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 افرابرروی اشریشیا کلی، استرپتوکوک پیوژنز، کاندیدا آلبیکنس و آسپرژیلوس فومیگاتوس-بخش۲

بخش نخست این مقاله درمجله شماره ۱۱۸ چاپ شده است. دراین شماره بخش دوم و بخش پایانی آن را می خوانید.

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 است. 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 افزارSPSS۱۸ و آزمون های آماری آنالیز واریانس دو طرفه و بن فرونی (Bonferroni) انجام گرفت. عصاره های آبی و الکلی برگ افرا اثر ضد قارچی نداشتند. 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 بکارگیری 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 شدند. 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 کرد.

تست تعیین حساسیت به عصاره با استفاده از دیسک

سوسپانسیون (CFU/ml ۱۰^۸ ×۱/۵) کاندیدا آلبیکنس و آسپرژیلوس فومیگاتوس به صورت کشت چمنی روی محیط SDA و سوسپانسیون اشریشیاکلی و استرپتوکوک پیوژنز به ترتیب روی محیط مولر هینتون آگار و مولر هینتون بلاد آگار کشت داده شد. از هر کدام عصاره های آبی، اتانولی و متانولی رقت های متوالی در غلظت های۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۵۰ میلی گرم در میلی لیتر تهیه و سپس حجم ۱۵ میکرولیتر از هر کدام از رقت های تهیه شده به طور جداگانه به روی دیسک‌های استاندارد خالی وارد شد. دیسک های حاوی عصاره در ۴۵ درجه سانتی‌گراد گذاشته شد تا خشک شود. سپس دیسک ها بوسیله پنس استریل روی محیط کشت SDA حاوی کلرامفنیکل جهت جلوگیری از رشد باکتری ها و محیط مولر هینتون آگار و محیط مولر هینتون بلاد آگار حاوی آنتی بیوتیک سیکلوهگزمید جهت جلوگیری از رشد قارچ قرار داده شد. در این مرحله کنترل مثبت در محیط کشت قارچ دیسک های آمفوتریسین B (۱۰ میکروگرم)، در محیط کشت اشریشیاکلی جنتامایسین (۱۰ میکروگرم) و در محیط کشت استرپتوکوک پیوژنز پنی سیلین (۱۰ میکروگرم) (پادتن طب، ایران) بود. کنترل منفی شامل دیسک حاوی حجم ۱۵ میکرولیتر از DMSO ۵٪ بود. پلیت های کشت داده شده برای ۴۸ ساعت در ۳۵ درجه سانتی گراد انکوبه شدند (برای هرکدام از قارچ های و باکتری های مذکور محیط کشت جداگانه در نظر گرفته شد و آزمایشات برای هرکدام ۳ مرتبه به طور مستقل تکرار شد). هاله عدم رشد بر اساس استاندارد CLSI محاسبه شد [۲۱، ۲۰].

تعیین MIC

ابتدا سوسپانسیون میکروبی از هرکدام از قارچ ها و باکتری های نام برده معادل ۰/۵ مک فارلند آماده شد. سپس ۱۱ لوله تهیه و از عدد ۱ الی ۱۱ شماره بندی شد، لوله ۱۱ به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. در مرحله بعد ۱ میلی لیتر از سابارو دکسترو براث Sabouraud Dextrose Broth (SDB) به لوله های در نظر گرفته شده جهت تعیین MIC قارچ ها، ۱ میلی لیتر از لاکتوز براث به به لوله های در نظر گرفته شده جهت تعیین MIC

اشریشیا کلی و ۱ میلی لیتر از سرم فیزیولوژی استریل به لوله های در نظر گرفته شده جهت تعیین MIC استرپتوکوک پیوژنز اضافه شد و بر اساس ۰/۱ سریال رقت، ۱ میلی لیتر از عصاره های برگ افرا به طور جداگانه به همه لوله ها افزوده شد (برای هر عصاره آبی، اتانولی و متانولی یک سری ۱۱ تایی از لوله در نظر گرفته شد). سپس ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون قارچ ها و باکتری های مذکور را به لوله های مربوط به خود اضافه و در ۳۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. بنابراین بر اساس سریال رقت MIC در لوله بطور مشاهده ای با توجه به وجود کدورت یا عدم وجود کدورت تعیین شد [۲۲].

محاسبه آماری

نرم افزارSPSS18 (SPSS Inc، Chicago، USA II) و روش آنالیز واریانس دو طرفه جهت بررسی اثر میزان غلظت و انواع عصاره بر قطر هاله عدم رشد و از آزمون تعقیبي بن فرونی (Bon-ferroni) جهت مقایسه دوتایی در روش دیسک در باکتری ها استفاده شد($p < ۰/۰۵$).

یافته ها

نتایج حاصل از سه تکرار برای هر آزمایش جهت تعیین اثر ضد میکروبی عصاره آبی و الکلی برگ درخت افرا بر قارچ ها و باکتری های مورد آزمایش نشان داد که قارچ های کاندیدا آلبیکنس و آسپرژیلوس فومیگاتوس نسبت به عصاره های مختلف آبی و الکلی برگ افرا هیچ حساسیتی نداشتند و در هیچکدام از موارد هاله عدم رشد مشاهده نشد. همچنین عصاره آبی برگ افرا روی اشریشیا کلی و استرپتوکوک پیوژنز اثری نداشت. اما نتایج حاصل از به کارگیری عصاره الکلی برگ درخت افرا در روش دیسک بر روی باکتری ها نشان داد اشریشیاکلی و استرپتوکوک پیوژنز به عصاره فوق واکنش نشان داده اند و هاله عدم رشد اطراف دیسک مشاهده گردید. بیشترین قطر هاله عدم رشد اشریشیاکلی و استرپتوکوک پیوژنز در غلظت ۵۰ میلی گرم در میلی لیتر از عصاره متانولی مشاهده شد که به ترتیب ۳۰ و ۲۰ میلی متر بودند. همچنین بیشترین قطر هاله عدم رشد اطراف اشریشیاکلی واسترپتوکوک پیوژنز در اثر بکارگیری عصاره اتانولی نیز در غلظت ۵۰ میلی گرم در میلی لیتر بود که به ترتیب ۲۰ و ۳۰ میلی متر تعیین شد (جدول ۱).

نتایج آماری

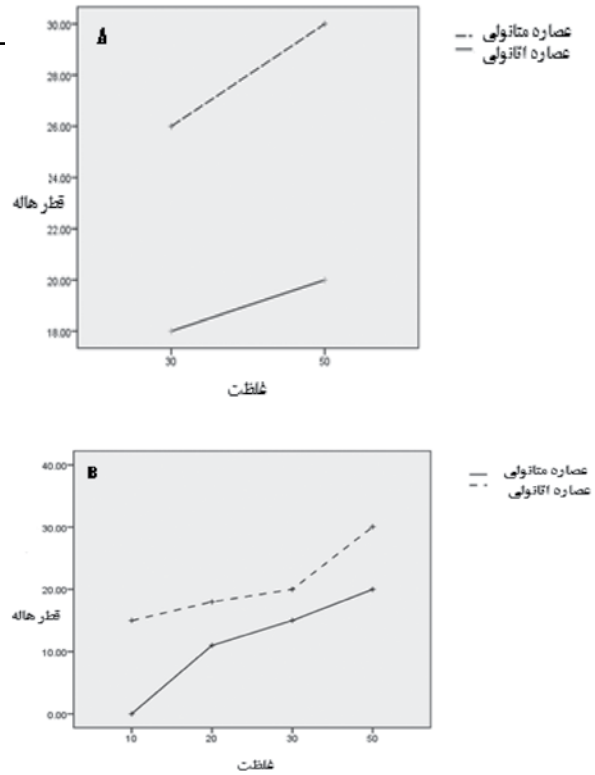
محاسبات آماری با استفاده از روش آنالیز واریانس برای باکتری اشریشیاکلی نشان داد که غلظت و عصاره بر قطر هاله عدم رشد

عصاره	میکروارگانیسم	غلظت mg/ml			
		۵۰	۳۰	۲۰	۱۰
متانولی	اشریشیاکلی	۳۰mm	۲۶ mm	–	–
	استرپتوکوک پیوژنز	۲۰mm	۱۵mm	۱۱mm	–
	کاندیدا آلبیکنس	–	–	–	–
	آسپرژیلوس فومیگاتوس				–
اتانولی	اشریشیاکلی	۲۰mm	۱۸ mm	–	–
	استرپتوکوک پیوژنز	۳۰ mm	۲۰ mm	۱۸ mm	۱۵ mm
	کاندیدا آلبیکنس	–	–	–	–
	آسپرژیلوس فومیگاتوس	–	–	–	–
آبی	اشریشیاکلی	–	–	–	–
	استرپتوکوک پیوژنز	–	–	–	–
	کاندیدا آلبیکنس	–	–	–	–
	آسپرژیلوس فومیگاتوس	–	–	–	–

جدول۱) میانگین قطر هاله ممانعت از رشد (میلی متر mm) نسبت به غلظت های معین (میلی گرم در میلی لیتر mg/ml) از عصاره های متانولی، اتانولی و آبی برگ افرا

اشریشیاکلی در روش دیسک تاثیر معنی داری دارد و بین قطر هاله عدم رشد و غلظت های م دو عصاره متانولی و اتانولی با هم تفاوت معناداری دارند و عصاره در روش دیسک با افزایش غلظت، میانگین سطح هاله در اثر به کارگیری هر دو عصاره افزایش می یابد ($p < ۰/۰۳$).

همچنین نتایج حال از آزمون بن فرونی نشان داد که در روش دیسک بین میزان تاثیر عصاره های متانولی و اتانولی بر قطر هاله عدم رشد اختلاف معنی داری وجود داشت ($p < ۰/۰۵$). در روش دیسک نتایج حاصل از این آزمون در مورد میزان غلظت های مختلف ثابت کرد که تفاوت معناداری بین دو غلظت ۳۰ و ۵۰ آشکار نشد ($p < ۰/۰۲$). همچنین اثر غلظت و عصاره با استفاده از آزمون آنالیز واریانس دوطرفه برای باکتری استرپتوکوک پیوژنز نشان داد که غلظت های دو عصاره متانولی و اتانولی با یکدیگر تفاوت معناداری دارند ($p < ۰/۰۰۱$). بنابراین نتیجه می گیریم که از بین چهار غلظت موجود، قطر هاله برای حداقل دو هاله تفاوت معناداری با هم دارند. همچنین مقایسه های زوجی و استفاده از آزمون بن فرونی نشان داد که



شکل ۱) نمایش رابطه خطی بین قطر هاله عدم رشد (محور عمودی) و غلظت های مختلف عصاره برگ درخت افرا (محور افقی) در اشریشیاکلی (A) و استرپتوکوک پیوژنز (B)؛ فاصله خطوط از یکدیگر تایید کننده تفاوت معنی دار سه عصاره با یکدیگر است.

میانگین قطر هاله برای دو غلظت ۱۰ و ۵۰ تفاوت معناداری با هم دارد (p <۰/۰۰۱)و ۲۰ و ۵۰ تفاوت معناداری با هم داشتند (p <۰/۰٤). تحلیل آنالیز واریانس نشان داد که بین قطر هاله عدم رشد و غلظت های مختلف اتانولی و متانولی در روش دیسک یک رابطه خطی برقرار است و با افزایش غلظت، میانگین سطح هاله برای هریک از دو عصاره بصورت خطی افزایش می یابد (جدول ۱) (شکل ۱).

نتایج حاصل از تعیین MIC عصاره های برگ افرا نیز نشان داد که بیشترین MIC مربوط به عصاره های متانولی و اتانولی $۱۰^{۳}$ × ۲۵ میلی گرم در میلی لیتر بود (جدول ۲).

بحث

تحقیقات مختلف نشان داده است که پلی فنل های گیاهی و تانن ها از طریق اتواکسیداسیون و تولید پراکسید هیدروژن علت مهار رشد میکروب ها می شوند (۶). در مطالعه ما اثر ضد باکتریایی عصاره برگ درخت افرا بر روی رشد اشریشیاکلی و استرپتوکوک پیوژنز ثابت شد اما اثر ضد قارچی مشاهده نشد. دونگ و همکاران در سال ۲۰۰۶ طی تحقیقی نشان دادند که ترکیبات فنلی و گلیکوزیدی جدا شده از برگ افرا دارای اثرات ضد میکروبی در برابر استافیلوکوک اورئوس می باشد [۲]. در مطالعه ما نیز عصاره های الکلی گرفته شده از برگ این درخت اثر ضد باکتریایی نشان دادند. تحقیقات نشان داده که قسمت های مختلف گیاهان مانند: پوست، برگ، ساقه، میوه و ریشه دارای مواد آنتی اکسیدان می باشند. مواد آنتی اکسیدان دارای ترکیبات فنلی بوده و دارای اثر دارویی می باشند [۲۳]. در مطالعه دیگر که توسط احمدی اسبچین و همکارانش در سال ۲۰۱۳ انجام شد مشخص شد که عصاره متانولی و اتانولی برگ درخت ازگیل اثر ضد باکتریایی روی سودوموناس آئروژینوزا، استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیاکلی داشتند و MIC آن ۱۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر تعیین شد [۲۴]. در مطالعه ما MIC عصاره متانولی و اتانولی برای اشریشیاکلی $۱۰^{۳}$ × ۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر تعیین شد که از مطالعه احمدی اسبچین بیشتر بوده و بنابراین حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره برگ ازگیل بیشتر می باشد. بنابراین نتایج می توان گفت برخی از گیاه دارای میزان ترکیبات ضد میکروبی بیشتر در برگ یا سایر قسمت های گیاه می باشند [۲۵، ۲۳]. نیستانی و خلجی در سال ۲۰۰۷ نشان دادند عصاره اتانولی برگ چای سبز بر رشد باکتری استرپتوکوکوس پایوژنز اثر مهاری داشتند. در مطالعه ما نیز عصاره اتانولی برگ افرا اثر ضد رشد بر روی استرپتوکوکوس پیوژنز داشتند و MIC آن $۱۰^{۳}$ × ۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر محاسبه شد. پلی فنل های گیاهی و سایر ترکیبات ضد میکروبی موجود در گیاه می توانند با تولید پراکسید هیدروژن و آسیب به دو لایه غشا اثرات مهاری خود را بر رشد میکروب ها اعمال می کنند [۱۶]. در مطالعه دیگری که توسط زارعی و همکارانش در سال ۲۰۱۳ انجام شد اثر ضد قارچی عصاره الکلی سه گیاه ختمی، مرزه بختیاری و چویر بر روی باکتری های اشریشیاکلی، کلبسیلا پنومونیه، استافیلوکوکوس اورئوس و استرپتوکوکوس آگالاکتیه اثر داده شد که بر اساس نتایج به دست آمده از مطالعه زارعی نشان که داد بالا رفتن غلظت عصاره الکلی هر سه گیاه سبب افزایش در قطر هاله ممانعت از رشد باکتری ها شده بود [۲۶]. بنابراین این نکته قابل توجه است که غلظت های

میکروارگانیسم	اشریشیاکلی	استرپتوکوک پیوژنز	کاندیدا آلبیکنس	آسپرژیلوس فومیگاتوس
عصاره				
متانولی	۲۵×۱۰^{۳}	۱۲۵×۱۰^{۲}	–	–
اتانولی	۲۵×۱۰^{۳}	۲۵×۱۰^{۳}	–	–
آبی	–	–	–	–

جدول۲) میزان MIC (میلی گرم در میلی لیتر) عصاره های برگ درخت افرا بر قارچ ها و باکتری های مورد آزمایش

مختلف عصاره های گیاهی اثرات متفاوت روی رشد میکروب ها دارند و با افزایش غلظت اثر میکروب کشی افزایش پیدا می کند. بنابراین تفاوت در میزان و مهار رشد میکروب ممکن است به علت کاربرد میزان متفاوتی از غلظت های عصاره گیاه مورد نظر باشد [۲۷]. همچنین بهالودیا و شوکلا در سال ۲۰۱۱ گزارش دادند که عصاره هیدروالکلی گیاه کاسیا فیستولا بر روی رشد قارچ های، کاندیدا آلبیکنس و آسپرژیلوس نایجر موثر واقع و هاله مماعت از رشد اطراف قارچ های مذکور دیده شد [۲۸]. در مطالعه حاضر عصاره های آبی و الکلی برگ درخت افرا اثر ضد قارچی از خود شان ندادند. تحقیقات نشان داده است که ترکیبات گیاهی در عصاره های گیاهان متفاوت فعالیت و مکانیسم ضد باکتریایی مشابه دارند، اما هرکدام هدف اختصاصی داشته و برروی دیواره سلول، غشا سیتوپلاسمی، سیتوپلاسم، میتوکندری، DNA و ایجاد آپوپتوزیس ممکن است اثر بگذارند. با برای تغییر در هرکدام از موارد نام برده بطوری که ماده ضد میکروبی نتواند اثر خود را اعمال کند موجب مقاوت میکروب در مقابل ماده ضد میکروبی می شود [۲۹].

نتیجه گیری

امروزه به علت مقاوت ایجاد شده توسط میکروب ها به ترکیبات گیاهی توجه زیادی شده است و در اکثر نقاط جهان مورد استفاده قرار می گیرد. در مطالعه ما نیز اثر ضد میکروبی عصاره برگ افرا بر باکتری ها ثابت شد، اما اثر ضد قارچی از خود نشان نداند. با توجه به نتایج ذکر شده تحقیقات بیشتری مورد نیاز است تا بتوان ترکیبات برگ درخت را استخراج نموده و اثر ضد میکروبی هرکدام از آ ن ها را در محیط های in-vivo و in-vitro مورد آزمایش قرار داده تا بتوان در مقیاس وسیع تر و مطمئن تر از آن ها استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مسوولان دانشگاه و کارشناسان محترم آزمایشگاه که ما را در انجام این طرح مصوب در دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل یاری نمودند تشکر می گردد (کد طرح: ۵۱۵۶۱۹۱۰۷۱۷۰۰۷).

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)

4) Kumar Shee A, Raja RB, Sethi D, Kunhambu A, Arunachalam KD, Studies on the antibacterial activity potential of commonly used food preservatives, International Journal of Engineering Science and Technology, 2010, 2(3): 264-269.

5) Min BR, Pinchak WE, Merke R, Walker S, Tomita G, Anderson RC, Comparative antimicrobial activity of tannin extracts from perennial plants on mastitis pathogens, Scientific Research and Essay, 2008; 3 (2), 066-073.

6) Dubey D, Sahu MC, Rath R, Paty BP, Debata NK, Padhy RN, Antimicrobial activity of medicinal plants used by aborigines of Kalahandi, Orissa, India against multidrug resistant bacteria, Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2012, 2 (2): S846-S854.

7) Hosseini N, Bayat M, Roudbarmohammadi S, Identification of molecular pattern of indoor & outdoor of 2 species Aspergillus (Fumigatus & Flavus) in the hospital, Journal of Microbial Biotechnology, 2011; 3 (10) , 15-22. (In Persian)

8) Karahan ZC, Guriz H, Agirbasli H, Balaban N, Gocmen JS, Aysev D, et al, Genotype distribution of Candida albicans isolates by 25S intron analysis with regard to invasiveness, Mycoses, 2004, 47 (11-12):465-469.

9) Wu D, Wu XD, You XF, Ma XF, Tian WX, Inhibitory effects on bacterial growth and beta-ketoacyl-ACP reductase by different species of maple leaf extracts and tannic acid, Phytotherapy Research, 2010, 24 (1): 35-41.

10) Espahbodi K, Ghorbanli M, Effect of site conditions and tree morphology on maple seed physiology, Pajouhesh & Sazandegi, 2008, 20 (4): 148-154. (In Persian)

11) Thériault M, Caillet S, Lacroix M, Antioxidant, antiradical and antimutagenicactivities of phenoliccompoundspresent in maple products, Food Chemistry, 2006, 98(3) 490–501.

12) DIX NJ, Identification of a Water-soluble Fungal Inhibitor in the Leaves of Acer platanoides L, Annals of Botany, 1974,