

مدلسازی و بهینه‌یابی خواص ضدقارچی برخی اسانس‌های گیاهی علیه پوسیدگی نرم (*Rhizopus Stolonifer*) با استفاده از روش سطح پاسخ

محمد طهماسبی^۱، عبدالله گل‌محمدی^{۱*}، علی نعمت‌اله زاده^۲، مهدی داوری^۳ و اسماعیل چمنی^۴

۱. گروه مهندسی مکانیک بیوسیستم، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی

۲. گروه مهندسی شیمی، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه محقق اردبیلی

۳. گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی

۴. گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۵/۱۴ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۹/۰۶)

چکیده

هدف از این مطالعه بررسی اثر غلظت (۷۵، ۱۵۰، ۳۰۰، ۶۰۰ و $1200 \mu\text{L.L}^{-1}$) اسانس گیاهان آویشن شیرازی، دارچین و مرزه خوزستانی و زمان تماس (۱۸، ۲۳ و ۲۸ ساعت) در کنترل قارچ *Rhizopus stolonifer* و مدلسازی و بهینه‌یابی خواص ضد قارچی اسانس‌های مذکور با استفاده از روش سطح پاسخ بود. همچنین ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس‌ها نیز شناسایی شد. براساس نتایج حاصل، در هر سه اسانس با افزایش غلظت، خاصیت ضدقارچی افزایش یافت اما اثر زمان در سه اسانس متفاوت بود؛ با گذشت زمان در اسانس آویشن شیرازی خاصیت ضد قارچی افزایش و در دو اسانس دیگر کاهش یافت. علاوه بر این، با توجه به نتایج بهینه‌یابی، اسانس دارچین با غلظت‌های $1200 \mu\text{L.L}^{-1}$ و $1200 \mu\text{L.L}^{-1}$ و زمان در معرض بودن $24/380$ و $22/802$ ساعت و مرزه خوزستانی با غلظت‌های $1200 \mu\text{L.L}^{-1}$ و $1200 \mu\text{L.L}^{-1}$ و زمان در معرض بودن 23 ساعت به ترتیب برای بازدارندگی ۵۰ و ۱۰۰ درصدی، دارای بیش‌ترین و کم‌ترین اثر در بازدارندگی رشد میسلومی این قارچ بودند. همچنین نتایج این پژوهش نشان داد که روش سطح پاسخ می‌تواند به عنوان یک روش مناسب و دقیق در مدلسازی و بهینه‌یابی فعالیت ضد قارچی این اسانس‌ها مطرح گردد.

واژه‌های کلیدی: اسانس؛ بازدارندگی رشد میسلومی؛ روش سطح پاسخ؛ مدلسازی، *Rhizopus stolonifer*

Modeling and Optimization of Antifungal effects of Some Essential oils against soft rot (*Rhizopus stolonifer*) through response surface methodology

Mohammad Tahmasebi¹, Abdollah Golmohammadi^{1*}, Ali Nematollahzadeh², Mahdi Davari³, Esmail Chamani⁴

1. Department of Biosystems Engineering, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

2. Department of Chemical Engineering, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

3. Department of Plant Protection, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

4. Department of Horticultural Science, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

(Received: August 5, 2019 - Accepted: November 27, 2019)

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of concentrations (75, 150, 300, 600 and $1200 \mu\text{L.L}^{-1}$) of *Zataria multiflora* (ZEO), *Cinnamomum zeylanicum* (CEO), and *Satureja khuzestanica* (SEO) plants essential oil (EO) and expose time (18, 23, 28h) the inhibition of mycelial growth of *Rhizopus stolonifer* fungi in vitro condition and modeling and optimizing antifungal properties of these EOs via response surface methodology (RSM). Also the chemical components of the EOs were identified. Based on the results, in all EOs the antifungal index increased with increasing the concentration, but the effect of time was different; with the time of expose, the antifungal index increased in ZEO, but decreased in the two other EOs. Furthermore, due to the results of optimization, the CEO with $120.133 \mu\text{L.L}^{-1}$ and $301.152 \mu\text{L.L}^{-1}$ concentrations and 24.380 and 22.802h expose time and SEO with $224.697 \mu\text{L.L}^{-1}$ and $550.803 \mu\text{L.L}^{-1}$ concentrations and 23h expose time, for 50 and 100% inhibit mycelial growth, respectively, have the most and least effect on inhibiting mycelial growth of *R. stolonifer*. Also, the results of this study showed that the response surface method can be considered as a suitable and accurate method for modeling and optimizing the antifungal activity of these EOs.

Keywords: Essential oil, Mycelial growth inhibition, Response Surface Methodology, *Rhizopus stolonifer*.

* Corresponding author E-mail: golmohammadi1342@gmail.com

مقدمه

میوه‌ها و سبزیجات، هم در مزرعه و هم در طول نگه‌داری پس از برداشت به شدت در معرض پوسیدگی ناشی از عوامل قارچی قرار دارند به طوری که رشد عوامل قارچی بر روی محصولات مختلف می‌تواند سبب فساد آنها و حتی تولید سموم خطرناک در آنها شود. در این بین *Rhizopus stolonifer* یکی از بیمارگرهای خطرناک با دامنه میزبانی وسیع می‌باشد که قادر است گیاهان زیادی را قبل و بعد از برداشت آلوده کند و از نظر اهمیت اقتصادی و علمی جایگاه مهمی را در بین قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی به خود اختصاص داده است. این قارچ مسئول ایجاد طعم نامطلوب در محصول بوده و از طریق استفاده از کربوهیدرات به عنوان منبع انرژی، تخریب لیپیدها و پروتئین‌ها، تولید متابولیت‌های فرار و تولید ترکیبات حساسیت‌زا موجب بالا رفتن دمای محصول و فساد هر چه بیشتر آن می‌شود (Spadaro and Gullino 2004). با وجود تلاش‌های مداوم برای کنترل بیمارگرهای محصولات کشاورزی و مواد غذایی، تهدیدات ایمنی میکروبی همچنان پابرجاست و بنابراین، تحقیق برای روش‌های تشخیص و کنترل میکروارگانیسم‌های مضر همچنان ادامه دارد. راهبردهای متعدد فیزیکی و شیمیایی برای افزایش عمر پس از برداشت سبزیجات و مواد غذایی، از جمله تیمارهای گرمایی، پرتو افکنی مادون قرمز و مایکروویو، استفاده از اتمسفر تغییر یافته در طول بسته‌بندی، با اضافه کردن مواد نگهدارنده شیمیایی (به عنوان مثال، اسیدهای سوربیک، بنزوئیک و پروپیونیک)، یا فناوری‌های در حال ظهور مانند میدان الکتریکی پالسی و پردازش با فشار بالا مورد استفاده قرار گرفته است (Sun 2014). با این حال، این روش‌ها تنها عفونت‌های میکروبی را کاهش می‌دهد و اغلب در از بین بردن کامل آلاینده‌های میکروبی با شکست مواجه می‌شوند. همچنین برخی از قارچ‌ها و باکتری‌ها قادر به انطباق با حضور نگهدارنده‌های خاص هستند (Davidson and Harrison 2002). علاوه بر این، مصرف‌کنندگان به طور فزاینده خواستار میوه‌ها و سبزیجات با کیفیت بالا همراه با طول عمر طولانی و مواد غذایی فاقد آفت‌کش‌های شیمیایی

هستند. سالم بودن مواد غذایی جنبه مهمی در بکارگیری روش‌های نگهداری برای جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌های آلوده کننده نامطلوب در نظر گرفته شود بطوریکه امروزه رویکرد صنایع غذایی بیشتر در تمرکز بر رویکردهای نگه‌داری طبیعی و عاری از سموم شیمیایی می‌باشد (daCruz et al. 2013, Zheng et al. 2013).

در سال‌های اخیر فناوری‌های نگه‌داری زیستی برای بهبود ایمنی، ارزش تغذیه‌ای و خواص حسی در پاسخ به تقاضای مصرف‌کنندگان مورد توجه قرار گرفته اند. از مهم‌ترین این مهارکننده‌های زیستی می‌توان به اسانس‌های گیاهی اشاره نمود. اسانس‌های گیاهی در قالب متابولیت‌های ثانویه نقش مهمی در حفاظت گیاهان در برابر قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی دارند. این ترکیبات به عنوان ملکول‌های علامت‌دهنده عمل نموده و رابطه‌ای تکاملی با نقش عملکردی خود را در گیاه نشان داده‌اند (Tholl 2006, Theis and Lerdaу 2003). همچنین، مطالعات متعددی در زمینه استفاده از اسانس‌های گیاهی در کنترل قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی صورت گرفته است و خاصیت قارچ‌کشی اسانس گیاهانی نظیر آویشن (Debonne et al. 2018)، دارچین (Cheng et al. 2019)، مرزه (Farzaneh et al. 2015)، نعنا (Liu et al. 2016)، زنجبیل (Singh et al. 2005) و اسطوخودوس (Cassella et al. 2002) به اثبات رسیده است. روش سطح پاسخ^۱ مجموعه‌ای از طرح‌های آزمایشی و روش‌های بهینه‌یابی است که پژوهشگر را قادر می‌سازد که رابطه بین پاسخ و متغیرهای مستقل آزمایش را تعیین نماید. این روش برای ترسیم یک سطح پاسخ در محدوده مورد نظر و بهینه‌یابی پاسخ برای انتخاب شرایط فرآیند به منظور دستیابی به مشخصات هدف یا نیازمندی‌های مصرف‌کننده به کار می‌رود. این روش برای مدل‌سازی، بهبود و بهینه‌یابی شرایط در انواع مختلف فرآیندهای زیستی مناسب است (Eren and Kaymak-Ertekin 2007). این روش دارای تعداد طراحی‌های آزمایشی مختلفی مانند باکس-بنکن^۲،

1. Response Surface Methodology (RSM)

2. Box-Behnken

نگه داشته شد، سپس دما تا 18°C افزایش یافته و برای ۲ دقیقه ثابت نگه داشته شد. شناسایی ترکیبات براساس مطالعه طیف های ترکیبات و مقایسه آن ها با طیف های استاندارد موجود در کتابخانه دستگاه انجام شد (Adams 2007).

تهیه قارچ های بیماری زا

قارچ *Rhizopus stolonifer* از میوه هلو آلوده روی محیط کشت PDA (شرکت مرک، آلمان) جداسازی شد. قارچ به دست آمده به روش تک اسپور خالص سازی و بر اساس خصوصیات مرفولوژیکی و با استفاده از کلید شیپر و استالپرس (Schipper and Stalpers, 1984) مورد بررسی قرار گرفتند شناسایی شد. به منظور تولید زادمایه کافی، جدایه قارچ بر روی محیط کشت PDA کشت و در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی داخل انکوباتور با دمای $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ نگهداری شد.

بررسی اثر ضد قارچی اسانس ها

اثر ضد قارچی اسانس ها به روش فاکتوریل و در قالب طرح کاملا تصادفی و براساس روش محمدی و همکاران (Mohammadi et al. 2015) انجام شد. بدین ترتیب که هر یک از اسانس ها با غلظت های ۷۵، ۱۵۰، ۳۰۰، ۶۰۰ و $1200 \mu\text{L.L}^{-1}$ (v/v) تهیه و با محیط کشت PDA سترون و در دمای تقریبی 40°C مخلوط و داخل تشتک های پتری به قطر ۹۰mm ریخته شد. توئین ۸۰ (v/v ۰/۰۵) به عنوان امولسیفایر به هر یک از تیمارها اضافه شد. پس از سرد شدن محیط های کشت، یک دیسک از قارچ *Rhizopus stolonifer* به قطر ۵mm در مرکز هر یک از آن ها قرار داده شد. تشتک های پتری با استفاده از پارافیلیم مسدود و در تناوب نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی داخل انکوباتور با دمای $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ نگهداری شدند. تغییرات قطر پرگنه تا زمان پر شدن کامل تشتک های پتری شاهد توسط قارچ در فواصل زمانی مناسب اندازه گیری شد. سپس شاخص خاصیت ضدقارچی اسانس با استفاده از رابطه ۱ محاسبه شد.

$$AI = \frac{C-T}{C} \times 100 \quad (1)$$

در این رابطه *AI* شاخص خاصیت ضدقارچی اسانس

مرکب مرکزی^۳، تک عاملی^۴ و داده های گذشته^۵ و... است (Olajide et al. 2014). مزیت طراحی سطح پاسخ با داده های گذشته این است که این امکان را برای پژوهشگران فراهم می سازد که نقاط طراحی را با استفاده از تمام یا برخی از داده های آزمایشی موجود تعریف کنند (Salam et al. 2014) و بر خلاف دیگر طراح ها، در این طرح هیچ محدودیتی در تعداد و سطوح فاکتورهای مورد بررسی وجود ندارد (Jeirani et al. 2013).

هدف اصلی مطالعه حاضر بررسی اثر غلظت اسانس گیاهان آویشن شیرازی، دارچین و مرزه خوزستانی و زمان در معرض بودن در کنترل قارچ *Rhizopus stolonifer* است. علاوه بر این، توسعه مدل های ریاضی برای یافتن شرایط بهینه برای این اثرات زیستی هدف دیگر مطالعه می باشد. بود. همچنین ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس های گیاهی مورد بررسی نیز شناسایی شده است.

مواد و روش ها

تهیه اسانس های گیاهی

اسانس خالص آویشن شیرازی توسط شرکت طبیب دارو در اختیار ما قرار گرفت. اسانس خالص دارچین و مرزه خوزستانی نیز از شرکت زردبند خریداری شد. همگی اسانس ها به روش استخراج با حلال آب تهیه شده بودند.

شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس ها

شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس ها با استفاده از دستگاه کارماتوگرافی گازی-طیف سنج جرمی (GC/MS) مدل 7890B مجهز به سیستم آشکارساز طیف سنج جرمی مدل 5977A صورت گرفت. جداسازی کارماتوگرافی دارای ستون کپیلاری HP-5MS به طول $30\text{m} \times 0.25\text{mm}$ و ضخامت $0.25 \mu\text{m}$ بود و گاز هلیم با خلوص ۹۹/۹۹۹ درصد با سرعت 1 mL/min به عنوان گاز حامل مورد استفاده قرار گرفت. دمای تزریق 250°C و حجم اسانس تزریق شده $1 \mu\text{L}$ بود.

دمای ستون به مدت ۳ دقیقه در دمای 50°C ثابت

3. Central Composite

4. One Factor

5. Historical Data

$$MAPE = \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n \left(\frac{|t_i - Z_i|}{Z_i} \right) \times 100 \quad (۴)$$

در اینجا، t_i و Z_i به ترتیب مؤلفه i -ام مقادیر واقعی و پیش‌بینی شده است. هرچه مقدار R^2 بزرگتر و MAPE کوچک‌تر باشد، مدل پیش‌بینی بهتری از رابطه بین متغیرها خواهد داشت (Nabavi-Pelesaraei et al. 2018). همچنین جهت رسم نمودارها نیز از نرم افزار Excel 2017 استفاده شد.

نتایج

ترکیبات شیمیایی اسانس‌ها

نتایج آنالیز ترکیبات شیمیایی اسانس‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است. براساس نتایج حاصل ۲۶ ترکیب مختلف در اسانس آویشن شیرازی (ZEO) شناسایی شد که ۹۸/۴۶٪ ترکیبات موجود در اسانس را شامل می‌شد. در بین این ترکیبات *Thymol* (۳۲/۶۸٪)، *Carvacrol* (۳۰/۵۷٪)، *p-cymene* (۸/۹۴٪) و γ -terpinene (۵/۹۶٪) ترکیبات عمده این اسانس بودند. همچنین در آنالیز شیمیایی ترکیبات اسانس دارچین (CEO)، *cinnamaldehyde* (۹۷/۶۶٪) ماده اصلی تشکیل دهنده این اسانس بود و سایر ترکیبات شناسایی شده کمتر از ۵٪ ترکیبات تشکیل دهنده این اسانس را شامل می‌شدند؛ علاوه بر این، ۱۲ ترکیب مختلف در اسانس مرزه خوزستانی (SEO) شناسایی شد که ۹۶/۹۹٪ کل ترکیبات این اسانس را شامل می‌شد. *Carvacrol* (۳۸/۴۳٪)، γ -terpinene (۱۲/۸۹٪)، *p-cymene* (۱۶/۵۵٪) و *a-terpinene* (۵/۷۶٪) ترکیبات عمده این اسانس بودند.

خاصیت ضد قارچی اسانس‌ها و مدل‌سازی

اثر زمان در معرض بودن قارچ‌ها و غلظت آویشن شیرازی، دارچین و مرزه خوزستانی بر میزان بازدارندگی رشد میلیسومی قارچ *Rhizopus stolonifer* به ترتیب در شکل ۱ نشان داده شده است. همانگونه که در این شکل مشخص است در هر سه اسانس با افزایش غلظت، شاخص خاصیت ضد قارچی آن افزایش یافته اما اثر زمان (۱۸، ۲۳ و ۲۸ ساعت) در سه اسانس متفاوت بوده و با گذشت زمان در اسانس آویشن شیرازی شاخص

و C و T به ترتیب قطر پرگنه‌های شاهد و تیمار می‌باشد (Pinto et al. 2013).

مدلسازی فعالیت ضدقارچی اسانس‌ها

روش سطح پاسخ مجموعه‌ای از تکنیک‌های آماری است که در بهینه‌یابی فرآیندهایی که پاسخ مورد نظر به واسطه تعدادی از متغیرها تحت تاثیر قرار می‌گیرد، به کار می‌رود. شمای گرافیکی مدل ریاضی، سبب تعریف واژه روش سطح پاسخ شده است. با کمک این طرح آماری، کلیه ضرایب مدل رگرسیون درجه دوم و اثر متقابل متغیرها، قابل برآورد هستند. در این روش سطح مورد نظر تحت تاثیر متغیرهای بسیاری قرار دارد و هدف، بهینه کردن پاسخ مذکور است. در این مطالعه برای به دست آوردن مقدار بهینه (Y_i) از رابطه ۲ استفاده شد.

$$Y_i = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ij} X_i X_j + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \varepsilon \quad (۲)$$

در این رابطه Y_i متغیر مستقل آزمایش، β_0 ، β_i و β_{ij} ضرایب ثابت رگرسیون، X_i و X_j متغیرهای مستقل آزمایش و ε خطای تصادفی است (Li et al. 2007). مدل‌های ریاضی برای هر پاسخ با تجزیه رگرسیون خطی چندگانه ارزیابی شدند. در پژوهش حاضر، به منظور تخمین اثر متغیرهای مستقل غلظت اسانس و زمان تاثیر بر میزان شاخص بازدارندگی رشد قارچ بیماری‌زا، از روش سطح پاسخ و طرح داده‌های گذشته و با استفاده از نرم‌افزار Design Expert versions 10 استفاده شد. معنی‌داری آماری عبارت‌های معادله رگرسیونی در سطح اطمینان ۹۵ درصد بررسی شد.

بررسی کارآیی مدل‌ها

برای ارزیابی قابلیت پیش‌بینی مدل‌های توسعه یافته در این مطالعه، از شاخص‌های آماری ضریب تبیین (R^2) و میانگین درصد خطای مطلق (MAPE) (روابط ۳ و ۴) استفاده شد.

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (t_i - Z_i)}{\sqrt{\sum_{i=1}^n t_i^2}} \quad (۳)$$

بازدارندگی از رشد میلیسیومی در هر سه اسانس و اثر متقابل زمان و غلظت (A×B) در اسانس های آویشن شیرازی و دارچین در سطح احتمال ۱٪ معنی دار بود. عباراتی که اثر آنها بر متغیر مستقل معنی دار نبودند از مدل حذف شدند.

خاصیت ضد قارچی افزایش و در دو اسانس کاهش یافت. نتایج تجزیه واریانس داده های حاصل از اثر بازدارندگی رشد میلیسیومی روی قارچ های مورد بررسی در جدول ۲ نشان داده شده است. اثر فاکتورهای زمان (A)، غلظت (B) و اثر توان دوم غلظت (B²) بر

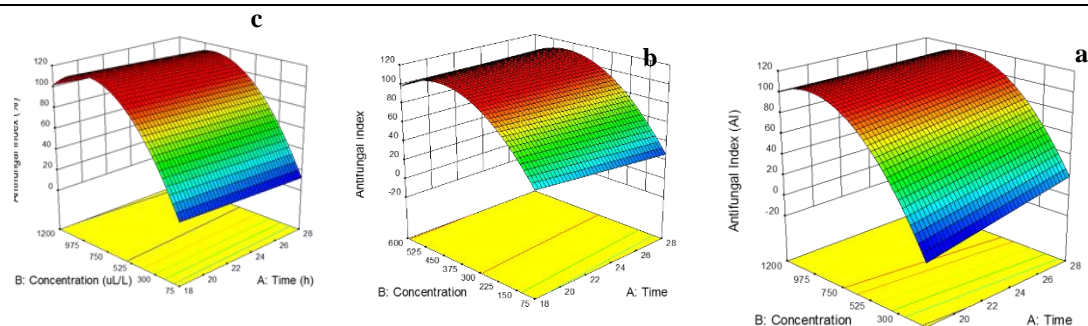
جدول ۱- ترکیبات شیمیایی شناسایی شده در اسانس آویشن شیرازی

Table 1. Chemical composition of ZEO, CEO, and SEO

Components	ZEO (%)	CEO (%)	SEO (%)	Retention index
α-Thujene	3.63	1.53	2.32	933
α-pinene	0.43	-	2.64	938
Benzaldehyde	-	0.37	-	944
Camphene	0.15	-	-	946
3-Octanone	0.14	-	-	966
β-pinene	0.39	-	1.83	973
β-Myrcene	0.71	-	2.47	981
α-Phellandrene	0.13	-	-	990
3-Carene	-	0.65	-	998
α-Terpinene	0.52	-	5.76	1008
p-Cymene	8.94	1.54	16.55	1009
Limonene	0.56	-	1.45	1018
β-Phellandrene	-	0.37	-	1024
Eucalyptol	0.43	1.15	-	1034
γ-Terpinene	5.96	0.08	21.89	1048
Linalool	1.13	-	-	1098
β-Terpineol, cis-	0.1	-	-	1135
α-Terpineol	1.54	0.08	-	1189
Thymol methyl ether	0.67	-	-	1216
Carvacrol methyl ether	0.98	-	-	1225
Carvone	-	-	1.21	1243
Linalool acetate	-	2.65	-	1248
Cinnamaldehyde	-	80.82	-	1263
Thymol	32.68	-	1.94	1281
Carvacrol	30.57	-	38.43	1294
Thymol acetate	1.45	-	-	1332
Carvacrol acetate	1.78	-	-	1348
Aromadendrene	1.21	-	-	1441
Eugenol	-	4.47	-	1376
Caryophyllene, (Z)-	2.38	-	-	1404
Caryophyllene	-	3.57	-	1456

Table 1. Continued...

Components	ZEO (%)	CEO (%)	SEO (%)	Retention index
(Z)-Cinnamic acid	-	0.12	-	1471
γ-Bisabolene, (E)-	0.8	-	2.32	1523
Spathulenol	0.83	-	-	1563
2H-1- Benzopyran-2-one	-	0.1	-	1581
Cinnamyl acetate	-	0.14	-	1635
Caryophyllene oxide	0.78	0.03	-	1961
Total	98.46	97.66	98.81	



شکل ۱- اثر زمان تماس قارچ ها و غلظت اسانس آویشن شیرازی (a)، دارچین (b) و مرزه خوزستانی (c) بر میزان بازدارندگی رشد

میلیسومی قارچ *Rhizopus stolonifer*

Figure 1- Effect of time and Concentration of ZEO (a), CEO (b) and SEO (c) on the inhibition of mycelial growth of *Rhizopus stolonifer*.

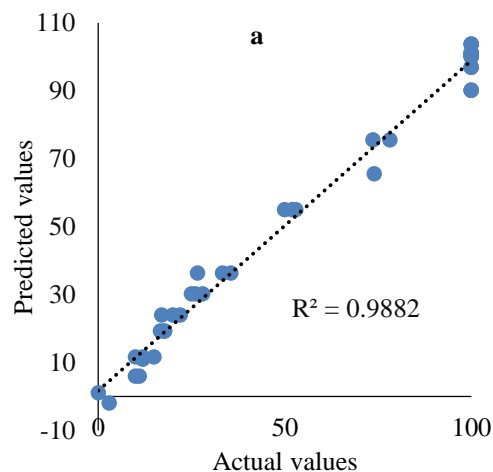
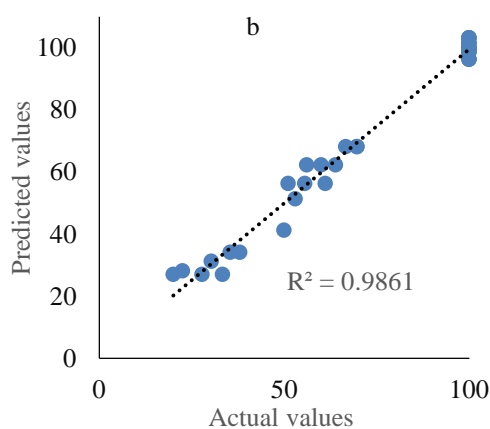
جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس داده‌های حاصل از اثر بازدارندگی رشد میلیسیومی اسانس‌ها روی *Rhizopus stolonifer*
 Table 2-Results of the analysis of variance of data on mycelial growth inhibitory of essential oils against *Rhizopus stolonifer*

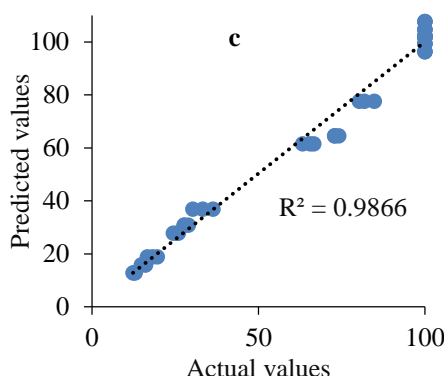
EOs	Source	df	Mean squares	value F
ZEO	Model	4	16903.37	309.16**
	Time (A)	1	1031.45	18.86**
	Concentration (B)	1	53043.27	970.14**
	A×B	1	762.43	13.94**
	B ²	1	14908.39	272.67**
	Residual	40	54.68	
	Pure Error	30	3.31	
	Cor Total		44	
CEO	Model	4	7048.63	286.50**
	Time (A)	1	181.47	7.38**
	Concentration (B)	1	22488.99	914.8**
	A×B	1	257.13	10.45**
	B ²	1	8433.91	342.80**
	Residual	40	24.60	
	Pure Error	30	25.76	
	Cor Total		44	
SEO	Model	4	18499.64	505.94**
	Time (A)	1	281.89	7.71**
	Concentration (B)	1	41395.44	1132.11**
	B ²	1	16913.42	462.56**
	Residual	1	36.56	
	Pure Error	40	1.47	
	Cor Total		30	

** Significance at 0.01 level

دهنده اثر افزایشی و علامت منفی بیانگر اثر کاهشنده آن متغیر بر شاخص بازدارندگی اسانس علیه قارچ بیمارگر می‌باشد. همچنین مقادیر دو پارامتر R^2 و MAPE نشان می‌دهد که تمامی مدل‌ها با دقت بسیار بالایی قادر به برآورد میزان خاصیت ضد قارچی اسانس هستند.

بهترین مدل تخمینی اثر غلظت اسانس آویشن شیرازی و زمان تماس برای خاصیت ضدقارچی و همچنین همبستگی بین مقادیر پیش‌بینی شده و واقعی میزان شاخص خاصیت ضد قارچی برای هر سه اسانس به ترتیب در جدول ۳ و شکل ۲ نشان داده شده است. در مدل‌های ارائه شده علامت مثبت ضرایب نشان





شکل ۲- همبستگی بین مقادیر پیش بینی شده و واقعی میزان خاصیت ضد قارچی اسانس های آویشن شیرازی (a)، دارچین (b) و مرزه خوزستانی (c) بر رشد میسلومی قارچ *Rhizopus stolonifer*

Figure 2 - Correlation between predicted and actual values antifungal activity of ZEO (a), CEO (b) and SEO (c) on mycelial growth of *Rhizopus stolonifer*

جدول ۳- بهترین مدل تخمینی اثر غلظت اسانس های آویشن شیرازی، دارچین و مرزه خوزستانی و زمان برای خاصیت ضدقارچی علیه *Rhizopus stolonifer*

Table 3- Best Estimated Model of Effect of ZEO, CEO and SEO Concentrations and Time for Response of Antifungal Activity against *Rhizopus stolonifer*

EOs	Model	R ²	MAPE
ZEO	$AI = 116.26 + 6.05A + 33.94B - 9.08AB - 50B^2$	0.988	4.83
CEO	$AI = 105.16 - 2.86A + 32.96B + 4.27AB - 38.07B^2$	0.987	5.21
SEO	$AI = 107.63 - 3.07A + 41.78B - 50.07B^2$	0.987	5.63

بازدارندگی ۵۰ و ۱۰۰ درصدی در رشد میسلومی این قارچ خواهد شد. همچنین در زمان ۲۳ و غلظت $\mu\text{L.L}^{-1}$ ۲۲۴/۶۹۷ اسانس مرزه خوزستانی رشد میسلومی قارچ به ۵۰ درصد کاهش می یابد و برای بازدارندگی ۱۰۰ درصد رشد میسلومی زمان ۲۳ ساعت و غلظت $\mu\text{L.L}^{-1}$ ۵۵۰/۸۰۳^۱ مورد نیاز است. بنابراین به نظر می رسد اسانس دارچین و مرزه خوزستانی به ترتیب دارای بیش-ترین و کم ترین اثر در مهار رشد میسلومی قارچ *Rhizopus stolonifer* هستند.

نتایج بهینه یابی اثر شاخص بازدارندگی رشدی اسانس آویشن باغی در رشد میسلومی قارچ های مورد بررسی در جدول ۴ نشان داده شده است. براساس این نتایج برای دستیابی به ۵۰ و ۱۰۰ درصد بازدارندگی در رشد میسلومی قارچ *Rhizopus stolonifer* به ترتیب زمان های ۲۷/۶۵۰ و ۲۵/۰۹۰ ساعت و غلظت های $\mu\text{L.L}^{-1}$ ۲۲۰/۳۳۲ و $\mu\text{L.L}^{-1}$ ۶۰۳/۰۷۶ از اسانس آویشن شیرازی مورد نیاز است. همچنین زمان های ۲۴/۳۸۰ و ۲۲/۸۰۲ ساعت و غلظت های $\mu\text{L.L}^{-1}$ ۱۲۰/۱۳۳ و $\mu\text{L.L}^{-1}$ ۳۰۱/۱۵۲^۱ اسانس دارچین به ترتیب منجر به

جدول ۴- نتایج بهینه یابی اثر بازدارندگی رشد اسانس ها در رشد میسلومی قارچ *Rhizopus stolonifer*

Table 4-Optimization result the mycelial growth inhibitory effect of Essential Oils on Mycelial growth of *Rhizopus stolonifer*

Eos	Response	Time (h)	Concentration ($\mu\text{L.L}^{-1}$)	Desirability
ZEO	IC=50	27.650	220.332	100
	IC=100	25.090	603.076	100
CEO	IC=50	24.380	120.133	100
	IC=100	22.802	301.152	100
SEO	IC=50	23	224.697	100
	IC=100	23	550.803	100

زیست سازگار و کم خطر در کنترل عوامل خسارت زای محصولات کشاورزی، در این مطالعه اثر غلظت اسانس-

بحث

با توجه به ضرورت استفاده از ترکیبات طبیعی

قارچ *Botrytis cinerea* (Eshaghi et al. 2017) نیز گزارش شده است. همچنین اسانس دارچین و مرزه خوزستانی به ترتیب دارای بیش‌ترین و کم‌ترین اثر در مهار رشد میسلیمی قارچ *Rhizopus stolonifer* هستند. با توجه به تعداد زیادی از اجزای شیمیایی شناسایی شده در این اسانس‌ها، یک مکانیسم واحد برای اثرات ضد قارچی آن‌ها نمی‌تواند مورد توجه قرار گیرد و این ترکیبات ممکن است چندین نقش را در سلول‌های قارچی داشته باشند. اما یکی از خواص مهم اسانس‌های گیاهی و ترکیبات آن‌ها خواص آبرگریزی آن‌ها است که باعث نفوذ این مواد به غشای سلولی قارچ، اختلال در ساختار سلولی و افزایش نفوذپذیری می‌شود. این امر موجب نشت یون‌های ضروری و دیگر محتویات سلولی و در نتیجه مرگ سلول می‌شود (dosSantos et al. 2012)، به طور کلی مواد فنولی با ساختار حلقوی عامل-دار باعث افزایش خواص ضد قارچ و ضد باکتری می‌شوند (Burt 2004). ثابت شده است که تیمول و کارواکرول در آویشن شیرازی (Mohammadi et al. 2015)، سینامالدهید در دارچین (Burt 2004) و کارواکرول در مرزه خوزستانی (Farzaneh et al. 2015) مسئول فعالیت ضد قارچی هستند. در بررسی اثر ضد قارچی اسانس آویشن شیرازی، مرزه و زنیان در کنترل قارچ *Rhizopus stolonifer* حداقل غلظت مهارکننده رشد میسلیم قارچ برای آویشن شیرازی $500 \mu\text{L.L}^{-1}$ و برای مرزه و زنیان $300 \mu\text{L.L}^{-1}$ گزارش شد (Behdad et al. 2013). در مورد اسانس آویشن شیرازی نتیجه به دست آمده در این پژوهش با نتایج پژوهش حاضر تقریباً مطابقت دارد، اما در مورد اسانس مرزه این غلظت در مطالعه حاضر تنها قادر به کنترل رشد میسلیم قارچ به میزان ۵۰٪ است. در مقابل در مطالعه‌ای دیگر حداقل غلظت مهارکننده اسانس دارچین در کنترل این قارچ در شرایط آزمایشگاهی $1000 \mu\text{L.L}^{-1}$ گزارش شده است (Alizadeh et al. 2015) که در مقایسه نتیجه به دست آمده در مطالعه حاضر ($301/152 \mu\text{L.L}^{-1}$) تفاوت قابل ملاحظه‌ای است. این تفاوت در نتایج می‌تواند ناشی از تفاوت در نوع و درصد ترکیبات موجود در اسانس استفاده شده در مطالعات مختلف باشد. به عنوان مثال در مطالعه صورت گرفته توسط فرزانه و همکاران در

های آویشن شیرازی، دارچین و مرزه خوزستانی و زمان در معرض بودن با این اسانس‌ها در کنترل قارچ *Rhizopus stolonifer* در شرایط آزمایشگاهی و مدل‌سازی و بهینه‌یابی خواص ضد قارچی اسانس‌های مذکور مورد بررسی قرار گرفت. همچنین ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس این گیاهان با استفاده از دستگاه کارماتوگرافی گازی-طیف سنج جرمی (GC/MS) بررسی شد. براساس نتایج حاصل از کارماتوگرافی گازی-طیف سنج جرمی ۲۶، ۱۶ و ۱۲ ترکیب مختلف به ترتیب در اسانس آویشن شیرازی، دارچین و مرزه خوزستانی شناسایی شد. ترکیبات شناسایی شده این اسانس‌ها در پژوهش‌های دیگر (Saharkhiz et al. 2016, Hadipanah et al. 2015, Valero and Salmeron 2003) گزارش شده است. اما بین درصد هر یک از این ترکیبات در پژوهش‌های مختلف تفاوت‌هایی وجود دارد. این تفاوت‌ها می‌تواند ناشی از تفاوت در آب و هوا، ارتفاع، مختصات جغرافیایی و ... محل رویش گیاه مورد استفاده در تهیه اسانس، مرحله رویشی و یا تکنیک‌ها و ابزار مورد استفاده در تهیه اسانس باشد (Saharkhiz et al. 2016, Hadipanah et al. 2015, Valero and Salmeron 2003).

نتایج آزمایشات ارزیابی اثر ضد قارچی اسانس‌ها بر روی رشد میسلیمی قارچ *Rhizopus stolonifer* نشان داد که این اسانس‌ها رشد میسلیم قارچ را در تمام تداخلات با سطوح مختلف غلظت‌های مورد استفاده کاهش می‌دهد اما عامل زمان در سه اسانس متفاوت بوده در اسانس آویشن شیرازی شاخص خاصیت ضد قارچی افزایش و در دو اسانس دیگر کاهش یافته است؛ این تغییرات شاخص خاصیت ضد قارچی با گذشت زمان می‌تواند به علت میزان فرآیند اکسیداسیون ترکیبات موثره اسانس با گذشت زمان یا تفاوت در مکانیزم اثر اسانس‌ها روی قارچ مورد بررسی باشد. نتایج مشابه در بررسی بازدارندگی رشد میسلیمی و سمیت تدخینی اسانس آویشن باغی روی دو قارچ بیماری‌زای *Fusarium graminearum* و *Botrytis cinerea* و سوسک زیان‌آور غلات (*Rhyzopertha dominica* F) (Ebadollahi et al. 2018b) و در بررسی اثر عصاره گیاهان چریش، مرزنجوش، به‌لیمو و صبرزرد در کنترل

آویشن کوهی و زمان در معرض بود با بازدارندگی رشد میسلیمی اسانس آویشن کوهی روی دو قارچ بیماری زای *Fusarium graminearum* و *Botrytis cinerea* یک معادله درجه دوم به ترتیب با R^2 برابر با ۰/۸۷۴ و ۰/۹۰۶ برآورد نماید. این محقق در رابطه با استفاده از روش سطح پاسخ در بهینه سازی بازدارندگی رشد میسلیمی و سمیت تدخینی اسانس آویشن باغی روی دو قارچ بیماری زای *Fusarium graminearum* و *Botrytis cinerea* و سوسک زیان آور غلات (*Rhyzopertha dominica* F) نیز گزارش نمودند (Ebadollahi et al. 2018a).

نتیجه گیری نهایی

براساس نتایج به دست آمده در این پژوهش، هر سه اسانس آویشن شیرازی، دارچین و مرزه خوزستانی به عنوان روشی ایمن برای انسان و محیط زیست قادر به کنترل رشد میسلیمی قارچ *Rhizopus stolonifer* هستند. اما با توجه عامل محدود کننده غلظت، اسانس دارچین بهتر از اسانس های آویشن شیرازی و مرزه خوزستانی در کنترل قارچ مذکور است. همچنین روش سطح پاسخ می تواند به عنوان یک روش مناسب و دقیق در مدلسازی و بهینه یابی فعالیت ضد قارچی این اسانس ها مطرح گردد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از شرکت طبیب دارو برای در اختیار قرار دادن اسانس آویشن شیرازی تشکر می نمایند. علاوه بر این، آن ها از سرکار خانم مهندس مهساسادات رضوی به پاس کمک ها و همکاری بی دریغشان در طول انجام آزمایشات نهایت تشکر و قدردانی را دارند.

مورد اثر اسانس سه رقم مرزه بر کنترل قارچ های *Botrytis cinerea* و *Rhizopus stolonifer* حداقل غلظت مهارکننده رشد میسلیم قارچ ریزوپوس برای مرزه خوزستانی $300 \mu\text{L.L}^{-1}$ گزارش شده است که تقریباً نیمی از مقدار بدست آمده در مطالعه حاضر است. اما مقدار کارواکرول که عمدتاً ترکیب اصلی اسانس مرزه خوزستانی است نیز در این مطالعه ۵۷/۴٪ گزارش شده است (Farzaneh et al. 2015)؛ در حالی که اسانس مرزه خوزستانی مورد استفاده در پژوهش حاضر تنها دارای ۳۰/۳۰٪ کرواکرول بود. همچنین در بررسی اثر سه اسانس گیاهان مرزه، آویشن شیرازی و مریم گلی در کنترل قارچ *Rhizopus stolonifer* از نظر رابطه بین درصد مواد موثره اسانس آویشن شیرازی و مرزه و همچنین میزان بازدارندگی رشد قارچ مذکور تشابه وجود دارد. در این پژوهش تیمول (۲۵/۵٪) و کرواکرول (۳۸/۵٪) و کرواکرول (۳۸٪) به ترتیب ترکیبات عمده اسانس آویشن شیرازی و مرزه را تشکیل می دادند و اسانس آویشن شیرازی در غلظت $360 \mu\text{L.L}^{-1}$ قادر به مهار رشد میسلیم این قارچ به میزان ۹۶/۱۲٪ و اسانس مرزه در در غلظت $240 \mu\text{L.L}^{-1}$ قادر به مهار رشد میسلیم این قارچ به میزان ۸۶/۱۲٪ بودند (Alizadeh-Salteh et al. 2010). همچنین با توجه به مقادیر پارامترهای R^2 و MAPE نتایج پژوهش حاضر نشان داد که روش سطح پاسخ را می توان به عنوان یک روش مناسب و دقیق برای مدلسازی و بهینه یابی فعالیت ضد قارچی اسانس های مورد بررسی علیه قارچ های *Rhizopus stolonifer* به کار گرفت. قابلیت این روش در بهینه سازی اثر قارچ کشی اسانس آویشن کوهی نیز در پژوهش انجام شده توسط دیگر محققین (Ebadollahi et al. 2018a) نیز گزارش شده است. در این تحقیق نیز روش سطح پاسخ توانست رابطه بین غلظت اسانس

REFERENCES

- Adams RP (2007) Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Allured Publishing Corporation. Carol Stream, USA.
- Alizadeh, H, Farzaneh M, Azami Z (2015) Effects of Nano-emulsion of cinnamon oils in decreasing strawberry post-harvest rots. Biological control of pests & planet journal 2(1): 57-64. [In Persian].
- Alizadeh-Salteh S, Arzani K, Omidbeigi R, Safaie N (2010) Essential oils inhibit mycelial growth of *Rhizopus stolonifer*. European Journal of Horticultural Science, 75(6): 278-282.
- Behdad M, Etemadi NA, Behdad E, Zeinali H (2013) Antifungal effects of three plant essential oils against *Rhizopus stolonifer*, the cause of soft rot on strawberry fruit. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants 29(2): 399-411. [In Persian].

- Burt S** (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International journal of Food microbiology* 94: 223-253.
- Cassella S, Cassella JP, Smith I** (2002) Synergistic antifungal activity of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) and lavender (*Lavandula angustifolia*) essential oils against dermatophyte infection. *International Journal of Aromatherapy* 12: 2-15.
- Cheng SS, Lin CY, Chung MJ, Chen YJ, Chang ST** (2019) Potential source of environmentally benign antifungal agents from *Cinnamomum osmophloeum* leaves against *Phellinus noxius*. *Plant Protection Science* 55:43-53.
- daCruz CL, Pinto VF, Patriarca A** (2013) Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. *International Journal of food microbiology* 166: 1-14.
- Davidson PM, Harrison MA** (2002) Resistance and adaptation to food antimicrobials, sanitizers, and other process controls. *Food Technology Champaing Then Chicago* 56: 69-78.
- Debonne E, Van Bockstaele F, De Leyn I, Devlieghere F, Eeckhout M** (2018) Validation of in-vitro antifungal activity of thyme essential oil on *Aspergillus niger* and *Penicillium paneum* through application in par-baked wheat and sourdough bread. *LWT* 87: 368-378.
- dosSantos NST, Aguiar AJAA, deOliveira CEV, deSales CV, Silva SDM, daSilva RS, Stamford TCM, deSouza EL** (2012) Efficacy of the application of a coating composed of chitosan and *Origanum vulgare* L. essential oil to control *Rhizopus stolonifer* and *Aspergillus niger* in grapes (*Vitis labrusca* L.). *Food Microbiology* 32: 345-353.
- Ebadollahi A, Taghinezhad E, Davari M** (2018a) Optimization of the Antifungal Activity of Essential Oil Isolated from Aerial Parts of *Thymus kotschyanus* Boiss & Hohen (Lamiaceae). *Journal of Applied Sciences and Environmental Management* 22(6): 907-910.
- Ebadollahi A, Taghinezhad E, Davari M** (2018b) Optimization of antifungal and insecticidal effects of garden thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil through response surface methodology. *Biological control of pests & planet journal* 7(1): 9-19. [In Persian].
- Eren I, Kaymak-Ertekin F** (2007) Optimization of osmotic dehydration of potato using response surface methodology. *Journal of Food Engineering* 79: 344-352.
- Eshaghi S, Abas-Manesh A, Mansory S** (2017) The Effect of Extract of Some Medicinal Plants on Control of *Botrytis cinerea* caused The Gray Mold in Vitro Condition. *Forest strategical approachmeny Journal* 2(7): 11-22. [In Persian].
- Farzaneh M, Kiani H, Sharifi R, Reisi M, Hadian J** (2015) Chemical composition and antifungal effects of three species of Satureja (*S. hortensis*, *S. spicigera*, and *S. khuzistanica*) essential oils on the main pathogens of strawberry fruit. *Postharvest Biology and Technology* 109: 145-151.
- Hadipanah A, Ghahremani A, Khorrami M, Ardalani H** (2015) Diversity in chemical composition and yield of essential oil from three ecotypes of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) in Iran. *Biological Forum* 7(1): 1802-1805.
- Jeirani Z, Jan BM, Ali BS, Noor IM, See CH, Saphanuchart, W** (2013) Prediction of the optimum aqueous phase composition of a triglyceride microemulsion using response surface methodology. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 19(4): 1304-1309.
- Li J, Ding S, Ding X** (2007) Optimization of the ultrasonically assisted extraction of polysaccharides from *Zizyphus jujuba* cv. jinsixiaozao. *Journal of Food Engineering* 80: 176-183.
- Liu D, Hu L, Liu X, Kang X, Hu Y, Xie H, Xia Z, Xie L** (2016) Antibacterial, antifungal and in vitro cytotoxic activities of three extracts isolated from mint. *Journal of Medicinal Plants Research* 10: 546-552.
- Mohammadi A, Hashemi M, Hosseini S** (2015) The control of *Botrytis* fruit rot in strawberry using combined treatments of Chitosan with *Zataria multiflora* or *Cinnamomum zeylanicum* essential oil. *Journal of Food Science and Technology* 52: 7441-7448.
- Nabavi-Pelesaraei A, Rafiee S, Mohtasebi S, Hosseinzadeh-Bandbafha H, Chau KW** (2018) Integration of artificial intelligence methods and life cycle assessment to predict energy output and environmental impacts of paddy production. *Science of the Total Environment* 631: 1279-1294.
- Olajide JO, Afolabi TJ, Adeniran JA** (2014) Optimization of oil yield from shea kernels using response surface methodology and adaptive Neuro Fuzzy inference system (ANFIS). *International Journal of Engineering Research & Technology* 3(8):1611-1620.
- Pinto E, Hrimpeng K, Lopes G, Vaz S, Gonçalves M, Cavaleiro, C Salgueiro L** (2013) Antifungal activity of *Ferulago capillaris* essential oil against *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 32: 1311-1320.
- Saharkhiz MJ, Zomorodian K, Taban A, Pakshir K, Heshmati K, Rahimi MJ** (2016) Chemical Composition and Antimicrobial Activities of Three Satureja Species Against Food-borne Pathogens.

- Journal of Essential Oil Bearing Plants 19: 1984-1992.
- Salam KK, Arinkoola AO, Oke EO, Adeleye JO** (2014) Optimization of operating parameters using response surface methodology for paraffin-wax deposition in pipeline. *Petroleum & Coal* 56(1): 19-28.
- Schipper, MAA, Stalpers JA** (1984) A revision of the genus *Rhizopus*. II. The *Rhizopus* microsporus-group. *Studies in Mycology* 25:20-34.
- Singh G, Maurya S, Catalan C, DeLampasona M** (2005) Studies on essential oils, Part 42: chemical, antifungal, antioxidant and sprout suppressant studies on ginger essential oil and its oleoresin. *Flavour and Fragrance Journal* 20: 1-6.
- Spadaro D, Gullino ML** (2004) State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit diseases. *International Journal of Food Microbiology* 91: 185-194.
- Sun DW** (2014) *Emerging technologies for food processing*. Elsevier. Amsterdam, Netherlands.
- Theis N, Lerdau M** (2003) The evolution of function in plant secondary metabolites. *International Journal of Plant Sciences* 164: 93-102.
- Tholl D** (2006) Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 297-304.
- Valero M, Salmeron M** (2003) Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth. *International Journal of Food Microbiology* 85: 73-81.
- Zheng L, Bae YM, Jung KS, Heu S, Lee SY** (2013) Antimicrobial activity of natural antimicrobial substances against spoilage bacteria isolated from fresh produce. *Food Control* 32: 665-672.