

## تاثیر عصاره اتانولی برگ درخت کاج تهران (پینوس الداریکا) بر مهار رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس نایجر در توده ذرت در شرایط آزمایشگاهی

بهرز ولپور بارنجی<sup>۱</sup>، رامین سلامت دوست نوبر<sup>۲\*</sup>

۱ - دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی کشاورزی، واحد شبستر، دانشگاه آزاد اسلامی، شبستر، ایران.

۲ - استادیار گروه علوم دامی، واحد شبستر، دانشگاه آزاد اسلامی، شبستر، ایران.

\* نویسنده مسئول مکاتبات: r.salamatdoust@gmail.com

(دریافت مقاله: ۹۵/۲/۲۰ پذیرش نهایی: ۹۵/۸/۵)

### چکیده

این آزمایش با هدف بررسی تاثیر عصاره الکلی برگ درخت کاج تهرانی در شرایط آزمایشگاهی برای مهار رشد و فعالیت قارچ‌های آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس نایجر در توده ذرت مرطوب در قالب طرح کاملاً تصادفی با آرایش آزمایش فاکتوریل (۳×۴) با دو عامل، شامل سه سطح عصاره و چهار زمان مختلف انکوباسیون (۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ روز) انجام شد. برگ کاج بعد از تهیه در فصل پاییز با استفاده از حلال الکل اتانول عصاره‌گیری شده و در سه غلظت شامل صفر، ۱ و ۲ درصد و در چهار زمان، مورد انکوباسیون در دمای ۲۵ درجه سلسیوس انجام شد. توده ذرت از کارخانه‌های خوراک دام و طیور تهیه شد. مقدار ده گرم ذرت وزن گردیده و در ۹۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی مخلوط و چندین بار هم‌زده شد، سپس به صورت سریالی رقیق شده و مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از رقت به- دست‌آمده در سطح محیط کشت به‌وسیله پیت پاستور پخش گردیده و بعد از جذب رطوبت نسبی داخل انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت یک هفته انکوبه شده و هر ۲۴ ساعت از روز دوم تا رشد قارچ‌ها روزانه کنترل و ثبت شد. برای شمارش کلونی‌های قارچ، بعد از اتمام زمان انکوباسیون کلونی‌های تشکیل یافته روی محیط کشت به صورت چشمی شمارش گردید. نتایج نشان داد که سطوح ۱ و ۲ درصد عصاره به صورت موثری باعث کاهش تعداد کلونی‌های قارچ در روزهای ۱۰ و ۲۰ انکوباسیون شده و با ادامه انکوباسیون به ۳۰ و ۴۰ روز فعالیت و رشد قارچ به کلی مهار می‌گردد. نتایج حاصل شده در مورد هر دو قارچ یکسان بود. با توجه به نتایج، سطح ۱ درصد عصاره برای مهار رشد قارچ‌ها توصیه می‌شود.

کلید واژه‌ها: آسپرژیلوس فلاووس، آسپرژیلوس نایجر، توده ذرت، درخت کاج تهران (پینوس الداریکا).

**مقدمه**

سموم قارچی بالاخص آفلاتوکسین‌ها مسبب همه‌گیری‌های بزرگی در انسان و حیوانات در سال‌های گذشته بوده است. آلودگی ذرت به آفلاتوکسین یک مشکل مهم در مناطق مرطوب محسوب می‌شود. از طرف دیگر قارچ‌ها به‌عنوان عوامل مهم فساد مواد غذایی مطرح می‌باشند، که به دلیل ترشح آنزیم‌های متفاوت (پروتاز، لپاز و ...) قادرند اغلب ترکیبات موجود در مواد غذایی را تجزیه کرده و در نتیجه باعث تغییر رنگ، طعم و مزه مواد غذایی شوند.

اثر دارویی گیاهان و عصاره‌های آن‌ها از دیرباز مورد توجه بشر بوده است. در سال‌های اخیر بیش‌تر مطالعات روی اثرات ضد میکروبی ترکیبات مختلف گیاهان معطوف گردیده است و برحسب منطقه جغرافیایی و نوع فلور گیاهی مناطق جغرافیایی مختلف این مطالعات روی گونه‌های متفاوتی از گیاهان صورت می‌پذیرد.

بیشتر مطالعات انجام‌شده در محیط‌های کشت آزمایشگاهی صورت گرفته است و اثرات قابل قبول ضد میکروبی از ترکیبات گیاهان مشاهده شده است ولی اثرات ترکیبات گیاهی در محیط غذا و به‌خصوص مواد غذایی مورد استفاده در صنعت دام، طیور و آبزیان کم‌تر مورد ارزیابی قرار گرفته است ( Shimoni et al., 1993; Pitarokili et al., 2002).

یکی از این گیاهان دارویی که از زمان‌های گذشته تاکنون اثرات درمانی در مقابله با بیماری‌های مختلف داشته است، میوه درخت کاج تهران یا پینوس الداریکا (*Pinus elderica*) می‌باشد که زیرگونه‌ای از جنس *Pinus* است. این گونه بومی دشت الدار در جمهوری آذربایجان است (Zargari, 1997). در متون طبّی کهن

ایران از قسمت‌های مختلف انواع رده کاج به‌خصوص صمغ آن برای درمان زخم‌های کهنه استفاده می‌شده است (Sakagami et al., 1991). هم‌چنین در طب سنتی ژاپن از مخروط کاج برای درمان سرطان معده و نیز به‌عنوان یک ماده محرک سیستم ایمنی در افراد مبتلا به لوسمی و نیز یک ماده ضد تومور استفاده می‌شده است. علاوه بر این، مخروط کاج برخی از گونه‌های کاج برای سال‌های بسیاری در درمان بیماری‌هایی نظیر آسم، برونشیت، سرفه و بیماری‌های دیگر در طب سنتی چین استفاده می‌شده است (Sakagami et al., 1991).

مخروط درخت کاج دارای انواع ترکیبات فعال نظیر پلی‌ساکاریدها، تانن‌ها، لیگنین‌ها و انواع مختلفی از ترکیبات فنلی و ترپنوئیدی می‌باشد. برگ درخت کاج حاوی مونوترپن‌ها و دی‌ترپنوئیدها بوده و اثرات ضد قارچی دارد (Rhee et al., 2005; Nahar et al., 2015). این آزمایش با هدف تعیین موثرترین سطح عصاره برگ درخت پینوس الداریکا بر رشد و فعالیت قارچ‌های *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس نایجر* در شرایط آزمایشگاهی و نیز تاثیر این عصاره بر توده ذرت مرطوب آلوده به قارچ‌های مزبور انجام شد.

**مواد و روش‌ها**

این مطالعه که در آزمایشگاه قارچ‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز در سال ۱۳۹۴ انجام شد، در قالب طرح کاملاً تصادفی با آرایش آزمایش فاکتوریل (۳×۴) با دو عامل، شامل سه سطح عصاره و چهار زمان مختلف انکوباسیون (۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ روز) در کل با ۱۲ ترکیب تیماری انجام شد. همه تیمارهای آزمایشی در سه نوبت تکرار شدند.

با محلول نیم مک فارلند سوسپانسیونی با غلظت  $10^8 \times 1/5$  CFU/ml از قارچ به دست آمد.

مقدار ۱۰ گرم از ذرت ضدعفونی شده، به داخل ارلن‌مایر حاوی ۹۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل در شرایط استریل اضافه و چند دقیقه تکان داده شد. از سوسپانسیون حاصله رقت سریالی تهیه شد. به این صورت که یک میلی‌لیتر از محتویات ارلن برداشته شده و داخل ۵ لوله آزمایش به طریق سریالی رقیق گردید. از رقت تهیه‌شده، در سطح محیط کشت ساپرو دکستروز آگار مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر ریخته و به وسیله پیت پاستور در سطح محیط کشت پخش شد. از تمامی رقت‌ها بدین ترتیب کشت داده شد.

پلیت‌ها بعد از جذب رطوبت نسبی به صورت معکوس به مدت ۷-۵ روز در انکوباتور ۲۵ درجه سلسیوس قرار داده شد و بعد از انکوباسیون، کلونی‌های تشکیل‌یافته روی محیط کشت به صورت چشمی شمارش گردید و با در نظر گرفتن رقیق‌سازی‌های انجام یافته به توده ذرت مورد آزمایش تعمیم داده شد.

#### تحلیل آماری داده‌ها

طبقه‌بندی داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Excel نسخه ۲۰۱۰ و تجزیه و تحلیل آماری آن‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ انجام گردید. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۹۵ درصد استفاده شد.

#### یافته‌ها

نتایج نشان‌دهنده تاثیر معنی‌دار عصاره برگ پینوس *الداریکا* بر کاهش رشد کلونی‌های قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس نایجر* روی توده

بدین منظور برگ‌های تازه درخت پینوس *الداریکا* در فصل پاییز از درختان هم‌سن تهیه و در شرایط سایه خشک شدند.

برای تهیه عصاره از اتانول به عنوان حلال استفاده شد، به طوری که مقدار ۱۰۰ گرم برگ خشک و آسیاب‌شده بر اساس ماده خشک توزین شده و در بطری اتانول به نسبت ۵ به ۱ ریخته شد. بطری به مدت ۲۴ ساعت در شیکر هم زده شد و سپس با استفاده از دستگاه تبخیر در خلا با دمای ۳۷ درجه سلسیوس عصاره برگ درخت *الداریکا* تهیه شد و ماده خشک عصاره جهت افزودن بر پایه ماده خشک با روش خشک کردن در آن در دمای ۶۰ درجه سلسیوس در طول ۲۴ ساعت تعیین شد (Alizadeh Behbahani *et al.*, 2013).

ذرت‌های تهیه شده جهت اطمینان از آلودگی‌های اولیه به مدت ۷-۵ روز کشت داده شدند. با توجه به تعیین آلودگی در دو نوع ذرت آلوده به قارچ، تیمارها توسط الکل ضدعفونی و قارچ‌زدایی شدند.

قارچ‌های مورد استفاده در این مطالعه، سوش‌های *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس نایجر* بود که از مرکز پژوهش‌های علمی صنعتی ایران خریداری شد. طبق دستورالعمل، بعد از رشد قارچ‌ها در محیط کشت ساپروز دکستروز آگار در دمای ۲۵ درجه به مدت ۷ روز، از کلنی‌های رشد یافته، سوسپانسیون قارچی تهیه شد. سپس محیط ساپروز دکستروز آگار توسط سالیین نرمال ۰/۹ درصد شستشو داده شد و سوسپانسیون غلیظی از قارچ‌ها تهیه گردید. سپس توسط پیت استریل مقدار کمی از این سوسپانسیون داخل لوله‌های استریل ریخته شد و با افزودن سالیین نرمال و مقایسه آن

ذرت در شرایط آزمایشگاهی بود. جزئیات مربوط به تأثیر زمان انکوباسیون بر فراوانی کلونی قارچ‌های آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس نایجر در توده ذرت در جدول ۱ ذکر شده است.

جدول ۱- مقایسه میانگین تأثیر زمان انکوباسیون بر فراوانی کلونی قارچ‌های آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس نایجر در توده ذرت (CFU/g)

آسپرژیلوس فلاووس	آسپرژیلوس نایجر	آ. فلاووس و آ. نایجر	
۲۲۲/۲۲ <sup>a</sup>	۲۱۱/۱۱ <sup>a</sup>	۵۵/۵۵	روز ۱۰ انکوباسیون
۲۰۰ <sup>a</sup>	۴۴/۴۴ <sup>b</sup>	۷۷/۷۷	روز ۲۰ انکوباسیون
۱۰۰ <sup>b</sup>	۵۰ <sup>b</sup>	۵۰	روز ۳۰ انکوباسیون
۵۵/۵۵ <sup>b</sup>	۵۵/۵۵ <sup>b</sup>	۵۵/۵۵	روز ۴۰ انکوباسیون
۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۲	۰/۷۴۱۴	ارزش <i>p</i>
۳۹/۷۱	۴۴/۹۲	۳۳/۰۲	اشتباه معیار میانگین

جدول ۲- مقایسه میانگین تأثیر سطوح عصاره برگ کاج بر فراوانی کلونی قارچ‌های آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس نایجر در توده ذرت (CFU/g)

آسپرژیلوس فلاووس	آسپرژیلوس نایجر	آ. فلاووس و آ. نایجر	
۲۸۳/۳۳ <sup>a</sup>	۱۵۴ <sup>a</sup>	۱۴۵/۸۳ <sup>a</sup>	شاهد
۱۰۰ <sup>b</sup>	۷۵ <sup>b</sup>	۲۵ <sup>b</sup>	یک درصد عصاره برگ کاج
۵۰ <sup>b</sup>	۴۱/۶۶ <sup>b</sup>	۸/۳۳ <sup>b</sup>	دو درصد عصاره برگ کاج
۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۵۱	۰/۰۰۰۱	ارزش <i>p</i>
۳۹/۷۱	۴۴/۹۲	۳۳/۰۲	اشتباه معیار میانگین

در جدول ۳ مقایسه میانگین حداقل مربعات اثر متقابل سطوح مختلف عصاره برگ کاج و زمان انکوباسیون بر فراوانی کلونی قارچ‌های آسپرژیلوس

فلاووس و آسپرژیلوس نایجر در توده ذرت آورده شده است.

جدول ۳- مقایسه میانگین حداقل مربعات اثر متقابل سطوح مختلف عصاره برگ کاج و زمان انکوباسیون بر فراوانی کلونی قارچ‌های *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس نایجر* در توده ذرت (CFU/g)

آ. فلاووس و آ. نایجر	آسپرژیلوس نایجر	آسپرژیلوس فلاووس		
۱۰۰ <sup>ab</sup>	۳۰۰ <sup>a</sup>	۳۶۶/۶۶ <sup>a</sup>	شاهد	
۶۶/۶۶ <sup>ab</sup>	۲۰۰ <sup>ab</sup>	۲۰۰ <sup>bc</sup>	۱ درصد عصاره	روز ۱۰ انکوباسیون
-	۱۳۳/۳۳ <sup>bcd</sup>	۱۰۰ <sup>cd</sup>	۲ درصد عصاره	
۱۶۶/۶۶ <sup>a</sup>	۱۰۰ <sup>bcd</sup>	۳۰۰ <sup>ab</sup>	شاهد	
۳۳/۳۳ <sup>b</sup>	۳۳/۳۳ <sup>cd</sup>	۳۰۰ <sup>ab</sup>	۱ درصد عصاره	روز ۲۰ انکوباسیون
۳۳/۳۳ <sup>b</sup>	-	-	۲ درصد عصاره	
۱۵۰ <sup>a</sup>	۱۵۰ <sup>bcd</sup>	۳۰۰ <sup>ab</sup>	شاهد	
-	-	-	۱ درصد عصاره	روز ۳۰ انکوباسیون
-	-	-	۲ درصد عصاره	
۱۶۶/۶۶ <sup>a</sup>	۱۶۶ <sup>abc</sup>	۱۶۶ <sup>c</sup>	شاهد	
-	-	-	۱ درصد عصاره	روز ۴۰ انکوباسیون
-	-	-	۲ درصد عصاره	
۰/۰۴۸۸	۰/۰۴۳۵	۰/۰۰۰۸		ارزش <i>p</i>
۱۶/۵۱	۲۲/۴۶	۱۹/۸۵		اشتباه معیار میانگین

## بحث و نتیجه‌گیری

اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی دارای ترکیباتی با فعالیت‌های زیستی متفاوت، از جمله خواص ضد میکروبی می‌باشند (Rodríguez *et al.*, 2005). با مطالعاتی که تاکنون صورت گرفته است، به نظر می‌رسد که متابولیت‌های ثانویه، به‌عنوان موادی طبیعی، نقش‌های اکولوژیکی مهمی در واکنش‌های دفاعی گیاهان دارند. بسیاری از متابولیت‌ها در دفاع گیاه در مقابل آفات و امراض مؤثر می‌باشند (Cowan, 1999). شناخت و بررسی این متابولیت‌ها می‌تواند کمک مؤثری به کنترل آفات و امراض بنماید. مقدار و حتی نوع این متابولیت‌ها در گیاهان به شرایط محیطی و

جغرافیایی محل رویش بستگی دارد (Azlan *et al.*, 2003).

سوکوویچ و همکاران در سال ۲۰۱۲ مشخص نمودند که روغن اسانس لیمون در مقایسه با سایر اسانس‌ها مانند منتولن نعنا، کامفور مریم‌گلی بیشترین اثرات ضدقارچی را دارد (Soković *et al.*, 2012). موقرایی و همکاران در سال ۲۰۰۱ با استفاده از عصاره متانولی کیک زیتون بر فعالیت رشد قارچ‌ها، گزارش کردند که به شدت مانع رشد قارچ‌های فوزاریوم اکسی‌کلونیم و فوزاریوم ورتیسیلیوم می‌شود (Mughrabi *et al.*, 2001). سعدابی در سال ۲۰۰۶ نیز در یک مطالعه، فعالیت ضدقارچی بعضی از گیاهان عربستان از جمله پگانوم هارمالا (*Peganum*

همکاران در سال ۲۰۱۱ در مورد اثر عصاره متانولی بذر گیاه خارمریم بر قارچ‌های درماتوفیت و ساپروفیت در مقایسه با کلوتریمازول، اثر ضد قارچی قابل توجهی از عصاره متانولی دانه‌های این گیاه بر رشد قارچ‌های ساپروفیت به خصوص *آسپرژیلوس نایجر* گزارش نشد (Salehi et al., 2011). صمغ درخت کاج تهرانی اثر ممانعت از رشد بر باکتری‌های *اشریشیا کولای* و *استافیلوکوکوس آرتوس* دارد، چنان‌که در مقایسه با آنتی‌بیوتیک کوتریماکسازول و اسید اولئیک این اثرات ممانعت از رشد در عصاره الکی ۷۵ درصد قابل توجه بوده است (Asar et al., 2005). همچنین هافورد و همکاران در سال ۱۹۹۳ نیز تاثیر مواد موجود در صمغ درخت کاج را بر تعدادی باکتری و قارچ بررسی نموده‌اند و نتایج آنان حاکی از موثر بودن این عصاره بر رشد باکتری بوده است (Hufford et al., 1993). همچنین باتیستا و همکاران در سال ۱۹۹۴ نیز تاثیر مهاری اثر صمغ را بر رشد *استافیلوکوکوس آرتوس* و تعدادی باکتری گرم منفی تایید نموده‌اند (Batista et al., 1994). نتایج حاصل از مطالعه حاضر نیز نشان داد که عصاره برگ کاج تهرانی قادر است از رشد قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس نایجر* و هم ترکیب همزمان هر دو ممانعت کند، که حاکی از اثرات ضدقارچی عصاره برگ کاج تهرانی می‌باشد. با توجه به این‌که اکثر ترکیبات شیمیایی موجود در برگ کاج شامل لیمونن، تانن، فلاونوئیدها، رزین، تریپن‌ها، تریپنوییدها و ... می‌باشد و در گیاهان مورد بررسی نیز این ترکیبات وجود دارند، لذا به نظر می‌رسد نتایج مطالعه حاضر با اکثر تحقیقات مطابق باشد. با مطالعه روی فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های هیدروالکی و

*harmala*) را بر ضد قارچ‌های *آسپرژیلوس فلاووس*، *آسپرژیلوس فومیگاتوس*، *آسپرژیلوس نایجر* و *کاندیدا آلبیکنس* نشان داد (Saadabi, 2006). در مطالعه مذکور، سه نوع عصاره (آبی، متانولی و کلروفرمی) مورد استفاده قرار گرفت که عصاره متانولی موثرتر از سایر عصاره‌ها از جمله عصاره آبی بود. علیزاده بهبهانی و همکاران در سال ۲۰۱۳ در مطالعه‌ای دریافتند که عصاره اتانولی برگ گیاه حرا در مقایسه با عصاره آبی آن دارای اثر بازدارندگی بیش‌تری بر سوش‌های *آلترناریا سبتیرینوم* و *پنی‌سلیم دیجیتالوم* است که به علت استخراج بیش‌تر مواد موثر در برگ گیاه حرا توسط حلال اتانول است (Alizadeh Behbahani et al., 2013). هاواسین و همکاران در سال ۲۰۱۲ اثر مهاری عصاره آبی و الکی گیاه تشنه‌داری (*Scrophularia striata*) را روی قارچ *کاندیدا آلبیکنس* در شرایط آزمایشگاهی بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که عصاره الکی این گیاه هیچ تاثیری بر این قارچ در تمام غلظت‌های به‌کاررفته در این آزمایش نداشت (Havasian et al., 2012). اما عصاره آبی آن در بالاترین غلظت دارای اثر مهاری ضعیفی می‌باشد. در یک مطالعه آزمایشگاهی اثر ضدقارچی عصاره‌های آبی و الکی موسیر ایرانی را روی ۵ گونه قارچ ساپروفیت (*آسپرژیلوس فومیگاتوس*، *آ. فلاووس*، *آ. نایجر*، *پنیسیلیوم کریزوژنوم* و *آلترناریا*) و ۲ گونه درماتوفیت (*ترایکوفیتون متتاگروفیتیس* و *میکروسپوروم کنیس*) مورد بررسی قرار دادند (Nasiri et al., 2009). نتایج نشان داد که *آسپرژیلوس نایجر* مقاوم‌ترین گونه در مقابل عصاره‌های آبی و اتانولی موسیر ایرانی می‌باشد. در مطالعه صالحی و

که از متابولیت‌های ثانویه این گیاه محسوب می‌شوند. این ترکیبات با نام عمومی ترین‌ها خوانده می‌شوند که ساختار شیمیایی عمومی آنها  $C_{10}H_{16}$  است و به صورت دی‌ترین، تری‌ترین و تترترین‌ها مشاهده می‌شوند. هنگامی که این ترکیبات حاوی عناصر دیگری (معمولاً اکسیژن) باشند، ترپنوئید نامیده می‌شوند. ترپنوئیدها از واحدهای استات ساخته شده و دارای مبدأ مشترکی با اسیدهای چرب هستند. تفاوت آنها با اسیدهای چرب در انشعابات فراوان و حلقوی بودن آنها است. فعالیت مهارکنندگی ترپنوئیدها علیه باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌ها مورد شناسایی قرار گرفته‌اند، اما مکانیسم عملکرد آنها به روشنی شناخته نشده است (Dholwani et al., 2008; Kandaswami and Middleton, 1994). با توجه به مکانیسم تاثیر مواد موثره موجود در کاج، به نظر می‌رسد حضور این مواد مانع رشد و فعالیت قارچ‌های آسپرژیلوس فلاوروس و آسپرژیلوس نایجر شده است.

در مجموع، نتایج مطالعه نشان داد که استفاده از عصاره الکلی برگ کاج در سطوح مورد نظر در مهار و کنترل فعالیت و رشد قارچ‌های آسپرژیلوس فلاوروس و آسپرژیلوس نایجر موثر بوده ولی تفاوت چندانی در بین سطوح ۱ و ۲ درصد عصاره وجود ندارد و ادامه انکوباسیون و نگهداری توده ذرت به همراه سطوح مختلف عصاره بر مهار و توقف رشد قارچ‌ها موثر بوده و انکوباسیون توده ذرت بیش از ۲۰ روز موجب حذف و مهار کلی قارچ‌ها می‌شود. با توجه به نتایج، سطح ۱ درصد عصاره برای مهار رشد قارچ‌ها توصیه می‌شود.

هگزانی گیاه سگ‌دندان خاردار علیه دو گونه قارچی آسپرژیلوس نایجر و کاندیدا آلبیکنس، نتایج نشان داد که آسپرژیلوس نایجر حساسیت بیشتری به هر دو نوع عصاره هیدروالکلی و هگزانی دارد، به طوری که حداقل غلظت بازدارندگی عصاره هیدروالکلی برای آسپرژیلوس نایجر برابر ۱۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود و قطر هاله مهار رشدی برابر  $1/7 \pm 66$  میلی‌متر ایجاد کرد، در صورتی که این عدد برای کاندیدا آلبیکنس برابر ۶۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود که قطر هاله‌ای برابر  $1/9 \pm 14$  با میلی‌متر ایجاد کرد (Jalali et al., 2007). فنل‌های ساده و فنولیک اسید از ساده‌ترین ترکیبات شیمیایی با فعالیت زیستی در گیاهان، از حلقه‌های فنلی به دست می‌آیند. سینامیک اسید و کافئیک اسید نمایندگان گروه بزرگی از ترکیبات مشتق از ماده فنیل-پروپان می‌باشند که در بیش‌ترین سطح اکسیداسیون قرار دارند. کافئیک اسید که از ترکیبات فنیل‌پروپان است، علیه قارچ‌ها و باکتری‌ها موثر است. مکانیسم تاثیر این مواد از طریق واکنش با گروه‌های سولفیدریل، یا یک واکنش غیراختصاصی با پروتئین‌ها بوده و از این طریق باعث توقف و یا مهار فعالیت باکتری‌ها و قارچ‌ها می‌شود (Dholwani et al., 2008). برگ کاج با داشتن ترکیبات فلاونوئیدی می‌تواند باعث مهار رشد قارچ‌ها شود. این مواد از طریق اتصالشان به پروتئین‌های خارج سلولی و محلول و اتصال به دیواره سلولی باکتری‌ها و قارچ‌ها موثر واقع می‌شوند. فلاونوئیدها حالت چربی‌دوست داشته و می‌توانند موجب متلاشی شدن غشاهای باکتری‌ها و قارچ‌ها شوند. هم‌چنین در برگ کاج مواد ترپنوئید و اسانس‌های فرار وجود دارند

## سیاسگزاری

می‌گردد. نویسندگان اعلام می‌دارند هیچ‌گونه تضاد

منافعی ندارند.

بدین وسیله از کارشناسان آزمایشگاه قارچ‌شناسی

دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی تبریز قدردانی

## منابع

- Alam, M.H., Murat, E., Siegfrie, N. and Hubert, K. (2004). Chemical composition and content of essential oil from the bud cultivated Turkish clove (*Syzygium aromaticum* L.). *Bio-Resources*, 2(2): 265-269.
- Alizadeh Behbahani, B., Tabatabaei Yazdi, F., Mortazavi, A., Zendeboodi, F., Gholian, M.M. and Vasiee, A. (2013). Effect of aqueous and ethanolic extract of *Eucalyptus camaldulensis* L. on food infection and intoxication microorganisms "in vitro". *Journal of Paramedical Science*, 4(3): 89-99.
- Asar, Sh., Jafarzadeh, A., Mohaghegi, M. and Bahram Abadi, R. (2005). Antimicrobial Effects of Tehran gum trees (*Pinus eldarica*), and alcoholic extract on the number of bacteria causing skin infections. *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences*, 4(3): 186-191. [In Persian]
- Azlan, G.J., Madzali, M. and Johari, R. (2003). Accumulation of physalin in cell and tissues of *Physalis minimal*. L.III WOCAMP Congress on Medicinal and Aromatic Plant.
- Batista, O., Duarte, A., Nascimento, J., Simões, M.F., de la Torre, M.C. and Rodríguez, B. (1994). Structure and antimicrobial activity of diterpenes from the roots of *Plectranthus hereroensis*. *Journal of Natural Products*, 57(6): 858-861.
- Cowan, M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology*, 12(4):564-582.
- Dholwani, K.K., Saluja, A.K., Gupta, A.R. and Shah, D.R. (2008). A review on plant-derived natural products and their analogs with anti-tumor activity. *Indian Journal of Pharmacology*, 40(2): 49-58.
- Havasian, M.R., Panahi, J., Pakzad, I., Davoodian, A., Jalilian, A. and Zamanianazodi, M. (2012). Inhibitory effect of hydroalcoholic extract of *Scrophularia striata* on *Candida albicans* "in vitro". *Journal of Research in Medical Sciences*, 36(1): 19-23.
- Hufford, C.D., Jia, Y., Croom, E.M. Jr., Muhammed, I., Okunade, A.L., Clark, A.M., *et al.* (1993). Antimicrobial compounds from *Petalostemum purpureum*. *Journal of Natural Products*, 56(11): 1878-1889.
- Jalali, M., Abedi, D., Asgari, G. and Rezaei, Z. (2007). Antimicrobial effects of several types of fruit and plant extracts. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*, 17(59): 76-86. [In Persian]
- Kandaswami, C. and Middleton, E. (1994). Free radical scavenging and antioxidant activity of plant flavonoids. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 366: 351-376.
- Mughrabi, K.A., Aburjai, T.A., Anfoka, G.H. and Shahrour, W. (2001). Antifungal activity of olive cake extracts. *Phytopathologia Mediterranea*, 40: 240-244.

- Muyima, N.Y.O., Nziweni, S. and Mabinya, L.V. (2004). Antimicrobial and antioxidant activities of *Tagetes mimuta*, *Lippia javanica*, and *Foeniculum vulgare* essential oils from Eastern Cape Province of south Africa. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 7: 68-78.
- Nahar, M.K., Zakaria, Z., Hashim, U. and Bari, M.F. (2015). Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using *Momordica Charantia* Fruit Extracts. *Advanced Materials Research*, 1109: 35-39.
- Nasiri Kashani, M.J., Falahati, M., Motavallian, M., Yazdan Parast, S.A. and Fateh, R. (2009). Compare shallots and miconazole antifungal effect of extracts in the in vitro condition. *Qom University of Medical Sciences Journal*, 3(3): 13-18. [In Persian]
- Pitarokili, D., Couladis, M., Petsikos-Panayotarou, N. and Tzakou, O. (2002). Composition and antifungal activity on soil-borne pathogens of the essential oil of *Salvia sclarea* from Greece. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(23): 6688-6691.
- Rhee, K.S., Anderson, L.M., Sams, A.R., Leijs, H., Broekhans, J., Van Pelt, L., *et al.* (2005). Current awareness in flavour and fragrance. *Journal of Essential Oil Research*, 17(4): 380-381.
- Rodríguez-Ezpelet, N., Brinkmann, H., Burey, S.C., Roure, B., Burger, G., Löffelhardt, W., *et al.* (2005). Monophyly of primary photosynthetic eukaryotes: green plants, red algae, and glaucophytes. *Current Biology*, 15(14): 1325-1330.
- Saadabi, A.M. (2006). Antifungal activity of some Saudi plants used in traditional medicine. *Asian Journal of Plant Sciences*, 5(5): 907-909.
- Sakagami, H., Kawazoe, Y., Oh-hara, T., Kitajima, K., Inoue, Y., Tanuma, S., *et al.* (1991). Stimulation of human peripheral blood polymorphonuclear cell iodination by ligninrelated substances. *Journal of Leukocyte Biology*, 49: 277.
- Salehi, M., Hasanloo, T., Mehrabian, S. and Farahmand, S., (2011). Effects of *Silybummarianum* (L.) Gaertn seeds extract on dermatophytes and saprophytes fungi In vitro compare to clotrimazol. *Pharmaceutical Sciences*, 16(4): 203-210.
- Shimoni, M., Putievsky, E., Ravid, U. and Reuveni, R. (1993). Antifungal activity of volatile fractions of essential oils from four aromatic wild plants in Israel. *Journal of Chemical Ecology*, 19(6): 1129-1133.
- Soković Marina, D., Glamočlija, J., Marin Petar, D., Brkić Dejan, D., Vukojević, J., Jovanović, D., *et al.* (2012). Antifungal activity of the essential oils and components in vitro and in vivo on experimentally induced dermatomycoses at rats. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* 7: 959-966.
- Zargari, A. (1997). *Medical Plants*. 5<sup>th</sup> ed., Tehran: Tehran University Press, pp: 145-148 [In Persian]



## **Effect of ethanolic leaf extract of *Pinus eldarica* on inhibiting the growth of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger* in corn biomass under in vitro conditions**

**Valipour Barenji, B.<sup>1</sup>, Salamatdoust Nobar, R.<sup>2\*</sup>**

1- MSc Student of Animal Science, Shabestar Branch, Islamic Azad University, Shabestar, Iran.

2- Assistant Professor, Department of Animal Science, Shabestar Branch, Islamic Azad University, Shabestar, Iran.

\*Corresponding author's email: r.salamatdoust@gmail.com

(Received: 2016/5/9 Accepted: 2016/10/26)

### **Abstract**

This experiment was conducted as completely randomized design (CRD) with factorial arrangement (4×3) including three levels of extract and four incubation times (10, 20, 30 and 40 days) to evaluate the effect of alcoholic extract of pine tree leaves under in vitro conditions to inhibit the growth of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus Niger* on the biomass of wet corn. Pine tree leaves were collected in autumn and their extract prepared using ethanol and used at concentrations of 0, 1 and 2 percent. Mass commercial corn was purchased from the factory. Ten grams of corn were mixed with 90 ml of saline solution and stirred several times, then serially diluted and the volume of 0.1 ml was placed on the culture medium. The samples were incubated at 25°C for one week and the growth of fungi were checked every 24 hours from the second day of incubation. The fungus colonies were counted visually. The results indicated that 1 and 2% of pine leaf extract effectively reduced the number of fungi colonies at days 10 and 20 of incubation and the growth of fungi were completely inhibited on days 30 and 40 of incubation. The results were similar for both species of fungi. According to the results, pine leaf extract at the level of 1% is recommended for inhibition of fungi growth.

**Conflict of interest:** None declared.

**Key words:** *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, Corn biomass, *Pinus eldarica*.