

فعالیت ضد قارچی و اثرات هم‌افزایی ترکیب اسانس‌های گیاهی آویشن، دارچین، رزماری و مرزنجوش بر علیه قارچ‌های مولد فساد در میوه سیب

مهدی نیک خواه ممان^۱، محمدباقر حبیبی نجفی^{۲*}، مریم هاشمی^۳ و رضا فرهوش^۲

تاریخ دریافت: ۹۶/۵/۳۱ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۱/۳

^۱ دانشجوی دکتری صنایع غذایی - میکروبیولوژی مواد غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

^۲ استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

^۳ دانشیار گروه بیوتکنولوژی میکروبی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

* مسئول مکاتبه: Email: habibi@um.ac.ir

چکیده

زمینه مطالعاتی: استفاده از ترکیب برخی از اسانس‌های گیاهی می‌تواند منجر به تشدید فعالیت ضدقارچی آن‌ها علیه قارچ‌های مولد فساد در میوه‌ها شود. هدف: این مطالعه به منظور بررسی فعالیت ضد قارچی و اثرات هم‌افزایی ترکیب اسانس‌های گیاهی شامل آویشن شیرازی، رزماری، دارچین و مرزنجوش بر علیه قارچ‌های مهم مولد پوسیدگی پس از برداشت در میوه سیب انجام شد. روش کار: در این پژوهش ابتدا خواص ضد قارچی اسانس‌های گیاهی علیه میکروارگانیسم‌های مؤثر در پوسیدگی سیب شامل بوتریتیس سینه‌رآ، پنی‌سیلیوم اکسپانسونوم و آلترناریا آلترناتا به روش رقت‌سازی در آگار به منظور تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) به مدت ۷ روز مورد بررسی قرار گرفت. در مرحله بعد اثرات هم‌افزایی ترکیب‌های ۲ تایی اسانس به روش چکر بورد بررسی شد و در نهایت آزمایشات *in vivo* بر اساس اندازه‌گیری قطر زخم حاصل از فعالیت قارچی بر روی میوه سیب صورت گرفت. **نتایج:** اسانس آویشن با MIC=۱۲۵۰ µg/mL برای قارچ‌های آلترناریا آلترناتا و پنی‌سیلیوم اکسپانسونوم و ۶۲۵ µg/mL برای بوتریتیس سینه‌رآ و اسانس دارچین با MIC=۱۲۵۰ µg/mL برای آلترناریا آلترناتا و بوتریتیس سینه‌رآ و ۲۵۰۰ µg/mL برای پنی‌سیلیوم اکسپانسونوم در مقایسه با اسانس‌های رزماری و مرزنجوش اثرات مهارکنندگی بیشتری را نشان دادند. اثر هم‌افزایی در مورد ترکیب‌های ۲ تایی آویشن - رزماری و آویشن - دارچین با $FIC \leq 0.5$ (حداقل غلظت مهارکنندگی تلفیقی) بر علیه بوتریتیس سینه‌رآ و آلترناریا آلترناتا مشاهده شد. ترکیب‌های ۲ تایی دارچین - مرزنجوش و آویشن - دارچین نیز این اثر هم‌افزایی را در مهار رشد پنی‌سیلیوم اکسپانسونوم نشان دادند. همچنین نتایج حاصل از آزمایشات *in vivo* اثر هم‌افزایی ترکیب آویشن - دارچین در مهار رشد هر ۳ قارچ مولد فساد در میوه سیب را به خوبی مشخص کرد. **نتیجه‌گیری نهایی:** تیمار ۲ تایی آویشن - دارچین اثر مهارکنندگی بیشتری نسبت به تیمارهای تکی این اسانس‌ها نشان داد و بیشترین اثر مهارکنندگی آن بر روی بوتریتیس سینه‌رآ (قطر ضایعه ۵ میلی‌متر)، در روز ۱۰ و دمای ۲۵°C مشاهده شد.

واژگان کلیدی: اسانس‌های گیاهی، اثرات هم‌افزایی، مهار رشد قارچ، حداقل غلظت مهارکنندگی تلفیقی

مقدمه

فکر استفاده از روش‌های جایگزین انداخته است. در واقع جستجو برای یافتن متابولیت‌های زیستی به منظور کنترل فساد بیولوژیک و افزایش زمان ماندگاری محصولات فسادپذیر بیش از پیش مورد توجه قرار گرفته است و در این رابطه تمرکز بیشتر عمدتاً بر استفاده از اسانس‌های گیاهی و متابولیت‌های حاصل از میکروارگانیسم و یا استفاده تلفیقی از آن‌ها به منظور تشدید اثر ضد میکروبی می‌باشد (رومانازی و همکاران ۲۰۱۲). حدود ۳۰۰۰ نوع اسانس گیاهی شناخته شده وجود دارد که تقریباً ۳۰۰ نوع از آن‌ها اهمیت تجاری دارند. اسانس‌ها می‌توانند حاوی بیش از ۶۰ نوع ترکیب باشند و ترکیبات اصلی ممکن است تا ۸۵ درصد اسانس را تشکیل دهند. مشخص شده برخی از ترکیبات اسانس‌های گیاهی مثل ترکیبات فنلی، ترپن‌ها، الکل‌ها و آلدهیدها مسئول خواص ضد میکروبی هستند. نتیجه برخی از بررسی‌ها ثابت می‌کند اثرات ضد میکروبی اسانس‌ها نسبت به اثرات تک تک اجزای آنها بیشتر است (تکسیرا و همکاران ۲۰۱۳). در سال‌های اخیر توجه زیادی به تاثیر اسانس‌های گیاهی بر روی پاتوژن‌ها و میکروارگانیسم‌های عامل فساد مواد غذایی شده است اسانس‌های گیاهی از نقطه نظر سلامتی برای انسان و محیط زیست ایمن بوده و به همین دلیل تمایل به استفاده از آن‌ها با هدف دستیابی به محصولات سالم و عاری از سموم شیمیایی روز به روز گسترش یافته است (ماری و همکاران ۲۰۱۴). مکانیسم اثر ضد میکروبی اسانس‌ها به خاصیت آب‌گریزی آن‌ها برمی‌گردد که موجب نفوذ این مواد به فسفولیپید غشاء سلول‌های میکروبی شده و سبب اختلال در ساختمان آن‌ها و افزایش نفوذپذیری می‌گردد. با توجه به این که ساختار اسانس‌ها حاوی تعداد زیادی از اجزاء شیمیایی می‌باشد، به احتمال زیاد فعالیت ضد میکروبی آن‌ها به واسطه یک مکانیسم عمل خاص نبوده و شامل اهداف متعددی در سلول باکتری می‌باشد (هایلدگارد و همکاران ۲۰۱۲). با توجه به این که استفاده مناسب از اسانس‌ها مشروط به عدم تاثیر بر

با توجه به افزایش آگاهی مردم نسبت به مسائل تغذیه‌ای، استقبال از مصرف مواد غذایی و محصولات کشاورزی به صورت تازه و عاری از مواد نگهدارنده شیمیایی روز به روز گسترش بیشتری پیدا کرده است. بیماری‌های پس از برداشت، بیماری‌هایی هستند که طی دوره برداشت، درجه بندی، بسته بندی، انبارداری و حمل و نقل محصول به بازار به وجود می‌آیند و عوامل بیولوژیکی ایجاد کننده آن در دامای محیط و حتی در دامای سرد یخچال تا زمان مصرف محصول، به فعالیت و تکثیر خود ادامه می‌دهند. قارچ‌های رشته‌ای به خاطر وسعت پراکندگی محیطی بالا از عوامل اصلی آلودگی در محصولات کشاورزی می‌باشند. قارچ‌های جنس‌های آسپرژیلوس، پنی سیلیوم، بوتریتیس و آلترناریا از مهم‌ترین عوامل فساد پس از برداشت به خصوص در محصولات باغی می‌باشند. حمله عوامل بیماری‌زا اغلب به دنبال صدمات فیزیکی صورت می‌گیرد ولی تعدادی از قارچ‌ها وجود دارند که به بافت‌های سالم نیز حمله برده و شرایط را برای توسعه بقیه عوامل بیماری‌زا هموار می‌سازند (تجسویی و همکاران ۲۰۱۴). در ایران از مجموع حدود ۱۹ میلیون تن تولید محصولات باغی در سال ۱۳۹۴، حدود ۳/۸ میلیون تن (معادل حدود ۲۰ درصد) را میوه‌های دانه‌دار عمدتاً شامل سیب، گلابی و به تشکیل می‌دهند؛ که میوه سیب با تولید سالیانه ۳/۵ میلیون تن رتبه اول را در بین محصولات باغی به خود اختصاص داده است (آمارنامه محصولات باغی ۱۳۹۴). اگر چه استفاده از مواد نگهدارنده شیمیایی می‌تواند ضایعات حاصل از عوامل قارچی را کاهش دهد ولی روز به روز به دلیل عوارض جانبی این مواد، مصرف آن‌ها محدودتر می‌شود. افزایش نگرانی‌ها از به مخاطره افتادن سلامت انسان ناشی از باقیمانده سموم روی محصولات غذایی از یک طرف و افزایش مقاومت عوامل میکروبی ناشی از استفاده روز افزون از قارچ‌کش‌ها و نگهدارنده‌های شیمیایی از طرف دیگر، دانشمندان را به

محیط کشت جامد، نسبت به تهیه سوسپانسیون اسپوری اولیه و سپس شمارش اسپوری با استفاده از لام نئوبار و نهایتاً تهیه سوسپانسیون اسپوری 2×10^4 spore/mL اقدام گردید.

تهیه اسانس‌های گیاهی

اسانس‌های آویشن و رزماری از شرکت کشت و صنعت گل‌کاران (باریج اسانس)، دارچین از شرکت ماگنولیا و مرزنجوش از شرکت گیاه اسانس تهیه گردید. غلظت ۴۰ درصد (w/v) هرکدام از اسانس‌ها با استفاده از اتانول آماده و به‌منظور جلوگیری از هرگونه واکنش نامطلوب در مقابل رطوبت و نور، در بطری‌های تیره رنگ و درب بسته در دمای 4°C نگهداری شدند.

آنالیز شیمیایی ترکیبات اسانس‌های گیاهی

نمونه‌های ۴ اسانس با استفاده از یک دستگاه کروماتوگرافی گازی مدل Agilent HP-۶۸۹۰ مجهز به آشکارساز FID (یونیزاسیون با شعله هیدروژن) و یک دستگاه GC-MS از نوع Agilent -5973 با سیستم مجهز به ستون‌های موبینه BPX5 (طول ستون ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه داخلی ۰/۲۵ میکرومتر) تجزیه شد. گاز حامل، هلیوم با جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه بود. برنامه دمایی ستون به نحوی تنظیم شد که دمای ابتدایی آن 60°C و توقف در این دما ۵ دقیقه، گرادیان حرارتی 2°C در هر دقیقه، افزایش دما تا 220°C با سرعت ۱۵ درجه در هر دقیقه برای ستون قطبی و افزایش دما از ۶۰ تا 240°C با گرادیان حرارتی 3°C در هر دقیقه برای ستون غیر قطبی در نظر گرفته شد. ولتاژ یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت و دمای منبع یونیزاسیون 220°C بود. شناسایی طیف‌ها به کمک شاخص بازدارداری و مقایسه آن با شاخص‌های موجود در کتب مرجع و با استفاده از طیف‌های جرمی ترکیبات استاندارد و اطلاعات موجود در کتابخانه کامپیوتری صورت گرفت (آدامز ۲۰۰۷).

خصوصیات حسی مواد غذایی می‌باشد، بنابراین استفاده از غلظت‌های بالا به خاطر تأثیرات نامطلوب احتمالی با محدودیت مواجه است و بهینه کردن مقدار و غلظت آن‌ها بسیار مهم است (واگنر ۲۰۱۱). با فرموله کردن ترکیب‌های اسانسی و بررسی اثرات ضد قارچی آن‌ها در غلظت‌های کم (با احتمال اثر هم‌افزایی آن‌ها روی یکدیگر) می‌توان تا حد خیلی زیادی استفاده از آن‌ها را در صنایع غذایی و فرآوری پس از برداشت محصولات کشاورزی عملیاتی نمود. بر همین اساس در این مطالعه، با هدف دستیابی به یک ترکیب با کارکرد ضد قارچی و بیشترین اثر هم‌افزایی، از اسانس‌های گیاهی گونه‌های بومی ایران، شامل آویشن، رزماری و مرزنجوش استفاده شده و فعالیت ضد قارچی آن‌ها بر علیه قارچ‌های مولد فساد در میوه سیب به صورت *In vivo* و *In vitro* مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه و ذخیره‌سازی سویه‌های قارچی

سویه قارچی *آلترناریا آلترناتا*^۱ (PTCC5224) از کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی و قارچ‌های *بوتریتیس سینه‌رآ* و *پنی‌سیلیوم اکسپانسونوم*^۲ از کلکسیون میکروبی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی به‌صورت کشت فعال تهیه شد. برای ذخیره‌سازی طولانی‌مدت از روش انجماد با ازت مایع در محیط PDB^۳ حاوی ۲۰ درصد گلیسرول و سپس نگهداری در فریزر 70°C - استفاده شد.

تهیه سوسپانسیون‌های اسپوری

از کشت‌های جوان *پنی‌سیلیوم اکسپانسونوم*، *بوتریتیس سینه‌رآ* و *آلترناریا آلترناتا* (محیط PDA، ۷ روز گرمخانه‌گذاری در دمای 28°C برای اسپورزایی) استفاده شد به این صورت که با استفاده از آب مقطر استریل حاوی ۰/۱ درصد توپین ۸۰ و تراشیدن سطح

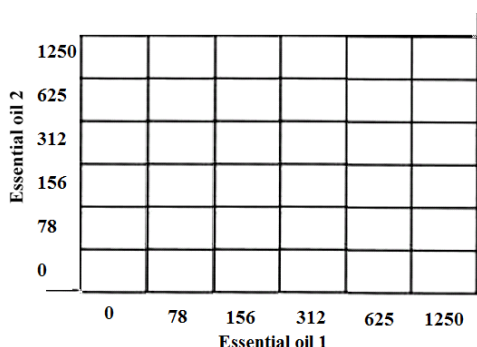
^۱*Penicillium expansum*

^۲Potato Dextrose Broth

^۳*Alternaria alternata*

^۴*Botrytis cinerea*

ردیف عمودی و افقی میکروپلیت و همچنین نسبت‌های مختلفی از غلظت‌های ۲ اسانس در هر چاهک میکروپلیت خواهیم داشت (شکل ۱)



شکل ۱- الگوی بررسی اثرات هم‌افزایی ترکیب ۲ تایی

اسانس به روش Checker board

Fig 1- Synergy test by checkerboard method of essential oil combinations

در این آزمایش ۶ ترکیب ۲ تایی شامل آویشن- رزماری، آویشن- مرزنجوش، آویشن - دارچین، دارچین - رزماری، دارچین - مرزنجوش و رزماری - مرزنجوش به‌عنوان تیمارهای آزمایش انتخاب شدند. محدوده غلظتی مورد آزمایش برای آویشن ۱۹ تا ۲۵۰۰، دارچین ۳۹ تا ۵۰۰۰ و رزماری و مرزنجوش ۳۱۲ تا ۲۰۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد. برای شروع کار ابتدا در هر چاهک مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محیط ۱۶۴۰ rpmi فیلتر شده اضافه کرده و سپس با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت مورد نظر هر اسانس رقت سازی دابل انجام شد و در انتها نیز ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون قارچی اضافه و در دمای ۲۸°C به مدت ۷ روز گرمخانه گذاری شد. برای تعیین اثر هم‌افزایی از رابطه زیر و بر اساس محاسبه شاخص FICI یا غلظت بازدارنده افتراقی استفاده شد. شاخص FIC در مقادیر کوچک‌تر یا مساوی ۰/۵ نشان‌دهنده اثر سینرژستی، مقادیر ۰/۵ تا ۱ اثر افزایشی، در محدوده ۱/۱ تا ۲ بی‌اثر و در مقادیر بیشتر از ۲

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی

برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) از روش رقت سازی در آگار استفاده شد به این ترتیب که ابتدا حجم‌های مساوی (۱۶ mL) از محیط کشت جامد PDA استریل و پس از خنک شدن تا دمای حدود ۵۰°C، برای تهیه محدوده غلظتی از ۲ تا ۰/۳ درصد (w/v)، با حجم مناسب از هر کدام از اسانس‌ها به‌طور کامل مخلوط و بلافاصله در پلیت های ۸cm پخش گردید. پلیت‌ها بعد از جامد شدن کامل آگار و مسدود شدن با پارافیلیم تا زمان تلقیح در دمای یخچال نگهداری شدند. در مرحله تلقیح، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپوری قارچ موردنظر، به هر پلیت اضافه‌شده و در دمای ۲۸°C به مدت ۷ روز گرمخانه گذاری شدند. آزمون‌های مشابه برای کنترل مثبت (محیط کشت و سوسپانسیون قارچی) و کنترل منفی (محیط کشت و اسانس) صورت گرفت. بعد از گرمخانه گذاری، اولین پلیت حاوی کم‌ترین غلظت اسانس که فاقد رشد قارچی بود به‌عنوان حداقل غلظت بازدارنده در نظر گرفته شد (اندروس ۲۰۰۱).

تعیین اثر هم‌افزایی اسانس‌ها به روش چکر برد آزمون‌های مربوط به تعیین اثر هم‌افزایی اسانس‌های گیاهی با استفاده از روش رقت سازی مایع و بر اساس استاندارد M_{۲۸} موسسه استانداردهای آزمایشگاهی و کلینیکی (CLSI) انجام شد (رکس و همکاران ۲۰۰۸). در این استاندارد از محیط ۱۶۴۰ rpmi حاوی گلوتامین و فاقد بیکربنات که با MOPS در pH= ۷ بافری شده است، استفاده شد. در این آزمایش از رقت سازی ۲ بعدی میکروپلیت ۹۶ خانه استفاده گردید به این صورت که حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس‌ها به‌عنوان غلظت مبنا انتخاب و اقدام به رقت سازی ترکیب‌های ۲ تایی اسانس در یک محدوده غلظتی (از ۲ برابر تا ۱۵ درصد غلظت مبنا) به‌صورت عمودی و افقی در محیط ۱۶۴۰ rpmi گردید به این صورت گرادیان غلظتی از ۲ اسانس در هر

^۱Fractional Inhibitory Concentration Index

^۲Minimum Inhibitory Concentration

^۳3-Morpholinopropane-1-sulfonic acid

استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام گردید.

نتایج و بحث

ترکیب شیمیایی اسانس‌ها

همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود از مهم‌ترین ترکیبات اسانس آویشن شیرازی می‌توان به تیمول (۳۹٪/۱۴)، کارواکرول (۲۶٪/۶۱) و در مورد اسانس دارچین نیز به سینامالدهید (۴۴٪/۲۵)، سینامالدهید پروپیل گلیکول استال (۲۵٪/۷) و فن سوکسیماید (۱۷٪/۳۷) اشاره کرد. در عین حال در اسانس رزماری آلفاپینن (۲۸٪/۴) و ۱-۸-سینئول (۱۳٪/۲۷) و در اسانس مرزنجوش، ترپینن-۴-ال (۳۳٪/۸۴) و گاما ترپینن (۱۶٪/۷۶) ترکیبات عمده را تشکیل می‌دهند.

حداقل غلظت مهارکنندگی

بر اساس نتایج بدست آمده (جدول ۲)، اسانس آویشن با حداقل غلظت مهارکنندگی $625 \mu\text{g/mL}$ برای بوتریتیس سینه‌رآ و $1250 \mu\text{g/mL}$ برای قارچ‌های پنی‌سیلیوم اکسپانسونم و آلترناریا آلترناتا دارای بیشترین اثر مهارکنندگی در مقایسه با سایر اسانس‌های گیاهی می‌باشد. بعد از آویشن، بیشترین فعالیت ضد قارچی مربوط به اسانس دارچین با $\text{MIC}=1250 \mu\text{g/mL}$ بر علیه ۲ قارچ بوتریتیس سینه‌رآ و آلترناریا آلترناتا و $2500 \mu\text{g/mL}$ بر علیه پنی‌سیلیوم اکسپانسونم است. کمترین اثر ضد قارچی نیز مربوط به اسانس‌های رزماری و مرزنجوش به ترتیب با $\text{MIC}=2500 \mu\text{g/mL}$ و $\text{MIC}=5000 \mu\text{g/mL}$ ، برای بوتریتیس سینه‌رآ و $\text{MIC}=10000 \mu\text{g/mL}$ برای قارچ‌های پنی‌سیلیوم اکسپانسونم و آلترناریا آلترناتا می‌باشد. به طور کلی اثر مهارکنندگی غلظت‌های مشخص از اسانس‌های مذکور بر روی بوتریتیس سینه‌رآ نسبت به پنی‌سیلیوم اکسپانسونم و آلترناریا آلترناتا بیشتر است.

به‌عنوان اثر آنتاگونیستی بین اسانس‌ها در نظر گرفته شد.

$$\text{SumFIC}_{BC} = \frac{\text{MIC}_B \text{ in combination}}{\text{MIC}_B \text{ alone}} + \frac{\text{MIC}_C \text{ in combination}}{\text{MIC}_C \text{ alone}}$$

Sum FIC_{BC}: مجموع غلظت بازدارندگی اسانس‌های B و C

MIC_B: حداقل غلظت بازدارندگی اسانس B

MIC_C: حداقل غلظت بازدارندگی اسانس C

بررسی اثر ضد قارچی اسانس‌های گیاهی در سیب

سیب زرد (گلدن دلشیز) از بازار مرکزی میوه و سبزی تهران خریداری گردید. میوه‌های هم اندازه و سالم برای انجام آزمایشات موردنظر انتخاب شدند. سپس سیب‌های جدا شده با استفاده از غوطه‌وری در هیپوکلریت سدیم ۱ درصد به مدت ۲ دقیقه ضد عفونی و سپس با مقدار کافی از آب استریل شستشو گردیدند. میوه‌های شسته شده زیر هود، خشک شده و با استفاده از یک میخ استریل، زخمی به قطر ۳ و عمق ۴ میلی‌متر در پوست ناحیه مرکزی آن‌ها ایجاد گردید. در مرحله بعد ۱۰ میکرولیتر از تیمارهای منتخب (اسانس‌های تکی و ۲ تایی) به زخم انتقال و بعد از حدود ۱ ساعت، هر سیب توسط ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپوری (5×10^6) تلقیح شد. میوه‌های تلقیح شده در بسته‌های پلی‌اتیلنی بسته‌بندی و در دمای اتاق و شرایط رطوبتی مناسب نگهداری شدند. اندازه قطر ضایعه ایجاد شده توسط قارچ‌ها در روزهای ۵ و ۱۰ ثبت و از سیب‌های فقط تلقیح شده با اسپور به عنوان تیمار شاهد استفاده گردید. برای هر تیمار ۳ تکرار در نظر گرفته شد و آزمایش مربوطه ۲ بار در شرایط یکسان تکرار گردید.

تحلیل آماری

برای تمام آزمایش‌ها ۳ تکرار در نظر گرفته شد و میانگین داده‌های به دست آمده، به عنوان نتایج MIC و FIC گزارش شد. نتایج حاصل با استفاده از نرم‌افزار SPSS مورد تجزیه آماری قرار گرفت و مقایسه میانگین‌ها با

جدول ۱- ترکیبات اصلی اسانس‌های گیاهی آویشن، دارچین، رزماری و مرزنجوش برحسب درصد

Table1- Main constituents (%) of the essential oils of thyme, cinnamon, rosemary and marjoram as identified by GC/MS analysis

Compounds	<i>Thymus vulgaris</i> thyme	<i>Cinnamom zeylanicum</i> cinnamon	<i>Rosemarinu sofficinalis</i> rosemary	<i>Origanum majorana</i> marjoram
α -Pinene	3.34	-	28.04	-
Para-Cymen	7.88	-	-	2.45
γ -Terpinene	6.57	-	-	16.76
Thymol	39.14	-	-	-
Carvacrol	26.61	-	-	-
Cinnamaldehyde	-	44.25	-	-
Cinnamaldehyde propylene glycol acetal	-	25.07	-	-
Phensuximide	-	17.37	-	-
Camphene	-	-	7.01	-
Myrecene	-	-	4.20	-
Limonene	-	-	4.10	-
1.8-cineole	-	-	13.27	-
Linalool	-	-	2.72	2.42
Camphor	-	-	8.06	-
Borneol	-	-	7.18	-
α -Terpineol	-	-	2.06	4.44
Verbenone	-	-	6.76	-
Isobornyl acetate	-	-	2.87	-
Sabinene	-	-	-	3.89
α -terpinene	-	-	-	10.08
Terpinolene	-	-	-	3.76
Terpinene-4-ol	-	-	-	33.84

جدول ۲- شاخص حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس‌های گیاهی در مقابل بوتریتیس سینه‌رآ، پنی‌سیلیوم اکسپانسونوم و

آلترناریا آلترناتا

Table 2 Antifungal activity of tested essential oils against *B. cinerea*, *P. expansum* and *A.alternata*

Fungal strain	MIC* of Essential oils ($\mu\text{g/mL}$)			
	Thyme	Cinnamon	Rosemary	Marjoram
<i>B.cinerea</i>	625	1250	2500	5000
<i>P. expansum</i>	1250	2500	10000	10000
<i>A.alternata</i>	1250	1250	10000	10000

MIC: minimum inhibitory concentration

آویشن - دارچین با $FICI=0/5$ بر روی بوتریتیس سینه‌رآ دارای اثر هم‌افزایی بوده، ترکیب‌های آویشن - مرزنجوش و دارچین - مرزنجوش دارای اثر افزایشی و ترکیب‌های دارچین - رزماری و مرزنجوش - رزماری فاقد اثر هم‌افزایی یا افزایشی می‌باشند. در مورد مهار رشد *آلترناریا آلترناتا*، بیشترین اثر هم‌افزایی مربوط به ترکیب‌های آویشن - دارچین با $FICI = 0/375$ و آویشن - رزماری ($FICI = 0/5$) بود و ترکیب‌های ۲ تایی آویشن - مرزنجوش، دارچین - رزماری و دارچین - مرزنجوش دارای اثر افزایشی بوده و ترکیب رزماری - مرزنجوش فاقد اثر هم‌افزایی یا افزایشی بر روی قارچ مولد فساد بودند. همچنین ترکیب‌های اسانسی دارچین - مرزنجوش ($FICI=0/5$) و آویشن - دارچین ($FICI=0/25$) دارای اثر هم‌افزایی بر روی پنی‌سیلیوم *اکسپانسوم* بوده و ترکیب‌های آویشن - مرزنجوش و دارچین - رزماری اثر افزایشی و ترکیب‌های آویشن - رزماری و رزماری - مرزنجوش فاقد اثر بر روی این قارچ تشخیص داده شدند. در مورد اثر هم‌افزایی ترکیب‌های اسانسی در مهار رشد میکروارگانیسم‌ها بیشتر مطالعات بر روی باکتری‌های پاتوژن و مولد فساد صورت گرفته است (باسول و همکاران ۲۰۱۲؛ گوتیرز و همکاران ۲۰۰۸؛ سانیتستان و همکاران ۲۰۰۷) و تحقیقات کمتری در مورد اثر ضد قارچی اسانس‌های قارچی به صورت ترکیبی انجام شده است (نئوفاک و همکاران ۲۰۱۲؛ کروز و همکاران ۲۰۰۹).

تاکنون مطالعات مختلفی در خصوص اثر مهارکنندگی اسانس‌های گیاهی به خصوص آویشن و دارچین بر علیه قارچ‌های پاتوژن صورت گرفته است (محمدی و همکاران ۲۰۱۶؛ زینگ و همکاران ۲۰۱۰؛ ویدوا و همکاران ۲۰۰۷) در مطالعات مذکور تأکید شده است که وجود مقادیر قابل توجه از ترکیبات فنلی و آلدئیدی به خصوص تیمول، کارواکرول و سینامالدهید در اسانس‌های گیاهی نقش بسیار مهمی در فعالیت ضد میکروبی و ضد قارچی آن‌ها دارد.

در حالی که اسانس‌هایی که عمدتاً حاوی ترکیبات استری و کتونی هستند فعالیت ضد میکروبی ضعیف‌تر و اسانس‌های حاوی مقادیر بالا از ترکیباتی مثل هیدروکربن‌های ترپن دار فاقد فعالیت ضد میکروبی می‌باشند (ایت اوزو همکاران ۲۰۱۱؛ تاج کریمی و همکاران ۲۰۱۰؛ دی باروس و همکاران ۲۰۰۹). در این مطالعه، همان طور که انتظار می‌رفت مونوترپن‌های فنلی (تایمول و کارواکرول) موجود در اسانس آویشن و مشتقات آلدئیدی (سینامالدهید و سینامالدهید پروپیلن گلیکول استال) موجود در دارچین مؤثرترین ترکیبات ضد قارچی اسانس‌های گیاهی می‌باشند. همچنین برخی دیگر از ترکیبات مثل آلفا پینن، ۱ و ۸ سینئول و گاما ترپینن نیز که عمدتاً در اسانس‌های رزماری و مرزنجوش وجود دارند دارای اثر ضد قارچی متوسط و ضعیف می‌باشند.

تعیین اثر هم‌افزایی ترکیب‌های اسانسی

با مقایسه شاخص $FICI$ یا حداقل غلظت بازدارنده افتراقی (جدول ۳، ۴ و ۵) مشخص شد که در بین ترکیب‌های ۲ تایی اسانس‌ها، آویشن - رزماری و

جدول ۳- شاخص حداقل غلظت مهارکنندگی تلفیقی ($FICI^a$) ترکیب‌های ۲ تایی اسانس گیاهی روی قارچ بوتریتیس سینه رآ

Table 3- $FICI^a$ and interaction effects of double combinations of essential oils on the *Botrytis cinerea*

Combination of Two essential oils (A / B)	MIC A (Alone)	MIC B (Alone)	MIC A (in the presence of B)	MIC B (in the presence of A)	Checkerboard FIC Index
Thyme/Rosemary	625	2500	156	625	0.5
Thyme /Marjoram	625	5000	312	2500	1
Cinnamon/ Rosemary	1250	2500	1250	625	1.25
Cinnamon/Marjoram	1250	5000	625	2500	1
Thyme / Cinnamon	625	1250	156	312	0.5
Rosemary / Marjoram	2500	5000	2500	1250	1.25

^a Abbreviations: FIC, Fractional Inhibitory Concentration; and MIC, Minimum Inhibitory Concentrations.

* $FICI \leq 0.5$: synergic effect; $0.5 < FICI \leq 1$: additive effect; $1 < FICI \leq 4$: no interactive effect; $FICI > 4$: antagonistic effect

.*Results expressed as $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$.

جدول ۴- شاخص حداقل غلظت مهارکنندگی تلفیقی (FICI^a) ترکیب‌های ۲ تایی اسانس‌های گیاهی بر قارچ *Alternaria alternata*Table 4- FICI^a and interaction effects of double combinations of essential oils on the *Alternaria alternata*

Combination of Two essential oils (A / B)	MIC A (Alone)	MIC B (Alone)	MIC A (in the presence of B)	MIC B (in the presence of A)	Checkerboard FIC Index
Thyme/Rosemary	1250	10000	312	2500	0.5
Thyme /Marjoram	1250	10000	625	2500	0.75
Cinnamon/ Rosemary	1250	10000	312	5000	0.75
Cinnamon/Marjoram	1250	10000	625	5000	1
Thyme / Cinnamon	1250	1250	312	156	0.375
Rosemary / Marjoram	10000	10000	10000	2500	1.25

^a Abbreviations: FIC, Fractional Inhibitory Concentration; and MIC, Minimum Inhibitory Concentrations.

*FICI \leq 0.5: synergic effect; 0.5<FICI \leq 1: additive effect; 1<FICI \leq 4: no interactive effect; FICI>4: antagonistic effect

. *Results expressed as $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

جدول ۵- شاخص حداقل غلظت مهارکنندگی تلفیقی (FICI^a) ترکیب‌های ۲ تایی اسانس گیاهی روی قارچ *penicillium expansum* / اکسیپانسونمTable 5- FICI^a and interaction effects of double combinations of essential oils on the *penicillium expansum*

Combination of Two essential oils (A / B)	MIC A (Alone)	MIC B (Alone)	MIC A (in the presence of B)	MIC B (in the presence of A)	Checkerboard FIC Index
Thyme/Rosemary	1250	10000	1250	10000	2
Thyme /Marjoram	1250	10000	625	5000	1
Cinnamon/ Rosemary	2500	10000	1250	2500	0.75
Cinnamon/Marjoram	2500	10000	625	2500	0.5
Thyme / Cinnamon	1250	2500	156	312	0.25
Rosemary / Marjoram	10000	10000	10000	10000	2

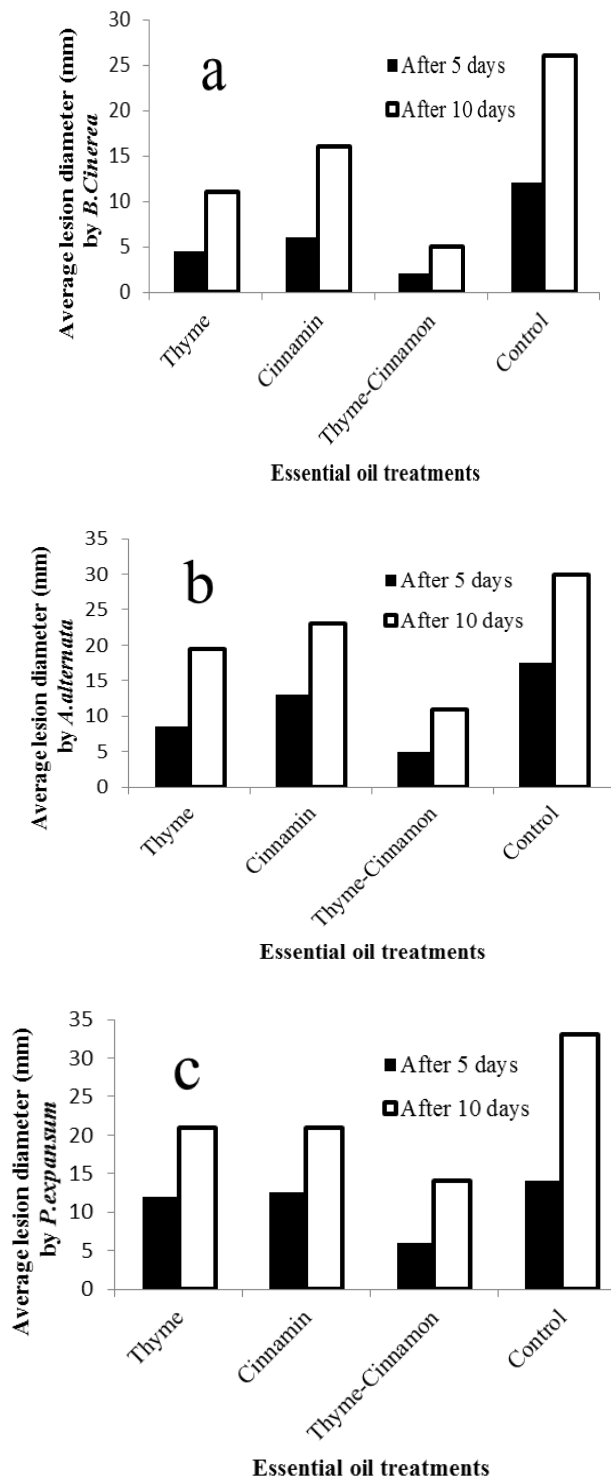
^a Abbreviations: FIC, Fractional Inhibitory Concentration; and MIC, Minimum Inhibitory Concentrations.

*FICI \leq 0.5: synergic effect; 0.5<FICI \leq 1: additive effect; 1<FICI \leq 4: no interactive effect; FICI>4: antagonistic effect

. *Results expressed as $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

اصلی اسانس، ترپن الکل‌ها و ترپن اکسایدها (مثل ۸و۱ سینئول) می‌باشد به‌مراتب اثرات ضد قارچی کمتری نسبت به فنل‌ها و آلدئیدها بروز می‌دهند. ترکیبات اصلی اسانس مرزنجوش نیز معمولاً ترپن الکل‌ها و ترپن هیدروکربن‌ها هستند که اثرات ضد قارچی ضعیف‌تری دارند و به همین دلیل استفاده از اسانس‌های رزماری و مرزنجوش به‌صورت ترکیب باهم معمولاً فاقد اثر ضد قارچی به‌صورت هم‌افزایی یا افزایشی می‌باشد. وجود اثرات هم‌افزایی بین ترکیب‌های این اسانس‌ها با ۲ اسانس دیگر (آویشن، دارچین) را می‌توان به اثرات متقابل بین ترکیبات اصلی و جزئی اسانس‌ها با یکدیگر و مکانیسم‌های ضد قارچی متفاوت آن‌ها ارتباط داد. به نظر می‌رسد استفاده ترکیبی از دو یا چند اسانس گیاهی به واسطه حضور ترکیبات مؤثر و فعال یک اسانس در کنار ترکیبات موجود در اسانس یا اسانس‌های دیگر که معمولاً به‌تنهایی دارای فعالیت ضد میکروبی محدودی می‌باشند، می‌تواند باعث تشدید فعالیت ضد میکروبی آن‌ها گردند (باسول و همکاران ۲۰۱۲؛ حسین و همکاران ۲۰۱۶).

استیویک و همکاران (۲۰۱۴)، اثر هم‌افزایی ترکیب اسانسی مرزنجوش و آویشن را بر روی گونه‌های *آسپرژیلوس فلاووس*، *آسپرژیلوس نایجر* و برخی از گونه‌های جنس فوزاریوم گزارش کردند. اثر هم‌افزایی مشابهی نیز به‌واسطه وجود ترکیبات مؤثر تایمول و کارواکرول در مخلوط چند اسانس گیاهی برعلیه قارچ‌های *آسپرژیلوس نایجر*، *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* و *پنی‌سیلیوم کریزوژنوم* گزارش شد (حسین و همکاران ۲۰۱۶). در مطالعه حاضر نیز، نتایج حاصل حاکی از تاثیر مهم ترکیبات جزئی اسانس‌ها در کنار سایر ترکیبات اساسی در القاء اثر هم‌افزایی و افزایشی در مهار رشد قارچ‌های مولد فساد می‌باشد. به‌طورکلی با توجه به این‌که ترکیبات فنلی مونوترپنوئید مثل تایمول و کارواکرول (آویشن) و ترکیبات آلدئیدی مثل سینامالدهید (دارچین) بیشترین نقش را در اثرات ضد قارچی اسانس‌ها دارند و مقدار این ترکیبات به ترتیب در آویشن و دارچین بیشتر است بنابراین استفاده از آن‌ها به‌صورت ترکیبی عمدتاً منجر به ایجاد اثرات افزایشی و هم‌افزایی می‌گردد در خصوص رزماری، با توجه به این‌که ترکیبات



شکل ۲- اثر مهارکنندگی تیمارهای اسانس گیاهی با معیار متوسط قطر ضایعه حاصل از فعالیت بوتریتیس سینه رآ (a)، آلترناریا آلترناتا (b) و پنی‌سیلیوم اکسپانسونم (c) در میوه سیب بعد از ۵ و ۱۰ روز نگهداری در دمای ۲۵ °C. تیمارها شامل آویشن (۱۲۵۰ µg/ml)، دارچین (۲۵۰۰ µg/ml) و تیمار ۲ تایی آویشن (۱۵۶ µg/ml) - دارچین (۳۱۲ µg/ml).

Figure 2- Effect of EO treatments on the control of decay caused by *B. cinerea* (a), *A. alternata* (b) and *P. expansum* (c) in artificially wounded apple fruits after 5 and 10 days at 25 °C. Thyme (1250 µg/ml), cinnamon (2500 µg/ml), Thyme/Cinnamon (156, 312 µg/ml)

اثر ضد قارچی اسانس‌های گیاهی در سیب

طبق نتایج حاصل از آزمایشات *In vivo* ۳ تیمار اسانسی شامل آویشن (۱۲۵۰ µg/mL)، دارچین (۲۵۰۰ µg/mL) و ترکیب ۲ تایی آویشن (۱۵۶ µg/mL) - دارچین (۳۱۲ µg/mL) برای آزمایشات *In vivo* انتخاب گردید. همان طور که در شکل‌های ۱، ۲ و ۳ قابل مشاهده است. تیمار ۲ تایی آویشن-دارچین اثر مهارکنندگی بیشتری نسبت به تیمارهای تکی این اسانس‌ها دارد و بیشترین اثر مهارکنندگی آن به ترتیب بر روی بوتریتیس سینه رآ (قطر ضایعه ۵ میلی‌متر)، آلترناریا آلترناتا (قطر ضایعه ۱۱ میلی‌متر) و پنی‌سیلیوم اکسپانسونوم (قطر ضایعه ۱۴ میلی‌متر) در روز ۱۰ و در دمای ۲۵°C می باشد (شکل ۲).

نتیجه گیری کلی

ترکیب‌های ۲ تایی آویشن - رزماری و آویشن - دارچین بر علیه قارچ های مولد فساد بوتریتیس سینه رآ و آلترناریا آلترناتا و ترکیب‌های ۲ تایی دارچین - مرزنجوش و آویشن - دارچین بر علیه رشد پنی‌سیلیوم اکسپانسونوم اثرات هم‌افزایی نشان دادند. همچنین نتایج حاصل از آزمایشات *invivo* اثرات هم‌افزایی ترکیب اسانس آویشن - دارچین در مهار رشد هر ۳ قارچ مولد فساد در میوه سیب را به خوبی مشخص کرد و بیشترین اثر مهارکنندگی تیمار ۲ تایی آویشن-دارچین نیز به ترتیب بر روی قارچ های بوتریتیس سینه رآ ، آلترناریا آلترناتا و پنی‌سیلیوم اکسپانسونوم مشاهده شد.

منابع مورد استفاده

بی نام، ۱۳۹۴. آمارنامه محصولات باغی ایران. اداره کل آمار و اطلاعات کشاورزی

- Adam R.P, 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4th Edition Allured Publishing Corporation.
- Ait-Ouazzou A, Cherrat L, Espina L, Lorán S, Rota C and Pagán R, 2011. The antimicrobial activity of hydrophobic essential oil constituents acting alone or in combined processes of food preservation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 12:320-329.
- Andrews JM, 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of antimicrobial Chemotherapy*, 48:5-16.
- Bassolé IHN and Juliani HR, 2012. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*, 17: 3989-4006.
- Cruz-Vega D, Verde-Star MJ, Salinas-Gonzalez NR, Rosales-Hernandez B, Estrada-Garcia I, Mendez-Aragon P, Carranza-Rosales P, Gonzalez-Garza M and Castro-Garza J, 2009. Review of pharmacological effects of *Glycyrrhiza radix* and its bioactive compounds. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 22:557-559.
- de Barros JC, Conceição ML, Neto NJG, da Costa A.C.V, Siqueira JP, Basílio ID and de Souza EL, 2009. Interference of *Origanum vulgare* L. essential oil on the growth and some physiological characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. *LWT-Food Science and Technology*, 42:1139-1143.
- Gutierrez J, Barry-Ryan C and Bourke P, 2008. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International journal of food microbiology* 124: 91-97.
- Hossain F, Follett P, Vu KD, Harich M, Salmieri S and Lacroix M, 2016. Evidence for synergistic activity of plant-derived essential oils against fungal pathogens of food. *Food microbiology*, 53:24-30.
- Hylgaard M, Mygind T and Meyer R.L, 2012. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in microbiology* 3 (12): 1-24.
- Mari M, Di Francesco A and Bertolini P, 2014. Control of fruit postharvest diseases: old issues and innovative approaches. *Stewart Postharvest Review*, 10: 1-4.
- Mohammadi A, Hashemi M and Hosseini SM, 2016. Postharvest treatment of nanochitosan-based coating loaded with *Zataria multiflora* essential oil improves antioxidant activity and extends shelf-life of cucumber. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 33:580-588.

- Nguefack J, Tamgue O, Dongmo JL, Dakole CD, Leth V, Vismer HF, Zollo PA and Nkengfack AE, 2012. Synergistic action between fractions of essential oils from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against *Penicillium expansum*. *Food Control*, 23:377-383.
- Rex JH, 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi: approved standard. Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Romanazzi G, Lichter A, Gabler F.M and Smilanick J.L, 2012. Recent advances on the use of natural and safe alternatives to conventional methods to control postharvest gray mold of table grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 63:141-147.
- Santiesteban-López A, Palou E and López-Malo A, 2007. Susceptibility of food-borne bacteria to binary combinations of antimicrobials at selected aw and pH. *Journal of applied microbiology*, 102: 486-497.
- Stević T, Berić T, Šavikin K, Soković M, Gođevac D, Dimkić I and Stanković S, 2014. Antifungal activity of selected essential oils against fungi isolated from medicinal plant. *Industrial Crops and Products*, 55:116-122.
- Tajkarimi MM, Ibrahim SA and Cliver DO, 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food control*, 21:1199-1218.
- Teixeira B, Marques A, Ramos C, Serrano C, Matos O, Neng NR, Nogueira JM, Saraiva JA and Nunes ML, 2013. Chemical composition and bioactivity of different oregano (*Origanum vulgare*) extracts and essential oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93:2707-2714.
- Tejeswini MG, Sowmya HV, Swarnalatha SP and Negi PS. 2014. Antifungal activity of essential oils and their combinations in in vitro and in vivo conditions. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 37:564-570.
- Viuda-Martos M, Ruiz-navajas Y, Fernandez-Lopez J and Perez-alvarez JA, 2007. Antifungal activities of thyme, clove and oregano essential oils. *Journal of Food Safety*, 27:91-101.
- Wagner H, 2011. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Fitoterapia* 82, 34-37.
- Xing Y, Li X, Xu Q, Yun, J. and Lu Y, 2010. Antifungal activities of cinnamon oil against *Rhizopus nigricans*, *Aspergillus flavus* and *Penicillium expansum* in vitro and in vivo fruit test. *International journal of food science & technology* 45:1837-1842.

Antifungal activity and synergistic effects of thyme, cinnamon, rosemary and marjoram essential oils in combination, against apple rot fungi

M Nikkhah¹, MB Habibi Najafi^{2*}, M Hashemi³ and R Farhoosh²

Received: August 22, 2017

Accepted: January 23, 2018

¹PhD Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

²Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

³Associate Professor, Microbial Biotechnology Department, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), AREEO, Karaj, Iran

*Corresponding author: Email: habibi@um.ac.ir

Introduction: The complex composition of the essential oils and the variety of chemical structures of their constituents are responsible of a wide range of biological activities many of which are of increasing interest in the field of foodstuff preservation (Romanazzi et al. 2012). Regarding that higher amount of EOs are required for food preservation, their application can negatively influence taste or odor. To avoid this unwanted side effect, several EOs can be combined. On the other hand the synergistic possible effect produced by the combination of plant essential oils was referred as an efficient strategy to combat microbial development (Wagner. 2011). The main purpose of this study was to evaluate the antifungal synergistic effect of combination of some essential oils including thyme, cinnamon, rosemary and marjoram against apple rot fungi during postharvest storage.

Material and methods: In this experiment, chemical composition of the essential oils was analyzed by gas chromatography. For evaluation of antifungal activity based on MIC, against *Alternaria alternata*, *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea*, an agar dilution method was used. EOs interactions were assessed using a checkerboard microdilution method. The evaluated concentrations were in the range of 5 dilutions below the MIC to twice the MIC. For the double combinations, a two-dimensional checkerboard with twofold dilutions of each EOs was used (six double combinations).

Results and discussion: The maximum antifungal activity was demonstrated by thyme oil which showed MIC values 1250 µg/mL for *A. alternata* and *P. expansum* and 625 µg/mL for *B. cinerea*. Cinnamon oil with MIC values 1250 µg/mL against *A. alternata* and *B. cinerea* and 2500 µg/mL against *P. expansum* displayed more inhibitory effects than rosemary and marjoram essential oils. In antifungal synergy testing, some double combinations (thyme/rosemary, thyme/cinnamon and cinnamon/marjoram) were found to be synergistic (FIC_i ≤ 0.5). The *in vivo* assay also demonstrated considerable inhibitory effects of EO combination treatments. Results from artificial wounding of treated apple indicated that double combination of thyme/cinnamon (156, 312 µg/mL) has more inhibitory effect than single EO treatments. Although the major components of thyme and cinnamon (especially thymol, carvacrol and cinnamaldehyde) are very important for their antifungal activity, other less-active compounds in rosemary and marjoram (such as α-Pinene, 1.8-cineole, Terpinene-4-ol and γ-Terpinene) play a significant role, as they can strengthen the effects of major components, though synergistic effects have also been observed.

Key words: Essential oils, Synergistic effects, fungal growth inhibition, Fractional inhibitory concentration