

اثرهای ضد قارچی دود مایع حاصل از پیرولیز ضایعات توتون روی قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی

یعقوب صرافی^{۱*}، غلامرضا مرادی رباطی^۲ و محمدحسین فاطمی^۳

۱- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه شیمی آلی، دانشکده شیمی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران، پست الکترونیک: ysarrafi@umz.ac.ir

۲- دانشجوی دکترا، گروه شیمی آلی، دانشکده شیمی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

۳- استاد، گروه شیمی تجزیه، دانشکده شیمی، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

تاریخ دریافت: تیر ۱۳۹۷

تاریخ اصلاح نهایی: آبان ۱۳۹۷

تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۹۷

چکیده

هدف از این مطالعه، بررسی اثرهای ضد قارچی دود مایع تولید شده از ضایعات توتون و همچنین شناسایی و اندازه‌گیری ترکیب‌های مؤثره آن بود. ضایعات در کوره در شرایط بدون اکسیژن پیرولیز شد و دود حاصل با استفاده از مبرد خنک شده و تبدیل به دود مایع شد. بررسی اثرهای ضد قارچی دود مایع با استفاده از سه نوع قارچ *Rhizoctonia solani*، *Sclerotinia sclerotiorum* و *Phytophthora nicotianae* که به ترتیب عامل بیماری ساق زخم، پوسیدگی یقه و ساق سیاه توتون می‌باشند در غلظت‌های صفر، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ ppm دود مایع به روش اختلاط با محیط کشت انجام شد. نتایج تجزیه واریانس تأثیر دود مایع بر قارچ‌ها نشان داد که تأثیر دود مایع، غلظت و اثر متقابل دود مایع بر غلظت روی قارچ‌ها در سطح احتمال ۱٪ آماری معنی‌دار می‌باشد. نتایج مقایسه میانگین تأثیر دود مایع بر قارچ‌ها نشان داد که نمونه دود مایع حاصل از پیرولیز ۲۵٪ دمار توتون + ۷۵٪ خرده برگ توتون در غلظت ۴۰۰۰ ppm رشد میسیلیوم قارچ‌های بیماری‌زای فوق را ۱۰۰٪ کنترل می‌نماید. همچنین دود مایع تولید شده از تیمار بالا در غلظت‌های پایین نیز رشد میسیلیوم قارچ‌های *Rhizoctonia solani* و *Sclerotinia sclerotiorum* را ۱۰۰٪ کنترل نمود. براساس گزارش نتایج تحقیقات، حضور ترکیب‌های فنولی، اسیدهای آلی و آلکالوئیدی در دود مایع عامل خواص ضد قارچی آن است. بنابراین استخراج این ترکیب‌ها از دود مایع انجام شده و آنالیز کیفی به وسیله روش کروماتوگرافی گازی اسپکتروسکوپی جرمی (GC/MS) و آنالیزهای کمی برای اندازه‌گیری فنول کل و ترکیب‌های آلکالوئیدی با استفاده از روش اسپکتروفتومتری انجام شد. مقایسه نتایج نشان داد که اثرهای کنترلی ترکیب‌های آلکالوئیدی بیشتر از ترکیب‌های فنولی و اسیدی در دود مایع تولید شده از ضایعات توتونی است. نتایج این تحقیق نشان از توان بالای دود مایع در مهار زیستی قارچ‌های بیماری‌زا دارد.

واژه‌های کلیدی: زیست‌توده، مهار زیستی، پیرولیز، فنول، نیکوتین، دود مایع.

مقدمه

در مزارع کشاورزی باقیمانده و خرده برگ و دمار برگ توتون که طی فرایندهای آماده‌سازی برگ توتون و ساخت سیگار در کارخانجات شرکت دخانیات تولید شده، در انبارهای این صنعت نگهداری می‌شوند. مهمترین کاربرد توتون در ساخت سیگار، سیگار، پپ، چپق و توتون

هر ساله مقدار زیادی ضایعات توتون در دو بخش کشاورزی و صنعت شرکت دخانیات تولید می‌شود که به علت کیفیت پایین، قابلیت استفاده در صنعت دخانیات را ندارد. ضایعات کشاورزی گیاه توتون شامل ساقه و ریشه است که

پوسته داخلی نارگیل، نارگیل و چوب اکالیپتوس به شدت وابسته به محتویات اسیدی و فنولی است و از طریق مهار رشد پنی سیلیوم مورد تأیید قرار گرفت (Oramahi & Yoshimura, 2013). دود مایع سال‌ها به‌عنوان استریل‌کننده، بوزدا، کود و آنتی‌میکروب مورد استفاده قرار می‌گرفت (Loo *et al.*, 2008). فعالیت آنتی‌میکروبی قوی دود مایع وابسته به محتوای بالای اسیدهای آلی و ترکیب‌های فنولی آن می‌باشد (Wei *et al.*, 2010؛ Shibayama *et al.*, 1998). زمانی که اسید جداسازی شده از دود مایع بکار برده شود و یا با اسیدهای دیگر در رقت ۳۰۰ تا ۶۰۰ برابر مخلوط گردد، می‌تواند در کنترل آفات و بیماری‌های گیاه مؤثر واقع شود (Souza, 2003). استفاده از سموم شیمیایی برای یک بازه زمان طولانی یک روش موفق برای کنترل بیماری‌های قارچی گیاه بود. کنترل قارچ‌ها با استفاده از سموم سنتزی اثر منفی بر سلامت انسان دارند و منجر به ایجاد باقیمانده سموم در محیط زیست می‌شوند. برای دوری از آلودگی محیط زیست و مشکلات باقیمانده سموم سنتزی، تولید سموم طبیعی حاصل از هیدرولیز زیست‌توده گیاهی از قبیل دود مایع، افزایش یافت. آینده‌نگری برای توسعه استفاده از دود مایع به‌عنوان یک نگه‌دارنده دوست‌دار طبیعت ضروری می‌باشد، زیرا این ماده ارگانیک دارای خواص ضد قارچی و حشره‌کشی است. دود مایع بدست‌آمده از منابع مختلف از زیست‌توده به‌عنوان مهارکننده طبیعی و بی‌خطر با فعالیت‌های زیستی گوناگون شناخته شده است که از فعالیت‌های زیستی مختلف آن می‌توان به خواص ضد قارچی، ضد موربانه‌ای و فعالیت دفع حشرات اشاره کرد (Oramahi & Yoshimura, 2013).

دود مایع به‌عنوان یک محصول جانبی از کربونیزاسیون زیست‌توده گیاهی، دارای توانایی ضد میکروبی و استریل‌کنندگی است و قادر به توسعه و رشد گیاه و نیز بهبود سلامت حیوانات در کشاورزی و صنعت می‌باشد. گزارش‌های علمی نشان داد که دود مایع یک محلول آبی به رنگ قرمز مایل به قهوه‌ای و مخلوط پیچیده‌ای از آب، گایاکول (Guaiacol)، فنول (Phenol)، وانیلین (Vanilin)، کاتکول

جویدنی است (Meher *et al.*, 1995). مشخصه اصلی پسماند جامد تولید شده در طی فرایند ساخت سیگار، محتوای نیکوتین بالا و ساختار پودری آن است. نیکوتین موجود در آن دارای خاصیت میکروب‌کشی بوده و ساختار پودری پسماند نیز اجازه بازیافت آن را نمی‌دهد (Civilini *et al.*, 1997).

پیرولیز (pyrolysis)، تجزیه حرارتی مواد آلی در غیاب اکسیژن یا وقتی که اکسیژن به‌طور قابل توجهی کمتر از حالت مورد نیاز برای احتراق کامل در محیط وجود داشته، تعریف می‌شود. پیرولیز زیست‌توده یک روش برای تولید زغال، قطران (دود مایع) و محصولات گازی است (Balat *et al.*, 2009). دما مهم‌ترین فاکتور برای توزیع محصولات پیرولیزی است. در دمای بالاتر مولکول‌های بزرگتر که در مایع و باقیمانده جامد وجود دارند، برای تولید مولکول‌های کوچکتر که کسر گازی را غنی می‌کنند، شکسته می‌شوند. دماهای پایین و زمان‌های توقف زیاد به نفع تولید زغال است، در حالی که دماهای بالاتر و مدت زمان حرارت کوتاه‌تر منجر به تولید مایع بیشتر می‌شود (Balat *et al.*, 2009؛ Bridgwater, 2003). فرایندهای شیمیایی حرارتی از قبیل پیرولیز یا تبدیل به گاز به‌طور گسترده‌ای برای زیست‌توده بکار می‌رود. با توجه به محتوای انرژی، پیرولیز یک شکل از بازیافت فرایند انرژی است که دارای قابلیت تولید زغال، روغن و محصولات گازی می‌باشد (Putun *et al.*, 2005).

دود مایع (liquid smoke) که سرکه چوب نیز نامیده می‌شود، یک ماده تولید شده از فرایند کربونیزاسیون زیست‌توده گیاهی در دمای بالا و عدم وجود اکسیژن می‌باشد. با توجه به منحصر به فرد بودن ساختار پیچیده و ترکیب‌های شیمیایی، دود مایع می‌تواند به‌عنوان یک ماده شیمیایی با توان آفت‌کش زیستی و نگه‌دارنده چوب قابل استفاده باشد. دود مایع تولید شده از انواع مختلف زیست‌توده گیاهی، با توجه به خواص متفاوت آنها به صورت ضد میکروب، ضد قارچ و ضد موربانه مورد استفاده قرار می‌گیرد. بازدهی دود مایع حاصل از زیست‌توده‌ای مانند

شاهد برای بررسی فعالیت ضد قارچی با همان گونه‌های قارچ در شرایط یکسان مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج نشان داد که نیکوتین، فعالیت ضد قارچی را در برابر بیشتر انواع قارچ‌های مورد مطالعه داشت. کمپلکس نیکوتین کبالت (II) نیز در برابر همه انواع قارچ‌های انتخاب شده مؤثر بود (Zaidi & Gul, 2005).

بسیاری از اسیدهای آلی شناخته شده، در برگ توتون نیز موجود می‌باشند. از میان اسیدهای غیرفرار در برگ توتون، اسید سیتریک (Citric acid)، مالیک (Malic acid) و اگزالیک (Oxalic acid) در گروه اسیدهای عمده و اسید گلیکولیک (Glycolic acid)، سوکسینیک (Succinic acid)، مالونیک (Malonic acid)، فوماریک (Fumaric acid) و پیرویک (Pyruvic acid) در گروه اسیدهای جزئی برگ توتون قرار دارند. در حالی‌که از میان اسیدهای فرار در توتون، اسید استیک و فوماریک در گروه اسیدهای عمده و پروپانوئیک (Propanoic acid)، آلفا-فورانیک (α -furanic acid)، بنزوئیک (Benzoic acid)، آلفا-متیل-بوتیریک (α -methyl-butyric acid) و بتا-متیل-والریک (β -methyl-valeric acid) در گروه اسیدهای جزئی می‌باشند. رنگدانه‌ها و فنول‌ها جزء ترکیب‌های اصلی هستند که موجب کیفیت برگ توتون شده و قابلیت استفاده از آن را ممکن می‌سازند. ترکیب‌های فنولی شناخته شده نقش مهمی در رنگ برگ توتون، کیفیت و قدرت فیزیولوژیکی دود دارند. در تحقیقات اخیر مقدار و تغییر در مقدار فنول‌های آزاد در دود نسبت به پلی‌فنول‌ها در برگ توتون از اهمیت بیشتری برخوردار بودند (Tso, 1990). بنابراین، هدف از انجام این پژوهش، بررسی اثرهای ضد قارچی دود مایع تولید شده از ضایعات توتون و همچنین شناسایی و اندازه‌گیری ترکیب‌های مؤثره آن بود.

مواد و روش‌ها

ضایعات توتون

ضایعات توتون استفاده شده در این پژوهش، شامل ضایعات صنعتی و کشاورزی توتون بودند. ضایعات صنعتی

(Catechol)، سیرینگول (Syringol)، فوران کربوکسی آلدئید (Furan carboxaldehyde)، ایزواوژنول (Isoeugenol)، پیرون (Pyron)، اسید استیک (Acetic acid) و فورمیک اسید (Formic acid) است. از میان این ترکیب‌ها، اسیدهای آلی و مشتقات فنولی به عنوان ترکیب‌هایی با اثرهای بیولوژیکی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که ترکیب‌های فنولی و اسیدهای آلی، عامل فعالیت ضد میکروبی دود مایع می‌باشند (Cai *et al.*, 2012). از کاربردهای دیگر دود مایع می‌توان به استفاده از آن به عنوان اسانس در صنعت غذایی اشاره کرد، زیرا می‌تواند در غذاها به عنوان یک افزودنی ضد میکروب، مورد استفاده قرار گیرد. نتایج تحقیقات بیانگر آن است که خواص ضد میکروبی دود مایع به وجود ترکیب‌هایی از قبیل فنول، کربونیل و ارگانیک اسید مربوط می‌شود (Marumoto *et al.*, 2012).

بازده محصولات پیرولیزی به شرایط فرایند از قبیل دمای پیرولیز، سرعت افزایش حرارت و مدت زمان حرارت بستگی دارد. بسیاری از انواع زیست‌توده از قبیل ساقه پنبه، پوسته بادام‌زمینی، سبوس برنج، کتان، پوست پرتقال و چوب، موادی هستند که در شرایط مختلف پیرولیز برای تولید سوخت، مواد شیمیایی و دیگر محصولات (به‌طور مثال دود مایع تولید شده از پیرولیز زیست‌توده)، به عنوان ضد عفونی‌کننده، طعم‌دهنده دودی، ضد میکروب و کود مورد استفاده قرار گرفتند. بر خلاف قطران زغال، قطران پیرولیتی مشتق شده از زیست‌توده گیاهی، هیدروکربن‌های آروماتیک چند هسته‌ای را شامل نمی‌شود (Okutucu *et al.*, 2011). فنول‌های مشتق شده از پیرولیز زیست‌توده، مواد شیمیایی مفید و با ارزشی هستند که دارای فعالیت میکروب‌کشی و خواص ضد اسهالی می‌باشند (Amen-Chen *et al.*, 1997). نیکوتین و کمپلکس فلزی آن از جمله نیکوتین کبالت، از برگ‌های *Nicotiana tabacum* با استفاده از یون‌های فلزی گوناگون به وسیله تکنیک‌های علمی برای بررسی فعالیت ضد قارچی در برابر چهارده نوع متفاوت قارچ مورد استفاده قرار گرفتند. در این تحقیق از نمونه خالص نیکوتین و نمک فلزی آن استفاده شد. همچنین کلرید کبالت (II) به عنوان

بررسی اثرهای ضد قارچی

نوع قارچ

بررسی اثرهای ضد قارچی دود مایع با استفاده از سه نوع قارچ (*Sclerotinia Rhizoctonia solani* (R24) *Phytophthora nicotianae* و *sclerotiorum* (Sc111) (Ph51) که به ترتیب عامل بیماری ساق زخم، پوسیدگی یقه و ساق سیاه توتون می‌باشند، انجام شد.

ارزیابی اثر بازدارندگی از رشد میسلیوم قارچ

دود مایع تولید شده با استفاده از روش اختلاط با محیط کشت برای ارزیابی اثر ضد قارچی مورد استفاده قرار گرفت. محیط کشت آرد ذرت آگار پس از اتوکلاو شدن در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و فشار یک اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه، در دمای اتاق قرار داده شد. سپس محیط کشت حاوی غلظت‌های صفر (شاهد)، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ ppm دود مایع تهیه گردید. محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف دود مایع به داخل پتری‌های استریل ریخته شد. ۲۴ ساعت پس از ریختن محیط در پتری‌ها، دیسکی به قطر ۷ میلی‌متر از حاشیه کشت سه روزه قارچ برداشته و در مرکز هر پتری قرار داده شد. پتری‌ها در داخل انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شده و قطر میسلیوم قارچ تا زمان اشغال سطح محیط کشت در تشتک‌های شاهد در ساعت‌های معین (۸ صبح) اندازه‌گیری شد (Yanar et al., 2011). درصد بازدارندگی از رشد میسلیوم قارچ با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید.

$$100 \times ((C-T)/C) = \text{درصد بازدارندگی}$$

که در آن C قطر رشد میسلیوم شاهد (میلی‌متر) و T قطر رشد میسلیوم نمونه (میلی‌متر) است.

در طی آماده‌سازی توتون در کارخانجات شرکت دخانیات ایجاد می‌شوند که شامل دمار و خرده برگ توتون و ضایعات کشاورزی نیز شامل ساقه و ریشه توتون می‌باشند. ضایعات چوب نیز به‌عنوان شاهد بود.

تولید دود مایع از ضایعات توتون

پیرولیز ضایعات

کوره‌ای با قابلیت پیرولیز ضایعات توتون در شرایط بدون اکسیژن در اندازه پایلوت در انستیتو تحقیقات توتون ایران طراحی و ساخته شد. سپس هر یک از تیمارها به‌طور جداگانه پیرولیز شدند و سه محصول از پیرولیز ضایعات توتون حاصل شد که شامل زغال، دود مایع و محصولات گازی بودند.

دود مایع

دود مایع حاصل از پیرولیز ضایعات توتون توسط مبرد خنک شده و تبدیل به دود مایع شد. دود مایع تولید شده شامل دو قسمت روغنی شکل و محلول در آب بود. برای استفاده راحت‌تر از دود مایع حاصل از پیرولیز ضایعات توتون در کشاورزی، با استفاده از کاغذ صافی، قسمت آبی از قسمت روغنی جدا شد و از قسمت آبی برای بررسی اثرهای ضد قارچی استفاده گردید.

تیمارهای دود مایع

در این تحقیق برای بررسی اثرهای ضد قارچی دود مایع حاصل از پیرولیز ضایعات توتون از هشت تیمار دمار توتون، خرده برگ توتون، ۵۰٪ دمار توتون + ۵۰٪ خرده برگ توتون، ۷۵٪ دمار توتون + ۲۵٪ خرده برگ توتون، ۲۵٪ دمار توتون + ۷۵٪ خرده برگ توتون، ساقه توتون، ریشه توتون و ضایعات چوب در شش غلظت صفر، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ ppm دود مایع استفاده گردید.

سلسیوس رسید و ۲ دقیقه توقف داشت. دمای تزریق ۲۵۰ درجه سلسیوس، حجم تزریق یک میکرولیتر و نسبت اسپلیت هم ۱۰:۱ بود.

آنالیز کمی ترکیب‌های دود مایع

فنول کل در دود مایع با استفاده از روش Senter و همکاران (۱۹۸۹) و دستگاه اسپکتروفتومتر مدل PerkinElmer UV/Vis Spectrometer Lambda EZ201 اندازه‌گیری شد. همچنین میزان اسیدهای آلی دود مایع با استفاده از روش Association of official analytical chemists (۱۹۹۰) و میزان نیکوتین با استفاده از روش Coresta (۱۹۶۸) تعیین گردید.

نتایج

اثرهای ضد قارچی دود مایع

نتایج تجزیه واریانس تأثیر دود مایع بر قارچ‌های *Sclerotinia sclerotiorum* و *Rhizoctonia solani* نشان داد که تأثیر دود مایع، غلظت دود مایع و اثر متقابل دود مایع بر غلظت روی قارچ‌ها در سطح احتمال ۱٪ آماری معنی‌دار می‌باشد (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین تأثیر دود مایع بر قارچ‌ها نشان داد که نمونه دود مایع حاصل از پیرولیز ۲۵٪ دمار توتون + ۷۵٪ خرده برگ توتون در غلظت ۴۰۰۰ ppm، رشد میسیلیوم هر سه نوع قارچ *Rhizoctonia solani*، *Sclerotinia sclerotiorum* و *Phytophthora nicotianae* را صد درصد کنترل کرد. همچنین دود مایع حاصل از پیرولیز ۲۵٪ دمار توتون + ۷۵٪ خرده برگ توتون در غلظت‌های ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ ppm و در غلظت‌های ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ ppm به ترتیب رشد میسیلیوم قارچ‌های *Rhizoctonia solani* و *Sclerotinia sclerotiorum* را صد درصد کنترل نمود. دود مایع حاصل از پیرولیز خرده برگ توتون، ریشه توتون و ۷۵٪ دمار توتون + ۲۵٪ خرده برگ توتون در غلظت ۴۰۰۰ ppm رشد

بررسی سازوکار اثر قارچ‌کشی (Fungicide) یا قارچ‌ایستایی (Fungistate) دود مایع

به‌منظور بررسی ویژگی قارچ‌کشی یا قارچ‌ایستایی دود مایع، دیسک قارچی تیمارهایی که رشد قارچی در آنها مشاهده نگردید روی محیط کشت آرد ذرت آگار واکشت شد و رشد یا عدم رشد قارچ روی محیط کشت پس از یک هفته بررسی گردید. عدم رشد قارچ به‌عنوان اثر قارچ‌کشی دود مایع و رشد قارچ در محیط کشت جدید به‌عنوان اثر قارچ‌ایستایی ثبت گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو فاکتور دود مایع تولید شده از ضایعات مختلف توتون در هشت سطح و غلظت در شش سطح در سه تکرار روی سه نوع قارچ در سطح پتری در آزمایشگاه انجام شد.

آنالیز شیمیایی دود

آنالیز کیفی ترکیب‌های دود مایع

با توجه به نتایج ارائه شده در مقالات مشابه، اثرهای ضد قارچی دود مایع مربوط به ترکیب‌های فنولی و اسیدهای آلی موجود در آن می‌باشد (Ma, Baimark & Niamsa, 2009; et al., 2011). بنابراین با استفاده از روش Amen-chen و همکاران (۱۹۹۷) ترکیب‌های فنولی و اسیدهای آلی دود مایع استخراج گردید و با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی اسپکتروسکوپی جرمی (HP, Agilent) با مشخصات ستون سیلیکا کیپلاری (۳۰ متر طول، ۰/۲۵ میلی‌متر قطر، ۰/۲۵ میکرومتر ضخامت)، گاز حامل هلیوم با خلوص ۹۹/۹۹۹ و جریان ۰/۹ میلی‌لیتر بر دقیقه شناسایی انجام شد.

برنامه دمایی ستون با دمای ۵۰ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه شروع گردید و با سرعت ۴ درجه بر دقیقه به دمای ۲۳۰ درجه سلسیوس رسید و ده دقیقه توقف داشت. سپس با سرعت ۵ درجه بر دقیقه به دمای ۲۸۰ درجه

رشد میسیلیوم قارچ *Rhizoctonia solani* قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* را نیز صد درصد کنترل نمود (جدول ۲).

میسیلیوم قارچ *Rhizoctonia solani* را صد درصد کنترل کردند. دود مایع حاصل از پیرولیز ۷۵٪ دمار توتون + ۲۵٪ خرده برگ توتون در غلظت ۴۰۰۰ ppm علاوه بر کنترل

جدول ۱- تجزیه واریانس تأثیر دود مایع بر قارچ‌های بیماری‌زای توتون

میانگین مربعات			درجه آزادی	منابع تغییر
<i>Phytophthora nicotianae</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>		
۲۱۵۹/۰۱**	۷۳۶۰/۸۰**	۴۸۹۱/۱۰**	۷	دود مایع
۱۹۷۶۱/۳۴**	۲۳۸۹۳/۸۴**	۲۲۳۱۹/۳۱**	۵	غلظت
۲۴۵/۲۹**	۷۳۶/۵۴**	۴۷۳/۴۳**	۳۵	دود مایع × غلظت
۲۸/۷۱	۱۷/۶۲	۱۷/۷۹	۹۶	خطا
۱۱/۴	۹/۵	۸/۶		ضریب تغییرات (%)

** معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪

آنالیز کیفی ترکیب‌های دود مایع

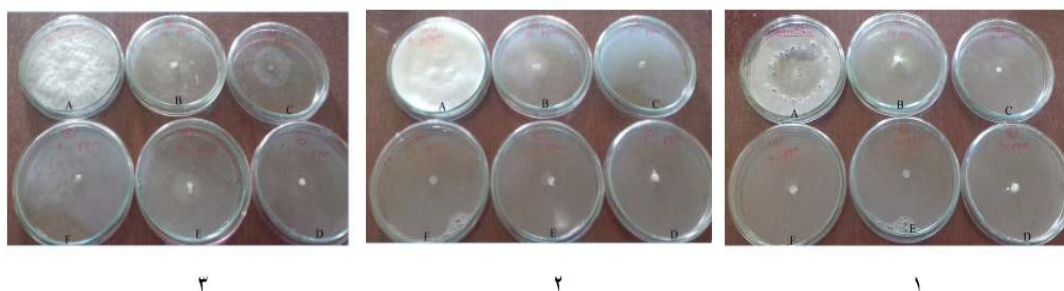
طیف جرمی ترکیب‌ها با استفاده از کتابخانه‌های تجاری NIST و Wiley شناسایی شدند. نتایجی از شناسایی ترکیب‌ها مورد قبول بود که درصد احتمال شناسایی بیش از ۸۰٪ باشد. ۲-متوکسی فنول فراوان‌ترین ترکیب فنولی شناسایی شده با ۱۴/۷۹۹٪ بود. ترکیب‌های دیگری مانند ۲-۶ دی-متوکسی فنول، ۲-متوکسی-۴-متیل فنول، فنول و ۴-متیل فنول به ترتیب با ۱۴/۰۳۴، ۴/۶۴۸، ۴/۶۰۰ و ۳/۲۰۴ درصد در تیمارهای مختلف دود مایع شناسایی شدند (جدول ۳).

سازوکار اثر قارچ‌کشی یا قارچ‌ایستایی دود مایع

دود مایع تولید شده از تیمارهای خرده برگ توتون در غلظت ۴۰۰۰ ppm روی قارچ *Rhizoctonia solani*، ۷۵٪ دمار توتون + ۲۵٪ خرده برگ توتون در غلظت ۴۰۰۰ ppm روی قارچ‌های *Rhizoctonia solani* و *Sclerotinia sclerotiorum*، ۲۵٪ دمار توتون + ۷۵٪ خرده برگ توتون در غلظت ۴۰۰۰ ppm روی همه قارچ‌های مورد مطالعه و ریشه توتون در غلظت ۴۰۰۰ ppm روی قارچ *Rhizoctonia solani* دارای فعالیت قارچ‌کشی بودند، زیرا نتایج بدست‌آمده از واکشت دیسک‌های قارچی تیمارهای فوق در محیط کشت جدید رشد قارچی را نشان ندادند (شکل ۱).

جدول ۲- مقایسه میانگین اثرهای متقابل دود مایع و غلظت‌های مختلف آن بر قارچ‌های بیماری‌زا توتون

درصد بازدارندگی از رشد میسیلیوم قارچ			غلظت	دود مایع
<i>Phytophthora nicotianae</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	(ppm)	
۰/۰۰p	۰/۰۰m	۰/۰۰o	۰	خرده برگ توتون
۱۱/۱۰op	۰/۰۰m	۱۱/۱۰n	۲۵۰	
۲۲/۲۰no	۱۱/۱۰l	۲۲/۲۰lm	۵۰۰	
۳۳/۳۰lmn	۳۳/۳۰i	۳۷/۰۰ijk	۱۰۰۰	
۴۸/۱۰ijk	۶۶/۶۰f	۵۹/۲۰fg	۲۰۰۰	
۸۸/۸۰ab	۸۸/۸۰bc	۱۰۰/۰۰a	۴۰۰۰	
۰/۰۰p	۰/۰۰m	۰/۰۰o	۰	۷۵٪ دمار توتون + ۲۵٪ خرده برگ توتون
۵۵/۵۳hij	۶۶/۶۰f	۳۸/۸۷ij	۲۵۰	
۶۶/۶۰efgh	۸۳/۳۰cd	۶۶/۶۰ef	۵۰۰	
۷۲/۱۷cdef	۸۸/۸۷bc	۸۳/۳۰bc	۱۰۰۰	
۷۲/۱۷cdef	۹۴/۴۳ab	۸۳/۳۰bc	۲۰۰۰	
۸۸/۸۷ab	۱۰۰/۰۰a	۱۰۰/۰۰a	۴۰۰۰	
۰/۰۰p	۰۰/۰۰m	۰۰/۰۰o	۰	۲۵٪ دمار توتون + ۷۵٪ خرده برگ توتون
۵۰/۰۰ij	۶۶/۶۰f	۷۲/۱۷de	۲۵۰	
۶۶/۶۰efgh	۸۳/۳۰cd	۱۰۰/۰۰a	۵۰۰	
۸۳/۳۰bc	۱۰۰/۰۰a	۱۰۰/۰۰a	۱۰۰۰	
۸۸/۸۷ab	۱۰۰/۰۰a	۱۰۰/۰۰a	۲۰۰۰	
۱۰۰/۰۰a	۱۰۰/۰۰a	۱۰۰/۰۰a	۴۰۰۰	
۰/۰۰p	۰/۰۰m	۰/۰۰o	۰	ریشه توتون
۴۴/۴۰jkl	۲۲/۲۰jk	۳۷/۰۰jk	۲۵۰	
۵۹/۲۰ghi	۳۷/۰۰hi	۵۱/۸۰gh	۵۰۰	
۵۹/۲۰ghi	۵۵/۵۰g	۶۶/۶۰ef	۱۰۰۰	
۷۰/۳۰defg	۷۷/۷۰de	۸۵/۱۰bc	۲۰۰۰	
۷۴/۰۰cdef	۹۶/۲۷ab	۱۰۰/۰۰a	۴۰۰۰	



شکل ۱- کنترل رشد میسلیوم قارچ (۱) *Sclerotinia sclerotiorum* (۲) *Rhizoctonia solani* و

(۳) *Phytophthora nicotianae* توسط دود مایع تولید شده از ۲۵٪ دمار توتون + ۷۵٪ خرده برگ توتون

به صورت مخلوط شده با محیط کشت

(A) محیط کشت مخلوط شده با آب مقطر (شاهد)، (B) محیط کشت مخلوط شده با دود مایع ۲۵۰ ppm، (C) محیط کشت مخلوط شده با دود مایع ۵۰۰ ppm، (D) محیط کشت مخلوط شده با دود مایع ۱۰۰۰ ppm، (E) محیط کشت مخلوط شده با دود مایع ۲۰۰۰ ppm، (F) محیط کشت مخلوط شده با دود مایع ۴۰۰۰ ppm

جدول ۳- ترکیب‌های فنولی شناسایی شده در دود مایع به روش کروماتوگرافی گازی اسپکتروسکوپی جرمی

نام ترکیب	زمان بازداری (دقیقه)	محتوای نسبی در دود مایع (%)
۲-متوکسی فنول	۱۷/۷۶۹	۱۴/۷۹۹
۲و۶-دی‌متوکسی فنول	۲۶/۶۲۶	۱۴/۰۳۴
۲-متوکسی-۴-متیل فنول	۲۱/۴۲۴	۴/۶۴۸
فنول	۱۳/۸۸۸	۴/۶۰۰
۴-متیل فنول	۱۷/۴۸۳	۳/۲۰۴

آنالیز کمی ترکیب‌های دود مایع

بر اساس نتایج تحقیقات، علاوه بر محتوای ترکیب‌های اسیدهای آلی و فنولی، نیکوتین توتون نیز دارای خواص ضد میکروبی می‌باشد (Oramahi & Yoshimura, 2013)؛ (Zaidi & Gul, 2005). نتایج نشان داد که بیشترین میزان نیکوتین در خرده برگ توتون و کمترین آن مربوط به ساقه توتون است. همچنین ریشه توتون دارای بیشترین میزان

فنول کل و اسید کل می‌باشد. با توجه به نتایج آنالیز شیمیایی دود مایع حاصل از تیمارهای ضایعات توتون، خواص شیمیایی آن متفاوت از دود مایع حاصل از ضایعات چوب است (جدول ۴). بنابراین اثرهای ضد قارچی تیمارهای دود مایع تولید شده از ضایعات توتون تحت تأثیر متقابل ترکیب‌های موجود قرار گرفت.

جدول ۴- غلظت فنول کل، اسید کل و نیکوتین در دود مایع

دود مایع	فنول کل (ppm)	اسید کل (لیتر/اکی والان)	نیکوتین (میلی گرم)
دمار توتون	۲۴۸۰	-	۷۷/۴
خرده برگ توتون	۴۱۰۰	-	۸۶۰/۴
۵۰٪ دمار توتون + ۵۰٪ خرده برگ توتون	۳۷۶۰	-	۳۸۹/۴
۷۵٪ دمار توتون + ۲۵٪ خرده برگ توتون	۳۴۰۰	-	۸۹/۷
۲۵٪ دمار توتون + ۷۵٪ خرده برگ توتون	۳۸۸۰	-	۴۸۹/۹
ساقه توتون	۱۷۶۸۰	۱/۱۱	۷۷/۰
ریشه توتون	۳۷۵۴۰	۱/۶۷	۱۸۲/۲
ضایعات چوب	۱۱۸۰۰	۰/۹۹	۰/۰

بحث

دود مایع دارای خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی، ضد موربانه‌ای، آفت‌کشی، ضد انگلی و تحریک‌کننده رشد گیاه می‌باشد که منشأ این خواص، ترکیب‌های شیمیایی موجود در آن است. علاوه بر این استفاده از پسماندهای کشاورزی می‌تواند به کاهش آلودگی‌های زیست-محیطی ناشی از سوزش پسماند یا ضایعات رها شده در طبیعت کمک کند. هدف از این تحقیق اثبات اثرهای ضد قارچی دود مایع حاصل از پیرولیز ضایعات توتون، شناسایی و اندازه‌گیری ترکیب‌های مؤثر بر فعالیت ضد قارچی آن بود. نتایج این تحقیق نشان داد که دود مایع در شرایط آزمایشگاهی بر رشد قارچ‌های بیماری‌زای *Rhizoctonia solani* (عامل ساق زخم توتون)، *Sclerotinia sclerotiorum* (عامل پوسیدگی یقه توتون) و *Phytophthora nicotianae* (عامل ساق سیاه توتون) به صورت معنی‌داری اثرهای بازدارندگی و کنترل‌کنندگی داشت. خاصیت کنترل دود مایع حاصل از پیرولیز بامبو، ضایعات چوب و گیاهان دارویی در کنترل بسیاری از بیمارگرهای گیاهی و حیوانی شامل آفات گیاهی، باکتری کلی‌فرم مضر روده خوک و موربانه در تحقیقات محققان Oramahi & Yoshimura,)

نتایج (Choi et al., 2009; Wang et al., 2012; 2013). تحقیقات نشان داد که اثرهای کنترل دود مایع به علت وجود ترکیب‌های فنولی در آن است (Yodthong & Niamsa, 2009; Baimark & Niamsa, 2009; Wei et al., 2010; Ma et al., 2011; Marumoto et al., 2012). مشتقات ترکیب‌های فنولی همانند گایاکول، کرزول (Cresol)، سیرینگول، مشتقات متوکسی فنول (Methoxyphenol derivatives) و کاتکول از مهمترین ترکیب‌های فنولی هستند که باعث خواص ضد قارچی دود مایع می‌شوند (Souza et al., 2012; Mathew & Zakaria, 2015; Ikerami et al., 1992). در پژوهشی گزارش شد که وجود اسید استیک در کنار ترکیب‌های فنولی در دود مایع تولید شده از ضایعات چوب سبب بهبود خاصیت ضد میکروبی ترکیب‌های فنولی می‌شود (Nakayama et al., 2001). با توجه به تنوع ترکیب‌های موجود در دود مایع، نمی‌توان سازوکار مستقلاً برای اثرهای ضد قارچی آن در نظر گرفت. به‌طور یقین چندین سازوکار به هم پیوسته فعالیت‌های ضد قارچی آن را تعیین می‌کنند. نتایج آنالیز شیمیایی فنول کل، اسیدیته و نیکوتین و همچنین تجزیه و تحلیل آماری اثرهای کنترل دود مایع بر قارچ‌های بیماری‌زا در این تحقیق نشان داد که اثرهای کنترل دود

مازندران برای همکاری در اجرای این پژوهش کمال تشکر را دارند.

منابع مورد استفاده

- Amen-chen, C., Pakdel, H. and Roy, C., 1997. Separation of phenols from *Eucalyptus* wood tar. *Biomass and Bioenergy*, 13(1-2): 25-37.
- Baimark, Y. and Niamsa, N., 2009. Study on wood vinegars for use as coagulating and antifungal agents on the production of natural rubber sheets. *Biomass and Bioenergy*, 33: 994-998.
- Balat, M., Balat, M., Kirtay, E. and Balat, H., 2009. Main routes for the thermo-conversion of biomass into fuels and chemicals. Part 1. pyrolysis systems. *Energy Conversion and Management*, 50: 3147-3157.
- Bridgwater, A.V., 2003. Renewable fuels and chemicals by thermal processing of biomass. *Chemical Engineering Journal*, 91: 87-102.
- Cai, K., Jiang, S., Ren, C. and He, Y., 2012. Significant damage-rescuing effects of wood vinegar extract in living *Caenorhabditis elegans* under oxidative stress. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92: 29-36.
- Choi, J.Y., Shinde, P.L., Kwon, I.K., Song, Y.H. and Chae, B.J., 2009. Effect of wood vinegar on the performance, nutrient digestibility and intestinal microflora in weanling pigs. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 22(2): 267-274.
- Civilini, M., Domenis, C., Sebastianutto, N. and Bertodi, M., 1997. Nicotine decontamination of tobacco agro-industrial waste and its degradation by micro-organisms. *Waste Management & Research*, 15: 349-358.
- Coresta recommended method N° 20, 1968. Determination of alkaloids in manufactured tobacco. 1-4.
- Ikerami, F., Sekin, T. and Fuji, Y., 1992. Antidematophyte activity of phenolic compounds in *Mokusakueki*. *Yakugaku Zasshi*, 118: 27-30.
- Loo, A.E., Jain, K. and Darah, I., 2008. Antioxidant activity of compounds isolated from the pyroligneous acid, *Rhizophora apiculata*. *Food Chemistry*, 107: 1151-1160.
- Ma, X., Wei, Q., Zhang, S., Shi, L. and Zhao, Z., 2011. Isolation and bioactivities of organic acids and phenols from walnut shell pyroligneous acid. *Journal of Analytical and Applied pyrolysis*, 91: 338-343.
- Marumoto, S., Yamamoto, S.P., Nishimura, H., Onomoto, K., Yatagai, M., Yazaki, K., Fujita, T. and

مایع تولید شده از تیمارهای مختلف ضایعات توتون به اثرهای متقابل ترکیب‌های فنولی، اسیدی و آلکالوئیدی موجود در دود مایع بستگی داشته و مقایسه نتایج نشان داد که اثر ترکیب‌های آلکالوئیدی بیشتر از ترکیب‌های فنولی و اسیدی در دود مایع تولید شده از ضایعات توتونی است. نتایج آنالیزهای شیمیایی تحقیق فوق برای شناسایی و اندازه‌گیری ترکیب‌های مؤثر بر خواص ضد قارچی دود مایع تولید شده از ضایعات توتون بود و مقایسه آن با تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها نشان داد که نتایج این تحقیق با گزارش‌های علمی محققان دیگر همسو است. نتایج این تحقیق نشان از توان بالای دود مایع حاصل از پیرولیز ضایعات توتون در مهار زیستی قارچ‌های بیماری‌زای *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* و *Phytophthora nicotianae* دارد. دود مایع تولید شده از برخی تیمارها شامل خرده برگ توتون روی قارچ *Rhizoctonia solani* ۷۵٪ دمار توتون + ۲۵٪ خرده برگ توتون روی قارچ‌های *Rhizoctonia solani* و *Sclerotinia sclerotiorum* ۲۵٪ دمار توتون + ۷۵٪ خرده برگ توتون روی همه قارچ‌های مورد مطالعه و ریشه توتون روی قارچ *Rhizoctonia solani* در غلظت ۴۰۰۰ ppm اثر قارچ‌کشی داشتند که در آینده امکان استفاده از این تیمارها به‌عنوان قارچ‌کش با توجه به قیمت پایین تولید آنها در مقایسه با قارچ‌کش‌های تجاری وجود دارد. این نتایج می‌تواند به‌عنوان یک راهنمای اولیه برای برنامه تحقیقاتی آینده، برای بررسی کاربردهای دود مایع حاصل از پیرولیز ضایعات توتون باشد. اگرچه در کار فعلی تنها از سه نوع قارچ استفاده شد، اما در آینده می‌توان طیف گسترده‌تری از اثربخشی دود مایع حاصل از ضایعات توتون را روی طیف وسیع‌تری از قارچ‌ها بررسی نمود.

سپاسگزاری

نویسندگان از مدیریت و محققان انستیتو تحقیقات توتون ایران و همچنین از معاونت پژوهشی دانشگاه

- on growth and free sugar contents of storage roots of sweet potato. *Marine and Highland Bioscience Center Report, Phukel*, 7: 15-23.
- Souza, J.B.G., Poppi, N.R. and Raposo, Jr.J.L., 2012. Characterization of pyrolygneous acid used in agriculture by gas chromatography mass spectrometry. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 23(4): 610-617.
 - Tso, T.C., 1990. *Production, Physiology and Biochemistry of Tobacco Plant*. IDEAS, Beltsville, Maryland, USA, 785p.
 - Wang, H.F., Wang, J.L., Wang, C., Zhang, W.M., Liu, J.X. and Dai, B., 2012. Effect of bamboo vinegar as an antibiotic alternative on growth performance and fecal bacterial communities of weaned piglets. *Livestock Science*, 144: 173-180.
 - Wei, Q., Ma, X., Zhao, Z., Zhang, S. and Liu, S., 2010. Antioxidant activities and chemical profiles of pyrolygneous acids from walnut shell. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 88: 149-154.
 - Yodthong, B. and Niamsa, N., 2009. Study on wood vinegars for use as coagulating and antifungal agents on production of natural rubber sheets. *Biomass and Bioenergy*, 33: 994-998.
 - Yanar, Y., Gokce, A., Kadioglu, I., Cam, H. and Whalon, M., 2011. In vitro antifungal evaluation of various plant extracts against early blight disease (*Alternaria solani*) of potato. *African Journal of Biotechnology*, 10(42): 8291-8295.
 - Zaidi, M.I. and Gul, A., 2005. Antifungal activity of nicotine and its cobalt complex. *Journal of Science and Technology*, 29(2): 27-30.
 - Watanabe, T., 2012. Identification of a germicidal compound against picornavirus in bamboo pyrolygneous acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60: 9106-9111.
 - Mathew, S. and Zakaria, Z.A., 2015. Pyrolygneous acid- the smoky acidic liquid from plant biomass. *Applied Microbiology Biotechnology*, 99: 611-622.
 - Meher, K.K., Panchwagh, A.M., Rangrass, S. and Gollakota, G., 1995. Biomethanation of tobacco waste. *Environmental Pollution*, 90(2): 199-202.
 - Nakayama, F.S., Vinyard, S.H., Chow, P., Bajwa, D.S., Youngquist, J.A., Muehl, J.H. and Krzysik, A.M., 2001. Guayule as a wood preservative. *Industrial Crop and Products*, 14: 105-111.
 - Okutucu, C., Duman, G., Ucar, S., Yasa, I. and Yanik, J., 2011. Production of fungicidal oil and activated carbon from pistachio shell. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 91: 140-146.
 - Oramahi, H.A. and Yoshimura, T., 2013. Antifungal and antitermitic activities of wood vinegar from *Vitex pubescens* Vahl. *Journal of Wood Science*, 59: 344-350.
 - Putun, A.E., Uzun, B.B., Apaydin, E. and Putun, E., 2005. Bio-oil from olive oil industry wastes, pyrolysis of olive residue under different conditions. *Fuel Processing Technology*, 87: 25-32.
 - Senter, S.D., Robertson, S.A. and Meredith, F.I., 1989. Phenolic compound of the mesocarp of cresthaven peaches during storage and ripening. *Journal of Food Science*, 54(5): 1259-1268.
 - Shibayama, H., Mashima, K., Mitsutomi, M. and Arima, S., 1998. Effects of application of pyrolygneous acid solution produced in Karatsu city

Antifungal effects of liquid smoke from pyrolysis of tobacco waste on plant pathogenic fungi

Y. Sarrafi^{1*}, Gh.R. Moradi Robati² and M.H. Fatemi³

1*- Corresponding author, Department of Organic Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Mazandaran, Babolsar, Iran
E-mail: ysarrafi@umz.ac.ir

2- Ph.D. student, Department of Organic Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

3- Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

Received: July 2018

Revised: November 2018

Accepted: November 2018

Abstract

The objective of this study was to investigate the antifungal effects of liquid smoke from tobacco waste on three plant pathogenic fungi and identification and measurement of compounds effective on the antifungal properties of liquid smoke. The waste was pyrolyzed in furnace in the absence of oxygen, and smoke was converted to liquid smoke by refrigerant. Antifungal effects of liquid smoke were tested against *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* and *Phytophthora nicotianae* causing tobacco sore shin, collar rot and black shank disease agents, respectively. Six concentrations of the liquid smoke 0, 250, 500, 1000, 2000 and 4000 ppm were prepared and mixed with culture medium. The results of variance analysis showed that the effect of liquid smoke, concentration and the interaction of liquid smoke on concentration in limiting the fungal growth were significant at 1% probability level. Mean comparison of the effect of liquid smoke on these fungi showed that liquid smoke of 25% midrib + 75% scrap pyrolysis in 4000 ppm concentration had 100 percent mycelial growth control on the above fungi. In addition, the liquid smoke pyrolysis of above treatment in low concentrations caused 100 percent mycelia growth control of *Rhizoctonia* and *Sclerotinia*. According to research reports, the presence of phenolic compounds, organic acids and alkaloids constituents in liquid smoke is an agent of antifungal effects. Therefore, extraction of these constituents from liquid smoke was carried out and qualitative analysis was done by gas chromatography and mass spectrometry (GC/MS) and quantitative analysis of total phenol and alkaloids was done by spectrophotometer method. The results of this research showed that the effects of alkaloids constituents on the control of fungi were more than phenolic and organic acids constituents in liquid smoke from tobacco waste. The results showed the high potential of the liquid smoke of pyrolysis to be used as a biological control of pathogenic fungi.

Keywords: Biomass, biological control, pyrolysis, phenol, nicotine, liquid smoke.