ بگذارد (شکل ۳).

در گیاه زنیان بیش‌ترین میانگین هاله عدم رشد مربوط به روش عصاره‌گیری سوکسله با حلال هگزان (۱۶/۳۷ میلی‌متر) بود و سپس سوکسله با استون با میانگین قطر هاله عدم رشد ۶/۳۲ میلی‌متر در جایگاه دوم قرار داشت. کم‌ترین میانگین قطر هاله عدم رشد مربوط به روش خیساندن با آب (۵۶/۲۰ میلی‌متر) گزارش شد (شکل ۳).

در گیاه مریم‌گلی روش سوکسله با حلال استون (۳/۲۲ میلی‌متر) بیش‌ترین تأثیر، روی عدم رشد قارچ *A. alternata* گذاشته است روش خیساندن با حلال هگزان (۱۵ میلی‌متر) وخیساندن با استون (۶/۱۵ میلی‌متر) هیچ تفاوت معنی‌داری با هم روی این قارچ نداشتند و روش خیساندن با آب خاصیت ضدقارچی نداشته است (شکل ۳).

عصاره آبی مریم‌گلی اثر بازدارندگی ضعیفی روی قارچ *A. solani* داشته است (قاسمی و همکاران، ۱۳۹۴).

قارچ *A. alternata* در مقابل عصاره تفاله موم زنبورعسل هیچ واکنشی نشان نداد و عصاره تفاله موم زنبورعسل مانع از رشد این قارچ نشد. بنابراین به نظر می‌رسدکه هیچ‌کدام از روش‌های عصاره‌گیری و هیچ‌یک از حلال ها نتوانسته‌اند باعث استخراج مواد ضدمیکروبی مؤثر از تفاله موم زنبورعسل شده در مقابل قارچ *A. alternata* شوند (شکل ۳).

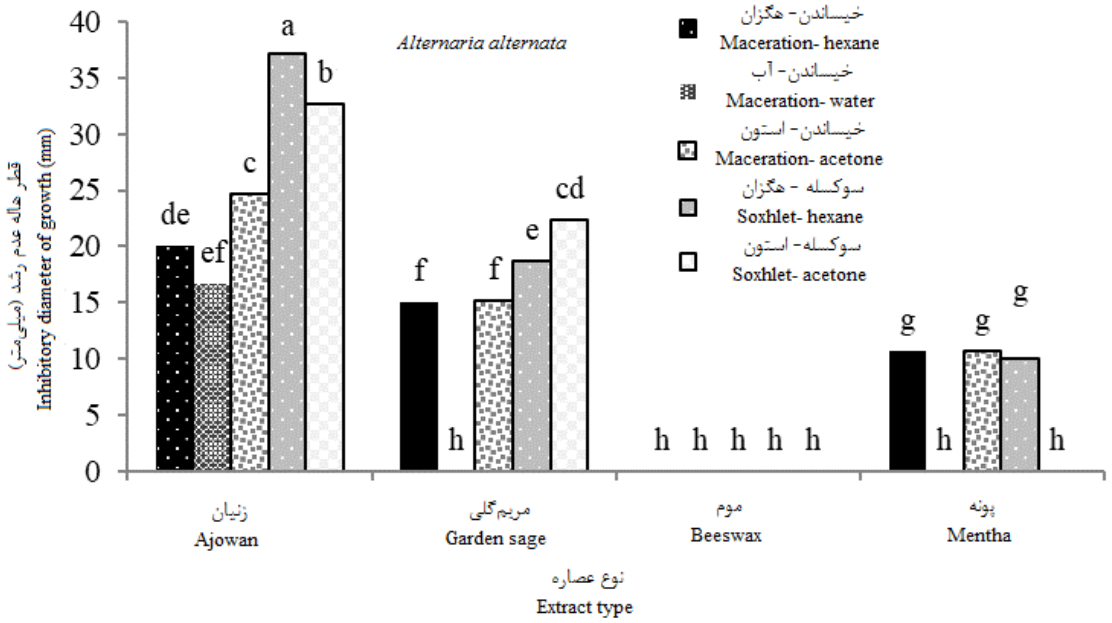
گیاه پونه تأثیر کمی روی قارچ *A. alternata* داشت، به‌طوری‌که روش خیساندن با هگزان و استون و روش سوکسله با هگزان هیچ تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند و دارای میانگین قطر هاله عدم رشد (۴/۱۰ میلی‌متر) بودند (شکل ۳).

روش عصاره‌گیری با سوکسله بیش‌ترین تأثیر را بر خاصیت ضدقارچی عصاره‌های زنیان و مریم‌گلی در مقابل قارچ *A. alternata* داشته‌اند. (شکل ۳). *واگی*[2] و همکاران، (2002) نیز طی عصاره‌گیری از گیاه مرزنگوش به سه روش سوکسله، عصاره‌گیری فوق بحرانی و تقطیر با بخار آب تفاوت‌هایی را از نظر نوع ترکیبات استخراج شده، گزارش دادند.

هم‌چنین از بررسی تأثیر همه عصاره‌های موردمطالعه بر قارچ *A. alternata* می‌توان دریافت که حلال آب کم‌ترین خاصیت ضدقارچی را ایجاد کرده است. که دلیل این را می‌توان به نوع مواد حل شده در عصاره‌ی آبی نسبت داد (شکل ۴). حلالی مانند آب که یک حلال قطبی است و عمدتاً ترکیبات قطبی را در خود حل می‌کند و محتوای ترکیبات فنلی به‌راحتی با این حلال استخراج نمی‌شود، این اصل با نتایج بشارتی و همکاران، (۱۳۹۸) مطابقت دارد که نشان دادند عصاره آبی اندام هوایی همیشه‌بهار دارای کم‌ترین میزان ترکیبان فنلی بوده است. این امر می‌تواند توجیهی قابل‌قبول برای فعالیت ضعیف ضدمیکروبی عصاره آبی گیاهان نسبت به سایر عصاره‌ها باشد که با نتایج این تحقیق نیز هم‌خوانی دارد. هگزان یک حلال کاملاً غیرقطبی است و به‌راحتی می‌تواند ترکیبات ذکر شده را پس از تماس با گیاه دارویی و نفوذ به داخل آن حل کند.

1. Parekh and Chanda

2. Vagi

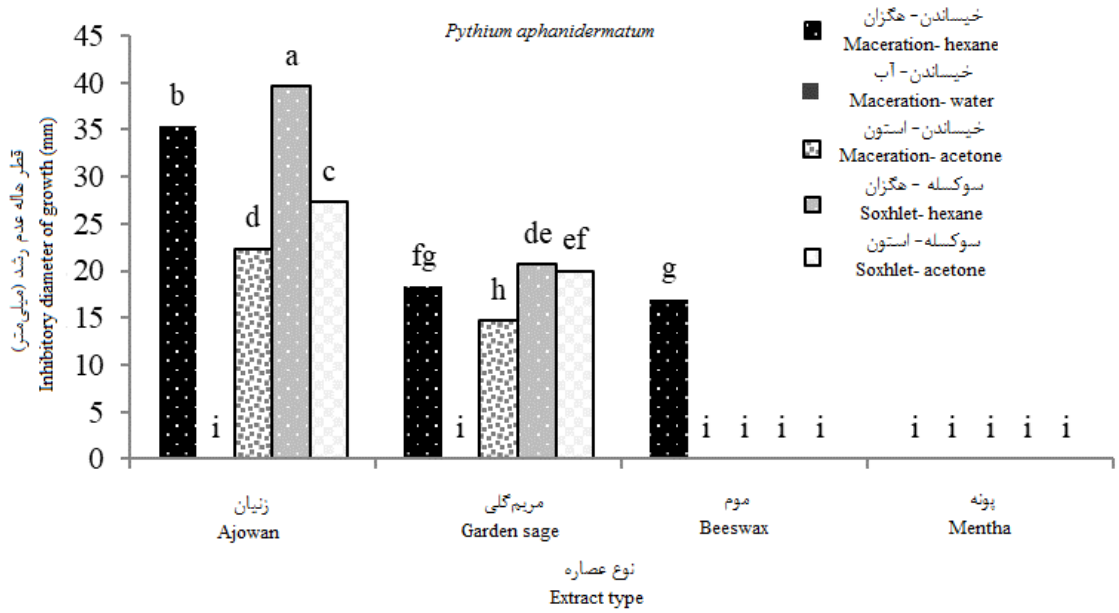


شکل ۳: اثر متقابل ماده (تفاله موم زنبورعسل، دانه‌ی زنیان، برگ مریم‌گلی و پونه) و روش عصاره‌گیری با حلال‌های مختلف (خیساندن با هگزان، آب و استون، سوکسله با هگزان و استون) بر قطر هاله عدم رشد *A. alternata*

Fig. 3: Interaction effect of material (beeswax waste, ajowan seed, mentha and garden sage leaves) and extraction method with various solvents (maceration with hexane, water and acetone, soxhlet with hexaneand acetone) on the inhibitory diameter of growth of *A. alternata*

میانگین‌های دارای حروف مشترک، دارای اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد بر اساس آزمون LSD نمی‌باشد

Column means with the same letter are not significantly different by LSD test (P≤ 0.05)



شکل ۴: اثر متقابل ماده (تفاله موم زنبورعسل، دانه‌ی زنیان، برگ مریم‌گلی و پونه) و روش عصاره گیری با حلال‌های مختلف (خیساندن با هگزان، آب و استون، سوکسله با هگزان و استون) بر قطر هاله عدم رشد *P. aphanidermatum*

Fig. 4: Interaction effect of material (beeswax waste, ajowan seed, mentha and garden sage leaves) and extraction method with various solvents (maceration with hexane, water and acetone, soxhlet with hexaneand acetone) on the inhibitory diameter of growth of *P. aphanidermatum*

میانگین‌های دارای حروف مشترک، دارای اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد بر اساس آزمون LSD نمی‌باشد

Column means with the same letter are not significantly different by LSD test (P≤ 0.01)

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر ماده، روش عصاره گیری و هم‌چنین اثر متقابل ماده در روش عصاره‌گیری بر قطر هاله عدم رشد اوومیست *P. aphanidermatum* در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بوده است (جدول ۲).

بر اساس نتایج به‌دست‌آمده از گیاه زنیان و مریم‌گلی، بهترین روش عصاره‌گیری، سوکسله با حلال هگزان گزارش شد، به‌طوری‌که میانگین هاله عدم رشد مربوط به گیاه زنیان ۶/۳۹ میلی‌متر و برای گیاه مریم‌گلی ۶/۲۰ میلی‌متر بود. این روش‌ها بهترین تأثیر را روی عدم رشد اوومیست *P. aphanidermatum* گذاشته بودند. درحالی‌که، روش خیساندن با حلال آب تأثیری روی این اوومیست نگذاشته بود (شکل ۴). در مطالعه‌ای که توسط *تپی*[1] و همکاران، (2005) انجام شده است عصاره متانولی گیاه مریم‌گلی اثر متوسط و عصاره قطبی مانند عصاره آبی اثر ضدمیکروبی ضعیفی داشته است که نشان‌دهنده‌ی این است که عصاره آبی مریم‌گلی روی رشد این اوومیست تأثیر چندانی ندارد. با توجه به تأثیر خوب گیاه زنیان، می‌توان خاصیت ضدمیکروبی زنیان را عمدتاً به تیمول موجود در آن نسبت داد در تحقیق جعفری ثالث و همکاران، ۱۳۹۷ گزارش دادند در عصاره زنیان نزدیک به ۱۶ ترکیب مؤثره وجود دارد اما تیمول اصلی‌ترین و مهم‌ترین ترکیب فنلی در این گیاه محسوب می‌شود که بیش‌تر از ۴۰ تا ۵۰ درصد عصاره را تشکیل می‌دهد. تیمول منجر به تغییر نفوذپذیری و نشت مواد داخل سلولی می‌شود (*نگالاکشمی*[2] و همکاران، 2000). هم‌چنین گروهی از محققان اعتقاد دارند که ترکیبات ضدمیکروبی موجود در عصاره‌های گیاهی با عبور از غشای سلولی و در تعامل با آنزیم‌ها و پروتئین‌های غشایی، موجب نشت پروتون به سمت بیرونی سلول شده که باعث تغییر در سلول و درنهایت مرگ آن ها می‌شود (*الرحمان*[3] و همکاران، 2011).

تنها عصاره استخراج شده از تفاله موم زنبورعسل که مانع از رشد اوومیست *P. aphanidermatum* شده بود روش خیساندن با عصاره‌گیر هگزان با میانگین قطر هاله عدم رشد (۱۷ میلی‌متر) بود و بقیه روش‌ها و حلال‌ها تأثیری روی رشد این اوومیست نداشته‌اند (شکل ۴).

با توجه به مشاهدات موجود، گیاه پونه هیچ‌گونه خاصیت ضدمیکروبی روی *P. aphanidermatum* نداشته است به‌گونه‌ای که هیچ‌کدام از روش‌های عصاره‌گیری و حلال‌های مختلف نتوانسته‌اند ماده‌ای با خاصیت ضدمیکروبی استخراج کنند (شکل ۴). اما در پژوهشی اثر ضدقارچی عصاره اتانولی پونه آبی روی قارچ‌های *F. oxysporum*، *R. solani* و *B. cinerea* بررسی و خاصیت ضدقارچی آن اثبات شد (نخعی، ۱۳۹۵).

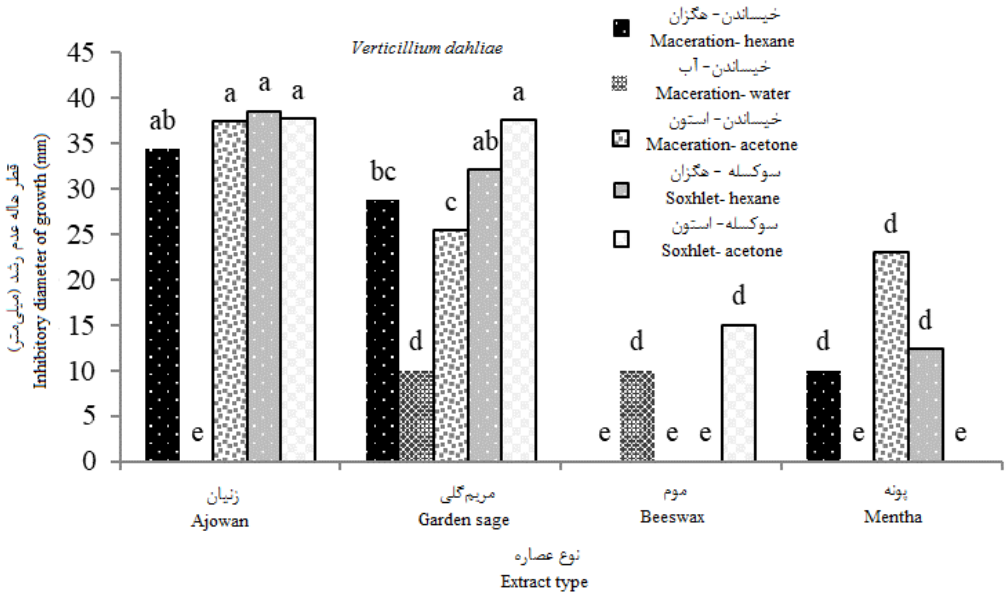
نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر ماده، روش عصاره گیری و هم‌چنین اثر متقابل ماده در روش عصاره‌گیری بر قطر هاله عدم رشد قارچ *V. dahliae* در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بوده است (جدول ۲).

گیاه زنیان زمانی که با حلال آب و با روش خیساندن عصاره‌گیری شد، هیچ‌گونه خاصیت ضدمیکروبی در مقابل قارچ *V. dahliae* از خود نشان نداد. درحالی‌که، به‌طور متوسط قطر هاله عدم رشد *V. dahliae* در روش‌های دیگر عصاره‌گیری و با حلال‌های مختلف حدود ۳۷ میلی‌متر نشان داد. به عبارت دیگر بین قدرت ضدمیکروبی این گیاه زمانی که با حلال‌های هگزان و استون و با روش‌های سوسکله و خیساندن عصاره‌گیری شد تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (شکل ۵). بنابراین، به‌نظر می‌رسد حلال قطبی آب توان استخراج متابولیت‌های ثانویه گیاه زنیان که مؤثر در کنترل قارچ موردنظر بوده‌اند را نداشته است، اما عصاره‌گیری با مواد نیمه‌قطبی (استون) و غیرقطبی (هگزان) با هر دو روش عصاره‌گیری منجر به استخراج مناسب این مواد شده و به همین دلیل عصاره حاصل از عمل عصاره‌گیری با این مواد توانست از رشد قارچ *V. dahliae* ممانعت نماید. به‌عبارت دیگر، استخراج متابولیت‌های ثانویه گیاه زنیان که در بازدارندگی رشد این قارچ نقش دارند توسط استون و هگزان نسبت به آب بهتر صورت گرفته است. با این حال این نکته قابل تأمل است که خیساندن زنیان در آب، روی برخی میکروارگانیسم‌ها اثر بازدارندگی داشته و بر برخی بدون تأثیر بوده است. این موضوع احتمالاً نشان می دهد که هر یک از عوامل میکروبی به یکی از ترکیبات موجود در زنیان حساسیت نشان داده است.

در گیاه مریم‌گلی بیش‌ترین میزان میانگین قطر هاله عدم رشد قارچ *V. dahliae* مربوط به روش سوکسله با حلال استون (۵/۳۷ میلی‌متر) بود که با روش سوکسله با هگزان (۳۲ میلی‌متر) تفاوت معنی‌داری نداشت (شکل ۵). در روش خیساندن بین حلال‌های هگزان و استون تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. میانگین قطر هاله عدم رشد ۹/۲۶ میلی‌متر بود که حدود سه برابر بیش از کم‌ترین قطر هاله عدم رشد که در روش خیساندن با آب، مشاهده شد، بود (شکل ۵). در مطالعه ای که توسط آوی (۱۳۹۵)، انجام شده است عصاره اتانولی گیاهان آویشن کرک آلود و آویشن زوفایی به روش خیساندن تهیه شده بود و دارای اثر بازدارندگی روی قارچ *V. dahliae* بوده است که درصد بالای تیمول و کارواکرول در این گیاهان

1. Tepe
2. Nagalakshmi
3. AL-Rahmah

که هم خانواده با گیاه مریم‌گلی می‌باشد باعث افزایش خاصیت ضدقارچی آن‌ها شده است.



شکل ۵: اثر متقابل ماده (تفاله موم زنبورعسل، دانه‌ی زنیان، برگ مریم‌گلی و پونه) و روش عصاره‌گیری با حلال‌های مختلف (خیساندن با هگزان، آب و استون، سوکسله با هگزان و استون) بر قطر هاله عدم رشد *V. dahliae*

Fig. 5: Interaction effect of material (beeswax waste, ajowan seed, mentha and garden sage leaves) and extraction method with various solvents (maceration with hexane, water and acetone, soxhlet with hexane and acetone on the inhibitory diameter of growth of *V. dahliae*

میانگین‌های دارای حروف مشترک، دارای اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد بر اساس آزمون LSD نمی‌باشد

Column means with the same letter are not significantly different by LSD test ($P \leq 0.01$)

تفاله موم زنبورعسل در روش خیساندن با حلال آب و در روش سوکسله با حلال استون با میانگین قطر هاله عدم رشد ۵/۱۲ میلی‌متر روی قارچ *V. dahliae* تأثیر گذاشته و در گیاه پونه روش خیساندن با حلال آب و روش سوکسله با حلال استون تأثیری روی رشد این قارچ نگذاشته است. بیش‌ترین میانگین هاله عدم رشد مربوط به روش خیساندن و با حلال استون (۳/۱۶ میلی‌متر) بود (شکل ۵).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که روش عصاره‌گیری و حلال‌های مورداستفاده، تأثیر قابل‌توجهی در استخراج میزان ترکیبات فیتوشیمیایی (فنل، فلاونوئید و تانن) داشتند. خیساندن با آب روش مناسبی برای استخراج هیچ‌یک از این ترکیبات نبود. بیش‌ترین مقدار فنل در روش سوکسله با حلال هگزان به‌دست آمد. بیش‌ترین مقدار فلاونوئید در تمام عصاره‌ها با عصاره‌گیر استون مشاهده شد. در بین عصاره‌های موردبررسی، گیاه دارویی زنیان دارای بیش‌ترین اثر ضدمیکروبی بود، به‌خصوص زمانی که عصاره آن با روش سوکسله و حلال هگزان، تهیه شد. برخی از انواع عصاره‌های تفاله موم زنبورعسل به‌عنوان یک پسماند آلی توانستند در مقابل برخی میکروارگانیسم‌ها خاصیت ضد میکروبی نشان دهند. تأثیر بازدارندگی این ماده روی باکتری‌های *B. cereus* و *P. vulgaris* و اوومیست *P. aphanydermatum* و قارچ *V. dahliae* قابل‌توجه بود، ولی قارچ‌های *A. alternate* و *F. oxysporum* نسبت به این ماده حساس نبودند.

منابع

احمدی، ر. و عبداللهی، ا. ۱۳۹۱. بررسی اثر عصاره گیاه مریم‌گلی بر سطح سرمی آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز و کراتین کیناز در موش های صحرایی نر. مجله علوم پزشکی رازی ۱۹ (۹۶): ۲۰-۲۵.

اسمعیل‌زاده بهابادی، ص و یوسف زائی، ف. ۱۳۹۷. تأثیر حلال‌های مختلف بر استخراج ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه هندوانه ابوجهل. علوم و صنایع غذایی، ۷۴ (۱۵): ۳۱۳-۳۲۰.

آوی، ب. ۱۳۹۵. بررسی فعالیت ضدقارچی عصاره چند گیاه دارویی بر قارچ *Verticillium dahliae* عامل بیماری پژمردگی ورتیسیلیومی زیتون. پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد در رشته‌ی علوم باغبانی (فیزیولوژی و اصلاح گیاهان دارویی، ادویه‌ای و نوشابه‌ای). دانشگاه ایلام. ۱۰۳ صفحه.

بشارتی، ن.، بی‌مکر، م. و گنجلو، ع. ۱۳۹۸. تأثیر نوع حلال و شرایط استخراج بر عملکرد استخراج، محتوای ترکیبات فنولی کل و فعالیت ضداکسایشی عصاره حاوی ترکیبات زیست فعال از اندام هوایی گیاه همیشه‌بهار (*Calendula officinalis* L.). علوم و صنایع غذایی، ۹۲ (۱۶): ۱۱-۲۱.

پورقاسمیان، ن. و مرادی، ر. ۱۳۹۷. بررسی پتانسیل استفاده از تفاله موم زنبورعسل به‌عنوان بستر کاشت گاوزبان اروپایی در رژیم‌های مختلف آبیاری. فرآیند و کارکرد گیاهی، ۷ (۲۳): ۴۹-۶۵.

پورقاسمیان، ن. و نوربخش، ف. ۱۳۹۴. اثر تفاله موم زنبورعسل بر سینتیک معدنی شدن کربن. چهارمین کنگره علوم خاک ایران. دانشگاه ولی‌عصر رفسنجان.

جعفری ثالث، ا.، رائی بناب، ف. و سیاحی، ج. ۱۳۹۷. بررسی اثرات باکتریال عصاره متانولی گیاه زنیان بر روی باکتری‌های پاتوژن استافیلوکوکوس اورئوس، *Bacillus cereus*، اشرشیاکلی و سودوموناس آئروژینوزا در شرایط آزمایشگاهی برون تنی. مجله علوم پیراپزشکی و بهداشت نظامی، ۴: ۱۹-۲۵.

حقیرالسادات، ب.، وحیدی، ع.، عظیم‌زاده، م.، کلانتر، م.، برنارد، ف. و حکم اللهی، ف. ۱۳۹۱. بررسی ترکیب‌های مؤثره و خواص آنتی‌اکسیدانی اسانس گیاه دارویی زنیان استان یزد. مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، ۱۱: ۱۹۷-۲۰۶.

داوری‌نژاد، غ.، تقی‌زاده، ف. و اصیلی، ج. ۱۳۹۶. تأثیر حلال‌های مختلف بر میزان ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی میوه عناب. نشریه علوم باغبانی، ۳۱: ۱۵۸-۱۸۸.

عبدالملکی، م.، بهرامی نژاد، ص.، سالاری، م.، عباسی، س. و پنجه‌که، ن. ۱۳۹۰. بررسی اثر ضدقارچی گیاه نعناع فلفلی بر قارچ‌های بیماری‌زا گیاهی. فصلنامه گیاهان دارویی، ۱: ۱-۳۴.

عزیزی، ا. و خسروی، ک. ۱۳۹۷. بررسی فیتوشیمیایی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس مریم‌گلی ارغوانی بومی ایران و کاربرد آن در پایداری اکسایشی روغن آفتابگردان. مجله دانشکده علوم پزشکی نیشابور ۶ (۴): ۴۶-۶۱.

فروغی، م.، محمدی، ص. و قاسمی، ع. ۱۳۹۱. اثر ضدقارچی پنج عصاره گیاهی بر قارچ بیماری‌زای *Rizoctonia solani*. مجله دنیای میکروب‌ها، ۵: ۱۱۵-۱۲۱.

قاسمی، س.، خان‌احمدی، م. و عباسی، س. ۱۳۹۴. اثر ضدقارچی عصاره خام ۲۷ گونه گیاهان دارویی علیه عامل لکه‌موجی گوجه فرنگی. نشریه حفاظت گیاهان، ۲۹ (۳): ۳۰۴-۳۰۹.

مزارعی، ا و فهمیده، ل. ۱۳۹۷. ارزیابی مقایسه‌ای میزان فنول و فلاونوئید کل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی عصاره متانولی گیاهان *Artemisia annua*، *Thymus vulgaris*، *Matricaria chamomilla*، *Salvia officinalis* و *Pistacia atlantica* var *mutica*. فصلنامه اکوفیتوشیمی گیاهان دارویی، شماره ۲۳ (۳): ۷۸-۹۶.

مشیری روشن، آ.، ساری، ع. و آقاجانی، ن. ۱۳۹۷. بهینه‌سازی شرایط استخراج عصاره استونی دانه زنیان (Ajowan seed) و تأثیر آن بر پایدارسازی روغن سویای خام. فصلنامه فناوری‌های نوین غذایی، ۵ (۳): ۴۶۹-۴۸۳.

مصلح آرانی، ا.، نعمتی، ن.، زندی، ه.، نادری، م. ۱۳۹۸. اثر ضدمیکروبی عصاره آبی سه گونه مریم‌گلی بر باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیا کولی و *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* آئروجینوزا. یافته‌های نوین در علوم زیستی، ۶ (۴): ۴۴۶-۴۵۳.

منصوری جاجایی، ش. و جباری، ل. ۱۳۸۸. تحلیلی بر وضعیت و جایگاه ترکیبات با منشأ گیاهی به‌عنوان جایگزینی مناسب برای حشره‌کش‌های شیمیایی جهت کنترل آفات کشاورزی، همایش ملی نیم‌قرن مصرف آفت‌کش‌ها در ایران: ۴۰۳-۴۲۹.

میرزائی، ع.، محمدی، ج.، میرزائی، ن.، میرزائی، م.، ۱۳۹۰ ارزیابی خواص آنتی‌اکسیدانی و فنل تام عصاره هیدروالکلی خاکشی، بارهنگ، زنیان، گشنیز و شنبلیله. مجله دانشگاه علوم پزشکی فسا، ۱ (۳): ۴۸-۵۷.

نبی پور، ف و دوستی، ب، ۱۳۹۷. بررسی مقایسه اثرات ضدقارچی عصاره‌های مختلف گیاه *Onosma chlorotricum* بر قارچ‌های کاندیدا آلبیکنس و کاندیدا گلابراتا با دو آنتی‌بیوتیک فلوکونازول و نیستاتین. فصلنامه علمی-پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی لرستان، دوره ۲۰ (۱): ۱۲-۲۲.

نخعی، ف. ۱۳۹۵. بازدارندگی اسانس و عصاره اتانولی پونه آبی بر چند گونه قارچ بیماری‌زای گیاهی در شرایط آزمایشگاهی. دوفصلنامه تحقیقاتی بیماری‌های گیاهی، ۴ (۱): ۳۱-۴۲.

نطنزیان قهفرخی، م.، ستاری، م.، یادگاری، م. ح.، گودرزی، غ. ر. و سحرخیز، م. ج. ۱۳۸۷. آثار ضدقارچی اسانس و عصاره الکی زنیان علیه ایزوله‌های بالینی مقاوم و حساس به فلوکونازول *کاندیدا آلبیکنس* در شرایط آزمایشگاهی. مجله علوم پزشکی مدرس، ۱۱ (۱): ۹۱-۹۷.

نوروزی، ع.، بی‌مکر، م. و گنجلو، ع. ۱۳۹۷. بررسی اثر حلال‌های مختلف بر راندمان استخراج و فعالیت ضداکسایشی عصاره برگ گیاه زولنگ. علوم و صنایع غذایی، ۸۳: ۳۷۹-۳۸۶.

Ali, M. S., Saleem, M., Ahmad, W., Parvez, M. and Yamdagni, R., 2002. A chlorinated monoterpene ketone, acylated â-sitosterol glycosides and a flavanone glycoside from *Mentha longifolia* (Lamiaceae). Phytochemistry, 59: 889-895.

Bahraminejad, S., Amiri, R., Ghasemi, S. and Fathi, N. 2013. Inhibitory effect of some Iranian plant species against three plant pathogenic fungi. International Journal of Agriculture and Crop Sciences, 9 (5): 1002-1008.

Bouyahya, A., Dakka, N., Tahbaoui, A., El Moussaoui, N., Abrini, J., Bakri, Y. 2018. Phenolic contents and antiradical capacity of vegetable oil from *Pistacia lentiscus* (L). Journal of Materials and Environmental Sciences, 9 (5): 1518-1524.

Cowan Marjorie, M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews; 4: 567-582.

Djeridance, A. Yousef, M. Nadjemi, B. Boutassouna, D. Stocker, P. Vidal, N. 2006. Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. Food chemistry 97: 654-660.

Ghesemi, A. 2010. Medicinal and Aromatic Plants. 2ed. Islamic Azad University Publisher, 2-10.

Gohorbani, M., Ganjloo, A. and Bimakr, M. 2017. Evaluation the effect of different solvents on total phenolic content and antioxidant activity of pea (*Pisum sativum* L.) pod Extract. Journal of Food Science and Technology, 64 (14): 83-92.

Handa, S. S., Singh Khanuja, S. P., Longo, G. and Rakesh, D. D. 2008. Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. International Centre for Science and High Technology, Trieste, Italy. 440 pp.

Hassan W, Gul S, Rehman S, Noreen h, Shah Z, Mohammadzai I, Zaman B. 2016. Chemical composition, Essential oil Characterization and Antimicrobial Activity of *Carum copticum*. Vitamins and Minerals 5 (2).

Khorasani Esmaeili A, Taha RM, Mohajer S, Banisalam, B. 2015. Antioxidant activity and total phenolic and flavonoid content of various solvent extracts from in vivo and in vitro grown *Trifolium pratense* L. (Red Clover). BioMed Research International. 1-11.

Kim, J., Marshall, M. R. and Wei, C-I. 1995. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43: 2839-2845.

Koliopoulos, G., Pitarokili, D., Kioulos, E., Michaelakis, A. and Tzakou, O., 2010. Chemical composition and larvicidal evaluation of *Mentha salvia*, and Melissa essential oils against the West Nile virus mosquito Culex pipiens. Parasitology Research, 107: 327-335.

Kumar, S., Kumar, D., Jusha, M., Saroha, K., Singh, N. and Vashishta, B. 2008. Antioxidant and free radical scavenging potential of *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad. Methanolic fruit extract. Acta Pharmaceutica, 58 (2): 215-220.

Moradi, R., Pourghasemian, N. and Naghizadeh, M. 2019. Effect of beeswax waste biochar on growth, physiology and cadmium uptake in saffron. Journal of Cleaner Production, 229: 1251-1261.

Nagalakshmi, S., Shankarachary, N. B., Naik, J. P. and Rao, L. J. M. 2000. Studies on chemical and technological aspects of ajowan (*Trachyspermum ammi* (L) Syn. *Carum copticum* Hiern) seeds. Journal of Food Science Technology, 37: 277-281.

Omidbeygi, M., Barzegar, M., Hamidi, Z. and Naghdibadi, H. 2007. Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against Aspergillus flavus in liquid medium and tomato paste. Food Control, 18: 1518-1523.

Parekh, J. and Chanda, S. 2007. Antibacterial and phytochemical studies on twelve species of Indian medicinal plants. African Journal of Biomedical Research, 10: 175-181.

Pokorny, J., Yanishlieva, N. and Gordon, M. H. 2001. Antioxidants in Food: Practical Applications: CRC press. 540 pp.

Pop, A., Tofana, M., Socaci, S., Pop, C., Rotar, M., Nagy, M. and Salanta, L. 2016. Determination of antioxidant capacity and antimicrobial activity of selected Salvia Species. Bulletin UASVM food Science and Technology, 73 (1): 14-18.

Rebaya, A., Igueld Blghith, S., Baghdikian, B., Mahiou Leddet, V., Mabrouki, F., Olivier, E., Cherif, J. and Trabelsi Ayadi, M. 2014. Total phenolic, total flavonoid, tannin content, and antioxidant capacity of *Halimium halimifolium.* Journal of Applied Pharmaceutical Science, 5 (1): 052-057.

Tepe, B. 2005. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). Food Chemistry, 90 (3): 333-340.

Vagi, E., Simándi, B., Daood, H., Deak, A. and Sawinsky, J. 2002. Recovery of pigments from *Origanum majorana* L. by extraction with supercritical carbon dioxide. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50 (8): 2297-2301.

Wanasandara, P. K. J. P. D. and Shahidi, F. 2005. Antioxidant: Science, Technology and application. In: Bailey's Industrial Oil and Fat Products. Ed. F. Shahidi, 6th Edn. A Wiley-Interscience Publication, John Wiley and Sons, New York, USA: 436-447.

Yousif Mohamad, A. and Mustafa, A. 2019. In vitro anti-microbial activity of essentisl oils and other extracts from *Salvia officinalis* against some Bacteria. Preprints, 11: 1-9.

Zarshenas, M., Moien, M., Mohammadi Samani, S. and Petramfar, P. 2014. An overview on Ajwain (*Trachyspermum ammi*) Pharmacological effects; Modern and traditional. Journal of Natural Remedies, 14 (1): 98-105.

In Vitro Effect of Various Extracting Methods with Water, Acetone and Hexane Solvents, on some Phytochemical and Antimicrobial Properties of Ajowan, Mentha, Garden Sage and Beeswax Waste

Asadi[1], E., Pourghasemian[2*], N., Shahidi Bonjar[3], Gh. and Bagheri[4], M.

Abstract

The aim of this study was to investigate effect of various extracting methods with water, acetone and hexane solvents, on some phytochemical and antimicrobial properties of ajowan, mentha, garden sage and beeswax waste. In the antimicrobial study, for each microorganism a separated experiment was conducted in factorial arrangement based on completely randomized design with three replications. The studied microorganisms were included *Bacillus cereus, Proteus vulgaris, Fusarium oxysporum, Alternaria alternata, Pythium aphanidermatum and Verticillium dahlia*. Experimental treatments were material types in four levels (beeswax, ajowan seed, mentha and garden sage leaves) and different extracting methods with different solvents in five levels (Maceration method at room temperature with hexane, distilled water and acetone, and soxhlet with hexane and acetone). Maceration with water was included the lowest levels of phenol and flavonoid in all the materials, and was not able to extract any tannin. Maceration with acetone in beeswax waste and soxhlet with acetone in other materials were the effective methods for extracting phenol and flavonoid. Acetone solvent in menthe and garden sage extract had more tannin, while beeswax waste and ajowan responded better to hexane solvent. The microbial result showed that the studied materials and extracting methods had no inhibitory effect on *Fusarium oxysporum*. The highest inhibitory diameter of growth for other studied microorganisms was assigned to hexane extract of ajowan with soxhlet method. The various extracts of beeswax had inhibitory effect on all the mentioned microorganisms except for *Alternaria alternata*, confirming the antimicrobial property of the waste. In general, the results of this study illustrated that the studied organic extracts had acceptable potential in controlling these pathogens, and the difference in the type of solvent polarity and the extraction method had a significant effect on the extracted componets and consequently antimicrobial characteristics of the extracts.

Keywords: Soxhlet, Antifungal, Antibacterial, Inhibitory diameter of growth, Extract

1 and 2. MSc Student and Associate Professor, Respectively, Department of Plant Productions, Faculty of Agricultural Bardsir, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

3. Professor, Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

4. Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agricultural Bardsir, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

⁎: Corresponding author Email: n.pourghasemian@uk.ac.ir

This paper has been extracted from the first author's MSc thesis under the guidance of Nasibeh Pourghasemian.