منورسادات موسوی زاده، استادیار میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل
عیسی غلامپور عزیزی، استادیار قارچ شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل
سمانه روحی، داتشجوی دوره دکترای اپیدمیولوژی مولکولی باکتری ها، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان و مرکز تحقیقات سلولی-مولکولی دانشگاه،
بیژن نوری،استادیار گروه اپیدمیولوژی و آمار زیستی، مرکز تحقیقات عوامل اجتماعی موثر بر سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کردستان
مولود گرجی، کارشناس ارشد میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل
شعبان حسن زاده میاندسته، کارشناس ارشد فیزیولوژی گیاهی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل
مهدی نوروزی، کارشناس ارشد علوم اجتماعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل
هادی علیجانی، دانشجوی دکترای دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل

# بررسی اثر ضد میکروبی عصاره برگ درخت افرا بر روی اشریشیا کلی، استرپتوکوک پیوژنز، کاندیدا آلبیکنس و آسپرژیلوس فومیگاتوس

**بخش های مختلف درخت افرا در درمان بیماری های عفونی و رفع درد کاربرد دارد. هدف از این بررسی مطالعه اثر ضد با کتریایی و ضد قارچی عصاره های آبی و الکلی برگ درخت افرا می باشد. غلظت های ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۵۰ میلی گرم در میلی لیتر از عصاره های الکلی و آبی برگ درخت افرا تهیه و اثر ضد قارچی و ضد باکتریایی آن ها به روش‌های دیسک و حداقل غلظت ممانعت کنندگی (MIC) مورد بررسی قرار گرفت. محاسبات آماری به وسیله نرم افزار SPSS۱۸ و آزمون های آماری آنالیز واریانس دو طرفه و بن فرونی (Bonferroni ) انجام گرفت. عصاره های آبی و الکلی برگ افرا اثر ضد قارچی نداشت. عصاره آبی نیز اثر ضد باکتریایی نداشت. بیشترین قطر هاله عدم رشد اشریشیاکلی و استرپتوکوک پیوژنز در غلظت ۵۰ میلی گرم در میلی لیتر از عصاره الکلی مشاهده شد که در اثر به کارگیری عصاره متانولی به ترتیب ۳۰ و ۲۰ میلی متر بودند و در اثر به کارگیری عصاره اتانولی نیز در غلظت ۵۰ میلی گرم در میلی لیتر بود که به ترتیب ۲۰ و ۳۰ میلی متر برای این دو باکتری تعیین شد. در مطالعه ما اثر ضد میکروبی عصاره برگ افرا بر باکتری ها ثابت شد و امید است در آینده با مطالعات بیشتر بتوان از آن به عنوان یک ماده ضد باکتریایی استفاده نمود.**

تحقیقات مختلف نشان داده است که تولیدات طبیعی نقش مهمی در علوم مربوط به داروسازی دارد. گیاهان همواره به عنوان یکی از منابع مهم درمانی و دارویی مطرح بوده اند و امروزه نیز افراد غالباً به درمان های سنتی اعتقاد دارند. بسیاری از درمان های رایج امروزی کاملاً یا به طور جزیی درون مایه طبیعی دارند. امروزه به علت استفاده بی رویه از داروهای ضد میکروبی در سال های اخیر مقاومت به انواع داروها در باکتری ها و قارچ ها به وجود آمده است و دانشمندان در تلاش به دنبال کشف عوامل ضد میکروبی جدید در منابع مختلف به خصوص گیاهان است [۳-۱]. با توجه به اینکه عوارض جانبی داروهای گیاهی از داروهای شیمیایی کمتر است استفاده از آن در درمان بیماری های عفونی رو به پیشرفت است. تقریبا حدود ۵۰۰ هزار نوع گونهٔ گیاهی در جهان وجود دارد که کمتر از هزار گونه از آن ها به عنوان گیاه دارویی نام گذاری و استفاده می شوند [٤]. از جمله باکتری ها و قارچ هایی که اثر ضد میکروبی گیاهان مختلف بر روی آن ها ثابت شده است اشریشیاکلی، استرپتوکوک پیوژنز، کاندیدا آلبیکنس و آسپرژیلوس فومیگاتوس را می توان نام برد. اشریشیاکلی عامل انواع عفونت ها ازجمله بیماری های اسهالی، عفونت های دستگاه ادراری، سپسیس و مننژیت و استرپتوکوک پیوژنز عفونت های گلو، زرد زخم و مخملک را به وجود می آورد [٦، ٥]. همچنین قارچ کاندیدا آلبیکنس عامل عفونت های جلدی و عمقی و آسپرژیلوس فومیگاتوس عامل بیماری های آسپرژیلوس مزمن نکروز دهنده، آسپرژیلوما و آسپرژیلوز آلرژیک برونکوپولمونری است [۸، ۷]. یکی از گیاهان که اثر ضد باکتری و ضد قارچی آن در مطالعات مختلف ثابت شده است بخش های مختلف درخت افرا (نام علمی Acer، درختی بلند قامت بوده و از خانواده Acera-ceae است. این درخت در جنگل های شمال ایران فراوان یافت می شود) است [۹]. همچنین از دیگرخواص درمانی گونه افرا می توان به رفع دردهای ضرب خوردگی، پیچیدگی و دررفتگی دست و پا، برطرف کردن اختلالات مجاری ادرار، رفع سرفه و ناراحتی های عصبی اشاره کرد. [۱۰]. ویو و همکارانش در سال ۲۰۱۰ در چین نشان دادند عصاره اتانولی برگ درخت افرا دارای اثر ضد باکتریایی در برابر ٢٤ سویه از باکتری های گرم مثبت و منفی از جمله اشریشیاکلی بود [۹]. تریایولت و همکاران در سال ۲۰۰۵ درکانادا نشان دادند که شربت افرا و شیره افرا اثر مهاری روی باکتری Salmonella typhimurium داشت [۱۱]. دیکس در ۱۹۷۳ در انگلستان نشان داد برگ های درخت افرا حاوی ماده ضد قارچ است. در این تحقیق مشخص شد عصاره آبی برگ این گیاه دارای اثر مهاری روی، Cladosporium herbarum و Cladosporium sphaerospermum و Cylindro-carbon radiclcol است [۱۲]. در مطالعه حاضر اثر ضد میکروبی عصاره های آبی و الکلی برگ درخت افرا بر روی باکتری های اشرشیا کلی، استرپتوکوک پیوژنز و قارچ های کاندیدا آلبیکنس و آسپرژیلوس فومیگاتوس در محیط

آزمایشگاهی به روش دیسک و حداقل غلظت ممانعت کنندگی Minimum Inhibitory Concentration (MIC) مورد بررسی قرار گرفته است.

## روش کار

### روش بررسی

این مطالعه تجربی-آزمایشگاهی در آزمایشگاه میکروب شناسی و شیمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل در استان مازندران، برای تعیین خاصیت ضد قارچی و ضد باکتریایی عصاره برگ درخت افرا به روش دیسک و همچنین تعیینMIC انجام شد.

### جمع آوری نمونه

برگ تازه درخت افرا از روستا های اطراف شهرستان بابل در استان مازندران جمع آوری و به آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل منتقل شد. نمو نه های جمع آوری شده به طور کامل چند بار با آب تمیز شستشوداده و بعد از حذف کامل آب به طور لایه لایه در فضای گرم و سایه قرار داده و بعد از یک ماه توسط جریان هوای گرم در دمای اتاق (۲۷ درجه سانتی گراد) به طور کامل خشک شد. سپس نمونه ها به طور جداگانه توسط آسیاب برقی پودر شدند تا عمل عصاره‌گیری راحت تر و بهتر انجام گیرد. این پودرها جهت عصاره‌گیری به آزمایشگاه شیمی انتقال داده شدند [۱۳].

### کشت قارچ

نمونه کاندیدا آلبیکنس (ATCC 10231) و آسپرژیلوس فومیگاتوس(PTCC 5009) جهت انجام آزمایش توسط دانشگاه علوم پزشکی مازندران ارائه شد. کشت این قارچ ها به صورت خطی در محیط سابورودکستروز آگار(Sabouraud Dextrose Agar)SDA شامل آنتی بیوتیک های کلرامفنیکول و جنتامایسین برای جلوگیری از رشد باکتری ها صورت گرفت و سپس به مدت ۴۸ ساعت در ۳۵ درجه سانتی گراد انکوبه شد. در مرحله بعد کلونی ها به وسیله بلودومتیلن رنگ آمیزی شدند. شناسایی کاندیدا آلبیکنس و آسپرژیلوس فومیگاتوس توسط تست های تشخیص آزمایشگاهی مانند رنگ آمیزی پریودیک اسید شیف (PAS)، تخمیر قند و آزمون جذب به وسیله کیت مخمر Rap ID، مشاهده میکروسکوپی لولـه زایـای بلند، هایف، بلاستوکونیدی و کلامیدیاکونیدی و همچنین توسط کلونی های ایجاد شده توسط قارچ های رشته ای، تست اسلاید کالچر و ساختمان اسپورزایی آنها مورد بررسی قرار داده شد [۱۵، ۱۴]. پس از تایید نهایی کاندیدا آلبیکنس و آسپرژیلوس فومیگاتوس در گروه قارچ شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل، مطالعه بر روی آن ها انجام شد.

### کشت باکتری

باکتری استرپتوکوک پیوژنز(ATCC 1447) و اشریشیاکلی(NCTC1290) نیز جهت انجام آزمایش توسط دانشگاه علوم پزشکی مازندران ارائه شد. محیط های کشت مولرهینتون آگار، نوترینت آگار، بلاد آگار و برین هارت اینفیوژن براث، جهت کشت و شناسایی باکتری استرپتوکوک پیوژنز به کار رفت. همچنین همولیز کامل در محیط کشت بلاد آگار، رنگ آمیزی گرم، مثبت بودن آزمون تشخیصی باسیتراسین و آزمون منفی CAMP جهت شناسایی این باکتری مورد استفاده قرار گرفت (۱۶). جهت کشت اشریشیاکلی نیز از محیط کشت بلادآگار و مک کانکی آگار، ائوزین متیلن بلو (Eosin methylene blue agar (EMB، تریپل شوگر ایرون آگار (Triple sugar iron agar (TSI و تست تخمیر قند، کاهش pH ، تست ایندول، متیل رد، وگس پرسکوئر و معرف سیترات Indole، Methyl red، Voges–Proskauer ، Citrate (IMVIC) استفاده شد [۱۷].

### تهیه سوسپانسیون قارچی و باکتریایی

از کلونی های تازه باکتری ها و قارچ ها تک کلونی برداشته و به ترتیب در لوله های حاوی ۵ میلی لیتر محیط کشت لاکتوز براث (اشرشیا کلی)، سرم فیزیولوژی استریل (استرپتوکوک پیوژنز)، سابارودکسترو براث ( کاندیدا آلبیکنس و آسپرژیلوس فومیگاتوس) کشت داده شد. سپس به مدت ۲٤ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرار داده شد تا میکروب ها رشد کنند. در مرحله بعد باکتری و قارچ های مورد نظر در ۵ میلی لیتر سالین نرمال (Normal Saline) رقیق و سپس به مدت ۱۵ ثانیه ورتکس شد و سوسپانسیون میکروبی به طور جداگانه برای هر گونه قارچ و باکتری به اندازه $1/5 \times 10^8$ CFU/ml بر اساس استاندارد ۰/۵ مک فارلند تنظیم شد [۱۸، ۶].

### عصاره‌گیری

از روش پرکولاسیون Percolation جهت آماده سازی عصاره ها استفاده شد. ۲۵ گرم از پودر برگ افرای خشک شده با ۲۵۰ میلی لیتر آب مقطر در یک ارلن مخلوط و به مدت ۳ دقیقه به طور مداوم تکان داده شد. سپس مخلوط مورد نظر

در دمای اتاق (۲۷ درجه سانتی گراد) برای ۲۴ ساعت نگه داری شد. کاغذ صافی No.1 جهت صاف کردن مخلوط استفاده شد. سپس مخلوط یا به عبارتی عصاره صاف شده در در دستگاه روتاری RE30 Rotary Evaporator برای حذف حلال قرار داده شد. در مرحله بعد عصاره آبی در انکوباتور (۴۰ درجه سانتی گراد) خشک شد. در آخرین مرحله از عصاره گیری آبی محلول استوک از ۱ گرم عصاره آبی خشک شده در غلظت نهایی ۵ میلی لیتر دی متیل سولفوکساید (DMSO) Dimethyl Sulphoxide حل و به وسیله سرنگ میلی پور با فیلترهایی به قطر ۰/۲۲ میکرون عبور داده و صاف شد. جهت عصاره گیری الکلی نیز همانند عصاره گیری آبی عمل کرده و ۲۵ گرم از پودر برگ خشک شده گیاه دو ارلن جدا ریخته شد. یکی از ارلن ها حاوی ۲۵ گرم پودر برگ خشک شده افرا، ۱۰۰ میلی لیتر متانول، ۱۰۰ میلی لیتر دی اتیل اتر و ۱۰۰ میلی لیتر N-هگزان (N-Hexane) جهت آماده سازی عصاره متانولی و ارلن بعدی حاوی ۲۵ گرم پودر برگ خشک شده، ۱۰۰ میلی لیتر اتانول۸۰٪، ۱۰۰ میلی لیتر دی اتیل اتر و ۱۰۰ میلی لیتر N-هگزان (N-Hexane) جهت آماده سازی عصاره اتانولی بود. سپس ارلن ها به مدت ۳ دقیقه به طور مداوم تکان داده و در دمای اتاق (۲۷ درجه سانتی گراد) برای ۲۴ ساعت نگه داری شد. در این مرحله نیز با استفاده از کاغذ صافی No.1 عصاره های الکلی صاف و در دستگاه روتاری برای حذف حلال قرار داده شد و سپس در انکوباتور (۴۰ درجه سانتی گراد) خشک شد. ۱ گرم از هر کدام از عصاره های الکلی (اتانولی و متانولی) خشک شده به طور جداگانه در غلظت نهایی ۵ میلی لیتر DMSO حل و به وسیله سرنگ میلی پور با فیلتر به قطر ۰/۲۲ میکرون صاف شد [۲۰، ۱۹].

## منابع


1) Patel M, Coogan MM, Antifungal activity of the plant Dodonaea viscose var. angustifolia on Candida albicans from HIV-infected patients, Journal of Ethnopharmacology, 2008; 118 (1):173–176.

2) Dong LP, Ni W, Dong JY, Li JZ, Chen CX, Liu HY, A New Neolignan Glycoside from the Leaves of Acer truncatum, Molecules, 2006, 11 (12): 1009-1014.

3) Mehrabian S, Majd A, Jonoubi P, Kheiri A, A study of the antimutagenic effects of different extracts of Aloe vera leaf gel and latex using Ames test, Arak Medical University Journal (Rahavard Danesh), 2012,15 (2) :100-106. (In Persian)



فرم اشتراک ماهنامه تشخیص آزمایشگاهی ۱۳۹٤

نام و نام خانوادگی: ..... رشته/تخصص: ..... کد ملی: .....

نام محل کار: ..... مسئولیت: .....

نشانی: .....

کدپستی: ..... تلفن: ..... فاکس: .....

موبایل: ..... ایمیل: .....

♦تکمیل تمام موارد فوق الزامی است♦

| | | | |
|---|---|---|---|
| اشتراک یکساله (با پست عادی) | ۶۰۰,۰۰۰ ریال | اشتراک ۶ ماهه (با پست عادی) | ۳۰۰,۰۰۰ ریال |
| اشتراک یکساله (با پست سفارشی) | ۷۲۰,۰۰۰ ریال | اشتراک ۶ ماهه (با پست سفارشی) | ۳۶۰,۰۰۰ ریال |

اشتراک **از طریق سایت eshterak.ir** (وزارت ارشاد) برای یک سال ۳۶۰/۰۰۰ ریال خواهد بود (صرفا برای تهران).

مبلغ اشتراک یکساله خارج از کشور با پست سفارشی ۳۶۰ دلار است.

لطفاً برای شروع یا تمدید اشتراک، رسید فیش واریزی را همراه با فرم تکمیل شده فوق به شماره زیر فاکس نمایید.

کارت بانک پاسارگاد به شماره کارت ۹۱۵۲-٤۰۷۲-۲۹۱۰-۵۰۲۲ و شماره حساب ۱-۱۲۰۸٤۲۳٤-۸۰۰۰-۲۰۶ به نام آقای محمود اصلانی

ایمیل: m_aslani۳٤۰۷@yahoo.com نمابر: ۸۹۷۷۶۷۶۹ تلفن: ۰۹۱۲۷۳۳۳٤۰۷