اثرات ضد قارچی عصاره انار اینترکلیت‌شده درون نانو ذرات سیلیکاتی علیه بیماری کپک آبی سیب (*Penicillium expansum*)

محمدرضا بلوچ[۱]، حسین صباحی[۲*]، حشمت اله امینیان[۱] و شاهین نوری‌نژاد[۱]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۳/۱۲؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۶/۲۰)

چکیده

کنترل بیماری‌های قارچی پس از برداشت به روش زیستی (استفاده از پلی فنل‌های گیاهی) به عنوان یک روش سالم و دوست دار محیط‌زیست مطرح است. با این وجود یکی از مشکلات پلی‌فنل‌های گیاهی تجزیه سریع در شرایط محیطی همچون دمای بالا، اکسیژن و نور است. یکی از بهترین راه‌حل‌های این مشکل اینترکلیت مواد موثره درون نانو ذرات است. لذا جهت بهبود پایداری پلی فنل‌های گیاهی و در نتیجه افزایش کارایی آنها در کنترل کپک آبی سیب، این طرح پیشنهاد شد. در این راستا استخراج عصاره غنی از پلی فنل از میوه انار و برگ میخک با استفاده از دو حلال آب و متانول بصورت جداگانه انجام شد. آنالیزهای XRD ، FTIR و DLS نشان دادند که عصاره بطور کامل در بین لایه‌های نانو ذرات سیلیکاتی (مونت موری لونیت) اینترکلیت شده است. آزمون بررسی اثر بازدارندگی به دو روش مخلوط با محیط کشت مایع و اختلاط با محیط کشت آگار علیه قارچ عامل کپک آبی انجام شد. نتایج نشان داد که فعالیت ضد قارچی عصاره انار بطور معنی داری بالاتر از عصاره میخک بود. در روش مخلوط با محیط کشت مایع، نانو ذرات سیلیکاتی به تنهایی اثری مشابه قارچ‌کش تجاری داشتند. در روش اختلاط با محیط کشت آگار، اینترکلیت کردن عصاره درون نانو ذرات اثر بازدارندگی آن را به‌طور بسیار معنی‌داری در حد ۱۱٪ بهبود بخشید. نتایج در کل نشان دادند که اینترکلیت کردن پلی فنل‌های گیاهی درون نانو ذرات سیلیکاتی می‌تواند بعنوان یک روش زیست محیط دوست و اقتصادی جهت کنترل کپک آبی، پیشنهاد شود.

کلیدواژه: کپک آبی، پلی فنل، اینترکلیت کردن، مونت موری لونیت

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: hsabahi@ut.acir

۱. گروه گیاه‌پزشکی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران

۲. گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران

Antifungal effects of pomegranate extract intercalated into silicate nanoparticles against blue mold of apple

M.R. Balooch[1], H. Sabahi[2*], H. Aminian[1], and S. Nourinejhad

(Received: 1.6.2016; Accepted: 11.9.2017)

Abstract

Biological method for controlling (use of plant polyphenols) the postharvest fungi diseases has been suggested as an environmentally friendly method. However the principal problems of plant polyphenols application as fungicide is their rapid decomposition in normal environmental conditions by temperature, oxygen and light. One of the best solutions for this problem is encapsulation or intercalation them into nanoparticles In this regard, the pomegranate fruit peel and clove rich of polyphenols was extracted by water and methanol and was intercalated into the layers of silica nanoparticles (montmorillonite) and his antifungal effect was tested via broth dilution method and agar well-diffusion method against blue mold fungi. The XRD, FTIR and DLS analyses confirmed completely intercalation of pomegranate peel extract into interlayer of montmorillonite. The results showed that in the broth dilution method, nanosilica particles alone had antifungal effect similar to commercial fungicide. And intercalation extract into nanoparticles did not affect its antifungal effects. In the contrast,, in agar well-diffusion method, intercalation the extract into nanoparticles increased its inhibitory effect very significantly ($p < 0.001$) compared to nanoparticles and extract alone (as much as 26%). This effects was apart from the improved stability of plant extracts containing polyphenols in the storage conditions. These results showed that intercalation the polyphenols of pomegranate fruit peel into silica nanoparticles, could be a environmentally friendly, eco-friendly and economic method for controlling the postharvest blue mold fungi instead of chemical fungicides that have many environmental hazards for humans, animals and soil.

Keywords: Blue mold, Polyphenols, intercalation, Montmorillonite

---

* Part of M.Sc. thesis of first author submitted to University of Kurdistan

**Corresponding author's E-mail: hsabahi@ut.acir

1. Department of Plant Protection, College of Aboureihan, University of Tehran

2. Life Science Engineering Department, Faculty of New Sciences and Technologies, University of Tehran

مقدمه

بیماری‌های قارچی پس از برداشت دارای توانایی های بالقوه‌ای در ایجاد آلودگی در محصولات کشاورزی هستند. در نتیجه، فاکتور اصلی محدودکننده در میوه‌ها و سبزی‌ها برای نگهداری طولانی مدت در انبار می‌باشند و فساد میوه‌ها به علت وجود بیماری‌های مهم در طول ذخیره‌سازی و انتقال برای فروش بالای ۲۵ درصد از کل تولید را در کشورهای صنعتی شامل می‌شود و در کشورهای درحال توسعه به علت فقدان امکانات ذخیره-سازی مناسب به ۵۰ درصد می‌رسد (Janisiewicz & Korsten, 2002). عوامل قارچی بیماریزا پس از برداشت، ۹۰ گونه قارچی هستند که باعث کاهش و فساد میوه سیب می‌شوند (Jones, 1990). کپک آبی سیب توسط قارچ *Penicillium expansum* ایجاد می‌شود که از مهم‌ترین عوامل فساد و آسیب‌های پس از برداشت میوه سیب به شمار می‌رود که باعث خسارت و فساد آن در انبار و پس از برداشت می‌شود (Janisiewicz & Korsten, 2002; Navarta *et al.*, 2014; Sanderson & Spotts, 1995; Sharma *et al.*, 2009).

کنترل این بیمارگر با شیوه‌های متفاوتی شامل کنترل فیزیکی، شیمیایی و زیستی انجام می‌گیرد (Sharma *et al.*, 2009; Wisniewski & Wilson, 1992). کنترل فیزیکی و شیمیایی دارای محدودیت زمان‌بر بودن، هزینه بالا و زیان به‌سلامت انسان و محیط‌زیست در دراز مدت هستند. بنابراین کنترل زیستی به عنوان روش سالم و دوست دار محیط‌زیست پیشنهاد می‌شود (Sharma *et al.*, 2009). یکی از روش‌های زیستی، استفاده از متابولیت‌های گیاهی برای کنترل بیمارگرهای پس از برداشت می‌باشد. پلی‌فنل‌ها یکی از گروه‌های مهم ترکیبات گیاهی هستند که به صورت گسترده در برگ، ساقه، گل و ریشه گیاهان وجود دارند. از نظر مولکولی این ترکیبات دارای حداقل یک حلقه آروماتیک با یک یا تعداد بیشتری از گروه هیدروکسیل(OH) هستند. ترکیبات پلی‌فنلی از دامنه وسیعی از کارکردهای بیولوژیکی از قبیل فعالیت های آنتی اکسیدانی و فعالیت کنترل کنندگی بیماری‌ها در جانوران و گیاهان را دارا هستند (Quideau *et al.*, 2011). یکی از مشکلات اصلی این متابولیت‌های گیاهی به‌عنوان آفت‌کش ، تجزیه سریع آن‌ها در اثر نور، اکسیژن و دمای بالا پس از تولید بویژه در طول دوره انبارداری و پس از کاربرد روی میوه است، بطوریکه قبل از اینکه بتوانند اثر خود را بر بیمارگر مورد نظر بگذارند، در شرایط درجه حرارت معمولی بعد از مصرف روی گیاه و یا در انبار، به علت حساسیت بالا، تجزیه‌شده و از بین می‌روند (Volf *et al.*, 2014). راه‌حل‌های مختلفی برای رفع این مشکل پیشنهاد می‌شود که آنکپسوله کردن آن‌ها درون نانو ذرات یکی از راه‌های پیشنهادی است. با توجه به این که نانوذره مورد استفاده باید از نظر هزینه ارزان و از نظر محیط‌زیست، دوستدار محیط‌زیست باشد، نانو ذرات سیلیکاتی مورد استفاده قرار گرفت. تابه‌حال در ایران و حتی در دنیا کاری در زمینه اینترکلیت کردن عصاره گیاهانی مثل میخک و انار (که غنی از پلی فنل هستند)، درون نانو ذرات سیلیکاتی به‌عنوان قارچ‌کش، کاری انجام نشده است، لذا هدف از این مطالعه سنجش اثرات ضدقارچی این عصاره‌ها در حالت معمول و حالت اینترکلیت‌شده درون نانو ذرات سیلیکاتی، بر علیه قارچ‌های *P. expansum* می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های گیاهی

نشاء گیاه میخک (*Dianthus caryophyllus*) از گلخانه‌های موجود در پاکدشت در مهرماه سال

۱۳۹۲جمع‌آوری و در گلخانه‌ی واقع در پردیس ابوریحان پرورش داده شد. سپس به‌منظور حذف گل‌ولای ریشه‌ها با آب شستشو داده شدند. پس‌ازاین مرحله، گیاه در محیط مناسب و دور از نور مستقیم خورشید قرار داده شد و در دمای معمولی اتاق خشک شد. پوست انار (*Punica granatum*) از میوه‌فروشی‌های شهر پاکدشت در آذرماه سال ۱۳۹۲ تهیه شد. نمونه‌ها پس از شستشو با آب و خشک شدن توسط مخلوط‌کن خردشد و پودر حاصل پس از غربال کردن با الک یک مش تا زمان عصاره‌گیری در آزمایشگاه نگهداری شد.

تهیه جدایه‌های عامل بیماری

در این تحقیق جدایه‌های A4، B2 و B5 قارچ *P. expansum* از کلکسیون قارچ‌شناسی گروه بیماری شناسی گیاهی پردیس ابوریحان–دانشگاه تهران تهیه شد. بعد از شناسایی اولیه به منظور انتخاب جدایه قارچی که دارای بیشترین قدرت بیماریزایی بر روی سیب دارد، آزمون اثبات بیماریزایی انجام شد و از میان جدایه‌های قارچ *P.expansum* جدایه B2 دارای بیشترین قطر لکه بر روی سیب ایجاد کردند و برای آزمون های بعدی از این ایزوله استفاده شد.

استخراج و اینترکلیت کردن پلی‌فنل‌های گیاهی درون نانو ذرات

استخراج پلی‌فنل‌ها با استفاده از روش (Ventura *et al.*, 2008) با استفاده از دو حلال آب و متانول بصورت جداگانه انجام شد. در این روش ۱۰ گرم از ماده گیاهی پودرشده در ۱۰۰ میلی لیتر حلال به مدت ۱۲ ساعت روی همزن مغناطیسی قرار داده شد. عصاره بعد از صاف شدن با کاغذ صافی واتمن ٤٢، برای ۱۵ دقیقه در سرعت ۳۵۰۰rpm سانتریفیوژ شد. فاز رویی دوباره از کاغذ صافی واتمن عبور داده شدد. سپس عصاره، توسط دستگاه تقطیر در خلا Vaccum rotary evaporator (Yamato, RE540) در دمای کمتر از ٤٠ درجه سلسیوس تا حد ۰/۱ برابر تغلیظ شد. به این معنی که ۱۰۰ میلی لیتر عصاره اولیه به به ۱۰ میلی لیتر تغلیظ شد. اینترکلیت کردن عصاره درون نانو ذرات مونت موری لونیت (یک نوع رس سیلیکاتی) به روش هم رسوبی انجام شد به این صورت که مقدار ۵ گرم نانو ذرات مونت موری لونیت در ۱۰۰ میلی لیتر عصاره تغلیظ‌شده گیاه میخک و پوست انار به مدت ۲ ساعت هم زده شد، مخلوط بدست آمده برای حذف ذرات اضافی سانتریفیوژ شد و توسط آون در دمای ٤٠ درجه سلسیوس خشک شد و تا زمان آزمون‌های زیست سنجی در یخچال در دمای ٤ درجه سلسیوس نگهداری شد (Beyki *et al.*, 2014; Robert *et al.*, 2010).

مشخصه‌یابی نانوذرات

خصوصیات نانوذرات مونت موری لونیت و کامپوزیت عصاره انار/مونت موری لونیت به کمک آنالیزهای XRD, FTIR و DLS تعیین شد. از XRD (X-ray diffraction) (Model: X'PERT MPD, Philips Company, Netherlands)؛ برای اندازه گیری فاصله بین لایه نانوذرات رس استفاده شد. این آنالیز در آزمایشگاه‌های دانشکده علوم دانشگاه تربیت مدرس انجام شد. همچنین از دستگاه FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy) (Model:TENSOR 27, Bruker Company, Germany) مستقر در انستیتوالکتروشیمی دانشگاه تهران برای سنجش عوامل شیمیایی هر ترکیب استفاده شد. برای تعیین اندازه هیدرودینامیکی ذرات از DLS (Dynamic light scattering) ($MAL_{1033439}$, Malvern instruments Ltd, United Kingdom) استفاده شد. این آنالیز در دانشکده علوم دانشگاه تهران به سرانجام رسید.

بررسی اثرات بازدارندگی پلی‌فنل‌های گیاهی اینترکیت‌شده و نشده به روش مخلوط با محیط کشت مایع[1]

آزمایش به صورت فاکتوریل و در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در چهار تکرار انجام شد. فاکتور A شامل نوع حلال یعنی آب و متانول، فاکتور B شامل روش کاربرد عصاره در دو سطح اینتر کلیت‌شده درون نانو ذرات و اینترکلیت نشده و فاکتور C شامل نوع ترکیب به‌صورت عصاره انار، عصاره میخک، گالیک اسید (به‌عنوان یک فنل استاندارد که اثرات ضد قارچی آن قبلا به‌طور کامل به اثبات رسیده است) و رس مونت موری لونیت بود. به‌منظور تعیین درصد بازدارندگی ترکیبات اینترکلیت‌شده و نشده به روش مخلوط با محیط کشت مایع ابتدا سوسپانسیون اسپور به غلظت 10^5 اسپور در هر میلی‌لیتر به مقدار ۲۰µl قارچ را در محیط کشت مایع اضافه شد. سپس مقدار ۱/۵ میلی لیتر از هر تیمار (ذرات کلوئیدی یا نانوذرات مونت موری لونیت، گالیک اسید اینتر کلیت‌شده و نشده، عصاره انار و میخک اینتر کلیت‌شده و نشده) در هر ارلن حاوی ۱۰۰cc محیط کشت مایع اضافه شد(۱/۵٪). برای شاهد این آزمون، به‌جای عصاره‌ی اینترکلیت‌شده و نشده موردنظر یک میلی‌لیتر آب مقطر و یا متانول به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت مخلوط با محیط کشت مایع اضافه گردید (Liu *et al.*, 2007, 2010). سپس ارلن‌ها را در شیکر انکوباتور به مدت ۱۰ روز با دمای 25 ± 1^{o}c نگهداری و بعد از گذشت این زمان وزن توده پرگنه قارچ اندازه‌گیری شد.

بررسی اثرات بازدارندگی پلی‌فنل‌های گیاهی اینترکیت‌شده و نشده به روش مخلوط با محیط کشت آگار

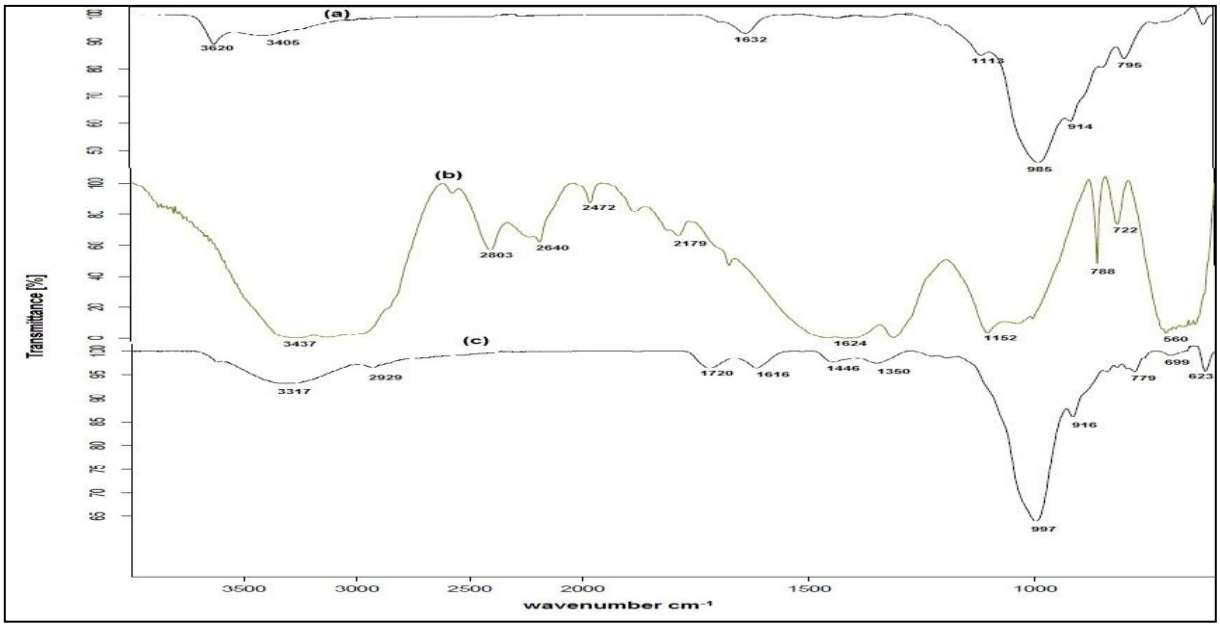
به‌منظور تعیین درصد بازدارندگی، ۱/۵ میلی لیتر از هر تیمار (ذرات کلوئیدی یا نانوذرات مونت موری لونیت، گالیک اسید اینتر کلیت‌شده و نشده، عصاره انار و میخک اینتر کلیت‌شده و نشده) به هر پتری حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت آگار اضافه شد (۱/۵٪) و سپس اثرات بازدارندگی آن‌ها برعلیه رشد قارچ *P. expansun* مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت تهیه غلظت مورد نظر، لازم است ابتدا ترکیب مورد نظر بصورت غلیظ در حلال (آب) حل شود و سپس بعد از تهیه محیط کشت و خروج محیط سترون از اتوکلاو زمانی که دمای آن به حدود ۴۲ درجه سانتی‌گراد رسید، از محلول حاصل به میزان ۱/۵ میلی لیتر به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت اضافه گردید. سپس به درون هر تشتک ۱۵ میلی‌لیتر از محیط کشت حاوی عصاره‌ی اینترکلیت‌شده و نشده توزیع شد. بعد از انعقاد محیط‌های کشت، قرص‌هایی به قطر شش میلی‌متر از حاشیه پرگنه‌ی فعال قارچ در وسط تشتک‌های حاوی محیط کشت قرار داده شدند. برای این آزمون چهار تکرار منظور گردید. برای شاهد این آزمون، به‌جای عصاره‌ی اینترکلیت‌شده و نشده موردنظر یک میلی‌لیتر آب مقطر و یا متانول به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت اضافه گردید. سپس تشتک‌ها به انکوباتور با دمای 25 ± 1^{o} C درون انکوباتور منتقل داده شد (هادیان و همکاران ۱۳۸۵).

نتایج

بررسی خصوصیات نانوکامپوزیت عصاره انار/مونت موری لونیت

با توجه به اینکه دو کامپوزیت گالیک اسید/مونت موری

[1] Broth



شکل ۱- آنالیز FT-IR ذرات مونت موری لونیت (a)، عصاره انار (b) و کامپوزیت عصاره انار/مونت موری لونیت (c)

Figure 1. FT-IR spectra of montmorillonite (a), pomegranate extract (b) and nanocomposite of montmorillonite/pomegranate extract (c).

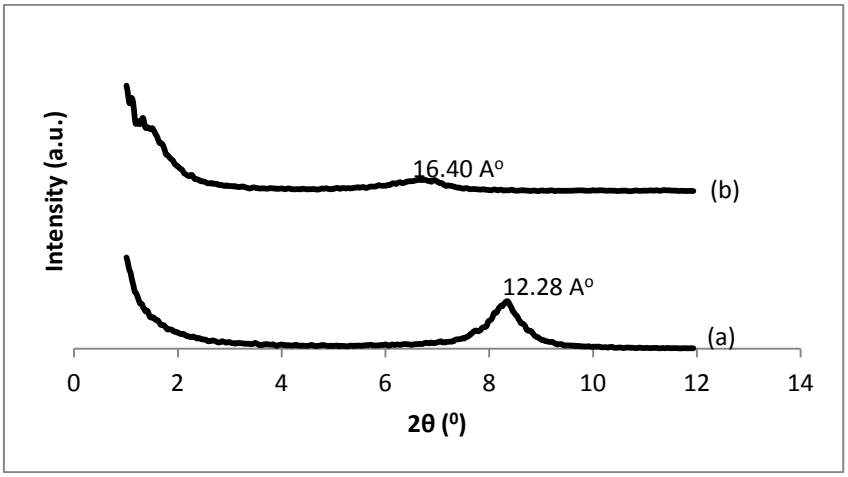
لونیت و عصاره میخک/مونت موری لونیت اثرات ضد قارچی بسیار کمتری نسبت به کامپوزیت عصاره انار/مونت موری لونیت داشتند (شکل ٦) فقط خصوصیات نانویی این کامپوزیت (عصاره انار/مونت موری لونیت) مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج آن بصورت زیر ارائه می‌شود.

آنالیز FTIR

طیف FTIR عصاره پوست انار (شکل ۱) به علت وجود مواد آلی مختلف شامل پلی فنل‌ها، آمینواسیدها، کربوهیدرات‌ها، فلاونوئیدها ، گلیکوزیدها و غیره دارای ساختار مشخص و دقیقی نیست و گروه‌های عاملی موجود در عصاره را می‌توان به‌طورکلی بیان نمود.

در طیف FTIR مونت موری لونیت (شکل 1a)، باند ۳٦۲۰ مربوط به پیوند کششی OH از پیوندهای Al-OH و Si-OH می‌باشد (ربیعی و همکارن، ۲۰۱٦). در این نمودار باند ۳٤۰٦ مربوط به پیوند کششی مولکولهای آب که بطور طبیعی در بین لایه‌های مونت قرار دارد می‌باشد.

در کامپوزیت عصاره انار/مونت موری لونیت (شکل 1c) پیکی پهن در ناحیه cm^{-1} 3200-3500 دیده می‌شود که مربوط به پیوندهای هیدروژنی بین‌مولکولی است. همان‌طور که مشاهده می‌شود پیک ۳٤۰۲ در مونت بعد از اینتر کلیت شدن با پلی فنل‌های انار به سمت راست جابجا شده است و در ناحیه cm^{-1} 3317 قرارگرفته است که نشان‌دهنده تغییر چشم‌گیری در پیوندهای هیدروژنی بین‌مولکولی است که در اینجا بین پلی‌فنل‌های عصاره با مونت موریلونیت ایجادشده است. ظاهر شدن یک پیک جدید در ناحیه cm^{-1} 2929 مر بوط به گروه C-H عوامل فنلی است (جعفری و همکاران، ۲۰۱٦) که دلیل دیگری بر وجود اینترکلیت شدن یا جذب پلی فنل‌های عصاره به سطح یا فاصله بین لایه ای رس می‌باشد. پیدایش پیک جدید در ناحیه cm^{-1} 1720 معرف گروه کربونیل (C=O) آزاد و متصل به گروه کربوکسیلیک فنل می‌باشد. نمایان



شکل۲- آنالیز X-ray diffraction مونت موری لونیت (a) و کامپوزیت عصاره انار/مونت موری لونیت (b).

Figure 2. X-ray diffraction pattern of montmorillonite (a) and nanocomposite of montmorillonite/pomegranate extract (b).

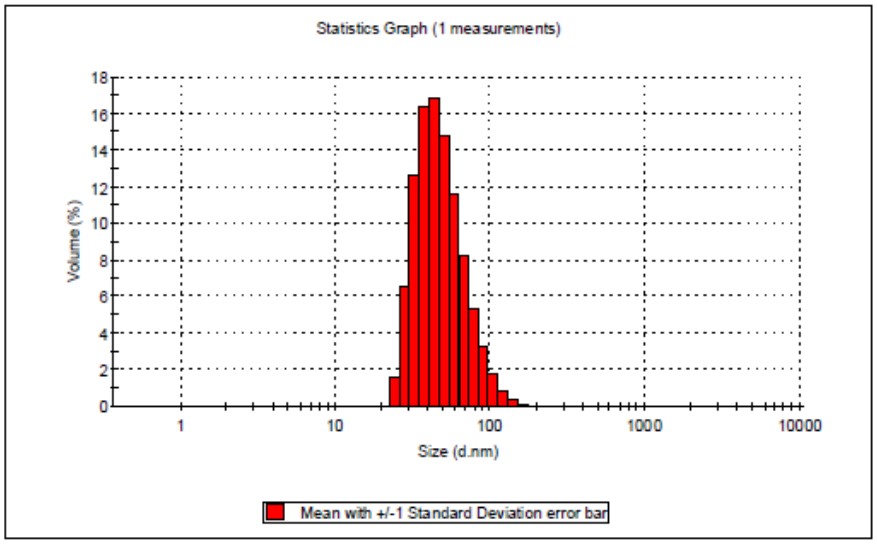
شدن این پیک در کامپوزیت می‌تواند ناشی از انتخاب گری سیلیکات باشد که پلی‌فنل‌ها را از بقیه عصاره جدا کرده و جذب نموده است. پیک $1616\ cm^{-1}$ مربوط به حلقه آروماتیک پلی فنل‌هاست (جعفری و همکاران، ۲۰۱۶) که در کامپوزیت به صورت پیکی تیز و مشخص حضور این حلقه‌های را نشان می‌دهد. باندهای 1446 و $1350\ cm^{-1}$ مربوط به گروه‌های CH_2 و CH_3 پلی فنل‌ها است که در عصاره و کامپوزیت به وضوح دیده می‌شود و دلیل دیگری بر اینتر کلیت شدن یا اتصال آنها به سطح ذرات مونت می‌باشد. پیک $997\ cm^{-1}$ مربوط به Si-O در رس است که به سمت چپ جابجا و تیزتر شده است که می‌تواند برهم‌کنش این گروه را با مولکول‌های آلی موجود در عصاره را اثبات کند (ربیعی و همکاران، ۲۰۱۶).

آنالیز XRD

در آنالیز XRD مربوط به مونت موری لونیت، حرکت زاویه ۲ تتا به سمت چپ نشان دهنده افزایش فاصله بین لایه ایست (گلباشی و همکارن، ۲۰۱۶). در شکل ۲ مشاهده می‌شود که فاصله بین لایه ای ذرات مونت موری لونیت در حالت عادی ۱۲/۲۸ آنگستروم است ولی بعداز اینترکلیت شدن عصاره انار، این فاصله به ۱۶/۴۰ آنگستروم افزایش پیدا کرده است. این امر نشان دهنده اینتر کلیت شدن کامل پلی فنل‌های موجود در عصاره در فاصله بین لایه ای مونت می‌باشد. سایر محققین هم گزارش کرده اند که افزایش مقدار اینترکلیت همیشه با افزایش فضای بین لایه‌ای همراه است. بعنوان مثال جوشی و همکاران (۲۰۰۹) ویتامین B1 را درون مونیت موری لونیت اینترکلیت کردند و مشاهده کردند که با به‌کارگیری درصدهای جرمی مختلف ویتامین B1، به صورت ٪۶، ٪۱۶ و ٪۲۳ وزنی مقدار فضای لایه‌ای مونت موریلونیت از ۱۲/۴ آنگستروم به ترتیب به ۱۴، ۱۵/۵ و ۱۶/۷ آنگستروم افزایش پیدا کرد.

اندازه ذارت

آنالیز DLS نشان داد که اندازه ذرات مونت موری لونیت بعداز نانو شدن با میانگین ۷۹/۹ نانومتر می‌باشد (شکل ۳). مونت موری لونیت در حالت طبیعی بصورت میکرو می‌باشد به این معنی که چندین ذره با قطر و عرض



شکل ۳- اندازه نانو ذرات مونت موری لونیت.

Figure 3. The size of nanoparticle of montmorillonite.

جدول ۱- نتایج آنالیز واریانس (طرح فاکتوریل) اثر ضد قارچی تیمارهای مختلف به روش مخلوط با محیط کشت مایع بر روی قارچ *P.expansum*

Table 1. Analysis of variance (factorial design) the antifungal effect of different treatments on *P. expansum* growth in the broth dilution method.

S.O.V	df	MS	F
Block	2	0.0000084	0.9
Method (T_1)	1	0.002	221***
Compounds (T_2)	3	0.0053	566***
Solvent (T_3)	1	0.0000091	0.97
T_1*T_2	3	0.000067	7**
T_1*T_3	1	0.000011	1.2
T_2*T_3	3	0.000017	1.8
T_1*T_2*T_3	3	0.000073	0.77
Error	30	0.000009	

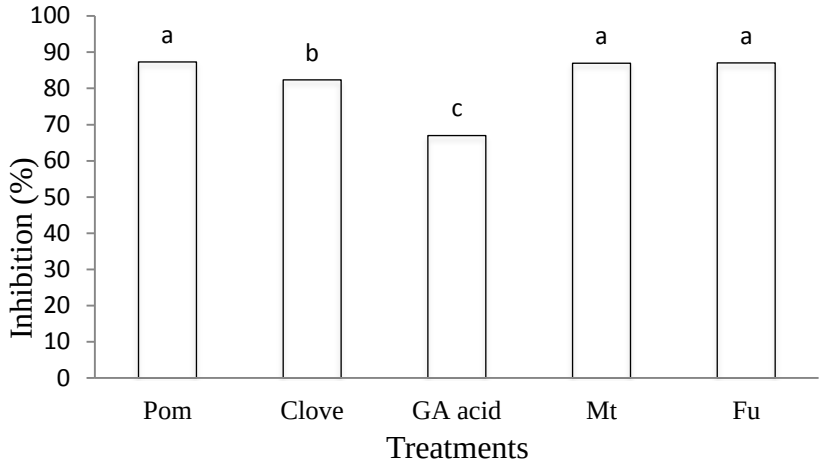
** و *** معنی دار در سطح ۰/۰۱ ($p<0.01$) و ۰/۰۰۱ ($p<0.001$)

در حد زیر ۱۰۰ نانومتر ولی طول در حد ۱۵۰ تا ۱۰۰۰نانومتر بهم چسبده هستند. این ذرات بعداز استریر، نه تنها از هم جدا می‌شوند بلکه از بعد طولی هم شکسته می‌شوند (ربیعی و همکارن، ۲۰۱۶). داده‌های شکل ۳ نشان می‌دهند که استریر بمدت ۲ ساعت، توانسته است میانگین اندازه ذارت را به زیر ۱۰۰ نانومتر کاهش دهد.

بررسی اثر بازدارندگی عصاره‌های اینترکلیت‌شده و نشده برعلیه قارچ عامل کپک آبی سیب (*P. expansum*) به روش مخلوط با محیط کشت مایع

نتایج آنالیز واریانس بصورت طرح فاکتوریل نشان داد که اثر روش کاربرد (روش نانو یا روش متداول) و نوع ترکیب (عصاره انار، عصاره میخک، گالیک اسید و مونت موری لونیت) در سطح ۰/۰۰۱ معنی‌دار بود (جدول ۱). هیچ کدام از اثرات متقابل بجز روش کاربرد * نوع ترکیب معنی‌دار نبودند (جدول۱).

نتایج مقایسه میانگین نشان داد که اثر ضد قارچی عصاره انار مشابه قارچ کش تجاری بود (شکل ٤). خود نانوذره هم اثری مشابه قارچ کش تجاری داشت. اینترکلیت کردن عصاره‌ها تاثیر زیادی روی افزایش اثر ضد قارچی آنها نداشت، بطوریکه اثر نانوذره با نانوذره+عصاره انار مشابه بود (شکل ٥). جالب اینکه اینترکلیت کردن گالیک اسید و عصاره میخک درون نانوذره، اثر قارچ کشی آن را کاهش داد که این اثر ناشی از روابط نانویی است (مقایسه نتایج شکل ٤ و ٥).



شکل٤- مقایسه فعالیت ضد قارچی (بازدارندگی زیست‌توده) عصاره انار (Pom)، عصاره میخک (Clove)، گالیک اسید (GA)، نانو ذرات مونت موری لونیت (Mt) و قارچ‌کش شیمیایی (Fu) در کنترل قارچ *P. expansum* در روش مخلوط با محیط کشت مایع.

Figure 4. Comparison the antifungal effect of pomegranate extract, clove extract, gallic acid, nano particles of montmorillonite and commercial fungicide on *P. expansum* in broth dilution method.

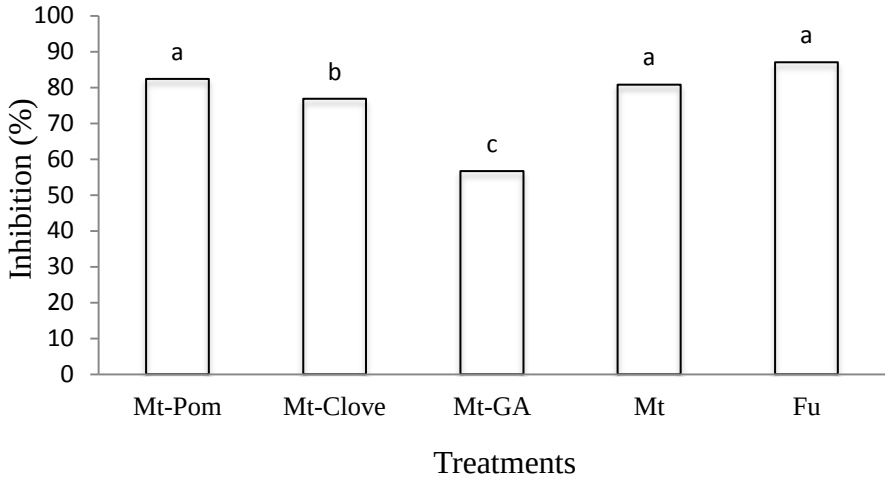
بررسی اثر بازدارندگی عصاره‌های اینترکلیت‌شده و نشده برعلیه قارچ عامل کپک آبی سیب (*P. expansum*) به روش مخلوط با محیط کشت آگار

نتایج آنالیز واریانس بصورت طرح فاکتوریل نشان داد که اثر روش کاربرد (روش نانو یا متداول) و نوع ترکیب (عصاره انار، عصاره میخک، گالیک اسید و مونت موری لونیت) در سطح ۰/۰۰۱ معنی‌دار بود (جدول ۲). مقایسه میانگین به روش دانکن هم نشان دادند که در حالت متداول، اثر عصاره انار بیشترین اثر ضد قارچی را داشت (شکل ٦، روش متداول). تاثیر عصاره میخک ۲۰ درصد کمتر از عصاره انار بود دلیل این را به نوع پلی فنل‌های موجود در عصاره انار می‌توان ربط داد.

نتایج مقایسه میانگین اثر ترکیبات به‌صورت اینترکلینت‌شده درون نانو ذرات مونت موری لونیت هم جالب توجه بود. نتایج نشان دادند که اینترکلیت کردن عصاره انار باعث افزایش معنی دار اثر ضد قارچی آن از ۲۵٪ به ۳٦٪ شد (شکل ٦). اینترکلیت کردن عصاره میخک و گالیک اسید هم باعث افزایش اثرات ضد قارچی آن‌ها به ترتیب از ٦ ٪ و ٤٪ به ۱۳٪ شد (شکل ٦). لذا می‌توان نتیجه‌گیری کرد که اینترکلیت کردن عصاره درون نانو ذرات مونت موری لونیت، کارایی آن را به‌طور معنی‌داری افزایش داده است.

بحث

در روش"مخلوط با محیط کشت مایع" (شکل ٤ و ٥)، اختلافی بین تاثیر عصاره تنها و عصاره اینترکلیت‌شده درون مونت موری لونیت وجود نداشت این در حالی‌ست که در روش"مخلوط با محیط کشت آگار" بین این دو تیمار اختلاف بسیار معنی داری در سطح ۰/۰۰۱ وجود داشت (شکل ٦). باید در نظر داشت که روشی که اکثر محقین جهت سنجش اثرات ضد قارچی ذرات رس و عصاره گیاهان بکار می‌برند روش " مخلوط با محیط کشت آگار" است (Elsherbiny et al., 2016; Al-Askar, 2012; Al-Zoreky, 2009;Lavie & Stotzky, 1986) و



شکل۵- مقایسه فعالیت ضد قارچی عصاره انار اینترکلیت شده (Mt-Pom)، عصاره میخک اینترکلیت شده (Mt-Clove) گالیک اسید (Mt-GA) اینتر کلیت شده، نانو ذرات مونت موری لونیت (Mt) و قارچ‌کش شیمیایی (Fu) در کنترل قارچ *P. expansum* در روش مخلوط با محیط کشت مایع.

Figure 5. Comparison the antifungal effect of intercalated pomegranate extract (Mt-Pom), intercalated clove extract (Mt-Clove), intercalated gallic acid (Mt-GA), nano particles of montmorillonite and commercial fungicide on *P. expansum* in broth dilution method.

جدول ۲- نتایج آنالیز واریانس (طرح فاکتوریل) اثر ضد قارچی تیمارهاری مختلف به روش مخلوط با محیط کشت آگار بر روی قارچ *P.expansum*

Table 2. Analysis of variance (factorial design) the antifungal effect of different treatments on *P. expansum* growth in the agar well-diffusion method.

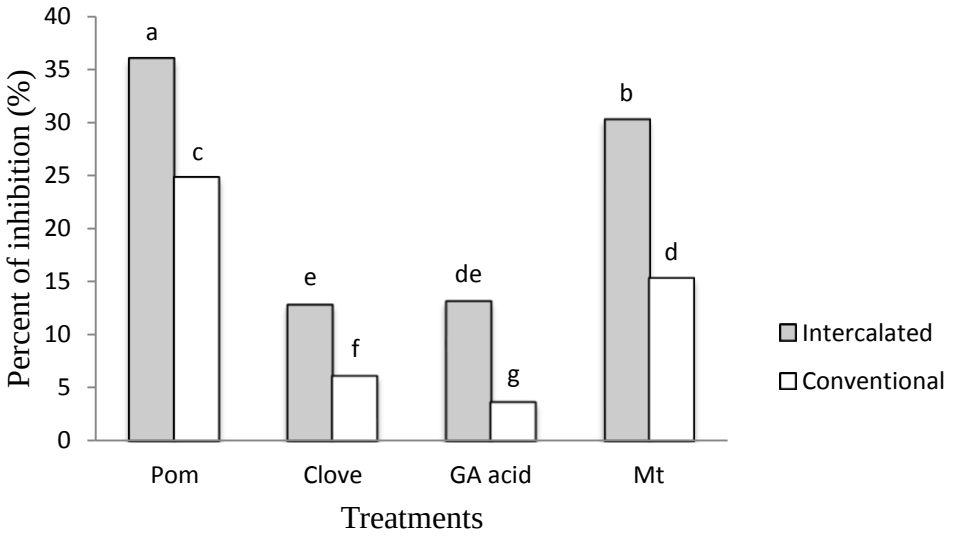
S.O.V	df	MS	F
Block	3	5	3.8
(T_1) Method	1	473	364***
(T_2) Compound	3	475	365***
(T_3) Solvent	1	185	142***
T_1*T_2	3	12.5	9.59***
T_1*T_3	1	0.36	0.28
T_2*T_3	3	15	11***
T_1*T_2*T_3	3	16	12***
Error	45	1.3	

*** معنی دار در سطح ۰/۰۰۱ ($p<0.001$)

روش "مخلوط با محیط کشت مایع" اغلب جهت سنجش حداقل غلظت بازدارندگی استفاده می‌شود (Elsherbiny et al., 2016). دلیل این امر هم کاملا مشخص است چرا که نتایج روش مخلوط با محیط جامد آگار بسیار نزدیک به شرایط طبیعی میوه است تا نتایج روش مخلوط با محیط مایع.

در روش مخلوط با محیط کشت آگار، فعالیت ضد قارچی عصاره انار بطور کاملا معنی داری بیشتر از عصاره میخک بود. این در حالیست که میزان کل پلی فنل برگ میخک بسیار بیشتر از پوست انار گزارش شده است (Perez-Jimenez et al., 2010). بنظر می‌رسد نوع نوع پلی فنل تاثیر بسیار مهمی در اثرات آنتی قارچی آن دارد. پلی فنل‌های پوست انار شامل کاتچین، کورونیک اسیدن، الاجیک اسید، پونیکالاجین، و...هستند (Elsherbiny et al., 2016) که گزارشات در مورد اثرات ضد قارچی آنها بسیار بیشتر از روغن‌های فنلیک و فرار میخک یعنی Anethol و Augenol می‌باشند (Perez-Jimenez et al., 2010).

محققین دلیل کاهش رشد قارچ در اثر عصاره انار را وجود ترکیبات پلی فنل‌های موجود در عصاره می‌دانند. این ترکیبات از طریق تخریب تراوایی و نفوذپذیری سلول،



شکل٦- مقایسه فعالیت ضد قارچی (بازدارندگی قطر پرگنه قارچ) عصاره انار (pom)، عصاره میخک (Clove) و گالیک اسید (GA) در دو حالت اینتر کلیت شده درون نانو ذرات مونت موری لونیت (Mt) و حالت رایج، و ذرات مونت موری لونیت در دو حالت نانو و میکرو، در کنترل قارچ *P.expansum* به روش مخلوط با محیط کشت آگار

Figure 6. Comparison the antifungal effect of pomegranate extract, clove extract and gallic acid applied in conventional and intercalated method, and micro and nano particles of montmorillonite (Mt) on *P. expansum* at agar well-diffusion method.

باعث بهم خوردن تعادل فشار اسمزی داخل سلول شده و در نتیجه باعث از هم پاشیدگی ارگانل‌های سلولی، نشت اجزاء سلولی و بالاخره مرگ سلول می‌شوند (Elsherbiny et al., 2016). الشربانی (۲۰۱٦) هم اثر قارچ کشی عصاره انار روی قارچ *Fusarium sambucinum* به روش مخلوط با محیط کشت آگاردار مورد آزمایش قرار داد که دریافت عصاره انار در غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر میلی لیتر (۲٪)، باعث کاهش ۷۵ ٪ رشد میسلیوم قارچ شد. در آزمایش حاضر، غلظت ۱۵ میلی‌گرم بر میلی لیتر عصاره متانولی انار (۱/۵٪)، باعث کاهش ۲۵٪ بیوماس قارچ شد (شکل ۳)، که کمتر از آزمایش الشربانی بود (Elsherbiny *et al.*, 2016). البته در آزمایش الشربانی ذکر نشده است که رشد قارچ چند روز بعداز اثر دادن عصاره، اندازه‌گیری شد، چرا که بر طبق آزمایش Beyki *et al.* (2014) و Askarne *et al.* (2012) زمان اندازه‌گیری بشدت روی نتایج تاثیر می‌گذارد. العسکر (۲۰۱۲) هم عصاره انار را روی قارچ‌های مختلف آزمایش کرد و دریافت که ۹ روز پس از اثر دادن عصاره در غلظت ۳٪، میزان کاهش رشد قارچ در روش مخلوط با محیط کشت آگار، در قارچ‌های *Phoma destructiva*، *Fusarium oxysporum*، *Sclerotium rolfsii*، *Alternsaria alterna* و *Rhizoctonia solani* به ترتیب ۰٪، ۲٤٪، ۳۸٪، ۱۸٪ و ۰٪ بود، که کمتر از آزمایش حاضر است. این در حالی است که غلظت عصاره کاربردی هم دو برابر آزمایش حاضر بود. این نتایج نشان می‌دهند که در آزمایش حاضر عصاره انار بسیار موثرتر از آزمایش العسکر عمل کرده است چراکه با وجود کاربرد غلظت کمتر (۱/۵٪) عصاره انار توانست تا حدود ۲۵٪ رشد قارچ را کاهش دهد. دلیل این امر را می‌توان به

نوع پلی فنل‌های موجود در عصاره انار بومی ایران نسبت داد (Elsherbiny *et al.*, 2016). البته نوع قارچ مورد تحقیق هم می‌تواند موثر باشد. آلزورکی (۲۰۰۹) هم اثر عصاره متانولی و آبی انار را روی میکروارگانیسم های مختلف مورد بررسی قرار داد و دریافت که در غلظت تقریبا مشابه آزمایش حاضر، عصاره آبی هیچ اثر بازدارندگی روی این قارچ نداشت ولی عصاره متانولی توانست فقط به میزان ۱۲ mm اثر بازدارندگی داشته باشد. جالب اینجاست که غلظت آمپی‌سیلین کاربردی به‌عنوان یک آنتی بیوتیک بسیار پایین‌تر (یک‌چهلم) از غلظت عصاره کاربری بود. حداقل غلظت بازدارندگی آمپی‌سیلین هم یک‌هزارم غلظت عصاره کاربردی بود. این امر بیان می‌کند که اگر تاثیر عصاره نسبت به قارچ‌کش تجاری کمتر بود، زیاد ناامید کننده نیست. چراکه می‌توان با خالص‌سازی عصاره اثر آن را به مراتب افزایش داد. علاوه بر این کاربرد عصاره به عنوان قارچ‌کش بسیار زیست محیط دوست تر (Eco-friendly) است. به این معنی که در طول دوره تولید آن کمترین استفاده از مواد شیمیایی می‌شود، لذا مواد مضر کمتری وارد محیط زیست می‌شود. علاوه بر این در صورت ورود آن به چرخه غذایی انسان، اثرات سرطان‌زایی آن کمتر است. مهمتر از همه اینکه وقتی بقایای این عصاره وارد خاک می‌شود برای موجودات و جمعیت زیستی خاک زیاد مضر نیست. باید توجه داشت که یکی از زنده ترین و متنوع ترین اکوسیستم‌های زیستی، اکوسیستم زنده خاک است. حفظ کارکرد زیستی این جمعیت، برای رشد و تولید گیاه از هر عامل دیگر از جمله کود دهی، آبیاری و مصرف سایر نهادها مهمتر است.

نتایج همچنین نشان دادند (در روش مخلوط با محیط کشت آگار) که اینترکلیت کردن عصاره درون نانو ذرات سیلیکاتی کارایی آن را به‌طور معنی‌داری افزایش داده است. بر طبق تحقیقات سایر محققین، دلیل این امر کاملا مشخص است. اولا اینکه در حالت مصرف به‌صورت معمول، در طول ۱۰ روز ماندگاری عصاره درون محیط کشت مایع، پلی فنل‌های گیاهی خیلی سریع تجزیه شده و بی اثر می‌شوند (Rabiei et al., 2016) ولی در حالت اینتر کلیت‌شده پلی فنل‌ها به دلیل اتصال به سطح بیرونی و خارجی لایه‌های مونت موری لونیت به کمک پیوندهای هیدروژنی، از این تجزیه محافظت می‌شود. ثانیا خود نانوذرات مونت موری لونیت هم فعالیت ضد قارچی بسیار معنی داری داشتند (شکل ٦) که می‌تواند با عصاره اثر هم افزایی داشته باشد. بر طبق یافته‌های Lavie & Stotzky (1986) مونت موری لونیت با اتصال به میسلیوم‌های قارچ و محدود کردن تنفس، باعث جلوگیری از رشد آن می‌شود. دونسی و همکاران (۲۰۱۰) هم عصاره میوه گلابی و پرتقال را درون سیستم‌های نانومتری انکپسوله کردند و اثر این ترکیبات انکپسوله را روی میکروارگانیسم ها بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که انکپسوله کردن باعث افزایش فعالیت ضد میکروبی و همچنین پایداری آن می‌شود (Donsì et al., 2011). بیکی و همکاران (۲۰۱٤) هم دریافتند که آنکپسوله کردن روغن‌های ضروری گیاه نعنا درون نانوژل کیتوزان–سیامیک اسید اثر قارچ کشی عصاره را روی *Aspergilus flavus* به‌طور معنی‌داری افزایش داد. جالب اینجاست که در این آزمایش هم اثر کشندگی ژل کیتوزان–سیامیک اسید مشابه عصاره خالص‌شده نعنا (روغن‌های ضروری) بود. در این آزمایش از روغن‌های ضروری و خالص‌شده گیاه نعنا که بسیار گران قیمت هم هست استفاده شد، به همین دلیل حداقل غلظت بازدارندگی بسیار پایین‌تر از آزمایش حاضر بود (۳۰۰ ppm یا ۰/۳ mg/ml) (Beyki *et al.*, 2014). لذا پیشنهاد می‌شود در تحقیقات آینده با خالص سازی عصاره

و افزایش درصد پلی فنل‌ها، اثر گذاری آن را افزایش داد.

نتایج این پژوهش در کل نشان دادند که کنترل بیمارهای پس از برداشت با ترکیبات زیستی مانند پلی فنل‌های گیاهی می‌تواند یک روش امید بخش باشد. این نتایج همچنین نشان دادند که نانو کردن عصاره‌های پلی فنلی گیاهی به‌طور معنی‌داری باعث افزایش فعالیت ضدقارچی و پایداری آن می‌شود. در بین ترکیبات کاربردی عصاره اینترکلیت شده پوست انار بیشترین اثربازدارندگی را روی رشد قارچ داشته و مشاهده شد که نانو ذرات سیلیکات با عصاره پلی فنلی موجود در انار اثر هم‌افزایی دارند. البته باید در نظر داشت که جهت رسیدن به نتایج در حد قارچ کش تجاری هنوز به تحقیقات خیلی بیشتری نیاز است.

تشکر و قدردانی

در پایان بدینوسیله از همکاری صمیمانه، خانم مهندس مهرنوش محمدی فر و آقای غلامرضا پازوکی قدردانی می‌نمایم.

منابع

هادیان، ج.، طباطبائی، س.م.، صالحی،پ.، حاجی اقراری، ب.، و قربان پور، م. (۱۳۸۵). بررسی فیتوشیمیایی اسانس *Cymbopogon parkeri Stapf* و اثرات بیولوژیک آن بر روی برخی قارچ‌های بیماری‌های گیاهی. مجله علوم کشاورزی ایران. ۳۷: ۴۳۱-۴۲۵.

Al-Askar, A.A. (2012). In vitro antifungal activity of three Saudi plant extract against some phytopathogenic fungi. *Journal of Plant Protection Research*, 52, 458-462

Askarne L., Talibi I., Boubaker H., Boudyach E., Msanda F., Saadi, B. Serghini M. and Aoumar, A. A. B. (2012). In vitro and in vivo antifungal activity of several Moroccan plants against *Penicillium italicum*, the causal agent of citrus blue mold. *Crop Protection*, 40, 53-58.

Al-Zoreky, N. (2009). Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. *International Journal of Food Microbiology*, 134(3), 244-248.

Beyki M. Zhaveh S. Khalili S. T. Rahmani-Cherati T. Abollahi A. Bayat M., Tabatabaei, M. & Mohsenifar, A. (2014). Encapsulation of *Mentha piperita* essential oils in chitosan–cinnamic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against Aspergillus flavus. *Industrial Crops and Products*, 54, 310-319.

Donsì, F., Annunziata, M., Sessa, M. & Ferrari, G. (2011). Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. *LWT-Food Science and Technology*, 44(9), 1908-1914

Elsherbiny, E. A., Amin, B. H. & Baka, Z. A. (2016). Efficiency of pomegranate (*Punica granatum* L.) peels extract as a high potential natural tool towards Fusarium dry rot on potato tubers. *Postharvest Biology and Technology*, 11: 256-263

Golbashy, M., Sabahi, H., Allahdadi, I., Nazokdast, H., Hosseini, M. 2017. Synthesis of highly intercalated urea-clay nanocomposite via domestic montmorillonite as eco-friendly slow-release fertilizer. Arch. Agron. *Soil Science*, 63, 84-95.

Jafari, Y., Sabahi, H., Rahaie, M. 2016. Stability and loading properties of curcumin encapsulated in Chlorella vulgaris. *Food Chemistry*. 211, 700-706.

Janisiewicz, W. J. & Korsten, L. (2002). Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annual Review of Phytopathology*, 40(1), 411-441.

Jones, A. L. . (1990). Compendium of apple and pear diseases. *American Phytopathological Society Press*, 1(1), 1-9.

Lavie, S. & Stotzky G. (1986). Adhesion of the clay minerals montmorillonite, kaolinite, and attapulgite reduces respiration of *Histoplasma capsulatum*. *American Society for Microbiology*, 51(1), 65-73

Liu, H., Guo, J., Cheng, Y., Liu, P., Long, C. & Deng, B. (2010). Inhibitory activity of tea polyphenol and *Hanseniaspora uvarum* against *Botrytis cinerea* infections. *Letters in Applied Microbiology*, 51(3), 258-263

Liu, M., Seidel, V., Katerere, D. R. & Gray, A. I. (2007). Colorimetric broth microdilution method for the antifungal screening of plant extracts against yeasts. *Methods*, 42(4), 325-329.

Navarta, L. G., Calvo, J., Posetto, P., Cerutti, S., Raba, J., Benuzzi, D. & Sanz ,M. I. (2014). Postharvest control of gray mold in apples with lyophilized formulations of *Cryptococcus laurentii*: the effect of cold stress in the survival and effectiveness of the yeast. *Food and Bioprocess Technology*, 7(10), 2962-2968.

Perez-Jimenez, J., Neveu, V., Vos, V., & Scalbert, A. (2010). Identification of the 100 richest dietary sourcesof polyphenols: an application of the Phenol-Explorer database. *European Journal of Clinical Nutrition*, 64, 112–120.

Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C. & Pouységu, L. (2011). Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, 50(3), 586-621.

Rabiei, M., Sabahi, H., Rezayan, AH. (2016). Gallic acid-loaded montmorillonite nanostructure as a new controlled release system. *Appied. Clay Science*. 119, 236-242.

Robert, P., Gorena, T., Romero, N., Sepulveda, E., Chavez, J. & Saenz, C. (2010). Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegranate (*Punica granatum*) by spray drying. *International Journal of Food Science and Technology*, 45(7), 1386-1394.

Rabiei, M., Sabahi, H., & Rezayan, A. H. (2016). Gallic acid-loaded montmorillonite nanostructure as a new controlled release system. *Applied Clay Science*, *119*, 236–242.

Sanderson, P. & Spotts, R. (1995). Postharvest decay of winter pear and apple fruit caused by species of *Penicillium*. *Phytopathology*, 85(1), 103-110.

Sharma, R., Singh, D. & Singh, R. (2009). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological Control*, 50(3),205-221

Ventura, J., Belmares, R., Aguilera-Carbo, A., Gutiérrez-Sanchez, G., Rodríguez-Herrera, R. & Aguilar, C. N. (2008). Fungal biodegradation of tannins from creosote bush (*Larrea tridentata)* and tar bush (Fluorensia cernua) for gallic and ellagic acid production. *Food Technology and Biotechnology*, 46(2),3-21

Volf, I., Ignat, I., Neamtu, M. & Popa, V. I. (2014). Thermal stability, antioxidant activity, and photo-oxidation of natural polyphenols. *Chemical Papers*, 68(1), 121-129

Wisniewski, M. E. & Wilson, C. L. (1992). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: recent advances. *HortScience*, 27(2), 94-98.