Crop Biotech.
Spring (2015) 9: 39-48.

مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال چهارم، شماره نهم، بهار ۱۳۹۴ (۴۸-۳۹)

بررسی فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌های بدست آمده از کالوس و سلول‌های کشت سوسپانسیون زیره سیاه در مقایسه با بذر آن و تاثیر نوع حلال و رقت عصاره بر این فعالیت

سارا خسروی‌نیا[۱]، عبدالرضا باقری[۲*]، سید مهدی زیارت‌نیا[۳]
۱. دانشجوی دکتری گروه بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهی دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۲. استاد گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۳. استادیار گروه بیوتکنولوژی مواد غذایی پژوهشکده علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۱/٦- تاریخ تصویب: ۱۳۹٤/۳/۱۰)

Investigation of antimicrobial activity of extracts obtained from callus and cell suspension culture of *Bunium persicum* compared to seed and effect of solvent and dilution of the extract on the activity

Sara Khosravinia[1], Abdolreza Bagheri[2]*, Seyed Mehdi Ziaratnia[3]
1. Ph. D. Student, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. 2. Professor, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.3. Assistant Professor, Research Insititute of Food and Technology, Mashhad, Iran.
(Received: Jan. 26, 2015 -Accepted: May 31, 2015)

Abstract

Incidence of resistance against antimicrobial drugs has led to the use of medicinal plants for treatment of infections. However, excessive harvesting of medicinal plants has led researchers to investigate the production of antibacterial compounds under in-vitro conditions. In this study, the inhibitory effects of different dilutions of aqueous, ethanol, methanol and ether extracts from callus, cell suspension cultures and seed of black zira were tested on microorganisms *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeroginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Aspergillus parasiticus* and *Candida albicans*. The results showed that although different extracts showed strong antibacterial activity, there is significant difference between various dilutions of extracts. The difference in antibacterial effect of extracts is related to different solubility power of solvents for volatile compounds extraction. Also increasing the concentration of the extracts, increased their inhibitory effect as evidenced by the fact that the greatest inhibitory effect was seen when no dilution of the extract was carried out. Also antimicrobial effects of callus and cell extracts of black zira against microorganisms were higher than seed extracts. Investigation of extract components by TLC showed that the Scopoletin has antimicrobial activity and there is the high amount of it in the cells suspension culture and callus of black zira. Therefore it could be concluded that antimicrobial property of cells and callus extracts, despite low concentration of Cuminaldehyde, could be due to the high amount of Scopoletin. Thus the application of cell culture strategies for production of antibacterial compounds, as Scopoletin, is a favorable technology and such compounds could be suitable replacements for the usual chemical drugs.

Keywords: *Bunium persicum,* Antimicrobial effect, Callus, Cell suspension culture, Scopoletin.

چکیده

مقاومت دارویی میکروارگانیزم‌ها سبب توجه بیشتر به گیاهان دارویی با عوارض جانبی کمتر شده است. اما برداشت بی‌رویه گیاهان دارویی محققان را به فکر گسترش تولید متابولیت‌های ضدمیکروبی در شرایط درون‌شیشه‌ای انداخته است. بنابراین در این تحقیق اثر مهارکنندگی رقت‌های مختلف عصاره‌های آبی، اتانولی، متانولی و اتری حاصل از کالوس، سلول‌های کشت سوسپانسیون و بذر زیره سیاه بر روی میکروارگانیزم‌های *Staphylococcus aureus*، *Bacillus subtilis*، *Pseudomonas aeroginosa*، *Escherichia coli*، *Klebsiella pneumoniae*، *Aspergillus parasiticus* و *Candida albicans* بررسی شد. نتایج نشان داد که عصاره‌های مختلف از خاصیت بازدارندگی بالایی برخور دارند و اثر مقدار رقت عصاره‌ها بر مهار رشد میکروارگانیزم‌ها معنی‌دار است. اما در نوع عصاره و اثر متقابل این دو فاکتور (رقت و نوع عصاره) اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. متفاوت بودن اثر ضدمیکروبی عصاره‌ها به‌خاطر تفاوت در قدرت حلالیت مواد موثره موجود در آنها می‌باشد. با افزایش غلظت عصاره‌ها، اثر بازدارندگی آن‌ها افزایش یافت به‌طوریکه عصاره رقیق نشده بیشترین اثر بازدارندگی را نشان داد. همچنین اثر بازدارندگی عصاره‌های حاصل از سلول و کالوس زیره سیاه بیشتر از عصاره‌های بذری است. نتایج بررسی ترکیبات عصاره‌ها با TLC نیز نشان داد که اسکوپولتین از خاصیت ضدمیکروبی برخودار است و به مقدار فراوان در کالوس و سلول‌های کشت سوسپانسیون زیره سیاه وجود دارد. بنابراین اثرات ضدمیکروبی عصاره‌های حاصل از کالوس و سلول زیره سیاه را می‌توان، علی‌رغم کم بودن مقدار کومین‌آلدهید آن‌ها، به مقدار زیاد اسکوپولتین ارتباط داد. در نهایت استفاده از سیستم‌های کشت سلول گیاهی برای تولید متابولیت‌هایی با خاصیت ضدمیکروبی، از جمله اسکوپولتین، یک فناوری مناسب محسوب شده و می‌تواند جایگزینی مناسب برای داروهای شیمیایی متداول باشد.

واژه‌های کلیدی: *Bunium persicum*، اسکوپولتین، اثر ضدمیکروبی، کالوس، کشت سوسپانسیون سلولی.

مقدمه

* نویسنده مسئول: E-mail: abagheri@um.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

یکی از مهمترین چالش‌های درمانی، مقابله با بیماری‌های عفونی به‌دلیل شیوع و گسترش بالای آنها است. پس از شناسایی پنی‌سیلین در دهه ۴۰ میلادی و گسترش استفاده از آن، هر روزه آنتی‌بیوتیک‌های جدیدی برای درمان عفونت‌ها ارائه شد. نتیجه این امر گسترش استفاده بالینی آنتی‌بیوتیک‌های طبیعی و سنتتیک در درمان عفونت‌ها بود. اما استفاده بی‌رویه از این داروهای ضدمیکروبی منجر به افزایش مقاومت‌های دارویی در اکثر باکتری‌ها شده است. همین موضوع یکی از دلایل استفاده رو به رشد از گیاهان به‌عنوان مواد طبیعی کم خطر، در دسترس و ارزان قیمت، نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سنتتیک، در درمان عفونت‌های میکروبی بوده است (Weinstine, 2001).

زیره سیاه *Bunium persicum* (Boiss.) B. Fedtsch. یکی از گیاهان دارویی مهم است که بذرهای آن دارای ۴ تا ۷٪ اسانس می‌باشد و حاوی ترکیب‌های ارزشمندی نظیر کومین‌آلدئید، گاما-ترپینن، پارا-سیمن، بتا-پینن، آلفا-پینن، میرسن و لیمونن است. اسانس زیره سیاه به‌عنوان طعم‌دهنده در صنایع غذایی کاربرد دارد و از خواص دارویی آن می‌توان به افزایش ترشح شیر، کاهش‌دهنده قند خون، اشتهاآوری، هضم‌کننده، رفع اسپاسم‌های معده و اثرات ضد سرطانی، ضد تشنج و ضد آسم اشاره کرد (Moghtader *et al*., 2009).

گزارش‌های بسیاری در مورد اثرات ضدمیکروبی عصاره‌های حاصل از گیاهان دارویی مختلف وجود دارد. عموماً این عصاره‌ها دارای ترکیب‌های ساپونینی، آلکالوئیدی، ترپنوئیدی، فنلی، اسیدهای چرب و پروتئین هستند (Hassanlo *et al*., 2008). به‌عنوان مثال اثر مهارکنندگی عصاره زیره سیاه و ۵۱ گیاه دیگر بر روی قارچ‌های *Fusarium oxysporum*، *Alternaria mali*، *Botrytis cinerea* و *Verticillium dahlia* مورد مطالعه قرار گرفت و نتایج نشان داد که بیشترین اثر مربوط به عصاره حاصل از زیره سیاه است (Sekine *et al*., 2007). همچنین در مطالعه‌ای دیگر اثر ضدمیکروبی عصاره آبی و الکلی بدست آمده از گیاهان پیاز و زنجبیل بر روی *Staphylococcus aureus*، *Pseudomonas aeroginosa*، *Escherichia coli* و *Candida albicans* نشان داد که عصاره الکلی زنجبیل دارای اثر مهارکنندگی بیشتری بر روی رشد باکتری‌های انتخابی نسبت به پیاز می‌باشد (Momeni and Zamanzad, 2010).

همان‌گونه که مطالعات فوق نشان می‌دهند، برخی از گیاهان دارویی خواص ضدمیکروبی بالایی دارند و می‌توان از آنها در درمان عفونت‌ها استفاده نمود. اما برداشت بی‌رویه گیاهان دارویی از رویشگاه‌های طبیعی جهت استحصال ترکیبات دارویی آنها سبب شده است که برخی از این گیاهان ارزشمند در معرض انقراض قرار گیرند و به‌همین دلیل محصولات دارویی بدست آمده از این گیاهان اغلب خیلی گران هستند (Hassanlo *et al*., 2008).

به‌همین علت در سال‌های اخیر تولید فرآورده‌های ضدمیکروبی از طریق کشت سلول‌های گیاهان دارویی در شرایط *این‌ویترو* به جای استحصال آنها از گیاهان رویشگاه‌های طبیعی، به‌صورت یک رویکرد مهم در تحقیقات کشت سلولی درآمده است (Mewis *et al*., 2011). حتی در بعضی موارد در شرایط کشت سلولی، میزان متابولیت‌های تولید شده توسط سلول‌های کشت بافتی خیلی بیشتر از گیاه کامل است و گاهی این سلول‌ها متابولیت‌هایی تولید می‌کنند که در گیاه اولیه یافت نمی‌شود (Mewis *et al*., 2011).

همچنین تحقیقات متعددی نیز بر روی خواص ضد قارچی، ضد ویروسی و ضد باکتریایی عصاره‌های حاصل از سلول‌های گیاهی کشت شده در شرایط این‌ویترو صورت گرفته است. به‌عنوان مثال اثرات ضد باکتریایی عصاره حاصل از کالوس و سلول‌های کشت سوسپانسیون *Ricinus communis* بررسی و اثبات شده است (Rahman & Bari, 2013). همچنین مطالعه‌ای که توسط Simoes-Gurgel *et al*. (2012) انجام شد، اثرات بازدارنگی عصاره

Archive of SID

www.SID.ir

متانولی کالوس و سلول‌های کشت سوسپانسیون *Cleome rosea* را بر روی ۱۹ باکتری اثبات کرد.

باکتری‌ها و قارچ‌های بیماری‌زای بسیاری وجود دارند ولی *S. aureus*، *Bacillus subtilis*، *P. aeroginosa*، *E. coli*، *Klebsiella pneumoniae*، *Aspergillus parasiticus* و *C. albicans* از مهم‌ترین میکروارگانیزم‌های بیماری‌زای انسان می‌باشند. به‌عنوان مثال *C. albicans* عامل ایجاد عفونت‌های بسیاری از جمله برفک دهان می‌باشد و *B. subtilis* سبب ایجاد اسهال و یا اختلالات معدی-روده‌ای می‌گردد (Moosavian *et al*., 2010). به‌همین علت اکثر مطالعات برای بررسی اثرات ضدمیکروبی عصاره‌های مختلف بر روی آنها انجام شده است (Grover *et al*., 2011; Bendahou *et al*., 2008).

بنابراین با توجه به مصارف دارویی فراوان زیره سیاه و به خصوص اثرات ضدمیکروبی آن که در تحقیقات بسیاری به آن اشاره شده است (Moghtader *et al*., 2009; Sekine *et al*., 2007) و با توجه به اهمیت کشت سلولی در تولید ترکیبات دارویی، در این تحقیق برای اولین بار اثر ضدمیکروبی عصاره‌های آبی، اتانولی، متانولی و اتری حاصل از کالوس و سلول‌های کشت سوسپانسیون زیره سیاه بر روی میکروارگانیزم‌های بیماری‌زای *Staphylococcus aureus*، *Bacillus subtilis*، *Pseudomonas aeroginosa*، *Escherichia coli*، *Klebsiella pneumoniae*، *Aspergillus parasiticus* و *Candida albicans* بررسی شد.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد مصرفی

کلیه حلال‌های شیمیایی، محیط‌های کشت، هورمون NAA و صفحات TLC از شرکت Merck تهیه شد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیک و دیسک‌های استریل نیز از شرکت پادتن طب و هورمون BA از شرکت Sigma خریداری شد.

استقرار کشت سوسپانسیون سلولی

بذر استفاده شده در این پژوهش، توده زراعی شده‌ای است که از مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد در خرداد ماه ۱۳۹۱ تهیه شد. به‌منظور القای کالوس، قطعات بذرهای جوانه‌زده زیره سیاه در محیط کشت MS جامد حاوی NAA (۲ mg/L) و BA (۰/۵ mg/L) کشت شدند. برای استقرار کشت سوسپانسیون سلولی نیز در حدود ۳۰۰–۲۰۰ میلی‌گرم از کالوس‌های شفاف و با رشد مناسب به محیط کشت MS مایع دارای همان ترکیب هورمونی منتقل و بر روی شیکری با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه نگهداری شدند. نمونه‌ها در شرایط تاریکی دائم و دمای ۱ ± ۲۵ سانتی‌گراد قرار گرفتند (Khosravinia *et al*., 2012a).

عصاره‌گیری از بذر، کالوس و سلول‌ها

به‌منظور عصاره‌گیری، ابتدا ۱۰۰ گرم از بذر، سلول و یا کالوس زیره سیاه پودر شده به‌طور مجزا با ۱۵۰ میلی‌لیتر از حلال‌های اتانول، آب، متانول و پترولیوم اتر مخلوط و پس از ۷۲ ساعت نگهداری در یخچال، صاف شدند (Grover *et al*., 2011). عصاره‌های صاف شده، با دستگاه روتاری کاملاً خشک شدند و پس از تعیین وزن خشک عصاره‌ها، ۱۰ میلی‌لیتر از حلال‌های اتانول، آب، متانول و پترولیوم اتر به‌طور مجزا به هر یک از آن‌ها افزوده و کاملا مخلوط شد. سپس هر یک از ۱۰ میلی‌لیتر عصاره بدست آمده با نسبت‌های ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰٪ رقیق شدند و در نهایت کلیه نمونه‌ها با عبور از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر استریل شدند.

بررسی اثر ضدمیکروبی نمونه‌ها

باکتری‌های گرم مثبت *S. aureus* (PTCC ۱۷۶۴) و *B. subtilis* (PTCC ۱۰۲۳)، باکتری گرم منفی

Archive of SID

www.SID.ir

E. coli (PTCC ۱۳۳۰)، قارچ *A. parasiticus* (PTCC ۵۲۸۶) و مخمر *C. albicans* (PTCC ۵۰۲۷) از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شدند. باکتری‌های گرم منفی *P. aeroginosa* و *K. pneumoniae* نیز از آزمایشگاه بیمارستان امام رضا (ع) مشهد بدست آمدند. از باکتری‌های کشت داده شده به‌مدت ۲۴ ساعت بر روی محیط کشت Mueller Hinton Broth در دمای ۳۷ سانتی‌گراد، سوسپانسیونی با کدورت معادل استاندارد ۰/۵ McFarland (10^8 cfu/mL) از باکتری‌ها تهیه و سپس ۱۰۰۰ میکرولیتر از آن به‌طور یکنواخت بر روی محیط کشت Mueller Hinton Agar پخش شد (Moghtader *et al*., 2009).

A. parasiticus نیز به‌مدت ۷ روز بر روی محیط کشت Potato Dextrose Agar و دمای ۲۸ سانتی‌گراد کشت و سپس با آب مقطر سوسپانسیونی از اسپورهای قارچ تهیه شد. غلظت آنها با استفاده از هموسایتومتر در تعداد 10^6 cfu/mL از اسپورهای قارچ تنظیم و ۰/۱ میکرولیتر از آن بر روی محیط کشت Potato Dextrose Agar پخش شد (Bendahou *et al*., 2008). برای اندازه‌گیری اثر ضد مخمری نمونه‌ها، *C. albicans* به‌مدت ۱ روز در محیط کشت Sabouraud Dextrose Broth و دمای ۳۰ سانتی‌گراد کشت داده شد. سپس سوسپانسیونی با کدورت معادل استاندارد McFarland ۰/۵ (10^8 cfu/mL) از کلنی‌های مخمر تهیه و ۱۰۰۰ میکرولیتر از آن بر روی محیط کشت Sabouraud Dextrose Agarپخش شد (Yoga-Latha *et al*., 2011). برای مقایسه فعالیت ضد باکتریایی و ضد قارچی نمونه‌ها از آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین (۱۰µg/disk)، تتراسایکلین (۳۰ µg/disk)، اریترومایسین (۱۵ µg/disk) (Menghani *et al*., 2011)، نیستاتین (۳۰ µg/disk) و Amphotericin B (۱۰ µg/mL) (Hajlaoui *et al*., 2010) به‌عنوان شاهدهای مثبت و از حلال‌ها بعنوان شاهد منفی استفاده شد. روش دیسک نیز برای بررسی اثر ضدمیکروبی نمونه‌ها استفاده شد و ۵۰ میکرولیتر از آنها بر روی دیسک‌های استریل ریخته شد.

بررسی ترکیبات عصاره‌های مختلف با استفاده از TLC

نمونه‌هایی از عصاره‌های حاصل بر روی ورقه‌های TLC قرار داده شد و به‌منظور جداسازی مواد از دو حلال دی‌کلرومتان و متانول با نسبت ۹ به ۱ به‌عنوان فاز متحرک استفاده شد و در نهایت، مشاهده باندهای مختلف در طول موج ۳۶۵ نانومتر انجام گردید. پس از مشاهده اسکوپولتین در عصاره‌ها، برای جداسازی آن از ستون کروماتوگرافی (حاوی سیلیکا ژل) و همچنین ورقه‌های TLC استفاده شد (Khosravinia *et al*., 2012b).

تجزیه آماری

در این مطالعه اثر بازدارندگی ۴ عصاره آبی، اتانولی، متانولی و اتری حاصل از بذر، سلول‌های کشت سوسپانسیون و کالوس زیره سیاه در ۵ رقت متفاوت بر روی ۷ میکروارگانیزم بیماری‌زا با سه تکرار بررسی شد. نتایج به‌صورت میانگین قطر هاله با آزمایش فاکتوریل (دو فاکتور نوع عصاره و میزان رقت به ترتیب با ۴ و ۵ سطح) بر پایه طرح کاملاً تصادفی با نرم افزار آماری SAS تجزیه شد (فاکتورهای نوع میکروارگانیزم و نوع مواد گیاهی مستقل و جداگانه در نظر گرفته شد). مقایسه میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ انجام گرفت.

نتایج و بحث

در این تحقیق خاصیت ضدمیکروبی رقت‌های مختلف عصاره‌های آبی، اتانولی، متانولی و اتری حاصل از بذر،

Archive of SID

www.SID.ir

سلول‌های کشت سوسپانسیون و کالوس زیره سیاه بر روی باکتری‌ها و قارچ‌های بیماری‌زای *S. aureus*، *B. subtilis*، *P. aeroginosa*، *E. coli* *K. pneumoniae* و *A. parasiticus* *C. albicans* با استفاده از روش Disk diffusion مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج، بیانگر اثر بازدارندگی قابل توجه نمونه‌ها بر رشد میکروارگانیزم‌ها بود که به‌صورت هاله عدم رشد نمایان شد. از نظر تئوری، قطر هاله که نشان‌دهنده عدم رشد میکروب‌ها می‌باشد، عکس العملی از غلظت ماده موثره موجود در گیاه است که با اندازه‌گیری و مقایسه آن با استاندارد مشخص، قدرت ضد میکروبی ماده مورد آزمایش تعیین می‌شود (Neef *et al*., 1995). نتایج تجزیه واریانس نوع و رقت عصاره‌های حاصل از بذر، سلول‌های کشت سوسپانسیون و کالوس زیره سیاه نشان داد که اثر بازدارندگی مقدار رقت عصاره‌ها بر رشد باکتری‌ها و قارچ‌های مورد آزمایش اختلاف بسیار معنی‌داری را نشان داد ($p<۰/۰۱$)، در حالی‌که نوع عصاره و اثر متقابل این دو فاکتور بر مهار رشد میکروارگانیزم‌ها معنی‌دار نبود. این نتایج به معنی این است که دو فاکتور نوع و رقت عصاره به‌صورت مستقل از یکدیگر عمل کرده‌اند (جدول‌های ۱، ۲ و ۳). همچنین جدول ۴ مقایسه میانگین اثر نوع عصاره‌های حاصل از بذر، سلول‌های کشت سوسپانسیون و کالوس زیره سیاه بر مهار رشد میکروارگانیزم‌های انتخابی را نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که اگر چه اثر بازدارندگی عصاره آبی غالباً بیشتر از عصاره‌های اتانولی، متانولی و اتری بود، ولی نوع عصاره اختلاف معنی‌داری را در سطح ۵٪ نشان نداد ($p>۰/۰۵$). متفاوت بودن اثر ضدمیکروبی عصاره‌ها بخاطر تفاوت در قدرت حلالیت مواد موثره موجود در آنها می‌باشد (Amiri, 2007). در گزارش Grover *et al*. (2011)، اثر مهارکنندگی عصاره متانولی *Azadirachta indica* بیشتر از عصاره‌های آبی، اتانولی و اتری بود. همچنین Amiri (2007) نشان داد که اثر بازدارندگی عصاره اتانولی *Allium jesdianum* بر روی تعدادی باکتری بیماری‌زا بیشتر از عصاره آبی است.

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس اثر نوع و رقت عصاره حاصل از بذر زیره سیاه بر بازدارنگی رشد میکروارگانیزم‌های مختلف

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات						
		E.coli	*P.aeroginosa*	*K. pneumonia*	*B. subtilis*	*S. aureus*	*C. albicans*	*A. parasiticus*
عصاره (A)	۳	0.19^{ns}	0.08^{ns}	0.13^{ns}	0.19^{ns}	0.14^{ns}	0.04^{ns}	0.18^{ns}
رقت (B)	۴	1.39^{**}	1.65^{**}	1.64^{**}	1.81^{**}	2.92^{**}	2.25^{**}	3.18^{**}
A×B	۱۲	0.03^{ns}	0.01^{ns}	0.03^{ns}	0.02^{ns}	0.02^{ns}	0.03^{ns}	0.03^{ns}
خطای آزمایش	۴۰	0.02	0.03	0.03	0.03	0.04	0.02	0.03

** دارای تفاوت معنی‌دار در سطح $\alpha=0.01$، ns عدم معنی‌داری

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس اثر نوع و رقت عصاره حاصل از سلول‌های کشت سوسپانسیون زیره سیاه بر بازدارنگی رشد میکروارگانیزم‌های مختلف

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات						
		E.coli	*P.aeroginosa*	*K. pneumonia*	*B. subtilis*	*S. aureus*	*C. albicans*	*A. parasiticus*
عصاره (A)	۳	0.04^{ns}	0.04^{ns}	0.01^{ns}	0.16^{ns}	0.55^{ns}	0.10^{ns}	0.10^{ns}
رقت (B)	۴	1.53^{**}	2.30^{**}	1.66^{**}	2.58^{**}	7.35^{**}	3.54^{**}	3.91^{**}
A×B	۱۲	0.02^{ns}	0.02^{ns}	0.02^{ns}	0.05^{ns}	0.06^{ns}	0.04^{ns}	0.66^{ns}
خطای آزمایش	۴۰	0.02	0.04	0.02	0.04	0.05	0.04	0.04

** دارای تفاوت معنی‌دار در سطح $\alpha=0.01$، ns عدم معنی‌داری

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس اثر نوع و رقت عصاره کالوس زیره سیاه بر بازدارنگی رشد میکروارگانیزم‌های مختلف

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات							
		E.coli	*P.aeroginosa*	*K. pneumonia*	*B. subtilis*	*S. aureus*	*C. albicans*	*A. parasiticus*
عصاره (A)	۳	0.01^{ns}	0.04^{ns}	0.01^{ns}	0.04^{ns}	0.37^{ns}	0.01^{ns}	0.04^{ns}
رقت (B)	۴	1.21^{**}	2.10^{**}	1.52^{**}	2.55^{**}	6.56^{**}	3.55^{**}	3.28^{**}
A×B	۱۲	0.02^{ns}	0.01^{ns}	0.01^{ns}	0.02^{ns}	0.05^{ns}	0.03^{ns}	0.03^{ns}
خطای آزمایش	۴۰	0.02	0.03	0.03	0.02	0.05	0.03	0.05

** دارای تفاوت معنی‌دار در سطح α=0.01، ns عدم معنی‌داری.

جدول ۴- مقایسه میانگین اثر نوع عصاره حاصل از بذر، سلول‌های کشت سوسپانسیون و کالوس زیره سیاه بر بازدارندگی رشد میکروارگانیزم‌های مختلف

نوع عصاره	*E.coli*	*P.aeroginosa*	*K. pneumonia*	*B. subtilis*	*S. aureus*	*C. albicans*	*A. parasiticus*
بذر زیره سیاه							
آبی	0.52 b	0.66 b	0.50 ab	0.64 b	0.84 b	0.44 b	0.72 ab
اتانولی	0.42 b	0.58 b	0.34 b	0.48 b	0.78 b	0.32 b	0.52 b
متانولی	0.30 b	0.54 b	0.30 b	0.38 b	0.66 b	0.36 b	0.50 b
اتری	0.28 b	0.48 b	0.30 b	0.42 b	0.64 b	0.34 b	0.48 b
شاهد	1.86 a	1.05 a	0.90 a	2.20 a	2.30 a	1.75 a	1.40 a
سلول‌های کشت سوسپانسیون زیره سیاه							
آبی	0.52 b	0.60 b	0.50 a	0.72 b	1.32 b	0.68 b	0.66 b
اتانولی	0.50 b	0.64 b	0.52 a	0.72 b	1.28 b	0.68 b	0.86 ab
متانولی	0.44 b	0.52 b	0.52 a	0.54 b	1.11 b	0.54 b	0.74 ab
اتری	0.40 b	0.60 b	0.56 a	0.54 b	0.90 b	0.54 b	0.72 ab
شاهد	1.86 a	1.00 a	0.90 a	2.26 a	2.20 a	1.80 a	1.40 a
کالوس زیره سیاه							
آبی	0.42 b	0.56 b	0.46 b	0.66 b	1.24 b	0.58 b	0.64 b
اتانولی	0.46 b	0.44 b	0.48 b	0.64 b	1.06 b	0.61 b	0.72 ab
متانولی	0.40 b	0.52 b	0.52 ab	0.58 b	0.92 b	0.54 b	0.75 ab
اتری	0.40 b	0.52 b	0.50 ab	0.54 b	0.90 b	0.58 b	0.66 b
شاهد	1.86 a	1.00 a	0.90 a	2.26 a	2.20 a	1.80 a	1.40 a

میانگین‌های دارای حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری نیستند (P>۰/۰۵).

شاهدهای مثبت برای باکتری‌ها: Tetracycline (۳۰ µg/disk)، Erythromycin (۱۵ µg/disk) و Gentamicin (۱۰ µg/disk)

شاهدهای مثبت برای قارچ‌ها: Nystatin (۳۰ µg/disk) و Amphotericin B (۱۰ µg/mL)

همچنین اثر مهارکنندگی عصاره‌های مختلف حاصل از بذر، سلول و کالوس زیره سیاه بر روی *E. coli*، *B. subtilis*، *P. aeroginosa*، *S. aureus* و *C.albicans* کمتر از شاهدهای‌مثبت بود (p<۰/۰۵). در مورد *K. pneumoniae* و *A. parasiticus* نتایج متفاوتی مشاهده شد، به‌طوری که اثر بازدارندگی بعضی از عصاره‌ها بر روی آن‌ها، اختلاف معنی‌داری (p>۰/۰۵) را نسبت به شاهدهای مثبت نشان نداد (Momeni and Zamanzad, 2010). در مطالعه Rahman and Bari (2013) نیز اثر ضد باکتریایی

Archive of SID

www.SID.ir

عصاره حاصل از کشت سلولی *R. communis* L. بر روی *P. aeroginosa* و *S. aureus* کمتر از شاهد مثبت Ciprofloxacin با غلظت µg/disk ۵ بود.

مقایسه میانگین اثر رقت‌های مختلف عصاره‌های بذر، سلول‌های کشت سوسپانسیون و کالوس زیره سیاه بر مهار رشد میکروارگانیزم‌ها در جدول ۵ آورده شده است. همان‌طور که نتایج نشان می‌دهد، اثر بازدارندگی عصاره‌ها با افزایش غلظت، افزایش یافت. به‌طوری که غلظت ۱۰۰٪ بیشترین اثر بازدارندگی را نشان داد و نسبت به رقت‌های ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰٪ اختلاف معنی‌داری را در سطح ۵٪ نشان داد ($p<۰/۰۵$). اثر بازدارندگی غلظت ۱۰۰٪ عصاره‌ها بر روی *K.pneumoniae*، *A.parasiticus* و *P.aeroginosa* اختلاف معنی‌داری با نمونه‌های شاهد نداشت ($p>۰/۰۵$)، در حالی‌که اثر مهارکنندگی شاهد بر روی *E. coli*، *B. subtilis* و *C. albicans* بیشتر از اثر غلظت‌های مختلف عصاره‌ها بود و اختلاف معنی‌داری را در سطح ۵٪ نشان داد ($p<۰/۰۵$). همچنین در مورد *S. aureus*، اثر بازدارندگی غلظت ۱۰۰٪ عصاره‌های حاصل از سلول اختلاف معنی‌داری با نمونه‌های شاهد نداشت ($P>۰/۰۵$) ولی در مورد عصاره‌های حاصل از کالوس و بذر کمتر از شاهدهای مثبت بود و این اختلاف در سطح ۵٪ معنی‌دار گردید (Moosavian *et al*., 2010).

جدول ۵- مقایسه میانگین اثر رقت‌های مختلف (٪) عصاره‌های حاصل از بذر، سلول‌های کشت سوسپانسیون و کالوس زیره سیاه بر بازدارندگی رشد میکروارگانیزم‌های مختلف

مقدار رقت	*E.coli*	*P.aeroginosa*	*K. pneumonia*	*B. subtilis*	*S. aureus*	*C. albicans*	*A. parasiticus*
بذر زیره سیاه							
۲۰	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 e	0.00 e	0.00 d
۴۰	0.07 d	0.47 c	0.00 d	0.20 d	0.47 d	0.00 e	0.12 d
۶۰	0.42 c	0.60 bc	0.35 c	0.50 c	0.90 c	0.25 d	0.52 c
۸۰	0.60 c	0.75 b	0.62 b	0.75 bc	1.05 bc	0.55 c	0.90 b
۱۰۰	0.80 b	1.00 a	0.82 ab	0.95 b	1.22 b	1.02 b	1.22 a
شاهد	1.83 a	1.05 a	0.90 a	2.20 a	2.30 a	1.75 a	1.40 a
سلول‌های کشت سوسپانسیون زیره سیاه							
۲۰	0.00 e	0.00 d	0.00 e	0.00 e	0.00 d	0.00 d	0.00 d
۴۰	0.25 d	0.35 c	0.32 d	0.42 d	0.80 c	0.10 d	0.45 c
۶۰	0.50 c	0.65 b	0.60 c	0.65 cd	1.34 b	0.70 c	0.70 c
۸۰	0.65 c	0.80 b	0.75 bc	0.82 c	1.60 b	1.05 b	1.10 b
۱۰۰	0.92 b	1.15 a	0.95 a	1.25 b	2.02 a	1.20 b	1.47 a
شاهد	1.86 a	1.00 a	0.90 ab	2.26 a	2.20 a	1.80 a	1.40 ab
کالوس زیره سیاه							
۲۰	0.00 e	0.00 e	0.00 d	0.00 e	0.00 f	0.00 d	0.00 d
۴۰	0.22 d	0.27 d	0.32 c	0.37 d	0.60 e	0.10 d	0.40 c
۶۰	0.47 c	0.47 c	0.52 b	0.60 cd	1.20 d	0.54 c	0.71 b
۸۰	0.57 c	0.70 b	0.65 b	0.82 c	1.47 c	1.02 b	1.00 b
۱۰۰	0.82 b	1.10 a	0.95 a	1.22 b	1.87 b	1.22 b	1.35 a
شاهد	1.86 a	1.00 a	0.90 a	2.26 a	2.20 a	1.80 a	1.40 a

میانگین‌های دارای حروف مشابه دارای اختلاف معنی‌داری نیستند ($P>۰/۰۵$).

شاهدهای مثبت برای باکتری‌ها: Tetracycline (۳۰ µg/disk)، Erythromycin (۱۵ µg/disk) و Gentamicin (۱۰ µg/disk)

شاهدهای مثبت برای قارچ‌ها: Nystatin (۳۰ µg/disk) و Amphotericin B (۱۰ µg/mL)

Archive of SID

www.SID.ir

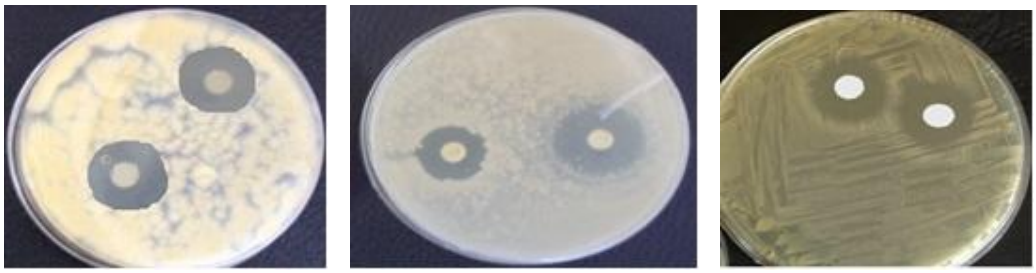
در مجموع با مقایسه میانگین‌های اثر ضد باکتریایی رقت‌ها و عصاره‌های مختلف حاصل از بذر، سلول و کالوس زیره سیاه می‌توان متوجه شد که اثر مهارکنندگی بر باکتری گرم مثبت *S. aureus* بیشتر از باکتری‌های گرم منفی است. مقاومت بالاتر باکتری‌های گرم منفی را می‌توان به حضور غشای فسفولیپیدی خارجی تقریباً غیر قابل نفوذ به ترکیبات چربی دوست نسبت داد (Amiri, 2007). همچنین بیشترین اثر بازدارندگی بر روی میکروارگانیزم‌های انتخابی مربوط به عصاره‌های سلولی و کمترین آن متعلق به عصاره‌های مختلف حاصل از بذر زیره سیاه است. نتایج گزارشی بر روی زعفران نشان داد که اثر ضد باکتریایی عصاره حاصل از سلول‌های کشت سوسپانسیون زعفران نسبت به عصاره حاصل از پیازهای آن بیشتر است (Takashi and Takeshi, 1991). پس از تایید اثرات ضدمیکروبی عصاره‌ها، ترکیبات آنها با TLC بررسی شد. نتایج بررسی صفحات TLC نشان داد که در همه عصاره‌های حاصل از کالوس و سلول‌های کشت سوسپانسیون زیره سیاه، مقادیر فراوانی اسکوپولتین وجود دارد در حالی که این ترکیب فلئورسنس در بذر مشاهده نشد (شکل ۱). این ترکیب یکی از مشتقات کومارین است که فرمول مولکولی آن $C_9H_5O_4Me$ می‌باشد و در شناسایی یون‌های فلزات سنگین در خاک، شناسایی آمین‌ها، آمینواسیدها، آنیون‌ها و آنزیم در ترکیبات آلی، شناسایی تومورهای سرطانی بدن، شناسایی جواهرات، سنگ‌های قیمتی و برخی مواد معدنی و همچنین در انگشت‌نگاری و تکنیک FISH کاربرد دارد (Li *et al*., 2012).

شکل ۱- مقایسه اسکوپولتین در زیر نور UV با طول موج ۳۶۵ nm در عصاره‌های آبی، اتانولی، متانولی و اتری حاصل از کشت سلولی (الف)، کالوس (ب) و بذر (ج) زیره سیاه

پس از جداسازی و خالص‌سازی اسکوپولتین از سلول‌های کشت سوسپانسیون (Khosravinia *et al.*, 2012b)، اثرات ضدمیکروبی آن بر *B. subtilis*، *P. aeroginosa* و *A. parasiticus* به‌عنوان نماینده‌ای از باکتری‌های گرم مثبت، گرم منفی و قارچ‌ها آزمایش شد. نتایج نشان داد که اسکوپولتین دارای اثر بازدارندگی زیادی بر رشد این میکروارگانیسم‌ها می‌باشد (شکل ۲).

Archive of SID

www.SID.ir



(ج) (ب) (الف)

شکل ۲- اثر بازدارنده اسکوپولتین بر رشد *B. subtilis* (الف)، *P. aeroginosa* (ب) و *A. parasiticus* (ج)

طبق گزارش Sekine *et al.* (2007)، اثر ضدمیکروبی عصاره حاصل از بذر زیره سیاه مربوط به کومین آلدهید آن می‌باشد، اما مقدار کومین آلدهید موجود در عصاره کالوس و سلول‌های کشت سوسپانسیون زیره سیاه بسیار پایین است (Khosravinia *et al.*, 2012a). بنابراین با توجه به شکل ۱ و ۲ می‌توان نتیجه‌گیری کرد که اثرات ضدمیکروبی عصاره حاصل از کالوس و سلول‌های کشت سوسپانسیون زیره سیاه می‌تواند به مقدار زیاد ترکیب اسکوپولتین موجود در آنها ارتباط داده شود. لذا با خالص‌سازی و بررسی اثرات فارماکولوژیکی اسکوپولتین، می‌توان گام موثری در جهت عرضه فرآورده‌های دارویی با منشاء گیاهی که دارای خاصیت ضد میکروبی هستند، برداشت.

علاوه بر این با توجه به نتایج، این تحقیق می‌تواند زمینه بسیار مناسبی برای تولید انبوه ترکیبات ضدمیکروبی از طریق کشت کالوس و کشت‌های سلولی در بیوراکتورها باشد.

سپاسگزاری

اعتبار این طرح از محل تحقیقاتی معاونت پژوهشی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد به شماره ۲/۲۵۳۲۵ تامین شده است، که بدین وسیله تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

Amiri H (2007) Antibacterial activity of essential oil and different extracs from *Smyrnium cordifolium* (Boiss) J. Pharm. Sci. Tabriz Univ. Med. Sci. 1: 15-19.

Bendahou M, Muselli A, Grignon-Dubois M, Benyoucef M, Desjobert JM, Bernardini A, Costa J (2008) Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. Essential oil and extract obtained by microwave extraction: Comparison with hydrodistillation. J. Food Chem. 106: 132-139.

Grover A, Bhandari BS, Rai N (2011) Antimicrobial activity of medicinal plants-*Azadirachta indica*, *Allium cepa* and *Aloe vera.* J. Pharm. Technol. Res. 3: 59-65.

Hajlaoui H, Mighri H, Noumi E, Snoussi N, Ksouri R, Bakhrou A (2010) Chemical composition and biological activities of Tunisian *Cuminum cyminum* essential oil: A high effectiveness against *Vibrio* spp. Food & Chem. Toxicol. 48: 86-92.

Hassanlo T, Rezazadeh SH, Rahnama H (2008) Hairy roots resource for production of compounds with medicinal value. J. Med. Arom. Plants 29: 1-17.

Khosravinia S, Ziaratnia SM, Bagheri A, Rajabzadeh G, Marashi SH (2012a) Comparison of Cuminaldehyde contents from cell suspension cultures and seeds of [*Bunium persicum* (Boiss.) B. Fedtsch.]. Not. Sci. Biol. 4: 49-54.

Archive of SID

www.SID.ir

Khosravinia S, Ziaratnia SM, Bagheri A, Marashi SH (2012b) Isolation and identification of Scopoletin from cell suspension cultures of black zira (*Bunium persicum*). Crop Biotech. 2: 49-56.

Li H, Cai L, Chen Z (2012) Coumarin-derived fluorescent chemosensors. In: Wang W (ed) Advances in Chemical Sensors, 1rd Ed. Wiley, New York. pp 121-150.

Menghani E, Pareek A, Negi RS, Ojha C (2011) Search for antimicrobial potentials from certain Indian medicinal plants. Res. J. Med. Plant. 5: 295-301.

Mewis I, Smetanska IM, Muller CT, Ulrichs C (2011) Specific poly-phenolic compounds in cell culture of *Vitis vinifera* L. cv. Gamay Freaux. Appl. Biochem. Biotech. 2: 148-161.

Moghtader M, Iraj Mansori A, Salari H, Farahmand A (2009) Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Bunium persicum* (Boiss.) seed. J. Med. & Arom. Plants. 25: 20-28.

Momeni L, Zamanzad B (2010) The antibacterial properties of *Allium cepa* (onion) and *Zingiber officinale* (ginger) extracts on *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Candida albicans* isolated from vaginal specimens. J. Shahrekord Uni. Med. Sci. 11: 81-87.

Moosavian M, Siahpoosh A, Abbasi E, Darabi Far H (2010) The effects of hydro-ethanolic *Albizzia lebbeck* extract on enteric gram-negative and aerobic gram-positive bacilli. Arak Med. Uni. J. 13: 119-126

Neef H, Declercq P, Laekeman G (1995) Hypoglycaemic activity of selected European plants. Phytother. Res. J. 9: 45-48.

Rahman MA, Bari MA(2013) Antibacterial activity of cell suspension cultures of Castor (*Ricinus communis* L. cv. Roktima). Eur. J. Med. Plants. 3: 65-77.

Sekine T, Sugan O, Azizi M, Fujii Y (2007) Antifungal effect of volatile compounds from *Buninum persicum* and other species. J. Chem. Ecol. 33: 23-32.

Simoes-Gurgel CAS, Rocha LS, Cordeiro CRM, Gayer TC, Castro MGP, Coelho N, Albarello E, Mansur AC, Rosa P (2012) Antibacterial activity of field-grown plants, in vitro propagated plants, callus and cell suspension cultures of *Cleome rosea.* Pharm. Res. 5: 4-8.

Takashi I, Takeshi O (1991) High yield production of Anthraquinone by cell suspension culture of *Crocus sativus* (L.) Plant Biotechnol J. 8: 171-174.

Weinstine RA (2001) Controlling antimicrobial resistance in hospitals: Infection control and use of antibiotics. Emerg. Infect. Dis. 7: 188-192.

Yoga-Latha L, Darah I, Jain K, Sasidharan S (2011) Effects of *Vernonia cinerea* Less methanol extract on growth and morphogenesis of *Candida albicans.* Eur. Rev. for Med. and Pharmacol Sci. 15: 543-549.

Archive of SID

www.SID.ir