مطالعات علوم زیستی و زیست فناوری
دوره ۸، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۱
صفحات ۱۱- ۱

Online ISSN: ٤٤٩٣-٢٤٧٦
Print ISSN: ٢٠٢٠-٢٥٣٨
www.irijournals.com

اثر ضد میکروبی عصاره آبی و الکلی گیاه تلخه بر روی *اشریشیا کولای* (PTCC 1399) و *مالاسزیا فور فور* (ATCC 14521) و مقایسه آن با سیپروفلوکساسین و فلوکونازول

مهدی داداشی فیروزجایی[۱]، منورالسادات موسی زاده[۲]، عیسی غلامپور عزیزی*[۳]

[۱]دانش آموخته دانشکده پیراپزشکی، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران
[۲] استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده پیراپزشکی، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران
[۳]استادیار گروه قارچ شناسی، دانشکده دامپزشکی، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران(نویسنده مسئول مکاتبات)

چکیده

مالاسزیا فورفور یک مخمر لیپولیتیک است و به عنوان عامل بیماری‌های پوستی شناخته می‌شود. *اشریشیا کولای* یک باکتری گرم منفی و عامل بیماری‌های گوارشی و ورم پستان در دام است. هدف از این مطالعه تعیین اثرات ضد میکروبی عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی گیاه تلخه بر روی *مالاسزیا فورفور* (ATCC 14521) و *اشریشیا کولای* (PTCC 1399) و مقایسه آن با سیپروفلوکساسین و فلوکونازول است. در این تحقیق اثر ضد قارچی عصاره‌ها به روش دیسک مورد ارزیابی قرار گرفت؛ همچنین حداقل غلظت ممانعت از رشد و حداقل غلظت کشنده باکتری و قارچ نیز به هر دو روش چاهک و ماکرودایلوشن محاسبه شد. نتایج نشان داد که هیچگونه هاله عدم رشدی برای *مالاسزیا فورفور* و *اشریشیا کولای* در روش دیسک دیده نشد ولی کلوتریمازول هاله عدم رشد ۱۹,۶۶ میلی‌متری ایجاد کرده بود و برای سیپروفلوکساسین این عدد ۲۳,۳۳ میلی‌متر بود. هاله ممانعت از رشد *مالاسزیا فورفور* و *اشریشیا کولای* در روش چاهک برای غلظت‌های ۸۰، ۹۰، ۱۰۰ و ۱۱۰ لاندا از عصاره آبی و عصاره اتانولی دیده نشد ولی عصاره متانولی تلخه در غلظت ۱۰۰ و ۱۱۰ به ترتیب هاله ۴,۷ و ۶,۱ میلی‌متری ایجاد کردند. حداقل غلظت ممانعت از رشد *مالاسزیا فورفور* برای عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی تلخه به ترتیب ۰، ۱,۶۶ و ۱۷,۶۶ میلی‌گرم/میلی‌لیتر بود و حداقل غلظت کشنده قارچی برای عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی تلخه به ترتیب ۰، ۱۸,۶۵ و ۳۵,۳۲ میلی‌گرم/میلی‌لیتر بود. عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی تلخه بر روی باکتری *اشریشیا کولای* اثر ممانعت از رشد و کشندگی نداشت. نتایج به دست آمده نشان داد که عصاره‌های اتانولی و متانولی تلخه دارای اثرات ضد قارچی در برابر *مالاسزیا فورفور* هستند.

کلمات کلیدی: عصاره تلخه، *مالاسزیا فورفور*، *اشریشیا کولای*

۱-مقدمه

از آنجایی که *اشرشیا کلی* معمولا در روده حیوانات خون‌گرم زندگی می‌کند، در معرض برخورد مکرر با آنتی‌بیوتیک‌ها قرار می‌گیرد و فشار انتخاب بالایی برای آن ایجاد می‌کند که منجر به مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های مصرف شده توسط میزبان می‌شود. این منجر به این فرضیه شد که الگوهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های *اشرشیا کلی* از میزبان‌های مختلف می‌تواند برای ردیابی منشا میزبان استفاده شود(Jang et al., 2017). مخمرهای مالاسزیا ارگانیسم‌های چربی دوست هستند که بیش از یک قرن است که به عنوان اعضای فلور طبیعی پوست انسان و همچنین به عنوان عوامل برخی از بیماری‌های پوستی شناخته شده‌اند. علاوه بر این، از دهه ۱۹۸۰، آنها به عنوان عامل عفونت‌های سیستمیک فرصت طلب گزارش شده‌اند. این مخمرها اغلب بر روی طیف متنوعی از حیوانات خون‌گرم دیگر یافت شده‌اند (Abdillah et al., 2021). مالاسزیا در میکرو فلور پوست معمولا به دلیل نرمی سیستم ایمنی اجازه رشد بدون علامت دارد. مخمرها زمانی که تعادل ایمنی مختل می‌شود، بیماری‌زا می‌شوند. الگوهای مولکولی مرتبط با پاتوژن که در غیر این صورت یک پاسخ التهابی از سیستم ایمنی را القا می‌کنند، پوشانده می‌شوند یا ایجاد نمی‌شوند (Pedrosa et al., 2014). *مالاسزیا فور فور* یکی از گونه‌هایی است که عمدتا پوست و گاهی اوقات مجاری تنفسی را کلونیزه می‌کند و ممکن است باعث عفونت نوزادی شود (Chen et al, 2020). مقاومت دارویی میکروبی سریعتر از سرعت کشف آنتی‌بیوتیک‌های جدید پدیدار شده است. عوامل ضد میکروبی مؤثر با ظهور سویه‌های میکروبی با مقاومت چند دارویی و پتانسیل تشکیل بیوفیلم محدود شده‌اند (Wypij et al., 2018). مقاومت ضد میکروبی در بین پاتوژن‌های ادراری همچون *اشرشیا کلی* در برابر عوامل خط اول فعلی بر مدیریت عفونت شدید دستگاه ادراری تأثیر گذاشته است (Cuba et al., 2014). بررسی *اشرشیا کلی* مقاوم به آنتی بیوتیک در هلند نشان داد که ۱ / ۱۷ ٪ از *اشرشیا کلی* جداشده از آب و فاضلاب رودخانه به عنوان بیماری‌زا گزارش شده است و از این سویه‌های بیماری‌زا، تقریبا ۸۴ ٪ در حداکثر سه کلاس دارویی از جمله بتالاکتام‌ها، تتراسایکلین‌ها و آمینوگلیکوزیدها مقاومت نشان دادند (Haberecht et al., 2019).

گیاه تلخه (*Acroptilon repens*) گیاهی علفی و چند ساله از خانواده آستراسه است. این گیاه یکی از مهاجم ترین گونه‌های علف هرز است که نسبت به سایر گونه‌های علف هرز در مناطق اشغالی رقابت پذیرتر است. رقابت پذیری این گیاه به توانایی آن در آزادسازی مواد شیمیایی مضر با فعالیت آللوپاتیک قابل توجه مربوط می‌شود. آللوپاتی اثر منفی گیاه در ممانعت از رشد سایر گیاهان است. گیاه تلخه در بسیاری از کشورها به ویژه در مغولستان، ایران، ترکیه، ارمنستان، ایالات متحده آمریکا و کانادا گسترده است (Dashti et al., 2022). این گیاه به طور بالقوه دارای دفاع بیوشیمیایی و آللوشیمیایی جدید است زیرا لاکتون‌های سسکوئیترپن تولید می‌کند. این مواد شیمیایی ممکن است به عنوان ترکیبات دفاعی جدید عمل کنند. گزارش شده است که پلیاستیلن‌ها و مشتقات تیوفن از ریشه‌های تلخه آزاد می‌شوند و یکی از این پلیاستیلن‌ها فیتوتوکسیک است و در ریزوسفرهای گیاه تلخه از خاک جدا شده است. (Ni et al., 2010). گیاه تلخه در طب سنتی به عنوان یک داروی قی آور، ضد صرع و ضد مالاریا در سراسر جهان استفاده شده است. مطالعات اخیر روی گیاه تلخه نشان داده است که این گیاه دارای خواص دارویی مانند اثرات ضد میکروبی، تب بر، کاهش دهنده چربی و ضد دیابت است (Nohtani et al., 2016). روغن این گیاه، از رشد باکتری‌های گرم مثبت جلوگیری می‌کند. تاکنون هیچ تحقیق علمی در مورد حساسیت زایی گرده آن انجام نشده است (Rezanejad et al., 2018). همچنین در مطالعات نشان داده شده است که گیاه تلخه دارای فعالیت مهاری در مقابل باکتری‌هایی همچون *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* می‌باشد (Egamberdieva et al., 2021). در مطالعه های دیگر نشان داده شد که عصاره اتانولی و فراکسیون گیاه تلخه می‌تواند به عنوان یک منبع جدید دارویی برای عفونت‌های بیمارستانی ناشی از سویه‌های *سودوموناس ایروژنوزا* مقاوم به دارو استفاده شود(Akhgari et al., 2021). با توجه به مقاومت آنتی بیوتیکی *اشرشیا کلی* و برخی مقاومت‌های ضد قارچی مخمر مالاسزیا به علاوه تأثیر گیاه تلخه بر مهار رشد باکتری‌ها، این مطالعه با هدف بررسی اثرات عصاره‌های آبی و الکلی (متانولی و اتانولی) گیاه تلخه روی *اشرشیا کلی* و مخمر مالاسزیا انجام و مواد مؤثره گیاه تلخه در مقایسه با داروهای ضدمیکروبی رایج نیز تعیین می‌شود.

۲-روش تحقیق

تهیه تلخه: گیاه تلخه از باغ گیاه شناسی تهران تهیه شد و پس از تایید گیاه‌شناسان مرکز با آب شرب شسته شد، پس از خشک شدن گیاه و در دمای اتاق و به دور از نور به صورت کامل خشک شد.

تهیه عصاره تلخه: در این مطالعه به سه روش از گیاه تلخه عصاره‌گیری به روش سوکسله انجام شد که عبارت بودند از: عصاره آبی تلخه، عصاره اتانولی، عصاره متانولی (سکوتی و همکاران، ۱۳۹۶).

آماده سازی میکروب: *اشرشیا کولای* مورد استفاده در این تحقیق با شناسنامه (PTCC 1399) تهیه شد و به منظور آماده سازی مجدد آن، با استفاده از لوپ استاندارد استریل کشت در محیط آبگوشت BHI انجام گرفت و لوله آزمایش به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید، برای حفظ قابلیت زیستی باکتری قبل از انجام آزمون‌های مطالعه، حداقل دوبار کشت در محیط نوترینت آگار به صورت خطی انجام شد تا کلنی تک و خالص *اشرشیا کولای* بدست آید.

مالاسزیا فورفور مورد استفاده در این تحقیق با شناسنامه (ATCC 14521) تهیه شد و به منظور آماده سازی مجدد آن، با استفاده از لوپ استاندارد استریل کشت در محیط آبگوشت سابورو دکستروز انجام گرفت و لوله آزمایش به مدت ۲۴ ساعت در ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید، برای حفظ قابلیت زیستی قارچ قبل از انجام آزمون‌های مطالعه، حداقل دوبار کشت در محیط سابورو دکستروز آگار به صورت خطی انجام شد تا کلنی تک و خالص *مالاسزیا فورفور* بدست آید (معصومی و همکاران، ۱۳۹۵).

فلوکونازول: در این مطالعه دیسک فلوکونازول با غلظت ۱۰ میکروگرم از شرکت زیست فناوری سینوهه تهیه و در آزمون اندازه‌گیری خصوصیات ضد میکروبی به روش دیسک بر علیه مخمر *مالاسزیا فورفور* مورد استفاده قرار گرفت.

سیپروفلوکساسین: در این مطالعه دیسک سیپروفلوکساسین (CP) با غلظت ۵ میکروگرم از شرکت زیست فناوری سینوهه تهیه و در آزمون اندازه‌گیری خصوصیات ضد میکروبی به روش دیسک بر علیه باکتری *اشرشیا کولای* مورد استفاده قرار گرفت.

تهیه سوسپانسیون باکتری *اشرشیا کولای*: در این تحقیق باکتری *اشرشیا کولای* با غلظت معادل کدورت لوله نیم مک‌فارلند استفاده شد که حاوی $۱٫۵ \times ۱۰^{۸}$ cfu/ml بود. برای تهیه کدورت مورد نظر باکتری، کدورت سوسپانسیون میکروبی با دستگاه اسپکتوفتومتری با طول موج ۶۲۵ نانومتر ارزیابی شد تا با کدورت سوسپانسون نیم مک فارلند یکسان باشد (هاشمی کروئی و همکاران، ۱۴۰۱). پس از تهیه سوسپانسیون مخمر *مالاسزیا فورفور* برای تایید تعداد مورد نیاز مخمر مورد مطالعه از لام نئوبار استفاده شد.

آزمون‌های تعیین خصوصیات ضد میکروبی به روش دیسک: ابتدا در سطح محیط کشت مولر هینتون آگار، ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی *اشرشیا کولای* معادل کدورت نیم مک فارلند با استفاده از سواپ استریل کشت یکنواخت تهیه شد، سپس در فواصل مشخص و منظم از یکدیگر و دیواره پلیت (حدود ۲ سانتی‌متر)، دیسک‌های استاندارد آنتی‌بیوگرام که دارای غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ لاندا از عصاره های تلخه بودند بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار قرار داده شد. پس از محکم کردن دیسک‌ها با پنس استریل در محیط کشت، محیط کشت مولر هینتون آگار دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد و وجود یا عدم وجود هاله ممانعت از رشد *اشرشیا کولای* در اطراف دیسک‌ها بررسی و اندازه آن برحسب میلی‌متر ثبت گردید (Humphries et al., 2021). آزمون در سه تکرار انجام گرفت و نتایج به صورت میانگین و انحراف معیار بیان شدند. برای تعیین خصوصیات ضد میکروبی عصاره های تلخه بر علیه *مالاسزیا فورفور*، به روش فوق عمل شد با این تفاوت که از محیط کشت سابورو دکستروز آگار استفاده شد.

بررسی خصوصیات ضد میکروبی عصاره های تلخه به روش چاهک: برای این کار ابتدا باکتری *اشرشیا کولای* به صورت سطحی بر روی محیط کشت مولرهینتون آگار به صورت یکنواخت کشت داده شد. سپس در فواصل معین و مساوی تقریبا با فاصله ۲ سانتی‌متر از یکدیگر، چهار عدد چاهک بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار ایجاد شد که در چاهک‌ها مقادیر به ترتیب ۸۰، ۹۰، ۱۰۰ و ۱۱۰ میکرولیتر از عصاره های تلخه که با رقت ۱ به ۵ تهیه شده بود ریخته شد. سپس پلیت‌ها به مدت یک ساعت بی‌حرکت نگه داشته شدند تا عصاره کاملا در داخل محیط مولرهینتون آگار و اطراف چاهک‌ها نفوذ کرد و بعد از آن

پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند و در نهایت رشد یا عدم رشد در اطراف چاهک‌های حاوی عصاره بررسی شدند. این آزمون در سه تکرار صورت گرفت (Balouiri et al., 2016). برای تعیین خصوصیات ضد میکروبی عصاره های تلخه بر علیه مالاسزیا فورفور، به روش فوق عمل شد با این تفاوت که از محیط کشت سابورو دکستروز آگار استفاده شد.

تعیین حداقل غلظت ممانعت از رشد(MIC): برای این آزمون ۱۱ لوله آزمایش که هر یک حاوی ۱ میلی‌لیتر محیط BHI براث بود تهیه شد، در ادامه رقت یک دوم در لوله اول تهیه شد؛ به این ترتیب که به لوله اول ۱ میلی‌لیتر عصاره آبی تلخه که به نسبت ۱ به ۴ با DMSO ترکیب شده بود اضافه شد. سپس یک میلی‌لیتر از محلول لوله اول به لوله دوم منتقل شد؛ سایر لوله‌ها نیز به این ترتیب رقت‌سازی سریالی شدند. لوله آخر فاقد عصاره آبی تلخه بود و به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. در مرحله بعد، به تمام لوله‌ها مقدار ۱۰ لاندا از سوسپانسیون میکروب مورد نظر با غلظت نیم مک‌فارلند اضافه شد (جدول ۱). تمامی لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. لوله حاوی کمترین غلظت عصاره آبی تلخه که کدورتی در آن مشاهده نشد، به عنوان حداقل غلظت ممانعت از رشد (MIC) میکروب مورد نظر در نظر گرفته شد. این آزمون با سه بار تکرار برای عصاره‌های اتانولی و متانولی نیز انجام شد و نتایج به صورت میانگین و انحراف معیار بیان شدند (غلامپور عزیزی و همکاران، ۱۴۰۰).

جدول ۱ -تهیه لوله‌ها برای آزمون حداقل غلظت ممانعت از رشد

شماره لوله	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱
محیط کشتml	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
نسبت محیط به ماده موثره	۱/۲	۱/۴	۱/۸	۱/۱۶	۱/۳۲	۱/۶۴	۱/۱۲۸	۱/۲۵۶	۱/۵۱۲	/۱۰۲۴ ۱	-
ماده موثره (mg/ml)	۱۰۰	۵۰	۲۵	۱۲,۵	۶,۲۵	۳,۱۲	۱,۵۶	۰,۷۸	۰,۳۹	۰,۱۹	-

تعیین حداقل غلظت کشنده (MBC): برای تعیین حداقل غلظت کشنده عصاره آبی تلخه، از لوله MIC و لوله‌های قبل از آن که فاقد کدورت یا رشد بودند، بر روی محیط کشت نوترینت آگار کشت سطحی داده شد و پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس پلیتی که حاوی کمترین غلظت عصاره آبی تلخه بود و رشد *اشرشیا کولای* در آن مشاهده نشد به عنوان حداقل غلظت کشنده *اشرشیا کولای* (MBC) عصاره آبی تلخه در نظر گرفته شد. این آزمون با سه بار تکرار برای عصاره‌های اتانولی و متانولی نیز انجام شد و نتایج به صورت میانگین و انحراف معیار بیان شدند.

تعیین حداقل غلظت کشنده *مالاسزیا فورفور* (MFC): برای تعیین حداقل غلظت کشنده عصاره آبی تلخه، از لوله MIC و لوله‌های قبل از آن که فاقد کدورت یا رشد بودند، بر روی محیط کشت سابورو دکستروز آگار کشت سطحی داده شد و پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس پلیتی که حاوی کمترین غلظت عصاره آبی تلخه بود و رشد *مالاسزیا فورفور* در آن مشاهده نشد به عنوان حداقل غلظت کشنده *مالاسزیا فورفور* (MFC) عصاره آبی تلخه در نظر گرفته شد. این آزمون با سه بار تکرار برای عصاره‌های اتانولی و متانولی نیز انجام شد و نتایج به صورت میانگین و انحراف معیار بیان شدند.

تعیین ترکیبات موثره گیاه تلخه

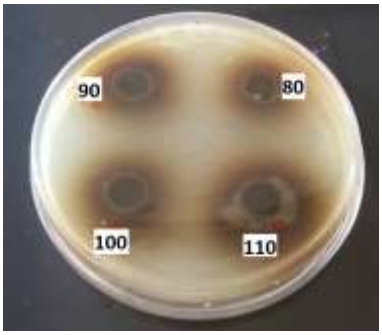
برای تعیین ترکیبات موجودر در عصاره متانولی تلخه از آزمون کروماتوگرافی گازی (GC) به روش شافعی و همکاران (۱۳۹۰) استفاده شد. برای انجام آزمون کروماتوگرافی گازی؛ از دستگاه گازکروماتوگراف از نوع آجیلنت با ستون موییینه به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰,۲۵ میلی‌متر و ضخامت داخلی ۰,۲۵ میکرومتر از نوع HP-5MS استفاده شد که دارای برنامه دمایی مشخص

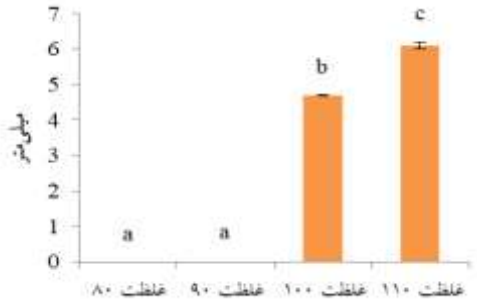
بود به این صورت که ابتدا ۵۰ درجه سانتی‌گراد با توقف ۳ دقیقه‌ای در این دما بود و سپس افزایش دما تا ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۲۰ درجه در هر دقیقه انجام شد؛ و در ادامه از افزایش دمای ستون تا ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه استفاده شد. دمای اتاقک تزریق ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد بود و از گاز هلیوم به عنوان گاز حامل با سرعت جریان ۰,۷۵ میلی‌متر در دقیقه و فشار ۱۵,۲۸۷ پاسکال استفاده شد. طیف نگار مورد استفاده از نوع آجیلنت ۵۹۷۳ (Agilent) بود که با نرم افزار مخصوص آجیلنت پشتیبانی می‌شد. شناسایی اجرای تشکیل دهنده با مقایسه طیف آن‌ها با طیف ترکیبات موجود در حافظه کامپیوتر و استانداردهای معتبر انجام شد (شافعی و همکاران، ۱۳۹۰).

آنالیز آماری: نتایج بدست آمده از این تحقیق با استفاده از نرم‌افزار SPSS (version 20) مورد ارزیابی آماری قرار گرفت. مقایسه میانگین داده‌ها توسط تست‌های آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و تست دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد بود. نمودارها توسط نرم افزار اکسل ۲۰۱۶ طراحی گردید.

۳-یافته های تحقیق

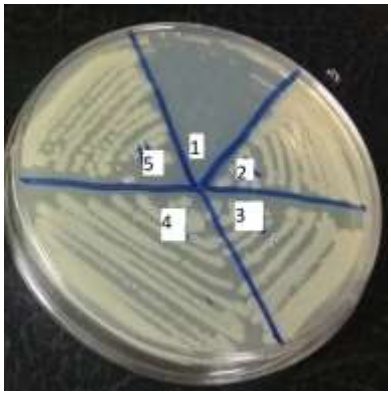
نتایج دیسک نشان داد که رشد میکروبی *اشرشیا کولای* در مجاورت غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ لاندا از تمام عصاره های تلخه نتوانستند اثر ضد باکتریایی بر علیه این میکروب داشته باشند با این حال آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین توانست اثر ممانعت کنندگی داشته باشد و هاله عدم رشد آن در تحقیق حاضر ۲۳,۳۳ میلی متر بود. در خصوص اثر ضد قارچی عصاره های تلخه بر *مالاسزیا فورفور* نیز مشخص شد که در غلظت‌های مورد مطالعه اثر ضد قارچی نداشت درحالی که فلوکونازول اثر ضد قارچی داشت و هاله عدم رشد با قطر ۱۹,۶۶ میلی‌متر ایجاد کرده بود. نتایج نشان داد که محلول رقیق کننده DMSO بر روی *مالاسزیا فورفور* و باکتری *اشرشیا کولای* اثر ضد قارچی و ضد باکتریایی نداشت. نتایج آزمون چاهک نشان داد که عصاره آبی و اتانولی تلخه در غلظت‌های ۸۰، ۹۰، ۱۰۰ و ۱۱۰ میکرولیتر اثر ضد باکتریایی بر علیه باکتری *اشرشیا کولای* نداشت؛ همین نتایج برای *مالاسزیا فورفور* نیز به دست آمد و اثر ضد قارچی دیده نشد. نتایج آزمون چاهک نشان داد که عصاره متانولی تلخه در غلظت‌های ۸۰، ۹۰، ۱۰۰ و ۱۱۰ میکرولیتر اثر ضد باکتریایی بر علیه باکتری *اشرشیا کولای* نداشت ولی عصاره متانولی تلخه بر روی *مالاسزیا فورفور* اثر ضد قارچی داشت به طوری که در غلظت‌های بالاتر یعنی غلظت ۱۰۰ و ۱۱۰ میکرولیتر توانست منطقه عدم رشد ایجاد نماید(نمودار۱ و شکل ۱).





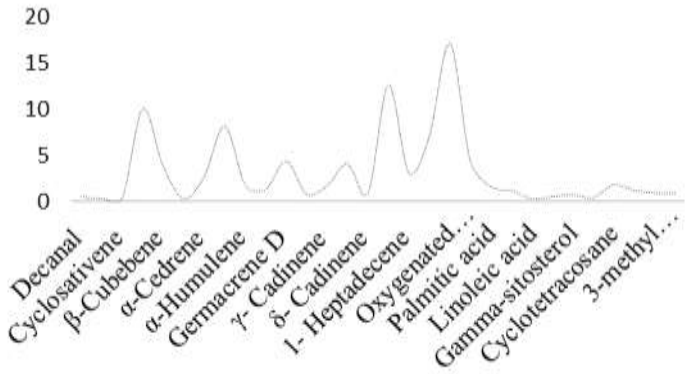
نمودار۱ و شکل ۱-قطر هاله عدم رشد *مالاسزیا فورفور* در مجاورت عصاره متانولی تلخه به روش چاهک

در این تحقیق، آزمون حداقل غلظت ممانعت از رشد *اشرشیا کولای* بر روی عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی عصاره تلخه صورت گرفت و نتایج نشان داد هیچ یک از عصاره‌های مورد مطالعه نتوانستند بر روی باکتری *اشرشیا کولای* اثر مهار کنندگی داشته باشند. آزمون حداقل غلظت ممانعت از رشد *مالاسزیا فورفور* بر روی عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی عصاره تلخه صورت گرفت و نتایج نشان داد عصاره‌های اتانولی و متانولی به ترتیب در غلظت‌های ۱۰,۶۶ و ۱۷,۶۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اثر مهار کنندگی داشتند و عصاره آبی تلخه تنوانست رشد *مالاسزیا فورفور* را مهار نماید. آزمون تعیین حداقل غلظت کشنده عصاره آبی، اتانولی و متانولی تلخه بر روی *مالاسزیا فورفور* نشان داد که عصاره آبی قادر به کشتن قارچ *مالاسزیا فورفور* نبود ولی عصاره‌های اتانولی و متانولی تلخه در غلظت‌های ۱۸,۶۵ و ۳۵,۳۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر باعث مرگ *مالاسزیا فورفور* شدند



شکل ۲- حداقل غلظت کشنده عصاره اتانولی تلخه بر روی *مالاسزیا فورفور*

نتایج آزمون کروماتوگرافی عصاره متانولی تلخه نشان داد که بیشترین ترکیبات موجود در عصاره عبارتند از اکسیژنیتد سسکوئیترپنز[1] (۱۷,۳ درصد)، کاریوفیلن اکساید[2] (۱۲,۷ درصد)، آلفا-کوپان[3] (۱۰,۱ درصد) و بتا-کاریوفیلن[4] (۸,۲ درصد). نتیجه کامل این آنالیز در نمودار ۲ و جدول ۲ نشان داده شده است.



نمودار ۲- نتایج آزمون کروماتوگرافی عصاره متانولی تلخه

جدول ۲- ترکیبات عصاره متانولی تلخه با کروماتوگرافی گازی

Compound	Percentage	RI (min)
Decanal	0/5	1198
α-Cubebene	0/3	1351
Cyclosativene	0/4	1367
α-Copaene	10/1	1378
β-Cubebene	3/8	1391
α-Gurjunene	0/3	1408
α-Cedrene	2/7	1411
β-Caryophyllene	8/2	1421
α-Humulene	1/8	1453

[1] . Oxygenated sesquiterpenes

[2] . Caryophyllene oxide

[3] . α-Copaene

[4] . β-Caryophyllene

γ-Muurolene	1/3	1479
Germacrene D	4/4	1486
Cadina-1,4-diene	0/8	1503
γ- Cadinene	1/7	1516
Δ-Cadinene	4/1	1521
δ- Cadinene	0/9	1526
Caryophyllene oxide	12/7	1578
1- Heptadecene	3/1	1691
Aliphatic hydrocarbons	7/1	1715
Oxygenated sesquiterpenes	17/3	1743
Octadecane	4/4	1800
Palmitic acid	1/6	1919
Eicosane	1/2	1995
Linoleic acid	0/3	2088
Octadecanoicacid,ethyl ester	0/5	2127
Gamma-sitosterol	0/7	2448
Pentacosane	0/4	2500
Cyclotetracosane	1/8	2680
Alpha-tocopherol	1/2	2740
3-methyl pentadecane	0/9	2864
Alpha-tocopherol	0/9	3011
Total	**95/4**	

۴-بحث و نتیجه گیری

در سال های اخیر تحقیقات زیادی در زمینه اثرات بازدارندگی مواد طبیعی در برابر میکروارگانیسم‌ها صورت گرفته است. در این تحقیق نیز سعی شد تا با استفاده از عصاره گیاهان بومی به یک ترکیبت ضد میکروب جدید و البته طبیعی دست یافت، یکی از گیاهان ارزان و در دست رس گیاه تلخه است؛ گیاه تلخه یک علف هرز صیفی‌کاری‌ها، باغ‌ها و زمین‌های بایر است؛ این گیاه دارای ترکیبات شیمیایی متعددی در ریشه، ساقه، گل و میوه است. ترکیباتی همچون: آلکالوئید سی تیزین، سوفورین (شبیه سی تیزین است)، ماترین و متیل سی تیزین، سی تیزین، روتین، رامنو گلیکوزید، کوثرستین، سوفورین (مشابه روتین است) و انی سول می‌باشد که مسئول خصوصیات ضد متعددی در گیاه هستند (Afsharnezhad et al., 2021). در این تحقیق از عصاره‌های گیاه تلخه که با استفاده از حلال‌های آبی، اتانولی و متانولی مستخرج شده بودند به مطالعه اثر ضد قارچی و ضد باکتریایی آن‌ها پرداخته شد؛ همچنین مقایسه‌ای بین خصوصیات ضد میکروبی عصاره‌ها با ترکیبات آنتی‌بیوتیکی متداول انجام گرفت. نتایج نشان داد که عصاره آبی، اتانولی و متانولی تلخه به روش دیسک غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ لاندا نتوانست اثر ضد باکتریایی بر علیه *اشرشیا کولای* و یا اثر ضد قارچی بر علیه *مالاسزیا فورفور* داشته باشد درحالی که سیپروفلوکساسین اثر ضد باکتریایی قوی داشت و فلوکونازول اثر ضد قارچی خوبی از خود نشان دادند. این نتایج ماید این موضوع است که عصاره‌های تلخه در غلظت‌های مورد مطالعه به شکل معنی داری از داروهای ضد قارچ و ضد باکتری متداول در بازار ضعیف‌تر هستند. یکی از دلایل نتایج به دست آمده ممکن است این باشد که برای مشاهده خصوصیات ضد میکروبی عصاره‌ها نیاز به دوز بالاتری از عصاره است و دوزهای یاد شده به دلیل کم بودن ماده موثره قادر به ایجاد تاثیر ضد میکروبی نیستند؛ در مطالعات قبلی نیز کم بودن غلظت عصاره نتایج مشابهی ایجاد کرده بود (Firooziyan et al., 2021). نتایج ضد میکربی عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی تلخه نتوانستند در غلظت‌های بالاتر به روش چاهک مانع از رشد باکتری *اشرشیا کولای* شوند و غلظت‌های ۸۰، ۹۰، ۱۰۰ و ۱۱۰ میکرولیتر هیچ یک از عصاره‌ها اثر ضد باکتریایی بر علیه باکتری *اشرشیا کولای* نداشت؛ نتایج نشان داد که عصاره‌های آبی و اتانولی تلخه نتوانستند بر روی *مالاسزیا فورفور* نیز اثر ضد قارچی داشته باشند ولی عصاره متانولی تلخه اثرات ضد قارچی خود را بروز داد و در غلظت ۱۰۰ و ۱۱۰ میکرولیتر توانست منطقه عدم رشد

مالاسزیا فورفور را اطراف چاهک ایجاد نماید؛ هرچه مقدار عصاره بیشتر شد منطقه عدم رشد *مالاسزیا فورفور* نیز بیشتر شده بود که احتمالا به دلیل افزایش غلظت ترکیبات موثره در عصاره بود. نتایج نشان داد که عصاره متانولی و در غلظت بالا توانست اثرات ضد قارچی بر علیه *مالاسزیا فورفور* نشان دهد. نتایج آزمون حداقل غلظت ممانعت از رشد *اشرشیا کولای* بر روی عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی عصاره تلخه نشان داد هیچ یک از عصاره‌های مورد مطالعه نتوانستند بر روی باکتری *اشرشیا کولای* اثر مهار کنندگی داشته باشند، این در حالی است که عصاره‌های اتانولی و متانولی تلخه به ترتیب در غلظت‌های ۱,۱۵ ± ۱۰,۶۶ و ۱,۵۳ ± ۱۷,۶۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اثر مهار کنندگی بر روی *مالاسزیا فورفور* داشتند و عصاره آبی تلخه تنوانست رشد *مالاسزیا فورفور* را مهار نماید.

آزمون تعیین حداقل غلظت کشنده عصاره آبی، اتانولی و متانولی تلخه بر روی باکتری *اشرشیا کولای* نشان داد که هیچ کدام از عصاره‌های تلخه نتوانستند در هیچ غلظتی باعث کشته شدن *اشرشیا کولای* شوند؛ آزمون تعیین حداقل غلظت کشنده عصاره آبی، اتانولی و متانولی تلخه بر روی *مالاسزیا فورفور* نشان داد که عصاره آبی قادر به کشتن قارچ *مالاسزیا فورفور* نبود ولی عصاره‌های اتانولی و متانولی تلخه در غلظت‌های ۲,۰۱ ± ۱۸,۶۵ و ۳,۰۶ ± ۳۵,۳۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر باعث مرگ *مالاسزیا فورفور* شدند. با این اوصاف و با تکیه بر نتایج به دست آمده از این تحقیق میتوان اینگونه نتیجه گیری کرد که عصاره گیاه تلخه قادر به مهار رشد باکتری *اشرشیا کولای* نیست، ولی در خصوص *مالاسزیا فورفور* اثر ضد قارچی دیده شد. اثرات ضد قارچی عصاره تلخه به دلیل ترکیبات و مواد موثره موجود در آن است به طوری که در تحقیقات قبلی نیز مشخص شده بود ولی بیشتر تحقیقات نشان داده بودند که عصاره تلخه بر روی باکتری‌های گرم منفی اثر ضد باکتریایی ندارد که دقیقا مطابق نتایج تحقیق ما بود.

در تحقیق Norouzi و همکاران نتایج نشان داد که اسانس تلخه بر روی باکتری های گرم مثبت مانند *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* اثر ضد میکروبی داشت و نکته جالب در مورد باکتری های گرم منفی بود که تقریبا همه آنها نسبت به اسانس تلخه غیر حساس یا مقاوم بودند (Norouzi et al., 2006). در تحقیق Afsharnezhad و همکاران (۲۰۲۱)، اثر عصاره گیاه تلخه روی باکتری‌های *باسیلوس سوبتیلیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *میکروکوکوس لوته اوس*، *سودوموناس آیروژنوزا* و *اشیریشیا کولی* مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد حساس‌ترین باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* بود. باکتری‌های *سودوموناس آیروژنوزا* و *اشیریشیا کولی* که گرم منفی بودند نیز کاملا مقاوم بودند و هاله عدم رشد تشکیل ندادند. نتایج این تحقیق نشان داد که بیشترین اثر ضد میکروبی مربوط به عصاره متانولی و بعد از آن عصاره اتانولی بود (Afsharnezhad et al., 2021). مطالعات Chalabian و همکاران نیز نشان داد که اسانس گیاه تلخه خصوصیات ضد میکروبی دارد ولی این خصوصات تنها بر روی باکتری‌های گرم مثبت بوده است به طوری که *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به اسانس حساس بودند ولی باکتری های *سالمونلا تیفی*، *شیگلا فلکسنری* و *اشریشیا کولای* حساس نبودند (Chalabian et al., 2003). مشابه همین نتایج در تحقیق Dilfuza و همکاران بود و نشان داد که خصوصیت ضد میکروبی عصاره تلخه به باکتری گرم مثبت محدود بود و باکتری گرم منفی در برابر این گیاه حساسیت نداشت (Dilfuza et al., 2021). ببری بناب و جودی (۱۳۹۳) نیز عنوان کردند که در مقایسه بین عصاره گیاه تلخه با آنتی‌بیوتیک، قدرت ضد میکروبی آنتی بیوتیک به مراتب بالاتر بود (ببری بناب و جودی، ۱۳۹۳). به نظر می‌رسد وجود ترکیبات متنوع در گیاه تلخه مسئول خصوصیات ضد میکروبی آن باشد؛ تحقیق حاضر و مطالعه تحقیقات قبلی نیز نشان می‌دهد که گیاه تلخه دارای خصوصیت ضد میکروبی است ولی این ویژگی ضد میکروبی بسیار محدود است و تنها در عصاره متانولی با غلظت بالا و بر روی قارچ دیده شده است. قدرت ضد قارچی عصاره در مقایسه با داروهای رایج در بازار نیز قابل رقابت نبوده و به شکل معنی داری نسبت به داروی فلوکونازول ضعیف‌تر بود. قدرت ضد میکروبی عصاره تلخه بر روی باکتری *اشریشیا کولای* دیده نشد که در تحقیقات قبلی نیز مشخص شده بود که عصاره این گیاه خصوصیت ضد باکتریایی علیه باکتری‌های گرم منفی نداشته است در حالی که آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین قدرت ضد میکروبی بالایی از خود نشان داده بود.

۵-منابع

۱. ببری بناب رقیه، جودی لیلا (۱۳۹۳). بررسی خاصیت ضد میکروبی عصاره گیاه تلخه (Acroptilon repens L.) اولین همایش ملی گیاهان دارویی، طب سنتی و کشاورزی ارگانیک، همدان.

۲.سکوتی زهرا، حسینی محمد، شیروی عبدالحسین، چنگیزی رضا، مشرفی امیرحسین (۱۳۹۶). بررسی تأثیر عصاره اندام هوایی علف هرز تلخه (Acroptilon repens Lبر روی سلول‌های لوسمی حاد پرومیلوسیتی رده سلولی -HL۶۰. مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران ۱۳۹۶; ۲۷ (۱۴۷) :۴۷-۴۱.

۳.شافعی مریم، شریفان انوشه، آقازاده مشگی مهزاد (۱۳۹۰). شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس کاکوتی و بررسی اثر ضد میکروبی آن بر روی مخمر کلویورومایسس مارکسیانوس. علوم غذایی و تغذیه، سال نهم، شماره ۱، صفحه ۱۰۱-۱۰۷.

۴.غلامپور عزیزی ع.، احمدی ف.، کلانتری م. ۱۴۰۰. بررسی اثرمهاری عصاره ی آبی اتانولی و متانولی گیاه خارخاسک (Tribulus terrestris) بر رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس. مطالعات علوم زیستی و زیست فناوری ۷(۴): ۱-۲۶

۵.هاشمی کروئی س. م.، علی نیا ف.ز.، غلامپور عزیزی ع. ۱۴۰۱. بررسی اثر ضد باکتری متابولیت کپک های جدا شده از سیب پوسیده روی*E. coli* . مطالعات علوم زیستی و زیست فناوری ۸(۳): ۱-۱۲

۶.معصومی ولی اله، تاجیک حسین، مرادی مهران، فروغ مهرداد، شهابی نسیم (۱۳۹۵). اثرات ضدمیکروبی نانوامولسیون اسانس آویشن شیرازی علیه اشرشیاکلی O۷:H۱۵۷. مجله مطالعات علوم پزشکی ۱۳۹۵; ۲۷ (۷) :۶۱۷-۶۰۸.

7. Abdillah A, Ranque S. (2020). Chronic Diseases Associated with Malassezia Yeast. Journal of Fungi. 2021;7(10):855.
8. Afsharnezhad Moslem, Shahangian S. Shirin, Rasti Behnam, Faezi Ghasemi Mohammad (2021). Inhibitory Potential of Acroptilon repens against Key Enzymes involved in Alzheimer and Diabetes, Phytochemical Profile, Radical Scavenging, and Antibacterial Activity. Iran Biomed J. 2021 Jan; 25(1): 21–32.
9. Akhgari Z, Nazari R, Zargar M, Tanomand A. (2021). Antibacterial and antibiofilm properties of Acroptilon repens (L.) Dc extract and its effect on exotoxin A gene expression of Pseudomonas aeruginosa. Gene Reports. 2021; 25: 101357.
10. Balouiri, M., Sadiki, M. and Ibnsouda, S.K. (2016) Methods for in Vitro Evaluating Antimicrobial Activity: A Review. Journal of Pharmaceutical Analysis, 6, 71-79.
11. Chalabian F, Norouzi Arasi H, Moosavi S. (2003). A study of growth inhibitory effect of essential oils of seven species from different families on some kinds of microbes. J. Med. Plants. 2003; 2 (7) :37-42
12. Chen I-T, Chen C-C, Huang H-C, Kuo K-C. (2020). Malassezia furfur emergence and candidemia trends in a neonatal intensive care unit during 10 years: the experience of fluconazole prophylaxis in a single hospital. Advances in Neonatal Care. 2020;20(1):E3.
15. Cuba GT, Pignatari ACC, Patekoski KS, Luchesi LJ, Kiffer CRV. (2014). Pharmacodynamic profiling of commonly prescribed antimicrobial drugs against Escherichia coli isolates from urinary tract. Brazilian Journal of Infectious Diseases. 2014;18:512-7.
16. Dashti A, Shokrzadeh M, Karami M, Habibi E. (2022). Phytochemical identification, acute and subchronic oral toxicity assessments of hydroalcoholic extract of Acroptilon repens in BALB/c mice: A toxicological and mechanistic study. Heliyon. 2022;8(2):e08940.
17. Dilfuza Egamberdieva, Dilfuza Jabborova, Svetlana Babich, Sokhiba Xalmirzaeva, Kamaliddin Salakhiddinov, Madamin Madazimov. (2021). Antimicrobial activities of herbal plants from Uzbekistan against human pathogenic microbes. Environmental Sustainability volume 4, pages87–94.

18. Egamberdieva D, Jabborova D, Babich S, Xalmirzaeva S, Salakhiddinov K, Madazimov M. (2021). Antimicrobial activities of herbal plants from Uzbekistan against human pathogenic microbes. Environmental Sustainability. 2021;4(1):87-94.
19. Firooziyan S, Osanloo M, Moosa-Kazemi SH, Basseri HR, Hajipirloo HM, Sadaghianifar A, (2021). Preparation of a Nanoemulsion of Essential Oil of Acroptilon repens Plant and Evaluation of its Larvicidal Activity Agianst Malaria Vector, Anopheles stephensi. Journal of Arthropod-Borne Diseases. 2021;15(3):335-48
20. Humphries, R., Bobenchik, A. M., Hindler, J. A., & Schuetz, A. N. (2021). Overview of changes to the clinical and laboratory standards institute performance standards for antimicrobial susceptibility testing, M100. Journal of clinical microbiology, 59(12), e00213-21.
21. Jang J, Hur HG, Sadowsky MJ, Byappanahalli M, Yan T, Ishii S. (2017). Environmental Escherichia coli: ecology and public health implications—a review. Journal of applied microbiology. 2017;123(3):570-81.
22. Ni G-Y, Schaffner U, Peng S-L, Callaway RM. (2010). Acroptilon repens, an Asian invader, has stronger competitive effects on species from America than species from its native range. Biological Invasions. 2010;12(11):3653-63.
23. Nohtani F, Pouraboli I. (2014). Antidiabetic and Anti-lipid Peroxidative Effects of Hydroalcoholic Extract of Acroptilon repens in Male Rats. Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences. 2016;14(10):84-89.
24. Norouzi-Arasi Hassan, Yavari Issa, Chalabian Firoozeh, Kiarostami Vahid, Ghaffarzadeh Fatimeh, Nasirian Abdolhamid (2006). Chemical constituents and antimicrobial activities of the essential oil of Acroptilon repens (L.) DC. Flavour and Fragrance Journal. Volume21, Issue2, March/April 2006. Pages 247-249
25. Pedrosa AF, Lisboa C, Rodrigues AG. (2014). Malassezia infections: a medical conundrum. Journal of the American Academy of Dermatology. 2014;71(1):170-6.
26. Rezanejad F, Shojaei M ,Zamani Bahramabadi E, Badoei-Dalfard A, Esmaeili Mahani S. (2018). Allergenicity of Acroptilon repens and Juglans regia pollen in rats. Grana. 2018;57(4):292-7.
27. Wypij M, Świecimska M, Czarnecka J, Dahm H, Rai M, Golinska P. (2018). Antimicrobial and cytotoxic activity of silver nanoparticles synthesized from two haloalkaliphilic actinobacterial strains alone and in combination with antibiotics. Journal of applied microbiology. 2018;124(6):1411-24.

مطالعات علوم زیستی و زیست فناوری

دوره ۸، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۱، صفحات ۱۱-۱

Investigation of antibacterial and antifungal effects of aquatic and alcholic extracts of *Acroptilon repens* against on *E. coli* (ATCC 1399) and *Malassezia furfur* (ATCC 14521) compared by ciprofloxacin and fluconazole

Mehdi Dadash Firozjaii[1], Monavarssadat Mousavizadeh[2], Issa Gholampour Azizi*[3]

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

Abstract

Malassezia furfur is a lipophilic yeast and is known as the agent of skin diseases, especially tinea versicolor. *E. coli* is gram negative bacteria that cause gastrointestinal diseases and mastitis in animals, The aim of this study was to compare the antimicrobial effects of aquatic, ethanolic and methanolic extracts of *Acroptilon repens* against *Malassezia furfur* (ATCC 14521) and *E. coli* (PTCC 1399) compared with fluconazole and ciprofloxacin. In this study, the antimicrobial effect of extracts has been evaluated by Disk Diffusion methods, Moreover, the MIC and MFC/MBC of the extracts were assessed by agar dilution and broth microdilution method. Results shows that there was no inhibition zone of *Malassezia furfur* and *E. coli* in disk diffusion method but fluconazole had inhibition zone about 19.66 mm and ciprofloxacin had inhibition zone about 23.33 mm. There was no inhibition zone for *Malassezia furfur* and *E. coli* in agar dilution method for aquatic and ethanolic extract but methanolic extract had inhibition zone 4.7 and 6.1 mm respectively for 100 and 110 µl concentration for *Malassezia furfur*. The MIC and MBC of aquatic, ethanolic and methanolic extracts against *E. coli* was 0 mg/ml. The MIC of aquatic, ethanolic and methanolic extracts against *Malassezia furfur* was 0, 1.66 and 17.66 mg/ml MFC range for aquatic, ethanolic and methanolic extracts was 0, 18.65 and 35.32 mg/ml respectively. Results obtained show that the extracts of *Acroptilon repens* had antifungal activities against *Malassezia furfur*.

Keywords: *Antibacterial, Antifungal, Acroptilon repens, extracts, Drug resistance*