ترکیبات بیوشیمیایی و نقش بازدارندگی اسانس گیاه درمنه A. fragrans Willd بر سویه‌های آسپرژیلوس فلاووس به عنوان بیماری غذازاد در شرایط برون تنی

مهدی یونسی حمزه‌خانلو*[۱]، بیوک‌آقا فرمانی[۲]، محمد اسماعیل‌پور[۱] سحر سلیمانپور دیزجی[۱] و مریم خلیلی[۱]

۱*- گروه جنگلداری و گیاهان دارویی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اهر، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

۲- گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اهر، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

* ایمیل نویسنده مسئول: mehdiyounessi377@gmail.com

تاریخ دریافت : ۱۴۰۰/۰۳/۱۹ تاریخ پذیرش : ۱۴۰۰/۰۴/۲۲

چکیده

کپک آسپرژیلوس فلاووس با تولید سموم آفلاتوکسین، آلودگی‌های زیادی در انواع مواد غذایی باعث می‌شود. امروزه تحقیقات زیادی برای جلوگیری از تولید سموم قارچی با استفاده از ترکیبات طبیعی گیاهی به ویژه اسانس‌ها برای مهار فعالیت قارچ‌ها انجام می‌شود. در این مطالعه، تاثیر اسانس درمنه بر سویه‌های (R5 و P7) آسپرژیلوس فلاووس بررسی شد. در آزمایشات ۱۳ غلظت مختلف (۴/۵، ۹، ۱۳/۵، ۱۸، ۳۶، ۷۲، ۸۶، ۱۰۰، ۱۱۴، ۱۲۸، ۱۴۲، ۱۶۶ و ۱۸۰ µL/L) اسانس درمنه به محیط کشت PDA اضافه شد و سپس با کشت سویه‌های آسپرژیلوس فلاووس به طور جداگانه، نرخ مهار اسانس درمنه در رشد سویه‌ها بررسی شد. در بررسی اندازه قطر هاله‌های رشد یافته در مقایسه با شاهد، مشاهده شد که با افزایش غلظت اسانس، قطر هاله‌ها کاهش یافته بود. به طوری که در سویه‌های R5 (قطر هاله ۱۸/۹۷ mm) و P7 (قطر هاله ۱۸/۳۹ mm) با غلظت اسانس ۱۶۶ µL/L، بیشترین اثر مهارکنندگی در مقایسه با نمونه شاهد (قطر هاله ۶۷/۴ mm) داشتند.

کلمات کلیدی

اسانس درمنه، آسپرژیلوس فلاووس، نقش ضدکپکی، قطر هاله

۱- مقدمه

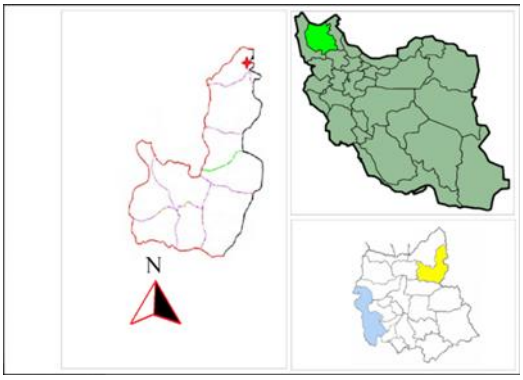
به دلیل افزایش نیاز داخلی و جهانی به گیاهان دارویی از جمله درمنه و ترکیبات دارویی مشتق شده از آن، شناسایی ترکیبات و اثرات درمانی و ضدمیکروبی آنها در جمعیت‌های وحشی مختلف می‌تواند به تأمین نیاز جهانی این گیاهان کمک کند (Younessi-Hamzekhanlu et al., 2020; Younessi-Hamzekhanlu et al., 2021). گیاه درمنه یکی از مهمترین جنس‌های خانواده کامپوزیته است که شامل صدها گونه در نواحی مختلف آسیا، اروپا، شمال آفریقا و آمریکای شمالی می‌باشد (Farghadan et al., 2016). ویژگی‌های دارویی مختلف این گونه‌ها می‌تواند بر علیه برخی از بیماری‌ها نظیر هپاتیت، سرطان، مالاریا و التهاب مورد استفاده قرار گیرد (Saddi et al., 2007). گونه A. fragrans Willd یک گیاه معطر و چندساله با برگهای سبز-نقره‌ای و گل‌های زرد رنگ می باشد که در مراتع ایران، آذربایجان، روسیه و ارمنستان رشد می‌کند. در ایران این گونه بیشتر در شمال و شمال غرب کشور گسترش یافته است و شامل بیشترین پوشش گیاهی در زیستگاه‌های آذربایجان می‌باشد (Morteza-Semnani et al., 2005; Motamedi et al., 2016).در کشور ما حدود ۳۴ گونه درمنه یکساله و چندساله وجود دارد که دارای کاربردهای متعددی مانند نگهدارنده و طعم دهنده مواد غذایی، دارویی و آرایشی هستند. اسانس و عصاره جدا شده از گونه‌های مختلف این گیاه منبع خوب ترکیبات زیست‌فعال و متابولیت‌های ثانویه با اثرات ضدمالاریایی، ضدتومور، ضدقارچ، ضدویروس، ضدهپاتیت، ضداسپاسم، آنتی‌اکسیدانت، و خواص ضدالتهابی دارند. تحقیقات در گونه‌های مختلف گیاه درمنه وجود ترکیبات پلی‌استیلنی، لاکتون‌های سسکئوی، ترپنی، فلاوونوئیدها را در اسانس نشان داده است. این گونه به واسطه ترکیبات معطر، که عمدتا ترپنوئیدهای زیست‌فعال و ترکیبات فنولی هستند، شناخته می‌شوند (Younessi-Hamzekhanlu et al., 2020).

قارچ‌ها از عوامل مهم فساد مواد غذایی در طول انبارداری و ذخیره محسوب می‌شوند که باعث کاهش کیفیت و کمیت محصولات شده و همچنین به علت توانایی بالا در تولید انواع مایکوتوکسین‌ها موجب ایجاد خطرات زیادی برای مصرف‌کننده می‌شوند. مایکوتوکسین‌ها متابولیت‌های ثانویه‌ای هستند که دارای اثرات سمی مختلف روی انسان و حیوانات می‌باشند. تقریبا حدود ۴۵-۲۰٪ غلات دنیا آلوده به مایکوتوکسین‌ها هستند (Kumar et al., 2006 and Patkar et al., 1993). مخصوصا برخی از سویه‌های آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس با تولید مایکوتوکسین اثرات سمی، سرطان-زایی، جهش‌زایی و آسیب به جنین در انسان و حیوانات نشان داده‌اند (Jayashree and Subramanyam, 1999 and Fan and Chen, 1999). کنترل قارچ‌ها معمولا با استفاده از نگهدارنده‌های شیمیایی انجام می‌شود، اما این مواد در اغلب دارای اثرات جانبی مثل سرطان‌زایی و آسیب به جنین ناشی از باقی‌مانده آنها در مصرف‌کننده هستند. همچنین افزایش تقاضای مصرف‌کنندگان برای غذاهای تازه باحداقل فرآوری و فاقد نگهدارنده‌های شیمیایی، باعث شده است تا در سال‌های اخیر مطالعات خیلی زیادی برای استفاده از ترکیبات طبیعی بویژه اسانس‌های گیاهی جهت جلوگیری از رشد انواع قارچها و تولید آفلاتوکسین متمرکز شود (Sa´nchez et al., 2005 and Soliman and Badeaa, 2002).

۲- مواد و روش‌ها

• مواد گیاهی

بخش‌های هوایی گیاه A. fragrans Willd از منطقه ازناب شهرستان هوراند با مشخصات جغرافیایی: ارتفاع ۵۸۶ متر، طول ۴۷/۴۳۳ متر و عرض ۳۹/۰۵۳ متر، در مرحله رشد رویشی جمع آوری شدند (شکل ۱) .



شکل ۱- نقشه مکان جمع‌آوری گیاه درمنه.

- **استخراج سانس گیاه درمنه**

از بخش هوایی تازه گیاه درمنه حدود ۲۰۰ g برداشته و با دستگاه کلونجر در مدت ۲/۵ ساعت اسانس‌گیری شد. سولفات سدیم برای آب‌زدایی کامل اسانس استفاده شد و تا زمان آنالیز شیمیایی، در ظروف دربسته تیره در یخچال نگهداری شد.

- **آنالیز اسانس درمنه با GC-MS**

آنالیز GC اسانس با دستگاه GC (Agilent 7890A) انجام شد. سیستم آنالیز GC مجهز به اینجکتور مدل splitless (با حجم ۱ µL و دمای ۲۵۰°C) بود. گاز هلیوم به عنوان حامل (۱/۱ mL/min) و لوله موئین مدل HP 5MS (۳۰ m × ۰/۲۵ mm، ضخامت لایه ۰/۲۵ µm) با فشار ستون ثابت ۸/۱۳ psi بود. دمای اولیه آون ۵۰°C برای ۲ دقیقه پس از تزریق اسانس نگهداری شده و سپس تا دمای ۲۵۰°C با نرخ ۸°C در هر دقیقه افزایش یافت تا نهایت به مدت ۲ دقیقه در دمای ۲۵۰ °C ثابت نگه داشته شد. طیف سنجی جرمی در بخش MS دستگاه (Agilent 5975C Network با دتکتور Triple-Axis) مورد آنالیز قرار گرفت. قسمت MS با ولتاژ یونیزاسیون ۷۰eV و طیف جرمی m/z ۵۰۰-۳۴ اجرا شد. دماهای ۲۸۰ و ۲۵۰°C به ترتیب به عنوان دماهای منبع آنیون و تداخل مورد استفاده قرار گرفتند. برای شناسایی ترکیبات اسانس از مقایسه زمان نگهداری (RT) و الگوی طیف جرمی با داده‌های موجود در کتابخانه Wiley دستگاه GC-MS صورت گرفت. سری آلکان C8-C20 تحت شرایط یکسان در آنالیز GC-MS برای محاسبه شاخص اندیکس نگهداری (RI) ترکیبات مورد تجزیه قرار گرفت (جدول ۱). درصد هر یک از ترکیبات شناسایی شده با استفاده از فضای زیر پیک GC اندازه گیری شدند.

- **کشت سویه‌های آسپرژیلوس فلاووس در برون تنی**

سویه‌های (R5 و R7) آسپرژیلوس فلاووس از دانشگاه ارومیه تهیه شدند. ابتدا سویه‌ها در محیط کشت پتتودکستروزآگار (PDA) به مدت ۱۰-۷ روز در انکوباکتور گذاشته شد تا کپک‌های تازه با اسپورهای فعال بدست آمد. ارزیابی فعالیت سویه‌های آسپرژیلوس فلاووس: به محیط کشت‌های مذاب و استریل PDA، در ۱۲ سطح مختلف (۴/۵، ۹، ۱۳/۵، ۱۸، ۳۶، ۷۲، ۸۶، ۱۰۰، ۱۱۴، ۱۲۸، ۱۴۲، ۱۶۶ و 180 µL/L) اسانس درمنه آماده شده با غلظت‌های مساوی دی‌متیل سولفواکساید به عنوان حلال افزوده شد. این عمل برای هر دو سویه به طورجداگانه در سه تکرار انجام شد. پس از تلقیح هر دو سویه R5 و P7 از کپک به قطر ۲ mm در محیط کشت، همه پتری‌ها در دمای ۲۷ ℃ به مدت یک هفته در انکوباتور قرار داده شدند.

جدول ۱- ترکیبات اسانس گیاه درمنه شناسایی شده به روش GC-MS.

Compounds		درصد ترکیبات	
Alkane (ALKA) RI[a]		RI[b]	
Octadecane	1800	1796	0.56
Fatty acid (FA)			0.45
Palmitic acid	1961	1957	0.45
Monoterpenes (MT)			22.23
4-carene	1014	1008	1.37
Camphene	933	934	1.20
β -Myrcene	981	977	1.32
α-Phellandrene	998	1010	0.17
Sabinene	971	961	2.94
α -Terpinene	1014	1008	1.37
α – Terpinolene	1088	1090	0.84
α -Pinene	917	919	0.33
β -Phellandrene	1028	1025	4.26
β –Pinene	978	969	0.36
γ –Terpinene	1060	1056	2.10
Pseudo-limonene	1007	1012	5.97
Oxygenated Monoterpenes (OMT)			72.2
1,8-Cineole	1026	1028	23.79
Camphor	1160	1157	4.66
Myrtenal	1205	1205	0.99
Myrtenol	1215	1239	0.20
Pinocarvone	1168	1171	0.71
Trans-Pinocarveol	1145	1147	0.66
Thujone	1112	1111	41.19
Sesquiterpenes (ST)			0.83
Bicyclogermacrene	1483	1480	0.17
Germacrene-D	1453	1450	0.66
Oxygentated Sesquiterpenes (OST)			0.13
Spathulenol	1557	1557	0.13
Others (OTH)			0.23
Cis-Jasmone	1378	1380	0.23
Total monoterpenes			94.43
Total Sesquiterpenes			0.96
Total			96.63

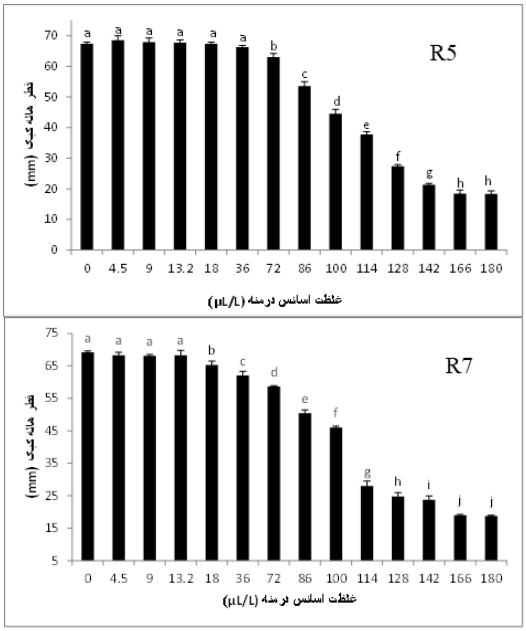
- **آنالیز داده‌های آماری**

آزمایشات در سه تکرار به صورت طرح کاملا تصادفی انجام شد. برای آنالیز داده‌ها از روش تجزیه واریانس در سطح احتمال $p < ۰/۰۵$ با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ انجام شد. همه نمودارها با نرم-افزار اکسل رسم شدند.

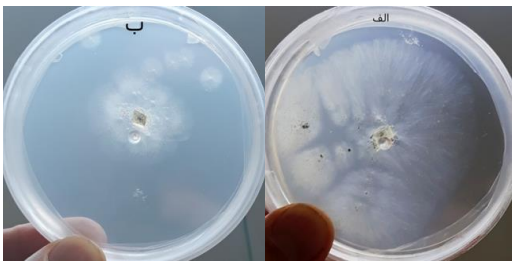
۳- نتایج و بحث

آنالیز ترکیبات اسانس گیاه درمنه توسط توسط GC-MS حدود ۳۲ ترکیب مختلف شناسایی شدند (جدول ۱). بررسی درصد ترکیبات اصلی اسانس نشان داد که منوترپن‌های اکسیژندار با ۷۲/۲٪ فراوانی، بیشترین مقدار را داشتند. همچنین توجون با ۴۱/۱۹٪ فراوانی، ۱،۸-سینول با ۲۳/۷۹٪ فراوانی و کامفور با ۴/۶۶٪ فراوانی در دسته سکوئترپن‌های اکسیژندار بودند.در مجموع اسانس درمنه ۹۴/۴۳٪ انواع منوترپن‌ها را شامل می‌باشد که فعالیت ضدکپکی اسانس به این ترکیبات نسبت داده

شد. نتایج اثر غلظت‌های مختلف اسانس درمنه بر رشد سویه‌های R5 و P7 آسپرژیلوس فلاووس در شکل‌های ۱ و ۲ آمده است. که این تصاویر تاثیر معنی‌دار اسانس در غلظت‌های بالا بر کاهش قطر هاله هیف سویه‌های آسپرژیلوس فلاووس در محیط آزمایشگاه به صورت برون تنی نشان داد. با توجه به شکل ۲، در مورد سویه R5، با افزایش غلظت اسانس تا ۳۶ µL/L در مقایسه با شاهد (قطر هاله ۶۷/۴ mm) تاثیری بر قطر هاله نداشت. اما از غلظت ۷۲ µL/L اثر قابل توجهی بر کاهش قطر هاله سویه داشت که بیشترین کاهش (قطر هاله ۱۸/۳۹ mm) در ۱۶۶ µL/L بدست آمد ($p < ۰/۰۵$). در شکل ۲، در مورد سویه P7، با افزایش غلظت اسانس تا ۱۳/۲ µL/Lدر مقایسه با شاهد (قطر هاله ۶۹/۱۷ mm) تاثیری بر قطر هاله نداشت. اما از غلظت ۱۸ µL/L اثر قابل توجهی بر کاهش قطر هاله سویه داشت که بیشترین کاهش (قطر هاله ۱۸/۹۷ mm) در ۱۶۶ µL/L بدست آمد ($p < ۰/۰۵$) (شکل ۲ و ۳).



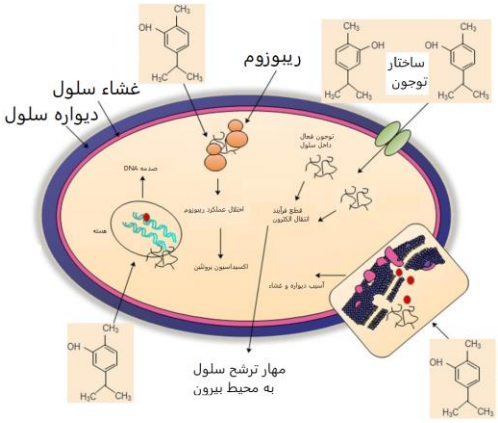
شکل ۲- اثر مهارکنندگی غلظت‌های مختلف اسانس درمنه بر سویه R5 و P7 آسپرژیلوس فلاووس.



شکل ۳- مقایسه تاثیر اسانس درمنه بر قطر هاله رشد سویه R5 آسپرژیلوس فلاوس: الف) بدون اسانس و ب) با اسانس.

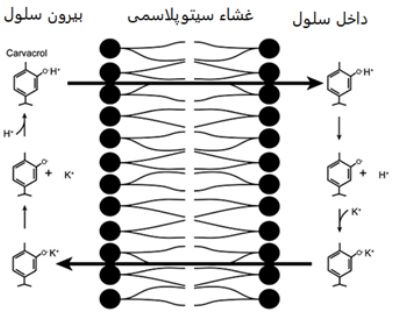
مکانیسم مهارکنندگی اسانس درمنه بر کپک آسپرژیلوس فلاوس

اسانس‌های گیاهی حاوی ترکیباتی با زیست‌فعال‌های متفاوتی دارای خاصیت ضدمیکروبی می‌باشند. مطالعات زیادی در متابولیت‌های ثانویه گیاهان معطر و دارایی نشان داده است که موادی طبیعی، نقش‌های حفاظتی مهمی در سیستم‌های دفاعی گیاهان دارند که بسیاری از متابولیت‌ها، گیاه را در مقابل آفات و امراض ایمن می‌کند. بنابراین، شناخت و بررسی این متابولیت‌ها کمک مؤثری در کنترل انواع آفات و امراض دارد. بررسی‌ها نشان داده است که مقدار و حتی نوع این متابولیت‌ها در یک نوع گیاه وابسته به شرایط محیطی و جغرافیایی محل رویش آنها است (Rodriguez et al., 2005). از ترکیبات شیمیایی گیاهی رایج می‌توان به فنول‌ها، فلاونوئیدها، کومارین‌ها، مشتقات سینامیک اسید، دی‌ترپن‌های فنولیک و فنولیک اسیدها اشاره کرد. تعدادی از ترکیبات با خواص آنتی‌اکسیدانی به عنوان متابولیت-های ثانویه مانند ترکیبات فنولی که توسط گیاهان ساخته می‌شوند که در مبارزه با گونه‌های فعال اکسیژن نقش مهمی دارند. گونه‌های فعال اکسیژن از طریق آسیب زدن به DNA، میتوکندری، دیواره سلولی و افزایش نشت سلولی باعث مرگ میکروارگانیسم‌ها می‌شوند (یحیی آبادی و همکاران، ۱۳۹۰).در شکل ۲ توجون با ۴۱/۱۹٪ فراوانی از ترکیبات مهم در اسانس درمنه می‌باشد. بررسی مکانیسم نقش ضد کپکی توجون انواع مسیرهای ضدآسپرژیلوس را نشان داده است که می‌توان: ۱) صدمه به DNA سلول، ۲) اختلال عملکرد ریبوزوم و اکسیداسیون پروتئین سلول، ۳) تخریب دیواره و غشاء سلول، ۴) قطع فرآیند انتقال الکترون و ۵) مهار ترشح سلول به محیط بیرون از نقش اثراتی مهم آن اشاره کرد که همه باعث مرگ سلول و یا حتی از کارانداختن بخشی از سیستم زنده سلول می‌گردند.



شکل ٤- انواع روش‌های مهاری مختلف توجون بر کپک آسپرژیلوس فلاوس

عناصر معدنی مهم مانند پتاسیم و سدیم نقش حیاتی در عملکرد میکروارگانیسم‌ها دارد که هر گونه اختلال و کاهش در مقادیر آنها باعث مرگ می‌شود. شکل ۵ شمای کلی مکانیسم پیشنهادی عمل کارواکرول (یکی از اجزاء اسانس درمنه) را نشان می‌دهد. کارواکرول تفکیک نشده از میان غشای سیتوپلاسم به داخل سیتوپلاسم سلول انتشار می‌یابد. در داخل سیتوپلاسم با آزادسازی پروتون به صورت تفکیک شده در می‌آید. سپس یون پتاسیم (یا سایر یون‌ها) به کارواکرول ضمیمه می‌شوند، ترکیب حاصل از میان غشای سیتوپلاسمی به بیرون منتقل می‌گردد. در محیط بیرون با آزاد سازی یون پتاسیم، دوباره پروتون بر روی کارواکرال تثبیت می‌شود. این چرخه به طریق بین قسمت بیرونی و داخلی غشای سیتوپلاسمی تکرار شده تا هر چه بیشتر یون پتاسیم به بیرون سلول انتقال یابد (Ultee et al., 2005).



شکل ۵- شمایی از مکانیسم عمل ضدمیکروبی کارواکرول

در تحقیقی که حکیمی میبدی و همکاران (۱۳۸۲) انجام دادند، نتایج حاصل از نقش ضدمیکروبی اسانس درمنه صخره‌ای A.iahausskenechtii نشان داد که اسانس این گیاه از رشد انواع میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا جلوگیری می‌کرد. به طوری که در بعضی از موارد فعالیت ضدمیکروبی آن از آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند نالیدیکسیک اسید، جنتامیسین، سفالوتین، آموکسی‌سیلین و کلرامنفیل بیشتر بود. اسانس این گیاه دارای ترکیبات اصلی سینئول، کامفور، آترمینرین، کتون، فراگراند، بورنئول و توجون است. همچنین بررسی ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس درمنه دشتی A. sieberi که شامل ترکیب‌های اصلی کامفور، لیمونن، سینئول، کامفن، پینن و توجون هم اثرات ضدمیکروبی داشت (حکیمی میبدی و همکاران، ۱۳۸۲). پژوهش سردرودیان و آریانفر (۱۳۹۷) برای شناسایی ترکیبات شیمیایی، قدرت آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی اسانس A. Turanica انجام شد که در آنالیز اسانس ۲۶ ترکیب مختلف عمدتا مونوترپن اکسیژندار شناسایی شدند. چهار ترکیب عمده این اسانس کریرسانتن (۲۱/۳۷٪)، ۱،۸-سینئول (۱۹/۲۰٪)، پیپریتنن (۱۶/۶۱٪) و آلفا- پینن (۵/۵۲٪) و توجون (۱۴/۱۲٪) که ۷۶/۸۲٪ از اسانس گیاه را تشکیل داده بودند. بررسی خواص ضدمیکروبی نشان داد که مهار باکتری‌های گرم منفی توسط اسانس حاصل از اندام‌های هوایی گیاه بیشتر از انواع گرم مثبت بود. همچنین خاصیت ضدباکتریایی اسانس این گیاه با جنتامایسین قابل مقایسه بود. نتیجه‌گیری شد که مقادیر زیاد ترکیبات فنولی و ترپنی اسانس A. Turanica، دارای پتاسیل آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی بالایی دارد که می‌تواند این گیاه را به عنوان یک موضوع با ارزش جهت پژوهش‌های بیشتر، توصیه نمایید (سردرودیان و آریان فر، ۱۳۹۷).یونسی همزه‌خانلو و همکاران (۱۳۹۸) برای نخستین‌بار اثرات ضدباکتریایی اسانس A. fragrans Willd با استفاده از روش انتشار دیسک بر روی باکتری‌های Escherichia coli، Klebsiella pneumonia،Proteus vulgaris، Staphylococcus aureus وBacillus subtillus انجام دادند. بر اساس نتایج تحقیق، باکتری‌های گرم منفی (P. vulgaris ،E. coli و K. Pneumonia) در برابر اسانس درمنه در مقایسه با باکتری‌های گرم مثبت (S. aureus و B. subtillus) حساس‌تر بودند (یونسی همزه‌خانلو و همکاران، ۱۳۹۸).

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعات نشان داد که اسانس درمنه در مهار رشد هیف سویه‌های (R5 و P7) آسپرژیلوس فلاووس کارآیی بسیار خوبی در مقایسه با شاهد داشت. به طوری که در غلظت‌های بالاتر قابلیت مهار قابل توجهی بر رشد کپک و در نتیجه کاهش قطر هیف داشت. در سویه R5، افزایش اسانس از غلظت µL/L ۷۲ اثر قابل توجهی بر کاهش قطر هاله سویه داشت که بیشترین کاهش در µL/L ۱۶۶ بدست آمد. در سویه P7، افزایش اسانس از غلظت µL/L ۱۸ نقش قابل توجهی بر کاهش قطر هاله سویه داشت که بیشترین کاهش در µL/L ۱۶۶ بدست آمد. از ترکیبات مهم اسانس درمنه می‌توان به توجون و کارواکرول اشاره کرد که از طریق آسیب‌زدن به DNA، زنجیره الکترون، دیواره و غشاء سلولی و همچنین افزایش نشت سلولی باعث مرگ سویه‌های کپک آسپرژیلوس فلاوس می‌شوند.

منابع

- Fan, J.J., Chen, J.H. 1999. Inhibition of aflatoxinproducing fungi by welsh onion extract. J. Food Protection, Vol. 62 (4), P. 414-417.
- Farghadan, M., et al. 2016. The Effect of Artemisia fragrans Willd: Essential Oil on Inducible Nitric Oxide Synthase Gene Expression and Nitric Oxide Production in Lipopolysaccharide-stimulated Murine Macrophage Cell Line. Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology, Vol. 15 (6), P. 515.
- Hakimi Maybody, M.H., et al. 2004. An investigation into biological activities of A. persica's essential oil. Pajouhesh and Sazandegi, Vol. 61, P. 2-5.
- Jayashree, T., Subramanyam, C. 1999. Antiaflatoxigenic activity of eugenol is due to inhibition of lipid peroxidation. Letters in Applied Microbiology, Vol. 28, P.179-83.
- Kumar, R., et al. 2006. Evaluation of Chenopodium ambrosioides as a potential source of antifungal, antiaflatoxigenic and antioxidant activity. International J. of Food Microbiology, Vol. 115, P. 159 - 64.
- Morteza-Semnani, K., et al. 2005. Essential oil composition of Artemisia fragrans Willd. from Iran. Flavour and fragrance journal, Vol. 20 (3), P. 330-331.
- Motamedi, J., et al. 2016. Variation in biomass and morphology of Artemisia fragrans Willd. under grazing in northwest mountainous rangelands of Iran. Acta Ecologica Sinica, Vol. 36 (6), P. 477-482.
- Patkar, K., et al. 1993. Effect of spice essential oils on growth and aflatoxin B1production by A. flavus. Letters in Applied Microbiology, Vol. 17, P. 49-51.

- Rasooli, I., et al. 2006. Growth inhibition and morphological alterations of Aspergillus niger by essential oils from Thymus eriocalyx and Thymus x-porlok. Food Control, Vol. 17, P. 359-64.
- Saddi, M., et al. 2007. Antiherpevirus activity of Artemisia arborescens essential oil and inhibition of lateral diffusion in Vero cells. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, Vol. 6 (1), P. 10-21.
- Sardarodiyan, M., Arianfar, A . 2018. Essential oil composition, Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of Artemisia Turanica on typical foodborne pathogens. Food Science and Technology, Vol. 78 (15), P. 295-309.
- Soliman, K.M., Badeaa, R.I. 2002. Effect of oil extractedfrom some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. Food and chemical toxicology, Vol. 40, P. 1669-1675.
- Sa´nchez, E., et al. 2005. Inhibition of growth and mycotoxin production of Aspergillus flavus and Aspergillus parasiticus by extracts ofAgave species. International J. Food Microbiology, Vol. 98, P. 271-279.
- Ultee, A., Bennik, M.H., Moezelaar, R. 2005. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen bacillus cereus. Appl. Environmental Microbiology, Vol. 68 (4), P. 1561-1568.
- YahyaeeAbadi, S., et al. 2011. Effect of numbers from plant extracts on growth of Aspergillus strains. Herbal medicines, Vol. 2 (1), P. 69-81.
- Younessi, M., et al. 2019. Study of phytochemical composition and antibacterial effects of Artemisia fragrans Willd. essential oil in different seasons. Food Science and Technology, Vol. 16 (91), P. 357-367.
- Younessi-Hamzekhanlu, M., et al. 2020. Evaluation of Essential Oil from Different Artemisia fragrans Willd. Populations: Chemical Composition, Antioxidant, and Antibacterial Activity. J. Essential Oil Bearing Plants, Vol. 23 (6), P. 1218-1236.
- Younessi-Hamzekhanlu, M., et al. 2020. Ethnopharmacological study of medicinal plants from Khoy city of West Azerbaijan-Iran. Indian Journal of Traditional Knowledge, Vol. 19 (2), P. 251-267.
- Younessi-Hamzekhanlu, M., et al. 2021. Herbals Used in Western Iran as Food and for Health Treatments. Biodiversity, Conservation and Sustainability in Asia. Springer, P.547.

Biochemical compositions and inhibitory role of A. fragrans Willd essential oil on strains of Aspergillus flavus as foodborne illness in In vitro conditions

Mehdi Younessi-Hamzekhanlu[*1], Boukaga Farmani[2], Mohammad Esmaeilpour[1], Sahar Soleimanpour-Dizagi[1] and Maryam Khalili[1]

1.Department of Forestry and Medicinal Plants, Ahar Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
2.Department of Food Science and Technology, Ahar Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
[*]Email: mehdiyounessi377@gmail.com

Abstract

Aspergillus flavus mold causes many contaminants in foodstuffs with aflatoxin production. Today, many researches are carried out for the use of natural compounds especially herbal essential oils for inhibiting production of fungi toxins. In this study, the effect of Artemisia essential oil on strains (R5 and P7) of Aspergillus flavus was investigated. In the experiments 13 different concentrations (4.5, 9, 13.5, 18, 36, 72, 86, 100, 114, 128, 142, 166 and 180 µL/L) Artemisia essential oil was added to PDA culture medium and then with separately culture of strains of Aspergillus flavus, inhibition rate of essential oil investigated in growth of strains. In investigation of diameter size of the grown halos in compared to control, it was observed that diameter of halos had been decreased with increasing essential oil concentration. So that in strains R5 (halo diameter 18.97 mm) and P7 (halo diameter 18.39 mm) with essential oil concentration of 166 µL/L, the most inhibitory effect had in compared with control sample.

Introduction

Research on different species of Artemisia has shown the presence of lactones, terpenes and flavonoids in essential oils. These species are known for their bioactive compounds, which are mainly terpenoids and phenolic compounds. Fungi are important factors in food spoilage during storage, which reduces the quality and quantity of products and as well as due to high ability to produce a variety of mycotoxins that cause great risks for consumers. In particular, some strains of Aspergillus flavus and Aspergillus parasiticus have shown toxic, carcinogenic, mutagenic, and fetal harm effects in humans and animals by producing different types of mycotoxins. Fungal control is usually done using chemicals, but these substances often have side effects such as carcinogenesis in the consumers. Therefore, in recent years a lot of studies have been carried out on natural compounds, especially plant essential oils to inhibit the growth of fungi and aflatoxin production.

Methodology

Aerial parts of A. frariris Willd plant collected from aznab area of horand city. About 200 gr plant was used for extracting essential oil with aclevenger Apparatus within 2.5 hours. GC-MS analysis of essential oil was performed for identifying and quantifying of compounds. The C8-C20 alkanes were analyzed under the same conditions in GC-MS analysis to calculate the retention index (RI) of the compounds. For preparing 12 different levels (4/5, 9, 13/5, 18, 36, 72, 86, 100, 114, 128, 142, 166 and 180 µL/L), equal concentrations of Artemisia essential oil mixed with dimethyl sulfoxide (as a solvent). These operations were performed for both strains separately in three replications. After inoculating R5 and P7 strains with diameter of 2 mm on culture medium, all petri dishes were incubated at 27℃ for 7 days. The experiments were performed in three replications in a completely randomized design. Data were analyzed by analysis of variance at the probability level of $p < 0.05$ using SPSS software (version 22). All diagrams were drawn with Excel software.

Conclusion

Analysis of Artemisia essential oil by GC-MS showed that was about 32 different types of compounds. The percentage of main constituents showed that oxygenated monoterpenes (72.2% frequency), tojun (41.19% frequency), 1,8-Sineol (23.79% frequency) and Camphor (4.66% frequency) were in essential oil. In general, Artemisia essential oil contains of 94.43% of monoterpenes which antifungal activity of essential oil was attributed to these components. In the case of R5 strain, increasing the essential oil concentration up to 36 µL/L had no effect on halo diameter at compared to control (halo diameter of 67.4 mm). But, the concentration of 72 µL/L and higher had significant effects on reducing diameter of strain halo, which the lowest halo diameter (18.39 mm) was obtained at 166µL/L ($p < 0.05$). In P7 strain, increasing essential oil concentration up to 13.2 µL/L (halo diameter of 69.17 mm) had no effect on the halo diameter at compared to control. But, the

concentration of 18µL/L and higher had significant effects on reducing diameter of strain halo that the highest reduction (18.97 mm halo diameter) obtained in 166 µL/L ($p < 0.05$). Plant essential oils contain of compounds with different bioactive effects such as antimicrobial properties. Many metabolites protect the plant against pests and diseases. Studies have shown that the amount and even the type of these metabolites in a plant type depend on the environmental and geographical conditions of their growth. Common phytochemicals include phenols, flavonoids, coumarins, cinnamic acid and other derivatives. Tojun with 41.19% abundance is an important ingredient in Artemisia essential oil. The study of its mechanism role as antifungal has shown various antifungal pathways such as 1) damage to DNA, 2) dysfunction of ribosomes, 3) oxidation of proteins, 4) destruction of cell wall and membrane, 4) disruption of electron transfer process and 5) Inhibition of cell secretion to the environment outside.The research of Sardroodian and Arianfar (2015) was performed to identify the phytochemical compounds, antioxidants and antimicrobials of A. Turanica essential oil. In the analysis of essential oils, 26 different compounds, mainly oxygen monoterpene, were identified. The 4 major constituents of this essential oil were chrysanthanmene (21/37%), 1,8-cineole (19/20%), piperitenene (16/61%), alpha-pinene (52/5%) and tojun (14/12%). The study of antimicrobial properties showed that the inhibition of gram-negative bacteria by essential oil from plant shoots was more than gram-positive types. Also, the antibacterial properties of the essential oil of this plant were comparable to gentamicin. It was concluded that large amounts of phenolic and terpene compounds of A. Turanica essential oil had high antioxidant and antimicrobial effects, which could recommend as a valuable subject for further research.

The results showed that Artemisia essential oil was very effective in controlling the growth of strains of Aspergillus flavus (R5 and P7) compared to the control sample. So that in higher concentrations, it was able to inhibit significantly the growth of Aspergillus strains with monitoring halo diameter. Important constituents of Artemisia essential oil include tojun and carvacrol, which inhibited strains of Aspergillus flaus by damaging to DNA, electron chains, cell wall and membrane, as well as increasing cell leakage to outside.

Keywords

Artemisia essential oil, Aspergillus flavus, Antimold role, Halo diameter.