مطالعات علوم زیستی و زیست فناوری
دوره ۱۰، شماره ۱، بهار ۱۴۰۳
صفحات ۱۶۸-۱۵۷

Online ISSN: ۴۴۹۳-۲۴۷۶
Print ISSN: ۲۰۲۰-۲۵۳۸
www.irijournals.com

بررسی اثرات ضد قارچی عصاره‌های آبی و الکلی گل همیشه‌بهار و مقایسه آن با داروهای ضد قارچی

فاطمه اسدی[۱]، عیسی غلامپور عزیزی[۲]، امیرحسین اسماعیلی[۳*]

[۱] دانش‌آموخته دانشکده پیراپزشکی، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران
[۲] استادیار گروه قارچ‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران
[۳*] استادیار گروه بیوشیمی، دانشکده پیراپزشکی، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران (نویسنده مسئول مکاتبات)

چکیده

گل همیشه‌بهار از خانواده کاسنیان است که از آن در درمان اختلالات پوستی، درد و نیز به‌عنوان باکتری‌کش، ضدعفونی‌کننده و ضدالتهاب استفاده شده است. در این مطالعه اثر کشندگی گل مزبور با غلظت‌های مختلف بر قارچ‌های *آسپرژیلوس فلاووس و مالاسزیا فورفور* در شرایط آزمایشگاهی ارزیابی شدند. نتایج MICعصاره اتانولی، متانولی و آبی گل همیشه‌بهار روی *آسپرژیلوس فلاووس* به ترتیب ۱۰، ۱۰ و ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و MFC آن ۲۰، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. برای MIC *مالاسزیا فورفور* به ترتیب ۲۰، ۲۰ و ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و MFC آن ۳۰، ۳۰ و ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. نتایج هاله عدم رشد در روش دیسک و چاهک قابل توجه بوده ولی نسبت به داروهای ضد قارچی فلوکونازول و کلوتریمازول کمتر بود. عصاره‌های آبی و هیدرو الکلی گل همیشه‌بهار در شرایط آزمایشگاهی اثر بازدارندگی بر روی سویه های مورد مطالعه داشت.

واژه های کلیدی: گل همیشه‌بهار، *آسپرژیلوس فلاووس*، *مالاسزیا فورفور*

۱-مقدمه

طبق گفته سازمان جهانی بهداشت، مقاومت ضد میکروبی یکی از ۱۰ تهدید جهانی بهداشتی در سراسر جهان به دلیل سوء استفاده از آنتی بیوتیک ها، همچنین دلیل اصلی عدم کارایی برخی داروهای ضد باکتری در موارد خاص است (World Health Organization Newsroom, 2021). طب سنتی نیز داروهای جدید مشتقات گیاهی را به طب مدرن ارائه کرده است. تجدید علاقه به گیاهان دارویی پزشکی تا حد زیادی ناشی از پی بردن به اثرات سوء است که سایر سیستم ها بر انسان وارد می کنند (Gertsch 2011). گل همیشه‌بهار (*Calendula officinalis* L.) گیاهی علفی چند ساله است متعلق به راسته Calenduleae و خانواده Asteraceae است. بسیاری از گیاهان این تیره از جمله گل همیشه بهار تا مدت ها به عنوان گیاهی زینتی کشت می شدند، تا اینکه خواص دارویی آن شناخته شد و به عنوان گیاه دارویی مورد استفاده قرار گرفت (Baghaeifar et al., 2019). به طور گسترده در مناطق معتدل در سراسر جهان کشت می شود. برداشت از اوایل تا اواسط مرداد انجام می شود و تا یخبندان های پاییزی گلدهی ادامه دارد. ساقه هوایی افراشته منشعب و دارای پرزهای غده‌ای گل آن زردرنگ می‌باشد. گیاهی علفی، یک‌ساله دارای ساقه‌ای به طول ۲۰ تا ۵۰ سانتی‌متر است، برگهایی ساده بیضوی، دراز، پوشیده از کرک، با کناره‌های موجدار و به رنگ سبز، مایل به قهوه‌ای دارد (Ahmad et al., 2012). این گیاه حاوی مقادیر کم اسانس روغنی فرار، ساپونین، رزین، اسیدهای آلی، کالندولین، صمغ، مواد لعابی، آلبومین، اینولین، اسیدسالیسیلیک، اسیدلوریک، اسیدپالمیتیک می باشد و غنی ترین منبع فلاونوئیدها، به ویژه آگلیکون و گلیکوزیدهای فلاونول است (ایزورامنتین، کوئرستین)، ساپونوزیدها، لیپیدها (استرول ها و کاروتنوئیدها)، اسیدهای آلی و ساکاریدها (Saleem, 1986). اثرات دارویی عصاره این گیاه اثر شامل ضدالتهاب در درمان خشکی و التهاب پوست، درمان سلولیت، دیابت، کاهش کلسترول و اص آنتی باکنریال می باشد (Baghaeifar et al., 2019). فرآورده‌های حاوی کالاندولا نیز به طور موثر برای درمان مشکلات پوستی استفاده می‌شوند و می‌توانند برای هموروئید، شقاق مقعد، ورم پستان، کیست‌های چربی، زرد زخم یا سایر التهابات استفاده شوند (Arora et al., 2013). دمنوش گل همیشه‌بهار برای غرغره، شستشوی چشم و برای درمان ورم ملتحمه، بثورات پوشک، هموروئید، استوماتیت و بیماری های التهابی مخاط استفاده می شود. گیاه همچنین به عنوان ضد تشنج، انرژی زا، ضدعفونی‌کننده، ادرار آور، رقیق کننده خون، ضد استفراغ، ضد زخم، ضد اسپاسم، ضدالتهاب و کرم زدایی مورد استفاده قرار گرفته است (Salehi-Sormaghi, 2006: Pazhohideh et al., 2018). ماده مؤثره و اثر بخش آن هلنالین است که موجب مهار فاکتور کپی‌برداری NF-kappa B(Transcription) می‌شود. این ماده، فاکتور TNFα که توسط ماکروفاژهای ایجادکننده التهاب تولید می‌شود را مهار می‌کند. از طرف دیگر عوامل مؤثر دیگر در ایجاد التهاب مانند سیتوکین‌ها، اینترلوکین-۱و۶، TNFαو پروتئین C فعال را به‌طور قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌دهد. افزون برمهار عوامل یادشده با مهار آنزیم سیکلواکسی ژناز-۲ از سنتز پروستاگلاندین‌های مؤثر در ایجاد التهاب پیشگری می‌نماید. یک ژل محتوی عصاره گل‌های همیشه‌بهار کوهی که به‌طور موضعی روی عضله ساق پای مرد داوطلب استفاده شده در تسکین درد عضلانی مؤثرتر از دارونما بوده‌است. به‌طور کلی مهم‌ترین کاربردهای این گیاه: بهبودکننده زخم (Jan, N. and John, 2017)، ضدالتهاب، نرم‌کننده، ضد سرطان و ضد میکروب (Ashwlayan et al., 2018). نتایج تحقیق Noor و همکاران نشان داد که با استفاده از عصاره گیاه همیشه‌بهار میتوان رشد باکتری های عامل عفونت ادراری را مهار کرد و از این گیاه به عنوان مهار کننده باکتری *ای کولای* نام برده شد. در این تحقیق عصاره متانولی با غلظت ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر مانع از رشد باکتری شد (Altaai, 2014). نتایج مشابهی توسط Goyal و همکاران به دست آمد و ادعا شد که برای از بین بردن باکتری های بیماری زا برای انسان میتوان از عصاره اتانولی و متانولی گل همیشه‌بهار استفاده کرد (Goyal et al., 2011). در تحقیق Zilda و همکاران اثر ضد قارچی اسانس گل همیشه‌بهار بر روی ۲۳ گونه قارچی در کشور برزیل مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد اسانس گل همیشه‌بهار اثر ضد قارچی بسیار قوی بر روی همه انواع قارچ داشته است (Zilda et al., 2008). در تحقیق که Khalid و همکاران بر روی پروفایل ترکیبات موجود در عصاره گل همیشه‌بهار انجام داده بودند مشخص شد که بیشترین ترکیبات موجود در عصاره ترکیبات فنولی هستند؛ بیشتر خصوصیات عصاره گیاه شامل خصوصیات ضد باکتریایی، ضد قارچی و ضد سرطانی این گیاه به دلیل سطح بالای این ترکیبات است (Khalid et al., 2006).

مالاسزیا به طور طبیعی بر روی سطوح پوست بسیاری از حیوانات از جمله انسان یافت می‌شود. گاه به گاه در عفونت‌های فرصت‌طلب، برخی از گونه‌ها می‌توانند باعث کمبود رنگ یا هیپرپیگمانتاسیون در تنه و مکان‌های دیگر در انسان شوند. تست حساسیت برای این قارچ در دسترس است. این ارگانیسم فقط در محیط‌های کشت حاوی اسیدهای چرب با زنجیره کربنی ۱۲ تا ۱۴ رشد می‌کند. هرچند که *مالاسزیا فورفور* یک جزء از فلور نرمال پوست است، اما می‌تواند یک پاتوژن فرصت‌طلب باشد. این ارگانیسم بعنوان عاملی در برخی دیگر از بیماریهای پوستی نیز در نظر گرفته می‌شود که شامل فولیکولیت پیتروسپورومی، درماتیت سبوروئیک، و برخی از فرمهای درماتیت آتوپیک، آکانتولیتیک درماتوز گذرا، پسوریازیس و اونیکومایکوزیس می‌باشند. بیماری حاصله در انسان تینا ورسیکالر است. اختلال پوستی دیگری بنام درماتیت سبوروئیک نیز بوسیله این قارچ بوجود می‌آید (فرجی و همکاران، ۱۳۹۱). گونه‌های دیگر مالاسزیا شامل *مالاسزیا پاکی‌درماتیس (Malassezia pachydermatis)* که اغلب روی بدن سگ‌ها یافت می‌شود. این قارچ قادر است سایر حیوانات اهلی و خانگی را نیز آلوده نماید و باعث عوارض کچلی و یا ریزش مو در آنها شود (رزاقی ابیانه و شمس قهفرخی،۱۳۸۴).

آسپرژیلوس فلاووس از جمله قارچ‌های رشته ای است که دارای توزیع جهانی بوده و بر روی انواع کثیری از مواد آلی فاسد شدنی یافت می شود (Thanaboripat, 2011). این قارچ، متابولیت ثانویه سمی و کارسینوژنی به نام آفلاتوکسین تولید می کنند که برای سلامتی انسان و حیوان مضر است؛ بنابراین، این نگرانی سبب شده است که محدودیت‌های تنظیمی بر روی رشد این قارچ و به مراتب بر تولید آفلاتوکسین توسط آنها اتخاذ شود (Ehrlich et al., 2007). گونه های مختلف آسپرژیلوس به خصوص *آسپرژیلوس فلاووس*، *آسپرژیلوس نایجر* و *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* عامل بیماری آسپرژیلوزیس یا مشکلات ریوی در حیوانات خانگی هستند که در سگ و گربه، طیور زینتی و صنعتی و حتی گاو و گوسفند دیده میشود. علائم بیماری با توجه به نوع دام ممکن است متفاوت باشد ولی بیشتر در جانداران کم سن و یا افرادی با ضعف ایمنی و یا در معرض استرس محیطی بروز میکند و ممکن است شامل تنگی نفس، خونریزی ریوی، سرفه و عطسه و موارد مشابه باشد (رزاقی ابیانه و شمس قهفرخی،۱۳۸۴). در انسان این قارچ قادر به ایجاد حساسیت، آلرژی و عفونت ریوی است. استنشاق اسپورهای قارچ می تواند با توجه به وضعیت دفاعی میزبان اشکال متنوعی از آسپرژیلوزیس را ایجاد نماید. در افراد طبیعی عفونت آسپرژیلوسی بصورت لوکالیزه در ریه، سینوس و یا سایر اندامها ایجاد می شود، همچنین آسپرژیلوسها بعنوان عوامل آلرژیک مطرح هستند (Hedayati et al., 2019). در مصرف کنندگان کورتیکوستروئیدی اغلب تب مشاهده نمی شود و درد مختصری در سینه وجود دارد (Frisvad et ai., 2019). بیمار سرفه های خشک یا خلط خونی دارد (Vesth et al., 2020).

برای از بین بردن قارچ‌های بیماریزا استفاده از داروهای ضد قارچ بسیار متداول است ولی به دلیل استفاده غیر اصولی و نابجا، در سالهای اخیر با مقاومت دارویی این قارچ ها رو به رو هستیم که نتیجه آن تلاش برای یافتن منابع جدید ضد قارچ است و یکی از بهترین منابع برای این داروهای جایگزین استفاده از عصاره گیاهان دارویی است (Araghi-Sooreh and Hassanpour, 2015). هدف از این تحقیق مقایسه اثر ضد قارچی عصاره‌های آبی و الکلی گل همیشه‌بهار بر قارچ *مالاسزیا فورفور* و *آسپرژیلوس فلاووس* در شرایط آزمایشگاهی با داروی فلوکونازول و کلیتومازول است.

۲-روش تحقیق

ابتدا مقدار ۵ کیلوگرم گل همیشه‌بهار تازه جمع آوری شدند و پس از خشک و آسیاب کردن، عصاره‌های آبی، اتانولی ۸۰٪ و متانولی۸۰٪ آن به روش سوکسوله تهیه شدند. عصاره ها به کمک دی متیل سولفوکساید به نسبت ۱ به ۴ رقیق شدند. کشت جوان *آسپرژیلوس فلاووس و مالاسزیا فورفور* در محیط سابورودکستروز آگار تهیه گردید.

تعیین MIC(حداقل غلظت مهار کننده رشد) عصاره ها روی *آسپرژیلوس فلاووس و مالاسزیا فورفور:* این کار به روش ۱۱ لوله ای با اضافه کردن ۱ سی سی محیط سابورودکستروز براث (SDB) و ۱ سی سی عصاره با رقت ۰/۱ به هر لوله انجام شد؛ بنابراین مقدار ماده موثر در لوله اول ۵×۱۰^{۴} میکروگرم بر میلی‌لیتر بوده و رقت های ۱/۲ از آن در لوله های بعدی تهیه شدند.

یک سی سی از محتویات لوله دهم را دور ریخته و به لوله یازدهم عصاره ای وارد نشد و بعنوان شاهد در نظر گرفته شد. در ادامه مقدار ۱۰ لاندا از اسپور قارچ وارد لوله ها شدند. سپس لوله ها در دمای ۲۰ تا ۳۰ درجه به مدت چند روز انکوبه شده و ایجاد کدورت در لوله ها با نمونه شاهد (لوله یازدهم) مقایسه و تیتر ماده موثره در آخرین لوله فاقد کدورت، به عنوان MIC عصاره در نظر گرفته شد (Espinel-Ingroff, et al., 2010).

تعیین MFC عصاره ها روی قارچ ها (حداقل غلظت کشندگی قارچ ها): MFC به معنای حداقل غلظت از داروی ضد قارچ است که سبب کشتن ۹۹/۹ درصد سلول های قارچ می شود یا به عبارتی حداقل غلظتی که فقط به۰/۱ درصد سلول های قارچ اجازه ی رشد می دهد. جهت تعیینMFC مقدار ۱۰ لاندا ($۱۰^{۴}\times ۱$ سلول قارچ) از لولهMIC و سایر لوله های فاقد کدورت برداشته و در محیط کشت سابرودکستروز آگار به صورت سفره ای کشت شد و پس از آن ۲ تا ۳روز پلیتها را در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه قرار گرفتند. غلظت عصاره مرتبط با پلیتی که فاقد قارچ بود به عنوان حداقل غلظت کشنده قارچی ثبت گردید. کمترین غلظتی که در آن رشدی مشاهده نشد را به عنوان MFC در نظر می گیریم.

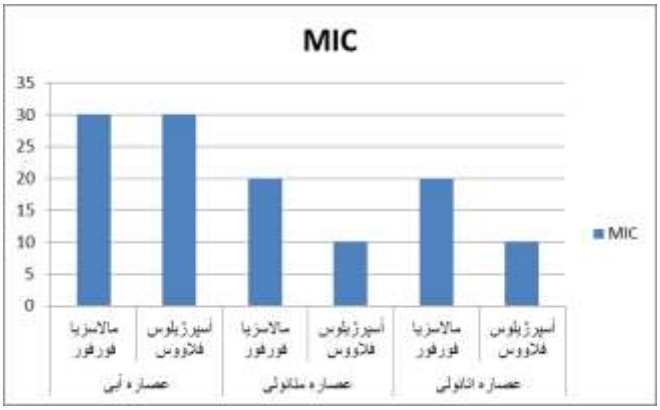
تعیین حساسیت قارچ ها با روش دیسک: جهت این کار، ابتدا مقادیر ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ لاندا عصاره ها را به طور جداگانه در دیسک های استاندارد وارد نموده، آن ها را در فور ۴۵ درجه سانتی گراد قرار داده تا رطوبت اضافی آن خشک شود. سوسپانسیون قارچی به میزان ۱۰ لاندا در تمام سطح محیط کشت سابورودکستروز آگار کشت داده و در فواصل معینی دیسک ها را قرار داده و در دمای ۳۰-۲۵ درجه سانتی گراد به مدت چند روز انکوبه نموده، ایجاد یا عدم ایجاد هاله ممانعت از رشد قارچ در اطراف دیسک ها بررسی شدند (Darshit & Pandya, 2018).

تست تعیین حساسیت قارچ ها با استفاده از روش چاهک: برای این کار، ابتدا در محیط کشت سابورو دکستروز آگار، چاهک هائی ایجاد نموده و ۱۱۰،۱۰۰،۹۰،۸۰ لاندا از عصاره ها 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 نموده، سپس نمونه قارچ را کشت داده در دمای ۳۰-۲۵ درجه سانتی گراد به مدت چند روز انکوبه نموده و بعد از انکوباسیون، ایجاد یا عدم ایجاد هاله ممانعت از رشد قارچ در اطراف چاهک بررسی شدند.

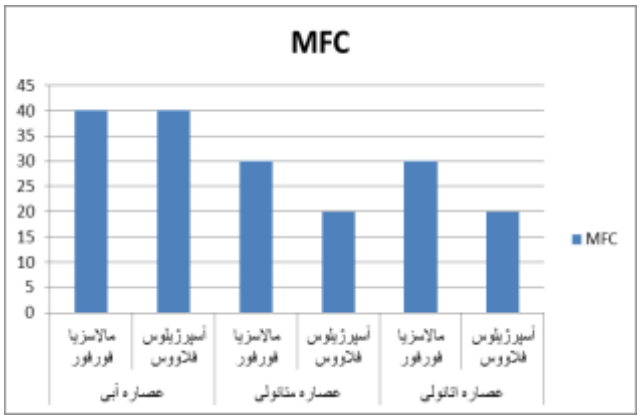
تجزیه و تحلیل اطلاعات: میانگین نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون واریانس یک طرفه مورد ارزیابی قرار گرفتند.

۳-یافته ها

نتایج MICعصاره اتانولی، متانولی و آبی گل همیشه‌بهار روی *آسپرژیلوس فلاووس* به ترتیب ۱۰، ۱۰ و ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و MFC آن ۲۰، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. برای MIC *مالاسزیا فورفور* به ترتیب ۲۰، ۲۰ و ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و MFC آن ۳۰، ۳۰ و ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد (نمودار ۱و۲).

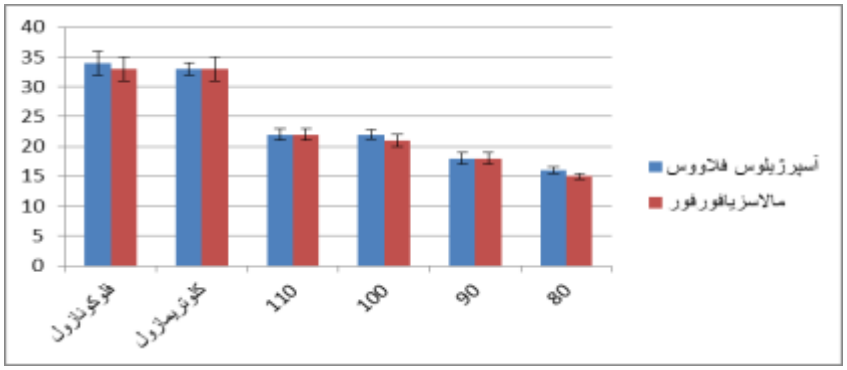


نمودار۱- مقدار MIC عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی گل همیشه‌بهار برای *آسپرژیلوس فلاووس* و *مالاسزیا فورفور*

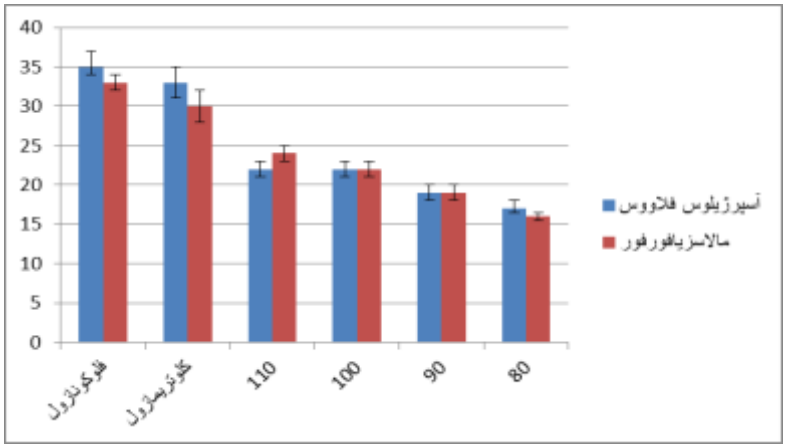


نمودار۲- مقدار MFC عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی گل همیشه‌بهار برای قارچها

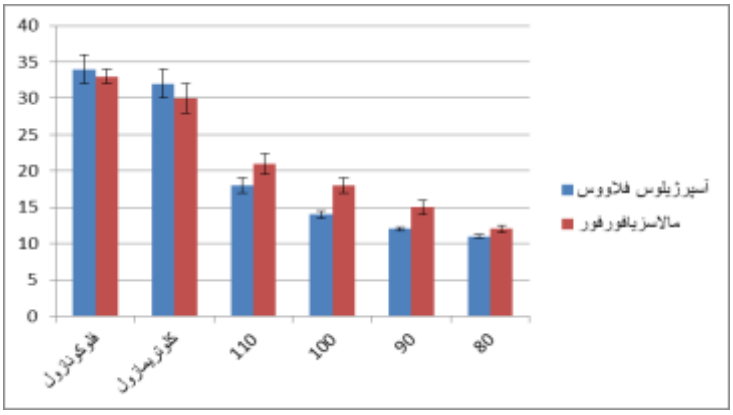
با توجه به نتایج به دست آمده MIC و MFC عصاره‌های آبی در مقایسه با اتانولی و متانولی همیشه‌بهار بر روی قارچ *آسپرژیلوس فلاووس و مالاسزیا فورفور* تفاوت معنی داری با یکدیگر داشتند ($p<0.05$)؛ اما MIC عصاره اتانولی و متانولی همیشه‌بهار بر روی قارچ *آسپرژیلوس فلاووس و مالاسزیا فورفور* تفاوت معنی داری با یکدیگر نداشتند ($p>0.05$).



نمودار ۳ - میانگین قطر هاله عدم رشد (بر حسب میلی متر) قارچ *آسپرژیلوس فلاووس و مالاسزیا فورفور* اطراف چاهکهای حاوی مقادیر مختلف عصاره اتانولی گل همیشه‌بهار در مقایسه با داروی ضد قارچی

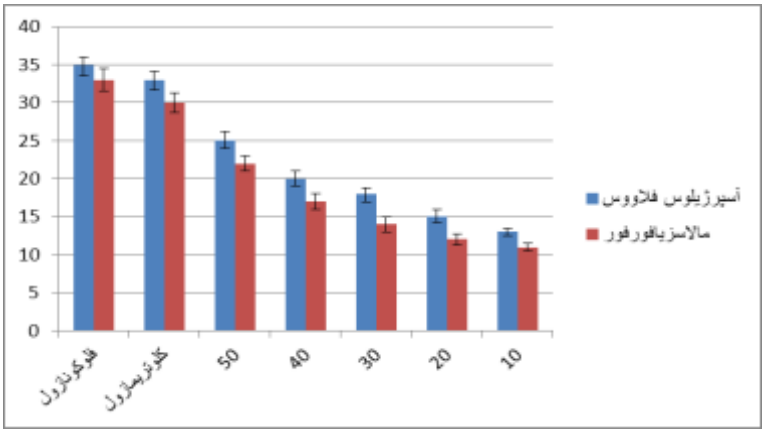


نمودار ۴- میانگین قطر هاله (بر حسب میلی متر) قارچ ها در اطراف چاهکهای عصاره متانولی گل همیشه‌بهار در مقایسه با داروی ضد قارچی

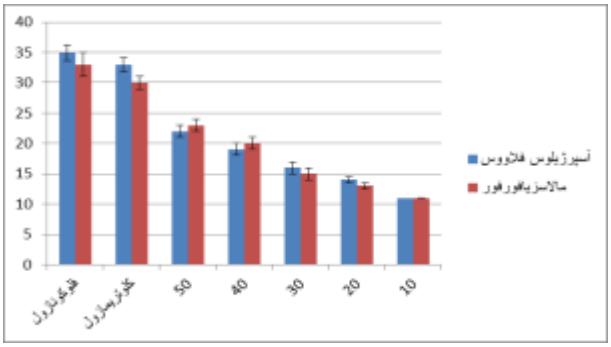


نمودار۵- میانگین قطر هاله قارچ ها در اطراف چاهکهای عصاره آبی گل همیشه‌بهار در مقایسه با داروی ضد قارچ

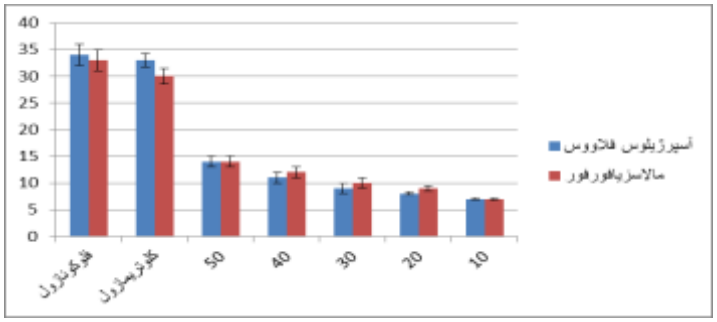
با توجه به نتایج فوق می توان گرفت: در هر سه عصاره اتانولی، متانولی و آبی هاله عدم رشد روند افزایشی با تغییرات حجم مورد استفاده نشان داد، ولی این تغییرات معنی دار نبود. مقایسه عصاره‌های اتانولی، متانولی و آبی بر هاله عدم رشد در هر کدام از حجم ها نشان می دهد که هیچکدام از عصاره ها در حجمهای مختلف از نظر هاله عدم رشد تفاوت معنی داری با یکدیگر نشان ندادند (جهت مقایسه این که در هر کدام از حجم ها کدام عصاره بیشترین اثر قارچ کشی را دارد). در تست تعیین حساسیت قارچ ها به داروی فلوکونازول و کلوتریمازول به روش چاهک، هاله عدم رشد بیشتری در اطراف چاهکها نسبت به عصاره‌های همیشه‌بهار مشاهده شد (نمودار ۳، ۴و۵).



نمودار ۶- میانگین قطر هاله عدم رشد (بر حسب میلی متر) قارچ ها اطراف دیسک های عصاره اتانولی گل همیشه‌بهار در مقایسه با داروی ضد قارچ



نمودار ۷- میانگین قطر هاله قارچ ها اطراف دیسکهای عصاره‌های متانولی همیشه‌بهار در مقایسه با داروی ضد قارچ



نمودار ۸-میانگین قطر هاله (بر حسب میلی متر) قارچ ها اطراف دیسک های حاوی مقادیر مختلف عصاره آبی همیشه‌بهار در مقایسه با داروی ضد قارچ

با توجه به نتایج فوق می توان گرفت: در هر سه عصاره اتانولی، متانولی و آبی هاله عدم رشد روند افزایشی با تغییرات حجم مورد استفاده نشان داد، ولی این تغییرات معنی دار نبود؛ به عبارت دیگر تمام غلظتها اثر یکسانی داشتند. مقایسه عصاره‌های اتانولی، متانولی و آبی بر هاله عدم رشد در هر کدام از حجم ها نشان می دهد که هیچکدام از عصاره ها در حجمهای مختلف از نظر هاله ی عدم رشد تفاوت معنی داری با یکدیگر نشان ندادند. در تست تعیین حساسیت قارچ ها به داروی فلوکونازول و کلوتریمازول به روش دیسک، هاله عدم رشد بیشتری در اطراف چاهکها نسبت به عصاره‌های همیشه‌بهار مشاهده شد (نمودار ۶،۷و۸).

۴-بحث و نتیجه گیری

علیرغم این واقعیت که تشکیل مقاومت در میکروارگانیسم ها یک فرآیند طبیعی تکامل است، مطالعات زیادی با هدف توسعه عوامل ضد میکروبی موثر، عاری از مضرات عوامل ضد باکتری سنتی وجود دارد (Behzad et al., 2021). مواد طبیعی یا ترکیبات مشتق از گیاهـان بـه صـورت گسترده ای در مقابله با میکروارگانیسم های بیماری زا به کار می روند. در این تحقیق اثرات ضدقارچی عصاره‌های هیدروالکلی گل همیشه‌بهار بر روی قارچ *آسپرژیلوس فلاووس و مالاسزیا فورفور* مورد بررسی قرار گرفت. مطالعاتی در زمینه فعالیت ضد قارچی گل همیشه‌بهار توسط محققین انجام گرفته است. مرادپور و همکاران خاصیت ضد قارچی اسانس گل همیشه‌بهار بر روی قارچ رازوپوس مورد ارزیابی قرار دادند که غلظت های ۱۲۵ میکرولیتر در لیتر و بالاتر از آن به طور کامل مانع از رشد قارچ شدند و غلظت ۱۱۵ میکرو لیتر در لیتر حداقل غلظت بازدارنده از رشد بود که با نتایج مطالعه ما مبنی بر خواص ضد قارچی گل همیشه‌بهار مطابقت دارد (مرادپور و همکاران، ۱۳۹۸). Zilda و همکاران جهت ارزیابی فعالیت ضد قارچی گل همیشه‌بهار بر ۲۳ گونه کلینتیکی قارچی انجام دادند، نشان دادند که عصاره این گیاه دارای خاصیت ضد قارچی اثر ضد قارچی بسیار قوی بر روی همه انواع قارچ بوده و توانست از رشد این قارچ ها جلوگیری نماید که با نتایج مطالعه ما مبنی بر خواص ضد قارچی گل همیشه‌بهار مطابقت دارد (Zilda et al., 2008). Efstratios و همکاران جهت ارزیابی فعالیت ضد قارچی عصاره گل همیشه‌بهار بر قارچ *مالاسزیا فورفور* و *کاندیدا البیکنس* انجام دادند، نشان دادند که عصاره این گیاه دارای خاصیت ضد قارچی بوده و توانست از رشد این قارچ جلوگیری نماید که با نتایج مطالعه ما مبنی بر خواص ضد قارچی گل همیشه‌بهار مطابقت دارد. هم چنین مطالعات نشان داد که عصاره ها در مقایسه با فلوکونازول دارای تاثیر ضد قارچی بیشتری بودند که در مطالعه ما فلوکونازول بیشترین اثر ضد قارچی را داشته است (Efstratios et al., 2012). ایمنی و قیامی راد اثر ضدباکتریایی عصاره اتانولی گل همیشه‌بهار بر علیه سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس، انتروکوکوس فکالیس، اشرشیا کلی و سودوموناس آئروژینوزا* در شرایط آزمایشگاهی را مطالعه کرده بودند. بیشترین حساسیت با میانگین قطر هاله عدم رشد ۰,۴۵ ± ۱۳ mm ناشی از غلظت ۵۰ mg/ml عصاره اتانولی گل های گیاه همیشه بهار مربوط به *استافیلوکوکوس اورئوس* ارزیابی شد. حداقل غلظت مهارکنندگی، برای *استافیلوکوکوس اورئوس و انتروکوکوس فکالیس* ۷۵ mg/ml به دست آمد. همچنین حداقل غلظت کشندگی برابر با ۷۵ mg/ml در مقابل باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مشاهده گردید. عصاره اتانولی گل های گیاه همیشه بهار در شرایط آزمایشگاهی علیه هر ۴ سویه مورد آزمایش، اثر بازدارندگی قابل ملاحظه ای داشت (ایمنی و قیامی راد، ۱۳۹۷). نتایج تحقیق Cetinو همکاران نشان داد که از عصاره گل همیشه‌بهار به عنوان یک ماده ضد میکروب قوی و طبیعی بر علیه باکتری های گرم مثبت و منفی میتوان استفاده کرد. در این تحقیق ۵ باکتری شامل ۳ باکتری گرم منفی (*اشریشیا کولای، کلبسیلا نومونیه، سالمونلا انتریتیدیس*) و ۲ باکتری گرم مثبت شامل (*باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس*) مورد مطالعه قرار گرفتند که غلظت ۷۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره مانع از ادامه رشد تمامی میکروب های یاد شده کرد (Cetin et al., 2017).

Calendula officinalis که به دلیل محتوای غنی از کاروتنوئیدها شناخته شده است، ترپنوئیدها، فلاونوئیدها، کومارین ها، کینون ها، روغن فرار، به عنوان یک عامل ترمیم کننده زخم با خواص ضد باکتریایی استفاده می شود (Nicolaus et al., 2017: Zhangabay & Berillo, 2023). نتایج کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) گل همیشه‌بهار نشان داد که اجزای آن عبارتند از اسیدهای فنولیک (p-کوماریک، کافئیک، فرولیک و الاژیک) و فلاونوئیدها (پروسیانیدین A2 و کوئرستین-۳-روتینوزید) می باشد (Bragueto Escher et al., 2019). بهشتی مقدم و همکاران (۱۳۹۴) اثر حفاظتی گل همیشه‌بهار در بروز آسیب کبدی ناشی از تتراکلرید کربن در جوجه های گوشتی را مورد مطالعه قرار دادند که اثر حفاظتی عصاره گل همیشه بهار بر کبد می باشد که احتمالا بواسطه فلاونویید های موجود در گیاه و توانایی آنها در مهار فعال سازی زیستی CCl4 و در نتیجه مهار فعالیت سیتوکروم P450 و اثر خنثی کنندگی رادیکال های آزاد می باشد. به نظر میرسد وجود همین ترکیبات بتواند خصوصیات ضد میکروبی عصاره گل همیشه‌بهار را توجیح نماید (بهشتی مقدم و همکاران، ۱۳۹۴). در نتیجه تحقیق Jimenezو

همکاران عنوان شده بود که ترکیبات فنولی موجود در گیاه همیشه‌بهار به عنوان یک منبع از ترکیبات فنولی است و از آن به عنوان ترکیبات ضد تومور و حتی ترکیبات ضد باکتری و ضد قارچی میتوان بهره برد (Jimenez et al., 2006). به نظر می رسد گیاه گل همیشه‌بهار دارای اهمیت ضد قارچی می باشد اما خاصیت ضد قارچی آن از دو داروی فلوکونازول و کلوتریمازول کمتر است؛ بنابراین پیشنهاد می شود بررسی های بیشتری در زمینه آثار سایر فراکشن ها و ترکیب های گیاه گل همیشه‌بهار با هر سه عصاره آبی، اتانولی و متانولی انجام شود تا با انجام تحقیق های جامع تر به اهداف کاربردی که تولید داروی ضد قارچ گیاهی و موثر با حداقل عوارض جانبی است، دست یافت.

منابع

۱. ایمنی نازیلا، قیامی راد مهدی (۱۳۹۷). اثر ضدباکتریایی عصاره اتانولی گل همیشه‌بهار بر علیه سویه های استافیلوکوکوس اورئوس، انتروکوکوس فکالیس، اشرشیا کلی و سودوموناس آئروژینوزا در شرایط آزمایشگاهی. علوم پزشکی زانکو. ۱۳۹۷. دوره ۱۹ , شماره ۶۲ ; از صفحه ۶۱ تا صفحه ۶۹

۲. بهشتی مقدم سارا، کرمانشاهی حسن، واحد ریحانه، نصیری مقدم حسن (۱۳۹۴). اثر حفاظتی گل همیشه‌بهار در بروز آسیب کبدی ناشی از تتراکلرید کربن در جوجه های گوشتی. تحقیقات دامپزشکی و فرآورده های بیولوژیک (پژوهش و سازندگی). ۱۳۹۴. دوره ۲۸ , شماره ۴ (پیاپی ۱۰۹) ; از صفحه ۶۰ تا صفحه ۶۹ .

۳. رزاقی ابیانه م؛ و شمس قهفرخی م. ۱۳۸۴. بیماریهای قارچی دامپزشکی. سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی. چاپ اول.

۴. فرجی رضا، سبزی فریدون، زرنشان ایوب، مرادخانی چمن (۱۳۹۱). بررسی شیوع گونه‌های مالاسزیا در دام‌های اهلی. نشریه علمی میکروبیولوژی دامپزشکی. دوره ۸، شماره ۲ - شماره پیاپی ۲۵، صفحه ۱۱۹-۱۲۵

۵. مرادپور عارف، اتقیا امید، اکبرپور رسول، (۱۳۹۸)، مطالعه خاصیت ضد قارچی اسانس گل همیشه‌بهار در مقابل Rhizopus stolonifers، نخستین کنگره بیماری شناسی گیاهی ایران، کرج.

6. Ahmad, H., Khan, I. and Wahid, A., 2012. Antiglycation and antioxidation properties of Juglans regia and Calendula officinalis: possible role in reducing diabetic complications and slowing down ageing. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, *32*(3), pp.411-414.
7. Altaai, N.A., 2014. The inhibitory effect of Calendula Officinalis and Salvia Officinalis on growth of some bacterial isolates from urinary tract infections. *International Journal of Advanced Research*, *2*(4), pp.316-322.

8. Araghi-Sooreh, A. and Hassanpour, V., 2015. Prevalence of fungi in the conjunctival sac of clinically normal sheep. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, *21*(3), 425-427.

9. Arora, D., Rani, A. and Sharma, A., 2013. A review on phytochemistry and ethnopharmacological aspects of genus Calendula. *Pharmacognosy reviews*, *7*(14), p.179.
10. AshwlayanVD, K.A. and Verma, M., 2018. Therapeutic potential of Calendula officinalis. *Pharm Pharmacol Int J*, *6*(2), pp.149-155.
11. Baghaee Far, Z., Ghdirpour, Z. and Chehregani Rad, A., 2018. The study of development of generative organs in Calendula officinalis L. *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*, *31*(2), pp.279-290.

12. Behzad, F., Naghib, S.M., Tabatabaei, S.N., Zare, Y. and Rhee, K.Y., 2021. An overview of the plant-mediated green synthesis of noble metal nanoparticles for antibacterial applications. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, *94*, pp.92-104.
13. Bragueto Escher, G., Cardoso Borges, L.D.C., Sousa Santos, J., Mendanha Cruz, T., Boscacci Marques, M., Araújo Vieira do Carmo, M., Azevedo, L., M. Furtado, M., S. Sant'Ana, A., Wen, M. and Zhang, L., 2019. From the field to the pot: Phytochemical and functional analyses of Calendula officinalis L. flower for incorporation in an organic yogurt. *Antioxidants*, *8*(11), p.559.
14. Çetin, B., Kalyoncu, F. and Kurtuluş, B., 2017. Antibacterial activities of Calendula officinalis callus extract. *International Journal of Secondary Metabolite*, *4*(3, Special Issue 1), pp.257-263.
15. Darshit, R., & Pandya, D. D. (2018). Screening and characteristic study of antimicrobial actinomycetes from near-by soil of medicinal plants. *Int. J. Pharm. Pharma. Sci*, *10*, 66.

16. Efstratiou, E., Hussain, A.I., Nigam, P.S., Moore, J.E., Ayub, M.A. and Rao, J.R., 2012. Antimicrobial activity of Calendula officinalis petal extracts against fungi, as well as Gram-negative and Gram-positive clinical pathogens. *Complementary Therapies in Clinical Practice*, *18*(3), pp.173-176.

17. Ehrlich, K.C., Kobbeman, K., Montalbano, B.G. and Cotty, P.J., 2007. Aflatoxin-producing Aspergillus species from Thailand. *International journal of food microbiology*, *114*(2), pp.153-159.
18. Espinel-Ingroff, A., Diekema, D. J., Fothergill, A., Johnson, E., Pelaez, T., Pfaller, M. A., ... & Turnidge, J. (2010). Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for the triazoles and six Aspergillus spp. for the CLSI broth microdilution method (M38-A2 document). *Journal of clinical microbiology*, *48*(9), 3251-3257.

19. Frisvad, J.C., Hubka, V., Ezekiel, C.N., Hong, S.B., Novßkovß, A., Chen, A.J., Arzanlou, M., Larsen, T.O., Sklenßř, F., Mahakarnchanakul, W. and Samson, R.A., 2019. Taxonomy of Aspergillus section Flavi and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. *Studies in mycology*, *93*(1), pp.1-63.

20. Gertsch, J., 2011. Botanical drugs, synergy, and network pharmacology: forth and back to intelligent mixtures. *Planta medica*, *77*(11), pp.1086-1098.
Goyal, M. and Mathur, R., 2011. Antimicrobial effects of Calendula officinalis against human pathogenic microorganisms. *J Herbal Med Tox*, *5*(1), pp.97-101.

21. Hedayati, M.T., Taghizadeh- Armaki, M., Zarrinfar, H., Hoseinnejad, A., Ansari, S., Abastabar, M., Er, H., Özhak, B., Öğünç, D., Ilkit, M. and Seyedmousavi, S., 2019. Discrimination of aspergillus flavus from Aspergillus oryzae by matrix- assisted laser desorption/ionisation time- of- flight (MALDI- TOF) mass spectrometry. *Mycoses*, *62*(12), pp.1182-1188.
22. Jiménez-Medina, E., Garcia-Lora, A., Paco, L., Algarra, I., Collado, A. and Garrido, F., 2006. A new extract of the plant Calendula officinalis produces a dual in vitro effect: cytotoxic anti-tumor activity and lymphocyte activation. *BMC câncer*, *6*, pp.1-14.

23. Khalid, K.A. and da Silva, J.T., 2012. Biology of Calendula officinalis Linn.: focus on pharmacology, biological activities and agronomic practices. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, *6*(1), pp.12-27.

24. Jan, N. and John, R., 2017. Calendula officinalis-an important medicinal plant with potential biological properties, 83 (4): 769-87.

25. Nicolaus, C., Junghanns, S., Hartmann, A., Murillo, R., Ganzera, M. and Merfort, I., 2017. In vitro studies to evaluate the wound healing properties of Calendula officinalis extracts. *Journal of ethnopharmacology*, *196*, pp.94-103.

26. Pazhohideh, Z., Mohammadi, S., Bahrami, N., Mojab, F., Abedi, P. and Maraghi, E., 2018. The effect of Calendula officinalis versus metronidazole on bacterial vaginosis in women: A double-blind randomized controlled trial. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research*, *9*(1), pp.15-19.

27. Saleem, M., Zaka, S., Shakir, N. and Khan, S.A., 1986. Studies on marigold seed oil and seed meal. *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, *88*(5), pp.178-180.

28. Salehi-Sormaghi, M.H., 2006. Medicinal and medical plant. *Iran*, *1*, p.406.

29. Thanaboripat, D., 2011. Control of aflatoxins in agricultural products using plant extracts. *Current Applied Science And Technology*, *11*(1), pp.35-42.

30. Vesth T., Frisvad J.C., Nybo J.L., Theobald S., Kildgaard S., Petersen T.I., Kuo A., Sato A., Lyhne E.K. 2020. A comparative genomics study of 23 Aspergillus species from section Flavi. *Nat. Commun*. 11.pp.1–12.

31. World Health Organization Newsroom, 2021. Antimicrobial resistance. https:// www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance. (Accessed 17 November 2021).

32. Zhangabay, Z. and Berillo, D., 2023. Antimicrobial and antioxidant activity of AgNPs stabilized with Calendula officinalis flower extract. *Results in Surfaces and Interfaces*, *11*, p.100109.

33. Zilda C., Gazim C., Moraes R., Regina F., Terezinha I., Estivaleti S. 2008. Antifungal activity of the essential oil from Calendula officinalis L. (asteraceae) growing in Brazil. General Microbiology, Braz. J. Microbiol. 39 (1). P. 131-142

مطالعات علوم زیستی و زیست فناوری

دوره ۱۰، شماره ۱، بهار ۱۴۰۳، صفحات ۱۶۸-۱۵۷

Investigating the antifungal effects of aqueous and alcoholic extracts of marigold and comparing it with antifungal drugs

Fatemeh Asadi[1], Issa Gholampour Azizi[2], Amir Hosein Smaeili[3*]

[1]*Gradated student, Faculty of Medicine, Babol Branch, Islamic Azad University, Babol, Iran.*
[2]*Department of Mycology, Faculty of Veterinary Medicine, Babol Branch, Islamic Azad University Babol, Iran*
[3*]*Department of Biobiology, Faculty of Medicine, Babol Branch, Islamic Azad University Babol, Iran.*

Abstract

Calendula belongs to the chicory family, which has been used in the treatment of skin disorders, pain, and as a bactericide, antiseptic, and anti-inflammatory. In this study, the lethal effect of this flower with different concentrations on *Aspergillus flavus* and *Malassezia furfur* fungi was evaluated in laboratory conditions. The results of MIC of ethanolic, methanolic and blue extracts of marigolds on *Aspergillus flavus* were 10, 10 and 30 µg/ml respectively and MFC was 20, 20 and 40 µg/ml. The MIC of *Malassezia furfur* was 20, 20 and 30 µg/ml and its MFC was 30, 30 and 40 µg/ml, respectively. The results of halo of non-growth in the disc and well method were significant, but they were less compared to fluconazole and clotrimazole antifungal drugs. Aqueous and hydroalcoholic extracts of marigold flowers had an inhibitory effect on the studied strains in laboratory conditions.

Keywords: Marigold, *Aspergillus flavus*, *Malassezia furfur*