تأثیر نانوکیتوزان حاوی اسانس‌های گیاه درمنه و مرزه روی گونه‌های آسپرژیلوس جدا شده از پودر ماهی تولیدی کارخانجات استان مازندران

مهسا عنایتی[1*]، منصور بیات[2]، افشین محسنی‌فر[3]

چکیده

پودر ماهی یک ماده مغذی و سرشار از ویتامین‌ها، مواد معدنی و پروتئین‌های قابل هضم است. حضور انواع قارچ‌های مولد مایکوتوکسین علاوه بر کاهش تولید محصولات کشاورزی خسارت‌های جبران ناپذیری را بر سلامت و بهداشت جامعه وارد می‌کند. در پژوهش حاضر اثر مهاری نانواسانس‌های گیاه درمنه و مرزه بر روی گونه‌های آسپرژیلویس جدا شده از پودر ماهی کارخانجات تولیدی استان مازندران با استفاده از تکنیک ریز رقت بررسی شد. کیتوزان ترکیب غیر سمی، طبیعی و قابل تجزیه بوده که از کیتین مشتق شده است. کیتوزان دارای خاصیت ضدمیکروبی قوی بر علیه طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها از جمله قارچ‌ها، باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی می‌باشد. این تحقیق بر روی ۸۹ نمونه پودر ماهی از ١٤ کارخانه استان مازندران به منظور جداسازی و شناسایی آسپرژیلوس‌های موجود در پودر ماهی انجام گردید. بعد از کشت بر روی محیط سابورو دکستروز آگار و گرمخانه گذاری و در نهایت بررسی هریک از پرگنه ها و مشاهده در زیر میکروسکوپ آسپرژیلوس‌های موجود خالص سازی گردید. بیشترین و کمترین تعداد مربوط به آسپرژیلوس فومیگاتوس و آسپرژیلوس نیدولانس بوده است. سپس برای انجام آزمون MIC وMFC از کشت در محیط RPMI1640 2% در میکرو پلیت استفاده شد. نتایج آزمون MIC نشان داد که نانواسانس مرزه اثر بهتری نسبت به نانواسانس درمنه دارد.

کلید واژگان: *پودر ماهی، آسپرژیلوس، نانو اسانس، درمنه، مرزه*

تاریخ دریافت: ۹۲/۶/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۲/۸/۱۲

مقدمه

اهمیت پودر ماهی بعنوان یک ماده خوراکی جهت تأمین قسمتی از پروتئین جیره حیوانی دام، طیور و آبزیان از دیرباز مورد توجه‌بوده است. قارچ‌های آسپرژیلوس، پنی سیلیوم و فوزاریوم از عمده ترین قارچ‌هایی هستند که سم موجود در آنها در کاهش کیفیت و انتقال بیماری در حیواناتی که از این فرآورده استفاده می‌کنند، سهم عمده‌ای دارد. کپک‌ها بر روی مواد آلی مانند غلات در حال رشد و غذاهای انباری قادر به رشد بوده که به دلیل تولید متابولیت‌های ثانویه و ایجاد خطر برای انسان و دام، حائز اهمیت می‌باشند(۵ و٤). تاکنون بیش از ۳۰۰ مایکوتوکسین شناسایی شده که حدود ۲۰ نوع از این مایکوتوکسین‌ها در محصولات غذایی انسان و خوراک دام به فراوانی یافت می‌شوند(۱۵). در شرایط محیطی گرما، رطوبت، آسیب حشرات و هرگونه استرس به گیاه یا محصول کشاورزی، میزان تولید مایکوتوکسین‌ها در آن‌ها افزایش می‌یابد (۱۰). حضور مایکوتوکسین‌ها با غلظت‌های بالا در محصولات کشاورزی علاوه بر کاهش تولید محصولات کشاورزی، در صورت مصرف آن‌ها در تغذیه انسان و دام موجب خسارت-های جبران ناپذیری بر سلامت و بهداشت جامعه می‌شوند (۱۷). کیتین با نام شیمیایی β–D(1-4)N-acetyl-glucosamine است که پس از داستیله شدن بنام کیتوزان با نام علمی (1- D– β4)-2-amino-2-deoxy-α-glucan تبدیل می‌شود کیتوزان به عنوان بیوپلیمری با کاربرد وسیع در صنایع غذایی شناخته شده است و فراوان‌ترین پلیمر طبیعی پس از سلولز است(۱). گیاه درمانی در کشورهای غربی از اوایل قرون وسطی شروع به پیشرفت کرد و از قرن نوزدهم کوشش همه جانبه‌ای جهت استخراج مواد موثره از گیاهان دارویی آغاز شد و تاکنون نیز این تلاش و کوشش ادامه دارد. امروزه در اکثر کشورهای جهان به گیاه درمانی توجه زیادی می‌شود و پژوهشگران متعددی در این رشته مشغول به فعالیت می‌باشند(۲). مهم ترین ماده موثره هر گیاه اسانس‌آن است. درصد اسانس هر گیاه به منطقه رشد و سن گیاه بستگی دارد. بررسی مربوط به آنالیز اسانس گیاه

۱*- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، دانشجوی دامپزشکی دکترای عمومی، تهران، ایران
dvmmahsa@yahoo.com
۲- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه پاتوبیولوژی، تهران، ایران.
۳- استادیار، گروه سم‌شناسی، ساختمان شماره ۲ پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، پل گیشا، تهران، ایران

Archive of SID
www.SID.ir

درمنه نشان می‌دهد که این گیاه حاوی ترکیبات گوناگونی همانند توجون، Scopodrinal، Scopofarnol، Cymene، Sabinene، Cineol، Linalool، Cugeol، Borneol و Farnesol می‌باشد. اسانس مرزه علاوه بر اثر ضد قارچی که دارد، ترپن ها و ترپنوئیدهای موجود در آن دارای اثرات ضد میکروبی هستند. این گیاه دارای ۰/۸ تا ۱/۵درصد اسانس به همراه تانن، رزین و موسیلاژ می‌باشد. تیمول وکارواکرول و پاراسیمن مواد تشکیل دهنده اسانس درمنه می‌باشد(۳). اسانس‌های گیاهی دارای اثرات آنتی سپتیک و ضدمیکروبی و اثرات بیولوژیکی و فارماکولوژیکی متعددی هستند(۱۲). تحقیقات نشان می‌دهد که علی رغم مطالعات زیادی که در زمینه اسانس‌ها صورت گرفته است در زمینه نانواسانس‌ها مطالعات جدی و زیادی صورت نگرفته است. هدف از این مطالعه بررسی تأثیرات محافظت کننده کیتوزان حاوی نانواسانس‌های گیاه (درمنه و مرزه) بر روی گونه‌های آسپرژیلوس موجود در پودر ماهی تولیدی کارخانجات استان مازندران می‌باشد.

مواد و روش کار

در این تحقیق به طریق برون تنی تاثیر نانوکیتوزان حاوی اسانس‌های گیاه درمنه و مرزه بر روی گونه‌های قارچی آسپرژیلوس جدا شده از کارخانجات تولیدی پودر ماهی واقع در سطح استان مازندران به روش ریز رقت تعیین شد.

جمع‌آوری نمونه‌ها: در این پژوهش از ۱٤ کارخانه‌ی تولید کننده‌ی پودر ماهی واقع در سطح استان مازندران و از هر کارخانه چندین نمونه بطور تصادفی جمع آوری گردید که در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱ـ تعداد نمونه پودر ماهی جمع‌آوری شده از کارخانجات تولیدی در سطح استان مازندران

شماره کارخانه	۱	۲	۳	٤	٥	٦	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱٤	مجموع
تعداد نمونه	۸	٦	٥	٥	٦	٦	۷	۹	٦	٦	٦	۷	۷	٥	۸۹

تهیه اسانس‌ها: اسانس‌های مورد مطالعه در این تحقیق به صورت تجاری از شرکت باریج اسانس‌تهیه گردیده است. برای اطمینان از عدم آلودگی اسانس‌ها، هر یک از اسانس‌ها روی محیط‌های آزمایشگاهی بلاداگار، مک کانکی آگار و سابورو دکستروز آگار کشت داده و هیچ گونه آلودگی مشاهده نگردید.

تهیه نانو اسانس‌ها

تهیه محلول کیتوزان: برای تهیه‌ی محلول کیتوزان ۰/۵ درصد که در ساخت نانوژل به کار برده می‌شود ابتدا ۰/۵ گرم کیتوزان را در اسید استیک ۱ درصد با pH =۳- ۳/۵ حل کرده و آن را همراه با یک مگنت روی دستگاه همزن مغناطیسی قرار داده تا کاملاً حل شود، برای یکنواخت سازی محلول را در دستگاه اولترا سونیک مدل UP400-S به مدت ۲۰ دقیقه سونی کیت می‌نماییم.

کرباميد و بنزوئیک اسید داخل همزن قطره قطره به محلول کیتوزان اضافه کرده سپس با استفاده از هیدروکسید سدیم ۱ مولار pH آن روی ۹-۸/۵ تنظیم شد. مقدار کرباميد ۳ برابر بنزوئیک اسید درنظر گرفته شده است تا قابلیت ایجاد پیوند بین همه را داشته باشد که مقدار اضافی آن در طی واکنش شسته می‌شود. محلول فوق حالت ژله‌ای به خود گرفته و غلیظ شد سپس محلول ۳ بار سانتریفوژ گردید.

در نهایت برای تهیه نانو اسانس با غلظت ppm۵۰۰۰ حدود ۲۵ میکرولیتر از اسانس با ۵۰۰۰ میکرولیتر نانوژل آماده شده در مرحله قبل مخلوط و در دستگاه اولترا سونیک به مدت ۵ دقیقه سونی کیت شده است.

جداسازی گونه های قارچی آسپرژیلوس از پودر ماهی: بعد از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه میکروب شناسی، ابتدا به میزان ۱۰ گرم از هر نمونه در ۹۰ سی سی سابورو دکستروز

www.SID.ir

براث حاوی کلر آمفنیکل حل گردید سپس از این مقدار نمونه که برابر رقت 10^{-1} می‌باشد رقت‌های متوالی تهیه شد. جهت جداسازی و شمارش پرگنه‌های قارچی از روش کشت سطحی استفاده گردید. محیط‌های مورد استفاده در این آزمایش شامل سابورودکستروز آگار حاوی کلرآمفنیکل جهت شمارش قارچ‌ها و مخمر، پوتیتو دکستروز آگار حاوی کلرآمفنیکل جهت شمارش قارچ‌ها و رزبنگال آگار جهت شمارش گونه های آسپرژیلوس است. بعد از کشت به مدت ۷ تا ۱۰ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرم خانه گذاری شدند. در نهایت از کل نمونه‌ها ۱۲ عدد قارچ آسپرژیلوس تعیین و تشخیص داده شد.

روش تهیه محیط کشت اولیه جهت رشد: به مقدار کافی از محیط کشت پوتیتو دکستروز آگار هم در داخل لوله به صورت شیبدار و هم در پلیت تهیه و اتوکلاو شدند. پس از اطمینان از بسته شدن محیط‌ها برای اطمینان از استریل بودن آن‌ها، یکی از محیط‌ها برای مدت ۱۸ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت و پس از اطمینان از عدم آلودگی محیط کشت‌های آماده شده تا زمان مصرف در یخچال ٤ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

روش تهیه محیط کشت RPMI 1640-2%G: پودر محیط کشت را به میزانی‌که در جدول ۲ اشاره شده است با غلظت ۲٪ گلوگز و بافر مخلوط نموده و بعد از تعیین pH، با فیلترهای یکبارمصرف۱µ ۰/۲۲ و سرنگ استریل محلول فیلتر گردیده و به داخل فالکون‌های ۵۰ سی‌سی منتقل و در یخچال نگهداری شد.

جدول ۲- محیط کشت مناسب برای انجام آزمون حساسیت ضدقارچی به روش میکرودایلوشن به ازای هر لیتر

۲ برابر غلظت	۱ برابر غلظت		
۲۰/۸۰ گرم	۱۰/٤۰ گرم	پودر RPMI ۱٦٤۰	محیط RPMI۲٪ گلوکز
٦۹/۰٦ گرم	۳٤/۵۳ گرم	ان- مورفولینو پروپان سولفونیک اسید	
۳٦ گرم	۱۸ گرم	گلوکز	

روش‌های تهیه محلول سوسپانسیون قارچی: قارچ‌های آسپرژیلوس جداشده از پودرهای ماهی در محیط پوتیتو دکستروز آگار کشت داده شد و در انکوباتور یخچال‌دار، در دمای ۳۰ درجه به مدت یک هفته انکوبه شدند. بعد از یک هفته به میزان ۵ سی‌سی از محلول PST (حاوی ۱۰۰ سی‌سی سرم فیزیولوژی نرمال+۱۰میکرو لیتر توین ۸۰ و سپس اتوکلاو محلول) به روی محیط آگار شیبدار اضافه گردید و با سوآپ استریل کاملاً سطح اسپورها شستشو داده شد و سوسپانسیون قارچی را به مدت ۱۵ ثانیه کاملاً ورتکس نموده و سپس به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه در آزمایشگاه قرار داده تا میسیلیوم‌ها ته-نشین و اسپورها در محلول باقی بماند. در ادامه این سوسپانسیون با استفاده از سمپلر به لوله دیگر منتقل و با استاندارد ۰/۵ مک فارلند مقایسه گردید. غلظت سوسپانسیون با استفاده از اسپکتروفتومتر با طول موج ۵۳۰ نانومتر قرائت شد. میزان OD قارچ آسپرژیلوس برابر ۰/۱۷-۰/۱۵ تهیه شد تا غلظت سوسپانسیون برابر با $10^{5}\times1$ CFU/ml به دست آید. استاندارد نمودن مقدار تلقیح در این روش برای قارچ‌های رشته ای، نوع محیط کشت، انکوباسیون و تعیین نقطه انتهایی مهم می باشد (۱٦و۱۵و۱۱).

روش علمی تعیین MIC: برای تعیین MIC ابتدا به هریک از گوده‌های پلیت ۹٦ خانه با سمپلر هشت کاناله به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از محیط ۲ درصدRPMI۱٦٤۰ اضافه نموده، سپس از نانو اسانس‌های درمنه و مرزه (هر نانواسانس به طور جداگانه) رقت‌های سریالی در میکروپلیت‌های مسطح ۹٦ خانه‌ای به میزان ۱۰۰ میکرولیتر برای هر گوده تهیه شد. بدین صورت که به گوده اول از سمت چپ اضافه و به خوبی با محیط مخلوط گردید. در ادامه از گوده اول به میزان ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و به گوده دوم منتقل و به همین ترتیب رقت ۱/۲ از اسانس در هر گوده تهیه و در نهایت از گوده دهم ۱۰۰ میکرولیتر نانواسانس خارج کردیم. در این روش گوده اول حاوی بیشترین غلظت و گوده دهم حاوی کمترین غلظت است. گوده ۱۲ عاری از نانو اسانس می‌باشد. سپس به هریک از گوده‌ها بجز گوده ۱۱ به

Archive of SID

www.SID.ir

میزان ثابت ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون استاندارد شده اضافه نموده تا حجم نهایی محلول برابر با ۲۰۰ میکرولیتر با غلظت‌های متفاوت گردد. گوده ۱۱ حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط و ۱۰۰ میکرولیتر نانواسانس به عنوان کنترل منفی و گوده ۱۲ حاوی محیط کشت و سوسپانسیون قارچی می‌باشد که به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شده است. این آزمون برای هر گونه قارچی در ردیف افقی مجزا و به صورت دوبار تکرار انجام گرفت. سپس میکرو پلیت‌ها در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤٨ ساعت انکوبه شدند. بعد از مدت زمان معینی میکرو پلیت‌ها از انکوباتور خارج و هم به صورت چشمی و هم توسط دستگاه الایزاریدر در طول موج ٥٤٠ نانومتر قرائت گردید. گوده‌ای که مانع رشد قارچ گردیده به عنوان MIC در نظر گرفته شده است(١٦).

تعیین حداقل غلظت کشندگی قارچی یا MFC: MFC بنا به تعریف کمترین غلظتی از فعالیت ضد قارچی است که در آن غلظت ۹۹/۹٪ از میکروارگانیسم‌ها از بین رفته باشند. جهت تعیین MFC با استفاده از سمپلر از گوده MIC و گوده بعد از MIC که رشد دارد و گوده‌های قبل از MIC به میزان بالاتر نانواسانس مقدار۵۰ میکرولیتر برداشته و به روی محیط پوتیتو دکستروز آگار تلقیح و سپس مدت یک هفته انکوبه شد، بعد از گذشت این زمان هر رقتی که در پلیت مانع رشد کامل قارچ شده باشد یا کمتر از ۳ کلونی(تقریباً معادل ۹۹/۵-۹۹٪ فعالیت کشندگی) وجود داشته باشد به عنوان MFC در نظر گرفته شده است. (١٦و١٥، ١١).

آنالیز آماری

این مطالعه تجربی بوده و با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه۱۹ و روش‌های آماری توصیفی داده‌ها پردازش شد.

نتایج

بعد از جمع‌آوری نمونه‌ها، قارچ‌های موجود در نمونه‌ها جداسازی گردید. سپس گونه‌های آسپرژیلوس تشخیص داده شد. در نهایت از کل نمونه‌های پودر ماهی ۱۲ عدد آسپرژیلوس جدا گردید که بعد از بررسی، شناسایی و مشاهده در زیر میکروسکوپ به ترتیب بیشترین و کم ترین تعداد مربوط به آسپرژیلوس فومیگاتوس و آسپرژیلوس نیدولانس بوده است. جدول ۳ نوع گونه‌های قارچی آسپرژیلوس جدا شده را نشان می‌دهد.

جدول۳ ـ نوع گونه‌های قارچی آسپرژیلوس جدا شده بعد از شناسایی و تشخیص

نوع قارچ	آسپرژیلوس نایجر	آسپرژیلوس فلاووس	آسپرژیلوس نیدولانس	آسپرژیلوس فومیگاتوس
تعداد	۲	٤	۱	٥

جدول ٤ و ٥ نتایج آزمایش MFC و MIC نانواسانس‌های درمنه و مرزه را نشان می‌دهد.

جدول ٤ـ نتایج آزمایش MFC و MIC نانواسانس درمنه برحسب µg/mL

شماره نمونه‌ها	MIC	MFC
A_1*	٦/٢٥	١٢/٥
A_2	٦/٢٥	١٢/٥
A_3	٦/٢٥	١٢/٥
A_4	١٢/٥	٢٥
A_5	٢٥	٥٠
A_6	١٢/٥	٢٥
A_7	١٢/٥	٢٥
A_8	٦/٢٥	١٢/٥
A_9	١٢/٥	٢٥
A_{10}	١٢/٥	٢٥
A_{11}	٦/٢٥	١٢/٥
A_{12}	٦/٢٥	١٢/٥

* A نشان‌دهنده گونه‌های آسپرژیلوس جدا شده می‌باشد.

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۵ـ نتایج آزمایش MFC و MIC نانواسانس مرزه برحسب µg/mL

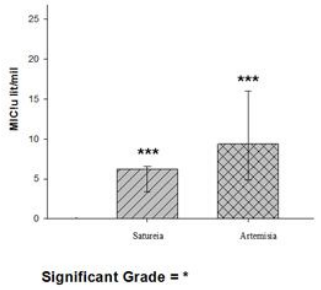
شماره نمونه‌ها	MIC	MFC
A_1^*	٦/٢٥	١٢/٥
A_2	٣/١٢٥	٦/٢٥
A_3	٦/٢٥	١٢/٥
A_4	٦/٢٥	١٢/٥
A_5	٣/١٢٥	٦/٢٥
A_6	٦/٢٥	١٢/٥
A_7	٦/٢٥	١٢/٥
A_8	٣/١٢٥	٦/٢٥
A_9	٦/٢٥	١٢/٥
A_{10}	٣/١٢٥	٦/٢٥
A_{11}	٣/١٢٥	٦/٢٥
A_{12}	٦/٢٥	١٢/٥

* A نشان‌دهنده گونه‌های آسپرژیلوس جدا شده می‌باشد.

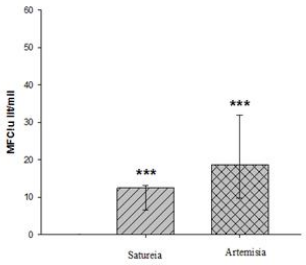
نتایج آزمایشات MIC نشان از تأثیر بالای نانواسانس مرزه نسبت به نانواسانس درمنه بر روی گونه‌های آسپرژیلوس است. همچنین در تمامی آزمایشات MIC و MFC بصورت دوبار تکرار انجام شد و مشخص شد که تأثیرات نانو اسانس‌ها در هر دوبار آزمون نتایج مشابهی دارد.

برای تعیین MFC، بعد از تعیین MIC و مشخص شدن گوده ها، رقت‌های قبل و بعد از آن به روی محیط‌های PDA منتقل و کشت داده، بعد از زمان انکوباسیون رقت‌هایی که در پلیت آگار رشدی نداشتند به عنوان MFC گزارش شد که در هر دوبار تکرار نتایج مشابه مشاهده شد.

باتوجه به نمودارهای ۱ و۲ بین نانواسانس‌های درمنه و مرزه رابطه معنادار ۰/۰۰۱ وجود دارد.MIC هر ۱۲ نمونه آسپرژیلوس جدا شده با MFC شان رابطه معنادار ۰/۰۰٤ وجود دارد.



نمودار۱ـ مقایسه حداقل غلظت ممانعت از رشد نانو اسانس‌های درمنه و مرزه



نمودار ۲ـ مقایسه حداقل غلظت کشندگی نانو اسانس‌های درمنه و مرزه

با توجه به جدول ٦ و نمودارهای ۱و۲ در مورد آزمایش MICنانو اسانس مرزه اثر بهتری نسبت به نانو اسانس درمنه داشته است. در مورد آزمایش MFC نانواسانس درمنه اثر بهتری نسبت به نانو اسانس مرزه داشته است.

جدول٦ـ حداقل، حداکثر و میانگین نتایج *MFC* و *MIC* مربوط به نانواسانس های درمنه و مرزه بر حسب µg/mL

نوع آزمون	اسانس مورد استفاده	تعداد نمونه	میانگین	حداقل غلظت	حداکثر غلظت
MIC	درمنه	١٢	١٠/٤١٦٧	٦/٢٥	٢٥
	مرزه	١٢	٤/٩٤٧٩	٣/١٣	٦/٢٥
MFC	درمنه	١٢	٢٠/٨٣٣٣	١٢/٥	٥٠
	مرزه	١٢	٩/٨٩٥٨	٦/٢٥	١٢/٥

www.SID.ir

بحث

مطالعه حاضر بر روی ۸۹ نمونه پودر ماهی جمع آوری شده از کارخانجات واقع در سطح استان مازندران انجام گردید که در نهایت ۱۲ عدد آسپرژیلوس جدا شد. شرایط تولید پودر ماهی، دپو نمودن آن در کف کارخانه و همچنین شرایط انبارداری، پتانسیل آلودگی آن به قارچ‌های مختلف از جمله آسپرژیلوس را فراهم می‌کند. مطالعات انجام شده سایر محققین موید این نکته است که پودر ماهی دارای آلودگی قارچی بالایی می‌باشد(۱۹ و ۱۳، ۱۰، ۸). فرآورده هایی از قبیل پودر ماهی، ذرت و کنجاله سویا چنانچه در محیط های مرطوب نگه داری شوند و در هنگام فرآوری آنها یا در مسیر حمل و نقل آن ها دقت لازم صورت نگیرد شرایط رشد قارچ بر روی آنها فراهم شده، اسپورهای موجود رشد کرده و تولید سم می‌کنند. غالب مواد غذایی که به مصرف حیوان یا انسان می‌رسند محیط کشت مناسبی برای رشد قارچ‌ها و تولید توکسین‌ها می‌باشند(۱۰). Olajuyigbe در مطالعه‌ی خود به حضور باکتری و قارچ‌های زیادی از جمله آسپرژیلوس‌ها در آنالیز نمونه‌های پودر ماهی اشاره کرده است و رطوبت را یکی از دلایل حضور میکروارگانیسم‌ها دانسته است (۱۹). در تحقیق حاضر نیز حضور قارچ‌های مختلف از جمله آسپرژیلوس در پودر ماهی اشاره شده است که یکی از دلایل آن وجود رطوبت در منطقه شمال می‌باشد. در مطالعه‌ای که بر روی جداسازی آسپرژیلوس و اندازه گیری میزان آفلاتوکسین موجود در پودر ماهی، ذرت و کنجاله سویا انجام شد نشان داده شد که میزان آلودگی به قارچ و آفلاتوکسین به ترتیب در کنجاله سویا ۹۶ و ۴۰ درصد، در ذرت ۸۸ و۴۰ درصد و در پودر ماهی ۱۰۰و ۶۰ درصد بوده است. همچنین کنجاله سویا وارداتی با ذرت تولید داخل و پودر ماهی تولید داخل بیشترین میزان آلودگی به قارچ آسپرژیلوس را دارا بودند و بیشترین مقدار آلودگی به سم آفلاتوکسین B1 در پودر ماهی تولید داخل به مقدار ۱۵میکروگرم در کیلوگرم بود (۸). در تحقیق دیگر، گونه های آسپرژیلوس خوراک دام جداسازی و بصورت مولکولی شناسایی گردید. نتایج بدست آمده نشان داد که بیشترین میزان آلودگی مربوط به گونه های آسپرژیلوس بوده است (٦).

امروزه استفاده از روش‌های بیولوژیک، استفاده از مواد طبیعی و ترکیبات گیاهان دارویی در کنترل آفات بدلیل اثبات اثرات جانبی مواد شیمیایی روبه گسترش می‌باشد. اسانس‌ها از ترکیبات گیاهان دارویی هستند که از نظر طبی شناخته شده می‌باشند. مقایسه نتایج تحقیقات گذشته نشان می‌دهد که اسانس‌ها تاثیرات ضد قارچی قوی دارند که در گزارش خسروی و مینوییان نیز به آن اشاره شده است(۱۷). تحقیقات متعدد نشان داده شده است که اسانس درمنه از رشد انواع میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا جلوگیری می‌کند به طوری‌که در بعضی موارد فعالیت ضد میکروبی آن از آنتی بیوتیکها بیشتر است(۳). توجون، کامفور و وربنول اصلی-ترین و عمده ترین ترکیب موجود در اسانس گیاه درمنه است است که خاصیت ضد قارچی قوی دارد. در مطالعه‌ای دیگر اثر ضد میکروبی اسانس‌های آویشن، مرزنجوش، مرزه و اکالیپتوس بر باکتری‌های اشریشیاکلی، سالمونلاتیفی موریوم و قارچ‌های آسپرژیلوس نایجر، آسپرژیلوس فلاووس بررسی شد. در این تحقیق بیان شد که اسانس‌ها بر قارچ‌ها اثر مهاری دارند، در حالی که اثر قارچ‌کشی اسانس-های گیاهی از اثر باکتری کشی آنها ضعیف‌تر است اما سوش‌های آسپرژیلوس نایجر از سایرین نسبت به اسانس-های گیاهی حساس‌تر می‌باشند و آسپرژیلوس نایجر از آسپرژیلوس فلاووس حساس‌تر می‌باشد(۹). شهرکی در تحقیق خود به اثر بازدارندگی دو اسانس مرزه و آویشن بر رشد قارچ آسپرژیلوس پارازیتیکوس اشاره کرده است که با تحقیق حاضر همخوانی دارد(۷). اصلی ترین و عمده ترین ترکیب موجود در اسانس گیاه مرزه که خاصیت ضد قارچی

www.SID.ir

دارد تیمول و کارواکرول است(۲). در تحقیق انجام شده در سال ۲۰۰۸ توسط Dikbas و همکاران روی کنترل آسپرژیلوس فلاوس توسط اسانس و متانول خروجی از مرزه مطالعاتی انجام گردید. نتایج نشان داد که روغن این گیاه فعالیت ضد قارچی قوی بر روی پاتوژن های قارچی دارد (١٤). در پژوهشی دیگر فعالیت ضد میکروبی مرزه مورد ارزیابی قرارگرفت و مشخص شد که هگزان استخراج شده از مرزه اثر ضد قارچی ندارد و فقط بر روی چند گونه باسیلوس و کاندیدا اثر گسترده ای دارد، اما متانول استخراج شده از آن اثر ضد قارچی و ضد باکتریایی دارد. متانول استخراج شده نسبت به هگزان اثر قوی تری دارد (۲۰).

در پژوهش حاضر نتایج میکروپلیت‌های MIC هم بصورت چشمی و هم با دستگاه قرائت الایزا انجام شد. با مقایسه این دو روش اختلاف قابل ملاحظه ای در نتایج مشاهده نشد($P\leq0.05$). همچنین مقایسه زمان‌های ٤٨ ساعت و ٧٢ ساعت انکوباسیون نشان از مشابه بودن اطلاعات بدست آمده در زمان‌های ذکر شده را دارد و هیچ اختلاف معناداری بین زمان‌های ٤٨ ساعت و ٧٢ ساعت وجود نداشت($P\leq0.05$). با مقایسه بین مدت زمان انکوباسیون ٤٨ ساعت و ٧٢ ساعت میکرو پلیت‌ها در انکوباتور و مشاهده عدم اختلاف بین این دو زمان، موید این موضوع است که مواد موثره نانواسانس‌های مورد مطالعه در همان ساعت‌های ابتدایی در محیط آزاد و تأثیر خود را بر جا گذاشته و افزایش مدت زمان انکوباسیون تأثیری بر روند ضد قارچی بیشتر نانواسانس‌ها ندارد. در بررسی و مقایسه سایر نتایج، با نتایج میزان MIC وMFC پژوهش حاضر، نتایج نشان دهنده این مطلب است که بین کمترین رقت‌های جلوگیری از رشد و رقت‌های کشندگی فاصله کمی وجود داردکه نشان از حساس بودن جدایه‌ها به اسانس‌ها است و طبیعتا برای از بین بردن آن نیاز به تجویز بیشتر ماده ضد قارچی نمی‌باشد.

با توجه به اینکه در زمینه استفاده از نانواسانس‌ها فعالیت‌های بسیار محدودی انجام گرفته است تحقیق در این زمینه بسیار مفید و کاربردی خواهد بود.

فهرست منابع

١- اجاق، م.، رضایی، م.، رضوی، ه.، حسینی، م.(١٣٩١):اثر پوشش های آنتی میکروبی در افزایش ماندگاری ماهی قزل الای رنگین کمان، فصلنامه علوم و صنایع غذایی، ٩: ١٣-٢٣.

٢- جعفرنیا، س.، خسرو شاهی، س.، قاسمی، م. (١٣٩٠): راهنمای جامع و مصور خواص و کاربرد گیاهان دارویی، چاپ سوم، انتشارات سخن گستر، تهران، ایران،: ٦٥-١٥.

٣- حکیمی میبدی، م.، افخمی عقدایی، م.، میرجلیلی، ف.(١٣٨٢): بررسی فعالیت بیولوژیکی اسانس درمنه ایرانی، مجله پژوهش و سازندگی، ٦١: ٥-٢.

٤- خسروی، ع. (١٣٨٧): بیماری‌های قارچی و پاسخ‌های ایمنی، چاپ اول، انتشارات دانشگاه تهران، تهران، ایران،: ٧٦٣-٧٥٣.

٥- رزاقی ابیانه، م.، قهفرخی، م. (١٣٨٤): قارچ شناسی عمومی دامپزشکی، چاپ اول، انتشارات موسسه آموزش عالی علمی کاربردی جهاد کشاورزی، تهران، ایران،: ٦٥-٥٠.

٦- رنجبر، س.،نظری،ر.، نوری،م.(١٣٩٠): جداسازی و شناسایی مولکولی گونه‌های آسپرژیلوس خوراک دام، مجله میکروبیولوژی دامپزشکی، ٧(١): ١٦-١١ .

٧- شهرکی، ر. ، شیبانی صفت، م.، حداد خداپرست، م. (١٣٨٨): بررسی اثرات ضد قارچی اسانس های آویشن،مرزه، اکالیپتوس، لیمو، نعناع و باریجه بر روی قارچ‌های As.parasiticus، عامل فساد محصولات کشاورزی، همایش ملی انسان، محیط زیست و توسعه

Archive of SID
www.SID.ir

پایدار، باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد همدان.

۸- فیید، م.، مظفری، ن.، شجاعی آرانی، الف. (۱۳۸٤): جداسازی و شناسایی مهمترین باکتری‌ها و قارچ‌های مولد فساد از پودر ماهی کیلکا در استان گیلان، مجله علمی شیلات ایران، ٤: ۱۳۸-۱۲۷.

۹- محبوبی، م.، فیض آبادی، م.(۱۳۸۸): بررسی اثر ضد میکروبی اسانس‌های آویشن، مرزنجوش،مرزه و اکالیپتوس بر باکتری‌های اشریشیاکلی،سالمونلا تیفی موریوم و قارچ های آسپرژیلوس نایجر، آسپرژیلوس فلاووس، فصلنامه گیاهان دارویی، ۸ (۲): ۱٤٤-۱۳۷.

۱۰- میاحی، م.، راضی جلالی، م.، سلامات، ن.(۱۳۸٦): جداسازی آسپرژیلوس و اندازه گیری میزان آفلاتوکسین موجود در پودر ماهی،ذرت و کنجاله سویا، مجله علوم دانشگاه شهید چمران، ۱۰۵:۱۷-۹۵.

11- Arikan, S., Lozano- Chiu, M., Paetznick, V., Nangia, S., Rex, J.H. (1999): Microdilution Susceptibility Testing of Amphotericin B, Itraconazole, and Voriconazole against Clinical Isolates of Aspergillus and Fusarium Species. J .Clin. Micro. 12:3946–3951.

12- Coulombe, R.A. (1993): Biological action of mycotoxins, J. dairy sci. 76(3):880-891.

13- Cowan, MM. (1999): Plant products as antimicrobial agents. Clin. Microb. 12:564-582.

14- Dikbas, N., Kotan, R., Dadasoglu, F., Sahin, F. (2008): Control of aspergillus flavus with essential oil and methanol extract of Satureja hortensis. Inter. J. Food Microb. 124: 179-182.

15- Espinel Ingroff, A., Chaturvedi, V., Fothergill, A., Rinaldi, M.G. (2002): Optimal testing conditions for determining MICs and minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for uncommon molds. J. clin. microb. 40(10):3776-3781.

16- Kavanagh, K., (2006): Medical mycology cellular and molecular techniques. Recherche. 67:96-102.

17- Khosravi, A.R., Minooeian Haghighi, M.H., Shokri, H., Emami, S.A., Alavi, S.M., Asili, J. (2011): The potential inhibitory effect of Cuminum cyminum, Ziziphora clinopodioides and Niglla sativa essential oils on the growth of Aspergillus fumigatus and Aspergillus flavus, Brazilian J. Microb. 42: 216-224.

18- Konietzny, U., Greiner, R. (2003): The application of PCR in the detection of mycotoxigenic fungi in foods. Brazilian J. Microb. 34(4):283-300.

19- Olajuyigbe, O.O., Akanda, G., Ezekiel, M.O., Olusola, A,O., Salaudeen, M.M., Amusan, E.E., Babalola, A.F. (2011): Microbial and proximate composition of some fish meal samples. Inte. J. food saf. 13:41-44.

20- Sahin, F., Karaman, I., Gulluce, M., Ogutcu, H., Sengul, M., Adguzel, A., Ozturk, S., Kotan, R. (2003): Evaluation of antimicrobial activities of Satureja hortensis. J. ethnopha. 87:61-65.

Archive of SID

www.SID.ir