بررسی میزان اثر پوشش خوراکی عصاره دارچین بر مهار رشد آسپرژیلوس فلاووس مولد آفلاتوکسین برروی مغز بادام

نویسندگان: الهام السادات موسوی احمد آبادی[۱]،عباسعلی جعفری[۲]، سید مرتضی سیفتی[۳]، حسین جعفری[۴]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشدمیکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، واحد اشکذر، دانشگاه آزاد اسلامی

۲. نویسنده مسئول:استاد گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد تلفن تماس: ۰۹۱۳۳۵۱۹۲۱۲ Email: jafariabbas@ssu.ac.ir

۳. استادیار، گروه زیست شناسی، واحد اشکذر، دانشگاه آزاد اسلامی

۴. دانشجوی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد

طلوع بهداشت

دو ماهنامه علمی پژوهشی دانشکده بهداشت یزد
سال چهاردهم
شماره: ششم
بهمن و اسفند ۱۳۹۴
شماره مسلسل: ۵۴

تاریخ وصول: ۱۳۹۴/۵/۲۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۷/۶

چکیده

مقدمه: آفلاتوکسین‌ها از شایعترین و خطرناکترین مایکوتوکسین‌ها هستند که توسط قارچهای سمی که بر روی طیف وسیعی از مواد غذایی انسانی و حیوانی رشد می کند تولید می شوند. این گروه از سموم قارچی عوارض و خطراتی از جمله القاء سرطان کبد دارند. با توجه به معایب بعضی از روش های فیزیکی و شیمیایی برای کنترل آلودگی قارچها، اخیرا توجه زیادی بر روی استفاده از عصاره گیاهان دارویی برای کنترل آلودگی های قارچی مولد آفلاتوکسین بر روی مواد غذایی شده است، لذا هدف از انجام این مطالعه بررسی تاثیر پوشش خوراکی حاوی عصاره دارچین بر روی مهار رشد آسپرژیلوس فلاووس مولد آفلاتوکسین بر روی مغز بادام می باشد.

روش بررسی: در این مطالعه مداخله ای تجربی نمونه هایی ازمغز بادام بطور تصادفی برای انجام مطالعه انتخاب شدند. نمونه های مغز بادام را ابتدا در محلول پوشش خوراکی آب پنیر حاوی۳ درصد عصاره هیدروالکلی دارچین بصورت غوطه وری تیمار و سپس با سوسپانسیون ۱×۱۰^{۳}کونیدیهای قارچ آسپرژیلوس فلاووس مولد آفلاتوکسین آلوده شدند. میزان مهار آلودگی مغزهای بادام را با کشت محلول شستشوبادامهای آلوده شده و شمارش تعداد کونیدی های زنده قارچ ارزیابی شدند. در نهایت مقادیر MFC و MIC_{50} هر یک از عصاره مورد بررسی با تهیه رقتهای سریالی از عصاره ها و آلوده کردن با سوسپانسیون کونید قارچ مطابق با دستورالعمل روش استاندارد CLSI تعیین شدند.

یافته ها: در مجموع مشاهده ماکروسکوپی مغزهای تیمار شده نشان داد که پوشش خوراکی حاوی عصاره ۳٪ هیدروالکلی دارچین توان مهار کامل رشد قارچ مورد بررسی بر روی مغز بادام بود. با انجام تست آماری T زوج تفاوت آماری کاملاً معنی داری بین میانگین تعداد کلنی های جدا شده از کشت محلول شست و شوی مغزهای گروه تست و کنترل بدست آمد (p=(۰/۰۰۰۱). میزان MFC و MIC_{50} برای دارچین به ترتیب معادل غلظت های ۱۸۷ و ۹۴ میلی گرم درصد بدست آمد.

نتیجه گیری: نتایج مطالعه حاضر نشان داد که پوشش خوراکی حاوی عصاره دارچین درکنترل رشد قارچ آسپرژیلوس فلا ووس بر روی مغز بادام موثر می باشد. هر چند استفاده عملی از این عصاره ها نیاز مند بررسی های بیشتر اقتصادی، میکروبی و سم شناسی می باشد.

واژه های کلیدی: بادام، آسپرژیلوس فلاووس، آفلاتوکسین، پوشش خوراکی، دارچین

مقدمه

بادام (Almond) ودرخت بادام (Amygdalus) در زمان های قدیم بومی نواحی خاورمیانه و جنوب و غرب آسیا مخصوصا افغانستان و ایران، سوریه و فلسطین پرورش می یافته است. ایران با تولید ۶٪ کل بادام جهان در رتبه پنجم تولیدکنندگان این محصول قرار دارد. در بین محصولات باغی بادام با ۱۰۲۴۰ هکتار رتبه دوم پس از پسته را دارد. بادام از اقلام مهم خشکبار صادراتی ایران است که میزان صادرات بادام و مغز بادام بین ۱۲۲۴/۴۶ تن تا ۴۲۵۴ تن و ارزش آن بین ۱/۹ تا ۹/۳ میلیون دلار بوده است. میزان صادرات بادام بین ۱/۲ تا ۴ درصد تولید کشور را شامل شده که جایگاه چهارم در بین خشکبار صادراتی پس از پسته، خرما و کشمش را دارا می باشد (۱). استان یزد در بین استان های کشور رتبه سوم در تولید بادام پس از استان های فارس و کرمان دارد (۲).

با توجه به اینکه ایران از دیرباز بازارهای جهانی خشکبار از جمله پسته و بادام سهم خوبی داشته و از چهارمین تولید کنندگان و صادر کنندگان بادام تا سال ۱۳۷۳ بوده ولی متاسفانه مطابق با آمار و ارقام منتشره از طرف اداره جهاد کشاورزی نشان دهنده روند نزولی در وزن و ارزش در صادرات بادام از سال ۱۳۷۳ به بعد بوده است. به نظر می رسد که کیفیت بهداشتی دانه های گیاهی از جمله پسته و بادام در کاهش سهم بازار جهانی این محصولات موثر بوده است (۱). نقش آلودگیهای قارچی از جمله قارچ های توکسیک مولد آفلاتوکسین در کاهش کیفیت بهداشتی دانه های گیاهی مانند پسته و بادام و کاهش خریداران جهانی بسیار مهم و موثر می باشد.

قارچهای ساپروفیت از جمله قارچ های سمی (Toxic) از عوامل بیولوژیک مهم آلوده کننده محصولات باغی از جمله پسته و بادام میباشند که مانند پسته در هنگام رشد بر روی درخت، برداشت و نگهداری و در انبار آلودگی ایجاد می کنند. با توجه به این‌که عمده مناطق کشت بادام از نواحی گرم و خشک فلات مرکزی ایران می‌باشد، احتمال آلودگی با قارچهای ترموفیل (گرمادوست) آسپرژیلوس مانند گونه‌های مولد آفلاتوکسین از جمله آسپرژیلوس فلاووس وجود دارد (۳).

آفلاتوکسین ها متابولیت های ثانویه قارچی هستند که توسط گونه های سمی قارچهای آسپرژیلوس و پنی سیلیوم تولید می شوند. این ترکیبات به شدت سمی و سرطانزا هستند و به عنوان مواد جهش زا در دنیا شناخته شده اند (۵، ۴). طبق تحقیقات انجام شده گونه های آسپرژیلوس از جمله آسپرژیلوس فلاووس از روی پوسته نرم، و مغز پسته، بادام و سایر دانه های روغنی ایران جدا شده است. بادام، از جمله دانه های روغنی است که در تهیه بعضی از غذاها، شیرینی ها کاربرد داشته و ۴۹٪ دانه بادام را روغن تشکیل می‌دهد که شامل اسید اوئیک، اسید لینولئیک غیراشباع، و اسید پالمیتیک اشباع می باشد و مقدار انرژی موجود در هر ۱۰۰ گرم مغز بادام، ۵۷۶ کیلوکالری است (۳).

Kenjo و همکاران در مطالعه ای در ژاپن با هدف تعیین میزان آلودگی قارچهای مولد آفلاتوکسین در پودر مغز بادام نشان دادند که میزان آلودگی در بین نمونه ها از ۱×۱۰^{۳} تا CFU/g $۸/۵ \times ۱۰^{۳}$ کونیدی قارچ بویژه قارچهای آسپرژیلوس فلاووس جدا نمودندکه این گونه ها مولد انواع مختلف آفلاتوکسینهای B1, B2, G1, G2 بودند (۶).

آفلاتوکسین تولید شده توسط قارچهای سمی برروی دانه های روغنی از جمله بادام به شدت هپاتوکارسینوزن است و می تواند سلامت انسان و حیوانات را به خطر بیندازد (۳). بنابراین مبارزه با عامل مولد این سم ضروری به نظر می رسد. از طرفی کنترل قارچها معمولا با استفاده از نگهدارنده های شیمیایی و سنتزی انجام می شود که این مواد خود نیز در اغلب موارد دارای اثرات جانبی مثل سرطان زایی و تراتوژنیسیتی ناشی از باقیمانده آنها هستند که موجب نگرانی مسئولین بهداشتی می باشد. این موضوع از یک طرف و افزایش تقاضای مصرف کنندگان برای محصولات غذایی با حداقل فرآوری و فاقد نگهدارنده های شیمیایی از طرف دیگر باعث شده در سالهای اخیر تحقیقات روی استفاده از ترکیبات طبیعی به ویژه عصاره ها و اسانسهای گیاهی جهت جلوگیری از رشد قارچها و تولید توکسین متمرکز شود (۸، ۷).

مطالعات معدودی در رابطه با کنترل و مهار رشد قارچهای مولد آفلاتوکسین توسط عصاره های گیاهی انجام شده که نتایج مختلف ضد ونقیضی داشته است (۱۰، ۹).

جوانمرد و همکاران پوشش خوراکی (Edible Coating) حاوی عصاره الکلی آویشن شیرازی را به منظور جلوگیری از رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس بر روی مغز پسته مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که پوشش های حاصل از پروتئین آب پنیر حاوی اسانس آویشن توانایی جلوگیری از آلودگی و رشد ثانویه قارچ ها را بر روی سطح مغز پسته خواهند داشت (۱۱).

لذا هدف از انجام این تحقیق، بررسی اثر عصاره های آویشن، مرزنجوش و دارچین بوسیله تهیه پوشش خوراکی با آب پنیر بر روی مهار رشد آسپرژیلوس فلاووس مولد آفلاتوکسین بر روی مغز بادام می باشد.

روش بررسی

در این مطالعه مداخله ای تجربی (Lab trial)، در خصوص تعیین میزان آلوده شدن تجربی مغز های بادام تیمار شده با عصاره دارچین به کمک فرمول تعیین حجم نمونه زیر با در نظر گرفتن۰/۰۵= α ،۰/۰۵= p (نسبت شیوع) و۰/۰۵=d و با توجه به فرمول (n= z2p(1-p)/d2) تعداد ۶۰ نمونه مغز بادام های تولید شده در احمد آباد یزد برای این مطالعه در نظر گرفته شد. دربخش دوم حجم نمونه جهت بررسی میزان حساسیت دارویی با توجه به اصول مطالعات Lab trial که بین ۳ تا ۷ تکرار لازم است (۱۳، ۱۲)، در مطالعه حاضر تعداد ۷ تکرار برای هر رقت عصاره تعیین گردید. داده های بدست آمده در این مطالعه به کمک نرم افزار آماریSPSS19 و با استفاده از تست آماری T زوج برای مقایسه های دوگانه میانگین ها استفاده شد.

گیاه دارویی دارچین (کد SSU0012 تایید شده توسط هرباریوم دانشکده داروسازی یزد) و با نام علمی Cinnamomum zeylanicum Nees جهت تهیه عصاره هیدروالکلی مطابق با روش استاندارد استفاده شد (۱۴).

مغزهای بادام انتخابی را ابتدا با استفاده از اشعه UV بمدت ۵ ساعت استریل نموده و با کشت نمونه هایی از آن برروی محیط کشت سابورو از سترون بودن آنها اطمینان حاصل گردید.

جهت پوشش دهی مغز بادام از روش جوانمرد در سال ۲۰۰۸ استفاده شد. محلول آب پنیر (۸۵ حاوی درصد پروتئین) به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم در ۹۰ درجه سانتی گراد حرارت داده تا پروتئین ها ی آن دناچوره شو ند. سپس محلول دناچوره

شده در دمای آزمایشگاه (۲۵ درجه سانتی گراد) خنک کرده و با افزودن سود یک نرمال Ph آن برروی ۷ تنظیم میگردد. با افزودن گلیسرول استریل به عنوان عامل پلاستی سایزر به نسبت ۰/۶ وزن گلیسرول به وزن پروتئن به ماده پروتئینی به محلول پوشش دهی افزوده گردید (۱۵).

عصاره های هیدروالکلی دارچین به عنوان تست، سیکلوهگزامید (کنترل مثبت) و آب مقطر (کنترل منفی) به این محلول قبل از پوشش دهی مغزهای بادام اضافه گردیدند. کشت لیوفیلیزه قارچ آسپرژیلوس فلاووس (PTCC 5006) خریداری شده از مرکز کلکسیون قارچ ها و باکتری های صنعتی ایران (ضمیمه شماره ۱) را برروی محیط کشت Potato dextrose Agar (PDA) (Himedia, India) حاوی ۵۰۰ mg/l کلرامفنیکل کشت داده کشت داده و بعد از یک هفته انکوباسیون در حرارت ۳۰ درجه، با استفاده از۲ میلی لیتر محلول توین ۰/۵٪ استریل سطح کلنی را جهت تهیه سوسپانسیون کونیدیهای قارچ شستشو داده شده و به لوله فالکون استریل حاوی محلول سرم فیزیولوژی استریل انتقال داده میشود. سپس با استفاده از لام نئوبار و سرم فیزیولوژی استریل سوسپانسیون ۱۰۳CFU/ml× ۱ (معادل ۰.۵ لاندا) کونیدی های قارچ رقیق و بلافاصله برای آلوده کردن مغز بادام استفاده میشوند (۱۶).

تعداد ۶۰ عدد مغز بادام سفید شده (بدون پوست) استریل شده (در بخش ۳-۶-۲ اشاره شده) را در داخل آب پنیر (آماده شده برای پوشش خوراکی) حاوی عصاره های گیاهی (۳٪) سه گانه خیسانده و با قرار دادن در پلیتهای استریل و اون در حرارت ۳۷ درجه خشک می شوند. سپس مغزها را با یک میلی لیتر سوسپانسیون ۱×۱۰^{۳} کونیدیهای قارچ آسپرژیلوس فلاووس مولد آفلاتوکسین (Aspergillus flavus PTCC 5006) خریداری شده از مرکز تهیه کلکسیون قارچ ها و باکتری های صنعتی ایران IROST) آلوده میگردند (ویال شیشه ای خریداری شده را شکسته و اسپورهای قارچ ابتدا برروی محیط کشت پوتیتو دکستروز اکار گشت میشوند). از مغز بادام هایی که در پوشش خوراکی حاوی آب مقطر استریل و محلول ۵۰۰ mg/l سیکلوهگزامید (Oxoid, UK) میباشند به ترتیب به عنوان کنترل منفی و کنترل مثبت (gold standard) استفاده میشوند. نمونه های مغز بادام گروه های مختلف را بمدت ۵ روز در پلیتهای استریل مجزا در انکوباتور دارای رطوبت و در حرارت ۲۸ درجه سانتیگراد نگهداری میشوند تا آلودگی های احتمالی با آسپرزیلوس ظاهر شوند. سپس با انتقال مغزهای مورد بررسی هر گروه بداخل لوله آزمایش استریل جداگانه حاوی ۲ میلی لیترسرم فیزیولوژی استریل آنها را بمدت ۵ دقیقه شدیدا برروی شیکر(۳۰۰rpm) شیکر نموده و بعلاوه با سونیکاسیون (Elma, Germany) کونیدیها ی قارچی از مغزها جدا شده و سپس ۱۰ میکرولیتر از محلول سوسپانسیون کونیدی بر روی محیط کشت سابورو دکستروز آگار (Oxoid, UK) کشت داده میشوند. با نگهداری کشتها در دمای ۳۰ درجه بمدت ۵ روز تعداد کلنیهای آسپرژیلوس رشد کرده شمارش و با ضرب در عدد ۱۰۰ تعداد نهایی در یک میلی لیتر محاسبه و بصورت CFu/ml ثبت میگردند (۱۷).

مطابق با دستورالعمل CLSI (Clinical laboratory Standard Institute) برای سنجش میزان حساسیت دارویی با روش Broth dilution، ابتدا رقت های سریالی (Serial dilution) معادل ۱/۲، ۱/۴، ۱/۸ ، ۱/۱۶و ۱/۳۲ و ۱/۶۴

ازعصاره داروهای گیاهی تهیه شده در این مطالعه در داخل لوله آزمایش با استفاده از محیط کشت محلول Yeast extract broth استریل (pH معادل ۶) داخل لوله های آزمایش استریل تهیه شد (حجم نهایی برابر ۱ میلی لیتر) و برای مخلوط شدن کامل ورتکس گردیدند. سپس تمامی لوله ها را با ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون 1×10^{3} CFU/ml کونیدیهای قارچ آسپرژیلوس فلاووس استاندارد مولد آفلاتوکسین Aspergillus flavus PTCC 5006 آلوده و به مدت ۷۲ ساعت در حرارت ۳۰ درجه نگهداری می شوند.

پس از این مدت، رشد میکروارگانیسم با شاهد فاقد عصاره (کنترل منفی) مقایسه گردید. مقادیر MFC یا به عبارتی حداقل غلظت کشندگی کامل اسپورهای قارچ و MIC_{50} (حداقل غلظتی از عصاره که در آن به میزان نصف رشد قارچ درمقایسه با شاهد کنترل منفی) با کشت ۱۰۰ میکرولیتر از محلول مور آزمایش در لوله ها بر روی پلیت های حاوی محیط کشت سابورودکستروز آگار حاوی۱ /۱۰۰mg کلرامفنیکل (SC) و شمارش کلنی های جدا شده برروی پلیت تعیین میشود. میزان MFC را با کشت ۱۰۰ میکرولیتراز محلول داخل لوله های فاقد هر گونه رشد و دو غلظت قبل و بعد از لوله فاقد رشد آدر مقایسه با شاهد برروی محیط کشت سابورودکستروز آگار حاوی۱ /۱۰۰mg کلرامفنیکل تعیین میگردد.که در حقیقت حداقل غلظتی از عصاره ها است که در آن قارچ تیمار شده پس از انتقال به پلیت هیچ گونه رشدی از خود نشان ندهد.

البته لازم به ذکر است که جهت کنترل دقیق میزان MFC و MIC50 لازم است که چند رقت قبل و بعد مقدار تعیین شده علاوه بر ۷ تکرار مربوط به تحقیق مجدادآ نیز در چندین تکرار اضافی تر کشت داده تا از هر گونه خطای احتمالی جلوگیری شود ۱۷،۱۶).

لازم به ذکر است که از سیکلوهزامید (500mg/l) به عنوان کنترل مثبت شاهد (gold standard) و از آب مقطر استریل به عنوان کنترل منفی در این آزمایش استفاده میشود. در اینگونه مطالعات هر اسپور فعال و زنده (Viable) منجر به تولیدیک کلنی در سطح محیط کشت می شود (۱۷).

یافته ها

در مجموع مشاهده ماکروسکوپی مغزهای تیمار شده نشان داد که پوشش خوراکی حاوی عصاره هیدروالکلی دارچین دارای اثر ضد قارچی قوی درکنترل رشد قارچ مورد آسپرژیلوس فلاووس مولد آقلاتوکسین بر روی مغز بادام های آلوده شده بود که نتایج آن در جدول ۱ و ۲ و همچنین شکل ۱ آمده است.

جدول۱: تعداد کلنی های شمارش شده آسپرژیلوس فلاووس از کشت یک میلی لیتر (CFU/ml) محلول شستشوی مغز بادام های پوشش داده شده با عصاره دارچین

شماره تکرار	عصاره دارچین	کنترل منفی*	کنترل مثبت**
۱	۰	۱۵۶۰۰	۰
۲	۱	۱۸۴۰۰	۰
۳	۰	۲۰۰۰۰	۰
۴	۰	۱۴۸۰۰	۰
۵	۱	۱۶۰۰۰	۰
۶	۰	۱۸۴۰۰	۰
۷	۰	۲۰۰۰۰	۰

* آب مقطر استریل

** سیکلوهگزامید

جدول۲: میانگین و انحراف معیار تعداد کلنی های آسپرژیلوس فلاووس شمارش شده از کشت یک میلی لیتر (CFU/ml) محلول شستشوی مغز بادام های پوشش داده شده با عصاره دارچین

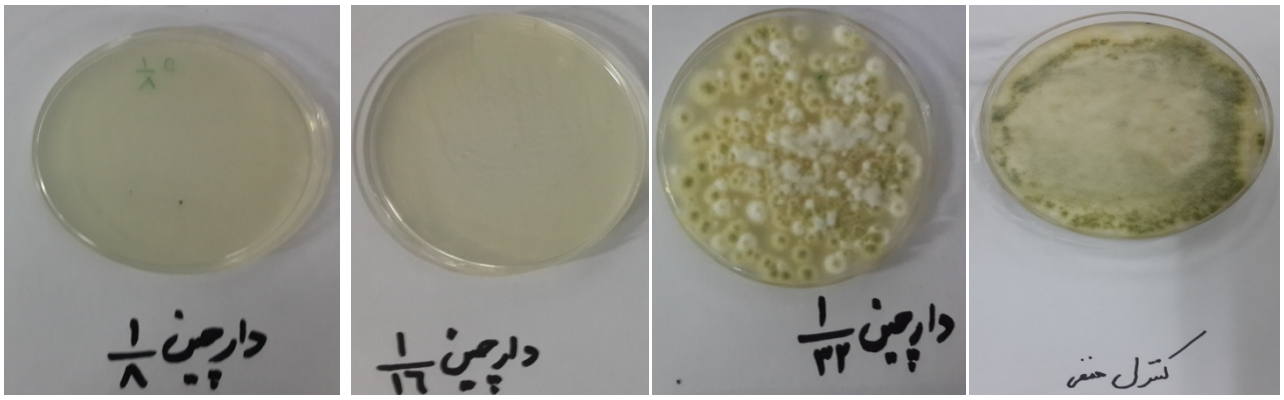
انواع پوشش خوراکی	تعداد تکرار	میانگین	انحراف معیار
دارچین	۷	۰/۲۸	۰
آب مقطر (منترل منفی)	۷	۱۷۶۰۰	۲۱۲۹/۲
سیکلوهگزامید (کنترل مثبت)	۷	۰	۰
جمع	۲۱	۴۱۵۴/۵	۶۹۰/۱

جدول ۳: مقادیر MFC و MIC_{50} عصاره های مورد مورد استفاده برای تیمار مغز بادام ها

میزان حساسیت	MFC		MIC_{50}	
عصاره دارچین*	رقت	غلظت (mg/100)	رقت	غلظت (mg/100)
مقدار	۱/۱۶	۰/۱۸۷	۱/۳۲	۰/۰۹۵

* لازم به ذکر است که نتیجه کشت محلول تیمار عصاره دارچین در دو رقت قبل MFC یعنی رقت های ۱/۸و ۱/۴ نیز صفر بود.

شکل ۱: میزان آلودگی مغز بادامهای تیمار شده و آلوده شده با اسپورهای قارچ آسپرژیلوس فلاووس در گروه پوشش خوراکی واجد کنترل منفی (راست)، کنترل مثبت سیکلوهگزامید (چپ) و عصاره دارچین (وسط)



شکل ۲: نتا یج حاصل از کشت رقتهای ۱/۸، ۱/۱۶، ۱/۳۲ عصاره دارچین و کنترل منفی در تست حساسیت دارویی

با انجام تست آماری T test تفاوت آماری کاملاً معنی داری (P=۰/۰۰۰۰۱) بین میانگین تعداد کلنی های جدا شده از کشت محلول شست و شوی مغزهای تیمار شده با عصاره دارچین و مغزهای گروه کنترل منفی آمد.

همانگونه که از شکل ۲ و جدول ۳ مشاهده میشود عصاره دارچین تا رقت ۱/۱۶ معادل غلظت ۱۸۷ میلی گرم درصد قادر به مهار کامل رشد قارچ آسپرژیلوش فلاووس بود که این رقت به منزله MFC تعیین گردید. ضمناً رقت ۱/۳۲ معادل ۹۴ میلی گرم درصد (۰/۰۹۴ گرم در صد) با توجه به شمارش کلنی های جدا شده در مقایسه با کنترل منفی به عنوان غلظت MIC_{50} در نظر گرفته شد.

بحث و نتیجه گیری

با توجه به خطرات ناشی از باقیمانده مواد شیمیایی که برای کنترل رشد قارچ ها در مواد غذایی استفاده می شود، در سال-های اخیر توصیه فراوانی به استفاده از گیاهان دارویی و مواد شیمیایی با زمینه

گیاهی بدین منظور شده است. همچنین به دلیل افزایش علاقه مردم به مصرف مواد طبیعی و نیز شیوع بیماریهای گوارشی، تنفسی و انواع سرطانها، تحقیقات گسترده ای جهت استفاده از اسانس ها و عصاره های گیاهان دارویی انجام گرفته است (۱۸). اسانس های بدست آمده از گونه های گیاهان معطر دارای مصارف زیادی در صنایع صابون سازی، عطرسازی، صنایع غذایی و غیره می باشند. این اسانس ها ترکیبات طبیعی حاوی مخلوطی از فلانوییدها و اجزای ترپنیک بوده که از قسمت های مختلف گیاهان استخراج می شوند و یکی از منابع بالقوه واجدترکیبات ضد باکتریایی و ضد قارچی می باشند و برای این منظور بسیار موثر و مفید هستند (۱۸). در حال حاضر علاقه فزاینده ای به گیاهان معطر و دارویی هم در زمینه صنعت و هم در زمینه تحقیقات علمی وجود دارد و علت آن خواص ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی این مواد است (۱۹،۱۸، ۱۱).

نتایج تحقیق حاضر نشان میدهد که پوشش خوراکی حاوی عصاره های هیدروالکلی با غلظت ۳٪ دارچین بطور کامل همانند کنترل مثبت (gold standard) یعنی محلول ۵۰۰mg/100 سیکلوهگزامید رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس را بر روی مغز بادام بطور کامل مهار کنند. در مجموع با انجام آزمایش سنجش میزان حساسیت قارچ مورد بررسی در برابر رقت های مختلف عصاره های مورد بررسی با روش Broth dilution در این مطالعه، مشخص شد که عصاره هیدروالکلی دارچین دارای قدرت مهار کنندگی آسپرژیلوس فلاووس در شرایط آزمایشگاهی دارد (جدول و شکل ۱).

دارچین از گیاهان دارویی طعم دهنده مورد علاقه و استفاده در بین مردم میباشد. علاوه بر طعم دهندگی مشخص شده که پوست درخت دارچین دارای فعالیت آنت اکسیدانت قوی نیز میباشد که مربوط به Cinamaldehyde به عنوان مهمترین و فراوانترین ماده موثره (۷۵٪) این گیاه می باشد و طعم شیرین آن مربوط به این ماده است. بعلاوه ترکیباتی مانند limonene, copaene, naphthalene, heptane, bicyclo[4.2.0]octa-1,3,5-triene and 2-propenal از سایر مواد موثره دارچین میباشد (۲۰).

دارچین همچنین به دلیل داشتن ترکیبات مؤثر سینام آلدئید و اوژنول خاصیت ضد میکروبی نیز دارد. سینامالدهاید از طریق اتصال گروه کربونیلی به پروتئین باکتری ها و ممانعت از دکربوکسیلاسیون اسیدهای آمینه، خاصیت ضدمیکروبی خود را اعمال می نمایند (۲۱).

علاوه بر این، در مطالعات مشابهی خاصیت ضدقارچی دارچین بر قارچ های آسپرژیلوس نیجر، آسپرژیلوس فومیگاتوس و آسپرژیلوس فلاووس نشان داده است که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد (۲۲).

Saleem و همکاران در مطالعه ای فعالیت ضد باکتریال و ضد قارچی عصاره دارچین بر علیه باکتریهای Bacillus subtilis, Escherichia coli, Pastrurella multocida and Straphylococcus aureus و قارچهایی مانند آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس نیجر نشان دادند (۲۰) که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد.

علاوه براین در مطالعات دیگری مانند مطالعات محمدی و همکاران (۱۱)، Soliman و همکاران (۲۳) نیز فعالیت ضد قارچی اسانس Cinnamomum zeylanicum (دارچین) را علیه جدایه های بالینیی آسپرژیلوس از جمله آسپرژیلوس فلاووس و آسپر ژیلوس نیجر با استفاده از روش Broth dilution مشابه روش استفاده شده در مطالعه حاضر نشان دادند که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارند.

علاوه بر خواص ضد قارچی عصاره دارچین بر روی قارچهای مولد آفلاتوکسین، موسوی آیت الهی و کاظمی نیز مشابه مطالعه حاضر فعالت ضد قارچی عصاره های گیاهان دارویی از جمله عصاره دارچین در شرایط برون تنی (آزمایشگاهی) بر روی قارچهای درماتوفیت عوامل کچلی نشان داده اند (۲۴).

Sumalan و همکاران در تحقیقی بر روی قارچهای آلوده کننده گندم از جمله گونه های قارچ فوزاریوم مولد سم (fumonisins)، اثر مهار کنندگی عصاره های گیاهان دارویی مانند دارچین، آویشن و گشنیز بر روی این قارچها در کنترل سموم و آلودگی گندم را نشان دادند (۲۵).

خواص ضد قارچی عصاره دارچین نه تنها بر علیه گونه های مختلف آسپرژیلوس بلکه بر علیه قارچهای بیماریزای گیاهی، Rhizoctonia solani، Fusarium oxysporum Phytophthora drechsleri و Bipolaris sorokiniana، نیز اثبات شده است، چنانکه عبدالملکی و همکاران قدرت مهار کنندگی عصاره هیدروالکلی این گیاه دارویی بر روی قارچهای مختلف از جمله گونه های آسپرژیلوس گزارش نموده اند که با نتایج حاصله از مطالعه حاضر همخوانی دارد (۲۶).

دارچین با طعم تند و تیز خود گرچه بیشتر در آشپزخانه استفاده می شود ولی از مصارف درمانی آن نباید غافل بود. این گیاه یکی از قدیمی ترین گیاهان دارویی است که در طب سنتی به عنوان دارویی مهم کاربرد داشته است. قسمت های مختلف این گیاه از جمله پوست آن خواص درمانی زیادی دارد به طوری که مصرف آن باعث تقویت قلب، معده و روده ها و بهبود فعالیت کلیه ها می شود.

در بررسی مطالعات و مقالات، مشاهده شده که خواص درمانی دارچین اثر بسیار موثری در پایین آوردن قند خون در دیابت نوع II داشته و سطح آنزیم های کبدی را تنظیم می کند (۲۷). ارزش دارویی این گیاه بیشتر به دلیل روغن فرار آن می باشد. ترکیبات اصلی این اسانس شامل سینامالدئید، اوژنول و سافرول فعالیتی شبیه به انسولین دارد و می تواند در درمان دیابت مفید باشد. همچنین تاثیر این ترکیبات در کاهش تری گلیسیرید، کلسترول و لیپو پروتئین با دانسیته پایین خون مثبت می باشد. دارچین به دلیل خاصیت ضد قارچی و ضد باکتریایی خود بر ضد انواع پاتوژن های مهم بدن از جمله اشرشیاکلی، هلیکوباکتر پیلوری، قارچهای کاندیدا از جمله کاندیدا آلبیکنس و گونه های کاندیدا مقاوم به فلوکونازول کاربرد دارد. مصرف این ادویه به دلیل خاصیت آنتی اکسیدانی قوی آن مانع اکسیداسیون مواد آلی بدن و سبب کاهش رادیکالهای آزاد آن می شود (۲۹، ۲۸).

نتایج مطالعه حاضر نشان می دهد که عصاره دارچین بصورت پوشش خوراکی قادر به مهار و کنترل رشد آسپرژیلوس فلاووس مولد آفلاتوکسین بر روی مغز بادام می باشد و این عصاره ها میتوانند جایگزین مناسبی برای نگهدارنده های شیمیایی در مواد غذایی به شمار روند. هر چند استفاده عملی از این عصاره ها نیاز مند بررسی های بیشتر اقتصادی، میکروبی و سم شناسی می باشد. با توجه به این که از این دانه های روغنی و آجیل ها از جمله بادام و پسته علاوه بر اینکه از اقلام مهم صادراتی و ارزآور می باشد، در تهیه بعضی از مواد غذایی از جمله انواعی از شیرینی ها استفاده می گردد. لذا جلوگیری از رشد این قارچها و کنترل آلودگی به سموم قارچی از جمله آفلاتوکسین در این دانه های درختی ضروری به نظر می رسد. تیمار مغز بادام با غوطه ور کردن در پوشش خوراکی حاوی عصاره دارچین میتواند در کنترل آلودگی قارچی از جمله قارچ آسپرژیلوس فلاووس موثر باشد. از امتیازات عصاره دارچین طعم و مزه قابل قبول و مناسبی است که در غذاها و شیرینی ایجاد می نماید و به نظر می رسد استفاده از آن استقبال شود.

References

1-Zare A. Survey the world market and export of Iranian almond. Research and reconstruction in agriculture and horticulture, 2008; 21(1):2-10

2-Salem G, Zare A. Evaluation of marketing and Almond comparative advantage in Yazd. Journal of Agricultural Economics Research, 2010; 2(2):73-90

3-Bayman P, Baker J L, and Mahoney N E. Aspergillus on tree nuts: incidence and associations. Mycopathologia. 2002; 155:161-9.

4-Williams JH, Phillips TD, Jolly PE, Stiles JK, Jolly CM, et al. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. Am J Clin Nutr 2004; 80:1106–1122

5-Henry SH, Bosch FX, Troxell TC, Bolger PM. Reducing liver cancer—global control of aflatoxin. Science 1999; 286:2453– 4.

6-Kenjo T, Ishideh Y, Aoyama K, Ichinoe M. Fungal Population and Distribution of Aflatoxigenic Fungi in Commercial Almond Powder Products. Journal of the Food Hygienic Society of Japan 2007; 48(4): 90-96

7-Dorman HJ, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. J. Appl Microbiol; 2000; 88(2): 308-16

8-Zomorodian K, Saharkhiz MJ, Rahimi MJ, Bandegi A, Shekarkhar G, Bandegani A,et al. Chemical composition and antimicrobial activities of the essential oils from three ecotypes of Zataria multiflora. Pharmacogn Mag. 2011;7(25):53-9

9-Fakour M, Alamah A, Rasooli A, Mazaheri M. Antifungal effect of Thymus eriocalyx **(**Ronniger**)** and Zataria multiflora essential oils on aflatoxin producer Aspergillus parasiticus. Quarterly Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research, 2007; 23(2): 269-77

10-Mohseni R, Nasolahi-Omran A, Noorbakhash f, Rezaei S, Hoseinjani H. Survey the the effect of licorice extract on gene adjustment and aflatoxin production by Real time PCR. Tarbiat moderes Journal of Medical Sciences and pathology, 2012; 15(3): 63-77

11-Javanmard M, Ramadan Y. The application of edible coatings with thyme alcoholic extract in inhibiting the growth of Aspergillus flavus on pistachio. Quarterly Journal of Medicinal Plants, 2010; 2(30): 61-70

12-Kalemba D, Kunicka A. Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. Curr Med Chem 2003; 10(10): 813-29.

13-Javanmard M. Shelf life of whey proteincoated pistachio kernel (Pistacia vera L.). Journal of Food Process Engineering. 2008; 31: 247 – 59

14-Mohammad R, Shokooeh-Amiri M, Mosavi M, Sepahvand A, Shams M, Yadegari M et al. Antifungal properties of Cinnamon essential oils against clinical isolates of Aspergillus. Quarterly journal of medicinal plants, 2010, 4(34): 66-75

15-Javanmard M. Shelf life of whey proteincoated pistachio kernel (Pistacia vera L.). Journal of Food Process Engineering. 2008; 31: 247 – 59

16-Galgiani JN, Rinaldi MG, Polak AM, Pfaller MA. Standardization of antifungal susceptibility testing. J Med Vet Mycol 1992; 30(Suppl 1): 213-24

17-Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2008). Reference Method for roth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi: Approved Standard- Second Edition. CLSI Document M38-A2. Wayne, PA: Clinicaland Laboratory Standards Institute.

18-Miller AB, Cates RG, Lawrence M, Soria JA, Espinoza LV, Martinez JV, Arbizu DA. The antibacterial and antifungal activity of essential oils extracted from Guatemalan medicinal plants. Pharm Biol. 2015; 53(4):548-54.

19-Sokmen M, Serkedjieva J, Daferera D and et al. Antimicrobial and Antiviral Activities of the essential oil and Various Extracts from Herbal Parts and Cullus Cultures of Origanum acutidens. J Agric Food Chem 2004; 52(11): 3309-12.

20-Saleem M, Bhatti HN, Jilani M, Hanif MA. Bioanalytical evaluation of Cinnamomum zeylanicum essential oil. Nat Prod Res. 2015;29(19):1857-9

21-Prasad KN, Yang B, Dong X, Jiang G, Zhang H, Xie H, et al. Flavonoid contents and antioxidant activities from cinnamun spesies. Innovative Food Sci Emerg Tech 2009; 10: 627-32.

22-Singh HB, Srivastava M, Singh AB, Srivastava AK. Cinnamon bark oil, a potent fungitoxicant against fungi causing respiratory tract mycoses. Allergy 1995; 50: 995-9

23-Soliman KM, Badeaa RI. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. J Food and Chemical Toxicology 2002; 40(11): 1669-75

24-Ayatollahi Mousavi SA, Kazemi A. In vitro and in vivo antidermatophytic activities of some Iranian medicinal plants. Med Mycol. 2015;53(8):852-9.

25-Sumalan RM1, Alexa E, Poiana MA. Assessment of inhibitory potential of essential oils on natural mycoflora and Fusarium mycotoxins production in wheat. Chem Cent J. 2013; 14;7(1):32-38

26-Abdolmaleki M, Salary M, Bahram-nejad SAbasi S. Antifungal effect of cinnamon crude extract of on some plant pathogenic fungi. 2009, 44(3): 255-361

27-Dashti-Rahmatabady M, Vahidi-Mehrjardy A, Pillahvaran A, Farzan F. Survey the effect of cinnamon extract on chronic pain in rats using formalin test. Shahid Sadoughi Journal of Yazd medical sciences, 2010, 17(2): 57-66

28-Kobar S. Evaluation of antifungal effects of thyme and marjoram herbal extracts against clinical isolates of fluconazole resitance Candida albicans, Medicinal plants, 2007; 6(1):53-62

29-Wang GS, Deng JH, Ma YH, Shi M, Li B. Mechanisms, clinically curative effects, and antifungal activities of cinnamon oil and pogostemon oil complex against three species of Candida. J Tradit Chin Med. 2012;32(1): 19-24.

Evaluation the inhibitory effect of edible films from Cinnamomum zeylanicum extracts against aflatoxigenic Aspergillus flavus on Almonds kernel

Mosavy Ahmadabady ES (MS.c)[1], Jafari A A(Ph.D) [2], Seifaty SM(Ph.D)[3], Jafari H (Pharm.D)[4]

1. M.Sc Student in Microbiology, Department of Biology, Ashkezar Branch, Islamic Azad University, Ashkezr, Yazd, Iran
2. Corresponding Author: Professor, Department of Medical Parasitology and mycology, Shahid Sadoughi University of Medical sciences Yazd Iran
3. Assistant Professor, Department ofBiology, Ashkezar Branch, Islamic Azad University, Ashkezr, Yazd, Iran
4. Pharmacy student, Shahid Sadoughi University of Medical sciences Yazd Iran

Abstract

Introduction: Aflatoxins are the most common and dangerous mycotoxins produced by species of Aspergillus and penicillium grow on a wide range of human and animal food. This group of mycotoxins has disorder and risks, including the induction of liver cancer. According to disadvantages for several physical and chemical methods, there are recently great deals of interest in the use of herbal extracts for control of fungal growth and aflatoxin contamination on food. The main aim of this study was to evaluate the effect of Cinnamomum zeylanicum extract on growth inhibition of aflatoxin-producing Aspergillus flavus on Almonds' kernel.

Methods: In current experimental lab-trial study almond kernel samples were randomly selected for study. Almond kernel samples were firstly immersed in edible coating containing 3% hydro-alcoholic of Cinnamomum zeylanicum extract and then contaminated with 1×10^3 aflatoxin producer A. flavus conidial suspensions. The extracts' inhibitory properties were evaluated using with enumeration of viable and cultivable fungal conidia on almond washing solutions. Finally MFC and MIC_{50} values of herbal extracts were measured by preparing of their serial dilutions that contaminated with fungal conidial suspensions using CLSI standard broth dilution method.

Results: In general, the macroscopic observation of Almond kernel treated with edible coating of 3% Cinnamomum zeylanicum extracts showed full control of fungal growth. Statistical T test showed significant differences between the mean isolated colonies from culture of washing solutions from test and control samples (P= 0.0001). The MFC and MIC_{50} values value for Cinnamomum extract was concentration of 187 and 94 mg/100 respectively.

Conclusion: Results of present study showed that edible coating of Cinnamomum extracts was been effective in controlling of A. flavus colonization on Almond kernels. However, the practical uses of these extracts require more, antimicrobial, toxicology and economic studies.

Keywords: Almond, Aspergillus flavus, Aflatoxin, Edible coating, Cinnamomum zeylanicum