Antifungal Activity of *Ephedra major* Extract against *Candida Albicans* (ATC1677), *Candida Tropicalis* (CBS94), and *Candida Globrata* (CBS2175)

Faranak Bidad[*1], Mahboobeh Madani[2*], Seyed-Mohammad Masoumi[3], Pegah Shakib[4*]

1. MSC of Microbiology, Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran. ORCID ID:0000-0003-3120-2142

2. Associate Professor of Mycology, Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran Email:mmadani66@gmail.com. ORCID ID: 0000-0003-3961-8409

3. Associate Professor of Biology. Department of Biology, Faculty of Science, Razi University, Kermanshah, Iran. ORCID ID: 0000-0001-7642-7543

4. Assistant Professor of Medical Bacteriology, Razi Herbal Medicines Research Center, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran. Email:shakib.pegah@yahoo.com.ORCID ID: 0000-0003-3525-226X

ABSTRACT

Background and Aim: *Candida* species are among the major causes of opportunistic fungal infection in immunocompromised individuals, cancer patients, and organ transplants patients. Resistance to the antifungal medications has been on the rise. On the other hand, there have been several reports about the antimicrobial effects of different species of Ephedra major extract. The aim of the present study was to investigate the antifungal effects of *Ephedra major* against some *Candida* species.

Materials and Methods: In this experimental-laboratory study, after collecting *E. major* in the spring of 2014 from the mountains located in the west of Kermanshah Province, plant extraction was performed with ethanol, methanol, petroleum ether, and chloroform solvents. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC) of *E. major* against *Candida albicans* (ATC1677), *Candida tropicalis* (CBS94), and *Candida glabrata* (CBS2175) were evaluated by macrodilution method. Then its chemical composition was determined by GC-MS.

Results: Based on the results of this study, ethanolic, methanolic, petroleum ether, and chloroform extracts of *Ephedra major* had antifungal effects. Also, the most desirable rate of MIC and MFC were 15.6 and 31.25 mg/ml respectively for chloroform extract against *Candida glabrata*. The results of GC-MS also showed that phenolic compounds were the most abundant compounds in this plant.

Conclusion: The results showed that the anti-candidal activity of ethanolic, methanolic, petroleum ether, and chloroform extracts of *E. major* was considerable.

Keywords: *Candida*,*Ephedra major*, Minimum inhibitory concentration, Minimum fungicidal concentration

Received: July 15, 2021 **Accepted:** July 6, 2022

How to cite the article: Faranak Bidad, Mahboobeh Madani, Seyed-Mohammad Masoumi, Pegah Shakib. Antifungal Activity of *Ephedra major* Extract against *Candida Albicans* (ATC1677), *Candida Tropicalis* (CBS94), and *Candida Globrata* (CBS2175) .ŚJKU 2023;28(3):58-67.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-05-13]

[DOI: 10.61186/sjku.28.3.58]

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره بیست و هشت / مرداد و شهریور ۱۴۰۲/۶۷-۵۸

فعالیت ضد قارچی عصاره گیاه *Ephedra major* علیه *کاندیدا آلبیکنس*(ATC1677)، *کاندیدا تروپیکالیس* (CBS94) و *کاندیدا گلوبراتا* (CBS2175)

فرانک بیداد [۱]، **محبوبه مدنی**[۲]، **سید محمد معصومی** [۳]، **پگاه شکیب** [۴]

۱. کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۳-۳۱۲۰-۲۱۴۲

۲. دانشیار قارچ شناسی، گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.mmadani66@gmail.com ، کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۳-۳۹۶۱-۸۴۰۹

۳. دانشیار زیست شناسی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران. کد ارکید:۰۰۰۰-۰۰۰۱-۷۶۴۲-۷۵۴۳

۴. استادیار باکتری‌شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم‌آباد، ایران shakib.pegah@yahoo.com . کد ارکید:x ۰۰۰۰-۰۰۰۳-۳۵۲۵ – ۲۲۶

چکیده

زمینه و هدف: گونه‌های کاندیدا عامل اصلی بیماری‌زایی قارچی فرصت‌طلب، در افراد دارای نقص ایمنی، بیماران سرطانی و پیوند اعضا می‌باشند. امروزه مقاومت در برابر درمان‌های ضد قارچی گسترش یافته است. گزارش‌های متعددی مبنی بر تأثیر ضد میکروبی گیاه *Ephedra major* وجود دارد؛ بنابراین هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات ضد قارچی گیاه *Ephedra major* در برابر برخی از گونه‌های کاندیدا است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی- آزمایشگاهی، گیاه *Ephedra major* در فصل بهار سال ۱۳۹۳ از کوه‌های واقع در غرب استان کرمانشاه جمع‌آوری شد. عصاره گیری گیاه توسط حلال‌های اتانول، متانول، پترلیوم اتر و کلروفرم انجام گرفت. حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت قارچ کشی (MFC) گیاه *Ephedra major* علیه گونه‌های *کاندیدا آلبیکنس*(ATC1677)، *کاندیدا تروپیکالیس* (CBS94) و *کاندیدا گلابراتا* (CBS2175) با روش ماکرودایلوشن ارزیابی شد. همچنین ترکیب شیمیایی گیاه توسط GC-MS تعیین شد.

یافته‌ها: بر اساس نتایج حاصل، عصاره‌های اتانولی، متانولی، پترلیوم اتری و کلروفرمی گیاه *Ephedra major* دارای اثرات ضد قارچی می‌باشند. همچنین مطلوب‌ترین میزان MIC وMFC به ترتیب ۱۵/۶ و ۳۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مربوط به عصاره کلروفرمی گیاه *Ephedra major* علیه *کاندیدا گلابراتا* بود. همچنین نتایج حاصل از GC-MS نشان داد که ترکیبات فنولی بیشترین ترکیبات موجود در این گیاه را تشکیل می‌دهند.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که فعالیت ضد کاندیدایی عصاره‌های اتانولی، متانولی، پترلیوم اتری و کلروفرمی گیاه *Ephedra major* ارزشمند است.

کلمات کلیدی: کاندیدا، *Ephedra major*، حداقل غلظت مهارکنندگی رشد(MIC)، حداقل غلظت قارچ کشی MFC

وصول مقاله:۱۴۰۰/۴/۲۴اصلاحیه نهایی:۱۴۰۱/۴/۱۱ پذیرش:۱۴۰۱/۴/۱۵

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-05-13]

[DOI: 10.61186/sjku.28.3.58]

مقدمه

کاندیدیازیس، بیماری ناشی از قارچ فرصت طلب شایعی است که توسط گونه‌های مختلف جنس کاندیدا ایجاد می شود. کاهش مقاومت موضعی یا سیستمیک میزبان منجر به بیماری می گردد(۱).آسیب‌پذیری بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه، بیماران تحت شیمی‌درمانی یا داروهای سرکوب کننده سیستم ایمنی و همچنین بیماران دارای نقص سیستم ایمنی توسط گونه های کاندیدا امری اجتناب ناپذیر است. گونه های کاندیدا عامل طیف وسیعی از بیماری‌ها از جمله عفونت‌های جلدی، جلدی مخاطی شامل واژینیت، عفونت‌های گوارشی، تنفسی و نیز عفونت‌های سیستمیک می باشند(۳, ۲). در بین گونه‌های *کاندیدا*، *کاندیدا آلبیکنس* مهم‌ترین و معمول‌ترین ساکن موکوس واژن، دهان و لوله گوارش انسان است (۵, ۴).

استفاده از داروهای ضد قارچی سبب ظهور گونه‌های مقاوم به دارو شده است(۷, ۶). امروزه موارد شکست درمان و مقاومت گونه‌های مختلف کاندیدا به ترکیبات دارویی آزولی در حال افزایش است. گستردگی بیماری‌های قارچی فرصت طلب و افزایش روز افزون مقاومت‌های دارویی و اثر سوء داروها، دلیل اهمیت بررسی آثار ضد قارچی گیاهان است(۹, ۸).

Ephedra major ریش بز، ارمک از تیره گیاهان *Ephedracea* است. رویشگاه و پراکندگی جغرافیایی ا ین گیاه در دامنه‌های سنگی و تراس ماسه، اغلب در سنگ آهک و در مناطق خشک است. پراکندگی جغرافیایی آن از اروپا به سمت شرق آسیا و دریای مدیترانه تا هیمالیا است. از این جنس تاکنون ۱۲ گونه ارزشمند در ایران شناسایی شده است (۱۰-۱۲).گیاه *Ephedra major* دارای اثرات ضد التهابی و ضد آرتریت بوده و برای درمان برونشیت، تب، سرماخوردگی، آنفولانزا، سردرد، سرفه، تب بالا، ادم، بیماری‌های مفصلی و استخوانی استفاده می‌شود. این گیاه دارای ترکیبات متعددی شامل افدرین، پسود افدرین، نورپسودو افدرین، نورافدرین، متیل افدرین، تانن هیدروکسی کینورنیک اسید، کوئینولین است(۱۳).

با توجه به خواص ارزشمند گیاه *Ephedra major* هدف از این مطالعه بررسی خواص ضد قارچی این گیاه بر چندگونه استاندارد *کاندیدا* و تعیین ترکیبات مؤثره به روش GS-MS است.

مواد و روش‌ها

نوع مطالعه و تهیه نمونه‌ها: در این مطالعه توصیفی – مقایسه‌ای گیاه *Ephedra major* در فصل بهار سال ۱۳۹۳ از کوه (چهارزبر) واقع در غرب استان کرمانشاه جمع‌آوری گردید. برگ های گیاه *Ephedra major* بعد از جدا شدن از ساقه‌های بسیار محکم و چوبی آن در دمای محیط (درجه سانتی‌گراد ۲۷-۲۵) و در سایه خشک گردید. برگ‌های سوزنی شکل گیاه حتی پس از خشک شدن رنگ سبز خود را کاملاً حفظ نمودند.

نمونه‌های استاندارد *کاندیدا آلبیکنس (ATC 1677)*، *کاندیدا گلابراتا (CBS 2175)* و *کاندیدا تروپیکالیس (CBS 94)* از دانشگاه علوم پزشکی ایران تهیه شد.

عصاره گیری: برگ‌های گیاه به‌وسیله آسیاب برقی پودر شدند تا عمل عصاره گیری و نفوذ حلال به داخل گیاه راحت‌تر انجام پذیرد. سپس عصاره گیری به روش سوکسله انجام شد. به این منظور ۵۰ گرم از پودر تهیه شده از گیاه را در کاغذ صافی نرم و تمیز پیچیده و به‌طور جداگانه توسط ۲۵۰ میلی‌لیتر از حلال‌های اتانول ۹۶ درصد، متانول، پترلیوم اتر و کلروفرم عصاره گیری انجام شد(۱۴, ۱۵). سپس با حذف حلال در مجاورت هوا، عصاره ها را خشک کرده و وزن خشک آن‌ها اندازه‌گیری شد. نمونه‌های به دست آمده تا زمان انجام آزمایش ها در ظروف دربسته، در یخچال (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند.

تست تعیین حساسیت قارچ به عصاره ها با روش انتشار چاهک:

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-05-13]

[DOI: 10.61186/sjku.28.3.58]

توسط پیت پاستور استریل دو چاهک به قطر ۶ میلی‌متر در محیط کشت سابارو دکستروز آگار ایجاد شد. فاصله چاهک ها از یکدیگر و لبه پلیت ۲۰ میلی‌متر بود. در یکی از چاهک ها مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر و در دیگری مقدار ۱۵۰ میکرو لیتر از هر یک از غلظت‌های هر عصاره اضافه گردید. پس از جذب عصاره‌ها در محیط کشت میزان ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه شده از هرکدام از قارچ ها روی محیط کشت ریخته شد و کشت به صورت چمنی انجام گردید. بعد از طی ۲۴ تا ۴۸ ساعت نگه‌داری در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد وجود یا عدم وجود هاله ممانعت از رشد در اطراف چاهک بررسی شد(۱۶). فلوکونازول (sigma-F8929) به عنوان شاهد مثبت و دی متیل سولفوکساید به عنوان شاهد منفی استفاده گردید. این آزمایش‌ها برای هر عصاره و هر میکروارگانیسم سه بار تکرار شد(۱۴).

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت قارچ کشی:

برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد(Minimum Inhibitory Concentration,MIC)انواع عصاره‌ها از روش ماکرودایلوشن(Macrodilution) استفاده شد(۱۷).مراحل انجام کار بدین ترتیب بود که برای هر عصاره و هر قارچ مورد آزمایش به طور مستقل یازده لوله استریل حاوی ۲ میلی لیتر محیط کشت سابارودکستروز براث تهیه شد. قبل از انجام آزمایش نمونه سوسپانسیون هریک از قارچ‌ها معادل نیم مک فارلند تهیه گردید. ۲ میلی لیتر از محلول هر عصاره در لوله شماره یک ریخته شد، ۲ میلی لیتر از لوله شماره یک برداشته و در لوله شماره دو ریخته و مراحل کار به همین ترتیب تا لوله دهم ادامه یافت. از لوله دهم ۲ میلی لیتر محلول دور ریخته شد؛ لذا لوله یازده فاقد عصاره و به عنوان لوله شاهد رشد در نظر گرفته شد. از سوسپانسیون قارچی ۲۰ میکرولیتر به تمام لوله‌ها اضافه گردید. پس از انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس کدورت حاصل از رشد میکروارگانیسم‌ها با لوله شاهد مقایسه و ثبت گردید. تمامی مراحل برای هر عصاره و هر میکروارگانیسم سه مرتبه تکرار گردید.

برای تعیین حداقل غلظت قارچ کشی Minimum Fungicidal Concentration,MFC) از اولین لوله‌ای که کدورت در آن مشاهده شده بود و سه لوله قبل از آن میزان ۲۰ میکرولیتر برداشته و بر روی محیط کشت سابارودکستروز آگار کشت داده شد و پس از انکوبه کردن در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت نتیجه بررسی و ثبت شد(۱۷). کشت نمونه حاوی فلوکونازول به عنوان شاهد مثبت انجام شد، تمامی تست‌های مربوط به تعیین حساسیت قارچ‌ها با شرایط کاملاً یکسان انجام گرفت تا نتایج مقایسه گردد.

تعیین ترکیبات با روش آنالیز گاز کروماتوگرافی – طیف سنج جرمی GC-MS :

در این پژوهش از دستگاه (GC - MS) شامل ردیاب جرمی Aglient 5975 C با منبع یونیزاسیون الکترونی (EI) کوپل شده با دستگاه کروماتوگرافی گازی Aglient 7890 شامل ستون HP-5MS با طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی متر و ضخامت فیلم ۰/۲۵ میکرومتر استفاده شد. دمای محل تزریق (Inlet) دستگاه کروماتوگرافی گازی برابر ۲۸۰ درجه سلسیوس، دمای منبع یونیزاسیون ردیاب جرمی برابر ۱۵۰ درجه سلسیوس، دمای آنالایزر (کوادروپل) برابر ۲۳۰ درجه سلسیوس تنظیم گردید(۱۸).

تجزیه و تحلیل داده‌ها:

به منظور مقایسه مقادیر قطر هاله عدم رشد در غلظت‌های مختلف عصاره های متانولی، اتانولی، پترلیوم اتری و کلروفرمی گیاه*Ephedra major* علیه قارچ های *کاندیدا آلبیکنس*، *کاندیدا گلابراتا* و *کاندیدا تروپیکالیس* از آزمون کروسکال والیس استفاده شد. همچنین به منظور

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-05-13]

[DOI: 10.61186/sjku.28.3.58]

مقایسه دو به دو میان غلظت‌ها در هر قارچ آزمون تعقیبی من ویتنی با تعدیل بونفرونی استفاده شد.

یافته ها

تأثیر عصاره‌های گیاه *افدرا ماژور* بر گونه‌های *کاندیدا*: نتایج تأثیر عصاره‌های مختلف گیاه *Ephedra major* در شرایط آزمایشگاهی بر روی رشد مخمرهای *کاندیدا آلبیکنس*، *کاندیدا گلابراتا* و *کاندیدا تروپیکالیس* در غلظت های ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲۵، ۱۵/۶۲ و ۷/۶ میلی-گرم بر میلی‌لیتر مطابق جدول ۱ است. مقادیر قطر هاله عدم رشد برای عصاره متانولی در *کاندیدا آلبیکنس* و *کاندیدا گلابراتا* تنها در غلظت‌های ۲۵۰ و ۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و در *کاندیدا تروپیکالیس* در غلظت‌های ۲۵۰، ۱۲۵ و ۶۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد. بر اساس نتایج آزمون کروسکال والیس در هر سه کاندیدا اختلاف معناداری بین قطر هاله عدم رشد بین غلظت‌های مختلف عصاره متانولی وجود داشت ($p<0,05$). به منظور مقایسه دو به دو میان غلظت‌ها در هر قارچ آزمون تعقیبی من ویتنی با تعدیل بونفرونی انجام شد و بر اساس نتایج به دست آمده در *کاندیدا آلبیکنس* و *کاندیدا گلابراتا* به جز غلظت‌های ۷/۸ تا ۶۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر که در آن‌ها قطر هاله مشاهده نشد، در سایر مقایسه‌های دوتایی مابین غلظت‌ها، قطر هاله در غلظت بیشتر به‌طور معناداری بزرگتر بود. در *کاندیدا تروپیکالیس* نیز به جز غلظت‌های ۷/۸ تا ۳۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر که در آن‌ها قطر هاله مشاهده نشد در سایر مقایسه-های دوتایی مابین غلظت‌ها، قطر هاله در غلظت بیشتر به‌طور معناداری بزرگتر بود (جدول ۱).

مقادیر قطر هاله عدم رشد برای عصاره اتانولی *Ephedra major* در *کاندیدا آلبیکنس* غلظت‌های ۲۵۰، ۱۲۵ و ۶۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، در *کاندیدا گلابراتا* تنها در غلظت‌های ۲۵۰ و ۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و در *کاندیدا تروپیکالیس* در غلظت‌های ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵ و ۳۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی-لیتر مشاهده شد(جدول۱). بر اساس نتایج آزمون کروسکال والیس در هر سه گونه مخمر *کاندیدا* اختلاف معناداری بین قطر هاله عدم رشد بین غلظت‌های مختلف عصاره متانولی وجود داشت($p<0,05$). به منظور مقایسه دو به دو میان غلظت‌ها در هر سه گونه مخمر *کاندیدا* از آزمون تعقیبی من ویتنی با تعدیل بونفرونی انجام شد. بر اساس نتایج به دست آمده در هر سه گونه مخمر *کاندیدا* به جز غلظت‌هایی که برای آن‌ها هاله عدم رشد مشاهده نشده بود در سایر مقایسه-های دوتایی مابین غلظت‌ها، قطر هاله در غلظت بیشتر به‌طور معناداری بزرگتر بود.

نتایج تأثیر عصاره پترلیوم اتری گیاه *Ephedra major* در شرایط آزمایشگاهی بر روی رشد مخمرهای *کاندیدا آلبیکنس*، *کاندیدا گلابراتا* و *کاندیدا تروپیکالیس* در غلظت های ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲۵، ۱۵/۶۲ و ۷/۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در جدول ۱ مشاهده می‌شود.

مقادیر قطر هاله عدم رشد برای عصاره پترلیوم اتر *Ephedra major* در *کاندیدا آلبیکنس* و *کاندیدا گلابراتا* غلظت‌های ۷/۸ و ۱۵/۶۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و در *کاندیدا تروپیکالیس* تنها در غلظت ۷/۸ میلی‌گرم بر میلی-لیتر مشاهده نشد(جدول ۱).

بر اساس نتایج آزمون کروسکال والیس اختلاف معناداری بین قطر هاله عدم رشد بین غلظت‌های مختلف عصاره پترلیوم اتر وجود داشت ($p<0.05$). به منظور مقایسه دو به دو میان غلظت‌ها در هر قارچ آزمون تعقیبی من ویتنی با تعدیل بونفرونی انجام شد و بر اساس نتایج به دست آمده در هر سه گونه کاندیدا به جز غلظت‌هایی که برای آن‌ها قطر هاله عدم رشد مشاهده نشده بود در سایر در سایر مقایسه‌های دوتایی مابین غلظت‌ها، قطر هاله عدم رشد در غلظت بیشتر به طور معناداری بزرگتر بود(جدول۱).

نتایج تأثیر عصاره کلروفرمی گیاه *Ephedra major* در شرایط آزمایشگاهی بر روی رشد مخمرهای *کاندیدا آلبیکنس*، *کاندیدا گلابراتا* و *کاندیدا تروپیکالیس* در

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-05-13]

[DOI: 10.61186/sjku.28.3.58]

غلظت های ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۲۵، ۱۵/۶۲ و ۷/۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در جدول ۱ مشاهده می‌شود.

مقادیر قطر هاله عدم رشد برای عصاره کلروفرمی *Ephedra major* در *کاندیدا آلبیکنس* و *کاندیدا گلابراتا* تنها در غلظت ۷/۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده نشد. در *کاندیدا تروپیکالیس* نیز در همه غلظت‌های عصاره، هاله عدم رشد مشاهده شد(جدول۱).

بر اساس نتایج آزمون کروسکال والیس در هر سه مخمر *کاندیدا آلبیکنس*، *کاندیدا گلابراتا* و *کاندیدا تروپیکالیس* اختلاف معناداری بین قطر هاله عدم رشد بین غلظت‌های مختلف عصاره کلرفرمی وجود داشت($p<0.05$). به منظور مقایسه دو به دو میان غلظت‌ها در هر قارچ آزمون تعقیبی من ویتنی با تعدیل بونفرونی انجام شد و بر اساس نتایج این آزمون‌ها در همه مقایسه‌های دوتایی مابین غلظت‌ها، قطر هاله عدم رشد در غلظت بیشتر به‌طور معناداری بزرگتر بود(جدول۱).

جدول ۱.میانگین و انحراف استاندارد(Mean±Se) قطر هاله ممانعت از رشد (میلی‌متر) غلظت‌های مختلف عصاره‌های گیاه *Ephedra major* علیه گونه‌های کاندیدا

نوع عصاره	غلظت (mg/ml)						
	گونه‌های کاندیدا	۲۵۰	۱۲۵	۶۲/۵	۳۱/۲۵	۱۵/۶۲	۷/۸
متانولی	*کاندیدا آلبیکنس*	۱۱/۶۷ ±۰/۵۸	۱۰±۰/۰۰	۰۰±۰/۰۰	۰۰±۰/۰۰	۰۰±۰/۰۰	۰۰±۰/۰۰
	کاندیدا گلابراتا	۱۴ ±۱/۷۳	۱۰±۰/۰۰	۰۰±۰/۰۰	۰۰±۰/۰۰	۰۰±۰/۰۰	۰۰±۰/۰۰
	کاندیدا تروپیکالیس	۱۳± ۱	۱۰±۰/۰۰	۵±۰/۰۰	۰۰±۰/۰۰	۰۰±۰/۰۰	۰۰±۰/۰۰
اتانولی	*کاندیدا آلبیکنس*	۱۲/۳۳ ±۰/۵۸	۱۱±۰/۰۰	۱۰±۰/۰۰	۰۰±۰/۰۰	۰۰±۰/۰۰	۰۰±۰/۰۰
	کاندیدا گلابراتا	۸/۶۷ ±۰/۵۸	۵/۶۷ ±۰/۵۸	۰۰±۰/۰۰	۰۰±۰/۰۰	۰۰±۰/۰۰	۰۰±۰/۰۰
	کاندیدا تروپیکالیس	۲۱/۶۷ ±۱/۵۳	۱۹±۰/۰۰	۱۵±۰/۰۰	۹/۳۳± ۰/۵۸	۰۰±۰/۰۰	۰۰±۰/۰۰
پترلیوم اتر	*کاندیدا آلبیکنس*	۱۵/۶۷ ±۰/۵۸	۱۳/۶۷ ±۰/۵۸	۷/۶۷ ±۲/۰۸	۵±۱/۰۰	۰۰±۰/۰۰	۰۰±۰/۰۰
	کاندیدا گلابراتا	۱۹/۶۷ ±۱/۱۵	۱۶/۳۳ ±۲/۵۲	۱۱ ±۱/۷۳	۶/۶۷ ±۱/۵۳	۰۰±۰/۰۰	۰۰±۰/۰۰
	کاندیدا تروپیکالیس	۱۸/۳۳± ۰/۵۸	۱۴/۶۷ ±۰/۵۸	۱۱/۳۳ ±۱/۱۵	۸/۳۳± ۰/۵۸	۴/۶۷ ±۰/۵۸	۰۰±۰/۰۰
کلروفرمی	*کاندیدا آلبیکنس*	۱۸/۳۳± ۰/۵۸	۱۶/۳۳ ±۱/۵۳	۱۲/۶۷ ±۱/۱۵	۵/۶۷ ±۰/۵۸	۱± ۱/۷۳	۰۰±۰/۰۰
	کاندیدا گلابراتا	۲۱/۶۷ ±۰/۵۸	۱۹/۳۳± ۰/۵۸	۱۵/۳۳ ±۰/۵۸	۱۱/۳۳± ۲/۳۱	۷± ۲/۶۵	۰۰±۰/۰۰
	کاندیدا تروپیکالیس	۱۵±۰۰	۱۲/۳۳± ۰/۵۸	۱۰±۰/۰۰	۸±۰/۰۰	۵±۰/۰۰	۳/۶۷ ±۰/۵۸

تعیین MIC و MFC: برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد(MIC (Minimum Inhibitory Concentration;وMFC حداقل غلظت قارچ کشی Minimum Fungicidal Concentration; (MFC)هر یک از عصاره‌های اتانولی، متانولی، پترلیوم اتری و کلروفرمی گیاه*Ephedra major* ، رقت لوله‌ای که بعد از گذشت ۲۴ ساعت در آن کدورت مشاهده نشد، MIC و یک لوله ماقبل آن MFC تعیین شد. در جدول ۲ مقادیر میانگین MIC و MFC نشان داده شده است.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-05-13]

[DOI: 10.61186/sjku.28.3.58]

جدول ۲. میانگین مقادیر MIC و MFC

گونه کاندیدا	عصاره	روش سوکسله	
		Ephedra major	
		MIC	MFC
کاندیدا آلبیکنس	متانولی	۶۲/۵	۱۲۵
	اتانولی	۶۲/۵	۱۲۵
	پترلیوم اتر	۳۱/۲	۶۲/۵
	کلروفرم	۶۲/۵	۱۲۵
کاندیدا گلابراتا	متانولی	۶۲/۵	۱۲۵
	اتانولی	۶۲/۵	۱۲۵
	پترلیوم اتر	۶۲/۵	۱۲۵
	کلروفرم	۱۵/۶	۳۱/۲
کاندیدا تروپیکالیس	متانولی	۳۱/۲	۶۲/۵
	اتانولی	۳۱/۲	۶۲/۵
	پترلیوم اتر	۶۲/۵	۱۲۵
	کلروفرم	۳۱/۲	۶۲/۵

نتایج تعیین ترکیبات با روش GC/MS: همچنین تعیین ترکیبات گیاه *Ephedra major* انجام گردید و نتایج، شامل ترکیبات تولوئن، اتیل بنزن، زایلن، فنول و تیمول بود(جدول ۳).

جدول ۳. نوع و درصد برخی مواد متشکله موجود در *Ephedra major*

ترکیبات	درصد٪	ثابت کواتس (Kovats index)
تولوئن	۱۵/۴۶	۷۸۹
اتیل بنزن	۴/۶۵	۸۶۷
دی‌متیل بنزن	۰/۲۳	۸۸۶
زایلن	۲/۹	۸۹۷
فنول	۱۶/۵۵	۱۳۰۵
تیمول	۱/۷	۱۳۰۹
فنیل	۰/۹	۱۳۱۰

بحث

با توجه به عوارض جانبی داروهای ضد قارچی و گاهی عدم موفقیت درمان بیماری‌های قارچی با داروهای رایج، توجه به درمان‌های سنتی و استفاده از گیاهان دارویی حائز اهمیت است(۲۰, ۱۹). بسیاری از انواع مولکول‌ها با فعالیت ضد میکروبی از گیاهان جدا شده اند. در بین این مولکول‌های گیاهی، اخیراً پروتئین‌ها و پپتیدهای ضد قارچی گزارش شده‌اند(۲۱).

گیاه *Ephedra major* با نام فارسی ریش بز یا ارمک، هزاران سال است که در ایران به عنوان یک گیاه دارویی شناخته شده است. رویشگاه آن در ایران، افغانستان، پاکستان و هندوستان گزارش شده است. این گیاه برای درمان آسم و سرفه مورد استفاده قرار می‌گرفته است. خواصی از جمله اثر ضد باکتریایی، ضد ویروسی، ضد سرطانی، ضد التهاب، ضد حساسیت و گشادکنندگی عروق برای این گیاه ذکر گردیده است. این گیاه همچنین دارای خواص آنتی اکسیدانی بالایی می‌باشد(۲۲, ۲۳).

این تحقیق جهت بررسی اثر مهاری عصاره های اتانولی، متانولی، پترولیوم اتری و کلروفرمی گیاه *Ephedra major* بر رشد *کاندیدا آلبیکنس* (ATCC 1677)، *کاندیدا گلابراتا* (CDS 2175) و *کاندیدا تروپکالیس* (CBS 94) در شرایط آزمایشگاهی انجام شد. نتایج به

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-05-13]

[DOI: 10.61186/sjku.28.3.58]

دست آمده حاکی از فعالیت ضد کاندیدایی عصاره‌های مختلف گیاه *Ephedra major* بر علیه گونه‌های مورد مطالعه است. به طوری که از میان عصاره‌های مورد مطالعه تأثیر عصاره‌های متانولی و کلروفرمی بیشتر بود؛ بنابراین عصاره‌ها دارای ترکیبات مؤثر در برابر گونه‌های مختلف بودند آنالیز ترکیبات با روش GC/MS نشان داد که ترکیبات فنولی و تولوئن بیشترین مواد تشکیل دهنده گیاه را شامل می‌شوند.

مطالعات مختلف فعالیت ضد قارچی گیاهان دارویی علیه گونه های مختلف *کاندیدا* را نشان می‌دهد به‌طور مثال در مطالعه غلام پور عزیزی و همکاران در بررسی خواص ضد قارچی ملون علیه *کاندیدا آلبیکنس* مشخص شد که MIC و MFC عصاره متانولی میوه ملون به ترتیب $۱۰^{۳} \times ۲۵$ و $۱۰^{۴} \times ۵$ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. MIC و MFC عصاره متانولی میوه نابالغ $۱۰^{۳} \times ۲۵$ بود. برای عصاره اتانولی میوه بالغ، MIC و MFC، $۱۰^{۳} \times ۲۵$ بود میکروگرم در میلی‌لیتر و برای عصاره اتانولی میوه نارس ملون MIC ، $۱۰^{۳} \times ۲۵$ و MFC، $۱۰^{۴} \times ۵$ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. نتایج کروماتوگرافی گازی / طیف سنجی جرمی (GC / MS) نشان داد که اسید هگزادکانوئیک در تمام عصاره‌ها وجود دارد(۱۷). در مطالعه Deabes و همکاران گیاه *Ephedra Sinica* فعالیت ضد قارچی علیه گونه‌های مختلف *آسپرژیلوس* شامل *آسپرژیلوس فلاووس*، *آسپرژیلوس نایجر* و *آسپرژیلوس اکراسئوس* را نشان داد و بر اساس نتایج حاصل از GC / MS ترکیبات دی متوکسی فلاون و 4-(Ethylamino)-6-(methylsulfanyl)-1,3,5-triazin-2-ol بیشترین میزان ترکیبات گیاه را تشکیل دادند (۲۴). وجود ترکیبات متفاوت در عصاره‌های گیاهان مختلف عامل تفاوت در توانایی میزان مهار قارچ ها است.

Abdullah در سال ۲۰۲۱، اثر ضد قارچی عصاره متانولی ریشه و برگ گیاه *Myrtus communis* را بر مخمرهای *Candida albicans*، *C. glabrata*، *C. kefyr*، *C. parapsilosis* و *C. tropicalis* بررسی نمود. نتایج نشان داد که عصاره متانولی ریشه و برگ گیاه *Myrtus communis* دارای اثر ضد قارچی بر *کاندیدا گلابراتا* است. قطر هاله ممانعت از رشد عصاره متانولی ریشه و برگ گیاه *Myrtus communis* به ترتیب برابر ۰/۱۲+۲۳/۵ و ۰/۲۲+ ۲۰/۷. MIC و MFC ریشه به ترتیب برابر ۱۲/۵ و ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و MIC و MFC برگ به ترتیب برابر ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. در این تحقیق ریشه اثر ضد قارچی بیشتری را نشان داد(۲۵).

در برخی از مطالعات اثرات ضد میکروبی عصاره‌های مختلف گیاه *Ephedra major* گزارش شده است. میکائیلی و همکاران، فعالیت ضد قارچی گیاه *Ephedra major* علیه قارچ *میکروسپوروم جیپسئوم* را نشان دادند. از میان عصاره‌های آبی و هیدروالکلی تنها عصاره آبی(MIC برابر ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) فعالیت ضد قارچی داشت(۲۶) در حالی‌که در مطالعه حاضر تأثیر عصاره‌های متانولی و کلروفرمی نسبت به عصاره آبی بیشتر بود. در مطالعه تراب زاده، خواص ضد باکتریایی عصاره الکلی گیاه *Ephedra major* بر باکتری *اشریشیاکلی* و خواص ضد باکتریایی عصاره‌های آبی و الکلی گیاه بر دو باکتری *استرپتوکوکوس پیوژنز* و *استافیلوکوکوس اورئوس* گزارش شد(۲۷). در مطالعه زیبایی و همکاران بر عصاره‌های آبی و الکلی *Ephedra major* مشخص شد که این عصاره‌ها فعالیت ضد پروتواسکولکسی قوی در غلظت ۰/۱٪ دارند و در غلظت‌های کمتر میزان مرگ‌ومیر کاهش می یابد(۲۲).

با توجه به نتایج موفقیت‌آمیز تأثیر ضد کاندیدایی این گیاه پیشنهاد می‌شود بررسی تأثیرات ضد میکروبی علیه ایزوله‌های کاندیدایی جدا شده از بیماران که دارای مقاومت چندگانه هستند و امروزه از جمله معضلات سیستم درمانی محسوب می‌شوند به‌طور گسترده انجام شود. بعلاوه بررسی اثر ضد قارچی اسانس گیاه نیز ارزشمند است. از

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-05-13]

[DOI: 10.61186/sjku.28.3.58]

جمله محدودیت‌های موجود در تحقیق حاضر می‌توان به عدم امکانات کافی در زمینه انجام آزمایش‌های درون تنی اشاره نمود.

نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر ارزیابی‌ها نشان دادند که عصاره‌های اتانولی، متانولی، پترلیوم اتری و کلروفرمی گیاه *Ephedra major* دارای اثرات ضد قارچی می باشند. به طوری که از میان عصاره‌های مورد بررسی عصاره پترلیوم اتری گیاه *Ephedra major* *اثر بهتری بر کاندیدا آلبیکنس، عصاره کلروفرمی گیاه Ephedra major بر کاندیدا گلابراتا و عصاره های اتانولی، متانولی و کلروفرمی گیاه Ephedra major بر کاندیدا تروپکالیس داشت.*

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد میکروبیولوژی دانشگاه آزاد واحد فلاورجان، اصفهان با کد ۱۷۲۳۰۵۰۷۹۲۲۰۱۰ است. بدین‌وسیله نویسندگان از معاونت پژوهشی این دانشگاه کمال تشکر و قدردانی را دارند.

منابع

1. de Melo AV, Zuza-Alves D, da Silva-Rocha W, de Souza LFC, Francisco E, de Azevedo Melo AS, et al. Virulence factors of Candida spp. obtained from blood cultures of patients with candidemia attended at tertiary hospitals in Northeast Brazil. J Mycol Med. 2019;29(2):132-9.
2.Khadija B, Abbasi A, Khan S, Nadeem M, Badshah L, Faryal R. Isolation of pathogenic Candida species from oral cavity of postpartum females, and its association with obstetric and dental problems. Microb pathog. 2019;131:40-6.
3.Rodríguez-Cerdeira C, Martínez-Herrera E, Carnero-Gregorio M, López-Barcenas A, Fabbrocini G, Fida M, et al. Pathogenesis and clinical relevance of Candida biofilms in vulvovaginal candidiasis. Front Microbiol. 2020;11:28.
4.Jabra-Rizk MA, Kong EF, Tsui C, Nguyen MH, Clancy CJ, Fidel Jr PL, et al. Candida albicans pathogenesis: fitting within the host-microbe damage response framework. Infect immun. 2016;84(10):2724-39.
5.Poulain D. Candida albicans, plasticity and pathogenesis. Crit Rev Microbiol. 2015;41(2):208-17.
6.El Rabey HA, Almutairi FM, Alalawy AI, Al-Duais MA, Sakran MI, Zidan NS, et al. Augmented control of drug-resistant Candida spp. via fluconazole loading into fungal chitosan nanoparticles. Int J Biol Macromol. 2019;141:511-6.
7.Morace G, Perdoni F, Borghi E. Antifungal drug resistance in Candida species. J Glob Antimicrob Resist. 2014;2(4):254-9.
8.Soliman SS, Semreen MH, El-Keblawy AA, Abdullah A, Uppuluri P, Ibrahim AS. Assessment of herbal drugs for promising anti-Candida activity. MC Complement Altern Med. 2017;17(1):1-9.
9.Nejad BS, Rajabi M, Mamoudabadi AZ, Zarrin M. In vitro anti-candida activity of the hydroalcoholic extracts of heracleum persicum fruit against phatogenic candida species. Jundishapur j microbiol. 2014;7(1).
10.Parsaeimehr A, Sargsyan E, Javidnia K. A comparative study of the antibacterial, antifungal and antioxidant activity and total content of phenolic compounds of cell cultures and wild plants of three endemic species of Ephedra. Molecules. 2010;15(3):1668-78.
11.Aghdasi M, Mofid Bojnoordi M, Mianabadi M, Nadaf M. Chemical components of the Ephedra major from Iran. Nat prod res. 2016;30(3):369-71.
12.Ghanbari Hamedani S, Asri Y, Mehregan I. Genetic diversity and population structure of Iranian Ephedra major. Rostaniha. 2020;21(2):231-47.
13.Zhang B-M, Zhi-Bin W, Ping X, Qiu-Hong W, He B, Kuang H-X. Phytochemistry and pharmacology of genus Ephedra. Chin j nat med. 2018;16(11):811-28.
14.El-Kamali HH, EL-Karim EMA. Evaluation of antibacterial activity of some medicinal plants used in Sudanese traditional medicine for treatment of wound infections. J Plant Sci. 2009;2(4):246-51.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-05-13]

[DOI: 10.61186/sjku.28.3.58]

15.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(1):31-7.
16.Hoseini S, Joshaghani H. EvaluationEvaluation of antifungal activity of essential oil of Carvacrol on standard Fluconazole sensitive and resistance strains of Candida albicans. Med Lab J. 2011;5(2):28-33.
17.Gholampour-Azizi I, Rouhi S, Yahyayi F. In vitro antifungal activity of Cucumis melo on Candida albicans. Zahedan J Res Med Sci. 2015;17(7).
18.Kumar SS, Kamaraj M. Analysis of phytochemical constituents and antimicrobial activities of Cucumis anguria L. against clinical pathogens. Am Eurasian J Agric Environ Sci. 2010;7(2):176-8.
19.Saratale RG, Benelli G, Kumar G, Kim DS, Saratale GD. Bio-fabrication of silver nanoparticles using the leaf extract of an ancient herbal medicine, dandelion (Taraxacum officinale), evaluation of their antioxidant, anticancer potential, and antimicrobial activity against phytopathogens. Environ Sci Pollut Res. 2018;25(11):10392-406.
20.Kim JH, Do E-J, Lee G. Investigation of anti-microbial activity of herbal medicines used as natural preservatives based on the analysis of papers and patents. J Physiol & Pathol Korean Med. 2015;29(1):101-13.
21. Jeenkeawpieam J, Yodkeeree S, Andrianopoulos A, Roytrakul S, Pongpom M. Antifungal activity and molecular mechanisms of partial purified antifungal proteins from *Rhinacanthus nasutus* against *Talaromyces marneffei*. J Fungi. 2020; 6(4): 333.

21.Zibaei M, Salehi S, Jafari Z, Bahadory S, Firoozeh F, Shahivand M. In vitro assessment of the protoscolicidal activities of the Ephedra major methanol extracts.Int J Enteric Pathog.2017;5(1):5-8.
22.Bagheri-Gavkosh S, Bigdeli M, Shams-Ghahfarokhi M, Razzaghi-Abyaneh M. Inhibitory effects of Ephedra major host on Aspergillus parasiticus growth and aflatoxin production. Mycopathologia. 2009;168(5):249-55.
23.Deabes MM, Allayeh AK, Seif MM, Rasmey A-HM, Naguib KM. Antiviral, Antifungal, and Antibacterial Potential Activities of Ephedra Sinica in Vitro. Jordan J Biol Sci. 2020;13(3);313-320.
25. Abdullah A. Alyousef.Antifungal Activity and Mechanism of Action of Different Parts of *Myrtus communis* Growing in Saudi Arabia against *Candida* Spp. J Nanomater. 2021; 2021: 3484125.
26.Mikaeili A, Modarresi M, Mozafari K. Investigation of antifungal effect of Ephedra major against Microsporum gypseum. Sci J Kurd Univ Med Sci. 2015; 20 (3) :33-44.
27.Torabzadeh Khorasani P, Panahi P, Sabokbar A, Mokhtari A. Antibacterial activity evaluation of Ephedra Major Host acetonic, aqueous and alcoholic extracts against standard strains of E. coli, P. aeruginosa, S. aureus and S. pyogenes. J Comp Pathobiol. 2010;6(4):91-98.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2024-05-13]

[DOI: 10.61186/sjku.28.3.58]