

## اثر مهارى و تخریبى اسانس هاى زیره سبز، کاکوتى و سیاه دانه روى سلول هاى آسپرژیلوس

محمدحسن مینوئیان حقیقی<sup>۱\*</sup>، علیرضا خسروی<sup>۲</sup> (PhD)

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 مهارى و تخریبى اسانس هاى زیره سبز، کاکوتى و سیاه دانه روى سلول هاى 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 سیاه 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 ۱/۵ و ۰/۵ و ۰/۲۵ میلی گرم در میلی لیتر به روش برات ماکرودیوسیون و در غلظت های ۸ و ۶ و ۵ و ۴ و ۳ و ۲/۵ و ۱/۵ و ۰/۲۵ و ۰/۱ میلی گرم در میلی لیتر به روش میکرودیوسیون 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 روى ساختمان سلولی هر دو گونه آسپرژیلوس بررسی شد.

**یافته ها:** پس از ۴ بار تکرار آزمایش بر اساس روش برات ماکرودیوسیون میانگین اثرمهارى اسانس ها (MIC90) بر روى هر دو 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 تخریبى (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 برات میکرو دیوسیون نیز ترتیب اثر مهارى و تخریبى اسانسها را تایید نمود. رابطه معنی داری بین اثر مهارى و تخریبى 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 مهارى 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

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 (۵). علاوه بر آن، مقاومت آسپرژیلوس به بسیاری از ضد قارچ های موجود، پیش آگهی نگران کننده ای را برای افراد مورد تهاجم

با افزایش موارد مقاومت دارویی در میکروارگانیسم ها، جایگزینی داروهایی با کارایی 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

این مقاله حاصل پایان نامه محمدحسن مینوئیان حقیقی دانشجوی 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

**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 ۰/۸ 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 توپین ۸۰ (Tween 80) قرار گرفتند و مخلوط حاصل از اسپور و قطعات هائیفی 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 هموسیتمتر (Haemocytometer) شمارش شد و در غلظت  $1 \times 10^6$  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 ماکرودیوسیون و براث میکرودیوسیون)، استفاده شد. در شروع تحقیق، ابتدا هرکدام از اسانس ها به طور مجزا و به صورت مطالعه اولیه آزمایشی (pilot study)، روی اسپریلوس فومیگاتوس و اسپریلوس 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 ماکرودیوسیون و در غلظت های ۸، ۶، ۴، ۳، ۲/۵، ۲، ۱/۵، ۱، ۰/۷۵ و ۰/۵ میلی گرم در میلی لیتر در روش میکرودیوسیون بر روی قارچ های مذکور 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 ماکرودیوسیون:** 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 از حل 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

آسپریلوس 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 (۸-۱۰). 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 ۵/۵ تا ۱/۵ درصد اسانس است (۱۴). با توجه به اهمیت روز افزون عفونت های فرصت طلب آسپریلوزیسی به ویژه در میزبانان با ایمنی تضعیف شده و قدرت ضد میکروبی اسانس های گیاهی، این تحقیق با هدف تعیین اثرمهارى و تخریبى اسانس هاى زیره سبز، کاکوتی و سیاه دانه روی سولهای آسپریلوس 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 آسپریلوس فومیگاتوس (*Aspergillus fumigatus*) (ATCC 16913) و آسپریلوس 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 فارماکوتوزی، 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 حاصل 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 موبینه 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).

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 محاسبه شد.

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

وزن توده قارچی در نمونه کنترل =  $W_c$   
وزن توده قارچی در نمونه مورد آزمایش =  $W_s$

**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 بیست اکسترکت 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 هر کدام از ارلن ها را به طور جداگانه در لوله های اپندورف استریل، وارد کرده و پس از سانتریفیوژ، به هر کدام ۱۰۰۰ میکرولیتر، گلو تار آلبدید 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 از ۲۰۰۰۰) 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 برات ماکرودیلوسیون و برات میکرودیوسیون 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 اثر کاکوتی به تنهایی،

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 میکرودیوسیون:** 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 (۱۲ رقت) 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 هر کدام از گونه های قارچی مورد آزمایش و یک حفره به عنوان کنترل منفی برای هر یک از اسانس های تحت آزمایش در نظر گرفته 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 ارگانیسیم 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 وسایل 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 از ۱۰ 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

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  $8/3373 \pm 6/6$  میلیگرم. میانگین وزن کاغذ صافی حاوی بیومس ارلن شاهد مثبت مساوی  $3406/1 \pm 25/5$  میلیگرم. میانگین وزن کاغذ صافی حاوی بیومس ارلن محتوی محیط کشت و اسانس زیره سبز به میزان  $0/25$

میلی گرم در میلی لیتر برابر  $1079/4 \pm 19/6$  میلیگرم. میانگین وزن کاغذ صافی حاوی بیومس ارلن محتوی محیط کشت و اسانس کاکوتی به میزان  $0/25$  میلی گرم در میلی لیتر مساوی  $855/3 \pm 17$  میلیگرم، میانگین وزن کاغذ صافی حاوی بیومس ارلن محتوی محیط کشت و اسانس سیاه دانه به میزان  $1/5$  میلی گرم در میلی لیتر برابر  $1109 \pm 12/8$  میلیگرم بود.

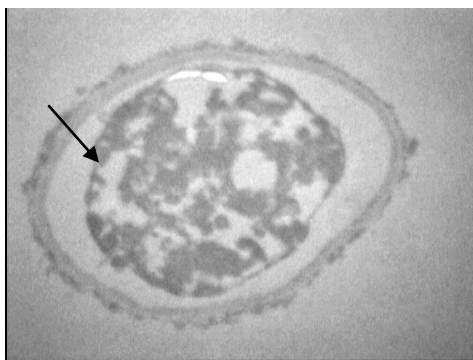
### جدول ۱. مشخصات، مقدار و اجزاء تشکیل دهنده اسانس های زیره سبز، کاکوتی و سیاه دانه با استفاده از روش کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی (GC/MS).

| 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 - پرتون      | ۱۳۱۰         | ۱۹/۶ | پی - سیمن            | ۱۰۲۶         | ۱۷   |
| ۸۱ سینتول           | 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    | ۸۱ سینتول       | ۱۰۲۳         | ۳/۵  | آلفا - توجن          | ۹۲۸          | ۲/۸  |
| آلفا ترپینتول       | ۱۱۸۰         | ۳    | منتول           | ۱۱۷۲         | ۳    | آنیس آلدئید          | ۱۲۵۵         | ۱/۹  |
| آلفا ترپینتول استات | ۱۳۴۲         | ۱/۵  | ورینون          | ۱۱۹۲         | ۲/۳  | ان - نونان           | ۹۰۱          | ۱/۹  |
| زیرانیول            | 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  |
| سایینن              | ۹۷۱          | ۰/۵  | پی - پرتون      | ۱۲۲۶         | ۱/۵  | سایینن               | ۹۷۹          | ۱/۷  |
| ترپینن - ۴ اول      | ۱۱۶۹         | ۰/۵  | ژرماکین         | ۱۴۳۳         | ۱/۱  | آلفا - پینن          | ۹۳۵          | ۱/۵  |
| گاما ترپینن         | ۱۰۵۱         | ۰/۵  | کاروون          | ۱۲۳۶         | ۰/۵  | فناسن                | ۱۰۹۷         | ۱/۴  |
| تری پینول           | ۱۰۸۲         | ۰/۳  | اوژنول          | ۱۳۲۴         | ۰/۵  | آپول                 | 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  | تیموکتون             | ۱۲۵۱         | ۰/۷  |
| میرسن               | ۹۸۱          | ۰/۱  | بتا - پینن      | ۹۷۷          | ۰/۲  | ۱-متیل ۳-پروپیل بنزن | ۱۰۵۲         | ۰/۵  |
| -                   | -            | -    | -               | -            | -    | ان - دکان            | ۱۰۰۱         | ۰/۴  |
| ۹۳/۱۰               |              |      | ۸۴/۴            |              |      | ۸۳/۵                 |              |      |

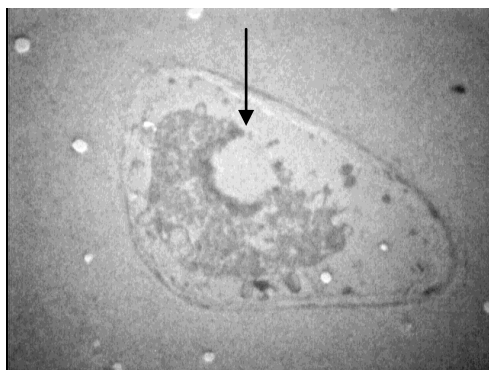
جدول ۲. میانگین MIC90 و MFC حاصل از آزمایشات برات ماکرودیوسین و برات میکرودیوسین اسانس های زیره سبز، کاکوتی و سیاه دانه، علیه هریک از قارچ های اسپریلوس فومیگاتوس و اسپریلوس پارازیتیکوس برحسب میلی گرم در میلی لیتر با ۴ بار تکرار

| قارچ      | اسپریلوس پارازیتیکوس |                 |                |                 | اسپریلوس فومیگاتوس |                 |                |               |
|-----------|----------------------|-----------------|----------------|-----------------|--------------------|-----------------|----------------|---------------|
|           | ماکرودیوسین          |                 | میکرودیوسین    |                 | ماکرودیوسین        |                 | میکرودیوسین    |               |
| اسانس     | MFC                  | MIC90           | MFC            | MIC90           | MFC                | MIC90           | MFC            | MIC90         |
| زیره سبز  | $1 \pm 0/4$          | $0/37 \pm 0/14$ | $3 \pm 0/57$   | $0/25 \pm 0/12$ | $0/5 \pm 0$        | $1/5 \pm 0/4$   | $2/5 \pm 1$    | $1/5 \pm 0/4$ |
|           | a                    | a               | a              | a-A             | a                  | a               | a              | a             |
| کاکوتی    | $1/2 \pm 0/6$        | $0/37 \pm 0/14$ | $2/1 \pm 0/47$ | $5/5 \pm 2/8$   | $0/43 \pm 0/12$    | $1/37 \pm 0/47$ | $3/2 \pm 0/86$ | $1/5 \pm 0/4$ |
|           | a                    | a               | a              | a               | b                  | b               | a              | a             |
| سیاه دانه | $2/5 \pm 0/4$        | $1/75 \pm 0/28$ | $2/75 \pm 0/9$ | $6/25 \pm 2/3$  | $2 \pm 0$          | $1/25 \pm 0/3$  | $3/38 \pm 0/7$ | $1/8 \pm 0/4$ |
|           | b                    | b               | a-B            | a               | c                  | c               | a              | a             |
| جمع       | $1/58 \pm 0/8$       | $0/83 \pm 0/7$  | $2/16 \pm 0/7$ | $5/08 \pm 2/3$  | $0/64 \pm 0/4$     | $1/29 \pm 0/6$  | $3/04 \pm 0/8$ | $1/6 \pm 0/4$ |

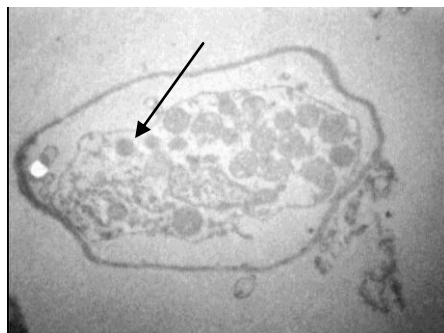
مقادیر مشخص شده با حروف لاتین مختلف (a, b, c)، در هر ستون، بیانگر اختلاف آماری معنی دار ( $P \leq 0.05$ ) می باشد.



شکل ۳. میکروگراف الکترونی (گذاره) از کونیدیهای اسپریلوس 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 سیتوپلاسمی همراه می باشد. شکل گیری و زیکول 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).

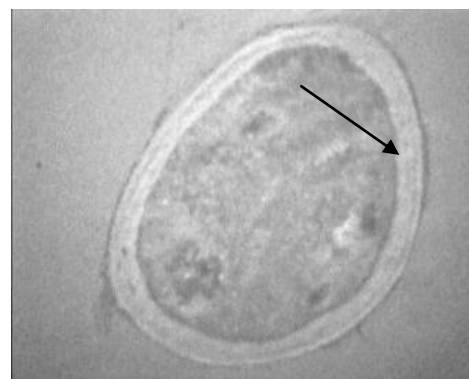


شکل ۴. میکروگراف الکترونی (گذاره) از کونیدی اسپریلوس پارازیتیکوس در محیط YES broth، کونیدی قارچ در معرض ۰/۲۵ میلی گرم در میلی لیتر از اسانس زیره سبز قرار گرفته است. تخریب کامل غشای سیتوپلاسمی، سیتوپلاسم واکوئل دار شده و قسمتهایی از غشای سیتوپلاسمی که تشکیل لومازوم را داده اند قابل مشاهده می باشد (بزرگنمایی ۳۱۵۰ برابر).

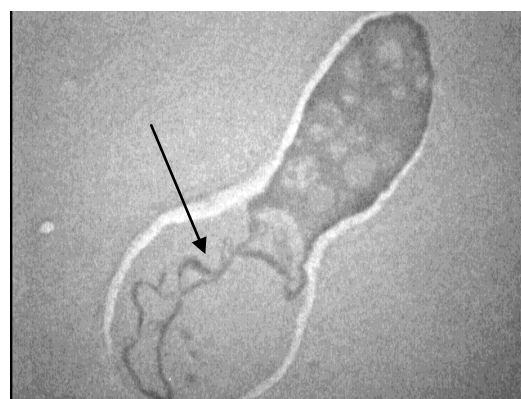


شکل ۵. میکروگراف الکترونی (گذاره) از کونیدی اسپریلوس پارازیتیکوس در محیط YES broth، کونیدی قارچ در معرض ۰/۲۵ میلیگرم در میلی لیتر از اسانس کاکوتی قرار گرفته است. جدا شده گی کامل غشای سیتوپلاسمی از دیواره سلولی، پاره گی غشای سیتوپلاسمی، نشأت سیتوپلاسم و پیدایش واکوئل و لومازوم ها دیده میشوند (بزرگنمایی ۵۰۰۰ برابر).

با استفاده از میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM)، در شکل های ۱ الی ۷ میکروگراف های هایف و کونیدی های اسپریلوس فومیگاتوس و اسپریلوس 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 اسپریلوس 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) اسپریلوس 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).



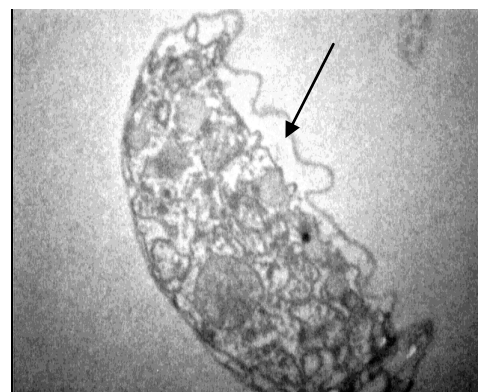
شکل ۲. میکروگراف الکترونی (گذاره) مربوط به اسپریلوس فومیگاتوس در محیط YES broth کونیدی ها با ۰/۲۵ میلی گرم در میلی لیتر اسانس زیره ی سبز مواجهه یافته اند. واکوئولاسیون سیتوپلاسم همراه با انفصال غشاء سیتوپلاسمی از دیواره سلولی و تخریب کامل قسمتی از غشاء قابل مشاهده می باشد (بزرگنمایی ۲۵۰۰ برابر).

(Limonene) (۴/۸٪)، کارون (Carvone) (۴/۴٪)، در سایر مطالعات، ترکیبات اصلی روغن اساسی زیره سبز، شامل پارا سیمول (سیمین) (Para-Cymol (Cymol (Cymin)، پی نن (Pinene)، سینئول (Cineole) و لینالول (Linalool) هستند، ترکیبات اصلی یافت شده در اسانس کاکوتی، پولگون (Pulegone)، منتون (Menthone)، ۸۱ سینئول (Cineole) و لیمون (Limonene) می باشند و در روغن اساسی سیاه دانه، تیموکینون (Thymoquinone)، پی- سیمین (Cymene)، کارواکرول (Carvacrol) و ترانس آنتول (Trans Anethole) وجود دارد (۹۱۲ و ۹۱۴). 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 طور کلی، 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 خصوصیات روغن گیاهی و خود میکروارگانیسم ارتباط دارد (۱). در این مطالعه در هر دو روش براث ماکرو و میکرو دیلوسیون MIC90 و 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 اسپریلوس، 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 ( $MIC \leq 0.5 \text{ mg/ml}$ )، متوسط ( $0.6 \text{ mg/ml} \leq MIC \leq 1.5 \text{ mg/ml}$ ) و ضعیف ( $MIC \geq 1.6 \text{ mg/ml}$ ) 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 اسپریلوس فومیگاتوس و اسپریلوس 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 تاثیر 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



شکل ۶. میکروگراف الکترونی (گذاره) از کونیدی و هایف اسپریلوس 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 اسپریلوس 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 لوزوم 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 (Pinene) (۳۰٪)، لیمون (Limonene) (۲۱٪)، ۸۱ سینئول (Cineole) (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) (۲۸/۹٪)، پی- سیمین (P-Cymene) (۱۷٪)، لیمون

مولکول ها که حضور کمتری در آن اسانس دارند تعدیل می گردد (۲۷ و ۱۰). بر اساس یافته های این تحقیق در آزمایشات براث ماکرودیوسیون و براث میکرودیوسیون رشد قارچی به طور کامل پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون و مطابق با MFC های حاصل، مهار گردید. 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 (۲۸ و ۱۲).

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 ماکرودیوسیون غربالگری مناسب تری را در مورد تعیین MIC و MFC در مقایسه با روش میکرودیوسیون دارا می باشد. در مجموع در روش ماکرودیوسیون، نتایج واضح تر، با انحراف معیار کمتر و با MIC90 و MFC پایین تری در مقایسه با روش میکرودیوسیون بودند. در این تحقیق نتایج متفاوت مشاهده شده برای MIC90 حاصل از روغن های اساسی در روش ماکرودیوسیون در مقایسه با روش میکرودیوسیون، 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. Suhir 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 قرار 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 ماکرودیوسیون با میکرودیوسیون، 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 ماکرودیوسیون و میکرودیوسیون 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 میسیلیوم های رویش یافته همیشه سبب ایجاد MIC های بالاتر نسبت به استفاده از اسپور یا کونیدیای قارچی می شود (۳۰ و ۲۵). 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 تأیید نماید. از این رو شاخص مهار رشد قارچ، به صورت میزان درصدی از کشت میکرو ارگانیزم 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 تأیید مجدد قرار گرفت.

در مشاهدات انجام شده به وسیله میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM)، قارچ هایی که تحت تأثیر 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 تأثیر 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 (۳۱ و ۲۴).

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 تأثیر ۲۵ ppm 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، تفاوت های 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.

انجام شود و به عنوان نگه دارنده هاى مواد غذایى، آزمایشات مناسبى در سیستمهاى غذایى طراحی گردد.

### تقدیر و تشکر

بدینوسیله از اساتید و همکاران محترم آزمایشگاه هاى قارچ شناسى و مرکزى دانشکده دامپزشکى دانشگاه تهران، دانشکده داروسازى دانشگاه علوم پزشکى مشهد و دانشگاه علوم پزشکى گناباد که در انجام این تحقیق ما را یارى نمودند، تشکر و قدردانى مى گردد.

هم چنین، نتایج حاصل از این بررسى در کاربرد اسانس هاى زیره سبز، کاکوتى و سیاه دانه مفید است، زیرا تعیین مقدار عددى MIC و MFC اسانس گیاهان مناطق مختلف جهت کاربرد آن در محصولات داروبى ضرورى است و از آنجایى که گیاهان مورد مطالعه به فراوانى در ایران رشد مى یابند، استفاده از این گیاهان و محصولات آنها مناسب و مقرون به صرفه است. از طرف دیگر، به علت این که روغن هاى اساسى در شرایط آزمایشگاهى نسبت به محل اصلى خودشان مانند داخل غذا یا در بیماران ممکن است بیشتر فعال باشند، پیشنهاد مى شود این موضوع زمینه تحقیقات بعدى قرار گیرد و به منظور ارزیابى خواص درمانى این اسانس ها بررسى هاى بیشترى بر روی حیوانات آزمایشگاهى و نهایتاً بیماران

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

M.H. Minooeian Haghighi (PhD)<sup>1\*</sup>, A.R. Khosravi (PhD)<sup>2</sup>

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 13<sup>th</sup> 2013, Revised: Jul 10<sup>th</sup> 2013, Accepted: Sep 4<sup>th</sup> 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  $\alpha$ - 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

## 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 Dis* 1989;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.

- 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<sup>+</sup> release and inhibition of ergosterol biosynthesis in *Trichophyton mentagrophytes* and related ultrastructural observations. J Antimicrob Chemother 1986;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.