تأثیر نانو ذرات لیپیدی جامد حاوی اسانس آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) بر بازدارندگی از رشد عوامل پوسیدگی قارچی *Aspergillus niger*، *Aspergillus ochraceus* و *Aspergillus flavus*

محبوبه ناصری[۱]، حسین آروئی[۲*]، شیوا گل محمدزاده[۳]، محمودرضا جعفری[۳] و حسین نعمتی[۲]

۱- دانش آموخته دکتری علوم باغبانی دانشگاه فردوسی مشهد.
۲- به ترتیب دانشیار و استادیار گروه علوم باغبانی و مهندسی فضای سبز دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد.
۳- به ترتیب دانشیار و استاد مرکز تحقیقات نانوفناوری دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مشهد.
* مسئول مکاتبه E-mail: aroiee@ferdowsi.um.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۴/۳/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۵/۴/۱

چکیده

استفاده از اسانس گیاهان دارویی به منظور کنترل عوامل بیماریزای گیاهی با مشکلاتی مانند ناپایداری، تبخیر و تجزیه در مقابل شرایط محیطی و شیمیایی روبرو است. به منظورمرتفع کردن مشکلات استفاده از اسانس آویشن شیرازی و افزایش کارایی آن در کنترل عوامل بیماریزای قارچی (*Aspergillus flavus, Aspergillus niger* و *Aspergillus ochraceus*) از سیستم حامل نانوذارت لیپیدی جامد استفاده شد. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار به روش اختلاط اسانس و نانوذرات لیپیدی جامد حاوی اسانس با محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار با چهار غلظت ۲۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرولیتر اسانس بر لیتر محیط کشت بود. نانوذرات لیپیدی جامد حاوی اسانس با استفاده از امواج فراصوت تهیه شد. اندازه نانوذرات لیپیدی جامد حاوی اسانس تهیه شده کمتر از ۲۰۰ نانومتر، شاخص پراکندگی ۰/۴۸۳، پتانسیل زتا ۴۲/۶- میلی‌ولت و شکل نانو ذرات نیز کروی بود. حداقل غلظت بازدارنده برای اسانس به فرم آزاد در گونه *A. niger* ۲۰۰ میکرولیتر بر لیتر و برای گونه‌های *A. ochraceus* و *A. flavus* ۳۰۰ میکرولیتر بر لیتر بود. همچنین حداقل غلظت بازدارنده برای نانوذرات لیپیدی جامد حاوی اسانس برای تمامی گونه‌های قارچی ۲۰۰ میکرولیتر بر لیتر بود. بر اساس این نتایج نانو ذرات لیپیدی جامد حاوی اسانس نسبت به فرم آزاد اسانس باعث افزایش ۳۸ درصدی بازدارندگی بر روی رشد عوامل بیماریزای قارچی مورد آزمایش شدند. این نتایج نشان داد نانوذرات لیپیدی جامد می‌تواند حامل مناسبی برای اسانس آویشن شیرازی در جهت افزایش کارایی و کنترل عوامل پوسیدگی *A. ochraceus*، *A.flavus* و *A.niger* باشد.

واژه های کلیدی: نانوذرات لیپیدی جامد، حداقل غلظت بازدارنده، اسانس، گونه‌های آسپرژیلوس.

مقدمه

اسانس‌های گیاهی، مخلوط‌های پیچیده‌ای از ترکیبات فرار هستند که توسط میکروارگانیسم‌های زنده تولید توسط روش‌های فیزیکی چون عصاره‌گیری و تقطیر از همه گیاه، یا بخش‌هایی از گیاه بدست می‌آیند. مدت‌های مدیدی است که خواص ضد میکروبی اسانس‌ها شناخته شده است، اسانس‌ها علاوه بر خاصیت ضدمیکروبی، دارای اثرات ضد قارچی، ضد ویروسی، ضد انگلی هستند (تاج کریم و همکاران ۲۰۱۰). علی‌رغم تمامی مزایای ذکر شده، اسانس گیاهان دارویی با مشکلاتی مانند ناپایداری، تبخیر و تجزیه در مقابل شرایط محیطی و شیمیایی (نور، اکسیژن، رطوبت، PH) روبرو است (دانسی و همکاران ۲۰۱۱). در همین ارتباط یکی از روش‌های پیشرفته جهت مرتفع کردن مشکلات ناشی از تبخیر اسانس‌ها در مقیاس نانو، کپسوله کردن آنهاست. در این روش

ماده مؤثره در مقیاس نانو در داخل یک محفظه یا پوسته کوچک بسته‌بندی می‌گردد، به این معنی که اسانس مورد نظر با ماده دیگری پیوند شیمیایی برقرار می‌کند و یا بطور فیزیکی در داخل یک ماده دیگر قرار می‌گیرد و این ترکیبات خاص محتوی اسانس در طول زمان از طریق آبگیری، هیدرولیز، فرسایش و تجزیه توسط میکروارگانیسم‌ها یا انتشار از طریق فشار اسمزی، جدا شدن مکانیکی یا طرق مناسب دیگر رهاسازی می‌شوند.

نانوکپسول‌ها علاوه بر اینکه باعث محافظت خوب و مناسب از اسانس‌های گیاهان دارویی در مقابل عوامل تجزیه کننده، تأثیر منفی بر فعالیت ضدمیکروبی آنها ندارند. همچنین سیستم‌های کپسوله کردن اسانس در مقیاس نانو به دلیل اندازه کوچکتر از سلول، ممکن است ضمن افزایش مکانیزم جذب غیر فعال سلولی، باعث کاهش مقاومت انتقال و درنتیجه افزایش فعالیت ضدمیکروبی شوند. در همین ارتباط وو و همکاران (۲۰۱۲) با استفاده از نانوذرات پروتئین گیاهی ذرت تیمول و کارواکرول را کپسوله کردند و توانستند خواص ضد میکروبی این ترکیبات را افزایش دهند.

برای کپسوله کردن ترکیبات اسانس گیاهان دارویی روش‌های مختلفی وجود دارد که یکی از مهم‌ترین آنها سیستم حاملی به نام نانوذرات لیپیدی جامد[1] می باشد. نانوذرات لیپیدی جامد سیستم‌های حامل کلوئیدی-هستند که هرچند مشابه نانوامولسیون‌ها هستند ولی از نظر نوع لیپید تفاوت عمده ای با آن‌ها دارند بطوریکه در امولسیون لیپید مایع بکا می‌رود در حالی که در نانوذرات لیپیدی جامد از لیپید های جامد مانند تری گلیسرید، اسید چرب (اسید استئاریک- اسید پالمیتیک)، استروئید (کلسترول) و موم (ستیل پالمیتیک) استفاده می‌شود (اکامبارام و همکاران ۲۰۱۱). نانوذرات لیپیدی جامد در سال ۱۹۹۱ جایگزین دیگر حامل های کلوئیدی رایج مانند امولسیون، لیپوزوم و میکرو پلیمرها شدند. اندازه آن‌ها بین ۵۰ تا ۱۰۰۰ نانومتر است. نانوذرات لیپیدی جامد قادرند پایداری و حلالیت اسانس را در آب افزایش دهند (شی و همکاران ۲۰۱۲). در همین راستا لای و همکاران (۲۰۰۶) کاهش فراریت و تبخیر اسانس آرتمیزیا[2] را با استفاده از نانوذرات لیپیدی جامد (SLN) گزارش نمودند. به طور کلی به کارگیری نانوذرات لیپیدی جامد به عنوان سیستم حامل اسانس گیاه دارویی دارای مزایایی مانند حفاظت اسانس محصور شده در مقابل فراریت و تبخیر، دارا بودن خصوصیات فیزیکی-شیمیایی مناسب، قابلیت رهایش اسانس به صورت تدریجی و کنترل شده، افزایش خواص ضد میکروبی اسانس، زیست تجزیه پذیر بودن اجزاء لیپیدی آن، افزایش دسترسی زیستی[3] ترکیبات زیست فعال[4] و عدم سمیت برای موجودات زنده می باشد که اهمیت استفاده از این ترکیب را آشکارتر می‌کند (فتحی و همکاران ۲۰۱۲ و اکامبارام و همکاران ۲۰۱۱ و ویز و همکاران ۲۰۰۹ و لای و همکاران ۲۰۰۶).

در بین ترکیبات موجود در اسانس گیاهان دارویی تیمول و کارواکرول دو ترکیبی هستند که دارای فعالیت ضدقارچی و ضدباکتریایی قوی می‌باشند (باچلا و همکاران ۲۰۰۹ و بورت ۲۰۰۴). در همین ارتباط آویشن شیرازی[5] گیاهی درختچه‌ای معطر از تیره نعناع است که در بین ترکیبات شناسایی شده آن تیمول و کارواکرول دو ماده مهم و عمده آن می‌باشد، بطوریکه تا ۷۸ درصد نیز مقدار این دو ماده در اسانس آویشن شیرازی گزارش شده است (شافعی و جاوید نیا ۱۹۹۷).

[1] Solid Lipid Nanoparticle (SLN)

[2] *Artemisia arborescens* L.
[3] Bioavailable
[4] Bioactive
[5] *Zataria multiflora*

گونه‌های قارچ آسپرژیلوس روی گستره وسیعی از محصولات کشاورزی و مواد غذایی رشد نموده و از عوامل پوسیدگی پس از برداشت میوه‌ها و سبزی‌ها می‌باشند (بارکای گولان ۲۰۰٤) همچنین با تولید متابولیت سمی وسرطان‌زایی[1] به نام آفلاتوکسین[2] موجب آلودگی آن‌ها می‌شوند. آفلاتوکسین بسیار سمی بوده و حد مجاز آن در محصولات کشاورزی در اغلب کشورها ٥ تا ١٥ نانو گرم در واحد وزن خشک ماده مشخص شده است (افشاری و همکاران ۱۳۹۲).

در ایران و جهان پژوهش های اندکی در زمینه تأثیر نانوذرات لیپیدی جامد بر کنترل قارچ‌های بیماریزای گیاهی انجام شده است و بیشتر تحقیقات انجام شده در جهت کپسوله کردن اسانس گیاهان دارویی با اهدافی مانند داروسازی، صنایع غذایی، بهداشتی و غیره بوده است. در همین راستا این تحقیق با هدف انجام مطالعات پایه‌ای، امکان مرتفع کردن ناپایداری اسانس گیاه دارویی آویشن شیرازی و افزایش کارایی آن با استفاده از سیستم حامل نانوذارت لیپیدی جامد در کنترل گونه‌های قارچی *A.ochraceus* و *A. flavus* و *A.niger* که جزو عوامل پوسیدگی محصولات کشاورزی می باشند، انجام پذیرفت.

مواد و روش

تهیه و شناسایی ترکیب‌های تشکیل دهنده اسانس‌ها

اسانس آویشن شیرازی از شرکت داروسازی باریج اسانس تهیه شد. سپس ترکیبات اسانس با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی[3] شناسایی شد.

تهیه جدایه های قارچ

جدایه‌های قارچ‌های *A.niger* , *A. ochraceus* و *A. flavus* از بخش تحقیقات گیاه پزشکی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی تهیه شد.

سنتز نانوذرات لیپیدی جامد حاوی اسانس آویشن شیرازی

تهیه نانو ذرات لیپیدی جامد (SLN) به روش امواج فراصوت با فشار کششی بالا انجام شد. برای تهیه SLN به این روش به دو فاز لیپیدی و آبی نیاز است. فاز چربی فرمولاسیون شامل گلیسیریل مونو استئارات[4] و پرسیرول[5] است که پس از دستیابی به فرمولاسیون نهایی اسانس نیز وارد همین فاز می‌شود. فاز آبی شامل توئین ۸۰ یا پولوکسامر۱۸۸ به همراه آب می‌باشد. بعد از توزین مواد مورد نیاز فرمولاسیون (لیپید، آب و امولسیون کننده) با درصدهای مشخص (جدول۱)، فاز لیپیدی و آبی هرکدام به طور جداگانه در دو فالکون مجزا داخل بن‌ماری قرارداده شد،جهت ذوب فاز چربی و هم دما شدن دو فاز داخل بن‌ماری با دمای $80^{\circ}C$ قرار داده شدند در این مرحله ابتدا اسانس به فاز چربی اضافه شده و پس از یک دقیقه دو فاز را از بن‌ماری خارج کرده و فاز آبی به سرعت و به طور ناگهانی به فاز چربی اضافه شد. در این مرحله امولسیون سفید رنگی تشکیل شد (در هر بار حجمی برابر ۲۰ سی سی نمونه تهیه شد) و سپس با دستگاه هموژنایزر[6] یکنواخت شد. شد. بعد از هموژناسیون، ترکیب به دستگاه پروب سونیکاتور[7] منتقل شد. سپس مخلوط در دمای محیط قرار داده شد تا کاملاً سرد شده و با محیط هم‌دما

[1]Carcinogeni
[2]Aflatoxin
[3]Gas Chromatography (GC)

[4]Glyceril monostearate
[5]Precirol
[6]DIAX900
[7]Prob Sonicator

شود تا ذرات لیپیدی جامد تشکیل شود (گل محمدزاده و همکاران ۲۰۱۲).

تعیین اندازه ذره‌ای و پتانسیل زتا

برای بررسی اندازه ذره‌ای از دستگاه موسوم به اندازه‌گیر ذرات[1] استفاده شد. به این صورت که ۱۰ میکرولیتر از نمونه تازه تهیه شده که خنک شده است در یک میکروتیوب با حجم ۱/۵ میلی‌لیتر ریخته و با ۹۹۰ میکرولیتر فاز بیرونی یعنی آب دیونیزه رقیق شد (۱ به ۱۰۰). دستگاه، اندازه ذره‌ای را برحسب تعداد[2]، حجم[3] و شدت[4] بیان می‌کند. پتانسیل زتا به سطح هیدرودینامیکی نسبت داده می‌شود و بار سطحی برای سطح جامد-مایع تعریف می‌شود با استفاده از دستگاه اندازه‌گیر ذرات پتانسیل زتا اندازگیری شد (مادر و مهنرت ۲۰۰۵).

بررسی ریخت‌شناسی ذرات لیپیدی جامد نانو با میکروسکوپ الکترونی

برای عکسبرداری و بررسی ریخت‌شناسی نانوذرات لیپیدی جامد از میکروسکوپ الکترونی عبوری[5] (واقع در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه فردوسی فردوسی مشهد) استفاده شد. هر نمونه حدود ۵۰ برابر با آب مقطر رقیق گردید، سپس ۲۰ میکرولیتر از آن به گریدهای با کربن پوشش داده شده، منتقل و پس از ۳۰ ثانیه به وسیله فیلتر کاغذی خشک شد. در مرحله بعد ۲۰ میکرولیتر از محلول اورانیل استات ٪۲ در آب، روی گرید منتقل و مجدداً پس از ۳۰ ثانیه با فیلتر کاغذی خشک شد. نمونه‌ها پس از خشک شدن کامل، در زیر میکروسکوپ الکترونی بررسی شدند (جورز و همکاران ۲۰۰۴).

بررسی فعالیت ضد قارچی اسانس آویشن در شرایط درون شیشه‌ای[6]

به منظور ارزیابی اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات لیپیدی جامد حاوی اسانس آویشن در ممانعت از رشد جدایه‌های متعلق به گونه‌های *A. niger* , *A. ochraceus* و *A. flavus* آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار در شرایط درون شیشه‌ای اجرا شد. فاکتورهای آزمایش شامل نوع فرمولاسیون اسانس آویشن شیرازی (فرم آزاد و فرم بارگذاری شده در نانوذرات لیپیدی جامد)، و غلظت‌های مختلف فرمولاسیون (۰، ۲۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرولیتر بر لیتر) بود. فلاسک‌های حاوی محیط کشت به مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو (دمای ۱۲۱ درجه و فشار ۱/۵ اتمسفر) استریل شدند. مقادیر مختلف اسانس‌آویشن شیرازی و نانوذرات لیپیدی جامد حاوی اسانس آویشن شیرازی (۲۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میکرولیتر در لیتر اسانس در محیط کشت دکستروز آگار) به فلاسک‌های حاوی محیط دکستروز آگار در دمای ۴۵-۴۲ درجه سانتی‌گراد افزوده شد و با به هم زدن مخلوط تا حصول یکنواختی کامل و تقسیم آنها در ظروف پتری نه سانتی‌متری، غلظت‌های مورد نظر تهیه شد. سپس با استفاده از یک چوب پنبه سوراخ کن، دیسک‌هایی به قطر ۵ میلی متر از میسلیوم‌های کشت ۱۰ روزه از هر کدام از گونه‌ها تهیه و در شرایط سترون به صورت معکوس در روی محیط کشت هر تکرار قرار داده شد و ظروف پتری با استفاده از پارافیلم درزگیری شدند. اندازه‌گیری قطر پرگنه قارچ-ها در زمان پر شدن ظروف پتری در تیمار شاهد با رشد قارچ (حدود ۱۲ روز) صورت گرفت و درصد ممانعت از رشد میسلیوم قارچ‌های مورد نظر در هر یک از غلظت‌های آزمایشی با استفاده از فرمول ۱ زیر

[1]Particle size analyzer
[2]Number
[3]Volume
[4]Intensity
[5]Transition Electron Microscope (TEM)

[6]In vitro

جدول ۱- اجزاء فرمولاسیون جهت سنتز SLN.

فاز	اجزاء فرمولاسیون	درصد مقادیر(وزنی- حجمی)
فاز چربی	70% Glecirin+30% percirol	۵٪
	Toween 80+ Poloxamer 188	۱/۲۵٪+۱/۲۵٪
فاز آبی	Water	تا ۱۰۰٪

محاسبه و معیار مقایسات قرار گرفت (اوزدن و بایندیریل ۲۰۰۲):

IP=dc-dt×100/dc

در این فرمول :

IP= درصد بازدارندگی، dc= قطر کلنی قارچ در تیمار شاهد و dt= قطر کلنی قارچ در تیمار اسانس

حداقل مقدار بازدارنده[1]، کمترین غلظت از اسانس است که بطور کامل از رشد قارچ جلوگیری کند (ناصری و همکاران ۲۰۱۵)، به همین جهت در آزمایش حاضر کمترین غلظتی که باعث بازدارندگی کامل (۱۰۰ درصد) از رشد گونه‌های قارچی شد به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی در نظر گرفته شد.

تجزیه آماری

آنالیز آماری با نرم افزار MSTATC و مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد. شکل‌ها نیز با نرم افزار Excel رسم شدند.

نتایج و بحث

ترکیبات موجود در اسانس

با بررسی طیف‌های GC محاسبه اندیس‌های بازداری و مقایسه طیف‌های جرمی ترکیب‌ها با ترکیب-های استاندارد، ۲۱ ترکیب مختلف در اسانس آویشن شناسایی شد که ترکیب‌های عمده آن به ترتیب تیمول[2] (۳۵/۳۱ درصد)؛ کارواکرول[3] (۳۳/۹ درصد)؛ پی‌سیمن[4] سیمن[4] (۹/۸۹درصد)؛ گاماترپینن[5] (۵/۸۸ درصد) و آلفاپینن[6] (۴/۲۲ درصد)، آلفا ترپینن[7] (۱/۲۶ درصد) و ترنس کاریوفیلن[8] (۱/۱۲ درصد) بودند.

بررسی اندازه[9]، شاخص پراکندگی[10] و پتانسیل زتا[11] زتا[11] نانوذرات لیپیدی حاوی اسانس

میانگین اندازه ذره و توزیع آن اغلب یکی از مهم-ترین پارامترهای مرتبط با کیفیت است که سایر خواص ماکروسکوپی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. اندازه ذره‌ای نانوذرات لیپیدی به وسیله پارامترهای مختلفی مانند ترکیب فرمولاسیون، روش‌های تولید و شرایط محیط (مانند زمان، حرارت، فشار، تعداد سیکل، تجهیزات) تحت تأثیر قرار می‌گیرد. در همین ارتباط در آزمایش حاضر میانگین اندازه ذره‌ای[12] ۲۸۴ نانومتر، شاخص پراکندگی ۰/۴۸۳ و پتانسیل زتا ۴۲/۶- میلی-ولت بود (شکل۱).

بررسی ریخت‌شناسی نانوذرات لیپیدی جامد با میکروسکوپ الکترونی

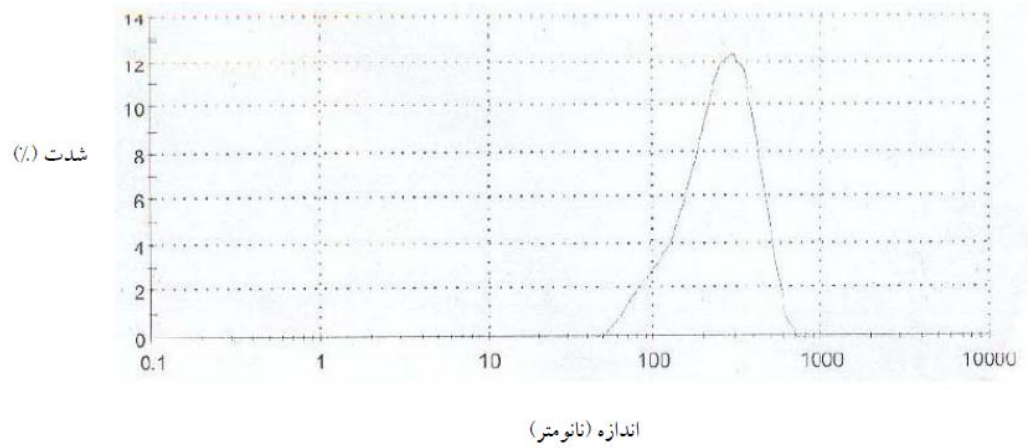
نتایج حاصل از عکس‌های میکروسکوپ الکترونی نشان داد که اندازه ذره‌ای ذرات کمتر از ۲۰۰ نانومتر بوده و شکل ذرات تقریبا کروی است (شکل۳). کروی بودن نانو ذرات لیپیدی جامد باعث می‌شود که این ذرات بیشترین توانایی را جهت آزاد سازی کنترل شده و محافظت از اسانس احتباس یافته داشته باشند. زیرا شکل کروی دارای طولانی‌ترین مسیر جهت حرکت اسانس محبوس در نانو ذره و همچنین کمترین سطح

[1]Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

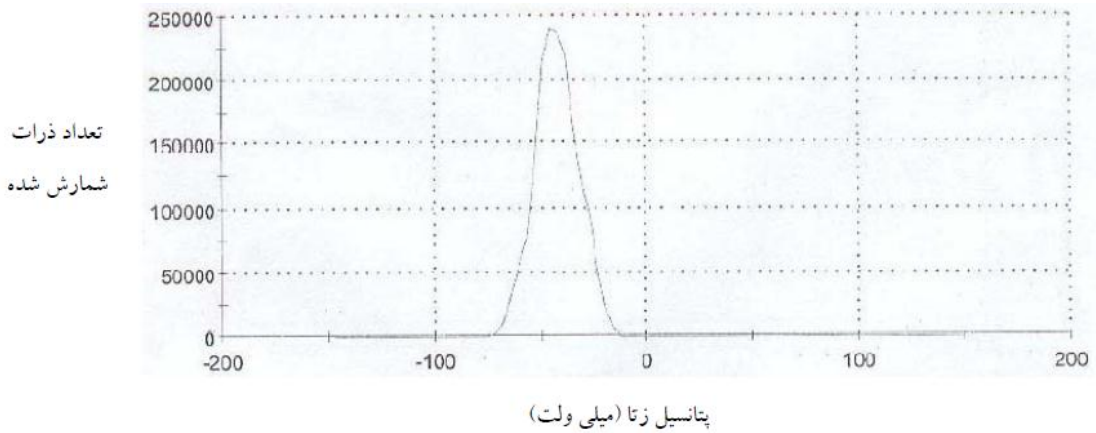
[2]Thymol
[3]Carvacrol
[4]p-Cymene
[5]Gamma-Terpinene

[6]Alpha-Pinene
[7]Alpha-Terpinene
[8]Trans-Caryophyllene
[9]Particle size
[10]Polydispersion index PDI
[11]Zeta Potential
[12]Z-average

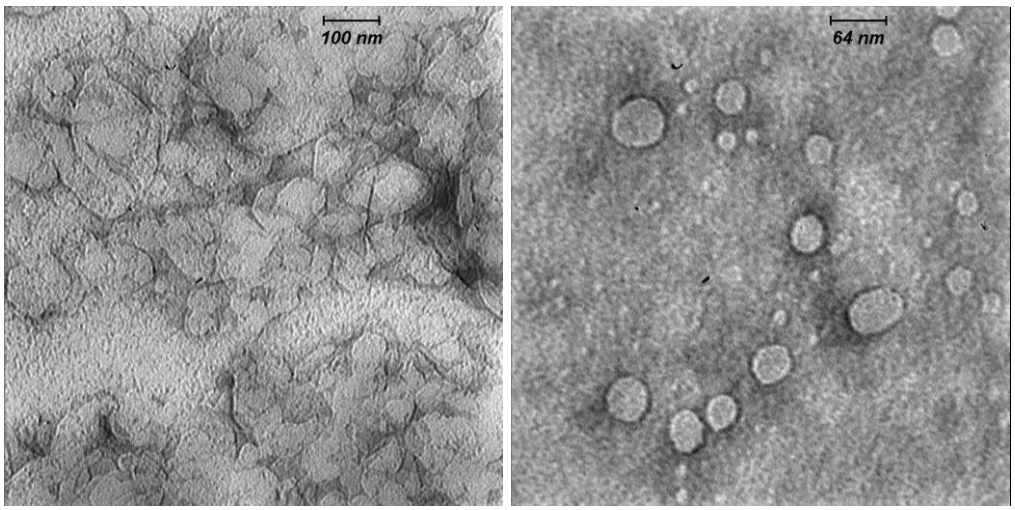
تماس با محیط آبی فاز پراکنده، نسبت به سایر اشکال نانوذرات می باشد (بانجز ۲۰۰۵).



شکل۱- توزیع اندازه (Size) نانوذرات لیپیدی جامد (نانومتر) بر اساس شاخص شدت (Intensity) فرمولاسیون تهیه شده با ۵٪. لیپید (گلیسیرین منواستئارات و پرسیرول) و ۲/۵٪ سورفکتانت (توئین۸۰ و پولوکسامر۱۸۸).



شکل۲- توزیع پتانسیل زتا (Zeta Potential) (میلی ولت) بر اساس کل ذرات شمارش شده (Total Counts) نانوذرات لیپیدی جامد حاوی اسانس آویشن شیرازی تهیه شده با ۵٪. لیپید (گلیسیرین منواستئارات و پرسیرول) و ۲/۵٪ سورفکتانت (توئین۸۰ و پولوکسامر۱۸۸).



شکل۳- عکس میکروسکوپ الکترونی TEM از SLN حاوی اسانس آویشن شیرازی (بزرگنمایی ۱۶۰۰۰۰ برابر).

بازدارندگی رشد کلنی قارچ‌های مورد آزمایش

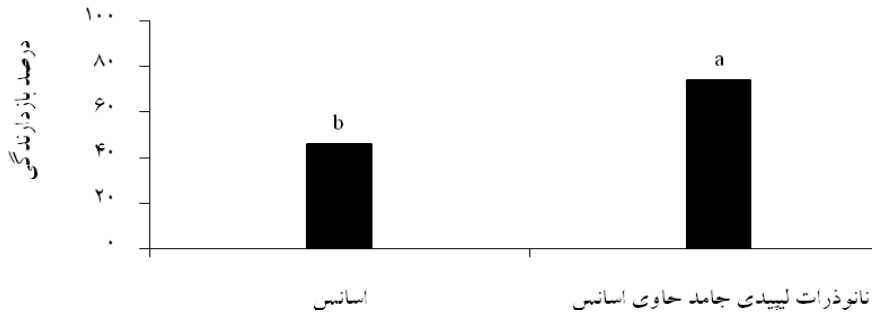
بر اساس نتایج آزمایش، تفاوت اثر فرمولاسیون‌های مختلف اسانس (فرم آزاد اسانس و فرم نانوذرات لیپیدی حاوی اسانس) بر درصد بازدارندگی از رشد قارچ‌های مورد آزمایش، معنی‌دار ($P\leq 0.01$) بود (جدول۲). بدین ترتیب که میانگین درصد بازدارندگی فرم آزاد اسانس و نانو ذرات لیپیدی جامد حاوی اسانس به ترتیب ٤٦ و ٧٤ درصد بود (شکل٤).

در همین راستا مشاهدات محققان بوسیله میکروسکوپ الکترونی نشان داده‌اند که اسانس گونه‌ای از آویشن (*Thymus patula*) باعث تغییر و اختلال در سیستم‌های درونی قارچ *Botrytis cinerea* و همچنین سبب تجزیه چین‌خوردگی‌های غشای داخلی میتوکندری، جدا شدن غشاء سیتوپلاسمی از دیواره سلولی و تجزیه آن، از هم پاشیدگی پوشش هسته و زبر و خشن شدن شبکه آندوپلاسمی می‌شوند (سویلو و همکاران ۲۰۰٦ و دبیلربک و همکاران ۲۰۰۱ و لامبرت و همکاران ۲۰۰۱ و حسنی و همکاران ۱۳۸۸). محمودی و همکاران (۱۳۹۰) گزارش کردند حداقل غلظت بازدارنده عصاره آویشن شیرازی برای بازدارندگی کامل از رشد قارچ *Alternaria alternate* ۵۰۰ پی‌پی‌ام می‌باشد. گندمی و همکاران (۲۰۰۹) حداقل غلظت بازدارندگی عصاره آویشن شیرازی را برای جلوگیری از رشد قارچ *A. flavus* ٤۰۰ میکرولیتر بر لیتر محیط PDA تعیین کردند. اثرات اسانس علیه رشد و تولید اسپور و تشکیل آفلاتوکسین توسط قارچ *A. flavus* بررسی شد. نتایج نشان داد غلظت ۱۵۰ میکرولیتر بر لیتر اسانس، رشد میسیلیوم و تجمع آفلاتوکسین را به ترتیب ۹۰ و ۹۹/٤ درصد کاهش داد (گندمی و همکاران ۲۰۰۸ و گندمی و همکاران ۲۰۰۹). در آزمایش حاضر به نظر می‌رسد کوچکتر شدن اندازه ذرات اسانس و توزیع بهتر آن در نانوذرات لیپیدی جامد حاوی اسانس منجر به افزایش جذب اسانس در سلول شده و در نتیجه فعالیت ضدمیکروبی افزایش گردید، شاید به همین دلیل میانگین درصد بازدارندگی از رشد قارچ‌های مورد مطالعه نانو ذرات لیپیدی جامد حاوی اسانس (٧٤ درصد) از میانگین درصد بازدارندگی فرم آزاد اسانس (٤٦ درصد) بیشتر بود (شکل ٤). اثر اسانس و نانوذرات لیپیدی جامد حاوی اسانس آویشن شیرازی بر گونه‌های قارچی معنی‌دار بود ($P\leq 0.01$) بطوریکه اسانس و نانوذرات لیپیدی جامد حاوی اسانس بر قارچ *A. ochraceus* (۷۰ درصد) از بیشترین بازدارندگی و بر قارچ *A. flavus* از کمترین بازدارندگی (۵۰ درصد) برخوردار بود (شکل۵).

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس درصد بازدارندگی فرمولاسیون اسانس از رشد عوامل قارچی ***A.niger*** ***A. ochraceus*** و ***A. flavus***

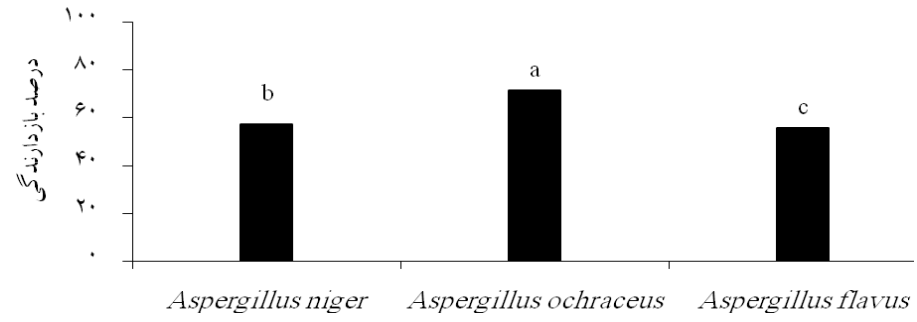
منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
A غلظت	۳	۱۷٦۳٤***
B فرمولاسیون اسانس (اسانس و نانوذرات لیپیدی جامد حاوی اسانس)	۱	۲۲٦٤۹***
AB غلظت× فرمولاسیون اسانس	۳	۲۰۳٤***
خطا	۱٦	٦/٤
C گونه قارچ	۲	۳۹۱۵***
AC غلظت ×گونه قارچ	٦	۸۳۷***
BC فرمولاسیون اسانس× گونه قارچ	۲	۱۰٦۸***
ABC غلظت× فرمولاسیون اسانس× گونه قارچ	٦	۵۹٤***
خطا	۳۲	۷
کل	۷۱	

*** معنی دار در سطح احتمال ۰/۰۰۱



شکل٤- مقایسه تأثیر نانوذرات لیپیدی جامد حاوی اسانس و اسانس آزاد بر درصد بازدارندگی از رشد گونه‌های قارچی ***A. niger*** , ***A. ochraceus*** و ***A. flavus***

ترکیبات مربوط به اسانس‌های مشابه می توانند در مقابل طیف گسترده‌ای از گونه‌های میکروارگانیسم فعالیت کنند اما درجه این فعالیت بستگی به نوع گونه میکروبی و اسانس مورد استفاده متفاوت است. با توجه به تنوع فراوان در گونه‌های مختلف جنس آسپرژیلوس (بلالی و همکاران ۱۳۸٦)، احتمالاً سازوکارهای دفاعی آنها نیز متفاوت بوده و درنتیجه می‌توان انتظار داشت که آستانه تأثیرپذیری هر قارچ نسبت به مواد ضد قارچی و شیب تغییرات رشد نسبت به مقدار ماده موثره متفاوت باشد.



شکل٥- تأثیر نانوذرات لیپیدی جامد حاوی اسانس و اسانس آزاد آویشن شیرازی بر بازدارندگی از رشد گونه‌های قارچی ***A. niger*** , ***A. flavus*** و ***A ochraceus***

نتایج آزمایش حاضر نشان داد (جدول۳ و ٤) حداقل مقدار بازدارنده برای اسانس به فرم آزاد در گونه قارچی *A. niger* ۲۰۰ (میکرولیتر بر لیتر) و برای گونه‌های قارچی *A. ochraceus* و *A. flavus* ۳۰۰ (میکرولیتر بر لیتر) بود. همچنین حداقل غلظت بازدارنده برای نانوذرات لیپیدی جامد حاوی اسانس برای تمامی گونه‌های قارچی ۲۰۰ میکرولیتر بر لیتر بود. از طرف دیگر اسانس‌های مختلف و یا اجزاء اسانس که از گونه‌های یک جنس حاصل شده‌اند، برای کنترل یک عامل یکسان، حداقل غلظت بازدارنده متفاوتی داشته‌اند. در آزمایش حاضر نیز اختلاف معنی دار ($P\leq 0.05$) بین حداقل غلظت بازدارنده در گونه‌های سه قارچ مشاهده شد (شکل٥). در توجیه استفاده از حامل های کلوئیدی در اندازه‌ی ذره‌ای نانومتر، می‌توان به بر هم کنش بهتر این سامانه‌ها با قارچ‌ها اشاره نمود. در ساخت این حامل‌ها از لیپیدهای جامدی استفاده می‌شود که با تکنیک‌های خاصی تهیه

می‌گردند. به این نوع حامل‌ها، نسل اول نانو ذرات لیپیدی گویند. از مزایای این حامل‌ها، آزادسازی آهسته ماده موثره و خاصیت مسدودکنندگی است (ویسسینگ و مولر۲۰۰۲)، ضمن اینکه ماده موثره قرارگرفته در داخل خود را نیز از تخریب محافظت می‌کنند (تیراناچایدیکول و همکاران ۲۰۰۷). در مطالعاتی که انجام شده است مشاهده شده که استفاده از گلیسرین مونو استئارات در فاز لیپیدی موجب افزایش احتباس ماده موثره می‌شود (ویویک و همکاران ۲۰۰۷). در این مطالعه نیز از گلیسرین مونو استئارات به عنوان لیپید استفاده شد (جدول۱). امولسیون کننده مورد استفاده در ترکیب نانو ذرات لیپیدی جامد، به نوع لیپید بستگی دارد (گولبرت و همکاران ۲۰۰۳). با توجه به مطالعاتی که در تهیه نانو ذرات لیپیدی جامد از گلیسرین مونو استئارات به عنوان لیپید استفاده شده است، سورفاکتانت توئین ۸۰، ذراتی با بهترین اندازه ذره‌ای و کم‌ترین پراکنش را فراهم می‌آورد. پس در این طرح از گلیسرین مونو استئارات به عنوان فاز لیپیدی و از توئین ۸۰ به عنوان سورفاکتانت استفاده شد چون از نظر اندازه ذره‌ای و پراکنش بهترین حالت را ایجاد نمودند. برای افزایش هموژنسیته و کاهش اندازه ذرات از دستگاه هموژنایزر استفاده شد (گولبرت و همکاران ۲۰۰۳).

با توجه به اثرات بارز و ویژه اسانس‌ها بر روی گونه‌های قارچی گیاهی، اسانس‌ها می‌توانند جایگزین-های مناسبی برای قارچکش‌ها به منظور کاهش مواد شیمیایی باشند. مشکل اصلی در استفاده از اسانس‌ها ناپایداری آن‌ها در مقابل نور، هوا، رطوبت و دمای بالاست که می‌تواند منجر به تبخیر سریع آن‌ها شده و کارایی آن‌ها را کاهش دهد (لرتاستیتاکورن و همکاران ۲۰۰۸). لذا قرارگیری اسانس‌های روغنی درون فرآورده‌های نانومولسیون از طریق افزایش طول عمر اسانس و همچنین افزایش سطح تماس اسانس با میکروب منجر به افزایش فعالیت ضد میکروبی آنها می‌شود. نحوه اثر سیستمهای نانومولسیونی بر روی فعالیت ضد میکروبی اسانس‌ها با بررسی حداقل غلظت بازدارندگی مشخص می‌شود (سائوپدرو و همکاران ۲۰۱۳). نتایج حداقل غلظت بازدارندگی فرمولاسیون حاوی گلیسرین مونو استئارات، توئین، آب و اسانس نسبت به فرم آزاد اسانس نشان می‌دهد که این غلظت علیه دو گونه قارچی *A. ochraceus* و *A . flavus* به میزان دوبرابر کاهش یافته است. در حقیقت نانو ذرات لیپیدی جامد با توجه به اندازه بزرگتری که نسبت به میکروب‌ها دارند، می‌توانند به خوبی سطح آن‌ها را پوشش دهند و کاملاً میکروب را احاطه نمایند. از طرفی نانو ذرات لیپیدی جامد مانع از تبخیر اسانس می‌گردند زیرا اسانس درون این سیستم‌های کلوییدی انکپسوله گردیده و لذا سرعت تبخیر آن کاهش پیدا می‌کند، بنابراین فرصت بیشتری برای تماس با میکروب‌ها دارد و لذا می تواند اثر بهتری نسبت به فرم آزاد از خود بروز دهد.

بر اساس مطالعه لی و همکاران (۲۰۱۲)، فرمولاسیون نانو ذرات کپسوله شده حاوی تیمول علیه *Escherichia coli* و *Salmonella* فعالیت مناسب آنتی باکتریایی مشاهده شده است. در مطالعه انجام شده توسط واتاناساتکا و همکاران (۲۰۱۲) نانو ذرات حاوی تیمول، فعالیت آنتی‌باکتریایی مناسبی علیه باکتری‌های استافیلوکوک اورئوس (*Staphylococcus aureus*)، پسودوموناس آئروژینوزا (*Pseudomonas aeruginosa*) و *Escherichia coli* داشته است (گومز و مورینا ۲۰۱۱ و واتاناساتکا و همکاران ۲۰۱۲ و لی و همکاران ۲۰۱۲).

به طور کلی نانو ذرات لیپیدی جامد با استفاده از خصوصیات انحصاری از جمله اندازه ریز ذرات، نفوذ بهتر، محافظت اسانس در برابر عوامل شیمیایی و محیطی و آزادسازی کنترل شده قادرند باعث افزایش خواص ضد قارچی اسانس شوند به طوری که حداقل غلظت بازدارنده اسانس را بر گونه‌های قارچی مورد

مطالعه کاهش داد و اثر بخشی مناسبی بر آن‌ها داشت. لیپیدی جامد می تواند حامل مناسبی برای اسانس بر اساس نتایج این تحقیق می توان گفت نانو ذرات آویشن شیرازی باشد.

جدول۳- نتایج مقایسه میانگین تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس و نانوذرات لیپیدی جامد حاوی اسانس آویشن شیرازی (میکرولیتر بر لیتر) بر درصد بازدارندگی از رشد گونه‌های قارچی *A. ochraceus* , *A. niger* و *A. flavus*

نوع فرمولاسیون	غلظت (میکرولیتر بر لیتر)	*A. niger*	*A. ochraceus*	*A. flavus*
اسانس آزاد	۲۰	۰ k	۳۰ h	۰ k
	۵۰	۰k	٤۱ g	۰ k
	۱۰۰	۰ k	۵۰ f	۱۱ j
	۲۰۰	۱۰۰ a	۷۸ d	۷۸ d
	۳۰۰	۱۰۰ a	۱۰۰ a	۱۰۰ a
نانو ذرات لیپیدی جامد حاوی اسانس	۲۰	٤۸ f	٤۲ g	۹ j
	۵۰	٦۹ e	٦۹ e	۱٦ i
	۱۰۰	۸٦ c	۹۲ b	۸۳ c
	۲۰۰	۱۰۰ a	۱۰۰ a	۱۰۰ a
	۳۰۰	۱۰۰ a	۱۰۰ a	۱۰۰ a

میانگین‌های دارای حرف مشابه بر اساس آزمون LSD اختلاف معنی‌داری ($P\leq 0.05$) با یکدیگر ندارند.

جدول٤- حداقل غلظت بازدارنده (میکرولیتر بر لیتر) فرم آزاد اسانس و نانوذرات لیپیدی جامد حاوی اسانس آویشن شیرازی بر درصد بازدارندگی از رشد گونه‌های قارچی *A. ochraceus* , *A. niger* و *A. flavus*

گونه قارچی	*A. niger*	*A. ochraceus*	*A. flavus*
حداقل مقدار بازدارنده (MIC) فرم آزاد اسانس (میکرولیتر برلیتر)	۲۰۰	۳۰۰	۳۰۰
حداقل مقدار بازدارنده (MIC) نانوذرات لیپیدی حاوی اسانس (میکرولیتر برلیتر)	۲۰۰	۲۰۰	۲۰۰

منابع

افشاری، ح، م افشاری، غ ر باقری، و ق لایی. ۱۳۹۲. بررسی اثر میدان مغناطیسی ایستا و زمان بر رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس و تولید آفلاتوکسین B1. فصلنامه علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی زابل. ۵ (٤): صفحه های ۱۰ تا ۱۵.

بلالی، غ، ا ع مینایی فر، ب شریف نبی، ۱۳۸٦. تنوع زایموگرافی پکتیناز در قارچ‌های *Aspergillus flavus* و *Aspergillus niger*. مجله زیست شناسی ایران. (۱) ۲۰ : صفحه‌های ۵ تا ۱٤.

حسنی ع، جلیلی مرندی ر و قوستا ی، ۱۳۸۸. استفاده از اسانس‌های گیاهی برای کنترل بیماری کپک خاکستری (*Botrytis cinerea*) میوه‌های گلابی. مجله علوم باغبانی ایران، دوره ٤٠، شماره۱. صفحه‌های ۸۵ تا ۹٤.

محمودی، ا، ا ر احمدی و د نادری.۱۳۹۰، بررسی مکانیسم سمیت عصاره آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) بر رشد قارچ *Alternaria alternate*. ششمین همایش ملی ایده های نو در کشاورزی، ۱۱ و ۱۲ اسفند، دانشگاه آزاد اسلامی خوراسگان.

Bacchella R, A.Testoni, and A. Lo Scalzo, 2009. Influence of genetic and environmental factors on chemical profile and antioxidant potential of 84 commercial Strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duchesne). Electronical Journal of environmental, Agricultural and Food Chemistry 8 (4): 230-242.

Barkai-Golan R, 2004. Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables: Development and Control. 1st Edn, Elsevier Science B.V Amsterdam.

Burt S, 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. International Journal of Food Microbiology 94: 223-253.

Bunjes H, 2005. Characterization of Solid Lipid Nano- and Microparticles. In: Lipospheres in drug targets and delivery. Edited by Nastruzzi C, pp: 41-66. Florida: CRC press.

De Billerbeck VG, Roques CG, Bessiere JM, Fonvieille J, and Dargent R, 2001. Effects of *Cymbopogon nardus* (L.) W. Watson essential oil on the growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. Canadian Journal of Microbiology 47: 9-17.

Donsi F, Annunziata M, Sessa M, and Ferrari G, 2011. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. Food Science and Technology 44:1908-1914.

Ekambaram P, Abdul Hasan Sathali A, and Priyanka K, 2011. Solid Lipid Nanoparticles: A Review. Scientific Reviews & Chemical Communications Journal 2(1):80-102.

Fathi M, Mozafari M. R, and Mohebbi M, 2012. Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. Trends in Food Science & Technology 23: 13-27.

Gandomi H, Misaghi A, AkhondzadehBasti A, Khosravi A, Bokaei S, Abbasifar A, 2008. Effectsof Zataria multiflora Boiss.essential oil on *Aspergillus flavus*. Journal of Medicinal Plants 7:45–51.

Gandomi H, Misaghi A, Akhondzadeh A, Bokaei S, Khosravi A, Abbasifar A, and Jebelli A, 2009. Effect of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil on growth and aflatoxin formation by *Aspergillus flavus* in culture media and cheese. Food Chemical Toxicology 47: 2397–2400.

GolmohammadzadehS, Mortezania S, Jaafari MR, 2012. Improved photostability, reduced skin permeation and irritation of isotretinoin by solid lipid nanoparticles. Acta Pharmaceutica 62(4): 547-562.

Gomes C, Moreira R.G, 2011. Castell-Perez E. Poly (DL-lactide-coglycolide) (PLGA) Nanoparticles with Entrapped trans-Cinnamaldehyde and Eugenol for Antimicrobial Delivery Applications. Journal Food Science 76: 16-24.

Gualbert J, Shahgaldian P, and Coleman AW, 2003. Interactions of amphiphilic calyx arene-based solid lipid nanoparticles with bovine serum albumin. International Journal of Pharmaceutics 257: 69-73.

Jores K, Mehnerta W, Drechslerb M, Bunjesc H, Johannd C, and Mäder K, 2004. Investigations on the structure of solid lipid nanoparticles (SLN) and oil-loaded solid lipid nanoparticles by photon

correlation spectroscopy, field-flow fractionation and transmission electron microscopy. Journal of Controlled Release 9: 217-227.

Lai F, Wissing S A, Müller R H, and Fadda A A, 2006. *Artemisia arborescens* L Essential Oil–Loaded Solid Lipid Nano particles for Potential Agricultural Application: Preparation and Characterization. American Association of Pharmaceutical Scientists 7 (1): 10-18.

Lambert RJW, Skandamis PN, Coote PJ, and Nychas GJE, 2001. A study of the minimum concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. Journal of Applied Microbiology 91: 453-462.

Li KK, Yin S-W, Yang X-Q, Tang C-H, and Wei ZH, 2012. Fabrication and Characterization of Novel Antimicrobial Films Derived from Thymol-Loaded Zein–Sodium Caseinate (SC) Nanoparticles. Journal of Agricultural and Food Chemistry 60: 11592-11600.

Lertsatitthanakorn P, Taweechaisupapong S, Aromdee C, Khunkitti W, 2008. Antibacterial Activity of citronella oil solid lipid particles in oleogel against Propionibacterium acnes and its chemical stability. International Journal of Essential Oil Therapeutics 2: 167-171.

Mader K. and Mehnert W, 2005. Solid lipid nanoparticles-concepts, procedures and physicochemical aspects. In: Lipospheres in drug targets and delivery. Edited by Nastruzzi C, pp: 1-22. Florida: CRC press.

Nasseri M, Arouiee H, Golmohammadzadeh S ,Jaafari MR, and Neamati H, 2015. Antifungal effects of *Zataria multiflora* essential oil on the inhibitory growth of some postharvest pathogenic fungi. Notulae Scientia Biologicae7(4):412-416.

Özden Ç, and Bayindirli L , 2002. Effects of combinational use of controlled atmosphere, cold storage and edible coating applications on shelf life and quality attributes of green peppers. Food Research Technology 21:320 – 326.

Sao Pedro A, Espirito Santo I, Silva C V, Detoni C, and Albuquerque E, 2013. The use of nanotechnology as an approach for essential oil-based formulations with antimicrobial activity. Microbial Pathogens and Strategies for combating them 1: 293-294.

Shafiee A, and Javidnia K, 1997. Composition of essential oil of *Zataria multiflora*. Plant Medicin 65: 371-372.

Shi F, Zhao J, Liu Y, Wang Z, Zhang Y, and Feng N, 2012. Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles loaded with frankincense and myrrh oil. International Journal of Nanomedicine 7: 2033–2043.

Soylu EM, Soylu S, and Kurt S, 2006. Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. Mycopathologia Journal 161: 119-128.

Tajkarim MM, Ibrahim SA, Cliver DO, 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. Food Control 21: 1199-1218.

Teeranachaideekul V, Souto EB, Junyaprasert VB, and Muller RH, 2007 Cetylpalmitate-based NLC for topical delivery of Coenzyme Q10: Development, physicochemical characterization and in-vitro release studies. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 67: 141–148.

Vivek K, Reddy H, and Murthy RS, 2007. Investigations of the effect of the lipid matrix on drug entrapment, in vitro release, and physical stability of olanzapine-loaded solid lipid nanoparticles. American Association of Pharmaceutical Scientists 8: 16-24.

Wattanasatcha A, Rengpipat S, and Wanichwecharungruang S, 2012. Thymol nanospheres as an effective anti-bacterial agent. International Journal of Pharmaceutics 434: 360-365.

Weiss J, Gaysinsky S, Davidson M, and McClements J, 2009. Nanostructured Encapsulation Systems: Food Antimicrobials. Global Issues in Food Science and Technology 24: 425- 479.

Wissing SA, and Muller RH, 2002. The influence of the crystallinity of lipid57- nanoparticles on their occlusive properties. International Journal of Pharmaceutics 242: 377-379.

Wu Y, Luo Y, and Wang Q, 2012. Antioxidant and antimicrobial properties of essential oils encapsulated in zein nanoparticles prepared by liquideliquid dispersion method. Food Science and Technology 48:283-290.

Effect of Solid Lipid Nanoparticle Containing Essential Oil of *Zataria multiflora* on the inhibitory growth of *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus*

M Nasseri[1], H Arouiee[*2], Sh Golmohammadzadeh[3], M R Jaafari [4] and H Neamati [5]

[1]PhD Student of Horticultural Science, Ferdowsi University of Mashhad, Iran
[2]Associate Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran
[3]Associate Professor, School of Pharmacy, University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
[4]Professor, Nanotechnology Research Center, School of Pharmacy, University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
[5]Assistant Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran
*Corresponding author:aroiee@ferdowsi.um.ac.ir

Received:15 Jun 215 Accepted:21 May 2016

Abstract

In order to dismiss the problems of using *Zataria multiflora* essential oil (instability, evaporation, and decomposition against environmental and chemical conditions) and increase its efficiency in controlling pathogenic fungi (*Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, and *Aspergillus ochraceus)*, a system carrying Solid Lipid Nanoparticles (SLNs) was used. The experiment was arranged using the completely randomized design (CRD) with three replications by mixing the essential oil and essential oil-load SLNs with potato dextrose agar (PDA) medium at four concentrations of 20, 50, 100, and 200 ppm. This experiment was performed in Nanotechnology Research Center, Pharmacy Department in Mashhad University of Medical Sciences and Department of Horticulture, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad. The essential oil-loaded SLNs were prepared high-tensile pressure homogenization together with ultrasonic waves. Results of particle size determination showed a mean size of 284 nm, PdI 0/483 and a ZP of – 42/6 mv and SLNs were spherical as shown by TEM. Furthermore, the minimum inhibitory concentration under *in vitro* conditions for the free form of essential oil in the *A. ochraceu*, *A. flavus* was 300 μlL^{-1} and for *A.niger* was 200 μlL^{-1}. For the essential oil-loaded SLNs, it was 200 μlL^{-1}. Essential oil-loaded SLNs increased 38% inhibitory growth of pathogenic fungi than free form of essential oil. Result indicated that SLNs were appropriate carriers for *Z. multiflora* essential oil to increase its efficiency in controlling of *A. niger*, *A. flavus*, and *A. ochraceus.*

Keywords: Essential oil, Minimum inhibitory, Solid lipid nanoparticle, Aspergillus species.