

بررسی تأثیر استفاده از اسانس نعناع فلفلی بر کنترل قارچ (*Aspergillus flavus*) در شرایط درون شیشه‌ای

حمید سلیمانی^{۱*}، یونس موستوفی^۲

^۱ دانشجوی دکتری (باغبانی، دانشگاه زنجان، زنجان- ایران)

^۲ استاد سابق (باغبانی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج- ایران)

*نویسنده مسئول: gh.a.soleymani@gmail.com

چکیده

افلاتوکسین‌ها سمومی هستند که بوسیله تعدادی از قارچ‌ها که بر روی مواد غذایی رشد می‌کنند و می‌توانند بیماری افلاتوکسیکوزیس را در انسان و حیوانات اهلی ایجاد کنند. برای جلوگیری از خسارت آفاتوکسین، از انواع مواد شیمیایی از جمله قارچ کش‌ها استفاده می‌شود. از سوی دیگر با توجه به اثرات زیان بار مواد شیمیایی برای طبیعت و انسان‌ها، لزوم استفاده از روش‌های سالم غیر شیمیایی برای جلوگیری از خسارت قارچ آسپرژیلوس فلاووس *Aspergillus flavus* در محصول پسته ضروری است. در این راستا به منظور استفاده از روش‌های غیر شیمیایی برای کنترل زهرابه آفاتوکسین ناشی از قارچ آسپرژیلوس فلاووس در شرایط درون شیشه‌ای، از اسانس طبیعی حاصل از گیاه دارویی نعناع فلفلی در این تحقیق استفاده گردید. کلیه مراحل پژوهش در آزمایشگاه قارچ شناسی و کنترل بیولوژیک گروه گیاه پزشکی پردیس کشاورزی و منبع طبیعی دانشگاه تهران در سال ۱۳۸۷ انجام گرفت و ۴ غلظت (۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ میکرولیتر بر لیتر) از اسانس نعناع فلفلی به دو روش دیسکی و ترکیب اسانس مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از بررسی اثرات ضد قارچی اسانس در شرایط درون شیشه‌ای نشان داد که توانایی اسانس نعناع فلفلی در کنترل عوامل بیماری‌زای گیاهی به غلظت بکار رفته و مهمتر از آن به روش اعمال تیمار بستگی دارد. در پژوهش حاضر مشخص شد که غلظت ۵۰۰ میکرولیتر بر لیتر بیشترین اثربخشی را در کنترل قارچ آسپرژیلوس داشته است و روش استفاده از دیسک کاغذی در غلظت ۵۰۰ میکرو لیتر بر لیتر بطور کامل از رشد قارچ *Aspergillus flavus* جلوگیری نموده ولی در روش ترکیب اسانس با محیط کشت، اثر کنترل‌کنندگی آن به غلظت بکار رفته بستگی داشت.

واژه‌های کلیدی: اسانس، پسته، درون شیشه‌ای، قارچ آسپرژیلوس، نعناع فلفلی

مقدمه

از جمله روش‌های سالم و بی‌خطر برای کنترل بیماری‌های پس از برداشت، استفاده از ترکیبات طبیعی تحت عنوان عصاره طبیعی یا اسانس‌های گیاهی است (Plotto et al., 2003). ترکیبات فرار (اسانس‌ها) ترکیباتی با فشار بخار بالا در دمای فیزیولوژیکی هستند که نه تنها به شکل مایع بلکه به شکل گاز نیز ارگانسیم‌ها را کنترل می‌کنند (Lanciotti et al., 2004). اسانس‌های گیاهی گستره وسیعی از متابولیت‌های ثانویه را شامل می‌شوند که توسط قسمت‌های مختلف گیاهان ساخته می‌شوند. در بیشتر پژوهش‌های انجام شده در مورد خواص ضد میکروبی ترکیبات شیمیایی نشان داده که فنل‌ها نسبت به الکل‌ها، آلدئیدها و اترها فعالیت ضد قارچی بالایی دارند (Plaza et al., 2004). خصوصیت چربی دوستی اسانس‌ها در بازدارندگی از رشد عوامل بیماری‌زا نقش مهمی دارد (Lanciotti et al., 2004). نتایج نشان می‌دهد که همه اسانس‌ها توانایی جلوگیری از رشد قارچ *Aspergillus flavus* را دارند. اسانس نعناع فلفلی توانایی حفظ ماندگاری روغن پسته می‌گردد (اسماعیلی و همکاران، ۱۳۹۷). لذا با توجه به موارد مذکور در این تحقیق به بررسی تأثیر اسانس نعناع فلفلی بر کنترل قارچ *Aspergillus flavus* پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

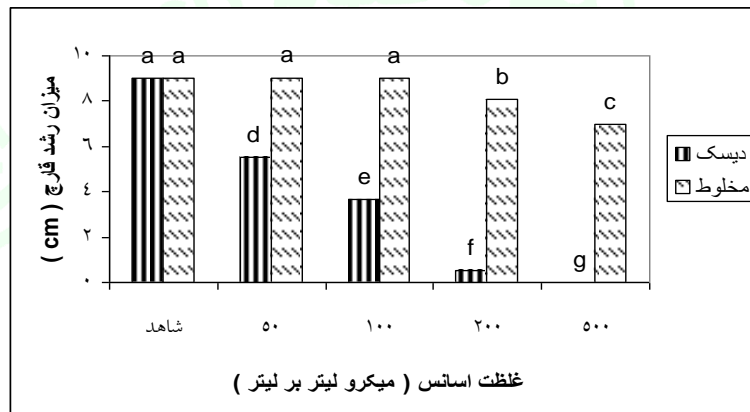
کلیه مراحل این پژوهش در آزمایشگاه قارچ شناسی و کنترل بیولوژیک گروه گیاه پزشکی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران در سال ۱۳۸۷ انجام گرفت. برای انجام این پژوهش از ایزوله‌های قارچ *Aspergillus flavus* موجود در گروه گیاه پزشکی استفاده

شد. اسانس پس از خریداری از شرکت تولید و فراوری گیاهان دارویی زربند جهت هر گونه آلودگی و ناخالصی با استفاده از میکرو فیلتر ۰/۲ میکرون ضد عفونی شده و در درون ظروف شیشه‌ای تیره که با فویل آلومینیومی پیچیده شده بود ریخته و در یخچال در دمای ۴ درجه نگهداری شد. سپس اثر بازدارندگی اسانس در شرایط درون شیشه‌ای به دو روش ترکیب اسانس با محیط کشت قارچ و استفاده از روش دیسک مورد بررسی قرار گرفت. در این پژوهش جهت انجام آزمایش در شرایط درون شیشه‌ای از محیط کشت PDA (ساخت شرکت مرک) استفاده گردید. پس از سرد شدن محیط کشت و رسیدن به دمای ۴۵-۴۰ درجه سانتی‌گراد استرپتومایسین به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر جهت حذف آلودگی‌های باکتریایی به محیط کشت افزوده شد (Plaza et al., 2004) و با یک همزن شیشه‌ای به هم زده شد تا کاملاً در درون محیط کشت پخش شود. وقتی که هنوز محیط کشت استریل گرم بود (حدود ۴۵ درجه سانتی‌گراد)، اسانس نعنای فلفلی به نسبت های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ میکرولیتر بر لیتر به آن اضافه شد. با توجه به اینکه اسانس‌ها ترکیبات روغنی هستند، حلالیت‌شان در آب کم است. بنابراین برای حل کردن اسانس در محیط کشت از حلال توئین ۸۰ با غلظت ۰/۰۵ درصد استفاده شد. به این صورت که ابتدا توئین ۸۰ با غلظت ۰/۰۵ درصد درست شد و سپس غلظت‌های مورد نظر از اسانس در توئین ۸۰ تهیه شده و وقتی دمای محیط کشت ۴۵-۴۰ درجه بود به محیط کشت اضافه شد و در تشتک‌های ۱۰ سانتی‌متری یکبار مصرف توزیع شد و اجازه داده شد تا جامد گردد. بلافاصله پس از آماده شدن محیط کشت، قارچ کشت شد. طرز تهیه محیط کشت برای اعمال تیمار اسانس‌ها در روش "استفاده از روش دیسک کاغذی" همانند قبل بوده به استثنای اینکه در این روش اسانس به محیط کشت اضافه نمی‌شود و محیط کشت تنها حاوی ۱۰۰ میکرولیتر بر لیتر استرپتومایسین می‌باشد و اسانس پس از کشت قارچ تیمار می‌شود. قارچ *Aspergillus flavus* که روی محیط کشت PDA تکثیر شده بود برای کشت استفاده شد. به این صورت که با استفاده از چوپ پنبه سوراخ کن دیسک‌هایی به قطر ۰/۵ سانتی‌متر از میسیلیوم‌های قارچ برداشته و در وسط پتری قرار داده شد و پس از اعمال تیمارها به شرح ذیل، در انکوباتور در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در روش ترکیب اسانس‌ها با محیط کشت، زمانی که محیط هنوز گرم و مایع است اسانس‌ها به آن اضافه می‌گردند تا با محیط مخلوط شده و همزمان با سرد شدن و بستن محیط اسانس هم در فاز جامد محیط به دام بیفتد. در روش دیسکی پس از توزیع محیط کشت، فضای خالی پتری دیش محاسبه شد و بر مبنای حجم فضای خالی موجود که قرار است اسانس بعد از تبخیر شدن در آن فضا به غلظت های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ میکرولیتر بر لیتر برسد، مقدار مورد نظر از اسانس با میکرو پیپت برداشته و روی دیسک‌های کاغذی از جنس کاغذ صافی (واتمن شماره ۱) به قطر ۲۰ میلی‌متر قرار داده شد. پس از قرار دادن کاغذ صافی آغشته به اسانس در داخل تشتک، بلافاصله دور آن پارافیلیم کشیده شد تا از تبخیر اسانس جلوگیری شود.

نتایج و بحث

نتایج نشان داد که اسانس نعنای فلفلی در روش ترکیب با محیط کشت در غلظت های ۵۰ و ۱۰۰ میکرو لیتر تأثیری بر رشد قارچ ندارد، شکل ۱. همچنین نتایج نشان داد روش استفاده از دیسک کاغذی در مقایسه با شاهد بطور قابل ملاحظه‌ای از رشد قارچ جلوگیری می‌نماید. نتایج نشان می‌دهد که با افزایش غلظت اسانس در هر دو روش اعمال تیمار اثر بازدارندگی بیشتر می‌شود. بطوری که در در غلظت ۵۰۰ میکرو لیتر بر لیتر در روش استفاده از دیسک کاغذی ۱۰۰ درصد باز دارندگی دارد. به طور کلی نتایج حاصل از بررسی اثر بازدارندگی اسانس‌های نعنای فلفلی بر رشد قارچ *Aspergillus flavus* در شرایط درون شیشه‌ای نشان می‌دهد که روش اعمال تیمار اثر قابل ملاحظه‌ای بر کارایی اسانس در بازدارندگی از رشد قارچ دارد، جدول ۱ به طور کلی خاصیت ضد قارچی و ضد باکتریایی اسانس‌ها در نتیجه فعالیت سینرژیستی ترکیبات موجود در آن می‌باشد. اسانس‌ها از نظر شیمیایی ترکیبات پیچیده هستند که اغلب انواع مختلف مواد شیمیایی در ترکیب آن‌ها وجود دارد که شامل هیدروکربن‌ها، الکل‌ها، کتون‌ها، آلدئیدها، اترها، فنل‌ها، و غیره می‌باشد که در هر اسانس یک یا چند گروه از این مواد نقش اصلی را در خواص اسانس بازی می‌کند (Bood and Zebataki, 2002) میزان فعالیت ضد قارچی ترکیبات فنلی بستگی به گروه هیدروکسیل و محل قرار گرفتن آن‌ها روی ساختار فضایی شان دارد (Dorman and Deans, 2000). گیاهان ترکیبات معطر زیادی تولید می‌کنند که بیشتر فنل و یا مشتقاتی از فنل می‌باشند. بیشتر این ترکیبات مسئول عطر و طعم در گیاهانی هستند که به عنوان غذا و یا دارو توسط انسان مصرف می‌شوند. اسانس‌های گیاهی فراوانی از گونه‌های مختلف در برابر پاتوژن‌های گیاهی مورد ارزیابی قرار گرفته و اثرات سودمند آن‌ها در کنترل پاتوژن‌های گیاهی به اثبات رسیده است. اسانس پونه کوهی

باعث تغییر در شیب pH در باکتری هایی که تحت تیمار با آن می گردد و تعادل pH مربوط به اثرات ضد میکروبی این ترکیبات قویاً به تراوش یون های ویژه بستگی دارد (Holyoak et al., 1996). به نظر می رسد اثر کنترل کنندگی اسانس ها علاوه بر اثر مستقیم اسانس ها روی قارچ به اثر اسانس ها در تحریک پاسخ های دفاعی گیاهان هم مربوط باشد.



شکل ۱- مقایسه اثر باز دارندگی غلظت های مختلف اسانس نعناع فلفلی بر رشد قارچ *Aspergillus flavus* در شرایط درون شیشه ای

جدول ۱- جدول تجزیه واریانس فعالیت ضد قارچی روش های مختلف اسانس

F ($\alpha = 0.05$)	SS	میانگین مربعات	درجه آزادی	منابع تغییرات
۴۰۰/۱۳ *	۲۹۰/۸۸۶۳۴۹	۱۴/۵۴۴۳۱۷	۲۰	اسانس
۲۹۱۳۶/۳ *	۱۰۵۹/۰۸۰۰۷۹	۱۰۵۹/۰۸۰۰۷۹	۱	روش اعمال
۲۱۶/۹۰ *	۱۵۷/۶۸۱۵۸۷	۷/۸۸۴۰۷۹	۲۰	اسانس × روش اعمال
		۰/۰۳۶۳۴۹	۸۴	خطا

ضریب تعیین $R=0.99$ ، ضریب تغییرات $C.V=3.35$ ، مقایسه تیمارها بر اساس روش LSD انجام شده است.

منابع:

اسماعیلی، م.، گلی، ا. ح. و شاکر اردکانی، احمد. ۱۳۹۷. تأثیر استفاده از اسانس نعناع فلفلی (*Mentha piperita*) بر مدت زمان ماندگاری روغن پسته. علوم و فن آوری پسته، ۲: ۹۴-۱۰۶.
توکلی پور، ح.، زبرجانی، ل. و جوانمرد داخلی، م. ۱۳۹۵. مقایسه تأثیر عصاره مریم گلی و زیره سبز در جلوگیری از توکسین-زایی قارچ آسپرژیلوس فلاووس در مغز پسته. نشریه نوآوری در علوم و فناوری غذایی، ۳۷: ۳۸-۴۲.

Bood, K.G., Zebatakis, I., 2002. The biosynthesis of strawberry flavor (II): biosynthetic and molecular biology studies. *Journal of Food Science*, 67:1-8.

Dorman H. Deans, S. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88: 308-316.

Holyoak, C. D., Stratford, M., McMullin, Z., Cole, M.B., Crimmins, K., Brown, A. J. P., Coote, P. J. 1996. Activity of the plasma membrane H^+ -ATPase and optimal glycolytic flux are required for rapid adaptation and growth of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of the weak-acid preservative ascorbic acid. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 3158-3164.

Lanciotti, R., Gianotti, A., Patrignani, F., Belletti, N., Guerzoni, M.E., Gardini, F. 2004. Use of natural aroma compounds to improve shelf life and safety of minimally processed fruits. *Journal of Science and Technology*, 15: 201-208.

Plaza, P., Torres, R., Lamarca, N., Vines, I. 2004. Evaluation of plant essential oils as commercial postharvest application of essential oils to control citrus decay. *Journal of Horticulture Science and Biotechnology*, 79: 935-940.

Investigation of the effect of using essential oils on fungal control (*Aspergillus flavus*) in vitro

Hamid Soleymani^{1*}, Yunes Mustofi²

^{1*} PhD Student, Department of Horticultural Science, Zanjan University, Zanjan, Iran and Researcher, Agricultural Engineering Research Institute, Karaj, Iran

².Professor, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Karaj, Iran

*Corresponding Author: gh.a.soleymani@gmail.com

Abstract

Aflatoxins are toxins produced by a number of fungi that grow on food and can cause aflatoxicosis in humans and domestic animals. A variety of chemicals, including fungicides, are used to prevent aflatoxin damage. On the other hand, due to the harmful effects of chemicals on nature and humans, it is necessary to use healthy non-chemical methods. Therefore, in order to use non-chemical methods to control aflatoxin poisoning caused by *Aspergillus flavus* in pistachio fruit, natural essential oils of peppermint was used in this study. All stages of research were performed in the laboratory of mycology and biological control of the Department of Plant Protection, Campus of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran in 2008 and 5 concentrations (50, 100, 200 and 500 microliters per liter) of essential oil by two methods of disk and combination of essential oil Was investigated. The results of the study of antifungal effects of essential oil in, in vitro showed that the ability of plant essential oils to control plant pathogens depends on concentration and method of treatment. In the present study, it was found that essential oils completely prevented the growth of *Aspergillus flavus* and their controlling effect depends on their concentration.

Keywords: Aspergillus, Essential oil, in vitro, *Mentha piperita*, pistachio.