علمی پژوهشی

ارزیابی فعالیت ضدقارچی اسانس اناریجه بر *آسپرژیلوس نایجر* (کپک سیاه) و *بوتریتیس سینه‌را* (کپک خاکستری) عامل فساد میوه انگور: مطالعه در شرایط آزمایشگاهی

مصطفی رحمتی جنیدآباد[۱*]، بهروز علیزاده بهبهانی[۲]

۱- استادیار، گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

۲- استادیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان،ملاثانی، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۹ /۰۳/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۶/۰۱)

چکیده

در حال حاضر افزایش آگاهی مردم نسبت به سلامت و خواص تغذیه ای محصولات کشاورزی و فراوردههای آنها، و از سویی دیگر عوارض ناشی از سموم شیمیایی و نگهدارندههای سنتزی تقاضا برای مصرف مواد غذایی تازه و عاری از مواد نگهدارنده شیمیایی و سنتزی را دوچندان نموده است. اناریجه (*Froriepiasubpinnata*) گیاهی از خانواده چتریان است و بومی بخشهایی از مناطق مرکزی و شمالی ایران میباشد. برای ارزیابی فعالیت ضدقارچی اسانس اناریجه از روشهای دیسک دیفیوژن آگار، چاهک آگار، حداقل غلظت مهارکنندگی (ماکرودایلوشن براث و رقت آگار) و حداقل غلظت کشندگی استفاده شد. نتایج نشان داد که اسانس اناریجه به خوبی توانست از رشد سویه های قارچی عامل فساد سیاه و خاکستری انگور در شرایط آزمایشگاهی جلوگیری کند. نتایج نشان داد قطر هاله بازدارندگی در روش دیسک دیفیوژن آگار برای سویه های قارچی *آسپرژیلوس نایجر*و *بوتریتیسسینه* را به ترتیب ۱۵/۵۰ و ۱۳/۳۰ میلیمتر بود. نتایج اثر ضدقارچی در روش چاهک آگار به مراتب هاله بازدارندگی بزرگتری نسبت به روش دیسک دیفیوژن از خود نشان داد. حداقل غلظت کشندگی برای سویه های قارچی *آسپرژیلوس نایجر* و *بوتریتیس سینه‌را* به ترتیب ٦٤ و ٢٥٦ میلیگرم بر میلیلیتر بود. حداقل غلظت کشندگی اسانس اناریجه برای هر دوسویه *آسپرژیلوس نایجر* و *بوتریتیس سینه را* نسبت به حداقل غلظت مهارکنندگی بیشتر بود.

کلید واژگان: اناریجه، *آسپرژیلوس نایجر*، *بوتریتیسسینه‌را*، قطر هاله بازدارندگی.

*مسئول مکاتبات: Rahmati@asnrukh.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-08-14]

[DOI: 10.52547/fsct.17.108.75]

۱- مقدمه

بیماری‌های پس از برداشت، شامل دسته‌ای از بیماری‌هایی هستند که در هنگام برداشت محصول، درجه‌بندی و سورتینگ، بسته‌بندی، انبارمانی و انتقال به بازار مصرف ایجاد می‌شود. با توجه به pH پایین میوه‌ها، احتمال فساد ابتدایی توسط باکتری‌ها پایین بوده و این قبیل محصولات کشاورزی اکثرا توسط قارچ‌ها مورد حمله قرار گرفته و از بین می‌روند. قارچ‌های عامل فساد محصولات باغی فراوان بوده اما جنس‌های *پنی‌سیلیوم*، *آلترناریا*، *آسپرژیلوس* و *بوتریتیس* از جمله کپک‌های اصلی محسوب می‌شوند. میوه انگور از جمله محصولات باغی است که به دلیل بافت نرم آن بسیار آسیب‌پذیر بوده و بخشی مهمی از آن در حین انتقال به سردخانه‌ها یا بازار صدمه دیده و از بین می‌رود. حمله عوامل بیماری‌زا اغلب اوقات به دلیل صدمات فیزیکی اتفاق می‌افتد بنابراین احتمال فساد و کپک‌زدگی در میوه انگور بسیار بالاست. در حال حاضر افزایش دانش و آگاهی بشر نسبت به سلامت و خواص تغذیه‌ای محصولات کشاورزی و فراورده‌های آن‌ها، و از سویی دیگر عوارض ناشی از سموم شیمیایی و نگهدارنده‌های سنتزی در حین پرورش و انبارمانی محصولات کشاورزی تقاضا برای مصرف مواد غذایی تازه و عاری از مواد نگهدارنده شیمیایی و سنتزی را دوچندان نموده است. بنابراین در سالیان اخیر یکی از اهداف تولیدکنندگان محصولات کشاورزی و غذایی، تولید هرچه بیشتر محصولات ارگانیک و طبیعی است [۱ و ۲].

اسانس‌های گیاهی با نام‌های روغن‌های فرار یا روغن‌های اتری نامیده می‌شوند، دلیل این نامگذاری تبخیر زودتر آن‌ها نسبت به روغن‌های دیگر، هنگامی که در معرض هوا قرار می‌گیرند است. راندمان استحصال اسانس از گیاهان معمولا کم بوده و به ندرت به بیش از ۱ درصد می‌رسد، البته شایان ذکر است که موارد استثنا نیز وجود دارد [۳].از نظر شیمیایی اسانس‌های روغنی بسیار آب‌گریزهستند و بیشتر آن‌ها بی‌رنگ یا زرد کم‌رنگ بوده و چگالی آن‌ها از آب کمتر است [۳ و ٤].اسانس‌های روغنی صنایع وابسته به کشاورزی بسیاری را ایجاد کرده‌اند. همچنین اسانس‌های روغنی این پتانسیل را دارا می‌باشند که در دیگر صنایع مانند صنایع غذایی، دارویی، عطر و آرایشی و بهداشتی مورد استفاده قرار گیرند [٥].با توجه به محدودیت‌هایی که برای استفاده از مواد شیمیایی قارچ‌کش وجود داشته و همچنین عوارض جانبی و واکنش‌های غیر قابل پیش‌بینی و ایجاد سویه-های مقاوم، امروزه پژوهشگران به دنبال یافتن ترکیبات ضدمیکروبی جدید و طبیعی هستند.

اناریجه یا انارجی با نام علمی *Froriepiasubpinnata* از خانواده‌ی چتریان است و گونه بومی ایران محسوب می‌شود. اناریجه به طور گسترده در مناطق شمال ایران، قفقاز، ارمنستان و روسیه رشد می‌کند. در مناطق شمالی ایران از این گیاه به عنوان سبزی معطر و خوشبو در تهیه غذاهای سنتی و محلی استفاده می‌شود. از نظر گیاه شناسی اناریجه گیاهی یک‌ساله با ارتفاع ۲۰ تا ۱۱۰ سانتی‌متر است. گل‌های این گیاه به رنگ سفید و میوه‌های آن بیضی شکل است. در طب سنتی از این گیاه در درمان نفخ، ضداسپاسم، عامل عفونی‌کننده و ... استفاده می‌شود. اثر ضدمیکروبی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی اناریجه در پژوهش‌های گذشته به اثبات رسیده است[٦-٨].

با توجه به اینکه تاکنون پژوهش‌های بسیار اندکی در زمینه استفاده از اسانس و عصاره اناریجه جهت کنترل و مهار رشد سویه‌های باکتریایی و قارچی انجام شده است، لذا اهداف این پژوهش، ابتدا استخراج اسانس روغنی از اناریجه به روش تقطیر با آب بود، در ادامه اثر ضدقارچی اسانس اناریجه بر دو سویه *آسپرژیلوس نایجر* (کپک سیاه) و *بوتریتیس سینه‌را* (کپک خاکستری) عامل فساد میوه انگور به روش‌های دیسک دیفیوژن آگار (دیسک دیفیوژن)، انتشار در آگار به کمک چاهک (چاهک آگار)، حداقل غلظت مهارکنندگی (ماکرودایلوشن براث و رقت آگار) و حداقل غلظت کشندگی (کشت سطحی) در شرایط محیط کشت مورد بررسی قرار گرفت.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- تهیه مواد مصرفی و شیمیایی

مواد مصرفی و شیمیایی در این پژوهش شامل: محیط‌های کشت سابروز دکستروز آگار (مرک آلمان)، سابروز دکستروز براث (مرک آلمان)، نوترینت آگار (مرک آلمان)، دی متیل سولفوکساید

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-08-14]

[DOI: 10.52547/fsct.17.108.75]

(مرک آلمان)، گلیسرول (مرک آلمان)، دیسک‌های کاغذی (پادتن طب) و الکل (مرک آلمان) بود.

۲-۲- تهیه سویه‌های قارچی استاندارد

سویه‌های میکروبی*بوتریتیس سینه‌را*[1](ATCC 28387) و*آسپرژیلوس نایجر*[2](PTCC 5010) از کلکسیون میکروبی آزمایشگاه میکروبیولوژی صنعتی، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد به صورت کشت فعال تهیه شد. برای ذخیره سازی طولانی مدت از روش انجماد با ازت مایع حاوی ۲۰ درصد گلیسرول استفاده شد و در نهایت هر یک از سویه‌های قارچی در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. ۷۲ ساعت قبل از آزمون‌های میکروبی کشت تازه هر سویه قارچی بر محیط کشت سابروز دکستروز براث تهیه می‌شد و بعد از چندین مرحله پاساژ و اطمینان از خلوص سویه‌ها، مطابق با استاندارد میزان 10^6 کلنی از آن‌ها تهیه می‌شد. لازم به ذکر است با توجه به مزوفیل بودن سویه‌های قارچی انکوباسیون آن‌ها دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت[۹].

۲-۳- اسانس‌گیری از اناریجه

بعد از تهیه گیاه اناریجه از رویشگاه‌های طبیعی در استان مازندران، عمل اسانس‌گیری مطابق با روش نوشاد و همکاران (۲۰۱۸)، انجام شد. در این روش به طور خلاصه ۵۰ گرم از اناریجه با ۷۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر (چون بدون املاح است و تحت تاثیر حرارت، روی اسانس تاثیر نمی‌گذارد) به بالون ژوژه اضافه شد. دستگاه کلونجر به بالون ژوژه حاوی مواد (اناریجه + آب مقطر) متصل شد وخود کلونجر با گیره و پایه به جای ثابتی محکم گردید. مکانیسم اسانس‌گیری با روش تقطیر با آب به این صورت بود که با توجه به چگالی کم‌تر اسانس روغنی در قسمت مبرد یا کندانسور کلونجر (دوجداره و دارای قوس و انحنای متعدد) سرد شده و به صورت مایع از لوله کلونجر خارج و در ظرف تمیزی جمع آوری شد. مدت زمان استحصال اسانس اناریجه ۳ ساعت بود. به منظور جلوگیری از هرگونه واکنش نامطلوب در برابر نور و رطوبت، اسانس اناریجه تا زمان انجام آزمون‌های میکروبیولوژی در بطری‌های استریل، تیره رنگ درب بسته که اطراف آن نیز با فویل آلومینیومی پوشیده شده بود در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری شد[۱۰].

۲-٤- انتشار در آگار به کمک دیسک (دیسک دیفیوژن)

از آنجا که روش انتشار در آگار به کمک دیسک (دیسک دیفیوژن) یک روش رایج، مقدماتی و کم‌هزینه در اندازه‌گیری فعالیت ضدمیکروبی اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی می‌باشد لذا اولین آزمونی که در پژوهش حاضر مورد بررسی قرار گرفت روش دیسک دیفیوژن بود. میزان ۲۰ میکرولیتر از اسانس اناریجه که از فیلتر سرسرنگی ۰/۲۲ میکرونی جهت استریل شدن عبور کرده بود به دیسک‌های کاغذی (پادتن طب) که دارای قطر ٦ میلی‌متر بود توسط سمپلر به آرامی اضافه شد. نحوه قرار گرفتن دیسک‌های کاغذی بر سطح محیط کشت میکروبی بسیار مهم است زیرا در صورت نامناسب بودن جای گذاری دیسک‌ها احتمالا تداخل هاله عدم رشد مشاهده می‌شود. بنابراین دیسک-های کاغذی به فواصل ۲۵ میلی‌متر از یکدیگر و ۲۰ میلی‌متر از دیواره پتری‌دیش روی سطح محیط کشت سابروز دکستروز آگار توسط پنس استریل با دقت انجام شد. لازم به ذکر است قبل از جای گذاری دیسک‌های کاغذی بر سطح محیط کشت سابروز دکستروز آگار، میزان ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون قارچی استاندارد به طور کامل و یکنواخت کشت سطحی داده شد. به منظور عمل پیش انتشار پتری‌دیش‌های کشت داده شده حاوی دیسک‌های کاغذی آغشته به اسانس اناریجه به مدت ۱۵ دقیقه در یخچال (دمای ٤ درجه سانتی‌گراد) قرار داده شدند. پس از عمل پیش انتشار، پتری‌دیش‌های کشت شده به انکوباتور منتقل داده شد. عمل گرمخانه‌گذاری به مدت ۷۲ ساعت و در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد انجام گردید. پس از گذشت این زمان، پتری-دیش‌های میکروبی با دقت زیر هود میکروبی به صورت چشمی بررسی گردید و قطر هاله عدم رشد (هاله‌ای که در اثر جلوگیری از رشد سویه قارچی توسط اسانس اناریجه ایجاده شده بود) با خط‌کش بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری و ثبت شد[۱۱].

1. *Botrytis cinerea*
2. *Aspergillus niger*

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-08-14]

[DOI: 10.52547/fsct.17.108.75]

۲-۵- انتشار در آگار به کمک چاهک (چاهک آگار)

اصول کلی روش انتشار در آگار به کمک چاهک (چاهک آگار) به این صورت است که در این روش اسانس روغنی یا عصاره گیاهی به صورت مستقیم در مواجهه با میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا قرار می‌گیرد.به طور خلاصه در این روش ابتدا به وسیله ژل پانچر چاهک‌هایی با قطر ٦ میلی‌متر (درون پتری دیش ۲۰ میلی‌لیتر از محیط کشت استریل سابروز دکستروز آگار ریخته شده بود) درون محیط کشت ایجاد گردید. میزان ۲۰ میکرولیتر از اسانس استریل شده اناریجه (عمل استریل کردن توسط فیلتر سرسرنگی ۰/۲۲ میکرونی انجام شد و جهت اطمینان از استریل بودن اسانس اناریجه، از اسانس بر سطح محیط کشت نوترینت آگار کشت سطحی انجام پذیرفت) به درون چاهک‌های تعبیه شده (۳ چاهک در اطراف پتری دیش و ۱ چاهک به عنوان کنترل) در سطح محیط کشت توسط سمپلر به آرامی ریخته شد. لازم به ذکر است انتهای چاهک‌های ایجاد شده در سطح محیط کشت به وسیله یک قطره آگار مذاب مسدود شده بود تا از پخش شدن اسانس اناریجه در پتری‌دیش جلوگیری به عمل آید.اسانس اناریجه طی زمان انکوباسیون (۷۲ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد) به آرامی به درون محیط کشت سابروز دکستروز آگار نفوذ کرده و باعث از بین رفتن سویه‌های قارچی شده و ایجاد شعاع انتشار و هاله عدم رشد می‌کند. شعاع انتشار توسط خط-کش به دقت اندازه‌گیری و بر حسب میلی‌متر نتایج آن گزارش گردید[۱۲].

۲-٦- تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس اناریجه به روش رقت آگار

روش‌های انجام شده برای تعیین فعالیت ضدمیکروبی عصاره و اسانس‌های گیاهان دارویی مختلف و دارای تنوع زیادی است. از آنجا که نتایج آزمون‌های میکروبی به طور گسترده تحت تاثیر شرایط آزمون می‌تواند متفاوت باشند، لذا لازم است که روش‌های انجام آزمون‌های ضدمیکروبی استاندارد گردند. در پژوهش حاضر از روش رقت در آگار براساس دستورالعمل سازمان CLSI[1] انجام گردید. از آنجاکه اسانس اناریجه در محیط کشت سا بروز دکستروز آگار نامحلول هست، از امولسیفایر دی متیل سولفوکساید برای محلول کردن اسانساناریجه در محیط کشت میکروبی استفاده شد (امولیسفایر دی متیل سولفوکساید فاقداثرات ضدمیکروبیچشم‌گیری می‌باشد). به طور خلاصه در این روش ابتدا غلظت‌های مختلف اسانس اناریجه شامل ۰/۵، ۱، ۲، ٤، ۸، ١٦، ۳۲، ٦٤، ۱۲۸، ۲٥٦ و ٥۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شد و با محیط کشت سابروز دکستروز آگار حاوی امولیسفایر مخلوط شده و درون پتری‌دیش‌های ۸ سانتی‌متری ریخته شد تا جامد شوند. ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون استاندارد که حاوی 10^6 کلنی از سویه‌های قارچی *آسپرژیلوس نایجر* و *بوتریتیس سینه‌را* در سطح محیط کشت به وسیله میله ال شکل استریل پخش گردید. پلیت‌های تلقیح شده فاقد اسانس اناریجه وامولیسفایر دی متیل سولفوکسایدبه عنوان کنترل منفی و پلیت‌های حاوی اسانس اناریجه و و امولیسفایر دی متیل سولفوکساید بدون تلقیح به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شدند.در نهایت محیط کشت حاوی قارچ‌های کشت شده در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شدند. پس از گذشت ۳ روز پتری‌دیش-های در زیر هود میکروبی به صورت چشمی مورد بررسی قرار گرفتند. مطابق با تعریف حداقل غلظت مهارکنندگی، رقت مربوط به اولین پلیتی که در آن رشدی مشاهده نشد، به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی از رشد گزارش گردید[۲ و ۱۳].

۲-۷- تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس اناریجه به روش رقت لوله‌ای (ماکرودایلوشن براث)

روش دیگری که برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس اناریجه انجام شد، روش رقت لوله‌ای (ماکرودایلوشن براث) بود. این روش مطابق با مطالعه علیزاده بهبهانی و همکاران (۱۳۹۲)، انجام گردید[١٤]. در این روش به طور خلاصه از ۱۳ لوله آزمایشگاهی استریل شده استفاده شد. ابتدا غلظت‌های مختلف اسانس اناریجه شامل ۰/۵، ۱، ۲، ٤، ۸، ١٦، ۳۲، ٦٤، ۱۲۸، ۲٥٦ و ٥۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شده و در ۱۱ لوله ریخته شد. ۲ لوله آزمایشگاهی به عنوان کنترل منفی و کنترل مثبت در نظر گرفته شد. از سوسپانسیون قارچی استاندارد به درون لوله

1. Clinical and laboratory standards institute

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-08-14]

[DOI: 10.52547/fsct.17.108.75]

آزمایشگاهی که حاوی محیط کشت سابروز دکستروز براث و غلظت‌های مختلف اسانس اناریجه بود عمل تلقیح صورت گرفت.در نهایت لوله‌های آزمایشگاهی در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شدند. پس از گذشت ۳ روز پتری‌دیش‌های در زیر هود میکروبی به صورت چشمی مورد بررسی قرار گرفتند. چناچه سویه قارچی بتواند در حضور اسانس اناریجه رشد کند، باعث ایجاد کدورت می‌گردد. اولین لوله‌ای که در آن کدورتی مشاهده نشد غلظت آن لوله به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس اناریجه گزارش شد[۱٤].

۲-۸- تعیین حداقل غلظت کشندگی اسانس اناریجه

برای اندازه‌گیری حداقل غلظت کشندگی اسانس اناریجه، از لوله‌های فاقد نشانه رشد (عدم کدورت) مربوط به آزمون حداقل غلظت مهارکنندگی، میزان ۱۰۰ میکرولیتر در نزدیکی شعله و زیر هود میکروبی برداشته و بر سطح محیط کشت سابروز دکستروز آگار کشت سطحی انجام شد. پس از انکوباسیون ۷۲ ساعته در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد، پلیت‌های کشت شده از نظر رشد و تشکیل کلنی بررسی شده و پلیتی که در آن ۹۹/۹۹ درصد سویه میکروبی از بین رفته و کلنی مشاهده نگردید به عنوان حداقل غلظت کشندگی اسانس اناریجه در نظر گرفته شد[۱۵].

۲-۹- آنالیز آماری

نتایج آزمون‌های میکروبی حاصل میانگین ۳ مرتبه تکرار است. نتایج به دست آمده توسط نرم افزار SPSS[1]نسخه ۱۸ تجزیه و تحلیل شد. نتایج آماری با استفاده از آزمون دانکن در سطح معنی‌داری ۵ درصد تفسیر گردید.

۳- نتایج و بحث

با توجه به مقاوم شدن تعداد زیادی از سویه‌های میکروبی بیماری‌زا نسبت به مواد شیمیایی سنتزی، و همچنین شناخت و آگاهی بشر امروزی نسبت به عوارض جانبی ترکیبات شیمیایی و آلودگی زیست محیطی، در سالیان اخیرعلاقه مردم به استفاده از داروهای گیاهی افزایش یافته است. شاید یکی از مهم‌ترین عاملی که موجب گرایش زیاد و علاقه فراوان انسان‌ها به استفاده از این اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهان دارویی شده است بی‌ضرر بودن آن‌هاباشد. استفاده از سموم و ترکیبات شیمیایی برای جلوگیری از رشد کپک‌های عامل فساد و پوسیدگی، هرچند بتواند از زوال محصول جلوگیری کند اما در دراز مدت علاوه بر مقاومت میکروبی، سلامت مصرف کننده را نیز تهدید می‌کند. بنابراین با توجه به موارد ذکر شده امروزه علاقه مصرف‌کنندگان محصولات کشاورزی و غذایی به استفاده از محصولات طبیعی و ارگانیک با کم‌ترین اثر جانبی رو به افزایش است[۱۳ و ۱٦].در پژوهش حاضر نیز اثر اسانس طبیعی اناریجه (بومی استان مازندران) بر مهار رشد و کنترل دو سویه قارچی *آسپرژیلوس نایجر* و *بوتریتیس سینه‌را* عامل فساد و پوسیدگی میوه انگور بررسی گردید. نتایج اثر اسانس اناریجه به روش انتشار در آگار به کمک دیسک در جدول ۱، آورده شده است. نتایج نشان داد که اسانس اناریجه به خوبی از رشد هر دو سویه قارچی در محیط کشت جلوگیری کرد. میزان قطر هاله عدم رشد مشاهده شده در این روش برای *آسپرژیلوس نایجر* و *بوتریتیس سینه‌را* به ترتیب ۱۵/۵۰ و ۱۳/۳۰ میلی‌متر بود. نتایج اثر اسانس اناریجه به روش چاهک آگار در جدول ۱، آورده شده است. نتایج نشان داد که اسانس اناریجه به خوبی از رشد هر دو سویه قارچی در محیط کشت جلوگیری کرد. میزان قطر هاله عدم رشد مشاهده شده در این روش برای *آسپرژیلوس نایجر* و *بوتریتیس سینه‌را* به ترتیب ۱۸/۱۰ و ۱۵/٤۰ میلی‌متر بود. نتایج آنالیز آماری نشان داد که میان دو روش دیسک دیفیوژن آگار و چاهک آگار برای هر دو سویه قارچی در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. قطر هاله عدم رشد (هاله بازدارندگی) در روش چاهک آگار بیشتر بود. نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی به روش رقت لوله‌ای (ماکرودایلوشن براث) در جدول ۲، آورده شده است. نتایج نشان داد در این روش حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس اناریجه برای *آسپرژیلوس نایجر* و *بوتریتیس سینه‌را* به ترتیب ۱٦ و ۳۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس اناریجه به روش رقت آگار در جدول ۳، آورده شده است. نتایج نشان داد در روش رقت آگار حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس اناریجه برای *آسپرژیلوس نایجر* و *بوتریتیس سینه‌را* به ترتیب ۱٦ و ٦٤ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. نتایج حداقل غلظت کشندگی

1. Statistical package for the social sciences

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-08-14]

[DOI: 10.52547/fsct.17.108.75]

اسانس اناریجه برای سویه‌های قارچی مورد بررسی در مطالعه حاضر در جدول ٤، آورده شده است. نتایج حداقل غلظت کشندگی اسانس اناریجه برای *آسپرژیلوس نایجر* و *بوتریتیس سینه‌را* به ترتیب ٦٤ و ٢٥٦ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود.

Table 1 Mean inhibition zone diameter (mm) of *Froriepiasubpinnata* essential oil on *Aspergillus niger*and *Botrytis cinerea*

Method / Microorganism	*Aspergillus niger*	*Botrytis cinerea*
Disk diffusion	15.50 ±0.28[b]	13.30 ±0.46[b]
well diffusion	18.10 ±0.52[a]	15.40 ±0.68[a]

Values are expressed as mean ±standard deviations, $n = 3$; different letters (a, and b) in each column show significant difference at $p \geq 0.05$.

Table 2 The minimum inhibitory concentration (MIC) of *Froriepiasubpinnata* essential oil on *Aspergillus niger*and *Botrytis cinerea* (broth microdilution method)

Concentration (mg/mL) / Microorganism	**0.5**	**1**	**2**	**4**	**8**	**16**	**32**	**64**	**128**	**256**	**512**
Aspergillus niger	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Botrytis cinerea	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-

+, grow; -, not grow; n = 3.

Table 3 The minimum inhibitory concentration (MIC) of *Froriepiasubpinnata* essential oil on *Aspergillus niger*and *Botrytis cinerea* (agar dilution method)

Concentration (mg/mL) / Microorganism	**0.5**	**1**	**2**	**4**	**8**	**16**	**32**	**64**	**128**	**256**	**512**
Aspergillus niger		+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Botrytis cinerea		+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

+, grow; -, not grow; n = 3.

Table 4 The minimum fungicidal concentration (MFC) of *Froriepiasubpinnata* essential oil on *Aspergillus niger*and *Botrytis cinerea*

Concentration (mg/mL) / Microorganism	**0.5**	**1**	**2**	**4**	**8**	**16**	**32**	**64**	**128**	**256**	**512**
Aspergillus niger		+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Botrytis cinerea		+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

+, grow; -, not grow; n = 3.

علیزاده بهبهانی و همکاران (١٣٩٢)، اثر ضدقارچی عصاره‌های آبی و متاولی برگ حرا را در غلظت‌های مختلف به روش انتشار در آگار به کمک دیسک بر *آلترناریا آلترناتا* و *پنی‌سیلیوم سیترینوم* مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که با افزایش غلظت عصاره قطر هاله عدم رشد افزایش پیدا کرد. همچنین عصاره متانولی دارای فعالیت ضدقارچی بیشتری بود. این پژوهشگران با توجه به مناسب بودن نتایج ضدقارچی عصاره حرا پیشنهاد دادند که از این عصاره برای سایر کپک‌های آلوده کننده مواد غذایی استفاده شود[١٤]. محمدی و همکاران (١٣٩٧)، اثر اسانس رزماری را بر سویه قارچی *بوتریتیس سینه‌را* به روش‌های دیسک دیفیوژن و حداقل غلظت مهارکنندگی مورد بررسی قرار دادند. نتایج این پژوهشگران نشان داد که اسانس رزماری به خوبی از رشد سویه قارچی جلوگیری کرد[١٧]. نیک‌خواه ممان و همکاران (١٣٩٨)، فعالیت ضدقارچی و اثرات هم‌افزایی چندین اسانس طبیعی را بر علیه *بوتریس سینه‌را*، *پنی‌سیلیوم اکسپانسیوم* و *آلترناریا آلترناتا* (قارچ‌های مولد فساد در میوه سیب) را مورد ارزیابی قرار دادند. تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس‌ها به روش رقت در آگار مشخص گردید. نتایج این پژوهشگران نشان داد اسانس آویشن و دارچین در مقایسه با اسانس‌های رزماری و مرزنجوش اثر مهارکنندگی بهتری

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-08-14]

[DOI: 10.52547/fsct.17.108.75]

داشتند[۲]. میرزانیا و همکاران (۲۰۱۹)، ترکیبات شیمیایی و فعالیت ضدباکتریایی و ضدقارچی اناریجه را مورد بررسی قرار دادند. این پژوهشگران ۵۳ ترکیب را در اسانس اناریجه شناسایی کرده و گزارش کردند ترکیبات اصلی اسانس اناریجه شامل Myrcenone، Limonene و Terpinolene است. همچنین فعالیت ضدمیکروبی بر تعدادی سویه باکتری و دو سویه قارچی (*آسپرژیلوس فلاووس* و *کاندیدا آلبیکنس*) به روش میکرودایلوشن براث نیز تعیین شد. نتایج این پژوهشگران نشان داد که حداق غلظت مهارکنندگی اسانس اناریجه برای دو سویه قارچی *آسپرژیلوس فلاووس* و *کاندیدا آلبیکنس* ٦٤ و ٦٤ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. حداقل غلظت کشندگی نیز به ترتیب ٦٤ و بیشتر از ٦٤ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شد[۱۸]. با توجه به ترکیبات شیمیایی شناسایی شده در پژوهش میرزانیا و همکاران (۲۰۱۹)[۱۸]، به نظر می‌رسد بخش مهمی از فعالیت ضدقارچی اسانس اناریجه را میتوان به ترکیباتی همانند Limonene و Terpinolene نسبت داد. لطیفی و همکاران (۲۰۱۹)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و وجود ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی را در گیاه اناریجه تایید کردند. این پژوهشگران میزان فنل کل و فلاونوئید گیاه اناریجه را به ترتیب ٤٧/٦٤ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم و ۱۹/۲۹ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم گزارش کردند[۱۹]. به نظر می‌رسد با توجه به ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی موجود در گیاه اناریجه بخشی از فعالیت ضدقارچی گیاه را می‌توان به این ترکیبات نسبت داد. معمولاً فعالیت ضدمیکروبی اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی را مربوط به یک نوع متابولیت ثانویه مرتبط نمی‌دانند، بلکه به همکاری ترکیبات شیمیایی تشکیل دهنده موجود در گیاه نسبت داده میشود. ترکیبات فیتوشیمیایی با اثر ضدمیکروبی به چندین گروه تقسیم شده که شامل فنلهای ساده و اسید فنولیک، کینون‌ها، فلاوونوئیدها، تانن‌هاو ... می‌باشند [۲۰].از آنجا که وجود ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی در گیاه اناریجه در پژوهش‌های پیشین (لطیفی و همکاران، [۱۹]) به اثبات رسیده است بخشی از فعالیت ضدقارچی گیاه اناریجه مربوط به این ترکیبات است. ساز کار سمیت فنل‌ها در برابر میکروارگانیسم‌ها از طریق مهار آنزیمی ترکیب اکسید شده و یا از طریق واکنش غیر اختصاصی با گروه‌های سولفیدریل پروتئین‌ها می‌باشد[۲۱].

٤- نتیجه‌گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که اسانس اناریجه به خوبی توانست از رشد سویه‌های قارچی عامل فساد سیاه و خاکستری میوه انگور در شرایط آزمایشگاهی جلوگیری کند. نتایج اثر ضدقارچی در روش چاهک آگار به مراتب هاله بازدارندگی بزرگتری نسبت به روش دیسک دیفیوژن از خود نشان داد. حداقل غلظت کشندگی اسانس اناریجه برای هر دو سویه *آسپرژیلوس نایجر* و *بوتریتیس سینه‌را* نسبت به حداقل غلظت مهارکنندگی بیشتر بود. در ادامه پیشنهاد می‌شود با انجام پژوهش‌های گسترده‌تر بستر لازم جهت استفاده هرچه بیشتر از اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی دارای فعالیت ضدقارچی در محصولات مختلف با هدف افزایش عمر انبارمانی، کاهش مصرف نگهدارنده‌های سنتزی و شیمیایی و جلب رضایت مصرف‌کنندگان فراهم آید.

٥- تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان به دلیل حمایت‌های مادی و معنوی صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

٦- منابع

[1] Tejeswini, M. G., Sowmya, H. V., Swarnalatha, S. P., & Negi, P. S. (2014). Antifungal activity of essential oils and their combinations in in vitro and in vivo conditions. *Archives of Phytopathology and Plant Protection,* 47(5), 564-570.

[2] Nikkhah, M., Habibi NAjafi, M., Hashemi, M., &Farhoosh, R. (2019). Antifungal activity and synergistic effects of thyme, cinnamon, rosemary and marjoram essential oils in combination, against apple rot fungi. *Journal of Food Research,* 29(1), 43-54. [Full text in Persian].

[3] Geng, S., Cui, Z., Huang, X., Chen, Y., Xu, D., &Xiong, P. (2011). Variations in essential oil yield and composition during Cinnamomum cassia bark growth. *Industrial Crops and Products,* 33(1), 248-252.

[4] Sabzghabaee, A. M., Davoodi, N., Ebadian, B., Aslani, A., &Ghannadi, A. (2012). Clinical evaluation of the essential oil of "Satureja Hortensis" for the treatment of denture

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-08-14]

[DOI: 10.52547/fsct.17.108.75]

stomatitis. *Dental research journal,* 9(2), 198-202.

[5] Anwar, F., Ali, M., Hussain, A. I., & Shahid, M. (2009). Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (Foeniculum vulgare Mill.) seeds from Pakistan. *Flavour and Fragrance Journal,* 24(4), 170-176.

[6] Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Simin, N., &Anackov, G. (2006). Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 54(5), 1822-1828.

[7] Mozaffarian, V. A., 1996, Dictionary of Iranian Plant Names. *FarhangMoaser,* 473-478.

[8] ShokoohSaremi, E., Habibi Najafi, M. B., Haddad Khodaparast, M. H., &Bahreini, M. (2017). Effect of extraction methods on phenolic content and antimicrobial properties of pimpinellaaffinis leaf. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 14(1), 59-68. [Full text in Persian].

[9] Alizadeh Behbahani, B., Yazdi, F. T., Shahidi, F., &Riazi, F. (2016). Antifungal Effect of the Aqueous and Ethanolic Avicennia marina Extracts on Alternaria citri and Penicillium digitatum. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences,* 18(2),1-6.

[10] Noshad, M., Hojjati, M., &Behbahani, B. A. (2018). Black Zira essential oil: Chemical compositions and antimicrobial activity against the growth of some pathogenic strain causing infection. *Microbial Pathogenesis,* 116, 153-157.

[11] Alizadeh Behbahani, B., &Fooladi, A. A. I. (2018). Evaluation of phytochemical analysis and antimicrobial activities Allium essential oil against the growth of some microbial pathogens. *Microbial Pathogenesis,* 114, 299-303.

[12] Alizadeh Behbahani, B., & Imani Fooladi, A. A. (2018). Development of a novel edible coating made by Balangu seed mucilage and Feverfew essential oil and investigation of its effect on the shelf life of beef slices during refrigerated storage through intelligent modeling. *Journal of Food Safety,* 38(3), e12443.

[13] Alizadeh Behbahani, B., Shahidi, F., Yazdi, F. T., Mortazavi, S. A., &Mohebbi, M. (2017). Antioxidant activity and antimicrobial effect of tarragon (Artemisia dracunculus) extract and chemical composition of its essential oil. *Journal of Food Measurement and Characterization,* 11(2), 847-863.

[14] Alizadeh behbahani, B., Tabatabaei Yazdi, F., Shahidi, F., &Mohebbi, M. (2014). Antifungal Effect of Aqueous and Methanolic Avicennia Marina Leaves Extracts on Alternaria Alternata and Penicillium Citrinum. *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences,* 12(12), 1015-1024. [Full text in Persian]

[15] Alghooneh, A., Behbahani, B. A., Noorbakhsh, H., &Yazdi, F. T. (2015). Application of intelligent modeling to predict the population dynamics of Pseudomonas aeruginosa in Frankfurter sausage containing Saturejabachtiarica extracts. *Microbial Pathogenesis,* 85, 58-65.

[16]Sureshjani, M. H., Yazdi, F. T., Mortazavi, S. A., Behbahani, B. A., & Shahidi, F. (2014). Antimicrobial effects of Kelussiaodoratissima extracts against food borne and food spoilage bacteria" in vitro. *Journal of Paramedical Sciences,* 5(2), 115-120.

[17] Mohammadi, I., Akhlaghi, S.H., Pedramnia. A. (2018). Evaluation of the inhibitory effect of Rosmarinus officinalis essential oil on Botrytis cinerea to increase shelf life the strawberry fruit. *Journal of Innovation in Food Science and Technology,* 10(1), 1-9. [Full text in Persian].

[18] Mirzania, F., Sarrafi, Y., &MoridiFarimani, M. (2019). Comparative Evaluation of Chemical Compositions and Biological Activities of Wild and Cultivated Froriepiasubpinnata L. Essential Oils. *Journal of Agricultural Science and Technology,* 21(2), 331-340.

[19] Latifi, Z. &Daneshniya, M. (2019). Measuring of phytochemical and antioxidant compounds and identification of main phenolic compound in Anarijeh plant (Froriepiasubpinnata) extract by RPHPLC method. International Conference of Engineering and Technology.

[20] Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International Journal of Food Microbiology,* 94(3), 223-253.

[21] Dholwani, K., Saluja, A., Gupta, A., & Shah, D. (2008). A review on plant-derived natural products and their analogs with anti-tumor activity. *Indian Journal of Pharmacology,* 40(2), 49-58.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-08-14]

[DOI: 10.52547/fsct.17.108.75]

Evaluation of the antifungal effect of *Froriepiasubpinnata*essential oil on *Aspergillus niger* (black mold) and *Botrytis cinerea* (gray mold) grape poisoning agent: A study *"in vitro"*

Rahmati-Joneidabad, M. [1*], Alizadeh Behbahani, B. [2]

1. Assistant Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.
2. Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.

(Received: 2020/06/11 Accepted: 2020/08/22)

At present, increasing public awareness of the health and nutritional properties of agricultural products and their products, as well as the effects of chemical toxins and synthetic preservatives, doubles the demand for fresh and chemical-free food preservatives.*Froriepiasubpinnata* is a member of the family Umbelliferae. This plant is native central and northern parts of Iran. Disk diffusion agar, well diffusion agar, minimum inhibitory concentration (broth microdilution and agar dilution) and minimum fungicidal concentration were used to evaluated the antifungal effect of *Froriepiasubpinnata* essential oil. The results showed that *Froriepiasubpinnata* essential oil was well able to prevent the growth of fungal strains that cause black and gray spoilage *in vitro*. The results showed that the inhibition zone diameter (disc diffusion method) for the fungal strains of *Aspergillus niger* and *Botrytis cinerea*was 15.50 and 13.30 mm, respectively. The results of the antifungal effect in the well agar method showed a much greater inhibition zone diameter than the disc diffusion method. The minimum fungicidal concentration for *Aspergillus niger* and *Botrytis cinerea*was 64 and 256 mg/mL, respectively.The minimum fungicidal concentration of *Froriepiasubpinnata*essential oil was higher for *Aspergillus niger* and *Botrytis cinerea* strains than the minimum inhibitory concentration.

Keywords: *Froriepiasubpinnata*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, Inhibition zone diameter.

* Corresponding Author E-Mail Address: Rahmati@asnrukh.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-08-14]

[DOI: 10.52547/fsct.17.108.75]