مجله دانشکده بهداشت وانستیتوتحقیقات بهداشتی
زمستان ۱۳۹٤، دوره ۱۳، شماره چهارم، صفحه ۸٤- ۷۹

مقاله پژوهشی

اثر ضد قارچی صمغ ون (*Pistacia atlantica var.kurdica*) بر قارچ *آسپرژیلوس پارازیتیکوس*

فرزاد اعلا: استادیار، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، دانشکده ، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران
صادق خداویسی: دانشجوی دوره دکتری، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
الهام بغدادی: کارشناس ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین- پیشوا، تهران، ایران
ساسان رضایی: دانشیار، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران- نویسنده رابط: srezaie@tums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹٤/۹/۱ **تاریخ پذیرش: ۱۳۹٤/۱۱/۱۸**

چکیده

زمینه و هدف: گونه های *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* غالباً در مناطق گرمسیری، محصولات کشاورزی را در مزرعه و انبار آلوده می‌نمایند. در سال های اخیر مطالعه بر روی عصاره ها و ترکیبات گیاهان جهت کاهش رشد میکروارگانیسم های تولید کننده سم افزایش داشته است. از آنجا که نحوه اثر صمغ ون بر روی مهار رشد قارچ های آسپرژیلوس کاملاً مشخص نیست تحقیق حاضر جهت تعیین اثر ضد قارچی صمغ ون بر قارچ *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* انجام گردید.

روش کار: بر اساس روش میکرودایلوشن مطابق با آخرین نسخه از روش های تاییدی CLSI، پروتکل M38-A2 اصلاح شده، حداقل میزان مهارکنندگی رشد (MIC) در غلظت های مختلف از صمغ ون (*Pistacia Atlantica subsp. Kurdica*) بر علیه سویه استاندارد *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* (ATCC15517) ارزیابی شد.

نتایج: در این بررسی مشاهده گردید که صمغ ون (*Pistacia Atlantica subsp. Kurdica*) دارای اثر ضد قارچی بر *علیه آسپرژیلوس پارازیتیکوس* می باشد و حداقل غلظت میزان مهار کنندگی از رشد قارچ، در غلظت ۱۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر مشاهده شد.

نتیجه گیری: به طور کلی صمغ ون می تواند به طور چشمگیری تأثیرات مهارکنندگی بر مهار رشد قارچ *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* داشته باشد. انجام مطالعات تکمیلی جهت بررسی میزان بیان ژن های دخیل در توکسین زایی پیشنهاد می‌گردد.

واژگان کلیدی: آسپرژیلوس پارازیتیکوس، صمغ ون

مقدمه

[Downloaded from sjsph.tums.ac.ir on 2024-11-21]

گونه‌های *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* غالباً در مناطق گرمسیری، محصولات کشاورزی را در مزرعه و انبار آلوده می‌نمایند (Stroka and Anklam 2002; Pitt 2000). آلودگی ناشی این عوامل در دامنه وسیعی از محصولات غذایی گزارش شده است (Scott et al. 1972). آفلاتوکسین تولیدی توسط این قارچ ها دارای اثرات متفاوت بیوشیمیایی شامل اثر بر متابولیسم انرژی، کربوهیدرات و چربی و نیز اثر بر سنتز پروتئین و اسید نوکلئیک می‌باشد در انسان منجر سیروز کبدی، مهار ایمنی، القای بدخیمی، اثرات تراتوژنیک می‌باشد که از جایگاه ویژه‌ای در بهداشت و سلامت انسان و حیوانات برخوردار می‌باشند (Betina 1989). با توجه به افزایش روزافزون سویه های مقاوم به دارو در میان انواع میکروارگانیسم ها، یافتن ترکیبات ضدقارچی از مواد طبیعی که قطعاً اثرات جانبی کمتری دارد، از دیرباز مورد توجه محققان بوده است (Mimica-Dukić et al. 2010). در سال های اخیر مطالعه بر روی گیاهان و عصاره ها و ترکیبات آنها در مواردی چون کاهش رشد میکروبی و تاثیر بر روی میکروارگانیسم ها به نحو چشمگیری افزایش یافته و بر همین اساس خصوصیات ضد قارچی و ضد میکروبی بسیاری از عصاره های گیاهی و صمغ های مختلف اثبات شده است (Sharifi and Hazell 2011; Peymani et al. 2014). علت این رویکرد را می توان برخورداری از منشأ طبیعی و نبود تقریبی عوارض جانبی نامطلوب در انسان و نیز در محیط زیست عنوان نمود. از جمله گیاهان دارویی که اثرات ضد میکروبی آن به اثبات رسیده است می توان از *Pistacia atlantica* که یکی از واریته‌های مهم آن *Pistacia atlantica var.kurdica* می باشد، نام برد. درخت بنه یا پسته کوهی منبع تولید شیره سقز است. سقز صمغی به رنگ سبز خیلی روشن، غلیظ و بسیار چسبنده‌است که استفاده دارویی فراوان داشته و به عنوان یک ملین قوی در درمان یبوست و درمان ناراحتی‌های گوارشی استفاده می‌شود (Rahimzade et al. 2014). از شیره سقز علاوه بر کاربردهای فراوان صنعتی در تهیه آدامس، عطر، خوشبوکننده‌ها، حشره کش‌ها و در صنعت داروسازی در تهیه مواد ضد عفونی کننده با توجه به خصوصیات ضد میکروبی آن استفاده می‌شود (Magiatis et al. 1999; Koutsoudaki et al. 2005). اکثر سقز تولیدی در ایران به خارج از کشور صادر و به عنوان مواد پایه بسیاری از صنایع فوق الذکر بکار برده می‌شود. هرچند که می‌توان با استقرار صنایع تبدیلی در داخل، بخصوص در ارتباط با مصارف پزشکی از صادر شدن این محصول بسیار پرارزش بصورت خام جلوگیری کرد و از آن استفاده‌های بهینه‌ای را بعمل آورد. همان طور که گفته شد، صمغ ون دارای خصوصیات ضد باکتریایی، ضد انگلی و ضد قارچی است (Magiatis et al. 1999; Koutsoudaki et al. 2005; Sharifi and Hazell 2011). در مطالعه حاضر با هدف بررسی میزان تأثیر عصاره تغلیظ شده صمغ ون بر روی میزان رشد قارچ *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* انجام شد.

روش کار

تهیه عصاره ون: صمغ ون که از کارخانه سقز سازی در استان کردستان تهیه شده را به صورت صنعتی در مجاورت حلال آبی و در فشار ۲ بار و در دمای ۹۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲ تا ۳ ساعت جوشانیده و پس از هیدراسیون شیره‌ی حاصل، آن را به روش حرارت تغلیظ نموده و پس از

[Downloaded from sjsph.tums.ac.ir on 2024-11-21]

رسانیدن رطوبت آن به ۷ الی ۱۰ درصد عصاره را به صورت قالب یا پودر درآورده و مورد استفاده قرار گردید. با توجه به اینکه تمامی شرایط فوق در دمای بالا، استریل و سپس رطوبت آن در شرایط پایین ۸ تا ۱۰ درصد قرار گرفت. عصاره ی مذکور با آب مجددا رقیق شده و پس از تهیه یک سوسپانسیون مایع از آن در غلظت های ۱۵/۶۲، ۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر به محیط کشت قارچی مایع اضافه گردید.

کشت سوش قارچی: یک سویه استاندارد *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* (ATCC 15517) مولد آفلاتوکسین های B_1، B_2، G_1، G_2 مورد استفاده قرار گرفت. برای کشت قارچ، نمونه ی *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* را در محیط سابورو دکستروز آگار (SDA) کشت داده و در انکوباتور۳۰ درجه سانتی گراد نگهداری گردید. پس از ۵ روز پلیت حاوی محیط کشت قارچی برای تعیین حداقل میزان مهارکنندگی رشد مورد استفاده قرار گرفت. پس از اینکه توده میسلیومی به مقدار کافی بدست آمد، در کنار شعله و زیر هود توسط آنس استریل اسپورها از سطح تودهٔ میسلیومی جمع آوری شده و وارد لوله آزمایش محتوی آب مقطر استریل در پیچ دار شدند. جهت بدست آوردن سوسپانسیون های یکنواخت یا همگن با نسبت یکسان از غلظت های قارچی از یک معیار کدورت سنجی سنتی به نام استاندارد مک فارلند با درجه ۰/۵ معادل $۱/۵\times۱۰^{۸}$ استفاده گردید.

تعیین حداقل میزان بازدارندگی از رشد: جهت تعیین حداقل میزان بازدارندگی از رشد (MIC) بر اساس روش Broth Microdilution مطابق با آخرین نسخه از روش های تاییدی CLSI (پروتکل M38-A2) (Wayne 2008) ابتدا ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون قارچی (۱×۱۰^{۶}) در هر یک از میکروپلیت‌ها ریخته سپس غلظت ۱ گرم بر میلی لیتر صمغ ون بوسیله سمپلر تحت شرایط استریل به میکروپلیت‌های با حجم مناسب اضافه گردید به این صورت که ۱ میلی‌لیتر عصاره را به میکروپلیت شماره۱ اضافه کرده سپس از همان میکروپلیت۱ میلی لیتر برداشته به میکروپلیت بعدی اضافه کرده و به این ترتیب الی آخر این کار را ادامه داده و در پایان ۱ میلی لیتر از میکروپلیت آخر دور ریخته شد. سپس به هر کدام از آنها ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون قارچی معادل سازی شده با ۰/۵ مک فارلند را توسط سمپلر اضافه و دو میکروپلیت نیز به نمونه کنترل اختصاص داده شد که یکی از آنها کنترل مثبت (شامل ۲ میلی لیتر از محیط RPMI 1640 و ۱۰۰ میکرولیتر اسپور قارچی) و دیگری کنترل منفی (شامل ۲ میلی لیتر از محیط RPMI 1640 بدون اسپور و عصاره) بوده است. سپس میکروپلیت ها را برای مدت ۲روز در دمای ۳۷ درجه انکوبه و پس از دو روز نتایج بررسی شد.

نتایج

قارچ *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* تحت تاثیر غلظت های مختلف عصاره در مقایسه میکروپلیت ها با کنترل مثبت توانایی مهار رشد قارچ توسط عصاره ون را اثبات کرد. کمترین میزان بازدارندگی از رشد در میزان ۱۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر از صمغ ون مشاهده شد. بررسی میکروسکوپی قارچ *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* تحت تاثیر غلظت ۱۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر صمغ ون در فاصله زمانی ۷ روزه تغییراتی را نشان داد. این تغییرات به صورت کاهش تولید مسیلیوم،

[Downloaded from sjsph.tums.ac.ir on 2024-11-21]

کاهش کونیدی‌زایی و تغییر رنگ کلنی از سبز به سفید می‌باشد.

بحث

از آنجا که قارچ های جنس آسپرژیلوس به طور گسترده ای در محیط منتشر هستند، با قرار گرفتن در شرایط مناسب رشد از جمله دما، رطوبت، و محیط مناسب در مزارع یا هنگام ذخیره و انبار محصولات کشاورزی مایکوتوکسین ها را تولید کرده و از این طریق مایکوتوکسین‌ها وارد زنجیره غذایی انسان و دام می شوند (Pitt 2000). در میان مایکوتوکسین ها آفلاتوکسین‌ها به عنوان سردسته تمامی مایکوتوکسین‌ها مطرح می‌باشند (Adye and Mateles 1964). آفلاتوکسین توکسینی با سمیت بالا است که اغلب توسط *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* تولید می شود و آفلاتوکسیکوزیس مسمومیت و عوارض حاصل از خوردن سم آفلاتوکسین بر روی مواد غذائی است و این توکسین در گونه‌های مختلف حیوانات و انسان میتواند توکسیژنیک، کارسینوژنیک، موتاژنیک، ایمونوساپرسیو و تراتوژنیک باشد (Heathcote and Hibbert 1978; Carnaghan et al. 1963). در سال‌های اخیر مطالعه بر روی عصاره ها و ترکیبات گیاهان در مواردی چون کاهش رشد میکروبی اثرات چشمگیری را نشان داده اند و از جمله گیاهان دارویی که اثرات ضد میکروبی و قارچی آنها به اثبات رسیده است می توان به صمغ ون اشاره نمود (Sharifi and Hazell 2011). بر اساس نتایج مطالعه حاضر عصاره ون در غلظت های مورد مطالعه توانایی مهار رشد قارچ *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* را نشان داده است. با توجه به خواص ضد میکروبی و ضد قارچی صمغ ون از سالیان گذشته تحقیقاتی در ارتباط با اثرات آن بر روی میکروارگانیزم‌ها انجام شده است از آن جمله می توان به مطالعه تاران و همکاران در ارتباط با اثر صمغ ون در درمان لیشمانیوز جلدی اشاره کرد (Taran et al. 2010).

در مطالعه حاضر با بررسی های انجام شده مشاهده گردید که هر چه بر غلظت عصاره افزوده می‌شد میزان تولید میسلیوم کاهش می یافت و بیشترین میزان مهار کنندگی رشد قارچ در غلظت ۱۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر مشاهده شد. در مطالعه حنفی و همکاران با هدف بررسی خواص ضد باکتریایی اسانس شیره درخت بنه بر روی باکتری های اشریشیا کلی در غلظت ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر و *کلستریدیوم اسپوروژنس* در غلظت ۱۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر به ترتیب ۱۳/٤±۰/۳۲، ۱۱/۱٦±۰/٤ و ۸/۸±۳/۰ تعیین گردید (Hanafi et al. 2012). همچنین در مطالعه رحیم زاده نشان دادند که با افزایش میزان غلظت اسانس شیره درخت بنه، قطر هاله ممانعت از رشد *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* بیشتر می شود (Rahimzadeh et al. 2014).

نتایج تحقیق حاضر می تواند در شناخت عملکرد و تعیین اثر ضد قارچی عصاره ون بر قارچ *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* موثر واقع شده و راه را برای انجام مطالعات تکمیلی بعدی در تولید مواد آنتی مایکوتوکسین با منشأ گیاهی هموار سازد. به عبارت دیگر این مطالعه با شناخت مکانیسم اثر صمغ ون زمینه ساز مطالعات تکمیلی به منظور استفاده از ممانعت کننده های بیان ژن در طراحی و ساخت داروهای جدید ضد قارچ می باشد.

[Downloaded from sjsph.tums.ac.ir on 2024-11-21]

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از همکاران آزمایشگاه مولکولار بیولوژی قارچ شناسی پزشکی دانشکده بهداشت، جناب آقای محمدرضا صفری، خانم دکتر فاطمه نوربخش و همچنین خانم آذر برهمه جهت همکاری در این مطالعه تشکر و قدردانی می گردد.

References

Adye, J. and Mateles, R., 1964. Incorporation Of Labelled Compounds Into Aflatoxins. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 86**,** pp. 418-420.

Betina, V., 1989. *Mycotoxins. Chemical, Biological And Environmental Aspects*, Elsevier.

Carnaghan, R., Hartley, R. and O'kelly, J., 1963. Toxicity And Fluorescence Properties Of The Aflatoxins.

Hanafi, Gh., Darvishi, Sh. and Darvishi, Na., 2012. Ntibacterial Effect Of Essential Oil Of Mastic Resin On Staphylococcus Aureus, Escherichia Coli And Clostridium Sporogenes. *Scientific Journal Of Kurdistan University Of Medical Sciences*, 17, pp. 1-11

Heathcote, J.G. and Hibbert, J., 1978. *Aflatoxins: Chemical And Biological Aspects*, Elsevier Scientific Publishing Co.

Koutsoudaki, C., Krsek, M. and Rodger, A., 2005. Chemical Composition And Antibacterial Activity Of The Essential Oil And The Gum Of Pistacia Lentiscus Var. Chia. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 53**,** pp. 7681-7685.

Magiatis, P., Melliou, E., Skaltsounis, A.-L., Chinou, I.B. and Mitaku, S., 1999. Chemical Composition And Antimicrobial Activity Of The Essential Oils Of Pistacia Lentiscus Var. Chia. *Planta Medica*, 65**,** pp. 749-752.

Mimica-Dukić, N., Bugarin, D., Grbović, S., Mitić-Ćulafić, D., Vuković-Gačić, B., Orčić, D., Jovin, E. and Couladis, M., 2010. Essential Oil Of Myrtus Communis L. As A Potential Antioxidant And Antimutagenic Agents. *Molecules*, 15**,** pp. 2759-2770.

Peymani, J., Gharaei, A., Ghafari, M. and Taheri, A., 2014. Evaluation Of Antibacterial And Antifungal Effects Of Marine Algae (Gracilariaarcuata) Of Chabahar Coasts. *Qom University Of Medical Sciences Journal*, 8.

Pitt, J., 2000. Toxigenic Fungi And Mycotoxins. *British Medical Bulletin*, 56**,** pp. 184-192.

Scott, P.M., Van Walbeek, W., Kennedy, B. and Anyeti, D., 1972. Mycotoxins (Ochhratoxin A, Citrinin, And Sterigmatocystin) And Toxigenic Fungi In Grains And Other Agricultural Products. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 20**,** pp. 1103-1109.

Rahimzade, Gh., Rokhzadi, A. and Bahramian, S., 2014. Antibacterial Activity Of Liquid Smoke And *Pistacia Atlantica Subsp. Kurdica* On Lactobacillus Bulgaricus. *Journal Of Food Microbiology*, 1, pp. 49-55.

Sharifi, M.S. and Hazell, S.L., 2011. GC-MS Analysis And Antimicrobial Activity Of The Essential Oil Of The Trunk Exudates From Pistacia Atlantica Kurdica. *Journal Of Pharmaceutical Sciences And Research*, 3**,** pp. 1364-1367.

Stroka, J. and Anklam, E., 2002. New Strategies For The Screening And Determination Of Aflatoxins And The Detection Of Aflatoxin-Producing Moulds In Food And Feed. *Trac Trends In Analytical Chemistry*, 21**,** pp. 90-95.

Taran, M., Mohebali, M. and Esmaeli, J., 2010. In Vivo Efficacy Of Gum Obtained Pistacia Atlantica In Experimental Treatment Of Cutaneous Leishmaniasis. *Iranian Journal Of Public Health*, 39**,** P. 36.

Wayne, P., 2008. Reference Method For Broth Dlution Antifungal Susceptibility Testing Of Filamentous Fungi, Approved Standard M38-A2. Clinical And Laboratory Standards Institute.

[Downloaded from sjsph.tums.ac.ir on 2024-11-21]

The antifungal effect of *Pistacia Atlantica subsp.Kurdica* on the growth of *Aspergillus parasiticus*

AAla, F., Ph.D. **Assistant professor, Department of Medical Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran**
Khodaveysi, S., **Ph.D. Student, Department of Medical Parasitology and Mycology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran**
Baghdadi, E., MSc. **Department of Microbiology, Islamic Azad University, Varamin, Iran**
Rezaie, S., Ph.D. **Associate Professor, Department of Medical Parasitology and Mycology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran- Corresponding author: Srezaie@tums.ac.ir**

Received: Nov 22, 2015 **Accepted: Feb 7, 2016**

ABSTRACT

Background and Aim: *Aspergillus arasiticus* species can contaminate agricultural products both on the farm and in storage in tropical regions. In recent years much research has been conducted on extracts of, and chemical compounds derived from, plants to be used potentially to reduce growth of toxin-producing microorganisms. Not much information is available in this area, so this study was conducted to determine the antifungal effect of *Pistacia Atlantica subsp. Kurdica* on the growth of *Aspergillus parasiticus*.

Materials and Methods: According to the microdilution method, based on the latest version of the Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI) Document M27-A3, modified M38-A2 protocol, minimum inhibitory concentration (MIC) at different concentrations of *Pistacia Atlantica subsp. Kurdica* against the standard *parasiticus* species (ATCC15517) was determined.

Results: *Pistacia Atlantica subsp. Kurdica* could inhibit growth of *Aspergillus parasiticus;* the minimum concentration with an inhibitory effect on the growth of the fungus was 125mg/ml.

Conclusion: The *Pistacia Atlantica subsp. Kurdica* can potentially have a pronounced growth-inhibiting effect on *A. Parasiticus.* It is recommended to conduct more studies in this area to getinformation on expression of genes involved in the phenomenon.

Key words: Aspergillus parasiticus, Pistacia Atlantica subsp. Kurdica, minimum inhibitory concentration (MIC)

[Downloaded from sjsph.tums.ac.ir on 2024-11-21]