

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

مهسا عنایتی<sup>۱\*</sup>، منصور بیات<sup>۲</sup>، افشین محسنی‌فر<sup>۳</sup>

## چکیده

پودر ماهی یک ماده مغذی و سرشار از ویتامین‌ها، مواد معدنی و پروتئین‌های قابل هضم است. حضور انواع قارچ‌های مولد مایکوتوکسین علاوه بر کاهش تولید محصولات کشاورزی خسارت‌های جبران ناپذیری را بر سلامت و بهداشت جامعه وارد می‌کند. در پژوهش حاضر اثر مهاری نانواسانس‌های گیاه درمنه و مرزه بر روی گونه‌های آسپرژیلوس جدا شده از پودر ماهی کارخانجات تولیدی استان مازندران با استفاده از تکنیک ریزو-وقت بررسی شد. کیتوزان ترکیب غیر سمی، طبیعی و قابل تجزیه بوده که از کیتین مشتق شده است. کیتوزان دارای خاصیت ضد میکروبی قوی بر علیه طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها از جمله قارچ‌ها، باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی می‌باشد. این تحقیق بر روی ۸۹ نمونه پودر ماهی از ۱۴ کارخانه استان مازندران به منظور جداسازی و شناسایی آسپرژیلوس‌های موجود در پودر ماهی انجام گردید. بعد از کشت بر روی محیط سابورو دکسترروز آگار و گرمخانه گذاری و در نهایت بررسی هریک از پرگنه‌ها و مشاهده در زیر میکروسکوپ آسپرژیلوس‌های موجود خلص سازی گردید. بیشترین و کمترین تعداد مربوط به آسپرژیلوس فومیگاتوس و آسپرژیلوس نیدولانس بوده است. سپس برای انجام آزمون MIC و MFC از کشت در محیط 2% RPMH1640 در میکرو پلیت استفاده شد. نتایج آزمون MIC نشان داد که نانواسانس مرزه اثر بهتری نسبت به نانواسانس درمنه دارد.

کلید واژگان: پودر ماهی، آسپرژیلوس، نانواسانس، درمنه، مرزه

تاریخ دریافت: ۹۲/۷/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۲/۸/۱۲

## مقدمه

اهمیت پودر ماهی بعنوان یک ماده خوراکی جهت تأمین قسمتی از پروتئین جیره حیوانی دام، طیور و آبزیان از دیرباز مورد توجه بوده است. قارچ‌های آسپرژیلوس، پنی سیلیوم و فوزاریوم از عمده ترین قارچ‌هایی هستند که سم موجود در آنها در کاهش کیفیت و انتقال بیماری در حیواناتی که از این فرآورده استفاده می‌کنند، سهم عمده‌ای دارد. کپک‌ها بر روی مواد آلی مانند غلات در حال رشد و غذاهای انباری قادر به

رشد بوده که به دلیل تولید متابولیت‌های ثانویه و ایجاد خطر برای انسان و دام، حائز اهمیت می‌باشند (۵ و ۴). تاکنون بیش از ۳۰۰ مایکوتوکسین شناسایی شده که حدود ۲۰ نوع از این مایکوتوکسین‌ها در محصولات غذایی انسان و خوراک دام به فراوانی یافت می‌شوند (۱۵). در شرایط محیطی گرما، رطوبت، آسب حشرات و هرگونه استرس به گیاه یا محصول کشاورزی، میزان تولید مایکوتوکسین‌ها در آنها افزایش می‌یابد (۱۰). حضور مایکوتوکسین‌ها با غلظت‌های بالا در محصولات کشاورزی علاوه بر کاهش تولید محصولات کشاورزی، در صورت مصرف آنها در تغذیه انسان و دام موجب خسارت-های جبران ناپذیری بر سلامت و بهداشت جامعه می‌شوند (۱۷). کیتین با نام شیمیایی  $\beta$ -D(1-4)N-acetyl-glucosamine است که پس از دالستیله شدن بنام کیتوزان با نام علمی (1-D-2-amino-2-deoxy- $\alpha$ -glucan) تبدیل می‌شود کیتوزان به عنوان بیوپلیمری با کاربرد وسیع در صنایع غذایی شناخته شده است و فراوان‌ترین پلیمر طبیعی پس از سلولز است (۱). گیاه درمانی در کشورهای غربی از اوایل قرون وسطی شروع به پیشرفت کرد و از قرن نوزدهم کوشش همه جانبه‌ای جهت استخراج مواد موثره از گیاهان دارویی آغاز شد و تاکنون نیز این تلاش و کوشش ادامه دارد. امروزه در اکثر کشورهای جهان به گیاه درمانی توجه زیادی می‌شود و پژوهشگران متعددی در این رشته مشغول به فعالیت می‌باشند (۲). مهم ترین ماده موثره هر گیاه اسانس آن است. درصد اسانس هر گیاه به منطقه رشد و سن گیاه بستگی دارد. بررسی مربوط به آنالیز اسانس گیاه

\*- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، دانشجوی دامپزشکی دکترای عمومی، تهران، ایران  
dvmahsa@yahoo.com

۲- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه باتوبیولوژی، تهران، ایران.

۳- استادیار، گروه سم‌شناسی، ساختمان شماره ۲ پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، بل کیش، تهران، ایران

نانواسانس‌های گیاه (درمنه و مرزه) بر روی گونه‌های آسپرژیلوس موجود در پودر ماهی تولیدی کارخانجات استان مازندران می‌باشد.

### مواد و روش کار

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

**جمع‌آوری نمونه‌ها:** در این پژوهش از ۱۴ کارخانه‌ی تولید کننده‌ی پودر ماهی واقع در سطح استان مازندران و از هر کارخانه چندین نمونه بطور تصادفی جمع‌آوری گردید که در جدول ۱ نشان داده شده است.

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

شماره کارخانه	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	مجموع
تعداد نمونه	۸	۶	۵	۵	۶	۶	۷	۹	۶	۶	۶	۷	۷	۵	۸۹

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

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

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

درمنه نشان می‌دهد که این گیاه حاوی ترکیبات گوناگونی همانند توجون، Scopofarnol، Scopodrinol، Cymene، Sabinene، Cineol، Linalool، Cugeol، Borneol و Farnesol می‌باشد. اسانس مرزه علاوه بر اثر ضد قارچی که دارد، ترین ها و ترپنوئیدهای موجود در آن دارای اثرات ضد میکروبی هستند. این گیاه دارای ۰/۸ تا ۱/۵ درصد اسانس به همراه تانن، رزین و موسیلاژ می‌باشد. تیمول و کارواکرول و پاراسیمن مواد تشکیل دهنده اسانس درمنه می‌باشد (۳). اسانس‌های گیاهی دارای اثرات آنتی سپتیک و ضد میکروبی و اثرات بیولوژیکی و فارماکولوژیکی متعددی هستند (۱۲).

تحقیقات نشان می‌دهد که علی‌رغم مطالعات زیادی که در زمینه اسانس‌ها صورت گرفته است در زمینه نانو اسانس‌ها مطالعات جدی و زیادی صورت نگرفته است. هدف از این مطالعه بررسی تأثیرات محافظت کننده کیتوزان حاوی

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

### تهیه نانو اسانس‌ها

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

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

**روش تهیه محیط کشت اولیه جهت رشد:** به مقدار کافی از محیط کشت پوتیتو دکستروز آگار هم در داخل لوله به صورت شیدار و هم در پلیت تهیه و اتوکلاو شدند. پس از اطمینان از بسته شدن محیط‌ها برای اطمینان از استریل بودن آن‌ها، یکی از محیط‌ها برای مدت ۱۸ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و پس از اطمینان از عدم آلودگی محیط کشت‌های آماده شده تا زمان مصرف در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

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

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

	۱ برابر	۲ برابر
	غلظت	غلظت
محیط RPMI ۲٪ گلوکز	پودر RPMI ۱۶۴۰	۲۰/۸۰ گرم
	ان-مورفولینو پروپان سولفونیک اسید	۳۴/۵۳ گرم
	گلوکز	۳۶ گرم

**روش‌های تهیه محلول سوسپانسیون قارچی:** قارچ‌های آسپریژیلوس جداشده از پودرهای ماهی در محیط پوتیتو دکستروز آگار کشت داده شد و در انکوباتور یخچال‌دار، در دمای ۳۰ درجه به مدت یک هفته انکوبه شدند. بعد از یک هفته به میزان ۵ سی‌سی از محلول PST (حاوی ۱۰۰ سی‌سی سرم فیزیولوژی نرمال+۱۰ میکرو لیتر توین ۸۰ و سپس اتوکلاو محلول) به روی محیط آگار شیدار اضافه گردید و با سوآپ استریل کاملاً سطح اسپورها شستشو داده شد و سوسپانسیون قارچی را به مدت ۱۵ ثانیه کاملاً ورتکس نموده و سپس به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه در آزمایشگاه قرار داده تا میسیلیوم‌ها ته-

نشین و اسپورها در محلول باقی بماند. در ادامه این سوسپانسیون با استفاده از سمپلر به لوله دیگر منتقل و با استاندارد ۰/۵ مک فارلند مقایسه گردید. غلظت سوسپانسیون با استفاده از اسپکتروفتومتر با طول موج ۵۳۰ نانومتر قرائت شد. میزان OD قارچ آسپریژیلوس برابر ۰/۱۷-۰/۱۵ تهیه شد تا غلظت سوسپانسیون برابر با  $10^6$  CFU/ml باشد. دست‌آید. استاندارد نمودن مقدار تلقیح در این روش برای قارچ‌های رشته ای، نوع محیط کشت، انکوباسیون و تعیین نقطه انتهایی مهم می‌باشد (۱۶ و ۱۵ و ۱۱).

**روش علمی تعیین MIC:** برای تعیین MIC ابتدا به هریک از گوده‌های پلیت ۹۶ خانه با سمپلر هشت کاناله به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از محیط ۲ درصد RPMI ۱۶۴۰ اضافه نموده، سپس از نانو اسانس‌های درمنه و مرزه (هر نانو اسانس به طور جداگانه) رقت‌های سریالی در میکروپلیت‌های مسطح ۹۶ خانه‌ای به میزان ۱۰۰ میکرولیتر برای هر گوده تهیه شد. بدین صورت که به گوده اول از سمت چپ اضافه و به خوبی با محیط مخلوط گردید. در ادامه از گوده اول به میزان ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و به گوده دوم منتقل و به همین ترتیب رقت ۱/۲ از اسانس در هر گوده تهیه و در نهایت از گوده دهم ۱۰۰ میکرولیتر نانو اسانس خارج کردیم. در این روش گوده اول حاوی بیشترین غلظت و گوده دهم حاوی کمترین غلظت است. گوده ۱۲ عاری از نانو اسانس می‌باشد. سپس به هریک از گوده‌ها بجز گوده ۱۱ به

شد. در نهایت از کل نمونه‌های پودر ماهی ۱۲ عدد اسپرژیلوس جدا گردید که بعد از بررسی، شناسایی و مشاهده در زیر میکروسکوپ به ترتیب بیشترین و کمترین تعداد مربوط به اسپرژیلوس فومیگاتوس و اسپرژیلوس نیدولانس بوده است. جدول ۳ نوع گونه‌های قارچی اسپرژیلوس جدا شده را نشان می‌دهد.

جدول ۳- نوع گونه‌های قارچی اسپرژیلوس جدا شده بعد از شناسایی و تشخیص

نوع قارچ	اسپرژیلوس نایچر	اسپرژیلوس فلاووس	اسپرژیلوس نیدولانس	اسپرژیلوس فومیگاتوس
تعداد	۲	۴	۱	۵

جدول ۴ و ۵ نتایج آزمایش MFC و MIC نانواسانس‌های درمنه و مرزه را نشان می‌دهد.

جدول ۶- نتایج آزمایش MFC و MIC نانواسانس درمنه برحسب  $\mu\text{g/mL}$

شماره نمونه‌ها	MIC	MFC
A <sub>1</sub> *	۶۲۵	۱۲/۵
A <sub>2</sub>	۶۲۵	۱۲/۵
A <sub>3</sub>	۶۲۵	۱۲/۵
A <sub>4</sub>	۱۲/۵	۲۵
A <sub>5</sub>	۲۵	۵۰
A <sub>6</sub>	۱۲/۵	۲۵
A <sub>7</sub>	۱۲/۵	۲۵
A <sub>8</sub>	۶۲۵	۱۲/۵
A <sub>9</sub>	۱۲/۵	۲۵
A <sub>10</sub>	۱۲/۵	۲۵
A <sub>11</sub>	۶۲۵	۱۲/۵
A <sub>12</sub>	۶۲۵	۱۲/۵

\* A نشان‌دهنده گونه‌های اسپرژیلوس جدا شده می‌باشد.

میزان ثابت ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون استاندارد شده اضافه نموده تا حجم نهایی محلول برابر با ۲۰۰ میکرولیتر با غلظت‌های متفاوت گردد. گوده ۱۱ حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط و ۱۰۰ میکرولیتر نانواسانس به عنوان کنترل منفی و گوده ۱۲ حاوی محیط کشت و سوسپانسیون قارچی می‌باشد که به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شده است. این آزمون برای هر گونه قارچی در ردیف افقی مجزا و به صورت دوبرار تکرار انجام گرفت. سپس میکرو پلیت‌ها در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند. بعد از مدت زمان معینی میکرو پلیت‌ها از انکوباتور خارج و هم به صورت چشمی و هم توسط دستگاه الیزاریلو در طول موج ۵۴۰ نانومتر فرائت گردید. گوده‌ای که مانع رشد قارچ گردیده به عنوان MIC در نظر گرفته شده است (۱۶). تعیین حداقل غلظت کشندگی قارچی یا MFC: MFC بنا به تعریف کمترین غلظتی از فعالیت ضد قارچی است که در آن غلظت ۹۹/۹٪ از میکروارگانیسم‌ها از بین رفته باشند. جهت تعیین MFC با استفاده از سمپلر از گوده MIC و گوده بعد از MIC که رشد دارد و گوده‌های قبل از MIC به میزان بالاتر نانواسانس مقدار ۵۰ میکرولیتر برداشته و به روی محیط پوتیتو دکستروز آگار تلقیح و سپس مدت یک هفته انکوبه شد، بعد از گذشت این زمان هر رفتی که در پلیت مانع رشد کامل قارچ شده باشد یا کمتر از ۳ کلونی (تقریباً معادل ۹۹-۹۹/۵٪ فعالیت کشندگی) وجود داشته باشد به عنوان MFC در نظر گرفته شده است. (۱۶ و ۱۱).

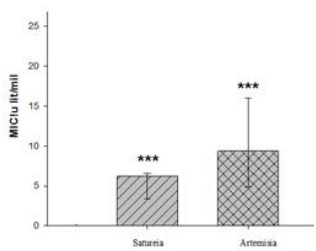
### آنالیز آماری

این مطالعه تجربی بوده و با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ و روش‌های آماری توصیفی داده‌ها پردازش شد.

### نتایج

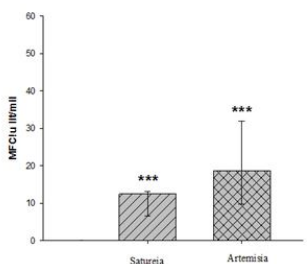
بعد از جمع‌آوری نمونه‌ها، قارچ‌های موجود در نمونه‌ها جداسازی گردید. سپس گونه‌های اسپرژیلوس تشخیص داده

باتوجه به نمودارهای ۱ و ۲ بین نانواسانس های درمنه و مرزه رابطه معنادار  $0/001$  وجود دارد. MIC هر ۱۲ نمونه آسپرژیلوس جدا شده با MFC شان رابطه معنادار  $0/004$  وجود دارد.



Significant Grade = \*

نمودار ۱- مقایسه حداقل غلظت ممانعت از رشد نانو اسانس های درمنه و مرزه



نمودار ۲- مقایسه حداقل غلظت کشندگی نانو اسانس های درمنه و مرزه

با توجه به جدول ۶ و نمودارهای ۱ و ۲ در مورد آزمایش MIC نانو اسانس مرزه اثر بهتری نسبت به نانو اسانس درمنه داشته است. در مورد آزمایش MFC نانواسانس درمنه اثر بهتری نسبت به نانو اسانس مرزه داشته است.

جدول ۶- حداقل، حداکثر و میانگین نتایج MFC و MIC مربوط به نانواسانس های درمنه و مرزه بر حسب µg/mL

نوع آزمون	اسانس مورد استفاده	تعداد نمونه	میانگین	حداقل غلظت	حداکثر غلظت
MIC	درمنه	۱۲	۱۰/۴۱۶۷	۶/۲۵	۲۵
	مرزه	۱۲	۴/۹۴۷۹	۳/۱۳	۶/۲۵
MFC	درمنه	۱۲	۲۰/۸۳۳۳	۱۲/۵	۵۰
	مرزه	۱۲	۹/۸۹۵۸	۶/۲۵	۱۲/۵

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

شماره نمونه ها	MIC	MFC
A <sub>1</sub> *	۶/۲۵	۱۲/۵
A <sub>2</sub>	۳/۱۲۵	۶/۲۵
A <sub>3</sub>	۶/۲۵	۱۲/۵
A <sub>4</sub>	۶/۲۵	۱۲/۵
A <sub>5</sub>	۳/۱۲۵	۶/۲۵
A <sub>6</sub>	۶/۲۵	۱۲/۵
A <sub>7</sub>	۶/۲۵	۱۲/۵
A <sub>8</sub>	۳/۱۲۵	۶/۲۵
A <sub>9</sub>	۶/۲۵	۱۲/۵
A <sub>10</sub>	۳/۱۲۵	۶/۲۵
A <sub>11</sub>	۳/۱۲۵	۶/۲۵
A <sub>12</sub>	۶/۲۵	۱۲/۵

\* A نشان دهنده گونه های آسپرژیلوس جدا شده می باشد.

نتیجه آزمایشات MIC نشان از تأثیر بالای نانواسانس مرزه نسبت به نانواسانس درمنه بر روی گونه های آسپرژیلوس است. همچنین در تمامی آزمایشات MIC و MFC بصورت دوبار تکرار انجام شد و مشخص شد که تأثیرات نانو اسانس ها در هر دوبار آزمون نتایج مشابهی دارد. برای تعیین MFC، بعد از تعیین MIC و مشخص شدن گوده ها، رقت های قبل و بعد از آن به روی محیط های PDA منتقل و کشت داده، بعد از زمان انکوباسیون رقت هایی که در پلیت آگار رشدی نداشتند به عنوان MFC گزارش شد که در هر دوبار تکرار نتایج مشابه مشاهده شد.

## بحث

۱۵ میکروگرم در کیلوگرم بود (۸). در تحقیق دیگر، گونه های آسپرژیلوس خوراک دام جداسازی و بصورت مولکولی شناسایی گردید. نتایج بدست آمده نشان داد که بیشترین میزان آلودگی مربوط به گونه های آسپرژیلوس بوده است (۶).

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

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

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

### فهرست منابع

- ۱- اجاق، م.، رضایی، م.، رضوی، ه.، حسینی، م. (۱۳۹۱): اثر پوشش‌های آنتی میکروبی در افزایش ماندگاری ماهی قزل‌الای رنگین کمان، فصلنامه علوم و صنایع غذایی، ۹: ۱۳-۲۳.
- ۲- جعفرنیا، س.، خسرو شاهی، س.، قاسمی، م. (۱۳۹۰): راهنمای جامع و مصور حواص و کاربرد گیاهان دارویی، چاپ سوم، انتشارات سخن گستر، تهران، ایران: ۶۵-۱۵.
- ۳- حکیمی میدی، م.، افخمی عقدایی، م.، میرجلیلی، ف. (۱۳۸۲): بررسی فعالیت بیولوژیکی اسانس درمنه ایرانی، مجله پژوهش و سازندگی، ۶۱: ۵-۲.
- ۴- خسروی، ع. (۱۳۸۷): بیماری‌های قارچی و پاسخ‌های ایمنی، چاپ اول، انتشارات دانشگاه تهران، تهران، ایران: ۷۶۳-۷۵۳.
- ۵- رزاقی ایبانه، م.، قهفرخی، م. (۱۳۸۴): قارچ شناسی عمومی دامپزشکی، چاپ اول، انتشارات موسسه آموزش عالی علمی کاربردی جهاد کشاورزی، تهران، ایران: ۶۵-۵۰.
- ۶- رنجبر، س.، نظری، ر.، نوری، م. (۱۳۹۰): جداسازی و شناسایی مولکولی گونه‌های آسپرژیلوس خوراک دام، مجله میکروبیولوژی دامپزشکی، ۱۷(۱): ۱۶-۱۱.
- ۷- شهرکی، ر.، شیبانی صفت، م.، حداد خداپرست، م. (۱۳۸۸): بررسی اثرات ضد قارچی اسانس‌های آویشن، مرزه، اکالیپتوس، لیمو، نعناع و باریجه بر روی قارچ‌های *As. parasiticus*، عامل فساد محصولات کشاورزی، همایش ملی انسان، محیط زیست و توسعه

دارد تیمول و کارواکرول است (۲). در تحقیق انجام شده در سال ۲۰۰۸ توسط Dikbas و همکاران روی کنترل آسپرژیلوس فلاوس توسط اسانس و متانول خروجی از مرزه مطالعاتی انجام گردید. نتایج نشان داد که روغن این گیاه فعالیت ضد قارچی قوی بر روی پاتوژن‌های قارچی دارد (۱۴). در پژوهشی دیگر فعالیت ضد میکروبی مرزه مورد ارزیابی قرارگرفت و مشخص شد که هگزان استخراج شده از مرزه اثر ضد قارچی ندارد و فقط بر روی چند گونه باسیلوس و کاندیدا اثر گسترده‌ای دارد، اما متانول استخراج شده از آن اثر ضد قارچی و ضد باکتریایی دارد. متانول استخراج شده نسبت به هگزان اثر قوی‌تری دارد (۲۰). در پژوهش حاضر نتایج میکروپلیت‌های MIC هم بصورت چشمی و هم با دستگاه قرائت لایزا انجام شد. با مقایسه این دو روش اختلاف قابل ملاحظه‌ای در نتایج مشاهده نشد ( $P \leq 0.05$ ). همچنین مقایسه زمان‌های ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت انکوباسیون نشان از مشابه بودن اطلاعات بدست آمده در زمان‌های ذکر شده را دارد و هیچ اختلاف معناداری بین زمان‌های ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت وجود نداشت ( $P \leq 0.05$ ). با مقایسه بین مدت زمان انکوباسیون ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت میکروپلیت‌ها در انکوباتور و مشاهده عدم اختلاف بین این دو زمان، موید این موضوع است که مواد موثره نانواسانس‌های مورد مطالعه در همان ساعت‌های ابتدایی در محیط آزاد و تأثیر خود را بر جا گذاشته و افزایش مدت زمان انکوباسیون تأثیری بر روند ضد قارچی بیشتر نانواسانس‌ها ندارد. در بررسی و مقایسه سایر نتایج، با نتایج میزان MIC و MFC پژوهش حاضر، نتایج نشان دهنده این مطلب است که بین کمترین رقت‌های جلوگیری از رشد و رقت‌های کشندگی فاصله کمی وجود دارد که نشان از حساس بودن جدایه‌ها به اسانس‌ها است و طبیعتاً برای از بین بردن آن نیاز به تجویز بیشتر ماده ضد قارچی نمی‌باشد.

- MICs and minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for uncommon molds. *J. clin. microb.* 40(10):3776-3781.
- 16- Kavanagh, K., (2006): Medical mycology cellular and molecular techniques. *Recherche.* 67:96-102.
- 17- Khosravi, A.R., Minooeian Haghghi, M.H., Shokri, H., Emami, S.A., Alavi, S.M., Asili, J. (2011): The potential inhibitory effect of *Cuminum cyminum*, *Ziziphora clinopodioides* and *Nigella sativa* essential oils on the growth of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus*. *Brazilian J. Microb.* 42: 216-224.
- 18- Konietzny, U., Greiner, R. (2003): The application of PCR in the detection of mycotoxigenic fungi in foods. *Brazilian J. Microb.* 34(4):283-300.
- 19- Olajuyigbe, O.O., Akanda, G., Ezekiel, M.O., Olusola, A.O., Salaudeen, M.M., Amusan, E.E., Babalola, A.F. (2011): Microbial and proximate composition of some fish meal samples. *Inte. J. food saf.* 13:41-44.
- 20- Sahin, F., Karaman, I., Gulluce, M., Ogutcu, H., Sengul, M., Adguzel, A., Ozturk, S., Kotan, R. (2003): Evaluation of antimicrobial activities of *Satureja hortensis*. *J. ethnoph.* 87:61-65.
- پایدار، باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد همدان.
- ۸- فیید، م.، مظفری، ن.، شجاعی آرنی، الف. (۱۳۸۴): جداسازی و شناسایی مهمترین باکتری‌ها و قارچ‌های مولد فساد از پودر ماهی کیلکا در استان گیلان، مجله علمی شیلات ایران، ۴: ۱۳۸-۱۲۷.
- ۹- محبوبی، م.، فیض آبادی، م. (۱۳۸۸): بررسی اثر ضد میکروبی اسانس‌های آویشن، مرزنجوش، مرزه و اکالیپتوس بر باکتری‌های اشریشیاکلی، سالمونلا تیفی موریوم و قارچ‌های آسپرژیلوس نایجر، آسپرژیلوس فلاووس، فصلنامه گیاهان دارویی، ۸ (۲): ۱۴۴-۱۳۷.
- ۱۰- میاحی، م.، راضی جلالی، م.، سلامات، ن. (۱۳۸۶): جداسازی آسپرژیلوس و اندازه‌گیری میزان آفلاتوکسین موجود در پودر ماهی، ذرت و کنجاله سویا، مجله علوم دانشگاه شهید چمران، ۱۷: ۱۰۵-۹۵.
- 11- Arian, S., Lozano- Chiu, M., Paetznick, V., Nangia, S., Rex, J.H. (1999): Microdilution Susceptibility Testing of Amphotericin B, Itraconazole, and Voriconazole against Clinical Isolates of *Aspergillus* and *Fusarium* Species. *J. Clin. Micro.* 12:3946-3951.
- 12- Coulombe, R.A. (1993): Biological action of mycotoxins, *J. dairy sci.* 76(3):880-891.
- 13- Cowan, MM. (1999): Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microb.* 12:564-582.
- 14- Dikbas, N., Kotan, R., Dadasoglu, F., Sahin, F. (2008): Control of *aspergillus flavus* with essential oil and methanol extract of *Satureja hortensis*. *Inter. J. Food Microb.* 124: 179-182.
- 15- Espinel Ingroff, A., Chaturvedi, V., Fothergill, A., Rinaldi, M.G. (2002): Optimal testing conditions for determining