

# بررسی اثر ضد قارچی اسانس گیاهان دارویی بر رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس و تولید آفلاتوکسین B1 در پسته

حسین افشاری<sup>۱</sup>، فرشته زیوه ای<sup>۲</sup>، غلامرضا باقری<sup>۳</sup>، مهدی افشاری<sup>۴</sup> و مسعود زاده باقری<sup>۵</sup>

۱- استادیار گروه علوم باغبانی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، (نویسنده مسئول) دامغان، ایران afshari2000ir@yahoo.com

۲- فارغ التحصیل کارشناسی ارشد علوم باغبانی دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، دامغان، ایران

۳- دکترای بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی زابل، زابل، ایران

۴- دکترای اپیدمیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی زابل، زابل، ایران

۵- استادیار علوم باغبانی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز، شیراز، ایران

## چکیده:

**مقدمه:** به منظور بررسی اثر ضد قارچی اسانس‌های گیاهی در جلوگیری از رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس و تولید آفلاتوکسین B1 از اسانس گیاهان دارویی آویشن، نعناع، اکالیپتوس، رازیانه، باریجه، رزماری و مرزه استفاده شد. روش پژوهش: آزمایشی بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی به منظور بررسی تأثیر این اسانس‌ها در کاهش میزان رشد قارچ، اسپورزایی و میزان آفلاتوکسین، محلول‌پاشی توسط اسانس بر روی مغز ۴ رقم پسته انجام شد. جهت بررسی میزان رشد میسلیم قارچ از دو محیط جامد و مایع استفاده گردید. یافته‌ها: اسانس‌های آویشن و رازیانه بیشترین میزان بازدارندگی را از خود نشان دادند. اثر نوع و غلظت اسانس در سطح احتمال آماری ۱ درصد بر درصد کلونیزاسیون و آفلاتوکسین و اثر متقابل رقم غلظت اسانس در سطح احتمال ۵ درصد بر درصد کلونیزاسیون قارچ آسپرژیلوس فلاووس معنی دار گشت. نتیجه‌گیری: غلظتهای ۸۰۰ و ۱۰۰۰ قسمت در میلیون اسانس رازیانه (۰,۵۸۴ppb و ۰,۲۱۳) و آویشن (۰,۴۵۲ppb) و ۰,۲۵۵) به ترتیب بیشترین میزان بازداری آفلاتوکسین B1 را داشتند. کلید واژه‌ها: اسانس، آسپرژیلوس فلاووس، آفلاتوکسین، پسته، محیط کشت.



## مقدمه و هدف

محصولات کشاورزی و مواد غذایی رشد نموده و با تولید زهرابه آفلاتوکسین موجب آلودگی آنها می‌شود. آفلاتوکسین‌ها سمی و سرطان‌زا بوده و مقدار آنها در محصولات کشاورزی به دقت بررسی شده و در اغلب کشورها حد مجاز آنها ۵ تا ۱۵ میلی گرم در گرم مشخص شده است (۲). اصولاً اسانس‌های گیاهی یکی از منابع بالقوه دارای ترکیب‌های ضد میکروبی بوده و برای این منظور بسیار مفید و مؤثر می‌باشند. مقایسه نتایج گزارش شده در مورد خواص ضد میکروبی اسانس‌های مختلف بسیار مشکل می‌باشد که از دلایل آن می‌توان به تفاوت در

در سال‌های اخیر توجه محققان به گروهی از ترکیبات طبیعی گیاهی به نام اسانس‌ها جلب شده که علاوه بر خواص ضد قارچی موادی طبیعی و کم‌خطر برای سلامت انسان و محیط زیست می‌باشند، به نظر می‌رسد که استفاده از اسانس و عصاره گیاهان دارویی در تمام مراحل فراوری بتواند در جمعیت جدایه‌های توکسین‌زا قارچ آسپرژیلوس فلاووس را تحت تأثیر قرار دهد و در نهایت بر روی کاهش آلودگی محصولات به آفلاتوکسین کمک نماید (۱). قارچ آسپرژیلوس فلاووس روی گستره وسیعی از



### مواد و روش‌ها:

گیاهان آویشن‌باغی، مرزه، رازیانه، اکالیپتوس، رزماری، باریجه و نعناع از مزرعه تحقیقاتی پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی در کرج تهیه و در سایه خشک و به روش تقطیر با بخار آب توسط دستگاه کلونجر اسانس گیری شد. اسانس‌های ذکر شده در شیشه‌های تیره در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد درون یخچال تا زمان آنالیز و استفاده نگه‌داری و جدایه قارچی مورد استفاده در این پژوهش شامل جدایه‌های اسپرژیلوس فلاووس بودند که از آزمایشگاه انستیتو پاستور ایران تهیه گردید.

برای بررسی تأثیرات ضد قارچی اسانس‌های فوق بر رشد قارچ اسپرژیلوس فلاووس از محیط کشت عصاره مخمر (YES) استفاده شد. اسانس‌ها با غلظت‌های ۱۰۰۰، ۸۰۰، ۶۰۰، ۴۰۰، ۲۰۰ پی پی ام همراه با توین ۸۰ به محیط کشت افزوده و در تیمار شاهد به جای اسانس به همان میزان آب مقطر و توین اضافه شد. سپس ۰/۵ سی سی سوسپانسیون با غلظت  $10^6$  اسپور در میلی لیتر به هر کدام از لوله‌ها افزوده شد و لوله‌ها به منظور یکنواخت شدن سوسپانسیون و اسانس به مدت ۶۰ ثانیه ورتکس شدند. سپس لوله‌ها توسط کاغذ صافی واتمن ۴۲ صاف گردید و وزن خشک میسلیم توسط ترازوی مخصوص یک ده هزارم گرم به دست آمد. در آزمایش بعدی مقدار ۱۲ گرم مغز پسته از هر رقم (در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار) با استفاده از هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد ضد عفونی سطحی و جهت جذب رطوبت اولیه حدود ۱۰ دقیقه در داخل آب مقطر استریل خیسانده شد. سپس مغز پسته ارقام مختلف به طور جداگانه در داخل تشتک پتری استریل قرار گرفت و یک میلی لیتر از سوسپانسیون قارچ (به غلظت  $2 \times 10^6$  اسپور در میلی لیتر) به پسته‌های داخل تشتک پتری مایه زنی گردید و پتری‌ها درون ظروف پلاستیکی که در کف آن برای تأمین رطوبت در حد اشباع، آب مقطر استریل ریخته شده بود قرار داده شد (۱۰).

روش‌های مختلف بررسی این خواص، منابع تهیه آن، شرایط کشت گیاه، جدایه‌های مختلف میکروبی و حتی غلظت‌های متفاوتی از قارچ یا باکتری که به عنوان مایه تلقیح به کار می‌رود اشاره کرد (۳). برخی از محققین معتقدند که بین ساختار شیمیایی و میزان مواد مؤثر آن‌ها همبستگی وجود دارد. معمولاً اسانس‌های غنی از ترکیبات فنلی دارای خاصیت بالای ضد میکروبی هستند و در واقع ترکیب‌های فنلی موجود در اسانس‌های گیاهی بیشترین تأثیر را در ایجاد خاصیت ضد میکروبی دارند. این ترکیبات هم در غشا سلول نفوذ می‌کند و هم می‌تواند در لخته شدن محتویات سلول نقش داشته باشد (۶-۴). همچنین بررسی‌های انجام شده نشان داد که اسانس ریحان، گشنیز، زیره، رزماری، با غلظت ۱۰۰۰ ppm بازدارندگی کامل از رشد اسپرژیلوس فلاووس داشته و اسانس‌های مذکور از تولید آفاتوکسین BI توسط قارچ مذکور در غلظت‌های (ppm) ۱۰۰۰، ۷۰۰، ۵۰۰ جلوگیری نمودند (۷). طی بررسی دیگر اثر ۴ اسانس آویشن دناپی، آویشن شیرازی، زیره‌سیاه و زوفا روی گونه‌های مختلف اسپرژیلوس شامل: اسپرژیلوس نیجر، اسپرژیلوس فومیگاتوس، اسپرژیلوس پارازیتیکوس و اسپرژیلوس فلاووس بررسی و نتایج نشان داد که اسانس آویشن دناپی و زوفا می‌تواند به عنوان عامل ضد قارچی علیه گونه‌های اسپرژیلوس فومیگاتوس اسپرژیلوس فلاووس و اسپرژیلوس نیجر به کار گرفته شود (۸). در سال ۲۰۱۱ اثر ضدقارچی اسانس رزماری علیه قارچ اسپرژیلوس فلاووس بررسی و نتایج نشان داد که اسانس رزماری با غلظت،  $\frac{1}{2}$  و  $\frac{1}{4}$  فعالیت ضدقارچی قوی نسبت به آنتی‌بیوتیک جنتامایسین روی اسپرژیلوس فلاووس دارد. درصد بزرگی از این فعالیت ضدقارچی اسانس رزماری به مونوترپن  $\alpha$ -Pinene نسبت داده می‌شود (۹). در این تحقیق، تأثیر اسانس گیاهان دارویی مختلف بر رشد، میزان اسپورزایی قارچ اسپرژیلوس فلاووس و تولید آفاتوکسین در شرایط طبیعی روی ارقام میوه پسته مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت.

در نهایت بمنظور تعیین غلظت آفلاتوکسین ۲۰۰ میکرولیتر از این عصاره به دستگاه HPLC تزریق گردید (۱۲).

در این تحقیق از آزمایش فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی برای بررسی اثرات ساده و متقابل استفاده شد و جهت تجزیه واریانس و گروه‌بندی میانگین تیمارها از نرم-افزار SAS و آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده گردید.

### یافته ها

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر اسانس و غلظت‌های

متفاوت اسانس گیاهان بر وزن میسلیم در محیط YES

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	مقدار F
نوع اسانس	۶	۰/۴۲۸	۰/۰۷۱	۱۳/۲۴**
غلظت اسانس	۵	۲۳/۲۵۸	۴/۶۵۱	۸۶۳/۲۹**
نوع اسانس* غلظت اسانس	۳۰	۴/۵۶۰	۰/۱۵۲	۲۸/۲۱**
خطا	۸۴	۰/۴۵۲	۰/۰۰۵	
کل	۱۲۵	۲۸/۶۹۸		

ns, \*\*, \* به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

نتایج به‌دست آمده از تجزیه واریانس داده‌های حاصل از اثر اسانس و غلظت‌های متفاوت اسانس گیاهان بر وزن میسلیم قارچ اسپرژیلوس فلاووس در محیط YES نشان داد که اثرات نوع اسانس و غلظت اسانس و نیز اثر متقابل نوع اسانس و غلظت در سطح آماری ۱٪ معنی‌دار می‌باشد. تقریباً کلیه اسانس‌های گیاهی بر رشد قارچ مذکور اثرگذار بوده اند (جدول ۱). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که کمترین وزن میسلیم مربوط به غلظت ۶۰۰ پی پی ام بود (نمودار ۱) (۰/۲۹۲ میلی‌گرم) که این غلظت با غلظت-های ۱۰۰۰، ۸۰۰، ۶۰۰، ۴۰۰ پی پی ام در یک گروه آماری قرار دارند و بیشترین وزن مربوط به میزان غلظت صفر با آب مقطر استریل بود (۱/۴۸۶ میلی‌گرم). بنابراین نتیجه-گیری می‌شود که غلظت‌های بیشتر از ۴۰۰ پی پی ام تاثیر بسزایی بر روی میزان وزن میسلیم داشته‌اند.

### بررسی اثر اسانس بر کلونیزاسیون قارچ اسپرژیلوس فلاووس روی میوه پسته

دو اسانس آویشن و رازیانه به عنوان بهترین و موثرترین اسانس و یک تیمار به عنوان شاهد با ۳ تکرار به کار برده شد. اسپری کردن سطح پسته‌های ۴ رقم اکبری، خنجری، عباسعلی و شاهپسند (۱۰ گرم برای هر تکرار) باید به نحوی صورت گیرد که همه سطوح پسته آغشته به سوسپانسیون را اسانس بپوشاند و سپس پتری‌ها را درون ظروف پلاستیکی که در کف آن برای تأمین رطوبت در حد اشباع، آب مقطر استریل ریخته شده بود قرار داده و در انکوباتور در دمای ۲۶ به مدت ۷ روز قرار گرفت. روز ۷ نمره دهی چشمی و شمارش اسپور توسط لام هموسایتومتری انجام شد (۱۱).

### استخراج و اندازه گیری میزان آفلاتوکسین B1 تولید شده در پسته های آلوده

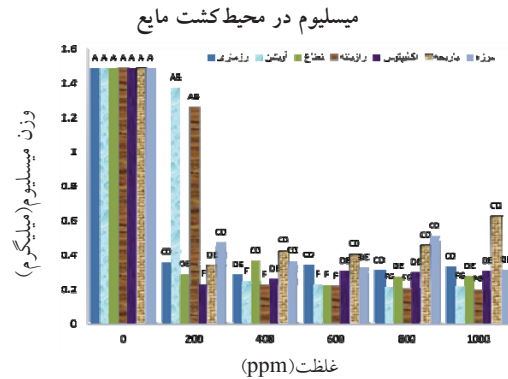
پس از محاسبه درصد کلونیزاسیون قارچ روی مغز پسته های آلوده، پسته ها در داخل آون خشک گردید تا از رشد بیشتر قارچ و تولید آفلاتوکسین ممانعت شود. نمونه های پسته به صورت مجزا به مدت ۲۴ ساعت داخل آون با درجه حرارت ۶۰ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. سپس نمونه های خشک شده داخل مخلوط کن شیشه ای ریخته و همزمان به آن آب مقطر دوبار تقطیر اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه با دور تند مخلوط گردید تا یک خمیر همگن بدست آمد. در مرحله بعد ۵ گرم نمک طعام خالص به ۵ گرم از خمیر حاصل افزوده شد و همراه با ۷۵ میلی لیتر مخلوط متانول-آب (۹۳-۷) داخل همزن ضد انفجار بمدت یک دقیقه با دور تند مخلوط گردید. سپس مخلوط حاصل از کاغذ صافی عبور داده شد. بعد از آن ۳/۱ میلی لیتر از عصاره حاصل با ۹/۹ میلی لیتر آب دیونیزه رقیق شده و ۱۲ میلی لیتر از عصاره رقیق شده از ستون های ایمونوفینیته عبور داده شد. پس از شستشوی ستون با ۲۰ میلی لیتر آب دیونیزه برای جداسازی آفلاتوکسین از ستون، ۱/۵ میلی لیتر متانول HPLC به آن اضافه گردید و حجم نهایی با استفاده از آب دیونیزه به ۳ میلی لیتر رسانده شد.



یک همبستگی معنی داری بین وزن و رشد قارچ روی مغز پسته دیده شد. بر اساس مقایسه میانگین ها و آنالیز واریانس، وزن خشک میسلیموم ها در محیط آبی YES با افزایش غلظت اسانس های گیاهی هر چند بصورت غیر معنی دار کاهش یافت (جدول ۲ و نمودار ۱).

تشکیل آفلاتوکسین B1 در نمودارهای ۲ و ۳ نشان داده شده، آنچنانکه نمونه های شاهد بیشترین مقدار آفلاتوکسین را داشتند. در مجموع اسانس های گیاهی بطور معنی داری ( $p \leq 0.05$ ) تشکیل آفلاتوکسین را توسط اسپرژیلوس فلاووس در همه غلظت ها متوقف نمودند و هر چه غلظت اسانس بیشتر شد مقدار تجمع آفلاتوکسین کاهش یافت. اسانس های آویشن و رازیانه با مقادیر ۱۰۰۰ ppm موجب بیشترین کاهش معنی دار در مقدار آفلاتوکسین B1 گردیدند (به ترتیب ۰/۲۱۳ و ۰/۲۵۱). به نظر می رسد تأثیر بازدارندگی اسانس های گیاهی در تولید آفلاتوکسین بیشتر از تأثیر آنها روی رشد میسلیموم بوده است (نمودار ۱). این موضوع در موارد دیگری هم اثبات شده بطوری که تأثیر بازدارندگی اسانس *Garcinia indica* بر رشد و تولید آفلاتوکسین از اسپرژیلوس فلاووس در غلظت های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ ppm بیشتر از بازدارندگی رشد قارچ بوده است (۱۳).

نمودار ۱- اثرات اسانس و غلظت های مختلف آن بر وزن خشک

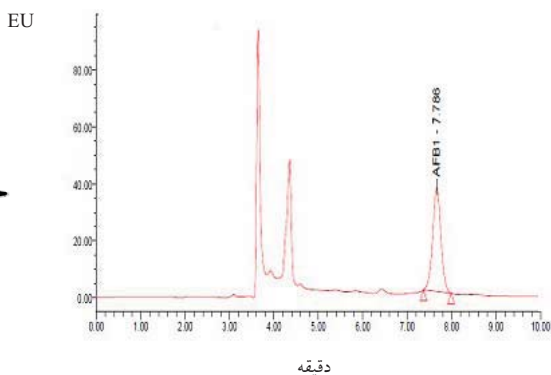


جدول ۲- تجزیه واریانس تأثیر تیمارهای مختلف بر میزان کلونیزاسیون قارچ اسپرژیلوس فلاووس هفت روز بعد از تلقیح و میزان آفلاتوکسین B1

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات (کلونیزاسیون)	میانگین مربعات (میزان آفلاتوکسین B1)
ارقام	۳	ns ۰/۸۶۶	ns ۰/۱۱
نوع اسانس	۱	** ۵۵/۷۵۷	** ۱۳۰/۲
غلظت اسانس	۲	** ۱۳۴/۳	** ۹۴/۵
ارقام * نوع اسانس	۳	ns ۰/۴۷	ns ۰/۲۵
ارقام * غلظت اسانس	۶	** ۵۶/۸۳	ns ۴/۵۵
نوع اسانس * غلظت اسانس	۲	ns ۳/۵۱۶	۸,۹۷ <sup>ns</sup>
نوع اسانس * غلظت اسانس * ارقام	۶	ns ۱/۰۵۷	۶,۹۵۳ <sup>ns</sup>
خطا	۴۸	۱۹	۳۲

ns, \*\*, \* به ترتیب غیر معنی دار و معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

نمودار ۲- کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا آفلاتوکسین B1 تیمار شده توسط اسانس های گیاهی



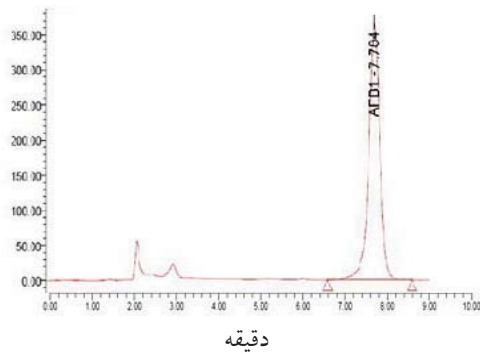
نتایج تجزیه واریانس (جدول ۲) نشان داد که اثر نوع و غلظت اسانس بر درصد کلونیزاسیون قارچ اسپرژیلوس فلاووس روی ۴ رقم پسته در روز هفتم در سطح احتمال آماری ۱ درصد دارای اختلاف معنی داری بوده، همچنین اثر متقابل (رقم\*غلظت اسانس) در سطح احتمال ۵ درصد بر درصد کلونیزاسیون این قارچ معنی دار بوده است. همچنین مشاهده شد غلظت صفر اسانس (شاهد) با میانگین ۵/۷۲ دارای بیشترین درصد کلونیزاسیون در روز هفتم در این قارچ بوده است و غلظت های ۶۰۰ و ۴۰۰ پی پی ام به ترتیب در سطوح بعدی قرار گرفتند، در اثرات متقابل ارقام اکبری و شاهپسند با غلظت صفر اسانس به ترتیب با میانگین ۶/۳۹۸ و ۶/۳۱۲ در گروه آماری بالاتری نسبت به سایر تیمارها قرار گرفتند. بنابراین با توجه به نتایج قبل



۱۰۰۰-۴۰۰ سبب بازداری از رشد قارچ و تغییرات مورفولوژیکی قارچ اسپرژیلوس فلاووس گردید(۱۶).

حساسیت گونه‌های قارچی بستگی به نوع اسانس و غلظت های مختلف آن دارد و تفاوت در فعالیت ضد قارچی اسانس‌های گیاهی به اجزای تشکیل دهنده آن مرتبط است. به طوری که یک ترکیب ممکن است به تنهایی یا به صورت تشدیدکنندگی با سایر ترکیب‌ها فعالیت ضد قارچی اسانس را باعث شود تا در غلظت معینی تأثیر قابل قبولی داشته باشد. راد و همکاران نشان دادند که اسانس آویشن و مرزه به ترتیب با غلظت ۲۰۰ و ۴۰۰ پی‌پی‌ام موفق به مهار رشد قارچ اسپرژیلوس پارازیتیکوس از طریق اندازه‌گیری وزن خشک شد (۱). طی بررسی دیگر امید بیگی و همکاران دریافتند که اسانس آویشن در غلظت ۳۵۰ میکرولیتر در میلی لیتر در محیط مایع باعث صد در صد بازداری از رشد قارچ اسپرژیلوس فلاووس شده است (۱۷). طی بررسی دیگر دریافتند که اسانس آویشن خاصیت ضد قارچی مناسبی را در مقابل قارچ اسپرژیلوس فلاووس از خود نشان داد که به علت دارا بودن ترکیبات فنلی (تیمول، کارواکرول، برنئول) می باشد و همچنین باعث گرانبولی شدن محتوی سیتوپلاسمی و از بین رفتن غشای سیتوپلاسمی و در نهایت از جوانه زنی میسلیم جلوگیری می کند (۱۸). طی بررسی دیگر محققین دریافتند که اسانس آویشن باعث کاهش رشد میسلیم در غلظت ۸ میکرولیتر شد و نشان دادند که هر چه غلظت افزایش می یابد باعث دناتوره شدن پروتئین آنزیم می شود که آن هم به علت وجود ترکیبات فنلی (تیمول، کارواکرول، ایوژنول) می باشد (۱۹). با توجه به اینکه ترکیبات طبیعی فعالیت سلولی آفلاتوکسین ها را تنظیم می کنند بنابراین ترکیبات حلقوی آروماتیک تولید آفلاتوکسین را نیز کنترل می کنند. تعدادی از قارچ ها بخصوص اسپرژیلوس و پنی سیلیوم توانایی رشد در محیط حاوی مواد فنولیک را به عنوان تنها منبع کربنی داشته و حتی توانایی کشت در سطوح بالای مواد تاننی را دارند. در بین این قارچ ها یک آنزیم قارچی از اسپرژیلوس فلاووس نژاد IF05838 استخراج شده

نمودار ۳- کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا آفلاتوکسین B1 تولید شده توسط اسپرژیلوس فلاووس



### بحث و نتیجه گیری

آزمایش‌های انجام شده نشان داد در محیط کشت مایع بیشترین میزان بازداری از رشد قارچ در غلظت ۶۰۰ ppm و کمترین میزان بازداری در غلظت ۲۰۰ ppm می باشد. نتایج رشد اسپرژیلوس فلاووس بعد از ۲۴ ساعت، طی هفت روز (روز سوم، پنجم، هفتم) پس از تلقیح بررسی شد. که روز اول پس از تلقیح در هیچ یک از تیمارها رشدی صورت نگرفته بود، بین مغز پسته بدون اسانس (شاهد) و پسته پوشش داده با غلظت های مختلف اسانس در هر دو سطح تفاوت معنی دار وجود دارد که هر چه غلظت افزایش می یابد حوزه مهار رشد هم افزایش می یابد. یعنی غلظت ۶۰۰ پی پی ام اثر مهارکنندگی بیشتری را نسبت به غلظت ۴۰۰ ppm از خود نشان داد بنابراین تفاوت در فعالیت ضد قارچی اسانس‌های گیاهی به ترکیب آن‌ها بستگی دارد. یک ترکیب ممکن است به تنهایی یا به صورت تشدید کنندگی با سایر ترکیب‌ها فعالیت ضد قارچی اسانس را باعث شود (۱۴). همان طور که عفت پناه و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند با افزایش غلظت اسانس آویشن قدرت بازدارندگی اسانس هم افزایش می یابد بنابراین اسانس آویشن با غلظت ۱۰ درصد سبب جلوگیری از رشد قارچ اسپرژیلوس فلاووس گردید. که با یافته های ما مطابقت دارد (۱۵). گندمی و همکاران طی تحقیقی نشان دادند که اسانس آویشن با غلظت ppm



بازداشته می شود و آنزیم Fungal Tannase مسئول بازداشتن آفلاتوکسین است (۲۱). با توجه به محدودیت های اتحادیه اروپا برای آفلاتوکسین (۴ ppb نسبت به ۱۰-۱۵ ppb) در این تحقیق نیز با استفاده از اسانس های آویشن و رازیانه تولید آفلاتوکسین به سطح قابل قبولی (۰/۲۱۳ ppb) کاهش یافت (۲).

### تشکر و قدردانی:

این مقاله بخشی از پایان نامه خانم مهندس فرشته زیوه ای و در ادامه طرح تحقیقاتی دکتر حسین افشاری بوده است. بدین وسیله از همکاران و دوستانی که در امر مشاوره آماری و اجرا به اینجانبان کمک نموده اند تشکر فراوان می نمایم.

است (۲۰). این آنزیم قارچی خارج سلولی زنجیره های استری در تانیک اسید، گلوکز ۱ گالات و متیل گالات را به ترتیب هیدرولیز می نماید. تانن های قابل هیدرولیز شامل یک کربوهیدرات مانند گلوکز استری شده با حلقه گالیک اسید یا هگزا هیدروکسی اسید که ساختار ساده ای دارد می باشند. ممکن است پیچیدگی بیشتر از اتصال زنجیره های اضافی حلقه های اسید گالیک با اسیدهای استری اولیه بدست آید. وجود آنزیم قارچی بین سلولی احتمالاً برای دسترسی قارچ به حلقه گلوکز تانن ها که جهت تغذیه قارچ اسپرژیلوس فلاووس مفید است لازم باشد. توانایی قارچ برای هیدرولیز تانن ها نشان می دهد که یک یا چند ترکیب هیدرولیزی وجود دارند که تولید آفلاتوکسین را متوقف می کنند. کری و همکاران در تحقیقاتشان نشان دادند که بیوستنز آفلاتوکسین توسط تانن های قابل هیدرولیز از جمله گالیک اسید موجود در پسته

### References:

1. Rad S, Afshari H, Hokmabadi H, Tahmasbi S. Study of Anti Fungal Effects of Herbal Essences on *Aspergillus Parasiticus*, A producer of Aflatoxin In pistachio. Journal of medicinal plant Research. 2011; 5(20): 5155-5159.
2. Codex General Standard For contaminants and Toxins in Food and Feed. Codex Standard. 2008; 44:193-199.
3. Bagambula M, uyttendaele J, Deberere C.F. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils carvacrol thymol , estragol , linalol and p-cymene towards shigella sonnei and s.flexeneri. Food Microbiology. 2004; 21:33-42.
4. Bush D. A. The nature of macerating factor of *penicillium digaitatum* saccardo. Phytochemistry. 1963; 7-134-137.
5. Burt S, Coote P. Preservative agents in food . Mode of action and Microbial resistance mechanisms. International Journal of food Microbiology.1999; 50:1-7.
6. Chalutz E, Wilson C. I. Post harvest bio control of green and blue mold and sours rot of citrus fruit. Plant Disease. 1990; 74(2):134-137.
7. Deabes M.M, Abou El – soud N.H, Abou EL Kassem L.T. In vitro Inhibition of Growth and Aflatoxin B1 production of *Aspergillus Flavus* strain (ATCC 16872) by Various Medicinal plan Essentail oils. Journal of Medicinal science. 2011; 4(4) 345 - 350.
8. Ghasemipirbalouti A, Hamed B, Abdizadeh R, Malekpoor F. Antifungal activity of the essential oil of Iranian medicinal plants. Journal of Medicinal plants Research. 2011; 5(20): 5089-5093.
9. Moghtader M, salari H, Farahmand A. Evaluation of the antifungal effects of rosemary oil and comparison with synthetic borneol and fungicide on the growth of *Aspergillus flavus*. Journal of

- Ecology and the natural Environment. 2011; 3(6): 210-214.
10. Ghewande M. P, Nagaraj G, Desai S, Narayan P. Screening of groundnut bold seeded genotypes for resistance to *Aspergillus flavus* seed colonization and less aflatoxin production. Journal of seed science and Technology. 1993;21, 45-51[persian].
  11. Shahvardi S, Sefidkon F, Jamzad Z, Nejad satari T. Extraction and determination of essential oil compounds *Origanum strobilaceum*. Iranian journal of medicinal and aromatic plants. 2012; 28(3): 23-31[persian].
  12. Afshari H, Talae A. R. Differences of elements in early splitting of pistachio nuts and the effect of Phenolic compounds and Gallic Acid on rate. Journal of Agricultural Sciences and Industries.2008; 23(1):12-19[persian].
  13. Selvi A. T, Joseph G. S, Jayaprakasha G. K. Inhibition of growth and aflatoxin production in *Aspergillus flavus* by *Garcinia indica* extract and its antioxidant activity. Food Microbiology. 2003; 20:455-460.
  14. Plotto A, Roberts D, Roberts R.G. Evaluation of plant essential oils as natural post harvest disease control of tomato (*lycopersicon Esculentum*). Acta Horticulturae. 2003;153.
  15. Effatpanah H, Sabokbar A, Kordbacheh P, Bahonar A, Mansour B, Saeednejad L. Antifungal Effect of *Zataria multiflora*: An In Vitro Evaluation. Journal of Global veterinaria. 2010; 4(2):140-143.
  16. Gandomi Nasrabadi H, Misaghi A, Akhondzadeh Basti A, Khosravi A, Bokae S, Abbasifar A. Effects of *Zataria multiflora* Boiss. Essential oil on *Aspergillus flavus*. Journal of Medicinal Plants. 2008; 7(27):45-51[persian].
  17. Omidbeygi M, Barzgar M, Hamidi Z, Naghibadi H. Antifungal activity of thyme , summer savory and clove essential oil against *Aspergillus Flavus* in liquid medium and tomato pasta. Food control. 2007; 18:1518-1523.
  18. Centeno S, Calvo M.A, Adelanado C, Figueroa S. Antifungal Activity of Extract *Rosemarinus officinalis* and *Thymus Vulgaris* against *Aspergillus flavus* and *A.ochraceus*. Journal of Biological Science. 2010; 13(9):452-455.
  19. Viuda Martos M, Ruiz Navaias Y, Fernandez-Looez J, perez-Alvarez J.A. Antifungal Activity of Thyme Clove And Organo Essential Oils. J. of Food Safety. 2005; (27):91-101.
  20. Mahoney N, Molyneux R.J. Phytochemical inhibition of aflatoxigenicity in *aspergillus flavus* by constituents of walnut (*juglans regia*). Journal of Agricultural Food Chemistry. 2004; 52:1882-1889.
  21. Cary J.W, Harris P.Y, Mahoney N.E, Molyneux R.J. Inhibition of aflatoxin biosynthesis by tannic acid. Proceeding of 4 annual fungal genomics, 17 annual aflatoxin elimination work shop. California. 2004:102.

# Study the antifungal effects of plant medicinal essences on growth of *Aspergillus Flavus* and Aflatoxin B1 in Pistachio (*Pistacia vera* L.)

Hossein Afshari<sup>1</sup>, Fereshte Ziveai<sup>2</sup>, Gholamreza Bagheri<sup>3</sup>, Mehdi Afshari<sup>4</sup> and Masoud Zadehbagheri<sup>5</sup>

1- (**Corresponding Author**), Asistant professor, damghan branch, Islamic azad, University, Iran. Email: afshari2000ir@yahoo.com

2-Plant Production Student, Islamic Azad University, Damghan branch ,damghan, Iran

3-Zabol university of medical sciences.

4- Ph.D candidates in epidemiology. Research center for modeling in health. Kerman university of medical sciences.

5-Department of Horticulture, damghan branch, Islamic azad University, Damghan,Iran

## Abstract:

**Background and purpose:** In order to study the antifungal (inhibitory) effect of herbal essences on prevention from growth of *Aspergillus Flavus* fungus and Aflatoxins, herbal essences, include thyme, mint, eucalyptus, fennel, galbanum, rosemary, and satureja were studied.

**Materials and methods:** factorial test was applied in basic completely randomized design. Solid and liquid environments were used for analyzing mycelium fungus.

**Results:** thyme and fennel essences exhibited maximal inhibitory effect. Results suggested that the effects of essence type and essence concentration caused significant differences on *A. Flavus* colonization percent and AFB1. Also, interaction effects (cultivar\*essence concentration) was significant on colonization percentage of this fungus in 5% level.

**Conclusion:** Concentrations of 800and 1000 of fennel(0.213 , 0.584 ppb) and thyme (0.215, 0.452 ppb) had the most inhibitory effects on AFB1 respectively.

**Key words:** *Aspergillus Flavus*, Aflatoxin, Essence, Media, Pistachio.