بررسی اثر ضد قارچی و تغییرات مورفولوژیکی اسانس زیره سبز بر روی جدایه‌های قارچ *فوزاریوم ورتیسیلیوئیدس* جداسازی شده در ایران

علیرضا مختاری[۱]، علیرضا خسروی[۲*]، تقی زهرایی‌صالحی[۳]

چکیده

قارچ‌هایی مانند فوزاریوم که به قارچ‌های مزرعه معروف می‌باشند، از لحاظ میزان تولید و سمیت توکسین، سرآمد این گروه می‌باشند. مهم‌ترین نوع توکسین فومونیزین، نوع B_1 می‌باشد. فوزاریوم‌ها عموماً سموم خود را در دمای پایین‌تر از درجه حرارت مطلوب رشد تولید می‌کنند. توکسین فومونیزین توسط قارچ *فوزاریوم ورتیسیلیوئیدس* تولید می‌شود. در سال‌های اخیر میزان آلودگی به قارچ *فوزاریوم ورتیسیلیوئیدس* با توجه به وضعیت آب و هوایی، شرایط فیزیولوژیکی و میزان نیتروژن موجود افزایش یافته است. در این بررسی به طریق برون تنی تاثیر اسانس زیره سبز بر روی قارچ‌های *فوزاریومورتیسیلیوئیدس* جداسازی شده از ایران به روش میکرودایلوشن تعیین شد.

زیره سبز با نام علمی *Cuminum cyminum.L* گیاهی است که، آلدئیدکومینیک اصلی‌ترین ترکیب موجود در اسانس آن می‌باشد. این اسانس تجاری اصلاح شده، محلول در آب می‌باشد. این تحقیق بر روی ۱٤ جدایه انجام شد. تست حساسیت دارویی طبق روش استاندارد Broth Microdillution NLCCLS– $M38A_2$ با دو بار تکرار انجام شد.

بیشترین میزان فراوانی MIC (حداقل غلظت ممانعت کننده) در غلظت ۰/۱۹۵ µg/ml با ٤۲/۸٤٪ جدایه حساس بوده و کمترین فراوانی در غلظت ۰/۲۹۳µg/ml با ۷/۱٤٪ جدایه حساس بود. در آزمایشMFC (حداقل غلظت کشنده) نتایج بیشترین میزان فراوانی در غلظت ۰/۳۹µg/ml با ٤۲/۸٤٪ و کمترین فراوانی در غلظت‌های µg/ml ۰/۱٤٦، ۰/۲۹۳ و ۰/۵۸٦ با۷/۱٤٪ به دست آمد. میزان MIC جدایه‌های مختلف اسانس زیره سبز بین µg/ml ۰/۳۹–۰/۰۹۷ و MFC آنها µg/ml ۰/۷۸۱–۰/۱٤٦ محاسبه شد. اثر اسانس بر روی تغییر شکل کنیدی‌های این قارچ به روش میکروسکوپی نیز به اثبات رسید. نتایج این مطالعه نشان‌دهنده موثر بودن این اسانس در مهار رشد قارچ *فوزاریوم ورتیسیلیوئیدس*است.

واژگان کلیدی: *فوزاریوم ورتیسیلیوئیدس، فومونیزین، زیره سبز، میکرودایلوشن*

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۱/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۱/٤/۱٤

مقدمه

قارچ‌هایی مانند فوزاریوم که به قارچ‌های مزرعه معروف می‌باشند، به دلیل مقاومت ناچیز در برابر کم‌آبی، در فصول بارانی موجب فساد محصولات کشاورزی در سطح مزرعه می‌شوند. به همین دلیل میزان جداسازی *فوزاریوم* در هوای بارانی بیشتر است، که نشانه انتشار فصلی این گونه قارچ‌ها می‌باشد. ارتباط بین رشد قارچ‌های مولد توکسین با درجه حرارت و پتانسیل آب، به اثبات رسیده است [۱]. قارچ‌های جنس *فوزاریوم* از لحاظ قدرت تولید سم گسترده‌ترین گروه می‌باشند. برای تولید سم نیاز به آب بالایی داشته و پیش از درو کردن محصول بر روی آن جایگزین و در طی انبار کردن ایجاد خسارت می‌نمایند. فوزاریوم‌ها اغلب سموم خود را در دمای پایین‌تر از درجه حرارت مطلوب رشد تولید می‌کنند. فوزاریوم در حرارت ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد توکسین زیادی تولید نمی‌کند، اما در حرارت نزدیک به صفر درجه هرچند رشد قارچ کمتر است، ولی میزان بالایی از مایکوتوکسین تولیدمی‌کنند [۱٦،۲۰]. ازمهم‌ترین توکسین‌های قارچ فوزاریوم، فومونیزین می‌باشد که که در سال ۱۹۸۸ شناسایی شد و توسط قارچ *فوزاریوم ورتیسیلیوئیدس* که از پاتوژن‌های قارچی غلات می‌باشد، تولید می‌شود[۱۰]. در سال‌های اخیر میزان آلودگی به قارچ *فوزاریوم ورتیسیلیوئیدس* با توجه به وضعیت آب و هوایی، شرایط فیزیولوژیکی و میزان نیتروژن موجود افزایش یافته است [۱۰]. مایکوتوکسین‌ها سالانه موجب میلیاردها دلار ضرر اقتصادی می‌شوند[۱۱]. توکسین فومونیزین شامل B_1,B_2B_3,B_4 بوده که مهم‌ترین آن B_1 می‌باشد. این توکسین محلول در آب بوده و پس از یک فصل خشک و به‌ویژه در فصول مرطوب مشاهده می‌شود[۲۵].

۱- دانشجوی مقطع کارشناسی ارشد، رشته قارچ شناسی، مرکز تحقیقات قارچ‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران Khosravi@ut.ac.ir

۲*-استاد مرکز تحقیقات قارچ‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۳- استاد گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

این سم موجب ایجاد سرطان مری در انسان، جلوگیری از سنتز سرامید و موجب اختلال در تشکیل اسفنگولیپید به دلیل تشابه ساختمانی با آن می‌شود. همچنین موجب لوکوانسفالومالاسی در اسب، خیز ریوی در خوک، مسمومیت کبد و کلیه در حیوانات خانگی و ایجاد سرطان در حیوانات آزمایشگاهی می‌شود[۲۲]. براساس اعلام جامعه آزمایشگاهیان آمریکا حداکثرمیزان توصیه شده حضور سم B_1 در جیره غذایی اسب، خوک، گاو و مرغ به ترتیب برابر باppm ۵، ۱۰،۱۰، ۵۰ است[۸].

زیره سبز با نام علمی *Cuminum cyminum. L* گیاهی است از خانواده apiaceae، که سه قطب اصلی کشت زیره سبز ایران استان‌های خراسان، اصفهان و کرمان است[۲]. زیره دارای تانن، روغن، رزین و اسانس است. درصد اسانس آن به منطقه رشد و سن گیاه بستگی دارد. آلدئیدکومینیک اصلی‌ترین و عمده‌ترین ترکیب موجود در اسانس زیره سبز است که حداکثر ۶۳ ٪ از کل میزان اسانس را تشکیل می‌دهد. برای تعیین میزان سمیت و مقادیر موثر ترکیبات مهارکننده ازجمله داروها و اسانس‌های گیاهی از روش بررسی تعیین حساسیت استفاده می‌شود[۲٤].

آلدئیدکومینیک یا کومینول، کومینول الکل، پاراسیمول، سیمونن، آلفاپینن، بتاپینن، گاماترپینن، فلاندرن، سینئول، ۱و۳ پارا منتادین- ۷-آل،۱و٤ پارامنتادین -۷- آل، کامفن، میرسن، میرتنال، کاپاسیمن، دی‌هیدروکومین آلدئید، کاریوفیلین، آلفا ترپنیئول، لینالول، ترپینولن، پولگون مواد تشکیل دهنده اسانس زیره سبز هستند [۲, ٦, ۱۵, ۲۱].

هدف از این پژوهش بررسی تاثیر اسانس زیره سبز بر روی جدایه‌های قارچ *فوزاریوم ورتیسیلیوئیدس* جدا شده در ایران به روش میکرودایلوشن و همچنین مطالعه و بررسی تغییرات مورفولوژیکی کنیدی جدایه‌های قارچ *فوزاریوم ورتیسیلیوئیدس* تحت تاثیر اسانس بوده است.

مواد و روش کار

در این بررسی بطریق برون تنی تاثیر اسانس گیاه زیره سبز (MIC و MFC) بر روی قارچ‌های *فوزاریوم ورتیسیلیوئیدس* جداسازی شده از ایران به روش میکرودایلوشن تعیین شد. این اسانس به صورت تجاری و به صورت اصلاح شده محلول در آب از شرکت دارویی زردبند تهیه شد.

این تحقیقات جمعاً بر روی ١٤ جدایه که شامل، ۹ نمونه قارچ *فوزاریوم ورتیسیلیوئیدس* توکسین زا و ۳ نمونه گونه *فوزاریوم غیر ورتیسیلیوئیدس* غیرتوکسین زا (به عنوان شاهد) شامل نمونه‌های F10,F7,F6 جداسازی شده از ایران بود که از مرکز قارچ‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه شد، همچنین ۲ جدایه استاندارد تایید شده F_{R200} و F_{R201} از مرکز تحقیقات بذر و نهال وزارت جهاد و کشاورزی تهیه شد.

روش تهیه محیط کشت اولیه جهت رشد

به مقدار کافی از محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار، هم در داخل لوله به صورت شیبدار و هم در پلیت تهیه و اتوکلاو شد.

روش تهیه محیط کشت RPMI 1640-2%G

به مقدار کافی از محیط کشت RPMI 1640-2%G تهیه و بعد از مخلوط نمودن مواد و تعیین pH، با فیلترهای یکبارمصرف µ ۰/۲۲ و سرنگ استریل محلول فیلتر شده و در یخچال نگهداری می‌شود. بهتر است این محیط به صورت تازه و به اندازه نیاز همان روز تهیه شود[۱۸].

روشهای تهیه محلول میکروبی

جدایه‌های مورد آزمایش قارچی در محیط سیب‌زمینی دکستروز آگارکشت داده شده و در انکوباتور یخچال‌دار، در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک هفته انکوبه شد. بعد از یک هفته به میزان ۵ سی‌سی از محلولPST (حاوی ۱۰۰ سی‌سی سرم فیزیولوژی نرمال + ۱۰µl تویین ۸۰ سپس اتوکلاو محلول) به روی محیط آگار شیبدار اضافه شده و با سوآپ استریل کاملاً سطح اسپورها شست‌وشو داده شده و سوسپانسیون قارچی را به مدت ۱۵ ثانیه کاملاً ورتکس نموده و سپس به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه در همین شرایط در

آزمایشگاه قرار داده تا میسیلیوم‌ها تـه‌نشـین و اسـپورها در محلول باقی بماند. در ادامه غلظت سوسپانسیون با استفاده از اسپکتروفتومتر با طول موج ۵۳۰ نانومترقرائت، و میـزان OD قارچ فوزاریوم بایـد برابـر ۰/۱۵ تـا ۰/۱۷ باشـد تـا غلظـت سوسپانسیون برابر با غلظت $conidia/ml^{6}10\times3/1-0/5$ باشد. استاندارد نمودن مقدار تلقیح در این روش برای قـارچ‌هـای رشته‌ای، نوع محیط کشت، انکوباسیون و تعیین نقطه انتهایی مهم می‌باشد. زمان انکوباسیون ۷۲–۴۸ سـاعت در دمـای ۳۵ درجه سانتی‌گراد مورد تایید می‌باشد[۱۸،۱۴،۱۳،۵،۲۸].

پائین‌ترین غلظتی که از رشد قارچ جلوگیری کند، به عنـوان MIC ماده ضد قارچی در نظر گرفته می‌شود که بـر حسـب میلی‌گرم در میلی‌لیتر، میکروگرم در میلی‌لیتـر، میکرولیتـر در میلی‌لیتر و یا بصورت واحد بین‌المللی در میلی‌لیتـر در نظـر گرفته می‌شود.

روش تعیین MIC

برای تعیین MIC، ابتدا به هر یک از گوده‌های پلیت ۹۶ خانه به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از محیط RPMI1640 اضافه نمـوده، سپس از محلول اسانس *زیره سبز* رقـت‌هـای سـریالی در۱۰ رقت در میکروپلیت‌های مسطح ۹۶ خانـه‌ای بـه میـزان ۱۰۰ میکرولیتر برای هر چاهک تهیه شد، بـدین صـورت کـه بـه گوده اول از سمت چپ اضافه و به خوبی با محیط مخلـوط شود، در ادامه از گوده اول به میزان ۱۰۰ میکرولیتر برداشـت و به گوده دوم منتقل و به همین ترتیب رقـت ½ از اسـانس در هر گوده تهیه و در نهایت از گـوده دهـم ۱۰۰ میکرولیتـر اسانس خارج مـی‌کنـیم. در ایـن روش چاهـک اول حـاوی بیشـترین غلظـت و چاهـک دهـم حـاوی کمتـرین غلظـت مـی‌باشـد. گـوده‌هـای ۱۱ و ۱۲ عـاری از محلـول اسـانس می‌باشد. در ادامه به هریک از گوده‌ها بـه میـزان ثابـت ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون استاندارد شـده اضـافه نمـوده تـا حجم نهایی محلول برابر با ۲۰۰ میکرولیتر بـا غلظـت هـای متفاوت اسانس شود. گوده ۱۱ محتوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط و ۱۰۰ میکرولیتر سوسپاسیون قارچی به عنوان کنتـرل مثبـت یا (Growth control) GC و گـوده ۱۲ کـه محتـوی محـیط کشت می‌باشـد بـه عنـوان کنتـرل منفـی یـا SC (Sterility control) در نظر گرفته شد. ایـن آزمـون بـرای هـر جدایـه قارچی در ردیف افقی مجزا و به صورت دوبار تکرار انجـام شد[۱۹].

در این آزمون بیشترین غلظـت در گـوده اول معـادل µg/ml ۲۵ و کمتـرین غلظـت در گـوده دهـم برابـر بـاµg/ml ۰/۰۴۸۵می‌باشد. بعـد از گذشـت مـدت زمـان انکوباسـیون، میکروپلیت‌ها هم به صورت چشـمی و هـم توسـط دسـتگاه الایزاریدر در طول موج ۵۴۰ نانومتر قرائت شد. گوده‌ای کـه مانع رشد قارچ شده به عنوان MIC در نظر گرفته می‌شود.

در روش چشمی مطابق یک قاعده کلـی بـرای نشـان دادن میزان رشد طبق راهنما از پنج امتیاز یعنی امتیاز صـفر (عـدم رشد واضح)، امتیاز یک (۲۵٪ رشد)، امتیاز دو (۵۰٪ رشـد)، امتیاز سه (۷۵٪ رشد)، امتیاز چهار (۱۰۰٪ رشـد)، درمقایسـه با حفره کنترل، که رشد۱۰۰٪دارد، استفاده شد. در این آزمون وقتی که ۱۰۰٪ رشد قارچ مهار شده بود به عنوان MIC_{90} در نظر گرفته شد[۳].

در روش استفاده از دستگاه الایزاریـدر کمتـرین غلظتـی کـه برابر با MIC_{90} باشد جواب آزمون خواهد بود [۱۹].

تعیین حداقل غلظت کشندگی قارچی یا MFC

جهت تعیـین MFC، از گـوده MIC و گـوده بعـد و قبـل از MIC به میزان۵۰میکرولیتر برداشت نموده و بـه روی محـیط سیب‌زمینی دکستروز آگار تلقیح و سپس به مدت یک هفتـه انکوبه می‌نماییم، بعد از این زمان هر رقتی که در هـر پلیـت مانع رشد کامل قارچ شده باشد یا کمتر از ۳ کلـونی(تقریبـاً معادل ۹۹/۵–۹۹٪ فعالیت کشندگی) وجـود داشـته‌باشـد بـه عنوان MFC در نظر گرفته می‌شود. در صورتی کـه اخـتلاف مقدار این دو زیاد باشد، قارچ مـورد نظـر نسـبت بـه عمـل کشندگی مقاوم است و اگر اختلاف مقدار این دو کم باشـد

نشان از حساس بودن این جدایه به این اسانس می‌باشد و طبیعتاً برای از بین بردن آن نیاز به تجویز بیشتر ماده ضد قارچی نمی‌باشد[۵،۱۳].

روش بررسی مورفولوژی کنیدی‌های فوزاریوم ورتیسیلیوئیدس تحت تاثیر اسانس به روش میکروسکوپی

جهت بررسی میکروسکوپی کنیدی‌های نمونه‌هایی که تحت تاثیر اسانس از نمونه‌های رشد یافته بر روی پلیت‌های تعیین MFC و کلونی‌های ظاهر شده بر روی این پلیت‌ها استفاده می‌شود. بعد از تهیه لام در مجاورت محلول لاکتوفنل بلو، کنیدی‌ها و هایف‌های این نمونه‌ها به وضوح در زیر میکروسکوپ قابل مشاهده است.

روش مطالعه و روش آماری

این نوع مطالعه تجربی بوده و با استفاده از نرم‌افزار SPSSنسخه ۱۹ و روش های آماری توصیفی، داده‌ها پردازش شد. از آزمون Student t-test جهت مقایسه بین زمان‌های انکوباسیون میکروپلیت‌های ۹۶ خانه استفاده شد و سطح معناداری P≤ ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج اثرات ضد قارچی و تعیین MFC و MIC

اسانس زیره سبز مورد استفاده به صورت تجاری اصلاح شده و در آب محلول بوده و نیاز به هیچ نوع حلالی مانند DMSO نداشته و به‌راحتی در محیط کشت مایع حل می‌شود. همچنین مشخص شد که تاثیرات این اسانس در هردوبار تکرار آزمون نتایج مشابهی دارد. نتایج آزمون MIC در روش میکروپلیت تمام نمونه‌ها بین گوده‌های ۹-۷ مشاهده شد.

تعیین MFC

نتایج آزمون MFC بین گوده‌های ۸-۶ به دست آمده و در هر دو بار تکرار نتایج مشابه مشاهده شد.

جدول۱- حداقل، حداکثر، میانگین و دامنه نتایج MIC و MFC بر حسب (µg/ml)

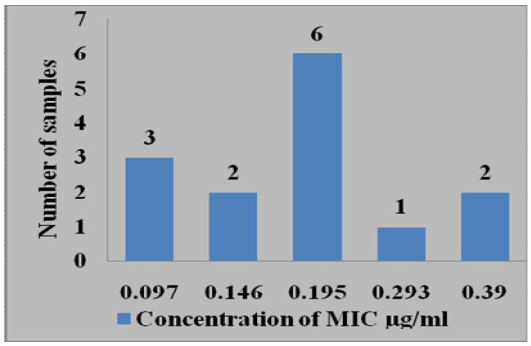
نوع آزمون	حداقل غلظت	حداکثر غلظت	دامنه	میانگین
MIC	۰/۰۹۷	۰/۳۹	۰/۲۹۳	۰/۲۰۱۸
MFC	۰/۱٤٦	۰/۷۸۱	۰/٦۳۵	۰/۳۹۳۷

جدول۲- نتایج میانگین غلظت آزمایشMFC و MIC اسانس زیره سبز بر حسب (µg/ml)

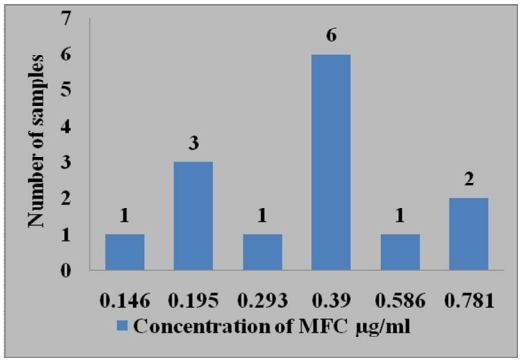
نمونه‌های F10,F7,F6 قارچ *فوزاریوم ورتیسیلیوئیدس غیرتوکسین زا* ، نمونه‌های F_{R200} و F_{R201} قارچ *فوزاریوم ورتیسیلیوئیدس* کنترل مثبت، سایر نمونه‌های قارچ *فوزاریوم ورتیسیلیوئیدس توکسین زا*.

شماره نمونه / نوع آزمون	F_4	F_5	F_6	F_7	F_9	F_{10}	F_{11}
MIC	۰/۰۹۷	۰/۳۹	۰/۰۹۷	۰/۰۹۷	۰/۳۹	۰/۱۹۵	۰/۱۹۵
MFC	۰/۱۹۵	۰/۷۸۱	۰/۱٤٦	۰/۱۹۵	۰/۷۸۱	۰/۳۹	۰/۳۹

شماره نمونه / نوع آزمون	F_{13}	F_{14}	F_{16}	F_{17}	F_{18}	F_{R200}	F_{R201}
MIC	۰/۱٤٦	۰/۱۹۵	۰/۲۹۳	۰/۱۹۵	۰/۱٤٦	۰/۱۹۵	۰/۱۹۵
MFC	۰/۱۹۵	۰/۳۹	۰/۵۸٦	۰/۳۹	۰/۲۹۳	۰/۳۹	۰/۳۹

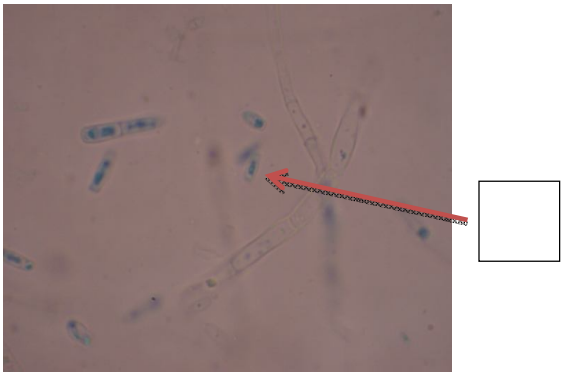


نمودار۱- توزیع فراوانی نتایج MIC نمونه‌ها



نمودار۲- توزیع فراوانی نتایج MFC نمونه‌ها

نتایج بررسی مورفولوژی کنیدی‌های *فوزاریوم ورتیسیلیوئیدس* تحت تاثیر اسانس به روش میکروسکوپی



نگاره ۱- مشاهده میکروسکوپی قارچ *Fusarium Verticillioides* تحت تاثیر اسانس و تغییر شکل ماکروکنیدی

بحث

قارچ‌های*فوزاریوم* پراکندگی وسیعی داشته و به جهت آلودگی غذا و تهدید سلامتی انسان و دام از اهمیت زیادی برخوردار است. شناسایی این قارچ‌ها در تعیین نقاط و میزان آلوده بودن محصولات به روش‌های مختلف، دارای نقش مهمی در کنترل و مبارزه با این قارچ‌های توکسین‌زا از جمله *فوزاریوم ورتیسیلیوئیدس*می‌باشد. بررسی مطالعات صورت گرفته در ایران و سایر نقاط نشان دهنده شیوع بالای قارچ *فوزاریوم* و به خصوص *فوزاریوم ورتیسیلیوئیدس*است. خسروی و همکاران در سال ۲۰۰۸ در قم قارچ *فوزاریوم* را در ٦٪ از نمونه‌های دانه‌های ذرت،جو و ذرت سیلو شده خوراک حیوانات جداسازی نمودند [۲۰].

وحید رهجو و همکاران در تحقیقاتی که بین سال‌های ۲۰۰۵-۲۰۰٤ در ایران انجام شد، از مجموع ۱۹۱ نمونه ذرت مورد آزمایش قرارگرفته از یازده منطقه جغرافیایی ایران، بر اساس آزمون PCR و تعیین گونه و ویژگی مورفولوژیکی با پرایمرهای *VER*٪۹۸/۵ از نمونه‌های جداسازی شده را *فوزاریوم ورتیسیلیوئیدس* گزارش نمودند[۲٦].

اسانس گیاه زیره سبز سابقه‌ای طولانی در درمان بیماری‌ها دارد، آزمایش MIC و MFC نشان می‌دهد که این اسانس دارای اثرات ضدقارچی قوی می‌باشد. این اثر در مطالعات دیگر علاوه بر قارچ *فوزاریوم ورتیسیلیوئیدس* بر روی سایر قارچ‌های رشته‌ای دیگر نیز به اثبات رسیده است. همچنین این قارچ در مطالعات سایر محققین نیز تحت تاثیر اسانس سایر گیاهان دارویی قرار گرفته که نتایج این تحقیقات نشان‌دهنده موثر بودن این اسانس‌ها در مهار رشد قارچ *فوزاریوم ورتیسیلیوئیدس*می‌باشد.

خسروی و همکاران در سال ۲۰۱۱ تاثیر اسانس دو نوع گیاه دارویی از جمله زیره سبز را بر روی قارچ‌های *آسپرژیلوس فومیگاتوس* و *آسپرژیلوس فلاووس* بررسی نموده و مشخص شد که اسانس این گیاه دارای فعالیت بسیار قوی،و ماهیت ضدقارچی با MIC_{90} در حدود ۱/۵mg/ml تا ۲می‌باشد [۲۰]. در مطالعه حاضر نیز میزان تاثیر ضدقارچی(MIC) اسانس زیره سبز (µg/ml) ۰/۳۹تا ۰/۰۹۷ و میزان تاثیر ضدقارچی (MFC) اسانس زیره سبز (µg/ml) ۰/۱٤٦ تا ۰/۷۸۱ محاسبه شده، که نشان از تاثیر ممانعت کنندگی این اسانس در رقت‌های کم دارد. Wildfeuer و همکاران در سال ۱۹۹۸ میلادی، در آزمایش‌های خود بر روی فعالیت ضدقارچی (مخمرها و قارچ‌های رشته‌ای) وریکونازول و مقایسه آن با داروهای شیمیایی دیگر مانند ایتراکونازول، کتوکونازول، آمفوتریسین B و گریزئوفولوین،

میزان حداقل و حداکثر MIC هرکدام از داروها را بر روی قارچ‌های فوزاریوم بیان نمودند. نتایج دامنه MIC این داروها بر روی گونه‌های مختلف فوزاریوم بدین شرح می‌باشد، داروی وریکونازول (µg/ml) ۰/۳۹۱ تا ۳/۱۲۵ و میانگین (µg/ml) ۰/۷۸، ایتراکونازول (µg/ml) ۰/۳۹۱ تا ٦/۲۵۰ و میانگین (µg/ml) ۲/۰۹ ، داروی کتوکونازول (µg/ml) ۰/۷۸۲ تا ٦/۲۵۰ و میانگین(µg/ml) ۲/۹۵، داروی آمفوتریسین B (µg/ml) ۰/۷۸۲ تا ۳/۱۲۵ و میانگین (µg/ml) ۱/٦٦[۲۹].

مقایسه نتایج فوق با نتایج پژوهش حاضر موید این مطلب می‌باشد که دامنه MIC اسانس زیره سبز نیز با دامنه MIC داروهای شیمیایی به خصوص با داروی وریکونازول در یک سطح قرار دارد. همچنین مقایسه نتایج دامنهMICسایر داروهای شیمیایی با اسانس زیره سبز همخوانی داشته و می‌تواند تاثیرات ضدقارچی این اسانس را در مقایسه با داروهای شیمیایی کاملاً تایید نماید.

مینوئیان حقیقی و خسروی در مقاله سال ۱۳۸۸ تاثیر اسانس زیره سبز، کاکوتی و سیاه‌دانه بر روی *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس فومیگاتوس* را بررسی نمودند. در این تحقیق اسانس زیره سبز دارای بیشترین تاثیر ضدقارچی در کمترین مقدارگزارش شده است. میزان فعالیت ضدقارچی اسانس زیره سبز با MIC_{90} در حدود ۰/۲۵mg/ml تا ۰/٤۳ گزارش شده است همچنین در این تحقیق به این موضوع نیز اشاره شده است که ترکیبات اصلی روغن زیره سبز،شامل پاراسیمول، سیمین، پی نن، سینئول ولینالول هستند[۱۵].

Aligiannis و همکاران در سال ۲۰۰۱ میلادی ترکیبات گیاهی را بر اساس MIC آنها به گروه‌های الف) مهارکننده‌های قوی (MIC≤ ۰/۵mg/ml)، ب) مهارکننده متوسط (۱/۵mg/ml ≤MIC≤ ۰/٦ mg/ml) و ج) مهار کننده‌های ضعیف (MIC≥ ۱/٦ mg/ml) طبقه‌بندی نمودند[٤].

Kalemba و همکاران در سال ۲۰۰۳ در تحقیقات خود این نکته را متذکر شده‌اند که روغن‌های اساسی از ساخت DNA، RNA، پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدها در سلول‌های قارچی و باکتریایی جلوگیری نموده، و این ترکیبات تغییراتی مشابه با اثرات ناشی از فعالیت پادزیست را در قارچ‌ها موجب می‌شوند[۱۷]. این نکته در نتایج حاصل از این پژوهش با تاثیر اسانس بر روی رشد قارچ و تغییرات مورفولوژیکی به اثبات رسید.

دامنه تاثیر ضدقارچی اسانس زیره سبز برضد قارچ‌های رشته‌ای آسپرژیلوس که در مطالعه مینوئیان و خسروی انجام گرفته است، تاحدودی مشابه نتایج به دست آمده پژوهش حاضر و تایید تاثیرات ضدقارچی زیره سبز برضد قارچ‌های رشته‌ای *فوزاریوم ورتیسیلیوئیدس* می‌باشد. مقایسه این نتایج موید این مطلب می‌باشد که این اسانس دارای تاثیرات ضدقارچی قوی در رقت های کم می‌باشد. همچنین با مقایسه بین نتایج MIC و MFCدو نمونه‌کنترل مثبت *فوزاریوم ورتیسیلیوئیدس* F_{R200} و F_{R201}، غلظت‌های به دست آمده به طور کامل برای دو نمونه مشابه بوده و هیچ اختلافی وجود نداشت (P≤۰/۰۵).ضمناً مقایسه نتایج قارچ‌های *فوزاریوم ورتیسیلیوئیدس* غیر توکسین زا و نمونه‌های *فوزاریوم ورتیسیلیوئیدس توکسین زا*، تفاوت قابل ملاحظه‌ای که نشان از اختلاف زیاد غلظت بین نمونه‌ها باشد، مشاهده نشد (P≤۰/۰۵).

Bansod و همکاران در سال ۲۰۰۸، در تحقیقاتی که بر روی عملکرد ضدقارچی ۱۵ اسانس ازگیاهان دارویی هند بر روی گونه‌های *آسپرژیلوس فومیگاتوس* و *آسپرژیلوس نایجر* جداسازی شده از نمونه‌های انسانی انجام دادند، گزارش نمودند که اسانس گیاه *زیره سبز* دارای فعالیت ضدقارچی ضعیف در مقایسه با سایر اسانس‌های گیاهان دارویی مانند *اوکالیپتوس گلوبولوس* می‌باشد [۷]. در صورتی که در مطالعه مینوئیان و خسروی اسانس زیره سبز بر روی قارچ‌های آسپرژیلوس کاملاً

موثر گزارش شده است، همین نتیجه در پژوهش ما مهار رشد قارچ رشته‌ای *فوزاریوم ورتیسیلیوئیدس* تایید شده است.

نایینی و همکاران در تحقیقات خود در سال ۲۰۱۰ تاثیر اسانس ۵ گیاه از جمله اسانس زیره سبز را بر روی قارچ‌های رشته‌ای شامل فوزاریوم‌های غیرتوکسین‌زا (*فوزاریوم سولانی* و *فوزاریوم اکسیسپوروم*) و فوزاریوم‌های توکسین‌زا(*فوزاریوم پوئه* و *فوزاریوم اکوئی‌ستی*) به روش ماکرودایلوشن بررسی نمودند. در این تحقیق اسانس زیره سبز با غلظت‌های µg/m ۱۸۵/۳و ۱۵۹ به طور کامل موجب مهار رشد قارچ‌های فوزاریوم توکسین‌زا و غیرتوکسین‌زا شده است [۲۳].

شکری و همکاران در سال ۲۰۱۱ تاثیر دو نوع اسانس گیاه(*Geranium pelargonium*،*Zataria multiflora*)را بر روی چهار گونه قارچی توکسین‌زا از جمله *فوزاریوم ورتیسیلیوئیدس*مورد بررسی قرارداده و نتایج حاکی از تاثیر ۱۰۰٪ مهارکنندگی رشد اسانس گیاه *Zataria multiflora* با غلظت‌های ppm ۴۰۰۰،۲۰۰۰،۱۰۰۰ بر روی رشد این قارچ می‌باشد. همچنین نتایج تاثیر اسانس گیاه، *Geranium pelargonium*بر روی قارچ *فوزاریوم ورتیسیلیوئیدس* در غلظت‌های ppm ۸۰۰۰ و ۴۰۰۰ دارای مهارکنندگی رشد ۱۰۰٪ گزارش شده است، این در حالی است که در غلظت ppm ۲۰۰۰ میزان مهارکنندگی رشد برابر ۸۱/۹٪ و در غلظت ppm ۱۰۰۰ به میزان ۷۲٪ گزارش شده است[۲۷].

در مطالعه انجام شده در سال ۲۰۱۰ توسط Ertuerk، تاثیر عصاره الکلی ۴۱ گیاه دارویی از جمله زیره سبز بر روی میکروارگانیسم‌های متفاوت مانند *آسپرژیلوس نایجر* و *کاندیدا آلبیکنس* انجام شد، در نتایج این محقق، میزان MIC اسانس زیره سبز بر روی قارچ آسپرژیلوس نایجر mg/ml ۲ و بر روی کاندیدا آلبیکنس mg/ml ۰/۲۵ گزارش شده است و دارای بیشترین تاثیر ممانعت از رشد بر روی این میکروارگانیسم‌ها است[۱۲].

مقایسه نتایج سایر محققین با نتیجه میزان MIC و MFC مطالعه حاضر، نتایج نشان‌دهنده این مطلب می‌باشد، که بین کمترین رقت‌های ممانعت از رشد و رقت‌های کشندگی قارچ فاصله کمی وجود دارد.

همچنین مقایسه بین مدت زمان انکوباسیون ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت میکروپلیت‌ها در انکوباتور و مشاهده عدم اختلاف بین این دو زمان، موید این موضوع می‌تواند باشد که مواد موثره این اسانس در همان ساعت‌های ابتدایی در محیط آزاد و تاثیر خود را برجا گذاشته و افزایش مدت زمان انکوباسیون تاثیری بر روند ضدقارچی بیشتر اسانس ندارد.

در این مطالعه نتایج میکروپلیت‌های MIC هم به صورت چشمی و هم با دستگاه الایزا ریدر قرائت و با مقایسه نتایج این دو روش اختلاف قابل ملاحظه‌ای مشاهده نشد. همچنین مقایسه زمانهای ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت انکوباسیون نشان از مشابه بودن اطلاعات به دست‌آمده در زمان‌های ذکر شده دارد و هیچ اختلاف معنی‌داری بین زمان‌های ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت وجود نداشت ($P\leq ۰/۰۵$).

در این مطالعه در بررسی میکروسکوپی هایف و کنیدی‌های قارچ *فوزاریوم ورتیسیلیوئیدس* که تحت تاثیر اسانس قرار گرفته بود به طور کامل دچار تغییر شکل شده و از حالت سالم که داسی شکل یا موزی شکل بودند خارج شده و به حالت مدور مشاهده شدند.

استفاده از روش‌های بیولوژیک و یا استفاده از مواد طبیعی و یا ترکیبات گیاهان دارویی در کنترل آفات امروزه به دلیل اثبات اثرات جانبی مواد شیمیایی رو به گسترش می‌باشد.

Nayaka و همکاران در سال ۲۰۰۹ در نورنبرگ نتایج گزارشی را منتشر نمودند که بر طبق این گزارش، بر روی بذرهای ذرت، باکتری *پزودوموناس فلورسانس* را اسپری نمودند (به همراه گروه شاهد که این باکتری بر روی بذرهای آنها اسپری نشده بود)، مشخص شد که بذرهایی که اسپری بر روی آنها انجام شده بود در مقایسه با گروه شاهد، نسبت به آلودگی با قارچ

فوزاریوم ورتیسیلیوئیدس و در ادامه تولید فومونیزین مقاومت بیشتری داشته‌اند. این مطالعه نقش مهم، کم هزینه و با اهمیت بیوکنترل را در جلوگیری از آلودگی غلات به قارچ‌های توکسین‌زا به اثبات رسانده است [۹].

به نظر می‌رسد با توجه به نتایج دکتر نایاکا و مقایسه با نتیجه تحقیق این پژوهش و اثبات اثرات ضدقارچی اسانس زیره سبز، استفاده از این نوع ترکیبات با توجه به نتایج و به‌کارگیری آنها در سطح مزارع کوچک واثبات همین تاثیرات در سطح این مزارع در گسترش مبارزه بیولوژیکی اهمیت فوق‌العاده دارد. بکارگیری این نتایج زمانی اهمیت پیدا می‌کند که بیشترین آلودگی در سطح مزارع و سیلوهای نگهداری غلات و موادغذایی مربوط به قارچ‌های مولد توکسین می‌باشد.

پیشنهاد می‌گردد با توجه به خواص تایید شده ضدقارچی اسانس زیره سبز و نوع ترکیبات موثر این گیاه، همچنین پایین بودن اثرات جانبی این نوع ترکیبات در مقایسه با ترکیبات شیمیایی و امکان تعیین غلظت دقیق ضدقارچی اسانس، نسبت به روند تجاری تبدیل این مواد موثره به داروهای ضد قارچی و ضدمیکروبی و همچنین نگهدارنده مواد غذایی اقدام شود.

تشکر و سپاسگزاری

با تشکر از همکاری جناب آقایان: مهندس پناهی، مهندس عابدی و مهندس رئیسوند و کلیه کارشناسان آزمایشگاه دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی واحد علوم وتحقیقات.

فهرست منابع

۱- خسروی، علیرضا، بیماری‌های قارچی وپاسخ‌های ایمنی ۱۳۸۷: دانشگاه تهران.

۲- زرگری، علی، گیاهان داروئی. جلد پنجم. چاپ چهارم. ۱۳۷۰: انتشارات دانشگاه تهران.

۳- ذاکری، م، زینی، ف، داعی، ر، زیبافر، ا، هاشمی، ج، بررسی حساسیت دارویی گونه‌های آسپرژیلوس جدا شده از ضایعات بالینی به برخی داروهای ضد قارچی رایج در شرایط آزمایشگاهی مجله دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۱۳۹۰. ۶۹(۲): ۸۳-۹۱.

4- Aligiannis, N., E. Kalpoutzakis, S. Mitaku, and I.B. Chinou, Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two Origanum species. Journal of agricultural and food chemistry, 2001. 49(9): 4168-4170.

5- Arikan, S., M. Lozano-Chiu, V. Paetznick, S. Nangia, and J.H. Rex, Microdilution Susceptibility Testing of Amphotericin B, Itraconazole, and Voriconazole against Clinical Isolates of Aspergillus and FusariumSpecies. Journal of clinical microbiology, 1999. 37(12): p. 3946-3951.

6- Azeez, S., 11 Cumin. Chemistry of Spices, 2008: 211.

7- Bansod, S. and M. Rai, Antifungal activity of essential oils from Indian medicinal plants against human pathogenic Aspergillus fumigatus and A. niger. World Journal of Medical Sciences, 2008. 3(2): 81-88.

8- Briefings, FRI., M. Ellin Doyle, Ph.D., Food Research Institute, UW-Madison. Fusarium Mycotoxins. December 1997.P: 1-4.

9- Chandra Nayaka, S., A.C. Udaya Shankar, M.S. Reddy, S.R. Niranjana, H.S. Prakash, H.S. Shetty, and C.N. Mortensen, Control of Fusarium verticillioides, cause of ear rot of maize, by Pseudomonas fluorescens. Pest management science, 2009. 65(7): 769-775.

10- Chandra Nayaka, S., A.C.G. Udaya Shankar, S.R. Niranjana, and H.S. Prakash, Molecular detection and characterisation ofFusarium verticillioides in maize (Zea mays. L) grown in southern India. Annals of microbiology, 2008. 58(3): 359-367.

11- Da Silva, V.N., J. de Araujo, E.L. Durigon, and B. Correa, Sequence variability in the

FUM1 gene of Fusarium verticillioides strains. Canadian journal of microbiology, 2007. 53(3): 446-449.
12- Ertuerk, O., Antibacterial and Antifungal Effects of Alcoholic Extracts of 41 Medicinal Plants growing in Turkey. Czech Journal of Food Science. 28(1): 53-60.
13- Espinel-Ingroff, A., et al., Optimal testing conditions for determining MICs and minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for uncommon molds: NCCLS collaborative study. Journal of clinical microbiology, 2002. 40(10): 3776-3781.
14- Fingold, S. and B. Ellenjo, Diagnostic microbiology. Mosby Co. St. Lowis, Toronto, London, 1982: 670-671.
15- Hassan Minooeian Haghighi, M. and A. Khosravi, The Effects of the Herbal Essences on the Two Important Species of Aspergillus. Ofogh-e-Danesh Journal, 2010. 15(4): 5-15.
16- Joffe, A.Z., Fusarium species: their biologyand toxicology1986: John Wiley & Sons.
17- Kalemba, D. and A. Kunicka, Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Current Medicinal Chemistry, 2003. 10(10): 813-829.
18- Karthikeyan, V., R. Rajarajan, S. Patharjan, P. Karthikeyan, P. Saravanakumar, M. Siva, P. Bhavani, and P. Palani, PCR based detection of fumonisin producing strains of Fusarium verticillioides and gene related to toxin production. Current Botany, 2011. 2(3): 34-37.
19- Kavanagh, K., Medical Mycology Cellular and Molecular Techniques. Recherche, 2006. 67: p. 02.
20- Khosravi, A., M. Minooeianhaghighi, H. Shokri, S. Emami, S. Alavi, and J. Asili, The potential inhibitory effect of cuminum cyminum, ziziphora clinopodioides and nigella sativa essential oils on the growth of Aspergillus fumigatus and Aspergillus flavus. Brazilian Journal of Microbiology. 42(1): 216-224.
21- Kim, J.C., Antifungal activity of five plant essential oils as fumigant against postharvest and soilborne plant pathogenic fungi. The Plant Pathology Journal, 2007. 23(2): 97-102.
22- MarÃ-n, P., N. Magan, C. VÃ¡zquez, and M.T. GonzÃ¡lezâ€ JaÃ©n, Differential effect of environmental conditions on the growth and regulation of the fumonisin biosynthetic gene FUM1 in the maize pathogens and fumonisin producers Fusarium verticillioides and Fusarium proliferatum. FEMS microbiology ecology. 73(2): 303-311.
23- Naeini, A., T. Ziglari, H. Shokri, and A. Khosravi, Assessment of growth-inhibiting effect of some plant essential oils on different Fusarium isolates. Journal de Mycologie MÃ©dicale/Journal of Medical Mycology. 20(3): 174-178.
24- O'Donnell, K. and E. Cigelnik, Two Divergent Intragenomic rDNA ITS2 Types within a Monophyletic Lineage of the FungusFusariumAre Nonorthologous. Molecular phylogenetics and evolution, 1997. 7(1): 103-116.
25- Pitt, J.I. and A.D. Hocking, Fungi and food spoilage2009: Springer Verlag.
26- Rahjoo, V., J. Zad, M. Javan-Nikkhah, A. Mirzadi Gohari, S. Okhovvat, M. Bihamta, J. Razzaghian, and S. Klemsdal, Morphological and molecular identification of Fusarium isolated from maize ears in Iran. Journal of Plant Pathology, 2008. 90(3): 463-468.
27- Shokri, H., A. Khosravi, M. Mansouri, and T. Ziglari, Effects of Zataria multiflora and Geranium pelargonium essentialoils on growth-inhibiting of some toxigenic fungi. IRANIAN JOURNAL OF VETERINARY RESEARCH (IJVR).
28- Standards), N.N.C.f.C.L., Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; . Approved

Standard- Second Edition M38-A2, 2008. 28(16).

29- Wildfeuer, A., H. Seidl, I. Paule, and A. Haberreiter, In vitro evaluation of voriconazole against clinical isolates of yeasts, moulds and dermatophytes in comparison with itraconazole, ketoconazole, amphotericin B and griseofulvin. Mycoses, 1998. 41(7-8): 309-319.