مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان/دوره بیستم/ فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۴/ ۳۹-۳۰

بررسی اثر ضد قارچی عصاره برگ درخت گردو (*Juglans regia* L.) بر قارچ *مالاسزیا فورفور* در شرایط آزمایشگاهی

عیسی غلامپور عزیزی[۱]، سمانه روحی[۲] ، بیژن نوری[۳]، شعبان حسن زاده میاندسته[۴]

۱. استادیار گروه قارچ شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل، بابل، ایران.

۲. دانشجوی دوره دکترای اپیدمیولوژی مولکولی باکتری ها، مرکز تحقیقات سلولی-مولکولی و گروه میکروب شناسی، عضو کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران.

۳. استادیار گروه اپیدمیولوژی و آمار زیستی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات عوامل اجتماعی موثر بر سلامت کردستان، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران.

۴. کارشناس ارشد فیزیولوژی گیاهی، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل، بابل، ایران. (نویسنده مسوول) تلفن ثابت:۴۲۲۵۲۱۹۶-۰۱۱
microbiol_sci@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: قارچ *مالاسزیا فورفور* عامل بیماری پیتیریازیس ورسیکالر می باشد. ترکیبات فنولی موجود در برگ درخت گردو دارای خاصیت ضد میکروبی می باشند. هدف از این تحقیق بررسی اثر ضد قارچی عصاره های الکلی و آبی برگ درخت گردو بر قارچ *مالاسزیا فورفور* در شرایط آزمایشگاهی است.

روش بررسی: از برگ گردو به روش تقطیر ساده و روتاری عصاره های آبی و الکلی تهیه و سپس اثرات ضد قارچی این عصاره ها بر *مالاسزیا فورفور* در آزمایشگاه به روش‌های دیسک و چاهک مطالعه و سپس حداقل غلظت ممانعت کنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MFC) آنها تعیین شد. نرم افزار SPSS18 و آزمون های آماری آنالیز واریانس دو طرفه و بن فرونی (Bonferroni) جهت تجزیه و تحلیل داده ها مورد استفاده قرار گرفت.

یافته ها: بیشترین قطر هاله ممانعت از رشد برای عصاره آبی، اتانولی و متانولی به ترتیب ۳۰ ، ۲۸/۶۶ و ۴۶/۳۳ میلی متر بود که در غلظت ۱۱۰ میلی گرم در میلی لیتر مشاهده شد. MIC عصاره آبی بر *مالاسزیا فورفور* برابر با ۲۵×۱۰^{۳} میلی گرم در میلی لیتر و MFC آن ۵×۱۰^{۴} میلی گرم در میلی لیتر تعیین شد . MIC و MFC عصاره اتانولی برگ گردو نیز به ترتیب برابر با ۶۲۵۰ و ۱۲۵×۱۰^{۲} میلی گرم در میلی لیتر بودند. همچنین MIC و MFC عصاره متانولی به ترتیب برابر با $۱۰^{۳}\times$ ۲۵ و ۵×۱۰^{۳} میلی گرم در میلی لیتر تعیین شدند. نتایج آماری نشان داد که عصاره های مختلف تاثیر متفاوتی بر قطر هاله عدم رشد داشتند و با افزایش غلظت عصاره، قطر هاله عدم رشد نیز افزایش یافت ($p <۰/۰۵$).

نتیجه گیری: بنابر نتایج بدست آمده می توان احتمال داد که در آینده بتوان از عصاره‌های برگ درخت گردو برای درمان بیماری های ناشی از قارچ *مالاسزیا فورفور* استفاده نمود.

واژه های کلیدی: اثر ضد قارچی، عصاره، برگ درخت گردو، *مالاسزیا فورفور*

وصول مقاله:۹۳/۱/۲۷ اصلاحیه نهایی:۹۳/۷/۲۰ پذیرش:۹۳/۸/۲۶

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-06-27]

[DOI: 10.22102/20.1.4]

مقدمه

با توسعه سریع داروهای سینتتیک (Synthetic) در بیست سال اخیر استفاده از گیاهان دارویی تا اندازه زیادی نسخ شده بود، ولی به علت ظاهر شدن عوارض نامطلوب و جانبی این ترکیبات و عدم سازگاری آنها با طبیعت انسان بار دیگر توجه دانشمندان و محققین به گیاه درمانی و مواد موثر موجود در گیاهان دارویی معطوف گردید. *مالاسزیا فورفور* (*Malassezia furfur*) یک مخمر چربی دوست است و عامل بیماری پیتیریازیس یا تینه آورسیکالر or tinea (Pityriasis versicolor versicolor) می باشد که باعث ضایعات پوستی در پوست سر، سینه، پشت، تنه ، ران و صورت می شود. همچنین این قارچ از بیماران با علائم و نشانه های عفونت خون یا سپسیس (Sepsis) نیز جدا شده است (۳ -۱). برای درمان این بیماری از مواد کراتولیتیک) (Keratolytic یا از بین برنده لایه شاخی پوست مثل پماد وایت فیلد، کلوتریمازول و تربینافین می توان استفاده کرد که همگی اینها مواد شیمیایی بوده و اثرات سوء روی بدن میزبان نظیر احساس سوزش، خارش و تحریک دارند (۳). همچنین استفاده گسترده از عوامل ضد قارچ ممکن است علت بوجود آمدن گونه های مقاوم به داروهای ضد قارچی شود (۴). ترکیبات فنولی موجود در برگ درخت گردو (نام علمی (walnut tree) *Juglans regia* L.) نظیر کینونها، تانهای هیدولیز شونده و فلاونوییدها دارای خاصیت حساسیت زدایی، ضد اکسایش، ضد التهاب و ضد میکروبی می باشند و به طور طبیعی ضرری برای محیط زیست و انسان ندارند. برگ درخت گردو حشرات موذی مانند بید و ساس را از بین می برد. عصاره برگ این درخت خاصیت با کتری کشی و انگل کشی دارد. مصرف دم کرده برگ گردو نیز اثر کاهش دهنده مقدار قند خون در مبتلایان به دیابت دارد و برای مبتلایان به ورم مفاصل و بیماری های پوستی اگزما نیز می تواند مفید واقع شود. در طب سنتی از برگ درخت گردو به عنوان تصفیه کننده خون و رفع عوارض مزمن دستگاه هضم و بیماریهای پوستی استفاده می شود (۶ و۵).

در مطالعات مختلف اثرات ضد میکروبی گیاه گردو بر میکروب های مختلف ثابت شده است:

Noumi و همکارانش در سال۲۰۱۰ در تونس با بررسی اثرات ضد قارچی عصاره متانولی، اتیل استاتی و استونی پوست میوه گیاه گردو بر *کاندیدا آلبیکنس* (*Candida albicans*) نتیجه گرفتند که این عصاره ها دارای اثر ضد کاندیدایی بودند و مقدار کمترین غلظت مهار کنندگی باکتری یا MIC (Minimum inhibitory concentration) آن ۰/۱۹۵ - ۰/۰۰۶ میلی گرم بر میلی لیتر بود (۷). Sharafati-Chaleshtori و همکاران در سال ۲۰۱۰ در ایران اثرات ضد باکتریایی عصاره اتانولی برگ گردوی ایرانی را بر روی *استرپتوکوک موتانس* (*Streptococcus mutans*) و *استرپتوکوک سانگوئیس* (*Streptococcus sanguinis*) بررسی کردند، در این مطالعه MIC عصاره اتانولی برگ گردو برای *استرپتوکوک های موتانس* و *سانگوئیس* به ترتیب ۱۲۵ و ۱۵/۶ میلی گرم در میلی لیتر بود. بنابراین عصاره برگ گردو دارای اثر ضد میکروبی علیه باکتری های مذکور بوده و می تواند به عنوان فرآورده ضد عفونی کننده در پیشگیری و درمان پوسیدگی های دندانی حاصل از این میکروارگانیسم ها جایگزین گردد (۸). در مطالعه دیگر نیز Sharafati-Chleshtori و همکاران در سال ۲۰۱۱ در ایران نشان دادند که عصاره اتانولی برگ درخت گردو فعالیت های ضد باکتریایی علیه *استرپتوکوک موتانس*، *استرپتوکوک سالیواریوس* (*Streptococcus salivarius*)، *استرپتوکوک سانگوئیس* و *اکتینومایسس ویسکوز* (*Actinomyces viscosus*) دارد و MIC آن ۱۸۷/۵-۱۵/۵ و کمترین غلظت باکتری کشی یا MBC (Minimum bactericidal concentration) آن ۳۱/۲۵ میلی گرم در میلی لیتر بود (۹). همچنین Zakavi و همکاران در سال ۲۰۱۳ در ایران گزارش دادند که عصاره های اتانولی پوسته ساقه درخت گردو اثر ضد میکروبی بر علیه *استافیلوکوک اورئوس*

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-06-27]

[DOI: 10.22102/20.1.4]

(*Staphylococcus aureus*)، *استرپتوکوک موتانس*، *استرپتوکوک سانگوئیس* و *استرپتوکوک سالیواریوس* دارد و MIC آن برای هر باکتری به ترتیب ۲، ۵، ۱/۲۵ و ۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر بود (۱۰). Ali-Shtayeh و Abu Ghdeib در سال ۱۹۹۹ نشان دادند که عصاره آبی برگ و میوه گردو اثر ضد قارچی بر علیه قارچ های بیماری زای *میکروسپوروم کنیس* (*Microsporum canis*) و *تریکوفیتون ویولاسئوم* (*Trichophyton violaceum*) دارد و MIC آن ۴۰- ۰/۶میکروگرم بر میلی لیتر تعیین شد (۱۱). با توجه به اثرات داوریی این گیاه و نیاز جامعه امروزی به داروهای جدید هدف در این تحقیق بررسی اثرات ضد قارچی عصاره‌های آبی و الکلی برگ درخت گردو در شرایط آزمایشگاه بر روی قارچ *مالاسزیا فورفور* به روش‌های دیسک، چاهک و تعیین کمترین غلظت مهارکنندگی MIC و کمترین غلظت قارچ کشی MFC (Minimum fungicidal concentrations) عصاره های مذکور می باشد.

روش بررسی

نوع مطالعه تجربی-آزمایشگاهی است. این تحقیق در آزمایشگاه قارچ شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل در استان مازندران برای تعیین خاصیت ضد قارچی عصاره برگ گردو بر قارچ *مالاسزیا فورفور* به روش دیسک و چاهک و همچنین تعیین MIC و MFC انجام شد.

جمع آوری نمونه

در فصول پاییز و زمستان ۱۳۹۲ از مزارع استان مازندران برگ درخت گردو ایرانی (نام علمی(Persian walnut (*J. regia*) جمع آوری شد و ابتدا چند بار با آب فراوان شستشو داده و در طول مدت یک ماه در دمای اتاق (۲۷ درجه سانتی گراد) خشک شد. از برگ های خشک شده بوسیله آسیاب برقی پودر تهیه شد (۱۲) .

کشت قارچ

نمونه بالینی *مالاسزیا فورفور* برای این مطالعه توسط دانشگاه علوم پزشکی مازندران ارائه شد. کشت قارچ بصورت خطی در محیط سابورودکستروز آگار SDA (Sabouraud Dextrose Agar) (شامل آنتی بیوتیک های کلرامفنیکول و جنتامایسین (Merck مرک ، آلمان) برای جلوگیری از رشد باکتری ها کشت داده شد و به مدت ۴۸ ساعت در ۳۵ درجه سانتی گراد انکوبه شد. سپس کلونی ها بوسیله بلودومتیلن رنگ آمیزی شدند. گونه *مالاسزیا فورفور* بر اساس مورفولوژی کلنی، شکل میکروسکوپیک و عدم رشد بر روی محیط سابورودکستروز بدون چربی شناسایی شدند. پس از تایید *مالاسزیا فورفور* در گروه قارچ شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل، مطالعه بر روی آنها انجام شد (۱۴و ۱۳).

تهیه سوسپانسیون قارچی

کلونی های تازه قارچ *مالاسزیا فورفور* در ۵ میلی لیتر سالین نرمال (Normal Saline) رقیق و سپس به مدت ۱۵ ثانیه ورتکس شد. بعد از این مرحله سوسپانسیون این قارچ به اندازه $۱/۵\times ۱۰^{۸}$ CFU/ml بر اساس استاندارد ۰/۵ مک فارلند تنظیم شد (۱۳).

عصاره‌گیری آبی

از روش پرکولاسیون جهت آماده سازی عصاره ها استفاده شد. ۲۵ گرم از پودر برگ گردو که قبلا خشک شده بود و بصورت پودر در آمده بود بطور جداگانه داخل یک کاغذ صافی تمیز پیچانده شد و سپس با ۲۵۰ میلی لیتر آب در یک ارلن مخلوط شد و به مدت ۳ دقیقه به طور مداوم تکان داده شد. بعد از این مرحله در دمای اتاق (۲۷ درجه سانتی گراد) برای ۲۴ ساعت قرار داده شد. سپس به کمک کاغذ صافی No. 1 عصاره صاف شد و در دستگاه روتاری Rotary برای حذف حلال قرار داده شد. بعد از این مرحله عصاره آبی در انکوباتور (۴۰ درجه سانتی گراد) خشک شد. سپس محلول استوک از ۱ گرم عصاره آبی خشک شده در غلظت نهایی ۵ میلی لیتر دی متیل سولفوکساید Dimethyl

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-06-27]

[DOI: 10.22102/20.1.4]

Sulphoxide (DMSO) حل شد و بوسیله سرنگ میلی پور با فیلترهایی به قطر ۰/۲۲ میکرون فیلتر شد (۱۶و ۱۵).

عصاره‌گیری متانولی و اتانولی

۲۵ گرم از پودر برگ خشک شده گیاه وزن شد و هر کدام جداگانه داخل یک ارلن ریخته شد. در این مرحله دو ارلن بطور جداگانه بکار برده شد که در یکی از ارلن ها ۲۵ گرم پودر برگ خشک شده گیاه گردو، ۱۰۰ میلی لیتر متانول، ۱۰۰ میلی لیتر دی اتیل اتر و ۱۰۰ میلی لیتر N هگزان (N-Hexane) جهت آماده سازی عصاره متانولی ریخته شد. در ارلن بعدی ۲۵ گرم پودر برگ خشک شده گیاه گردو، ۱۰۰ میلی لیتر اتانول ۸۰٪، ۱۰۰ میلی لیتر دی اتیل اتر و ۱۰۰ میلی لیتر N هگزان (N-Hexane) جهت آماده سازی عصاره اتانولی ریخته و دهانه آن‌ها را با ورقه آلومینیوم بسته و به مدت ۳ دقیقه به طور مداوم تکان داده و در دمای اتاق (۲۷ درجه سانتی گراد) برای ۲۴ ساعت نگهداری شد. سپس به کمک کاغذ صافی No. 1 عصاره صاف و در دستگاه روتاری برای حذف حلال قرار داده شد. بعد از این مرحله عصاره الکلی بدست آمده در انکوباتور (۴۰ درجه سانتی گراد) خشک شد. در انتها ۱ گرم از هر کدام از عصاره های الکلی (اتانولی و متانولی) خشک شده در غلظت نهایی ۵ میلی لیتر DMSO حل و بوسیله سرنگ میلی پور با فیلتر به قطر ۰/۲۲ میکرون فیلتر شد (این مرحله نیز برای تهیه هرکدام از عصاره های متانولی و اتانولی بطو ر جداگانه انجام گرفت) (۱۶و ۱۵).

تست تعیین حساسیت *مالاسزیا فورفور* به عصاره با استفاده از دیسک

سوسپانسیون قارچ *مالاسزیا فورفور* ($۱/۵\times ۱۰^{۸}$ CFU/ml) بصورت کشت چمنی روی محیط SDA کشت داده شد. از هر عصاره به طور جداگانه غلظت های ۴۰، ۵۰، ۶۰ و ۷۰ میلی گرم در میلی لیتر تهیه شد، سپس حجم ۱۵ میکرولیتر از هر کدام از رقت های تهیه شده به طور جداگانه بوسیله سمپلر از داخل لوله ها برداشته به روی دیسک‌های استاندارد خالی (پادتن طب، ایران) وارد و در ۴۵ درجه سانتی‌گراد گذاشته تا خشک شد. در مرحله بعد دیسک ها بوسیله پنس استریل روی محیط کشت SDA قرار داده شد. کنترل مثبت دیسک های فلوکونازول (۲۵ میکروگرم) (پادتن طب، ایران) و کنترل منفی شامل دیسک خالی حاوی حجم ۱۵ میکرولیتر از DMSO بود که آن نیز بوسیله سمپلر به روی دیسک خالی شد. سپس پلیت ها برای ۴۸ ساعت در ۳۵ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. هاله عدم رشد بر اساس استاندارد NCCLS محاسبه شد (۱۷و ۱۶).

تست تعیین حساسیت *مالاسزیا فورفور* به عصاره با استفاده از چاهک

برای این کار ابتدا از سوسپانسیون *مالاسزیا فورفور* بوسیله سوآپ در محیط SDA بصورت چمنی کشت داده شد. داخل پلیت متوسط (قطر ۱۱ سانتی متر) در فواصل معین و مساوی، چهار چاهک ۷ میلی متری بوسیله پیپت پاستور ایجاد شد. انتهای چاهک بوسیله محیط کشت بسته و در هرکدام از آن ها بوسیله سمپلر به طور جداگانه حجم ۲۰ میکرولیتر از غلظت های تهیه شده ۸۰، ۹۰، ۱۰۰ و ۱۱۰ میلی گرم در میلی لیتر از عصاره ریخته شد. همچنین یک حفره به عنوان کنترل مثبت حاوی حجم ۲۰ میکرولیتر داروی فلوکونازول (sigma-F8929) که در DMSO حل شده بود و یک حفره به عنوان کنترل منفی حاوی حجم ۲۰ میکرولیتر از DMSO در نظر گرفته شد. کنترل مثبت و منفی به عنوان تعیین اعتبار تست و حذف مثبت و منفی کاذب در نظر گرفته شدند. سپس پلیت ها برای ۴۸ ساعت در ۳۵ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. هاله عدم رشد بر اساس استاندارد NCCLS محاسبه و قطر هاله عدم رشد بر اساس میلی متر تعیین شد. هر تست به روش دیسک و چاهک سه بار تکرار شد (۱۹و ۱۸).

تعیین MIC

از روش تهیه‌ی سریال رقت برای تعیین MIC استفاده شد. ابتدا سوسپانسیون قارچی معادل ۰/۵ مک فارلند در محیط سابورودکستروز براث Sabouraud Dextrose broth (SDB) آماده شد. ۱۱ لوله در نظر گرفته شد و بعد از

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-06-27]

[DOI: 10.22102/20.1.4]

کدبندی آنها، ۱ میلی لیتر از SDB به آن ها اضافه شد. در مرحله بعد مطابق ۰/۰۱ سریال رقت ۱ میلی لیتر از عصاره به آن ها اضافه شد. سپس ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون قارچی به لوله ها اضافه شد. لوله در ۳۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. لوله شماره ۱۱ (۱ میلی لیتر SDB + ۲۰ میکرولیتر سوسپانسیون قارچی) به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. بعد از انکوباسیون، وجود کدورت (قارچ در لوله مورد نظر رشدکرده و تاثیر عصاره بر روی مهار رشد قارچ کم بوده است) یا عدم وجود کدورت (قارچ در لوله مورد نظر رشد نکرده و تاثیر عصاره بر روی مهار رشد قارچ بیشتر بوده است) در لوله ها مشاهده و بر اساس آن MIC تعیین شد (۲۰).

تعیین MFC

جهت تعیین حداقل غلظت کشندگی قارچ یا MFC، مقدار۱۰ میکرولیتر از لوله MIC و سایر لوله‌های فاقد کدورت برداشته و در محیط کشت SDA کشت داده شد و پس از گذشت زمان انکوباسیون پلیت‌ها در ۳۵ درجه سانتی گراد برای ۴۸ ساعت واحد تشکیل دهنده کلونی (Colony-forming unit (CFU)) تعیین شد. به این ترتیب که کلونی‌ها شمرده و در۱۰۰ (عکس ضریب رقت) ضرب شد. به این ترتیب تعداد قارچ ها در پلیت ها به دست آمد. کمترین غلظتی که در آن رشدی مشاهده نشد یا به عبارتی کمترین غلظتی را که تعداد قارچ ها از یک هزارم تعداد اولیه کمتر شده باشد به عنوان MFC در نظر گرفته شد (۲۴-۲۱).

روش آماری

داده ها بوسیله نرم افزار SPSS18 (SPSS Inc ، Chicago، Il USA) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. از روش آنالیز واریانس دو طرفه جهت بررسی اثر میزان غلظت و انواع عصاره بر قطر هاله عدم رشد قارچ و از آزمون تعقیبی بن فرونی (Bonferroni) جهت مقایسه دوتایی در روش دیسک و چاهک استفاده شد.

یافته ها

با احتساب میانگین سه تکرار برای هر آزمایش نتایج آزمون قطر هاله ممانعت از رشد قارچ *مالاسزیا فورفور* مشخص شد. در این آزمایش ها با افزایش غلظت عصاره های آبی، اتانولی و متانولی، قطر هاله ممانعت از رشد نیز در هر دو روش دیسک و چاهک بیشتر شده است. عصاره متانولی، آبی و اتانولی به ترتیب با قطر هاله عدم رشد ۳۱/۳۳، ۲۹/۶۶ و ۲۲ میلی متر در روش دیسک و ۴۶/۳۳، ۳۰ و۲۸/۶۶ میلی متر در روش چاهک بیشترین تاثیر را بر رشد قارچ *مالاسزیا فورفور* داشتند (جدول ۱).

جدول ۱- میانگین قطر هاله ممانعت از رشد (میلی متر) قارچ *مالاسزیا فورفور* ایجاد شده توسط غلظت های معین از عصاره آبی، متانولی و اتانولی برگ گردو به روش دیسک و چاهک (میلی گرم در میلی لیتر)

	دیسک					چاهک		
غلظت / عصاره	۴۰	۵۰	۶۰	۷۰	۸۰	۹۰	۱۰۰	۱۱۰
آبی	۲۲/۳۳	۲۴/۰۰	۲۷/۳۳	۲۹/۶۶	۲۳/۰۰	۲۵/۶۶	۲۷/۳۳	۳۰/۰۰
اتانولی	۱۵/۶۶	۱۹/۶۶	۲۱/۳۳	۲۲/۰۰	۲۰/۶۶	۲۷/۳۳	۲۷/۳۳	۲۸/۶۶
متانولی	۲۷/۳۳	۲۹/۰۰	۳۱/۰۰	۳۱/۳۳	۳۲/۰۰	۳۸/۰۰	۳۹/۶۶	۴۶/۳۳

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-06-27]

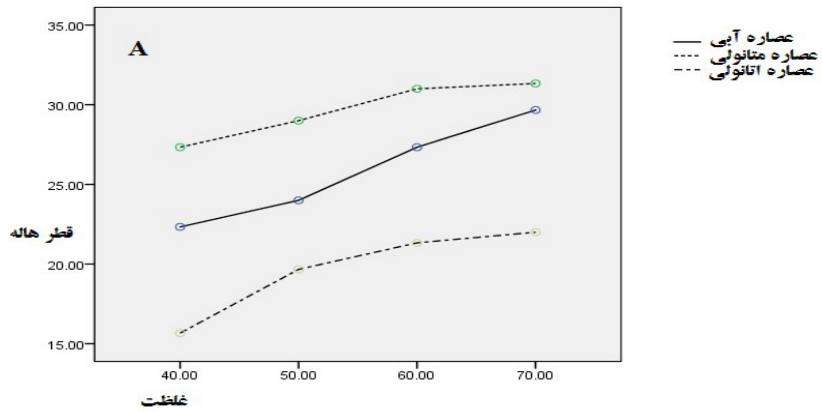
[DOI: 10.22102/20.1.4]

نتایج حاصل از تعیین MIC و MFC عصاره های برگ گردو در جدول ۲ نشان داده شده است. بر اساس این نتایج قارچ *مالاسزیا فورفور* به عصاره اتانولی برگ گردو حساسیت بیشتری داشت. MIC و MFC عصاره اتانولی نیز به ترتیب برابر با ۶۲۵۰ و ۱۲۵×۱۰^{۲} میلی گرم در میلی لیتر تعیین شدند (جدول ۲).

جدول۲- میزان MIC و MFC عصاره های برگ گردو بر قارچ *مالاسزیا فورفور* (میلی گرم در میلی لیتر)

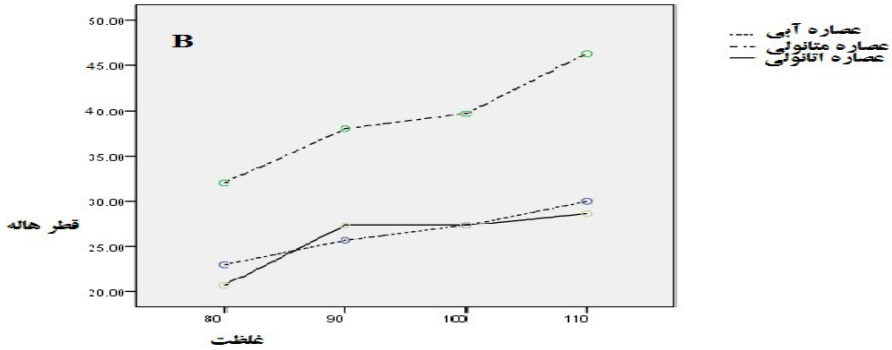
نوع عصاره	MIC	MFC
آبی	۲۵×۱۰^{۳}	۵×۱۰^{۴}
متانولی	۲۵×۱۰^{۳}	۵×۱۰^{۳}
اتانولی	۶۲۵۰	۱۲۵×۱۰^{۲}

اثر عامل های غلظت و عصاره بر قطر هاله عدم رشد قارچ *مالاسزیا فورفور* با استفاده از روش آنالیز واریانس دو طرفه نشان داد که غلظت های مختلف عصاره بر روی هاله عدم رشد در هر دو روش دیسک و چاهک تاثیر معنی داری دارد ($p <$ ۰/۰۵). همچنین نتایج حاصل از آزمون تعقیبی بن فرونی (عصاره ها بصورت زوجی مقایسه شدند) نشان داد که در روش دیسک بین میزان تاثیر هر سه عصاره ی آبی، متانولی و اتانولی بر قطر هاله عدم رشد اختلاف معنی داری وجود داشت ($p <$ ۰/۰۵)، اما در روش چاهک فقط تفاوت دو عصاره ی آبی و متانولی و همچنین متانولی و اتانولی معنی دار شد ($p <$ ۰/۰۵). در روش دیسک نتایج حاصل از این آزمون در مورد میزان غلظت های مختلف ثابت کرد که بین تاثیر برخی از غلظت ها اختلاف معنی دار وجود دارد، زیرا تفاوت اثر غلظت های ۴۰ و ۶۰ و همچنین ۴۰ و ۷۰ معنی دار شد ($p <$ ۰/۰۵). در روش چاهک نیز نتایج حاصل از مقایسه های زوجی بن فرونی آشکار نمود که بین تمامی غلظت ها به غیر از غلظت های ۱۰۰ و ۹۰ تفاوت معنی داری وجود دارد ($p <$ ۰/۰۵). همچنین نتایج تحلیل آنالیز واریانس نشان داد که بین قطر هاله عدم رشد و غلظت های مختلف عصاره در هر دو روش دیسک و چاهک یک رابطه خطی برقرار است و با افزایش غلظت، میانگین سطح هاله برای هریک از سه عصاره بصورت خطی افزایش می یابد ($p <$ ۰/۰۵) (نمودار ۱).



[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-06-27]

[DOI: 10.22102/20.1.4]



نمودار ۱: نمایش رابطه خطی بین قطر هاله عدم رشد (محور عمودی) و غلظت های مختلف عصاره برگ درخت گردو (محور افقی) در روش دیسک (A) و چاهک (B)؛ فاصله سه خط از یکدیگر تایید کننده تفاوت معنی دار سه عصاره با یکدیگر می باشد

بحث

اکثر گیاهان با مکانیسم های مختلف و حتی متفاوت از آنتی بیوتیک ها رشد میکروب ها را مهار می کنند (۲۵). در مطالعه حاضر اثر ضد قارچی عصاره برگ درخت گردو برروی قارچ *مالاسزیا فورفور* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مطالعه ما نشان داد که قارچ *مالاسزیا فورفور* به به عصاره‌های اتانولی، متانولی و آبی برگ گردو حساس بود و هاله ممانعت از رشد در روش دیسک و چاهک مشاهده شد. بیشترین قطر هاله ممانعت از رشد ۴۶/۳۳ میلی متر و مربوط به چاهک دارای غلظت ۱۱۰ میلی گرم در میلی لیتر از عصاره متانولی بود. MIC عصاره اتانولی ۶۲۵۰ و متانولی و آبی ۲۵×۱۰^{۳} میلی گرم در میلی لیتر ارزیابی شد. همچنین MFC عصاره آبی ۵×۱۰^{۴} و برای عصاره اتانولی برگ گردو ۱۲۵×۱۰^{۲} میلی گرم در میلی لیتر تعیین شد. MFCعصاره متانولی برگ گردو در این مطالعه برابر با ۵×۱۰^{۳} میلی گرم در میلی لیتر بود. در مطالعه Sharma و همکاران در سال ۲۰۰۸، اثر ضد قارچی عصاره اتانولی پوست ساقه درخت گردو روی *بلاستوشیزومایسز* (*Blastoschizomyces*) ثابت شد و MIC آن ۲۲ گرم بر میلی لیتر تعیین شد، در صورتی که عصاره های اتیل استات، کلروفرم و هگزان روی قارچ اثری نداشتند (۲۶). در مطالعه ما عصاره اتانولی برگ درخت گردو اثر ضد قارچی بیشتری روی *مالاسزیا فورفور* داشت و MIC آن برابر با ۶۲۵۰ میلی گرم در میلی لیتر بود. با توجه به اینکه MIC در مطالعه Sharma از مطالعه ما کمتر بود، بنابراین قدرت میکروب کشی بیشتر عصاره مصرف شده را نسبت به مطالعه ما نشان می دهد (هر چه MIC کمتر باشد قدرت ضد میکروبی بیشتر است). بسته به نوع گونه های گیاهی، ترکیبات فیتوشیمیایی در عصاره های قسمت های مختلف گیاه ممکن است مشابه و یا متفاوت باشند و روی انواع میکروب ها اثرات متفاوتی بگذارد (۲۷). در مطالعه Pereira و همکاران در سال ۲۰۰۷، عصاره میوه گردو روی قارچ *کاندیدا* (*Candida*) و *کریپتوکوکوس* (*Cryptococcus*) در غلظت های ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم در میلی لیتر اثر داشت ولی عصاره برگ گردو روی آنها اثر نداشت (۲۸). اما در مطالعه ما هر سه عصاره آبی، اتانولی و متانولی برگ گردو اثر ضد قارچی نشان دادند و بیشترین هاله ممانعت از رشد در غلظت ۱۱۰

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-06-27]

[DOI: 10.22102/20.1.4]

میلی گرم در میلی لیتر برای هر سه عصاره مشاهده شد. این نکته قابل توجه است که غلظت های 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 (۲۹). مطالعه Lopez و همکاران در سال ۲۰۰۱ نشان داد که عصاره متانولی پوست درخت گردو روی قارچ *کاندیدا* اثر نداشت (۳۰). در مطالعه ما نیز عصاره اتانولی برگ گردو اثر مهاری بیشتری در مقایسه با عصاره متانولی به *مالاسزیا* فورفور داشت. بنابراین عصاره برخی از بخش های گیاه موثرتر از عصاره حاصل از سایر بخش ها می باشد و این اثر می تواند به علت میزان و نوع ترکیب ضد میکروبی در عصاره و بخش مورد نظر گیاه باشد (۲). Sharafati-Chleshtori و همکاران در سال ۲۰۱۰ نشان دادند که عصاره اتانولی برگ درخت گردو دارای اثر مهاری روی *پروپیونی باکتریوم آکنه* (*Propionibacterium acnes*) بود و مقدار MIC آن ۱۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر تعیین شد (۳۱). در مطالعه Motaharinia و همکاران که در سال ۲۰۱۱ انجام شد میزان MIC عصارهٔ الکلی گل ختمی، ریشه ختمی، ریشه شیرین بیان و کتوکونازول را بر *مالاسزیا فورفور* به ترتیب ۲۵/۱۸، ۳۰۰، ۵۰۰ و ۶۵/۲ میکروگرم در میلی لیتر تعیین کردند. همچنین MFC عصارهٔ گل ختمی و کتوکونازول به ترتیب ۵۰ ≤ و ۳۲ ≤ میکروگرم در میلی لیتر بود (۳۲). در مطالعه حاضر MFC عصاره متانولی و اتانولی به ترتیب ۵×۱۰^{۳} و ۱۲۵×۱۰^{۲} میلی گرم در میلی لیتر محاسبه شدند. مطالعات مختلف نشان داده است که تعداد و محل گروه های هیدروکسیل در فنل موجود در گیاهان متفاوت است و روی قدرت میکروب کشی اثر دارد و به نوبه خود می تواند یکی از دلایل اختلاف نتایج در مطالعات مختلف باشد (۳۱).

به طور کلی نتایج مطالعه ما اثر ضد قارچی عصاره برگ درخت گردو را روی قارچ *مالاسزیا فورفور* ثابت کرد، بنابراین عصاره های مذکور حاوی ترکیبات ضد قارچی می باشند. همچنین در مطالعه حاضر اثرات ضد قارچی عصاره‌های الکلی (اتانولی و متانولی) در مقایسه با عصاره آبی بیشتر بود و می‌تواند نشان‌دهنده این موضوع باشد که مواد مؤثره در برگ گردو در الکل قدرت حل شوندگی و تاثیر گذاری بیشتری دارند. با توجه به این مسئله به نظر می‌رسد که در انجام طرح‌های تحقیقاتی تکمیلی و یا جهت مقاصد درمانی، استفاده از عصاره الکلی برگ گردو بسیار مناسب‌تر از عصاره آبی می باشد.

نتیجه گیری

نتیجه این تحقیق نشان داد که عصاره های الکلی و آبی برگ درخت گردو اثر ضد قارچی بر علیه *مالاسزیا فورفور* در شرایط آزمایشگاهی داشتند. با توجه به این نتایج در آینده می بایست تحقیقات بیشتری را بر روی قسمت های مختلف این گیاه در شرایط *in vitro* و *in vivo* انجام داد و ترکیبات ضد میکروبی آن را مشخص و استخراج نمود. نظر به اینکه داروهای گیاهی اثرات جانبی کمتری دارند، برای کاهش اثرات جانبی و مقاومت دارویی ایجاد شده توسط داروهای شیمیایی، امید است از ترکیبات موثر این گیاه بتوان در آینده برای درمان پی تی ریازیس ورسی کالر به عنوان یک جایگزین مناسب برای داروهای شیمیایی استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از کارشناسان محترم آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل که ما را در این انجام این مطالعه یاری نمودند تشکر به عمل می آید.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-06-27]

[DOI: 10.22102/20.1.4]

References

1. Marcon MJ, Durrell DE, Powell DA, Buesching WJ. In Vitro activity of systemic antifungal agents against Malassezia furfur.Antimicrob Agents Chemother 1987; 31:951-3.
2. KhosraviAR, Eidi S , Katiraee F, Ziglari T, Bayat M,Nissiani M. Identification of different malasseziaspecies isolated from patients with malasseziainfections. World J Zoology 2009; 4: 85-9.
3. Shadzi Sh. Medical Mycology. 11nd ed. Esfahan: Jahadedaneshgahi 2001. [In Persian]
4. Patel M,Coogan MM. Antifungal activity of the plant Dodonaea viscosevar. angustifolia on Candida albicansfrom HIV-infected patients. J Ethnopharmacol 2008; 118:173–6.
5. Shilling E, Shilling A, Road V, Marcos S, Higgins P, Uratsu SL, et al. Characterization of polyphenol oxidase from walnut Matthew A. J AmerSocHortSci 2008; 133:852–8.
6. Zargari A. Medical plants.6thed. Tehran: University of Tehran 1997. [In Persian]
7. Noumi E, Snoussi M, Hajlaoui H, Valentin E, Bakhrouf A. Antifungal properties of Salvadorapersica and Juglansregia L. extracts against oral candida strains. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2010;29:81–8.
8. Sharafati-Chaleshtori R, Sharafati-Chaleshtori F, Rafieian-kopaei M, Drees F, Ashrafi K. Comparison of the antibacterial effect of ethanolic walnut (juglansregia) leaf extract with chlorhexidine mouth rinse on Streptococcus mutans and sanguinis. J Islamic Dental Association Iran (JIDA) 2010; 22:211-17. [In Persian]
9. Sharafati-Chaleshtori R, Sharafati-Chaleshtori F, Rafieian M. Biological characterization of Iranian walnut (Juglansregia) leaves. Turk J Biol 2011; 35: 635-9.
10. Zakavi F, GolpasandHagh L, Daraeighadikolaei A, Farajzadeh SheikhA, Daraeighadikolaei A, LeilaviShooshtari Z. Antibacterial effect of Juglansregia bark against oral pathologic bacteria. Int J Dent 2013; 2013:1-5.
11. Ali-Shtayeh MS, Abu Ghdeib SI. Antifungal activity of plant extracts against dermatophytes. Mycoses 1999; 42: 665–72.
12. Madani M, KhosraviKh, ShiraniM.Comparison of the in vitro affection of different Allium jesdianumondifferent strains ofCandida albicansin vitro. LahijanBiol J2010; 3: 63-71. [In Persian]
13. Naeini A, Khosravi AR, Chitsaz M, Shokri H, Kamlnejad M. Anti-Candida albicansactivity of some Iranian plants used in traditional medicine activate. J de Mycol Med 2009;19:168-72.
14. Shams M, RasaeeMj, Moosavi M, Razzaghi M. Identifition of malassezia specie in patient with pityreasisversicolor submitted to the Razi hospital in Tehran. Iran Biomed J 2001; 5: 121-6.
15. El-Kamali HH, EL-Karim EMA. Evaluation of antibacterial activity of some medicinal plants used in sudanese traditional medicine for treatment of wound infections. Acad J Plant Sci 2009; 2: 246-51.
16. Zareii B, Seyfi T, Movahedi R, Cheraghi J , Ebrahimi S. Antibacterial effects of plant extracts of Alcea digitata L., Satureja bachtiarica L. and Ferulago angulata L. J Babol Univ Med Sci 2014; 16: 31-7. [In Persian]
17. Espinel-Ingroff AV, Pfaller MA. Susceptibility test methods: yeasts and filamentous in fungi. In: Manual of clinical microbiology, 9th ed, Murray PR, et al (Eds), Washington, DC: ASM Press. 2007.p. 1972.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-06-27]

[DOI: 10.22102/20.1.4]

18. Varalakshmi KN, Sangeetha CG, Shabeena AN, Sunitha SR, Vapika J. Antimicrobial and cytotoxic effects of Garciniaindicafruit rind extract. American-Eurasian J Agric Environ Sci 2010; 7:652-6.
19. Hoseini SS, Rudbarmohammadi SH, Joshaghani H R. Evaluation of antifungal activity of essential oil of Carvacrol on standard fluconazole sensitive and resistance strains of Candida albicans. Medical Laboratory Journal 2011; 5: 27-31. [In Persian]
20. Shariati A,Pordeli HR, Khademiyan A, Kyaie E. Evaluation of the antibacterial activity of the extracts of date palm (Phoenix dactylifera L.) fruits and pits on multi-resistant Staphylococcus aureus. Food Technol Nut 2010; 7:42-8. [In Persian]
21. Baron EJ, Finegold SM. Methods for testing antimicrobial effectiveness. In: Baily, Scotts, eds. Diagnostic microbiology. New York: Mosby. 1994.p.171-94.
22. Aderotimi B, Samuel A. Phytochemical screening and antimicrobial assessment of Abutilon mauritianum, Bacopamonifera and Daturastramonium. Biokemistri 2006; 18: 39-44.
23. Dahham SS, Ali MN, Tabassum H, Khan M. Studies on antibacterial and antifungal activity of pomegranate (PunicagranatumL.). American-Eurasian J Agric Environ Sci 2010; 9:273-81.
24. Gholampour-Azizi I, Rouhi S, Yahyayi F. In vitro Antifungal Activity of Cucumis melo on Candida albicans. Zahedan J Res Med Sci 2015; 17: 35-9. [In Persian]
25. Eloff JN. Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobialcomponents from plants. J Ethnopharmacol 1998; 60: 1-8.
26. Sharma RS, Mishra V, Singh R, Seth N and Babu CR. Antifungal activity of some Himalayan medicinal plants and cultivated ornamental species.Fitoterapia 2008;79: 589-91.
27. Shai LJ, Mcgaw LJ, Eloff JN. Extracts of the leaves and twigs of the threatened tree Curtisia dentate (Cornaceae) are more active against Candida albicansand other microorganisms than the stem bark extract. South Afr J Bot 2009; 75: 363–6.
28. Pereira JA. Walnut (Juglansregia L.) leaves: phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars. Food ChemToxicol 2007; 45: 2287-95.
29. Ben Douissa F, Hayder N, Chekir-Ghedira L, Hammami M, Ghedria K, Mariotte AM, et al. New study of the essential oil from leaves of Pistacialentiscus L. Anacardiaceae from Tunisia. Flavour Fragrance J 2005;20:410-14.
30. Lopez A, Hudson JB, Towers GHN. Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants. J Ethnopharmacol 2001; 77: 189-96.
31. Sharafati-chaleshtori A, Sharafati-chaleshtori R, Sharafati-chaleshtori F, Rafieian M. Antibacterial effects of ethanolic extract of walnut leaves (juglansregia) on Propionibacterium acnes. J Zanjan Univ Med Sci Health Services 2010; 18:42-9. [In Persian]
32. Motaharinia Y, Rezaee MA, Zandi F, Hosseini W, Rashidi A, Ahmadi neaz M, et al. Comparison of the antifungal effect of Licorice root, Althocaofficinalis extracts and ketoconazole on malassezia furfur. Armaghane-Danesh 2011; 16: 425-32. [In Persian]

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-06-27]

[DOI: 10.22102/20.1.4]