Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 11:53 +0430 on Monday June 18th 2018

Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2018; 21(130): 63-73

# Effects of Aqueous Extracts and Essential Oils of Mentha and Satureja on the Aflatoxin $B_1$ Production by *Aspergillus flavus*

Maryam Sadrnia[1*]

1. Assistant Professor, Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran

Received: 26 Dec 2017, Accepted: 25 Feb 2018

**Abstract**

***Background:*** Aflatoxins are natural fungal toxins produced by Aspergillus species such as *A. flavus*. The toxins are poisoning and can cause tissue necrosis and liver cancer. The aim of this study was to determine the control of Aflatoxin $B_1$ production by extracts and essential oils.

***Materials and Methods:*** Aqueous extracts were prepared by heating and essential oil by Clevenger's apparatus. Antifungal activity of essential oil and aqueous extract of *Mentha pulegium* and *Satureja hortensis* were determined by disc diffusion and microplate dilution methods. Production control of Aflatoxin $B_1$ was investigated with concentrations under MIC(Minimum inhibitory growth concentration) of two materials and were determined by HPLC method.

***Results:*** The most zone of inhibition was 10% belonging to Satureja essential oil and its aqueous extracts with diameters of 26mm and 12mm, respectively. These values for *Mentha* extract and 10% essential oil were 18mm and 8mm respectively. MIC of the aqueous extract of Satureja and Mentha were 0.031 and 0.063mg/ml respectively, and 1% essential oil of two materials was 0.039 and 0.078 mg/ml, respectively. Aflatoxin $B_1$ produced by A. flavus in concentrations of 1%, 2% and 10% *Satureja* essential oil were 122, 113 and 134 ppb, in 1%, 2% and 10% Mentha were 163, 168 and 171 ppb, respectively. The aqueous extracts of 1% *Satureja* reduced the production of toxin as 58.1 and the 1% aqueous extract of *Mentha* as 39.6.

***Conclusion:*** The results of this study showed that both Satureja hortensis and Mentha pulegium have the ability to inhibit the growth of Aspergillus flavus fungus, as well as control of aflatoxin $B_1$ production in low concentrations and recommended for further studies.

***Keywords:*** Aflatoxin $B_1$, Aqueous extract, Aspergillus flavus, Essential oil, *Mentha pulegium*, *Satureja hortensis*

*Corresponding Author:
Address: Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran
Email: msadrnia@yahoo.com

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 11:53 +0430 on Monday June 18th 2018

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک

سال ۲۱، شماره ۱ (شماره پیاپی ۱۳۰)، فروردین ۱۳۹۷، ۷۳-۶۳

# بررسی اثرعصاره های آبی و اسانس های مرزه و پونه بر تولیدآفلاتوکسین $B_1$ قارچ آسپرژیلوس فلاوس

**مریم صدرنیا[1]***

۱.استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۰/۵، تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۲/۶

## چکیده

**زمینه و هدف:** آفلاتوکسین‌ها سموم قارچی طبیعی هستند که توسط گونه‌های قارچ آسپرژیلوس تولید شده و می‌توانند مسمومیت،نکروز بافتی وسرطان کبد ایجاد کنند. هدف از این مطالعه، امکان سنجی کنترل تولید آفلاتوکسین $B_1$ قارچ آسپرژیلوس فلاوس توسط عصاره ها و اسانس‌های گیاهی می باشد.

**مواد و روش‌ها:** عصاره های آبی با کمک روش حرارت دهی مستقیم و اسانس با دستگاه کلونجر، تهیه گردیدند. فعالیت ضدقارچی اسانس و عصاره آبی مرزه و پونه در غلظت‌های کاهشی متوالی به روش‌های انتشاردیسک و میکروپلیت دایلوشن تعیین گردید. سپس در غلظت‌های کمتر از حداقل غلظت ممانعت از رشد، اثر اسانس و عصاره آبی پونه و مرزه بر کنترل میزان تولید آفلاتوکسین $B_1$،با روش HPLC مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** بیشترین هاله ممانعت از رشد قارچ مربوط به اسانس۱۰ درصد مرزه و عصاره آبی آن به ترتیب با قطر هاله ۲۶ و ۱۲ میلی متر بود. این مقادیر برای اسانس۱۰ درصد و عصاره آبی پونه به ترتیب ۱۸ و ۸ میلی متر بود. MIC عصاره آبی مرزه و پونه به ترتیب ۰/۰۳۱و۰/۰۶۳ و اسانس ۱ درصد مرزه و پونه به ترتیب ۰/۰۳۹و ۰/۰۷۸ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر بود. میزان آفلاتوکسین $B_1$ تولید شده در معرض اسانس مرزه با غلظت‌های ۱ ،۲ و۱۰ درصد به ترتیب۱۲۲،۱۱۳و۱۳۴ واحد در بیلیون و درمعرض اسانس پونه با همین غلظت‌ها به ترتیب ۱۶۳، ۱۶۸ و ۱۷۱ واحد در بیلیون بود. عصاره آبی ۱ درصد مرزه تولید سم را به مقدار ۵۸/۱ درصد و عصاره آبی ۱ درصد پونه تولید سم را به مقدار ۳۹/۶ درصد کاهش داد.

**نتیجه گیری:** یافته های این تحقیق نشان داد که دو گیاه مرزه و پونه دارای توانایی ممانعت از رشد قارچ آسپرژیلوس فلاوس و کنترل تولید آفلاتوکسین $B_1$ در غلظت‌های پایین می باشند. این محصولات گیاهی جهت مطالعات بیشتر برای کنترل این قارچ پیشنهاد می شوند.

**واژگان کلیدی:** عصاره آبی، اسانس، مرزه، پونه، آفلاتوکسین $B_1$، آسپرژیلوس فلاوس

***نویسنده مسئول:** ایران، تهران ، دانشگاه پیام نور، گروه زیست شناسی

Email: msadrnia@yahoo.com

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 11:53 +0430 on Monday June 18th 2018

**مقدمه**

استفاده از گیاهان دارویی همزمان با پیدایش انسان‌ها آغاز شده است. با مطالعه در تمدن اقوام قدیمی، به مصرف گیاهان دارویی به عنوان دارو، سم و مواد پاک کننده برمی خوریم. در قرن‌های هشتم تا دهم میلادی، ابوعلی سینا و محمد زکریای رازی سبب توسعه دانش درمان بیماری‌ها با استفاده از گیاهان شدند. در قرن نوزدهم با گسترش و توسعه علوم مختلف، استفاده از مواد شیمیایی در تولید دارو، توجه محققین را به خود معطوف کرده و داروهای شیمیایی به سرعت جایگزین داروهای گیاهی گردیدند. اما دانشمندان پس از مواجه شدن با عوارض جانبی داروهای شیمیایی که بعضا پس از چند نسل ظاهر می‌شوند، به فکراستفاده از ترکیبات استحصال شده از گیاهان افتادند (۱، ۲). این موضوع یکی از دلایل استفاده رو به رشد از گیاهان به عنوان مواد طبیعی کم خطر، در دسترس و ارزان قیمت نسبت به آنتی بیوتیک های سنتتیک بوده است. هم چنین این داروهای گیاهی نزد مردم دارای مقبولیت بیش تری در مصرف هستند (۵-۳). در سال‌های اخیر استفاده از فرآورده های گیاهی در ممانعت عوامل بیماری‌زا از جمله ویروس‌ها، باکتری‌ها، قارچ-ها و انگل‌ها به طور گسترده مورد توجه قرار گرفته است.

آسپرژیلوس قارچی است که برخی از گونه‌های آن بیماری‌زا می باشند. آفلاتوکسین‌ها سموم قارچی طبیعی هستند که توسط گونه‌های قارچ آسپرژیلوس مانند آسپرژیلوس فلاوس تولید می شوند. تاکنون بیش از ۲۰ نوع آفلاتوکسین وجود دارد، اما چهار نوع اصلی آن شامل $G_1$، $B_1$، $B_2$ و $G_2$ می‌باشد. افلاتوکسین‌های $M_1$ و $M_2$ به ترتیب متابولیت‌های ناشی از هیدروکسیله شدن افلاتوکسین‌های $B_1$ و $B_2$ می‌باشند. این سموم می‌توانند مسمومیت، نکروز بافتی، سیروز و سرطان کبد ایجاد کنند(۶).

عصاره و اسانس‌های گیاهی از جمله موادی هستند که به عنوان فرآورده‌های ضدقارچی مورد استفاده قرار گرفته اند. در بررسی که در خصوص اثرات ضدقارچی عصاره های آبی شوید(*Anethum graveolens*) ، آویشن (*Thymus vulgaris*)، گشنی (*Coriandrum sativum*) و گل محمدی (*Rosa damascena*) روی سویه های جداسازی شده قارچ آسپرژیلوس فلاوس انجام گرفت، موثرترین ترکیبات ضدقارچی به ترتیب شامل عصاره های آبی شوید، آویشن، گشنیز و در نهایت گل محمدی بودند.

گیاه خوشبو و خوش طعم مرزه یکی از گیاهان محبوبی است که به طور گسترده در غذاهای اروپایی و آمریکای شرقی به کار گرفته می‌شود. از لحاظ گیاه شناسی، این گیاه متعلق به خانواده‌ی نعناع بوده و از لحاظ علمی نیز به نام *Satureja hortensis* شناخته شده است. این گیاه به شرایط آب و هوایی مختلف بسیار مقاوم است و برای رشد خود به نور خورشید نیازمند می‌باشد. مرزه در فاصله ماه‌های تیر تا شهریور در ایران به گل می‌نشیند. معمولا گونه‌های وحشی مختلفی در مورد مرزه وجود دارد. نوع و مقدار ترکیبات مرزه بسته به شرایط آب و هوایی، فصل کشت و ناحیه رویش ممکن است متفاوت باشد(۷). مرزه عمدتا حاوی ترکیبات فنلی تیمول و کارواکرول است(۸). این گیاه دارای اثرات ضد دردهای عضلانی، ضد تهوع، ضد اسهال و ضد بیماری‌های عفونی می باشد. هم‌چنین دارای اثرات هضم کننده غذا، خلط آور، ادرارآور، ضددرد، ضدسرطان، محرک و مقوی معده است( ۹ ، ۱۰).

گیاه دیگر مورد استفاده در این تحقیق پونه می باشد. این گیاه با نام علمی *Mentha pulegium* از گیاهان خانواده نعناعیان بوده و نام‌های دیگر آن نعناع آمریکایی، گیاه پشه و سبزی پودینگ است(۱۱، ۱۲). ترکیب اصلی موجود در اسانس این گیاه، روغن منتول است. اسانس پونه در صنعت عطرسازی کاربرد دارد. مصرف دارویی این گیاه بیشتر به علت خاصیت آرامش‌بخشی و رفع سوءهاضمه، روان‌کنندگی عادت ماهانه و گاهی تسریع سقط جنین بوده است. دم کرده برگ و گل پونه در رفع دل‌درد و آنفلوآنزا موثر است ( ۱۳).

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 11:53 +0430 on Monday June 18th 2018

هم‌چنین کاهش نفخ معده را نیز از خواص این گیاه ذکر می‌کنند(۱۴).

با توجه به خواص متعدد گیاهان پونه و مرزه، بررسی اثر این دو گیاه بر رشد قارچ آسپرژیلوس و توانایی تولید سم آن‌ها، جهت اثبات اثر و متعاقباً گسترش استفاده از این گیاهان در کنترل آلودگی مواد غذایی به این قارچ و سم مهلک آن و ممانعت از بروز مسمومیت‌های غذایی ضرورت دارد.

هدف از این مطالعه، بررسی اثر مقایسه ای عصاره‌های آبی و اسانس‌های مرزه و پونه بر تولید آفلاتوکسین $B_1$ توسط قارچ آسپرژیلوس فلاوس است.

## مواد و روش‌ها

سویه قارچ

سویه ی قارچی مورد بررسی شامل سویه استاندارد آسپرژیلوس فلاوس PTCC 2004 بود که از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه گردید.

تهیه گیاه

دو گیاه مرزه و پونه از مزرعه گیاهان دارویی در استان اصفهان تهیه شده و پس از شستشو در محلی به دور از نور خورشید و در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد طی چند روز خشک گردیدند و پس از آن با استفاده از دستگاه خرد کننده آسیاب شدند.

تهیه عصاره آبی

عملیات تهیه عصاره آبی با استفاده از دستگاه عصاره‌گیری رفلاکس به روش تقطیر انجام گردید. این دستگاه متشکل از یک بالن با حجم یک لیتر بود که به مبرد ۴۰ سانتی متری متصل است. برای شروع عصاره‌گیری در ابتدا مقدار مشخصی از گیاه خشک و آسیاب شده در بالن ریخته شده و با آب مقطر در حجمی معادل ۲/۵ برابر گیاه خشک مخلوط و حرارت داده شد تا به جوش آید. در این حالت دما برای مدت ۶ ساعت ثابت نگه داشته شد. بدین ترتیب، عصاره گیاهی از همه اندام های گیاه پونه و مرزه به دست آمد. برای صاف کردن عصاره ها و جداسازی مواد معلق ناخالص از سانتریفوژ استفاده شد.

تهیه اسانس

مقدار ۳۰ گرم پودر مرزه درون بالن دستگاه کلونجر ریخته شده و مقدار ۳۰۰ میلی لیتر آب مقطر به آن افزوده شد. به مدت ۲ ساعت به مخلوط حرارت داده شده و سپس اسانس تولید شده درون ظرف شیشه ای تیره رنگ دربسته درون یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. اسانس گیاه پونه نیز مطابق روش فوق‌الذکر تهیه و نگهداری شد.

روش دیسک دیفوژن

از کشت تازه قارچ که در محیط کشت YES (Yeast Extract Sucros Broth) مایع تهیه شده بود، در محیط کشت PDA (Potato Dextrose Agar) کشت چمنی گسترده داده شد. پس از آن دیسک های بلانک روی آگار قرار داده شدند. سپس دیسک‌ها با مقدار ۲۰ میکرولیتر از هر کدام از غلظت های اسانس یا عصاره آبی توسط سمپلر و به آرامی تلقیح شدند. پس از ۴۸ تا ۷۲ ساعت انکوباسیون در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، قطرهاله عدم رشد از پشت پلیت با خط کش میلی‌متری اندازه گیری شد.

روش میکروپلیت دایلوشن

با کمک روش میکروپلیت دایلوشن حداقل غلظت مهارکننده (MIC) با استفاده از پلیت‌های ۹۶ خانه تعیین گردید. بدین منظور، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپور قارچ معادل غلظت نیم مک فارلند تهیه شده به هر یک از چاهک های پلیت ۹۶ خانه اضافه شد، یعنی به همه ۹۶ خانه (از خانه ی ۱۰-۱)، ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت حاوی اسپور اضافه شد. سپس به چاهک اول ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آبی یا اسانس اضافه شده و کاملا سمپلینگ گردیده و از آن ۱۰۰ میکرولیتر برداشته به چاهک بعدی اضافه شد. کار به همین ترتیب تا شماره ۱۰ ادامه یافت. شماره ی ۱۱ (کنترل

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 11:53 +0430 on Monday June 18th 2018

مثبت) حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت دارای اسپور قارچ بود. به دلیل این که عصاره‌ها عموماً رنگی بوده و در خواندن جذب نوری ایجاد خطا می‌کنند، از این رو شماره ۱۲ (شاهد) حاوی ۱۰۰ میکرولیتر عصاره یا اسانس خالص برای مشاهده‌ی جذب نوری عصاره یا اسانس بود. جذب نوری تمامی میکروپلیت ها در طول موج ۵۴۵ نانومتر دستگاه الایزا ریدر خوانده شدند.

سنجش آفلاتوکسین

برای ارزیابی و تعیین مقدار آفلاتوکسین $B_1$ تولید شده توسط قارچ، مقادیر آفلاتوکسین $B_1$ توسط دستگاه HPLC مدل اندازه گیری شد. ابتدا ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون قارچ آسپرژیلوس فلاوس به ۵۰ میلی لیتر محیط کشت YES مایع که در ارلن‌های جداگانه تحت تأثیر اسانس ۱، ۲ و ۱۰ درصد و عصاره آبی ۱ درصد گیاه مرزه و پونه قرار داشتند، تلقیح شده و ارلن‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در تاریکی به مدت ۸ تا ۱۰ روز انکوبه شدند. پس از آن میسلیوم-های رشد کرده بر سطح محیط کشت با عبور دادن محیط کشت از کاغذ صافی، جداسازی شده و محلول حاصله از کاغذ واتمن شماره ۱ نیز گذرانده شد. سپس محلول صاف شده برای سنجش آفلاتوکسین $B_1$ به آزمایشگاه مرجع سنجش آفلاتوکسین (مرجعان خاتم) ارسال گردید. نمونه ها بعد از پاک‌سازی به روش KHA-S001، مطابق با رفرنس استاندارد ملی ۶۸۷۲ مورد تحلیل قرار گرفتند.

## یافته‌ها

نتایج بررسی کیفی

اثر غلظت‌های مختلف دو نوع اسانس و عصاره گیاهی به روش انتشار دیسک (کربی بائر) انجام شد. در جدول ۱ نتایج بررسی اثر غلظت‌های متفاوت اسانس گیاه مرزه با روش کربی بائر(انتشار دیسک) بر قارچ آسپرژیلوس فلاوس ارائه شده است. نتایج نشان می دهد که اسانس ۱ درصد مرزه هاله ای با قطر ۷ میلی‌متر، اسانس ۲ درصد هاله ای با قطر ۱۸ میلی‌متر و اسانس ۱۰ درصد مرزه هاله ای با قطر ۲۶ میلی‌متر ایجاد نموده است.

بررسی اثر غلظت‌های متفاوت اسانس گیاه پونه با روش کربی بائر(انتشار دیسک) بر قارچ آسپرژیلوس فلاوس نیز نشان می‌دهد که اسانس ۱ درصد پونه هاله ای با قطر ۷ میلی‌متر، اسانس ۲ درصد هاله ای با قطر ۱۰ میلی‌متر و اسانس ۱۰ درصد مرزه هاله ای با قطر ۱۸ میلی‌متر ایجاد نموده است.

**جدول ۱. بررسی اثر اسانس مرزه و پونه بر مهار رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس در روش کربی بائر(انتشار دیسک)**

| درصد غلظت اسانس | قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر) | |
|---|---|---|
| | مرزه (*Saturejahortensis*) | پونه (*Mentha pulegium*) |
| ۱ | ۷ | ۷ |
| ۲ | ۱۸ | ۱۰ |
| ۱۰ | ۲۶ | ۱۸ |

ارزیابی اثر ضدقارچی عصاره آبی مرزه و پونه به روش دیسک دیفیوژن بر روی قارچ آسپرژیلوس فلاوس مشخص نمود که عصاره آبی این دو گیاه سبب کاهش و ممانعت از رشد قارچ شده اند.

نتایج بررسی اثر عصاره آبی گیاه مرزه و پونه بر مهار رشد قارچ آسپرژیلوس فلاوس در روش کربی بائر(انتشار دیسک) نشان می دهند که قطر هاله بازدارندگی رشد عصاره آبی گیاه مرزه ۱۲ میلی‌متر بوده و در شرایط یکسان قطر هاله بازدارندگی رشد عصاره آبی ۱ درصد گیاه پونه ۸ میلی‌متر

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 11:53 +0430 on Monday June 18th 2018

بوده است. با توجه به نتایج به دست آمده می توان گفت که عصاره آبی ۱ درصد مرزه دارای اثر ضدقارچی بالاتری نسبت به عصاره آبی ۲ درصد این گیاه می باشد.

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی رشد (MIC)

حداقل غلظت بازدارندگی رشد (MIC) اسانس گیاه مرزه بر حسب میلی‌گرم بر میلی لیتر در غلظت‌های مختلف به روش میکروپلیت دایلوشن بر قارچ آسپرژیلوس فلاوس تعیین گردید. همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌گردد، اسانس ۱ و۲ درصد گیاه مرزه در غلظت ۰/۰۳۹ میلی‌گرم بر میلی لیتر و اسانس ۱۰ درصد مرزه در غلظت ۰/۱۹۵ میلی‌گرم بر میلی لیتر مانع رشد قارچ شده اند.

**جدول ۲. حداقل غلظت بازدارندگی رشد(MIC) غلظت‌های مختلف اسانس گیاه مرزه و پونه بر حسب میلی‌گرم بر میلی لیتر**

| درصد غلظت اسانس | قطر هاله عدم رشد (میلی متر) | |
|---|---|---|
| | مرزه (*Satureja hortensis*) | پونه (*Mentha pulegium*) |
| ۱ | ۰/۰۳۹ | ۰/۰۷۸ |
| ۲ | ۰/۰۳۹ | ۰/۱۵۶ |
| ۱۰ | ۰/۱۹۵ | ۰/۱۹۵ |

نتایج بررسی حداقل غلظت بازدارندگی رشد اسانس پونه بر قارچ آسپرژیلوس فلاوس نشان می دهند که اسانس پونه در غلظت ۱ درصد دارای MIC، ۰/۰۷۸ میلی-گرم بر میلی لیتر، در غلظت ۲ درصد دارای MIC، ۰/۱۵۶ میلی‌گرم بر میلی لیتر و در غلظت ۱۰ درصد دارای MIC، ۰/۱۹۵ میلی‌گرم بر میلی لیتر می باشد.

در ادامه کار، حداقل غلظت بازدارندگی رشد (MIC) عصاره آبی دو گیاه مرزه و پونه به روش میکروپلیت دایلوشن به دست آمد. MIC حاصل از بررسی اثر عصاره آبی ۱ درصد مرزه بر قارچ آسپرژیلوس فلاوس مقدار ۰/۰۳۱ میلی‌گرم بر میلی لیتر و MIC حاصل از بررسی اثر عصاره آبی ۱ درصد پونه مقدار ۰/۰۶۳ میلی‌گرم بر میلی لیتر است.

کروماتوگرافی فاز مایع با کارآیی بالا (HPLC)

با توجه به این که اسانس و عصاره آبی گیاه مرزه و پونه در غلظت MIC و غلظت‌های بالاتر از آن مانع رشد قارچ می‌گردند، طبعا جستجوی سم در این محیط‌ها بی نتیجه خواهد بود. بنابراین ضرورت دارد برای بررسی میزان ممانعت از تولید سم، تست HPLC بر روی نمونه های حاوی غلظت-های کمتر از MIC اسانس و عصاره آبی صورت گیرد.

جهت انجام تست HPLC از هر غلظت اسانس و عصاره آبی دو گیاه مرزه و پونه، یک نمونه با یک غلظت پایین تر از MIC انتخاب و بررسی میزان ممانعت از تولید سم بر روی آن‌ها انجام گرفت. با توجه به نتایج ارائه شده در جدول ۳، میزان آفلاتوکسین $B_1$ تولید شده توسط قارچ آسپرژیلوس فلاوس قرار گرفته در معرض اسانس مرزه با غلظت‌های ۱ ، ۲ و ۱۰ درصد به ترتیب ۱۱۳، ۱۲۲و ۱۳۴ واحد در میلیارد می باشد.

**جدول ۳. مقایسه میزان تولید آفلاتوکسین $B_1$ در غلظت‌های مختلف اسانس گیاه مرزه**

| نوع نمونه | رقت نمونه | غلظت اسانس(میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) | غلظت آفلاتوکسین $B_1$(واحد در میلیارد) | درصد تولید آفلاتوکسین $B_1$ |
|---|---|---|---|---|
| شاهد مثبت | ۰ | ۰ | ۲۷۰ | ۱۰۰ |
| شاهد منفی | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ |
| اسانس ۱ درصد مرزه | ۱/۵۱۲ | ۰/۰۲۰ | ۱۱۳ | ۴۱/۹ |
| اسانس ۲ درصد مرزه | ۱/۱۰۲۴ | ۰/۰۱۶ | ۱۲۲ | ۴۵/۲ |
| اسانس ۱۰ درصد مرزه | ۱/۱۰۲۴ | ۰/۰۱۶ | ۱۳۴ | ۴۹/۶ |

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 11:53 +0430 on Monday June 18th 2018

میزان آفلاتوکسین $B_1$ تولید شده توسط آسپرژیلوس فلاوس قرار گرفته در معرض اسانس پونه با غلظت‌های ۱ ، ۲ و ۱۰ درصد ارائه شده در جدول ۴ نیز به ترتیب ۱۶۳، ۱۶۸ و ۱۷۱ واحد در میلیارد بود.

**جدول ٤. مقایسه میزان تولید آفلاتوکسین $B_1$ در حضور غلظت‌های مختلف اسانس گیاه پونه**

| نوع نمونه | رقت نمونه | غلظت اسانس (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) | غلظت آفلاتوکسین $B_1$(بر حسب واحد در میلیارد) | تولید آفلاتوکسین $B_1$(درصد) |
|---|---|---|---|---|
| شاهد مثبت | ۰ | ۰ | ۲۷۰ | ۱۰۰ |
| شاهد منفی | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ |
| اسانس ۱ درصد پونه | ۱/۲۵۶ | ۰/۰۳۹ | ۱۶۳ | ۶۰/۴ |
| اسانس ۲ درصد پونه | ۱/۲۵۶ | ۰/۰۷۸ | ۱۶۸ | ۶۲/۲ |
| اسانس ۱۰ درصد پونه | ۱/۱۰۲۴ | ۰/۰۹۸ | ۱۷۱ | ۶۳/۳ |

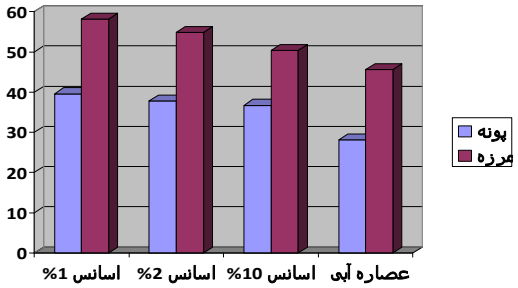
پس از بررسی مقایسه توانایی ممانعت از تولید سم غلظت‌های مختلف اسانس مرزه و پونه که قارچ در معرض آن‌ها قرار گرفته بود، بررسی اثر ممانعت از تولید سم عصاره آبی این دو گیاه نیز انجام شد که نتایج آن در جدول ۵ ارائه شده است. مشاهده می‌شود که عصاره آبی ۱ درصد پونه توانست سبب کاهش تولید سم تا مقدار ۱۹۴ واحد در میلیارد گردد. عصاره آبی ۱ درصد گیاه مرزه نیز تولید سم را تا ۱۴۷ واحد در میلیارد کاهش داد.

**جدول ٥. مقایسه میزان تولید آفلاتوکسین $B_1$ در حضور عصاره آبی گیاه مرزه و پونه**

| نوع نمونه | رقت نمونه | غلظت عصاره آبی (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) | غلظت آفلاتوکسین $B_1$ (واحد در میلیارد) | تولید آفلاتوکسین $B_1$(درصد) |
|---|---|---|---|---|
| شاهد مثبت | ۰ | ۰ | ۲۷۰ | ۱۰۰ |
| شاهد منفی | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ |
| عصاره آبی ۱ درصد پونه | ۱/۲۵۶ | ۰/۰۳۱ | ۱۹۴ | ۷۱/۹ |
| عصاره آبی ۱ درصد مرزه | ۱/۵۱۲ | ۰/۰۱۶ | ۱۴۷ | ۵۴/۴ |

اگر میزان تولید آفلاتوکسین $B_1$ توسط قارچ آسپرژیلوس فلاوس در نمونه شاهد مثبت ۱۰۰ درصد (درصد ممانعت از تولید سم صفر درصد) در نظر گرفته شود، درصد ممانعت از تولید سم آفلاتوکسین $B_1$ در هنگام تماس قارچ آسپرژیلوس فلاوس با اسانس و عصاره گیاه قابل محاسبه است. بدین ترتیب مشخص می گردد که درصد ممانعت از تولید سم آفلاتوکسین $B_1$ در سه غلظت ۱ ، ۲ و ۱۰ درصد اسانس مرزه به ترتیب ۵۸/۱ ، ۵۴/۸ و۵۰/۴ درصد می باشد. درصد ممانعت از تولید سم ارائه شده در نمودار فوق نشان می‌دهد که میزان بازدارندگی تولید آفلاتوکسین $B_1$ برای غلظت‌های۱ ، ۲ و ۱۰ درصد اسانس پونه به ترتیب ۳۹/۶ ، ۳۷/۸ و ۳۶/۷ درصد بوده است. عصاره آبی مرزه نیز توانسته به مقدار ۴۵/۶ درصد و عصاره آبی پونه به مقدار ۲۸/۱ درصد میزان تولید سم آفلاتوکسین $B_1$ قارچ آسپرژیلوس فلاوس را کاهش دهد(نمودار ۱).

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 11:53 +0430 on Monday June 18th 2018




**نمودار ۱. مقایسه درصد ممانعت از تولید سم آفلاتوکسین در حضور اسانس وعصاره آبی مرزه و پونه**

## بحث

در این تحقیق مشخص گردید که اسانس و عصاره آبی دو گیاه مرزه و پونه دارای اثر مناسبی بر رشد قارچ آسپرژیلوس فلاوس و هم‌چنین ممانعت از تولید سم آفلاتوکسین $B_1$ می باشند. تاکنون ۱۲۰ نوع قارچ دارای توانایی تولید سم شناسایی شده است. از جمله مهم‌ترین کپک‌های توکسین‌زا آسپرژیلوس فلاوس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس می‌باشند(۱۵). اسانس‌ها و عصاره های گیاهی از گذشته مورد استفاده قرار می گرفته‌اند. هم اکنون نیز با توجه به اثرات جانبی بسیار کمتر این گیاهان نسبت به ترکیبات شیمیایی، تحقیقات متنوعی در خصوص بررسی اثر آن‌ها بر کنترل رشد قارچ‌ها و تولید سم آن‌ها صورت گرفته است.

دو گیاه مرزه و پونه با توجه به خواص متعدد و متنوع از جمله خصوصیات ضد میکروبی و ضدقارچی و هم-چنین متداول بودن مصرف آن‌ها در رژیم غذایی اقوام و ملل مختلف، دارای اهمیت و جایگاه ویژه ای می باشند. این نکته از این نظر حائز اهمیت است که افزودن اسانس و عصاره این دو گیاه به مواد غذایی از دیدگاه ذائقه مصرف کنندگان، هیچ‌گونه دافعه ای ایجاد ننموده، بلکه جذابیت نیز دارد. طی مطالعات انجام شده داخلی و خارجی اثرات ضد قارچی این دو گیاه به اثبات رسیده است. به عنوان مثال، راد و همکاران نشان دادند که مرزه در غلظت ۴۰۰ واحد در میلیون رشد قارچ آسپرژیلوس را کنترل می کند(۱۶).

پریاگو و همکاران دریافتند که کارواکرول، تیمول و پاراسیمن موجود در اسانس مرزه اثر هم افزایی بر یکدیگر داشته و سبب ممانعت از رشد میکروب‌ها می شوند(۱۷). دیکباز و همکاران در سال ۲۰۰۸ و رزاقی ابیانه و همکاران درسال ۲۰۰۸ طی پژوهش‌های جداگانه ای دریافتند که ماده کارواکرول باعث کنترل غلظت آفلاتوکسین در غلات می‌شود(۱۸، ۱۹). هم‌چنین افشاری طی مطالعه ای مشخص نمود که اسانس گیاه مرزه تولید آفلاتوکسین $B_1$ توسط آسپرژیلوس فلاووس را به طور معنی‌داری کاهش می-دهد(۲۰). گران و همکاران در سال ۱۳۹۴ در خصوص تاثیر اسانس و عصاره‌های مختلف مرزه ماکروسیفون و خوزستانی بر رشد میسیلومی و تولیدآفلاتوکسین $B_1$ قارچ آسپرژیلوس نتیجه گرفتند که اسانس و عصاره اتانولی مرزه خوزستانی به طور قابل توجهی از رشد قارچ و تولید آفلاتوکسین جلوگیری می‌کنند(۲۱). یزدان پناه گوهرریزی و همکاران در ارزیابی اثرات ضد قارچی اسانس گیاه مرزه بر روی قارچ پاتوژن *Alternaria citri* نتیجه گرفتند که اسانس مرزه در غلظت ۴۰۰ واحد در میلیون به بالا در محیط کشت به طور کامل بر روی رشد قارچ اثر داشته و مانع رشد آن می گردد(۲۲).

در تحقیق حاضر، اسانس مرزه در غلظت ۰/۰۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تولید آفلاتوکسین $B_1$ را به میزان ۵۸/۱ کاهش داد.

منیره و همکاران نیز طی مطالعه ای نشان دادند که اسانس روغنی پونه توانایی بالایی در کنترل رشد قارچ‌های آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس و تولید سم توسط آن‌ها دارد(۲۳). ملایی و همکاران دریافتند که عصاره گیاه پونه به طور معنی داری رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس را کاهش می دهد(۲۴). در این پژوهش نیز اسانس پونه در غلظت ۰/۰۳۹میلی‌گرم بر میلی لیتر تولید آفلاتوکسین $B_1$ را به میزان ۳۹/۶ درصد کاهش داد. در تحقیق حاضر اثر اسانس و عصاره آبی دو گیاه مرزه و پونه بر رشد قارچ آسپرژیلوس فلاوس و هم‌چنین ممانعت از تولید سم آفلاتوکسین $B_1$ مورد

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 11:53 +0430 on Monday June 18th 2018

ارزیابی قرار گرفت. با توجه به نتایج جدول ۱ مشاهده می شود که قطر هاله ممانعت از رشد اسانس مرزه بر قارچ آسپرژیلوس فلاوس در روش دیسک دیفیوژن در سه غلظت ۱، ۲، و ۱۰ درصد، سیر افزایشی داشته و با بالا رفتن غلظت اسانس، قطر هاله نیز بیشتر می گردد. هم‌چنین بررسی اثر اسانس گیاه پونه به روش دیسک دیفیوژن بر رشد قارچ آسپرژیلوس فلاوس نیز نشان می دهد که با افزایش غلظت اسانس پونه قطر هاله ممانعت از رشد افزایش می یابد.

با مقایسه نتایج جدول ۱ مشخص می‌گردد که قطر هاله مانعت از رشد اسانس هر دو گیاه مرزه و پونه با بالا رفتن غلظت افزایش یافته، اما این افزایش در مورد اسانس مرزه بسیار بیش از اسانس پونه است، به طوری‌که قطر هاله ایجاد شده توسط اسانس مرزه از ۷ میلی‌متر در غلظت ۱ درصد به ۱۸ میلی‌متر در غلظت ۲ درصد و ۲۶ میلی متر در غلظت ۱۰ درصد رسیده است. درحالی‌که افزایش قطر هاله ایجاد شده توسط اسانس پونه در همین غلظت‌ها به ترتیب ۷ ، ۱۰ و ۱۸ میلی متر بوده است.

در نهایت نتیجه گیری می شود که اثر ممانعت از رشد قارچ اسانس مرزه نسبت به اسانس پونه در روش دیسک دیفیوژن بسیار بیشتر است. نتایج بررسی اثر عصاره آبی گیاه مرزه و پونه بر مهار رشد قارچ آسپرژیلوس فلاوس در روش کربی باثر(انتشار دیسک) نشان می دهد که عصاره آبی مرزه نسبت به عصاره آبی پونه تقریبا دارای اثر ۵۰ درصد بیشتر بوده است. به طورکلی، در صورت مقایسه نتایج بررسی اثر عصاره آبی گیاه مرزه و پونه بر مهار رشد قارچ آسپرژیلوس فلاوس در روش کربی باثر با نتایج جدول ۱ مجدداً مشخص می گردد که اثر ضدقارچی اسانس و عصاره آبی گیاه مرزه بسیار بیشتر از اسانس و عصاره آبی گیاه پونه است.MIC حاصل از بررسی اثر اسانس گیاه مرزه(جدول ۲) در سه غلظت ۱، ۲ و ۱۰ درصد به روش میکروپلیت دایلوشن نشان می دهد که هر دو اسانس ۱ و ۲ درصد دارای MIC برابر و یکسان بوده است، اما اسانس ۱۰ درصد، MIC بالاتری داشته است که نشان از اثربخشی کمتر آن است.

هم‌چنین MIC حاصل از بررسی اثر اسانس گیاه پونه (جدول ۲) در سه غلظت ۱، ۲ و ۱۰ درصد بر قارچ نیز نشان می دهد که اسانس ۱ درصد دارای MIC کمتری نسبت به اسانس ۲ و ۱۰ درصد بوده و اسانس ۲ درصد نیز دارای MICکمتری نسبت به اسانس ۱۰ درصد می باشد، بدین معنی که با افزایش غلظت اسانس MIC نیز بالا می رود. به عبارتی اسانس گیاه پونه در غلظت ۱ درصد دارای بیشترین اثر بازدارندگی بر رشد قارچ، اسانس ۲ درصد دارای اثر متوسط و اسانس ۱۰ درصد دارای کمترین اثر بوده است. به نظر می رسد که علت اثر کمتر اسانس ۱۰ درصد پونه و مرزه نسبت به اسانس‌های ۱ و ۲ درصد این دو گیاه، غلظت بالای ذرات روغنی اسانس در حلال آب و در نتیجه بروز پدیده عدم نفوذ کافی این ذرات از دیواره سلولی هیف‌های قارچ به درون سلول‌ها می باشد. از طرفی با مقایسه نتایج حاصل از انجام روش میکروپلیت دایلوشن اسانس مرزه و پونه بر قارچ آسپرژیلوس فلاوس در جدول ۲، مشاهده می‌گردد که در غلظت ۱۰ درصد مقدار MIC هر دو اسانس مرزه و پونه با یکدیگر برابر بوده که بیان‌گر اثر یکسان آن‌هاست. هم‌چنین مقدارMIC اسانس‌های ۱ و ۲ درصد کمتر از ۱۰ درصد بوده که به معنی اثر بیشتر این دو غلظت می باشد. اما نکته مهم و قابل توجه این است که در دو غلظت اصلی ۱ و ۲ درصد، اسانس مرزه دارای MIC پایین تری نسبت به اسانس پونه در همین غلظت‌ها بوده که به معنی اثر ضد قارچی بیشتر اسانس مرزه نسبت به اسانس پونه است.

نتایج ادامه تحقیق نشان دهنده مقدار MIC عصاره آبی دو گیاه مرزه و پونه به روش میکروپلیت دایلوشن است. MIC عصاره آبی گیاه مرزه نسبت به عصاره آبی گیاه پونه مقدار کمتری را نشان می‌دهد که به مفهوم بالاتر بودن اثر ضدقارچی عصاره آبی مرزه نسبت به عصاره آبی پونه می‌باشد. نتایج حاصل از بررسی حداقل غلظت بازدارندگی

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 11:53 +0430 on Monday June 18th 2018

رشد (MIC) عصاره آبی گیاه مرزه و پونه و نتایج بررسی حداقل غلظت بازدارندگی رشد (MIC) اسانس گیاه مرزه و پونه یکدیگر را تایید نموده و به اثربخشی بیشتر گیاه مرزه بر ممانعت از رشد قارچ آسپرژیلوس فلاوس اشاره دارند.

در ادامه، با توجه به نتایج جدول ۳ و نمودار ۱ می‌توان این‌گونه استنتاج نمود که میزان ممانعت از تولید آفلاتوکسین $B_1$ توسط اسانس۱ و ۲ درصد بیشتر از غلظت ۱۰ درصد اسانس می باشد. اسانس ۱۰ درصد نیز دارای توانایی ممانعت از تولید سم متوسطی بوده است. در صورت مقایسه درصد ممانعت از تولید سم آفلاتوکسین $B_1$ توسط غلظت-های مختلف اسانس پونه(جدول ۴ و نمودار ۱) نیز مشخص می‌گردد که اسانس ۱ و ۲ درصد دارای بیشترین و اسانس ۱۰ درصد دارای کمترین توانایی بازدارندگی از تولید سم بوده است.

در یک نگاه اجمالی به نتایج ارائه شده در جداول ۳ و ۴ و نمودار ۱، مشخص می شود که اسانس مرزه در هر سه غلظت ۱، ۲ و ۱۰ درصد دارای اثر بالاتری نسبت به اسانس پونه در همان غلظت‌ها بوده است. این امر البته در هنگام بررسی اثر این دو گیاه بر رشد قارچ آسپرژیلوس فلاوس نیز مشاهده شده و در واقع نتایج تست HPLC موید نتایج بررسی رشد می باشند. از طرفی با بررسی نتایج جدول ۵ و نمودار ۱ و مقایسه آن‌ها مشاهده می گردد که قدرت ممانعت از تولید سم آفلاتوکسین $B_1$ عصاره آبی مرزه نزدیک به دو برابر این توانایی در عصاره آبی گیاه پونه است که این نتیجه نیز مانند نتایج مذکور دال بر موثرتر بودن اسانس و عصاره آبی گیاه مرزه در ممانعت از رشد قارچ آسپرژیلوس فلاوس و تولید سم آفلاتوکسین $B_1$ می باشد.

## نتیجه گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می دهد که عصاره آبی و اسانس گیاه مرزه و پونه در غلظت‌های پایین دارای اثر ضد قارچی خوبی بر علیه قارچ آسپرژیلوس فلاوس هستند. هم‌چنین عصاره آبی و اسانس گیاه مرزه نسبت به عصاره آبی و اسانس گیاه پونه اثر بسیار بیشتری داشته و توانایی بسیار بالاتری در کنترل رشد و تولید سم دارند. با اثبات اثرات ممانعتی اسانس و عصاره های آبی گیاهان بر رشد قارچ آسپرژیلوس و تولید سم آفلاتوکسین $B_1$ توسط آن، می توان در آینده با خالص سازی ماده موثره گیاهان، به تولید ترکیباتی با اثرات ضدقارچی بالا و عوارض جانبی کم دست یافت.

## تشکر و قدردانی

نویسنده از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه پیام نور کمال تشکر و امتنان را دارد.

## منابع

1.Marjorie MC. Plant Products as Antimicrobial Agents.Clin Microb Rev 1999; 12: 564-582.
2.Thomson WAR. Medicines from the Earth. Maidenhead, United Kingdom: McGraw-Hill Book Co.; 1978.
3.Present. Traditional Medicine & Materia medica. Vol. 1. Tehran, Iran; Published TMRC; 2002: p:2-20.(Persian).
4.WHO Traditional Medicine Strategy 2002-2005, Geneva. 2002; 1-3:43-47.
5.The promotion & development of traditional medicine Report of a WHO meeting" WHO Report series, No.622, Switzerland. 1978; 8-13: 36-9.
6.Aflatoxins: A Global Concern for Food Safety, Human Health and Their Management . Front Microbiol. 2016; 7: 2170.
7.Jamzad Z. thymus and Satureja speices of Iran. Research Institute of Forestes and Rangelands. 2009; 78-132.
8.Sefidkon F, Sadeghzadeh L, Teimouri M, Asgari F, Ahmadi Sh. Antimicrobial effects of the essential oils of two Satureja species in two harvesting time. J.Med. and Arommatic plants. 2007; (23)2:174-182.

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 11:53 +0430 on Monday June 18th 2018

9.Saleh Mh. Medicinal plants and plant cure. Donyaye taghzieh 2014.
10.Behravan J, Mostafa F, Karimi Gh. Iranshahi M. The Effects of Sovary extraction and essential oil on leukocyte DNA Prodaction: an invitro study. J med. and Aromatic plants. 2007; (22)6:64-70.
11.Gunby, Phil. (1979). "Medical News: Plant Known for Centuries Still Causes Problems Today." Journal of the American Medical Association 241(21): 2246-2247.
12.Keville, Kathi. (1994). Herbs: An Illustrated Encyclopedia. New York, New York: Friedman/Fairfax Publishers. Pp. 128.
13.Kowalchik, Claire, and William H. Hylton, eds. (1998).Rodale's Illustrated Encyclopedia of Herbs. Emmaus, Pennsylvania: Rodale Press. Pp. 412-414.
14.Ritchason, Jack. (1995). The Little Herb Encyclopedia: The Handbook of Natures Remedies for a Healthier Life. 3d ed. Pleasant Grove, Utah: Woodland Health Books. 171.
15.Gulluce m., Socallus cultures of kmen M. daferera d., agar g., ozkan h., kartal n., polissiou a. and sahin f., 2003. In vitro antibacterial, antifungal and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of herbal parts and callus culture of Satureja hortensis L. journal of agriculture and food chemistry. 51(14):3958-3965.
16.Rad S, Afshari H, Hokmabadi H,Tahmasbi S. Study of Anti FungalEffects of Herbal Essences onAspergillus Parasiticus, A producer ofAflatoxin In pistachio. Journal ofmedicinal plant Research. 2011; 5(20): 5155-5159.
17. Periago P.m., Delgado B., Femandez P.s., Paplo 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. Dikbas n., kotan r., dadasoglu f. and sahin f., 2008. Control of Aspergillus flavus with essential oil and methanol of food microbiology. 124:179-182.
19. Razzaghi-abyaneh m., ghahfarokhi s., yoshinari m., rezaee t., jaimand m.b., Nagasawa k. and sakuda s., 2008. Inhibitory effects of Satureja hortensis L. essential oil on growth and aflatoxin production by Aspergillus flavus. international journal of food microbiology. 3:36-40.
20.Hossein Afshari, Fereshteh Zivahi, Gholamreza Bagheri Mehdi Afshari, Masoud Bagherzadeh. Antifungal Effects of Medicinal Plants on Growth of Aspergillus Flavus and Production of Aflatoxin B1 in Pistachios.1396.
21. Gran Akbar, Salehnia Benntolhoda, Alizadeh HamidReza, Farzaneh Mohsen, Shivazad Mahmoud. Effect of Essential Oil and Different Extracts of Saturea on Mucillium Growth and Production of Aflatoxin B in Aspergillus Flavus - Journal of Veterinary Research, Vol. 70 - No. 2 ,1394.
22. Yazdan Panah Goharzizi Laleh, Sepahdari Abolfazl, Sharifpour Isa. Scientific Journal of Fisheries of Iran. No3, Vol. 21, 1393.
23. Anti-aflatoxigenic effect of essential oils on AspergillusSpp. isolated from pistachio in Saudi Arabia. Munirah F. Al-Gahtani, Monira R. Al-Othman, Mohamed A. Mahmoudand Abeer R. M. AbdEl-Aziz.African Journal of Microbiology Research Vol. 7(25), pp. 3151-3159, 18 June, 2013 .
24. Saeed Mallaei, Zohreh Student, Tahmineh Nahimabadi. Investigation of the inhibitory effect of two plant species on the growth of Aspergillus parasiticus and production of phthalotoxin. The 6th Conference of Agricultural Research Findings.1392.