بررسی اثر اسانس گل گیاه سرخارگل (*Echinacea pupurea*) بر رشد و توانایی تولید مایکوتوکسین توسط قارچ *آسپرژیلوس فلاووس*

آرزو ملکوتی[1]، انوشه شریفان[2*]، علیرضا بصیری[3]

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم و مهندسی صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲. گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم و مهندسی صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۳. گروه صنایع غذایی و تبدیلی، پژوهشکده فناوری‌های شیمیایی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران.

***نویسنده مسئول:** *a_sharifan2000@yahoo.com*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۲/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۵/۳۰

چکیده

بیماری‌های ناشی از مواد غذایی آلوده به مایکو توکسین ها از موارد نگران کننده سلامت انسان می باشد. جهت کاهش زیان های اقتصادی و خطرات جانی ناشی از این عوامل، استفاده از ترکیبات زیست فعال به منظور بهبود ایمنی و نگهداری مواد غذایی مورد توجه قرار گرفته است. هدف از این مطالعه تعیین اثر اسانس گل گیاه سرخارگل به عنوان نگهدارنده طبیعی به منظور کنترل رشد کپک *آسپرژیلوس فلاووس* و جلوگیری از سنتز آفلاتوکسین B_1 می‌باشد. برای این منظور، ابتدا حداقل غلظت بازدارنده (MIC) و حداقل غلظت کشنده (MFC) اسانس با استفاده از روش انتشار دیسک محاسبه شد و سپس اثر غلظت‌های مختلف اسانس روی تولید آفلاتوکسین B_1 مورد ارزیابی قرار گرفت. مقدار آفلاتوکسین تولید شده در محیط کشت YES با استفاده از HPLC اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که شاخص‌های MIC و MFC به ترتیب برابر با ۱۰۰۰۰ ppm و ۱۵۰۰۰ ppm بودند. نتایج آزمون هاله عدم رشد نشان داد که افزایش غلظت اسانس به طور معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) مانع رشد میروبی شده است. تولید آفلاتوکسین B_1 به طور معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) وابسته به غلظت اسانس گیاه سرخارگل بود، به طوری‌که با افزایش غلظت اسانس میزان تولید آفلاتوکسین B_1 به طور معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) کاهش یافت. براین اساس، از تولید آفلاتوکسین B_1 توسط *آسپرژیلوس فلاووس* با استفاده از غلظت ۱۵۰۰۰ ppm اسانس گیاه سرخارگل جلوگیری شد. می‌توان نتیجه گرفته که اسانس گیاه سرخارگل می‌تواند تولید آفلاتوکسین B_1 توسط *آسپرژیلوس فلاووس* را تا سطح قابل قبولی کنترل نماید.

کلید واژه ها: آسپرژیلوس فلاووس، آفلاتوکسین B_1، اسانس گیاه سرخارگل، نگهدارنده طبیعی.

مقدمه

در قرن حاضر، حفظ ایمنی ماده غذایی و کیفیت آن در طول دوره نگهداری امری است که نه تنها توجه متخصصین صنعت غذا و مسئولین سلامت کشورها را به خود جلب کرده است، بلکه بی توجهی یا کم توجهی به آن می‌تواند صدمات جبران ناپذیری به جامعه وارد کند. امروزه بیماری‌های ناشی از مصرف غذاهای آلوده در سراسر جهان و حتی در کشورها یک مشکل اساسی به شمار می‌رود. در حال حاضر استفاده از نگهدارنده‌های شیمیایی، متداول‌ترین راه برای حفظ ایمنی و سلامت ماده غذایی در طول دوره نگهداری است. عدم اطمینان مصرف کنندگان به سلامت مواد غذایی حاوی نگهدارنده‌های سنتزی و اثبات اثرات مخرب این نگهدارنده‌ها بر سلامت انسان‌ها منجر به گرایش مصرف کنندگان به مواد غذایی طبیعی و یا محصولات غذایی حاوی جایگزین‌های طبیعی برای نگهدارنده‌های سنتتیک شده است (Alzoreky *et al.*, 2003; Burt, 2004).

به دلیل گستردگی بالای قارچها در سطح جهان، محصولات غذایی غالبا در معرض آلودگی با قارچها قرار دارند. سموم تولید شده توسط قارچها در طول دوره

انبارداری، حمل و نقل و فرآوری پس از برداشت منجر به کاهش کیفیت، مقدار، مواد مغذی و در نتیجه کاهش بازار پسندی محصول خواهد شد. برطبق گزارشات سازمان FAO سالانه حدود ۱۰۰۰ میلیون تن مواد غذایی در اثر رشد قارچ‌های انباری به سموم قارچی آلوده می‌شوند (Prakash *et al.*, 2015). گونه‌های جنس آسپرژیلوس عمدتا جزء کپک‌های انباری قلمداد می‌شوند و رشد و نمو قارچ‌های انباری و تولید متابولیت‌های ثانویه آنها مشکل جهانی برای کشاورزی، صنایع غذایی و صنایع تولید خوراک دام می‌باشد. *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* با تولید سموم قارچی مانند آفلاتوکسین از این نظر اهمیت بالایی دارند (سنچولی و همکاران، ۱۳۹۴).

آفلاتوکسین‌ها ترکیبات بسیار سمی، موتاژنیک، تراتوژنیستی و سرطانزا هستند که به عنوان متابولیت-های ثانویه توسط گونه‌های قارچی آسپرژیلوس تولید می‌شوند. این سموم قارچی به واسطه شرایط دمایی و رطوبتی حضور گسترده‌ای در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری دارند. براساس مطالعات انجام شده دریافت روزانه آفلاتوکسین‌ها توسط انسان‌ها در دامنه ۰-۳۰۰۰۰ppb و با میانگین دریافت ۱۰-۲۰۰ ppb تخمین زده شده است و این در حالی است که استاندارد اتحادیه اروپا حد مجاز مجموع آفلاتوکسین‌ها در مواد غذایی دریافتی را ۴ ppb تعیین کرده است (Bhat *et al.*, 2010). آژانس بین المللی تحقیقات سرطان این سموم را در دسته ۱ ترکیبات سرطان‌زا طبقه بندی کرده است (Chiavaro *et al.*, 2001).

اسانس‌ها متابولیت‌های ثانویه گیاهی هستند که به روش تقطیر یا به وسیله عمل فشردن و یا سایر روش‌ها به دست می آیند. اسانس‌ها ترکیبات طبیعی معطر، فرار و بسیار پیچیده متشکل از اجزاء مختلف هستند و عمدتا از نظر حضور ترکیبات فنلی اشتراک دارند (Farzaneh & Carvalho, 2005؛ مینوئیان حقیقی و خسروی، ۱۳۸۸). اسانس‌ها و دیگر عصاره‌های گیاهی عمدتا مسئول انجام فعالیت‌های ضد میکروبی در گیاهان، ادویه‌ها و گیاهان معطر هستند و این ترکیبات گیاهی از جمله گلیکوزیدها، ساپونین‌ها، تانن‌ها، آلکالوئیدها و اسانس‌ها در اندام‌های گیاهی به عنوان یک سیستم دفاعی در برابر حمله میکروبی حضور دارند. ترکیبات اصلی تشکیل دهنده هر نوع اسانس تا بیش از ۸۵ درصد از آن را شامل می‌شوند و سایر ترکیبات فرعی غالبا در مقادیر جزئی در کنار ترکیبات اصلی اسانس قرار دارند و در واقع ترکیبات اصلی موجود در هر اسانس تعیین کننده ویژگی‌های بیولوژیکی آن خواهد بود (Tajkarimi *et al.*, 2010).

گیاه سرخارگل (*Echinacea pupurea*) گیاه علفی، متعلق به تیره میناسانان (گل ستاره) (*Asteraceae*) است (Binns *et al.*, 2000). این گیاه دارای کاربرد-های دارویی، غذایی و آرایشی بهداشتی است و در سال‌های اخیر کشت آن در ایران آغاز شده است (ایزدی و همکاران، ۱۳۹۳b). عصاره گیاه سرخارگل در مبارزه با باکتری‌های بیماریزای باسیلوس سرئوس و لیستریا مونوسیتوژنز موثر بوده (ایزدی و همکاران، ۱۳۹۳a) و همچنین سلول‌های ایمنی شامل ماکروفاژها را تحریک کرده و دارای اثرات ضد التهابی است. در مورد اثرات ضد قارچی این گیاه در مطالعات آزمایشگاهی می‌توان به اثر ترکیبات پلی ساکاریدی موجود در عصاره گیاه سرخارگل در ممانعت از رشد *کاندیدا آلبیکنز* و همچنین افزایش مقاومت بدن موش-های آزمایشگاهی در برابر دوزهای کشنده تزریقی این میکروارگانیسم بیماری‌زا اشاره کرد (Tragni *et al.*, 1988; Roesler *et al.*, 1991). بر اساس مطالعات اخیر انجام شده مشخص شده است که اغلب اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی استخراج شده از گیاهان دارای خواص ضد میکروبی می‌باشند (Kordali *et al.*, 2005) و در این بین برخی از آنها دارای اثرات بازدارنده علیه *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* هستند (Rasooli, 2007). در سابقه مطالعات اثرات

ضد قارچی اسانس‌های گیاهی مختلف از جمله آویشن شیرازی و آویشن کرکی (فکور و همکاران، ۱۳۸۸)، زیره سبز، کاکوتی و سیاه دانه (مینوئیان حقیقی و خسروی، ۱۳۸۸)، گلپر (سقازاده و همکاران، ۱۳۸۹)، گزنه و نعنا فلفلی (گران و همکاران، ۱۳۹۴)، آویشن، خارمریم و آلوئه‌ورا (فانی مکی و همکاران، ۱۳۹۴)، گیاه‌های ریحان، پرک هندی، گشنیز و برگ مو (Atanda *et al.*, 2007)، ریحان و کافور (Mokbel & Alharbi, 2015)، دارچین (Kiran *et al.*, 2016) و زنجبیل (Nerilo *et al.*, 2016) بر قارچ‌های مولد آفلاتوکسین (*آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس پارازیتیکوس*) مورد بررسی قرار گرفته و نتایج نشان دهنده تاثیرات قابل توجه ضد قارچی آنها است. هدف از انجام مطالعه حاضر بررسی تاثیر اسانس گل گیاه سرخارگل بر رشد و توانایی تولید مایکوتوکسین توسط قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* می‌باشد.

روش کار

مواد مورد استفاده در این مطالعه از جمله محیط کشت‌های PDA[1] و YES[2]، متانول، سدیم سولفیت، کلروفرم، اتانول و Tween 80 از شرکت Merck تهیه و مورد استفاده قرار گرفت.

استخراج اسانس گل سرخارگل

گیاه سرخارگل از مزرعه تامین کننده محلی تهیه شد و اندام‌های مختلف آن از هم جدا شده و گل گیاه در شرایط آزمایشگاهی و بدون استفاده از نور مستقیم خورشید خشک و پودر شد. اسانس گیری از پودر الک شده با مش شماره ۲۵، با استفاده از دستگاه کلونجر انجام شده و اسانس حاصله با سولفات سدیم رطوبت زدایی شد (اندرگانی و همکاران، ۱۳۹۳).

تهیه سوسپانسیون اسپور قارچی

قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* ۵۰۰۴ ATCC از انستیتو پاستور ایران تهیه شده و روی محیط کشت PDA کشت داده شد و به مدت ۱۴ روز در دمای ۲۶ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شد. اسپورهای حاصل بر روی محیط کشت با استفاده از ۱۰ میلی لیتر از محلول Tween 80 (محلول ۰/۰۵ درصد) از سطح پلیت با استفاده از یک اسکالپل استریل جدا و برداشته شد. غلظت اسپور موجود در محلول با استفاده از روش نیم مک فارلند تعیین شد به این منظور استاندارد نیم مک فارلند سولفات باریم به این روش تهیه شد ml ۰/۵ از کلرور باریم ($BaCl_2$) ۰/۰۴۸ mol/l ($2H_2O$) ۱/۱۷۵درصد) W/V$BaCl_2$. به ml ۹۹/۵ اسید سولفوریک mol/l ۰/۱۸(V/V ۱ درصد) شده و بخوبی همزده شد. سوسپانسیون حاصله تا رسیدن به غلظت مطلوب با محلول Tween 80 (محلول ۰/۰۵ درصد) رقیق شد.

تعیین شاخص‌های MIC و MFC اسانس

برای ارزیابی تاثیر اسانس گل سرخارگل در رشد قارچ *آسپرژیلوس فلاووس*، غلظت‌های مختلف اسانس (صفر، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۳۰۰۰، ۴۰۰۰، ۵۰۰۰، ۷۵۰۰، ۱۰۰۰۰ و ppm ۱۵۰۰۰) در نسبت‌های معین درون محیط کشت PDA استریل مذاب ریخته و سپس درون پلیت‌های استریل ریخته شد. یک دیسک تهیه شده از کاغذ واتمن شماره ۱ با قطر ۵ میلی متر در مرکز پلیت بعد از بستن آن قرار داده شد و ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپور (با تعداد اسپور $۱۰^{۶}\times$ ۱ در هر میلی لیتر از سوسپانسیون) ریخته شد. پلیت‌ها به مدت ۱۰ روز در دمای۳۰ درجه سلسیوس در تاریکی گرمخانه گذاری شد و روزانه میانگین دو قطر عمودی پرگنه اندازه‌گیری شد. بعد از گذشت دوره گرمخانه گذاری دیسک‌هایی که رشدی روی محیط‌های کشت حاوی اسانس نداشتند از روی این پلیت‌ها

[1] Potato Dextrose Agar

[2] Yeast-extract-sucrose

برداشته شدند و روی محیط کشت PDA جدید فاقد اسانس قرار داده شد تا اثرات قارچ کشی و یا متوقف کردن رشد قارچها توسط اسانس تعیین شود. کمترین غلظتی که از رشد قارچها جلوگیری کرد را به عنوان حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC[3]) و کمترین غلظت اسانس که باعث مرگ قارچ شد را تحت عنوان حداقل غلظت کشنده قارچ (MFC[4]) بیان گردید. همه تیمارها در سه تکرار انجام شد و اثر ضد قارچی به صورت میانگین قطر هاله عدم رشد قارچ بیان شد (Gandomi *et al.*, 2009).

تهیه محیط رشد و تولید آفلاتوکسین

محیط کشت YES به عنوان محیط کشت پایه برای رشد و تولید آفلاتوکسین مورد استفاده قرار گرفت. ۱ میلی لیتر از محلول حاوی اسپورهای قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* با تعداد ۱×۱۰^{۶} در هر میلی لیتر درون محیط کشت مغذی YES تلقیح و همزنی شد. هم زمان غلظت مورد نظر از اسانس (غلظتهای ۱۰۰۰۰، ۱۵۰۰۰، ۲۰۰۰۰ و ppm۲۵۰۰۰) به محیط کشت افزوده شد و گرمخانه گذاری به مدت ۷ روز در دمای ۳۰ درجه سلسیوس انجام شد (Farag *et al.*, 1989).

اندازه‌گیری مقدار آفلاتوکسین B_1 موجود در محیط کشت YES با استفاده از تکنیک HPLC انجام شد. بخشی از محیط کشت (۱۰ میلی لیتر) ۲ مرتبه با استفاده کلروفرم (۱۵ میلی لیتر در هر مرتبه) شستشو شد. بعد از مخلوط کردن دو محلول کلروفرم حاوی آفلاتوکسین با یکدیگر، این مخلوط با سدیم سولفیت فیلتر شده و بر روی حمام آب داغ تا خشک شدن کامل ادامه یافت. سیستم HPLC شامل یک پمپ حلال، دتکتور فلوئورسنت و ستون C18 بود و حجم تزریق نمونه ۱۰ میکرولیتر می‌باشد. فاز متحرک متشکل از استونیتریل (۱۵ درصد)، آب (۷۰ درصد) و متانول (۱۵ درصد) و نرخ جریان ۱mL/min بود. زمان بازداری آفلاتوکسین B_1 تقریبا ۶/۳ دقیقه می‌باشد (Zinedine *et al.*, 2005).

آنالیز آماری

آزمایشات در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار با استفاده از روش تجزیه واریانس داده‌ها (ANOVA) و با به کارگیری نرم افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته و میانگین داده‌ها نیز با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد مورد مقایسه قرار گرفت. برای رسم نمودارها نیز از نرم افزار Excel استفاده شد.

نتایج

شاخص‌های MIC و MFC اسانس

جدول ۱ نشان دهنده نتایج مربوط به اندازه‌گیری قطر کلنی قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* تحت تاثیر غلظت‌های مختلف اسانس گیاه سرخارگل است. قطر پرگنه ه طور معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) وابسته به غلظت بکاررفته اسانس گیاه سرخارگل بود (جدول ۱). جدول ۲ نشان داده دهنده رشد و یا عدم رشد و زنده مانی قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* در مقابل غلظت های متفاوت اسانس سرخارگل به منظور تعیین دو شاخص MIC و MFC می باشد.

جدول ۱- قطرپرگنه قارچ آسپرژیلوس فلاووس در محیط کشت PDA حاوی غلظت‌های مختلف اسانس سرخارگل

ردیف	غلظت اسانس (ppm)	قطر پرگنه (میلی‌متر)
۱	صفر (شاهد)	۷/۳۲ ± ۰/۲۵[a]
۲	۵۰۰	۶/۶۱ ± ۰/۲۰[b]
۳	۱۰۰۰	۶/۵۸ ± ۰/۱۹[b]
۴	۲۰۰۰	۶/۵۶ ± ۰/۳۲[b]
۵	۳۰۰۰	۶/۵۵ ± ۰/۲۷[b]
۶	۴۰۰۰	۶/۵۳ ± ۰/۲۵[b]
۷	۵۰۰۰	۶/۵۰ ± ۰/۳۰[b]
۸	۷۵۰۰	۶/۴۵ ± ۰/۳۳[b]
۹	۱۰۰۰۰	۵/۳۲ ± ۰/۲۴[c]
۱۰	۱۵۰۰۰۰	-

*حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($p<۰/۰۵$) می‌باشد.

[3] Minimum inhibitory concentration

[4] Minimum fungal concentration

جدول ۲- غلظت‌های MIC و MFC اسانس گیاه سرخارگل علیه قارچ *آسپرژیلوس فلاووس*

غلظت اسانس(ppm)	MIC	MFC
۰ (شاهد)	+	+
۵۰۰	+	+
۱۰۰۰	+	+
۲۰۰۰	+	+
۳۰۰۰	+	+
۴۰۰۰	+	+
۵۰۰۰	+	+
۷۵۰۰	+	+
۱۰۰۰۰	-	+
۱۵۰۰۰	-	-

+: کاهش غیر معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) قطر کلنی؛ -: کاهش معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) قطر کلنی و یا عدم رشد کلنی

تعیین مقدار آفلاتوکسین B_1

جدول ۳ نتایج مربوط به تعیین مقدار آفلاتوکسین B_1 تولید شده توسط قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* در معرض غلظت‌های مختلف اسانس گیاه سرخارگل با روش HPLC در محیط کشت YES را نشان می‌دهد.

جدول ۳- مقدار آفلاتوکسین تولید شده توسط قارچ آسپرژیلوس فلاووس تحت تاثیر غلظت‌های مختلف اسانس گیاه سرخارگل

ردیف	غلظت اسانس (ppm)	مقدار آفلاتوکسین B1 (ppb)
۱	صفر (شاهد)	۱۲۰۱/۲۵ ± ۵۰a
۲	۱۰۰۰۰	۴۳۶/۴۷ ± ۶۲a
۳	۱۵۰۰۰	n.d.
۴	۲۰۰۰۰	n.d.
۵	۲۵۰۰۰	n.d.

*حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($p<۰/۰۵$) می‌باشد.

*n.d.: شناسایی نشد.

بحث

به طور کلی ارزیابی فعالیت ضد میکروبی اسانسهای گیاهی به دلیل تعدد و پیچیدگی ترکیبات شیمیایی آنها، فراریت و همچنین نامحلول بودن آنها در آب مشکل می باشد به این منظور انتخاب روش مناسب جهت بررسی ویژگی ضد میکروبی و در صورت لزوم انتخاب ترکیب حلال مناسب، در عین حال توجه به درجه حرارت در کلیه مراحل آزمون جهت جلوگیری از تبخیر ترکیبات موثر اسانس ضروری می باشد. آلودگی کپکی یکی از مشکلات اصلی نگهداری طیف گسترده‌ای از محصولات غذایی است و بی تردید یکی از جایگزین‌های ایمن نگهدارنده‌های سنتزی استفاده از عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی است. اسانسهای گیاهی از ساخت DNA، RNA، پروتئین و در مواردی پلی ساکاریدها در سلولهای قارچی جلوگیری کرده و می توانند در نقل و انتقال انتخابی مواد از طریق پوششهای سلولی اختلال ایجاد کنند. نتایج حاصل از این مطالعه می تواند اطلاعات پایه ای در زمینه اثربخشی و کارایی اسانس گل گیاه سرخارگل در مهار رشد و تولید توکسین توسط کپک آسپرژیلوس فلاووس ارائه دهد. با افزایش غلظت از صفر تا ppm ۷۵۰۰ قطر کلنی‌های قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* کاهش یافت اما این میزان کاهش از لحاظ آماری معنی‌دار نبود ($p<۰/۰۵$). با این وجود افزایش غلظت از ppm ۷۵۰۰ تا ppm ۱۰۰۰۰ به طور معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) منجر به کاهش قطر کلنی‌های قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* شد. همچنین با افزایش غلظت از ppm ۱۰۰۰۰ تا ppm ۱۵۰۰۰ اسانس گیاه سرخارگل روی محیط کشت PDA حاوی قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* نشان داد که هیچگونه رشدی از میسیلیوم‌های قارچ روی محیط کشت مشاهده نشد. فعالیت ضدقارچی اسانس سرخارگل وابسته به ترکیب غالب موجود در آن یعنی جرماکرن دی[5]می‌باشد. مطالعه اثر ضدمیکروبی این اسانس نشان دهنده تاثیرات ضد میکروبی بالاتر آن علیه قارچها و مخمرها در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی و مثبت است (ایزدی و همکاران، ۱۳۹۳a). تاثیرات ضد میکروبی عصاره و اسانس سرخارگل علیه باکتری

[5] Germacrene D

پکتوباکتریوم کاروتروم (اندرگانی و همکاران، ۱۳۹۳)، باکتری‌های بیماری زای *باسیلوس سرئوس*، *لیستریا مونوسیتوژنز*، *اشرشیاکلی*، *شیگلا دیسنتریا* و *سودوموناس آئروژینوزا* ، آسپرژیلوس نایجر، کاندیدا آلبیکنز و کاندیدا کروزی (ایزدی و همکاران، ۱۳۹۳a)، ساکارومایسس سرویزیه، کاندیدا کفیر، کاندیدا آلبیکانس، کاندیدا تروپیکالیس و کاندیدا مالتوزا (Binns *et al.*, 2000) اثبات شده است و یافته‌های مطالعه حاضر تایید کننده اثرات ضد قارچی اسانس سرخارگل می‌باشد.

براساس نتایج تحلیل واریانس داده‌های مربوط به تعیین مقدار آفلاتوکسین B_1 مشخص شد که مقدار آفلاتوکسین تولید شده به طور معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) وابسته به غلظت اسانس گیاه سرخارگل بکارگرفته شده است. همان‌طور که نتایج نشان می‌دهند با افزایش درصد بکارگیری اسانس مقدار آفلاتوکسین تولید شده به طور معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) کاهش می‌یابد.

نمونه‌های تیمار شده با اسانس گیاه سرخارگل در غلظت بالاتر از ppm ۱۰۰۰۰ (یعنی ۱۵۰۰۰ تا ۲۵۰۰۰ پی‌پی‌ام) تولید آفلاتوکسین توسط قارچ آسپرژیلوس فلاووس صورت نگرفت و آفلاتوکسین B_1 در این غلظت‌ها شناسایی نشد. تاثیرات ضد قارچی اسانس سرخارگل بواسطه حضور ترکیبات فنلی نظیر جرماکرن (فراوان‌ترین ترکیب)، پارا-سیمن، بتا-کاریوفیلن، آلفا-همولن و آلفا-پینن می‌باشد (Hudaib *et al.*, 2002). همچنین خاصیت آب‌گریزی ویژه اسانس‌ها و عصاره‌ها سبب واکنش آن‌ها با لیپیدهای موجود در غشای سلولی، نفوذپذیری غشاء، اختلال در ساختار اصلی سلول‌ها و از بین بردن هموستازی سلولی (حفظ تعادل سلولی) می‌شود (Seow *et al.*, 2014). تاثیرات ضد قارچی روی فعالیت *آسپرژیلوس فلاووس* و تولید آفلاتوکسین عصاره ادویه‌های طبیعی زیره سیاه، زردچوبه، فلفل سیاه، هل و بادیان رومی (Ibrahim *et al.*, 2017) ، اسانس‌های آویشن شیرازی و میخک (Moosavi-Nasab *et al.*, 2018) اثبات شده است.

نتیجه گیری کلی

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که شاخص‌های MIC و MFC برای قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* در محیط کشت PDA به ترتیب برابر با ppm ۱۰۰۰۰ و ppm ۱۵۰۰۰ بود. همچنین نتایج اندازه‌گیری مقدار آفلاتوکسین تولید شده در محیط کشت YES تحت تاثیر غلظت‌های مختلف اسانس گل سرخارگل نشان داد که با افزایش غلظت میزان تولید آفلاتوکسین کاهش یافت و غلظت به طورکلی از تولید آفلاتوکسین B_1 توسط قارچ آسپرژیلوس جلوگیری نمود. به طورکلی براساس نتایج به دست آمده در این تحقیق نیز می‌توان نتیجه گرفت که اسانس گیاه سرخارگل دارای فعالیت ضدقارچی بر علیه قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* بوده و قادر به ممانعت از تولید توکسین توسط کپک مذکور می باشد لذا بررسی استفاده از آن به عنوان ترکیبی موثر در فرمولاسیون مدلها و محصولات غذایی توصیه می شود.

منابع

۱. اندرگانی، سودابه، جمشیدی، سلیمان و اورعی، مهدی (۱۳۹۳). اثر ضدباکتریایی اسانس گل و عصارهٔ اندام‌های گیاهی سرخارگل بر باکتری Pectobacterium caratovorum subsp. Caratovorum در شرایط آزمایشگاه. فصلنامه تحقیقات بیماری‌های گیاهی، ۲(۳): ۳۴-۲۵.

۲. ایزدی، زهرا، سروش زاده، علی، مدرس ثانوی، سید علی محمد، آقاعلیخانی، مجید و داوودی، پوراندخت. (۱۳۹۳a). تأثیر روش استخراج عصاره اندام هوایی گیاه دارویی سرخارگل (Echinacea Purpurea L.) بر خاصیت ضد میکروبی آن در تعدادی از باکتری‌های بیماری‌زا. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، ۱۳(۳): ۲۶۷-۲۸۰.

۳. ایزدی، زهرا، سروش زاده، علی، مدرس ثانوی، سید علی محمد، آقاعلیخانی، مجید و داوودی، پوراندخت. (۱۳۹۳b). بررسی اثرات ضد میکروبی اسانس گیاه سرخارگل (Echinacea Purpurea L.) و شناسایی ترکیب‌های شیمیایی آن. دو ماهنامه طب جنوب، ۱۷(۱): ۵۸-۶۹.

۴. سقازاده، مژگان، خسروی، علیرضا، نیک آئین، دنیا و عرفان منش، احمد. (۱۳۸۹). رزیابی عملکرد اسانس گلپر بر مهار رشد و تولید آفلاتوکسین توسط آسپرژیلوس پارازیتیکوس. همایش ملی گیاهان دارویی، دوره ۱.

۵. سنچولی، نرجس، غفاری، مصطفی و قرایی، احمد. (۱۳۹۴). بررسی مقایسه‌ای اثرات ضدقارچی اسانس‌های آویشن شیرازی، زیره سبز و میخک هندی در مقایسه با فرمالین بر قارچ مولد آفلاتوکسین. پاتوبیولوژی مقایسه ای، ۱۲(۳)، صفحه ۱۶۹۸-۱۶۹۱.

۶. فانی مکی، امید، امیدی، آرش و هاشمی نژاد، سید احمد. (۱۳۹۴). بررسی اثر اسانس‌های آویشن، خارمریم و آلوئه ورا بر رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس و تولیدآفلاتوکسین B1. مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، ۱۷(۲): ۹۲-۸۴.

۷. فکور، محمد هادی، علامه، عبدالامیر، رسولی، ایرج و مظاهری، منصوره (۱۳۸۶). اثر ضد قارچی اسانس‌های Zataria multiflora Boiss و Thymus eriocalyx (Ronniger) Jalas بر قارچ مولد آفلاتوکسین آسپرژیلوس پارازیتیکوس. فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، ۲۳(۲): ۲۷۷-۲۶۹.

۸. گران، اکبر، صالح‌نیا، بنت الهدی، علیزاده، حمیدرضا، میرزایی، عظیم و فرزانه، محسن. (۱۳۹۴). اثر اسانس و عصاره‌های گزنه و نعنا فلفلی در جلوگیری از رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس و تولید آفلاتوکسین B1. مجله تحقیقات مهندسی کشاورزی، ۱۶(۳): ۷۸-۶۷.

۹. مینوئیان حقیقی، محمد حسن و خسروی، علیرضا. (۱۳۸۸). اثرات اسانس‌های گیاهی بر دو گونه ی مهم آسپرژیلوس. فصلنامه‌ی دانشگاه علوم پزشکی وخدمات بهداشتی درمانی گناباد، ۱۵(۴): ۱۶-۵.

10. Alzoreky, N. S., & Nakahara, K. (2003). Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. Int J Food Microbiol, 80(3), 223-230.

11. Atanda, O.O., Akpan, I. & Oluwafemi, F. (2007). The potential of some spice essential oils in the control of A. parasiticus CFR 223 and aflatoxin production. Food control, 18(5), 601-607.

12. Bhat, R., Rai, R. V., & Karim, A. A. (2010). Mycotoxins in food and feed: present status and future concerns. Compr Rev Food Sci F, 9(1), 57-81.

13. Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. Int J Food Microbiol, *94*(3), 223-253.

14. Binns, S. E., B. Purgina, C. Bergeron, M. L. Smith, L. Ball, B. R. Baum, and J. T. Arnason. "Light-mediated antifungal activity of Echinacea extracts." Planta medica 66, no. 03 (2000): 241-244.

15. Chiavaro, E., Dall'Asta, C., Galaverna, G., Biancardi, A., Gambarelli, E., Dossena, A., & Marchelli, R. (2001). New reversed-phase liquid chromatographic method to detect aflatoxins in food and feed with cyclodextrins as fluorescence enhancers added to the eluent. J Chromatogr, 937(1-2), 31-40.

16. Farag, R.S., Daw, Z.Y. & Abo-Raya, S.H. (1989). Influence of some spice essential oils on Aspergillus parasiticus growth and production of aflatoxins in a synthetic medium. J Food Sci, 54(1), 74-76.

17. Farzaneh, V., & Carvalho, I. S. (2015). A review of the health benefit potentials of herbal plant infusions and their mechanism of actions. Ind Crops Prod, 65, 247-258.

18. Gandomi, H., Misaghi, A., Basti, A.A., Bokaei, S., Khosravi, A., Abbasifar, A. &

Javan, A.J. (2009). Effect of Zataria multiflora Boiss. essential oil on growth and aflatoxin formation by Aspergillus flavus in culture media and cheese. Food Chem Toxicol, 47(10), 2397-2400.

19. Hudaib, M., Cavrini, V., Bellardi, M. G., & Rubies-Autonell, C. (2002). Characterization of the essential oils of healthy and virus infected Echinacea purpurea (L.) Moench Plants. J Essent Oil Res, *14*(6), 427-430.

20. Ibrahim, F., Asghar, M. A., Iqbal, J., Ahmed, A., & Khan, A. B. (2017). Inhibitory effects of natural spices extracts on Aspergillus growth and aflatoxin synthesis.

21. Kiran, S., Kujur, A., & Prakash, B. (2016). Assessment of preservative potential of Cinnamomum zeylanicum Blume essential oil against food borne molds, aflatoxin B1 synthesis, its functional properties and mode of action. Innov Food Sci Emerg Technol, 37, 184-191.

22. Kordali, S., Kotan, R., Mavi, A., Cakir, A., Ala, A., & Yildirim, A. (2005). Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of Artemisia dracunculus and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish Artemisia absinthium, A. dracunculus, Artemisia santonicum, and Artemisia spicigera essential oils. J Agric Food Chem, 53(24), 9452-9458.

23. Mokbel, A. A., & Alharbi, A. A. (2015). Antifungal effects of basil and camphor essential oils against 'Aspergillus flavus' and'A. parasiticus'. Aust J Crop Sci., 9(6), 532.

24. Moosavi-Nasab, M., Jamalian, J., Heshmati, H., & Haghighi-Manesh, S. (2018). The inhibitory potential of Zataria multiflora and Syzygium aromaticum essential oil on growth and aflatoxin production by Aspergillus flavus in culture media and Iranian white cheese. Food Sci Nutr, *6*(2), 318-324.

25. Nerilo, S. B., Rocha, G. H. O., Tomoike, C., Mossini, S. A., Grespan, R., Mikcha, J. M., & Machinski Jr, M. (2016). Antifungal properties and inhibitory effects upon aflatoxin production by Zingiber officinale essential oil in Aspergillus flavus. Int J Food Sci Tech, 51(2), 286-292.

26. Prakash, B., Kedia, A., Mishra, P. K., & Dubey, N. K. (2015). Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities–Potentials and challenges. Food Control, 47, 381-391.

27. Roesler, J., Steinmüller, C., Kiderlen, A., Emmendörffer, A., Wagner, H., and Lohmann-Matthes, M. L. (1991). Application of purified polysaccharides from cell cultures of the plant Echinacea purpurea to mice mediates protection against systemic infections with Listeria monocytogenes and Candida albicans. Int J Immunopharmacol, 13(1), 27-37.

28. Rasooli, I. (2007). Food preservation—a biopreservative approach. Food, 1(2), 111-136.

29. Seow, Y. X., Yeo, C. R., Chung, H. L., & Yuk, H. G. (2014). Plant essential oils as active antimicrobial agents. Crit Rev Food Sci Nutr, *54*(5), 625-644.

30. Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. A., & Cliver, D. O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. Food control, 21(9), 1199-1218.

31. Tragni, E., Galli, C. L., Tubaro, A., Del Negro, P., & Della Loggia, R. (1988). Anti-inflammatory activity of Echinacea angustifolia fractions separated on the basis of molecular weight. Pharmacol Res Commun, 20, 87-90.

32. Zinedine, A., Faid, M., & Benlemlih, M. (2005). In vitro reduction of aflatoxin B1 by strains of lactic acid bacteria isolated from Moroccan sourdough bread. Int J Agric Biol, 7(1), 67-70.

Effect of *Echinacea pupurea* essential oil on growth and *Aspergillus flavous* mycotoxin production

Malekouti A[1], Sharifan A[2*], Basiri A[3]

1-Gratuated of Master of Science in Food Science and Technology, Department of Food Science & Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2- Department of Food Science & Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

3- Department of food science and Technology, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran, Iran.

***Corresponding author:** *a_sharifan2000@yahoo.com*

Received: 20 May 2019 Accepted: 21 August 2019

Abstract

Foodborne diseases contaminated with mycotoxins are a concern for human health. The use of bioactive compounds to improve food safety and preservation has been considered to reduce the economic losses and risks of these factors. The aim of this study was to use purple coneflower (*Echinacea purpurea*) essential oil as a bio preservative to control the growth of *Aspergillus flavus* and to prevent the production of aflatoxin B_1. For this purpose, minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) values were calculated using a disk diffusion method and then the effect of different concentrations of the essential oil on aflatoxin B_1 production was evaluated. The amount of aflatoxin B_1 production in the YES (yeast extract sucrose) culture media was measured by HPLC. The results of this study showed that MIC and MFC were 10000 ppm and 15000 ppm, respectively. The results of the growth inhibition zone showed that increasing concentration of the essential oil significantly (p<0.05) increased the diameter of the inhibition zone. It was also founded that aflatoxin B_1 production was significantly (p<0.05) dependent on purple coneflower concentration so that by increasing the essential oil concentration the aflatoxin production significantly (p<0.05) decreased. Accordingly, the aflatoxin B_1 production by *A. flavus* was prevented using a concentration of 15000 ppm of purple coneflower essential oil. Overall, it can be concluded that purple coneflower essential oil can control the production of aflatoxin by *A. flavus* to an acceptable level.

Keywords: *Aspergillus flavus*, aflatoxin B_1, purple coneflower, bio preservat