# بررسی فیتوشیمیایی و اثر ضد قارچی اسانس گیاه دارویی *Artemisia persica* Boiss. در مقایسه با بورنئول سنتزی علیه قارچ *Aspergillus niger*

**محمد مقتدر[۱]، حسن سالاری[۲]، حسین مظفری[۳*]، آرمیتا فرهمند[٤]**

[۱]کارشناسی‌ارشد، گروه تنوع زیستی، پژوهشکده علوم محیطی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران.

[۲]استادیار، گروه اکولوژی، پژوهشکده علوم محیطی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران.

[۳]استادیار، گروه اکولوژی، پژوهشکده علوم محیطی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران.

[٤]گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده علوم محیطی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران.

**تاریخ دریافت: ۹٦/۱۰/۲٤ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۷/۱۷**

**چکیده**

اسانس گیاه دارویی درمنه ایرانی (*Artemisia persica* Boiss.) حاوی مواد موثره بورنئول و ۱و۸-سینئول بوده و این ترکیبات آلی دارای خواص ضدمیکروبی و ضدقارچی می‌باشند. در این پژوهش به جهت بررسی کمیت و کیفیت اسانس گیاه درمنه ایرانی در رویشگاه کرمان و میزان تاثیر بازدارندگی آن بر رشد قارچ آسپرژیلوس (*Aspergillus niger*)، سرشاخه‌های گیاه در مرحله قبل از گلدهی گیاه (PF)، از رویشگاه طبیعی آن در حوالی کرمان در خردادماه ۱۳۹٤ جمع‌آوری گردید. اسانس‌گیری به روش تقطیر با آب (طرح کلونجر) انجام شد و سپس ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس با دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف سنج جرمی (GC/MS) شناسایی گردید. بررسی اثر ضد قارچی اسانس گیاه علیه رشد قارچ آسپرژیلوس به روش چاهک با اندازه‌گیری قطرهاله عدم رشد بررسی شد و تعیین MIC نیز به روش ماکرودایلوشن در آزمایشگاه ارزیابی گردید. نتایج نشان داد بازده اسانس این گیاه (v/w) ۱/۵۵ درصد، از ۳۹ ترکیب شناسایی شده در اسانس گیاه با خلوص ۹۸/۲۱ درصد از مهمترین مواد: بورنئول (۳۲/۸۲ درصد)، ۱و۸-سینئول (۱۸/۳۲ درصد)، کامفور (۸/٦٤ درصد) و کامفن (٦/۷۵ درصد) تشکیل شده است و اینکه اسانس درمنه ایرانی با رقت‌های ۱، ۱/۲ دارای قدرت مهارکنندگی قابل ملاحظه‌ای بر این سویه قارچ آسپرژیلوس نیجر در مقایسه با آنتی‌بیوتیک فلوکونازول می‌باشد. بورنئول سنتزی هم با رقت ۱۰ درصد هم قدرت مهارکنندگی قابل ملاحظه‌ای بر رشد قارچ آسپرژیلوس نیجر داشت. اثر ضد قارچی اسانس گیاه درمنه ایرانی می‌تواند به درصد بالای ترکیب‌های بورنئول و ۱ و۸-سینئول موجود در آن مرتبط دانست و احتمالاً بتوان از اسانس این گیاه به‌عنوان یک داروی گیاهی با اثرات ضدقارچی در صنایع مختلف غذایی، بهداشتی و دارویی مورد استفاده قرار گیرد.

***واژه‌های کلیدی:*** اسانس، بورنئول، درمنه، سینئول، *Artemisia persica*، *Aspergillus niger*

*نویسنده مسئول: mozafari.hossein@gmail.com

**مقدمه**

در تحقیقات مختلف سال‌های اخیر، کاربرد گیاهان دارویی، اسانس‌ها و داروهای حاصل از آنها، در درمان بیماری‌های مختلف به‌ویژه بیماری‌های عفونی،میکروبی و قارچی روندی رو به افزایش داشته است (Baser et al., 2015; Bansod and Rai, 2008). کاربرد این نوع داروها، به‌ویژه جهت درمان بیماری‌های ریه انسان که ناشی از پاتوژن‌های قارچی مانند گونه‌های قارچ آسپرژیلوس هستند، نیز رو به گسترش می‌باشد (Baron and Finegold,1995; Bansod and Rai, 2008; Shibamoto et al., 2010). به هر حال این نوعقارچ‌ها در بیماران دارای نقص ایمنی به‌صورت مهاجم عمل نموده و با توجه به روند رو به افزایش تعداد این بیماران و همچنین در بیماران داوطلب پیوند اعضاء که با سرکوب شدید سیستم ایمنی مواجه‌اند، از اهمیت خاصی برخوردارند. از اینر و اهمیت عفونت‌های قارچی و به خصوص با جنس آسپرژیلوس بسیار افزایش یافته و به تبع آن، روش‌های شناسایی دقیق و سریع‌تر این قارچ‌ها نیز از اهمیت خاصی برخوردار شده است (Aghajani et al., 2009). گونه‌های آسپرژیلوس، بیشترین گونه‌های قارچی هستند که قادر به تولید ترکیبات مایکوتوکسین‌ها به‌عنوان عامل ایجاد بیماری‌های هپاتوکارسینوژنیک در حیوانات و انسان‌ها شناخته شده‌اند (Rex et al., 2008). به‌طورکلی فلور قارچی طبیعی موجود در منابع غذایی انسان، عمدتا شامل سه جنس آسپرژیلوس[1]، فوزاریوم[2]و پنی سیلیوم[3]می‌باشد (Rex et al., 2008).

نحوه تاثیر اسانس‌های گیاهی در ارتباط با ترکیبات شیمیایی و فعالیت ضدمیکروبی آنها بوده، ولی در تمامی موارد از مکانیسم مشابهی برخوردار نیستند (Cha et al., 2005; Rasooli et al., 2003). با این وجود، در اغلب موارد تاثیر اسانس‌های گیاهی بر ساختار دیواره سلولی تایید شده است (Sampietro et al., 2017). اغلب تحقیقات در زمینه اثرات ضدمیکروبی اسانس‌ها ابتدا در محیط آزمایشگاهی انجام گرفته و سپس خصوصیات کاربردی آن‌ها در مدل‌های تغذیه انسان ارزیابی می‌شود (Ahmad and Beg, 2002). لزوم به کارگیری غلظت‌های بالاتر اسانس در غذا در مقایسه با شرایط آزمایشگاهی نشان‌دهنده پیچیده بودن شرایط رشد میکروارگانیسم‌ها در غذا است، که می‌تواند اثرات محافظتی بر سلول‌های میکروبی در مقابل ترکیبات ضد میکروبی داشته باشد (Abu-Darwish et al., 2016).

همچنین استفاده بی‌رویه از داروهای شیمیایی جهت درمان بیماری‌های عفونی، منجر به ظهور ایزوله‌های مقاوم میکروبی گردیده که هر روز بر تعداد این ایزوله‌ها افزوده می‌گردد (Khosravi et al., 2018). گیاهانی مانند درمنه ایرانی و متابولیت‌های ثانویه و موثره موجود در اسانس‌ها و عصاره‌های این نوع گیاهان دارای توان بالقوه ضدقارچی جهت جایگزینی با داروهای شیمیایی معمولی باشند (Siadat et al., 2017; Sadeghpour et al., 2004).

جنس درمنه (*Artemisia* sp.) از گیاهان بوته‌ای بوده و شامل ٤٠٠ گونه در سطح جهان می باشد (Sefidkon et al., 2013; Mahboubi and Farzin, 2009). درمنه، گیاهی چند ساله است که در ایران دارای ٣٤ گونه مختلف می‌باشد. ترکیب‌های گیاهی مختلف حاصل از این گیاه شامل اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی بوده و دارای توان بالقوه جهت جایگزینی با داروهای شیمیایی هستند (Siadat et al., 2017; Rustaiyan and Faridchehr, 2014).

1. *Aspergillus*
2. *Fusarium*
3. *Penicillium*

گیاه درمنه ایرانی با خواص ضدمیکروبی که دارد، از اهمیت دارویی ویژه‌ای برخوردار است. درمنه ایرانی (*Artemisia persica* Boiss.) با نام محلی یوشن از زمان‌های قدیم به‌صورت سنتی در درمان بیماری‌هایی‌هایی مانند تب، مالاریا، خونریزی، هپاتیت، انگل‌های روده‌ای، دردهای عصبی، التیام‌زخم‌ها و اسپاسم مصرف می‌شود (Ramak and Sefidkon, 2008; Ramezani et al., 2004).

علاوه بر این، متابولیت‌های ثانویه‌ای مانند سینئولوبورنئول موجود در اسانس آن، دارای خواص ضدعفونی کننده، ضدمیکروبی و آرام بخش هستند (Mojarrab et al., 2013). گونه *A. persica* عمدتاً در مناطق شرقی ایران رشد می کند.این گونه درمنه یکی از قدیمی‌ترین و شناخته شده‌ترین گیاهان جهت حتی کاربردهای پزشکی در ایران محسوب می‌شود (Mojtahed Zadeh Asl et al., 2018) و مردم ساکن در مرکز و جنوب ایران از ریشه، ساقه و برگ این گونه درمنه جهت درمان سرفه، سرماخوردگی، تب، کاهش اشتها، دردهای کولیکی، سردرد، گوش درد، بیماری‌های انگلی و مالاریا استفاده می‌کنند (Rasooli et al., 2003).

در پژوهشی که بر روی درمنه دشتی (*Artemisia seiberi*) در سال ۱۳۹۱ انجام شد، مشخص گردیده که اسانس این گیاه دارای تاثیر بالایی بر شپشک آرد بوده و نرخ رشد نسبی حشرات بالغ را به‌طور معنی داری کاهش می دهد. همچنین اسانس استخراج شده از این گونه درمنه دشتی، تاثیر قابل توجهی بر شاخص بازدارندگی تغذیه شپشک آرد دارد (Ganjali and Pourramadani Herati, 2012). با مطالعات فیتوشیمیایی بر روی ۲۵ گونه درمنه از مناطق اسپانیا تا فلسطین و مقایسه نتایج این پژوهش‌ها با نمونه‌های درمنه حاصل از مناطق مرکزی ایران، مشخص شد که اصلی‌ترین گونه در این درمنه زارها، درمنه دشتی می‌باشد (Rabie et al., 2012). در مطالعه دیگر که بر درمنه دشتی صورت گرفت مشخص شد که اسانس این گیاه اثرات آنتی میکروبی قابل توجهی از خود نشان می‌دهد (Ramezani et al., 2004). همچنین طی تحقیقی بر روی گونه *A. tournefortiana* انجام شد، مشخص گردید که اسانس این گونه درمنه سرشار از مونوترپن بوده و می‌تواند اثرات ضدمیکروبی از خود نشان دهد. در مطالعه بر روی درمنه خراسانی نیز نشان داده شد که اسانس درمنه خراسانی نیز می‌تواند خواص آنتی میکروبی قابل ملاحظه‌ای از خود بروز دهد (Rabie et al., 2012).

همچنین اغلب پژوهش‌ها تایید می‌کنند که اسانس های گیاهی مانند درمنه به سرعت از راه پوست، دهان و ریه جذب می‌شوند و از سد خونی- مغزی عبور کرده و با گیرنده های سیستم اعصاب مرکزی ارتباط برقرار کرده و فرایندهای زیستی مانند خواب، آرامش و افزایش هضم را القاء می‌کنند (Khazaie et al., 2013). اغلب اجزا اسانس گیاهی از راه کلیه به فرم قطبی در پی متابولیسم محدود با چسبیدن به مواد گلوکوناتی یا سولفاتیو یا از طریق کلیه دفع می‌شوند (Kloucek et al., 2012). برای مثال، پس از تجویز یک داروی گیاهی حاصل از اسانس از طریق ریه‌ها یا به شکل خوراکی منتول، ۳۵ درصد منتول از راه کلیه‌ها به شکل گلوکورونیدمنتول دفع می‌شود و این رویه برای تیمول، لیمونناوژنولهم صادق می‌باشد. پس از تجویز خوراکی این ترکیبات فرم سولفات و گلوکورونید آنها در ادرار و پلاسما دیده شد (Kumar et al., 2011). متابولیسم سریع و نیمه عمرکوتاه اجزای فعال اسانس‌ها، این باور را ایجاد نموده است که اسانس‌ها تجمع کمی در بافت‌های بدن دارند (Klevenhusen et al., 2011; Koba et al., 2011). با توجه به افزایش موارد مقاومت دارویی در میکروارگانیسم‌ها، راه حل مناسب در این موضوع

جایگزینی کردن موادی با عملکرد مناسب و متفاوت علیه میکروب‌ها می‌باشد (Kalemba and Kunicka, 2003). از جمله این مواد دارویی که می‌تواند مورد مصرف انسان قرار گیرد و دارای حداقل اثر جانبی باشند، اسانس‌های گیاهی می‌باشند. به‌هرحال اسانس‌های گیاهی مانند درمنه به دلیل دارا بودن ترکیبات منحصر به فرد خود توانایی مقابله علیه طیف گسترده‌ای از میکروب‌ها، تک یاخته‌ها و حشرات را دارا می‌باشند (Bakkali et al., 2008; Alves et al., 2010). لذا با توجه تحقیقات انجام شده فوق در زمینه ترکیبات ثانویه اسانس گونه‌های مختلف درمنه و اهمیت دارویی، پزشکی و درمانی اسانس‌های حاصل از گیاهانی مانند درمنه، هدف از این پژوهش نیز بررسی و مطالعه اثر ضدقارچی اسانس گیاه درمنه ایرانی در رویشگاه کرمان و مقایسه آن با اثرات بورنئول سنتزی بر رشد قارچ آسپرژیلوس نیجر می‌باشد. به‌هرحال با توجه تاثیر شرایط اقلیمی مختلف بر کیفیت و کمیت اسانس‌ها، مطالعه درمنه حاصل از رویشگاه کرمان در این پژوهش تاکید شد و مطالعات در این رویشگاه در جنوب شهر کرمان انجام گرفت.

## مواد وروش‌ها

**مرحله اول پژوهش؛ جمع آوری نمونه گیاهی درمنه، تهیه اسانس و انجام گاز کروماتوگرافی (GC/MS):** سرشاخه‌های اندام هوایی گیاه درمنه ایرانی که رشد رویشی کافی انجام داده بودند، در مرحله قبل از گلدهی و در آستانه گلدهی (PF) از یک رویشگاه طبیعی آن در حوالی روستایی واقع در حومه جنوبی شهر کرمان با ارتفاع ۱۹۶۹ متر از سطح دریا در اواخر خردادماه ۱۳۹٤ جمع‌آوری شدند. نمونه‌ها پس از شناسایی و تعیین گونه از طریق کلید گیاهشناسی فلور ایران، تمیز و شسته شدند. جهت جلوگیری از هیدرولیز ترکیب‌های موثره موجود در گیاهان، نمونه‌ها در شرایط سایه در دمای محیط خشک شدند (Gharaman, 2007).

۱۵۰ گرم از نمونه خرد شده به روش تقطیر با آب با کمک دستگاه کلونجر به مدت سه ساعت اسانس‌گیری شد و اسانس پس از آب‌گیری با سولفات سدیم بدون آب به دستگاه گاز کروماتوگرافی (GC) تزریق شد تا مناسب‌ترین برنامه‌ریزی حرارتی ستون، جهت دستیابی به بهترین نوع جداسازی بدست آید. سپس اسانس به‌دست آمده جهت مطالعه فیتوشیمیایی به دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف‌سنج جرمی (GC/MS) تزریق گردید و طیف‌های جرمی و کروماتوگرام‌های مربوطه بدست آمد (Adams, 2001).

**مشخصات دستگاه گازکروماتوگرافی متصل به طیف سنج جرمی (GC/MS)**: در این تحقیق از گاز کروماتوگرافی مدل Hewlett Packard-5973 مجهز به ستون CP Sil 5CB به طول ۲۵ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر که ضخامت لایه فاز ساکن آن ۰/۳۹ میکرومتر بود، استفاده شد. برنامه حرارتی ستون ۲۰ دقیقه در ٦۰ درجه سانتی‌گراد و بعد از آن به مقدار ۷ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه تا ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد افزایش یافته و به‌مدت ۲۰ دقیقه در همین دما باقی ماند. دمای محفظه تزریق و آشکارگر (FID) به‌صورت ۲۷۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد و از گاز نیتروژن با سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه به‌عنوان گاز حامل استفاده گردید (Adams, 2001, Sardashti et al., 2012).

یک سری آلکان‌های نرمال C8–C17 نیز تحت شرایط یکسان با تزریق اسانس، جهت محاسبه اندیس بازداری (RI) اجزاء اسانس به دستگاه تزریق گردید.اندیس بازداری اجزاء نمونه با استفاده از برنامه کامپیوتری محاسبه شد.در نهایت اجزاء اسانس با استفاده از مقایسه طیف‌های جرمی بدست آمده با

طیف‌های جرمی استاندارد موجود در کتابخانه الکترونیکی و نرم افزارکامپیوتر دستگاه GC/MS و محاسبه اندیس بازداری استاندارد بر اساس سری آلکان‌های C8-C17 و مقایسه آنها با اعداد استاندارد موجود در مراجع شناسایی شدند (Adams, 2001).

**مرحله دوم پژوهش؛ بررسی فعالیت ضدقارچی اسانس گیاه درمنه ایرانی:** جهت بررسی فعالیت ضد قارچی اسانس گیاه درمنه ایرانیازسویه استاندارد قارچ آسپرژیلوس نیجر سویه PTCC=5223 استفاده گردید.این سویه قارچ آسپرژیلوس از بخش کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. جهت بررسی تاثیر اسانس درمنه ایرانی بر رشد قارچ آسپرژیلوس نیجر سویه (PTCC=5223) از روش انتشار در آگار[1] در شرایط آزمایشگاهی استفاده شد.

بدین‌منظور ابتدا نمونه‌های قارچ مذکور را بر روی یک محیط کشت غذایی ویژه قارچ به نام سابرو دکستروز آگار (SDA) کشت داده شد و به مدت یک هفته در انکوباتور در دمای ۲±۲۸درجه سانتی‌گراد نگهداری شد، تا قارچ رشد کرده و تولید اسپور کند. سپس با استفاده ازسرم فیزیولوژی استریل، سوسپانسیونی از اسپور قارچ‌های کشت داده شده تهیه گردید و به روش هموسایتومتری شمارش شد (Gundidza, 1993).

از سوسپانسیون ($۱۰۵ CFUm^{-1}$) بر روی محیط کشت سابرو دکستروز آگار تلقیح شد و با استفاده از دیسک‌های بلانک استریل ٦ میلی‌متری واتمن با روش بررسی هاله عدم رشد، میزان حساسیت اسپور قارچ به اسانس، با تلقیح ۲ میکرولیتر از اسانس درمنه ایرانیدر ۲۰µl میکرو لیتر DMSO[2] بر روی دیسک‌ها بررسی شد. این کشت‌ها به مدت ٤٨ ساعت در دمای ۲±۲۸ انکوبه شدند و قطرهاله عدم رشد پس از این مدت اندازه‌گیری شد.

در این پژوهش همچنین تاثیر اسانس گیاه درمنه ایرانی جمع آوری شده از یک رویشگاه طبیعی آن در استان کرمان با رقت‌های۱، ۱/۲، ۱/٤ و ۱/۸ نسبت به اسانس غلیظ تهیه شده، در مقایسه با تاثیر آنتی بیوتیک فلوکونازول بر رشد قارچ آسپرژیلوس نیجرمورد مطالعه قرارگرفت (Gundidza, 1993).

برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) از روش چاهک‌های آگار (Agar Well) استفاده شد. بدین صورت که در پتری‌دیش‌های حاوی محیط کشت سابرو دکستروز آگار در شرایط استریل، چاهک‌هایی با قطر ۱ سانتی‌متر ایجاد شد و از اسانس غلیظ نمونه درمنه ایرانی حاصل از مرحله قبلی آزمایش، محلول‌های رقیق‌تر با درجه‌های رقت ۱، ۱/۲، ۱/٤ و ۱/۸ تهیه گردید که در این چاهک‌ها مقدار ۵۰ میکرولیتر از اسانس مورد نظر تلقیح شد و اطراف آن قارچ آسپرژیلوسنیجر کشت داده شد. پس از نگهداری قارچ‌ها به مدت یک هفته در انکوباتور با دمای ۲±۲۸ درجه سانتی‌گراد، مشاهده گردید که میسلیوم‌های قارچ آسپرژیلوس مورد مطالعه که به غلظت‌های مواد ضدقارچی موجود در پتری‌دیش حساس بودند در مکان تلقیح رشد نداشتند. با استفاده از این موضوع، کمترین غلظت مهاری (MIC) که از روش انتشار آگار استفاده شده بود، تعیین گردید. برای تعیین نوع آنتی بیوتیک، از روش آنتی‌بیوگرام و برای تعیین دز مناسب، از کمترین غلظت آنتی‌بیوتیکی برای ممانعت از رشد (MIC) استفاده شد ( Adams, 2001; Gundidza, 1993).

## نتایج

در این تحقیق، با توجه به غلظت قابل توجه متابولیتبورنئول (۳۲/۸۲ درصد) که جز ترکیبات

1. Disc diffusion method
2. Dimethylsulfoxide

شناسایی شده اسانس گیاه درمنه ایرانی مورد مطالعه بود (جدول ۱ و شکل ۱)، لازم گردید علاوه بر شناسایی فیتوشیمیایی دقیق ترکیبات اسانس نمونه درمنه ایرانی، مقایسه اثرات ضد قارچی اسانس حاصل با تاثیر بورنئول سنتزی علیه رشد قارچ آسپرژیلوس نیجر مورد پژوهش قرار دهیم.

به هرحال نتایج GC/MS این پژوهش نشان داد که بازده اسانس گیاه درمنه ایرانی در رویشگاه منطقه کرمان ۱/۵۵ درصد (v/w) بود. ترکیبات شناسایی شده در اسانس، شاخص بازداری (RI)، درصد هر یک از متابولیت‌های شناسایی شده در جدول ۱ آورده شده است. از ۲۹ ترکیب شناسایی شده در اسانس استخراج شده از درمنه ایرانی در رویشگاه کرمان با ۹۸/۲۱ درصدخلوص، بیشترین درصد مواد موثره اسانس به‌ترتیب شامل؛ بورنئول (۳۲/۸۲درصد)، ۱و۸-سینئول (۱۸/۳۲درصد)، کامفور (۸/٦٤ درصد) و کامفن (٦/۷۵ درصد) بودند (جدول ۱).

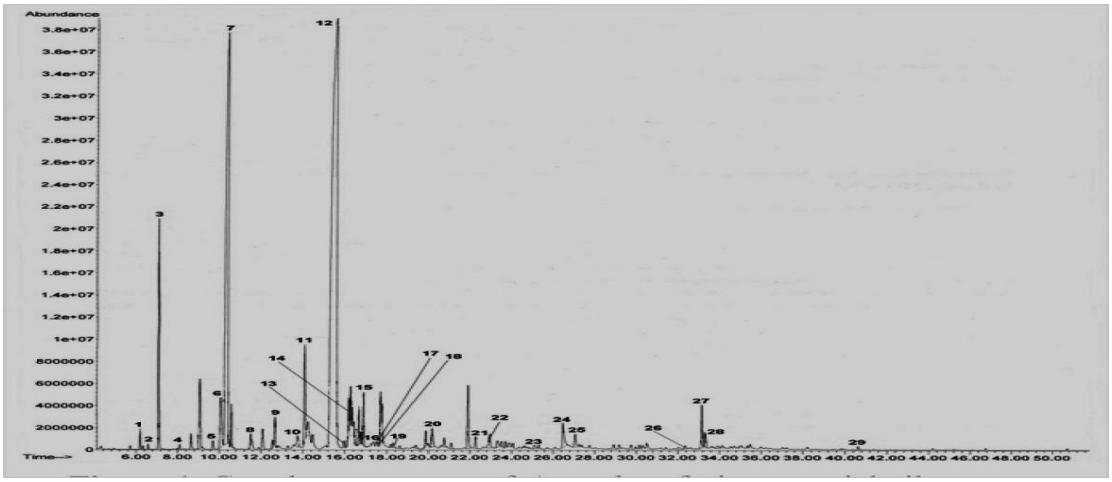
**جدول ۱:** ترکیب‌های شناسایی شده در اسانس حاصل از سرشاخه‌های اندام هوایی گیاه درمنه ایرانی *Artemisia persica* Boiss. در فاز رویشی (قبل از گلدهی) در رویشگاه کرمان.

| شماره پیک کروماتوگرام | نام ترکیب ثانویه | شاخص بازدارندگی *(RI)* | درصد ترکیب مورد نظر شناسایی شده |
|---|---|---|---|
| 1 | α-terpineol | 932 | 0.82 |
| 2 | Limonene | 940 | 1.37 |
| 3 | Camphor | 959 | 8.64 |
| 4 | Bornyl acetate | 980 | 1.42 |
| 5 | *trans*-caryophyllene | 987 | 1.36 |
| 6 | Linalool | 994 | 2.24 |
| 7 | 1,8-cineole | 1024 | 18.32 |
| 8 | n-decanal | 1027 | 1.63 |
| 9 | α-terpinyl acetate | 1032 | 1.72 |
| 10 | (Z)-α-bisabolene | 1040 | 0.65 |
| 11 | Camphene | 1043 | 6.75 |
| 12 | Borneol | 1052 | 32.82 |
| 13 | Methyl Eugenol | 1066 | 0.57 |
| 14 | *cis*-jasmone | 1094 | 3.18 |
| 15 | α-pinene | 1104 | 2.84 |
| 16 | (Z)-β-farnesene | 1161 | 0.54 |
| 17 | Spatulenol | 1174 | 0.53 |
| 18 | Terpinen-4-ol | 1182 | 0.49 |
| 19 | β-pinene | 1206 | 0.48 |
| 20 | α-thujene | 1219 | 1.67 |
| 21 | Elemol | 1243 | 0.62 |
| 22 | α-terpinene | 1251 | 0.65 |
| 23 | γ-terpinene | 1284 | 0.47 |
| 24 | carvone | 1290 | 1.71 |
| 25 | Carvacrol | 1299 | 1.37 |
| 26 | Caryophyllene oxide | 1351 | 0.39 |
| 27 | α-Bisabolol | 1373 | 1.92 |
| 28 | sabinene | 1389 | 0.36 |
| 29 | isobornyl propanoate | 1400 | 0.35 |
| | Total | | 98.21 |

*؛ شاخص‌های بازداری (RI) با تزریق مخلوط هیدروکربن‌های آلکان نرمال ($C_8$-$C_{17}$) به ستون HP-5MS محاسبه شده است.

در این پژوهش، تاثیر اسانس گیاه درمنه ایرانی جمع‌آوری شده از یک رویشگاه طبیعی آن در استان کرمان، در مقایسه با تاثیر ضدقارچی متابولیت بورنئول و آنتی بیوتیک فلوکونازول بر رشد قارچ آسپرژیلوس نیجرمورد مطالعه قرارگرفت.

بررسی اثرات ضدقارچی اسانس گیاه درمنه ایرانی نشان داد که؛ کاربرد اسانس رقیق شده این گیاه با رقت‌های ۱، ۱/۲، ۱/٤ و ۱/۸ بر رشد قارچ آسپرژیلوس نیجر، قطرهاله بازدارندگی رشد به‌ترتیب ۲۸، ۲٦، ۱۹ و ۱۷ میلی‌متر ایجاد کرده است. همچنین آنتی بیوتیک فلوکونازول بر روی رشد قارچ آسپرژیلوس نیجر قطر هاله بازدارندگی رشد به اندازه ۲۰ میلی‌متر ایجاد کرده است. استفاده از بورنئول سنتزینیز با غلظت‌های ۱ و ۱۰ درصد در محیط رشد قارچ آسپرژیلوس قطرهاله بازدارندگی رشد به‌ترتیب ۱۵ و ۲٤ میلی‌متر ایجاد کرد (جدول ۲). نتایج بررسی اثرات ضدقارچی اسانس گیاه درمنه ایرانی نشان داد که اسانس این گیاه با رقت‌های ۱، ۱/۲ مانع رشد موثر قارچ آسپرژیلوس نیجر سوش (PTCC=5223) در مقایسه با فلوکونازولداشته است و همچنین کاربردبورنئول سنتزینیز با رقت ۱۰ درصد، قدرت مهارکنندگی قابل ملاحظه‌ای بر روی رشد قارچ آسپرژیلوسنیجر داشته است. اثرات ضد قارچی اسانس گیاه درمنه ایرانی مورد تحقیق می‌تواند به درصد بالای ترکیب‌های بورنئول و ۱و۸-سینئول مرتبط دانست. در اغلب موارد تاثیر اسانس‌های گیاهی بر ساختار دیواره سلولی و رشد آن تایید شده است (Naeini et al., 2011).




**شکل ۱:** کروماتوگرام حاصل از تزریق اسانس حاصلاز گیاهان درمنه ایرانی به روش تقطیر با آب توسط دستگاه کلونجر که به دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف‌سنج جرمی (GC/MS) تزریق شده است. پیک‌های دارای شماره ۱۲، ۷ و ۳ و ۱۱ در کروماتوگرام فوق که دارای بیشترین درصد ترکیات موثره بودند که مربوط به بورنئول، ۱و۸- سینئول و کامفور و کامفن هستند.

**جدول ۲:** مقایسه قطرهاله عدم رشد (mm) اسانس رقیق و بورنئول سنتزیعلیهرشد قارچ آسپرژیلوسنیجرکه جهت تکمیل این تحقیق از آنتی بیوتیک فلوکونازول نیز جهت مقایسه بهتر نتایج استفاده شده است.

| بورنئول سنتزی | | نسبت رقت اسانس درمنه | | | آنتی بیوتیک |
|---|---|---|---|---|---|
| ٪۱۰ | ٪۱ | ۱/۸ | ۱/٤ | ۱/۲ | ۱ | فلوکونازول |
| ۲٤ | ۱۵ | ۱۷ | ۱۹ | ۲٦ | ۲۸ | ۲۰ |

**بحث**

اسانس‌ها مخلوط پیچیده‌ای از ترکیبات فرار آلی هستند که شامل ٦٠ یا تعداد بیشتری ترکیب جداگانه می‌باشند. اسانس گیاهانی مانند درمنه، لیمو، دارچین، یاسمن و غیره دارای بیش از ۱۰۰ نوع ترکیب مختلف هستند (Saddi et al., 2007). ترکیبات فرار اصلی شامل مواد مختلفی مانند پنین، سینئول، لیمونن، بورنئول، بیسابولن، سانتالول، لینولول، بنزوئیکاسید، سیترال، کومینال، کتونها، کامفور، لاکتونها، برگاپتن، فنولاترها آنتول و استرهاگرانیلاستات هستند (de Sousa et al., 2011). همه این مواد به‌طور کلی در دو گروه ترپنوییدها و فنیل پروپانوییدها تقسیم می‌شوند (Andrade et al., 2011; Ben-Arye et al., 2011). همچنین در تقسیم بندی دیگر به دو دسته هیدروکربن‌ها و ترکیبات اکسیژنه نیز تقسیم می‌شوند (Machado et al., 2011). جدول ساختار شیمیایی اسانس‌ها با توجه به موقعیت جغرافیایی، محل رشد گیاه نوع خاک، آب و هوا، ارتفاع از سطح دریا و میزان آب موجود می‌تواند متفاوت باشد. حتی نوع فصل، نمونه برداری در مرحله پیش‌گلدهی (PF) یا پس از گلدهی (F) و ساعتی که در آن نمونه برداری انجام می‌شود، بر کمیت و ساختار بیوشیمیایی اسانس‌ها اثر گذار است. عامل مهم اثر گذار دیگر ساختار ژنتیکی گیاه است از این رو تمام عوامل مشتمل بر ژنتیکی یا محیطی بر بیوسنتز اسانس‌ها در یک گیاه خاص اثر می‌گذارد. به این صورت که یک گونه گیاهی در شرایط مختلف محیطی می‌تواند اسانس‌هایی با ترکیبات مؤثره مختلف با فعالیت دارویی گوناگون را تولید کند بنابراین می‌توان این گونه نتیجه گرفت که گوناگونی در رویشگاه، شرایط رشد و گونه گیاهی منجر به ایجاد تنوع در ترکیبات بیوشیمیایی متابولیت‌های ثانویه گیاهی می‌شود (Andrade et al., 2011).

نتایج بخش گاز کروماتوگرافی حاصل از این پژوهش نشان داد که از ۳۹ ترکیب شناسایی شده در اسانس استخراج شده از درمنه ایرانی با ۹۸/۲۱ درصد خلوص، بیشترین متابولیتهای موثره اسانس از نظر غلظت به ترتیب شامل بورنئول، ۱و۸- سینئول، کامفور و کامفن بودند (جدول ۱). بنابراین با توجه به میزان بورنئول (۳۲/۸۲ درصد) موجود در آن که از ترکیبات اصلی و قابل توجه اسانس گیاه درمنه ایرانی در این پژوهش محسوب می شود. همچنین فعالیت ضدقارچی آن نیز در مقایسه با تاثیر بورنئول سنتزی و آنتی بیوتیک فلوکونازول قابل رقابت و چشمگیر بود. به هرحال نتایج نشان داد که؛ کاربرد اسانس درمنه ایرانی با رقت‌های ۱، ۱/۲ در محیط رشد قارچ آسپرژیلوس نیجر سوش (PTCC=5223) در مقایسه با فلوکونازول اثر مهارکنندگی مناسبی داشته است (جدول ۲).

کمیت و کیفیت متابولیت‌های ثانویه موجود در اسانس درمنه ایرانی دراین پژوهش در مقایسه با سایر تحقیقات مشابه در زمینه انواع و گونه‌های مختلف درمنه دارای تفاوتها و شباهتهایی از لحاظکمی و کیفی میباشد که ناشی از تاثیر عوامل محیطی می‌باشد هر چند خواص ضد قارچی و ضد میکروبی نیز ثابت شده است (Mojtahed Zadeh Asl et al., 2018). به هرحال اسانس گیاه درمنه ایرانی در ایران و جهان مورد مطالعه، شناسایی و تحقیق قرار گرفته است. حکیمی میبدی و همکاران، فعالیت بیولوژیکی اسانس درمنه ایرانی را مطالعه کرده‌اند و گزارش دادند که ترکیب‌های موجود در اسانس این گیاه دارای فعالیت بیولوژیکی هستند و خاصیت میکروب کشی و قارچ‌کشی این گیاه را تأیید نموده‌اند (Hakimi Maybody et al., 2003).

در تحقیقی مشابه که توسط گنجعلی و پور رمضانی هراتی در منطقه فاریاب استان کرمان انجام گرفت، مشخص گردید که؛ اسانس درمنه کرمانی (*Artemisia kermanensis*) با ترکیبات عمده ۱و۸-سینئول، کامفور، آلفا-توجون، بورنئول و آلفا-ترپینئول دارای اثر ضدباکتریایی و ضدقارچی قابل توجهی است (Ganjali and Pourramadani Herati, 2012). نتیجه این مقاله در تایید اثر ضد قارچی اسانس گیاه درمنه ایرانی در این پژوهش به دلیل وجود ترکیباتی مانند بورنئول، ۱و۸- سینئول، کامفور و کامفن،قابل استفاده است (جدول ۱).همچنین در گیاهان دیگر مانند رزماری، آکلیل کوهی، میخک اثرات ضد قارچی اسانس آنها که حاوی بورنئول می باشد نیز مشاهده شده است ( Celiktas et al., 2007; Vesaltalab and Gholami, 2011). بنابراین نتایج حاصل از تحقیق حاضر نیز نشان داد که اسانس درمنه ایرانی حاصل از رویشگاه کرمانبا دارا بودن درصد بالای برخی ترکیبات ترپنوئیدی اکسیژنه مانند بورنئول، خواص ضد میکروبی مطلوبی ازخود نشان داده است،که داده‌هایارائه شده مربوط به مطالعه خاصیت ضدقارچی اسانس درمنه نیزاینموضوعراتایید می نماید (جداول ۲).

در تحقیقی دیگر، کاربرد اسانس اندام هوایی درمنه دشتی (*Artemisia sieberi*) حاصل از ارتفاعات شرقی کشور زیمباوه، جهت مطالعه فعالیت ضدقارچی آن در برابر ۱۰ گونه قارچ با استفاده از روش وزن خشک مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج به‌دست آمده نشان داد که اسانس درمنه فعالیت ضدقارچی قابل توجهی بر روی رشد قارچ‌های *Aspergillus ochraceus*، *Alternaria alternata*، *Geotrichum candidum*، *Aspergillus niger*، *Penicillium citrium* و *Aspergillus parasiticus* داشته است ( Gundidza, 1993).

آقاجانی و همکاران (۲۰۰۹) گزارش دادند که؛ از ۲۷ ترکیب موجود در اسانس *A. Kulbadica* با ۹۲/۹ درصد خلوص، متابولیت‌های سابینن، ترانس توجون و گاما کادینن اجزای اصلی اسانس بودند. تاثیر این اسانس بر بازدارندگی رشد اکثر سویه‌های باکتری و قارچ مورد آزمایش به اثبات رسید ( Aghajani et al., 2009).

در بررسی مشابه که توسط Perez و همکاران (۲۰۰۳) انجام گرفت، نیز مشخص گردید که؛ ترکیباتکامفور،سینئول و داوانوناز مهم‌ترین مواد موثره اسانس گیاه *Artemisia pedemontana* Balbis با اثر ضد قارچی است (Perez-Alonso et al., 2003)

بطور کلی ترکیبات اسانس استخراج شده از درمنه ایرانی و سایر گونه‌های این گیاه در تحقیقات مختلف دیگر و همچنین رویشگاه‌های متنوع به ویژه در ایران، نشان داده است که اسانس این گیاه شامل ترکیب زیادی است که در رویشگاه‌های مختلف از نظر کمی و کیفی با هم تفاوت دارند ( Pourramazani Harati and Ganjali, 2012). به‌عنوان مثال بیشترین بازده اسانس از گونه درمنه دشتی ۱/۰۲ درصدبه دست آمده است ( Sefidkon et al., 2003, Sefidkon et al., 2002) پس علی‌رغم تشابه کلی ترکیب اسانس درمنه ایرانی حاصل از رویشگاه کرمان با سایر گونه‌های درمنه و گیاهان دیگر، اما درصد بالای میزان متابولیت‌هایی مانند بورنئول در این پژوهش قابل توجه می‌باشد (جدول ۱).

در گزارش دیگر، اسانس اندام‌های هواییگونه‌های درمنه شامل *A. Annua* L.، *A. scoparia* waldst and kit.، *A. vulgaris* L.، *A. spicigera* C. Koch. و *A. absinthium* L. که در ایران به طور خودرو رشد کرده بودند مورد بررسی قرار گرفت. بیشترین بازده اسانس مربوط به گونه *A. absinthium* بود که ۰/۹۲ درصدبه دست آمد (Sadeghpour et al., 2004).

ترکیبات اسانس اندام‌های هوایی گونه‌های درمنه شامل *Artemisia spicigera* C. Koch و *A. scoparia* Kit. Waldst.et نیز مورد بررسی قرار گرفت. ترکیب کامفور به‌عنوان ترکیب اصلی تشکیل دهنده در هر دو اسانس مشخص شد (Demirci et al., 2005, Farzaneh et al., 2006).

همچنین از اسانس گونه‌های مختلف جنس درمنه برای فعالیت ضد میکروبی، دارویی و آنتی‌اکسیدانی آنها استفاده می‌شود. سه گونه از این جنس، گونه *A. scoparia*، *A. sieberi* و *A. aucheri* به‌طور گسترده‌ای در منطقه کویری ایران پراکنده شده است اما ترکیبات گونه ایرانی درمنه دارای تفاوت زیادی با سایر گونه‌های ایران است (Kazemi and Akhavani, 2009).

تحقیقات فوق الذکر نشان می‌دهند که نوع گونه درمنه و رویشگاه آن تاثیر بسزایی در کمیت و کیفیت اسانس حاصله دارند و بنابراین بر خاصیت ضد قارچی و ضد باکتریایی تاثیر گذارند و این مطلب درک می‌شود که می‌توان از اسانس یک گونه یا رویشگاه خاص درمنه جهت افزایش خواص ضدقارچی، میکروبی و یا دارویی استفاده نمود که فرضیه و هدف این پژوهش نیز بر همین اساس بنا نهاده شد که نتایج قابل توجهی بدست آمد. هر چند پژوهش‌هایی در جهت تایید تاثیر ضدقارچی اسانس درمنه ایرانی نیز وجود دارد (Siadat et al., 2017; Sadeghpour et al., 2004;).

به هرحال اثرات ضدقارچی اسانس گونه درمنه ایرانی در ایران و دیگر کشورها مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته است (Siadat et al., 2017; Sadeghpour et al., 2004).اما اثرات ضدقارچی اسانس درمنه ایرانیدر رویشگاه کرمان چندان مورد بررسی قرار نگرفته است. در مطالعه حاضر نتایج نشان داد؛ متابولیت ثانویه اصلی در برگ گیاه درمنه ایرانی مورد بررسی از رویشگاهی درحوالی کرمان، ترکیب بورنئول با ۳۲/۸۲ درصد می‌باشد. در این مطالعه علاوه بر ترکیب بورنئول، ترکیب‌های ۱و۸- سینئول، کامفور و کامفن از ترکیب‌های عمده بودند (شکل ۱ و جدول ۱). تغییرات شدید نوع و میزان ترکیب‌های موجود در اسانس درمنه ایرانی که در گزارش‌های یاد شده و گزارش حاضر مشهود است می‌تواند ناشی از تفاوت‌های اکولوژیک مانند طول و عرض جغرافیایی، ارتفاع، دما، رطوبت، اقلیم، خاک و حتی ژنتیکی بوده (Younsi et al., 2018) و شرایط متفاوت اقلیمی، مسیرهای متابولیکی و بیوسنتز مواد مؤثره را در درمنه ایرانی تحت تأثیر قرار داده و در نتیجه متابولیت های ثانویه متنوعی به خصوص ترکیب‌های ثانویه متنوعی از ترپن‌ها تحت شرایط محیطی متفاوت بیوسنتز می‌شود (Vesaltalab and Gholami, 2011; Kazemi and Akhavani, 2009).

نتایج بررسی اثرات ضد قارچی اسانس گیاه درمنه ایرانی حاصل از رویشگاه استان کرمانشان داد که اسانس این گیاه با رقت‌های ۱، ۱/۲ مانع رشد قارچ آسپرژیلوس نیجر سویه (PTCC=5223) در مقایسه با فلوکونازولداشته است. همچنین بورنئول سنتزی با رقت ۱۰ درصد قدرت مهارکنندگی قابل ملاحظه‌ای بر روی رشد قارچ آسپرژیلوس نیجر داشته است. نتایج این تحقیق با توجه به ترکیب‌هایبورنئول و ۱و۸-سینئول که اثرات ضد قارچی دارند و بیشترین مقدار را از نظر کمی در برگ گیاه درمنه ایرانی دارا می باشند، لذا با توجه به اثرات ضد قارچی اسانس برگ گیاه درمنه ایرانی در مقایسه با فلوکونازول، می توان از این اسانس به عنوان ترکیبی با اثرات ضد قارچی و با منشاء طبیعی جهت مبارزه با سوش قارچ آسپرژیلوس نیجر مورد مطالعه استفاده کرد. استفاده از حلال DMSO به تنهایی هیچ تاثیری بر روی رشد قارچ آسپرژیلوس نیجر مورد بررسی نداشته است.

بلکه تاثیرات رشد یا عدم رشد فقط مربوط به اسانس گیاه درمنه ایرانی می باشد (جدول ۲). با توجه به خواص ضد قارچی که در عصاره و اسانس درمنه ایرانی وجود دارد، می توان از این فرآورده‌ها به عنوان جایگزین طبیعی برای آنتی بیوتیک فلوکونازول نیز استفاده کرد.در مجموع نتایج این تحقیق نشان داد که تاثیر بازدارندگی اسانس درمنه ایرانی مشهود می‌باشد و کاربرد اسانس این گیاه علیه قارچ آسپرژیلوسنیجر دارای اثرهای بازدارندگی قابل توجه بوده و می‌توان در راستای بهینه سازی استفاده از اسانس‌ها در کنترل مؤثر پاتوژن‌های مواد غذایی به عنوان یک روش مکمل که در عین حال اثر نامطلوب کمتری بر خواص مواد غذایی داشته باشند، استفاده نمود.

به‌دلیل گستردگی پروفایل‌ها و اجزا روغن‌های ضروری و اسانس‌های گیاهی، خاصیت ضد میکروبی آنها وابسته به یک مکانیسم خاص نیست و بلکه راه‌ها و مکانیسم‌های متنوع درسطح مولکولی در این موضوع ایفای نقش می‌کنند (Lee et al., 2011). از این رو چنین برداشت می‌شود که راه‌های متنوعی در فعالیت ضدمیکروبی اسانس‌ها دخیل است. یکی از راههای ممکن، آسیب رساندن غیرقابل برگشت به غشای سلول باکتری است که باعث نشت مواد سیتوپلاسمی، یون‌ها و ایجاد کمبود سوبستراهای انرژی مانند گلوکز شود که در نهایت منجر به لیز شدن باکتری و مرگ آن می‌شود. یک راه احتمالی دیگر، مهار تولید آمیلازوپروتئاز است که باعث توقف تولید سم و جریان الکترون می‌شود که در این حالت سلول منعقد گشته و می‌میرد (Kamatou and Viljoen, 2010).

به‌هرحال فعالیت ضدقارچی اسانس‌ها مشابه فعالیت ضدباکتریایی آنهاست، اما دو عامل دیگر در مهار فعالیت میکروارگانیسم ها قابل بیان است که شامل تاثیر برطرف غشا پلاسمایی و دیگری مهار تولید انرژی سلولی مشابه آنچه در فعالیت‌های ضدباکتریایی رخ می‌دهد. حتی به کارگیری هم‌زمان چندین اسانس به‌صورت مخلوط، فعالیت ضدمیکروبی بهتری را نسبت به زمانی که تنها اسانس مورد استفاده قرار گیرد ارائه می‌دهد. دلیل این امر ممکن است به خاطر اثر سینرژیسمی این مواد باشد (Bakkali et al., 2008). البته در این قضیه استثنائاتی نیز وجود دارد که به دلیل حضور مواد بتاکاریوفیلن مشهورترین ترکیب ضدمیکروارگانیسمی موجود در بیشتر اسانس‌ها است که به تنهایی اثر خود را اعمال می‌کند. با توجه به پژوهش های علمی صورت گرفته می‌توان چنین بیان کرد که اسانس‌ها کاربردهای فراوانی در بهداشتی، صنایع دارویی و صنایع غذایی دارند. همچنین آنها فعالیت‌ها یبیولوژیکی، فارماکولوژیکی و پتانسیل درمانی ویژه‌ای دارند. برای نمونه اسانس‌ها در فعالیت‌های میکروبیت داخل ایجاد می‌کنند و در بسیاری از موارد سبب نابودی میکروب‌ها و قارچ‌ها می‌شوند، بدون اینکه اثرهای نامطلوبی برسلامت مصرف کننده بگذارند (Gende et al., 2010).

## نتیجه‌گیری نهایی

با توجه نتایج بدست آمده حاصل از این پژوهش و تطبیق با سایر پژوهش‌های مرتبط می‌توان بیان کرد که اثرات ضدقارچی اسانس گیاه درمنه ایرانی مورد آزمایش که حاصل جمع‌آوری از رویشگاهی در جنوب شهر کرمانبود، می‌تواند به درصد بالای ترکیب‌های بورنئول و ۱و۸-سینئول مرتبط دانست. به‌طوری‌که کاربرد بورنئول سنتزی نیز همین تاثیر را در محیط کشت قارچی از خود نشان داد. بنابراین با توجه به نتایج این تحقیق می‌توان بیان کردکه ممکن است بتوان از اسانس این گیاه به عنوان یک گیاه دارویی موثر با اثرات ضدقارچی قابل توجه استفاده

نمـود و شـاید اسـانس آن بتوانـد در صـنایع مختلـف غذایی، بهداشتی و دارویی مورد استفاده و توجه بیشتر قرار گیرد. لذا با توجه بـه اثـرات ضـدقارچی اسـانس سرشـاخه‌هـای گیـاه درمنـه ایرانیقبـل از گلـدهی در رویشگاه کرمان در مقایسه با آنتی‌بیوتیک فلوکونازول، می‌توان از ایـن اسـانس بـه‌عنـوان ترکیبـی بـا اثـرات ضدقارچی و با منشاء طبیعی جهـت مبـارزه بـا قـارچ آسپرژیلوس نیجر مورد مطالعه استفاده کـرد. پیشـنهاد می‌گردد از اسانس این گونه درمنه در منطقه مورد نظر در تکمیل تحقیقـات مشـابـه بر روی قارچ‌هـا یـا میکروب‌های دیگر استفاده گردد.

## سپاسگزاری

این مقاله بخشی از یک طرح پژوهشـی بـوده کـه قـرارداد آن بـه شـماره ۱/٦٨٩٥ مـورخ ۹۳/۱۲/۲۳ در پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشـرفته کرمان به ثبت رسیده است. نویسـندگان مقالـه مراتـب تشکر و قـدردانی خـود را از مسـئولین پژوهشـگاه و دانشگاه اعلام می‌دارند.

## References

1. Adams, R.P. 2001. Identification of essential oil components by gas chromatography mass spectroscopy. Illinois Allured Publication Corporation, 804 p.
2. Aghajani, Z. Kazemi, M. Dakhili, M. and Rustaiyan, A. 2009. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Artemisia kulbadica* from Iran. Natural product communications, 4(9):1261-1266.
3. Ahmad, I.Z. and Beg, A. 2002. Antimicrobial and phyto chemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi drug resistant Human pathogens. Journal of Ethnopharmacology, 74: 113-123.
4. Alves, M, Gonçalves, J.C., Cruz J.S. and Araújo D.A. 2010. Evaluation of the sesquiterpene alpha-bisabolol as a novel peripheral nervous blocker. Neuroscience Letters, 472(1):11-5.
5. Andrade, E.H.A., Alves, C.N., Guimarães, E.F., Carreira, L.M.M. and Maia, J.G.S. 2011. Variability in essential oil composition of *Piper dilatatum* LCRich. Biochemical Systematic Ecolology, 39(4):669-75.
6. Anwar, F., Ali, M., Hussain, A.I. and Shahid, M. 2009. Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) seeds from Pakistan. Flavour Fragr Journal, 24(4):170-6.
7. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. and Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils: a review. Food Chemistery Toxicology, 46(2): 446-75.
8. Bansod, S. and Rai, M. 2008. Antifungal activity of essential oils from Indian medicinal plants against human pathogenic *zspergillus fumigatus* and *Aspergillus niger*. World Journal Medical Science, 3(2):81-8.
9. Baron, E.J. and Finegold, S.M. 1995. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology, 8th ed. Mosby, St. Louis, MO, USA. 171-193.
10. Baser, K.H.C. and Buchbauer, G.2015. Hand book of essential oils: Science, Technology, and Applications. Boca Raton, FL: CRC Press. P: 123-129.
11. Ben-Arye, E., Dudai, N., Eini, A., Torem, M., Schiff, E. and Rakover, Y. 2011.Treatment of upper respiratory tract infections in primary care: arandomized study using aromatic herbs. Evid Based ComplementAlternat Medical, 690346.
12. Celiktas, Y.O., Kocabas, H.E., Bedir, E.F., Sukan, V.T. and Baser, K.H.C. 2007. Antimicrobial activities of methanol extractsand essential oils of *Rosmarinus officinalis*, Depending on location and seasonal variations. Journal Food Chemistry, 100: 553-559.
13. Cha, J.D., Jeong, M.R., Jeong, S.I., Moon, S.E., Kim, J.Y., Kil, B.S. and Song, Y.H. 2005. Chemical composition

and antimicrobial activity of the essential oils of *Artemisia scoparia* and *A. capillaris*. Planta Medica, 71(2): 186-190.

14. De Sousa D.P. 2011. Analgesic-like activity of essential oils constituents. Molecules, 16(3): 2233-52.
15. Demirci, B. Demirci F. and Baser K.H.C. 2005**.** Headspace-SPME and hydrodistillation of two fragrant *Artemisia* sp. Flavour and Fragrance Journal, 20: 395-398.
16. Farzaneh, M. Ahmadzadeh, M., Hadian, J. and Tehrani, A.S. 2006. Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of three species of *Artemisia* on some soil-borne phytopathogens. Communications in agricultural and applied biological sciences, 71(3): 1327-1333.
17. Ganjali, A., Pourramadani Herati, M. 2012. Antibacterial and antifungal effects of essential oil of *Artemisia*. Quarterly journal of plant science research, 7:32-39.
18. Gende, L., Maggi, M., Van Baren, C., Lira, A.D.L, Bandoni, A. and Fritz, R. 2010. Antimicrobial and miticide activities of *Eucalyptus globulus* essential oils obtained from different Argentine regions. Spanich Journal Agriculture Research, 8(3): 642-50.
19. Gharaman, A. 2007. Flora of Iran in natural colors. Forestry and Rangeland Research Institute, (1): 1-26.
20. Gundidza, M. 1993. Antifungal activity of essential oil from *Artemisia afra* Jacq. Central African Journal of Medicine, 39(7): 140-142.
21. Hakimi Maybody, M. H., Afkhami Aghdai, M., Mirjalili, F. 2003. An investigation into biological activities of A. persica's essential oil. Pajohesh sazandegi, (5):1-4.
22. Johnson, A.J. 2011. Cognitive facilitation following intentional odor exposure. Sensors (Basel), 11(5):69-88.
23. Kalemba, D., and Kunicka, A. 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Current Medical Chemistry, 10(10): 813-29.
24. Kamatou, G.P. and Viljoen, A.M. 2010. A review of the application and pharmacological properties of α-bisabolol and α-bisabolol-rich oils. Journal American Oil Chemistry Society, 87(1):1-7.
25. Kazemi, M. and Akhavani, S. 2009.Constituents of *Artemisia ournefortiana* Rchb. Essential oil from Iran. Journal ofApplied Chemical Researches, 3 (10): 71-75.
26. Khazaie F., Modarres M., Rahimikian F., Rahnama P., Bekhradi R. and Fallah Huseini H. 2013. The effect of lavender essential oil on anxiety of intra uterine device insertion. J. Med. Plants, 2(46):60-5.
27. Khosravi, A.R. Sharifzadeh, A., Nikaein, D., Almaie, Z. and Gandomi Nasrabadi, H. 2018. Chemical composition, antioxidant activity and antifungal effects of five Iranian essential oils against *Candida* strains isolated from urine samples. J Mycol Med. In press.
28. Klevenhusen, F., Zeitz, J., Duval, S., Kreuzer, M. and Soliva, C. 2011.Garlic oil and its principal component diallyl disulfide fail to mitigate methane, but improve digestibility in sheep. Animal Feed Science Technology, 166-167: 356-63. 29.
29. Kloucek, P., Smid, J., Frankova, A., Kokoska, L., Valterova, I. and Pavela, R. 2012. Fast screening method for assessment of antimicrobial activity of essential oils in vapor phase. Food Research Interest, 47(2):161-5.
30. Koba, K., Nenonene, A.Y., Raynaud, C., Chaumont, J.P. and Sanda, K. 2011. Antibacterial activities of the buds essential oil of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry from Togo. Journal Biology Active Production Naional, 1(1):42-51.
31. Kordali, S. Cakir, A. Mavi A. Kilic H. and Yildirim, A. 2005. Screening of chemical composition and antifungal and antioxidant activities of the essential oils from three Turkish *Artemisia* species. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(5):1408-1416.
32. Kordali, S. Kotan, R. Mavi A. Cakir, A. Ala A. and Yildirim, A. 2005. Determination of the chemical

composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculus* and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *A. dracunculus*, *Artemisia santonicum*, and *Artemisia spicigera* essential oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(24): 9452-9428.

33. Kumar, P., Mishra, S., Malik, A. and Satya, S. 2011. Insecticidal properties of *Mentha* species: a review. Industrial Crops Production, 34(1): 802-17.
34. Lee, Y.L., Wu, Y., Tsang, H.W., Leung, A.Y. and Cheung, W. 2011. A systematicreview on the anxiolytic effects of aromatherapy in people withanxiety symptoms. Journal Alternation Complementation Medical, 17(2): 101-8.
35. Mahboubi, M. and Farzin, N. 2009. Antimicrobial activity of *Artemisia sieberi* essential oil from central Iran. MicrobialJournal of Iran, 1(2): 43-48.
36. Mohammadpoor, S.K., Yari, M., Rustaiyan, A. and Masoudi Sh. 2002. Chemical constituents of the essential oil of *Artemisia aucheri* Boiss. a species endemic to Iran. Journal of Essential Oil Research, 14(2): 122-123.
37. Mojarrab, M., Delazar, A., Esnaashari, S. and Afshar, F.H. 2013. Chemical composition and general toxicity of essential oils extracted from the aerial parts of *Artemisia armeniaca* Lam. and *A. incana* (L.) Druce growing in Iran. Research in Pharmacology Sciences, 8(1): 65-9.
38. Mojtahed Zadeh, A.R. 2018. Study of two-stage ohmic hydro-extraction of essential oil from *Artemisia aucheri* Boiss. Antioxidant and antimicrobial characteristics. Food Research International, 107: 462-469.
39. Naeini, A., Naseri, M., Kamalinejad, M., Khoshzaban, F., Rajabian, T. and Nami, H. 2011. Study on anti *Candida* effects of essential oil and extracts of Iranian medicinal plants, In vitro. Journal of mecinial plans, 2(38):163-172.
40. Perez-Alonso, M.J., Velasco-Negueruela, A., Pala-Paul, J. and Sanz, J. 2003. Variations in the essential oil composition of *Artemisia pedemontana* gathered in Spain: chemotype camphor-1,8-cineole and chemotype davanone. Biochemical Systematics and Ecology, 31(1): 77–84.
41. Pourramazani Harati, M. and Ganjali, A. 2012. Antimicrobial effect of essential oil of *Artemisia kermanensis* on water by HPLC method. Journal Research in Pharmaceutical sciences, 7(5): s849.
42. Rabie, M., Asri, Y., Hamzehee, B., Jalili, A. and Sefidkon F. 2012. Determination of chemotaxonomic indices of *Artemisia sieberi* besser based on environmental parameters in Iran. Iranian Journal of Botany, 18(1):149-57.
43. Ramak, P. and Sefidkon, F. 2008. Investigating the quality and quantity of essential oil of *Artemisia persica* Boiss. In field and provenance. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 24(2): 189-197.
44. Ramezani, M., Behravan, J. and Yazdinezhad, A. 2004. Chemical-composition and antimicrobial activity of the volatile oil of *Artemisia khorassanica* from Iran. Pharmaceutical Biology, 32(8): 599-602.
45. Rasooli, I., Rezaee, M.B., Moosavi, M.L. and Jaimand, K. 2003. Microbial sensitivity and chemical properties of the essential oil of *Artemisia annua.* Journal of Essential Oil Research, 15: 59-62.
46. Rex, J.H., Alexander, B.D., Andes, D., Brown, S.D. and Sheehan, D.J. 2008. Reference method for broth dilute on antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved standard. Third Edition. InClinical and Laboratory Standard Institute (CLSI), 6-25.
47. Rezayan A. and Ehsani A. 2015. Evaluation of the chemical compounds and antibacterial properties of the aerial parts of Persian *Heracleum persicum* essence. Journal Babol University Medical Science, 17(6): 26-32.
48. Rustaiyan, A. and Faridchehr, A. 2014. A review on constituents and biological activities of further Iranian *Artemisia* species. International Journal Pharm Biology Chemsitry Science, 3(3): 6-14.

49. Saddi, M., Sanna, A., Cottiglia, F., Chisu, L., Casu, L. and Bonsignore, L. 2007. Antiherpevirus activity of *Artemisia arborescens* essential oiland inhibition of lateral diffusion in Vero cells. Annual Clinical Microbiology Antimicrobes, 6: 10-11.
50. Sadeghpour, O., Asghari, G. and Shams, M.R. 2004. Composition of essential oil of *Artemisia persica* Boiss. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 3(1): 65-67.
51. Sardashti, A.R. and Pourramazani Harati, M. 2012. Chemical composition of the essential oil of *Artemisia kermanensis* fromTaftan aera by GC/MS technique. Journal ofAgriculture and Crop Sciences, 4(9): 561-563.
52. Sefidkon, F., Jalili A. and Mirhaji T. 2002. Essential oil composition of three *Artemisia* spp. from Iran. Flavour and fragrance Journal, 17(2): 150-152.
53. Sefidkon, F., Jalili, A., Rabie, M., Hamzehee, M. and Asri, Y. 2003. Chemical composition of the essential oil of five *Artemisia* species from Iran. Jornal of Essential Oil Bearing Plants 6(1): 41-45.
54. Sefidkon, F., Tayefeh, H.E., Fakhari, F. and Teimouri, M. 2013. Essential oil composition and antimicrobial activities of oil and alcoholic extract of *Artemisia Spicigera C. Koch* from Mazandaran province. Eco-phytochem Jornal of Medicinal Plants, 1(2): 1-13.
55. Shibamoto, K., Mochizuki, M. and Kusuhara, M. 2010. Aroma therapy in antiaging medicine. Anti-Aging Medical, 7(6):55-9.
56. Siadat, S. and Direkvand-Moghadam, F. 2017. Study of phytochemical characteristics *Artemisia persica* Boiss. in Ilam Province.Advanced Herbal Medicine, 3(3): 31-38.
57. Singh, R., Shushni, M.A. and Belkheir, A. 2015. Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita* L. Arab Journal Chemistry, 8(3): 322-8.
58. van Vuuren, S.F., Suliman, S. and Viljoen, A.M. 2009. The antimicrobial activity of four commercial essential oils in combination with conventional antimicrobials. Letters Appllied Microbiology, 48(4): 440-6.
59. Vesaltalab, Z. and Gholami, M. 2011. The effect of clove buds and rosemary extracts and essences on control of *Botrytis cinerea.*Growthplant production technology, 11(2): 1-10.
60. Younsi, F., Rahali, N., Mehdi, S., Boussaid, M., Messaoud, C. 2018. Relationship between chemotypic and genetic diversity of natural populations of *Artemisia herba-alba* Asso growing wild in Tunisia. Phytochemistry, 148: 48-56.