www.rifst.ac.ir/jrifst.aspx
نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی
سال ۱۳۹۲، جلد ۲، شماره ۱، صفحات ۹۲-۷۹

JRIFST

مطالعه اثر ضد باکتریایی عصاره سلولی حاصل از کشت درون‌شیشه‌ای زیره سیاه (*Bunium persicum*) و مقایسه آن با عصاره حاصل از بذر و اسانس

سارا خسروی‌نیا[۱]، سید مهدی زیارت نیا[۲*]، عبدالرضا باقری[۳]، سید حسن مرعشی[۴]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۲- استادیار گروه زیست فناوری مواد غذایی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی
* نویسنده مسئول (m.ziaratnia@rifst.ac.ir)
۳- استاد گروه بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۴- دانشیار گروه بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

چکیده

در سال‌های اخیر استفاده از گیاهان دارویی در درمان بیماری‌ها به علت مقاومت باکتری‌ها به داروهای شیمیایی رونق یافته است. در این تحقیق اثر ضد باکتریایی عصاره‌های آبی و اتانولی حاصل از کشت سلولی زیره سیاه با استفاده از روش‌های براث ماکرو دایلوشن و انتشار در آگار بر روی باکتری‌های *Staphylococus aureus*، *Escherichia coli* و *Bacillus subtilis* بررسی و با عصاره‌های بذری و رقت‌های مختلف اسانس مقایسه شد. این آزمایش در دو تعداد cfu/ml $۱۰^{۶}$ و $۱۰^{۷}$ از باکتری‌ها انجام شد و از دو آنتی‌بیوتیک جنتامایسین (۱۰ میکروگرم) و تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم) به عنوان شاهد مثبت و حلال‌ها به عنوان شاهد منفی استفاده شد. نتایج نشان داد که حداقل غلظت بازدارنده (MIC) برای اسانس حاصل از بذر زیره سیاه در دامنه ۳/۱۲ تا ۶/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، برای عصاره حاصل از کشت سلولی ۱۲/۵ تا ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و برای عصاره حاصل از بذر ۲۵ تا ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بدست آمد. اثر بازدارندگی تیمارها بر روی باکتری *S. aureus* نسبت به دو باکتری دیگر بیشتر است. همچنین با افزایش تعداد باکتری‌های *S. aureus* و *B. subtilis* اثر بازدارندگی تیمارها کاهش یافت ولی این موضوع در *E. coli* دیده نشد. اثرات بازدارندگی عصاره‌های سلولی حاصل از کشت درون‌شیشه‌ای بر باکتری‌های انتخابی کمتر از اسانس خالص و بیشتر از عصاره‌های بذری و رقت‌های مختلف اسانس بود و لذا به نظر می‌رسد کشت سلولی زیره سیاه روش مناسبی برای تولید ترکیبات ضد باکتریایی باشد.

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۰/۱۶
تاریخ پذیرش: ۹۲/۰۳/۰۶

واژه‌های کلیدی
اثرات ضد باکتریایی
اسانس
کشت
سوسپانسیون سلولی
عصاره
Bunium persicum

مقدمه

یکی از مهمترین چالش‌های درمانی، مقابله با بیماری‌های عفونی به دلیل شیوع و گسترش بالای آن‌ها است. پس از شناسایی پنیسیلین در دهه ۴۰ میلادی و گسترش استفاده از آن، هر روزه آنتی بیوتیک‌های جدیدی برای درمان عفونت‌ها ارائه شد. نتیجه این امر گسترش استفاده بالینی آنتی بیوتیک‌های طبیعی و سنتتیک در درمان عفونت‌ها بود. استفاده بی رویه از این داروهای ضد میکروبی منجر به افزایش مقاومت‌های دارویی در اکثر باکتری‌ها شد (Weinstine, 2001). همین موضوع یکی از دلایل استفاده رو به رشد از گیاهان به عنوان مواد طبیعی کم

خطر، در دسترس و ارزان قیمت، نسبت به آنتی بیوتیک‌های سنتتیک، در درمان عفونت‌های باکتریال بوده است (مشکی باف و همکاران، ۱۳۸۹).

زیره سیاه (*Bunium* (Boiss.) B. Fedtsch.) *persicum* گیاهی است دو لپه، متعلق به خانواده Apiaceae که در نواحی شمالی خراسان، کرمان و شرق زاگرس می‌روید (قهرمان، ۱۳۷۲). این گیاه علفی، چند ساله، گل‌آذین آن از نوع چتر مرکب، میوه نیام و به رنگ خاکستری قهوه‌ای می‌باشد. بذرهای آن دارای ۴ تا ۷ درصد اسانس می‌باشند که حاوی ترکیبات ارزشمندی نظیر کومین آلدئید، گاما- ترپینن، پارا- سیمن، بتا- پینن، آلفا- پینن، میرسن و لیمونن است (مقتدر و همکاران، ۱۳۸۸). اسانس زیره سیاه به عنوان طعم‌دهنده در صنایع غذایی کاربرد دارد و از خواص دارویی آن می‌توان به افزایش ترشح شیر، کاهش دهنده قند خون، اشتها آوری، هضم کننده، رفع اسپاسم‌های معده و اثرات ضد سرطانی، ضد تشنج، ضد حشره و ضد آسم آن اشاره کرد (مقتدر و همکاران، ۱۳۸۸).

گزارش‌های متعددی در خصوص اثرات ضد میکروبی اسانس و عصاره‌های گیاهی مختلف به وسیله محققان گزارش شده است. به عنوان مثال مومنی و زمان‌زاده (۱۳۸۸)، به بررسی خاصیت ضد باکتری عصاره خام، آبی و الکلی پیاز و زنجبیل در برابر *Staphylococus aureus*، *Pseudomonas aeroginosa*، *Escherichia coli* و *Candida albicans* پرداختند. نتایج بررسی آن‌ها نشان داد که عصاره الکلی زنجبیل بیش از سایرین، رشد میکروبی را مهار می‌کند و *P. aeroginosa* حساسیت زیادی به عصاره پیاز و زنجبیل نشان داد. در تحقیق دیگری اثرات ضد باکتریایی ۱۰ عصاره گیاهی علیه *Helicobacter pylori* صورت گرفت. نتایج آن نشان داد که عصاره‌های گیاهی حاصل از شیرین بیان، مریم گلی، افسنطین و شیطان زیتون دارای اثرات مهار کنندگی بر رشد باکتری‌ها هستند (شیرازی و همکاران، ۱۳۸۲).

بررسی اثرات ضد میکروبی اسانس هفت گونه گیاهی روی برخی باکتری‌های بیماری‌زا که توسط چلبیان و همکاران (۱۳۸۲) صورت گرفت، نشان داد که اسانس‌های حاصل از بخش‌های هوایی گیاهان مورد مطالعه دارای اثرات آنتی باکتریال قابل توجهی هستند. بررسی‌هایی در مورد فعالیت ضد میکروبی اسانس تعدادی از گونه‌های تیره نعناع نیز صورت گرفت که اثرات بازدارنده این گیاهان بر روی میکروارگانیسم‌های مورد استفاده را مورد تایید قرار داد و در این بین، *Thymus numidicus* از بقیه موثرتر بود (Kabuche et al., 2005). همچنین اثر ضد میکروبی اسانس *B. persicum* بر روی نژادهای استاندارد *S. aureus*، *E. coli*، *Salmonella typhi* و *Shigella dysentriae* بررسی و به اثبات رسید (Syed and Hanif, 1985). خاصیت ضد باکتریایی اسانس زیره سبز نیز علیه برخی از باکتری‌های پاتوژن گیاهی گزارش شده است (Iacobellis et al., 2005). همچنین اثر ضد میکروبی اسانس *Carum carvi*، در تحقیقی بر روی ۶ باکتری گرم مثبت و گرم منفی مورد بررسی قرار گرفت، که نتایج نشان داد بر روی باکتری‌های *S. aureus*، *E. coli*، *S. epidermidis* اثر ضد باکتریایی دارد (طالعی و همکاران، ۱۳۸۶).

در سال‌های اخیر تولید متابولیت‌های ثانویه از طریق کشت سلول‌های گیاهی به صورت یک رویکرد مهم در تحقیقات کشت سلولی درآمده است، به طوری که در بعضی موارد میزان متابولیت‌های ثانویه موجود در کشت درون شیشه‌ای خیلی بیشتر از میزان آن در گیاه کامل بوده است و یا گاهی سلول‌های کشت شده، متابولیت‌هایی تولید می‌کنند که در گیاه اولیه تولید نمی‌شود (Ziaratnia et al., 2009; Mewis et al., 2011).

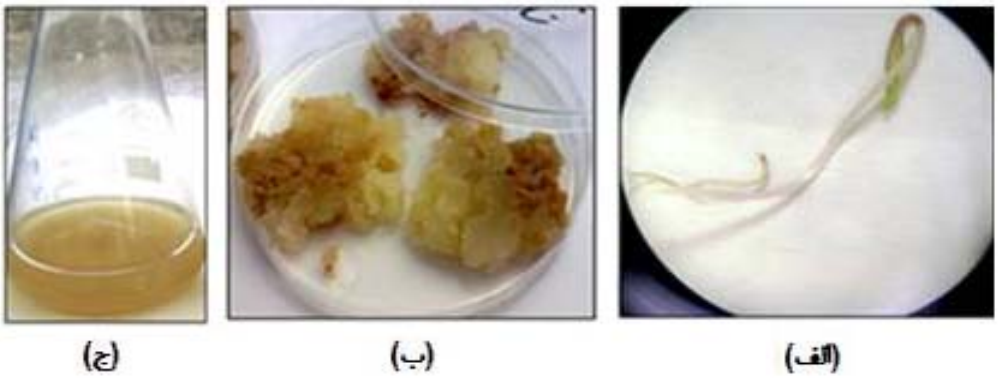
استقرار کشت سلولی گیاهان دارویی امکان تولید ترکیبات ضد باکتریایی را در شرایط درون‌شیشه‌ای فراهم می‌کند (Chintalwar et al., 2003). به عنوان مثال اثرات ضد باکتریایی عصاره سلولی حاصل از کشت سوسپانسیون *Ricinus communis* بررسی و اثبات شده است (Rahman and Bari, 2013). همچنین اثرات بازدارندگی عصاره متانولی کالوس و سلول *Cleome rosea* بر روی ۱۹ باکتری مختلف بررسی و گزارش شده است (Simoes-Gurgel et al., 2012).

با توجه به گزارش‌های متعدد در مورد بررسی خواص ضد میکروبی عصاره‌های حاصل از کشت سلولی در گیاهان مختلف (Villarreal et al., 1997; Haghbeen et al., 2011)، این تحقیق با هدف بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره‌های آبی و اتانولی حاصل از سلول‌های کشت سوسپانسیون زیره سیاه با دو روش دیسک دیفیوژن و چاهک پلیت و در دو تعداد cfu/ml 10^6 و 10^7 از سه باکتری *S. aureus*، *E. coli* و *Bacillus subtilis* و مقایسه آن با عصاره‌های بذری و اسانس انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی، القای کالوس و 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. مراحل طی شده از جوانه‌زنی بذر تا استقرار کشت سوسپانسیون سلولی مطابق با روش ذکر شده توسط Khosravinia و همکاران (۲۰۱۲) به صورتی که در شکل ۱ آمده است، صورت گرفت.



شکل ۱- بذر جوانه‌زده زیره سیاه در محیط کشت ساده حاوی ساکارز و آب آگار پس از گذشت ۲ ماه (الف)، تشکیل کالوس کامل پس از ۳ ماه در محیط کشت MS جامد حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BA (ب) و استقرار کشت سوسپانسیون سلولی در محیط کشت MS مایع (ج).

عصاره‌گیری از نمونه‌ها و تهیه اسانس

۱۲۰ گرم بذر زیره سیاه به مدت ۳ ساعت با دستگاه کلونجر اسانس‌گیری شد و اسانس حاصله با استفاده از سولفات سدیم آب‌گیری گردید.

به منظور عصاره‌گیری از سلول‌ها و بذر، مقدار ۷۰ گرم سلول خشک و ۷۰ گرم بذر را به صورت پودر درآورده و ۲۰۰ میلی‌لیتر از دو حلال اتانول ۸۰ درصد (امیری، ۱۳۸۵) و دی‌متیل سولفوکسید (DMSO) ۵ درصد (Oroojalian et al., 2010) به آن‌ها اضافه و به مدت ۷۲ ساعت در یخچال نگهداری و سپس عصاره‌ها صاف شد. خشک کردن عصاره‌ها با استفاده از دستگاه روتاری انجام شد و پس از تعیین وزن خشک آن‌ها (۰/۴ گرم)، ۵ میلی‌لیتر حلال به آن‌ها افزوده شد.

اسانس حاصل از بذر را هم به دو نسبت v/v ۱/۱۰ و v/v ۱/۱۰۰ با دو حلال اتانول ۸۰ درصد و DMSO ۵ درصد با استفاده از توئین۱۰ درصد (Bendahou et al., 2008) رقیق شد. در نهایت کلیه نمونه‌ها پس از عبور از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر استریل شدند.

بررسی اثر ضد میکروبی نمونه‌ها

فعالیت ضد باکتریایی اسانس و عصاره‌های حاصل از بذر و سلول زیره سیاه بر روی باکتری‌های *S. aureus*، *B. subtilis* و *E. coli* بررسی شد (جدول ۱). باکتری‌های مورد استفاده در این پژوهش از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران (IROST) تهیه شد. بدین منظور از باکتری‌های کشت داده شده به مدت ۲۴ ساعت در محیط کشت مولر هینتون براث (مرک آلمان)، سوسپانسیونی با کدورت معادل استاندارد ۰/۵ مک فارلند (10^8 باکتری در هر میلی‌لیتر) تهیه و سپس ۱۰۰ میکرولیتر و ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار

به طور یکنواخت پخش شد و از دو روش دیسک دیفیوژن و چاهک پلیت برای بررسی اثر ضد باکتریایی نمونه‌ها استفاده شد. دیسک‌های استریل بلانک (تهیه شده از شرکت پادتن طب) و چاهک‌هایی به قطر ۶ میلی‌متر روی محیط کشت‌های حاوی باکتری ایجاد شد و ۵۰ میکرولیتر از هر نمونه استریل در چاهک‌ها و بر روی دیسک‌ها ریخته شد. برای مقایسه فعالیت بازدارندگی عصاره‌ها و اسانس از دو آنتی‌بیوتیک استاندارد جنتامایسین (۱۰ میکروگرم در هر دیسک) (امیری، ۱۳۸۵ و دانشمندی و همکاران، ۱۳۸۹) و تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم در هر دیسک) (مقتدر و همکاران، ۱۳۸۸; Menghani et al., 2011) بعنوان شاهد مثبت و از حلال‌های اتانول ۸۰ درصد و DMSO ۵ درصد بعنوان شاهد منفی استفاده گردید و سپس نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. در نهایت جهت تعیین میزان بازدارندگی اسانس و عصاره‌های مختلف، قطر هاله بازدارندگی رشد به وسیله خط‌کش اندازه‌گیری شد.

جدول ۱- انواع و نژاد باکتری‌های مورد استفاده در این تحقیق

باکتری‌های مورد استفاده	واکنش به رنگ‌آمیزی گرم	نژاد باکتری‌ها
Staphylococus aureus	+	۱۷۶۴PTCC
Bacillus subtilis	+	۱۰۲۳PTCC
Escherichia coli	-	۱۳۳۰PTCC

تعیین MIC[1] (حداقل غلظت مهارکنندگی) و MBC [2] (حداقل غلظت کشندگی)

برای تعیین MIC از روش ماکرو براث دایلوشن (Microbroth dilution) استفاده شد. ۷ رقت متوالی دو برابر (از غلظت ۱/۵۶ تا ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، با استفاده از دو حلال اتانول ۸۰ درصد و دی‌متیل سولفوکسید ۵ درصد از اسانس و عصاره‌ها تهیه شد. ۵۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اورنایت باکتری‌های مورد آزمایش با کدورت معادل cfu/ml 10^7 به لوله‌های آزمایش حاوی محیط کشت مولر هینتون براث و رقت‌های متوالی دو برابر اسانس و عصاره‌ها افزوده شد. آزمایش‌های مشابه‌ای برای تعیین MIC در شاهدهای مثبت (محیط کشت مولر هینتون براث، نرمال سالین و عصاره یا اسانس) و منفی (محیط کشت مولر هینتون براث، باکتری و حلال) انجام شد. نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و اولین چاهک بدون کدورت به عنوان MIC (به صورت میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) گزارش شد. برای تعیین کدورت نمونه‌ها از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل UV-1600A (SHIMADZU) و طول موج ۶۰۰ نانومتر استفاده شد.

پس از بررسی نتایج MIC، به منظور تعیین MBC، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول موجود در لوله‌های آزمایشی فاقد کدورت به طور جداگانه بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، کمترین غلظتی از تیمارها که باکتری در آن رشد نکرده بود به عنوان غلظت کشندگی MBC در نظر گرفته شد.

تجزیه آماری

این آزمایش با سه تکرار در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی انجام شد و تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد.

1- Minimum Inhibition Concentrations
2- Minimum Bacteriocidal Concentrations

نتایج و بحث

در این تحقیق خاصیت ضد باکتریایی رقت‌های آبی و اتانولی اسانس حاصل از بذر زیره سیاه و عصاره‌های آبی و اتانولی حاصل از بذر و سلول‌های کشت سوسپانسیون زیره سیاه علیه باکتری‌های *S. aureus*، *B. subtilis* و *E. coli* (در تعداد cfu/ml $۱۰^{۷}$) با استفاده از روش براث ماکرو دایلوشن مورد آزمایش قرار گرفت. خواص ضد باکتریایی اسانس و عصاره‌ها با تعیین مقدار MIC و MBC گزارش شد (جدول ۲). مقدار MIC نمونه‌ها در مورد *S. aureus* اختلاف معنی‌داری را نشان دادند (P<۰/۰۵)، به طوری که بیشترین مقدار MIC در عصاره اتانولی حاصل از بذر و آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین (۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و کمترین مقدار آن در رقت‌های آبی و اتانولی اسانس و آنتی‌بیوتیک جنتامایسین (۳/۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) مشاهده شد. مقدار MIC عصاره‌های حاصل از کشت سلولی زیره سیاه، ۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و مقدار آن در عصاره آبی حاصل از بذر، ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. همان‌طور که در جدول ۲ نشان داده شده است، مقدار MBC در عصاره‌های آبی و اتانولی حاصل از بذر و کشت سلولی علیه *S. aureus*، ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود که اختلاف معنی‌داری را با مقدار MBC در رقت‌های آبی و اتانولی اسانس و آنتی‌بیوتیک جنتامیسین (۳/۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین (۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) نشان داد (P<۰/۰۵).

در مورد *E. coli*، مقدار MIC در رقت‌های آبی و اتانولی اسانس و آنتی‌بیوتیک جنتامیسین اختلاف معنی‌داری را نشان ندادند (*P*>۰/۰۵). مقدار MIC در عصاره‌های آبی و اتانولی حاصل از بذر و عصاره اتانولی حاصل از کشت سلولی نیز ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود که اختلاف معنی‌داری با عصاره آبی حاصل از کشت سلولی (۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین (۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) داشت. مقدار MBC در عصاره‌های آبی و اتانولی حاصل از بذر و کشت سلولی بر روی *E. coli*، مشابه بود (۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) که اختلاف معنی‌داری را با مقدار MBC در آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین (۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) نشان داد. همچنین مقدار MBC بر *E. coli*، در رقت‌های آبی و اتانولی اسانس و آنتی‌بیوتیک جنتامیسین، همانند مقدار MIC، اختلاف معنی‌داری نداشت (جدول ۲).

مقدار MIC و MBC اسانس و عصاره‌ها بر *B. subtilis* یکسان بود، به طوری که بیشترین مقدار آن در عصاره‌های آبی و اتانولی حاصل از بذر (۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و کمترین مقدار آن در عصاره آبی حاصل از کشت سلولی و آنتی‌بیوتیک جنتامیسین (۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) مشاهده شد. همچنین مقدار MIC و MBC عصاره اتانولی حاصل از کشت سلولی، ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. مقدار MIC و MBC رقت‌های آبی و اتانولی اسانس و آنتی‌بیوتیک جنتامیسین اختلاف معنی‌داری نداشتند (جدول ۲).

در مجموع، نتایج روش براث ماکرو دایلوشن نشان داد که مقدار MIC و MBC در اسانس، عصاره‌های حاصل از بذر و کشت سلولی زیره سیاه بر روی باکتری‌های گرم مثبت (*S. aureus* و *B. subtilis*) کمتر از باکتری‌های گرم منفی (*E. coli*) است و در حقیقت اثر مهارکنندگی آن‌ها بر باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از باکتری‌های گرم منفی می‌باشد (عروجعلیان و همکاران، ۱۳۸۹). همچنین مقدار MIC و MBC در اسانس و عصاره‌های حاصل از کشت سلولی زیره سیاه کمتر از عصاره‌های بذری آن است، که نشان‌دهنده قدرت بازدارندگی بیشتر آن‌ها بر باکتری‌های مورد آزمایش است (Sharififar et al., 2010). مقدار مشابه MIC و MBC در بیشتر نمونه‌ها (به خصوص در اسانس زیره سیاه) بر روی باکتری‌های انتخابی، نشان‌دهنده اثر قوی باکتریوسیدال و باکتریواستاتیک آن‌ها است. همچنین مقدار کمتر MIC نسبت به MBC در عصاره‌های حاصل از کشت سلولی زیره سیاه نشان می‌دهد که این عصاره‌ها در غلظت پایین‌تری دارای خاصیت باکتریواستاتیک و در غلظت بالاتری دارای خاصیت باکتریوسیدال هستند. در مطالعه‌ای که توسط Simoes-Gurgel و همکاران (۲۰۱۲) بر روی خاصیت ضدباکتریایی عصاره متانولی حاصل از کشت سلولی *Cleome rosea* vahl انجام شد، همین نتیجه مشاهده شد.

جدول ۲- غلظت MIC و MBC (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) جنتامایسین، تتراسایکلین، عصاره‌های آبی و اتانولی حاصل از بذر، کشت سلولی و رقت‌های مختلف اسانس زیره سیاه در تعداد 10^7 cfu/ml از باکتری‌های *S. aureus*، *E. coli* و *B. subtilis*.

ماده موثره	*S. aureus*		*E. coli*		*B. subtilis*	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
عصاره آبی بذر	۲۵/۰۰ b	۲۵/۰۰ b	۵۰/۰۰ a	۵۰/۰۰ a	۵۰/۰۰ a	۵۰/۰۰ a
عصاره اتانولی بذر	۵۰/۰۰ a	۲۵/۰۰ b	۵۰/۰۰ a	۵۰/۰۰ a	۵۰/۰۰ a	۵۰/۰۰ a
عصاره آبی کشت سلولی	۱۲/۵۰ c	۲۵/۰۰ b	۲۵/۰۰ b	۵۰/۰۰ a	۱۲/۵۰ c	۱۲/۵۰ c
عصاره اتانولی کشت سلولی	۱۲/۵۰ c	۲۵/۰۰ b	۵۰/۰۰ a	۵۰/۰۰ a	۲۵/۰۰ b	۲۵/۰۰ b
رقت‌های آبی اسانس	۳/۱۲ d	۳/۱۲ c	۳/۱۲ d	۳/۱۲ c	۳/۱۲ d	۳/۱۲ d
رقت‌های اتانولی اسانس	۳/۱۲ d	۳/۱۲ c	۶/۲۵ d	۶/۲۵ c	۶/۲۵ d	۶/۲۵ d
جنتامایسین (۱۰ میکروگرم در هر دیسک)	۳/۱۲ d	۳/۱۲ c	۶/۲۵ d	۳/۱۲ c	۶/۲۵ d	۳/۱۲ d
تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم در هر دیسک)	۵۰/۰۰ a	۵۰/۰۰ a	۱۲/۵۰ c	۱۲/۵۰ b	۱۲/۵۰ c	۱۲/۵۰ c

در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حروف مشابه‌ای هستند، اختلاف معنی‌داری ندارند (P>۰/۰۵).

با استفاده از روش انتشار در آگار، اثر ضد باکتریایی اسانس حاصل از بذر (در رقت‌های مختلف ۱، ۱۰ و ۱۰۰ درصد) و عصاره‌های آبی و اتانولی حاصل از بذر و سلول‌های کشت سوسپانسیون زیره سیاه (در غلظت ۸۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به دو روش کمی چاهک پلیت و دیسک دیفیوژن و در دو تعداد 10^6 cfu/ml و 10^7 از باکتری‌های *S. aureus*، *B. subtilis* و *E. coli* در جدول ۳ و ۴ نشان داده شده است. نتایج بیانگر اثر بازدارندگی قابل توجه نمونه‌ها بر رشد باکتری‌ها بود که به صورت هاله عدم رشد نمایان شد. از نظر تئوری قطر هاله که نشان‌دهنده عدم رشد باکتری‌ها می‌باشد، عکس‌العملی از غلظت ماده موثره موجود در گیاه است. این پدیده یک ارتباط خطی بین اندازه هاله و لگاریتم غلظت ماده مورد آزمایش می‌باشد که با اندازه‌گیری قطر هاله و مقایسه آن با استاندارد مشخص، قدرت ضد میکروبی ماده مورد آزمایش معین می‌شود (Neef et al., 1995).

مقایسه این دو روش کمی چاهک پلیت و دیسک دیفیوژن نشان داد که روش چاهک پلیت در مقایسه با روش دیسک دیفیوژن، اثر مهارکنندگی بیشتری بر رشد میکروارگانیزم‌ها دارد. این تفاوت ممکن است به این دلیل باشد که در روش چاهک، عصاره گیاهی مستقیماً در چاهک ریخته می‌شود در حالی‌که در روش دیسک دیفیوژن ابتدا دیسک‌ها به عصاره آغشته شده و پس از تبخیر کامل حلال (۱-۲ ساعت) در سطح آگار قرار می‌گیرند (به طور غیر مستقیم).

اثر ضد باکتریایی اساس و عصاره‌های حاصل از بذر و کشت سلولی زیره سیاه بر باکتری‌های *S. aureus* و *B. subtilis* بیشتر از *E. coli* است (جدول ۳ و ۴). در اغلب موارد اثرات ضد میکروبی اسانس و عصاره‌های مختلف گیاهان بر روی باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از باکتری‌های گرم منفی است. مقاومت بالاتر باکتری‌های گرم منفی را می‌توان به حضور غشای فسفو لیپیدی خارجی تقریبا غیر قابل نفوذ به ترکیبات چربی دوست نسبت داد که این امر در نتایج سایر محققان هم دیده می‌شود (امیری، ۱۳۸۵ و عروجعلیان و همکاران، ۱۳۸۹).

استفاده از حلال‌های متفاوت بر فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌های حاصل از اندام‌های مختلف گیاهی موثر است (امیری، ۱۳۸۵). طبق نتایج بدست آمده از جدول ۳ و ۴، خاصیت ضد باکتریایی عصاره‌های آبی بذر و سلول زیره سیاه بیشتر از عصاره‌های اتانولی آن بود که با نتایج امیری و همکاران (۱۳۸۸) بر روی خاصیت ضد باکتریایی سیر بر *Aeromonas sobria* مطابق است، در حالی که در نتایج امیری (۱۳۸۵) اثر ضد میکروبی عصاره اتانولی گیاه *Allium jesdianum* Boiss.& Buhse بیشتر از عصاره آبی آن بود. اختلاف در خاصیت ضد باکتریایی

عصاره‌ها ممکن است به خاطر تفاوت در حلالیت مواد موثره موجود در اندام‌های گیاهی باشد.

همان‌طور که در جدول ۳ و ۴ نشان داده شده است، اثر ضد باکتریایی اسانس خالص زیره سیاه بیشتر از آنتی‌بیوتیک جنتامایسین و تتراسایکلین است (P<۰/۰۵). اثر بازدارندگی رقت‌های ۱ و ۱۰ درصد اسانس همواره کمتر از جنتامایسین بود (P<۰/۰۵)، ولی در مورد تتراسایکلین، اثر آن‌ها بستگی به نوع باکتری دارد. به طوریکه در مورد *S. aureus*، اثر رقت‌های ۱ و ۱۰ درصد اسانس بیشتر از آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین و در مورد *B. subtilis* و *E. coli*، کمتر از آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین بود. نتایج بدست آمده از بررسی اثرات ضدباکتریایی اسانس حاصل از گیاهان مختلف، قدرت بازدارندگی زیاد آن‌ها را نشان می‌دهد. به عنوان مثال در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۱ انجام شد، اسانس زیره سیاه در میان ۱۵ گیاه دارویی ایرانی بررسی شده، قدرت مهارکنندگی زیادی علیه *Lactococcus garvieae* داشت (Goudarzi et al., 2011). مقتدر و همکاران (۱۳۸۸) ترکیب‌های شیمیایی و اثر ضد میکروبی اسانس زیره سیاه توده وحشی کرمان را علیه ۹ سوش باکتریایی به روش دیسک دیفیوژن بررسی کردند و اظهار نمودند که اسانس این گیاه اثر ضد باکتریایی داشته و می‌تواند برای مقابله با میکروب‌های بیماری‌زای خاص مورد استفاده قرار گیرد. اسانس استخراج شده به وسیله روش تقطیر با آب از گیاه زیره سبز فعالیت ضد میکروبی قوی‌تری نسبت به اسانس *Rosmarinus officinalis* علیه *E. coli*، *S. aureus* و *Listeria monocytogenes* نشان می‌دهد (Gachkar et al., 2007). در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۲ انجام شد، خواص ضد باکتریایی اسانس ۷ گونه از خانواده کرفس نیز بر روی *Corynebacterium diphtheria*، *S. aureus*، *Streptococcus haemolyticus*، *E. coli*، *Proteus vulgaris* و *Klebsiella* spp. مورد آزمایش قرار گرفت و نتایج نشان داد که از بین ۷ گونه مورد بررسی، اسانس زنیان بسیار موثر است (Singh et al., 2002).

اثر بازدارندگی عصاره حاصل بذر زیره سیاه اختلاف معنی‌داری با آنتی‌بیوتیک جنتامایسین و تتراسایکلین داشت (P<۰/۰۵). اثر مهارکنندگی عصاره‌های بذری بر باکتری‌های مورد آزمایش همواره کمتر از جنتامایسین بود، در حالی که اثر بازدارندگی آن‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین به نوع باکتری بستگی داشت. قطر هاله در مورد *S. aureus* بیشتر از تتراسایکلین و در مورد *E. coli* و *B. subtilis* کمتر از تتراسایکلین بود (جدول ۳ و ۴). طبق تحقیقات صورت گرفته اثر ضد باکتریایی و ضد قارچی عصاره اتانولی حاصل از اندام‌های مختلف گیاه زیره سیاه بر روی *E. coli*، *S. aureus*، *P. aeroginosa* و *C. albicans* بررسی شد. نتایج آن‌ها نشان داد که این عصاره دارای اثرات قابل توجهی بر روی باکتری‌ها و قارچ‌های انتخابی می‌باشد (Menghani et al., 2011). اثر عصاره‌های آبی، اتانولی، استونی و پترولیوم اتر حاصل از قسمت‌های مختلف ۶ گیاه دارویی از جمله زیره سیاه علیه *S. typhimurium*، *S. abony*، *E. coli*، *S. aureus*، *Clostridium butyricum*، *B. cereus*، *Micrococcus luteus* و *C. albicans* بررسی شد و نتایج نشان داد که اثر عصاره‌های مختلف زیره سیاه در مقایسه با *Amomum subulatum*، *Nigella sativa* و *Glycyrrhiza glabra* کمتر است (Abubaker et al., 2010).

در مقایسه اثرات بازدارندگی عصاره‌های آبی و اتانولی حاصل از کشت سلولی زیره سیاه و آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین و تتراسایکلین بر باکتری‌های مورد آزمایش، همان‌طور که در جدول ۳ و ۴ نشان داده شده است، می‌توان به اثر مهارکنندگی بیشتر عصاره‌های حاصل از کشت سلولی بر *S. aureus* نسبت به دو آنتی‌بیوتیک اشاره کرد. همچنین اثر عصاره‌های حاصل از کشت سلولی بر *E. coli* و *B. subtilis* کمتر از جنتامایسین و تتراسایکلین است (P<۰/۰۵). تحقیقات متعددی بر روی بررسی اثرات ضد قارچی (Villarreal et al., 1997)، ضد ویروسی (Sokmen, 2001) و ضد باکتریایی (Rahman and Bari, 2013) عصاره‌های حاصل از کشت سلولی در گیاهان صورت گرفته است. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۲ صورت گرفت، اثرات ضد باکتریایی عصاره متانولی کالوس و سلول *Cleome rosea* اثبات شد ولی این اثرات در مقایسه با عصاره حاصل از اندام‌های

مختلف گیاه کمتر بود. این تفاوت را می‌توان به اختلاف در تمایز یافتگی بافت‌ها نسبت داد (Simoes-Gurgel et al., 2012).

جدول ۳- مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر) جنتامایسین، تتراسایکلین، عصاره‌های آبی و اتانولی حاصل از بذر، کشت سلولی و رقت‌های مختلف اسانس زیره سیاه با دو روش چاهک و دیسک در تعداد 10^6 cfu/ml از باکتری‌های *S. aureus*، *E. coli* و *B. subtilis*

ماده موثره	*S. aureus*		*E. coli*		*B. subtilis*	
	دیسک	چاهک	دیسک	چاهک	دیسک	چاهک
عصاره آبی بذر	۲۲ c	۲۹	۱۲ ed	۱۴	۱۶ d	۱۹
عصاره اتانولی بذر	۲۲ c	۲۴	۱۲ ed	۱۱	۱۴ e	۱۹
عصاره آبی کشت سلولی	۲۴ b	۲۷	۱۳ d	۱۸	۱۷ cd	۲۴
عصاره اتانولی کشت سلولی	۲۵ b	۲۸	۱۱ e	۱۵	۱۸ bc	۱۹
رقت ۱۰ درصد اسانس (DMSO ۵ درصد)	۱۷ d	۱۷	۱۵ c	۱۸	۱۴ e	۱۹
رقت ۱ درصد اسانس (DMSO ۵ درصد)	۱۲ e	۱۴	۷ f	۹	۱۰ f	۱۱
رقت ۱۰ درصد اسانس (اتانول ۸۰ درصد)	۱۶ d	۱۴	۱۳ d	۱۴	۱۶ d	۱۶
رقت ۱ درصد اسانس (اتانول ۸۰ درصد)	۱۰ f	۹	۷ f	۹	۱۱ f	۱۳
اسانس خالص (۱۰۰ درصد)	۲۸ a	۳۲	۲۵ a	۲۷	۲۵ a	۲۹
اتانول ۸۰ درصد	-	-	-	-	-	-
DMSO ۵ درصد	-	-	-	-	-	-
جنتامایسین (۱۰ میکروگرم در هر دیسک)	۲۲ c	-	۱۸ b	-	۱۹ b	-
تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم در هر دیسک)	۱ g	-	۱۸ b	-	۱۷ cd	-

در هر ستون میانگین‌های مربوط به روش دیسک که دارای حروف مشابه‌ای هستند، اختلاف معنی‌داری ندارند ($P>0/05$).

با افـزایش تعداد باکتری‌ها از 10^6 cfu/ml به 10^7، اثرات بازدارندگی اسانس و عصاره‌ها کاهش یافت. کاهش در اثرات بازدارندگی نمونه‌ها (کاهش قطر هاله) در مورد باکتری‌های گرم مثبت (*S. aureus* و *B. subtilis*) بیشتر از باکتری گرم منفی (*E. coli*) بود (جدول ۴). همچنین با افزایش تعداد باکتری‌ها، اثر بازدارندگی عصاره‌های آبی و اتانولی حاصل از بذر و کشت سلولی زیره سیاه بیشتر از اسانس و رقت‌های آن کاهش یافت. در نتایج عباسی و همکاران (۱۳۸۵) نیز، با افزایش تعداد باکتری *S. aureus*، اثر بازدارنده عصاره آبی گیاه *Scrophularia striata* Boiss کاهش یافت (کاهش قطر هاله عدم رشد).

جدول۴- مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر) جنتامایسین، تتراسایکلین، عصاره‌های آبی و اتانولی حاصل از بذر، کشت سلولی و رقت‌های مختلف اسانس زیره سیاه با دو روش چاهک و دیسک در تعداد 10^7 cfu/ml از باکتری‌های *S. aureus*، *E. coli* و *B. subtilis*

ماده موثره	*S. aureus*		*E. coli*		*B. subtilis*	
	دیسک	چاهک	دیسک	چاهک	دیسک	چاهک
عصاره آبی بذر	۱۷ d	۲۶	۱۳ cd	۱۱	۱۲ fg	۱۷
عصاره اتانولی بذر	۱۵ e	۲۰	۱۲ de	۱۲	۱۰ h	۹
عصاره آبی کشت سلولی	۲۱ bc	۲۹	۱۰ f	۱۹	۱۵ cd	۱۸
عصاره اتانولی کشت سلولی	۲۲ b	۲۷	۱۱ ef	۱۵	۱۳ ef	۲۰
رقت ۱۰ درصد اسانس (DMSO ۵ درصد)	۱۵ e	۱۶	۱۴ c	۱۶	۱۴ de	۱۶
رقت ۱ درصد اسانس (DMSO ۵ درصد)	۱۰ f	۱۱	۸ g	۸	۱۱ gh	۱۰
رقت ۱۰ درصد اسانس (اتانول ۸۰ درصد)	۱۶ de	۱۸	۱۴ c	۱۲	۱۶ c	۱۷
رقت ۱ درصد اسانس (اتانول ۸۰ درصد)	۱۰ f	۱۱	۶ h	۱۰	۱۰ h	۱۱
اسانس خالص (۱۰۰ درصد)	۲۷ a	۳۳	۲۸ a	۲۵	۲۷ a	۲۹
اتانول ۸۰ درصد	-	-	-	-	-	-
DMSO ۵ درصد	-	-	-	-	-	-
جنتامایسین (۱۰ میکروگرم در هر دیسک)	۲۰ c	-	۱۷ b	-	۱۹ b	-
تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم در هر دیسک)	۱ g	-	۱۷ b	-	۱۶ c	-

در هر ستون میانگین‌های مربوط به روش دیسک که دارای حروف مشابه‌ای هستند، اختلاف معنی‌داری ندارند ($P>0/05$).

در مجموع، نتایج روش انتشار در آگار نشان داد که اثرات بازدارندگی عصاره حاصل از کشت سلولی زیره سیاه بر روی باکتری‌های انتخابی کمتر از اسانس خالص و بیشتر از عصاره‌های بذری و رقت‌های مختلف اسانس زیره سیاه است.

نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر با تحقیقات پاره‌ای از محققان فوق الذکر هماهنگی‌ها و تفاوت‌هایی را نشان می‌دهد. این تفاوت‌ها را می‌توان به تاثیر عوامل متعددی از جمله نوع گیاه، نوع حلال، نوع بافت گیاهی مورد استفاده، زمان و محل جمع‌آوری گیاه، تغییرات آب و هوایی و شرایط جغرافیایی منطقه، شرایط و امکانات آزمایشگاه و غیره نسبت داد.

نتیجه‌گیری

محدودیت‌های روز افزون استفاده از مواد شیمیایی ضد میکروبی مانند عوارض جانبی و ایجاد مقاومت دارویی، سبب تمایل روز افزون مردم به استفاده از این گیاهان در درمان بیماری‌ها شده است (Marjorie, 1999). از طرفی پژوهش‌های زیادی توسط محققان مختلف در ایران و سایر کشورهای جهان بر روی اثرات ضد میکروبی اسانس و عصاره حاصل از اندام‌های مختلف گیاهان خانواده Apiaceae و به خصوص زیره سیاه انجام شده و آن را اثبات نموده‌اند. در مجموع قدرت مهارکنندگی و میکروب‌کشی بالای اسانس و عصاره زیره سیاه ممکن است به دلیل ترکیبات ترپن‌دار و کومین‌آلدئید موجود در بذر آن باشد

(Khaidrov et al., 1991). لذا تخلیص عصاره سلولی حاصل از کشت درون‌شیشه‌ای زیره سیاه و تعیین مواد موثره مختلف این گیاه ضرورت دارد و می‌تواند گام موثری در جهت عرضه فرآورده‌های دارویی که دارای خاصیت ضد میکروبی هستند، باشد. اگر چه تجربه حاضر در محیط غیر زنده (in-vitro) و بر روی محیط کشت‌های جامد انجام شده، لیکن به دلیل نتایج قابل قبول به دست آمده به نظر می‌رسد این یافته‌ها زمینه بسیار مناسبی برای تولید انبوه ترکیبات ضدباکتریایی از طریق کشت سلولی در بیوراکتورها و بررسی‌های بیشتر به صورت (in-vivo) بر روی حیوانات آزمایشگاهی باشد.

تشکر و قدردانی

از پژوهشکده علوم و صنایع غذایی که حمایت مالی این پژوهش را بر عهده گرفتند و امکانات لازم در جهت پیشبرد این تحقیق را فراهم نمودند، کمال تشکر را داریم.

منابع

۱- امیری ح. ۱۳۸۵. بررسی اثرات ضد میکروبی اسانس و عصاره‌های مختلف گیاه *Smyrnium cordifolium* Boiss بر روی برخی از باکتری‌های بیماری‌زا. فصلنامه علوم دارویی، ۱:۱۵-۱۹.

۲- امیری ح. ۱۳۸۵. بررسی مواد متشکله موجود در اسانس و اثرات ضد میکروبی اسانس و عصاره‌های مختلف گیاه *Allium jesdianu* Boiss.& Buhsem. فصلنامه گیاهان دارویی، ۱:۳۹-۴۴.

۳- امیری س.، پیغان ر. و معتمدی ح. ۱۳۸۸. بررسی اثر آنتی باکتریالی عصاره اتانولی، متانولی و آبی سیر و عصاره خام سیر بر روی باکتری آئروموناس سوبریای جدا شده از ماهی کپور. خلاصه مقالات اولین همایش دانشجویی کاربرد گیاهان دارویی در ایران، اهواز، ۱۳-۱۲ اسفند، ۲۳.

۴- چلبیان ف.، نوروزی ح. و موسوی س. ۱۳۸۲. بررسی اثرات ضد میکروبی هفت گونه گیاهی از تیره‌های مختلف بر روی برخی از باکتری‌های بیماری‌زا. فصلنامه گیاهان دارویی، ۷:۳۴-۳۷.

۵- دانشمندی س.، سلیمانی ن.، ستاری م. و پورفتح اله ع. ا. ۱۳۸۹. اثرات متقابل دارویی و فعالیت ضد باکتریایی اسانس زیره سبز. مجله دانشگاه علوم پزشکی اراک ۱۳:۷۵-۸۲.

۶- شیرازی م. ح.، فاضلی م. ر. و سلطان م. م. ۱۳۸۲. بررسی اثر ضد میکروبی ۱۰ عصاره گیاهی برروی هلیکوباکترپیلوری و مقایسه آن با آنتی بیوتیک‌های موثر انتخابی. فصلنامه گیاهان دارویی، ۷:۵۳-۶۰.

۷- طالعی غ.، مشکوه م. ه. و موسوی ز. ۱۳۸۶. بررسی اثر ضد باکتریایی اسانس زیره سیاه و بومادران. خلاصه مقالات سومین همایش گیاهان دارویی، تهران، ۳-۲ آبان، ۴۸۱.

۸- عباسی ن.، عزیزی جلیلیان ف.، عبدی م. و سیف منش م. ۱۳۸۵. بررسی اثر ضد میکروبی عصاره گیاه *Scrophularia striata* Boiss بر روی استافیلوکوکوس اورئوس و پسودوموناس ائروژینواز و مقایسه آن با آنتی بیوتیک‌های موثر انتخابی. فصلنامه گیاهان دارویی، ۱:۱۰-۱۸.

۹- عروجعلیان ف.، کسری کرمانشاهی ر.، عزیزی م. و باسامی م. ر. ۱۳۸۹. بررسی اثر ضد باکتریایی و خاصیت سینرژیستی اسانس سه گیاه دارویی علیه برخی از پاتوژن‌های مهم مواد غذایی به روش میکرودایلوشن. فصلنامه تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، ۲۶:۱۳۳-۱۴۶.

۱۰- قهرمان ا. ۱۳۷۲. فلور رنگی ایران. جلد اول، انتشارات موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، صفحات ۲۳۴-۲۳۵.

۱۱- مشکی باف م. ح.، عبداللهی ع.، فصیحی رامندی م.، عدنانی ساداتی س. ج.، مروج ع. و حاتمی ش. ۱۳۸۹. اثرات ضد باکتریایی عصاره هیدروالکی پونه کوهی، مروه تلخ، زرشک وحشی، چای کوهی. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی سمنان، ۱۱:۲۴۰-۲۴۵.

۱۲- مقتدر م.، ایرج منصوری ع.، سالاری ح. و فرهمند آ. ۱۳۸۸. شناسایی ترکیب‌های شیمیایی و بررسی اثر ضد میکروبی اسانس زیره سیاه (*Bunium persicum* Boiss.). فصلنامه تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، ۲۵:۲۰-۲۸.

۱۳- مومنی ل. و زمان‌زاده ب. ۱۳۸۸. بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره پیاز و زنجبیل بر روی باکتری‌ها و قارچ کاندیدا آلبیکانس جدا شده از نمونه‌های ادرار افراد مبتلا به عفونت‌های ادراری- تناسلی. مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، ۱۱:۸۱-۸۷.

14- Abubaker A.Z., Ehsan B.R. & Bipinraj N.K. 2010. Antimicrobial activity of six Indian spices. The IUP Journal of Biotechnology, 3: 40-45.

15- Bendahou M., Muselli A., Grignon-Dubois M., Benyoucef M., Desjobert J.M., 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. Food Chemistry, 106: 132-139.

16- Chintalwar G.J., Gupta S., Roja G. & Bapat V.A. 2003. Protoberberine alkaloids from callus and cell suspension cultures of *Tinospora cordifolia*. Pharmocetical Biology, 41: 81-86.

17- Gachkar L., Yadegari D., Bagher Rezaei M., Taghizadeh M., Alipoor Astaneh S. & Rasooli I. 2007. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. Food Chemistry, 102: 898-904.

18- Goudarzi M., Hamedi A.B., Malekpoor F., Abdizadeh R., Ghasemi Pirbalouti A. & Raissy M. 2011. Sensitivity of *Lactococcus garvieae* isolated from rainbow trout to some Iranian medicinal herbs. Medicinal Plants Research, 5: 3067-3073.

19- Haghbeen K., Pourmolaei S., Mareftjo M.J., Mousavi A., Akbari Noghabi K., Hosseini Shirazi F. & Meshkat A. 2011. Detailed Investigations on the Solid Cell Culture and Antimicrobial Activities of the Iranian *Arnebia euchroma*. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 4:1-8.

20- Iacobellis N.S., Cantore P.L., Capasso F. & Senatore F. 2005. Antibacterial activity of *Cuminum cyminum* and *Carun carvi* essential oils. Agricultural and Food Chemistry, 53: 57-61.

21- Kabuche Z., Boutaghane N., Laggoune S., Kabuche A., Aitkaki Z. & Benlabed K. 2005. Comparative antibacterial activity of five Lamiaceae essential oils from Algeria. International Journal of Aromatherapy, 15: 129-133.

22- Khaidrov K.K.H., Sadykov Y.V.D., Lebedeva L.D. & Ismaailov M.B. 1991. Composition and pharmacological activity of essential oil from *Bunium persicum* Boiss. Burdenko fedsch Khimiko Farmatsevticheskii Zhurnal, 25: 73-75.

23- Khosravinia S., Ziaratnia S.M., Bagheri A., Rajabzadeh G. & Marashi S.H. 2012. Comparison of Cuminaldehyde Contents from Cell Suspension Cultures and Seeds of [*Bunium persicum* (Boiss.) B. Fedtsch.]. Notulae Scientia Biologicae, 4: 49-54.

24- Marjorie M.C. 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. Clinical Microbiology Review, 12: 564-582.

25- Menghani E., Pareek A., Negi R.S. & Ojha C.K. 2011. Search for Antimicrobial Potentials from Certain Indian Medicinal Plants. Research Journal of Medicinal Plant, 5: 295-301.

26- Mewis I., Smetanska I.M., Muller C.T. & Ulrichs C. 2011. Specific poly-phenolic compounds in cell culture of *Vitis vinifera* L. cv. Gamay Freaux. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2: 148-161.

27- Neef H., Declercq P. & Laekeman G. 1995. Hypoglycaemic activity of selected European plants. Phytotherapy Research., 9: 45-48.

28- Oroojalian F., Kasra-Kermanshahi R., Azizi M. & Bassami M.R. 2010. Phytochemical composition of the essential oils from three Apiaceae species and their antibacterial effects on food-borne pathogens. Food Chemistry, 120:765–770.

29- Rahman M.A., & Bari M.A. 2013. Antibacterial Activity of Cell Suspension Cultures of Castor (*Ricinus communis* L. cv. Roktima). European Journal of Medicinal Plants, 3:65-77.

30- Sharififar F., yassa N., & Mozaffarian V. 2010. Bioactivity of Major Components from the Seeds of *Bunium persicum* (boiss.) Fedtch. Journal of Pharmacy Science, 3: 300-304.

31- Simoes-Gurgel C., Rocha A.S., Cordeiro L.S., Gayer C.R.M., Castro T.C., Coelho M.G.P., Albarello N., Mansur E. & Rosa A.C.P. 2012. Antibacterial activity of field-grown plants, in vitro propagated plants, callus and cell suspension cultures of *Cleome rosea* Vahl. Journal of Pharmacy Research, 5: 3304-3308.

32- Singh G., Kapoor I.P.S., Pandey S.K., Singh U.K. & Singh R.K. 2002. Studies on essential oils: Part 10; Antibacterial activity of volatile oils from some species. Phytotherapy Research, 16: 680-682.

33- Sokmen A. 2001. Antiviral and Cytotoxic Activities of Extracts from the Cell Cultures and Respective Parts of Some Turkish Medicinal Plants. Turkish Journal of Biology, 25: 343-350.

34- Syed M. & Hanif M. 1985. Antimicrobial activity of the essential oil of the umbelliferae family part 1. *Cuminum cyminum*, *Coriandrum sativum*, *Foeniculum vulgar* and *Bunium persicum* oils. Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research, 55: 116-120.

35- Villarreal M.L., Arias C., Feria-Velasco A., Tonatiuh Ramırez O. & Quintero R. 1997. Cell Suspension Culture of *Solanum chrysotrichum* (Schldl.)-A Plant producing an Antifungal Spirostanol Saponin. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 50: 39-44.

36- Weinstine R.A. 2001. Controlling antimicrobial resistance in hospitals: Infection control and use of antibiotics. Emerging Infectious Disease, 7: 188-192.

37- Ziaratnia S.M., Ohyama K., Fattah Hussein A.A., Muranaka T., Lall N., Kunert K.J. & Meyer J.J.M. 2009. Isolation and identification of a novel chlorophenol from a cell suspension culture of *Helichrysum aureonitens*. Chemicall and Pharmaceutical Bulletin, 11: 1282-1283.

Investigation of antibacterial effects of cell suspension culture and comparison by essential oils and seed extract in *Bunium persicum*

S. Khosravinia [1], S.M. Ziaratnia [2*], A. Bagheri [3], S.H. Marashi [4]

1. MSc. student, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Ferdowsi University of Mashhad
2. Assistant professor, Research Institute of Food Science and Technology (RIFST)
*Corresponding author (m.ziaratnia@rifst.ac.ir)
3- Professor, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Ferdowsi University of Mashhad
4- Associated professor, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Ferdowsi University of Mashhad,

Abstract

Recently by no incident there is a great concern in people to consume herbal antibiotics rather than using chemical ones due to bacterial resistances witnessed in chemical treatments. In this research the antibacterial activity of aqueous and ethanol extracts of black zira cell suspension culture in comparison with seed extracts and essential oils were investigated against *Staphylococus aurous*, *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* using disk diffusion and digging hole methods. The bacterial concentration was at 10^6 and 10^7 CFU/mL. Positive and negative controls were antibiotics (Gentamicin [10 µg/disk], Tetracycline [30 µg/disk]) and solvents (5% DMSO and 80% Ethanol) respectively. Inhibitory effects were studied by measuring the growth inhibiting circle diameter. The Results showed that the range of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) were 3.12-6.25, 12.5-50 and 25-50 mg/ml, for the essential oil, the cell extract and the seed extract respectively. According to the results a promising antibacterial activities were revealed from all black zira samples against tested bacteria with the maximum activity to the *S. aurous*. In contrast to *E. coli*, the effect of extracts on *S. aurous* and *B. subtilis* was dependent to the bacteria concentration. Overall antibacterial effects of cell extracts against tested bacteria were lesser than essential oils (100%) and higher than seed extracts and different dilution of essential oils, therefore it seems cell suspension culture of black zira is a suitable method to produce antibacterial compounds.

Keywords: Antibacterial effect; *Bunium persicum;* Cell suspension culture; Essential oils; Extract