

# اثرات اسانس های گیاهی بر دو گونه ی مهم آسپرژیلوس

محمد حسن مینوئیان حقیقی<sup>۱</sup> - علیرضا خسروی<sup>۲</sup>

## چکیده

**زمینه و هدف:** خطرات استفاده از داروهای شیمیایی و نگهدارنده های صنعتی مواد غذایی، افزایش عفونت های میکروبی مقاوم به پادزیست ها، توجه به آسپرژیلوزیس و مایکوتوکسیکوزیس، به عنوان بیماری های حایز اهمیت قارچی، و هم چنین فساد کپکی محصولات کشاورزی، و از سوی دیگر، ظرفیت اسانس ها، در مقابله با میکروارگانسیم ها، بستر مناسبی را برای تحقیق فراهم نموده است. هدف این مطالعه بررسی اثرات اسانس های زیره ی سبز، کاکوتی و سیاه دانه ی رویش یافته در استان خراسان رضوی روی رشد قارچ های آسپرژیلوس فومیگاتوس و آسپرژیلوس فلاووس می باشد.

**روش تحقیق:** این مطالعه از نوع تجربی است و مواد گیاهی مورد استفاده در این تحقیق، در طی سال ۱۳۸۷ انتخاب و جمع آوری گردیدند. سپس اسانس آن ها به روش تقطیر با آب تهیه شد. با استفاده از روش برات ماکرودیلوسیون، میانگین حداقل غلظت مهار کننده (MIC<sub>90</sub>) و میانگین حداقل غلظت قارچ کشی (MFC) اسانس های مزبور، در غلظت های ۳، ۲/۵، ۲، ۱/۵، ۱، ۰/۵ و ۰/۲۵ میلی گرم در میلی لیتر، علیه آسپرژیلوس فومیگاتوس و آسپرژیلوس فلاووس، با ۴ بار تکرار آزمایش، تعیین گردید. قارچ های مورد آزمایش پس از کشت در حرارت ۲۸ درجه ی سانتی گراد و در محیط عصاره ی مخمر به ترتیب بعد از مدت ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت از نظر درجه ی رشد مورد بازبینی قرار می گرفتند. سپس با انجام کشت مجدد در محیط ژلوز سیب زمینی، MIC<sub>90</sub> و MFC آن ها تعیین می شد.

**یافته ها:** در مجموع، پس از ۴ بار تکرار آزمایش، میانگین MIC<sub>90</sub> اسانس های مذکور علیه هر دو گونه قارچ مورد مطالعه از ۰/۲۵ تا ۱/۷۵ میلی گرم در میلی لیتر تعیین شد و میانگین MFC این اسانس ها از ۰/۵ تا ۲/۵ میلی گرم در میلی لیتر به دست آمد. روغن های اساسی زیره سبز و کاکوتی، قوی ترین فعالیت علیه هر دو گونه ی قارچی را داشتند (۰/۴۳ ≤ MIC<sub>90</sub> ≤ ۰/۲۵). حال آن که اسانس سیاه دانه فعالیت ضد آسپرژیلوسی نسبتاً متوسطی را دارا بود (۱/۷۵ ≤ MIC<sub>90</sub> ≤ ۱/۲۵).

**نتیجه گیری:** از یافته های حاصل از این تحقیق می توان نتیجه گرفت که اسانس های زیره ی سبز، کاکوتی و سیاه دانه دارای عملکرد مناسب ضد قارچی علیه آسپرژیلوس فومیگاتوس و آسپرژیلوس فلاووس هستند و امکان استفاده از آن ها به منظور کاربرد در امور پزشکی، داروسازی، دامپزشکی، صنایع غذایی، رایحه درمانی، آرایشی و بهداشتی به صورت دارو و عناصر ضد قارچی وجود دارد.

**کلید واژه ها:** اسانس؛ زیره ی سبز؛ کاکوتی؛ سیاه دانه؛ آسپرژیلوس فومیگاتوس؛ آسپرژیلوس فلاووس

افق دانش؛ فصلنامه ی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی گناباد (دوره ۱۵؛ شماره ۴؛ زمستان سال ۱۳۸۸)

دریافت: ۱۳۸۸/۸/۲۵ اصلاح نهایی: ۱۳۸۸/۱۱/۲۰ پذیرش: ۱۳۸۸/۱۲/۱۸

۱- عضو هیأت علمی گروه آموزشی علوم آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی گناباد و دانشجوی دکتری قارچ شناسی دانشگاه تهران

۲- نویسنده ی مسؤول: استاد مرکز تحقیقات قارچ شناسی، دانشکده ی دامپزشکی، دانشگاه تهران

آدرس: تهران- خیابان آزادی- دانشکده ی دامپزشکی- دانشگاه تهران- مرکز تحقیقات قارچ شناسی صندوق پستی: ۱۴۱۵۵-۶۴۵۳

پست الکترونیک: [Khosravi@ut.ac.ir](mailto:Khosravi@ut.ac.ir)

نمابر: ۰۲۱-۶۶۹۳۳۲۲۲

تلفن: ۰۲۱-۶۱۱۱۷۱۵۱

## مقدمه

آسپرژیلوما<sup>6</sup> نیز به علت آ. فلاووس و آ. نیجر به وجود می آیند (3).

عفونت های آسپرژیلوسی می توانند به اشکال مختلف، شامل بیماری در میزبانان با ایمنی طبیعی، عفونت در بافت های آسیب دیده ی میزبان و عفونت در میزبانان با ایمنی سرکوب شده، ظاهر شوند (4). از طرفی به دلیل وجود آنزیم های تجزیه کننده در این قارچ ها، آن ها می توانند درجه ی بالایی از فساد را، هنگامی که بر روی یا داخل غذا قرار دارند، موجب شوند و از این رو، سلامتی انسان و حیوان را تهدید می کنند (5).

گونه هایی از آسپرژیلوس، مانند آ. فلاووس و آ. پارازیتیکوس<sup>7</sup>، با تولید سموم قارچی، مانند آفلاتوکسین<sup>8</sup>، از اهمیت خاصی برخوردارند. این سموم می توانند سبب بروز اثراتی شامل سمیت حاد و مزمن، سمیت عصبی، اثرات سرکوب کننده ی سیستم ایمنی، ناقص الخلقه زایی، جهش زایی و سرطان زایی بشوند، که به نام مایکوتوکسیکوزیس<sup>9</sup> خوانده می شوند (6).

مقاومت آسپرژیلوس به بسیاری از ضد قارچ های مورد استفاده در کلینیک، پیش آگهی نگران کننده ای را برای افراد مورد تهاجم آسپرژیلوس به همراه دارد (7).

زیره ی سبز، میوه ی خشک شده ی گیاه *Cuminum cyminum* از خانواده ی چتریان<sup>10</sup> است که واجد حداقل 2/5 درصد اسانس می باشد و دارای خواص مختلف مدر، گرم، کرم کش، ضد سم حشرات، درمان اسهال (آمیبی)، شیرآور، ضد باکتریایی و ضد قارچی است. قسمت دارویی گیاه زیره ی سبز، میوه ی آن می باشد (9-11). این گیاه به نام های کمون، سنوت، کرویا و Cumin معروف است.

کاکوتی (*Ziziphora clinopodioeides*) جزو خانواده ی نعناعیان<sup>11</sup> می باشد و به نام آنوخ یا آویشن برگ باریک

یک پرسش عمومی مبنی بر این که چرا در سال های اخیر پژوهش های مرتبط با تأثیر و فعالیت های زیستی روغن های اساسی گیاهان (اسانس ها) بر روی سلامتی انسان به طور متمرکز و متعدد انجام می شوند وجود دارد. از آن جا که داروهای شیمیایی و نگهدارنده های مواد غذایی به عنوان عوامل سرطان زا، مسمومیت زا و ناقص الخلقه زایی مورد توجه قرار گرفته اند، مصرف کنندگان با نظر مشکوک به افزودنی های شیمیایی می نگرند، و به همین علت، تقاضا برای مواد طبیعی و قابل پذیرش از طرف جامعه به منظور پیش گیری از بیماری ها در انسان و دام، نگهداری مواد غذایی و مبارزه با آفات و پوسیدگی ها افزایش یافته است. هم چنین، اخیراً با افزایش عفونت های مقاوم به پادزیست ها، تحقیق در مورد داروهای با کارایی جدید در مقابله با عفونت ها یک ضرورت قطعی است (1).

اسانس ها مخلوطی از متابولیت های ثانویه ی فرار حاصل از گیاهان می باشند که به روش های مختلفی استحصال می شوند. آن ها ترکیبات طبیعی بسیار پیچیده ای هستند که می توانند حاوی حدوداً 20 تا 60 جزء در غلظت های کاملاً متفاوت باشند (2).

قارچ کپکی آسپرژیلوس<sup>1</sup> جنس بزرگی را با بیش از 200 گونه تشکیل می دهد که انسان به طور دایم در مواجهه با آن ها قرار دارد. تنها تعداد کمی از این گونه ها بیماری زا می باشند، که از آن میان بیش از 95 درصد عفونت ها به علت 3 گونه ی آسپرژیلوس، شامل آسپرژیلوس فومیگاتوس<sup>2</sup>، آسپرژیلوس فلاووس<sup>3</sup> و آسپرژیلوس نیجر<sup>4</sup>، می باشند. از آن بین آسپرژیلوس فومیگاتوس، علت اغلب موارد آسپرژیلوزیس مهاجم و غیر مهاجم است.

علاوه بر آن، اشکال آلرژیک بیماری به علت این ارگانسیم ایجاد می شود. آسپرژیلوزیس مهاجم<sup>5</sup> و

6- Aspergilloma

7- *A. Parasiticus*

8- Aflatoxin

9- Mycotoxicosis

10- Apiaceae

11- Lamiaceae

1- Aspergillus

2- *A. fumigatus*3- *A. flavus*4- *A. niger*

5- Invasive Aspergillois

آزمایشگاه هرباریوم دانشکده ی داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مشهد، و توسط کارشناس ارشد سیستماتیک اکولوژی گیاهی، به طریقه ی علمی شناسایی، و جنس و گونه ی آن ها مشخص، و مورد تأیید قرار گرفت. این گیاهان بر اساس اطلاعات حاصل از طب سنتی و طب نبوی و با توجه به مناطق رویش آنان، انتخاب گردیدند (21-22). پس از آسیاب نمودن مواد گیاهی مذکور، اسانس آن ها با استفاده از دستگاه کلونجر<sup>2</sup> و به روش تقطیر با آب<sup>3</sup> تهیه گردیده و پس از آگیری با سولفات سدیم بدون آب، در ویال های قهوه ای با حجم 10 میلی لیتر جمع آوری، و پس از اندود<sup>4</sup> درب ویال ها، با ذکر مشخصات اسانس مربوطه تا هنگام استفاده، در یخچال نگهداری می شدند. اسانس های مورد استفاده در تحقیق شامل اسانس زیره ی سبز، اسانس کاکوتی و اسانس سیاه دانه بودند.

**تهیه ی محلول استاندارد<sup>5</sup> از اسانس ها:** به طور معمول محلول استاندارد اسانس مورد نظر، با غلظت دو برابر اولین غلظت مورد آزمایش ساخته می شد. برای این منظور ابتدا از حلال دی متیل سولفوکساید<sup>6</sup>، که با محیط کشت آر-پی-ام-آی-1640<sup>7</sup> مایع، به میزان 0/1 رقیق شده بود، استفاده شد. به عنوان مثال برای ساخت استوک 2 میلی گرم در میلی لیتر از اسانس مورد نظر، 10 میکرو لیتر از اسانس خالص حاصل از تقطیر را به 0/5 میلی لیتر از DMSO رقیق شده افزوده، و سپس 4/5 میلی لیتر آر-پی-ام-آی-1640 مایع را به آن اضافه نموده تا حجم استوک به 5 میلی لیتر برسد (زیرا طبق محاسبه، غلظت 2 میلی گرم در میلی لیتر مساوی است با 2 میکرو لیتر در میلی لیتر، و 10 میکرو لیتر در 5 میلی لیتر). در این مطالعه تمامی مواد شیمیایی از کمپانی مرک آلمان خریداری گردیدند.

**گونه های قارچی و تهیه ی کونیدیا<sup>8</sup>:** از گونه های آسپرژیلوس فومیگاتوس (ATCC-16913) و آسپرژیلوس

معروف است. این گیاه به طور خودرو در مناطق مختلف ایران می روید. حداقل دارای 1/2 درصد اسانس است. اندام دارویی گیاه شامل قسمت های هوایی آن و به طور عمده برگ های کشیده و مقدار کمی ساقه ی نازک و گل می باشد (13). کاکوتی دارای اثرات ضد میکروبی و ضد عفونی کننده است. به علاوه، اثرات ضد قارچی برای آن نیز گزارش شده است (14-16).

سیاه دانه، دانه های خشک شده ی گیاه *Nigella sativa* از خانواده ی آلاله<sup>1</sup> است و به نام های سیاه تخمه، شونیز، حبه البرکه، کمون اسود، حبه السوداء، شانوج و کمون اکحل خوانده می شود. دانه ها بخش دارویی این گیاه را تشکیل می دهند. دانه ی گیاه حاوی 0/5 تا 1/5 درصد اسانس است (13). سیاه دانه دارای اثرات ضد باکتری، ضد پلاک دندان، ضد قارچی، ضد کرم، ضد تب، ضد مسمومیت، ضد سرطان و آنتی اکسیدان است. این گیاه یکی از داروهای طب نبوی است (17-20).

در سال های اخیر تعداد زیادی از اسانس ها و اجزای سازنده ی آن ها از نظر خصوصیات ضد میکروبی بر روی بسیاری از باکتری ها و قارچ ها، و در بیش از پانصد گزارش، مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته اند (1،2).

اهداف این مطالعه، بررسی اثرات روغن های اساسی زیره ی سبز، کاکوتی و سیاه دانه روی رشد و نابودی دو گونه ی مهم قارچ آسپرژیلوس، شامل آسپرژیلوس فومیگاتوس و آسپرژیلوس فلاووس، که به عنوان بیماری زاهای منتقله از طریق هوا و غذا محسوب می شوند، می باشد.

## روش تحقیق

**آماده سازی مواد گیاهی و اسانس ها:** گیاهان دارویی مورد استفاده در پژوهش از مناطق مختلف استان خراسان رضوی، جمع آوری و به روش صحیح خشک شدند. برگ های کاکوتی از کوه های بینالود شهرستان نیشابور، میوه های زیره ی سبز از شهرستان سبزوار و دانه های سیاه دانه از شهرستان تربت حیدریه تهیه گردیدند. سپس در

2- Clevenger

3- Hydrodistillation

4- Seal

5- Stock

6- Dimethyl Sulfoxide (DMSO)

7- RPMI 1640

8- Conidia

1- Ranunculacea

آزمایش مورد استفاده قرار می گرفتند. هر یک از ارلن ها حاوی 100 میلی لیتر محیط کشت مایع عصاره ی مخمر بود. در ارلن های شاهد مثبت، محیط کشت و اسپوره های قارچی و در ارلن های شاهد منفی، فقط محیط کشت و اسانس وجود داشت.

در این جا، مقدار مناسب اسانس با توجه به غلظت اسانس مورد آزمایش، و هم چنین حجم محیط کشت، محاسبه می شد و پس از حل کردن در 0/5 میلی لیتر حلال DMSO به محیط کشت افزوده می گردید. (به طور مثال، برای تهیه ی رقت 3 میلی گرم در میلی لیتر باید 300 میکرو لیتر از اسانس، پس از حل کردن در 0/5 میلی لیتر DMSO، به ارلن حاوی 100 میلی لیتر محیط کشت اضافه می شد). سپس از سوسپانسیون کونیدیایی استاندارد حاصل از مرحله ی قبل به مقدار کافی به هر کدام از ارلن های حاوی محیط کشت افزوده می شد. ارلن ها به گرمخانه ی 28 درجه ی سانتی گراد مجهز به همزن با حرکت آرام منتقل می شد و نتیجه ی کشت پس از 48 تا 72 ساعت، و سپس تا 4 روز، از نظر درجه ی رشد یا عدم رشد مورد ارزیابی بصری قرار می گرفت. علاوه بر آن، از هر کدام از نمونه های مورد آزمایش، کشت مجدد به عمل آمده، که نتایج ثبت و قضاوت بر آن مبنا انجام می شد. نتایج نهایی به صورت میانگین MIC90 و MFC های حاصل از 4 بار آزمایش محاسبه شد، که در جدول 1 مشخص گردیده است. تمامی وسایل، مواد و محیط های کشت مورد استفاده استریل بود و کار نیز در زیر هود، کنار شعله و با دستکش و ماسک و در شرایط استریل انجام می شد.

MIC در پلیت های حاصل از کشت، پلیتی است که کاهش رشد قارچ در آن غلظت از اسانس، در مقایسه با پلیت شاهد مثبت، مشهود است. در این تحقیق آنچه به عنوان MIC ثبت شده است، MIC90 می باشد، یعنی پلیتی که کاهش 90 درصدی رشد را در مقایسه با شاهد مثبت نشان می دهد. MFC پلیتی است که در آن غلظت از اسانس، و در مقایسه با پلیت شاهد مثبت، هیچ رشد قابل ملاحظه ی قارچی حتی بعد از انکوباسیون کشت های مجدد، مشهود نیست. از آماره های میانگین، انحراف معیار و فاصله ی

فلاووس (*ATCC-16013*) به عنوان میکرو ارگانیزم های مورد آزمایش، استفاده گردید. این گونه ها از مجموعه ی قارچی مرکز تحقیقات قارچ شناسی دانشکده ی دامپزشکی دانشگاه تهران اخذ گردیدند.

گونه های قارچی در محیط ژلوز سیب زمینی<sup>1</sup>، به صورت شیب دار<sup>2</sup>، در حرارت 28 درجه ی سانتی گراد، و به مدت 10 روز، کشت اولیه شدند. کونیدیا ها پس از برداشت از محیط کشت، در آب مقطر استریل حاوی 0/01 درصد توپین<sup>3</sup> 80 قرار گرفتند. سپس، به مدت 15 ثانیه مخلوط گردیدند و 5 دقیقه اجازه داده شد تا قطعات سنگین ته نشین شوند. اسپوره های موجود در سوسپانسیون حاصل با 3 بار تکرار توسط لام هموسیتومتر<sup>4</sup> شمارش شد و در غلظت  $1 \times 10^6$  کونیدیا در میلی لیتر استاندارد گردید.

**تعیین فعالیت ضد قارچی اسانس ها:** به منظور تعیین حداقل غلظت مهارکننده<sup>5</sup> و حداقل غلظت قارچ کشی<sup>6</sup>، از روش رقیق سازی (براث ماکرودیوسسیون<sup>7</sup>)، استفاده شد، بدین ترتیب که ابتدا هر کدام از اسانس ها به صورت آزمایشی<sup>8</sup>، و به طور جداگانه، یک بار روی آسپرژیلوس فومیگاتوس و یک بار روی آسپرژیلوس فلاووس، در غلظت های مختلف 1، 0/75، 0/5، 0/25 و 0/1 میلی گرم در میلی لیتر، تأثیر داده شدند و با استفاده از نتایج حاصل از آن، اسانس های مورد نظر در غلظت های 1، 2/5، 2، 1/5، 0/5 و 0/25 میلی گرم در میلی لیتر به روش براث ماکرودیوسسیون بر روی قارچ های مذکور مورد سنجش قرار گرفتند. بر این اساس هفت ارلن حاوی محیط کشت، اسانس و کونیدی قارچ و هفت ارلن به عنوان شاهد، شامل 2 شاهد مثبت برای هر قارچ و یک شاهد منفی برای هر کدام از اسانس ها، در نظر گرفته شد، و چون آزمایش بر روی دو گونه ی قارچی انجام می شد در مجموع 19 ارلن در هر بار

- 1- Potato Dextrose Agar (PDA)
- 2- Slant
- 3- Tween 80
- 4- Haemocytometer
- 5- Minimum Inhibitory Concentration (MIC90)
- 6- Minimum Fungicidal Concentration (MFC)
- 7- Broth Macro Dilution
- 8- Pilot Study

به 1/75 میلی گرم در میلی لیتر ختم می شود. هم چنین MFC این روغن ها 0/5 تا 2 میلی گرم در میلی لیتر تعیین گردید. حدود اطمینان محاسبه شده، مؤید اطمینان 95 درصدی از فعالیت و تأثیر مقادیر معین اسانس های مزبور علیه هر دو گونه قارچ مورد آزمایش می باشد.

میانگین MFC های اسانس مورد آزمایش، با توجه به MFC های آن اسانس در هر یک از گونه های قارچی مورد مطالعه، محاسبه شد و سپس همین عمل نیز برای MIC های آن اسانس ها، انجام گرفت، که نهایتاً اختلاف MFC و MIC های به دست آمده برای اسانس های زیره ی سبز، کاکوتی و سیاه دانه به ترتیب 0/44، 0/91 و 0/75 میلی گرم در میلی لیتر تعیین گردید.

هم چنین هر کدام از اسانس ها، دو به دو با یکدیگر و سپس تمامی آن ها با هم و به نسبت مساوی مخلوط شدند. نتیجه ی حاصل در مورد مخلوط اسانس زیره ی سبز و سیاه دانه، مشابه اثر زیره ی سبز به تنهایی، و مخلوط اسانس کاکوتی و سیاه دانه، مشابه اثر کاکوتی به تنهایی، و مخلوط زیره سبز و کاکوتی، مشابه اثر زیره ی سبز به تنهایی، و مخلوط اسانس های زیره ی سبز، کاکوتی و سیاه دانه، مشابه اثر زیره ی سبز به تنهایی بود. با استفاده از میانگین و فاصله ی اطمینان حاصل از آزمایشهای MIC و MFC اسانس های مورد آزمایش بر روی *Aspergillus fumigatus* و *Aspergillus flavus*، با اطمینان 95 درصدی، تفاوت آماری معنی داری بین میانگین های آزمایشهای فوق در این دو گونه ی قارچی وجود نداشت، و هر کدام از اسانس های سه گانه تأثیر تقریباً یکسانی بر روی هر یک از گونه های قارچی داشتند.

نمودارهای 1 و 2 به ترتیب بیان گر میزان حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت قارچ کشی اسانس های زیره ی سبز، کاکوتی و سیاه دانه روی قارچ های *Aspergillus fumigatus* و *Aspergillus flavus* می باشد. در نمودار شماره 3، MIC90 و MFC هر کدام از اسانس های زیره سبز، کاکوتی و سیاه دانه، روی گونه های قارچی *Aspergillus fumigatus* و *Aspergillus flavus*، برحسب میلی گرم در میلی لیتر، مقایسه شده است.

اطمینان برای تجزیه و تحلیل داده ها استفاده گردید. به منظور تعیین وجود و یا عدم وجود تفاوت بین دو میانگین مستقل با استفاده از فواصل اطمینان، ملاک های ذیل مد نظر قرار گرفت: 1- فاصله ی اطمینان دو میانگین کاملاً از یکدیگر جدا هستند و هیچ گونه فصل مشترکی ندارند، بنابراین، 95 درصد اطمینان داریم که تفاوت وجود دارد. 2- فاصله ی اطمینان دو میانگین نه تنها دارای فصل مشترک هستند، بلکه میانگین یک گروه در فاصله ی اطمینان گروه دیگر قرار دارد. بنابراین، با اطمینان 95 درصد نتیجه می گیریم که هیچ گونه تفاوتی بین دو میانگین وجود ندارد (21).

## یافته ها

میانگین، انحراف معیار و حدود اطمینان حاصل از 4 بار تکرار آزمایشهای مربوط به MIC و MFC اسانس های زیره ی سبز (*Cuminum cyminum*)، کاکوتی (*Ziziphora clinopodioeides*) و سیاه دانه (*Nigella sativa*)، علیه قارچ های کپکی *Aspergillus fumigatus* و *Aspergillus flavus*، به روش برات ماکرودیلوسیون، پس از 48 ساعت انکوباسیون بر حسب میلی گرم در میلی لیتر، در جدول 1 ارائه شده است.

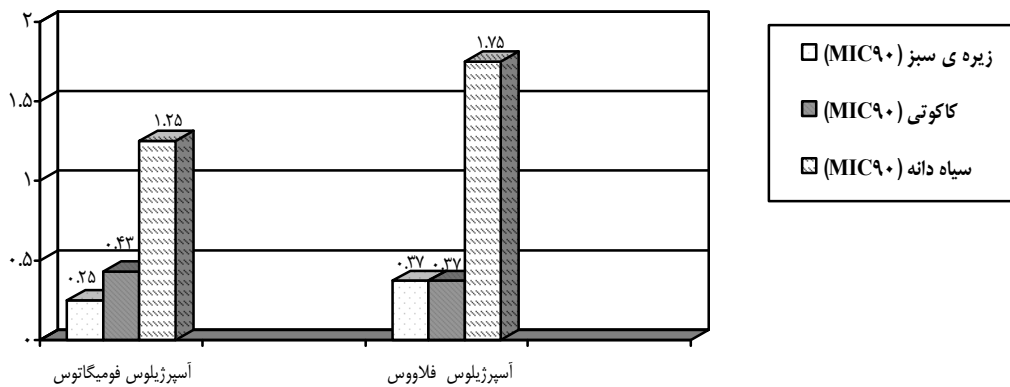
مطابق داده های مندرج در جدول فوق، میانگین تأثیرات مهاری رشد و قارچ کشی اسانس های مزبور، در مقابل کپک های *Aspergillus fumigatus* و *Aspergillus flavus*، به نوع اسانس، مقدار مورد استفاده (mg/ml) و قارچ تحت آزمایش بستگی دارد، به طوری که کم ترین مقادیر میانگین MIC و MFC به ترتیب به اسانس های زیره ی سبز، کاکوتی و با کمی فاصله، به سیاه دانه اختصاص دارد و بیشترین مقدار، مربوط به اسانس سیاه دانه است.

بنابر یافته های این پژوهش، قوی ترین اثر ضد قارچی اسانس های مورد آزمایش به ترتیب مربوط به زیره ی سبز، کاکوتی و سپس سیاه دانه می باشد. فعالیت ضد قارچی روغن های اساسی زیره ی سبز و کاکوتی در مقایسه با اسانس سیاه دانه به یکدیگر نزدیک تر بود.

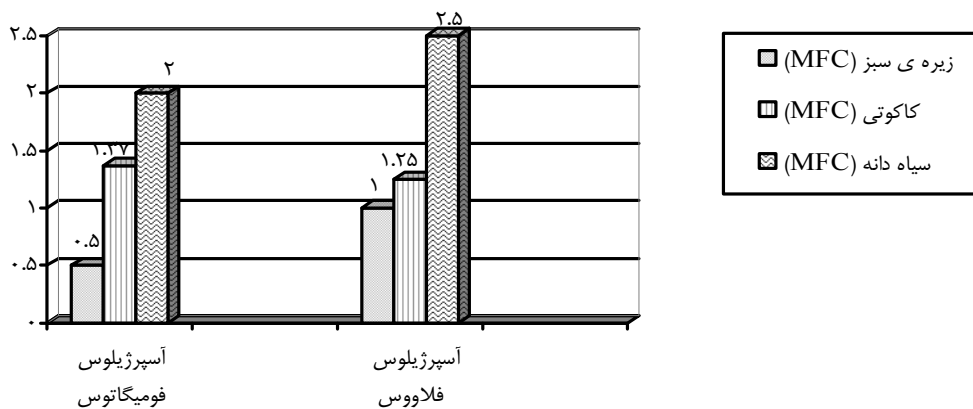
MIC روغن های گیاهی مورد آزمایش علیه هر دو گونه ی قارچ از 0/25 میلی گرم در میلی لیتر شروع شده و

جدول ۱: میانگین، انحراف معیار و حدود اطمینان (%۹۵) حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MFC) حاصل از ۴ بار تکرار آزمایش برات ماکرودیوسین هر کدام از اسانس های زیره ی سبز، کاکوتی و سیاه دانه علیه هر یک از قارچ های آسپرژیلوس فومیگاتوس و آسپرژیلوس فلاووس بر حسب غلظت (mg/ml)

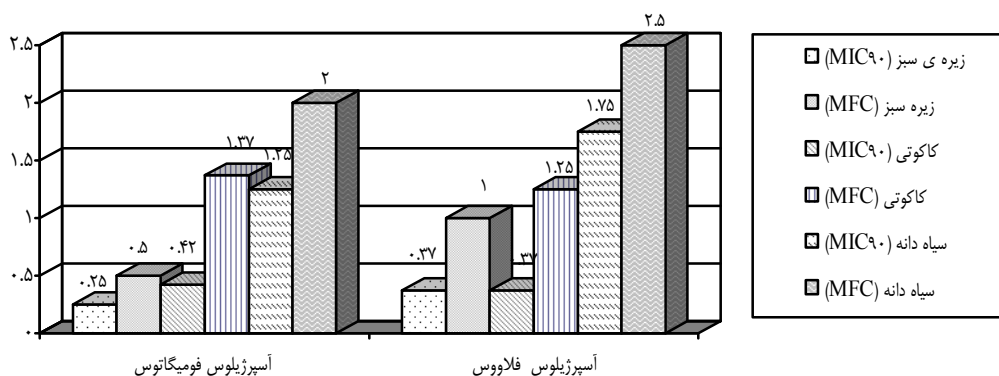
اسانس گیاهی	آسپرژیلوس فومیگاتوس			آسپرژیلوس فلاووس		
	MIC90	MFC	فاصله ی اطمینان	MIC90	MFC	فاصله ی اطمینان
زیره ی سبز	۰/۲۵	۰	۰/۲۵-۰/۲۵	۰/۳۷	۰	۰/۳۷-۰/۳۷
کاکوتی	۰/۴۳	۱/۳۷	۰/۳۳-۰/۵۵	۰/۳۷	۰/۴۷	۰/۳۳-۰/۹۱
سیاه دانه	۱/۲۵	۰/۲۸	۱/۴۸-۲/۰۲	۱/۲۵	۲	۲-۲



نمودار ۱: میزان حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC90) اسانس های زیره ی سبز، کاکوتی و سیاه دانه روی رشد قارچ های آسپرژیلوس فومیگاتوس و آسپرژیلوس فلاووس بر حسب میلی گرم در میلی لیتر



نمودار ۲: میزان حداقل غلظت قارچ کشی (MFC) اسانس های زیره ی سبز، کاکوتی و سیاه دانه روی قارچ های آسپرژیلوس فومیگاتوس و آسپرژیلوس فلاووس بر حسب میلی گرم در میلی لیتر



نمودار ۳: مقایسه ی حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد و حداقل غلظت قارچ کشی هر کدام از اسانس های زیره ی سبز، کاکوتی و سیاه دانه روی هر یک از قارچ های آسپرژیلوس فومیگاتوس و آسپرژیلوس فلاووس بر حسب میلی گرم در میلی لیتر

### بحث

به طور کلی آزمایش و ارزیابی عمل ضد میکروبی اسانس ها (روغن های اساسی) به دلیل پیچیدگی، فراریت و غیر قابل حل بودن آن ها در آب مشکل است. ولی با تمهیدات خاصی از قبیل استفاده از یک حلال یا ماده ی تسهیل کننده ی انتشار، که خود روی رشد و تمایز میکرو ارگانیسم های مورد آزمایش تأثیر نداشته باشد، احتراز از انکوباسیون طولانی مدت اسانس ها و در نتیجه پیش گیری از تصعید و نابودی بعضی از اجزای آن ها، استفاده از میکرو ارگانیسم های مورد آزمایش به تعداد استاندارد شده و مشخص، تکرار آزمایشها بین 2 تا 7 بار، مقایسه ی کشت های رشد یافته با موارد شاهد مثبت و منفی، به کارگیری روش های مناسب مورد استفاده، مانند روش رقیق سازی (دیلسیون) سریالی، توجه به عواملی از قبیل وضعیت کشت، مانند نوع، حجم، غلظت، سن تلقیح، درجه حرارت و مدت زمان انکوباسیون، می توان تا حدود زیادی بر مشکلات فوق فائق آمد (1).

روغن های اساسی از ساخت DNA، RNA، پروتئین ها و پلی ساکارید ها در سلول های قارچی و باکتریایی جلوگیری می کنند، و این مواد تغییراتی مشابه به اثرات ناشی از فعالیت پادزیست را در قارچ ها موجب می شوند. بسیاری از محققین به عملکرد ضد میکروبی اسانس ها توجه دارند و بعضی از اجزای مختلف اسانس ها و ترکیبات آن ها را به منظور یافتن تأثیرات هم افزایی احتمالی مورد آزمایش قرار می دهند (1,2). در این مطالعه تأثیر مناسب روغن های

با استفاده از فواصل اطمینان حاصل از آزمایشهای انجام شده به منظور بررسی تفاوت بین دو میانگین مستقل و مقایسه MIC های اسانس های سه گانه روی هر یک از گونه های آسپرژیلوس با اطمینان 95 درصد، می توان اظهار نمود که بین MIC های اسانس های زیره ی سبز و کاکوتی، زیره ی سبز و سیاه دانه، کاکوتی و سیاه دانه بر روی آسپرژیلوس فومیگاتوس تفاوت وجود دارد. هم چنین، بین میانگین MIC های اسانس های زیره سبز و سیاه دانه، کاکوتی و سیاه دانه، روی آسپرژیلوس فلاووس اختلاف وجود داشت ولی بین میانگین MIC اسانس های زیره ی سبز و کاکوتی تفاوت معنی داری مشاهده نگردید، و این دو اسانس تأثیر مشابهی روی آسپرژیلوس فلاووس داشتند. همین نتایج از مقایسه ی میانگین MFC های اسانس های سه گانه ی مزبور روی هر یک از گونه های قارچی مورد آزمایش به دست آمد.

توضیح این که آخرین رقت از اسانس مورد آزمایش را که قارچ در آن رشد نمی کند، به عنوان MFC تلقی کرده، و رقت قبل از آن، به عنوان MIC90 در نظر گرفته شد.

برای تأیید آزمایشها، از رقت های مذکور روی محیط کشت PDA کشت مجدد انجام می شد و نتایج رشد قارچ ثبت می گردید. بنابراین، مبنای قضاوت در مورد MFC و MIC90، به ترتیب، عدم رشد قارچ و کاهش 90 درصدی رشد، در رقت مورد آزمایش اسانس مورد نظر بود.

با توجه به فعالیت قوی تر اسانس زیره ی سبز بر روی گونه های قارچی مورد آزمایش نسبت به اسانس های کاکوتی و سیاه دانه ممکن است فعالیت متفاوت این روغن ها مربوط به ترکیبات مختلف، فرم ساختمانی، اجزای تشکیل دهنده و گروه های عامل آن ها و احتمال عملکرد هم افزایی بین اجزای آن ها باشد (27).

ترکیبات اصلی روغن زیره ی سبز، شامل پاراسیمول (سیمین)<sup>1</sup>، پی نن<sup>2</sup>، سینئول<sup>3</sup> و لینالول<sup>4</sup> هستند. حال آن که ترکیبات اصلی یافت شده در اسانس کاکوتی، پولگون<sup>5</sup>، منتون<sup>6</sup>، 1 و 8 سینئول<sup>7</sup> و لیمونن<sup>8</sup>، و در روغن سیاه دانه، تیموکینون<sup>9</sup>، پی-سیمین<sup>10</sup>، کارواکرول<sup>11</sup> و ترانس آنتول<sup>12</sup> می باشد (10,13,15,17).

در مطالعه ای که بر روی تیموکینون به عنوان یک ماده ی فعال سیاه دانه انجام شده است، تأثیر مهار صد در صدی این ماده بر روی آسپرژیلوس نیچر در غلظت 2 میلی گرم در میلی لیتر به دست آمده است (18).

تعدادی از محققین MIC مربوط به 24 روغن اساسی را علیه 9 باکتری و 7 قارچ معین نمودند. تمام روغن های مورد آزمایش، تأثیر قطعی و مشخصی را علیه میکوباکتریوم اسمگماتیس<sup>13</sup> با MIC برابر 62/5-4000 میکروگرم در میکرولیتر داشتند. 13 روغن رشد استافیلوکوک اورئوس<sup>14</sup> و 17 روغن رشد کاندیدا آلبیکانس<sup>15</sup> را مهار کردند. اما فقط 6 روغن روی آسپرژیلوس نیچر و 3 روغن هنگامی که به غلظت 250-4000 میکروگرم در میلی لیتر می رسیدند، روی استرپتوکوکوس فکالیس<sup>1</sup> مؤثر بودند. در مطالعه ای فعالیت

اساسی زیره ی سبز، کاکوتی و سیاه دانه، علیه گونه های آسپرژیلوس فومیگاتوس و آسپرژیلوس فلاووس، توسط آزمایش برات ماکرودیلوسیون تأیید گردید. با توجه به MIC90 های حاصل، و بر مبنای طبقه بندی Aligiannis و همکاران در سال 2001 میلادی، که مواد گیاهی را بر اساس MIC آن ها به انواع مهارکننده های قوی ( $MIC \leq 0/5 \text{ mg/ml}$ )، متوسط ( $0/6 \text{ mlg/ml} \leq MIC \leq 1/5 \text{ mg/ml}$ ) و ضعیف ( $MIC \geq 1/6 \text{ mg/ml}$ ) طبقه بندی نمودند (24).

اسانس های زیره ی سبز، کاکوتی و سیاه دانه مورد مطالعه در این پژوهش به ترتیب، از فعالیت مهار رشد و کشندگی قوی، قوی و متوسط در برابر گونه های آسپرژیلوس فومیگاتوس و آسپرژیلوس فلاووس برخوردار بودند. MFC رقتی از ماده مؤثره (اسانس) است که می تواند اسپورهای قارچ های مورد آزمایش را نیز از بین ببرد ولی در مورد MIC این عمل به طور کامل انجام نمی شود. اختلافات جزئی در MIC های حاصل از اسانس های مورد بررسی علیه آسپرژیلوس فومیگاتوس و آسپرژیلوس فلاووس احتمالاً به اندازه ی اسپور یا کونیدی قارچ مورد آزمایش وابسته است (25).

از طرفی Manavathu و همکاران مشاهده نمودند که استفاده از میسیلیوم های رویش یافته، همیشه سبب ایجاد MIC های بالاتر نسبت به استفاده از اسپور یا کونیدیای قارچی می شود (26).

بر اساس میانگین حاصل از MFC ها و هم چنین MIC های یک اسانس مشخص در هر کدام از دو گونه قارچ آسپرژیلوس، و محاسبه ی اختلاف بین MFC و MIC های مربوط به همان اسانس در گونه های قارچی تحت بررسی که در بخش نتایج برای اسانس های مورد آزمایش تعیین گردیده است، می توان یک فعالیت اثربخش تر اسانس زیره ی سبز را بر روی قارچ های مذکور ملاحظه نمود، زیرا اختلاف هرچه کمتر بین MFC و MIC دلیل بر سودمندی بیش تر آن به عنوان یک دارو و یا یک ماده ضد میکروبی می باشد. مطالعه حدود اطمینان حاصل از بررسی که نشان دهنده ی اختلاف ناچیز بین حد بالا و حد پایین آن می باشد، نیز مؤید مطلب فوق الذکر است.

1- Para-Cymol (Cymen)

2- Pinene

3- Cineole

4- Linalool

5- Pulegone

6- Menthone

7- Cineole

8- Limonene

9- Thymoquinone

10- Cymene

11- Carvacrol

12- Trans Anethole

13- *Mycobacterium Smegmatis*14- *Staphylococcus aureus*15- *Candida albicans*



عملکرد ضد قارچی در جلوگیری از رشد آسپرژیلوس فومیگاتوس و آسپرژیلوس فلاووس هستند.

براساس فعالیت ضد قارچی این روغن ها امکان استفاده از آن ها، به منظور کاربرد در امور پزشکی، دارو سازی، دامپزشکی، صنایع غذایی، آرایشی و بهداشتی به صورت عناصر ضد قارچی وجود دارد. هم چنین، نتایج حاصل از این بررسی در کاربرد اسانس های زیره ی سبز، کاکوتی و سیاه دانه مفید است، زیرا تعیین مقدار عددی MIC و MFC اسانس گیاهان مناطق مختلف جهت کاربرد آن در محصولات دارویی ضروری است، و از آن جایی که گیاهان مورد مطالعه به فراوانی در ایران رشد می یابند، استفاده از این گیاهان و محصولات آن ها مناسب و مقرون به صرفه است. از طرف دیگر، به علت این که روغن های اساسی در شرایط آزمایشگاهی نسبت به محل اصلی خودشان مانند داخل غذا یا در بیماران ممکن است بیشتر فعال باشند، پیشنهاد می شود این موضوع زمینه ی تحقیقات بعدی قرار گیرد و به منظور ارزیابی خواص درمانی این اسانس ها بررسی های بیشتری بر روی حیوانات آزمایشگاهی و نهایتاً بیماران انجام شود و به عنوان نگه دارنده های مواد غذایی، آزمایشات مناسبی در سیستم های غذایی طراحی گردد. از این اسانس ها می توان در آروماتراپی (رایحه درمانی) نیز استفاده نمود.

### تشکر و قدردانی

از کارشناس محترم آزمایشگاه هرباریوم دانشکده ی داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مشهد و کارشناس محترم آزمایشگاه مرکز تحقیقات قارچ شناسی دانشکده ی دامپزشکی دانشگاه تهران که در مراحل انجام این پژوهش ما را یاری دادند، تقدیر و تشکر می شود.

ضد قارچی 11 روغن اساسی علیه آسپرژیلوس نیچر، به روش برات دیلوسیون تعیین گردید، که از آن میان 5 روغن اثرات مہاری روی میکرو ارگانیسم مورد آزمایشهای داشتند (1).

نتایج حاصل از آزمایشهای متعدد، استفاده از روغن های اساسی به عنوان نگهدارنده های مواد غذایی را نیز مورد ترغیب قرار می دهد (1,15).

عدم کاهش مقادیر MIC و MFC مخلوط اسانس های مورد آزمایش به صورت دو به دو و یا هر سه ی آن ها، بیان گر فقدان تأثیر هم افزایی قابل توجهی بین آن ها می باشد. گرچه در توجیه قدرت ضد میکروبی یک اسانس می توان این توانایی را با تأثیرات سودمند هم افزایی اجزای تشکیل دهنده آن اسانس خاص مربوط دانست، ولی این حالت، هنگامی که اسانس های مورد آزمایش با هم مخلوط می شوند کمتر از آن است که اهمیتی از نظر عملی داشته باشد. میزان تأثیر مخلوط اسانس ها با جمع جبری میزان اثر هر یک از آن ها به تنهایی، هماهنگ نیست و کمتر از تأثیر مجموع آن ها می باشد؛ بنابراین، می توان حدس زد که در این جا اسانس ها به طور متقابل عمل نموده اند.

بالعکس هم افزایی بین روغن های اساسی و افزودنی های مواد غذایی ممکن است راهنمای استفاده ی مقادیر کمتر نگهدارنده های غذایی دارای بو و مزه (معطر) باشد، زیرا کاربرد روغن های اساسی در صنعت غذایی اغلب به علت مزه و بوی آن ها دارای محدودیت است. البته بعضی از اسانس ها تأثیرات هم افزایی مہارکننده ای را با نمک، ساکارز یا اسید آسکوربیک نشان دادند (1).

### نتیجه گیری

از یافته های حاصل از این تحقیق می توان نتیجه گرفت که روغن های زیره ی سبز، کاکوتی و سیاه دانه دارای

### References:

- 1- Kalemba D, Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils (A review article). Current Medicinal Chemistry 2003; 10: 813-829.

1- Streptococcus faecalis

- 2- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils-A review. Food and Chemical Toxicology 2008; 46: 446-475.
- 3- Anaissie EJ, Mc Ginnis MR, Pfaller MA. Clinical Mycology. Churchill Livingstone 2003: 273-296.
- 4- Bodey GP, Vartivarians. Aspergillosis. Eur J Clin Microbial Infect Dis 1989; 8: 413-437.
- 5- Ovary DP, Seifert KA, Savard ME, Frisvad JC. Spoilage fungi and their mycotoxins in commercially marketed chestnuts. Int J. Food Microbial 2003; 88: 69-77.
- 6- Razzaghi-Abyaneh M, Shams-Ghahfarokhi M, Yashinari T, Rezaee MB, Jaimand K, Nagasawa H, et al. Inhibitory effects of *Satureja hortensis* L. essential oil on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. International Journal of Food Microbiology 2008; 123: 228-233.
- 7- Curtis L, Conroy L, Coli S, Baker K, Our CG, Hershov R, et al. Aspergillus's surveillance project at a large tertiary-care hospital. J Hosp Infect 2005; 59: 188-196.
- 8- Shahsavar Condory GH, Asgarzadeh MA. The mechanisms of stable improvement of Iranian herbal drugs. Proceeding of the national congress of stable improvement of Iranian herbal drugs 2006.
- 9- Kafi M. *Cuminum cyminum*: production and processing. Center of excellence for Agronomy Faculty of Agriculture Ferdowsi University of Mashad 2003: 165-182.
- 10- Nicola S. Iacobellis, Pietro lo Cantore, Capasso F, Senatore F. Antibacterial activity of *Cuminum cyminum* L. and *Carum carvi* L. essential oils. J Agric Food Chem 2005; 53(1): 57-61.
- 11- Bansod S, Rai M. Antifungal activity of essential oils from Indian medicinal plants against human pathogenic *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus niger*. World Journal of Medical Sciences 2008; 3(2): 81-88.
- 12- Georgani S. Al-aghrazoltebbieh. Translated by Hassan Tajbakhsh. Tehran, Iran: 2008.
- 13- Ghasemi-Dehkordi N, et al. Iranian herbal pharmacope. Ministry of Health; Tehran, Iran: 1998.
- 14- Ozturc S, Ercisly S. Antibacterial activity and chemical constitutions of *Ziziphora clinopodioides*. Food Control 2007; 18(5): 535-540.
- 15- Unal EL, Mavi A, Aydan-Kara A, Sengul M, Yildirim A. Antimicrobial and antioxidant activities of some plants used as remedies in Turkish traditional medicine. Pharmaceutical Biology 2008; 46(3): 207-224.
- 16- Kursat M, Erecevit. The antimicrobial activities of methanolic extracts of some *Lamiaceae* members collected from Turkey. Turkish Journal of Science Technology 2008; 4(1): 81-85.
- 17- Ali BH, Blunden G. Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa* (Review Article). Phytother Res 2003; 17: 299-305.
- 18- Al-Jaber S, Al-Akloby OM, Al-Qurashi AR, Akhtar N, Al-Dossary A, Randhawa MA. Tymoquinone, an active principle of *Nigella sativa*, inhibited *Aspergillus niger*. Pakistan J Med Res 2003; 42(3).
- 19- Khan M.A.U, Ashfaq M.k, Zuberi H.S, Mahmood M.S, Gilani A.H. The invitro anti fungal activity of the aqueous astract from *Nigella sativa* seeds. Phytother Res 2003; 17: 183-186.
- 20- Khan N, Sultana S. Inhibition of two stage renal carcinogenesis, oxidative damage and hyper response by *Nigella sativa*. Europen Journal of Cancer Prevention 2005; 14(2): 159-168.
- 21- Beth DS, Robret G. Basic and Clinical Biostatistics. Translated by Sarafraz AA, Ghaffar-zadegan K. Ferdowsi University Press, Mashhad, Iran: 1997.

- 22- Aynehchi Y, Salehi Sormaghi M.H. Screening of Iranian Plants for Antimicrobial Activity. Acta Pharm. Suec 1980; 17: 341-346.
- 23- Fazly Bazzaz B.S, Harirzadeh G. Screening of Iranian Plants for Antimicrobial Activity. Pharmaceutical Biology 2003; 41(8): 573-583.
- 24- Aligiannis N, Kalpotzakis E, Mitaku S, Chinou IB, Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *origanum* species. J Agri Food Chem 2001; 40: 4168-4170.
- 25- Robert A, Samson, Ellen S. Hoekstra. Introduction to Food and Airborne Fungi. 6<sup>th</sup>, an Institute of the Royal Netherlands. Academy of Arts and Sciences. The Netherlands, 2002.
- 26- Elias K. Manavathu, Jessica Cutright, Pranatharthi H. Chandrasekar. Comprative study of susceptibilities of germinated and ungerminated conidia of *Aspergillus fumigatus* to various antifungal agents. Journal of Clinical Microbiology 1999; 37(3): 858-861.
- 27- Dorman HGD and Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. J Appl Microbiol 2000; 88(5): 308-316.

## The Effects of the Herbal Essences on the Two Important Species of *Aspergillus*

Mohammad Hassan Minoeian Haghighi<sup>1</sup> and Alireza Khosravi<sup>2</sup>

### Abstract

**Background and Aim:** Complications due to chemical usage and the artificial preservatives of food stuffs, an increase in microbial infections resistant to antibiotics, consideration of Aspergillosis and Mycotoxicosis as important fungal diseases, and also mold decay of agricultural products, on the one hand, and the great potential essences against microorganisms, on the other hand, have led us to carry out this study. The aim of the study is to survey the effects of *Cuminum cyminum*, *Ziziphora clinopodioiedes* and *Nigella sativa* which grow in Khorasan Razavi Province on the growth of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus*.

**Materials and Methods:** In this experimental study, herbal substances which include *Cuminum cyminum*, *Ziziphora clinopodioiedes* and *Nigella sativa* were selected and collected during the year 2008. Then, their essential oils (essences) were extracted by hydro-distillation procedure. By applying Broth Macro Dilution technique and four times of repetition, the mean of Minimum Inhibitory Concentration (MIC90) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC) of the above-mentioned essences was certified against *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus* in concentrations of 3, 2.5, 2, 1.5, 1, 0.5 and 0.25 mg /ml. The testing fungi were observed from growth level point of view after being cultured in 28 degrees centigrade in Yeast Extract Sucrose (YES) broth media for 48, 72 and 96 hours in order. Then, their MIC and MFC were determined by being sub-cultured in Potato Dextrose Agar (PDA).

**Results:** In general, after repeating the test 4 times, the mean of MIC90 and MFC of the above-mentioned essences against both types of fungi was determined from a low of 0.25 to a high of 1.75 and a low of 0.5 to a high of 2.5 mg/ml, respectively. According to the results of this study, the essential oils of *Cuminum cyminum* and *Ziziphora clinopodioiedes* showed the best and most tonic activity against both types of fungi ( $0.25 \leq \text{MIC90} \leq 0.43$ ) while *Nigella sativa* showed a fairly moderate activity against them ( $1.25 \leq \text{MIC90} \leq 1.75$ ).

**Conclusion:** The findings of this study showed that *Cminum cyminum*, *Ziziphora clinopodioiedes* and *Nigella sativa* have fungicidal and anti-fungal functions against *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus*. Therefore, they can be used in medical pharmacology, veterinary, food industries, aromatherapy and health affairs as drugs and anti-fungal elements.

**Keywords:** Essences, *Cuminum cyminum*, *Ziziphora clinopodioiedes*, *Nigella sativa*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*

*Ofogh-e-Danesh. GMUHS Journal. 2010; Vol. 16, No. 1*

1- Faculty Member, Department of Basic Sciences and Laboratory Sciences, Gonabad University of Medical Sciences, Gonabad, Iran and PhD Candidate of Mycology at Tehran University, Tehran, Iran

2- **Corresponding Author:** Professor at Research Center for Mycology, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran, Iran. **Tel:** +98 21 61117151 **Fax:** +98 21 66933222 **E-mail:** [Khosravi@ut.ac.ir](mailto:Khosravi@ut.ac.ir)