

Research Article

Investigating the antifungal effects of honey royal jelly in nano and raw form on *Aspergillus flavus*Elham Rezvannejad^{1*}, Maryam Fayazi², Batool Sadeghi³¹ Department of Biotechnology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran² Department of Environment, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran³ Department of Medical Plant, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran

Key Words

Low-risk drug
Inhibitory effects
Aspergillus flavus
Honey bee
Nanocomposite

Abstract

Introduction: Due to the increasing resistance of pathogenic bacteria and fungi to common antibiotics, it is important to find natural antimicrobial agents as alternative drugs. *Aspergillus flavus* is one of the most important fungi producing aflatoxin. In this research, the antifungal effects of royal jelly and its nanocomposite derivatives on *Aspergillus flavus* were studied.

Materials & Methods: To carry out this research, royal jelly sample was collected from bee farm in Kerman province and extracted in the laboratory. Then, *Aspergillus flavus* was cultured in a special environment and was affected by different dilutions of royal jelly extracts, sepiolite/royal jelly nanocomposites, and sepiolite/silver nitrate/royal jelly. Finally, the MIC and MFC of the samples and disk diffusion tests were determined. The obtained data were analyzed by SAS 9.1 software.

Result: The results of this research showed that although extracts of royal jelly and its nano compounds had less antifungal properties compared to the antibiotic used against *Aspergillus flavus* ($P < 0.01$). But they have had a significant effect on the inhibition and lethality of *Aspergillus flavus*. So that royal jelly in crude form and nanocomposite at a concentration of 400mg/ml had inhibitory and lethal properties on the target fungus. Also, the sepiolite/silver nitrate/royal jelly nanocomposite extract had slightly but significantly more antifungal effect than the crude extract ($P < 0.01$).

Conclusion: Therefore, it can be seen that royal jelly can be used as a natural antifungal, especially in nano form.

Article info

* Corresponding Author's email:
e.rezvannejad@kgut.ac.ir

Received: 22 June 2025

Reviewed: 27 July 2025

Revised: 29 September 2025

Accepted: 31 October 2025

مقاله علمی - پژوهشی

بررسی اثرات ضدقارچی فرم نانو و خام ژل رویال زنبورعسل بر قارچ آسپرژیلوس (*Aspergillus flavus*) فلاووس

الهام رضوان نژاد^{۱*}، مریم فیاضی^۲، بتول صادقی^۳

^۱ گروه بیوتکنولوژی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران
^۲ گروه محیط‌زیست، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران
^۳ گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

کلمات کلیدی

چکیده

داروی کم خطر
اثرات مهارکنندگی
آسپرژیلوس فلاووس
زنبورعسل
نانوذرات

مقدمه: به دلیل مقاومت روزافزون باکتری‌ها و قارچ‌های بیماری‌زا به آنتی‌بیوتیک‌های رایج، یافتن عوامل ضد میکروبی طبیعی به عنوان داروهای جایگزین اهمیت دارد، از آن‌جا که قارچ آسپرژیلوس فلاووس یکی از قارچ‌های مهم مولد تولید آفات توکسین می‌باشد. در این تحقیق اثرات ضدقارچی ژل رویال زنبورعسل و مشتقات نانو کامپوزیت آن بر روی قارچ *Aspergillus flavus* مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: برای انجام این تحقیق نمونه ژل رویال از زنبورستان‌های استان کرمان جمع‌آوری شده و در آزمایشگاه عصاره‌گیری به عمل آمد. سپس قارچ *Aspergillus flavus* در محیط اختصاصی کشت داده شده و تحت تاثیر رقت‌های مختلف عصاره‌های ژل رویال، نانو کامپوزیت‌های سپیولایت/ژل رویال و سپیولایت/نیترات نقره/ژل رویال قرار گرفت. در نهایت MIC و MFC نمونه‌ها توسط تست دیسک دیفیوژن و چاهک پلیت تعیین گردید. اطلاعات به دست آمده توسط نرم‌افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج: نتایج این تحقیق نشان داد که اگرچه عصاره‌های ژل رویال و ترکیبات نانوی آن در مقایسه با آنتی‌بیوتیک مورد استفاده بر علیه قارچ آسپرژیلوس فلاووس دارای خاصیت ضدقارچی کم‌تری بودند ($P < 0/01$). اما تاثیر معنی‌داری بر میزان مهار و کشندگی قارچ آسپرژیلوس فلاووس داشته‌اند. به طوری که ژل رویال به صورت بالک و نانو کامپوزیت در غلظت ۴۰۰ mg/ml دارای خاصیت مهار و کشندگی بر روی قارچ مورد نظر بودند. هم‌چنین عصاره نانو کامپوزیت سپیولایت/نیترات نقره/ژل رویال به میزان ناچیز اما معنی‌داری اثر ضدقارچی بیش‌تری نسبت به عصاره خام داشت ($P < 0/01$).

بحث و نتیجه‌گیری: بنابراین می‌توان دریافت که ژل رویال می‌تواند به عنوان یک ضدقارچ طبیعی به خصوص در فرم نانو مورد استفاده قرار گیرد.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول:
e.rezvannejad@kgut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱ تیر ۱۴۰۴
تاریخ داوری: ۵ مرداد ۱۴۰۴
تاریخ اصلاح: ۷ مهر ۱۴۰۴
تاریخ پذیرش: ۹ آبان ۱۴۰۴

مقدمه

آسپرژیلوسیک سرده شامل چندصد گونه از کپک است که در اقلیم‌های متنوع آب و هوایی در سرتاسر جهان یافت می‌شود (۱). برخی گونه‌های آن بیماری‌زا و برخی دیگر دارای کاربرد صنعتی و غذایی می‌باشند. آسپرژیلوس فلاووس، آسپرژیلوس پارازیتیکوس و آسپرژیلوس فومیگاتوس گونه‌های بیماری‌زا بوده و آسپرژیلوس نایجر و آسپرژیلوس اورایزا گونه‌های مفید آن هستند. مایکوتوکسین‌ها یا سموم قارچی ترکیبات ثانویه متابولیسی هستند که توسط کپک‌ها ساخته شده و دارای خواص سمی می‌باشند. متابولیت‌های اولیه (مانند اسیدهای آمینه، استات، پیروات،...) ترکیباتی هستند که برای رشد قارچ‌ها ضروری می‌باشند، اما متابولیت‌های ثانویه که در انتهای فاز رشد به هنگام تجمع متابولیت‌های اولیه تولید می‌شوند، تأثیر چندانی بر روی رشد قارچ‌ها ندارند (۲، ۳، ۴، ۵). اگرچه کپک‌ها قادر به رشد و تولید سم در بسیاری از مواد غذایی و در شرایط مختلف رطوبت، pH و دما می‌باشند، اما معمولاً در مواد غذایی که تحت شرایط گرم و مرطوب نگهداری می‌شوند، بهتر رشد می‌کنند. بیماری به وجود آمده در نتیجه مصرف سموم قارچی، مایکوتوکسیکوز نامیده می‌شود. آسپرژیلوس فلاووس *A. flavus* از جمله کپک‌هایی است که از نظر مسمومیت غذایی اهمیت ویژه‌ای داشته و قادر به تولید مایکوتوکسینی به نام آفلاتوکسین می‌باشد (۲، ۳، ۴، ۵). آسپرژیلوس تمایل زیادی به دانه‌های خوراکی و دانه‌های روغنی دارد. دانه‌های روغنی، برای رشد آسپرژیلوس مستعد می‌باشند. در دانه‌های صدمه دیده (صدمه مکانیکی در حین برداشت و یا صدمه وارده توسط حشرات) رشد کپک‌ها آسان‌تر می‌باشد. محیط گرم و مرطوب نیز رشد کپک‌ها را تسریع می‌کند. غلات مانند ذرت، جو، گندم و برنج، دانه‌های روغنی و روغن‌های آن‌ها مانند بادام‌زمینی، سویا، پنبه و آفتابگردان، ادویه‌ها مانند فلفل و زردچوبه، دانه‌های درختی مانند پسته، بادام و گردو، میوه‌های خشک مانند انجیر و دیگر مواد خوراکی مانند حبوبات و شیر از جمله مواد غذایی هستند که تاکنون آفلاتوکسین از آن‌ها جدا شده است (۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸). ظهور گونه‌های قارچی مقاوم و نیز عوارض زیاد داروهای ضدقارچی محققین را به کشف روش‌های جدید ضدقارچی وادار کرده است (۹). داروهای طبیعی به علت داشتن منشأ طبیعی نسبت به داروهای شیمیایی دارای سازگاری بیش‌تری با ارگانیسم‌های زنده از جمله بدن انسان هستند (۱۰). استفاده از عصاره آن‌ها به دلیل عدم عوارض جانبی در دسترس بودن آن‌ها و همچنین عدم اثرات سو نسبتاً پایین آن‌ها در حال گسترش است (۱۱). زنبور عسل یکی از حشرات مفید برای انسان است که متعلق به راسته بال‌غشائیان Hymenoptera خانواده Apidae و گونه *Apis mellifera* است (۱۲). زنبور عسل تولیدات

زیادی دارد که عبارتند از: عسل، عسلک، گرده، بره‌موم، ژل رویال، موم و زهر زنبور. ژل رویال یا شاهانه ماده‌ای است که به وسیله یک جفت غده مغزی کارگران در سنین اول زندگی ترشح شده و برای تغذیه نوزادان جوان و ملکه به کار می‌رود. ژل شاهانه غذای مخصوص ملکه و تنها غذای وی از اولین روز تولد تا آخر عمرش است. ژل رویال دارای اکثر اسیدهای آمینه و تمام ویتامین‌ها است و دارای مصارف پزشکی زیادی بوده و از نظر ارزش چندین برابر قیمت عسل و اکثراً در بازارهای جهانی به صورت آمپول، کپسول و هم‌چنین به صورت شربت عرضه می‌شود (۱۲). مطالعات زیادی در رابطه با اثرات ضدقارچی و ضدباکتری محصولات زنبور عسل تاکنون انجام شده است و اثرات آن‌ها تایید شده است (۱۳). هم‌چنین دانشمندان علم فیزیکی بر این باورند که بسیاری از خواص فیزیکی ماده ارتباط تنگاتنگی با آرایش اتم‌ها و ساختار اتمی ترکیب شیمیایی و اندازه یک ماده جامد در یک، دو و یا سه بعد دارد. بدیهی است با پذیرش چنین اصلی انتظار تغییر خواص فیزیکی یک ماده جامد را در اثر تغییر یافتن یکی از پارامترهای فوق، باید داشته باشیم. در ارتباط با نانو مواد گزارش‌های متعددی در خصوص تغییرات خواص فیزیکی یک جامد در اثر کاهش اندازه ذرات یا بلورها ارائه گردیده است (۱۴). در تحقیق حاضر بررسی خواص ضدقارچی ژل رویال به عنوان یک ماده طبیعی و ایمن به صورت خام و هم‌چنین به صورت نانوکامپوزیت در ترکیب با سپیولیت و نیترات نقره، بر علیه قارچ آسپرژیلوس فلاووس در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره‌های ژل رویال: نمونه ژل رویال از زنبورستان‌های صنعتی (پرورشی) در استان کرمان تهیه شد و سپس در آزمایشگاه دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی کرمان، در آب مقطر استریل حل شده و از کاغذ صافی واتمن رد شد تا در صورت وجود ناخالصی در ژل رویال، عصاره به دست آمده خالص باشد و سپس برای خشک شدن کامل، به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۴۰°C قرار داده شد و سپس جهت تهیه غلظت‌های مورد نیاز وزن‌کشی شده و در داخل میزان مشخصی از آب مقطر استریل حل شد تا رقت‌های مورد نظر به دست آید.

ساخت نانوکامپوزیت‌های سپیولیت/ژل رویال و سپیولیت/ژل رویال/نیترات نقره

آماده‌سازی سپیولایت: سپیولایت از جمله کانی‌های خاک‌های مناطق خشک و نیمه‌خشک جهان به شمار می‌رود. این کانی با توجه به ویژگی‌های منحصر به فردی دارد از جمله فراوانی و در دسترس بودن، ارزانی، تخلخل بالا، سطح ویژه زیاد و هم‌چنین قدرت جذب

بالای آن به عنوان یک ترکیب پایه مناسب برای ساخت ترکیبات نانو کامپوزیت مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۵). اصلاح و آماده‌سازی سپیولایت در دو مرحله صورت گرفت. برای این منظور، ابتدا یک سوسپانسیون حاوی ۱۰ گرم بر لیتر از سپیولایت تهیه و سپس به مدت ۲۴ ساعت تحت هم‌زدن قرار گرفت. بعد از گذشت ۲ دقیقه که محلول در حال سکون باقی ماند، محلول بالایی سوسپانسیون به وسیله کاغذ صافی جداسازی گردید. در پایان به منظور خشک کردن، نمونه سپیولایت خالص شده در دمای ۱۰۵ درجه سلسیوس برای ۲۴ ساعت قرار گرفت (۱۶). سپس، مقدار ۱۰ گرم از سپیولایت مرحله قبل در ۱۰۰ میلی‌لیتر از اسید نیتریک ۱ مولار در دمای بین ۷۰ تا ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت روی هم‌زن مغناطیسی قرار گرفت. سپس به منظور رسیدن به pH خنثی، عملیات شستشو دادن با آب، جداسازی با سانتریفیوژ و پخش مجدد با اولتراسونیک به طور متناوب انجام شد. در نهایت رسوب در دمای ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک شد.

آماده‌سازی سپیولایت/ژل رویال: مخلوط ژل رویال و سپیولایت با نسبت ۱ به ۱ در آب مقطر به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۳۶۰ دور بر دقیقه هم خورد. سپس ماده جامد چندین دفعه با کمک سانتریفیوژ جدا و با آب مقطر شستشو داده شد و در نهایت در دمای اتاق، تحت شرایط خلاء به خوبی خشک شد. ماده حاصل سپیولایت/ژل رویال نام‌گذاری شد.

نانوکامپوزیت سپیولایت/ژل رویال/نیترات نقره: بسیاری از فلزات از جمله نقره، مس، تیتانیوم، منیزیم، روی، طلا، نقره و آلزینات از گذشته‌های دور به عنوان مواد ضد میکروبی مطرح بوده‌اند و امروزه نانوذرات آن‌ها به علت سطح بزرگ‌تر نسبت به حجم‌شان پتانسیل ضدباکتریایی قوی‌تری نیز دارد. از میان همه این‌ها ثابت شده است که نانوذرات نقره مؤثرترین عامل ضد میکروبی بر علیه باکتری‌ها، ویروس‌ها و سایر میکروارگانیسم‌های یوکاریوتی هستند (۱۷). جهت تهیه، ابتدا نیترات نقره در آب مقطر حل شد و سپس سپیولایت/ژل رویال حاصل از مرحله قبل به آن اضافه شد (نسبت ۱ به ۲) مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه هم خورد. سپس آسکوربیک اسید در آب حل و آرام آرام به مخلوط بالا اضافه گردید. مخلوط به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق هم خورد و در نهایت رسوب حاصل چندین دفعه با آب مقطر شستشو داده شد و در آن خشک گردید.

تهیه غلظت‌ها مناسب از قارچ مورد استفاده: سویه قارچ *A. Flavus* تهیه شده از انستیتو موسسه رازی کرج، در محیط کشت مایع PDA جهت ساخت مایه قارچی به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ °C در انکوباتور شیکر قرار داده شد. پس از رشد، قارچ در محیط

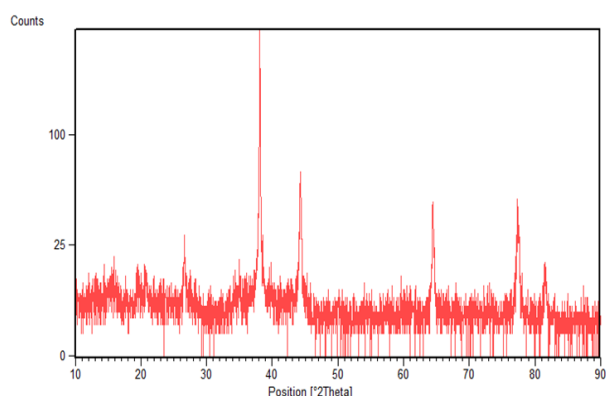
کشت PDA آگار کشت داده شد. سپس با کمک لوپ استریل چند کلونی از محیط کشت قارچ مورد استفاده به محیط کشت شیب‌دار PDA (Potato Dextrose Agar) اضافه گردید تا کدورت محیط با لوله استاندارد نیم مک‌فارلند یکسان شود. قارچ مورد استفاده در غلظت استاندارد (1×10^6 CTU/ml) نیم مک‌فارلند آماده و در مرحله بعد ۵۰۰ میکرولیتر از مایه قارچی استاندارد حاصله با استفاده از لوپ استریل بر روی محیط کشت جامد PDA کشت داده شدند.

انتشار دیسک (Disk diffusion): بعد از تهیه رقت‌های مختلف از عصاره‌های مورد نظر، عصاره‌ها به داخل چاهک‌های ایجاد شده در داخل پلیت‌های حاوی محیط کشت PDA اضافه گردید. سپس پلاک‌هایی از قارچ کشت داده شده (در حدود ابعاد ۰/۲ میلی‌متر) در مرکز هر پلیت به صورت نقطه‌ای قرار داده شد و کشت‌ها به مدت ۷ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد، انکوبه شدند. برای تست کنترل منفی پلیتی با شرایط یکسان در حجم‌های مشابه آب (۱ ml) قرار گرفتند. هاله تشکیل شده دور هر چاهک بعد از ۷ روز نمایانگر ناحیه عدم رشد قارچ بود که با واحد میلی‌متر (قطر هاله) اندازه‌گیری شد. علاوه بر این یک دیسک نیز در آنتی‌بیوتیک مورد استفاده، جهت مبارزه با قارچ مولد آفلاتوکسین، با غلظت مشخص تهیه شد و بر روی محیط کشت PDA قرار داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ روز قرار گرفت. تمام مراحل آزمایش برای هر نمونه سه بار تکرار شد و قطر هریک از مناطق مهار با کولیس دیجیتال اندازه‌گیری شد.

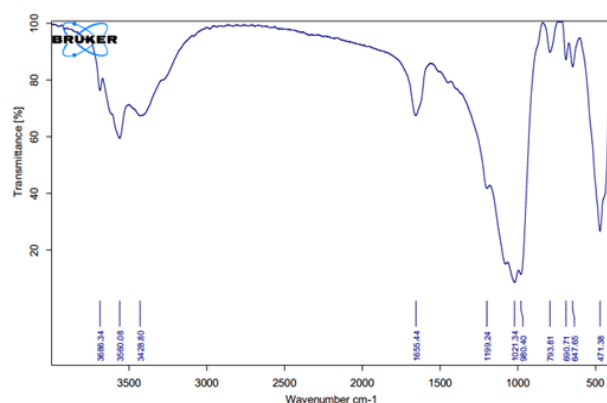
تعیین MFC (Minimally Fungal Concentration) و MIC

(Minimally Inhibitory Concentration): برای تعیین غلظت مهار (MIC) عصاره‌ها بر قارچ *A. Flavus*، از محیط کشت مایع برای آماده سازی سوسپانسیون قارچ در کدورت نیم مک‌فارلند استفاده گردید. در این روش جهت تعیین نسبی حداقل غلظتی که باعث مهار رشد قارچ‌ها (MIC) و حداقل غلظتی که باعث مرگ قارچ‌ها (MFC) می‌گردد، از عصاره‌ها سریال‌های رقتی در محیط PDA برات تهیه گردید. سپس به هر کدام از رقت‌ها به ازای هر میلی‌لیتر محیط مایع، 5×10^5 قارچی فعال اضافه گردید. در کنار لوله‌ها از کنترل مثبت (محیط کشت حاوی قارچ، بدون عصاره) و کنترل منفی (محیط کشت بدون قارچ) استفاده گردید. در نهایت لوله‌ها به مدت ۷۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه و سپس نتایج قرائت گردید. برای هر کدام از رقت‌های عصاره‌ها، آخرین رقتی که در آن هیچ‌گونه کدورتی مشاهده نگردید (عدم رشد) به عنوان MIC در نظر گرفته شد و از تمام لوله‌های بدون کدورت روی محیط PDA برات روی آگار کشت داده شد. آخرین رقتی از عصاره‌ها که قادر به مرگ ۹۹/۹ درصد از قارچ‌های زنده اولیه بود به عنوان MFC عصاره‌ها در نظر گرفته شد.

پیک‌های مشخصه Si-O-Si رامی‌توان در 1021 cm^{-1} ، 1199 cm^{-1} و 980 cm^{-1} مشاهده کرد (۲۱). پیک جذبی در 647 cm^{-1} نشان‌دهنده ارتعاشات خمشی پیوند Mg-OH می‌باشد (۲۲).



شکل ۲: الگو XRD سپیولایت / ژل رویال / نقره



شکل ۳: طیف FT-IR سپیولایت

در نمونه سپیولایت/ژل رویال، حضور پیک‌های جذبی در نواحی 438 cm^{-1} و 2979 cm^{-1} حاکی از پوشش موفقیت‌آمیز ژل رویال بر روی کانی سپیولایت است (شکل ۴). به منظور مقایسه بهتر، طیف FT-IR مربوط به نانوکامپوزیت سپیولایت/ژل رویال/نقره در شکل ۵ نشان داده شده است.

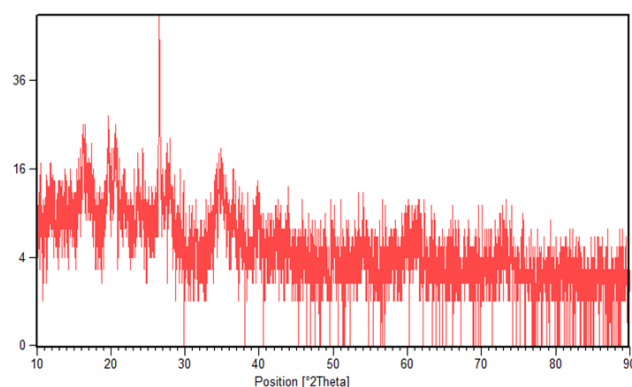
اثر ضدقارچی فرم خام و نانوکامپوزیت ژل رویال: در جدول ۱ قطر هاله ممانعت از رشد باکتری با میزان عصاره ژل رویال و نانوکامپوزیت نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، با افزایش میزان عصاره موجود در دیسک‌ها، قطر هاله ممانعت از رشد اطراف دیسک‌ها نیز افزایش یافته است.

آنالیز آماری: برای اندازه‌گیری قطر ناحیه مهاری، داده‌ها با نرم‌افزار SAS نسخه ۹.۱ (۱۸) به روش ANOVA مورد آنالیز آماری قرار گرفت و مقایسه میانگین‌ها به روش توکی صورت پذیرفت.

نتایج

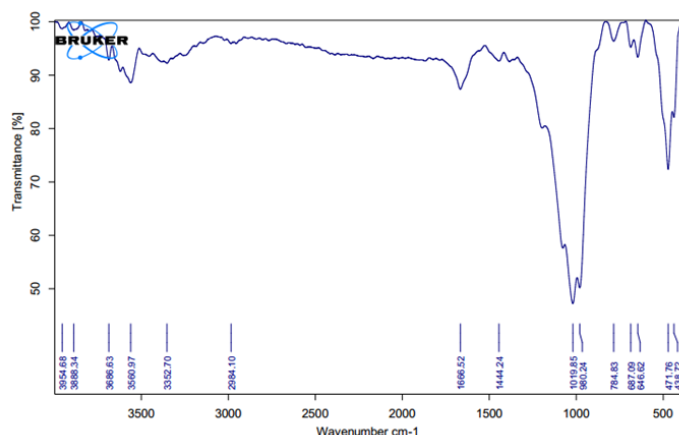
مشخصه‌یابی نانوکامپوزیت‌های ساخته شده: الگو XRD

سپیولایت/ژل رویال در شکل ۱ نشان داده شده است. الگوی پراش مربوط به صفحات (۰۸۰)، (۰۶۰)، (۱۳۰)، (۲۶۰)، (۲۴۱)، (۰۸۰)، (۳۳۱)، (۳۴۱)، (۴۴۱)، (۳۷۱)، (۲۰۲)، (۵۴۱) و (۷۹۱) که به ترتیب در زوایای $2\theta = 12.03^\circ$ ، 19.96° ، 20.83° ، 24.03° ، 25.43° ، 26.82° ، 28.19° ، 29.56° ، 33.51° ، 35.23° و 40.08° و 60.10° مشاهده می‌شود، بر اساس مقایسه با الگوی استاندارد سپیولایت (JCPDS card No. 13-0595)، مطابق با ساختار سپیولایت با سلول‌های واحد ارتورومبیک می‌باشد. علاوه بر این، الگوهای موجود در زوایای (۲۰۲) 44.01° (۱۲۲) 58.22° (۳۰۰) 62.28° و (۱۲۸) 95.72° مربوط به صفحات شبکه کلسیت (JCPDS card No. 05-0586) می‌باشد (۱۹). ژل رویال به دلیل ساختار بی‌شکل در الگو XRD پیک نشان نمی‌دهد و فقط منجر به کاهش شدت پیک‌های سپیولایت می‌شود.

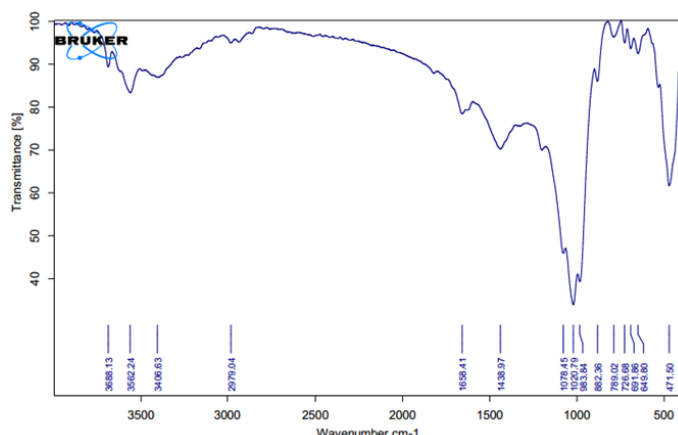


شکل ۱: الگو XRD سپیولایت / ژل رویال

در شکل ۲، پیک‌های مربوط به نانوذرات نقره در زوایای (۱۱۱) 38.1° ، (۲۰۰) 44.25° ، (۲۲۰) 64.72° ، (۳۱۱) 77.40° و (۳۳۱) 83.45° قابل مشاهده هستند (JCPDS card No. 01-087-0719) که نشان‌دهنده سنتز موفقیت‌آمیز نانوکامپوزیت سپیولایت/ژل رویال/نقره می‌باشد. طیف FT-IR سپیولایت در شکل ۳ نشان داده شده‌اند که باندهای جذبی مشاهده شده در 3560 cm^{-1} و 3428 cm^{-1} و 1655 cm^{-1} در طیف FT-IR مربوط به گروه‌های هیدروکسی آب می‌باشد (۲۰).



شکل ۵: طیف FT-IR نانوکامپوزیت سیلیولیت/ژل رویال/نیترا نقره



شکل ۴: طیف FT-IR سیلیولیت/ژل رویال

جدول ۱: میزان هاله رشد در غلظت‌های مختلف عصاره‌های ژل رویال و نانوکامپوزیت ژل رویال

ماده آنتی باکتریال رقت (mg/ml)	ژل رویال (mm)	نانوکامپوزیت سیلیولیت/ژل رویال (mm)	نانوکامپوزیت سیلیولیت/ژل رویال/نقره (mm)
۱۰	۶/۳	۶/۴	۷/۳
۲۰	۶/۴۱	۷/۰۰	۷/۶
۳۰	۶/۷۵	۷/۵	۸/۰۶
۴۰	۶/۸۴	۷/۶۹	۸/۷
۵۰	۷/۰۰	۸/۰۹	۹/۲
۶۰	۷/۱۱	۹/۰۰	۹/۳
۷۰	۷/۴۳	۹/۰۸	۹/۵
۸۰	۷/۷۶	۹/۱	۹/۸۸
۹۰	۸/۰۰	۱۰/۲۴	۱۰/۰۵
۱۰۰	۸/۳۶	۱۰/۲۷	۱۰/۴۱

هم چنین در جدول ۲ نتایج حاصل از روش حداقل ممانعت کننده رشد (MIC) نشان داده شده است. همان گونه که مشاهده می شود در این روش هم میزان مهار رشد قارچ با عصاره ژل رویال و نانوکامپوزیت ژل رویال رابطه مستقیم دارد. غلظت ۴۰۰ میلی گرم در میلی لیتر که در تحقیق حاضر به عنوان آخرین حد غلظت مورد استفاده قرار گرفته است، دارای تاثیر بازدارنده‌ای بر روی قارچ آسپرژیلوس فلاووس می باشد.

مقایسه اثرات ضدقارچی عصاره‌های مختلف مورد استفاده:

در تحقیق حاضر مقایسه بین اثرات ضدقارچی عصاره‌های ژل رویال، نانوکامپوزیت سیلیولیت/ژل رویال و سیلیولیت/ژل رویال/نقره و هم چنین داروی ضدقارچی رایج مورد استفاده انجام شد. نتایج نشان داد که

تفاوت بین تاثیر عصاره‌های مورد استفاده در مقایسه با آنتی قارچ معنی دار می باشد ($P < 0.01$). هم چنین اختلاف بین عصاره‌های ژل رویال به صورت خام و به صورت نانوکامپوزیت بررسی شد هر چند که عصاره نانوکامپوزیت ژل رویال به میزان ناچیزی تاثیر آنتی قارچی بیش تری نسبت به عصاره خام داشت ($P < 0.01$). به هر حال هر سه نوع عصاره دارای تاثیر آنتی قارچی قابل مشاهده‌ای بر قارچ آسپرژیلوس فلاووس بودند (جدول ۳). شکل ۶ به صورت شماتیک تفاوت هاله رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس نسبت به تغییرات غلظت عصاره‌های مورد استفاده را نشان می دهد.

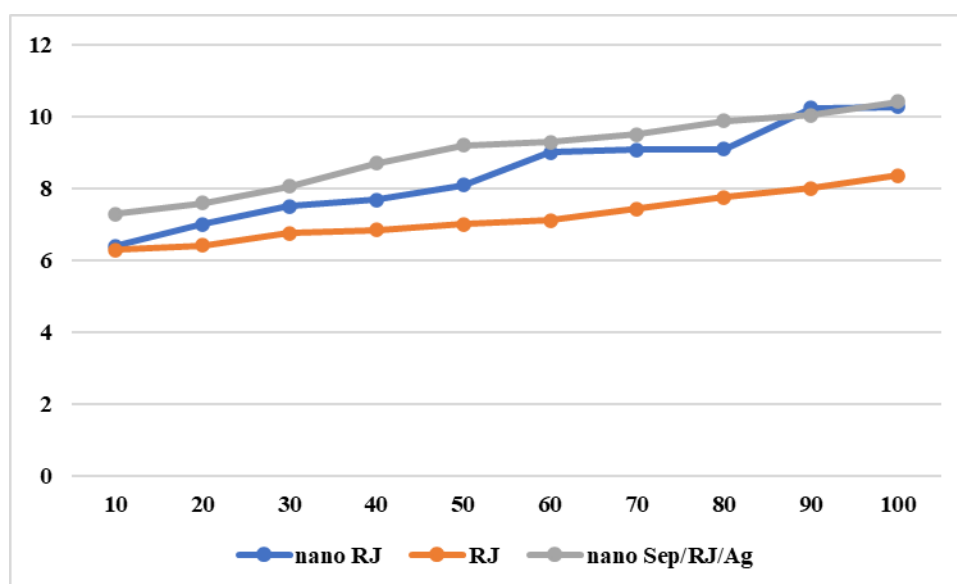
جدول ۲: نتایج حداقل ممانعت کننده رشد (MIC) حداقل غلظتی که باعث مرگ قارچ ها (MFC) عصاره های مختلف ژل رویال و نانوکامپوزیت ژل رویال بر قارچ آسپرژیلوس فلاووس

MFC			MIC			رقت (mg/ml)
نانوکامپوزیت سیپولیت/ژل رویال/نقره	نانوکامپوزیت سیپولیت/ژل رویال	ژل رویال	نانوکامپوزیت سیپولیت/ژل رویال/نقره	نانوکامپوزیت سیپولیت/ژل رویال	ژل رویال	
-	-	-	رشد قارچ	رشد قارچ	رشد قارچ	۱۰
-	-	-	رشد قارچ	رشد قارچ	رشد قارچ	۲۰
-	-	-	رشد قارچ	رشد قارچ	رشد قارچ	۳۰
-	-	-	رشد قارچ	رشد قارچ	رشد قارچ	۴۰
-	-	-	رشد قارچ	رشد قارچ	رشد قارچ	۵۰
-	-	-	رشد قارچ	رشد قارچ	رشد قارچ	۶۰
-	-	-	رشد قارچ	رشد قارچ	رشد قارچ	۷۰
-	-	-	رشد قارچ	رشد قارچ	رشد قارچ	۸۰
-	-	-	رشد قارچ	رشد قارچ	رشد قارچ	۹۰
-	-	-	رشد قارچ	رشد قارچ	رشد قارچ	۱۰۰
-	-	-	رشد قارچ	رشد قارچ	رشد قارچ	۲۰۰
عدم زندهمانی قارچ	عدم زندهمانی قارچ	عدم زندهمانی قارچ	عدم رشد قارچ	عدم رشد قارچ	عدم رشد قارچ	۴۰۰

جدول ۳: میانگین قطر هاله عدم رشد دیسک های حاوی عصاره های بره موم، ژل رویال و نانوکامپوزیت آن ها بر قارچ آسپرژیلوس فلاووس

مواد آنتی باکتریال قارچ	ژل رویال (mm)	نانوکامپوزیت سیپولیت/ژل رویال (mm)	نانوکامپوزیت سیپولیت/ژل رویال/نقره (mm)	آب مقطر استریل	بستر	آنتی بیوتیک (mm)
آسپرژیلوس فلاووس	۷/۱۹۶±۱/۱۱۱	۸/۴۳۷±۰/۶۸۰	۹/۰۰±۱/۰۴۵	*	*	۱۸/۰۷

* فاقد هاله عدم رشد



شکل ۶: تغییرات اندازه هاله رشد بر اساس غلظت در عصاره های مختلف ژل رویال و نانوکامپوزیت های ژل رویال برای قارچ آسپرژیلوس فلاووس

بحث

ژل رویال سرشار از پروتئین‌ها، مونوساکاریدها، پلی‌فنل‌ها و ویتامین‌ها است که فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی برای آن فراهم می‌کند. از نظر شیمیایی، ژل رویال آمولسیون از پروتئین‌ها، قندها و لیپیدهای موجود در آب است. علاوه بر این، حاوی حدود ۱/۵٪ نمک‌های معدنی (به‌طور عمده نمک‌های مس، روی، آهن، کلسیم، منگنز، پتاسیم و سدیم) و مقادیر کمی فلاونوئیدها، پلی‌فنول‌ها و ویتامین‌ها (بیوتین، اسید فولیک، اینوزیتول، نیاسین، اسیدپانتوتنیک، ریبوفلاوین، تیامین و ویتامین E) است. ژل رویال را می‌توان از نظر فلاونوئیدهای موجود در آن متمایز کرد: فلاونون‌ها (هسپرتین، ایزوساکورانتین و نارینگنین)، فلاون‌ها (آکاستین، آپیزنین و گلوکوزید آن، کریزین و لوتولین گلوکوزید)، فلاونول‌ها (ایزوراهمننتین و کامفرول گلوکوزیدها) و ایزوفلاونوئیدها (فورموننتین و جنیستین) (۲۳). با این حال، اگرچه ترکیب ژل رویال از زمان‌های گذشته، مورد مطالعه قرار گرفته است، شناسایی کامل ترکیب پیچیده ژل رویالیک موضوع تحقیقاتی است و توسعه تکنیک‌های جدید خصوصیات، امکان کشف ترکیبات جدید آن را فراهم کرده است (۲۴). به‌عنوان مثال، ۱۹ پروتئین جدید در ژل رویال توسط الکتروفورز ژل یک‌بعدی و روش‌های پروتئومی بدون ژل شناسایی شده است (۲۵). اسید ترانس ۲-دسنوئیک که اسید ژل رویال نامیده می‌شود و خواص آنتی‌بیوتیکی قوی، در آن شناسایی شده است (۲۶، ۲۷). تحقیقات گذشته نشان داده‌اند که آنتی‌اکسیدان‌های رایج مثل توکوفرول‌ها، فلاونوئیدها و ترکیبات مربوطه مثل کومارین‌ها، مشتقات سینامیک اسید، در ترپن فنولیک و اسیدفنولیک در محصولات طبیعی وجود دارند. اثر ضدقارچی برخی مواد طبیعی به‌واسطه وجود ترکیبات آنتی‌اکسیدانی می‌تواند ناشی از آسیب به DNA، میتوکندری، آسیب به دیواره سلولی و نهایتاً مرگ میکروارگانیسم باشد (۲۸). مطالعات زیادی نقش ژل رویال را به‌عنوان یک پاک‌کننده رادیکال‌های آزاد تأیید کرده‌اند. به‌عنوان مثال، Liu و همکاران، خواص آنتی‌اکسیدانی ژل رویال را که به‌عنوان اثر حذف رادیکال‌ها بر رادیکال‌های DPPH، هیدروکسیل و سوپراکسید بیان می‌شود، بررسی کردند (۲۹). محققان هم چنین قدرت کاهنده، اثر بازدارندگی آن بر اکسیداسیون اسید لینولئیک و فعالیت سوپراکسید دیسموتاز را ارزیابی کردند. نتایج به دست آمده بسته به سن لارو (۱، ۲، ۳ روزه) و زمان برداشت پس از انتقال لارو از فنجان‌های سلول ملکه به کندوهای زنبور عسل (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) مقایسه شد. نویسندگان بیان کردند که اثر مهار رادیکال DPPH (در محدوده ۴۳/۰-۶۲/۸٪) و هم چنین اثر مهاری بر تشکیل رادیکال سوپراکسید (از ۲۳/۹ تا ۳۴/۴٪) و بر تشکیل رادیکال هیدروکسیل (۴۸-۶۸٪) است. علاوه بر این، نمونه ژل رویال یک اثر

بازدارنده بر پراکسیداسیون اسید لینولئیک نشان داد (۶-۲۷٪) (Guo. ۲۹) و همکاران، خواص آنتی‌اکسیدانی قوی‌ای را برای پپتیدهای به‌دست آمده پس از هیدرولیز پروتئین‌های ژل رویال با استفاده از پروتئاز N شناسایی کردند. خواص آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای به‌دست آمده از نظر مکانیسم‌هایی مانند هیدروژن پراکسید، سوپراکسید و فعالیت‌های رادیکال‌های هیدروکسیل ۲ و فلزات مورد بررسی قرار گرفت. فعالیت کیلینگ دوازده پپتید به‌دست آمده فعالیت مهارکننده رادیکال‌های هیدروکسیل قوی را نشان دادند. نویسندگان به این نتیجه رسیدند که دی و تری پپتیدها می‌توانند فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیش‌تری نسبت به اسیدهای آمینه تشکیل‌دهنده خود داشته باشند (۳۰). نتایج تحقیق حاضر نشان داد که ژل رویال مورد استفاده که در استان کرمان تولید شده است دارای خواص آنتی‌قارچی قابل قبولی است به‌طوری‌که میزان MIC و MFC آن ۴۰۰ mg/ml می‌باشد. هم چنین نتایج نشان داد که خاصیت آنتی‌قارچی، عصاره ژل رویال مورد استفاده با افزایش غلظت افزایش یافته است، نتایج این تحقیق با بررسی‌های García و همکاران (۳۱) مطابقت داشت به نحوی که در آن مطالعه، اثر دو نوع ژله رویال مربوط مناطق از آرژانتین بر روی *Staphylococcus aureus*، *Staphylococcus micrococcus*، *Enterococcus luteus*، *Escherichia coli*، *Pseudomonas aeruginos* و *Klebsiella pneumoniae faecalis* به روش دیسک دیفوزن و میکرودیالوژن بررسی گردید. نتایج بیانگر مهار دو نمونه ژله رویال به دست آمده از مناطق مختلف بر باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت مورد استفاده بوده و در کل باکتری‌های گرم مثبت حساس‌تر بودند، هم چنین نمونه‌های ژله رویال هر منطقه دارای MIC و MBC متفاوت بود که احتمالاً این تفاوت با منشأ جغرافیایی و یا تنوع بین کلنی‌های زنبور عسل در ارتباط است. علاوه بر آن، طبق مطالعه Moselhy و همکاران، اثر ژل رویال *Apis mellifera* جمع‌آوری شده از چین و مصر بر روی باکتری‌های *Pseudomonas aeruginos*، *Bacillus subtilis*، *Escherichia coli*، *Staphylococcus aureus* و نوع قارچ *Spergillus* و *Aspergillus fumigates*، *Candida albicans*، *niger* و *racemosum* بررسی گردید و نتایج بیانگر MIC بالاتر ژل رویال مصر نسبت به چین بود و بیش‌ترین تأثیر بر روی باکتری‌های گرم مثبت مشاهده شد و در بین باکتری‌های گرم منفی *Escherichia coli* بیش‌ترین حساسیت را نشان داد اما هیچ‌یک از ژل‌های رویال بر روی قارچ *Syncephalastrum racemosum* اثری نداشتند (۳۲).

نتیجه‌گیری: در تحقیق حاضر اثرات ضدقارچی عصاره ژل رویال و ترکیبات نانوکامپوزیت آن به‌خصوص در ترکیب با نیترات نقره، مورد تأیید قرار گرفت. بنابراین می‌توان امیدوار بود که در آینده با مطالعات حیوانی بتوان با بررسی عوارض احتمالی آن به ترکیبی موثر و طبیعی

16. Doğan, M., Turhan, Y., Alkan, M., Namli, H., Turan, P. and Demirbaş, Ö., 2008. Functionalized sepiolite for heavy metal ions adsorption. *Desalination*. 230(1-3): 248-268.
17. Gong, P., Li, H., He, X., Wang, K., Hu, J., Tan, W., Tan, S. and Zhang, X.Y., 2007. Preparation and antibacterial activity of Fe₃O₄@Ag nanoparticles. *Nanotech*. 18: 604-611. doi: 10.1088/0957-4484/18/2/85604
18. SAS. 2003. Statistical Analysis System. SAS Release 9.1 for windows, SAS Institute Inc. Cary, NC, USA.
19. Sheikhsosseini, A., Shirvani, M. and Shariatmadari, H., 2013. Competitive sorption of nickel, cadmium, zinc and copper on palygorskite and sepiolite silicate clay minerals. *Geoderma*. 192(1): 249-253. doi: 10.1016/j.geoderma.2012.07.013
20. Lazarević, S., Janković-Častvan, I., Jovanović, D., Milonjić, S., Janačković, D. and Petrović, R., 2007. Adsorption of Pb²⁺, Cd²⁺ and Sr²⁺ ions onto natural and acid-activated sepiolites. *Applied Clay Science*. 37(1-2): 47-57. doi: 10.1016/j.clay.2006.11.008
21. Eren, E., Gumus, H. and Ozbay, N., 2010. Equilibrium and thermodynamic studies of Cu (II) removal by iron oxide modified sepiolite. *Desalination*. 262(1-3): 43-49.
22. Tabak, A., Eren, E., Afsin, B., and Caglar, B., 2009. Determination of adsorptive properties of a Turkish Sepiolite for removal of Reactive Blue 15 anionic dye from aqueous solutions. *Journal of hazardous materials*. 161(2-3):1087-94. doi: 10.1016/j.jhazmat.2008.04.062
23. López-Gutiérrez, N., del Mar Aguilera-Luiz, M., RomeroGonzález, R., Vidal, J.L.M. and Frenich, A.G., 2014. Fast analysis of polyphenols in royal jelly products using automated TurboFlow™-liquid chromatography Orbitrap high resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 973: 17-28. doi: 10.1016/j.jchromb.2014.09.038
24. Ahmad, S., Campos, M.G., Fratini, F., Altaye, S.Z. and Li, J., 2020. New Insights into the Biological and Pharmaceutical Properties of Royal Jelly. *International Journal of Molecular Sciences*. 21(2):382. doi: 10.3390/ijms21020382
25. Han, B., Li, C., Zhang, L., Fang, Y., Feng, M. and Li, J., 2011. Novel royal jelly proteins identified by gel based and gel-free proteomics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59(18): 10346-10355. doi: 10.1021/jf202355n
26. Ramadan, M.F. and Al-Ghamdi, A., 2012. Bioactive compounds and health-promoting properties of royal jelly: A review. *Journal of Functional Foods*. 4(1): 39-52. doi: 10.1016/j.jff.2011.12.007
27. Weaver, N., Johnston, N.C., Benjamin, R. and Law, J.H., 1968. Novel fatty acids from the royal jelly of honeybees (*Apis mellifera*, L.). *Lipids*. 3(6): 535-538. doi: 10.1007/BF02530898
28. Firouzbakhsh, F., Zolfaghari, A., Mehrabi, Z. and Khalesi, M.K., 2015. Invitro antifungal activity of Nettle (*Urtica dioica*) and Basil (*Ocimum basilicum*) extracts on *Saprolegniaparasitica*. *Journal of Animal Environment*. 7(3): 211-216. (In Persian)
29. Liu, J.R., Yang, Y.C., Shi, L.S. and Peng, C.C., 2008. Antioxidant properties of royal jelly associated with larval age and time of harvest. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56(23): 11447-11452. doi: 10.1021/jf802494e
30. Guo, H., Kouzuma, Y. and Yonekura, M., 2009. Structures and properties of antioxidative peptides derived from royal jelly protein. *Food Chemistry*. 113(1): 238-245. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.06.081
31. Garcia, M. C., Finola, M. S., and Marioli, M. J., 2010. Antibacterial activity of Royal jelly against bacteria capable of infecting cutaneous wounds. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*. 2(3): 93-99. doi:10.3896/IBRA.4.02.3.02
32. Moselhy, W., Fawzy, A. and Kamel, A., 2013. An evaluation of the potent antimicrobial effect and unsaponifiable matter analysis of the Royal jelly. *Life Science Journal*. 2(10): 290-296.

در از بین بردن قارچ *A. flavus* که یکی از مهم ترین قارچ های مولد آفلاتوکسین و مسمویت در دانه های خوراکی و دانه های روغنی می باشد، دست یافت.

تشکر و قدردانی

هزینه های تحقیق حاضر از طرح پژوهشی شماره ۵۴۰/۹۹ پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان فراهم شده است، بدین وسیله نویسندگان لازم می دانند که مراتب قدردانی خود را اعلام نمایند.

منابع

1. Zarei, F. and Mansouri, M., 2013. Comprehensive book of IQB mycology. Tehran: Dr. Khalili's editorial group. 165 p. (In Persian)
2. Montville, T.J., 2005. Matthews KR: Food Microbiology, an Introduction. Washington D C: ASM Press. 272-280.
3. Deshpande, S.S., 2002. Handbook of Food Toxicology. New York: Mercel Dekker. 390-411.
4. Jay, M.J., 2000. Modern Food Microbiology. 6th edition. New York: Chapman & Hall. 595-600.
5. Mehdizadeh, M. and Mohammad Alipur, M., 1999. Bacterial and fungal contamination of food. Isfahan, Arkan Publications. 105-102. (In Persian)
6. Bommakanti, A.S. and Waliyar, F., 2008. Importance of aflatoxin and its producing fungi (Online). Available from: www.aflatoxin.info/health.asp
7. Farivar, F., Dastoorani, M., Taliei, F. and Bahri Binabaj, F., 2023. Fungi flora of animal feed and aflatoxin contamination of feed and milk in dairy farms of Sabzevar County. *Journal of Animal Environment*. 14(4): 81-86. doi: 10.22034/AEJ.2022.311157.2667 (In Persian)
8. Liu, Y. and Wu, F., 2010. Global burden of aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma: a risk assessment. *Enviro Health Perspect*. 118(6): 818-824. doi: 10.1289/ehp.0901388
9. Naseri, A., Arj, P., Najaf, M.J. and Rakhshandeh zadeh, H., 2015. Antifungal Effects of Methanolic and Aquatic Extract of Leaf and Walnut Peel on candidate Species. *Journal of Translational Medical Research*. 22(2): 115-124. (In Persian)
10. Tyang, N.J. and Verpoorte, R., 2013. A Review of the Medicinal Potentials of Plants of the Genus *Vernonia* (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 146(3): 681-723. doi: 10.1016/j.jep.2013.01.040
11. Salem, M.Z.M., Zidan, Y.E., Mansour, M.M.A., HadidiNesrin, M.N.E. and Elgat Wael, A.A.A., 2016. Antifungal Activities of Two Essential Oils Used in the Treatment of Three Commercial Woods Deteriorated by Five Common Mold Fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 106: 88-96. doi: 10.1016/J.IBIOD.2015.10.010
12. Shahrashvani, N., 2012. Honey bee and its breeding (with a complete revision and the latest beekeeping achievements). Sepehr Publications (In Persian)
13. Ebad, F. and Azimi, A., 2017. A review on the biological function of royal jelly with an emphasis on its effects on health and longevity, National Conference on Bee Products from the Perspective of Biology, Health and Economy, Isfahan.
14. Pileni, M.P., 2007. Size and morphology control of nanoparticle growth in organized surfactant assemblies. Nanoparticles and nanostructured films: Wiley-VCH Verlag GmbH. 71-89.
15. Murray, H.H., 2006. Chapter 7 Palygorskite and Sepiolite Applications. In: Haydn HM, editor. Developments in Clay Science: Elsevier. 131-40.