Original Article

Comparing the in vitro antifungal activity of various *Aloe vera* leaf extracts on *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin B1 production

Babaei A[1*], Tavafi H[1], Manafi M[2], Fahimifar A[3]

1- Department of Biology, Faculty of Sciences, Malayer University, Malayer, I. R. Iran.
2- Department of Animal Sciences, Faculty of Natural Sources, Malayer University, Malayer, I. R. Iran.
3- Faculty of Psychology and Education, Allameh Tabatabaei University, Tehran, I. R. Iran.

Received August 18, 2012; Accepted October 31, 2013

Abstract:

Background: Due to the wide spread of *Aspergillus flavus* contamination on the food stuff, its complete growth inhibition is inevitable. *Aloe vera* has anti-microbial compounds that have significant antifungal and antibacterial activities. The aim of this study was to compare the antifungal activity of acetonic, ethanolic and aqueous extracts of *Aloe vera* on *A. flavus* growth and aflatoxin B1 production.

Materials and Methods: In this study, the antifungal activity of acetonic, ethanolic, and aqueous extracts of *Aloe vera* was evaluated using the agar plate diffusion method. Extracts were tested at different concentrations (0, 10^2, 10^3, 10^4 and 10^5 microliters /liter). To evaluate the effect of the extract on aflatoxin B1 production, the acetonic extract of *Aloe vera* was used and the amount of toxin produced was measured using the HPLC method.

Results: The maximum antifungal activity (100%) was observed in 10^5 microliters /liter of acetonic extract. The inhibition percentages of aflatoxin B1 production at 2,000 and 2 microlitters /liter concentrations in 50 ml of culture medium were 40.94% and 18.14%, respectively.

Conclusion: The acetonic extract of *Aloe vera* can be more effective than the other solvents to prevent *A. flavus* growth and it can also reduce the production of aflatoxin B1by *A. flavus*.

Keywords: *Aspergillus flavus,* Aflatoxin B1, Antifungal activity, *Aloe vera,* HPLC

* **Corresponding Author.**
Email: arash_babaei@yahoo.com
Tel: 0098 918 851 2622
Fax: 0098 851 235 5404

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences January, 2014; Vol. 17, No 6, Pages 537-544

Please cite this article as: Babaei A, Tavafi H, Manafi M, Fahimifar A. Comparing the in vitro antifungal activity of various *Aloe vera* leaf extracts on *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin B1 production. ***Feyz*** 2014; 17(6): 537-44.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-06]

مقایسه فعالیت ضد قارچی عصاره‌های مختلف برگ گیاه صبر زرد بر میزان رشد قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* و تولید آفلاتوکسین B_1 در شرایط آزمایشگاهی

آرش بابایی [*1]، حدیث طوافی [2]، میلاد منافی [3]، آمنه فهیمی‌فر [4]

خلاصه:

سابقه و هدف: با توجه به آلودگی وسیع قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* بر مواد غذایی، مهار کامل رشد آن اجتناب ناپذیر است. گیاه صبر زرد به‌دلیل دارا بودن ترکیب‌های ضد میکروبی، فعالیت‌های ضد قارچی و ضد باکتریایی را نشان می‌دهد. هدف از این مطالعه، مقایسه فعالیت ضد قارچی عصاره‌های استونی، اتانولی، متانولی و آبی گیاه صبر زرد بر رشد *آسپرژیلوس فلاووس* و ارزیابی اثر عصاره بر میزان تولید آفلاتوکسین B1 می‌باشد.

مواد و روش‌ها: فعالیت ضد قارچی عصاره‌های استونی، اتانولی، متانولی و آبی گیاه صبر زرد به‌روش Agar Plate Diffusion بررسی شد. عصاره‌ها در غلظت‌های ۰، 10^2، 10^3، 10^4 و 10^5 میکرولیتر بر لیتر مورد آزمایش قرار گرفتند. به‌منظور ارزیابی اثر عصاره بر میزان تولید آفلاتوکسین B1، از عصاره‌ی استونی استفاده گردید و به‌کمک روش HPLC میزان سم تولیدی اندازه‌گیری شد.

نتایج: بیشترین فعالیت ضد قارچی (۱۰۰ درصد)، در غلظت 10^5 میکرولیتر بر لیتر عصاره استونی دیده شد. میزان مهار تولید آفلاتوکسین در غلظت ۲۰۰۰ میکرولیتر بر ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت، ۴۰/۹۴ درصد و در غلظت ۲ میکرو لیتر بر ۵۰ میلی‌لیتر، ۱۸/۱۴ درصد گزارش شد.

نتیجه‌گیری: عصاره‌ی استونی گیاه صبر زرد می‌تواند به‌عنوان عامل ضد قارچی موثرتری بر مهار رشد *آسپرژیلوس فلاووس* نسبت به حلال‌های دیگر باشد. هم‌چنین، این عصاره باعث کاهش تولید آفلاتوکسین B_1 توسط قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* می‌شود.

واژگان کلیدی: *آسپرژیلوس فلاووس*، آفلاتوکسین B_1، فعالیت ضد قارچی، گیاه صبر زرد، HPLC

دو ماه‌نامه علمی– پژوهشی فیض، دوره هفدهم، شماره ٦، بهمن و اسفند ۱۳۹۲، صفحات ٥٤٤-٥٣٧

مقدمه

گیاهان دارویی به‌دلیل تولید برخی از متابولیت‌های ثانویه معمولا به‌عنوان منبع غنی از عوامل ضد میکروبی محسوب می‌شوند که می‌توان از آنها به‌عنوان داروهای ضد میکروبی استفاده کرد [۲،۱]. صبر زرد، گیاهی است از خانواده‌ی لاله (*Liliaceae*)، که دارای برگ‌های ضخیم، آبدار و درشت می‌باشد و حاشیه و وسط برگ‌ها را ژلی شفاف با ویسکوزیته‌ی بالا پر کرده است [۳]. گیاه صبر زرد شامل ترکیب‌های متنوعی از جمله ترکیب‌های فنولی، ساپونین‌ها و آنتروکوئینون‌ها می‌باشد. این ترکیب‌ها از جمله عوامل ضد عفونی کننده به‌شمار می‌آیند و دارای فعالیت‌های ضد باکتریایی، ضد ویروسی و ضد قارچی می‌باشند [٤].

قارچ‌ها از جمله میکروارگانیسم‌های دخیل در فساد مواد غذایی (به‌خصوص مواد غذایی انباری) هستند و باعث کاهش ارزش مواد غذایی می‌شوند. از جمله قارچ‌هایی که به‌صورت غالب بر روی محصولات انباری رشد می‌کنند، گونه‌های مختلف جنس *آسپرژیلوس*، *فوزاریوم* و *پنیسیلیوم*‌ها هستند [٥]. *آسپرژیلوس فلاووس* (*Aspergillus flavus*) و *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* (*Aspergillus parasiticus*) از جمله قارچ‌های رشته‌ای هستند که دارای توزیع جهانی‌اند و بر روی انواع زیادی از مواد آلی فاسد شدنی یافت می‌شوند. قارچ‌های نام برده متابولیت ثانویه سمی و کارسینوژنی به‌نام آفلاتوکسین تولید می‌کنند که برای سلامتی انسان و حیوان مضر است [٦]. بنابراین، این نگرانی سبب شده است که محدودیت‌های تنظیمی بر روی رشد این قارچ‌ها و به‌مراتب بر تولید آفلاتوکسین توسط آنها اتخاذ شود. آفلاتوکسین‌ها متابولیت‌های ثانویه‌ی پلی کتیدالی هستند که به‌طور عمده توسط سویه‌های توکسین‌زای *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* تولید می‌شوند [۸،۷]. مصرف مواد غذایی آلوده به آفلاتوکسین‌ها باعث بیماری‌های حاد و یا مزمن مانند سرطان کبد می‌شوند و اگر در مقادیر بسیار مصرف شوند، منجر به مرگ می‌گردند [۹]. در میان ۱۸ نوع آفلاتوکسین تولید شده توسط قارچ‌ها آفلاتوکسین B1 بیشتر از سایر مایکوتوکسین‌ها مورد توجه قرار

[1] استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه ملایر

[2] دانشجوی دکتری میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه ملایر

[3] استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده منابع محیط زیست، دانشگاه ملایر

[4] کارشناس ارشد مشاور خانواده، دانشکده روانشناسی و علوم تربیتی، دانشگاه علامه طباطبایی

*** نشانی نویسنده مسئول:**

ملایر، دانشگاه ملایر، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی

تلفن: ۰۹۱۸ ۸۵۱۲۶۲۲ **دورنویس:** ۰۸۵۱ ۲۳۵۵۴۰۴

پست الکترونیک: arash_babaei@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۱/۵/۲۸ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۹۱/۸/۱۰

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-06]

می‌گیرد [۱۱،۱۰]. از جمله راه‌های موثر برای کنترل مشکلات ناشی از آفلاتوکسین‌ها جلوگیری از رشد قارچ‌ها بر روی سوبستراها می‌باشد [۱۲]. عصاره‌ها و پودرهای انواع مختلف گیاهان دارویی و روغن‌های اسانس استخراج شده از آنها دارای فعالیت ضد قارچی هستند و هم‌چنین تعدادی از آنها حتی تشکیل و تولید آفلاتوکسین را نیز مهار می‌کنند [۱۵-۱۳]. Casion و همکارانش با بررسی که بر رشد میسلیوم‌های *هتروسپوریوم پرونتی*، *بوتریتیس گلادیولروم*، *فوزاریوم اکسیزپوریوم و پنی سیلیوم گلادیولی* داشتند، دریافتند که عصاره‌های آبی‌الکلی برگ‌های تازه‌ی صبر زرد اثرات مهارکنندگی قابل ملاحظه‌ای بر رشد این قارچ‌ها دارد [۱۶]. Thanaboripat و همکارانش نیز اثر چندین گیاه دارویی را به‌منظور کنترل رشد *آسپرژیلوس فلاووس* مورد بررسی قرار دادند و نتایج آنها نشان داد که عصاره‌های خام اتانولی برخی از گیاهان دارویی رشد قارچی را مهار می‌کنند [۱۷]. عصاره‌های آبی گیاهانی مانند *Lupinus albus*, *Ammi visnaga* و *Xanthium pungens* باعث مهار رشد میسلیوم‌ها و هم‌چنین مهار تولید آفلاتوکسین در قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* می‌شوند [۱۸]. عصاره‌ی گیاهان *Argemone Mexicana* و *Cyperus rotundus* تولید آفلاتوکسین را از طریق ممانعت رشد قارچ *آسپرژیلوس فلاووس*، مهار می‌کند [۱۹]. آنالیز آفلاتوکسین‌ها بر پایه سه روش TLC، HPLC و ELISA انجام می‌گیرد [۲۰]. TLC روشی قدیمی می‌باشد و در مقایسه با دو روش ذکر شده دارای دقت پایینی می‌باشد. ELISA روشی سریع، ساده و با حساسیت بالا است اما ممکن است نتایج کاذب ارائه دهد. پس بایستی با روش‌های دیگر نیز جهت تائید نتیجه همراه گردد [۲۱]. HPLC روشی شیمیایی است که در مقایسه با ۲ روش دیگر دارای مزایایی می‌باشد. این روش قادر است، میزان ترکیب‌های شیمیایی درون مخلوطی از مواد شیمیایی را آنالیز و تعیین مقدار کند. هم‌چنین، دارای دقت بالایی می‌باشد و به‌عنوان روشی سریع در تشخیص عمل می‌کند [۲۲]. هدف از این مطالعه، بررسی و ارزیابی اثر عصاره‌های استونی، اتانولی، متانولی و آبی گیاه صبر زرد بر میزان ممانعت از رشد قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* بود. هم‌چنین، تاثیر عصاره‌ی مذکور بر میزان تولید آفلاتوکسین B1 به‌وسیله‌ی قارچ به‌روش HPLC نیز مورد آنالیز قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

به‌منظور عصاره گیری از گیاه صبر زرد برگ‌های تازه گیاه خریداری شد و بعد از شستشو توسط آب مقطر به‌منظور ضد عفونی کردن برگ‌ها از اتانول ۷۰ درصد استفاده گردید. سپس، به قطعات کوچکی خرد شدند. قطعات ریز شده‌ی برگ‌ها در دمای ۶۰- ۵۰ درجه‌ی سانتی گراد، به‌مدت ۳ روز قرار داده شدند تا به‌طور کامل خشک شوند. بعد از خشک شدن کامل، برگ‌ها توسط دستگاه آسیاب کن الکتریکی پودر شدند. ۳۰ گرم از مواد گیاهی پودر شده با ۱۰۰ میلی‌لیتر از حلال‌های مختلف (استون، اتانول، آب و متانول) مخلوط کرده و به‌مدت ۷۲ ساعت در دمای اتاق قرار داده شدند. سپس، محتویات گیاهی از کاغذ واتمن شماره‌ی ۱ گذرانده شدند و مواد صاف شده توسط حمام بخار آب در دمای ۷۰ -۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد تبخیر شدند تا خشک شدند. عصاره‌های خشک شده پودر شدند و در حجم‌های مساوی از حلال‌های مربوطه و آب مقطر استریل (۵۰ به۵۰) دوباره حل گردیدند و در دمای ٤ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند تا مورد مطالعه قرار گیرند. در این مطالعه قارچ *Aspergillus flavus* ATCC 5004 از بخش قارچ شناسی انستیتو پاستور ایران تهیه گردید. قارچ بر روی محیط شیب دار Potato Dextrose Agar (PDA) کشت داده شده بود. از قارچ کشت داده شده در آزمایشگاه به‌عنوان ذخیره قارچی استفاده گردید و بر روی محیط PDA به‌مدت ۷ روز در دمای ۲۸ درجه‌ی سانتی‌گراد کشت داده شد. به‌منظور بررسی فعالیت ضد قارچی عصاره‌های استخراج شده توسط حلال‌های مختلف از روش Agar Plate Diffusion استفاده گردید [۲٤]. بدین منظور غلظت‌های ۰، $۱۰^{۲}$، $۱۰^{۳}$، $۱۰^{٤}$ و $۱۰^{٥}$ میکرولیتر بر لیتر (در هر پلیت به‌ترتیب: ۰، ۵، ۵۰، ۵۰۰، ۵۰۰۰ میکرولیتر بر ۵۰ میلی‌لیتر) از عصاره‌ها به محیط کشت PDA مذاب که حرارت آن در داخل پلیت‌ها به ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد رسیده بود اضافه گردید و سپس مخلوط شدند. بعد از جامد شدن محیط‌های کشت پلاک‌هایی از قارچ‌های کشت داده شده از سویه‌های استاندارد (در حدود ابعاد ۰/٤ میلی‌متر) در مرکز هر پلیت به‌صورت نقطه‌ای قرار داده شد و کشت‌ها به‌مدت ۷ روز در دمای ۲۸ درجه‌ی سانتی گراد، انکوبه شدند. برای هر یک از تیمارها ۳ تکرار گذاشته شد. در پایان روز هفتم میزان رشد شعاعی قارچ‌ها بر حسب سانتی‌متر گزارش گردید و میزان مهار رشد قارچی با توجه به فرمول مورد تحلیل قرار گرفت [۱۶]:

درصد مهار =(قطر کلونی کنترل - قطر کلونی تیمار شده/ قطر کلونی کنترل)×۱۰۰

برای ارزیابی و تعیین مقدار آفلاتوکسین B1 حاصل از قارچ، از عصاره استونی گیاه مورد نظر استفاده شد. مقادیر آفلاتوکسین توسط دستگاه HPLC اندازه‌گیری شد. در ابتدا ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* در ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت YES (Yeast Extract Sucrose) مایع که در ارلن‌های

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-06]

جدا تحت تاثیر غلظت‌های ۰، ۲، ۲۰، ۲۰۰ و۲۰۰۰ میکرولیتر بر ۵۰ میلی‌لیتر از عصاره‌ی صبر زرد قرار داشتند، تلقیح شدند و در دمای ۲۸ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت ۷ روز انکوبه گردیدند. از هر کدام از غلظت‌ها ۳ تکرار تهیه شد. بعد از ۷ روز میسیلیوم-های رشد کرده بر سطح محیط کشت خارج شدند و با آب مقطر استریل شستشو داده شدند و به‌منظور بررسی ایندکس رشد قارچی، بعد از خشک شدن وزن شدند. محیط کشت بعد از گذراندن از تنظیف، از کاغذ واتمن شماره‌ی ۱ نیز پاساژ داده شد و برای آنالیز به‌وسیله‌ی HPLC به آزمایشگاه مرجع سنجش آفلاتوکسین فرستاده شد. بعد از پاک‌سازی، نمونه‌ها به‌روش KHA-S001 مطابق با رفرنس موجود در استاندارد ملی ۶۸۷۲ مورد آنالیز قرار گرفتند.

اساس آزمایش

سم موجود در نمونه‌ها بعد از پاک‌سازی از محیط کشت با استفاده از حلال متانول آب (۸:۲) از آزمونه استخراج شد و عصاره به‌دست آمده با حجم مشخصی از آب در بالن ژوژه تا رسیدن به یک غلظت معین رقیق گردید. عصاره رقیق شده از ستون‌های ایمونوافینیتی دارای آنتی‌بادی‌های ویژه آفلاتوکسین-های گروه‌های B عبور داده شد. با عبور عصاره رقیق شده از ستون سم موجود در عصاره (آنتی ژن) به آنتی‌بادی‌های درون ستون متصل می‌گردد. سم متصل شده به آنتی‌بادی در درون ستون توسط عبور متانول از داخل ستون شسته شده و درون ویال جمع‌آوری گردیده و با آب رقیق گردید. تعیین مقدار با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا انجام گرفت.

استخراج

به ۵۰ میلی‌لیتر آزمودنی ۵ گرم کلرور سدیم و ۳۰۰ میلی‌لیتر متانول- آب اضافه گردید و به‌مدت ۳۰ ثانیه تکان داده شد. عصاره استخراجی از نمونه از کاغذ صافی عبور داده شد. هم‌چنین، ۱۰ میلی‌لیتر از عصاره صاف شده با استفاده از کاغذ صافی از جنس فیبر شیشه‌ای عبور داده شد.

آماده‌سازی ستون و تخلیص

مخزن نمونه به ستون ایمونوافینیتی متصل گردید و بعد از اینکه دمای ستون به دمای اتاق نزدیک شد، ۱۰ میلی‌لیتر PBS به مخزن متصل به ستون ریخته شده و اجازه داده شد با سرعت ۲ تا ۳ میلی‌لیتر در دقیقه بدون فشار خارجی از ستون عبور نماید. زمانی که حدود ۰/۵ میلی‌لیتر از PBS در بخش بالای آنتی‌بادی ستون باقی بود، ۶۰ میلی‌لیتر PBS داخل مخزن ریخته شده و ۱۰ میلی‌لیتر از محلول صاف شده شفاف به‌دست آمده را به آن اضافه نموده و محتویات مخزن با یک قاشقک خوب بهم زده شد. عصاره فوق با سرعت ۲ تا ۳ میلی‌لیتر در دقیقه بدون فشار خارجی از ستون عبور داده شد. ستون با ۱۰ میلی‌لیتر آب شسته شده و به‌مدت ۵ تا ۱۰ ثانیه با عبور هوا از ستون به کمک فشار مثبت خشک شد.

تزریق آفلاتوکسین به ستون

ابتدا ۰/۵ میلی‌لیتر متانول به داخل ستون ریخته شد و بدون فشار خارجی و با استفاده از نیروی ثقل از ستون عبور داده شد. محلول خارج شده در یک بالن ژوژه ۳ میلی‌لیتری جمع شد. بعد از یک دقیقه، ۰/۷۵ میلی‌لیتر متانول به ستون منتقل شد. محلول خارج شده از ستون در همان بالن ژوژه اولیه جمع‌آوری شده و محلول باقیمانده در ستون را نیز تحت فشار خارجی در بالن ژوژه جمع نموده و تا نشانه، بالن ژوژه را با آب پر کرده و محلول هم زده شد. محلول شفاف مستقیما در آنالیز HPLC به‌کار گرفته شد. در نهایت مقدار ماده با آشکار ساز فلورسانس تعیین شد.

نتایج

فعالیت ضد قارچی عصاره‌های مختلف صبر زرد بر رشد *آسپرژیلوس فلاووس*

بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق بیشترین اثر مهار کنندگی عصاره گیاه صبر زرد مربوط به عصاره استونی با غلظت 10^5 میکرولیتر (۱۰۰ درصد) و کمترین اثر ضد قارچی متعلق به عصارهی متانولی با غلظت 10^2 میکرولیتر (۶/۲۵ درصد) بود (جدول شماره ۱). نتایج نشان دادند که عصاره‌ی استخراج شده از استون در غلظت 10^5 میکرولیتر مهار رشد ۱۰۰ درصد را برَ قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* نشان داده است و در کمترین غلظت استفاده شده از عصاره‌ی استونی (10^2 میکرو لیتر) مهار رشد ۵۱/۷۲ درصد گزارش شد. ممانعت رشد قارچ در بیشینه غلظت عصاره-های اتانولی، آبی و متانولی به‌ترتیب برابر با ۷۶/۷۲، ۵۸/۳ و ۳۷/۵ درصد و در کمینه غلظت از عصاره‌ها (10^2 میکرو لیتر) به‌ترتیب برابر ۳۵/۳۴، ۲۸/۳۳ و ۶/۲۵ درصد دیده شد. (جدول شماره ۱ و نمودارهای شماره ۱ و ۲).

اثر عصاره‌ی استونی صبر زرد بر تولید آفلاتوکسین B1 به‌وسیله‌ی *آسپرژیلوس فلاووس*

به استناد جدول شماره ۲، عصاره گیاه صبر زرد بر کاهش تولید آفلاتوکسین B1 حاصل از قارچ *آسپرژیلوس* اثر معنی‌دار

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-06]

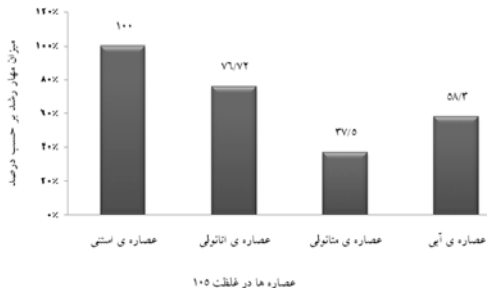
داشته است. بیشترین اثر مهارکنندگی در تولید آفلاتوکسین مربوط به غلظت ۲۰۰۰ میکرولیتر بر ۵۰ میلی‌لیتر از عصاره (۴۰/۹۴ درصد) و کمترین فعالیت مهارکنندگی عصاره در غلظت ۲ میکرولیتر بر ۵۰ میلی‌لیتر (۱۸/۱۴ درصد) گزارش شد. این در حالی است که در نمونه شاهد (بدون تاثیر عصاره) میزان آفلاتوکسین تولید شده ۷۷/۲ نانوگرم بر گرم بود. در غلظت‌های ۲۰ و ۲۰۰ میکرولیتر بر ۵۰ میلی‌لیتر از عصاره میزان آفلاتوکسین تولید شده به‌ترتیب ۵۹/۸ و ۵۲/۶ نانوگرم بر گرم گزارش شد. وزن خشک میسیلیوم‌های ایجاد شده توسط قارچ در محیط YES مایع در غلظت‌های ۰، ۲، ۲۰، ۲۰۰، ۲۰۰۰ میکرولیتر بر ۵۰ میلی‌لیتر به‌ترتیب: ۳/۵۸، ۳/۰۲، ۲/۸۶، ۲/۴۳ و ۱/۹۳ گرم بود. نتایج نشان می‌دهد که در محیط YES رشد قارچ در غلظت ۲۰۰۰ میکرولیتر به‌طور کامل مهار نشده است، در صورتی‌که بر محیط PDA در این غلظت مهار رشد ۱۰۰ درصد دیده شد.

جدول شماره ۱- تاثیر عصاره‌های صبر زرد بر رشد *آسپرژیلوس فلاووس* در دمای ۲۸ درجه‌ی سانتی گراد به‌مدت ۷ روز

عصاره‌ها	غلظت‌ها µl/L	میانگین ابعاد میسیلیوم cm	میزان مهار رشد بر حسب (درصد)
عصاره استونی	۰	۵/۸	۰
	10^2	۲/۸	۵۱/۷۲
	10^3	۲/۳	۶۰/۳۴
	10^4	۱/۶	۷۲/۴
	10^5	۰	۱۰۰
عصاره اتانولی	۰	۵/۸	۰
	10^2	۳/۷۵	۳۵/۳۴
	10^3	۳/۲۵	۴۴
	10^4	۲/۲۵	۶۱/۲
	10^5	۱/۳۵	۷۶/۷۲
عصاره متانولی	۰	۴	۰
	10^2	۳/۷۵	۶/۲۵
	10^3	۳/۲۵	۱۸/۷۵
	10^4	۲/۷۵	۳۱/۲۵
	10^5	۲/۵	۳۷/۵
عصاره آبی	۰	۶	۰
	10^2	۴/۳	۲۸/۳۳
	10^3	۳/۷۵	۳۷/۵
	10^4	۳/۲۵	۴۵/۸
	10^5	۲/۵	۵۸/۳

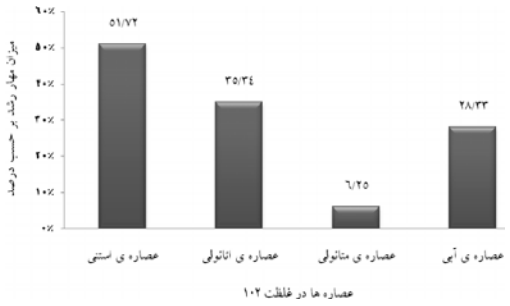
جدول شماره ۲- ارزیابی عصاره‌ی استونی صبر زرد بر بیوماس میسیلیومی (g) و میزان تولید آفلاتوکسین حاصل از *آسپرژیلوس فلاووس* در محیط YES

میزان مهار تولید آفلاتوکسین ٪	آفلاتوکسین B1 ng/g	وزن خشک میسیلیوم (g)	غلظت عصاره‌ها µl/50ml
۰	۷۷/۲	۳/۵۸	۰
۱۸/۱۴	۶۳/۲	۳/۰۲	۲
۲۲/۵۴	۵۹/۸	۲/۸۶	۲۰
۳۱/۸۷	۵۲/۶	۲/۴۳	۲۰۰
۴۰/۹۴	۴۵/۶	۱/۹۳	۲۰۰۰



نمودار شماره ۱- درصد مهار رشد *آسپرژیلوس فلاووس* در غلظت 10^5 عصاره‌های استونی، اتانولی، متانولی و آبی

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-06]



نمودار شماره ۲- درصد مهار رشد *آسپرژیلوس فلاووس* در غلظت 10^2 عصاره‌های استونی، اتانولی، متانولی و آبی

بحث

با توجه به اینکه قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* توانایی رشد سریعی بر روی محصولات غذایی داشته و می‌تواند خسارت‌هایی در زمینه صنایع غذایی، سلامتی و اقتصادی ایجاد کند، بنابراین مهار رشد این قارچ می‌تواند کمک شایانی به سلامت جامعه نماید. نتایج حاصله از این مطالعه می‌تواند اطلاعات پایه‌ای در زمینه کارایی و اثر بخشی عصاره‌های مختلف گیاه صبر زرد به‌منظور کاهش رشد این قارچ‌ها و فعالیت ضد قارچی این گیاه در اختیار قرار دهد. به‌دلیل انحلال متفاوت ترکیب‌های متنوع موجود در گیاه صبر زرد در هر حلال، ترکیب‌های خاصی از این گیاه جدا می‌شوند، بنابراین عصاره‌های مختلف دارای دامنه‌ای از فعالیت‌های ضد قارچی می‌باشند. مطالعاتی در زمینه‌ی فعالیت ضد قارچی صبر زرد توسط محققین مختلف انجام گرفته است. در سال ۲۰۰۷ Cooposamy و Magwa ثابت کردند که عصاره صبر زرد اثر ضد قارچی بر روی قارچ‌های *کاندیدا آلبیکنس*، *کاندیدا تروپیکالیس*، *تریکوفیتون منتاگروفیتس*، *تریکوفیتون روبروم*، *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس گلاوکوس* دارد [۲۴]. طبق مشاهدات و نتایج به‌دست آمده توسط Arunkumar و Muthuselvam در سال ۲۰۰۹، بالاترین فعالیت ضد قارچی گیاه صبر زرد در عصاره‌ی استونی آن، بر روی رشد *آسپرژیلوس نایجر* و *آسپرژیلوس فلاووس* مشاهده شده است [۲۵]، که این نتایج موافق با نتایجی است که ما در این مطالعه به‌دست آورده‌ایم. در مطالعه حاضر فعالیت ضد قارچی صبر زرد در غلظت 10^5 میکرولیتر از عصاره استونی اثر مهار کنندگی ۱۰۰ درصد بر رشد *آسپرژیلوس فلاووس* داشت. Casian و همکاران نیز دریافتند که عصاره‌های آبی- الکلی برگ‌های گیاه صبر زرد اثر مهاری بر رشد میسیلیوم‌های *متروسپوریوم پرونتی*، *بوتریتیس گلادیولروم*، *فوزاریوم اکسیزپوریوم* و *پنی سیلیوم گلادیولی* دارد [۱۶]. در مطالعه حاضر نیز مشاهده شد عصاره‌های الکلی در مقایسه با عصاره‌ی آبی اثر مهاری بیشتری بر رشد قارچ دارند. Jasso و همکارانش نیز فعالیت ضد قارچی عصاره‌ی این گیاه را ارزیابی کردند و گزارش نمودند که عصاره‌ی صبر زرد با غلظت 10^5میکرولیتر بر لیتر از رشد میسیلیوم‌ها در قارچ‌های *فوزاریوم اکسیزپوریوم*، *ریزوکتوما سولانی* و *کولکتوتریکوم کوکودس* ممانعت می‌کند [۲۶]. در مطالعه‌ی حاضر نیز ممانعت رشد در غلظت 10^5 میکرولیتر از عصاره‌ی استونی دیده شد و در کمترین غلظت استفاده شده، 10^2 میکرولیتر، مهار رشد ۵۱/۷۲ درصد گزارش شد. مطالعات فراوانی نیز در جهت یافتن روش‌های مناسب برای کنترل آلودگی قارچ‌ها از مواد غذایی صورت گرفته است. در مطالعه‌ای که توسط Horn و همکارانش در سال ۱۹۸۳ انجام شد اثر *آسپرژیلوس نایجر*، به‌عنوان یک مداخله کننده با عملکرد تولید آفلاتوکسین توسط *آسپرژیلوس فلاووس*، بررسی شد و آنها نتیجه گرفتند که ذرت‌هایی که با *آسپرژیلوس نایجر* نیز آلوده شده بودند، آفلاتوکسین از آنها جدا نشد. این گروه غلظت آفلاتوکسین را با کمک روش TLC آنالیز کردند و در تیمارهای مختلف دریافتند که pH پایین ۳-۲/۸ تولید آفلاتوکسین را به‌طور کامل متوقف می‌کند [۲۷]. Christiane و همکارانش در سال ۲۰۱۰، اثر روغن گیاه چریش را به‌صورت آزمایشگاهی بر رشد، مورفولوژی و تولید آفلاتوکسین در *آسپرژیلوس فلاووس* بررسی کردند. اگرچه در غلظت‌های ۰/۵ تا ٤ درصد از روغن تقریبا ۹۵ درصد تولید آفلاتوکسین مهار شده بود، اما رشد قارچ را کاهش نداده بود [۲۸]. Priyanka و همکاران نیز اثر روغن‌های اسانسی دو گیاه *Citrus reticulata* و *Cymbopogon citrates* را بر روی رشد *آسپرژیلوس فلاووس* بررسی کردند. این تیمارها به‌طور کامل رشد قارچ را در ۷۵۰ ppm مهار کرده بودند و دو اسانس به‌طور کامل تولید توکسین را در غلظت‌های ۷۵۰ ppm و ۵۰۰ ppm مهار کرده بودند [۲۹]. در این مطالعه، در تیمار عصاره‌ی استونی گیاه صبر زرد نسبت به گروه کنترل، میزان مهار تولید آفلاتوکسین در غلظت ۲۰۰۰ میکرو لیتر بر ۵۰ میلی‌لیتر، ٤۰/۹٤ درصد و در کمترین غلظت از عصاره (۲ میکرولیتر بر ۵۰ میلی‌لیتر) ۱۸/۱٤ درصد گزارش شد. نتایج نشان می‌دهد که با کاهش رشد قارچ میزان تولید آفلاتوکسین نیز کاهش یافته است.

نتیجه‌گیری

در مجموع می‌توان گفت عصاره استونی برگ گیاه صبر زرد بیشترین فعالیت ضد قارچی خود را در غلظت 10^5 میکرولیتر بر روی رشد *آسپرژیلوس فلاووس* نشان می‌دهد. بنابراین، به‌نظر

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-06]

می‌رسد که عصاره‌ی استونی صبر زرد می‌تواند به‌عنوان عامل ضد قارچی موثرتری نسبت به عصاره‌های دیگر در نظر گرفته شود.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از مسئولین شرکت خدماتی، آموزشی و تحقیقاتی مرجعان خاتم به‌خاطر همکاری با گروه در خصوص آنالیز آفلاتوکسین در نمونه‌ها تشکر و قدردانی به‌عمل می‌آید. هم-چنین، از جناب آقای دکتر رزاقی (انستیتو پاستور ایران- بخش قارچ شناسی) که در تهیه سویه‌ی استاندارد *آسپرژیلوس فلاووس* با این گروه همکاری داشتند نیز تشکر می‌گردد.

References:

[1] Mahesh B, Satish S. Antimicrobial activity of some important medicinal plant against plant and human pathogens. ***World J Agri Sci*** 2008; 4: 5, 839-43.

[2] Muhammad BI. Anti-microbialeffects of extract leaf, stem and root bark of *Anogeissus leiocarpus* on *Staphylococcus aureaus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli* and *Proteus vulgaris*. ***J Pharma Devpt*** 1997; 2: 20- 30.

[3] Surjushe A, Vasani R, Saple DG. Aloe vera: a short review. ***Indian J Dermatol*** 2008; 53 (4): 163-6.

[4] Thiruppathi S, Ramasubramanian V, Sivakumar T, Thirumalai Arasu V. Antimicrobial activity of *Aloe vera* (L.) Burm. f. against pathogenic microorganisms. ***J Biosci Res*** 2010; 1(4): 251-8.

[5] Thanaboripat D. Control of Aflatoxins in Agricultural Products using Plant Extracts. ***KMITL Sci Tech J*** 2011; 11: 1 - 35

[6] Hesseltine CW. A millennium of fungi, food and fermentation. ***Mycologia*** 1965; 57: 149-97.

[7] Narasaiah KV, Sashidhar RB, Subramanyam C. Biochemical analysis of oxidative stress in the production of aflatoxin and its precursor intermediates. ***Mycopathologia*** 2006; 162(3): 179–89.

[8] Ehrlich KC, Kobbeman K, Montalbano BG, Cotty PJ. Aflatoxin- producing *Aspergillus* species from Thailand. ***Int J Food Microbiol*** 2007; 114(2): 153–9.

[9] Sergent T, Ribonnet L, Kolosova A, Garsou S, Schaut A, De Saeger S, et al. Molecular and cellular effects of food contaminants and secondary plant components and their plausible interactions at the intestinal level. ***Food Chem Toxicol*** 2008; 46(3): 813–41.

[10] Pitt JI, Hocking AD. Fungi and Food Spoilage. 2nd ed. Blackie Academic & Professional, London, United Kingdom; 1977.

[11] Hedayati MT, Pasqualotto AC, Warn PA, Bowyer P, Denning DW. Aspergillus flavus: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. ***Microbiology*** 2007; 153(Pt 6): 1677-92.

[12] Moreno-Martinez E, Vazquez-Badillo M, Facio-Parra F. Use of propionic acid salts to inhibit aflatoxin production in stored grains of maize. ***Agrociencia*** 2000; 34(4): 477-84.

[13] Krishnamurthy YL, Shashikala J. Inhibition of aflatoxin B1 production of *Aspergillus flavus* isolated from soybean seeds by certain natural plants products. ***Lett Appl Microbiol*** 2006; 43: 469-74.

[14] Thanaboripat D, Mongkontanawut N, Suvathi Y, Ruangrattametee V. Inhibition of aflatoxin production and growth of *Aspergillus flavus* by citronella oil. ***KMITL Sci J*** 2004; 4(1): 1-8.

[15] Bullerman LB, Lieu Y, Sieier SA. Inhibition of growth and aflatoxin production by Cinnamon and Clove oils,Cinnamic aldehyde and eugenol. ***J Food Sci*** 1977; 46: 1107-9.

[16] Casian OR, Parvu M, Vlase L, Tamas M. Antifungal activity of *Aloe vera* leaves. ***Fitoterapia*** 2007; 78(3): 219-22.

[17] Thanaboripat D, Suvathi Y, Srilohas P, Spripakdee S, Patthanwanitchai O, Chareonsettasilp S. Inhibitory effect of essential oils on the growth of *Aspergillus flavus*. ***KMITL Sci J*** 2007; 6(1): 18- 24.

[18] Thanaboripat D, Cheunoy W, Petcharat U, Ruangrattametee V, Kraisintu K. Control of aflatoxigenic fungi by Thai neem. ***Government Pharmaceutical Organization J*** 2000; 21: 41-9.

[19] Masood A, Ranjan KS. The effect of aqueous plant extracts on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. ***Lett Appl Microbiol*** 1991; 13(1): 32- 4.

[20] Whitaker T, Horwitz W, Albert R, Neshim S. Variability associated with analytical methods used to measure aflatoxin in agricultural commodities. ***AOAC Int Mar*** 1996; 79(2): 476-485.

[21] Sabino M, Milanez TV, Lamardo LC, Navas SA, Stofer M, Gracia CB. Evaluation of the efficiency of two immunoassay kits for detection of aflatoxin B1in corn, fish feed, peanuts and its products. ***Ciencia E Tecnologia de Alimentos J*** 1997; 17(2): 107-10.

[22] Lee LS, Wah JH, Cotty PJ, Bayman P. Integration of enzyme- linked immunosorbent assay with conventional chromatographic procedures for quantitation of aflatoxin in individual cotton bolls, seeds and seed sections. ***Anal Chem J*** 1990; 73(4): 581-4.

[23] Sitara U, Hassan N, Naseem J. Antifungal activity of *Aloe vera* gel against plant pathogenic fungi. ***Pak J Bot*** 2011; 43(4): 2231-33.

[24] Coopoosamy RM, Magwa ML. Traditional use, antibacterial activity and antifungal activity of crude extract of *Aloe excelsa*. ***Afr J Biotechnol*** 2007; 6(20): 2406-10.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-06]

[25] Arunkumar S, Muthuselvam M. Analysis of phytochemical constituents and antimicrobial activities of *Aloe vera* L. against clinical pathogens. ***World J Agric Sci*** 2009; 5 (5): 572-6.
[26] Jasso de Rodriguez D, Hernandez-Castillo R, Rodriguez-Gracia JL. Angulo-Sanchez. Antifungal activity in vitro of *Aloe vera* pulp and liquid fraction against plant pathogenicfungi. ***Ind Crops Prod*** 2005; 21(1): 81-7.
[27] Horn BW, Wicklow DT. Factor influencing the inhibition of aflatoxin production in corn by *Aspergillus niger*. ***Canadian. J Microbiol*** 1983; 29: 1087-91.
[28] Costa CL, Geraldo MRF, Arrotéia CC, Kemmelmeie C. In vitro activity of neem oil [*Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae)] on *Aspergillus flavus* growth, sporulation, viability of spores, morphology and Aflatoxins B1and B2 production. ***Adv Biosci Biotechnol*** 2010; 1: 292-9.
[29] Singh P, Shukla R, Kumar A, Prakash B, Singh S, Dubey NK. Effect of Citrus reticulata and Cymbopogon citratus essential oils on Aspergillus flavus growth and aflatoxin production on Asparagus racemosus. ***Mycopathologia*** 2010; 170(3): 195-202.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-06]