مطالعات علوم زیستی و زیست فناوری
دوره ۷، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۰
صفحات ۲۶- ۱

Online ISSN: ٤٤٩٣-٢٤٧٦
Print ISSN: ٢٠٢٠-٢٥٣٨
www.irijournals.com

بررسی اثر مهاری عصاره‌ی آبی اتانولی و متانولی گیاه خارخاسک Tribulus terrestris بر رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس

عیسی غلامپور عزیزی[۱]، فاطمه احمدی[۲]، مصطفی کلانتری[۳]

[۱] استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل

[۲] فارغ‌التحصیل دکتری دامپزشکی دانشگاه آزاد بابل

[۳] دانشجو دکتری دامپزشکی دانشگاه آزاد بابل

چکیده

آسپرزیلوس فلاووس طیف وسیعی از بیماری‌ها را در انسان ایجاد می‌کند، از واکنش‌های حساسیت بالا گرفته تا عفونت‌های تهاجمی. راه اصلی عفونت، استنشاق اسپورهای قارچی است. امروزه مصرف بیش‌ازحد داروهای ضد قارچی احتمال مسمومیت دارویی یا مقاومت دارویی را سبب شده است. استفاده از اسانس و عصاره‌های گیاهان دارویی به دلیل داشتن خواص دارویی، ضدقارچی، ضد باکتریایی و آنتی‌اکسیدانی در صنایع دارویی، غذایی و خوراک دام رو به پیشرفت است. خارخاسک دارای خواص متعددی از جمله خاصیت ضد میکروبی و ضد باکتریایی، پاکسازی رادیکال‌های آزاد و مهار پراکسیداسیون چربی است و از طریق مکانیسم‌های مختلف سلولی و مولکولی موجب خواص مختلف فارماکولوژیک و درمانی می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی اثر مهاری عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی گیاه خارخاسک بر رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس با روش‌های دیسک، چاهک، حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی قارچ (MFC) می‌باشد. در روش دیسک و چاهک هیچ‌گونه هاله عدم رشدی مشاهده نشد. میانگین مقدار عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی در روش MIC به ترتیب برابر با ۵۰۰۰۰، ۶۲۵۰ و ۶۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و در روش MFC به ترتیب برابر با صفر، ۱۲۵۰۰ و ۱۲۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. در روش‌های MIC و MFC تفاوت معناداری بین گروه‌های مختلف آبی و الکلی وجود دارد و عصاره‌های الکلی نتایج بهتری را نشان داده‌اند ($P<0.05$). بر اساس یافته‌های مطالعه حاضر عصاره‌های الکلی گیاه خارخاسک در شرایط آزمایشگاهی اثرات ضدقارچی مطلوبی در برابر آسپرزیلوس فلاووس نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: گیاه خارخاسک، گیاهان دارویی، آسپرژیلوس فلاووس، فعالیت ضد قارچ

مقدمه

قارچها در همه جا حضور داشته و نسبت به عوامل میکروبی دیگر در طبیعت فراوان ترند، در هر جا که غذا وجود داشته باشد، قارچها به راحتی بر روی آن کلونیزه شده و از مواد آلی موجود استفاده می کنند. حضور و رشد قارچها از چند جهت حائز اهمیت می باشد؛ اولاً برخی قارچها تولید آنزیم ها و مواد مفیدی می نمایند که می توانند ارزش غذایی را افزایش دهند، ثانیاً ممکن است متابولیت های غیر توکسیکی آزاد نمایند که موجب فساد آن ماده غذایی گردند، ثالثا برخی قارچها مواد سمی به نام مایکوتوکسین تولید می نمایند که در صورت استفاده از آن در خوراک، سلامتی انسان و دام را به مخاطره می اندازد. مایکوتوکسین ها دارای دامنه وسیعی از اثرات بیولوژیک و توکسیکولوژیک هستند که برای انسان و برخی از گونه های حیوانات زیان بار است (Rippon, 1988).

امروزه این را میدانیم که مصرف دارو های ضد قارچ احتمال مسمومیت دارویی یا مقاومت دارویی را سبب شده است و همچنین استفاده از عصاره‌های گیاهی جهت حفظ مواد غذایی در برابر فساد توسط عوامل بیماری زا از جمله عوامل قارچی، موردتوجه قرارگرفته است، استفاده از اسانس وعصاره‌های گیاهان دارویی به دلیل داشتن خواص دارویی، ضدقارچی، ضد باکتریایی و آنتی‌اکسیدانی در صنایع دارویی، غذایی و خوراک دام رو به پیشرفت است (Akbar Gorran et al., 2015). همچنین استفاده از گیاه درمانی در بیماری‌های عفونی به صورت عمومی و سیستمیک افزایش یافته است (طالبی و همکاران، ۱۳۹۹). با توجه به این که گیاهان دارویی دارای عوارض و هزینه کمتری می باشند می توانند یکی از منابع داروهای ضد قارچی و ضد میکروبی باشند.

متابولیک های ثانویه گیاهان دارویی مانند عصاره‌های گیاهی ازنظر اثرات ضد میکروبی شان مورد بررسی قرارگرفته اند و مشخص شده است که اغلب عصاره‌های گیاهی استخراج شده از گیاهان دارویی دارای خواص ضد قارچی، ضد انگل، ضد باکتری و ضد ویروس می باشند.

گیاهان منبع دارویی هستند. گیاهان طیف گسترده ای از مواد فعال زیستی که در قسمت های آن مانند برگ ها، ساقه، پوست ریشه، دانه و گل است را سنتز می‌کند. که در مکانیسم دفاعی گیاهان نقش دارند در برابر میکروارگانیسم ها، حشرات و گیاهخواران از آنها محافظت می‌کند. مولکول های فعال زیستی در گیاهان بومی سازی می شوند: آلکالوئیدها، ساپونین ها، تانن ها فلاوینوئیدها، گلیکوزیدهای قلبی، استروئیدها، ترپنوئیدها، ترکیبات فنلی و بسیاری دیگر که برخی از این مواد اثر آنتی میکروبیال بر روی انواع پاتوژن ها را دارا می‌باشد (حبیبی نجفی و همکاران، ۱۳۹۸).

خارخاسک (*Tribulus terrestris*) گیاهی یکساله بوده که در مناطق گرم و مرطوب، در نواحی مدیترانه و نواحی گرم اروپا، آسیا، آفریقا و استرالیا پراکنده است. این گیاه دارای فواید مختلفی بوده و در طب سنتی برای درمان انواع بیماری‌ها از جمله دفع سنگ کلیه، کاهش فشار خون، خواص ضد دیابتی، درمان بیماری‌های دستگاه قلبی- عروقی، اختلالات معدی- روده‌ای، تقویت عملکرد جنسی در مردان و درمان بیماری‌های کبدی توصیه می‌شود. خارخاسک دارای خواص متعددی از جمله خاصیت ضد میکروبی و ضد باکتریایی، پاکسازی رادیکال‌های آزاد و مهار پراکسیداسیون چربی است و از طریق مکانیسم‌های مختلف سلولی و مولکولی موجب خواص مختلف فارماکولوژیک و درمانی می‌شود. از جمله مهم‌ترین خواص درمانی این گیاه خواص ضد التهابی و ضد سرطانی است. همچنین مطالعات متعدد بالینی نشان دادند که مصرف توأم عصاره خارخاسک با داروهای شیمی درمانی موجب کاهش عوارض جانبی داروها می‌شود. با توجه فقدان سمیت و خواص متنوع خارخاسک، مصرف

ترکیبات این گیاه به عنوان مکمل دارویی در رژیم های درمانی جهت بیماری‌های مختلف مورد توجه قرار گرفته است (Wink et al., 2018).

آسپرژیلوس فلاووس گونه بیماری زا از خانواده آسپرژیلوس هاست که در اقلیم‌های متنوع آب و هوایی در سرتاسر جهان یافت می‌شود. آسپرژیلوس را نخستین بار یک کشیش و زیست‌شناس ایتالیایی به نام پی‌یر انتونیو می‌چلی کشف کرد. او با دیدن این قارچ در زیر ریزبین بخاطر شباهت آن با آب افشانی که در مراسم مذهبی آسپرژیلیوم خوانده می‌شد نام آسپرژیلوس برای این گونه برگزید. آسپرژیلوس از قارچه های رشته ای با انتشار بسیار وسیع در طبیعت است. آسپرژیلوس تولید مثل غیرجنسی دارد و اینکار را با ساخت هاگ انجام می‌دهد و این ویژگی در میان همه اعضای این گونه مشترک است (bennett et al., 1992). آسپرژیلوس فلاووس با تولید آفلاتوکسین ها که ترکیبات سمی از دسته مایکوتوکسین ها هستند روی مواد غذایی و محصولات کشاورزی، باعث بروز مسمومیت های حاد و مزمن، سمیت عصبی، سرکوب سیستم ایمنی بدن، ناقص الخلقه زایی، جهش زایی و سرطان زایی می شوند (Razzaghi et al., 2008). آسپرژیلوس فلاووس منجر به ایجاد آسم و التهاب دستگاه تنفسی از طریق استنشاق هاگ های این قارچ می شود. اخیراً آسپرژیلوس فلاووس به عنوان عامل اصلی کراتیت مایکوتیک ، عفونت قارچی قرنیه شناخته شده است (Tilak et al., 2010).

ضرورت خاص انجام تحقیق

کنترل بیماری‌ها با عصاره‌های گیاهی مورد توجه پژوهشگران است. این ترکیبات پیوسته به عنوان موادی غیرقابل جایگزین مورد استفاده بوده وخواهد بود. ازآن جا که گیاهان دارویی درکشورما فراوان می روید، مطالعه و شناسایی اثرات دارویی آنها با بررسی ترکیبات موثره این گیاهان می تواند گام مثبتی در استفاده بهینه از این ثروت ملی با ارزش باشد. از آن جا که خارخاسک خواص ضد قارچی نسبتا مناسبی علیه برخی قارچهای مورد مطالعه داشته، ولی تا به حال اثر گذاری این گیاه بر روی قارچ آسپرژیلوس فلاووس مورد بررسی قرار نگرفته است، شایسته است اثرات این گیاه بر روی قارچ مذکور بررسی گردد.

مواد و روش

مراحل عصاره‌گیری

ابتدا گیاه خارخاسک را جمع آوری کرده و آن را پس از تمیز کردن در سایه خشک نمودیم. سپس گیاه خشک شده را خوب آسیاب نموده و به روش سوکسله با استفاده از حلال های آب، اتانول و متانول عمل عصاره گیری انجام شد. برای این کار از پودرهای تهیه شده از گیاه هر یک به طور جداگانه به روش سوکسله با استفاده از آب، اتانول ۸۰٪ و متانول ۸۰ ٪ عصاره تهیه شد و در مرحله بعد حلال حذف شده و سپس خشک شده و وزن عصاره خشک اندازه‌گیری شد.

عصاره گیری با کمک دستگاه سوکسله

ابتدا گیاه خارخاسک را تهیه کرده و بعد خوب آسیاب شده و سپس به روش سوکسله با استفاده از حلال آب، اتانول و متانول عصاره گیری انجام شده و با حذف حلال به کمک فور عصاره خشک گردید. دستگاه سوکسله از جنس شیشه در اندازه های مختلف برای عصاره گیری مقادیر متفاوت گیاه ساخته شده است. دستگاه سوکسله از چهار قسمت: منبع گرمایی، بالن، دستگاه سوکسله و مبرد تشکیل می شود (شکل ۳-۱).

استخراج با متانول و اتانول

به این منظور ۱۰۰۰ گرم پودر نمونه طی سه مرحله متوالی با مجموع ۲۰۰ میلی لیتر (بترتیب ۷۰ ، ۷۰ و ۶۰ میلی لیتر) متانول و اتانول استخراج گردید. در دو مرحله اول که در مجموع دو ساعت به طول انجامید از شکر استفاده شد و در مرحله سوم، تفاله باقی مانده از دو مرحله قبل ۲۲ ساعت در دمای محیط و بدون استفاده از شکر در معرض متانول و اتانول قرار داده شد. عصاره به دست آمده از هر مرحله پس از صاف کردن به عصاره مراحل بعد اضافه شد. برای رنگبری به کل عصاره به دست آمده کربن فعال (نسبت ماده مورد استخراج به کربن فعال: پنج به سه) اضافه و سپس با استفاده از قیف بوخنر و کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف شد. بخش اعظم متانول با استفاده از دستگاه تبخیرکننده گردان حذف گردید. عصاره تغلیظ شده در سطح پلیت های شیشه ای به صورت ورقه نازک پخش و سپس به آون تحت خلا (۴۰ C) منتقل گردید. عصاره تا رسیدن به وزن ثابت درون فور خشک و سپس بازده استخراج محاسبه شد (مقدار گیاه / مقدار عصاره به دست آمده × ۱۰۰ = بازده استخراج) پودر به دست آمده تا زمان انجام آزمایش های بعدی در یخچال (۴ C) نگهداری شد.

روش آبی

به این منظور چهار گرم نمونه خشک در یک ارلن با ۴۰ سی سی آب جوش مخلوط و به یک اتوکلاو جوش منتقل شد. از زمان رسیدن دما به ۱۰۵ درجه سلسیوس نمونه ها به مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو نگهداری شدند. سپس نمونه ها خارج و عصاره آنها جداسازی شد. تفاله باقی مانده با ۶۰ سی سی آب جوش مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۳۰ درجه سلسیوس در اتوکلاو نگهداری شد. عصاره به دست آمده با عصاره قبلی مخلوط و پس از رنگبری با کربن فعال (نسبت ماده مورد استخراج به کربن فعال: ۵ به ۳) به صورت لایه ای نازک روی پلیت شیشه ای پخش و در دمای ۴۰ درجه سلسیوس تا رسیدن به وزن ثابت خشک گردید.

روش تهیه محیط کشت

آماده سازی محیط کشت سابورو دکستروز براث

برای این کار ابتدا از روی دستور کار روی بروشور به مقدار نیاز از پودر محیط کشت را وزن نموده و در ادامه به همان مقدار بر اساس نیاز از حجمی از آب مقطر که می خواهیم به آن اضافه می نماییم. سپس طبق دستور کار آماده سازی روی بروشور محیط را اماده نموده و اگر نیاز به اتوکلاو باشد آن را استریل می نماییم.

آماده سازی محیط کشت سابورو دکستروز آگار

براساس میزان دستور کار روی بروشور یا ظرف به هر مقدار از محیط کشت که نیاز باشد از پودر مورد نظر وزن نموده و در ادامه به همان حجم از آب مقطر که برروی دستور کار گزارش شده است محیط را آماده می کنیم و پس از آماده نمودن محیط کشت آن را در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد و زمان ۱۵ دقیقه قرار داده. در ادامه بعد از استریل نمودن از اتوکلاو خارج نموده و وقتی به دمای ۴۵-۴۰ درجه رسید به مقدار لازم در داخل پلیت های استریل خالی نموده و برای تست های مورد نظر از آن استفاده می کنیم.

آماده سازی عصاره

از عصاره‌هایی که از گیاه تهیه نمودیم برای تهیه غلظت مناسب از آن ها برای عصاره متانولی و اتانولی از حلال (رقیق کننده) DMSO (دی متیل سولفوکساید) استفاده می کنیم به این طریق که یک گرم از عصاره را وزن نموده و با CC ۴ از DMSO حل می کنیم. این کار در داخل لوله تمیز استریل انجام می شود. برای عصاره آبی به جای حلال DMSO از آب مقطر استریل استفاده می کنیم. یعنی یک گرم از عصاره آبی را با ۴ گرم آب مقطر استریل حل می کنیم. در نتیجه عصاره ما برای متانولی و اتانولی و ابی با غلظت ۱/۵ آماده می شود (شمس قهفرخی و همکاران، ۱۳۸۵).

تهیه قارچ و آماده سازی سوسپانسیون اسپور

در این مطالعه قارچ آسپرژیلوس فلاووس از بخش قارچ شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل تهیه گردید. از قارچ‌های کشت داده شده در آزمایشگاه به عنوان ذخیره قارچی استفاده گردید و بر روی محیط سابورودکستروز آگار به مدت ۷ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد کشت داده شد و پلیت ها بعد از ۷ روز در دمای ۴ درجه سانتی گراد برای مطالعه بیشتر نگهداری شدند. آمپول لیوفیلیزه حاوی پودر را با پنبه الکل ۷۰ ٪ تمیز کرده و در محیط استریل درب آن را با کاتر برمی داریم و پودر داخل آن را همراه با آب مقطر استریل یا سرم فیزیولوژی استریل مخلوط می کنیم سپس به آن Tween 80 اضافه می کنیم تا میسلیوم ها از اسپورها جدا گردد؛ سپس ۱۰۰۰ میکرولیتر را درون لوله اسپکتوفوتومتر ریخته و Transmitance آن را از ۱۰۰ به ۹۰ تقلیل می دهیم که میزان اسپور spor/ml 1×10^{6} می شود که میزان مورد نیاز ما از سوسپانسیون حاوی اسپور 1×10^{4} برای هر لوله می‌باشد که تناسب ببندیم ۱۰ میکرولیتر برای هر لوله می شود. سپس در محیط سابرودکستروز براث می ریزیم.

روش رقت‌سازی در محیط مایع

روش کار به این صورت است که در ۱۱ لوله آزمایش که حاوی cc ۱ محیط مایع مثل سابورودکستروز براث هستند، رقت‌های ۱/۲ برابر از عصاره مورد نظر را می‌سازیم به این صورت که به لوله اول cc ۱ از محلول عصاره که دارای مقدار ثابت و مشخصی از مادهٔ موثره می‌باشد وارد نموده و در مراحل بعدی در تمام لوله‌ها غیر از لوله آخر رقت‌های ۱/۲ از آن تهیه می شود. تنها لوله آخر را فاقد عصاره و به عنوان شاهد برای رشد قارچ نگه می‌داریم. در نهایت تمام لوله‌ها مقدار ثابت و معین از مادهٔ شیمیائی در حجم معین از محیط کشت می‌باشد در مرحله بعد، به تمام لوله‌ها مقدار λ ۱۰ از سوسپانسیون قارچی که در هر cc خود واجد 1×10^{4} قارچ می‌باشد، اضافه می‌نماییم.

پس از انکوباسیون در دمای۳۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد کمترین غلظت یا به عبارت دیگر در بیشترین رقتی که کدورتی در آن مشاهده نشد، آن لوله به عنوان MIC در نظر گرفته می‌شود یا به عبارتی مقدار مادهٔ شیمیائی موجود در آن حداقل مقداری می‌باشد که مانع از رشد میکروارگانیزم وارد شده به محیط می‌باشد. معمولا این لوله کدورتی برابر با ۲۰٪ کدورت نمونه شاهد را دارا می‌باشد یا بعبارتی دیگر کدورت آن ۸۰٪ کمتر از کدورت لوله شاهد می‌باشد.

حال برای تعیین MFC باید λ ۱۰ (که واجد 1×10^{4} قارچ می‌باشد) از لوله MIC و سایر لوله‌های فاقد کدورت در محیط آگار کشت داده، سپس در دمای۳۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه می شود.

پس از گذشت زمان لازم، در پلیت‌ها CFU را تعیین می‌کنیم. به این ترتیب که کلونی‌ها را شمرده و در عکس ضریب رقت ضرب می‌نماییم. به این ترتیب تعداد میکروب‌ها یا قارچ‌ها در پلیت ها به دست می‌آید. کمترین غلظتی را که تعداد میکروب ها یا قارچ‌ها از یک هزارم تعداد اولیه کمتر شده باشد، به عنوان MFC در نظر می‌گیریم.

فاکتور قابل توجه در این تست مقدار میکروارگانیزم وارد شده به لوله‌ها می‌باشد. جهت اینکار می‌توان به روشهای مختلفی سوسپانسیون میکروبی تهیه نمود که دارای مقدار معینی از میکروارگانیزم موردنظر باشد که در مطالعه حاضر از روش ترنسمیتنس استفاده شده است.

ارزیابی فعالیت ضد قارچی در شرایط آزمایشگاهی

بررسی اثر ضد قارچی عصاره‌های آبی و الکلی گیاه خارخاسک با استفاده از روش دیسک

محیط کشت سابورودکستروز آگار تهیه و مقدار ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت آماده شده در داخل هر پلیت (هشت سانتی متری) استریل ریخته شد. پس از انعقاد محیط کشت، ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون قارچی در شرایط سترون در سطح آگار با کمک پیپت پاستور پخش گردید. سپس مقادیر ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ میکرولیتر از عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی را به طور جداگانه در دیسک های استاندارد وارد نموده، آن ها را در فور ۴۵ درجه سانتی گراد قرار داده تا رطوبت اضافی آن خشک شده، بتوان از آن ها استفاده نمود. در مرحله بعد، این دیسک ها را به فواصل مشخص و معینی از همدیگر در سطح محیط کشت قرار داده و در دمای ۳۰-۲۵ درجه سانتی گراد به مدت چند روز انکوبه نموده، بعد از مدت انکوباسیون، ایجاد یا عدم ایجاد هاله ممانعت از رشد قارچ در اطراف دیسک ها بررسی شدند. اندازه گیری قطر هاله مهاری قارچ‌های مورد آزمایش در تیمار های مختلف، به صورت دو قطر عمود بر هم هاله روی پلیت با خط کش اندازه گیری گردید و بر حسب میلی متر ثبت شد.

بررسی اثر ضد قارچی عصاره‌های آبی و الکلی گیاه خارخاسک با استفاده از روش چاهک

محیط کشت سابورودکستروز آگار تهیه و مقدار ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت آماده شده در داخل هر پلیت (هشت سانتی متری) استریل ریخته شد. پس از انعقاد محیط کشت، چاهک هائی ایجاد نموده و ۷۰، ۸۰، ۹۰، ۱۰۰ و ۱۱۰ میکرولیتر از عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی را وارد نموده، بعد از وارد نمودن عصاره به چاهک به مدت چند ساعت صبر نموده تا عصاره به طور کامل در محیط کشت نفوذ کند. سپس نمونه قارچ را کشت داده در دمای ۳۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت چند روز انکوبه نموده و بعد از انکوباسیون، ایجاد یا عدم ایجاد هاله ممانعت از رشد قارچ در اطراف چاهک بررسی شد. اندازه گیری قطر هاله مهاری قارچ‌های مورد آزمایش در تیمار های مختلف، به صورت دو قطر عمود بر هم هاله روی پلیت با خط کش اندازه گیری گردید و بر حسب میلی متر ثبت شد. در ضمن یک چاهک به عنوان کنترل مثبت حاوی حجم ۲۰ میکرولیتر از داروی فلوکونازول در نظر گرفته می شود.

تعیین حداقل غلظت مهار رشدی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MFC) عصاره گیاه خارخاسک علیه قارچ آسپرژیلوس فلاووس

با توجه به روش رقت سازی در محیط مایع مقدار مادهٔ مؤثر در لوله اوّل ۵×۱۰^{۴} میکروگرم بر میلی‌لیتر بوده با تهیه رقت‌های ۱/۲ از آن در لوله‌های بعدی بدین صورت که با یک سر سمپلر استریل دیگر ۱۰۰۰ میکرولیتر از لوله اوّل گرفته به لوله دوم

وارد کردیم، تیتر یا مقدار ماده مؤثره در لوله دوم به $۲۵×۱۰^{۳}$ میکروگرم بر میلی‌لیتر خواهد رسید. به همین طریق بر اساس

جدول ۱- روش انجام کار MIC

شماره لوله	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱
محیط S.D.B	۱ CC	۱ CC	۱ CC	CC ۱	CC ۱	۱ CC	۱ CC	۱ CC	۱ CC	۱ CC	CC ۱
رقت عصاره	۱/۲	۱/۴	۱/۸	۱/۱۶	۱/۳۲	۱/۶۴	۱/۱۲۸	۱/۲۵۶	۱/۵۱۲	۱/۱۰۲۴	-
سوسپانسیون قارچی	۱۰ λ	۱۰ λ	۱۰ λ	۱۰ λ	۱۰ λ	۱۰ λ	۱۰ λ	۱۰ λ	۱۰ λ	۱۰ λ	۱۰ λ

تمام لوله ها را در انکوباتور۳۰-۲۵ درجه سانتی گراد به مدت تقریبا ۷۲ ساعت قرار می دهیم و بعد از این مدت کدورت لوله ها را با لوله شماره یازده که بعنوان لوله شاهد می‌باشد می سنجیم و جواب لوله ها را گزارش می دهیم .

تیتر یا مقدارماده موثر µg/ml	$۵×۱۰^{۴}$	$۲۵×۱۰^{۳}$	$۱۲۵×۱۰^{۲}$	۶۲۵۰	۳۱۲۵	۱۵۶۲/۵	۷۸۱/۲۵	۳۹۰/۶۲	۱۹۵/۳۱	۹۷/۶۵	۰

جدول زیر در لوله‌های مختلف، مقدار معینی از مواد مؤثره را خواهیم داشت (جدول ۱).

در تهیه سریال‌های مربوطه بایستی توجه داشت که بعد از این که یک سی سی از محتویات لوله نهم به لوله دهم وارد شده یک سی سی از محتویات لوله دهم را دور ریخته، به لوله یازدهم عصاره‌ای وارد نمی‌شود و به عنوان شاهد رشد می‌باشد. در ادامه کار بایستی به لوله‌های آماده شده که محتوی مقادیر ثابت و معین مادهٔ مؤثره هستند، تعداد ثابتی به مقدار ۱۰ میکرولیتر از اسپور قارچ تحت آزمایش را به لوله‌ها وارد نمائیم.

جهت تهیه سوسپانسیون قارچی مربوطه بر اساس آنچه گفته شده می توان به طرق مختلفی عمل کرد در این تحقیق ابتدا در شرایط کاملاً استریل از کلنی خالص سوسپانسیون قارچی تهیه نموده، برای چند ساعتی در انکوباسیون مناسب رشد قرار داده، شروع به رشد نموده از اسپور جدا شده نمونه گرفته بعد از آن، با دستگاه اسپکتوفتومتر شفافیت سوسپانسیون مربوطه را با طول موج ۵۲۰ نانومتر اندازه‌گیری نموده با رساندن آن به ۹۰ درصد، نشانه این می‌باشد که در یک سی سی از آن سوسپانسیون قارچی $۱×۱۰^{۶}$ سلول قارچ وجود خواهد داشت. لازم به ذکر می‌باشد که ابتداً بایستی شفافیت دستگاه را با محلول رقیق کننده و تهیه سوسپانسیون که به کار رفته به ۱۰۰ درصد رسانده بعد شفافیت سوسپانسیون را به ۹۰ رساند. از چنین سوسپانسیونی قارچی مقدار ۱۰ میکرولیتر به تمام لوله‌های مربوطه وارد شده، لوله‌های مربوط در دمای ۳۰-۲۵ درجه به مدت چند روز انکوبه کرده، بعد از این مدت انکوباسیون ایجاد کدورت در لوله‌ها با نمونه شاهد، لوله یازدهم، مقایسه و در ارتباط با نتیجه بررسی می‌شود.

جهت تعیین حداقل غلظت کشندگی قارچ یا MFC، مقدار ۱۰ میکرولیتر از لوله MIC و سایر لوله‌های فاقد کدورت توسط فیلدوپلاتین استاندارد ۰/۰۱ سی سی برداشته و در محیط کشت سابورودکستروز آگار کشت داده می شود و پس از گذشت زمان لازم در پلیت‌ها، CFU را تعیین می‌شود. به این ترتیب که کلونی‌ها را شمرده و در ۱۰۰ (عکس ضریب رقت) ضرب

می‌نماییم. به این ترتیب تعداد قارچ‌ها در پلیت ها به دست می‌آید. کمترین غلظتی که در آن رشدی مشاهده نشد یا به عبارتی کمترین غلظتی را که تعداد قارچ‌ها از یک هزارم تعداد اولیه کمتر شده باشد، به عنوان MFC در نظر گرفته می شود.

آنالیز آماری

کلیه آزمایشات حداقل در سه تکرار انجام شد. جمع بندی داده ها با نرم افزار Excel و آنالیز آماری با نرم افزار spss نسخه ۲۰ انجام گرفت و مقایسه میانگین ها به کمک آزمون ناپارامتریک کروسکال والیس و تست تعقیبی من ویتنی در سطح احتمال $P<0.05$ انجام شد.

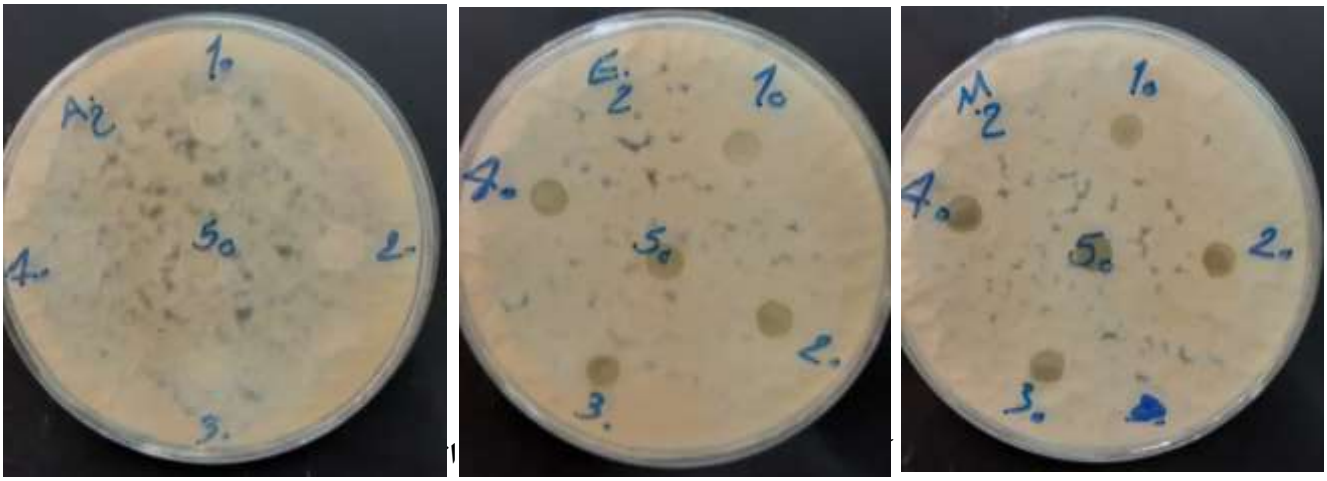
یافته ها

نتایج

در این بررسی عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی گیاه خارخاسک بر روی قارچ آسپرژیلوس فلاووس با روش‌های دیسک، چاهک، حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی قارچ (MFC) مورد مطالعه قرار گرفت.

تست تعیین حساسیت قارچ آسپرژیلوس فلاووس به عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی گیاه خارخاسک به روش دیسک

در اطراف دیسک های دارای ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ میکرولیتر از عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی میانگین هاله عدم رشد برابر با صفر میلی متر بوده است (شکل ۱).



شکل ۱- تست تعیین حساسیت به عصاره های آبی، اتانولی و متانولی گیاه خارخاسک به روش دیسک

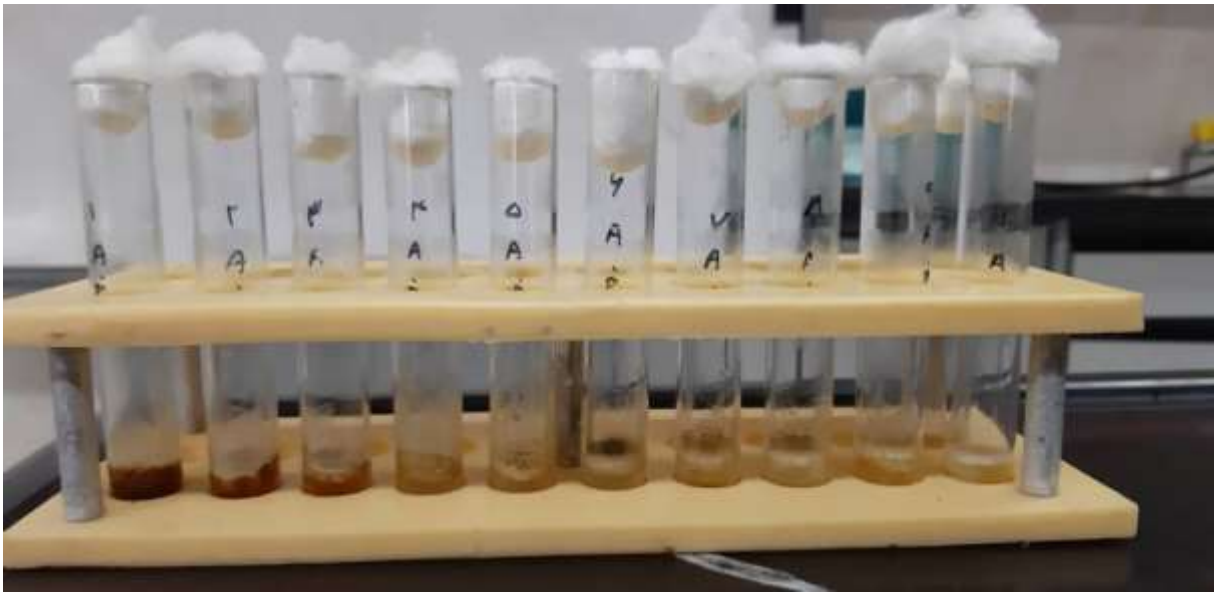
برابر با صفر میلی متر بوده است (شکل ۲).

شکل ۲- تست تعیین حساسیت به عصاره های آبی، اتانولی و متانولی گیاه خارخاسک به روش چاهک

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی گیاه خارخاسک بر روی قارچ آسپرژیلوس فلاووس به روش MIC

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی عصاره آبی گیاه خارخاسک بر روی قارچ آسپرژیلوس فلاووس به روش MIC

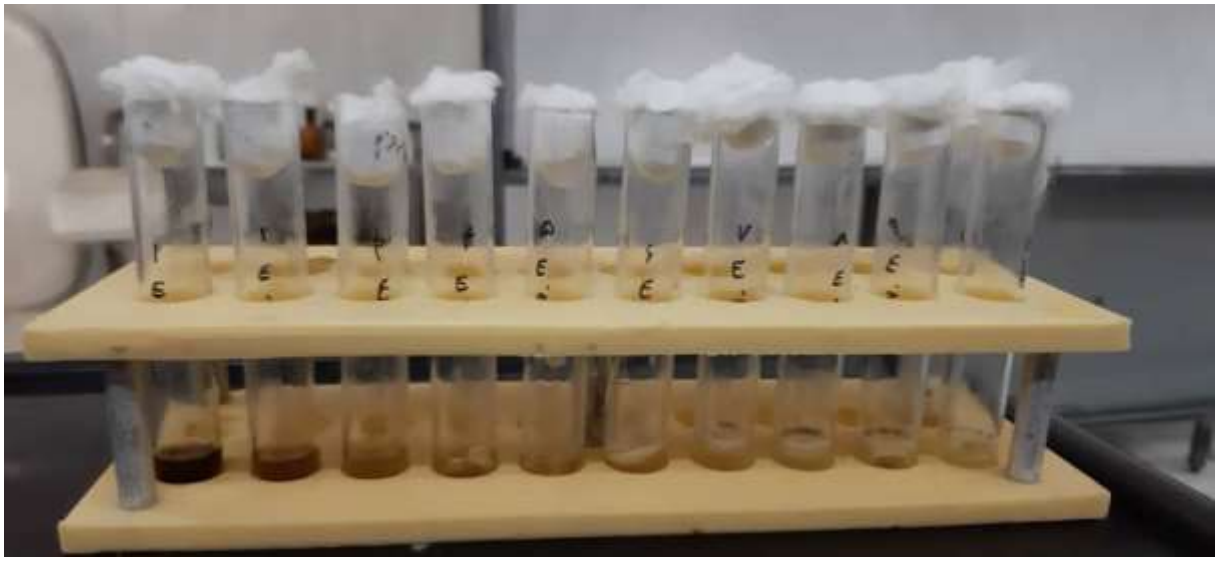
در این روش برای مشخص کردن MIC از لوله شماره ۱۰ شروع به شمارش کرده و میزان کدورت را بررسی کردیم که در نتیجه آن در عصاره آبی در تکرارهای اول، دوم و سوم در لوله شماره ۱ (رقت ۵×۱۰^{۴} میکروگرم بر میلی‌لیتر) کدورت دیده شد (شکل ۳).



شکل ۳- تعیین حداقل غلظت بازدارندگی عصاره آبی گیاه خارخاسک بر روی قارچ آسپرژیلوس فلاووس به روش MIC

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی عصاره اتانولی گیاه خارخاسک بر روی قارچ آسپرژیلوس فلاووس به روش MIC

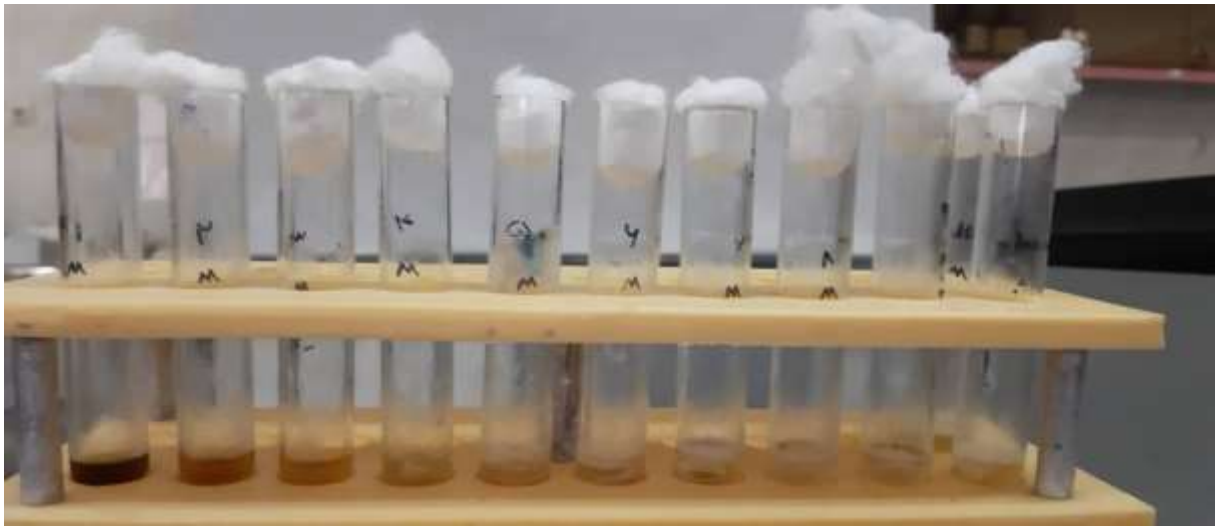
در این روش برای مشخص کردن MIC از لوله شماره ۱۰ شروع به شمارش کرده و میزان کدورت را بررسی کردیم که در نتیجه آن در عصاره اتانولی در تکرارهای اول، دوم و سوم در لوله شماره ۴ (رقت ۶۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) کدورت دیده شد (شکل ۴).



شکل ۴- تعیین حداقل غلظت بازدارندگی عصاره اتانولی گیاه خارخاسک بر روی قارچ آسپرژیلوس فلاووس به روش MIC

روش MIC

در این روش برای مشخص کردن MIC از لوله شماره ۱۰ شروع به شمارش کرده و میزان کدورت را بررسی کردیم که در نتیجه آن در عصاره متانولی در تکرارهای اول، دوم و سوم در لوله شماره ۴ (رقت ۶۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) کدورت دیده شد (شکل ۵).

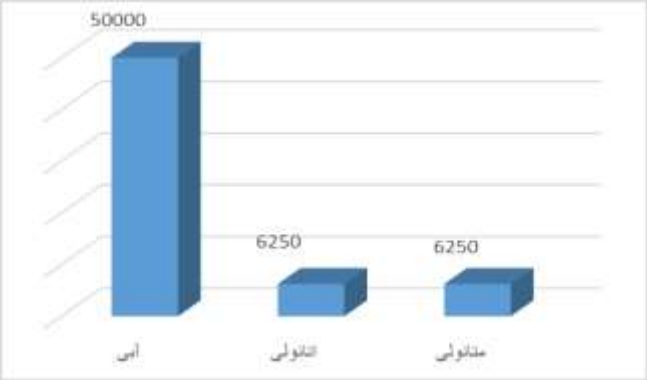


شکل ۵- تعیین حداقل غلظت بازدارندگی عصاره متانولی گیاه خارخاسک بر روی قارچ آسپرژیلوس فلاووس به روش MIC

باتوجه ۰/۰۱۸= sig بدست آمده با استفاده از آزمون ناپارامتریک کروسکال والیس در روش MIC، چون این عدد کمتر از ۰/۰۵ می‌باشد بنابراین نتیجه می گیریم تفاوت معناداری بین گروه‌های مختلف آبی و الکلی وجود دارد. همچنین در آزمون تعقیبی من ویتنی ذیل نیز این نتیجه را تایید می‌کند ($P<0.05$) (جدول ۲) (نمودار ۱).

جدول ۲- میانگین مقدار عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی گیاه خارخاسک در روش MIC و MFC

	آبی	اتانولی	متانولی	p-Value
MIC	۵۰۰۰۰	۶۲۵۰	۶۲۵۰	۰/۰۱۸
MFC	۰	۱۲۵۰۰	۱۲۵۰۰	۰/۰۱۸

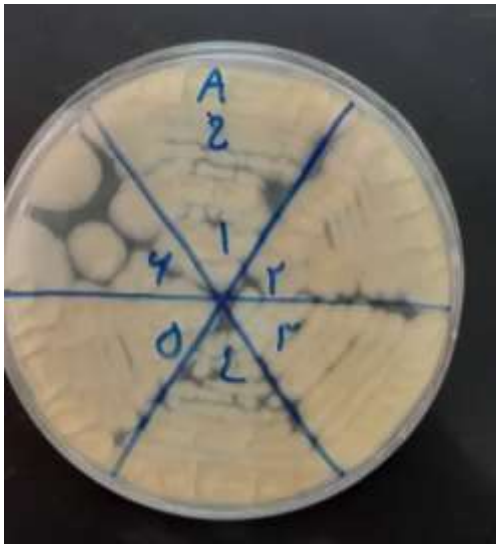


نمودار ۱- میانگین مقدار عصاره های آبی، اتانولی و متانولی گیاه خارخاسک در روش MIC

تعیین حداقل غلظت کشندگی قارچ آسپرژیلوس فلاووس (MFC)

تعیین حداقل غلظت کشندگی عصاره آبی گیاه خارخاسک بر روی قارچ آسپرژیلوس فلاووس به روش MFC

در روش MFC عصاره آبی در تکرارهای اول، دوم و سوم اثری مشاهده نشد (شکل ۶).



شکل ۶- تعیین حداقل غلظت کشندگی عصاره آبی گیاه خارخاسک بر روی قارچ آسپرژیلوس فلاووس به روش MFC

تعیین حداقل غلظت کشندگی عصاره اتانولی گیاه خارخاسک بر روی قارچ آسپرژیلوس فلاووس به روش MFC

میزان MFC عصاره اتانولی در تکرارهای اول، دوم و سوم برابر با لوله شماره ۳ (رقت ۱۲۵×۱۰^{۲} میکروگرم بر میلی‌لیتر) بوده است (شکل ۷).

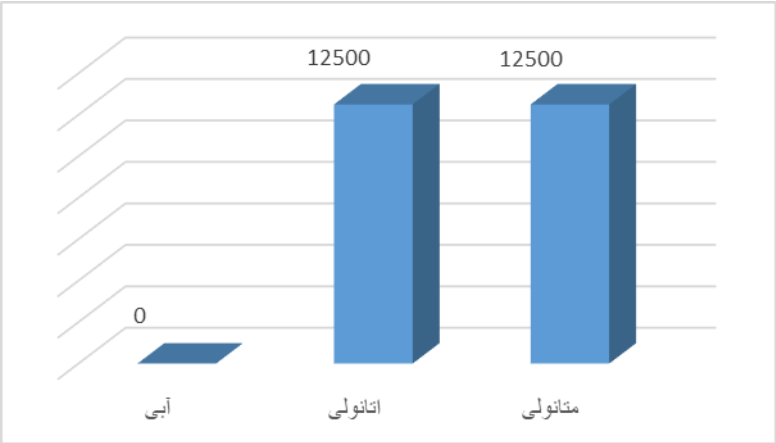
شکل ۷- تعیین حداقل غلظت کشندگی عصاره اتانولی گیاه خارخاسک بر روی قارچ آسپرژیلوس فلاووس به روش MFC

تعیین حداقل غلظت کشندگی عصاره متانولی گیاه خارخاسک بر روی قارچ آسپرژیلوس فلاووس به روش MFC

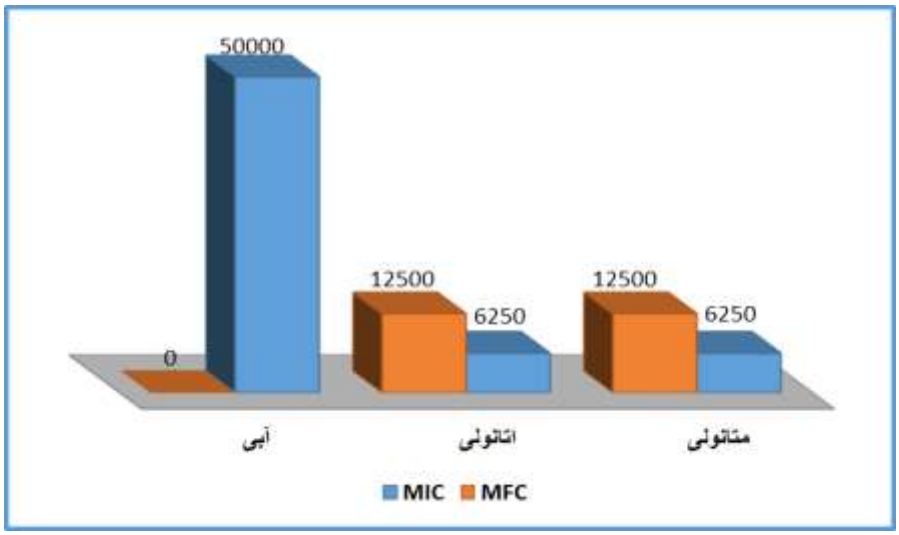
میزان MFC عصاره متانولی در تکرارهای اول، دوم و سوم برابر با لوله شماره ۳ (رقت ۱۲۵×۱۰^{۲} میکروگرم بر میلی‌لیتر) بوده است (شکل ۸).

شکل ۸- تعیین حداقل غلظت کشندگی عصاره متانولی گیاه خارخاسک بر روی قارچ آسپرژیلوس فلاووس به روش MFC

باتوجه sig =۰/۰۱۸ بدست آمده با استفاده از آزمون ناپارامتریک کروسکال والیس در روش MFC، چون این عدد کمتر از ۰/۰۵ می‌باشد بنابراین نتیجه می گیریم تفاوت معناداری بین گروه‌های مختلف آبی و الکلی وجود دارد. همچنین در آزمون تعقیبی من ویتنی ذیل نیز این نتیجه را تایید می‌کند ($P<0.05$) (جدول ۲) (نمودار ۲) (نمودار ۳).



نمودار ۲- میانگین مقدار عصاره های اتانولی، متانولی و آبی خارخاسک در روش MFC



نمودار ۳- مقایسه میانگین عصاره های اتانولی، متانولی و آبی خارخاسک در دو روش MIC و MFC

نتیجه گیری و پیشنهادات

بحث

امروزه استفاده از گیاهان دارویی در درمان بیماری‌ها رو به گسترش است و استخراج و بررسی خواص ترکیبات گیاهی و ارائه مکانیسم های عملکرد این ترکیبات در درمان بیماری‌های مختلف، مورد توجه قرار گرفته است. هدف طب سنتی و کاربرد گیاهان دارویی، توجه بیشتر به نمونه های گیاهی بومی ایران، کاربردهای نوین به عنوان داروهای کمکی در درمان های شیمیایی یا آنتی بیوتیکی، پی بردن به ارزش درمانی گیاهان و بالاخره کشف مواد جدیدی نظیر ویتامین ها، شبه هورمون ها،

مواد ضد میکروبی، ضد ویروسی و ضد توموری در میان گیاهان است. کشت گیاهان دارویی در حال حاضر به عنوان شاخه مهمی از علم کشاورزی مطرح است که موجب استخراج ترکیبات مفید از گیاهان و استفاده در درمان بیماری‌های مختلف می شود. گیاهانی که می توانند در درمان بیماری‌های شایع از جمله دیابت، پرفشاری خون، چربی خون و حتی سرطان مورد استفاده قرار گیرند. امروزه به علت شناسایی ترکیبات مختلف با خواص ضد توموری، حمایت از سیستم ایمنی و درمان بیماری‌هایی همچون آلزایمر، تحقیقات ابعاد دیگری به خود گرفته است (Van Wyk and Wink, 2018). عوامل متعددی بر اثر ضد میکروبی یک گیاه موثر هستند، عواملی چون میزان اسانس و یا عصاره گیاه، روش عصاره گیری، نوع حلال مورد استفاده و مواد موثره موجود در آن و غلظت عصاره نیز می توانند بر اثرات ضد میکروبی گیاه تاثیرگذار باشند. عصاره‌هایی که با روش ها و حلال های مختلف از یک گیاه استخراج می شوند می توانند اثر ضد میکروبی متفاوتی را بر میکروارگانیسم های مورد نظر از خود نشان دهند (صفائی قمی و عباسی، ۲۰۱۰).

نتایج مطالعات نشان می دهند که نوع حلال در مورد استخراج عصاره گیاهان بسیار مهم می‌باشد، به نحوی که نوع اینتراکشن هایی که بین گیاه و حلال مورد استفاده صورت می گیرد نقش به سزایی در استخراج ترکیبات موثر گیاهان و در نتیجه افزایش بازدهی و در نهایت افزایش اثر ضد میکروبی گیاهان دارد، به عنوان مثال می توان به مطالعات حیدری سورشجانی و همکاران (۱۳۹۲)، علیزاده بهبهانی و همکاران (۱۳۹۳)، طباطبایی یزدی و همکاران (۱۳۹۳) و پیرنیا و همکاران (۱۳۹۴) اشاره نمود. این نتایج موید این مطلب است که مهمترین و اساسی ترین عاملی که باید در هنگام استخراج مواد متشکله گیاهان مورد توجه قرار گیرد، حلال مناسب است که انتخاب آن به قسمت های مختلف یک گیاه و نیز به مواد متشکله آن بستگی دارد. با توجه به اینکه امروزه یکی از مشکلات اصلی در ارتباط با میکروارگانیسم های بیماری زا، افزایش مقاومت آن ها به آنتی بیوتیک می‌باشد، تلاش های فراوانی برای دستیابی به اطلاعات بیشتر در مورد مواد موثره موجود در گیاهان و کاربرد آن ها در درمان بیماری‌های مختلف در حال انجام است.

تاثیر کمتر عصاره ها و اسانس های گیاهی خام در مقایسه با آنتی بیوتیک های سنتزی شیمیایی به علت ترکیب شیمیایی پیچیده و عدم وجود یک ترکیب خالص درمانی می‌باشد و اگر ترکیبات دارای اثرات ضد میکروبی این عصاره ها جداسازی و خالص گردند اثرات قابل مقایسه تری با آنتی بیوتیک های رایج درمانی خواهند داشت (مجنونی و همکاران، ۱۳۸۸).

گیاه خارخاسک دارای فالونوئیدها، استروئیدها، ساپونین ها، آلکالوئیدها، اسیدهای چرب غیر اشباع، ویتامین ها، تانن، رزین، پتاسیم، نیترات، فسفر، آهن، سدیم، کلسیم، گوگرد، کلر، اسید آسپارتیک و اسید گلوتامیک است (Georgiev et al., 2010; Hassan et al., 2007). این گیاه دارای فواید مختلفی از جمله خاصیت ضد میکروبی، ضد باکتریایی، آنتی اکسیدانی، مهار سیکلواکسیژناز، پاکسازی رادیکال های آزاد، مهار پراکسیداسیون چربی و تعدیل عوامل التهابی است. در طب سنتی درمان انواع بیماری‌ها از جمله دفع سنگ کلیه، کاهش فشار خون، اثرات ضد دیابتی، بیماری‌های دستگاه قلبی- عروقی، اختلالات معده ای- روده ای، تقویت کننده و بهبود عملکرد جنسی در مردان و درمان بیماری‌های کبدی برای خارخاسک گزارش شده است (Bhandari et al., 2013).

با بررسی پژوهش های انجام شده در داخل و خارج، در خصوص ویژگی آنتی میکروبیال خارخاسک در زمینه خاصیت آنتی باکتریال این گیاه پژوهش هایی به ثبت رسیده است؛ همچنین در خصوص فعالیت ضد قارچی گیاه خارخاسک بر روی برخی قارچ‌ها نیز تحقیقاتی اجرا شده است. علاوه بر آن تحقیقاتی در زمینه خواص ضد التهابی و آنتی اکسیدانی این گیاه انجام شده است. عصاره میوه گیاه خارخاسک اثر باکتریواستاتیک و باکتریسیدال خوبی بر روی تعدادی از باکتری های گرم مثبت و منفی

دارد که از عوامل مهم بعضی از عفونت‌های انسانی می باشند و این اثر قابل مقایسه با آنتی بیوتیک های رایج برای درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری ها می‌باشد؛ لذا با انجام مطالعات فارماکولوژیک و بالینی تکمیلی عصاره میوه این گیاه می توان آن را برای درمان برخی از عفونت‌های باکتریایی پیشنهاد کرد. خارخاسک فعالیت بازدارندگی مناسبی در برابر استرپتوکوک فکالیس، استافیلوکوک آرئوس، اشریشیاکلی و سودوموناس دارد (Tian et al., 2020). تاکنون مطالعاتی در زمینه اثر ضدقارچی خارخاسک بر روی قارچهای مختلف مورد بررسی قرار گرفته است که بر اساس نتایج به دست آمده دارای اثر مهاری مناسبی بر روی قارچهای خانواده کاندیداها (کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا گلابراتا، کاندیدا تروپیکالیس و کاندیدا پاراپسیلوزیس) و کریپتوکوکوس نئوفورمنس دارد (Zhang et al., 2006).

از اسپیروستانول موجود در گیاه خارخاسک در درمان ولوواژینیت نیز استفاده شده است. اسپیروستانول ترکیبی است که در درمان بیماری‌های پوستی ویروسی، قارچی، انگلی و باکتریایی در نواحی مختلف بدن از جمله چشم، گوش و پوست نواحی جنسی مورد استفاده قرار گرفته است. راسکوژنین به عنوان محصول تجاری ساپونین های استروئیدی به صورت پماد در درمان بیماری‌های پوستی استفاده می شود و در فرآیندهای ضدالتهابی و ضد ترومبوزی نیز نقش ایفا می‌کند (Huang et al., 2008). ساپونین ها خواص ضد قارچی گیاه را بر عهده داشته که در صورت افزایش میزان مصرف آن ها دارای آثار سمی و همولیتیک هستند (Xu et al., 2010).

خواص آنتی باکتریایی عصاره گیاه خارخاسک بستگی به مکانی که گیاه از آن گرفته شده و بخشی از گیاه که استفاده می شود، دارد. عصاره اتانولی گرفته شده از میوه و برگ نوع هندی این گیاه فعالیت علیه Staphylococcus aureus و اشرشیاکالی دارد این در حالی است که خارخاسک منطقه یمن، فعالیت ضد باکتریایی ندارد. تمامی بخش های گیاه خارخاسک ایرانی فعالیت ضد باکتریایی علیه استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکالی، سودوموناس آئوروژیز، انتروکوکوس فکالیس و کلبسیال نومونیه دارند. عصاره متانولی میوه های گیاه بیشترین فعالیت را در برابر باکتری های گرم مثبت و گرم منفی نشان می دهد (Mohammed, 2008; Al-Bayati and Al-Mola, 2008). علاوه بر باکتری های یاد شده، ترکیبات عصاره این گیاه اثر مهارکنندگی بر هلیکوباکترپیلوری نیز نشان می دهد (Hakemi et al., 2013).

ساپونین ها به عنوان یکی از ترکیبات مؤثر در مقابله با رشد قارچها محسوب می شود. خواص عصاره این گیاه موجب کاهش بیماریزایی قارچهایی از جمله کاندیدا آلبیکنز، کاندیدا گالبراتا، کاندیدا پارازیلوزیس، کاندیدا تروپیکالیس و کریپتوکوکوس نئوفورمنس می شود. ساپونین های موجود در این گیاه با تخریب دیواره سلولی قارچها موجب کاهش بیماری زایی آنها می شود (Zhang et al., 2006). این نتایج همراستا با نتایج مطالعه حاضر می‌باشد.

Saadabi (۲۰۰۶) فعالیت ضد قارچی بعضی از گیاهان عربستان از جمله Peganum harmala را بر قارچهای آسپرژیلوس فلاووس، آسپرژیلوس فومیگاتوس، آسپرژیلوس نیجر و کاندیدا آلبیکنس مورد بررسی قرار داد. در این بررسی، دو نوع عصاره آبی و الکلی مورد استفاده قرار گرفت که عصاره الکلی به خصوص متانولی موثرتر از سایر عصاره ها از جمله عصاره آبی بود، یافته‌های این تحقیق نیز با پژوهش اخیر همخوانی داشت.

در مطالعه کلانترهرمزی و همکاران (۱۳۸۱) اثرات ضد میکروبی عصاره میوه خارخاسک بر علیه باکتری های استرپتوکوک فکالیس، استافیلوکوک آرئوس، اشریشیا کلای و سودوموناس آئروژینوزا با روش دیسک پلیت و رقت لوله ای مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این بررسی نشان داد که عصاره میوه استخراج شده بر علیه سوش های استاندارد باکتری های استرپتوکوک فکالیس، استافیلوکوک آرئوس، اشریشیاکلی و سودوموناس آئروژینوزا به ترتیب با غلظت های ۴۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰ و ۱۰۰

میکروگرم در میلی لیتر خاصیت باکتریواستاتیک و با غلظت های ۸۰۰، ۴۰۰، ۴۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر خاصیت باکتریسیدال دارند. همچنین مقایسه اثرات ضد میکروبی عصاره این گیاه با آنتی بیوتیک های موثر بر این باکتری ها از قبیل سیپرفلوکساسین، پنی سیلین G، اکساسیلین، جنتامایسین، کوتریموکسازول، نالیدیکسیک اسید و نیترو فورانتویین نشان داد که عصاره متانولی میوه گیاه خارخاسک در غلظت مورد استفاده، اثری قابل مقایسه و در مواردی حتی بیشتر از برخی از این آنتی بیوتیک ها بر علیه میکروب های مورد بررسی دارد. نگهداری عصاره میوه خارخاسک در طول مدت زمان پس از استخراج باعث کاهش خاصیت ضد میکروبی آن شد (Kalantar et al., 2003).

فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های آلی و آبی میوه ها، برگ ها و ریشه های گیاه خارخاسک در برابر ۱۱ گونه میکروارگانیسم بیماری زا و غیر بیماری زای استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سابتیلیس، باسیلوس سرئوس، کورینه باکتریوم دیفتریا، اشریشیا کلای، پروتئوس وولگاریس، سراشیا مارسسنس، سالمونلا تیفی موریوم، کلبسیلا پنومونیه، سودوموناس آئروجنوزا و کاندیدیا آلبیکنز مورد بررسی قرار گرفت. تمام عصاره‌های قسمت های مختلف گیاه در برابر اکثر میکروارگانیسم های مورد آزمایش فعالیت ضد میکروبی نشان دادند. فعال ترین عصاره در برابر باکتری های گرم منفی و گرم مثبت عصاره اتانولی میوه ها با MIC برابر با ۱۵ میلی گرم/ میلی‌لیتر در برابر باسیلوس سابتیلیس، باسیلوس سرئوس، پروتئوس وولگاریس و کورینه باکتریوم دیفتریا گزارش گردید (Al-Bayati and Al-Mola, 2008).

فعالیت های ضد قارچی in vitro هشت ساپونین گیاه خارخاسک در برابر شش مخمر مقاوم به فلوکونازول شامل Candida albicans، Candida glabrata، Candida parapsilosis، Candida tropicalis، Candida krusei و Cryptococcus neoformans با استفاده از روش رقت میکروبراث مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که ساپونین های TTS-12 و TTS-15 در برابر چندین گونه کاندیدای بیماری زا و C. neoformans در شرایط آزمایشگاهی بسیار موثر هستند. قابل ذکر است که ساپونین های TTS-12 و TTS-15 در برابر کاندیدیا آلبیکنز مقاوم به فلوکونازول (MIC_{80}= 4.4, 9.4 µg/ml)، کاندیدیا نئوفورمنس (MIC_{80}= 10.7, 18.7 µg/ml) و کاندیدیا کروسئی (MIC_{80}= 8.8, 18.4 µg/ml) فعالیت قابل توجهی داشتند (Zhang et al., 2005). در مطالعه حاضر نیز بر اساس نتایج MIC و MFC عصاره‌های اتانولی و متانولی گیاه خارخاسک اثرات ضدقارچی قابل قبولی در برابر قارچ آسپرژیلوس فلاووس از خود نشان دادند.

در سال های اخیر پذیرش طب سنتی به عنوان یک روش جایگزین برای خدمات درمانی، افزایش مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک ها و درمان بیماری‌های ناشی از آن ها سبب گردیده است که محققان در پی یافتن عوامل ضد قارچی با منشا گیاهی دارای اثرات جانبی کمتر نسبت به آنتی بیوتیک ها باشند. نتایج این پژوهش نشان داد که عصاره‌های الکلی گیاه خارخاسک دارای اثرات ضد قارچی قابل ملاحظه ای بر قارچ آسپرژیلوس فلاووس می‌باشد و می تواند به عنوان یک منبع طبیعی برای استفاده در درمان بیماری‌های عفونی باشد. لذا جداسازی ترکیبات موثره، خالص سازی، بررسی اثرات ضد قارچی آن ها برای تهیه فرمولاسیون های غذایی و دارویی پیشنهاد می شود.

نتیجه گیری

به طور کلی آنچه از این تحقیق استنباط می شود این است که شرکت های سازنده دارو به ویژه تولیدکنندگان داروهای ضد قارچی می توانند با استناد به نتایج حاصل از این پژوهش، به کمک عصاره گیاه خارخاسک انواع پمادها و محلول ها را به منظور درمان بیماری‌های قارچی سطحی و جلدی ساخته و آن را جایگزین داروهای شیمیایی موجود کنند. با این حال تحقیقات مشابه گسترده تر با استفاده از مواد موثره موجود در گیاه خارخاسک پیشنهاد می گردد.

پیشنهادات

- انجام تحقیقات مشابه با استفاده از مواد موثره موجود در گیاه خارخاسک و مقایسه آن با نتایج مطالعه حاضر
- بررسی اثرات ضد قارچی گیاه خارخاسک بر روی سایر قارچها
- تحقیق و بررسی اثرات ضد قارچی عصاره گیاه خارخاسک در شرایط in vivo
- استفاده از عصاره گیاه خارخاسک جهت ساخت داروی گیاهی و یا بخشی از داروهای ضد قارچی

منابع

۱. پیرنیا، م.، عدالتیان دوم، م. ح.، طباطبایی یزدی، ف.، شهیدی، ف.، (۱۳۹۴)، «تاثیر ضد باکتریایی عصاره‌های آبی و اتانولی میوه درخت سپستان بر استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، اریشیاکلی و سالمونلا تیفی»، مجله دانشگاه علوم پزشکی قم، شماره ۹، صص ۴۸-۳۹.

۲. حبیبی نجفی، م.، حسینی، ا.، یاسینی اردکانی، ع.، مورکی، ن.، (۱۳۸۹)، «بررسی خواص کاربردی آنتی باکتریال و آنتی اکسیدانی عصاره گیاه نعناع »، ششمین همایش ملی گیاهان دارویی طب سنتی وکشاورزی ارگانیک، همدان- مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی ومنابع طبیعی استان همدان، انجمن علمی پژوهشی دانش پژوهان بوعلی سینا - مرکز تحقیقات آموزش کشاورزی ومنابع طبیعی استان همدان، شماره ۶، صص ۴۴-۳۹.

۳. حیدری سورشجانی، م.، طباطبائی یزدی، ف.، مرتضوی، س. ع.، شهیدی، ف.، (۱۳۹۲)، «بررسی اثر مهارکنندگی و کشندگی عصاره‌های آبی و اتانولی کرفس کوهی (Kelussia odoratissima) بر Bacillus cereus، Escherichia coli و Listeria inocua در شرایط آزمایشگاهی»، فصلنامه بیماری‌های عفونی و گرمسیری ایران، شماره ۱۸، صص ۲۴-۱۹.

۴. شمس قهفرخی، م.، شکوه امیری م، صادقی گ، رزاقی ابیانه م، میرزاحسنی ح، (۱۳۸۵)، «ارزیابی تاثیر دارویی ضدقارچی تربینافین بر رشد ایزوله های مالاسزیا فورفور و مقایسه آن با کتوکونازول در شرایط آزمایشگاهی»، دو ماهنامه علمی پژوهشی دانشگاه شاهد شماره ۶۶، ص ۴۹-۴۶.

۵. طالبی، م.، خلفیان، م.، خلفیان، پ.، (۱۳۹۹)، «تاثیر ضد قارچی جلبک لامیناریا جاپونیکا بر روی کاندیدا آلبیکنس»، هفتمین کنگره ملی زیست شناسی و علوم طبیعی ایران، تهران، مرکز مطالعات و تحقیقات علوم و فنون بنیادین- موسسه آموزش عالی آل طه، شماره ۴، صص ۱۱۰-۱۰۷.

۶. طباطبایی یزدی، ف.، علیزاده بهبهانی، حیدری سورشجانی، م.، (۱۳۹۳)، «مقایسه اثر ضد میکروبی عصاره گیاه چویل (Ferulago angulate) با انواع آنتی بیوتیک های رایج درمانی در شرایط آزمایشگاهی»، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک، شماره ۱۷، صص ۴۶-۳۵.

۷. علیزاده بهبهانی، ب.، طباطبائی یزدی، ف.، شهیدی، ف.، محبی، م.، وسیعی، ع.، (۱۳۹۳)، «بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره آبی و الکلی برگ گیاه حرا (Avicennia marina) بر میکروارگانیسم های عامل عفونت و مسمومیت در شرایط آزمایشگاهی»، مجله دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، شماره ۶، صص ۱۰۹-۹۹.

۸. مجنونی، م. ب.، عبیری، ر.، ملک خطابی، پ.، ادیبی، ه.، (۱۳۸۸)، «اثرات ضد میکروبی عصاره آبی الکلی برگ و دانه گیاه شنبلیله (Trigonella foenum) بر روی سویه های مختلف میکروبی»، مجله علوم آزمایشگاهی، شماره ۳، صص ۳۵-۳۱.

9. Abirami P, Rajendran A., (2011) «GC-MS Analysis of *Tribulus terrestris*. L.» Asian J Plant Sci Res. Vol. 1, pp 13-21.
10. Adaikan PG, Gauthaman K, Prasad RN. (2000), «Proerectile pharmacological effects of *Tribulus terrestris* extract on the rabbit corpus cavernosum». Ann Acad Med. Vol. 29, pp 22-26.
11. Adaikan PG, Gauthaman K, Prasad RN. (2001), «History of herbal medicines with an insight on the pharmacological properties of *Tribulus terrestris*». Aging Male. Vol. 4, pp 163-169.
12. Aggarwal A, Tandon S, Singla SK, Tandon C. (2012), «A novel antilithiatic protein from *Tribulus terrestris* having cytoprotective potency». Protein Pept Lett. Vol. 19, pp 812-819.
13. Al-Ali M, Wahbi S, Twaij H, Al-Badr A. (2003), «*Tribulus terrestris*: Preliminary study of its diuretic and contractile effects and comparison with Zea mays». J Ethnopharmacol. Vol. 85, pp 257-260.
14. Al-Bayati, F.A. and Al-Mola, H.F., (2008). «Antibacterial and antifungal activities of different parts of Tribulus terrestris L. growing in Iraq». Journal of Zhejiang University Science B, Vol. 9, pp 154-159.
15. Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., Blackwell, M., (1986), «Introductory Mycology». Mashhad university's Jahadpubli. Vol. 4, pp 44-63.
16. Allameh, A., Razzaghi-Abyaneh, M., (2011), «Mycotoxins: mycological, chemical and environmental aspects». Tehran, IRAN: EmamHossein University Publ. Vol. 4, pp 115-123.
17. Alrajhi, A.A., Enani, M., Mahasin, Z. and Al-Omran, K., (2001). «Chronic invasive aspergillosis of the paranasal sinuses in immunocompetent hosts from Saudi Arabia». The American journal of tropical medicine and hygiene, Vol. 65, pp 83-86.
18. Amin A, Lotfy M, Shafiullah M, Adeghate E. (2006), «The protective effect of *Tribulus terrestris* in diabetes». Ann N Y Acad Sci. Vol. 1084, pp 391-401.

19. Anand R, Patnaik GK, Kulshreshtha DK, Dhawan BN. (1994), «Activity of certain fractions of *Tribulus terrestris* fruits against experimentally induced urolithiasis in rats». Indian J Exp Biol. Vol. 32, pp 548-552.
20. Arcasoy HB, Erenmemisoglu A, Tekol Y, Kurucu S, Kartal M. (1998), «Effect of *Tribulus terrestris* L. saponin mixture on some smooth muscle preparations: A preliminary study». Boll Chim Farm. Vol. 137, pp 473-475.
21. Ayyanna C Ayyanna. C, Chandra Mohan Rao G, Sasikala M, Somasekhar P. (2012), «Absorption Enhancement Studies of Metformin Hydrochloride by Using *Tribulus terrestris* Plant Extract». Int J Pharm Technol. Vol. 4, pp 4118-4125.
22. Baburao B, Rajyalakshmi G, Venkatesham A, Kiran G, Shyamsunder A, Gangarao B. (2009), «Anti-inflammatory and antimicrobial Activities of methanolic extract of *Tribulus terrestris* linn plant». Int J Chem Sci. Vol. 7, pp 1867-1872.
23. Bennett JW, Klich MA, ed. (1992). «Aspergillus: Biology and Industrial Applications». Stoneham, MA:Butterworh-Heineman. Vol. 1, pp 448-456.
24. Bhandari, B., Chopra, D. and Kohli, S.K., (2013). «Pharmacological effects of Tribulus terrestris: A Review». International journal of contemporary medicine, Vol. 1, pp 71-77.
25. Bhutani SP, Chibber S, Seshadri TR. (1969), «Flavonoids of the fruits and leaves of *T. terrestris*». Phytochemistry. Vol. 8, pp 299-303.
26. Bremner J, Sengpracha W, Southwell I, Bourke C, Skelton B, White A. (2005), «The Alkaloids of *Tribulus terrestris*: A revised structure for the Alkaloid Tribulusterine». Perspect Nat Prod Chem. Vol. 3, pp 11-17.
27. Cary, J.W., Gilbert, M.K., Lebar, M.D., Majumdar, R., Calvo, A.M., (2018). «Aspergillus flavus secondary metabolites: more than just aflatoxins». Food Safety, Vol. 6, pp 7-32.
28. Cavalheiro, A.C., (1981). «Aflatoxin and Aflatoxicosis-A Review». World's Poultry Science Journal, Vol. 37, pp 34-38.
29. Chakrabarti, A., Sethi, S., Raman, D.S.V. and Behera, D., (2002). «Eight-year study of allergic bronchopulmonary aspergillosis in an Indian teaching hospital». Mycoses, Vol. 45, pp 295-299.
30. Cheikh-Rouhou, F., Makni, F., Ayadi, A. and Ghorbel, R., (2001). «Ocular parasitoses and mycoses: cases diagnosed in the Central University Hospital of Sfax between 1996 and 1999». Bulletin de la Societe de pathologie exotique (1990), Vol. 94, pp 11-13.
31. Chhatre S, Nesari T, Somani G, Kanchan D, Sathaye S. (2014), «Phytopharmacological overview of Tribulus terrestris». Pharmacognosy reviews. Vol. 8, pp 45-53.

32. Chhatre S, Nesari T, Somani G, Kenjale R, Sathaye S. (2012), «Comparative Evaluation of Diuretic Activity of Different Extracts of *Tribulus terrestris* Fruits in Experimental Animals». Int J Res Phytochem Pharmacol. Vol. 3, pp 129-133.
33. Chu S, Qu W, Pang X, Sun B, Huang X. (2003), «Effect of saponin from *Tribulus terrestris* on hyperlipidemia». Zhong Yao Cai. Vol. 26, pp 341-344.
34. Deepak M, Dipankar G, Prashanth D, Asha MK, Amit A, Venkataraman BV. (2002), «Tribulosin and β-sitosterol-D-glucoside, the anthelmintic *principles of Tribulus terrestris*». Phytomedicine. Vol. 9, pp 753-756.
35. Denning, D.W., (1998). «Invasive aspergillosis». Clinical infectious diseases, Vol. 2, pp 781-803.
36. Deole YS, Chavan SS, Ashok BK, Ravishankar B, Thakar AB, Chandola HM. (2011) «Evaluation of antidepressant and anxiolytic activity of *Rasayana Ghana* tablet (a Compound Ayurvedic formulation) in albino mice». Ayu. Vol. 32, pp 375-379.
37. Duke J, Duke PK, Cellier JL. (2002), «Duke Handbook of medicinal herbs», United States: CRC Press; Vol. 2, pp 595-603.
38. Ehrlich, K.C., Montalbano, B.G., Cotty, P.J., (2003). «Sequence comparison of aflR from different Aspergillus species provides evidence for variability in regulation of aflatoxin production». Fungal Genetics and Biology, Vol. 38, pp 63-74.
39. El-Sheikh TM, Bosly HA, Shalaby NM. (2012), «Insecticidal and repellent activities of methanolic extract of *Tribulus terrestris* L. (Zygophyllaceae) against the malarial vector Anopheles arabiensis (Diptera: Culicidae)» , Egypt Acad J Biolog Sci. Vol. 5, pp 13-22.
40. Georgiev, G.I., Ivanova, A., Mechkarova, P., Ivanova, A. and Popova, L., (2010). «Rate and forms of Mineral Nutrition CAN Influence Dry Matter Accumulation and Saponin Content of Puncture Vine (Tribulus Terrestris L.)» . Biotechnology & Biotechnological Equipment, Vol. 24, pp 49-52.
41. Gorran A., B. Salehnia, H. R. Alizadeh, A. Mirzaei and M. Farzane. (2015). «Inhibitory Effects of Essential Oils and Extracts of Nettle (Urtica Dioica L.) and Mentha Piperita on Growth and Aflatoxin B1 Production by Aspergillus Flavus». Journal of Agricultural Engineering Research, Vol. 16, pp 67-78.
42. Gugnani, H.C., Gupta, S. and Talwar, R.S., (1978). «Role of opportunistic fungi in ocular infections in Nigeria». Mycopathologia, Vol. 65, pp 155-166.
43. Hakemi, V.M., Goudarzi, H., Naseri, M.S., Kamalinejad, M., Jahangiri, S. and Gholami, M., (2013). «In vitro assessment of Tribulus Terrestri aqueous extract and Benzoxacin fraction against Helicobacter pylori isolates from biopsy samples of Iranian patients». Novelty in biomedicine, Vol. 3, pp 84-87.

44. Hassan, L.G., Umar, K.J. and Umar, Z., (2007). «Antinutritive factors in Tribulus terrestris (Linn) leaves and predicted calcium and zinc bioavailability». J. Trop. Biosci, Vol. 7, pp 33-36.
45. Heathccote, Y.C., (1984), «Introduction and review of the development of research activity in to mycotoxin». Chemistry and Industry. Vol. 6, pp 530-534.
46. Heidari MR, Mehrabani M, Pardakhty A, Khazaeli P, Zahedi MJ, Yakhchali M, (2007), «The analgesic effect of *Tribulus terrestris* extract and comparison of gastric ulcerogenicity of the extract with indomethacine in animal experiments». Ann N Y Acad Sci. Vol. 1095, pp 418-427.
47. Huang, Y.L., Kou, J.P., Ma, L., Song, J.X. and Yu, B.Y., (2008). «Possible mechanism of the anti-inflammatory activity of ruscogenin: role of intercellular adhesion molecule-1 and nuclear factor-κB». Journal of pharmacological sciences, Vol. 108, pp 198-205.
48. Hussain, S., Salahuddin, N., Ahmad, I., Salahuddin, I. and Jooma, R., (1995). «Rhinocerebral invasive mycosis: occurence in immunocompetent individuals». European journal of radiology, Vol. 20, pp 151-155.
49. Kalantar Hormezi, E., Delavar, M., Kianbakht, S. and Payani, M.A., (2002). «The antimicrobial effects of tribulus terrestris fruit extract on some gram negative and positive bacteria in comparison with some in use antibiotics». Journal of Arak University of Medical Sciences, Vol. 5, pp 7-12.
50. Kameswaran, M., Al-Wadei, A., Khurana, P. and Okafor, B.C., (1992). «Rhinocerebral aspergillosis». The Journal of Laryngology & Otology, Vol. 106, pp 981-985.
51. Kavitha P, Ramesh R, Bupesh G, Stalin A, Subramanian P. (2011), «Hepatoprotective activity of *Tribulus terrestris* extract against acetaminophen-induced toxicity in a freshwater fish». *In Vitro* Cell Dev Biol Anim. Vol. 47, pp 698-706.
52. Kavitha P, Ramesh R, Subramanian P., (2012), «Histopathological changes in *Poecilia latipinna* male gonad due to *Tribulus terrestris* administration». *In Vitro* Cell Dev Biol Anim. Vol. 48, pp 306-312.
53. Kennedy, C.A., Adams, G.L., Neglia, J.R. and Giebink, G.S., (1997). «Impact of surgical treatment on paranasal fungal infections in bone marrow transplant patients». Otolaryngology–Head and Neck Surgery, Vol. 116, pp 610-616.
54. Khairallah, S.H., Byrne, K.A. and Tabbara, K.F., (1992). «Fungal keratitis in Saudi Arabia». Documenta ophthalmologica, Vol. 79, pp 269-276.
55. Khan S, Kabir H, Jalees F, Asif M, Naquvi KJ. (2011), «Antihyperlipidemic potential of fruits of *Tribulus terrestris* linn». Int J BiomedRes. Vol. 2, pp 98-101.

56. Khan, Z.U., Sandhu, R.S., Randhawa, H.S., Menon, M.P. and Dusaj, I.S., (1976). «Allergic bronchopulmonary aspergillosis: a study of 46 cases with special reference to laboratory aspects». Scandinavian journal of respiratory diseases, Vol. 57, pp 73-87.
57. Khare CP. (2007), «Berlin, Heidelberg: Springer Verlag», Indian medicinal plants: An illustrated dictionary, Vol. 4, pp 669-671.
58. Kim, H.J., Kim, J.C., Min, J.S., Kin, M.J., Kim, J.A., Kor, M.H., Yoo, H.S., Ahn, J.K., (2011). «Aqueous extract of Tribulus terrestris Linn induces cell growth arrest and apoptosis by down-regulating NF-κB signaling in liver cancer cells». J. Ethnopharmacol. Vol. 136, pp 197-203.
59. Kiran B, Lalitha V, Raveesha KA. (2011), «*In Vitro* Evaluation of Aqueous and Solvent extract of *Tribulus terrestris* L. leaf against Human bacteria». Int J Pharm Tech Res. Vol. 3, pp 1897-1903.
60. Kokate CK, Purohit AP, Gokhale SB., (2007), «Pune: Nirali Prakashan Publisher», Pharmacognosy, Vol. 26, pp 370-381.
61. Kostova I, Dinchev D., (2005), «Saponins in *Tribulus terrestris* – chemistry and bioactivity». Phytochem Rev., Vol. 4, pp 111-137.
62. Kumar M, Panwar M, Samarth R, Kumar A. (2009), «Evaluation of radiomodulatory influence of *Tribulus terrestris* Root extract against gamma radiation: Hematological, Biochemical and cytogenetic alterations in swiss albino mice». Pharmacologyonline. Vol. 1, pp 1214-1228.
63. Kumar M, Soni AK, Shukla S, Kumar A. (2006), «Chemopreventive potential of *Tribulus terrestris* against 7, 12- dimethylbenz (a) anthracene induced skin papillomagenesis in mice». Asian Pac J Cancer Prev. Vol. 7, pp 289-294.
64. Lamba HS, Bhargava CH, Thakur M, Bhargava S. (2011), «α- glucosidase and aldose reductase inhibitory activity *in vitro* and antidiabetic activity *in vivo* of *Tribulus terrestris*». Int J Pharm Pharma Sci. Vol 3, pp 270-272.
65. Li M, Qu W, Chu S, Wang H, Tian C, Tu M. (2001), «Effect of the decoction of *Tribulus terrestris* on mice gluconeogenesis». Zhong Yao Cai. Vol. 24, pp 586-588.
66. Li M, Qu W, Wang Y, Wan H, Tian C. (2002), «Hypoglycemic effect of saponin from *Tribulus terrestris*». Zhong Yao Cai. Vol. 25, pp 420-422.
67. Louveaux A, Jay M, Taleb O, Hadi ME, Roux G. (1998), «Variability in flavonoid compounds of four *Tribulus* species: Does it play a role in their identification by desert locust Schistocerca gregaria?» J Chem Ecol. Vol. 24, pp 1465-1481.
68. Ma, Y., Guo, Z., & Wang, X. (2015). «Tribulus terrestris extracts alleviate muscle damage and promote anaerobic performance of trained male boxers and its mechanisms: roles of androgen, IGF-1, and IGF binding protein-3». J Sport Health Sci, Vol. 12, pp 1-8.

69. Mahgoub, E.S. and El Hassan, A.M., (1972). «Pulmonary aspergillosis caused by Aspergillus flavus». Thorax, Vol. 27, pp 33-37.
70. Matin Y, Alavi S, Hajiaghaee R, Ajani Y. (2008), «Flavonoid Glycosides from *Tribulus terriestris* L.» orientalis Iran J Pharm Sci. Vol. 4, pp 231-236.
71. Mishra, H.N., Das, C., (2003). «A review on biological control and metabolism of aflatoxin». Williams and Wilkins, Vol. 11, pp 42-52.
72. Mitra N, Mehdi DM, Reza ZM. (2012), «*Tribulus terrestris* L. Flavonoid Compounds». Int J Mod Bot. Vol. 2, pp 35-39.
73. Mohammed MJ. (2008), «Biological Activity of Saponins Isolated from *Tribulus terrestris* (Fruit) on Growth of Some Bacteria». Tikrit J Pure Sci. Vol. 13, pp 114-126.
74. Mohapatra, A., Panigrahi, S., Rout, M., Swain, K., Sahoo, S., Ganguly, S., (2016). «Aflatoxicosis in Poultry: A Review». Prevention and control, Vol. 6, pp 7-14.
75. Nadkarni KM. (1927), «Mumbai: Popular Prakashan», Indian Materia Medica, Vol. 3, pp 1230-1231.
76. Nam, J. H., Jung, H. W., Chin, Y. W., Kim, W. K., & Bae, H. S. (2016). «Modulatory effects of the fruits of Tribulus terrestris L. on the function of atopic dermatitis-related calcium channels, Orai1 and TRPV3». Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, Vol. 6, pp 580-585.
77. Neychev VK, Nikolova E, Zhelev N, Mitev VI. (2007), «Saponins from *Tribulus terrestris* L. are less toxic for normal human fibroblasts than for many cancer lines: Influence on apoptosis and proliferation». Exp Biol Med (Maywood), Vol. 232, pp 126-133.
78. Oh HK, Park SJ, Moon HD, Jun SH, Choi NY, You YO. (2011), «*Tribulus terrestris* inhibits caries-inducing properties of *Streptococcus mutans*». J Med Plants Res. Vol. 5, pp 6061-6066.
79. Oh JS, Baik SH, Ahn EK, Jeong W, Hong SS. (2012), «Anti-inflammatory activity of *Tribulus terrestris* in RAW264.7 Cells». J Immunol. Vol. 88, pp 54-62.
80. Perez-Arellano, J.L., Angel-Moreno, A., Belon, E., Frances, A., Santana, O.E. and Martín-Snchez, A.M., (2001). «Isolated renoureteric aspergilloma due to Aspergillus flavus: case report and review of the literature». Journal of Infection, Vol. 42, pp 163-165.
81. Phillips OA, Mathew KT, Oriowo MA. (2006), «Antihypertensive and vasodilator effects of methanolic and aqueous extracts of *Tribulus terrestris* in rats». J Ethnopharmacol. Vol. 104, pp 351-355.
82. Raja M, Venkataram AR. (2011), «Pharmacognostical studies on *Tribulus terrestris* and *Tribulus alatus*». Der Pharmacia Sinica. Vol. 2, pp 136-139.

83. Rajendar B, Bharavi K, Rao GS, Kishore PV, Kumar PR, Kumar CS, (2011), «Protective effect of an aphrodisiac herb *Tribulus terrestris* Linn on cadmium-induced testicular damage». Indian J Pharmacol. Vol. 43, pp 568-573.
84. Razzaghi-Abyaneh, M., Shams-Ghahfarokhi, M., Yashinari, T., Rezaee, M. B., Jaimand, K. and Nagasawa, (2008). «Inhibitory effects of (Satureja hortensis L.) essential oil on growth and aflatoxin production by Aspergillus parasiticus». Int. J. Food Microbiol. Vol. 123, pp 228-233.
85. Rippon, J.W., (1988), «Medical mycology». Saunders Company, Chicago, Illinois, USA. Vol. 3, pp 143-147.
86. Rudwan, M.A. and Sheikh, H.A., (1976). «Aspergilloma of paranasal sinuses—a common cause of unilateral proptosis in Sudan». Clinical radiology, Vol. 27, pp 497-502.
87. Saadabi, A.M., (2006). «Antifungal activity of some Saudi plants used in traditional medicine». Asian J Plant Sci, Vol. 5, pp 907-909.
88. Safaei-Ghomi, J., Ahd, A.A., (2010). «Antimicrobial and antifungal properties of the essential oil and methanol extracts of Eucalyptus largiflorens and Eucalyptus intertexta». Pharmacognosy magazine, Vol. 6, p 172-186.
89. Sangeeta D, Sidhu H, Thind SK, Nath R. (1994), «Effect of *Tribulus terrestris* on oxalate metabolism in rats». J Ethnopharmacol. Vol. 44, pp 61-66.
90. Shirfule AL, Sangamwar AT, Khobragade CN. (2011), «Exploring glycolate oxidase (GOX) as an antiurolithic drug target: Molecular modeling and *in vitro* inhibitor study». Int J Biol Macromol. Vol. 49, pp 62-70.
91. Singh S, Nair V, Gupta YK. (2012), «Evaluation of the aphrodisiac activity of *Tribulus terrestris* Linn. in sexually sluggish male albino rats», J Pharmacol Pharmacother. Vol. 3, pp 43-47.
92. Singh SP, Raghavendra K, Singh RK, Mohanty SS, Dash AP. (2008), «Evaluation of *Tribulus terrestris* Linn (Zygophyllaceae) *acetone extract* for larvicidal and repellence activity against mosquito vectors». J Commun Dis. Vol. 40, pp 255-261.
93. Sutton, D., Fothergill, A., Rinaldi, M., (1998), «Clinically significant fungi». Williams and Wilkins. Vol. 3, pp 98-114.
94. Tian, C., Chang, Y., Liu, X., Zhang, Z., Guo, Y., Lan, Z., Zhang, P. and Liu, M., (2020). «Anti-inflammatory activity in vitro, extractive process and HPLC-MS characterization of total saponins extract from Tribulus terrestris L. fruits». Industrial Crops and Products, Vol. 150, pp 112343-112351.
95. Tilak R, Singh A, Maurya OP, Chandra A, Tilak V. (2010). «Mycotic keratitis in India: a five-year retro-specive study». J. Infect. Dev. Ctries. Vol. 4, pp 171-174.

96. Tilwari A, Shukla NP, Devi U. (2011), «Effect of five medicinal plants used in Indian system of medicines on immune function in Wistar rats». Afr J Biotechnol. Vol. 10, pp 16637-16645.
97. Tola, M., Kebede, B., (2016). «Occurrence, importance and control of mycotoxins: A review». Cogent Food & Agriculture, Vol. 2, pp 119-131.
98. Trease GE, Evans WC. (2002), «Trease and Evans Pharmacognosy. 15th ed. Singapore: Harcourt Brace and Company Asia Pvt. Ltd; 2002». A taxonomic approach to the study of medicinal plants and animal derived drugs, Vol. 3, pp 27-36.
99. Tuncer MA, Yaymaci B, Sati L, Cayli S, Acar G, Altug T, Demir R. (2009), «Influence of Tribulus terrestris extract on lipid profile and endothelial structure in developing atherosclerotic lesions in the aorta of rabbits on a high-cholesterol diet». Acta Histochem. Vol. 111, pp 488-500.
100. Usman H, Abdulrahman F, Ladan A. (2007), «Phytochemical and antimicrobial evaluation of Tribulus terrestris L. growing in Nigeria». Res J Biol Sci., Vol. 2, pp 244-247.
101. Van Burik, J.A., Myerson, D., Schreckhise, R.W. and Bowden, R.A., (1998). «Panfungal PCR assay for detection of fungal infection in human blood specimens». Journal of Clinical Microbiology, Vol. 36, pp 1169-1175.
102. Van Wyk, B.E. and Wink, M., (2018). «Medicinal plants of the world». CABI. Vol. 3, pp 23-36.
103. Vidal, A., Mengelers, M., Yang, S., De Saeger, S., De Boevre, M., (2018). «Mycotoxin biomarkers of exposure: A comprehensive review». Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, Vol. 17, pp 1127-1155.
104. Wang, T., Zhao, S.S., Wang, Y.C., Yang, Y.J., Yao, L., (2014). «Protective effects of escin against indomethacin-induced gastric ulcer in mice». Toxicol. Mech. Method. Vol. 24, pp 560-566.
105. Williams, P.A., Cosme, J., Sridhar, V., Johnson, E.F. and McRee, D.E., (2000). «Mammalian microsomal cytochrome P450 monooxygenase: structural adaptations for membrane binding and functional diversity». Molecular cell, Vol. 5, pp 121-131.
106. Wu TS, Shi LS, Kuo SC. (1999), «Alkaloids and other constituents from Tribulus terrestris». Phytochemistry. Vol. 50, pp 1411-1415.
107. Xu, Y.J., Xu, T.H., Zhou, H.O., Li, B., Xie, S.X., Si, Y.S., Liu, Y., Liu, T.H. and Xu, D.M., (2010). «Two new furostanol saponins from Tribulus terrestris». Journal of Asian natural products research, Vol. 12, pp 349-354.
108. Yang M, Yang C, Bai S, Zhao M, Zhu M., (2011), «Tribulus terrestris Extraction of total flavonoids», Posted, Vol. 4, pp 16-21.

109. Yu, J., Bhatnagar, D., Ehrlich, K.C., (2002). «Aflatoxin biosynthesis». Revista iberoamericana de micología, Vol. 19, pp 191-200.

110. Zhang S, Li H, Xu H, Yang SJ. (2010), «Effect of gross saponins of Tribulus terrestris on cardiocytes impaired by adriamycin». Yao Xue Xue Bao. Vol. 45, pp 31-36.

111. Zhang S, Li H, Yang SJ. (2010), «Tribulosin protects rat hearts from ischemia/reperfusion injury». Acta Pharmacol Sin. Vol. 31, pp 671-378.

112. Zhang, J.D., Cao, Y.B., Xu, Z., Sun, H.H., An, M.M., Yan, L., Chen, H.S., Gao, P.H., Wang, Y., Jia, X.M. and Jiang, Y.Y., (2005). «In vitro and in vivo antifungal activities of the eight steroid saponins from Tribulus terrestris L. with potent activity against fluconazole-resistant fungal». Biological and pharmaceutical bulletin, Vol. 28, pp 2211-2215.

113. Zhang, J.D., Xu, Z., Cao, Y.B., Chen, H.S., Yan, L., An, M.M., Gao, P.H., Wang, Y., Jia, X.M. and Jiang, Y.Y., (2006). «Antifungal activities and action mechanisms of compounds from Tribulus terrestris L.» Journal of ethnopharmacology, Vol. 103, pp 76-84.