دراسة فعالية زيت عشبة الليمون في تثبيط نمو بعض الفطريات الممرضة لثمار التفاح المخزنة بالتبريد

م.وسيم كاسر الجهني [1]، أ.د. محمد مصري [2]، د. رضوان الخطيب [3]

الملخص:

استُخدمت طريقة تخفيف الآجار في دراسة فعالية زيت عشبة الليمون العطري كمادة مضادة لنمو بعض الفطريات الممرضة التي تصيب ثمار التفاح المخزنة بالتبريد والتي تضمنت كل من *Aspergillus niger*، *Botrytis cinerea* و *Penicillium* spp. وتم تحديد التركيز المثبط الأدنى(MIC) minimum inhibitory concentration والتركيز القاتل الأدنى (MFC) minimum fungicidal concentration من زيت عشبة الليمون ضد الفطريات المدروسة باستخدام طريقة التخفيفات المتسلسلة بالمرق المغذي.

أظهرت النتائج أن الفطريات المُمرضة المدروسة كانت لها حساسية قوية تجاه زيت عشبة الليمون المستخدم بتراكيز 250 و500 و 1000 µl/ml ، وكان أعلى نشاط تثبيطي لزيت عشبة الليمون ضد الفطر *Penicillium* spp. تلاه الفطر *Botrytis cinerea* و *Aspergillus niger* على التوالي. وتراوحت قيمة التركيز المثبط الأدنى (MIC) من زيت عشبة الليمون ضد الفطريات المدروسة 0.125 ، 0.25 و 0.50 µl/ml لكل من *Penicillium* spp. ، *Botrytis cinerea* و *Aspergillus niger* على التوالي، في حين بلغت قيمة التركيز القاتل الأدنى (MFC) لجميع الفطريات المدروسة 1.00 µl/ml.

وتشير هذه النتائج إلى فعالية زيت عشبة الليمون القوية المضادة لنمو الفطريات الممرضة المدروسة وإمكانية استخدامه في السيطرة عليها.

كلمات مفتاحية: النشاط المضاد للفطريات، زيت عشبة الليمون، *Aspergillus niger*، *Botrytis cinerea*، *Penicillium* spp.

(1) طالب دكتوراه . قسم علوم الأغذية . كلية الهندسة الزراعية . جامعة البعث . سورية.

(2) أستاذ دكتور . قسم علوم الأغذية . كلية الهندسة الزراعية . جامعة البعث . سورية.

(3) دكتور باحث . المعهد العالي للعلوم التطبيقية والتكنولوجيا. دمشق . سورية.

Study the Anti-Fungal Activity of Lemon grass Essential Oil Against Some Pathogenic Fungi of Cold-Stored Apples

ENG. WASIM KASER ALJUHNI(1) , Dr. Mohammed Massri(2)

Dr. RADWAN ALKHATIB(3)

Abstract:

Agar Dilution Method was employed to study the effectiveness of lemon grass oil as an antifungal agent against some pathogenic fungi affecting cold stored apples. These fungi included *Aspergillus niger, Botrytis cinerea,* and *Penicillium* spp. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) of lemon grass essential oil against the studied fungi were determined using Microdilution.

The results showed that the studied pathogenic fungi exhibited strong sensitivity to lemon grass oil at concentrations of 250, 500, and 1000 µl/ml . Significant differences were observed in the growth inhibition rates of the studied fungi. The highest inhibitory activity of lemon grass oil was against *Penicillium* spp., followed by *Botrytis cinerea* and *Aspergillus niger*, respectively. The MIC values for lemon grass oil against the studied fungi were 0.125, 0.25 and 0.50 µl.ml^{-1} for *Penicillium* spp., *Botrytis cinerea* and *Aspergillus niger* respectively. while the MFC for all studied fungi was 1.00 µl.ml^{-1}.

These results indicate the strong effectiveness of Lemon grass oil against the growth of the studied pathogenic fungi and the possibility of its use in controlling them.

Keywords: Antifungal activity, Lemon grass oil, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea, Penicillium* spp.

(1) ENG. Dep. Food Science, Faculty of Agriculture, Al-Baath University, Syria.

(2) Prof. Dr. Dep. Food Science, Faculty of Agriculture, Al-Baath University, Syria.

(3) Prof. Dr. Higher Instute for Applied Sciences and Technology, Damascus, Syria.

1. المقدمة:

يتم تخزين ثمار التفاح تحت درجات حرارة منخفضة لفترات طويلة، وخلال ذلك يمكن أن يحدث تغيير في جودتها وتدهور في مواصفاتها نتيجة تعرضها للتفاعلات الأنزيمية وتفاعلات الأكسدة ونتيجة إصابتها بالأمراض الفطرية (Nyamende *et al.*, 2021). حيث يسبب فطر *Penicillium expansum* إصابة ثمار التفاح بالعفن الأزرق، ويسبب الفطر *Botrytis cinerea* الإصابة بالعفن الرمادي، ويرتبط الفطر *Alternaria alternata* بمرض البقع البنية (Arrarte *et al.*,2017). كما تتعرض ثمار التفاح للإصابة بالفطريات التابعة للجنس *Aspergillus* (النصراوي وآخرون، 2010). ويمكن أن يكون لمسببات الأمراض الفطرية عواقب سيئة إذا لم يتم منعها. فقد تتسبب بعض أنواع الفطريات في تلوث الأغذية والأعلاف، خاصة تلك الفطريات القادرة على إنتاج السموم الفطرية، والتي تُعرف بأنها مسرطنات كبدية قوية في الحيوانات والبشر (Bankole *et al.*, 2005). ويُعد الفطر *Penicillium expansum* المُنتج الرئيسي لسم الباتيولين الفطري، وقد عُثر عليه في عينات عديدة من ثمار التفاح المخزنة المصابة بالتعفن (Rosenberger, 2003). كما تسبب العديد من الفطريات التابعة للجنس *Aspergillus* تدهور الغذاء، وهي تقوم بإنتاج الأفلاتوكسينات السامة المسرطنة. (Samson et al., 2014)

لذلك، أصبح تطبيق المعالجة الوقائية المُسبقة المختلفة قبل التخزين طويل الأجل من الممارسة الشائعة في غرف التعبئة للتحكم في الإصابات الفطرية. وعلى مدى العقود الماضية، تم تطبيق المعالجة الكيميائية المسبقة مثل هيبوكلوريت الصوديوم أو كلوريد الكالسيوم أو ثنائي فينيل أمين (DPA) وكبريتيد الهيدروجين للحفاظ على جودة ثمار التفاح خلال التخزين (Nyamende *et al.*, 2021).

وقد أدت القيود التي تفرضها الصناعات الغذائية والهيئات التنظيمية على استخدام بعض المضافات الغذائية الاصطناعية إلى تجديد الاهتمام بالبحث عن بدائل، مثل المركبات الطبيعية المضادة للميكروبات، وخاصةً المركبات ذات الأصل النباتي (Nguefack *et al*., 2012). ووفقاً لما ذكره (Nguefack *et al*., 2007) فقد ثبت أن الزيوت العطرية بمكوناتها فعالة ضد العديد من العوامل المسؤولة عن تدهور السلع الغذائية المخزنة. وازداد الاهتمام مؤخراً بالمستخلصات والزيوت الأساسية من النباتات العطرية ذات الأنشطة المضادة للميكروبات للسيطرة على مسببات الأمراض والفساد الناتج عن نشاط الفطريات في الأطعمة (Sacchetti *et al*., 2005). وأظهرت العديد من الدراسات إمكانية استخلاص المركبات الفعّالة المضادة لنمو الميكروبات من العديد من الأعشاب العطرية، والتي تُعد مركبات آمنة وغير خطرة ورخيصة نسبياً وصديقة للبيئة (Osanaiye *et al*., 2007).

وتُعد عشبة الليمون من النباتات العشبية العطرية المُعمّرة المعروفة برائحتها التي تشبه رائحة الليمون. وهي تنتمي إلى العائلة Poaceae، ويضم الجنس Cymbopogon حوالي 55 نوعاً، ويستخدم النوع *Cymbopogon citratus* بشكل أساسي لاستخلاص الزيت من الأوراق عن طريق عملية التقطير بالبخار (Schaneberg & Khan, 2002).

ويختلف التركيب الكيميائي لزيت عشبة الليمون باختلاف النوع ومرحلة النضج وظروف الإضاءة والحرارة والممارسات الزراعية المتبعة (Ekpenyong & Akpan, 2017). كما يختلف التركيب الكيميائي لزيت عشبة الليمون باختلاف المناطق التي يتواجد فيها النبات ووقت الحصاد والعوامل المناخية المختلفة (Rahimi *et al*., 2013).

ووفقاً لما ذكره (Majewska *et al*., 2019) يتكون زيت عشبة الليمون بشكل عام من الألدهيدات والكحولات والتربينات الهيدروكربونية والإسترات والكيتونات. كما بين

(Valkova *et al.*,2022) أن المركب الرئيسي في زيت عشبة الليمون هو الستزال وتبلغ نسبته 61.5٪.

وأشار (Mbili *et al.*, 2018 , Mangalagiri *et al.*, 2021)، أن فعالية زيت عشبة الليمون المضادة لنمو الميكروبات تعود إلى محتواه العالي من مركب الستزال الذي يملك نشاط فعّال مضاد لنمو الميكروبات.

وبينت نتائج الدراسة التي قام بها (Jalel *et al.*, 2023) أن استخدام زيت عشبة الليمون الأساسي بتركيز 1500 جزء بالمليون كان له فعالية تثبيط كاملة 100% ضد الفطريات *Aspergillus niger, Penicillium fimorum , Penicllium digitatum, Alternaria alternata* ، كما وجد الباحثون أن فعالية زيت عشبة الليمون المضادة لنمو الفطريات تفوقت على فعالية المبيدات الفطرية الاصطناعية المدروسة والتي تضمنت (Thiride, Ceresan, Dithane M-45, Agrozim, Bavistin, Emison, Thiovit ، الكبريت و أوكسي كلوريد النحاس).

ووفقاً لما ذكره الباحثان (Ekpenyong & Akpan, 2017) يستخدم زيت عشبة الليمون في صناعة العطور والنكهات ومستحضرات التجميل والمنظفات والمستحضرات الصيدلانية وحفظ الأغذية. ويمتاز بفاعليته الجيدة المضادة لنمو الميكروبات وفاعليته المضادة للأكسدة (Shendurse *et al.*, 2021). لذلك كان هناك اهتمام كبير بتطبيق زيت عشبة الليمون للحفاظ على جودة وسلامة المحاصيل الغذائية المخزنة.

2. هدف البحث:

نظراً لخطورة الإصابات الفطرية المنتجة للسموم الضارة المرافقة للثمار المُخزنة بالتبريد، وأهمية استخدام زيت عشبة الليمون كمضادات ميكروبية، وقلة الدراسات حول هذا الموضوع، فقد هدفت هذه الدراسة إلى:

1) استخلاص زيت عشبة الليمون من أوراق نبات عشبة الليمون والتحقق من فعالية استخدام هذا الزيت كمادة مضادة لنمو بعض الفطريات المسببة لفساد الثمار المخزنة بالتبريد.

2) تحديد الحد الأدنى من التركيز المثبط (MIC) والحد الأدنى من التركيز القاتل (MFC) لزيت عشبة الليمون المستخلص اتجاه الفطريات المدروسة.

3. مواد وطرائق البحث:

3-1- الفطريات المستخدمة في الدراسة:

تم تقييم فعالية زيت عشبة الليمون الأساسي في تثبيط نمو بعض الفطريات الممرضة التي تصيب الثمار. والتي تضمنت كل من فطر *Penicillium* spp. الذي تم عزله وتنقيته من ثمار التفاح المصابة صنف غولدن ديليشس المخزنة بالتبريد. وفطري *Aspergillus niger, Botrytis cinerea* الذي تم الحصول عليهما من مركز التقانة الحيوية في جامعة دمشق. وتم تنقية وتنمية الفطريات المدروسة باستخدام الوسط المغذي آغار ديكستروز البطاطا Potato Dextrose Agar (PDA)، وتم التأكد من خصائصها المزرعية والمجهرية قبل استخدامها.

3-2- طرائق البحث:

1.2.3. استخلاص الزيت العطري من أوراق نبات عشبة الليمون:

تم استخلاص الزيت العطري من أوراق نبات عشبة الليمون باستخدام الطريقة المتبعة من قبل (Selim, 2011)، حيث تم جمع أوراق عشبة الليمون التابعة للنوع Cymbopogon citratus في شهر آب عام 2022م من مشتل الأتاسي في مدينة حمص، وتم تنظيف الأوراق من الأتربة والغبار واستبعدت الأوراق المريضة والمصابة،

ثم قُطعت بعد ذلك الأوراق إلى قطع صغيرة ووضع 100 غ من الأوراق المُقطعة في 1000 مل من الماء المقطر ضمن الدورق الخاص بجهاز تقطير كلفنجر المصمم لاستخلاص الزيوت العطرية الطبية.

رُفعت حرارة السخان الكهربائي تدريجياً إلى 70 °م واستمرت عملية التقطير مدة ثلاث ساعات وكانت كافية لتثبت عندها كمية الزيت المفصولة والطافية في الجزء المدرج، وسُجّلت القراءة (مل). بعدها أفرغت الطبقة المفصولة من الزيت العطري في عبوات زجاجية عاتمة اللون. وتم معاملة الزيت العطري المستخلص بمادة كبريتات الصوديوم اللامائية للتخلص من الرطوبة، وحُفظ الزيت بعيداً عن الضوء في البراد عند 5 °م.

2.2.3. دراسة فعالية زيت عشبة الليمون الأساسي المضادة لنمو بعض الفطريات الممرضة لثمار التفاح:

أُختبرت فعالية زيت عشبة الليمون الأساسي المضادة لنمو الفطريات المدروسة على مرحلتين. في المرحلة الأولى تم اختبار حساسية الفطريات المدروسة لزيت عشبة الليمون باستخدام طريقة تخفيف الآجار Agar Dilution Method المتبعة من قبل (Kgang *et al*,. 2022). وفي المرحلة الثانية تم حساب التركيز المثبط الأدنىMIC والتركيز القاتل الأدنى MFC من زيت عشبة الليمون للفطريات المدروسة باستخدام طريقة تخفيفات المرق المتسلسلة Microdilution Broth Method وفق ما جاء في توصيات معهد المواصفات المختبرية والسريرية الأمريكي (CLSI, 2008).

1.2.2.3. اختبار فعالية زيت عشبة الليمون الأساسي المضادة لنمو الفطريات المُمرضة لثمار التفاح باستخدام طريقة تخفيف الآجار:

تم اختبار فعالية زيت عشبة الليمون الأساسي في تثبيط نمو الفطريات المُمرضة المدروسة باستخدام طريقة تخفيف الآجار وذلك وفق الخطوات التالية:

- تم تنمية الفطريات المدروسة على بيئة آجار دكستروز البطاطا PDA ، والتحضين عند 25 °م لمدة 5 أيام.

- تم تحضير ثمانية دوارق ذات أحجام معيارية سعة 100 مل من أوساط PDA المغذية وتم تعقيمها بالاوتوغلاف على درجة حرارة 121°م مدة 20 دقيقة، وأضيف إليها زيت عشبة الليمون بتراكيز 0 ، 250 ، 500، و 1000 µl/ml ، حيث تم إضافة الكمية المطلوبة من الزيت العطري إلى 2 مل من الإيثانول 20% (حجم/حجم) ، وتم إضافتها بعد ذلك إلى الأحجام المعيارية سعة 100 مل من أوساط PDA المعقمة والمحضنة في حمام مائي بدرجة 40 °م، وحركت الأوساط بشكل جيد وصبت في أطباق بتري معقمة قطرها (8.5 سم) وبمعدل 20 مل في كل طبق واستخدم ثلاثة أطباق لكل تركيز. واستخدم في معاملة الشاهد الإيثانول 20% بدون إضافة زيت عشبة الليمون.

- استخدم ثاقب الفلين بعد تعقيمه باللهب وتبريده لنزع قرص بقطر (1 سم) من مركز كل طبق من الأطباق الحاوية على أوساط مغذية PDA المعقمة والمضاف إليها زيت عشبة الليمون بتراكيز مختلفة.

- استخدم ثاقب الفلين بعد تعقيمه باللهب وتبريده لنزع قرص بقطر (1سم) من حافة كل مزرعة من المزارع الفطرية المدروسة والمحضنة مدة 5 أيام. وتم نقل أقراص المستعمرات ضمن ظروف معقمة وزرعها في وسط كل طبق من الأطباق الحاوية على أوساط PDA المعقمة والمضاف إليها زيت عشبة الليمون بتراكيز مختلفة.

- تم لف أطباق بتري بشكل محكم بورق البارافيلم لمنع فقدان أي جزء من مركبات زيت عشبة الليمون الطيار وحضنت الأطباق بشكل مقلوب بدرجة حرارة 25±1مْ. مدة 14 يوم.

- تم حساب أقطار نمو المستعمرات الفطرية خلال فترة التحضين في الأيام (3، 5، 7، 9، 12، و 14 يوم) وذلك بأخذ متوسط قطرين متعامدين للسطح العلوي للمستعمرة باستخدام مسطرة ميليمترية، وعُبّر عن القيم بوحدة السنتيمتر. وكررت العملية ثلاث مرات لكل تركيز وسلالة فطرية. وحسبت النسبة المئوية للتثبيط وفق ما ذكره (Kgang *et al*,. 2022) باستخدام المعادلة التالية:

MGI (%) = (dc−dt) /dc X 100 حيث أن:

- MGI (%) : النسبة المئوية لتثبيط نمو الفطر خلال فترة التحضين المحددة.

- dc : متوسط قطر مستعمرة الفطر في معاملة الشاهد.

- dt : معدل نمو قطر مستعمرة الفطر في المعاملة المدروسة.

2.2.2.3. تقدير التركيز المثبط الأدنى (MIC) والتركيز القاتل الأدنى (MFC) من زيت عشبة الليمون الأساسي المضاد لنمو الفطريات الممرضة المدروسة:

تم تقديرMIC و MFC من زيت عشبة الليمون الأساسي المضاد لنمو الفطريات الممرضة المدروسة باتباع طريقة تخفيفات المرق المتسلسلة وفق ما جاء في توصيات معهد المواصفات المختبرية والسريرية الأمريكي (CLSI, 2008) مع إجراء بعض التعديلات، وذلك وفق الخطوات التالية:

- تم تنمية وإكثار السلالات الفطرية المدروسة باستخدام بيئة مرق دكستروز البطاطا السائلة Potato Dextrose Broth (PDB)، وتم ضبط تركيز المعلق الفطري إلى القيمة 1 x 10^5 بوغة / مل، باستخدام شريحة العد المليمترية.

- تم استخدام أنابيب معقمة ومحلول DMSO (10%) معقم في التحضير المسبق لسلسلة من ستة تراكيز مختلفة من زيت عشبة الليمون، بإتباع طريقة التمديد المضاعف الثنائي Two-Fold Dilutions، حيث تراوحت التراكيز المستخدمة ضمن المجال (0.125 ـ 8.00 µl/ml).

- نُقلت حجوم متساوية (50 ميكرولتر) من تراكيز زيت عشبة الليمون المتتالية إلى الحُجر المتتالية في الصفوف السبعة الأولى ضمن الطبق ذو الـ 96 حجرة. ونُقل 50 ميكرولتر من محلول DMSO (10%) إلى الصف الثامن من الحجرات ضمن الطبق كتجربة شاهد للمقارنة.

- بعد ذلك تم تلقيح كل حجرة بحجم (150 ميكرولتر) من المعلق الفطري المُعدْ مسبقاً ذو التركيز (1×10^5 بوغة / مل)، ليصبح محتوى سلسلة الحجرات المتتالية من زيت عشبة الليمون في الصفوف السبعة الأولى ضمن المجال (0.0312 – 2.00 µl/ml).

- تم إجراء العملية السابقة بمعدل أربع حجرات لكل تركيز مختبر ومن أجل كل نوع من الأنواع الفطرية المختبرة. وتم تغطية الشرائح وتحضينها على درجة حرارة (25 °م) مدة (48 ساعة) .

- تم بعد ذلك قراءة النتائج وتحديد قيم التركيز المثبط الأدنى (MIC) والتركيز القاتل الأدنى (MFC) لزيت عشبة الليمون ضد السلالات الفطرية المدروسة. حيث عُدَّ أول تركيز صعوداً ضمن سلسلة التراكيز الذي يحدث عنده تثبيط في النمو المرئي للفطر (أي توقف تشكل العكارة) بمثابة التركيز المثبط الأدنى MIC . أمّا من أجل تحديد قيم التركيز القاتل الأدنى MFC ، تم زرع (0,1 مل) من محتوى الحفرة الموافقة للتركيز المثبط الأدنى MIC وما يليها من حفر رائقة المظهر صعوداً ضمن سلسلة

التراكيز على أطباق بتري تحتوي بيئة PDA الخاصة بالفطر وتم تحضينها مدة 72 ساعة، وكان التركيز القاتل الأدنى للفطر MFC موافقاً لأول حجرة رائقة لا تشكل مستعمرات داخل الطبق، وقد ينعدم النمو في حفرة MIC فتكون هي حفرة MFC ذاتها، فيتساوى التركيزان MFC=MIC.

3.3. التحليل الإحصائي:

تم تحليل النتائج التي تم التوصل إليها باستخدام برنامج Minitab 17 . حيث تم التعبير عن نتائج التحاليل على أساس حساب المتوسط لثلاث مكررات وحساب الانحراف المعياري (±SD). واستخدم تحليل التباين (ANOVA) لتحديد تأثير تراكيز زيت عشبة الليمون المستخدمة على تثبيط نمو المستعمرات الفطرية المدروسة، وتمت المقارنة بين المتوسطات باستخدام اختبار فيشر Fisher Individual Tests عند مستوى ثقة 99%.

4. النتائج والمناقشة:

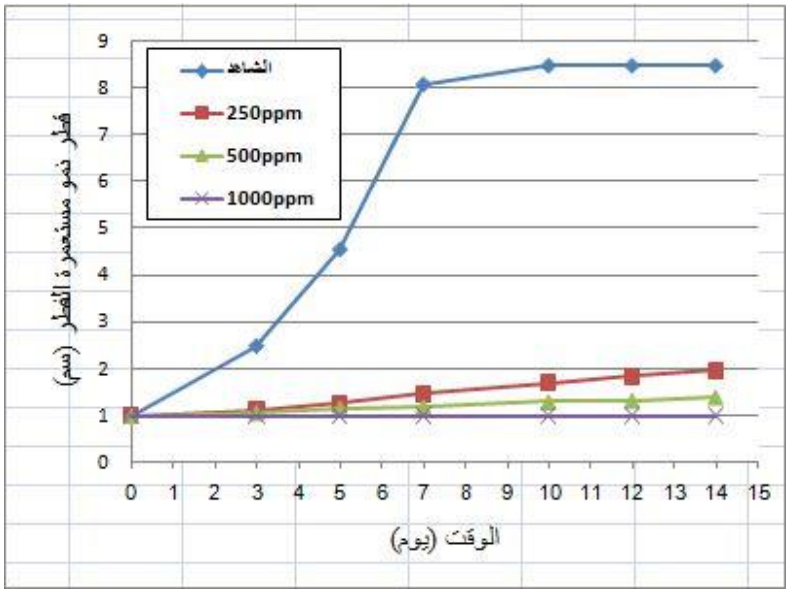
1.4. الخصائص الظاهرية للزيت العطري المُستخلص من أوراق عشبة الليمون:

بلغت نسبة الزيت العطري المستخلص من أوراق نبات عشبة الليمون الخضراء 1.0% حجم/وزن. وامتاز الزيت العطري المستخلص بلونه الأصفر الفاتح، ورائحته العطرية المميزة التي تشبه رائحة الليمون. واختلفت نسبة زيت عشبة الليمون العطري المُستخلصة في هذه الدراسة عن النسب المذكورة في الدراسات الأخرى، حيث بلغت نسبة الزيت العطري المستخلص في الدراسة التي قام بها (Mahanta *et al.*, 2007) 0.4%، في حين بلغت نسبة الاستخلاص في الدراسة التي قام بها (Desai & Parikh, 2015) 1.8%. ويعود السبب في اختلاف نسبة عائد الاستخلاص لزيت عشبة الليمون إلى اختلاف الطرق المستخدمة في عملية الاستخلاص واختلاف التركيب الكيميائي لزيت عشبة الليمون المستخلص (Majewska *et al.*, 2019).

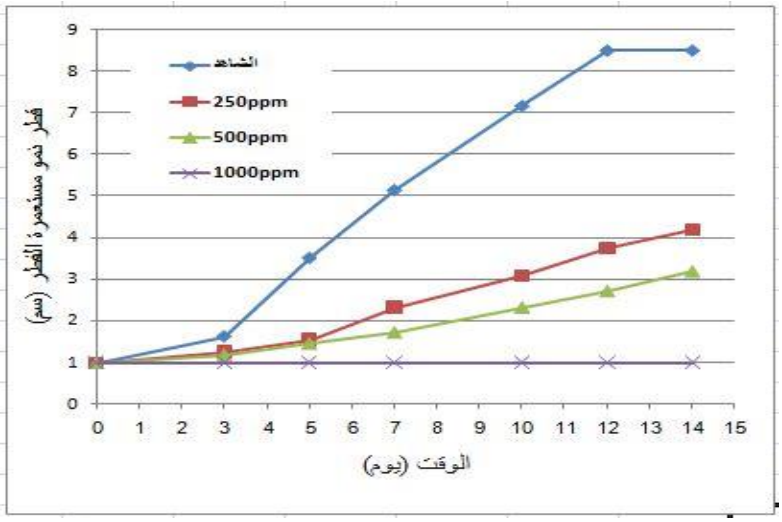
2.4. نتائج اختبار فعالية زيت عشبة الليمون الأساسي المضادة لنمو الفطريات المُمرضة باستخدام طريقة تخفيف الآجار:

تشير الأطباق في الشكل (1) والبيانات في الأشكال (2،3،4) بوضوح أن جميع الفطريات المدروسة تم تثبيط نموها بواسطة التراكيز المختلفة المستخدمة من زيت عشبة الليمون. ولوحظ توقف تشكل الأبواغ الفطرية من المستعمرات الفطرية لكل من الفطر *Aspergillus niger* و *Penicillium* spp. في الأطباق المعاملة بالتراكيز المختلفة من زيت عشبة الليمون مقارنةً مع عينة الشاهد.

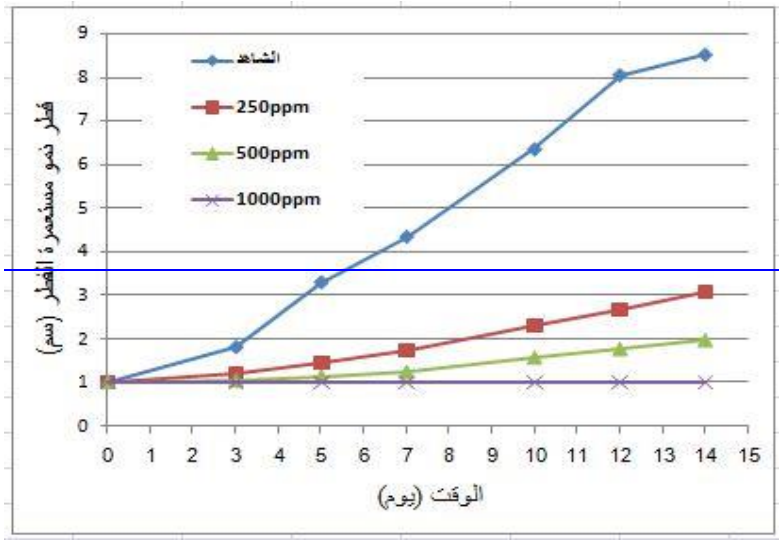
الشكل (1) يبين فعالية زيت عشبة الليمون في تثبيط نمو بعض الفطريات المُمرضة لثمار التفاح، (أ). على نمو الفطر *Botrytis cinerea*، (ب) على نمو الفطر *Penicillium* spp.، (ج) على نمو الفطر *Aspergillus niger* .



الشكل (2) تأثير التراكيز المختلفة من زيت عشبة الليمون في تثبيط نمو مستعمرات فطر *Penicillium spp.* أثناء التحضين على 25 °م مدة 14 يوم.



الشكل (3) تأثير التراكيز المختلفة من زيت عشبة الليمون في تثبيط نمو مستعمرات فطر *Aspergillus niger* أثناء التحضين على 25 °م مدة 14 يوم.



الشكل (4) تأثير التراكيز المختلفة من زيت عشبة الليمون في تثبيط نمو مستعمرات فطر *Botrytis cinerea* أثناء التحضين على 25 °م مدة 14 يوم.

ويوضح الجدول (3)، تأثير تركيز زيت عشبة الليمون المستخدم في نسبة تثبيط نمو الفطريات الممرضة المدروسة التي تصيب ثمار التفاح وذلك بعد 14 يوم من التحضين بدرجة حرارة 25 °م. ويلاحظ من الجدول (3) أن الفطر *Penicillium* spp. كان أكثر حساسية للمعاملة بزيت عشبة الليمون مع وجود فرق معنوي عند مستوى دلالة 0.01 وذلك مقارنةً مع كل من الفطر *Botrytis cinerea* والفطر *Aspergillus niger*. كما أظهرت النتائج وجود فعالية تثبيط كاملة 100% للفطريات المدروسة عند استخدام زيت عشبة الليمون بتركيز 1000 µl/ml . ومع انخفاض تركيز زيت عشبة الليمون المستخدم إلى 500 و 250 µl/ml انخفض معدل تثبيط نمو الفطريات الممرضة المدروسة بشكل معنوي عند مستوى معنوية 0.01، حيث انخفض معدل تثبيط نمو فطر *Penicillium* spp. إلى 94.67% و87.11٪ على التوالي، وانخفض معدل تثبيط نمو فطر *Botrytis cinerea* إلى 87.56٪ و 72.44٪ على التوالي، في حين

انخفض معدل تثبيط نمو الفطر *Aspergillus niger* إلى 70.67٪ و 57.33٪ على التوالي. وذلك بعد 14 يوم من التحضين بدرجة حرارة 25 °م.

جدول (3) تأثير تركيز زيت عشبة الليمون المستخدم في معدل قطر نمو المستعمرات الفطرية ونسبة تثبيط النمو في الفطريات الممرضة لثمار التفاح المدروسة.

	معدل قطر نمو المستعمرة (سم)				نسبة تثبيط نمو الفطر %		
نوع الفطر	الشاهد	250 µl/ml	500 µl/ml	1000 µl/ml	250 µl/ml	500 µl/ml	1000 µl/ml
Penicillium spp.	7.50 ±0.00	0.97 ±0.15	0.40 ±0.10	0.00 ±0.00	Ca 87.11 ±2.04	Ba 94.67 ±1.33	Aa 100.0 ±0.00
Aspergillus niger	7.50 ±0.00	3.20 ±0.20	2.20 ±0.10	0.00 ±0.00	Ec 57.33 ±2.67	Dc 70.67 ±1.33	Aa 100.0 ±0.00
Botrytis cinerea	7.50 ±0.00	2.07 ±0.21	0.97 ±0.15	0.00 ±0.00	Db 72.44 ±2.08	Cb 87.56 ±2.78	Aa 100.0 ±0.00

كل قيمة في الجدول تمثل المتوسط الحسابي ± الانحراف المعياري (n=3)، وتدل الأحرف الكبيرة المختلفة في السطر الواحد على وجود فرق معنوي عند مستوى معنوية 1%، أما الأحرف الصغيرة المختلفة في العمود الواحد فتدل على وجود فروق معنوية عند مستوى معنوية1%.

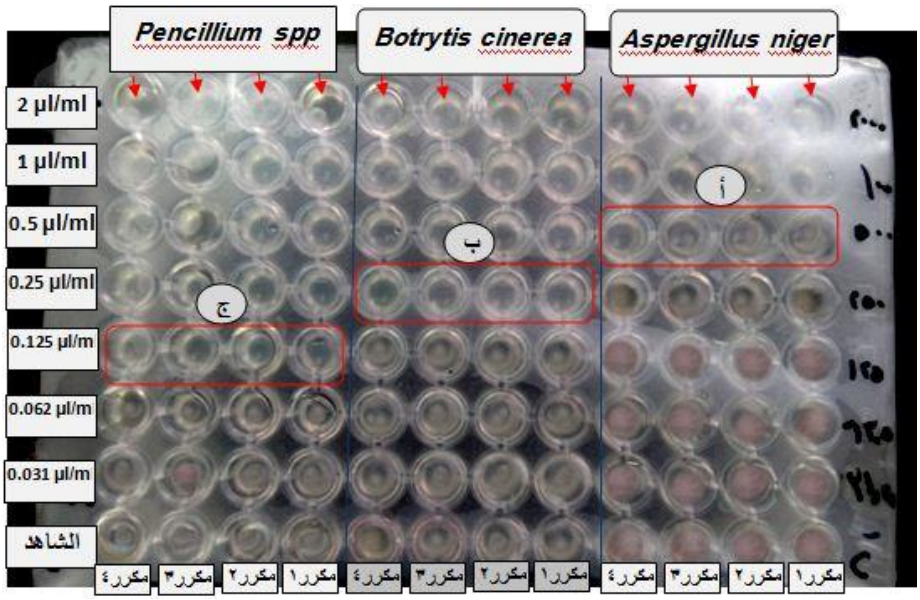
توافقت النتائج التي تم التوصل إليها في هذه الدراسة إلى حد كبير مع نتائج الدراسة التي قام بها (Mahanta *et al.*, 2007)، حيث وجد الباحث وزملاؤه أن استخدام زيت عشبة الليمون بتركيز 500 µl/ml و 1000 µl/ml منع تماما نمو كل من *A. flavus* ، *A. niger*، *A. alternata* و *P. citrinum*. كما وجد الباحث وزملاؤه أن استخدام زيت عشبة الليمون بتركيز 250 µl/ml قلل بشكل كبير من إنبات الأبواغ الفطرية المتسارع للفطر *A. niger* والفطر *P. citrinum* .

كما أظهرت النتائج التي توصل إليها (Kumar *et al.*, 2009) أن استخدام زيت عشبة الليمون بتركيز 250 µl/ml أدى إلى حدوث تثبيط كامل في نمو الفطر *Aspergillus niger*.

وفي دراسة أخرى قام بها (Premathilake *et al.*, 2018) أظهرت النتائج أن التراكيز الأربعة التي قام الباحث وزملاؤه باستخدامها من زيت عشبة الليمون (15000 µl/ml ، 10000µl/ml ، 5000µl/ml ، و 1000µl/ml) عملت على التثبيط الكامل لنمو كل من الفطريات *Chrysosporium* spp. *Penicillium* spp*., Fusarium* spp*.*

ووفقاً لما ذكره (Rasooli & Abyaneh, 2004) يمكن عند اختبار نشاط الزيوت الأساسية المضادة لنمو الميكروبات أن يكون هناك اختلاف في النتائج وقيم التركيز المثبط من الزيت، وذلك وفقاً لتقنية الفحص، ووسط النمو، والكائنات الحية الدقيقة التي يتم اختبارها، ومكونات وتركيب الزيت العطري المستخدم. وهذا ما يفسر اختلاف قيم

التركيز المثبط من زيت عشبة الليمون في هذه الدراسة عن القيم التي تم ذكرها في الدراسات الأخرى.



3-4- نتائج تقدير التركيز المثبط الأدنى (MIC) والتركيز القاتل الأدنى (MFC) لزيت عشبة الليمون الأساسي المضاد لنمو الفطريات المدروسة:

تم تقدير التركيز المثبط الأدنى (MIC) والتركيز القاتل الأدنى (MFC) من زيت عشبة الليمون المضاد لنمو الفطريات الممرضة المدروسة باستخدام الشريحة ذات 96 حفرة وذلك كما هو مخطط وواضح في الشكل (5).

الشكل (5) يبين التركيز المثبط الأدنى (MIC) والتركيز القاتل الأدنى (MFC) من زيت عشبة الليمون المضاد لنمو الفطريات الممرضة المدروسة باستخدام الطبق ذو 96 حجرة أ: MIC الذي توقفت تشكل العكارة عنده للفطر *Aspergillus niger* ، ب: MIC الذي

توقفت تشكل العكارة عنده للفطر *Botrytis cinera* ، ج: MIC الذي توقفت تشكل العكارة عنده للفطر *Penicillium* spp.

وأظهرت النتائج أن قيم التركيز المثبط الأدنى (MIC) من زيت عشبة الليمون ضد السلالات الفطرية الممرضة المدروسة تراوحت بين 0.125 و 0.50 µl/ml. وبلغت قيم MIC 0.125 و 0.250 و 0.50 µl/ml *لكل من فطر* *Penicillium* spp. ، *Botrytis cinerea* و *Aspergillus niger* على التوالي. بينما بلغت قيمة التركيز القاتل الأدنى (MFC) 1.00 µl/ml لجميع الأنواع الفطرية المدروسة.

وقد اقترح (Aligianis *et al.*, 2001) تصنيف نشاط الزيوت النباتية العطرية المضادة لنمو الميكروبات وفق قيم MIC إلى ثلاثة أقسام تضمنت؛ المثبطات القوية التي يكون فيها قيمة MIC مساوية أو أقل من 0.5 µl/ml؛ والمثبطات المعتدلة التي تتراوح فيها قيمة MIC بين 0.6 و1.5 µl/ml؛ والمثبطات الضعيفة التي تكون قيمة MIC فيها أعلى من 1.6 µl/ml.

وبناءًا على قيم MIC من الزيت الأساسي لعشبة الليمون ضد السلالات الفطرية المذكورة في دراستنا، ووفقاً لتصنيف نشاط الزيوت النباتية العطرية المضادة لنمو الميكروبات المقترح من قبل (Aligianis *et al.*, 2001)، فإن زيت عشبة الليمون الأساسي يُعد من المثبطات القوية المضادة لنمو كل من الفطريات
Aspergillus niger, Botrytis cinerea و *Penicillium* spp.

5. الاستنتاجات والتوصيات:

يُعد زيت عشبة الليمون العطري من المثبطات القوية المضادة لنمو فطريات *Penicillium* spp. و *Aspergillus niger* و *Botrytis cinerea* الممرضة للثمار المُخزنة.

وأظهرت النتائج أن الحد الأدنى من التركيز القاتل MFC من زيت عشبة الليمون الأساسي ضد الفطريات السابقة المدروسة بلغ 1.00 µl/ml.

وتشير هذه النتائج إلى إمكانية استخدام زيت عشبة الليمون كمضاد فطري فعّال صديق للبيئة للسيطرة على الفطريات *Penicillium* spp. و *Aspergillus niger* و *Botrytis cinerea* .

ويُقترح إجراء مزيد من الدراسات للتحقق من خصائص زيت عشبة الليمون ضد مسببات الأمراض الفطرية الأخرى.

6. المراجع:

1.6. المراجع العربية:

[1].النصراوي، حسين و فهد، ستار جبار و سكر، فؤاد (2010). تأثير إحداث الجروح الميكانيكية لثمار التفاح مختبرياً على انتشار الفطريات المسببة للتعفن. مجلة ميسان للدراسات الأكاديمية، المجلد 9 العدد 17.

2.6. المراجع الأجنبية:

[1]. Aligianis, N.; Kalpoutzakis, E.; Mitaku, S. & Chinou, IB. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oil from Origanum species. J. Agric Food Chem. V.49, pp: 4168–4170.

[2]. Arrarte, E.; Garmendia, G.; Rossini, C.; Wisniewski, M. & Vero, S.(2017). Volatile organic compounds produced by Antarctic strains of Candida sake play a role in the control of postharvest pathogens of apples. Biol Control. V.109, pp:14–20.

[3]. Bankole, S. A.; Joda, A. O. & Ashidi, J. S. (2005). The use of powder and essential oil of Cymbopogon citratus against mould deterioration and aflatoxin contamination of egusi melon seeds. J. Basic Microbiol.V.2, pp:133–141.

[4]. Clinical and Laboratory Standards Institute .CLSI. (2012).Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility. Tests for Bacteria That Grow Aerobically. Approved Standard—Ninth Edition. CLSI document M07-A9.

[5]. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).(2008). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. CLSI document M27-A3, 2008; 28(14): 10. Dzoyem JP, Tchuenguem RT, Kuiate JR, Teke GN, Kechia FA.

[6]. Desai, M. A. & Parikh, J. (2015). Extraction of essential oil from leaves of lemon grass using microwave radiation: optimization, comparative, kinetic, and biological studies. ACS Sustainable Chemistry and Engineering.V;3(3), 421-431.

[7]. Ekpenyong, C. E. & Akpan, E. E. (2017). Use of Cymbopogon citratus essential oil in food preservation: Recent advances and future perspectives. Food Sci. Nutr. V.57, pp; 2541–2559.

[8]. Jalel, S.J.; Abed, I. J. & Jasim, A. N. (2023). Evaluating the biological activity of lemon grass and rosemary essential oils against some fungi isolated from vegetables and fruits.

Journal of Population Therapeutics and Clinical Pharmacology .V. 30, N.8, pp:46–54.

[9]. Kgang, I. E.; Mathabe, P. M. K.; Klein, A.; Kalombo, L.; Belay, Z. A. & Caleb, O. J. (2022). Effects of lemon(Citrus Limon L.) lemon grass (Cymbopogon citrates) and peppermint (Mentha piperita L.) essential oils against of Botrytis cinerea and Penicillium expansum. journal JSFA Reports. V.2, pp:405-414.

[10]. Kumar, S.; Mishra, R. K.; Kumar, A.; Srivastava, S. & Chaudhary, S. (2009). Regulation of stipule development by cochleata and stipule-reduced genes in pea (Pisumsativum), journal Planta.V.230,N.3,pp:449–58.

[11]. Mahanta, J. J.; Chutia, M.; Bordoloi, M.; Pathak, M. G.; Adhikary, R. K. & Sarma, T. C.(2007). Cymbopogon citratus L. essential oil as a potential antifungal agent against key weed moulds of Pleurotus spp. Spawns. Flavour And Fragrance Journal.V.22,pp:525–530.

[12]. Majewska, E.; Kozlowska, M.; Gruszczynska-Sekowska, E. & Kowalska, D. (2019). Tarnowska, K. Lemon grass (Cymbopogon citratus) essential oil: Extraction, composition,

bioactivity and uses for food preservation-a review. Polish J. Food Nutr. Sci.V.69, N.4, pp;xx-xx.

[13]. Mangalagiri, N. P.; Panditi, S. K. & Jeevigunta, N. L. L.(2021). Antimicrobial activity of essential plant oils and their major components. journal Heliyon. V.7 ,pp:678-685.

[14]. Mbili, N. C.; Laing, M. D. & Yobo, K. S.(2018). Integrated Control of Penicillium expansum and Botrytis cinerea of Apples Using Potassium Silicate. International Symposium on Innovative Plant Protection in Horticulture.V.12,pp;75-80.

[15]. Nguefack, J.; Nguikwie, S. K.; Fotio, D.; Dongmo, B.; Leth, V. & Nkengfack, A. E. (2007). Fungicidal potential of essential oils and fractions from Cymbopogon citratus, Ocimum gratissimum and Thymus vulgaris to control Alternaria padwickii and Bipolaris oryzae, two seed-borne fungi of rice (Oryza sativa L.). Journal of Essential Oil Research. V.19,pp:581-587.

[16]. Nguefack, J.; Tamgue, O.; Lekagne Dongmo, J. B.; Dakole C. D.; Leth, V., Vismer, H. F., Amvam Zollo, P. H. & Nkengfack, A. E.(2012). Synergistic action between fractions of essential oils from Cymbopogon citratus, Ocimum

gratissimum and Thymus vulgaris against Penicillium expansum. Journal of Food Control.V.23,pp:377-383.

[17]. Nyamende, N. E.; Domtchouang, F. R.; Belay, Z. A.; Keyser, Z.; Oyenihi, A. & Caleb, O. J. (2021). Alternative postharvest pre-treatment strategies for quality and microbial safety of 'Granny Smith' apple. Science Direct. Heliyon. V.7,pp:xx-xx.

[18]. Osanaiye, B. C. A.; Agbaji, A. S. & Dakare, M. A.(2007). Antimicrobial activity of oils extracts of Cymbopogon citratus (lemon grass), Eucalyptus citriodora and Eucalyptus camaldulensis. J. Med. Sci.V.7,pp:694-697.

[19]. Premathilake, U. G. A. T.; Wathugala, D. L. & Dharmadasa, R. M. (2018). Evaluation of chemical composition and assessment of antimicrobial activities of essential oil of lemon grass (Cymbopogon citratus). International Journal of Minor Fruits, Medicinal and Aromatic Plants. V.4, N.1,pp; 13-19.

[20]. Rahimi, N. M.; Nazarian, Sh.; Farahani, H.; Fallah-Koohbijari, G. R.; Ahmadi, F. & Atooli, H. (2013). Chemical Composition, Antioxidant, and Antibacterial Activities of the Essential Oil and Methanol Extracts of Eucalyptus

largiflorens. International Journal of Food Proper, V.16, N.2,pp:369-381.

[21]. Rasooli, I. & Abyaneh, M. R. (2004). Inhibitory effects of thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. Journal of Food Control. V.15,pp:479–483.

[22]. Rosenberger, D. A. (2003). Control of Penicillium expansum during apple harvest and storage. National Center for Food Safety and Technology.V.3, pp:12-19.

[23]. Sacchetti, G.; Majetti, S. & Muzzoli, M.(2005). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. Food Chem.V.91,pp:621–632.

[24]. Samson, R. A.; Visagie, C. M.; Houbraken, J.; Hong, S. B.; Hubka, V. & Klaassen, CH.; (2014). identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. Stud. Mycol. V.78.pp:141-173.

[25]. Schaneberg, B. T. & Khan, I. A.(2002). Comparison of extraction methods for marker compounds in the essential oil of lemon grass by GC. Journal of Agricultural Food and Chemistry.V.50,pp:134-142.

[26]. Selim, Samy A. (2011). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extract of the Egyptian lemongrass *Cymbopogon proximus* Stapf. Grasas.V.62 (1)pp: 55-61.

[27]. Shendurse, A.M.; Sangwan, R.B.; Amit Kumar, R.V.; Patel, A.C.; Gopikrishna, G. & Roy, S.K.(2021). Phytochemical screening and antibacterial activity of lemon grass (Cymbopogon citratus) leaves essential oil. J. Pharmacogn. Phytochem.V.10,pp:445–449.

[28]. Valkova, V.; Duranova, H.; Galovicova, L.; Borotova, P.; Vukovic, N. L.; Vukic, M. & Kacaniova, M. (2022). Cymbopogon citratus Essential Oil: Its Application as an Antimicrobial Agent in Food Preservation. AGRONOMY Journal, V.12, pp:155-179.