فصلنامه

دانش میکروب شناسی

سال دوم، شماره ۵، زمستان ۱۳۸۸

بررسی اثرات ضد قارچی عصاره برگ گیاه مورد رودبار برروی برخی از قارچ های درماتوفیت و ساپروفیت در شرایط In vitro

دانا آزاد احیایی[1*]، مسعود امامی[1]، پروانه عدیمی[2] و غلامرضا امین[3]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال ۲. مربی گروه انگل و قارچ دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم پزشکی تهران۳. دانشیار گروه فارماکوگنوزی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده

در کشورهای در حال توسعه عفونت‌های قارچی یک مشکل عمده محسوب می‌شود و داروهای رایج جهت درمان نیز عموماً سمی و گرانند و یا دارای عوارض جانبی هستند. هدف ازانجام این تحقیق شناسایی داروی گیاهی ضد قارچی جدید برای درمان برخی از بیماریهای قارچی از جمله درماتوفیتوزیس است که هنوز درمان ایده‌آلی برای آنها وجود ندارد. جهت بررسی در شرایط آزمایشگاهی ابتدا برگهای مورد جمع‌آوری و سپس خشک و پودر شدند. عصاره گیری به روش پرکولاسیون با حلال‌های اتانول، کلروفرم، N هگزان و پترولیوم بنزن انجام شد. سپس رقت های mg/ml ۶۰۰-۳۰ و mg/ml ۴-۰/۵ از عصاره مذکور را به روش Broth Dilution بر روی قارچ‌های مورد نظر اثر داده و رشد قارچها را بررسی کرده و MIC و MFC قارچ‌های مورد نظر را تعیین کرده به عنوان شاهد عدم رشد نیز از داروی کلوتریمازول جهت مقایسه آن به عنوان یک داروی شیمیایی با عصاره مورد نظر استفاده شد. رقت mg/ml ۶۰۰-۳۰ عصاره تام به قارچ‌های ترایکوفایتون منتاگروفایتیس و میکروسپورم کانیس و اپیدرموفایتون فلوکوزوم هیچ گونه اجازه رشدی نمی‌داد اما روی قارچ‌های کاندیدا آلبیکنس و آسپرژیلوس نایجر موثر نبود. فراکشن‌های اتردوپترولی، کلروفرمی وN-هگزانی نیز روی هیچ یک از قارچها اثری نداشتند اما در رقت‌های پایین‌تر در مورد عصاره تام مورد MIC برای قارچ ترایکوفایتون منتاگروفایتیس برابر mg/ml ۱/۵ و برای میکروسپورم کانیس mg/ml ۱ و برای اپیدرموفایتون فلوکوزوم mg/ml ۱ بود. با توجه به موثر بودن عصاره تام هیدروالکلی مورد روی قارچ‌های ترایکوفایتون منتاگروفایتیس و اپیدرموفایتون فلوکوزوم و میکروسپورم کانیس پیشنهاد می‌شود از این عصاره برای درمان عفونتهای ناشی از این قارچها استفاده شود..

واژگان کلیدی: عصاره مورد، ترایکوفایتون منتاگروفایتیس، کاندیدا آلبیکنس، میکروسپوروم کانیس، اپیدرموفایتون فلوکوزوم، آسپرژیلوس نایجر، Broth Dilution، درماتوفیتوزیس.

مقدمه

درماتوفیت‌ها دسته‌ای از قارچها هستند که به قسمت کراتینی پوست، مو، ناخن حمله می‌کنند و از نظر خصوصیات ظاهری، فیزیولوژی، تاکسونومی و علائم بالینی شباهت زیادی به یکدیگر دارند. در حال حاضر ۴۱ گونه از آنها شناخته شده، آنها را در سه جنس ترایکوفایتون، میکروسپوروم و اپیدرموفایتون طبقه‌بندی می‌کنند (۲،۱) .

درماتوفیتوزیس هنوز به عنوان یک مشکل بزرگ و حل نشده باقی مانده است این عفونت‌ها نه فقط در کشورهای در حال توسعه بلکه در افراد مسن و افراد دارای نقص سیستم ایمنی در تمام دنیا روی می‌دهد(۳). مقاومت به داروهای ضد قارچی ممکن است یکی از دلایل شکست درمانی با داروهای شیمیایی باشد(۴).

Archive of SID

www.SID.ir

منابع طبیعی بویژه گیاهان و میکروارگانیسم‌ها یک انتخاب ارجح برای کمک به مشکلات مقاوم شدن میکروبها هستند. درمانهای قدیمی بیشتر ملل بر پایه گیاهان بوده است. دانشمندان قدیم از گیاهان برای درمان سوختگی‌ها، کچلی‌ها و بیماریهای عفونی استفاده می‌کردند. گیاهان درمانی بر حسب مکانی که رشد می‌کنند دارای تنوع آثار هستند(۵).

مورد یا مورت با اسم علمی *Myrtus Communis* درختچه‌ای پایا و همیشه سبز و معطر است ساقه‌های آن بسیار متعدد، منشعب و شاخه‌ها دارای برگهای نزدیک به هم و متراکم با پوشش خاکستری رنگ است و دارای گلهای سفید رنگ است محل رویش آن در دامنه رشته کوه‌های زاگرس در نواحی مرطوب و نیمه مرطوب دیده می‌شود.

این برگها چنانچه در سایه آفتاب خشک شده باشند رنگی پر رنگ و بویی مطبوع و تند دارند در صورتی که در مقابل آفتاب شدید خشک شده باشند رنگ زرد پیدا کرده و بوی کمی دارند (۶و۷). برگهای این گیاه دارای ۲-۱/۵ درصد حجمی اسانس است که قسمت عمده آن ترپینولن است همچنین در برگ گیاه علاوه بر اسانس تانن، فلاونوئید و ویتامین C وجود دارد (۸).

در تحقیق حاضر اثرات ضد قارچی گیاه مورد رودبار روی تعدادی از قارچهای درماتوفیت و سایر وضعیت مورد بررسی قرار گرفت. قارچهای مورد بررسی عبارتند از: آسپرژیلوس نایجر، کاندیدا آلبیکنس، ترایکوفایتون منتاگروفایتیس، اپیدرموفایتون فلوکوزوم و میکروسپوروم کانیس.

مواد و روش ها

در این تحقیق که یک پژوهش تجربی بود اثر ضد قارچی عصاره تام گیاه مورد و فراکشنهای اتردوپترول و کلروفرمی و N هگزانی روی قارچهای نامبرده بررسی شد و تعیین حداقل غلظت مهار کننده هر عصاره روی هر قارچ مطالعه شد.

تهیه عصاره

ابتدا گیاه خشک و پودر گردید سپس عصاره‌گیری به روش پرکولاسیون صورت گرفت به این ترتیب که مقدار معینی از برگ پودر شده را به همراه حلال مورد استفاده که یک مرتبه اتانول یک مرتبه N هگزان، کلروفرم و پترولیوم بنزن بود در سه مرحله ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت در دکانتور ریخته شد بعد از جمع‌آوری محلول حاصل در ظرفهای شیشه‌ای آنرا در حرارت محیط قرار داده تا حلال مصرفی از آن خارج شود عصاره باقی مانده صمغ مانند بود.

محیط کشت‌های مصرفی

در این روش محیط‌های مصرفی عبارتند از: محیط RPMI -۱۶۴۰ شرکتGiBCo، محیط سابورودکستروز مایع شرکت Merck و محیط *Potato Dextrose Agar* دست‌ساز بود.

تهیه سوسپانسیون قارچی استاندارد

از هر نمونه قارچها سه عدد از آزمایشگاه قارچشناسی دانشکده بهداشت دانشگاه تهران تهیه شد و بعد از چند بار پاساژ دادن آنها در محیط سابورو دکستروزآگار و خالص سازی کلنی‌ها برای قارچهای درماتوفیت از کشت ۱۴-۱۰ روزه ،برای آسپرژیلوس از کشت یک هفته‌ای و برای کاندیدا از کشت ۴۸ ساعته جهت تهیه سوسپانسیون، استفاده شد. بدین صورت که مقداری آب مقطر استریل به لوله‌ها افزوده شد سپس سطح کلنی‌ها توسط پیپت پاستور استریل خراشیده شد و مایع رویی در یک لوله استریل ریخته شد سپس عددعبور نوری(Transmission) آنها را در طول موج ۵۳۰ نانومتر به ۷۰٪- ۶۵٪ رساندیم اما در مورد کاندیدا OD آن معادل با OD لوله ۰/۵ مک فارلند در نظر گرفته شد (۹).

روش کشت

در این روش که طبق پروتکلNCCLS M-38 A انجام شده است ابتدا به ازای هر ۴/۹ml محیط مایع مصرفی که برای کاندیدا سابوروی مایع و برای سایر قارچها RPMI-۱۶۴۰ بود ۰/۱ از سوسپانسیون قارچی استاندارد را به محیط مایع اضافه و به مدت ۱۰ s روی شیکر قرار دادیم سپس از این محیط به دست امده به هر لوله مقدار ml ۰/۹ از آنرا تلقیح کردیم. سپس از عصاره رقتهای mg/ml ۳۰-۶۰۰ را تهیه کردیم و به همه لوله‌ها به جز

Archive of SID

www.SID.ir

لوله شاهد مقدار ml ۰/۱ از عصاره‌های رقیق شده را می‌افزاییم. لوله شاهد ما فقط محتوی سوسپانسیون و محیط کشت مایع است و به جای عصاره به ان همان مقدار ml ۰,۱ محیط مایع می افزاییم (البته در این تحقیق به علت بالا بودن غلظت عصاره در رقت‌های mg/ml ۶۰۰-۳۰ و جلوگیری این مقدار از هر گونه رشد قارچها به همان طریق ذکر شده رقت‌های mg/ml ۰/۵-۴ و mg/ml ۰/۷۵- ۳ نیز تهیه شد).

سپس لوله‌ها را در دستگاه اسپکتروفوتومتر قرار داده و درصد عبور نوری(Transmission) آنها را در طول موج ۵۳۰نانومتر خوانده بعد نمونه‌ها را به مدت ۵-۲ روز انکوبه کرده بعد از این مدت زمان مجدداً درصد عبور نوری(Transmission) نمونه‌ها را بررسی کرده و کاهش یا افزایش درصد عبور نوری(Transmission) را یادداشت کرده. سپس برای امکان تعیین MFC (Minimum Fungicide Concentration) نمونه‌ها و اطمینان از عدم آلودگی آنها (ml ۰/۵) نیمی از محتویات هر لوله را روی محیط PDA برده و بعد محیط ها را در دمای مناسبC°۲۳ برای درماتوفیتها و آسپرژیلوس ودمایC°۳۷ برای کاندیدا انکوبه کرده و سپس با مشاهده رشد در پلیت شاهد که فاقد عصاره بود به بررسی سایر پلیت‌ها می‌پردازیم .

نتایج و بحث

در روش Broth dilution میزان % T لوله‌ها قبل و بعد از انکوباسیون در طول موج ۵۳۰نانومتر خوانده می‌شود. اگر عدد عبور نوری(Transmission) افزایش پیدا کند قارچ رشد نکرده و کدورت محیط پایین آمده و در نتیجه عبور نوری زیاد می‌شود.

اگر عدد عبور نوری(Transmission) کاهش پیدا کند، قارچ رشد کرده و کدورت محیط بالا رفته و عبور نوری نیز کم شده.

MIC یا حداقل غلظت بازدارنده رشد مربوط به رقتی می‌شود که درصد عبور نوری(Transmission) قبل و بعد از انکوباسیون تغییر چندانی نمی‌کند که نشان دهنده توقف رشد قارچ است اگر محتویات لوله MIC بر روی پلیت رشد نکند MIC = MBC است. در غیر این صورت با مشاهده کلنی بر روی پلیت حاوی محتویات لوله MIC، $MIC \neq MBC$ و احتمالاً MBC در رقت‌های بالاتر عصاره بدست می‌آید.

در این تحقیق عصاره تام با رقت mg/ml ۶۰۰- ۳۰ سبب جلوگیری از رشد قارچهای ترایکوفایتون منتاگروفایتس، میکروسپوروم کانیس و اپیدرموفایتون فلوکوزوم شد (جدول ۱). به همین دلیل آزمایش روی رقت‌های پایین‌تر mg/ml ۰/۵- ۴ و mg/ml ۰/۷۵- ۳ نیز انجام شد.

عصاره تام با رقت mg/ml ۶۰۰-۳۰ هیچ گونه اثری روی قارچهای آسپرژیلوس نایجر و کاندیدا آلبیکنس نداشت. سایر عصاره‌های N هگزان، پترولیوم بنزن و کلروفرمی نیزدر تمامی رقتها فاقد هر گونه اثری روی قارچها بودند.

در رقت mg/ml ۰/۵- ۴ و mg/ml ۰/۷۵- ۳ عصاره تام مقدار MIC برای قارچ تریکوفایتون منتاگروفایتس mg/ml ۱/۵ و برای قارچ میکروسپوروم کانیس mg/ml ۱ و قارچ اپیدرموفایتون فلوکوزوم mg/ml ۱ بود. این مقدار عصاره تام روی قارچهای آسپرژیلوس و کاندیدا نیز اثری نداشت (جدول ۲) .

در مورد عصاره‌های N هگزانی، پترولیوم بنزنی و کلروفرمی نیز هیچ گونه اثری روی هیچ یک از قارچها مشاهده نشد.

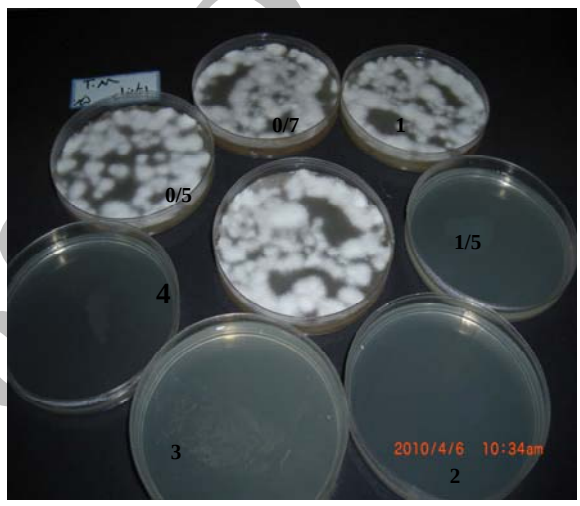
در مورد تعیین MFC نیز مقدار MFC = MIC بود یعنی برای ترایکوفایتون منتاگروفایتیس مقدار mg/ml ۱/۵ قارچ را به کلی از بین می‌برد و مقدار MFC برای میکروسپوروم کانیس نیز mg/ml ۱ بود و مقدار MFC اپیدرموفایتون فلوکوزوم نیز mg/ml ۱بود.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱. MFC وMICعصاره تام مورد سبزرویقارچ های میکروسپوروم کانیس، اپیدرموفایتون فلوکوزوم، ترایکوفایتون منتا گروفایتیس، آسپرژیلوس نایجرو کاندیدا آلبیکنس در رقتهایmg/ml۶۰۰-۳۰

عصاره تام مورد (mg/ml)	۶۰۰	۴۵۰	۳۳۷	۲۴۰	۱۲۰	۶۰	۳۰
میکروسپوروم کانیس	+	+	+	+	+	+	+
ترایکوفایتون منتاگروفایتیس	+	+	+	+	+	+	+
اپیدرموفایتون فلوکوزوم	+	+	+	+	+	+	+
آسپرژیلوس نایجر	-	-	-	-	-	-	-
کاندیدا آلبیکنس	-	-	-	-	-	-	-



a. ترایکوفایتون منتاگروفاتیس

b. میکروسپوروم کانیس

شکل ۱. اثر رقتهایmg/ml ۴-۰/۵ عصاره تام مورد سبز

جدول ۲. MFC وMIC عصاره تام مورد سبز در رقتهای mg/ml۴-۰/۵

عصاره تام مورد (mg/ml)	۴	۳	۲	۱/۵	۱	۰/۷۵	۰/۵
میکروسپوروم کانیس	-	-	-	-	-	+	+
ترایکوفیتون منتاگروفاتیس	-	-	-	-	+	+	+
اپیدرموفایتون فلوکوزوم	-	-	-	-	-	+	+
آسپرژیلوس نایجر	+	+	+	+	+	+	+
کاندیدا آلبیکنس	+	+	+	+	+	+	+

مطالعه حاضر نشان داد که عصاره تام هیدروالکلی مورد روی قارچهای ترایکوفایتون منتا گروفایتیس واپیدرموفایتون فلوکوزوم و میکروسپوروم کانیس تاثیر بسزایی دارد و دارای اثر کشندگی روی قارچهای فوق می‌باشد با این که رقت‌های مختلف بازدارنده عصاره برای هر کدام متفاوت بود اما می‌توان گفت که در کل عصاره تام مورد دارای تاثیر بازدارندگی و کشندگی چشمگیری روی قارچهای درماتوفیت است و سایر فراکشن‌های آن فاقد اثر بازدارندگی هستند در این تحقیق تحت هیچ شرایطی نتوانستیم اثر ضد قارچی عصاره تام را علیه آسپرژیلوس نایجر و کاندیدا آلبیکنس به اثبات برسانیم.

Archive of SID

www.SID.ir

در یک بررسی که توسط رسولی و همکاران صورت گرفته است با آنالیز GC-MC ترکیب شیمیایی اسانس مورد مشخص شده است. در این بررسی ۳۲ ترکیب در اسانس شناسایی شدند در این میان لیمونن، لینالول، پینن و ۱و۸ سینول اصلی‌ترین ترکیبات این اسانس بوده‌اند. همچنین در این مطالعه با روش دیسک دیفیوژن و تعیین MIC و MBC اثر آنرا بر اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس نشان داده‌اند (۱۰). Bonjar اثر عصاره متانولی برگ مورد را علیه برخی باکتریها از جمله استافیلوکوکها نشان داد (۱۱). اولیاء و همکاران نیز اثر اسانس مورد را در درمان تبخال مدل حیوانی بررسی کردند و دریافتند که این اسانس سبب به تاخیر افتادن تبخال می‌شود (۱۲).

نتایج حاصله از این پژوهش نشان دهنده اثر ضد قارچی عصاره مورد روی قارچهای ترایکوفایتون منتاگروفایتس، میکروسپوروم کانیس و اپیدرموفایتون فلوکوزوم می‌باشد و نشانگر وجود ترکیبات ضد قارچی در عصاره مورد است. این نتایج همگی در شرایط آزمایشگاهی بوده و احتیاج به تحقیقات و مطالعات بیشتری دارد امید است که با مطالعات بیشتر روی عصاره مورد در آینده بتوان از آن داروی مناسبی جهت درمان بیماری‌های کچلی و ... تهیه کرد.

تشکر و قدر دانی

بدین وسیله از جناب آقای دکتر امامی و خانم دکتر عدیمی که بی دریغ مرا در انجام این پروژه راهنمایی کردند کمال تشکر و قدر دانی را دارم.

منابع

1. Zaini F; Mehbod S; Emami M, (1999). Comprehensive Medical Mycology, University of Tehran publications, 1st edition.

2. Pakshir K ;Bahaedinie L ; Rezaei Z; Sodaifi M ; Zomorodian K, (2009). In vitro activity of six anti fungal drugs against clinically important dermatophytes.jundi shapur. j. Microbio. **2**(4): 158-163.

3. Torros B; Inza I; Guarra J, (2003). In vitro activities of the new antifungal drug Eberconazol and three other topical agents against 200 strains of dermatophytes. J. clin. Microbiol. **41**(11): 5209-11.

4. Sarifakioglue E; Seckin D; Demirbilek M; Can F, (2007). Invitro antifungal susceptibility patterns of dermatophyte strains causing tinea unguium .clinical and experimental dermatology Journal. **32**(6): 657-679.

5. Bonjar G.H, (2004). Screening for anti bacterial properties of some Iranian Plants against two strains of Escherichia Coli.Asian journal of plant sciences.; **3**(3):310-314.

6. Available from: URL:http://arizona.edu/pima/gardening/aridplants/Myrtus Communis.html

7. Amin GH, (1991). Popular Medicinal Plants of Iran, Ministry of Health publications, 1st edition.

8. Naseian R, (1997).Phytochemical and Antimicrobial studies on myrtus communis extract,doctor of pharmacy thesis,shiraz university of medical sciences.

9. Keivani s, (2006). In vitro evaluation of the susceptibility of dermatophytic and saprophytic fungi to Pistacia vera's pericarp extract, Microbiology MSc thesis**,** Islamic Azad University NorthTehran Branch**.**

10. Rasooli I ;Moosavi M. L ; Rezaee M.B ; Jaimand K, (2002) .Susceptibility of Micro organisms to Myrtus Communis L .Essential oil and its Chemical Composition .j.Agric .sci.Technol.; **4**, 127-133.

11. Bonjar G.H, (2004). Anti Bacterial Screening of Plants used in Iranian Folkloric Medicine.Fitoterapia. **75**(2):231-235.

12. Owlia P; Saderi H; Aghaee H; Yaraee R; Zayeri F, (2007). The effect of Myrtus communis L. Essential oil on treatment of Herpes Simplex infection in animal model. J. Medicinal and Aromatic Plants. **23**(2): 157-165.

Archive of SID

www.SID.ir