مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره پانزدهم، شمارهٔ ۶، آبان ۱۳۹۲، صفحه ۳۵-۲۵

اثر مهاری و تخریبی اسانس های زیره سبز،کاکوتی و سیاه دانه روی سلول های آسپرژیلوس

محمدحسن مینوئیان حقیقی(PhD) [*۱]، علیرضا خسروی(PhD) [۲]

۱- گروه قارچ شناسی، دانشگاه علوم پزشکی گناباد
۲- مرکز تحقیقات قارچ شناسی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

دریافت: ۹۱/۱۱/۲۵، اصلاح: ۹۲/۴/۱۹، پذیرش: ۹۲/۶/۱۳

خلاصه

سابقه و هدف: با افزایش عفونت های قارچی از جمله آسپرژیلوزیس و گسترش مقاومت دارویی در قارچ ها، محققین بر اثرات ضد قارچی اسانس های گیاهی به عنوان جایگزینی مناسب برای داروهای شیمیایی تاکید می نمایند. هدف از این مطالعه تعیین اثر مهاری و تخریبی اسانس های زیره سبز، کاکوتی و سیاه دانه روی سلول های آسپرژیلوس می باشد.

مواد و روشها: در این مطالعه تجربی، گروه های مورد مطالعه از گروه مداخله شامل هر یک از اسانس های حاصل از گیاهان زیره سبز، کاکوتی و سیا ه دانه و گروه های شاهد مثبت و شاهد منفی تشکیل شده بودند. اسانس های مورد مطالعه به طریقه تقطیر با آب تهیه شدند. سپس با چهار بار تکرار آزمایش، میانگین حداقل غلظت مهار کننده (MIC90) و میانگین حداقل غلظت قارچ کشی (MFC) اسانس های مزبور به عنوان متغیر های مورد سنجش در غلظت های ۳ و ۲/۵ و ۲ و ۱/۵ و ۱ و ۰/۵ و ۰/۲۵ میلی گرم در میلی لیتر به روش براث ماکرودیلوسیون و در غلظت های ۸ و ۶ و ۵ و ۴ و ۳ و ۲/۵ و ۲ و ۱/۵ و ۱/۲۵ و ۱ و ۰/۷۵ و ۰/۵ میلی گرم در میلی لیتر به روش میکرودیلوسیون علیه آسپرژیلوس فومیگاتوس (ATCC 16913) و آسپرژیلوس پارازیتیکوس (ATCC 115201) بررسی شدند. آنالیز اسانس ها با استفاده از روش کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی (Gc/Ms) انجام شد. با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) آثار ناشی از عملکرد روغن های اساسی مذکور روی ساختمان سلولی هر دو گونه آسپرژیلوس بررسی شد.

یافته ها: پس از۴ بار تکرار آزمایش بر اساس روش براث ماکرودیلوسیون میانگین اثرمهاری اسانس ها (MIC90) بر روی هردو گونه آسپرژیلوس به ترتیب شامل اسانس زیره سبز (۰/۳۱)، اسانس کاکوتی (۰/۴۰) و اسانس سیاه دانه (۱/۵۰) میلی گرم در میلی لیتر و میانگین اثر تخریبی (MFC) آن ها به ترتیب مربوط به اسانس زیره سبز (۰/۷۵)، اسانس کاکوتی (۱/۲۸) و اسانس سیاه دانه (۲/۲۵) میلی گرم در میلی لیتر بدست آمد. هم چنین نتایج حاصل از روش براث میکرو دیلوسیون نیز ترتیب اثر مهاری و تخریبی اسانسها را تایید نمود. رابطه معنی داری بین اثر مهاری و تخریبی اسانس های مختلف با یکدیگر مشاهده شد. در آنالیز اسانس ها، مهم ترین اجزای اسانس های زیره سبز، کاکوتی و سیاه دانه، به ترتیب شامل آلفا پینین (۳۰٪)، پولگون (۳۷٪) و ترانس آنتول (۳۸/۹٪) بودند. در مشاهدات انجام شده به وسیله TEM، تغییرات پاتولوژیک اصلی در دیواره سلولی، غشاء پلاسمایی و ارگانل های غشایی، دیده شد.

نتیجه گیری: نتایج مطالعه نشان داد که اسانس های زیره سبز، کاکوتی و سیاه دانه دارای عملکرد مهاری و قارچ کشی مناسبی علیه آسپرژیلوس فومیگاتوس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس می باشند.

واژه های کلیدی: روغن اساسی، زیره سبز، کاکوتی، سیاه دانه، آسپرژیلوس فومیگاتوس، آسپرژیلوس پارازیتیکوس.

مقدمه

با افزایش موارد مقاومت دارویی در میکروارگانیسم ها، جایگزینی داروهایی با کارآیی جدید علیه میکروب ها ضروری می باشد (۱). از جمله این مواد دارویی، اسانس های گیاهی می باشند. این روغن ها علیه طیف وسیعی از ارگانیسم ها مانند باکتری ها، قارچ ها، ویروس ها، تک یاخته ها و حشرات عمل می کنند (۲). آسپرژیلوس ها انتشار جهانی دارند و می توانند به بافت های بدن هجوم ببرند. عفونت های آسپرژیلوسی به اشکال مختلف در میزبانان با ایمنی طبیعی و در میزبانان با ایمنی سرکوب شده ظاهر می گردند (۳). هم چنین، این قارچ ها با ایجاد فساد در مواد غذایی و تولید سموم قارچی (مایکو توکسین ها) سلامتی انسان و حیوان را تهدید می کنند (۴). استفاده گسترده از عوامل ضد میکروبی در انسان و حیوان می تواند سبب پیدایش سریع گونه های قارچی مقاوم، مسمومیت و تعارضات دارویی گردد (۶و۵). علاوه بر آن، مقاومت آسپرژیلوس به بسیاری از ضد قارچ های موجود، پیش آگهی نگران کننده ای را برای افراد مورد تهاجم

▣ این مقاله حاصل پایان نامه محمدحسن مینوئیان حقیقی دانشجو دکتری قارچ شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران می باشد.

* مسئول مقاله:
آدرس: گناباد، حاشیه جاده آسیایی، معاونت آموزشی، پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی گناباد، تلفن: ۰۵۳۳-۷۲۲۵۰۲۷
e-mail:drminooeian@gmu.ac.ir

[DOR: 20.1001.1.15614107.1392.15.6.4.7]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.15.6.25]

آسپرژیلوس به همراه دارد (۷). زیره سبز، میوه خشک شده گیاه Cuminum Cyminum از خانواده چتریان (Apiaceae) است که واجد حداقل ۲/۵٪ اسانس می باشد (۱۰-۸). کاکوتی (Ziziphora clinopodioeides) جزو خانواده نعناعیان (Lamiaceae) می باشد و به نام آنوخ یا آویشن برگ باریک و در بعضی جوامع به پونه کوهی، معروف است. این گیاه به طور خود رو در مناطق مختلف ایران می روید. حداقل دارای ۱/۲ درصد اسانس است (۱۳-۱۱). سیاه دانه، دانه های خشک شده گیاه Nigella sativa از خانواده آلاله (Ranunculaceae) است. دانه ها بخش دارویی این گیاه را تشکیل می دهند. دانه گیاه حاوی ۰/۵تا ۱/۵ درصد اسانس است (۱۴). با توجه به اهمیت روز افزون عفونت های فرصت طلب آسپرژیلوزیسی به ویژه در میزبانان با ایمنی تضعیف شده و قدرت ضد میکروبی اسانس های گیاهی، این تحقیق با هدف تعیین اثرمهاری و تخریبی اسانس های زیره سبز، کاکوتی و سیاه دانه روی سلولهای آسپرژیلوس انجام شد.

مواد و روشها

اسانس های مورد مطالعه: در این پژوهش از اسانس های گیاهان زیره سبز (Cuminum cyminum)، کاکوتی(Ziziphora clinopodioides) و سیاه دانه (Nigella sativa) که توسط محقق استحصال شده بودند، بهره برداری شد.

قارچهای مورد آزمایش: از گونه های آسپرژیلوس فومیگاتوس (s Aspergillus fumigtu) (ATCC 16913) و آسپرژیلوس پارازیتیکوس (Aspergillus parasiticus) (ATCC 115201)، به عنوان میکرو ارگانیسم های تحت آزمایش، استفاده شد.

آماده سازی مواد گیاهی و اسانس ها: برگ های کاکوتی، از کوه های بینا لود شهرستان نیشابور، میوه (دانه) های زیره سبز از شهرستان سبزوار و دانه (میوه) های سیاه دانه از شهرستان تربت حیدریه تهیه گردیدند. سپس به روش علمی جنس و گونه آن ها توسط کارشناس ارشد گیاه شناسی گرایش سیستماتیک اکولوژی گیاهی مرکز تحقیقات گیاهان دارویی جهاد کشاورزی مشهد، مورد تایید قرار گرفت (۱۷-۱۵). در مرحله بعد در دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مشهد و با نظارت عضو هیات علمی فارماکوگنوزی، مواد گیاهی جمع آوری شد. پس از خشک شدن در سایه، آسیاب شده و اسانس آن ها به روش تقطیر با آب (Hydrodistillation) تهیه گردید. Clevenger type) apparatus) اسانس ها پس از آب گیری با سولفات سدیم (بدون آب) در ویال های قهوه ای و با ذکر مشخصات مربوطه نام اسانس، تاریخ تهیه و مقدار اسانس حا صل بر مبنای نسبت وزنی، حجمی تا هنگام استفاده در فریزر نگهداری شدند (۱۸).

تعیین اجزای اسانس های مورد آزمایش: تجزیه اسانس های مورد مطالعه به وسیله دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی (GC/MS) ساخت کارخانه شیمادزو کشور ژاپن (Shimadzu – 9A) انجام شد. این دستگاه دارای ستون مویینه ۳۰ متر در ۰/۲۵ میلی متر و لایه داخلی ۰/۲۵ میکرومتر و گاز حامل هلیوم با جریان ۰/۸ میلی لیتر در دقیقه و درجه حرارت ستون از ۶۰ تا ۲۶۰ درجه سانتی گراد با افزایش ۴ درجه سانتی گراد در دقیقه و دمای اتاقک تزریق ۲۵۰ درجه سانتی گراد بود. یونیزاسیون اجزای نمونه در ۷۰ الکترون ولت انجام شد (۱۹).

آماده سازی محلول استاندارد(Stock) اسانس ها: ابتدا به عنوان حلال از دی متیل سولفوکساید(DMSO) که با محیط کشت RPMI 1640 مایع به میزان ۰/۱ رقیق شده بود، استفاده شد. غلظت محلول استاندارد اسانس مورد نظر مطابق روش Souza و همکاران تهیه شد (۲۰). در این مطالعه تمامی مواد شیمیایی از کمپانی مرک آلمان (Merk-Germany)خریداری گردیدند.

تهیه اسپور از گونه های قارچی مورد بررسی: گونه های قارچی مورد آزمایش در محیط ژلوز سیب زمینی(Potato Dextrose Agar) (PDA) به صورت شیب دار (Slant)، در حرارت ۲۸ درجه سانتی گراد و به مدت ۱۲ روز کشت اولیه شدند. اسپورها پس از برداشت از محیط کشت در آب مقطر استریل حاوی ۰/۰۱ درصد توین ۸۰ (Tween 80) قرار گرفتند و مخلوط حاصل از اسپور و قطعات هایفی برای ۱۵ ثانیه مخلوط گردیدند و به مدت ۵ دقیقه اجازه داده شد تا قطعات سنگین ته نشین شوند. اسپورهای موجود در سوسپانسیون حاصل با ۳ بار تکرار توسط لام هموسیتومتر (Haemocytometer) شمارش شد و در غلظت ۱×۱۰^{۶} اسپور در میلی لیتر استاندارد گردید (۲۱).

سنجش عملکرد ضد قارچی اسانس ها: به منظور تعیین حداقل غلظت ممانعت از رشد (Minimum inhibitory concentration, MIC) و حداقل غلظت قارچ کشی (,Minimum fungicidal concentration) MFC، از روش رقیق سازی (براث ماکرودیلوسیون و براث میکرودیلوسیون)، استفاده شد. در شروع تحقیق، ابتدا هرکدام از اسانس ها به طور مجزا و به صورت مطالعه اولیه آزمایشی (pilot study)، روی آسپرژیلوس فومیگاتوس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس در غلظت های مختلف ۱، ۰/۷۵، ۰/۵، ۰/۲۵ و ۰/۱ میلی گرم در میلی لیتر اثر داده شدند و با توجه به نتایج حاصل از آن، اثر اسانس های مورد نظر در غلظت های ۳، ۲/۵، ۲، ۱/۵، ۱، ۰/۵ و ۰/۲۵ میلی گرم در میلی لیتر به روش براث ماکرودیلوسیون و در غلظت های ۸، ۶، ۵، ۴، ۳، ۲/۵، ۲، ۱/۵، ۱/۲۵، ۱، ۰/۷۵ و ۰/۵ میلی گرم در میلی لیتر در روش میکرودیلوسیون بر روی قارچ های مذ کور مورد سنجش قرار گرفتند (۲۱). در این تحقیق آن چه به عنوان MIC ثبت شده است MIC90 می باشد، یعنی پلیتی که کاهش ۹۰ درصدی رشد را در مقایسه با شاهد مثبت نشان می دهد. MFC، پلیتی است که در آن غلظت از اسانس و در مقایسه با پلیت شاهد مثبت هیچ رشد قابل ملاحظه قارچی حتی بعد از انکوباسیون کشت های مجدد، مشهود نیست. هم چنین فعالیت روغن های اساسی علیه قارچ ها می تواند از طریق مهار اسپورولاسیون و محصولات سمی نیز ارزیابی شود.

الف) روش ماکرودیلوسیون: بر این اساس، هفت ارلن حاوی محیط کشت، اسانس و کونیدی قارچ و هفت ارلن به عنوان شاهد شامل: دو شاهد مثبت برای هر قارچ و یک شاهد منفی برای هر کدام از اسانس ها در نظر گرفته شد و چون آزمایش بر روی دو گونه قارچی انجام شد در مجموع ۱۹ ارلن در هر بار آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند. هریک از ارلن ها حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت مایع عصاره مخمر (Yeast Extract) بود. در ارلن های شاهد مثبت، محیط کشت و اسپورهای قارچی و در ارلن های شاهد منفی، فقط محیط کشت و اسانس وجود داشت. در ادامه با توجه به غلظت اسانس مورد آزمایش و هم چنین حجم محیط کشت، مقدار مناسب اسانس محاسبه و پس ازحل کردن در ۰/۵ میلی لیتر حلال DMSO به محیط کشت اضافه شد. در مرحله بعد از سوسپانسیون کونیدیایی استاندارد حاصل از مرحله قبل به مقدار لازم به هرکدام از ارلن های

[DOR: 20.1001.1.15614107.1392.15.6.4.7]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.15.6.25]

حاوی محیط کشت افزوده گشت. سپس ارلن ها به گرم خانه ۲۸ درجه سانتی گراد مجهز به هم زن با حرکت آرام منتقل شد و نتیجه کشت پس از ۴۸ تا ۷۲ ساعت و سپس تا ۴ روز از نظر درجه رشد (یا عدم رشد) مورد ارزیابی بصری قرار گرفت. علاوه بر آن از نمونه های مورد آزمایش کشت مجدد به عمل آمد، سپس نتایج حاصل از آن مورد قضاوت قرار گرفت. نتایج نهایی به صورت میانگین MIC90 و MFC های حاصل از ۴ بار آزمایش محاسبه شد (۲۱). تمامی وسایل، مواد و محیط های کشت مورد استفاده استریل بوده و کار نیز در زیر هود، کنار شعله و با دستکش و ماسک و در شرایط استریل انجام شد.

ب) روش میکرودیلوسیون: برای انجام آن از میکروپلیت های ۹۶ خانه ای ساخت کشور دانمارک (NUNCLON TM Surface CAT, NO 168055. Batch, NO 038079) بهره برده شد. در حفره های عمودی میکروپلیت، اسانس ها و در حفره های افقی، رقت های مورد نظر اسانس ها (۱۲رقت) ریخته شد. ضمن اینکه تمامی حفرات نیز حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت RPMI-1640 و ۱۰ میکرولیتر از اسپورهای قارچ مورد آزمایش بودند. هم چنین، از حفرات میکروپلیت، دو حفره به عنوان کنترل مثبت برای هرکدام از گونه های قارچی مورد آزمایش و یک حفره به عنوان کنترل منفی برای هر یک از اسانس های تحت آزمایش در نظرگرفته شد. آزمایشات ۴ بار تکرار گردیدند و نتایج نهایی به صورت میانگین MIC90 و MFC های حاصل از ۴ بار آزمایش محاسبه شد (۲۱).

گرم خانه گذاری و کشت مجدد محتویات هر یک از حفرات میکرو پلیت ها: در این مرحله اطراف درب میکروپلیت ها با استفاده از چسب اسکاچ محکم شد و به مدت ۴۸ ساعت در گرم خانه (CO. Incubator, SANYO MCO-17 AIC Model 1E4L) ۲۸ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. پس از مدت مذکور بر اساس کشت مجدد**(subculture)** هر کدام از حفرات میکروپلیت در مورد آن ها قضاوت انجام شد و MIC90 و MFC هر یک از اسانس ها مشخص گردید. پس از ۴۸ ساعت از هر یک از حفرات میکروپلیت حاوی محیط کشت RPMI-1640 ، اسانس و ارگانیسم و هم چنین از حفرات کنترل مثبت و کنترل منفی، پس از اختلاط کامل محتویات هر کدام از آن حفرات به مقدار ۱۰ میکرولیتر برداشت گردید و روی پلیت های حاوی محیط سا بورود کستروز آگار حاوی کلرامفنیکل (SC)، کشت شد. سپس این پلیت ها به انکوباتور ۲۸ درجه سانتی گراد منتقل شدند و پس از ۴۸ ساعت مورد بازخوانی قرار گرفتند و بر اساس درجه رشد و یا عدم رشد قارچ روی آن ها، MIC90 و MFC اسانس های مورد مطالعه تعیین گردیدند. این کار زیر هود، کنار شعله و با وسا یل استریل انجام شد (۲۱).

تهیه مخلوط اسانس ها: با استفاده از محلول های استاندارد هر کدام از اسانس ها، از هر کدام به نسبت مساوی (۵۰۰ میکرولیتر) برداشته و مخلوط شدند.

توزین توده (Biomass) قارچی: بعد از۱۰ روز که از کشت محتویات ارلن های حاوی نمونه قارچی و اسانس سپری شد و رشد قارچ انجام گرفت توده حاصل از رشد هریک از محتویات ارلن ها برداشته شد و روی کاغذ صافی واتمن شماره ۱ قرار گرفت. سپس کاغذ های صافی حاوی بیومس و هم چنین کاغذ صافی خالی (به عنوان شاهد) جهت خشک شدن به مدت ۲۴ ساعت، داخل گرم خانه ۸۰ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. این عمل برای هر کدام از نمونه ها ۳ بار تکرار شد که در هر بار، کاغذ صافی خالی و کاغذ های صافی حاوی توده قارچی با استفاده از ترازوی دیجیتال توزین شده و نتایج یادداشت گردید (۲۲). (توضیح این که کاغذ های صافی به کار برده شده هم وزن بودند).

محاسبه درصد مهار رشد قارچ: درصد مهار رشد قارچ با استفاده از فرمول ریاضی زیر محا سبه شد.

$$\text{درصد مهار رشد قارچ} = \frac{W_c - W_s}{W_c} \times 100$$

W_c = وزن توده قارچی در نمونه کنترل

W_s = وزن توده قارچی در نمونه مورد آزمایش

آماده سازی نمونه ها برای تهیه میکروگراف های الکترونی: ابتدا قارچ های مورد نظر به منظور تقویت کونیدی زایی روی پلیت حاوی محیط ژلوز سیب زمینی (PDA) استریل کشت داده شد و به مدت ۱۲ روز در حرارت ۲۸ درجه سانتیگراد، نگهداری شدند تا قارچ به خوبی اسپورزایی کند. سپس کشت اسپورهای قارچی در ارلن های حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط مایع پیست اکستراکت ۲ درصد، به اضافه ساکارز ۱۵ درصد (YES) استریل، انجام شد. غلظت اسانس های مورد استفاده در تهیه میکروگراف ها، با توجه به MIC90 و MFC های حاصل از آزمایشات انجام شده مراحل قبل، انتخاب شدند. در مرحله بعد ۵۰۰ میکرولیتر از نمونه قارچ رشد یافته در هرکدام از ارلن ها را به طور جداگانه در لوله های اپندورف استریل، وارد کرده و پس از سانتریفیوژ، به هر کدام ۱۰۰۰ میکرولیتر، گلوتارآلدئید ۲/۵ درصد به مدت ۲۴ ساعت و به منظور تثبیت (Fixation) اولیه نمونه افزوده شد، به طوری که روی نمونه را به خوبی می پوشاند. سپس نمونه ها به بخش میکروسکوپ الکترونی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران منتقل گردید و بر اساس پروتکل سایر مراحل آماده سازی میکروگراف های الکترونی در مورد آن ها انجام شد (۲۳). در نهایت با هماهنگی های انجام شده، گرید های حاوی نمونه به پژوهشکده بوعلی وابسته به دانشگاه علوم پزشکی مشهد منتقل گردید و با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) مجهز به دوربین دیجیتال از نمونه ها عکس و فیلم تهیه گردید. در TEM از ولتاژ ۶۰ کیلو ولت، برای رویت نمونه های بیولوژیک استفاده شد. توضیح این که یکی از مشکلات تهیه عکس و فیلم از نمونه ها در بزرگنمایی های بالا (به طور معمول بالاتر از۲۰۰۰۰) پاره شدن نمونه روی گرید بود.

نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS-16 و آزمون های آماری Kruskal-Wallis و Mann-Whitney، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و $p<0/05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

مشخصات، مقدار و اجزاء تشکیل دهنده اسانس های زیره سبز، کاکوتی و سیاه دانه که با روش کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی (GC/MS) شناسایی و اندازه گیری شد (جدول ۱). نتایج فعالیت های مهار رشد (MIC90) و قارچ کشی (MFC) روغن های اساسی زیره سبز، کاکوتی و سیاه دانه به دو روش براث ماکرودیلوسیون و براث میکرودیلوسیون روی رشد آسپرژیلوس فومیگاتوس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس در جدول شماره ۲ ارائه شده است. نتیجه حاصل در مورد مخلوط اسانس زیره سبز و سیاه دانه، مشابه اثر زیره سبز به تنهایی، مخلوط اسانس کاکوتی و سیاه دانه، مشابه اثرکاکوتی به تنهایی،

[DOR: 20.1001.1.15614107.1392.15.6.4.7]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.15.6.25]

مخلوط زیره سبز و کاکوتی، مشابه اثر زیره سبز به تنهایی و مخلوط اسانس های زیره سبز، کاکوتی و سیاه دانه، مشابه اثر زیره سبز به تنهایی بود. میانگین وزن کاغذ صافی خالی برابر ۶/۶±۸/۳۳۷۳ میلیگرم. میانگین وزن کاغذ صافی حاوی بیومس ارلن شاهد مثبت مساوی ۲۵/۵±۳۴۰۶/۱ میلیگرم. میانگین وزن کاغذ صافی حاوی بیومس ارلن محتوی محیط کشت و اسانس زیره سبز به میزان ۰/۲۵ میلی گرم در میلی لیتر برابر ۱۹/۶±۱۰۷۹/۴ میکیگرم. میانگین وزن کاغذ صافی حاوی بیومس ارلن محتوی محیط کشت و اسانس کاکوتی به میزان ۰/۲۵ میلی گرم در میلی لیترمساوی ۱۷±۸۵۵/۳ میلیگرم، میانگین وزن کاغذ صافی حاوی بیومس ارلن محتوی محیط کشت و اسانس سیاه دانه به میزان ۱/۵ میلی گرم در میلی لیتر برابر ۱۲/۸±۱۱۰۹ میلیگرم بود.

جدول ۱. مشخصات، مقدار و اجزاء تشکیل دهنده اسانس های زیره سبز، کاکوتی و سیاه دانه با استفاده از روش کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی(GC/MS).

زیره سبز			کاکوتی			سیاه دانه		
ترکیبات	شاخص بازداری	درصد	ترکیبات	شاخص بازداری	درصد	ترکیبات	شاخص بازداری	درصد
آلفا پینن	۹۳۱	۳۰	پولگون	۱۲۱۸	۳۷	ترانس آنتول	۱۲۸۹	۳۸/۹
لیمونن	۱۰۲۵	۲۱	پی – پریتون	۱۳۱۰	۱۹/۶	پی – سیمن	۱۰۲۶	۱۷
۱و۸ سینئول	۱۰۲۸	۱۸/۵	کارواکرول	۱۲۸۲	۵/۴	لیمونن	۱۰۳۰	۴/۸
لینالول	۱۰۸۹	۱۰	نئومنتول	۱۱۴۹	۵	کاروون	۱۲۴۵	۴/۴
لینالیل استات	۱۲۴۸	۴	۱و۸ سینئول	۱۰۲۳	۳/۵	آلفا – توجن	۹۲۸	۲/۸
آلفا ترپینئول	۱۱۸۰	۳	منتول	۱۱۷۲	۳	آنیس آلدئید	۱۲۵۵	۱/۹
آلفا ترپینئول استات	۱۳۴۲	۱/۵	ورینون	۱۱۹۲	۲/۳	ان – نونان	۹۰۱	۱/۹
ژرانیول	۱۲۴۲	۱/۵	تیمول	۱۲۶۵	۲/۲	کارواکرول	۱۳۰۲	۱/۸
متیل اوژنول	۱۳۶۹	۱/۲	گاما – ترپینن	۱۰۵۹	۱/۸	سین میریستی	۱۵۲۳	۱/۷
سابینن	۹۷۱	۰/۵	پی – پریتنون	۱۲۲۶	۱/۵	سابینن	۹۷۹	۱/۷
ترپینن – ۴ اول	۱۱۶۹	۰/۵	ژرماکرین	۱۴۳۳	۱/۱	آلفا – پینن	۹۳۵	۱/۵
گاما ترپینن	۱۰۵۱	۰/۵	کاروون	۱۲۳۶	۰/۵	فناسن	۱۰۹۷	۱/۴
تری پینولن	۱۰۸۲	۰/۳	اوژنول	۱۳۲۴	۰/۵	آپیول	۱۶۸۴	۱/۳
پی – سیمن	۱۰۱۳	۰/۳	لینالول	۱۰۸۳	۰/۵	ترپینن – ۴ اول	۱۱۷۹	۰/۸
آلفا – توجن	۹۲۲	۰/۲	ایزومنتیل استات	۱۲۹۶	۰/۳	تیموکینون	۱۲۵۱	۰/۷
میرسن	۹۸۱	۰/۱	بتا – پینن	۹۷۷	۰/۲	۱متیل۱– ۳پروپیل بنزن	۱۰۵۲	۰/۵
–	–	–	–	–	–	ان – دکان	۱۰۰۱	۰/۴
		۹۳/۱۰			۸۴/۴			۸۳/۵

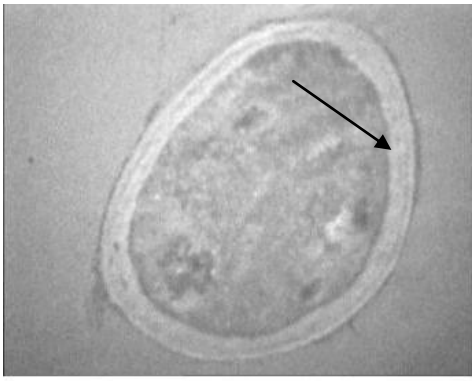
جدول ۲. میانگینMIC90 و MFC حاصل از آزمایشات براث ماکرودیلوسیون و براث میکرودیلوسیون اسانس های زیره سبز، کاکوتی و سیاه دانه، علیه هریک ازقارچ های آسپرژیلوس فومیگاتوس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس برحسب میلی گرم درمیلی لیتر با ۴ بارتکرار

قارچ	آسپرژیلوس پارازیتیکوس				آسپرژیلوس فومیگاتوس			
	ماکرودیلوسیون		میکرودیلوسیون		ماکرودیلوسیون		میکرودیلوسیون	
اسانس	MIC90	MFC	MIC90	MFC	MIC90	MFC	MIC90	MFC
زیره سبز	۰/۳۷±۰/۱۴ a	۱±۰/۴ a	۱/۶۲±۰/۲ a-A	۳/۵±۰/۵۷ a	۰/۲۵±۰ a	۰/۵±۰ a	۱/۵±۰/۴ a	۲/۵±۱ a
کاکوتی	۰/۳۷±۰/۱۴ a	۱/۲±۰/۶ a	۲/۱±۰/۴۷ a	۵/۵±۲/۸ a	۰/۴۳±۰/۱۲ b	۱/۳۷±۰/۴۷ b	۱/۵±۰/۴ a	۳/۲±۰/۸۶ a
سیاه دانه	۱/۷۵±۰/۲۸ b	۲/۵±۰/۴ b	۲/۷۵±۰/۹ a-B	۶/۲۵±۲/۳ a	۱/۲۵±۰/۳ c	۲±۰ c	۱/۸±۰/۴ a	۳/۳۸±۰/۷ a
جمع	۰/۸۳±۰/۷	۱/۵۸±۰/۸	۲/۱۶±۰/۷	۵/۰۸± ۲/۳	۰/۶۴±۰/۴	۱/۲۹±۰/۶	۱/۶±۰/۴	۳/۰۴±۰/۸

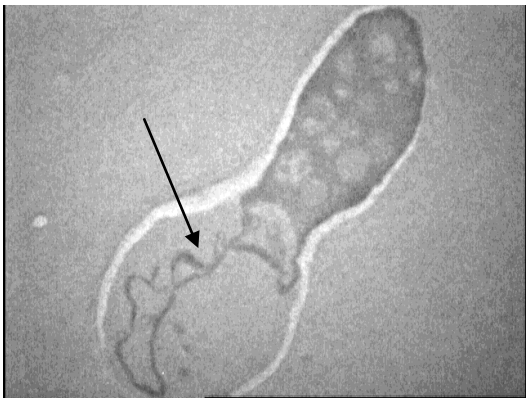
مقادیر مشخص شده با حروف لاتین مختلف (a, b, c)، در هر ستون، بیانگر اختلاف آماری معنی دار($P\leq0.05$) می باشد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1392.15.6.4.7]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.15.6.25]

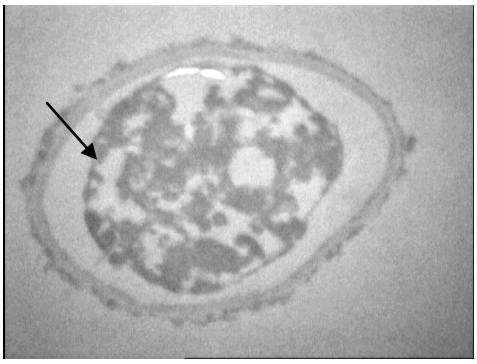
با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM)، در شکل های ۱ الی۷ میکروگراف های هایف و کونیدی های آسپرژیلوس فومیگاتوس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس که تحت تاثیر غلظت های مختلف روغن های اساسی مورد آزمایش قرار گرفته بودند، نشان داده شده است. در هر دو نوع قارچ که تحت تاثیر اسانس های تحت آزمایش قرار نگرفته بودند دیواره سلولی یک پارچه بوده و به طور کامل توسط یک لایه فیبریلی دست نخورده و سالم، احاطه شده بود. غشای پلاسمایی به صورت یک پارچه، نمایان بود و تمامی اندامک ها مانند هسته و میتوکندری حالت طبیعی داشتند. بعد از تاثیر اسانس ها بر قارچ های مذکور، مورفولوژی طبیعی هایف و کونیدیای قارچی، هنگامی که غلظت روغن های اساسی در محیط کشت افزایش می یافت دستخوش تخریب قرار گرفت. شکل کلی سلول تغییر یافت و نظم و تعادل آن در مقایسه با موارد شاهد کاهش یافت. نوع تغییرات اساسی هایف و کونیدی های هر دو گونه قارچ آسپرژیلوس که تحت تاثیر اسانس های مورد آزمایش قرار گرفته بودند، با یکدیگر مشابه بود. تغییرات پاتولوژیک اصلی در دیواره سلولی، غشاء پلاسمایی، ارگانل های غشایی به خصوص میتوکندری و هسته، مشاهده شد.



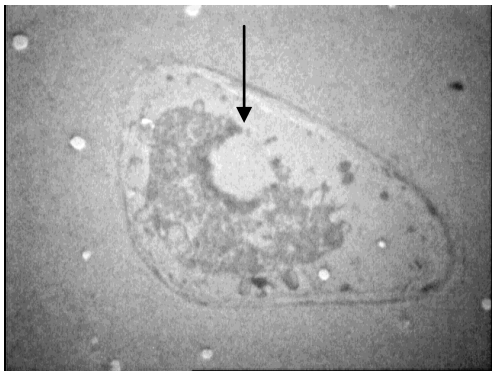
شکل ۱. میکروگراف الکترونی (گذاره) آسپرژیلوس پارازیتیکوس در محیط YES broth بدون اسانس کونیدی کامل با دیواره و غشای سلولی یک پارچه و فاقد چین خورده گی همراه با سیتوپلاسم متراکم و یکنواخت را نشان می دهد (بزرگنمایی ۳۱۵۰ برابر).



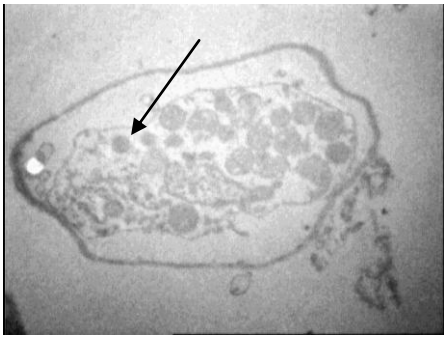
شکل ۲. میکروگراف الکترونی (گذاره) مربوط به آسپرژیلوس فومیگاتوس در محیط YES broth کونیدی ها با ۰/۲۵ میلی گرم در میلی لیتر اسانس زیره ی سبز مواجهه یافته اند. واکوئولاسیون سیتوپلاسم همراه با انفصال غشاء سیتوپلاسمی از دیواره سلولی و تخریب کامل قسمتی از غشاء قابل مشاهده می باشد (بزرگنمایی ۲۵۰۰ برابر).



شکل۳. میکروگراف الکترونی(گذاره) از کونیدیهای آسپرژیلوس فومیگاتوس در محیط YES broth، کونیدی که در معرض ۰/۲۵ میلیگرم در میلیلیتر از اسانس کاکوتی قرار گرفته است نشاندهنده جدا شده گی غشاء سیتوپلاسمی از دیواره سلولی است که با تخریب و شکستگی غشاء سیتوپلاسمایی همراه می باشد. شکل گیری وزیکول های حجیم متصل به پرده سیتوپلاسمی قابل مشاهده است. آسیب به دیواره و تخریب اندامک های غشایی شامل هسته، شبکه اندوپلاسمی و میتوکندری نهایتا موجب نابودی سلول را فراهم می نماید (بزرگنمایی ۸۰۰۰ برابر).

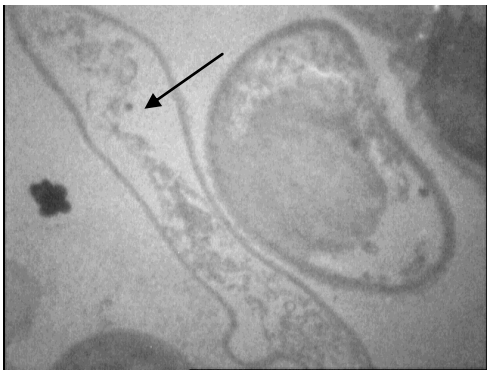


شکل۴. میکروگراف الکترونی (گذاره) از کونیدی آسپرژیلوس پارازیتیکوس در محیط YES broth، کونیدی قارچ در معرض ۰/۲۵ میلی گرم در میلی لیتر از اسانس زیره سبز قرار گرفته است. تخریب کامل غشای سیتوپلاسمی، سیتوپلاسم واکوئل دارشده و قسمتهایی از غشای سیتوپلاسمی که تشکیل لومازوم را داده اند قابل مشاهده می باشد (بزرگنمایی ۳۱۵۰ برابر).

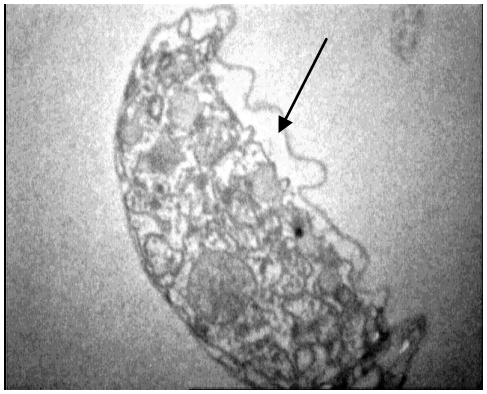


شکل۵. میکروگراف الکترونی (گذاره) از کونیدی آسپرژیلوس پارازیتیکوس در محیط YES broth، کونیدی قارچ در معرض۰/۲۵ میلیگرم در میلی لیتر از اسانس کاکوتی قرارگرفته است. جدا شده گی کامل غشای سیتوپلاسمی از دیواره سلولی، پاره گی غشای سیتوپلاسمی، نشت سیتوپلاسم و پیدایش واکوئل و لومازوم ها دیده میشوند (بزرگنمایی ۵۰۰۰ برابر).

[DOR: 20.1001.1.15614107.1392.15.6.4.7]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.15.6.25]



شکل ۶. میکروگراف الکترونی (گذاره) از کونیدی و هایف آسپرژیلوس پارازیتیکوس در محیط YES broth، غشای سیتوپلاسمی از دیواره سلولی جدا شده و واکوئولاسیون سیتوپلاسم انجام پذیرفته است. سلول ها در معرض ۲ میلی گرم در میلی لیتر اسانس سیاه دانه قرار گرفته اند (بزرگنمایی ۳۱۵۰ برابر).



شکل ۷. میکروگراف الکترونی گذاره از کونیدی آسپرژیلوس فومیگاتوس در محیط YES broth، کونیدی قارچ در معرض اسانس سیاه دانه با غلظت ۲ میلی گرم در میلی لیتر قرار گرفته است. چین خورده گی های دیواره و غشای سلول همراه با تعداد زیادی از واکوئل ها و لوماروم ها ملاحظه می شوند (بزرگنمایی ۶۳۰۰ برابر).

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه اجزایی از روغن اساسی زیره سبز که درصد بیشتری از اسانس را به خود اختصاص داده بودند به ترتیب عبارتند از: آلفا- پی نن (α-Pinene) (۳۰٪)، لیمونن (Limonene) (۲۱٪)، ۱و ۸ سینئول (1,8Cineole) (۱۸/۵٪)، لینالول (Linalole) (۱۰٪)، و اجزایی از روغن اساسی کاکوتی که درصد بیشتری از اسانس را به خود اختصاص داده بودند به ترتیب شامل: پولگون(Pulegone) (۳۷٪)، پی پریتون (Piperitone) (۱۹/۶٪)، کارواکرول (Carvacrol) (۵/۴٪)، نئومنتول (Neomenthol) (۵٪)، می باشند. هم چنین اجزایی از روغن اساسی سیاه دانه که درصد بیشتری از اسانس را تشکیل داده بودند به ترتیب شامل ترانس آنتول (Trans Anethole) (۳۸/۹٪)، پی- سیمین (P-Cymene) (۱۷٪)، لیمونن (Limonene) (۴/۸٪)، کاروون(Carvone) (۴/۴٪)، بودند. در سایر مطالعات، ترکیبات اصلی روغن اساسی زیره سبز، شامل پا را سیمول (سیمین) (Para-Cymol(Cymin)، پی نن(Pinene)، سینئول (Cineole) ولینالول (Linalool) هستند، ترکیبات اصلی یافت شده در اسانس کاکوتی، پولگون (Pulegone)، منتون (Menthone)، ۱و۸ سینئول (Cineole)و لیمونن (Limonene) می باشند و در روغن اساسی سیاه دانه، تیموکینون (Thymoquinone)، پی- سیمن (Cymene)، کارواکرول (Carvacrol) و ترانس آنتول (Trans Anethole) وجود دارد (۲۴و۱۲و۹).

از میان بسیاری از عوامل مربوط به تاثیر و قدرت اجزاء روغن اساسی، مهم ترین آن ها شامل زادگاه یا خاستگاه، قسمت یا بخش مورد استفاده و مرحله تکامل گیاه، آب و هوا و موقعیت رشد (درجه حرارت- خاک-کود و .....) و هم چنین چگونگی تقطیر، ذخیره سازی و نگهداری آن ها می باشد. اجزاء تشکیل دهنده و غلظت نسبی این ترکیبات شیمیایی در روغن های اساسی فقط به گونه های گیاهی وابسته نیست و روغن های اساسی حاصل از قسمت های مختلف گیاه، به طور معمول در ترکیب و فعالیت زیستی متفاوتند. بنابراین، اهمیت این که اجزاء و ترکیبات روغن اساسی مورد آزمایش، مشخص شده باشند، واضح و روشن است. به طورکلی، در آزمایشات تجربی، فعالیت روغن های اساسی در برابر میکروارگانیسم ها، بستگی به روش های مورد استفاده دارد. حساسیت یک میکروارگانیسم به روغن های گیاهی، اول از همه با خصوصیا ت روغن گیاهی و خود میکروارگانیسم ارتباط دارد (۱). در این مطالعه در هر دو روش براث ماکرو و میکرودیلوسیون MIC90 و MFC اسانس های زیره سبز و کاکوتی از فعالیت مهاری و قارچ کشی قوی تری نسبت به روغن اساسی سیاه دانه برخوردار بودند. قدرت مهاری و کشندگی اسانس های مورد آزمایش بر روی هر دو گونه قارچ آسپرژیلوس، به ترتیب شامل اسانس زیره سبز، کاکوتی و سیاه دانه بود. با توجه به MIC90 های حاصل از این مطالعه و بر مبنای طبقه بندی Aligiannis و همکاران، که مواد گیاهی را بر اساس MIC آن ها به دستجات مهار کننده های، قوی (MIC≤0/5mg/ml)، متوسط (0.6mg/ml≤MIC≤1.5mg/ml) و ضعیف (MIC≥1.6mg/ml) طبقه بندی نموده اند (۲۵). اسانس های زیره سبز، کاکوتی و سیاه دانه مورد مطالعه در این پژوهش به ترتیب از فعالیت مهار رشد و کشندگی قوی، قوی و متوسط در برابر گونه های آسپرژیلوس فومیگاتوس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس برخوردار بودند. با توجه به فعالیت قوی تر اسانس زیره سبز بر روی گونه های قارچی مورد آزمایش نسبت به اسانس های کاکوتی و سیاه دانه، ممکن است فعالیت متفاوت این روغن ها مربوط به ترکیبات مختلف، فرم ساختمانی، اجزا تشکیل دهنده و گروه های عامل آن ها و احتمال عملکرد هم افزایی بین اجزا آن ها باشد (۲۶).

در بخشی از این مطالعه که روی مخلوط اسانس ها انجام شد عدم کاهش مقادیر MIC و MFC مخلوط اسانس های مورد آزمایش به صورت دو به دو و یا هر سه آن ها، بیان گر فقدان تأثیر هم افزایی قابل توجهی بین آنها می باشد. نتیجه بعضی مطالعات نشان داد که تاثیر متقابل هم افزایی بین مخلوط روغن های اساسی متفاوت یا مخلوط روغن ها و اجزاء تشکیل دهنده اختصاصی آنها کمتر از آن بود تا کاربردی از نظر عملی داشته باشد (۲). به طور کلی اجزاء و ترکیبات موجود در روغن های اساسی، خصوصیات بیولوژیکی آن ها را معین می کند. بررسی ها نشان داده اند که فعالیت اجزاء اصلی اسانس توسط سایر

[DOR: 20.1001.1.15614107.1392.15.6.4.7]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.15.6.25]

مولکول ها که حضور کمتری در آن اسانس دارند تعدیل می گردد (۲۷و۲و۱). بر اساس یافته های این تحقیق در آزمایشات براث ماکرودیلوسیون و براث میکرودیلوسیون رشد قارچی به طور کامل پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون و مطابق با MFC های حاصل، مهارگردید. کشت های مجدد این موارد نیز منفی بود که موید اثرات قارچ کشی آن ها روی آسپرژیلوس فومیگاتوس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس در غلظت های به دست آمده می باشد. مهار رشد قارچی و قارچ کشی اسانس های مورد آزمایش در دو گونه آسپرژیلوس یک فعالیت ضد کپکی وابسته به مقدار را نشان دادند. بین MIC90 و MFC هر یک از اسانس های کاکوتی و سیاه دانه، اختلاف آماری معنی دار وجود داشت ولی در مورد اسانس زیره سبز این اختلاف معنی دار نبود و نزدیکی و مشابهت هر چه بیشتر بین این دو، این اسانس را در کاربردهای عملی (درمانی، بهداشتی، آرایشی، غذایی و...) بیشتر متمایز می نماید زیرا اختلاف هرچه کمتر بین MFC و MIC دلیل بر سودمندی بیشتر آن به عنوان یک دارو و یا یک ماده ضد میکروبی می باشد. نتایج آزمایشات متعدد، استفاده از روغن های اساسی به عنوان نگهدارنده های مواد غذایی را نیز مورد ترغیب قرار می دهد (۲۸و۱۲و۱).

Bansod و همکاران، عملکرد ضد قارچی روغن های اساسی حاصل از گیاهان دارویی هند را علیه قارچ های بیماری زای آسپرژیلوس فومیگاتوس و آسپرژیلوس نایجر، بررسی نمودند و نتیجه گرفتند که روغن های گیاهی می توانند برای بهبود عفونت های قارچی، مورد استفاده قرار گیرند (۱۰). آن چه که در این مطالعه به دست آمد مشخص نمود که روش ماکرودیلوسیون غربالگری مناسب تری را در مورد تعیین MIC و MFC در مقایسه با روش میکرودیلوسیون دارا می باشد. در مجموع در روش ماکرودیلوسیون، نتایج واضح تر، با انحراف معیار کمتر و با MIC90 و MFC پایین تری در مقایسه با روش میکرودیلوسیون بودند. در این تحقیق نتایج متفاوت مشاهده شده برای MIC90 حاصل از روغن های اساسی در روش ماکرودیلوسیون در مقایسه با روش میکرودیلوسیون، نشان داد که سطح فعالیت ضد قارچی اسانس ها، ارتباط نزدیکی با روش آزمایش غربال گری مورد استفاده و قارچ های مورد آزمایش دارد. تفاوت آماری معنی داری مرتبط با فعالیت روغن های اساسی، علیه دو گونه آسپرژیلوس مورد آزمایش مشاهده نشد. Suhr و همکاران، فعالیت ضد قارچی برخی اسانس ها علیه قارچ های عامل فساد نان چاودار از جمله آسپرژیلوس فلاووس را با دو روش مورد ارزیابی قرار دادند در یک روش از محیط آگار و اسانس و در روش دیگر از مجاورت روغن فرار با نان چاودار آلوده استفاده کردند، نتایج نشان داد که اثرات اسانس ها بستگی به روش آزمایش به کار رفته دارد و شناخت این امر که برای هر اسانس کدام روش بهترین اثر را دارد، مهم است (۲۹).

در تحقیق ما، یکی از دلایل تفاوت در نتایج حاصل از آزمایشات ماکرودیلوسیون با میکرودیلوسیون، می تواند مربوط به فراریت سریعتر و بیشتر اسانس از حفرات میکروپلیت در مقایسه با فلاسک های مورد استفاده در روش ماکرو باشد. دیگر این که اجزایی از اسانس که روی مهار رشد قارچ و یا نابودی آن موثرند در حفرات میکروپلیت به اندازه ای نباشد که بتواند به خوبی روش ماکرو عمل خود را انجام دهند. در این مطالعه تأثیر مناسب روغن های اساسی زیره سبز، کاکوتی و سیاه دانه، علیه گونه های آسپرژیلوس فومیگاتوس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس، توسط آزمایشات براث ماکرودیلوسیون و میکرودیلوسیون تأیید گردید. اختلافات جزئی در MIC های حاصل از اسانس های مورد بررسی علیه آسپرژیلوس فومیگاتوس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس احتمالاً به اندازه اسپور یا کونیدی قارچ مورد آزمایش وابسته است. از طرفی برخی محققین مشاهده نمودند که استفاده از میسلیوم های رویش یافته همیشه سبب ایجاد MIC های بالاتر نسبت به استفاده از اسپور یا کونیدیای قارچی می شود (۳۰و۲۵). علاوه بر محاسبه MIC و MFC، به عنوان شاخص فعالیت اسانس ها علیه قارچ ها، توزین توده قارچی بر اساس جایگزینی و رشد قارچ در محیط کشت، می تواند تخمین فعالیت اسانس را تسهیل و تایید نماید. از این رو شاخص مهار رشد قارچ، به صورت میزان درصدی از کشت میکرو ارگانیسم رشد یافته در گروه کنترل که فاقد روغن اساسی است در مقایسه با نمونه اسانس مورد آزمایش، تعیین می گردد (۱). در این پژوهش، مطابق نتایج حاصل از توزین توده قارچی، فعالیت ضد قارچی اسانس های مورد مطالعه مورد تایید مجدد قرار گرفت.

در مشاهدات انجام شده به وسیله میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM)، قارچ هایی که تحت تاثیر روغن های اساسی قرار گرفته بودند، در مقایسه با موارد شاهد، به طور واضحی تغییرات پاتولوژیک سلولی وابسته به مقدار را به خصوص در ساختمان های غشایی، نشان دادند. از طرف دیگر، مهار رشد آسپرژیلوس فومیگاتوس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس، توسط این روغن ها و در غلظت های مختلف، با تغییرات مورفولوژیک این قارچ ها، ارتباط تنگاتنگی داشتند Gandomi و همکاران و Rassooli و همکاران در دو مطالعه جداگانه که یکی مربوط به تاثیر اسانس آویشن شیرازی روی آسپرژیلوس فلاووس و دیگری مرتبط با اثر عصاره گیاه" نیم "علیه آسپرژیلوس پارازیتیکوس بود، با بررسی میکروگراف های حاصل، تغییر شکل سلول ها همراه با از دست رفتن استحکام دیواره سلولی، از هم گسیختگی غشای سلول، واکوئل دار شدن سیتوپلاسم، از بین رفتن یکپارچگی غشای سلولی، ایجاد فاصله بین دیواره سلولی و غشای سیتوپلاسمی و فرورفتگی موضعی دیواره سلولی در نقاط مختلف را گزارش نمودند که با نتایج تحقیق ما هم خوانی دارد. هم چنین با افزایش غلظت اسانس، تخریب کامل غشای سلولی و از دست رفتن شکل طبیعی سلول و تشکیل"لومازوم" و تخلیه سیتوپلاسم سلول دیده شد (۳۱و۲۴).

روغن های اساسی در غلظت های بالاتر از غلظت مهار رشد قارچ، نه تنها از دیواره سلولی بلکه از میان غشای سیتوپلاسمی عبور کرده و ساختمان های غشایی اندامک های سیتوپلاسمی را مورد تعرض قرار می دهند. تغییرات مذکور، به طور معمول در مواجهه قارچ ها با ترکیبات ایمیدازول، دیده می شود (۳۲). میکروگراف های الکترونی حاصل از مطالعه Eweis و همکاران، نشاندهنده آسیب آشکار دیواره سلولی، غشاء سیتوپلاسمی و ارگانل های سلولی پس از تاثیر ۲۵۰ppm روغن اساسی آویشن بر آسپرژیلوس پارازیتیکوس بود (۳۳). نتایج پژوهش ما نیز موید تغییرات مذکور می باشند و به وضوح نشان می دهند که روغن های اساسی، توانایی پیشگیری از رشد قارچی را از طریق تعارض و تقابل مستقیم با دیواره سلولی و غشاء های سیتوپلاسمی دارند (۳۴).

این مطالعه نشان داد در مشاهده سلول ها با میکروسکوپ الکترونی، تفاوتهای اندکی در تغییرات ساختاری دو گونه قارچ مورد آزمایش بر اساس روغن مورد استفاده وجود داشت. از یافته های حاصل از این تحقیق می توان نتیجه گرفت که اسانس های زیره سبز، کاکوتی و سیاه دانه دارای عملکرد مهار رشد و کشندگی روی سلول های آسپرژیلوس فومیگاتوس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس می باشند.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1392.15.6.4.7]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.15.6.25]

هم چنین، نتایج حاصل از این بررسی درکاربرد اسانس های زیره سبز، کاکوتی و سیاه دانه مفید است، زیرا تعیین مقدار عددی MIC و MFC اسانس گیاهان مناطق مختلف جهت کاربرد آن در محصولات دارویی ضروری است و از آنجایی که گیاهان مورد مطالعه به فراوانی در ایران رشد می یابند، استفاده از این گیاهان و محصولات آنها مناسب و مقرون به صرفه است. از طرف دیگر، به علت این که روغن های اساسی در شرایط آزمایشگاهی نسبت به محل اصلی خودشان مانند داخل غذا یا در بیماران ممکن است بیشتر فعال باشند، پیشنهاد می شود این موضوع زمینه تحقیقات بعدی قرار گیرد و به منظور ارزیابی خواص درمانی این اسانس ها بررسی های بیشتری بر روی حیوانات آزمایشگاهی و نهایتاً بیماران انجام شود و به عنوان نگه دارنده های مواد غذایی، آزمایشات مناسبی در سیستمهای غذایی طراحی گردد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از اساتید و همکاران محترم آزمایشگاه های قارچ شناسی و مرکزی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مشهد و دانشگاه علوم پزشکی گناباد که در انجام این تحقیق ما را یاری نمودند، تشکر و قدردانی می گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1392.15.6.4.7]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.15.6.25]

Inhibition and Destruction Effects of Cuminum Cyminum, Ziziphora Clinopodioides and Nigella Sativa Essences on Aspergillus Cells

M.H. Minooeian Haghighi (PhD) [1*], A.R. Khosravi (PhD) [2]

1. Department of Mycology, Gonabad University of Medical Sciences, Gonabad, Iran
2. Mycology Research Center, Faculty of Veterinary, University of Tehran, Tehran, Iran

J Babol Univ Med Sci; 15(6); Nov 2013; pp: 25-35
Received: Feb 13th 2013, Revised: Jul 10th 2013, Accepted: Sep 4th 2013.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Considering the increasing of fungal infections, including Aspergillosis and with the development of fungal drug resistance, many researchers focus on the antifungal properties of plant essences. The aim of this study was to evaluate the inhibition and destruction effects of Cuminum cyminum, Ziziphora clinopodioides and Nigella sativa essences on aspergillus cells.

METHODS: In this experimental study, the first group was included of each one of the Cuminum cyminum, Ziziphora clinopodioides and Nigella sativa essences as case group, and the second group of the study was included of positive and negative control group. The essences were extracted by hydro-distillation procedure. Then, by applying Broth Macro Dilution and Broth Micro Dilution techniques and four times of repetitions, the mean of Minimum Inhibitory Concentration (MIC90) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC) of the above-mentioned essences were certified against Aspergillus fumigatus (ATCC 16913) and Aspergillus parasiticus (ATCC 115201) in Broth Macro Dilution and Broth Micro Dilution techniques, in 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 and 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 6 and 8 concentrations (mg/mlit), respectively. Analysis of chemical compositions of the essences was performed by using gas chromatography linked to mass spectrometer (Gc/Ms). The effects of above-mentioned essences on cellular structure of aspergillus species were examined by transmission electron microscopy (TEM).

FINDINGS: Based on broth macro dilution technique and 4 times of repetitions, the mean of MIC90 and MFC of Cuminum cyminum, Ziziphora clinopodioides, and Nigella sativa essences on both of aspergillus species, were 0.31, 0.40, 1.50 mg/ml, and 0.75, 1.28, 2.25 mg/ml, respectively. The same arrangement of the above-mentioned essences effect was also confirmed by broth micro dilution technique. The statistical tests showed a significant correlation between inhibition and destruction effects of essences used in this study (p=0.017). Considering the analysis, the main constituent of C. cyminum oil was α- pinene (30%), in Z. clinopodioides oil was pulegone (37%), and in N. sativa oil it was transanethole (38.9%). The main pathologic changes were observed by TEM were in the cell wall, plasma membrane and membranous organelles.

CONCLUSION: The findings of this study showed that Cminum cyminum, Ziziphora clinopodioides and Nigella sativa had appropriate fungistatical and fungicidal functions against Aspergillus fumigatus and Aspergillus parasiticus.

KEY WORDS: *Essences, Cuminum cyminum, Ziziphora clinopodioiedes, Nigella sativa, Aspergillus fumigatus.*

[*] **Corresponding Author;**
Address: Next to the Asian Road, Gonabad University of Medical Sciences and Health services, Gonabad, Iran. Postal Code: 9691793718
Tel: +98 533 7225027
E-mail: drminooeian@gmu.ac.ir

[DOR: 20.1001.1.15614107.1392.15.6.4.7]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.15.6.25]

References

1.Kalemba D, Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Curr Med Chem 2003;10(10):813-29.

2.Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils- a review. Food Chem Toxicol 2008;46(2):446-75.

3.Bodey GP. Vartivarians. Aspergillosis. Eur J Clin Microbial Infect Dis1989;8(5):413-37.

4.Ovary DP, Seifert KA, Savard ME, Frisvad JC. Spoilage fungi and their mycotoxins in commercially marketed chestnuts. Int J Food Microbiol 2003;88(1):69-77.

5.Georgopapadakou NH. Infectious diseases 2001: drug resistance, new drugs. Drug Resist 2002;5(5):181-91.

6.Shahi SK, Shukla AC, Bajaj AK, Medgely G, Dikshit A, Broad spectrum antimycotic drug for the control of fungal infection in human beings. Curr Sci 1999;76:836-9.

7.Curtis L, Coli S, Conroy L, et al. Aspergillus's surveillance project at a large tertiary-care hospital. J Hosp Infect 2005;59(3):188-96.

8.Kafi M. Cumin cyminum: Production and processing. 1st ed. Mashhad: Center of Excellence for Agronomy Faculty of Agriculture Ferdowsi University of Mashad 2003; pp: 165- 82. [in Persian]

9.Iacobellis NS, Lo Cantore P, Capasso F, Senatore F. Antibacterial activity of Cuminum cyminum L. and Carum carvi L. essential oils. J Agric Food Chem 2005;53(1):57-61.

10.Bansod S, Rai M. Antifungal activity of essential oils from Indian medicinal plants against human pathogenic Aspergillus fumigatus and Aspergillus niger. World J Med Sci 2008;3(2):81-8.

11.Ozturk S, Ercisli S. Antibacterial activity and chemical constitutions of Ziziphora clinopodioides. Food Control 2007;18(5):535-40.

12.Unal EL, Mavi A, Aydan-Kara A, Cakir A, Sengul M, Yildirim A. Antimicrobial and antioxidant activities of some plants used as remedies in Turkish traditional medicine. Pharm Biol 2008;46(3):207-24.

13.Kursat M, Erecevit. The antimicrobial activities of methanolic extracts of some Lamiaceae members collected from Turkey. Turk J Sci Technol 2009;4(1):81-5.

14.Ali BH, Blunden G. Pharmacological and toxicological properties of Nigella sativa. Phytother Res 2003;17(4):299-305.

15.Fazly Bazzaz BS, Haririzadeh G, Imami SA, Rashed MH. Survey of Iranian plants for alkaloids, flavonoids, saponins and Tannins [Khorasan Province]. Pharm Biol 1997;35(1):17-30.

16.Aynehchi Y, Salehi Sormaghi MH, Farrohi KH. Screening of Iranian plants for antimicrobial activity. Acta Pharm Suec 1980;17(6):341-6.

17.Bin Jantan I, Mohd Yassin MS, Bee Chin C, Lee Chen L, Lee Sim N. Antifungal activity of the essential oils of nine Zingiberaceae species. Pharma Biol 2003;41(5):392-7.

18.Baydar H, Sagdic O, Ozcan G, and Karadogan T. Antibacterial activity and composition of essential oils from Origanum, Thymbra and Satureja species with commercial importance in Turkey. Food Contr 2004;15(3):169-72.

19.Davies NW. Gas chromatographic retention index of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and carbowax 20M phases. J Chromatogr 1990;503:1-24.

20.de Souza EL, de Oliveira Lima E, de Luna Freire KR, de Sousa CP. Inhibitory action of some essential oils and phytochemicals on the growth of various moulds isolated from foods. Braz Arch Biol Technol 2005;48(2):245-50.

21.Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi. Wayne, 2002. (Approved standard M38-A)

22.Patkar KL, Usha CM, Shetty HS, Paster N, and Lacey J. Effect of spice essential oil on growth and aflatoxin B1 production by Aspergillus flavus. Lett Appl Microbiol 1993;17(2):49-51.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1392.15.6.4.7]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.15.6.25]

23.Bozzola JJ, Russel LD. Electron microscopy: Principles and techniques for biologist. 2nd ed. Sudbury: Massachusetts: Jones and Bartlett Publishers 1999; pp: 199-205.
24.Rassooli I, Razzaghi Abyaneh M. Inhibitory effects of Thyme oils on growth and aflatoxin production by Aspergillus parasiticus. Food Control 2003;15(6):479-83.
25.Aligiannis N, Kalpotzakis E, Mitaku S, Chinou IB. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two origanum species. J Agri Food Chem 2001;49(9):4168-70.
26.Dorman HG, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. J Appl Microbiol 2000;88(5):308-16.
27.Bassole IH, Juliani HR. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. Molecules 2012;17(4): 3989- 4006.
28.Hitokoto H, Morozumi S, Wauke T, Sakal S, Kurata H. Inhibitory effects of spices on growth and toxin production of toxigenic fungi. Appl Environ Microbiol 1980;39(4):818-22.
29.Suhr KI, Nielsen PV. Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi. J Appl Microbiol 2003;94(4):665-74.
30.Samson RA, Hoekstra ES. Introduction to food and airborne fungi. 6th ed. An Institute of the Royal Netherlands. The Netherlands: Academy of Arts and Sciences 2002; pp: 306-16.
31.Gandomi H, Misaghi A, Akhondzadeh Basti A, Bokaei S, Khosravi A, Abbasifar A, Jebelli Javan A. Effect of Zataria multiflora Boiss Essential oil on growth and aflatoxin formation by Aspergillus flavus in culture media and cheese. Food Chem Toxicol 2009;47(10):2397-400.
32.Scott EM, Gorman SP, Millership JS, Wright LR. Effect of miconazole and clotrimazole on K+ release and inhibition of ergosterol biosynthesis in Trichophyton mentagrophytes and related ultrastructural observations. J Antimicrob Chemother1986;17(4):423-32.
33.Eweis M, Ali Abd-Alla Imhemmed, Ambers Gad. Influence of Thymus serpyllum essential oil on Aspergillus parasiticus morphology and aflatoxins production. Res J Pharm Biol Chem Sci 2012;3(2):322.
34.Sikkema J, de Bont JA, Poolman B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. Microbiol Rev 1995;59(2): 201-22.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1392.15.6.4.7]
[DOI: 10.18869/acadpub.jbums.15.6.25]