دوماهنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijmapr.2018.114890.2094
جلد ۳۴، شماره ۱، صفحه ۸۶-۷۷ (۱۳۹۷)

فعالیت ضدقارچی کلاله زعفران (*Crocus sativus* L.) علیه گونه‌های مختلف *Aspergillus* و تولید زهرابه در محیط آزمایشگاهی

سیدجواد صانعی[1*] و سید اسماعیل رضوی[2]

۱*- نویسنده مسئول، مربی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران، پست‌الکترونیک: sa_nei@yahoo.com

۲- استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۹۶ تاریخ اصلاح نهایی: آبان ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: دی ۱۳۹۶

چکیده

با توجه به اهمیت گونه‌های مختلف *Aspergillus* از نظر فساد مواد غذایی و تولید زهرابه، در این تحقیق اثرات ضدقارچی زعفران (*Crocus sativus* L.) علیه *Aspergillus niger*، *Aspergillus flavus* و *Aspergillus parasiticus* و تولید زهرابه در شرایط آزمایشگاه بررسی شد. بدین منظور، مقدار ۰، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم زعفران پودر شده به‌ازای هر میلی‌لیتر محیط کشت Yeast Extract Sucrose (YES) اضافه گردید و رشد میسیلیومی قارچ‌ها ۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ روز پس از تلقیح اندازه‌گیری شد. سنجش پیکروکروسین، سافرانال و کروسین زعفران به‌روش رنگ‌سنجی انجام گردید. میزان آفلاتوکسین B1 (AFB1) نیز در روز سی‌ام به روش کروماتوگرافی لایه نازک اندازه‌گیری گردید. مقادیر کروسین، پیکروکروسین و سافرانال در عصاره‌های تهیه شده از زعفران مورد بررسی به‌ترتیب ۰/۵۲±۲۳۱/۲۰، ۰/۸۵±۸۷/۱۶ و ۰/۲۵±۳۴/۸۶ میلی‌گرم/ گرم وزن خشک محاسبه شد. به‌طوری که با اضافه شدن زعفران به‌میزان ۱۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر به محیط کشت YES، رشد میسیلیومی گونه‌های مختلف *Aspergillus* نسبت به شاهد (فاقد زعفران) ۲۹ تا ۳۲ درصد کاهش می‌یافت. همچنین با اضافه کردن زعفران به محیط کشت YES، تولید زهرابه AFB1 از ۵ میکروگرم/ میلی‌لیتر به سطح غیرقابل ردیابی کاهش داشت. تأثیر زعفران بر کاهش رشد میسیلیومی و کاهش تولید AFB1 بین گونه‌های مختلف *Aspergillus* فاقد اختلاف معنی‌دار بود. این نتایج استفاده از زعفران را در صنایع داروسازی و به‌عنوان افزودنی‌های مواد غذایی برای جلوگیری از رشد گونه‌های *Aspergillus* و تولید زهرابه پیشنهاد می‌کند.

واژه‌های کلیدی: آفلاتوکسین، بازدارندگی، زعفران (*Crocus sativus* L.)، *Aspergillus*.

مقدمه

مسمومیت‌های قارچی در حال حاضر یکی از شایع‌ترین و مهمترین مشکلات تغذیه‌ای در بسیاری از کشورهای جهان، به‌ویژه در خاورمیانه و مناطق گرمسیری به‌شمار می‌رود. این نوع مسمومیت به‌ویژه برای طیور به‌دلیل قارچ‌زدگی مواد اولیه غذایی در انبار اهمیت زیادی دارد (Strosnider *et al*., 2006). با توجه به اهمیت کپک‌ها در مواد غذایی، پژوهش‌های وسیعی روی این قارچ‌ها و متابولیت‌های ثانویه آنها، به‌ویژه آفلاتوکسین انجام شده است (Tzanidi *et al*., 2012). آفلاتوکسین‌ها به‌عنوان شناخته‌شده‌ترین زهرابه‌های قارچی است که روی طیف وسیعی از غلات، حبوبات، میوه‌جات و سایر

محصولات غذایی از زمان تولید مواد خوراکی، عمل‌آوری، حمل‌ونقل و انبارداری تولید می‌شوند (Hedayati *et al*., 2016). جنس *Aspergillus* با بیش از ۲۰۰ گونه به‌طور گسترده در رابطه با بهداشت مواد غذایی به‌ویژه تولید آفلاتوکسین مورد بررسی قرار گرفته‌است (Rahimi & Ameri, 2012؛ Movassagh, 2011) و گونه‌های *Aspergillus flavus* و *Aspergillus parasiticus* از مهمترین گونه‌های تولیدکننده آفلاتوکسین محسوب می‌شوند (Zain *et al*., 2011؛ Anaissie *et al*., 2003).

آفلاتوکسین‌ها منجر به سرطان و سرکوب سیستم ایمنی در انسان و حیوانات می‌شوند (Olojede *et al*., 1995) و با توجه به ارتباط مستقیم بین رشد قارچ و تولید آفلاتوکسین به‌ویژه آفلاتوکسین B1 (AB1) در گونه‌های مختلف *Aspergillus*، پژوهش‌های متعددی برای کاهش رشد آنها در مواد غذایی انجام شده‌است (Moosavian *et al*., 2016). ظهور گونه‌های مختلف قارچی مقاوم به ترکیب‌های ضدقارچی پژوهشگران را به گسترش روش‌های درمانی جدید در مبارزه با قارچ‌ها معطوف کرده است (Erturk, 2006). از این روش‌ها می‌توان به استفاده از منابع طبیعی ازجمله گیاهان و میکروارگانیسم‌های مفید و متابولیت‌های تولید شده از آنها به‌عنوان روش‌های زیست فناور و ایمن اشاره کرد. از طرفی، در بین گیاهان، گیاهان دارویی به‌دلیل داشتن طیف گسترده‌ای از ترکیب‌های مفید، توجه زیادی را به‌خود معطوف کرده‌اند. با توجه به اثرات شناخته شده ضدمیکروبی عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی و اجزای تشکیل‌دهنده آنها برخی از تحقیقات روی کاربرد گیاهان دارویی به‌ویژه اسانس و عصاره‌های آنها برای جلوگیری از رشد قارچ‌ها و ممانعت از تولید زهرابه متمرکز شده است (Deabes *et al*., 2011).

ازجمله اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی زعفران (*Crocus sativus* L.) می‌باشد. زعفران گیاهی کوچک و چندساله از خانواده زنبق (Iridaceae) است که کلاله خشک شده گل آن به‌عنوان زعفران در صنایع غذایی (طعم‌دهنده و رنگین‌کننده غذا)، صنعت دارویی (آرام‌بخش و مسکن بیماری آسم، سیاه‌سرفه و التهاب) و رنگ کردن پارچه مورد استفاده قرار می‌گیرد (Carmona *et al*., 2007). زعفران از زمانهای قدیم به‌طور وسیعی به‌عنوان دارو در درمان بیماری‌ها و تقویت سلامتی به‌ویژه در خاورمیانه و جنوب‌غربی آسیا بکار می‌رفته است (Afrazeh *et al*., 2014). کلاله که قسمت اصلی زعفران تجارتی را تشکیل می‌دهد دارای رنگ، طعم و عطر مخصوصی است که هر یک از این ویژگی‌ها به گروهی از ترکیب‌های شیمیایی موجود در آن مانند کروسین، پیکروکروسین و سافرانال مربوط می‌شود و خواص دارویی زعفران به ترکیب‌های شیمیایی مذکور نسبت داده می‌شود (Maghsoodi *et al*., 2012).

اگرچه استفاده دارویی زعفران به‌دلیل کاربردهای گسترده این ماده به‌عنوان یک ادویه و عامل رنگ‌دهنده در چند دهه گذشته به‌شدت کاهش یافته است، اما امروزه با مشخص شدن نقش زیستی برخی از فرآورده‌های طبیعی آن در کاهش ابتلا به سرطان، همچنین به تأخیر انداختن سرطان‌زایی به‌طور گسترده مورد توجه قرار گرفته است (Acar *et al*., 2010). تعدادی از مطالعات نیز بیانگر فعالیت ضدمیکروبی عصاره کلاله و گلبرگ زعفران می‌باشد. در این رابطه، فعالیت ضدباکتریایی این ترکیب مورد توجه بیشتری بوده است (Vahidi *et al*., 2002). همچنین ممانعت از *Helicobacter pylori* توسط عصاره‌های متانولی زعفران، سافرانال و کروسین گزارش شد (Nakhaei *et al*., 2008). فعالیت ضدقارچی زعفران نیز توسط تعدادی از محققان پیشنهاد شده است (Pintado *et al*., 2011؛ Muzaffar *et al*., 2016). Roudbary و همکاران (۲۰۰۹) تأثیر عصاره الکلی کلاله زعفران را بر مهار رشد *Candida albicans* و *Candida dulbliniensis* (از گونه‌های فرصت‌طلب کاندیدا) نشان دادند. عصاره گیاهان دارویی مختلف در کاهش رشد *A. flavus* و تولید Aflatoxin B_1 مؤثر بوده‌اند (Olojede *et al*., 1995). همچنین، روغن‌های اسانسی

رشد *A. flavus* و تولید Aflatoxin B_1 را کاهش می‌دادند (Mahmoud, 1994؛ Montes-Belmont & Carvajal, 1998). Pawar و Thaker (۲۰۰۶) تأثیر ۷۵ روغن اسانسی را بر رشد *A. niger* بررسی کردند، اما تأثیر زعفران را روی رشد قارچ مشاهده نکردند. در مقابل، تأثیر زعفران بر کاهش رشد *A. parasiticus* معنی‌دار بوده است (Tzanidi *et al*., 2012).

با توجه به اهمیت گونه‌های مختلف *Aspergillus* از نظر بهداشت مواد غذایی به‌ویژه تولید آفلاتوکسین و ارتباط مستقیم بین رشد و تولید آفلاتوکسین در گونه‌های مختلف *Aspergillus* (Moosavian *et al*., 2016) و کاربرد زعفران در صنایع غذایی، در این تحقیق اثرات ضدقارچی زعفران بر مهار رشد میسیلیومی و تولید زهرابه سه گونه از *Aspergillus* بررسی شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های زعفران

نمونه‌های زعفران از منطقه قائن جمع‌آوری شد. برای تهیه عصاره، ۲ گرم زعفران آسیاب شده که ذرات آن از الک با مِش ۱۰۰ عبور داده شده بود، استفاده گردید.

کیفیت زعفران

برای بررسی کیفیت زعفران مورد استفاده در این تحقیق، ابتدا از نمونه مورد نظر عصاره‌گیری بعمل آمد. در این رابطه، نمونه‌های حاصل با آب مقطر در دمای اتاق مخلوط گردید و به‌مدت ۵ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت. سپس برای جداسازی فیبرهای زعفران، مخلوط حاصل سانتریفیوژ شد و محلول شفاف رویی جداسازی شد. برای اندازه‌گیری قدرت رنگی، عطر و طعم زعفران که هر یک به‌ترتیب به ترکیب‌های پیکروکروسین، سافرانال و کروسین موجود در آن است، مطابق با استاندارد بین‌المللی ISO 3632 در طول موج ۲۵۷، ۳۳۰ و ۴۴۰ نانومتر استفاده گردید (Maghsoodi *et al*., 2012).

جدایه‌های قارچ

جدایه *A. parasiticus* (PTCC S286) با قابلیت زهرابه‌زایی از مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران و جدایه‌های *A. flavus* و *Aspergillus niger* از کلکسیون قارچ‌های گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان تهیه شد. منشأ این قارچ‌ها به‌ترتیب از پسته (رفسنجان) و خاک (گرگان) بوده است.

اثر ضدقارچی

رشد قارچ‌های مورد مطالعه در محیط کشت Yeast Extract Sucrose (YES) انجام شد (Tzanidi *et al*., 2012). به همین منظور، به فلاسک‌های ۱۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۰ میلی‌لیتر از محیط YES استریل شده، $۱×۱۰^{۶}$ اسپور به‌ازای هر میلی‌لیتر محیط اضافه گردید. قبل از تلقیح فلاسک‌ها، مقدار ۰، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم زعفران پودر شده به‌ازای هر میلی‌لیتر محیط کشت اضافه شد. فلاسک‌ها به مدت ۳۰ روز در شرایط دمایی ۲±۲۷ درجه سانتی‌گراد و تاریکی قرار گرفتند. سپس رشد ریسه‌ای قارچ‌ها ۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ روز پس از تلقیح پس از صاف کردن محیط به‌همراه ریسه تولید شده از کاغذ صافی واتمن ۴۲ و خشک کردن کاغذ در دمای ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت انجام شد.

سنجش کلی آفلاتوکسین

به‌منظور استخراج زهرابه‌های تولید شده از روش Moosavian و همکاران (۲۰۱۶) استفاده شد. در این روش بعد از ۳۰ روز رشد قارچ‌ها در محیط کشت YES و عبور محتویات فلاسک‌ها از کاغذ صافی شماره ۱، عصاره بدست آمده در دمای ۷۰ درجه سلسیوس قرار گرفت. پس از خشک شدن عصاره استخراج شده، ۲ میلی‌لیتر محلول متانول- آب (۱۰ به ۹۰) به آن اضافه گردید و به‌مدت یک ساعت در دمای اتاق قرار گرفت. سپس ۲ میلی‌لیتر محلول متانول- آب (۵ به ۹۵) و ۲ میلی‌لیتر محلول استونیتریل- متانول (۳ به ۱) نیز به آن

افزوده شد و به‌منظور تبخیر دوباره حلال، دوباره در آون با دمای ۷۰ درجه سلسیوس قرار گرفت. در نهایت، به عصاره خشک شده ۲ میلی‌لیتر محلول متانول- آب (۵ به ۹۵) اضافه شد و عصاره‌های استخراج شده در دمای ۲۰- نگهداری شدند. سنجش کلی آفلاتوکسین تولید شده به روش کروماتوگرافی لایه نازک (Thin Layer Chromatography= TLC) انجام شد. در این خصوص، محلول نمونه و استاندارد آفلاتوکسین در یک راستا نقطه‌گذاری گردید و در مخزن حاوی متانول- استونیتریل (۸۸: ۱۲) قرار داده شد. پس از خشک کردن صفحه‌ها در دمای اتاق، شدت نقاط در طول موج ۳۶۵ نانومتر ارزیابی شد.

تجزیه‌وتحلیل داده‌ها

مطالعه در سه تکرار به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد و برای هر تکرار یک فلاسک در نظر گرفته شد. نتایج بدست آمده با روش آنالیز واریانس (ANOVA) مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفت و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD انجام شد. تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار R 3.3.1 انجام و ترسیم شکل‌ها توسط نرم‌افزار Excel 2007 انجام شد.

نتایج

مقادیر کروسین، پیکروکروسین و سافرانال عصاره‌های تهیه شده از زعفران مورد بررسی ۰/۵۲±۲۳۱/۲۰، ۰/۸۵±۸۷/۱۶ و ۰/۲۵±۳۴/۸۶ میلی‌گرم/ گرم وزن خشک محاسبه شد.

نتایج تجزیه واریانس تأثیر غلظت‌های مختلف از کلاله زعفران بر رشد میسیلیومی سه گونه از قارچ *Aspergillus* اثر معنی‌دار منابع تغییراتِ غلظت‌های مختلف از پودر کلاله زعفران، زمان، غلظت‌های مختلف از پودر کلاله زعفران × زمان و غلظت‌های مختلف از پودر کلاله زعفران × زمان × گونه *Aspergillus* را بر میزان رشد میسیلیومی را در سطح ۱٪ ($P\leq0.01$) و اثر غلظت‌های مختلف از پودر کلاله زعفران × گونه *Aspergillus* و زمان × گونه *Aspergillus* را در سطح ۵٪ ($P\leq0.05$) نشان داد (جدول ۱). البته نتایج تجزیه واریانس تأثیر معنی‌دار زعفران را بر کاهش رشد میسیلیومی بین گونه‌های مختلف *Aspergillus* نشان نداد ($P\leq0.05$). رشد میسیلیومی در تیمار ۱۰ میلی‌گرم کلاله زعفران به‌ازای میلی‌لیتر محیط کشت برای سه گونه *Aspergillus* مورد مطالعه کاهش معنی‌دار داشته است، اما تأثیر غلظت‌های ۰ و ۵ میلی‌گرم کلاله زعفران به‌ازای میلی‌لیتر محیط کشت بر ممانعت از رشد میسیلیومی قارچ‌های مورد مطالعه معنی‌دار نبوده است ($P\leq0.05$، جدول ۲). به‌منظور کمّی کردن تجزیه‌وتحلیل رشد میسیلیومی از روش رگرسیونی استفاده شد و با استفاده از مدل‌های رگرسیونی مرحله به مرحله، تغییرات وزن میسیلیوم در تیمارهای مختلف نسبت به زمان برازش داده شد. در این رابطه، کمترین خطا و بیشترین همبستگی برای مدل‌های نمایی بدست آمد (شکل ۱). این نتایج بیانگر الگوی مشابه افزایش میسیلیوم در تیمارهای ۰ و ۵ میلی‌گرم کلاله زعفران به‌ازای میلی‌لیتر محیط کشت بوده است. در این رابطه، روند افزایش میسیلیوم در تیمار ۱۰ میلی‌گرم کلاله زعفران به‌ازای میلی‌لیتر محیط کشت از شیب کمتری برخوردار بود (شکل ۱).

میزان تولید AFB1 توسط گونه‌های مختلف *Aspergillus* در محیط کشت YES پس از ۳۰ روز متفاوت بود و به‌ترتیب برای *A. niger*، *A. flavus* و *A. parasiticus* حدود ۱/۷۷±۲۷/۷۹، ۱/۴۴±۵۴/۳۲ و ۱/۶۷±۱۰۰/۹ میکروگرم برای هر فلاسک در محیط فاقد پودر کلاله زعفران بدست آمد. وجود پودر کلاله زعفران در محیط با کاهش تولید زهرابه همراه بوده است، به‌طوری که میزان آفلاتوکسین در غلظت ۱۰ میلی‌گرم پودر کلاله زعفران به‌ازای میلی‌لیتر محیط کشت قابل ردیابی نبود. رفتار گونه‌های مختلف *Aspergillus* در رابطه با کاهش تولید آفلاتوکسین در محیط واجد زعفران مشابه بوده است (جدول ۳).

جدول ۱- تجزیه واریانس تأثیر سه سطح از پودر کلاله زعفران بر رشد میسیلیومی سه گونه از *Aspergillus* در پنج زمان مختلف نمونه‌برداری

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
مقدار زعفران	۲	۰/۲۹۸۹**
زمان	۶	۰/۴۰۰۴ **
گونه *Aspergillus*	۲	۰/۰۰۱۰ n.s.
مقدار زعفران × زمان	۱۲	۰/۰۰۸۹ **
مقدار زعفران × گونه *Aspergillus*	۴	۰/۰۰۲۳ *
زمان × گونه *Aspergillus*	۱۲	۰/۰۰۱۳ *
مقدار زعفران × زمان × گونه *Aspergillus*	۲۴	۰/۰۰۱۴ **
باقیمانده	۱۲۶	۰/۰۰۰۵
ضریب تغییرات	۱۰/۶۲	

n.s.، * و **، به‌ترتیب بیانگر غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪ می‌باشند.

جدول ۲- مقایسه میانگین ممانعت از رشد میسیلیومی (گرم/ فلاسک) گونه‌های مختلف *Aspergillus* در محیط کشت YES با مقادیر مختلف از پودر کلاله زعفران پس از ۳۰ روز

گونه	مقادیر مختلف از پودر کلاله زعفران		
	۰	۵	۱۰
Aspergillus niger	۰ a*	۰ a	۳۲/۴۴ b
Aspergillus flavus	۰ a	۰ a	۳۰/۹۷ b
Aspergillus parasiticus	۰ a	۰ a	۲۹/۷۶ b

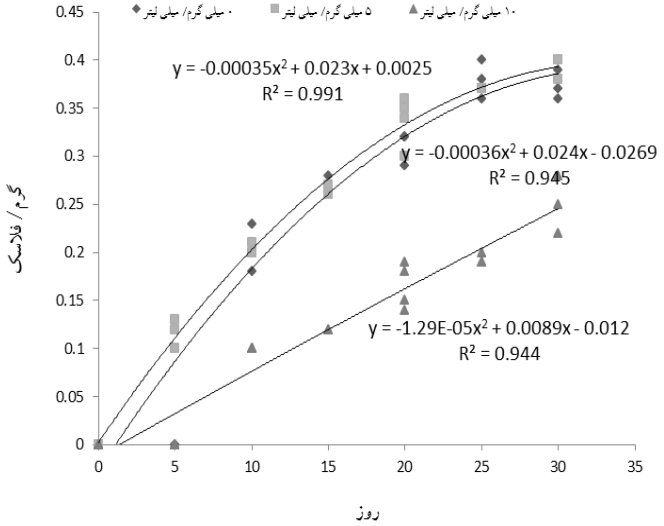
*: میانگین‌های دارای حروف مشابه براساس آزمون LSD فاقد تفاوت آماری در سطح احتمال ۵٪ می‌باشند.

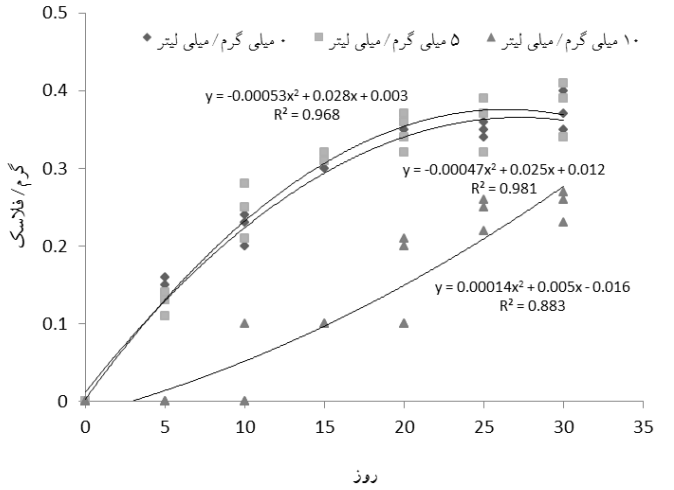
جدول ۳- ممانعت از تولید آفلاتوکسین AB1 توسط گونه‌های مختلف *Aspergillus* در محیط کشت YES (میکروگرم/ فلاسک) با مقادیر مختلف از پودر کلاله زعفران پس از ۳۰ روز

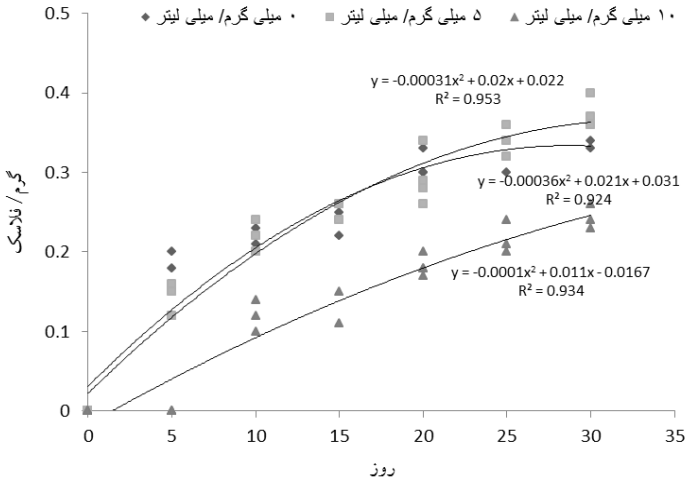
گونه	غلظت زعفران (میلی‌گرم/ میلی‌لیتر)		
	۰	۵	۱۰
Aspergillus niger	۲۷/۷۹c*	۲۳/۴۵c	–**
Aspergillus flavus	۵۴/۳۲b	۵۳/۲۹b	–
Aspergillus parasiticus	۱۰۴/۹۰a	۱۰۲/۴۰a	–

*: میانگین‌های دارای حروف مشابه براساس آزمون LSD فاقد تفاوت آماری در سطح احتمال ۵٪ می‌باشند.

**: غیرقابل ردیابی







شکل ۱- رشد میسیلیومی *Aspergillus niger* (A)، *Aspergillus flavus* (B) و *Aspergillus parasiticus* (C) در محیط کشت YES با مقادیر مختلف از پودر کلاله زعفران

بحث

مواد غذایی خام و فرآوری شده در طول دوره تولید، فروش و توزیع در معرض مشکلات ناشی از اکسایش و آلودگی به قارچ‌ها و باکتری‌های مختلف قرار دارند. به این ترتیب، استفاده از نگهدارنده‌ها به‌منظور افزایش طول دوره نگهداری ضروری به‌نظر می‌رسد. از طرفی، ایمن بودن مواد نگهدارنده شیمیایی همواره مورد تردید بوده است. در سال‌های اخیر به‌دلیل بروز مشکلات و خطرات ناشی از مصرف بی‌رویه نگهدارنده‌های شیمیایی و مضرات آنها و همچنین ایجاد مقاومت قارچ‌ها و باکتری‌ها به داروها و سموم مختلف، گرایش زیادی به استفاده از توانمندی بالقوه گیاهان دارویی به‌عنوان نگهدارنده‌های طبیعی در مواد غذایی در کنترل قارچ‌ها و سموم آنها ایجاد شده است. از این‌رو مطالعات مختلفی در ارتباط با اثر اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی مختلف روی باکتری‌ها و قارچ‌های بیماری‌زا با منشأ غذایی در محیط کشت و غذا انجام شده است (Erturk, 2006؛ Tzanidi *et al*., 2012).

در میان گیاهان دارویی، زعفران به‌دلیل داشتن مواد شیمیایی ضدمیکروبی مختلف به‌ویژه سافرانال از اهمیت زیادی برخوردار است (Carmona *et al*., 2007؛ Pintado *et al*., 2011). مقادیر محاسبه شده برای کروسین، پیکروکروسین و سافرانال در این مطالعه در محدوده گزارش‌های موجود بوده است (Maghsoodi *et al*., 2012). تفاوت میزان ترکیب‌های موجود در کلاله زعفران در مکانهای مختلف عمدتاً ناشی از تفاوت محیط، ژنتیک (رقم) و فعالیت‌های کشاورزی است (Abdullave & Ortega, 2007). این تفاوت می‌تواند اختلاف بین گزارش‌های مربوط به تأثیر ضدمیکروبی کلاله زعفران را توضیح دهد.

در مورد فعالیت ضدمیکروبی زعفران مطالعات بیشتر بر فعالیت ضدباکتریایی آن متمرکز بوده است. Vahidi و همکاران (۲۰۰۲) اثرات ضدمیکروبی عصاره قسمت‌های مختلف زعفران را علیه باکتری‌های *Microccucos luteus*، *Staphylococcus epidermitis*، *Staphylococcus aureus* و *E. coli* نشان دادند. طبق این بررسی عصاره قسمت‌های مختلف زعفران بجز برگ‌های آن روی میکروارگانیسم‌های مورد بررسی اثرات ضدمیکروبی داشته است. Acar و همکاران (۲۰۱۰) هم در مطالعه‌ای اثرات ضدمیکروبی زعفران بر باکتری‌های بیماری‌زای غذایی ازجمله *Bacillus subtilis*، *Staphylococcus aureus* و *E. coli* را نشان دادند. خاصیت ضدباکتریایی زعفران علیه *Salmonella enteric* از عوامل آلوده‌کننده مواد غذایی بود (Pintado *et al*., 2011). طبق بررسی‌های Muzaffar و همکاران (۲۰۱۶) فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌های بدست آمده از زعفران به روش‌های مختلف بیشتر از فعالیت ضدقارچی آنها بوده است. در این رابطه، فعالیت ضدباکتریایی بالای عصاره‌های بدست آمده علیه *Proteus vulgaris*، *Klebsiella pneumonia*، *Pseudomonas aeruginosa*، *S. aureus* و *E. coli* مشاهده شد (Muzaffar *et al*., 2016). بررسی اثر ضد هلیکوباکتریایی زعفران نیز نشان داد که زعفران اثرات ضد هلیکوباکتریایی متوسطی دارد (Nakhaei *et al*., 2008). فعالیت ضدقارچی زعفران نیز توسط تعدادی از محققان بررسی شده است. Vahidi و همکاران (۲۰۰۲) اثرات زعفران را روی قارچ‌های *C. albicans*، *A. niger* و *Cladospourium* sp. بررسی کردند و توانایی مهارکنندگی آن را بر قارچ‌های مورد مطالعه مشاهده نمودند. Roudbary و همکاران (۲۰۰۹) تأثیر عصاره الکلی کلاله زعفران را بر مهار رشد *C. albicans* و *Candida dulbliniensis* (از گونه‌های فرصت‌طلب کاندیدا) نشان دادند. برخلاف گزارش‌های مذکور، Pawar و Thaker (۲۰۰۶) تأثیر ۷۵ روغن اسانسی را بر رشد *A. niger* بررسی کردند، اما تأثیر زعفران را روی رشد قارچ مشاهده نکردند. البته عدم تأثیر ضدقارچی زعفران در مطالعات محققان دیگر نیز مشاهده می‌شود (Kamble & Patil, 2007؛ Sekine *et al*., 2007). در مقابل، تأثیر زعفران بر کاهش رشد *A. parasiticus* نیز معنی‌دار بوده است (Tzanidi *et al*., 2012). تأثیر معنی‌دار فعالیت ضدقارچی زعفران علیه *C. albicans*، *Aspergillus fumigates* و *Aspergillus niger* توسط Muzaffar و همکاران (۲۰۱۶) نیز مشخص گردید.

البته تفاوت‌های موجود در نحوه استخراج عصاره، نوع و میزان زعفران مورد آزمایش و ارزیابی خواص ضدمیکروبی عصاره‌ها می‌تواند سبب نتایج متفاوت در میزان بازدارندگی محاسبه شده در تحقیقات مختلف شود (Muzaffar *et al*., 2016؛ Singh *et al*., 2005). این موضوع به‌ویژه در رابطه با ارزیابی خواص میکروبی به روش انتشار دیسک قابل تأمل است. این روش غربالگری حساسیت میکروارگانیسم‌ها را نسبت به مواد بازدارنده مورد بررسی قرار می‌دهد، اما تحت تأثیر میزان و سرعت انتشار مواد بازدارنده در محیط کشت قرار دارد، بنابراین برای اندازه‌گیری دقیق فعالیت میکروبی به‌ویژه تأثیر ترکیب‌های بازدارنده بر رشد میسیلیومی قارچ‌ها مناسب نمی‌باشد (Almedia *et al*., 2006). این مطالعه در مورد اضافه کردن مواد بازدارنده به محیط کشت قبل از تلقیح آن از روش‌های مناسب برای اندازه‌گیری فعالیت ضدمیکروبی بر رشد میسیلیومی قارچ‌ها محسوب می‌شود (Tzanidi *et al*., 2012). این مطالعات به‌ویژه در مورد ارتباط رشد میسیلیومی گونه‌های مختلف قارچ *Aspergillus* و تولید زهرابه ارزشمند است.

با وجود اهمیت گونه‌های مختلف قارچ *Aspergillus* به‌عنوان یکی از آلوده‌کننده‌های مهم مواد غذایی و تولیدکننده زهرابه‌های سرطان‌زا و اثرات مهارکنندگی برخی از اسانس‌های گیاهان دارویی علیه *A. flavus* و *A. parasiticus* (Deabes *et al*., 2011؛ Viuda-Martos *et al*., 2008)، مطالعات تخصصی در مورد اثر گیاهان دارویی و میزان ترکیب‌های مؤثره آنها علیه گونه‌های مختلف قارچ *Aspergillus* و رشد میسیلیومی آنها که در ارتباط مستقیم با تولید زهرابه است، محدود بوده است (Gorran *et al*., 2015؛ Tzanidi *et al*., 2012). این تحقیق تأثیر زعفران را بر کاهش رشد میسیلیومی سه گونه از جنس *Aspergillus* یکسان نشان داد ($P\leq0.05$، جدول ۲). در این تحقیق مشخص شد که کاهش رشد به غلظت زعفران در محیط رشد بستگی دارد و غلظت ۱۰ میلی‌گرم آن در هر میلی‌لیتر محیط کشت با کاهش معنی‌دار رشد میسیلیومی همراه است. در این رابطه تأثیر غلظت ۵ میلی‌گرم آن در هر میلی‌لیتر محیط کشت فاقد کاهش معنی‌دار بر رشد میسیلیومی قارچ بوده است. این نتایج می‌تواند تفاوت حساسیت قارچ‌ها به زعفران را در مطالعات مختلف توجیه کند.

نتایج این مطالعه به‌طور کلی نشان‌دهنده اثر ضدمیکروبی زعفران بر سه گونه مختلف از قارچ *Aspergillus* می‌باشد. این بررسی همچنین تأثیر زعفران را بر کاهش تولید زهرابه توسط قارچ‌های مورد مطالعه نشان می‌دهد. بنابراین با توجه به اهمیت غلظت زعفران، استفاده از غلظت‌های مناسب آن در صنایع غذایی توصیه می‌شود.

منابع مورد استفاده

- Abdullave, F. and Ortega, C., 2007. HPLC quantification of major active components from different saffron (*Crocus sativus* L.) sources. Food Chemistry, 10(3): 1126-1131.
- Acar, G., Dogan, N., Duru, M.E. and Kivrak, E., 2010. Phenolic profiles, antimicrobial and antioxidant activity of the various extracts of *Crocus* species in Anatolia. African Journal of Microbiology Research, 4(11): 1154-1161.
- Afrazeh, Z., Bolandi, M., Khorshidi, M. and Mohammadi Nafchi, M., 2014. Evaluation of antioxidant activity of aqueous and alcoholic extracts (methanol, ethanol) saffron petals. Saffron Agronomy and Technology, 2(3): 231-236.
- Almedia, A.A.P., Farah, A., Silva, D.A.M, Nunan, E.A. and Beatriz, M.A.G., 2006. Antibacterial activity of coffee extracts and selected coffee chemical compounds against Enterobacteria. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54(23): 8738-8743.
- Anaissie, E.J., Ginnis, M.R. and Pfaller, M.A., 2003. Clinical mycology. Churchill Livingstone, Philadelphia, Churchill Livingstone, 51(2): 273-296.
- Carmona, M., Zalacain, A., Salinas, M.R. and Alonso, G.L., 2007. A new approach to saffron aroma. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 47(2): 145-159.
- Deabes, M.M., El-Soud, N.H.A. and El-Kassem, L.T.A., 2011. *In vitro* inhibition of growth and aflatoxin B1 production of *Aspergillus flavus*strain (ATCC 16872) by various medicinal plant essential oils. Macedonian Journal of Medical Sciences, 4(4): 345-350.
- Erturk, O., 2006. Antibacterial and antifungal activity of ethanolic extracts from eleven spice plants.

Mycoses, 49(4): 316-323.
- Pintado, C., de Miguel, A., Acevedo, O., Nozal, L., Novella, J.L. and Rotger, R., 2011. Bactericidal effect of saffron (*Crocus sativus* L.) on *Salmonella enterica* during storage. Food Control, 22(3-4): 638-642.
- Rahimi, E. and Ameri, M., 2012. A survey of aflatoxin M1 contamination in bulk milk samples from dairy bovine, ovine, and caprine herds in Iran. The Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 89(1): 158-160.
- Roudbary, M., Roudbar Mohammadi, Sh., Hajimoradi, M., Taghizadeh Armaki, M., Ghasemi, Sakha, F. and Vahidi, M., 2009. Evaluation of antifungal of alcoholic extract and safranol of *Crocus sativum* on *Candia albicans* and *Candida dulbliniensis* growth *in vitro*. Jornal of Jahrom University of Medical Sciences, 7(2): 1-9.
- Sekine, T., Sugano, M., Majid, A. and Fujii, Y., 2007. Antifungal effects of volatile compounds from black zira (*Bunium persicum*) and other spices and herbs. Journal of Chemical Ecology, 33(11): 2123-2132.
- Singh, G., Marimuthu, P., Heluani, C.S. and Catalan, C., 2005. Chemical constituents and antimicrobial and antioxidant potentials of essential oil and acetone extract of *Nigella sativa* seeds. Journal of the Sciences of Food and Agriculture, 85(13): 2297-2306.
- Strosnider, H., Azziz-Baumgartner, E., Banziger, M., Bhat, R., Breiman, R. and Brune, M., 2006. Public health strategies for reducing aflatoxin exposure in developing countries. Environtonemal ealth Perspect, 12(12): 898-903.
- Tzanidi, C., Proestos, C. and Markaki, P. 2012. Saffron (*Crocus sativus* L.) inhibits aflatoxin B1 production by *Aspergillus parasiticus*. Advances in Microbiology, 2(2): 310-316.
- Vahidi, H., Kamalinejad, M. and Sedaghati, N., 2002. Antimicrobial properties of *Croccus sativus* L. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 1(1): 33-35.
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernandez-Lopez, J. and Pérez-Alvarez, J., 2008. Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradise* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. Food Control, 19(12): 1130-1138.
- Zain, M.E., 2011. Impact of mycotoxins on humans and animals. Journal of Saudi Chemical Society, 15(1): 29-144.
Section Cell. Journal of Molecular Biology, 61(3): 275-278.
- Gorran, A., Salehnia, B., Alizadeh, H., Farzaneh, M. and Shivazad, M., 2015. Effect of essential oils and extracts of *Satureja macrosiphon* and *Satureja khozistanica* on mycelial growth and aflatoxin B1 production in *Aspergillus flavus*. Journal of Veterinary Research, 70(2):139-145.
- Hedayati, M.T., Omran, S.M., Soleymani, A. and Taghizadeh Armaki, M., 2016. Aflatoxins in food products in Iran: a review of the literature. Jundishapur Journal of Microbiology, 9(7): e33235.
- Kamble, V.A. and Patil, S.D., 2007. Antimicrobial effects of certain spices and condiments used in an Indian indigenous system of medicine. Zeitschrift fur Arznei and Gewurzpflanzen, 12(4): 188-193.
- Maghsoodi, V., Kazemi, A. and Akhondi, E., 2012. Effect of different drying methods on Saffron (*Crocus sativus* L) quality. Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering, 31(2): 85-89.
- Mahmoud, A.L.E., 1994. Antifungal action and antiaflatoxigenic properties of some essential oil constituents. Letters in Applied Microbiology, 19(2): 110-113.
- Montes-Belmont, R. and Carvajal, M., 1998. Control of *Aspergillus flavus* in maize with plant essential oils and their components. Journal of Food Protection, 61(5): 616-619.
- Moosavian, S.M., Darvishnia, M. and Bazgir, A., 2016. The effect of pH and NaCl on the aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus*. Iranian Journal of Plant Protection, 46(2): 2015-2016.
- Movassagh, M.H., 2011. Presence of aflatoxin m1 in uht milk in Tabriz (northwest of Iran). Journal of Food Safety, 31(2): 238-241.
- Muzaffar, S., Rather, S.A. and Zaman Khan, K., 2016. *In vitro* bactericidal and fungicidal activities of various extracts of saffron (*Crocus sativus* L.) stigmas from Jammu & Kashmir, India, Cogent Food and Agriculture, 2(1): 1158999.
- Nakhaei, M., Khaje-Karamoddin, M. and Ramezani, M., 2008. Inhibition of *Helicobacter pylori* growth *in vitro* by saffron (*Crocus sativus* L.). Iranian Journal of Basic Medical Sciences, 11(1): 91-96.
- Olojede, F., Engelhardt, G., Wallnofer, P.R. and Adegoke, G.O., 1995. Decrease of growth and aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus* caused by spices. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 9(5): 605-606.
- Pawar, V.C. and Thaker, V.S., 2006. *In Vitro* efficacy of 75 essential oils against *Aspergillus niger*.

In vitro antifungal activities of saffron (*Crocus sativus* L.) stigmas against *Aspergillus* species and toxin production

S.J. Sanei[1*] and S.E. Razavi[2]

1*- Corresponding author, Department of Plant Protection, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran, E-mail: sa_nei@yahoo.com
2- Department of Plant Protection, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

Received: August 2017 Revised: October 2017 Accepted: December 2017

Abstract

This study was carried out to evaluate the *in vitro* use of *Croccus sativus* L. (saffron) stigmas in the control of *Aspergillus* species which is a notable causative agent of food rot and mycotoxins. Antifungal activities of saffron stigmas and toxin production were tested against *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus in vitro*. Saffron dried stigmas (0, 5, 10 mg ml^{-1}) were added in Yeast Extract Sucrose (YES) medium and dry weight of the mycelium was measured after 0, 5, 10, 15, 20, 25 and 30 days after inoculation. Colorimetric procedure was used for safranal content in tested saffron and thin layer chromatography for aflatoxin B1 (AFB1) determination. Results indicated that the amounts of crocin, picrocrocin and safranal in saffron sample were 231±0.52, 87.16±0.85 and 34.86±0.25 mg. g^{-1} dw, respectively. When saffron was added at concentration of 10 mg·ml^{-1} to YES inoculated with *Aspergillus* species, mycelium growth decreased by 29-32% compared to control cultures without saffron addition. Conclusively when saffron was added to YES inoculated, AFB1 production decreased from 5µg·ml^{-1} to not detectable level compared to control cultures without saffron addition. The growth and AFB1 reduction were not significantly different between *Aspergillus* species. The results suggest that saffron can be used in pharmaceutical and food formulations to inhibit *Aspergillus* species and toxin production.

Keywords: Aflatoxin, inhibitory, saffron (*Croccus sativus* L.), *Aspergillus*.