

تأثیر اسانس‌های آویشن، زیره، دارچین و سیر بر باکتری بیماری‌زای استرپتوکوکوس اینیایی در محیط برون‌تنی

- سیدهدادی سیدالحسینی*: گروه شیلات، واحد بندرعباس، دانشگاه آزاد اسلامی، بندرعباس، ایران
- مازیار یحیوی: گروه شیلات، واحد بندرعباس، دانشگاه آزاد اسلامی، بندرعباس، ایران
- لاله یزدان‌پناه گوهرریزی: مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرمان، ایران

تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۹۸

چکیده

اهمیت بیماری آبزیان و همچنین گزارشات فراوان درخصوص خسارات ناشی از بروز بیماری‌های عفونی در مزارع پرورش قزل‌آلای رنگین کمان از یک‌سو و بروز مقاومت میکروبی در نتیجه استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها و سایر مواد شیمیایی جهت کنترل و درمان بیماری‌ها، تقاضا برای درک صحیح مقادیر موثر اسانس‌ها به‌عنوان عوامل ضد میکروبی جایگزین را بیش از پیش اثبات می‌کند. هدف از انجام مطالعه حاضر بررسی اثر ضدباکتریایی اسانس‌های آویشن، سیر، دارچین و زیره بر رشد باکتری استرپتوکوکوس اینیایی در محیط برون‌تنی (*In vitro*) طی زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۱۲۰ ساعت انکوباسیون است. پس از کشت باکتری مورد نظر در محیط کشت اختصاصی، تعداد ۳ چاهک در محیط کشت ایجاد و سپس غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ ppm از هر یک از اسانس‌ها به‌طور جداگانه به چاهک اضافه و پس از گذشت زمان‌های فوق‌الذکر، عدم رشد باکتری با کولیس اندازه‌گیری شد. نتایج به‌دست آمده حاکی از وجود اثر توأم معنی‌دار پارامترهای نوع اسانس، غلظت آن و زمان انکوباسیون است ($P < 0.001$). درخصوص اثر مهارکنندگی بر رشد باکتری استرپتوکوکوس اینیایی بیش‌ترین اثر بخشی به‌ترتیب مربوط به اسانس سیر، آویشن، زیره و درنهایت دارچین بوده است که به‌طور معنی‌داری با یکدیگر اختلاف داشتند ($P < 0.05$). سریع‌ترین (پس از ۲۴ ساعت) اثر مهارکنندگی رشد باکتری مربوط به سیر و آویشن بود. در مجموع می‌توان این‌گونه نتیجه‌گیری نمود که اسانس‌های گیاهی مورد استفاده در این تحقیق، دارای خواص آنتی‌باکتریال منتهی با درجات و میزان اثر بخشی متفاوت هستند.

کلمات کلیدی: گیاهان دارویی، اسانس، بیماری‌های عفونی ماهی، آزمایش برون‌تنی



مقدمه

علی‌رغم پیشرفت معنی‌دار در روش‌های تولید و هم‌چنین فرآورده‌های بهداشت مواد غذایی، ایمنی غذا هنوز به‌عنوان یکی از مهم‌ترین مباحث بهداشت عمومی در جهان مطرح است. طبق مطالعات صورت گرفته، تخمین زده شده است که ۳۰ درصد افراد در جوامع پیشرفته از بیماری‌های منتقل شده از مواد غذایی رنج می‌برند. در سال ۲۰۰۰ میلادی، حدود ۲ میلیون نفر به‌خاطر بیماری‌های ناشی از مواد غذایی جان خود را از دست داده‌اند (Tsironi و همکاران، ۲۰۱۱). ازجمله عوامل ایجادکننده بیماری، موجود در مواد غذایی می‌توان از باکتری *استرپتوکوکوس اینیایی* به‌عنوان یک عامل بیماری‌زای مشترک در ماهی و انسان هم‌چون یک پاتوژن مهم نوظهور در چند دهه اخیر نام برد. در جهان بالغ بر ۲۵ مورد عفونت انسانی تحت تاثیر این باکتری در تحقیقات علمی مختلف گزارش شده است. باکتری مذکور حداقل در ۲۷ گونه از ماهیان اقتصادی در مراکز پرورشی آب شور و شیرین مشاهده شده است (Sun و همکاران، ۲۰۱۳). علاوه براین، در مقایسه با سایر فرآورده‌های گوشتی، ماهیان از فسادپذیری بالاتری برخوردارند. فسادپذیری در گوشت ماهی پروسه‌ای است که می‌تواند به‌صورت فیزیکی، شیمیایی و میکروبی انجام پذیرد. احتمال به‌وقوع پیوستن فساد میکروبی نسبت به دو روش دیگر بیش‌تر است. از طرف دیگر، اثرات منفی مواد شیمیایی ضدعفونی‌کننده و آنتی‌بیوتیک‌ها بر مصرف‌کنندگان ماهیان تحت درمان مانند ایجاد مقاومت دارویی در برابر عوامل باکتریایی، سبب افزایش تقاضای مصرف‌کنندگان برای بررسی جایگزین‌های طبیعی مانند گیاهان دارویی و ترکیبات آن‌ها شده است (Yao و همکاران، ۲۰۱۱؛ Hong و همکاران، ۲۰۱۲). اسانس‌های گیاهی روغن‌هایی فراری هستند که از بخش‌های مختلف گیاه به‌دست می‌آیند و دارای اثرات ضد میکروبی هستند. اسانس‌ها، مایعات خالص و به‌ندرت رنگی هستند و به‌واسطه ایجاد ناپایداری در لایه فسفولیپیدی غشا سلولی، سیستم آنزیمی و مواد ژنتیکی باکتری نقش ضدباکتریایی خود را ایفا می‌کنند (Abdollahzadeh و همکاران، ۲۰۱۴). ازجمله گیاهانی که دارای خاصیت ضدباکتریایی هستند می‌توان به آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) اشاره نمود. این گیاه، معطر و از تیره نعناع است و در مناطقی از جمله نجف‌آباد اصفهان، کلاه‌گزی، شاه‌کوه، یزد، دزفول، فیروزآباد یافت می‌شود (زرگری، ۱۳۷۱). اسانس این گیاه حاوی مواد مهمی هم‌چون تیمول و کارواکرول به‌عنوان ماده تثبیت‌کننده در فرآورده‌های دارویی (شریف‌روحانی و همکاران، ۱۳۹۰) و اسیدرزمارینیک با خواص ضدباکتری، ضدویروسی، آنتی‌اکسیدان و ضدالتهابی است (Mohagheghzadeh و همکاران، ۱۹۸۵؛ Kesselring و Parnham، ۲۰۰۴؛ Osakabe و همکاران، ۲۰۰۴). خواص ضد میکروبی این گیاه و

اجزای تشکیل‌دهنده آن در مطالعات پیشین مورد بررسی قرار گرفته است (Zomorodian و همکاران، ۲۰۱۴). در این راستا خواص آنتی باکتریال اسانس این گیاه بر باکتری *Salmonella typhi* به‌عنوان یک عامل پاتوژن مسمومیت‌های غذایی مورد بررسی قرار گرفت (Ettehad و Arab، ۲۰۰۷). زیره سبز (*Cuminum cyminum*) در بسیاری از نواحی با آب و هوای مدیترانه‌ای یافت می‌شود و از گذشته به‌عنوان ادویه و داروی طب سنتی شناخته شده است. بیش‌ترین ترکیبات اسانس دانه زیره سبز شامل کومین‌آلدهید، بنزالدهید، مشتقات منتون، گاما ترپنین و پاراسیمن است که در مناطق مختلف جغرافیایی درصد آن‌ها متفاوت است (پژوهی‌الموتی و همکاران، ۱۳۹۱). خواص ضد میکروبی زیره سبز در محیط برون‌تنی در مقابل برخی عفونت‌های قارچی انسان و حیوان به‌اثبات رسیده است (Gavanji و همکاران، ۲۰۱۵). یکی از گیاهان دارویی شناخته شده در طب سنتی ایران و هم‌چنین در مطالعات بالینی انسانی و دامی، گیاه دارچین (*Cinnamomum verum*) است (خانی و همکاران، ۱۳۹۵). خاصیت آنتی‌کسیدانی دارچین به‌علت وجود ترکیباتی نظیر اوژنول، کاریونیلن، سینئول و سینامالدهید است. اوژنول و سینا مآلدهید دارای خواص ضد میکروبی و ضدقارچی هستند (Mushlova و همکاران، ۲۰۰۹). در مطالعات پیشین، اثرات ضدباکتریایی ترکیبات استخراج شده از دارچین بر گونه‌ها مختلف جنس *Streptococcus* sp. به‌اثبات رسیده است (Ghorbani Darabad و همکاران، ۲۰۱۵). خواص حیات‌بخش سیر (*Allium sativum*) از دیرباز شناخته شده است و هر قدر دامنه تحقیقات روی سیر گسترده‌تر می‌شود، اثرات بیش‌تر و مهم‌تری از آن به‌اثبات می‌رسد. ازجمله خواص سیر می‌توان به خاصیت ضد هیپرلیپیدمی و ضد دیابتی آن‌ها در انسان و برخی حیوانات (Durak و همکاران، ۲۰۰۴؛ Choudhary و همکاران، ۲۰۱۳)، کاهش کلسترول و تری‌گلیسرید خون در انسان و هم‌چنین تحریک عملکرد سیستم ایمنی، افزایش دفع سموم خارجی، محافظت از بافت کبد، اثرات ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی آن اشاره کرد (Liu و Yeh، ۲۰۰۱). اهمیت بیماری آب‌زیان و هم‌چنین گزارشات فراوان در خصوص خسارات ناشی از بروز بیماری‌های عفونی در مزارع پرورش قزل‌آلای رنگین کمان از یک‌سو و بروز مقاومت میکروبی در نتیجه استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها و سایر مواد شیمیایی جهت کنترل و درمان بیماری‌ها، تقاضا برای استفاده از مواد موثر جایگزین را افزایش داده است. یکی از این عوامل می‌تواند استفاده از اسانس‌های گیاهی باشد اما مطالعات اندکی در زمینه تاثیر این ترکیبات بر پاتوژن‌های بیماری‌زا در آب‌زیان صورت گرفته است. بنابراین، درک صحیح مقادیر موثر اسانس‌ها به‌عنوان عوامل ضد میکروبی جایگزین ضروری به‌نظر می‌رسد. هدف از انجام مطالعه حاضر بررسی اثر ضدباکتریایی اسانس‌های آویشن، سیر، دارچین

و زیره بر رشد باکتری استرپتوکوکوس اینیایی در محیط برون تنی (*In vitro*) طی زمان‌های مختلف انکوباسیون است.

مواد و روش‌ها

تهیه اسانس‌های مورد مطالعه: اسانس‌های گیاهی سیر و آویشن در مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی کرمان با استفاده از دستگاه کلونجر به صورت تقطیر با بخار آب تهیه گردید. به این منظور، ابتدا گیاهان در سایه خشک شدند و با استفاده از آسیاب خرد گردید و الک شد. به طور مشابه دانه‌های زیره و هم‌چنین پوست دارچین نیز آسیاب گردید. برای استخراج اسانس از قطعات یا برگ‌های خرد شده با اندازه ۰/۵ تا ۲ میلی‌متر استفاده شد. سپس نمونه‌های الک شده در داخل بالن ژوژه حاوی دوسوم آب قرار داده شدند. سپس کلونجر به بالن ژوژه حاوی مواد متصل و پایه آن به جای ثابتی محکم می‌شود. سپس شعله روشن و به مدت یک ساعت اسانس جداسازی شده در بالن جمع‌آوری گردید (میرمصطفایی و همکاران، ۱۳۹۲).

تهیه و آماده‌سازی باکتری: باکتری بیماری‌زای استرپتوکوکوس اینیایی (PTCC 1887)، از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی کشور و به صورت بومی نیز از آب استخرهای پرورش ماهی استان جداسازی و کشت داده شد. کشت لیوفیلیزه باکتری که در دمای یخچال نگهداری شده بود بلافاصله پس از دریافت مورد استفاده قرار گرفت. نمونه لیوفیلیزه را در محیط آبگوشت قلب و مغز (Brain Heart (BHIB Infusion Broth در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت تلقیح شد. این مرحله دو مرتبه به طور متوالی تجدید کشت شد. سپس کشت ۲۴ ساعته دوم را به نسبت ۵ به ۱ با گلیسرول استریل مخلوط و در حجم مورد نظر داخل میکروتیوپ اپندورف استریل وارد شد. سپس لوله‌ها در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد تا در طول مطالعه مورد استفاده قرار گیرد. به منظور تأیید خلوص باکتری‌های لیوفیلیزه استرپتوکوکوس اینیایی، پس از خروج آن‌ها از فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد، ابتدا در محیط کشت TSB کشت داده شدند و به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند (Pinto و همکاران، ۲۰۱۱).

آماده‌سازی و افزودن اسانس: جهت بررسی فعالیت مهار کنندگی اسانس‌ها، از روش Jayanth و همکاران (۲۰۰۱) با کمی تغییرات استفاده گردید. ابتدا از کشت ۱۸ ساعته باکتری‌ها در محیط کشت به کمک لوپ، به صورت خط عمود در مرکز پلیت روی محیط اختصاصی کشت داده شد و پلیت‌ها انکوبه شدند. سپس از کشت ۱۸ ساعته باکتری استرپتوکوکوس اینیایی به صورت سفره‌ای کشت داده شد. سپس با ایجاد چاهک‌هایی در محیط کشت

اقدام به افزودن غلظت‌های مختلف از اسانس‌ها (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ ppm) شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و هاله عدم رشد با کولیس اندازه‌گیری گردید. نتایج مربوط به سه تکرار در هر یک از جدایه‌ها ثبت و برحسب میلی‌متر گزارش شد (Jayanth و همکاران، ۲۰۰۱).

تجزیه و تحلیل داده‌ها: ابتدا نرمال بودن اعداد با استفاده از کولموگوروف-اسمیرنوف (Kolmogorov-Smirnov) بررسی و تایید شد. در ادامه به منظور بررسی همگن بودن واریانس‌ها از آزمون لون (Levene) استفاده شد. از آنجایی که این طرح در قالب طرح سه عاملی نوع اسانس، غلظت اسانس، زمان طراحی شده است از آزمون تحلیل واریانس چندطرفه MANOVA استفاده شد. تفاوت‌های آماری درخصوص پارامترهای قطر هاله عدم رشد باکتری اندازه‌گیری و با آنالیز مذکور مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. برای تعیین اختلاف معنی‌دار بین تیمارها از روش مقایسات چندگانه (آزمون تکمیلی دانکن) استفاده شد (SPSS نسخه ۱۸). در تمامی موارد، اعداد برحسب انحراف معیار $\pm$ میانگین بیان شده است و معنی‌داری در سطح P value کم‌تر از ۰/۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

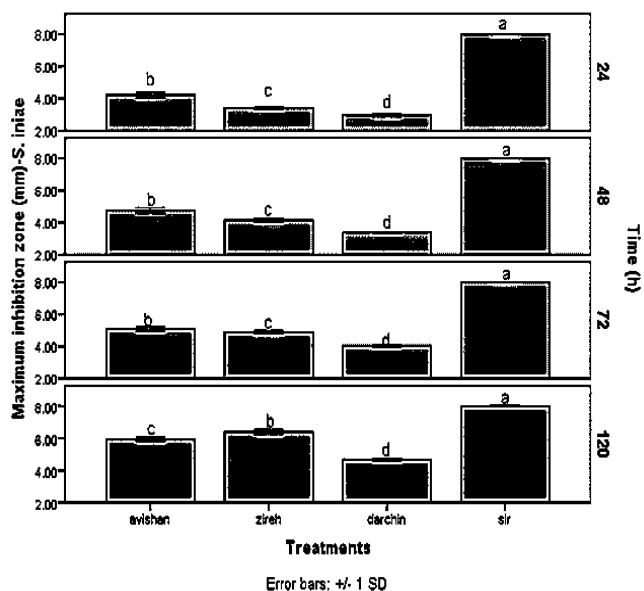
اثرات توام: نتایج به دست آمده از آنالیز واریانس چندطرفه (MANOVA) نشان می‌دهد که تیمارهای مختلف اسانس مورد استفاده (آویشن، زیره، دارچین و سیر) به تنهایی اثر معنی‌داری بر رشد باکتری *S. iniae* در محیط کشت نداشته‌اند. به طور مشابه غلظت‌های مختلف (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ ppm) نیز سبب بروز اختلاف معنی‌دار درخصوص رشد باکتری‌های مورد آزمایش شده‌اند ($P = 0/001$). در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری (۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۱۲۰ ساعت) نیز اختلاف معنی‌داری در عدم رشد باکتری مورد مطالعه در محیط کشت مشاهده شد ($P = 0/001$). اثر توام تیمارهای مختلف اسانس و غلظت‌های مختلف آن نیز سبب بروز اختلاف معنی‌دار ($P = 0/001$) در رشد باکتری در محیط کشت آزمایشی شده است. به طور مشابه، اثر توام تیمارهای مختلف اسانس و زمان‌های مختلف نیز سبب بروز اختلاف معنی‌دار ($P = 0/001$) در رشد باکتری در محیط کشت آزمایشی شده است. غلظت‌های متفاوت از اسانس نیز به صورت توام با زمان نمونه‌برداری تداخل معنی‌داری را از خود نشان داده است ($P = 0/001$). در نهایت اثر توام نوع اسانس، غلظت اسانس و زمان نمونه‌برداری نیز سبب بروز اختلاف معنی‌دار ($P = 0/001$) در روند رشد باکتری استرپتوکوکوس اینیایی شده است.



شد (شکل ۲). روند مشاهده شده درخصوص غلظت ۱۵۰ ppm نیز تقریباً مشابه غلظت ۱۰۰ ppm است. براین اساس در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب بیش‌ترین هاله عدم رشد باکتری استرپتوکوکوس اینیایی در تیمار اسانس سیر، آویشن، زیره و دارچین مشاهده شد که دارای اختلاف معنی‌دار از نظر آماری با یکدیگر بوده‌اند ($P < 0.05$). این شاخص در زمان ۱۲۰ ساعت تا اندازه‌ای متفاوت بود به نحوی که سیر بیش‌ترین ($P < 0.05$) هاله عدم رشد را نشان داد و سپس بیش‌ترین قطر هاله عدم رشد به ترتیب در تیمارهای زیره، آویشن و دارچین قابل مشاهده است (شکل ۳). در غلظت ۲۰۰ ppm در تمامی زمان‌ها سیر با اختلاف معنی‌دار در مقایسه با سایر تیمارها بیش‌ترین قطر هاله عدم رشد باکتری استرپتوکوکوس اینیایی را ایجاد نموده است ($P < 0.05$). قطر هاله عدم رشد باکتری در سایر تیمارها به ترتیب عبارت بودند از آویشن، زیره و دارچین که دارای اختلاف معنی‌دار آماری ($P < 0.05$) نیز هستند (شکل ۴).

تاثیر غلظت‌های متفاوت اسانس آویشن در زمان‌های مختلف:

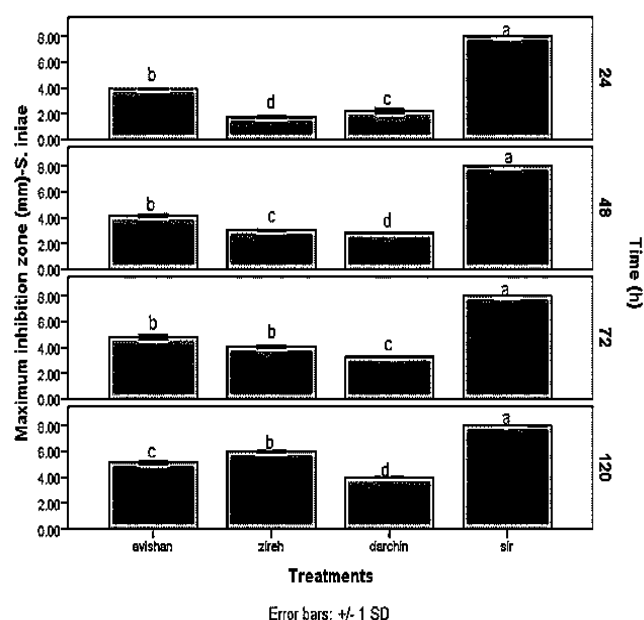
نتایج به‌دست آمده از این آنالیز نشان می‌دهد که اسانس آویشن با افزایش دوز از ۵۰ به ۲۰۰ به‌طور کلی سبب افزایش معنی‌دار ($P < 0.05$) قطر هاله عدم رشد در محیط کشت باکتری استرپتوکوکوس اینیایی در تمامی زمان‌ها می‌شود (شکل ۵، مقایسات عمودی). روند افزایش ($P < 0.05$) مشابهی نیز با افزایش دوره انکوباسیون در قطر هاله عدم رشد این باکتری قابل مشاهده است (شکل ۵، مقایسات افقی).



شکل ۲: نمودار تاثیر غلظت ۱۰۰ ppm اسانس‌های مختلف آویشن، زیره، دارچین و سیر بر رشد باکتری استرپتوکوکوس اینیایی طی زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۱۲۰ ساعت را نشان می‌دهد. ستون‌ها نشان‌دهنده میانگین و انحراف معیار ($n=3$) است. اعداد در هر پانل به‌طور جداگانه با یکدیگر مقایسه شده است. حروف الفبای انگلیسی معنی‌داری در سطح $P < 0.05$ را نشان می‌دهد.

مقایسه اسانس‌ها: نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد که عدم رشد

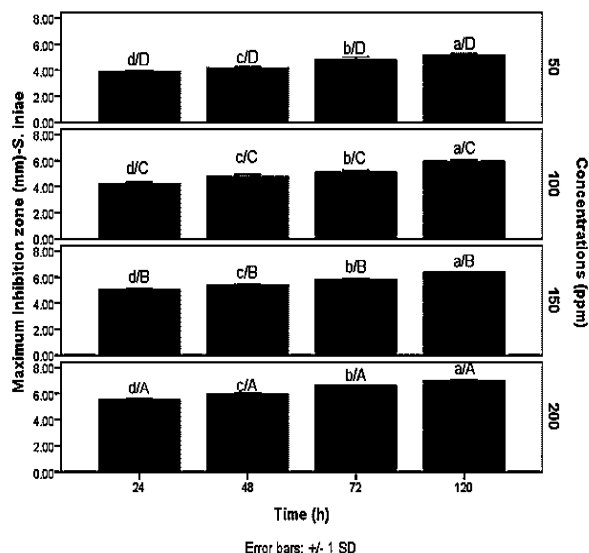
باکتری استرپتوکوکوس اینیایی تحت تاثیر غلظت ۵۰ ppm اسانس‌های مختلف به‌طور معنی‌داری با یکدیگر متفاوت است ($P < 0.05$). در زمان ۲۴ ساعت، بیش‌ترین میزان قطر هاله عدم رشد مربوط به سیر، سپس آویشن، دارچین و زیره است. پس از گذشت ۴۸ ساعت، بیش‌ترین میزان قطر هاله عدم رشد مربوط به سیر، سپس آویشن، زیره و دارچین است. در زمان ۷۲ ساعت، به ترتیب بیش‌ترین میزان قطر هاله عدم رشد مربوط به سیر، سپس آویشن= دارچین و در نهایت کم‌ترین اثر مربوط به زیره است. طی ۱۲۰ ساعت، هم‌چنان سیر بیش‌ترین اثر را بر باکتری استرپتوکوکوس اینیایی گذاشته است و سپس زیره، آویشن و دارچین در رتبه بعدی قرار دارند (شکل ۱).



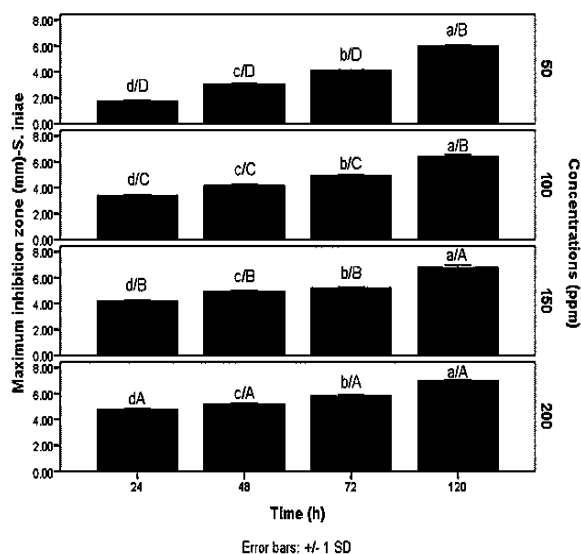
شکل ۱: نمودار تاثیر غلظت ۵۰ ppm اسانس‌های مختلف آویشن، زیره، دارچین و سیر بر رشد باکتری استرپتوکوکوس اینیایی طی زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۱۲۰ ساعت را نشان می‌دهد. ستون‌ها نشان‌دهنده میانگین و انحراف معیار ($n=3$) است. اعداد در هر پانل به‌طور جداگانه با یکدیگر مقایسه شده است. حروف الفبای انگلیسی معنی‌داری در سطح $P < 0.05$ را نشان می‌دهد.

در غلظت ۱۰۰ ppm نیز همانند غلظت قبلی، اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در هر مرحله زمانی مشاهده گردید ($P < 0.05$). در زمان ۲۴ ساعت، بیش‌ترین قطر هاله عدم رشد باکتری استرپتوکوکوس اینیایی مربوط به تیمار اسانس سیر، سپس آویشن، زیره و در نهایت اسانس دارچین به‌دست آمد ($P < 0.05$). روند مشابه‌ای برای زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت نیز مشاهده گردید اما در بازه زمانی ۱۲۰ ساعت، اسانس سیر بیش‌ترین هاله عدم رشد را از خود نشان داد ($P < 0.05$). با کمی اختلاف زیره، آویشن و در انتها کم‌ترین هاله مربوط به دارچین مشاهده

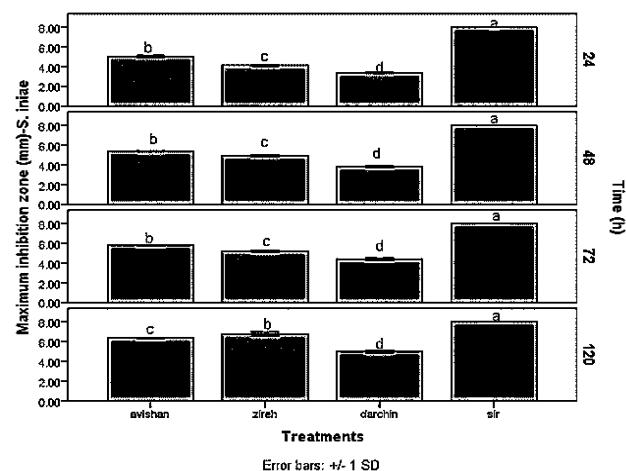
۱۵۰ و ۲۰۰ نیز هیچ اختلاف معنی داری را در زمان مذکور از خود نشان نمی دهند اما با غلظت های ۵۰ و ۱۰۰ دارای اختلاف معنی دار هستند ($P < 0.05$). مقایسات زمانی نیز مشابه تیمارهای قبل به طور معنی دار افزایش را نشان می دهد ($P < 0.05$).



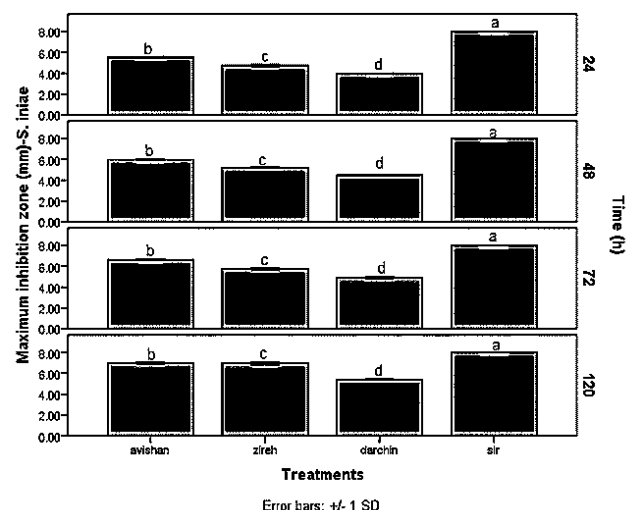
شکل ۵: نمودار تاثیر غلظت های مختلف اسانس های آویشن بر رشد باکتری استرپتوکوکوس اینیایی طی زمان های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۱۲۰ ساعت را نشان می دهد. ستون ها نشان دهنده میانگین و انحراف معیار ($n=3$) است. اعداد در هر پانل به طور جداگانه با یکدیگر مقایسه شده است. حروف بزرگ الفبای انگلیسی مقایسات در هر ستون به صورت عمودی را نشان می دهد که مقایسه بین غلظت ها در زمان واحد است. حروف کوچک الفبای انگلیسی مقایسات در هر ردیف به صورت افقی را نشان می دهد که مقایسه بین زمان ها در هر غلظت است.



شکل ۶: نمودار تاثیر غلظت های مختلف اسانس های زیره بر رشد باکتری استرپتوکوکوس اینیایی طی زمان های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۱۲۰ ساعت را نشان می دهد. توضیحات مشابه شکل ۵.



شکل ۳: نمودار تاثیر غلظت ۱۵۰ ppm اسانس های مختلف آویشن، زیره، دارچین و سیر بر رشد باکتری استرپتوکوکوس اینیایی طی زمان های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۱۲۰ ساعت را نشان می دهد. ستون ها نشان دهنده میانگین و انحراف معیار ($n=3$) است. اعداد در هر پانل به طور جداگانه با یکدیگر مقایسه شده است. حروف الفبای انگلیسی معنی داری در سطح $P < 0.05$ را نشان می دهد.



شکل ۴: نمودار تاثیر غلظت ۲۰۰ ppm اسانس های مختلف آویشن، زیره، دارچین و سیر بر رشد باکتری استرپتوکوکوس اینیایی طی زمان های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۱۲۰ ساعت را نشان می دهد. ستون ها نشان دهنده میانگین و انحراف معیار ($n=3$) است. اعداد در هر پانل به طور جداگانه با یکدیگر مقایسه شده است. حروف الفبای انگلیسی معنی داری در سطح $P < 0.05$ را نشان می دهد.

تاثیر غلظت های متفاوت اسانس زیره در زمان های مختلف:

نتایج به دست آمده از شکل ۶ نشان می دهد که افزایش دوز اسانس زیره در زمان های ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت سبب افزایش معنی دار هاله عدم رشد در باکتری استرپتوکوکوس اینیایی می شود ($P < 0.05$). روند تغییرات در زمان ۱۲۰ ساعت نیز افزایشی است منتهی تیمارهای ۵۰ و ۱۰۰ فاقد اختلاف معنی دار با یکدیگر هستند. به طور مشابه تیمارهای



بحث

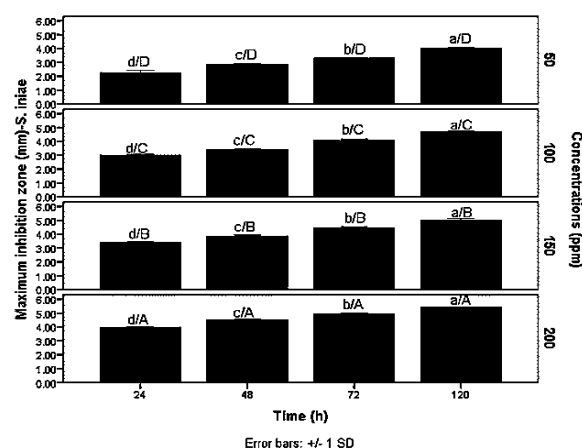
مطالعات صورت گرفته در زمینه تاثیر ترکیبات گیاهی دارویی بر آبیان و پاتوژن‌های آن‌ها بسیار محدود است. در این راستا می‌توان به بررسی اثر آویشن شیرازی بر باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* جداسازی شده از تاس‌ماهیان پرورشی (معصوم‌زاده و همکاران، ۱۳۹۵) و بررسی اثرات ضدباکتریایی عصاره آویشن به همراه برخی عصاره‌های گیاهی علیه سه باکتری بیماری‌زا استرپتوکوکوس اینیایی، پرسینیاراکری و *آئروموناس هیدروفیلا* اشاره کرد (علیشاهی و همکاران، ۱۳۸۹). رومیانی و رکنی (۱۳۹۲)، اثر بازدارندگی اسانس زیره سبز بر میزان رشد استرپتوکوکوس اینیایی در فیله ماهی قزل‌آلا را مورد بررسی قرار دادند. نتایج مطالعه انجام گرفته روی ماهی گرین ترور با هدف بررسی تاثیر دارچین بر شاخص‌های خونی این ماهی نشان داد که تعداد گلبول‌های سفید در تیمار تغذیه شده یک درصد پودر دارچین به‌طور معنی‌دار نسبت به گروه شاهد افزایش یافته است (Roozi و همکاران، ۲۰۱۳). نتایج به‌دست آمده از تحقیق حاضر نشان می‌دهد که اسانس‌های مورد استفاده در این تحقیق کمابیش خاصیت ضدباکتریایی در محیط برون‌تنی را داشته است. احتمالاً دلیل تفاوت اندک در مکانیسم عمل اسانس‌های مختلف بر رشد باکتری مورد آزمایش به نوع ترکیبات شیمیایی آن‌ها ارتباط دارد. در این راستا، محققین با بررسی تاثیر اسانس‌های گیاهی روی کل سطوح و حتی استفاده از آن‌ها به‌عنوان پوشش در آبیان به این نتیجه رسیدند که این ترکیبات می‌تواند مانع رشد باکتری‌ها با درجات مختلف شوند (Burt، ۲۰۰۴). نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که اغلب اسانس‌های گیاهی استخراج شده از گیاهان دارویی دارای خواص ضدقارچی، ضدانگلی، ضدباکتریایی و ضدویروسی هستند (Choobkar و همکاران، ۲۰۱۰). از این‌رو محققان تلاش‌هایی را در جهت به‌کارگیری اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهان بومی و دارویی به‌عنوان جایگزینی برای نگه‌دارنده‌های شیمیایی انجام داده‌اند (Madsen و Bertrisen، ۱۹۹۵). نتایج این دست مطالعات نشان می‌دهد که این ترکیبات ضمن ایجاد عملکرد قابل مقایسه با ترکیبات شیمیایی، سمیت پایین‌تری برای انسان و سایر پستانداران داشته و با داشتن اثرات مخرب کم‌تر در محیط زیست می‌توانند جایگزین یا مکمل مواد شیمیایی باشند (Ghasemi pirbalouti و Rahimi، ۲۰۱۰). رمضانپور و همکاران (۱۳۹۵)، اثر اسانس آویشن شیرازی بر باکتری اشریشیاکلی مورد بررسی قرار دادند. حداقل غلظت بازدارندگی برای اسانس آویشن شیرازی ۰/۱ و حداقل غلظت کشندگی نیز به‌ترتیب برابر با ۰/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تعیین گردید. اسانس آویشن شیرازی با ۶۴/۲ درصد مشارکت دارای بیش‌ترین اثر ضدباکتریایی بر باکتری اشریشیاکلی بود. می‌توان این‌گونه نتیجه‌گیری نمود که اسانس آویشن شیرازی دارای خاصیت ضدباکتریایی

تاثیر غلظت‌های متفاوت دارچین در زمان‌های مختلف: به‌طور

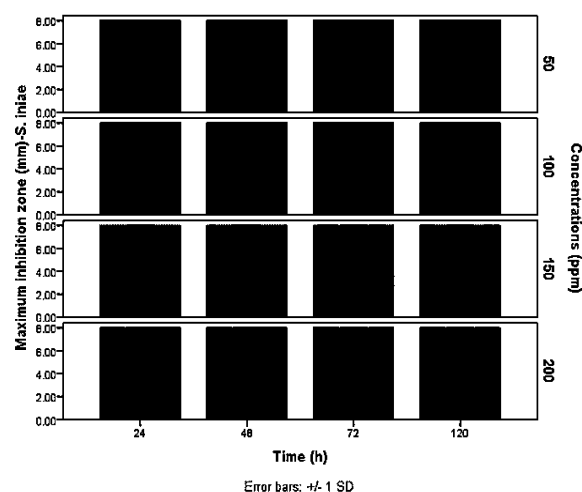
مشابه با موارد قبل، نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد که اسانس دارچین با افزایش دوز از ۵۰ به ۲۰۰ به‌طور کلی سبب افزایش معنی‌دار ($P < 0.05$) قطر هاله عدم رشد در محیط کشت باکتری استرپتوکوکوس اینیایی در تمامی زمان‌ها می‌شود (شکل ۷، مقایسات عمودی). روند افزایش ($P < 0.05$) مشابهی نیز با افزایش دوره انکوباسیون در قطر هاله عدم رشد این باکتری قابل مشاهده است (شکل ۷، مقایسات افقی).

تاثیر غلظت‌های متفاوت اسانس سیر در زمان‌های مختلف:

همان‌طور که از شکل ۸ برمی‌آید، دوزهای مختلف اسانس سیر در زمان‌های مختلف از نظر آماری هیچ اختلاف معنی‌داری در قطر هاله عدم رشد باکتری استرپتوکوکوس اینیایی ایجاد نکرده است ($P > 0.05$).



شکل ۷: نمودار تاثیر غلظت‌های مختلف اسانس‌های دارچین بر رشد باکتری استرپتوکوکوس اینیایی طی زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۱۲۰ ساعت را نشان می‌دهد. توضیحات مشابه شکل ۵.



شکل ۸: نمودار تاثیر غلظت‌های مختلف اسانس‌های سیر بر رشد باکتری استرپتوکوکوس اینیایی طی زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۱۲۰ ساعت را نشان می‌دهد. توضیحات مشابه شکل ۵.



coli, *Candida albicans*, *Bacillus cereus* *Salmonella typhimurium*، حداقل میزان غلظت بازدارنده یا مهارکننده (MIC) در مقابل این باکتری‌ها ۰/۵ میکرولیتر بر دیسک محاسبه کردند. تحقیق حاضر نیز نشان داد که حتی کم‌ترین دوز اسانس دارچین مورد استفاده یعنی، ۵۰ نیز سبب مهار رشد باکتری استرپتوکوکوس اینیایی شده است. در مطالعه انجام شده توسط Alsaid و همکاران (۲۰۱۰) میزان MIC عصاره ۱۰ درصد آب سیر در مقابل باکتری استرپتوکوکوس آگالاکتیایی (*Streptococcus agalactiae*) خواص بازدارندگی نشان داده است که خود تاییدی بر نتایج به‌دست از مطالعه حاضر در خصوص جنس استرپتوکوکوس است. در مجموع، با مقایسه نتایج به‌دست آمده از تحقیق حاضر و مطالعات پیشین می‌توان به این نتیجه دست یافت که اسانس‌های گیاهی مورد استفاده، دارای خواص آنتی‌باکتریال منتهی با درجات و میزان اثر بخشی متفاوت هستند. به‌طور کلی، آنالیزهای آماری چندطرفه نشان داد که اثر بخشی این اسانس‌ها نه تنها تحت تاثیر نوع اسانس و غلظت به کار رفته است بلکه دوره در معرض قرارگیری نیز می‌تواند اثرات متفاوتی را از خود نشان دهد. در خصوص اثر مهار کنندگی بر باکتری استرپتوکوکوس اینیایی بیش‌ترین اثر بخشی مربوط به سیر، آویشن و تا اندازه‌ای زیره بوده است. به‌طور کلی همواره غلظت‌های بالاتر اسانس‌های مورد استفاده اثر بخشی بیش‌تری بر ممانعت از رشد باکتری از خود نشان دادند. بنابراین پیشنهاد می‌شود که در مطالعات آتی روی اسانس‌های مورد استفاده در این تحقیق، از غلظت‌های خارج از محدوده مورد آزمایش نیز استفاده شود.

منابع

۱. پژوهی الموتی، م. ح.؛ تاجیک، ح.؛ آخوندزاده، ا.؛ گندمی، ح. و احسانی، ع.، ۱۳۹۱. مطالعه ترکیب شیمیایی و فعالیت ضد میکروبی اسانس‌های پونه کوهی و زیره سبز در سوپ. فصلنامه علوم و صنایع غذایی. شماره ۳۶، صفحات ۳۳ تا ۴۵.
۲. سنچولی، ن.، ۱۳۹۵. بررسی اثرات ضدباکتریایی اسانس‌های گیاهی روی برخی از باکتری‌های پاتوژن ماهی در محیط آزمایشگاهی. نشریه میکروبیولوژی دامپزشکی. شماره ۱۲، صفحات ۱ تا ۱۲.
۳. شریف‌روحانی، م.؛ حقیقی، م.؛ عصاییان، ح.، ۱۳۹۰. غلظت نیمه‌کشنده اسانس آویشن شیرازی در بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پرورشی. مجله علمی شیلات ایران. شماره ۲۰، صفحات ۸۹ تا ۹۶.
۴. خانی، س.؛ سروی‌مغانلو، ک.؛ ایمانی، ا.؛ آق، ن. و رازی، م.، ۱۳۹۵. اثر حفاظتی افزودن اسانس دارچین به جیره غذایی در کاهش سمیت آفلاتوکسین B1 در بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان. مجله منابع طبیعی ایران. شماره ۶۹، صفحات ۴۸۱ تا ۴۹۵.
۵. رومیانی، ل. و رکنی، ن.، ۱۳۹۲. بررسی اثر بازدارندگی اسانس زیره سبز و نیسین بر میزان رشد استرپتوکوکوس اینیایی در فیله قابل توجهی بر باکتری اشیریشیاکلی بوده در حالی که خواص ضدباکتریایی اسانس‌های برگ بو و بابونه ضعیف است. این در حالی است که نتایج تحقیق آن‌ها نشان داد که مقادیر بسیار کم‌تر از اسانس آویشن شیرازی قادر به بازدارندگی رشد و حتی کشتن اشیریشیاکلی است. به عبارتی اثرات ضدباکتریایی اسانس آویشن بیش‌تر از عصاره الکلی آن است. در تحقیق حاضر نیز اسانس آویشن مورد استفاده در مقادیر اندک سبب مهار رشد برخی باکتری‌ها در بالاترین سطح ممکن شد. سنچولی (۱۳۹۵)، اثر ضدباکتریایی اسانس‌های گیاهی روی برخی باکتری‌های پاتوژن ماهی در محیط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار داد. در این مطالعه مشخص گردید که باکتری گرم مثبت استرپتوکوکوس اینیایی در مقایسه با دو باکتری گرم منفی آئروموناس هیدروفیلا و یرسینیا روکری حساسیت بیش‌تری نسبت به اسانس‌های مورد استفاده داشت، که در این مورد می‌توان علت را وجود غشای خارجی سلولی در باکتری‌های گرم منفی دانست. بنابراین باکتری گرم مثبت استفاده شده در تحقیق حاضر می‌بایست حتی در مقادیر کم اسانس نیز تحت تاثیر قرار می‌گرفت که نتایج به‌دست آمده این مورد را تایید می‌کند. نتایج تحقیق رهنما و همکاران (۱۳۹۷) در مورد خاصیت ضدباکتریایی اسانس زیره سبز بر جمعیت لیستریا مونوسیتوزن تلقیح شده در گوشت چرخ شده ماهی شیزوتوراکس زارودنی نشان داد که میانگین لگاریتم تعداد سلول‌های لیستریا مونوسیتوزن تحت تاثیر غلظت‌های مختلف اسانس زیره سبز در گوشت چرخ شده شیزوتوراکس در روز صفر 10^3 CFU/g بود. با گذر زمان تعداد باکتری لیستریا در گروه شاهد افزایش یافت. در روز اول نگهداری تعداد باکتری‌های تیمارهای حاوی اسانس زیره سبز نسبت به گروه شاهد کاهش معنی‌داری داشت ($P=0/001$). ولی در روز سوم نگهداری تعداد باکتری لیستریا در تیمار شاهد غیرقابل شمارش شدند. بقیه تیمارها اثر مهار کنندگی ضعیف و معنی‌داری را در برابر باکتری لیستریا از خود نشان دادند ولی تیمار ۳ درصد اسانس در روز اول مانع از رشد باکتری شد و تعداد باکتری را به صفر رساند ($P=0/001$). زیره سبز در سطح ۱ و ۲ درصد اثر مهار کنندگی ضعیف و معنی‌داری را نسبت به گروه شاهد در برابر باکتری لیستریا از خود نشان داد ولی نتوانست باکتری را به‌طور کامل مهار کند. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که اسانس زیره سبز در سطح ۳ درصد (v/w) اثر مهار کنندگی و باکتری‌کشی قوی علیه لیستریا مونوسیتوزن در گوشت چرخ شده ماهی شیزوتوراکس دارد که احتمالاً به دلیل منتول فراوان موجود در اسانس زیره سبز است. مطالعات در محیط آزمایشگاهی نشان می‌دهند که این ترکیب فنولی موجود در اسانس زیره سبز فعالیت ضد باکتریایی دارد. در آزمایش انجام شده توسط Vazirian و همکاران (۲۰۱۵) با هدف بررسی خاصیت ضدباکتریایی دارچین بر چند پاتوژن مختلف (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia*)



۱۹. **Ghasemipirbalouti, A. and Rahimi, E., 2010.** Antimicrobial activity of essential oils of three herbs against *Listeriamonocytogenes* on chicken frankfurters. *Acta Agriculture Slovenica Abbreviation*. Vol. 95. pp: 219-223.
۲۰. **Ghorbani Darabad, S.; Mohsenifar, A.; Yazdannarast, S.R. and Bavat, M., 2015.** Antimicrobial Effects of *Lavandula anaustifolia* Mill. *Artemisia sieberi* Besser. *Cinnamomum verum* Presl. and *Myrtus communis* L. Encapsulated Essential Oils Against Prevalent Microorganisms Causing Sinusitis. *Thrita*. Vol. 4, pp: 2-12.
۲۱. **Hong, H.; Luo, Y.; Zhou, Z. and Shen, H., 2012.** Effects of low concentration of salt and sucrose on the quality of bighead carp (*Aristichthys nobilis*) fillets stored at 4 °C. *Journal of Food Chemistry*. Vol. 133, pp: 102-107.
۲۲. **Jayanth, K.; Jeyasekaran, G. and Jeya Shakila, R., 2001.** Biocontrol of Fish Bacterial Pathogens by the Antagonistic Bacteria isolated from the Coslnl Waters of Gulf of Mannar, India. *Bulletin of European Association of Fish Pathologist*. Vol. 21. pp: 1218-1222.
۲۳. **Madsen, H.L. and Bertelsen, G., 1995.** Spices as antioxidants. *Trends in Food Science & Technology*. Vol. 6, pp: 271-277.
۲۴. **Mohagheghzadeh A.; Shams-Ardekani, M.; Ghannadi, A. and Minaeian, M., 2004.** Rosmarinic acid from *Zataria multiflora* tops and in vitro cultures. *Fitoterapia*. Vol. 75, pp: 315-321.
۲۵. **Mushlova, Z.; Schindler, I. and Staeck, W., 2009.** Description of *Andinoacara stalsbergi* (Teleostei: Cichlidae: Cichlasomatini) from pacific coastal rivers in Peru/and annotation on the phylogeny of the genus. *Vertebrate Zoology*. Vol. 59, pp: 131-141.
۲۶. **Osakabe, N.; Yasuda, A.; Natsume, M. and Yoshikawa, T., 2004.** Rosmarinic acid inhibits epidermal inflammatory responses: Anticarcinogenic effect of *Perilla frutescens* extract in the murine two stage skin model. *Carcinogenesis*. Vol. 25, pp: 549-557.
۲۷. **Parnham, M.J. and Kesselring, K., 1985.** Rosmarinic acid. *Drug Future*. Vol. 10, pp: 756-757.
۲۸. **Pinto, M.S.; de Carvalho, A.F.; Santos Pires, A.C.; Campos Souza, A.A.; da Silva, P.H.F.; Sobral, D.; de Paula J.C.J. and de Lima Santos, A., 2011.** The effects of nisin on *Staphylococcus aureus* count and the physicochemical properties of Traditional Minas Sero cheese. *International Dairy Journal*. Vol. 21, pp: 90-96.
۲۹. **Roozi, Y.; Moraki, N.; Zoriyeh Zahra, S.J. and Haghighi, M., 2013.** Effect of different levels of powdered cinnamon (*Cinnamomum zeylanicm*) in the diet of fish green terror (*Andinocara rivulatus*) index, blood glucose and survival. *Breeding and Aquaculture Sciences Quarterly*. Vol. 1, No. 3, pp: 41-52 (In Persian).
۳۰. **Sun, Y.; Sun, L.; King, M.; Liu, C. and Hu, Y., 2013.** Sag E induces highly effective protective immunity against *Streptococcus iniae* mainly through an immunogenic domain in the extracellular region. *Journal of Acta Veterinaria Scandinavica*. Vol. 1, No. 55, pp: 2-9.
۳۱. **Tsironi, T.; Stamatiou, A.; Giannoglou, M.; Velliou, E. and Taoukis, P.S., 2011.** Predictive modelling and selection of time temperature integrators for monitoring the shelf life of modified atmosphere packed gilthead sea bream fillets. *J of Food Science and Technology*. Vol. 44. pp: 1156-1163.
۳۲. **Vazirian, M.; Mohammadi, M.; Farzaei, M.H.; Amin, G. and Amanzadeh, Y., 2015.** Chemical composition and antioxidant activity of *Oriaanum vulgare* subsp. *vulgare* essential oil from Iran. *Research Journal of Pharmacognosy*. Vol. 2, No. 1, pp: 41-46.
۳۳. **Yao, J.Y.; Shen, J.Y.; Li, X.L.; Xu, Y.; Hao, G.J.; Pan, X.Y.; Wang, G.X. and Yin, W.L., 2012.** Isolation of bioactive components from *Chelidonium majus* with activity against *Trichodina* sp. *Aquaculture*. Vol. 318, pp: 235-238.
۳۴. **Yeh, Y.Y. and Liu, L., 2001.** Cholesterol lowering effect of garlic extracts and organo-sulphur compounds: human and animal studies. *J of Nutrition*. Vol. 131, No. 3, pp: 989-993.
۳۵. **Zomorodian, K.; Saharkhiz, M.J.; Rahimi, M.J.; Bandegi, A.; Shekarkhar, G.; Bandegani, A.; Pakshir, K. and Bazargani, A., 2011.** Chemical composition and antimicrobial activities of the essential oils from three ecotypes of *Zataria multiflora*. *Pharmacognosy Magazine*. Vol. 7, pp: 53-59.
- ماهی قزل‌آلا با استفاده از تکنولوژی ترکیبی. فصلنامه علوم و صنایع غذایی. شماره ۴۸، صفحات ۳۷ تا ۴۶.
۶. **رهنما، م.؛ نوری‌جنگی، ا. و علیپوراسکندانی، م.، ۱۳۹۷.** خاصیت ضدباکتریایی اسانس زیره سبز و نیسین بر جمعیت لیستریا مونوسیتوزن تلقیح‌شده در گوشت چرخ‌شده ماهی شیزوتوراکس. مجله دانشگاه علوم پزشکی تربت‌حیدریه. شماره ۶، صفحات ۲۷ تا ۳۱.
۷. **زرگری، ع.، ۱۳۷۱.** گیاهان دارویی. انتشارات دانشگاه تهران. چاپ چهارم، صفحات ۱ تا ۵۷.
۸. **علیشاهی، م.؛ حیدری، م.؛ پشم‌فروش، م. و نجف‌زاده، ح.، ۱۳۸۹.** مطالعه اثرات ضدباکتریایی برخی عصاره‌های گیاهی علیه استرپتوکوکوس اینیایی، یرسینیا راکری و آنروموناس هیدروفیلا. مجله دامپزشکی ایران. شماره ۶، صفحات ۲۱ تا ۳۰.
۹. **میرمصطفایی، س.؛ عزیزی، م.؛ بحرینی، م.؛ آروئی، ح. و عروجعلیان، ف.، ۱۳۹۴.** تأثیر روش‌های مختلف خشک کردن بر سرعت کاهش وزن، میزان اسانس و بار میکروبی نعنای فلفلی. مجله پژوهش‌های تولید گیاهی. شماره ۲۰، صفحات ۱۳۳ تا ۱۴۴.
۱۰. **معصوم‌زاده، م.؛ شریف‌روحانی، م.؛ شناورماسوله، ع.؛ علیزاده، م.؛ جلیل‌پور، ج. و بازاری‌مقدم، س.، ۱۳۹۵.** تأثیرات ضدباکتریایی عصاره‌های سیر و آویشن شیرازی بر باکتری آنروموناس هیدروفیلا جداسازی شده از تاس‌ماهیان پرورشی. نشریه توسعه آبی‌پروری. شماره ۴، صفحات ۱۲۵ تا ۱۳۲.
۱۱. **Alsaid, M.; Daud, H.; Beio, S.K. and Abuseliana, A., 2010.** Antimicrobial activities of some culinary spice extracts against *Streptococcus aalactiae* and its prophylactic uses to prevent streptococcal infection in red hybrid tilapia (*Oreochromis* sp.). *World Journal of Fish and Marine Sciences*. Vol. 2, No. 6, pp: 532-538.
۱۲. **Abdollahzadeh, E.; Rezaei, M. and Hosseini, H., 2014.** Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: The role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control *Listeria monocytogenes* inoculated in minced fish meat. *Journal of Food Control*. Vol. 35, No. 1, pp: 177-183.
۱۳. **Burt S., 2004.** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods, a review, *International of Food Microbiology*. Vol. 4, No. 3, pp: 233-253.
۱۴. **Choobkar, N.; Soltani, M.; Ebrahimzadeh Mousavi, H.; Akhonzadeh Basti, A. and Matinfar, A., 2010.** Effect of *Zataria multiflora* Boiss essential oil on the growth of *Staphylococcus aureus* in the light salted fillets of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Iranian Journal of Fisheries Sciences*. Vol. 9, No. 3, pp: 352-359.
۱۵. **Choudhary, P.R.; Shekhawat, J.S.; Sharma, M.S. and Dashora, J., 2013.** Effect of *Allium Sativum* on experimentally induced hyperlipidemia in guinea pigs. *Pakistan Journal of Physiology*. Vol. 9, No. 2, pp: 38-40.
۱۶. **Durak, I.; Kavutcu, M.; Aytac, B.; Avci, A.; Devrim, E.; Ozbek, H. and Ozturk, H.S., 2004.** Effects of garlic extract consumption on blood lipid and oxidant/antioxidant parameters in humans with high blood cholesterol. *The J of Nutritional Biochemistry*. Vol. 15, No. 6, pp: 373-377.
۱۷. **Ettehad, G.H. and Arab, R., 2007.** Evaluation of antibacterial effects of Shiraz oregano essence (*Zataria multiflora*) on *Salmonella typhi* and comparing to antibiotics. *Research Journal of Bioogical Sciences*. Vol. 2, pp: 674-676.
۱۸. **Gavanji, S.; Zaker, S.R.; Neiad, Z.G.; Bakhtari, A.; Bidabadi, E.S. and Larki, B., 2015.** Comparative efficacy of herbal essences with amphotricin B and ketoconazole on *Candida albicans* in the in vitro condition. *Integrative Medicine Research*. Vol. 4, pp: 112-118.

