CORE
Metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
Provided by Aquatic Commons

میزان تاثیر اسانس مرزه (*Satureja hortensis*) در جلوگیری از تولید سم آفلاتوکسین در غذای آبزیان

لاله یزدانپناه گوهرریزی[۱]*؛ ابوالفضل سپهداری[۲]؛ عیسی شریف پور[۳]؛ مصطفی شریف روحانی[٤] و داوود درویشی[٥]

l_yazdanpanah@yahoo.com

۱و ٥- مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی بخش تحقیقات شیلات، کرمان صندوق پستی: ۷٦۱۷۹۱۳۷۳۹

۲، ۳ و ٤- موسسه تحقیقات علوم شیلاتی ایران، تهران صندوق پستی: ٦۱۱٦-۱٤۱٥٥

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹۰ تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۹۱

چکیده

این تحقیق بمنظور بررسی امکان استفاده از مواد طبیعی از قبیل اسانس مرزه در جلوگیری از تولید آفلاتوکسین در خوراک آبزیان در سال ۹۰- ۱۳۸۹ انجام گردید. پس از تهیه اسانس مرزه و اندازه‌گیری میزان مواد موثره از قبیل تیمول و کارواکرول با روش GC، ابتدا میزان بالاترین اثرگذاری اسانس را بر علیه قارچ آسپرژیلوس فلاووس در محیط کشت PDA بررسی و سپس در خوراک آبزیان مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا میزان ۳۰۰ گرم از نمونه خوراک آبزیان را درظروف درب‌دار ریخته و سپس نمونه‌ها توسط دستگاه اتوکلاو استریل گردیدند و مقدار ۲ سی‌سی از سوسپانسیون قارچ به نمونه‌های خوراک اسپری شد. سپس غلظت‌های مختلف اسانس (۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰ و ۶۰۰ ppm) به میزان ۳ سی‌سی در ۳ تکرار به خوراک افزوده گردید. نمونه‌ها در دمای با میانگین (± انحراف معیار) ۲±۲۸ درجه سانتیگراد انکوبه گردیدند. پس از اتمام هر دوره در مقاطع ۲۰، ۴۰ و ۶۰ روزه بصورت تصادفی از ظروف نمونه‌برداری و برای اندازه‌گیری میزان تولید آفلاتوکسین‌های B_1، B_2، G_1 و G_2 به آزمایشگاه ارسال گردید. نتایج نشان دادند که اسانس مرزه در غلظت‌های ۵۰۰ppm و بالاتر، دارای خاصیت ضد قارچی قوی برعلیه آسپرژیلوس فلاووس می‌باشد و میزان تولید آفلاتوکسین B_1 راپس از ۶۰ روز به حدود صفرمی‌رساند.

لغات کلیدی: تغذیه آبزیان، گیاهان دارویی، سموم قارچی

* نویسنده مسئول

مقدمه

آفلاتوکسین B_1 یکی از قویترین آفلاتوکسین‌های عامل ایجاد کننده سرطان بطور طبیعی در حیوانات می‌باشد. اولین شیوع آفلاتوکسیکوزیس ماهی در تخم‌گشایی ماهی قزل‌آلا در سال ۱۹۶۰ اتفاق افتاد. در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان پرورشی که با غذاهای دان آماده شده با ترکیب تخم پنبه آلوده به آفلاتوکسین‌ها تغذیه شده بودند تومورهای کبدی گسترش یافت (مسکوکی و مرتضوی، ۱۳۸۳). اگرچه تخم پنبه آلوده به مدت طولانی بعنوان اجزای اصلی در ترکیب غذا استفاده نشده بود با وجود این بیش از ۸۵ درصد ماهی‌ها در این تخم‌گشایی تلف شدند. انبارکردن نادرست همه مواد غذایی و تغذیه با غذاهای آلوده باعث آلودگی به آفلاتوکسین‌ها می‌شود. آفلاتوکسیکوزیس اکنون در صنعت ماهی قزل‌آلای رنگین کمان بدلیل مقررات سخت اداره دارو و غذای ایران (F.D.A) بعلت غربالگری آفلاتوکسین در دانه‌های روغنی، ذرت و سایر اجزای خوراکی محدود شده است. به هر حال این سم ماهیان پرورشی گرمابی مانند تیلاپیا و گربه ماهی را بدلیل اجزای گیاهی نسبت به اجزای حیوانی، بیشتر تحت تاثیر قرار می‌دهد. به این دلیل افزایش پتانسیل گسترش آفلاتوکسیکوزیس ماهیان گرمابی سریع مورد توجه قرار گرفت که اجزای گیاهی پتانسیل بالاتری نسبت به اجزای حیوانی برای آلودگی با آفلاتوکسین‌ها دارند. در شرایط گرمسیری و نیمه گرمسیری، پتانسیل گسترش آفلاتوکسیکوزیس بعلت انبار کردن مواد غذایی تحت شرایط رطوبت و حرارت بالا افزایش می‌یابد . غذای آلوده به سم آفلاتوکسین علاوه بر ضربه اقتصادی، باعث تلفات شدید در حیوانات می‌شود (Irkin & Korukluoglu, 2007). غلظت‌های مختلف آفلاتوکسین B_1 روی تیلاپیای نیل ۲/۷ گرمی بررسی شدد (Gowda *et al.*, 2004). ماهی‌هایی که با جیره غذایی محتوی ۲/۵، ۱۰ یا ۱۰۰ میلی‌گرم آفلاتوکسین B_1 در هر کیلوگرم غذا به مدت ۸ هفته تغذیه شده بودند کاهش وزن و کاهش شمار سلولهای خونی را نشان دادند. ماهیان تغذیه شده به میزان ۱۰ میلی‌گرم آفلاتوکسین B_1 در هر کیلوگرم غذا ناهنجاری کبدی را نشان دادند و ماهیانی که با ۱۰۰ میلی‌گرم آفلاتوکسین B_1 در هر کیلوگرم غذا تغذیه شده بودند کاهش وزن به همراه آسیب کبدی مشاهده شد.۶۰ درصد ماهی‌ها نیز در پایان آزمایش تلف شدند. ماهی قزل‌آلای رنگین کمان تغذیه شده با جیره حاوی ۰/۰۰۰۴ میلی‌گرم آفلاتوکسین B_1 در هر کیلوگرم غذا (۰/۴ppb) به مدت ۱۵ ماه احتمالاً به میزان ۱۴ درصد تومورها گسترش می‌یابند در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان تغذیه شده با جیره حاوی ۰/۰۲ آفلاتوکسین B_1 در هر کیلوگرم غذا (۲۰ ppb) به مدت ۸ ماه میزان شیوع تومورهای کبدی ۵۸ درصد و با ادامه تغذیه به مدت ۱۲ ماه میزان شیوع تومورها به ۸۳ درصد رسید. گربه ماهی تغذیه شده با جیره حاوی ۱۰ میلی‌گرم آفلاتوکسین B_1 در هر کیلوگرم غذا (۱۰۰۰۰ ppb) به مدت ۱۰ هفته کاهش سرعت رشد و زخم‌های داخلی خفیف را نشان دادند (Gowda *et al.*, 2003).

انبار کردن نامناسب مواد غذایی یکی از متداولترین عوامل مستعد کننده برای رشد آفلاتوکسین و تولید کپک می‌باشد و می‌تواند توسط پرورش‌دهنده ماهی کنترل شود (Dikbas *et al.*, 2008).

امروزه در پی افزایش مقاومت میکروبی و هزینه‌های سنگین درمان بیماری همراه با فشار مصرف‌کنندگان به تولید فرآورده‌های عاری از دارو و محدودیت استفاده از این فرآورده‌ها در بسیاری از کشورها محققین بدنبال ترکیباتی هستند که بتوان از آنها به جای آنتی بیوتیک‌ها در رژیم غذایی آبزیان استفاده کنند (Rasooli *et al.*, 2006). گیاه مرزه گیاهی است که در تمامی کشور قابل کشت و برداشت بوده و بالغ بر۳۰ هکتار سطح زیر کشت در کشور موجود است و دارای خاصیت ضد قارچی قوی می‌باشد (Sanchez *et al.*,2005; Razzaghi-Abyaneh *et al.*, 2008) و از هر ۱۰۰ گرم مرزه تقریباً ۲ تا ۵ سی‌سی اسانس بدست می‌آید.

هدف از انجام این تحقیق بررسی اثر بخشی اسانس مرزه در جلوگیری از رشد قارچ و تولید آفلاتوکسین روی خوراک آبزیان است. لذا با افزودن اسانس مرزه به خوراک آبزیان و آنالیزهای انجام شده اثر بخشی این اسانس در جلوگیری از تولید توکسین بررسی گردید.

مواد و روش کار

در این طرح از اسانس مرزه (*Satureja hortensis*) و سوش قارچ آسپرژیلوس فلاووس PTCC5006IR6 و خوراک آبزیان که از کارخانه چینه تهیه شده بود، استفاده گردید . اسانس از گیاه مرزه که در باغ کشاورزی شرکت گلکاران کاشان کاشت شده بود توسط دستگاه اسانس‌گیر با بخار آب تهیه و در

یخچال در دمای ۴ درجه سانتیگراد در طول انجام آزمایش نگهداری گردید.

قارچ پاتوژن آسپرژیلوس فلاووس PTCC5006 که ایزوله‌ای از مغز پسته شهرستان رفسنجان در استان کرمان بود و در بخش کلکسیون قارچها و باکتری‌های صنعتی ایران توسط متدهای مورفولوژیک استاندارد شناسایی و تحت عنوان قارچ با توکسین‌زایی بالا و بصورت لیوفیلیزه برای انجام طرح در اختیارمان قرار گرفت. ابتدا قارچ را در محیط کشت PDA به مدت ۱۰ روز در دمای با میانگین (± انحراف معیار) ۲±۲۸ درجه سانتیگراد گرم خانه‌گذاری کرده تا تولید اسپور کند. از این محیط کشت پس از ۴ مرحله پاساژ و تهیه کشت خالص استفاده گردید. پس از انجام آزمایش در محیط کشت در شرایط *In vitro* و تعیین موثرترین غلظت بازدارندگی رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس مرحله بعدی کار که بررسی نقش اسانس مرزه در خوراک آبزیان جهت جلوگیری از تولید آفلاتوکسین بود، انجام گردید. بدین صورت که ا بتدا خوراکها را با اوزان مساوی به مقدار ۳۰۰ گرم در ظروف دربدار توزین و برای هر غلظت ۳ تکرار در نظر گرفته شد. ظروف آماده شده را در دستگاه اتوکلاو قرار داده و در حرارت ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه استریل گردید. پس از استریل شدن خوراک‌ها ظروف در دسته‌های ۱۸تایی تقسیم شدند، سپس میزان‌های مختلف غلظت اسانس (ppm ۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰ و ۶۰۰) بسته به وزن خوراک با ۳ سی‌سی آب مقطر استریل (جهت تامین میزان رطوبت) در شرایط کاملا استریل و زیر هود میکروبی مخلوط گردید. برای نمونه‌های شاهد بعنوان جایگزین اسانس مرزه فقط از آب مقطر استریل استفاده گردید. سوسپانسیون اسپور نیز پس از آماده نمودن به میزان ۲ سی‌سی به تمامی نمونه‌های خوراک اضافه گردید. سپس ظروف را در انکوباتور با میانگین (± انحراف معیار) دمای۲±۲۸ درجه سانتیگراد قرار داده و پس از هر ۲۴ ساعت یکبار محیط‌ها را تکان داده تا از نظر اکسیژن رسانی کل محیط در شرایط یکسان قرار گیرند و با توجه به اینکه اسانس مرزه حالت فرار دارد میزان ماده‌ای که در سطح قرار گرفته بود با تکان دادن در سراسر محیط پخش شود . همچنین آلودگی قارچی نیز در تمام محیط یکسان پخش گردد. شرایط نور، دما، اکسیژن برای تمامی نمونه‌ها یکسان بود. اولین نمونه‌برداری پس از گذشت ۲۰ روز بصورت تصادفی انجام شد و هر ظرف بصورت سربسته سریعا به آزمایشگاه برای اندازه‌گیری میزان آفلاتوکسین ارسال گردید. دومین نمونه‌برداری پس از گذشت ۴۰ روز و سومین نمونه‌برداری نیز پس از گذشت ۶۰ روز انجام گردید و نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل و نتایج دریافت شد. آفلاتوکسین با استفاده از دستگاه HPLC و با روش آزمون ISIRI6872 انجام گرفت.

برای شناسایی ترکیب‌های اسانس از دستگاه GC (گاز کروماتوگرافی) و گاز کروماتوگرافی متصل شده به طیف سنج جرمی (GC/MS) استفاده شد. پس از تزریق اسانس به دستگاههای فوق، با استفاده از زمان بازداری ترکیبات (tr) اندیس بازداری (RI) طیف جرمی و مقایسه این مولفه‌ها با ترکیب‌های استاندارد یا با اطلاعات موجود در کتابخانه‌ها و نرم‌افزار Saturn ترکیب‌های تشکیل‌دهنده اسانس‌ها مورد بررسی کیفی و کمی قرار گرفت.

کروماتوگراف گازی مدل Shinadzu-9A مجهز به دتکتور F.I.D (یونیزاسیون شعله هیدروژن) و داده‌پرداز Chromatepac ستون DB-5 و بطول ۳۰ متر و قطر ۰/۲۵ میکرون و ضخامت لایه فاز ساکن برابر ۰/۲۵ میکرون گاز حامل هلیوم سرعت جریان گاز حامل ۲۲/۷ سانتیمتر در ثانیه و انرژی یونیزاسیون در طیف‌سنج جرمی معادل ۷۰ الکترون ولت بود. برنامه حرارتی ۱۰۰ تا ۲۲۰ درجه سانتیگراد با سرعت ۲ درجه سانتیگراد در دقیقه و دمای محفظه تزریق ۲۳۰ درجه سانتیگراد بود.

از گاز کروماتوگراف گازی Varin-3400 متصل شده به طیف سنج جرمی (Saturn 2) مجهز به ستون DB-5 بطول ۳۰ متر و قطر ۰/۲۵ میلیمتر و ضخامت لایه فاز ساکن برابر ۰/۲۵ میکرون استفاده شد. دتکتور Ion trap گاز حامل هلیوم سرعت جریان گاز حامل ۵۰ سانتیمتر در ثانیه و انرژی یونیزاسیون در طیف‌سنج جرمی معادل ۷۰ الکترون ولت بوده است. برنامه حرارتی ۶۰ تا ۲۴۰ درجه سانتیگراد با سرعت ۳ درجه سانتیگراد در دقیقه و دمای محفظه تزریق ۲۵۰ درجه سانتیگراد بود.

اطلاعات جمع‌آوری شده در نرم‌افزار Excel و SPSS ثبت، تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS14 از طریق ANOVA (آنالیز واریانس یکطرفه و مقایسه میانگین‌ها به روش LSD) انجام شده و جهت رسم منحنی‌ها و نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده گردید.

نتایج

نتایج در شرایط *In vitro* نشان داد که اسانس گیاه مرزه دارای خاصیت ضد قارچی قوی بر علیه قارچ آسپرژیلوس فلاووس

در شرایط آزمایشگاهی می باشد. پس از انجام این عملیات نتایج بدست آمده نشان دادند که غلظت ۵۰۰ppm و بالاتر بیشترین تاثیر را در کاهش میزان آفلاتوکسین در خوراک دام دارد . جداول ۱ تا ۳ تاثیر پذیری میزان تولید آفلاتوکسین را در دوره‌های مختلف زمانی و غلظت‌های مختلف استفاده از اسانس مرزه و نمونه شاهد نشان می‌دهند.

اثر غلظت اسانس روی میزان آفلاتوکسین B_1 در سطح ۱ درصد معنی‌دار است یعنی با احتمال ۹۹ درصد اطمینان یا بعبارتی با احتمال کمتر از ۱ درصد خطا می‌توان گفت که بین میانگین تیمارهای مورد بررسی (چهار غلظت + شاهد) اختلاف معنی‌دار وجود دارد. با مقایسه میانگین به روش دانکن در جداول ۴ و ۵ مشخص شد بین تاثیر غلظت‌های مختلف اسانس در این آزمایش (غلظت‌های ۴۰۰، ۵۰۰ و ppm۶۰۰) اختلاف معنی‌داری وجود ندارد و در یک گروه قرار می‌گیرند ولی بین این ۳ غلظت و غلظت‌های ۳۰۰ppm و شاهد ، اختلاف در سطح ۱ درصد وجود دارد بطوریکه شاهد و غلظت ۳۰۰ppm نیز در یک گروه جداگانه قرار گرفت. همچنین با توجه به نتایج آنالیز در جدول ۱ اثر زمانها (۲۰، ۴۰ و ۶۰ روز) روی آفلاتوکسین B_1 در سطح ۵ درصد معنی‌دار است که بیانگر تاثیر مدت زمان مواجهه اسانس بر تولید آفلاتوکسین در تیمارهای آزمایشی است. فاکتور زمان روی میزان اسانس بر آفلاتوکسین در تیمارهای آزمایشی می‌باشد و اختلاف معنی‌داری را در سطح ۵ درصد ایجاد می‌نماید که با توجه به مقایسه میانگین زمانهای مختلف مشخص شد که زمان۲۰ روز و ۶۰ روز اختلاف معنی‌دار مشخصی در سطح ۵ درصد داشتند که در دو گروه جداگانه (A و B) قرار گرفتند و اثر تیمار ۴۰روز در گروه حد واسط این دو گروه یعنی AB قرار می‌گیرد که اختلاف این گروه با هرکدام از دو گروه A و B به تنهایی معنی‌دار نیست. چون مقادیر آفلاتوکسین B_2 در غلظت‌ها و در زمانهای مختلف همگی صفر بودند لذا تجزیه واریانس برای این صفت انجام نگردیده است که موید تاثیر مثبت غلظت مختلف بکار گرفته شده از اسانس برای حذف آفلاتوکسین B_1 در تیمارهای آزمایشی است.

جدول ۱: مقایسه میزان آفلاتوکسین B_1 پس از ۳ دوره زمانی ۲۰، ٤٠ و٦٠ روز در غلظت‌های مختلف ppm ٤٠٠، ٥٠٠ و٦٠٠ اسانس مرزه و نمونه شاهد (میکروگرم در گرم)

زمان (روز) ◄	۲۰	٤٠	٦٠
غلظت اسانس مرزه (ppm) ▼			
غلظت ٤٠٠	۰/۵۳	۰/۵۸	۰
غلظت ۵۰۰	۰/۵٦	۰/۲۲	۰
غلظت ٦٠٠	۰/۵٦	۰/۱۵	۰
نمونه شاهد بدون افزودن اسانس مرزه	۰/۲۳	۰/۵۷	۱/۱۳

جدول ۲: مقایسه میزان آفلاتوکسین G_1 پس از ۳ دوره زمانی ۲۰، ٤٠ و٦٠ روز در غلظت‌های مختلف ppm٤٠٠، ۵۰۰ و٦٠٠ اسانس مرزه و نمونه شاهد

زمان (روز) ◄	۲۰	٤٠	٦٠
غلظت اسانس مرزه (ppm) ▼			
غلظت ٤٠٠	۲/۱۰	۱/۱۱	۰/٤۸
غلظت ۵۰۰	۱/۱۹	۰/٦٤	۰/۲٤
غلظت ٦٠٠	۰/۸۷	۰/٤٤	۰/۱۵
نمونه شاهد بدون افزودن اسانس مرزه	۰/۲۰	۱/۲۱	۱/٤۹

جدول ۳ : مقایسه میزان کل آفلاتوکسین‌های G_2, G_1, B_2, B_1، پس از ۳ دوره زمانی ۲۰،۴۰ و ۶۰ روز در غلظت‌های مختلف ppm۴۰۰،۵۰۰ و۶۰۰ اسانس مرزه و نمونه شاهد

زمان (روز) ◄	۲۰	۴۰	۶۰
غلظت اسانس مرزه (ppm) ▼			
غلظت ۴۰۰	۲/۵۲	۰/۸۲	۰/۸۲
غلظت ۵۰۰	۱/۷۵	۰/۸۶	۰/۵۲
غلظت ۶۰۰	۱/۴۶	۰/۸۴	۰/۱۵
نمونه شاهد بدون افزودن اسانس مرزه	۰/۴۳	۱/۷۸	۲/۶۲

جدول ۴ : جدول آنالیز تجزیه واریانس آفلاتوکسین B_1

منبع تغییرات	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F
تکرار	۵/۲۴۲E -۰۲	۲	۲/۶۲۱E-۰۲	۱/۲۷۷ ns
تیمار	۰/۹۳۴	۳	۰/۳۱۱	۱۵/۱۷۱**
زمان	۰/۲۱۵	۲	۰/۱۰۷	۵/۲۳۳*
تیمار× زمان	۲/۶۳۹	۶	۰/۴۴۰	۲۱/۴۲۱**
خطا	۰/۴۵۲	۲۲	۲/۰۵۳ E-۰۲	---

جدول ۵ : آنالیزداده‌های غلظت اسانس و مدت زمان تاثیر آن روی میزان آفلاتوکسین به روش آزمون دانکن

غلظت (ppm)	تکرار	زمان (روز)	تکرار
۶۰۰	۰/۲۳۶۷ a	۶۰	۰/۲۸۲۵ a
۵۰۰	۰/۲۶۲۲ a	۴۰	۰/۳۸۱۷ ab
۴۰۰	۰/۳۷۲۲ a	۲۰	۰/۴۷۱۷ b
۰	۰/ ۶۴۳۳ b	---	---

حروف لاتین غیرمشابه در هر ردیف نشان‌دهنده‌ی معنی‌دار بودن می‌باشد.

بحث

اهمیت آسپرژیلوس‌ها از دیدگاه بهداشتی و بیماریزایی بدلیل تولید آفلاتوکسین می‌باشد. این سموم اگر بطور مستمر استفاده شوند روی انسان و دام اثرات سوء خواهند گذاشت که این اثرات به ۳ حالت تولید سم، اثرات آلرژی‌زایی و عامل عفونت می‌تواند ایجاد بیماری کند (دادار و همکاران، ۱۳۸۵). تاکنون حدود ۱۲۰ قارچ شناسایی شده‌اند که قادر به تولید سم می‌باشند و یکی از آنها آسپرژیلوس فلاووس است (Gulluce *et al.*, 2003). تاکنون نزدیک ۱۲ نوع آفلاتوکسین شناسایی شده است. بسیاری از کپک‌ها آفلاتوکسین تولید می‌کنند اما مهمترین کپک‌های توکسین‌زا *A. flavus* و *A. parasiticus* است (محبوبی و فیض آبادی، ۱۳۸۸). برخی از این سوشها روی غلات تا ۲۰۰۰ میکروگرم در گرم توکسین تولید می‌کنند (Ashok *et al.*, 2010) . امروزه رویکردهای جدیدی نسبت به استفاده از گیاهان دارویی از جمله اثرات ضد میکروبی آنها ایجاد شده است بطوریکه مطالعات بسیار زیادی روی اثرات ضد میکروبی اسانس‌های گیاهان مختلف صورت می‌گیرد (Sefidkon *et al.*, 2006). این مطالعه نیز با هدف یافتن راه حلی برای مهار رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس انجام گرفت.

نتایج روی محیط کشت (*In vitro*) نشان داد که اسانس گیاه *Satureja hortensis* دارای اثرات ضد قارچی قوی بر علیه آسپرژیلوس فلاووس می‌باشد. در این تحقیق حداقل غلظت بازدارندگی از رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس توسط اسانس مرزه ppm۵۰۰ بود. با توجه به منحنی‌ها و داده‌های بدست آمده این نتایج نشان می‌دهد که بین نمونه شاهد و استفاده از ppm۳۰۰ اسانس مرزه با غلظت‌های ppm۴۰۰ به بالا تفاوت‌هایی وجود دارد و هر چه غلظت اسانس استفاده شده بالاتر رود اثر مهارکنندگی روی رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس بیشتر و

معنی‌دارتر می‌شود بطوریکه غلظت ۳۰۰ppm تفاوت چندانی با نمونه شاهد از نظر رشد قارچ (بر طبق رسم منحنی) وجود ندارد، ولی هر چه غلظت از ۴۰۰ppm بالاتر می‌رود تفاوت معنی‌دارتر می‌گردد. بطوریکه غلظت ۵۰۰ppm اسانس مرزه کاملاً روی محیط کشت اثرات بازدارندگی از رشد را روی قارچ در بردارد. این اثرات ضد قارچی اسانس مرزه را می‌توان به ۲ ماده موثره تیمول و کارواکرول مربوط نمود. همانطور که Gowda و همکاران (۲۰۰۴) و Gulluce و همکاران (۲۰۰۳)، Boyraz و Ozcan (۲۰۰۶) در گزارشات خود به این مطلب اشاره کرده‌اند.

البته Neslihan (۲۰۰۸) نیز به این نتیجه رسید که کارواکرول اثر ممانعت‌کنندگی بیشتری از تیمول بر آفلاتوکسین دارد. وی همچنین در زمینه اثرات اسانس مرزه روی وزن خشک و خیس میسیلیوم قارچ پاتوژن آسپرژیلوس فلاووس تحقیقاتی انجام داده و نتایج معنی‌داری بر کاهش وزن میسیلیوم‌ها بدست آورد. البته غلظت ۶/۲۵ میکرولیتر بر میلی‌لیتر اسانس باعث افزایش وزن میسیلیوم‌های خشک و تر قارچ گردید که دلیل آن نیز مربوط به دمای انکوباسیون یا ترکیبات شیمیایی اسانس متانولی است. وی همچنین در سال ۲۰۰۸ در نتایج بدست آمده در این طرح روی میوه لیمو در شرایط انبارداری استفاده نمود. Boyraz و Ozvan (۲۰۰۶) و Askok و همکاران (۲۰۱۰) روی خاصیت ضد قارچی تعدادی اسانس گیاهی و بررسی اثرات این اسانس‌ها بر تولید آفلاتوکسین B_1 در خوراک‌ها تحقیق نمود و به این نتیجه رسیدند که کارواکرول می‌تواند مانع مهمی برای رشد قارچ‌های آسپرژیلوس فلاووس در محیط مایع و آسپرژیلوس پارازیتیکوس در تولید آفلاتوکسین باشد.

Razzaghi-Abyaneh و همکاران (۲۰۰۸) و Omidbeygy و همکاران (۲۰۰۷) و Dikbas و همکاران (۲۰۰۸) طی تحقیقاتی گزارش کردند که ماده موثره کارواکرول می‌تواند برای کنترل غلظت آفلاتوکسین در غلات مفید باشد. Razzaghi-Abyaneh و همکاران (۲۰۰۸) نیز در تحقیقی که روی اثرات ممانعت‌کنندگی اسانس مرزه روی رشد و تولید آفلاتوکسین روی قارچ آسپرژیلوس پارازیتیکوس داشتند به این نتیجه رسیدند که اسانس مرزه یک پتانسیل ممانعت‌کننده مهم بر تولید آفلاتوکسین B_1 و G_1 تولید شده از قارچ آسپرژیلوس پارازیتیکوس می‌باشد و در جداسازی مواد موثره که توسط RP-HPLC انجام دادند آنها نیز تائیدی بر اثرات مواد موثره تیمول و کارواکرول داشتند.

Sadeghinejad (۲۰۱۰) روی برگهای مرزه گونه خوزستانیکا تحقیق نمود و به خاصیت ضد قارچی آن اشاره نمود. درتحقیقی دیگر گزارش گردید که اسانس‌های آویشن و مرزه قابلیت جلوگیری از رشد قارچ‌های آلوده کننده محصولات غذایی و محصولات باغی و زراعی را داراست و قادر به جایگزینی مواد ضد قارچی شیمیایی کنونی می‌باشند (مسکوکی و مرتضوی، ۱۳۸۳). نتایجی دیگر حاکی از امکان استفاده از اسانس‌های گیاهی در کنترل رشد قارچ و پیشگیری از تولید آفلاتوکسین بدست آوردند (رسولی و همکاران، ۱۳۸۷). نتایج بدست آمده نشان داد که اسانس مرزه تفاوت معنی‌داری نسبت به دیگر اسانس‌های مورد استفاده در تحقیق در قطر هاله عدم رشد نشان می‌دهد. بیشترین قطر هاله عدم رشد مربوط به ترکیبات مرزه و آویشن بود (محبوبی و فیض‌آبادی، ۱۳۸۸). Lakman (۲۰۱۰) روی اثرات ممانعتی اسانس بر فعالیت آفلاتوکسین تحقیق نموده و به این نتیجه رسید که فعالیت‌های ضد قارچی اسانس‌های گیاهان دارویی می‌تواند مربوط به عوامل کارواکرول و تیمول باشد. همچنین دریافتند که بیوسنتز آفلاتوکسین‌ها، تولید آفلاتوکسین‌ها و در کل رشد قارچ آسپرژیلوس رابطه متقابلی با وجود اسانس‌های گیاهی دارد که این اثرات متقابل قابل اندازه‌گیری می‌باشد.

با توجه به تحقیقات سایر محققین، در این بررسی نیز این نتیجه بدست آمد که با توجه به خاصیت ضد قارچی اسانس مرزه، استفاده از غلظت‌های مختلف این اسانس می‌تواند از رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس (در بیماری‌های گیاهی، خوراکهای انسان، دام، آبزیان) و کنترل تولید آفلاتوکسین توسط این قارچ جلوگیری بعمل آورد.

منابع

رسولی، ا.؛ یادگاری نیا، د.؛ گچکار، ل.؛ رضایی، م.ب.؛ فکور، م.ه. و علامه، ع.ا.، ۱۳۸۷. مهار تولید آفلاتوکسین قارچ *Spergillus parasiticus* توسط روغن‌های اسانسی. مجله پژوهش و سازندگی، دوره ۲۱، طمستان ۱۳۸۷، صفحات ۱۴۶ تا ۱۵۵

محبوبی، م. و فیض‌آبادی، م.م.، ۱۳۸۸. بررسی اثر ضد میکروبی اسانس‌های آویشن، مرزنجوش، مرزه و اکالیپتوس بر باکتریهای اشرشیا کلی، سالمونلا تیفی موریوم و قارچهای آسپرژیلوس نایجر و آسپرژیلوس فلاووس. فصلنامه گیاهان دارویی، سال هشتم، دوره ۲، بهار ۱۳۸۸، صفحات ۱۳۷ تا ۱۴۴.

مسکوکی، ع.م. و مرتضوی، س.ع.، ۱۳۸۳. کنترل رشد قارچ آسپرژیلوس پارازیتیکوس توسط اسانسهای طبیعی در محیط کشت مصنوعی. نجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی، سال یازدهم، شماره ۳، صفحات ۶۱ تا ۷۰.

Ashok K., Ravindra S., Priyanka S., Anuradha N. and Dubay K., 2010. Efficacy of extract and essential oil of Lantana indica Roxb against food contaminating moulds and aflatoxin B_1 production. International journal of Food Science and Technology, 45(1):179-185.

Boyraz N. and Ozcan M., 2006. Inhibition of phytopathogenic fungi by essential oil , hydrosol, ground material and extract of summer *savory* (*Satureja hortensis* l.) growing wild in Turkey. International Journal of Food Microbiology, 107:238-242.

Dikbas N., Kotan R., Dadasoglu F. and Sahin F., 2008. Control of *Aspergillus flavus* with essential oil and methanol of food microbiology. International Journal of Microbiology, 124:179-182.

Güllüce M., Sökmen M., Daferera D., Agar G., Ozkan H., Kartal N., Polissiou M., Sökmen A. and Sahin F., 2003. *In vitro* antibacterial, antifungal, and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of herbal parts and callus cultures of *Satureja hortensis* L. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 51(14):3958–3965.

Gowda N.K.S., Malathi V. and Suganthi R., 2003. Screening for aflatoxin and effect of moisture, duration of storage and from of feed on fungal growth and toxin production in livestock feeds. Animal Nutrition Feed Technology, 3:45-51.

Gowda N.K.S., Melathi V. and Saganthi R., 2004. Effect of some chemical and herbal compounds on growth of *Aspergillus parasiticus* and aflatoxin production. Animal Feed Science and Technology, 116:281-291.

Irkin R. and Korukluoglu M., 2007. Control of *Aspergillus niger* with garlic, onion and leek extracts. African Journal of Biotechnology, 6(4):384–387.

Lokman A., 2010. Inhibitory effect of essential oil on aflatoxin activities. African Journal of Biotechnology, 9(17):2474-2481.

Neslihan D., Recep K., Fatih D. and Fikrettin S., 2008. Control of *Aspergillus flavus* with essential oil and methanol extract of *Satureja hortensis*. International Journal of Food Microbiology, 124:179-182.

Omidbeygi M., Barzegar M., Hamidi Z. and Naghdibadi H., 2007. Antifungal activity of thyme, summer savory and close essential oils against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste. Food Control, 18:1518-1523.

Rasooli I., Rezaei M. and Allameh A., 2006. Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from Thymus eriocalyx and Thymus x-porlok. Food Control, 17:359-64.

Razzaghi-Abyaneh M., Ghahfarokhi S., Yoshinari M., Rezaee T., Jaimand M.B., Nagasawa K. and Sakuda S., 2008. Inhibitory effects of *Satureja hortensis* L. essential oil on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. International Journal of Food Microbiology, 123:228-233.

Sadeghinejad B., 2010. Antifungal activity of satureja Khuzestanica Leaves. Journal of Microbiology, 3:36-40.

Sanchez E., Heredia N. and Garcıa S., 2005. Inhibition of growth and mycotoxin production of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* by extracts of Agave species. International Journal of Food Microbiology, 98:271-279.

Sefidkon F., Abbasi K. and Khaniki G., 2006. Influence of drying and extraction method on yield and chemical composition of the essential oil of *Satureja hortensis*. Food Chemistry, 99:19–23.

Evaluation inhibitory effect of essential oil *Savory* (*Satureja hortensis*) in food fish

Yazdanpanah Goharrizi L.[(1)]*; Sepahdari A.[(2)]; Sharifpour E.[(3)]; Sharifrohani M.[(4)] and Darvishi D.[(5)]

l_yazdanpanah@yahoo.com

1,5- Fisheries Research Department, Agriculture &Natural Resource Research Center, P.O.Box: 76179-13739 Kerman, Iran

2,3,4-Iranian Fisheries Research Organization, P.O.Box: 14155-6116 Tehran, Iran

Received: November 2011 Accepted: September 2012

Keywords: Aquatic organism, Food, Medicine plants, Fungal poisons

Abstract

Aflatoxins are a group of fungal metabolites that are produced by the growth of fungi on food. These toxins cause illness in animals and humans, and are important in economic and humans health. In this investigation, inhibitory effects of *savory* (*Satureja hortensis* L.) essential oil were evaluated on the growth of *Aspergillus flavus* in fish food. A gas chromatograph apparatus linked to a mass spectrometer (GC/MS) was used to identify the effective components in *Satureja hortensis* essential oil after extraction. Essential oils against *Aspergillus flavus* incubated in PDA media and antifungal properties of essential oil *Satureja hortensis* was investigated. About of 300g of food samples was weighted and samples were sterilized by autoclave. Fungal suspension (3cc) was spraied into the feed samples, and various concentrations of essential oils (0, 300, 400, 500, 600ppm) added to samples. The samples were incubated at temperature of (±SD) 28±2°C. After 20-40 and 60 days period, randomly, some sampled were taken from containers and the production of aflatoxin B_1, B_2, G_1, and G_2 was measured in the laboratory. This result confirms that 500ppm concentrations of oil *savory* have antifungal properties against *Aspergillus flavus*.

*Corresponding author