Archive of SID

مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۴، دوره ۷۰، شماره ۲، ۱۴۵-۱۳۹
Original Article
Journal of Veterinary Research. 70,2: 139-145, 2015

تأثیر اسانس و عصاره‌های مختلف مرزه ماکروسیفون و مرزه خوزستانی بر رشد میسلیومی و تولید آفلاتوکسین B1 قارچ آسپرژیلوس فلاووس

اکبر گران[1*] بنت الهدی صالح نیا[2] حمیدرضا علیزاده[3] محسن فرزانه[4] محمود شیوازاد[1]

۱) گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج-ایران
۲) دانش آموخته بیماری‌شناسی گیاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد پیشوا، تهران-ایران
۳) گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه جیرفت، جیرفت-ایران
۴) گروه کشاورزی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی، تهران-ایران

(دریافت مقاله: ۱۸ بهمن ماه ۱۳۹۳، پذیرش نهایی: ۱۵ فروردین ماه ۱۳۹۴)

چکیده

زمینه مطالعه: سمی بودن آفلاتوکسین‌ها برای انسان و حیوان، دستیابی به روش‌های مناسب برای کنترل آنها را ضروری ساخته است. **هدف:** اثر اسانس و عصاره‌های مختلف مرزه خوزستانی و مرزه ماکروسیفون در جلوگیری از رشد میسلیومی، تولید آفلاتوکسین توسط قارچ آسپرژیلوس فلاووس و تجزیه آفلاتوکسین B1 در محیط کشت مایع بررسی شد. **روش کار:** اسانس به روش تقطیر با آب و به کمک دستگاه کلونجر تهیه شد و عصاره‌ها با حلال‌های آب، اتانول و اتانول ۷۰٪ استخراج شدند. تأثیر اسانس (۰، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۳۷۵ و ۵۰۰ mg/L) و عصاره‌ها (۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۴۰۰۰ و ۶۰۰۰ mg/L) بر کاهش رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس و آفلاتوکسین به روش اختلاط با محیط کشت مایع، مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان آفلاتوکسین با استفاده از کروماتوگرافی نازک با کارایی بالا سنجش شد. **نتایج:** اسانس و عصاره‌های اتانولی و اتانولی ۷۰٪ مرزه خوزستانی بیشترین تأثیر در جلوگیری از رشد قارچ داشتند و بترتیب در غلظت‌های ۳۷۵ mg/L، ۴۰۰۰ و ۶۰۰۰ علیه قارچ آسپرژیلوس فلاووس مهارکنندگی کامل نشان دادند. اسانس و عصاره‌های مرزه ماکروسیفون حتی در بیشینه غلظت مورد استفاده قادر به مهار کامل رشد قارچ نبودند. اسانس‌های مرزه خوزستانی و مرزه ماکروسیفون در غلظت ۲۵۰ mg/L به ترتیب باعث ۹۸ و ۳۳/۵۲ ٪ بازدارندگی از تولید آفلاتوکسین B1 شدند. عصاره‌های مختلف گیاه مرزه خوزستانی در مقایسه با مرزه ماکروسیفون در کاهش آفلاتوکسین قارچ از فعالیت بالاتری برخوردار بودند بطوری که در غلظت ۴۰۰۰ mg/L از عصاره‌های اتانولی، اتانولی ۷۰٪ و آبی بترتیب ۱۰۰، ۹۶ و ۳۲/۳۷ ٪ کاهش در میزان آفلاتوکسین تولیدی مشاهده شد. از سوی دیگر، اسانس و عصاره‌های اتانولی و اتانولی ۷۰٪ هر دو گیاه، قادر به تجزیه قابل توجه آفلاتوکسین B1 محیط نبوده در حالی‌که عصاره‌های آبی مرزه ماکروسیفون و مرزه خوزستانی در غلظت ۴۰۰۰ mg/L بترتیب باعث تجزیه ۳۲/۱۶ و ۲۵ ٪ آفلاتوکسین B1 شدند. **نتیجه گیری نهایی:** اسانس و عصاره اتانولی مرزه خوزستانی بطور قابل توجهی از رشد قارچ و تولید آفلاتوکسین جلوگیری کردند در حالیکه عصاره آبی مرزه ماکروسیفون فعالیت تجزیه‌کنندگی بالاتر آفلاتوکسین B1 را نشان داد و بعنوان کاندیدای امیدبخش جهت تجزیه و کاهش آفلاتوکسین معرفی شد.

واژه‌های کلیدی: آفلاتوکسین، قارچ آسپرژیلوس فلاووس، مرزه خوزستانی، مرزه ماکروسیفون

مقدمه

آفلاتوکسین‌ها متابولیت‌های ثانویه‌ای هستند که عمدتاً توسط قارچ‌های آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس روی طیف وسیعی از غلات، حبوبات، میوه‌جات و سایر محصولات غذایی تولید می‌شوند (۲۶). آفلاتوکسین‌ها به خصوص آفلاتوکسین B1 و M1 از قوی‌ترین زهرابه‌های قارچی محسوب شده که منجر به سرطان و سرکوب سیستم ایمنی در انسان و حیوانات می‌شوند (۹،۱۳). بنابراین فعالیت‌های بسیاری برای از بین بردن و یا کاهش محتوای آفلاتوکسین‌ها در مواد غذایی انجام می‌شود که می‌توان به کاربرد روش‌های مختلف فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیک اشاره کرد (۱۶).

در ایران کنترل قارچ‌ها معمولاً با استفاده از ترکیبات سنتزی شیمیایی انجام می‌شود که در اغلب ترکیبات اثرات جانبی مثل سرطان‌زایی و تومورزایی گزارش شده است (۲۵). امروزه جهت رفع این مشکل، استفاده از منابع طبیعی از جمله گیاهان و میکروارگانیسم‌های مفید و متابولیت‌های تولید شده از آنها به عنوان روش‌هایی زیست فناور و ایمن بیش از پیش مورد توجه قرار گرفته‌اند. از طرفی در بین گیاهان، گیاهان دارویی به دلیل داشتن طیف گسترده‌ای از ترکیبات مفید، توجه زیادی را به خود معطوف کرده‌اند و در سال‌های اخیر برخی تحقیقات روی کاربرد گیاهان دارویی بویژه اسانس و عصاره‌های آنها جهت جلوگیری از رشد قارچ‌ها و ممانعت از تولید توکسین متمرکز شده است (۳،۷،۱۲،۲۱). در کاهش آلودگی آفلاتوکسین B1 و مهار رشد آسپرژیلوس فلاووس، توانایی برخی از گونه‌های گیاهی متعلق به خانواده Lamiaceae نیز شناخته شده است (۱،۴،۱۵،۱۹،۲۰،۲۲)، اما هنوز قابلیت درصد بالایی از این گیاهان مشخص نشده است. بنابراین در این تحقیق تأثیر مرزه خوزستانی و مرزه ماکروسیفون بعنوان منابع جدید زیستی، ارزان و کارآمد، دوستدار محیط زیست و با خاصیت دارویی در جلوگیری از رشد میسلیومی و تولید آفلاتوکسین B1 قارچ آسپرژیلوس

*) نویسنده مسئول: تلفن: ۰۲۶-۳۲۲۴۸۰۸۲ نمابر: ۰۲۶-۳۲۲۴۸۰۸۲ Email: a_gorran 2003@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

فلاووس و مشخص کردن قسمت مؤثره (اسانس و عصاره‌ها) آنها جهت معرفی یک منبع جدید گیاهی در تجزیه و سم‌زدایی آفلاتوکسین B۱ مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار

تهیه مواد گیاهی، استخراج اسانس و عصاره: اندام‌های هوایی دو گونه مرزه خوزستانی و مرزه ماکروسیفون در مرحله گلدهی کامل از زیستگاه طبیعی خود به ترتیب در استان‌های خوزستان و لرستان جمع آوری و به پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی منتقل گردید. مواد گیاهی تهیه شده در سایه، خشک و سپس بوسیله آسیاب خرد شدند. برای تهیه اسانس، ۵۰g نمونه گیاهی مورد آزمایش به روش تقطیر با آب و به کمک دستگاه کلونجر به مدت ۳ ساعت استخراج گردید. اسانس بدست آمده بوسیله سولفات سدیم خشک، آبگیری و در شیشه‌های تیره در دمای ۴°C درون یخچال تا زمان آنالیز و آزمون بیولوژیک نگهداری شد. برای تهیه عصاره‌های مختلف، ۴۰g از مواد گیاهی پودر شده با ۴۰۰ mL از اتانول مخلوط شده و به مدت ۶ ساعت با استفاده ازدستگاه سوکسله عصاره اتانولی تهیه شد. فرایند استخراج عصاره آبی و اتانول- آب به نسبت (۷۰ به۳۰) در دمای ۳۵ °C به مدت ۴۸ ساعت روی شیکر انکوباتور (۱۵۰ دور در دقیقه) انجام شد و سپس عصاره‌های حاصل با استفاده از سانتریفوژ (۱۰ دقیقه در ۱۵۰۰ دور در دقیقه) وعبور از کاغذ صافی، صاف گردید. حلال باقی مانده عصاره اتانولی توسط دستگاه روتاری در دمای ۴۵°C و عصاره عصاره آبی و اتانول- آب (اتانولی ۷۰٪) به کمک دستگاه فریزدرایر به مدت ۲۴ ساعت تبخیر شده و در نهایت ماده خشک حاصل در دمای ۴ °C نگهداری شد.

تهیه قارچ توکسین‌زا آسپرژیلوس فلاووس و استاندارد آفلاتوکسین: جدایه آسپرژیلوس فلاووس R۵ که توکسین‌زایی آن قبلاً اثبات شده بود (۸) از کلکسیون قارچ شناسی گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه تهران تهیه شد. استاندارد آفلاتوکسین B۱ (AFB۱ ,USA ,ORGANICS ACROS) از گروه کشاورزی پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی دریافت شد و محلول‌های کار با غلظت‌های ۱۰۰ mg/L، ۵۰ و ۵ تهیه و در دمای ۲۰°C- نگهداری شد.

تهیه زادمایه قارچ: جهت تهیه زادمایه قارچ، ۲۰ µL از سوسپانسیون رقیق اسپور قارچ در آب مقطر سترون، روی محیط غذایی PDA داخل ویال‌های اپندورف ۲ mL به صورت مورب کشت داده و در دمای ۳۰°C در شرایط تاریکی به مدت یک هفته نگهداری شدند. هنگام انجام آزمایش، یک میلی لیتر از محلول ۰/۱۵ mol نمک طعام حاوی ۰/۰۵٪ توئین ۸۰ به هر ویال اضافه شده و به آرامی تکان داده شد تا سوسپانسیون اسپور تهیه شود. در پایان جمعیت اسپور در میلی لیتر سوسپانسیون با استفاده از لام هماسیتومتر تعیین شد.

بررسی فعالیت ضد قارچی گیاه: در روش اختلاط با محیط کشت مایع PDB (Potato Dexterose Broth)، غلظت‌های ۰mg/L، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰ ، ۳۷۵ و ۵۰۰ از اسانس و غلظت‌های ۰mg/L، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۴۰۰۰ و ۶۰۰۰ از عصاره ها در ارلن های ۱۰۰mL حاوی ۲۵mL محیط کشت مایع تهیه و بلافاصله ۱ mL سوسپانسیون اسپور قارچ (۱۰۴×۱) افزوده شد. پس از نگهداری به مدت ۵ روز روی شیکرانکوباتور در دمای۲۸°C، توده‌های میسلیومی به کمک پارچه ململ دولا از محیط کشت جدا شده و در آون در دمای ۷۰°C خشک شدند. در نهایت وزن خشک میسلیوم محاسبه شد (۶).

تأثیر بازدارندگی گیاه از تولید AFB۱ توسط قارچ آسپرژیلوس فلاووس: جهت تعیین تأثیر اسانس و عصاره‌های مختلف دو گیاه دارویی مذکور بر میزان تولید آفلاتوکسین توسط قارچ، غلظت‌های مشخص اسانس (۰ mg/L، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰ ، ۳۷۵ و ۵۰۰) و عصاره‌های مختلف (mg/L ۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۴۰۰۰ و ۶۰۰۰) به ارلن مایرهای ۱۰۰ mL حاوی ۲۰ mL محیط PDB، افزوده شد و بلافاصله با ۱۰۰µL سوسپانسیون اسپور (با غلظت 10^5 اسپور در میلی‌لیتر) مایه‌زنی شد. ارلن‌های حاصل به مدت ۵ روز بر روی شیکر انکوباتور با دمای ۲۸ °C و سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه نگهداری شد. در نهایت میزان آفلاتوکسین B۱ موجود درعصاره خارج سلولی و میسلیوم قارچ استخراج و تعیین گردید. درصد بازدارندگی رشد قارچ و آفلاتوکسین B۱ با استفاده از فرمول، ٪ بازدارندگی= ((گروه کنترل- تیمار/ گروه کنترل) ×۱۰۰) محاسبه شد (۶).

بررسی میزان تجزیه آفلاتوکسین توسط اسانس و عصاره‌ها: میزان ۲mg/L از آفلاتوکسین B۱ را به ویال‌های ۱/۸mL حاوی غلظت‌های مختلف اسانس و عصاره در حلال DMSO، افزوده شد و روی شیکر انکوباتور با دمای ۳۰°C و ۱۰۰ دور در دقیقه در شرایط تاریکی نگهداری شدند. پس از مدت ۲۴ ساعت مقادیر آفلاتوکسین موجود ارزیابی شد.

استخراج و ردیابی آفلاتوکسین: برای استخراج آفلاتوکسین B۱ از میسلیوم، وزن مشخصی از میسلیوم توسط ازت مایع منجمد گردید و در هاون پودر شد. محتوای آفلاتوکسین پودر حاصل در حضور کلروفرم (۱۰۰mL) با استفاده از قیف دکانتور سه مرتبه استخراج گردید. استخراج آفلاتوکسین‌های موجود در محیط کشت مایع نیز سه مرتبه و طبق روش Teniola و همکاران در سال ۲۰۰۵ (۲۳) با استفاده از حلال کلروفورم انجام شد. سپس کلروفورم در دمای ۶۰ °C با استفاده از حمام آبی تبخیر شد. نمونه‌های حاصل حداکثر به مدت دو هفته تا انجام آنالیز کروماتوگرافی در دمای ۴ °C درون یخچال نگهداری شدند. جهت انجام کروماتوگرافی و اندازه‌گیری آفلاتوکسین از دستگاه کروماتوگرافی لایه نازک با کارایی بالا (High Performance Tin Layer Chromatography) HPTLC) استفاده شد. ابتدا هر نمونه در ۱mL کلروفورم به کمک دستگاه تولید کننده امواج ماورای صوت، پاور سونیک، کاملاً حل شد. سپس نمونه‌ها روی صفحه سلیکاژلی (Merck, Darmstadt, Germany, F۲۵۴ ۶۰ TLC Silica gel)

www.SID.ir

Archive of SID

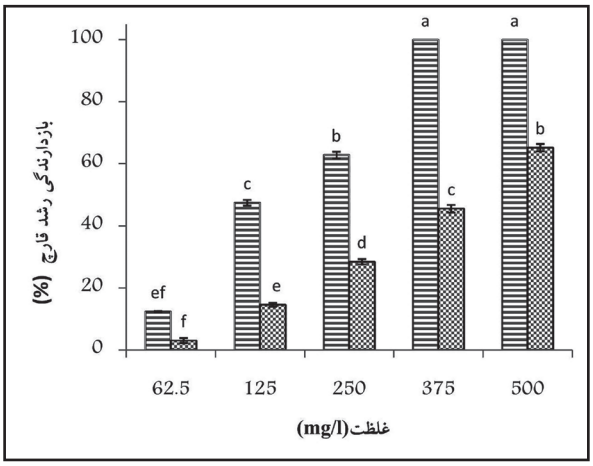
به فاصله مناسب لکه گذاری شدند. سپس صفحات لکه گذاری شده در حلال کلروفورم- استون (به نسبت ۹ به ۱) قرار گرفته و عمل جداسازی آفلاتوکسین صورت گرفت. پس از جداسازی، صفحات مذکور درون قسمت آنالیز دستگاه HPTLC قرار گرفته و با استفاده از نرم افزار (CAMAG VideoScan TLC/HPTLC Evalution Software V. ۱/۰۱) بصورت کمی و کیفی در طول موج ۳۶۵nm مورد ارزیابی قرار گرفتند.

تجزیه و تحلیل آماری: تمام آزمایش‌ها به صورت طرح کاملاً تصادفی و با ۴ تکرار انجام شد. برای تجزیه واریانس از نرم افزار SAS و به روش GLM استفاده شد. پس از تجزیه واریانس، میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۱٪ یا ۵٪ مقایسه شدند.

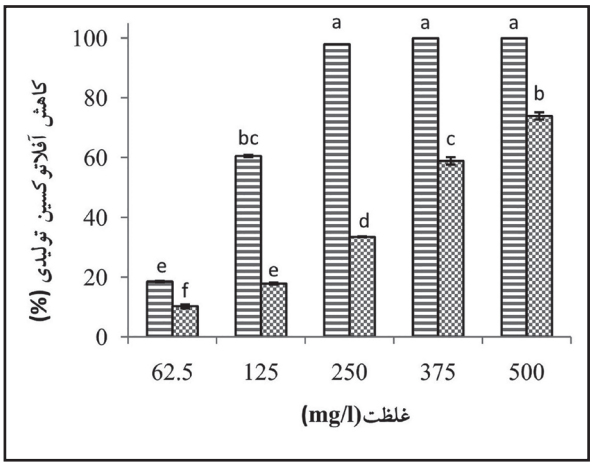
نتایج

بررسی فعالیت اسانس در بازدارندگی از رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس و تولید آفلاتوکسین B1: نتایج بررسی تأثیر اسانس گرفته شده از دو گیاه دارویی بر رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس (نمودار ۱) و تولید آفلاتوکسین B1 (نمودار ۲) نشان داد که بین سطوح مختلف اسانس دو گیاه تفاوت معنی‌داری در بازدارندگی از رشد قارچ و کاهش آفلاتوکسین تولیدی وجود دارد ($p<0/01$). بطور کلی با افزایش غلظت اسانس فعالیت ضد قارچی افزایش یافته و اسانس مرزه خوزستانی در مقایسه با مرزه ماکروسیفون از قدرت بازدارندگی بیشتری برخوردار بود. اسانس مرزه خوزستانی در غلظت ۳۷۵ mg/L با جلوگیری کامل از رشد قارچ در محیط مایع باعث عدم تولید آفلاتوکسین B1 قابل ردیابی در محیط شد. در غلظت ۲۵۰ mg/L، اسانس مرزه خوزستانی با ۶۲/۳٪ کاهش وزن خشک میسلیومی قارچ باعث کاهش آفلاتوکسین B1 تولیدی به میزان ۹۸٪ شد که نشان از پتانسیل بالای این اسانس در کاهش تولید آفلاتوکسین است. اسانس مرزه ماکروسیفون در حداکثر غلظت کاربردی باعث کاهش وزن خشک قارچ به میزان ۶۵٪ شد اما باعث کاهش ۷۳/۹٪ میزان آفلاتوکسین تولیدی شد. به هر حال نرخ شیب کاهش رشد قارچ و آفلاتوکسین B1 در مورد اسانس مرزه خوزستانی به صورت تند بود و در مرزه ماکروسیفون بصورت کند پیش رفت.

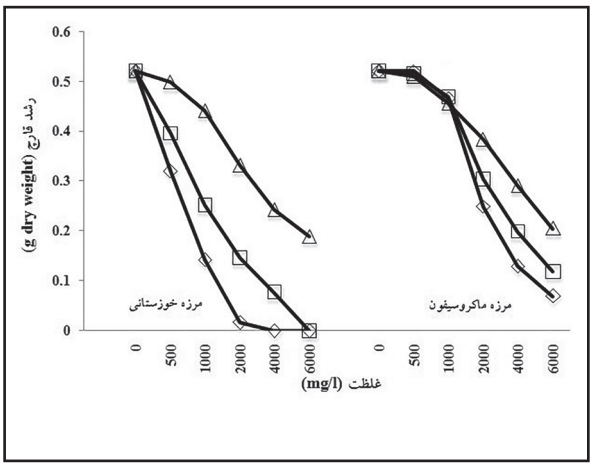
بررسی فعالیت عصاره‌ها در بازدارندگی از رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس و تولید آفلاتوکسین B1: به طور کلی با توجه به میزان رشد میسلیومی قارچ آسپرژیلوس، عصاره اتانولی و اتانولی ۷۰٪ فعالیت ضد قارچی قوی تری نسبت به عصاره آبی نشان دادند. عصاره اتانولی و اتانولی ۷۰٪ از مرزه خوزستانی به ترتیب در غلظت ۴۰۰۰mg/L و ۶۰۰۰ به طور کامل رشد قارچ را مهار کرد، در حالی که عصاره آبی آن در بالاترین غلظت (۶۰۰۰ mg/L) نتوانست کاملا رشد قارچ را مهار کند. همچنین نتایج نشان داد که عصاره اتانولی مرزه ماکروسیفون در غلظت‌های ۴۰۰۰mg/L و ۶۰۰۰ به ترتیب ۷۵/۲۳ و ۸۶/۶۶ ٪ از رشد آسپرژیلوس فلاووس جلوگیری کرد (نمودار ۳).



نمودار ۱. تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس دو گیاه دارویی در بازدارندگی از رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس پس از پنج روز نگهداری در دمای ۲۸ °C در شرایط تاریکی.
مرزه خوزستانی ▤ مرزه ماکروسیفون ▦



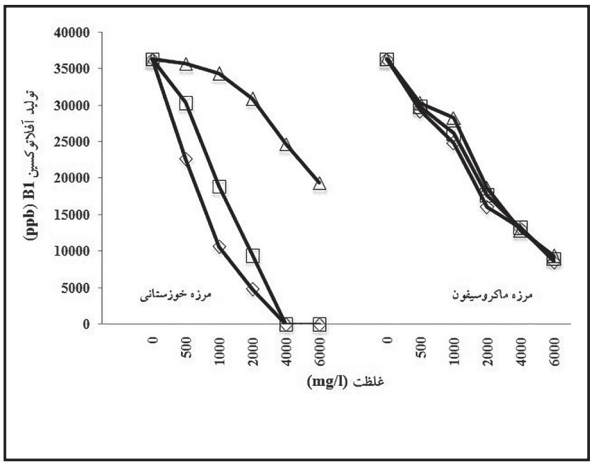
نمودار ۲. تأثیر غلظت های مختلف اسانس دو گیاه دارویی در کاهش آفلاتوکسین آسپرژیلوس فلاووس پس از پنج روز نگهداری در دمای ۲۸°C در شرایط تاریکی.
مرزه خوزستانی ▤ مرزه ماکروسیفون ▦



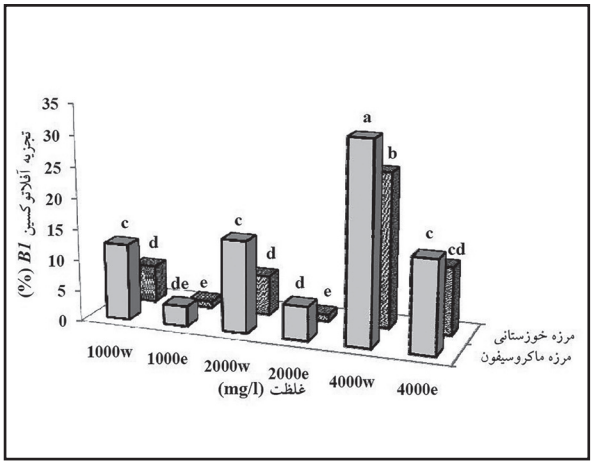
نمودار ۳. میزان رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس در حضور غلظت‌های مختلف عصاره‌های دو گیاه دارویی پس از پنج روز نگهداری روی شیکرانکوباتور در دمای ۲۸°C در شرایط تاریکی. عصاره اتانولی ◇ عصاره اتانولی ۷۰٪ ⊟ عصاره آبی △

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۴. میزان تولید آفلاتوکسین B1 در حضور غلظت‌های مختلف عصاره‌های دو گیاه دارویی پس از پنج روز نگهداری روی شیکرانکوباتور در دمای ۲۸°C و شرایط تاریکی. عصاره اتانولی عصاره اتانولی ۷۰٪ عصاره آبی



نمودار ۵. مقایسه میزان تجزیه آفلاتوکسین B1 توسط عصاره‌های آبی (w) و اتانولی ۷۰٪ (e) دو گیاه دارویی مرزه خوزستانی و مرزه ماکروسیفون پس از نگهداری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰°C و شرایط تاریکی.

داده‌های اولیه حاصل از HPTLC نشان داد که عصاره مرزه خوزستانی و مرزه ماکروسیفون قادرند به طور مؤثر تولید آفلاتوکسین B1 توسط قارچ را مهار کنند. جالب توجه است که عصاره اتانولی و اتانولی ۷۰٪ مرزه خوزستانی در غلظت ۲۰۰۰ mg/L (۷۴-۸۷٪) آفلاتوکسین B1 تولید شده توسط آسپرژیلوس فلاووس را مهار کرد، در حالی که هر سه نوع عصاره مرزه ماکروسیفون به طور مشابه (۴۹-۵۵٪) مانع از تولید آفلاتوکسین B1 شدند (نمودار۴).

بررسی فعالیت اسانس و عصاره‌ها در تجزیه آفلاتوکسین B1: بدلیل اهمیت آفلاتوکسین‌ها بویژه AFB1 ترکیبات بسیاری از نظر پاکسازی آفلاتوکسین مورد بررسی قرار گرفته است. در تحقیق حاضر هم تأثیر اسانس و عصاره‌های اتانولی، آبی و اتانولی ۷۰٪ دو گیاه دارویی مرزه خوزستانی و مرزه ماکروسیفون بر تجزیه آفلاتوکسین مورد بررسی قرار گرفت. اسانس‌ها و عصاره اتانولی هر دو گیاه تأثیر چندانی در کاهش آفلاتوکسین محیط نداشت (داده ها نمایش داده نشده)، اما عصاره آبی و اتانولی ۷۰٪ دو گیاه تأثیر قابل قبولی نشان دادند (نمودار ۵). نتایج بدست آمده نشان داد که از بین عصاره‌های دو گیاه مذکور، عصاره آبی آنها در پاکسازی آفلاتوکسین مؤثرترین است. در حضور عصاره آبی مرزه ماکروسیفون و مرزه خوزستانی با غلظت ۴۰۰۰ mg/L محیط کشت بترتیب باعث تجزیه ۳۲/۱۶ و ۲۵٪ آفلاتوکسین B1 شدند.

بحث

در سال‌های اخیر بدلیل بروز مشکلات و خطرات ناشی از مصرف بی رویه سموم شیمیایی، گرایش زیادی به استفاده از پتانسیل بالقوه گیاهان دارویی در کنترل قارچها و سموم آنها ایجاد شده است. در تحقیق حاضر هم تأثیر اسانس و عصاره‌های اتانولی، اتانولی ۷۰٪ و آبی دو گیاه دارویی بر کاهش رشد میسلیومی و تولید آفلاتوکسین قارچ آسپرژیلوس فلاووس مشخص کرد که اسانس مرزه خوزستانی فعالیت ضد قارچی قابل توجهی داشت به‌طوری‌که در غلظت ۳۷۵ mg/L، به طور کامل رشد آسپرژیلوس فلاووس را مهار کرد. تفاوت در فعالیت ضد قارچی اسانس‌های گیاهی به اجزاء تشکیل دهنده آنها بستگی دارد. یک ترکیب ممکن است به تنهایی یا به صورت تشدیدکنندگی با سایر ترکیب‌ها فعالیت ضد قارچی اسانس را باعث شود (۱۸). بنابراین به‌نظر می‌رسد اثرات ضد قارچی قابل توجه اسانس‌های مورد مطالعه در این تحقیق ضمن اینکه تحت تأثیر ترکیب غالب اسانس(کارواکرول و تیمول)(۱۰) است، اما اثرات تشدیدکنندگی بین تمام ترکیب‌ها، فاکتور عمده تعیین کننده فعالیت ضد قارچی بالای اسانس می‌باشد. همچنین مشخص شده است که کارواکرول باعث افزایش خاصیت ضد میکروبی تیمول و پاراسیمن باعث افزایش خاصیت ضد میکروبی کارواکرول می شود (۱۷). فعالیت ضد میکروبی اسانس‌ها ممکن است در آسیب‌زدن به لیپیدها، پروتئین‌ها، دیواره سلولی، غشای سلول و اندامک‌های سلولی میکروب باشد (۲).

نتایج HPTLC نشان داد که اسانس مرزه خوزستانی به طور مؤثر باعث کاهش میزان AFB1 تولید شده توسط آسپرژیلوس فلاووس شد. مشابه نتایج ما، اثرات مهارکنندگی برخی از اسانس‌های گیاهان دارویی علیه تولید AFB1 توسط قارچهای آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس در مطالعات قبلی گزارش شده است (۲۴، ۶).

در میان گیاهان دارویی، اسانس گونه‌های متعلق به جنس مرزه، به دلیل داشتن مواد شیمیایی مختلف فعال، مانند ترپن و مونوترپن‌ها (کارواکرول، تیمول) با مقدار کمی هیدروکربن، از اهمیت زیادی برخوردارند (۱۰،۱۱،۱۴). اما اطلاعات کمی در مورد فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های مختلف این گیاهان وجود دارد.

عصاره های اتانولی و اتانولی ۷۰٪ در مقایسه با عصاره آبی از تأثیر بیشتری در بازدارندگی از رشد قارچ برخوردار بودند. عصاره اتانولی و اتانولی ۷۰٪ از مرزه خوزستانی در غلظت ۴۰۰۰ mg/L به طور کامل رشد قارچ را

www.SID.ir

Archive of SID

مهار کرد، در حالی که عصاره آبی آن نتوانست در بالاترین غلظت رشد قارچ را به طور کامل مهار کند.

در جلوگیری از تولید آفلاتوکسین نیز عصاره اتانولی و اتانولی ۷۰٪ در مقایسه با عصاره آبی از فعالیت بالاتری برخوردار بودند. عصاره‌های اتانولی، اتانولی ۷۰٪ و آبی مرزه خوزستانی در کاهش سطح آفلاتوکسین تولیدی مؤثر بود و با افزایش غلظت عصاره ها سطح آفلاتوکسین تولیدی کاهش یافت.

در این پژوهش مشخص گردید که درصد تجزیه آفلاتوکسین در عصاره آبی بالاتر از عصاره اتانولی و اتانولی ۷۰٪ بود. به طور کلی عصاره آبی مرزه ماکروسیفون نسبت به مرزه خوزستانی فعالیت تجزیه‌کنندگی بالاتر آفلاتوکسین B۱ را نشان داد و عصاره آبی مرزه ماکروسیفون در بیشینه غلظت مورد استفاده (۴۰۰۰ mg/L) سطح آفلاتوکسین قادر به ردیابی را ۳۲/۱۶٪ کاهش داد و بر اساس روش HPTLC، مساحت و شدت لکه فلورسنت آبی رنگ مربوط به آفلاتوکسین B۱ روی صفحه سلیکاژل کاهش یافته و لکه فلورسنتی در موقعیت دیگری روی صفحه مشاهده نشد. به عبارت دیگر، محصول ناشی از آفلاتوکسین B۱ تجزیه شده توسط عصاره‌ها قابل ردیابی نبود که نشان می‌دهد ترکیب حاصله از نظر شیمیایی متفاوت از آفلاتوکسین می‌باشد.

بنابراین نتایج این تحقیق مشخص کرد علاوه بر گیاه، نوع حلال در استخراج مواد بازدارنده اهمیت بسیار زیادی دارد. جهت 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، عصاره 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 (۵). به‌طور کلی، از آنجایی که تقریباً اغلب ترکیبات و متابولیت‌های گیاهی که دارای خاصیت ضد قارچی می‌باشند ترکیبات آلی اشباع شده یا ترکیبات آروماتیک هستند، غالباً از حلال‌های اتانولی یا متانولی برای استخراج اولیه آنها استفاده می‌شود (۵). همچنین در این آزمایش مشخص شد که جهت استخراج متابولیت‌های از اندام‌های هوایی که توانایی تجزیه آفلاتوکسین B۱ را دارند آب در مقایسه با اتانول از کارایی بالاتری برخوردار بود. ترکیبات محلول در آب مانند پلی‌ساکاریدها و پلی‌پپتیدها و انواع لکتین‌ها ودر مواردی تانن‌ها و ترپنوئیدها که در فاز آبی یافت می شوند (۵) ممکن است در تجزیه آفلاتوکسین B۱ نقش داشته باشند.

بطور کلی نتایج نشان داد گیاه مرزه خوزستانی در مقایسه با مرزه ماکروسیفون از خاصیت ضد قارچی بالاتری برخوردار است. اسانس و عصاره اتانولی مرزه خوزستانی تأثیر قابل توجهی را در جلوگیری از رشد قارچ و کاهش آفلاتوکسین تولیدی داشت در حالیکه عصاره آبی مرزه ماکروسیفون فعالیت تجزیه کنندگی بالاتر آفلاتوکسین B۱ را نشان داد و به عنوان کاندیدای امیدبخش جهت تجزیه و کاهش آفلاتوکسین معرفی شد.

تشکر و قدردانی

هزینه و امکانات مورد استفاده در این پژوهش از محل اعتبارات معاونت پژوهشی دانشگاه شهید بهشتی (طرح شماره ۶۰۰/۱۵۲۰) تأمین شده است که بدین وسیله نگارندگان مراتب قدردانی خود را ابراز می‌دارند.

References

1. Atanda, O.O., Akpan, I., Oluwafemi, F. (2007) The potential of some spice essential oils in the control of *A. parasiticus* CFR 223 and aflatoxin production. Food Control. 18: 601-607.
2. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008) Biological effects of essential oils – A review. Food Chem Toxicol. 46: 446-475.
3. Basilico, M.Z., 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.
4. Bluma, R., Amaiden, M.R., Etcheverry, M. (2008) Screening of Argentine plant extracts: Impact on growth parameters and aflatoxin B1 accumulation by *Aspergillus* section Flavi. Int J Food Microbiol. 122: 114-125.
5. Cowan, M.M. (1999) Plant products as antimicrobial agents. Clin Microbiol Rew. 12: 564-582.
6. Deabes, M.M., El-Soud, N.H.A., 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. Maced J Med Sci (MJMS). 4: 345-350.
7. Fan, J.J., Chen, J.H. (1999) Inhibition of aflatoxin producing fungi by welsh onion extract. J Food Prot. 62: 414 - 7.
8. Farzaneh, M., Shi, Z.Q., Ghassempour, A., Sedaghat, N., Ahmadzadeh, M., Mirabolfathy, M., Javan-Nikkhah, M. (2012) Aflatoxin B1 degradation by *Bacillus subtilis* UTBSP1 isolated from pistachio nuts of Iran. Food Control. 23: 100-106.
9. Guengerich, F.P., Johnson, W.W., Ueng, Y.F., Yamazaki, H., Shimada, T. (1996) Involvement of cytochrome P450, glutathione S-transferase, and epoxide hydrolase in the metabolism of af-

www.SID.ir

Archive of SID

latoxin B1 and relevance to risk of human liver cancer. Environ Health Perspect. 104: 557-562.

10. Hadian, J., Akramian, M., Heydari, H., Mumivand, H., Asghari, B. (2012) Composition and in vitro antibacterial activity of essential oils from four *Satureja* species growing in Iran. Nat Prod Res. 26: 98–108.
11. Hadian, J., Tabatabaei, S.M.F., Naghavi, M.R., Jamzad, Z., Ramak-Masoumi, T. (2008) Genetic diversity of Iranian accessions of *Satureja hortensis* L. based on horticultural traits and RAPD markers. Sci Hortic. 115: 196-202.
12. Jayashree, T., Subramanyam, C. (1999) Antiaflatoxigenic activity of eugenol is due to inhibition of lipid peroxidation. Lett Appl Microbiol. 28: 179 - 83.
13. Liu, Y., Wu, F. (2010) Global burden of aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma: A risk assessment. Environ Health Perspect. 118: 818-824.
14. Nickavar, B., Mojab, F., Dolat-Abadi, R. (2005) Analysis of the essential oils of two *Thymus* species from Iran. Food Chem. 90: 609-611.
15. Omidbeygi, M., Barzegar, M., Hamidi, Z., 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.
16. Park, D.L. (1993) Controlling aflatoxin in food and feeds. Food Technol. 47: 92-96.
17. Periago, P.M., Delgado, B., Fernandez, P.S., Palop, A. (2004) Use of carvacrol and cymene to control growth and viability of *Listeria monocytogenes* cells and predictions of survivors using frequency distribution functions. J Food Prot. 67: 1408–1416.
18. Plotto, A., Roberts, D.D., Roberts, R.G. (2003) Evaluation of plant essential oils as natural postharvest disease control of tomato (*Lycopersicon esculentum*). Acta Hort. 628: 737-745.
19. Rasooli, I., Abyaneh, M.R. (2004) Inhibitory effects of Thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. Food Control. 15: 479-483.
20. Reddy, K.R.N., Reddy, C.S., 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.
21. Sa´nchez, E., Heredia, N., 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.
22. Škrinjar, M.M., Nemet, N.T. (2009) Antimicrobial effects of spices and herbs essential oils. APTEFF. 40: 195-209.
23. Teniola, O.D., Addo, P.A., Brost, I.M., Färber, P., Jany, K.D., Alberts, J.F., Van Zyl, W.H., Steyn, P.S., Holzapfe, W.H. (2005) Degradation of aflatoxin B1 by cell-free extracts of *Rhodococcus erythropolis* and *Mycobacterium fluoranthenivorans* sp. Int J Food Microbiol. 105: 111-117.
24. Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J. (2008) Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. Food Control. 19: 1130-1138.
25. Wills, R.H., McGlasson, B., Graham, D., Joyce, D. (1998) Postharvest: An Introduction to the Physiology and Handling of Fruit, Vegetables and Arnamentals. (4th ed.). CAB International, Willingford, Oxan, UK.
26. Wilson, D.M., Payne, G.A. (1994) Factors affecting *Aspergillus flavus* group infection and aflatoxin contamination of crops. In: The Toxicology of Aflatoxins. Eaton, D.L., Groopman, J.D. (eds.). Academic Press, San Diego, New York, USA. p. 309–326.

www.SID.ir

Archive of SID

Effect of essential oils and extracts of *Satureja macrosiphon* and *Satureja khozistanica* on mycelial growth and aflatoxin B1 production in *Aspergillus flavus*

Gorran, A.[1*], Salehnia, B.[2], Alizadeh, H.[3], Farzaneh, M.[4], Shivazad, M.[1]

[1]*Department of Animal Sciences, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj-Iran*

[2]*Graduated from the Pishva Branch of Islamic Azad University, Tehran-Iran*

[3]*Department of plant protection, Faculty of Agriculture, University of Jiroft, Jiroft-Iran*

[4]*Department of Agriculture, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran-Iran*

(Received 9 December 2014, Accepted 18 Februry 2015)

Abstract:

BACKGROUND: The hazardous nature of aflatoxins to human and animals necessitate the establishment of control measures. **OBJECTIVES:** The effect of two medicinal plants, *Satureja khozistanica* and *Satureja macrosiphon*, was studied on inhibiting *Aspergillus flavus* growth and reducing aflatoxin B1-content in the liquid medium. **METHODS:** Essential oils were isolated by hydrodistillation method, using a Clevenger-type apparatus. Various extracts of plant materials were macerated with various extraction solvents (ethanol, ethanol70% and water extracts). Essential oils (0, 62/5, 125, 250, 375 and 500 mg/l) and various extracts (0, 500, 1000, 2000, 4000 and 6000 mg/l) of *S. khozistanica* and *S. macrosiphon* were examined for reducing *A. flavus* growth and it's AFB1-content in the liquid medium. Amount of aflatoxinB1 was evaluated by high performance thin layer chromatographymethod. **RESULTS:** Essential oil of *S. khozistanica* at the concentration of 375 mg/l as well as its ethanol and ethanol 70% extracts at 4000 and 6000 mg/l respectively caused complete inhibition of fungus mycelial growth, whereas essential oil and extracts of *S. macrosiphon* couldn't inhibit *Aspergillus* growth completely even at the maximum concentration. Essential oils of *S. khozistanica* and *S. macrosiphonia* at the concentration of 250 mg/l reduced AFB1-production 98 and 33.52% respectively. Various Extracts of *S. khozistanica* exhibited stronger anti-AFB1-biosyntesis activity than those of *S. macrosiphon*, so that, ethanol, ehanol70% and aqueous extracts of *S. khozistanica* at 4000 mg/l reduced 100, 96 and 32.37% of AFB1-production, respectively. On the contrary, essential oils, ethanol and ehanol70% extracts of both plants couldn't significantly degrade AFB1-contamination, whereas aqueous extractsof *S. khozistanica* and *S. macrosiphonia* at the concentration of 4000 mg/l resulted in degradation of 25 and 32.16% AFB1-content, respectively. **CONCLUSIONS:** In general, Essential oil and ethanol extract of *S. khozistanica* considerably inhibited *A. flavus* growth as well as AFB1-biosynthesis while aqueous extract of *S. macrosiphon* showed strong AFB1-degradation activity.

Keyword: aflatoxin, *Aspergillus flavus*, *Satureja khozistanica*, *Satureja macrosiphon*

Figure Legends and Table Captions

Graph 1. The inhibitory effect of essential oils against *A. flavus* growth after 5 days of incubation.

Graph 2. The inhibitory effect of essential oils against AFB1-formation of *A. flavus* after 5 days of incubation.

Graph 3. The *Aspergillus flavus* growth incubated in different concentrations of extracts for 5 days.

Graph 4. The AFB1-production by *Aspergillus flavus* after 5 days incubation in different concentrations of extracts.

Graph 5. Degradation of AFB1 in difference concentrations of ethanol 70% (e) and aqueous (w) extracts of two medicinal plants after 24 h of incubation.

***Corresponding author's email: a_gorran2003@yahoo.com, Tel: 026-32248082, Fax: 026-32248082**

www.SID.ir