مجله تحقیقات مهندسی کشاورزی/جلد ۱۶/ شماره ۳/سال ۱۳۹۴/ص ۷۸-۶۷

اثر اسانس و عصاره‌های گزنه و نعنا فلفلی در جلوگیری از رشد قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* و تولید آفلاتوکسین B1

اکبر گران*، بنت الهدی صالح‌نیا، حمیدرضا علیزاده، عظیم میرزایی و محسن فرزانه**

* نگارنده مسئول: کرج، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، گروه علوم دامی، ص. پ ۴۱۱۱، تلفن: ۳۲۲۴۸۰۸۲(۰۲۶)، پیام‌نگار: a_gorran2003@yahoo.com

** به ترتیب: دانش‌آموخته دکتری گروه علوم دامی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران؛ کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی؛ استادیار گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه جیرفت؛ دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم دامی دانشگاه تربیت مدرس؛ و استادیار گروه کشاورزی پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۲/۱۳؛ تاریخ پذیرش: ۹۴/۵/۳۱

چکیده

استفاده از اسانس و عصاره‌های گیاهان دارویی به دلیل داشتن خواص دارویی، ضد قارچی، ضد باکتریایی و آنتی‌اکسیدانی در صنایع دارویی، غذایی و خوراک دام رو به پیشرفت است. به منظور ارزیابی اثر دو گیاه دارویی گزنه و نعنا فلفلی در جلوگیری از رشد میسلیومی و کاهش آفلاتوکسین قارچ *Aspergillus flavus* این پژوهش اجرا شد. تأثیر اسانس با غلظت‌های ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر و عصاره‌های آبی، اتانولی و اتانولی ۷۰ درصد (با غلظت ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۴۰۰۰ و ۶۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر) بر کاهش رشد قارچ *A. flavus* و آفلاتوکسین به روش اختلاط با محیط کشت مایع بررسی شد. میزان آفلاتوکسین با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک با کارایی بالا ارزیابی شد. به کارگیری اسانس نعنا و گزنه در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر به ترتیب ۷۹/۴۰ و ۵۳/۳۰ درصد کاهش در وزن خشک قارچ و ۸۸/۲۵ و ۵۷/۳ درصد کاهش در میزان آفلاتوکسین تولیدی را به دنبال داشت. عصاره‌های گیاه نعنا فلفلی در کاهش رشد میسلیومی قارچ و آفلاتوکسین کارآمدتر از عصاره‌های گزنه بودند و بیشترین کاهش وزن خشک قارچ (۹۵/۲۵ درصد) و آفلاتوکسین تولیدی (۸۹/۵۸ درصد) در غلظت ۶۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر عصارهٔ اتانولی نعنا فلفلی دیده شد. از سوی دیگر مشخص شد که اسانس و عصاره‌های اتانولی و اتانولی ۷۰ درصد هر دو گیاه، قادر به تجزیهٔ قابل توجه آفلاتوکسین B1 محیط نیستند در حالی‌که عصاره‌های آبی گزنه و نعنا فلفلی در غلظت ۴۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر به ترتیب ۸۷/۱۵ و ۵۶/۱ درصد آفلاتوکسین B1 را کاهش دادند. بنابراین اسانس و عصاره‌های نعنا فلفلی در مقایسه با اسانس و عصاره‌های گزنه در کاهش رشد میسلیومی قارچ و آفلاتوکسین تولیدی کارآمدتر هستند. در این تحقیق عصارهٔ آبی گزنه فعالیت تجزیه‌کنندگی قوی آفلاتوکسین B1 را نشان داد که می‌تواند کاندیدایی امیدبخش برای کاهش آفلاتوکسین معرفی شود.

واژه‌های کلیدی

***آسپرژیلوس فلاووس*، آفلاتوکسین، گزنه، نعنا فلفلی**

مقدمه

آفلاتوکسین‌ها ترکیباتی سمی از دسته مایکوتوکسین‌ها هستند که سویه‌های توکسین‌زای آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس آنها را روی محصولات کشاورزی و مواد غذایی تولید می‌کنند (Sweeny & Dobson, 1998). این سموم ممکن است سبب بروز سمیت حاد و مزمن، سمیت عصبی، تاثیرات سرکوب کنندهٔ سیستم ایمنی، ناقص الخلقه زایی،

Archive of SID
www.SID.ir

جهش‌زایی و سرطان‌زایی شوند (Razzaghi-Abyaneh *et al*., 2008). بنابراین، آلودگی محصولات به آفلاتوکسین، مشکل جهانی ویران کننده اقتصاد کشاورزی و صنایع غذایی و دامی است.

آلودگی برخی محصولات کشاورزی، غذایی و خوراک دام به آفلاتوکسین معمولا اجتناب‌ناپذیر است، از این رو چندین استراتژی سم‌زدایی و غیرفعال کردن سم شامل روش‌های فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی برای پیشگیری از بروز مسمومیت با آفلاتوکسین در حیوانات و انسان پیشنهاد شده است (Park, 1993). اما محدودیت‌های پاکسازی فیزیکی و شیمیایی از قبیل کاهش کیفیت و خواص تغذیه‌ای محصول، تاثیرات نامطلوب روی سلامت انسان و محیط زیست و گرانی تجهیزات مورد نیاز موجب شده است که به سمت روش‌های بیولوژیکی سوق داده شود (Phillips, 1994) از بین روش‌های بیولوژیک، علاقه زیادی پیدا شده است تا از ترکیبات بیولوژیکی فعال طبیعی که از گیاهان مشتق می‌شوند استفاده شود به طوری که در سال‌های اخیر برخی تحقیقات روی کاربرد گیاهان دارویی به ویژه اسانس و عصارهٔ این گیاهان جهت جلوگیری از رشد قارچ‌ها و ممانعت از تولید توکسین متمرکز شده است (Basilico & Basilico, 1999., Jayashree & Subramanyam, 1999; Sa´nchez *et al*., 2005). در کاهش آلودگی آفلاتوکسین B1 و مهار رشد A. flavus، توانایی تعداد معدودی از گونه‌های گیاهی شناخته شده است (Rasooli & Abyaneh, 2004; Atanda *et al*., 2007; Omidbeygi *et al*., 2007; Bluma *et al*., 2008; Marija & Nevena, 2009; Reddy *et al*., 2009). اما هنوز قابلیت اسانس و عصارهٔ گیاهان بسیاری مطالعه نشده است (Sufferdini *et al*., 2004). بنابراین، دستیابی به منابع جدید زیستی، ارزان، کارآمد، دوستدار محیط زیست و با خاصیت دارویی به عنوان کاندیدهای بالقوه برای کاهش آفلاتوکسین در محصولات کشاورزی، مواد غذایی و خوراک دام از مهمترین اهداف خواهد بود که شامل ۱- بررسی پتانسیل قارچکشی اسانس و عصاره‌های مختلف گونه‌های دارویی گزنه و نعنا فلفلی، ۲- دستیابی به قسمت موثر دو گونه دارویی فوق در تجزیه و سم‌زدایی آفلاتوکسین B1 در محیط است.

مواد و روش‌ها

تهیهٔ قارچ توکسین‌زا *A. flavus* و استاندارد آفلاتوکسین

جدایه *A. flavus* R5 که توکسین‌زایی آن قبلا ثابت شده است (Alibakhshi, 2009) از کلکسیون قارچ‌شناسی گروه گیاهپزشکی دانشگاه تهران تهیه شد. سوسپانسیون اسپور قارچ با آب مقطر سترون دارای توئین ۸۰ تهیه و تراکم اسپور در هر میلی‌لیتر به کمک لام هماسیتومتر محاسبه شد. استاندارد آفلاتوکسین B1 (AFB1, ACROS ORGANICS, USA) در غلظت‌های ۱۰۰، ۵۰ و ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد.

تهیهٔ مواد گیاهی، استخراج اسانس و عصاره‌ها

مواد گیاهی گونه‌های مورد آزمایش شامل پیکر رویشی نعنا فلفلی و گزنه از مزرعه پژوهشکده گیاهان و مواد اولیهٔ دارویی دانشگاه شهید بهشتی واقع در تهران، ولنجک، تهیه گردید. هر یک از نمونه‌ها در آسیاب خرد شد و اسانس آنها به روش تقطیر با آب و به کمک دستگاه کلونجر به مدت ۳ ساعت استخراج شد. اسانس به دست آمده با سولفات سدیم خشک، آبگیری و تا زمان آنالیز و آزمون‌های بیولوژیک در شیشه‌های تیره در دمای ۴ درجه سلسیوس درون یخچال نگهداری شد.

برای تهیهٔ عصاره اتانولی، از هر گیاه، ۴۰ گرم از اندام هوایی خشک شده در ۲۰۰ میلی‌لیتر اتانول برای ۶ ساعت خیسانده و پس از آن با کمک دستگاه سوکسله (Soxhlet) عصاره‌گیری شد. برای تهیهٔ عصارهٔ اتانولی- آبی (۷۰ -۳۰)

Archive of SID

www.SID.ir

و عصاره آبی، هر نمونهٔ گیاهی در ۲۰۰ میلی‌لیتر حلال در دمای ۳۵ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت روی شیکر قرار گرفت. عصاره‌های آبی و اتانولی- آبی از فیلترهای کاغذی ۰/۴۵ میکرون به کمک پمپ خلا عبور داده شدند. حلال باقیمانده هر عصاره با دستگاه روتاری در دمای ۴۵ درجه سلسیوس یا به کمک دستگاه فریزدارید به مدت ۲۴ ساعت برطرف و سرانجام ماده خشک حاصل در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد.

بررسی فعالیت ضد قارچی اسانس و عصاره‌ها

برای بررسی فعالیت ضد قارچی اسانس و عصاره‌ها از روش اختلاط با محیط کشت مایع[1] (PDB) استفاده شد. ابتدا غلظت‌های ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم اسانس در لیتر محیط کشت و غلظت‌های ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۴۰۰۰ و ۶۰۰۰ میلی‌گرم عصاره در لیتر محیط کشت در فلاسک‌های ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت مایع تهیه و بلافاصله ۵×۱۰^{۴} اسپور قارچ افزوده شد. پس از نگهداری به مدت ۵ روز روی شیکر انکوباتور در دمای ۲۸ درجه سلسیوس، توده‌های میسلیومی به کمک پارچه ململ دولا از محیط کشت جدا و در آون در دمای ۷۰ درجه سلسیوس خشک شدند. در نهایت وزن خشک میسیلیوم محاسبه شد (Teniola *et al*., 2005).

بررسی بازدارندگی اسانس و عصاره‌ها از تولید آفلاتوکسین توسط قارچ *A. falavus*

جهت تعیین تاثیر اسانس و عصاره‌های دو گیاه دارویی گزنه و نعنا فلفلی بر میزان تولید آفلاتوکسین توسط قارچ، غلظت‌های مشخص اسانس‌ها (۱۰۰۰ - ۶۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر) و عصاره‌های مختلف (۶۰۰۰- ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) به ارلن مایرهای ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط PDB، افزوده و بلافاصله با ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون اسپور (با غلظت $۱۰^{۵}$ اسپور در میلی‌لیتر) مایه‌زنی شد. ارلن‌های حاصل به مدت پنج روز روی شیکر انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سلسیوس و سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه نگهداری شد. در نهایت وزن خشک میسلیوم محاسبه و میزان آفلاتوکسین B1 موجود استخراج و تعیین گردید (Teniola *et al*., 2005). درصد بازدارندگی رشد قارچ و آفلاتوکسین B1 با استفاده از فرمول، درصد بازدارندگی= ((گروه کنترل- تیمار/ گروه کنترل) ×۱۰۰) محاسبه شد (Deabes *et al*., 2011).

بررسی میزان تجزیه شدن آفلاتوکسین براثر اسانس و عصاره‌ها

دو میکروگرم بر میلی‌لیتر از آفلاتوکسین B1 به ویال‌های[2] ۱/۸ میلی‌لیتری حاوی غلظت‌های مختلف اسانس و عصاره در حلال DMSO، افزوده شد. ویال‌ها روی شیکر انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سلسیوس و سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه در شرایط تاریکی نگهداری شدند. پس از ۲۴ ساعت، مقدار آفلاتوکسین موجود ارزیابی شد.

استخراج و ردیابی آفلاتوکسین

برای استخراج آفلاتوکسین B1 از میسلیوم، وزن مشخصی از میسلیوم خشک با نیتروژن مایع منجمد و در هاون پودر شد. مقدار آفلاتوکسین پودر حاصل در حضور کلروفرم با استفاده از قیف دکانتور و سه مرتبه استخراج گردید. آفلاتوکسین موجود در محیط کشت مایع نیز سه مرتبه و طبق روش تنیولا و همکاران (Teniola *et al*., 2005) با استفاده از حلال کلروفرم استخراج و پس از آن کلروفرم در دمای ۶۰ درجه سلسیوس با استفاده از حمام آبی تحت خلا تبخیر شد. نمونه‌های حاصل حداکثر به مدت دو هفته تا آغاز آنالیز کروماتوگرافی در یخچال با دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند. کروماتوگرافی و اندازه‌گیری آفلاتوکسین با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی لایه نازک با کارایی بالا[3] (HPTLC) انجام شد. ابتدا هر نمونه به کمک دستگاه

1- Potato Dextrose Broth (PDB)
2- Cryovial Cap Tubes
3- High Performance Tin Layer Chromatography (HPTLC)

Archive of SID
www.SID.ir

تولید کنندهٔ امواج ماورای صوت[1] در یک میلی‌لیتر کلروفرم کاملاً حل شد. نمونه‌ها روی صفحهٔ سلیکاژلی[2] بـه فاصـلهٔ مناسب لکه‌گذاری شـدند. صـفحات لکـه‌گـذاری شـده در حلال کلروفرم - استون (به نسبت ۹ به ۱) قرار داده شدند و جداسازی آفلاتوکسین صورت گرفت. پس از جداسـازی، صفحات مذکور درون قسمت آنالیز دستگاه HPTLC قـرار داده شد و با استفاده از نرم‌افـزار (CAMAG VideoScan TLC/HPTLC Evalution Software V. 1.01)، به صورت کمی و کیفی در طول موج ۳۶۵ نانومتر ارزیـابی شدند.

تجزیه و تحلیل آماری

تمام آزمایش‌ها به صورت طرح کاملاً تصـادفی و بـا ۴ تکرار اجرا شدند. برای تجزیه داده‌ها از نرم‌افـزار SAS 9.1 و به روش GLM استفاده شـد. پـس از تجزیـه واریـانس، میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک درصد یا ۵ درصد مقایسه شدند.

نتایج و بحث

بررسی اثر اسانس و عصاره‌ها در بازدارندگی از رشـد قارچ *A. falavus* و تولید آفلاتوکسین

تأثیر اسانس دو گیاه دارویی گزنه و نعنا فلفلی بر رشد قارچ *A. falavus* (جدول ۱) نشان می‌دهد که بین سـطوح مختلـف اسـانس دو گیـاه تفـاوت معنـی‌داری وجـود دارد. به طور کلی با افزایش غلظت اسـانس، فعالیـت ضـدقارچی افزایش می‌یابد. نتایج همچنین نشان می‌دهد کـه اسـانس نعنا فلفلی در مقایسه با اسـانس گزنـه قـدرت بازدارنـدگی بیشتری دارد. حداقل غلظـت بازدارنـدگی کامـل از رشـد قـارچ بـرای اسـانس‌هـای گزنـه و نعنـا فلفلـی بـیش از ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر ارزیابی شد. اسانس‌هـای گزنـه و نعنا در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر بـه ترتیـب باعـث کـاهش ۵۷/۳ و ۸۸/۲۵ درصـد از میـزان آفلاتوکسـین تولیدی شدند که نشان از فعالیت بالای اسانس نعنا فلفلـی در جلوگیری از تولید آفلاتوکسین است.

جدول ۱- تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس نعنا فلفلی و گزنه در جلوگیری از رشد قارچ و کاهش آفلاتوکسین *A. flavus* پس از پنج روز نگهداری در دمای ۲۸ درجه سلسیوس در تاریکی

اسانس	غلظت (میلی‌گرم در لیتر)	درصد بازدارندگی	
		رشد قارچ *A. flavus*	تولید آفلاتوکسین
نعنا فلفلی	۶۲/۵	۲/۱۰ed±۱/۵۷	۱۰/۴۵e±۱/۰۷
	۱۲۵	۲۸/۴۹c±۱/۴۶	۳۲/۷d±۱/۱۳
	۲۵۰	۴۶/۹۳bc±۱/۸۰	۴۹/۸c±۱/۱۲
	۵۰۰	۵۸/۳۳b±۱/۸۲	۶۹/۷b±۱/۳۹
	۱۰۰۰	۷۹/۴۰a±۱/۷۸	۸۸/۲۵a±۰/۹۹
گزنه	۶۲/۵	۰/۹۹e±۰/۸۷	۵/۹e±۰/۹۲
	۱۲۵	۱۴/۱۷d±۱/۲۸	۱۲/۲e±۱/۰۴
	۲۵۰	۲۵/۲۳cd±۱/۵۰	۲۹/۸d±۰/۸۸
	۵۰۰	۳۴/۱۴c±۱/۸۳	۴۶/۷c±۱/۱۰
	۱۰۰۰	۵۳/۳۰bc±۲/۱۲	۵۷/۳g±۰/۹۱

در هر ستون میانگین‌های دارای حروف مشترک بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

1- Power Sonic

2- TLC Silica Gel 60 F254, Merck, Darmstadt, Germany

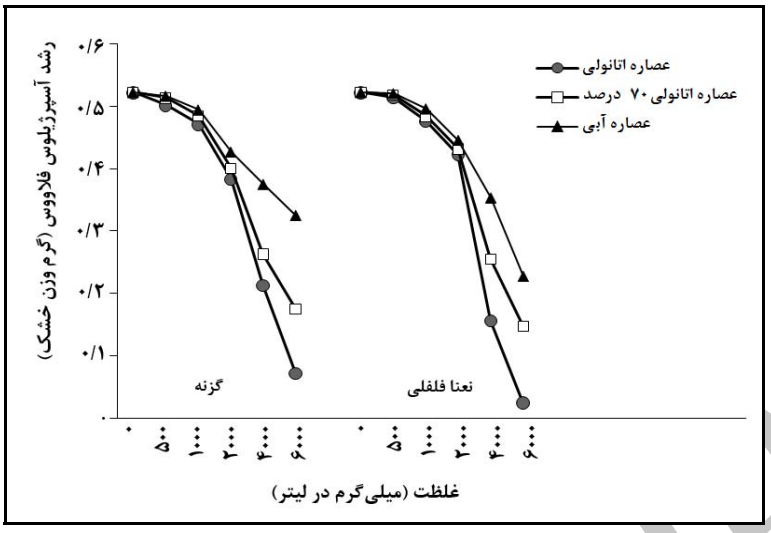
Archive of SID
www.SID.ir

بر اساس شکل‌های ۱ و ۲، عصاره‌های اتانولی و اتانولی- آبی نعنا فلفلی تأثیر چشم‌گیری در بازدارندگی از رشد قارچ و کاهش آفلاتوکسین نشان می‌دهند. عصارهٔ اتانولی، عصارهٔ اتانولی ۷۰ درصد و عصارهٔ آبی نعنا فلفلی در غلظت ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر به ترتیب با کاستن ۱۹/۰۳، ۱۷/۳۵ و ۱۴/۶۷ درصد از رشد قارچ، باعث کاهش ۳۴/۹۳، ۳۰/۴۳ و ۲۶/۷۹ درصد از میزان آفلاتوکسین تولیدی شدند. با افزایش غلظت عصارها میزان رشد قارچ و نیز میزان آفلاتوکسین تولیدی کاهش یافته است به طوری که در غلظت ۶۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر از عصاره‌های اتانولی، اتانولی ۷۰ درصد و آبی نعنا فلفلی به ترتیب ۹۵/۲۵ ، ۷۱/۶۹ و ۵۶/۴۶ درصد کاهش در وزن خشک قارچ و ۸۹/۵۸ ، ۷۶/۱۹ و ۶۲/۰۴ درصد کاهش در میزان آفلاتوکسین تولیدی مشاهده می‌شود. در مورد گزنه به طور کلی هر سه نوع عصاره تأثیر نسبتاً یکسان و معنی‌داری در کاهش آفلاتوکسین تولیدی دارند، درحالی که عصارهٔ اتانولی و اتانول- آبی این گیاه تأثیر قوی‌تری در کاهش رشد قارچ دارد. در بیشینه غلظت کاربردی (۶۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر) از عصارهٔ اتانولی، عصارهٔ اتانولی ۷۰ درصد و عصاره آبی گزنه به ترتیب ۸۶/۱۱، ۶۶/۴۷ و ۳۷/۷۳ درصد از رشد قارچ جلوگیری شد و کاهشی برابر با ۷۸/۶۵، ۷۱/۷۱ و ۵۶/۵۸ درصد در میزان آفلاتوکسین تولیدی رخ داد.

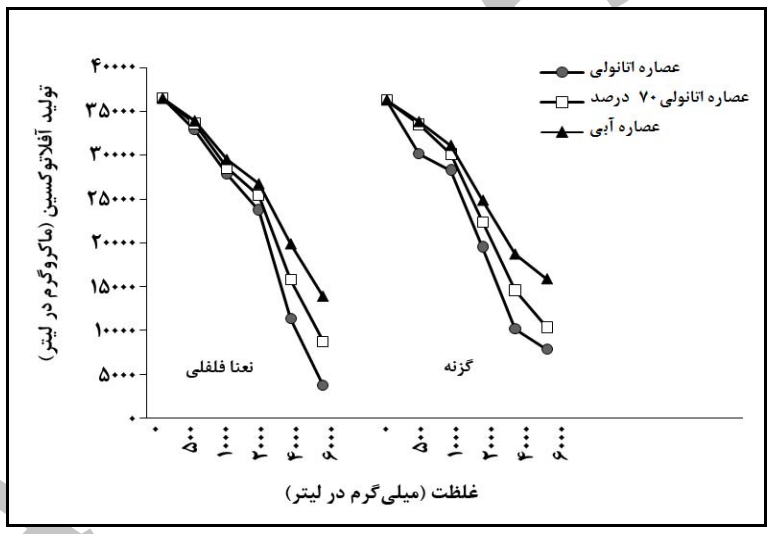
تفاوت در فعالیت ضد قارچی اسانس‌های گیاهی به اجزای تشکیل دهندهٔ آن‌ها بستگی دارد (Ramezani *et al*., 2004). همچنین، حساسیت گونه‌های مختلف قارچی، بسته به نوع اسانس و غلظت‌های مختلف آن نیز متفاوت است. در این تحقیق نشان داده شد که اسانس نعنا فلفلی، در مقایسه با اسانس گزنه، به طور معنی‌داری از رشد قارچ *A. flavus* و تولید آفلاتوکسین کاسته است. اسانس نعنا فلفلی و اسانس گزنه در بیشینه غلظت به‌کار برده شده، به ترتیب ۷۹/۴۰ و ۵۳/۳۰ درصد بازدارندگی از رشد قارچ و ۸۸/۲۵ و ۵۷/۳ درصد کاهش در آفلاتوکسین تولیدی را به دنبال داشت. فعالیت ضد قارچی قوی اسانس نعنا فلفلی را می‌توان به ترکیبات غالب آن (منتانول و منتون) نسبت داد. هر ترکیب ممکن است به تنهایی فعالیت ضد قارچی داشته باشد یا با سایر ترکیب‌ها فعالیت ضد قارچی اسانس را تشدید کند (Ramezani *et al*., 2004). بنابراین همان‌طور که گفته شد به نظر می‌رسد با توجه به فعالیت قوی‌تر اسانس نعنا فلفلی روی گونه قارچی مورد آزمایش، نسبت به اسانس گزنه، ممکن است فعالیت متفاوت این اسانس مربوط به ترکیبات مختلف، فرم ساختمانی، اجزای تشکیل دهنده و گروه‌های عامل آنها و احتمال عملکرد هم‌افزایی بین اجزای آنها باشد. برخی از محققان از جمله کاستا و همکاران (Costa *et al*., 2010) اثر اسانس گیاه چریش را به صورت آزمایشگاهی روی *آسپرژیلوس فلاووس* بررسی کردند. نتایج تحقیقات آنها نشان داده است که اسانس این گیاه تقریباً ۹۵ درصد تولید آفلاتوکسین را مهار می‌کند. محققان دیگر، سینگ و همکاران (Singh *et al*., 2010) نیز اثر اسانس‌های دو گیاه *Cymbopogon citrates* و *Citrus reticulata* را روی رشد *آسپرژیلوس فلاووس* بررسی کرده‌اند، نتایج تحقیقات آنها نیز نشان می‌دهد که اسانس این دو گیاه رشد قارچ را در ۷۵۰ میلی‌گرم در لیتر و تولید توکسین را در غلظت‌های ۵۰۰ و ۷۵۰ میلی‌گرم در لیتر مهار می‌کند. محققان دیگر سلیمان و بدیعی (Soliman & Badeaa, 2002)، همچنین مهار کامل *آسپرژیلوس فلاووس*، *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* و *آسپرژیلوس اوکراسیوس* را بر اثر اسانس‌های آویشن، دارچین (کمتر از ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر)، گل همیشه بهار (کمتر از ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر)، پودنه و ریحان (۳۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر) گزارش کرده‌اند.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- میزان رشد قارچ *A. falavus* در حضور غلظت‌های مختلف عصاره‌های مختلف گزنه و نعنا فلفلی پس از پنج روز نگهداری روی شیکر انکوباتور در دمای ۲۸ درجه سلسیوس در تاریکی



شکل ۲- میزان تولید آفلاتوکسین B1 توسط قارچ *A. falavus* در حضور غلظت‌های مختلف عصاره‌های مختلف نعنا فلفلی و گزنه پس از پنج روز نگهداری روی شیکرانکوباتور در دمای ۲۸ درجه سلسیوس در تاریکی

عصاره‌ها و پودرهای انواع مختلف گیاهان دارویی دارای فعالیت ضد قارچی هستند و همچنین تعدادی از آنها حتی تشکیل و تولید آفلاتوکسین را نیز مهار می‌کنند (Bullerman *et al.*, 1977; Krishnamurthy & Shashikala, 2006)، پاره‌ای از محققان از جمله تانبوریپات و همکاران (Thanaboripat *et al.*, 2007) اثر چندین گیاه دارویی را به منظور کنترل رشد *آسپرژیلوس فلاووس* بررسی کرده‌اند. نتایج تحقیقات آنها نشان می‌دهد که عصاره‌های اتانولی برخی از گیاهان دارویی رشد قارچی را مهار می‌کنند. عصاره گیاهان *Cyperus rotundus* و *Argemone mexicana* تولید آفلاتوکسین را از طریق جلوگیری از رشد قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* مهار می‌کند (Masood & Ranjan, 1991). فعالیت ضد قارچی برخی گیاهان دارویی دیگر در

www.SID.ir

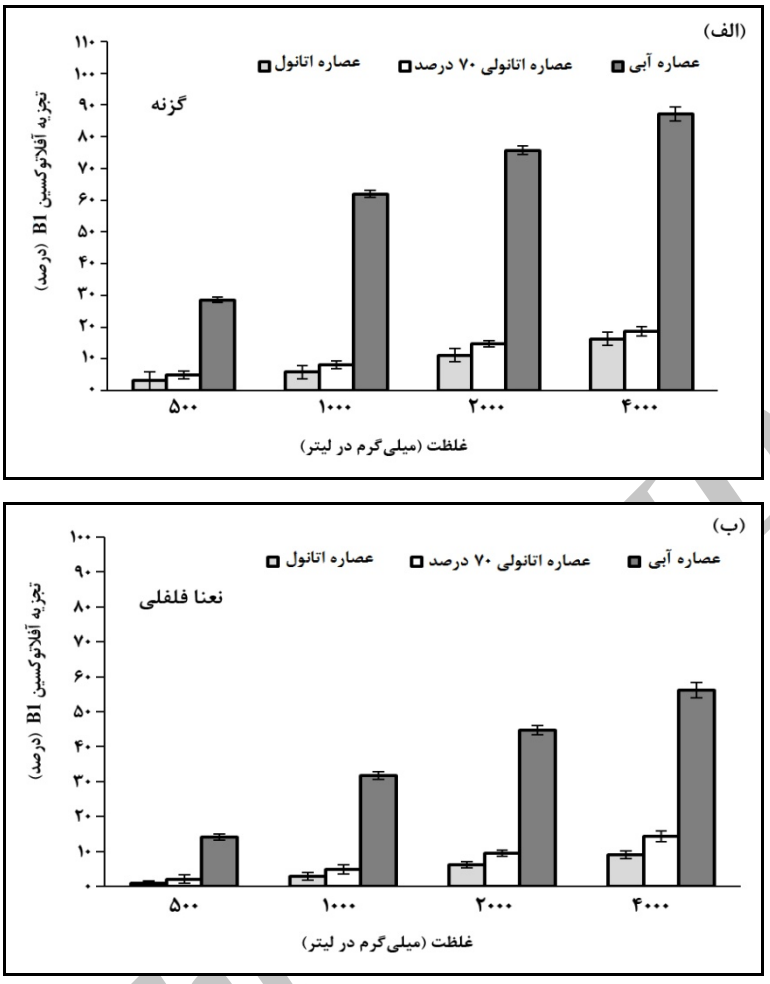
جلوگیری از رشد *A. flavus* و کاهش آفلاتوکسین قبلا نیز گزارش شده است (Reddy *et al*., 2009). هر چند کاهش رشد قارچی به تنهایی همیشه دال بر کاهش معنی‌دار توکسین نیست (Cotty & Bhatnagar, 1994) اما در تحقیق حاضر همبستگی مثبت معنی‌داری بین کاهش رشد قارچ و کاهش تولید آفلاتوکسین مشاهده شده است. با توجه به تعداد زیاد گروه‌های مختلف ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس‌ها و عصاره‌ها، به احتمال قوی نمی‌توان فعالیت ضدمیکروبی آنها به یک مکانیسم ویژه ربط داد بلکه هدف‌های مختلفی در سلول به واسطهٔ این ترکیبات تحت تأثیر قرار می‌گیرد (Carson *et al*., 2002; Skandamis *et al*., 2001) که از طریق تغییرات فراساختاری و تحلیل مسیلیوم قارچ مثل کاهش قطر و ضخامت دیواره‌های مسیلیومی (Zambonelli *et al*., 1996; De Billerbeck *et al*., 2001; Nogueira *et al*., 2010)، دیواره و غشای سلولی، غشای سیتوپلاسمی (Knobloch *et al*., 1989) و تغییرات در غشای میتوکندری (Rasooli *et al*., 2006) اتفاق می‌افتد.

بررسی فعالیت اسانس و عصاره‌ها در تجزیه آفلاتوکسین B1

به دلیل با اهمیت بودن آفلاتوکسین‌ها به ویژه AFB1، ترکیبات بسیار زیادی از نظر پاکسازی آفلاتوکسین مورد بررسی قرار گرفته است. در تحقیق حاضر هم تأثیر اسانس و عصاره‌های آبی، اتانولی و اتانولی ۷۰ درصد دو گیاه دارویی گزنه و نعنا فلفلی بر تجزیهٔ آفلاتوکسین بررسی شده است. اسانس‌ها (داده‌ها نمایش داده نشده) و عصارهٔ اتانولی هر دو گیاه تأثیر چندانی در کاهش آفلاتوکسین محیط ندارند، اما عصارهٔ آبی و اتانولی ۷۰ درصد دو گیاه در این خصوص تأثیر قابل قبولی نشان دادند (شکل ۳). نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که از بین عصاره‌های دو گیاه مذکور، عصارهٔ آبی آنها در پاکسازی آفلاتوکسین مؤثرتر است. عصارهٔ آبی گزنه در غلظت ۴۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر باعث کاهش ۸۷ درصد میزان آفلاتوکسین B1 شده است در حالی که عصاره‌های آبی نعنا فلفلی ۵۶ درصد مقدار آفلاتوکسین را کاهش داده است. بر اساس روش HPTLC، مساحت و شدت لکه فلورسنت آبی رنگ مربوط به آفلاتوکسین B1 روی صفحهٔ سلیکاژل کاهش یافته است و لکهٔ فلورسنتی در موقعیت دیگری روی صفحه مشاهده نشده است، بدین معنا که محصول ناشی از آفلاتوکسین B1 که بر اثر عصاره‌ها تجزیه شده است دیگر قابل ردیابی نبوده است. این موضوع نشان می‌دهد ترکیب به دست آمده از نظر شیمیایی متفاوت از آفلاتوکسین است.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۳- مقایسه میزان تجزیه آفلاتوکسین بر اثر عصاره‌های آبی، اتانولی و اتانولی ۷۰ درصد دو گیاه دارویی (الف) گزنه و (ب) نعنا فلفلی پس از ۲۴ ساعت نگهداری در دمای ۳۰ درجه سلسیوس در تاریکی

نتایج این تحقیق مشخص می‌کند که علاوه بر گیاه، نوع حلال در استخراج مواد بازدارنده نیز اهمیت بسیار زیادی دارد. برای استخراج متابولیت‌های ضد قارچی از اندام‌های هوایی، اتانول، در مقایسه با آب از کارایی بالاتری برخوردار بود و به عبارت دیگر در بین عصاره‌های مختلف، عصارهٔ اتانولی در کاهش رشد قارچ مؤثرتر ظاهر شد. اثر بازدارندگی عصاره علاوه بر نوع حلال مورد استفاده برای استخراج، به غلظت عصاره نیز بستگی دارد. به طور کلی، از آنجایی که اغلب ترکیبات و متابولیت‌های گیاهی که خاصیت ضد قارچی دارند حاوی ترکیبات آلی اشباع شده یا ترکیبات آروماتیک هستند، غالباً از حلال‌های اتانولی یا متانولی برای استخراج اولیه آن‌ها استفاده می‌شود (Cowan, 1999). در این آزمایش همچنین مشخص شد که برای استخراج متابولیت‌ها از اندام‌های هوایی که توانایی تجزیهٔ آفلاتوکسین B1 را دارند آب در مقایسه با اتانول کارایی بالاتری دارد و به همین دلیل این روش استخراج متابولیت به تولید عصارهٔ آبی گزنه می‌انجامد که قادر به پاکسازی درخور توجه آفلاتوکسین محیط است. ترکیبات انحلال‌پذیر در آب مانند پلی‌ساکاریدها و پلی‌پپتیدها و انواع لکتین‌ها و در مواردی تانن‌ها و ترپنوئیدها که در فاز آبی یافت می‌شوند (Cowan, 1999) ممکن است در تجزیهٔ آفلاتوکسین B1 نقش داشته باشند.

www.SID.ir

نتیجه‌گیری

به طور کلی نتایج تحقیق نشان می‌دهد که اسانس و عصارهٔ اتانولی نعنا فلفلی جایگزینی‌های مناسب و امیدوارکننده برای قارچ‌کش‌های شیمیایی هستند و می‌توانند برای کنترل قارچ *A. flavus* به‌کار گرفته شوند عصارهٔ آبی گزنه فعالیت تجزیه‌کنندگی بالاتر آفلاتوکسین B1 را نشان می‌دهد کاندیدای امیدبخش برای تجزیه و کاهش آفلاتوکسین در محصولات کشاورزی، مواد غذایی و دامی آلوده خواهد بود.

با اثبات اثربخش بودن عصاره‌های آبی گزنه در تجزیهٔ آفلاتوکسین می‌توان امیدوار بود که بتوان در آینده با تخلیص مادهٔ موثر گیاه فوق و روی آوردن به تحقیقات بیشتر به تولید صنعتی ترکیبی با تأثیرات ضد آفلاتوکسین B1 قابل قبول با عوارض جانبی کم دست یافت در این زمینه تحقیقات گسترده‌تر در شرایط مدل حیوانی برای بررسی ترکیبات ایجاد شده از تجزیهٔ آفلاتوکسین به واسطهٔ عصاره روی موجود زنده ضروری به نظر می‌رسد تا بتوان به صورت کارآمدتر و علمی راهکارهای عملی برای تجزیه و کاهش آفلاتوکسین در مواد غذایی و خوراک دام پیشنهاد کرد.

قدردانی

هزینه و امکانات مورد استفاده در این طرح از محل اعتبارات دانشگاه شهید بهشتی تأمین شده است که بدین وسیله نگارندگان مراتب قدردانی خود را ابراز می‌دارند.

مراجع

Alibakhshi, Z. 2009. Study on effect of hyphal anastomosis on transferring of genetic materials between aflatoxigenic and non–aflatoxigenic isolates of the fungus *Aspergillus flavus* Link, isolated from Pistachio and their analysis by molecular marker rep-PCR. M. Sc. Thesis. University of Tehran. Karaj. Iran (in Farsi).

Atanda, O. O., Akpan, I. and Oluwafemi, F. 2007. The potential of some spice essential oils in the control of *A. parasiticus* CFR 223 and aflatoxin production. Food Control. 18, 60-607.

Basilico, M. Z. and Basilico, J. C. 1999. Inhibitory effects of some spice essential oils on *Aspergillus ochraceus* NRRL 317 growth and Ochratoxin A production. Lett. Appl. Microbiol. 29, 238- 241.

Bluma, R. V., Amaiden, M. R. and Etcheverry, M. 2008. Screening of Argentine plant extracts: Impact on growth parameters and aflatoxin B1 accumulation by *Aspergillus* section Flavi. Int. Food Microbiol. 122, 114-125.

Bullerman, L. B., Lieu, Y. and Sieier, S. A. 1977. Inhibition of growth and aflatoxin production by Cinnamon and Clove oils, Cinnamic aldehyde and eugenol. J. Food Sci. 46, 1107-1109.

Carson, C. F., Mee, B. J. and Riley, T. V. 2002. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. Antimicrob. Agents Chemother. 46(6):1914-1920.

Costa, C. L., Geraldo, M. R. F., Arrotéia, C. C. and Kemmelmeie, C. 2010. In vitro activity of neem oil [*Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae)] on *Aspergillus flavus* growth, sporulation, viability of spores, morphology and Aflatoxins B1and B2 production. Adv. Biosci. Biotechnol. 1, 292-299.

Cotty, P. J. and Bhatnagar, D. 1994. Variability among atoxigenic *Aspergillus flavus* strains in ability to prevent aflatoxin contamination and production of aflatoxin biosynthetic pathway enzymes. Appl. Environ. Microbiol. 60, 2248-2251.

Archive of SID

www.SID.ir

Cowan, M. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiol. Rev. 12, 564- 582.

De Billerbeck, V. G., Roques, C. G., Bessière, J. M., Fonvieille, J. L. and Dargent, R. 2001. Effects of *ymbopogon nardus* L.) *W. Watson* essential oil on the growth and morphogenesis of (*Aspergillus niger*. Canadian J. Microbiol. 47(1): 9-17.

Deabes, M. M., El-Soud, N. H. A. and El-Kassem, L. T. A. 2011. In Vitro Inhibition of growth and aflatoxin B1 production of *Aspergillus Flavus* strain (ATCC 16872) by various medicinal plant essential oils. Macedonian J. Med. Sci. 4, 345-350.

Jayashree, T. and Subramanyam, C. 1999. Antiaflatoxigenic activity of eugenol is due to inhibition of lipid peroxidation. Lett. Appl. Microbiol. 28, 179-183.

Knobloch, K., Pauli, P., Iberl, B., Weigand, H. and Weiss, N. 1989. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. J. Essen. Oil Res. 1, 119-128.

Krishnamurthy, Y. L. and Shashikala, J. 2006. Inhibition of aflatoxin B1 production of *Aspergillus flavus* isolated from soybean seeds by certain natural plants products. Lett. Appl. Microbiol. 43, 469-474.

Marija, M. Š. and Nevena, T. N. 2009. Antimicrobial effects of spices and herbs essential oils. Acta Periodica Technol. 40, 195-209.

Masood, A. and Ranjan, K. S. 1991. The effect of aqueous plant extracts on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. Lett. Appl. Microbiol. 13(1): 32-34.

Nogueira, J. H., Gonçalez, E., Galleti, S. R., Facanali, R., Marques, M. O. and Felício, J. D. 2010. *Ageratum conyzoides* essential oil as aflatoxin suppressor of *Aspergillus flavus*. Int. J. Food Microbiol. 137(1): 55-60.

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.

Park, D. L. 1993. Controlling aflatoxin in food and feeds. Food Technol. 47, 92-96.

Phillips, T. D., Clement, B. A. and Douglas, L. P. 1994. Approaches to reduction of aflatoxins in foods and feeds. 383-406. In: Eaton , D. L. and Groopman, J. D., (Eds.) The Toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary and Agricultural Significance. Academic Press, San Diego, California, United States, 527p.

Ramezani, M., Hosseinzadeh, H. and Samizadeh, S. 2004. Antinociceptive effect on Zataria multiflora Bioss fractions in mice. J. Ethnopharmacol. 91, 167-170.

Rasooli, I. and Abyaneh, M. R. 2004. Inhibitory effects of *Thyme* oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. Food Control. 15, 479-483.

Rasooli, I., Rezaei, M. B. and Allameh, A. 2006. Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from Thymus eriocalyx and Thymus x-porlock. Food Control. 17, 359-364.

Razzaghi-Abyaneh, M., Shams-Ghahfarokhi, M., Yashinari, T., Rezaee, M. B., Jaimand, K. and Nagasawa, H. 2008. Inhibitory effects of (*Satureja hortensis* L.) essential oil on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. Int. J. Food Microbiol. 123, 228-233.

Reddy, K. R. N., Reddy, C. S. and Muralidharan, K. 2009. Potential of botanicals and biocontrol agents on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* infecting rice grains. Food Control. 20, 173-178.

Sa´nchez, E., Heredia, N. and Garcıa, S. 2005. Inhibition of growth and mycotoxin production of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* by extracts of Agave species. Int. J. Food Microbiol. 98, 271-279.

Archive of SID

www.SID.ir

Singh, P., Shukla, R., Kumar, A., Prakash, B., Singh, S. and Dubey, N. K. 2010. Effect of *Citrus reticulata* and *Cymbopogon citratus* essential oils on *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production on *Asparagus racemosus*. Mycopathologia. 170, 195-202.

Skandamis, P., Koutsoumanis, K., Fasseas, K. and Nychas, G. J. E. 2001. Inhibition of oregano essential oil and EDTA on *Escherichia coli* O157: H7. Italian J. Food Sci. 13, 65-75.

Soliman, K. M. and Badeaa, R. I. 2002. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. Food Chem. Toxicol. 40(11):1669-1675.

Sufferdini, J. B., Sader, H. S., Goncalves, A. G., Reis, A. O., Gales, A. C., Varella, A. D. and Younes, R. N. 2004. Screening of antimicrobial extracts from plants native to the Brazilian Amazon rainforest and Atlantic forest. Brazilian J. Med. Res. 37, 379-384.

Sweeny, M. Y. and Dobson, A. D. W. 1998. Mycotoxin production by *Aspergillus Fusarium* and *Penicillium* species. J. Food Microbiol. 43, 141-158.

Teniola, O. D., Addo, P. A., Brost, I. M., Färber, P., Jany, K. D., Alberts, J. F., van Zyl, W. H., Steyn, P. S. and Holzapfel, W. H. 2005. Degradation of aflatoxin B1 by cell-free extracts of *Rhodococcus erythropolis* and *Mycobacterium fluoranthenivorans* sp. nov. DSM44556T. Int. J. Food Microbiol. 105, 111-117.

Thanaboripat, D., Suvathi, Y., Srilohas, P., Spripakdee, S., Patthanwanitchai, O. and Chareonsettasilp, S. 2007. Inhibitory effect of essential oils on the growth of *Aspergillus flavus.* King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang Sci. J. 6(1): 18-24.

Zambonelli, A., DAurelio, A. Z., Bianchi, A. and Albasini, A. 1996. Effects of essential oils on phytopathogenic fungi. J. Phytopathol. 144, 491-494.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Agricultural Engineering Research/Vol.16/No.3/2015/P:67-78

Inhibitory Effects of Essential Oils and Extracts of Nettle *(Urtica Dioica* L.*)* and Mentha Piperita on Growth and Aflatoxin B1 Production by *Aspergillus Flavus*

A. Gorran*, B. Salehnia, H. R. Alizadeh, A. Mirzaei and M. Farzaneh

* Corresponding author: Ph.D. Graduated Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, P.O. Box 4111, Karaj, Iran. Email: a_gorran2003@yahoo.com.
Received: 4 March 2015, Accepted: 22 August 2015

The use of essential oils and extracts of medicinal plants for thefood, feed, and pharmaceutical industries is growing in response to their medicinal, antifungal, antibacterial, and antioxidant properties.The inhibitory effect of nettle and *Mentha piperita* on the growth of *Aspergillus flavus* and decrease in aflatoxin B1level was studied. Essential oils (62.5, 125, 250, 500 and 1000 mg/l) and aqueous, ethanol, and 70% ethanolextracts (500, 1000, 2000, 4000 and 6000 mg/l) of the plants were testingfor reducing *A. flavus* growth and AFB1content in a liquid culture. The AFB1 content was evaluated using high-performance thin-layer chromatography. Essential oil of *M. piperita* and nettle at the 1000 mg/l concentration decreasedthe dried mycelia weight 79.40% and 53.30% and decreased AFB1production 88.25% and 57.3%,respectively. The extracts of *M. piperita* were stronger thannettle for reducing AFB1 content and mycelial growth; the ethanol extract of *M. piperita* at 6000mg/l decreasedmycelial growth 95.25% and FB1 production 89.58%. Essential oils, ethanol and 70% ethanolextracts of both plants did notsignificantly decrease AFB1 content, whereas aqueous extracts of nettle and *M. piperita* at the 4000 mg/l concentration decreased AFB1 content 78.15% and 56.1%, respectively. In general, essential oil and extracts of *M. piperita* were stronger than those from nettlefor reducing AFB1 content and mycelial growth. Aqueous extracts of nettle showed strong AFB1degradation activity andshould be considereda promising new candidate for decreasing AFB1 content.

Keywords: *Aspergillus Flavus*, Aflatoxin, Mentha Piperita, Nettle (*Urtica dioica* L.)

Archive of SID

www.SID.ir