

ارزیابی اثر ضدقارچی عصاره متانولی گیاه *Teucrium polium* علیه گونه‌های مختلف جنس کاندیدا در شرایط آزمایشگاهی

Evaluation of antifungal effect of methanolic extract of *Teucrium polium* on *Candida* spp. in vitro

<https://dorl.net/dor/20.1001.1.25885073.1400.10.2.8.0>

DOR:20.1001.1.25885073.1400.10.2.8.0

Genetic Engineering and Biosafety
Journal
Volume 10, Number 2
2022

<http://gebsj.ir/>

<https://ecc.isc.ac/showJournal/23064>

مریم ندیمی^۱، محمدعلی ضیا^۲، محبوبه مدنی^{۳*}، پگاه شکیب^{۴*}

Maryam Nadimi¹, Mohammadali Zia², Mahboobeh Madani^{3*}, Pegah Shakib^{4*}

- ۱- کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، اصفهان،
- ۲- دانشیار قارچ‌شناسی، گروه علوم پایه پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان
- ۳- دانشیار میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، اصفهان، ایران.
- ۴- استادیار باکتری‌شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم‌آباد، ایران.

1. MSC of Microbiology, Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.
2. Associate Professor of Mycology, Department of Medical Basic Sciences, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.
3. Associate Professor of Mycology, Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.
4. Assistant Professor of Medical Bacteriology, Razi Herbal Medicines Research Center, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: *Corresponding Author, Email:

shakib.pegah@yahoo.com و mmadani66@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۷/۲۱ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۲۳)

واژه‌های کلیدی

چکیده

گیاه مریم‌نخودی یا کل پوره با نام علمی *Teucrium polium*، دارای خواص ضد میکروبی است و از گذشته‌های دور، در طب سنتی برای درمان بسیاری از عفونت‌ها کاربرد دارد. هدف از مطالعه حاضر، بررسی خواص ضدقارچی عصاره متانولی گیاه کل پوره علیه گونه‌های مختلف کاندیدا است. در این مطالعه تجربی، پس از جمع‌آوری و خشک نمودن گیاه کل پوره از ارتفاعات بروجن در استان اصفهان در سال ۱۳۹۰، عصاره‌گیری به روش سوکسله انجام شد. سپس فعالیت ضدقارچی عصاره به روش انتشار چاهک و دیسک بر روی ایزوله‌های *Candida albicans* (NCPF 3153، ATCC 1677) و *Candida glabrata* CBS 2175 بررسی شد. همچنین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد و حداقل غلظت قارچ‌کشی تعیین گردید. آنالیز داده‌ها با نرم‌افزار SPSS ۱۸ و با استفاده از آنالیز واریانس دوطرفه انجام شد ($P < 0.001$). عصاره متانولی گیاه کل پوره در غلظت‌های مختلف بر گونه‌های *C. albicans* NCPF 3153 و *C. krusei* اثر بازدارندگی داشت. کمترین غلظت ممانعت‌کنندگی از رشد علیه ایزوله‌های *C. albicans* NCPF 3153 و *C. albicans* ATCC 1677، *C. glabrata* و *C. krusei* به ترتیب $۶/۲۵$ ، $۶/۲۵$ و $۱۲/۵$ و $۰/۷۸$ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و کمترین غلظت قارچ‌کشی، به ترتیب برابر $۱۲/۵$ ، $۱۲/۵$ و $۱/۵۶$ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. بر اساس نتایج این تحقیق، عصاره متانولی گیاه کل پوره دارای فعالیت مهارتی قابل‌ملاحظه‌ای علیه گونه‌های مختلف کاندیدا بود.

توکریوم پولیوم،
کاندیدا،
اثر ضدقارچی،
عصاره متانولی

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 10, Number 2, 2022

Abstract

Germanders with the scientific name of *Teucrium polium* has antimicrobial properties and has long been used in traditional medicine to treat many infections. The aim of the present study is to investigate the antifungal properties of methanolic extract of *Teucrium polium* against different *Candida* species. Briefly, after collecting from Borujen hills in Isfahan province in 2011 and preparing isolates of *Candida albicans* (NCPF 3153, ATCC 1677), *Candida cruzi* (CBS 537) and *Candida glabrata* (CBS 2175), the extraction process was performed by soxhlet apparatus. Then the antifungal activity of methanolic extract of *Teucrium polium* was evaluated by well and disk agar diffusion method. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicide concentration (MFC) were determined. Data analysis was performed using SPSS 18 software using two-way analysis of variance ($P < 0.001$). In the well and disk diffusion method, all concentrations of methanolic extract of *Teucrium polium* had an inhibitory effect on *Candida albicans* (NCPF 3153) and *Candida cruzi* species. The lowest inhibitory concentration (MIC) of methanolic extract of *Teucrium polium* on *Candida albicans* NCPF 3153 and ATCC 1677, *Candida glabrata*, and *Candida cruzi* isolates were 6.25, 6.25, 12.5, and 0.78 mg/ml, respectively. The lowest fungicide concentration (MFC) against both *Candida albicans* tested was 12.5, on *Candida glabrata* and *Candida cruzi* were 25 and 1.56 mg/ml, respectively. According to the results, methanolic extract of *Teucrium polium* plant had significant inhibitory activity against different species of *Candida*.

Key words: *Teucrium polium*, *Candida*, Antifungal effect, Methanolic extract

مقدمه

جانبی این داروها مورد توجه قرار گرفته است (Berman and Kryan, 2020)؛ از این رو تحقیقات در زمینه یافتن استراتژی‌های جدید با پایه طبیعی مانند گیاهان دارویی برای درمان مؤثر عفونت قارچی مورد استقبال قرار گرفته است. گیاهان دارویی یکی از مهم‌ترین منابع دارویی سالم و اقتصادی هستند که به طور گسترده‌ای برای بیماری‌های مختلف استفاده می‌شوند. این گیاهان دارای متابولیت‌های ثانویه از قبیل فلاونوئیدها، فنولیک‌ها و گلیکوزیدهای فنلی، لا کتون‌های اشباع‌نشده، ترکیبات گوگردی، ساپونین‌ها هستند و عامل فعالیت ضد میکروبی گیاهان دارویی هستند (Martins et al. 2015, Seleem et al. 2017). یکی از گیاهانی که از زمان‌های گذشته مصارف دارویی دارد گیاه چندساله علفی مریم‌نخودی یا کل پوره (*Teucrium polium*) از خانواده نعنائیان (Lamiaceae) است، این گیاه بیش از ۳۴۰ گونه دارد و در طب سنتی برای کاهش فشارخون، کاهش چربی خون، استفاده می‌شود، همچنین دارای اثرات ضد تشنج، ضد درد، آنتی‌اکسیدان، و ضد میکروبی است (Wassel and Ahmed, 1974). در مطالعات قبلی اثرات ضدباکتریایی عصاره گیاه کل پوره علیه باکتری‌های گرم منفی مانند *Pseudomonas*

باتوجه به گزارش‌های علمی متعدد، میزان شیوع عفونت‌های قارچی در سراسر دنیا، میزان شیوع عفونت‌های قارچی سیستمیک به‌ویژه کاندیدیازیس در بیماران دارای نقص سیستم ایمنی در حال افزایش است (Mergoni et al. 2018, Bitew and Abebaw, 2018). از جمله قارچ‌های مهم بیماری‌زا در انسان می‌توان به گونه‌های مختلف جنس کاندیدا شامل (*Candida albicans*، *C. parapsilosis*، *C. krusei*، *C. glabrata tropicalis*) اشاره نمود که باعث عفونت‌های مختلفی از جمله پنومونی، آبسه مغزی، آرتریت، اندوکاردیت، عفونت‌های تناسلی از جمله واژینیت کاندیدیایی می‌شوند (Fadda et al. 2008, Gharaghani et al. 2018). در برخی موارد، عدم تشخیص و درمان صحیح، علت اصلی مرگ بیماران است؛ بنابراین، شروع زودهنگام درمان‌های دارویی ضدقارچی مؤثر بهترین راه مقابله با عفونت‌های قارچی است (Kołaczowska and Kołaczowski, 2016). در سال‌های اخیر شاهد افزایش میزان مقاومت قارچ‌های بیماری‌زا در برابر عوامل ضدقارچی هستیم که این امر به یکی از معضلات اصلی در سیستم بهداشت و درمان تبدیل شده است. از طرف دیگر عوارض

(DMSO /10) و فلوکونازول به ترتیب به عنوان شاهد منفی و مثبت استفاده شدند این آزمایش برای هر میکروارگانیسم سه بار تکرار شد (Rouhi et al. 2020).

به منظور تهیه محلول دارویی فلوکونازول (تهیه شده از شرکت پارس دارو) ۲۰۴۸ میکروگرم از پودر فلوکونازول را در یک میلی لیتر دی متیل سولفوکساید حل شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار گرفت.

تعیین حساسیت قارچ‌ها به عصاره به روش انتشار دیسک:
بدین منظور، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از هر غلظت عصاره بر روی دیسک‌های استاندارد به قطر ۶ میلی متر افزوده شد و دیسک‌ها در دمای ۳۲ درجه سانتی گراد خشک شدند. سپس محیط کشت سابارو دکستروز آگار به طور جداگانه با ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون گونه‌های مورد آزمایش مخمر *کاندیدا* تلقیح شدند. پس از دیسک گذاری پلیت‌ها به مدت ۷۲-۴۸ ساعت در دمای ۲۷-۲۵ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. پس از ۴۸ ساعت، وجود یا عدم وجود هاله ممانعت از رشد در اطراف دیسک‌ها بررسی گردید. از دیسک حاوی فلوکونازول به عنوان شاهد مثبت و از دیسک حاوی دی متیل سولفوکساید به عنوان شاهد منفی استفاده شد. این آزمون برای هر میکروارگانیسم سه بار تکرار شد (Rouhi et al. 2020).

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت قارچ کشی (MFC): حداقل غلظت بازدارندگی (Minimum inhibitory concentration; MIC) و حداقل غلظت قارچ کشی (Minimum fungicidal concentration; MFC) عصاره متانولی گیاه کل پوره بر گونه‌های کاندیدای مورد مطالعه در این تحقیق به روش ماکرودیلوشن تعیین شد (Gavanji & Larki, 2017). برای تعیین MIC سری رقت‌هایی از ۱۰۰ تا ۰/۹۳ میلی گرم در میلی لیتر از عصاره متانولی گیاه کل پوره تهیه شد. بدین منظور یازده لوله حاوی یک میلی لیتر محیط کشت استریل سابارو دکستروز برات (SDB) آماده کرده، سپس یک میلی لیتر از عصاره با غلظت ۱۰۰ میلی گرم در میلی لیتر به لوله اول افزوده شد، محتویات لوله را مخلوط کرده و سپس از لوله اول، یک میلی لیتر به لوله دوم منتقل گردید، این کار تا لوله دهم تکرار شد. سپس یک میلی لیتر از لوله

Escherichia coli aeruginosa و باکتری‌های گرم مثبت مانند باکتری‌های دهانی *Streptococcus mutans*، *Staphylococcus aureus* و *S. epidermidis* گزارش شده است (Khalil et al. 2009). همچنین اثرات ضدقارچی عصاره آبی و اتانولی این گیاه علیه گونه‌های مختلف جنس کاندیدا و مالاسیزیا توصیف شده است (Nadimi et al. 2013). هدف از مطالعه حاضر بررسی فعالیت ضدقارچی عصاره متانولی گیاه کل پوره علیه گونه‌های جنس کاندیدا است.

مواد و روش‌ها

در سال ۱۳۹۰، گیاه کل پوره از ارتفاعات بروجن در استان اصفهان جمع‌آوری شد. گیاه در سایه خشک و آسیاب شد. سپس ۲۵ گرم از گیاه آسیاب شده در ۲۵۰ میلی لیتر متانول ۸۰٪ به مدت ۷۲ ساعت توسط دستگاه سوکسله عصاره‌گیری شد. عصاره با استفاده از روتاری در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد خشک گردید (Behmanesh et al., 2007). عصاره متانولی آماده شده تا زمان استفاده در بطری‌های شیشه‌ای استریل در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

سپس ایزوله‌های *C. NCPF 3153*، *C. albicans ATCC 1677*، *C. glabrata CBS 2175* و *C. krusei CBS 537 albicans* از گروه قارچ‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه گردید.

تعیین حساسیت قارچ‌ها به عصاره به روش انتشار چاهک: پس از حفر چاهک‌هایی به قطر ۷ میلی متر بر روی سطح محیط کشت سابارو دکستروز آگار ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون مخمر (سوسپانسیون حاوی $1/5 \times 10^8$ cfu/ml) روی محیط به صورت چمنی کشت داده شد. سپس یک گرم از عصاره متانولی گیاه کل پوره را با دی متیل سولفوکساید (۱۰٪) مخلوط کرده و ۶ غلظت (۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵ و ۳/۱۲ میلی گرم در میلی لیتر) تهیه شد. ۱۵۰ میکرولیتر از هر غلظت در هر چاهک ریخته شده، سپس پلیت‌ها در دمای ۳۲ درجه سانتی گراد برای مدت ۷۲-۴۸ ساعت انکوبه شدند. فعالیت ضدقارچی با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد (برحسب میلی متر) تعیین شد. دی متیل سولفوکساید

نتایج حاصل، بیشترین قطر هاله عدم رشد در روش انتشار چاهک در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر علیه NCPF 3153 *C. albicans*، *C. krusei*، *C. glabrata*، *C. albicans* ATCC 1677، *C.* ترتیب ۱۶، ۱۵/۳، ۱۳/۶ و ۳۱ میلی‌متر بود (جدول ۱).

نتایج تعیین حساسیت گونه‌های مختلف کاندیدا به عصاره متانولی گیاه کل پوره به روش انتشار دیسک:

نتایج نشان داد که عصاره‌های متانولی گیاه کل پوره، فعالیت ضد کاندیدیایی علیه گونه‌های کاندیدای مورد آزمون داشت. قطر هاله ممانعت از رشد در رقت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای فلوکونازول ۱۴ میلی‌متر بود. قطر هاله ممانعت از رشد ATCC 1677 *C. albicans* در رقت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای فلوکونازول ۷ میلی‌متر بود. *C. glabrata* و *C. krusei* نسبت به فلوکونازول مقاومت داشتند و هاله ممانعت از رشد مشاهده نشد. در اطراف دیسک حاوی دی متیل سولفوکساید هاله ممانعت از رشد ایجاد نشد. بر اساس آزمون آنالیز واریانس دوطرفه (2-way ANOVA) در آزمون انتشار دیسک در غلظت‌های ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵ و ۳/۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، اثر زمان بر قطر هاله ممانعت از رشد گونه‌های کاندیدای مورد آزمایش معنی‌دار بود ($P < 0.001$).

بر اساس نتایج حاصل، بیشترین قطر هاله عدم رشد در روش انتشار دیسک در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر علیه NCPF 3153 *C. albicans*، *C. albicans* ATCC 1677، *C. glabrata*، *C. krusei* به ترتیب ۱۳/۳، ۱۳/۳، ۱۰/۳، ۱۰/۶ میلی‌متر بود (جدول ۲).

مقایسه اثر ممانعتی عصاره متانولی گیاه کل پوره علیه گونه‌های کاندیدا مورد آزمایش به روش انتشار دیسک و چاهک:

آزمون آنالیز واریانس دوطرفه (2-way ANOVA) نشان داد که اثر نوع آزمون (چاهک و دیسک) ($P = 0.06$) در عصاره متانولی در مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت بر قطر هاله عدم رشد NCPF 3153 *C. albicans* معنی‌دار نبوده است اما اثر غلظت عصاره ($P < 0.001$) بر قطر هاله عدم رشد NCPF 3153 *C. albicans* معنی‌دار است.

دوم دور ریخته شد، بنابراین لوله یازدهم فاقد عصاره است. سپس ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون هر یک از کاندیداها به طور جداگانه به لوله‌ها اضافه شد. پس از تکان دادن لوله‌ها در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. کمترین رقتی از عصاره که در آن هیچ کدورتی مشاهده نشد به‌عنوان MIC در نظر گرفته شد. برای تعیین MFC، ۲۰ میکرولیتر از محتویات لوله‌های فاقد کدورت بر روی محیط کشت سابارو دکستروز آگار (SDA) کشت داده شدند و پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس کمترین رقتی از عصاره که قارچ در آن رشد نکرده بود به‌عنوان MFC در نظر گرفته شد. آزمایش برای هر مخمر سه بار تکرار شد (Nadimi et al 2013).

تجزیه و تحلیل آماری: تجزیه و تحلیل آماری با نرم‌افزار SPSS ۱۸ و با استفاده از آنالیز واریانس دوطرفه (ANOVA دوطرفه) انجام شد. قطر هاله عدم رشد برحسب میلی‌متر گزارش گردید و نتایج با سطح $P < 0.001$ و سطح احتمال ۵٪ تجزیه و تحلیل شد.

نتایج و بحث

نتایج تعیین حساسیت گونه‌های مختلف کاندیدا به عصاره متانولی گیاه کل پوره به روش انتشار چاهک: قطر هاله ممانعت از رشد در رقت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای فلوکونازول ۱۸ میلی‌متر بود، پس از ۷۲ ساعت NCPF 3153 *C. albicans* و *C. albicans* ATCC 1677 در اطراف چاهک‌های حاوی فلوکونازول رشد کردند. *C. glabrata* و *C. krusei* نسبت به فلوکونازول مقاومت داشتند و هاله ممانعت از رشد مشاهده نشد. همچنین در اطراف چاهک‌های حاوی دی متیل سولفوکساید هاله ممانعت از رشد ایجاد نشد.

آزمون آنالیز واریانس دوطرفه (2-way ANOVA) نشان داد که در غلظت‌های ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵ و ۳/۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، اثر زمان بر قطر هاله ممانعت از رشد کاندیداهای مورد آزمایش معنی‌دار است ($P < 0.001$). به‌طوری‌که قطر هاله ممانعت از رشد در مدت ۴۸ ساعت بیشتر از ۷۲ ساعت بود. بر اساس

جدول ۱- اثر ممانعتی عصاره متانولی گیاه کل پوره علیه گونه‌های کاندیدا به روش انتشار چاهک

Table 1. Inhibitory effect of methanolic extract of *Teucrium polium* against candida species by well diffusion

(Mean±Se) میانگین قطر هاله ممانعت از رشد برحسب میلی‌متر ± انحراف معیار

مخمر	زمان (ساعت)	<i>C. albicans</i> (NCPF 3153)		<i>C. albicans</i> (ATCC 1677)		<i>C. glabrata</i> (CBS 2175)		<i>C. krusei</i> (CBS 573)	
		۴۸	۷۲	۴۸	۷۲	۴۸	۷۲	۴۸	۷۲
عصاره متانولی (میلی گرم/میلی لیتر)	۱۰۰	۱۶ ± ۰	۱۳ ± ۰	۱۵/۳ ± ۰/۵۷	۱۲/۳ ± ۰/۵۷	۱۳/۶ ± ۰/۵۷	۱۰/۶ ± ۰/۵۷	۳۱ ± ۱/۰۰	۲۸ ± ۱/۰۰
	۵۰	۱۳/۶ ± ۰/۵۷	۱۰/۶ ± ۰/۵۷	۱۲/۳ ± ۰/۵۷	۱۰/۳ ± ۰/۵۷	۱۰/۶ ± ۰/۵۷	۸/۳ ± ۰/۵۷	۲۵ ± ۱/۰۰	۲۲ ± ۱/۰۰
	۲۵	۹/۶ ± ۱/۱۵	۹/۳ ± ۰/۵۷	۱۰/۳ ± ۰/۵۷	۸/۳ ± ۰/۵۷	۹/۳ ± ۱/۱۵	۷/۶ ± ۰/۵۷	۱۸/۶ ± ۰/۵۷	۱۵/۶ ± ۰/۵۷
	۱۲/۵	۸/۶ ± ۰/۵۷	۷/۳ ± ۰/۵۷	۹/۳ ± ۰/۵۷	۷/۳ ± ۰/۵۷	۹/۳ ± ۰/۵۷	۰	۱۲/۶ ± ۰/۵۷	۱۰/۳ ± ۰/۵۷
	۶/۲۵	۷/۶ ± ۰/۵۷	۶/۶ ± ۰/۵۷	۸/۶ ± ۰/۵۷	۶/۳ ± ۰/۵۷	۸/۳ ± ۰/۵۷	۰	۱۲/۶ ± ۰/۵۷	۹/۳ ± ۰/۵۷
	۳/۱۲۵	۶/۶ ± ۰/۵۷	۶ ± ۰	۷/۳ ± ۰/۵۷	۰	۷/۳ ± ۰/۵۷	۰	۸/۶ ± ۰/۵۷	۷/۳ ± ۰/۵۷

جدول ۲- اثر ممانعتی عصاره متانولی گیاه کل پوره علیه گونه‌های مختلف کاندیدا به روش انتشار دیسک

Table 2. Inhibitory effect of methanolic extract of *Teucrium polium* against candida species by disk diffusion

(Mean±Se) میانگین قطر هاله ممانعت از رشد برحسب میلی‌متر ± انحراف معیار

مخمر	زمان (ساعت)	<i>Candida albicans</i> (NCPF 3153)		<i>Candida albicans</i> (ATCC 1677)		<i>C. glabrata</i> (CBS 2175)		<i>C. krusei</i> (CBS 573)	
		۴۸	۷۲	۴۸	۷۲	۴۸	۷۲	۴۸	۷۲
عصاره متانولی (میلی گرم/میلی لیتر)	۱۰۰	۱۳/۳ ± ۱/۱۵	۱۰/۶ ± ۰/۵۷	۱۳/۳ ± ۱/۱۵	۱۰/۶ ± ۰/۵۷	۱۰/۳ ± ۰/۵۷	۸/۳ ± ۰/۵۷	۱۰/۶ ± ۱/۰۰	۸/۳ ± ۰/۵۷
	۵۰	۱۲/۳ ± ۰/۵۷	۹/۶ ± ۰/۵۷	۱۲ ± ۰/۵۷	۱۰ ± ۰	۹/۳ ± ۰/۵۷	۶/۳ ± ۰/۵۷	۹/۶ ± ۱/۰۰	۷/۳ ± ۰/۵۷
	۲۵	۱۰/۶ ± ۰/۵۷	۸/۶ ± ۰/۵۷	۱۱ ± ۰/۵۷	۸/۶ ± ۰/۵۷	۷/۶ ± ۰/۵۷	۰	۸/۳ ± ۰/۵۷	۶/۳ ± ۰/۵۷
	۱۲/۵	۹/۳ ± ۰/۵۷	۷/۶ ± ۰/۵۷	۹/۶ ± ۰/۵۷	۷/۶ ± ۰/۵۷	۶/۳ ± ۰/۵۷	۰	۷/۳ ± ۰/۵۷	۶ ± ۰
	۶/۲۵	۷/۶ ± ۰/۵۷	۶/۶ ± ۰/۵۷	۸/۰ ± ۰	۶/۳ ± ۰/۵۷	۰	۰	۶/۶ ± ۰/۵۷	۶ ± ۰
	۳/۱۲۵	۶/۳ ± ۰/۵۷	۶/۳ ± ۰/۵۷	۶/۳ ± ۰	۰	۰	۰	۶/۳ ± ۰/۵۷	۶ ± ۰

کاهش غلظت عصاره قطر هاله عدم رشد به طور معنی‌داری کاهش یافته است. بررسی نتایج در مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت نشان داد که اثر نوع آزمون (چاهک و دیسک) ($P < 0.001$) و همچنین اثر غلظت عصاره بر قطر هاله عدم رشد *C. krusei* CBS 573 معنی‌دار است و میانگین قطر هاله عدم رشد *Ca. krusei* CBS 573 در چاهک بیشتر از دیسک است، و با کاهش غلظت عصاره قطر هاله عدم رشد به طور معنی‌داری کاهش یافته است.

تعیین MIC و MFC به روش ماکرودیلوشن:

کمترین غلظت ممانعت‌کنندگی از رشد (MIC) عصاره متانولی گیاه کل پوره بر ایزوله‌های NCPF 3153 و ATCC 1677 *C. albicans* ۶/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و کمترین غلظت قارچ‌کشی

عصاره متانولی در مدت ۴۸ ساعت نشان داد که اثر نوع آزمون (چاهک و دیسک) ($P < 0.001$) و همچنین اثر غلظت عصاره بر قطر هاله عدم رشد *C. albicans* ATCC 1677 معنی‌دار بوده و در مدت ۷۲ ساعت اثر نوع آزمون (چاهک و دیسک) ($P = 0.1$) بر قطر هاله عدم رشد *C. albicans* ATCC 1677 معنی‌دار نبوده است اما اثر غلظت عصاره ($P < 0.001$) بر قطر هاله عدم رشد *C. albicans* ATCC 1677 معنی‌دار است. بر اساس نتایج، در مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت اثر نوع آزمون (چاهک و دیسک) ($P < 0.001$) و همچنین اثر غلظت عصاره بر قطر هاله عدم رشد CBS 2175 *C. glabrata* معنی‌دار است و میانگین قطر هاله عدم رشد *C. glabrata* CBS 2175 در چاهک بیشتر از دیسک است. با

۱/۵۶ میلی گرم بر میلی لیتر بود. کمترین غلظت ممانعت‌کنندگی از رشد فلوکونازول علیه NCPF 3153 و ATCC 1677 *C. albicans* به ترتیب ۳/۱۲ و ۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر و کمترین غلظت قارچ‌کشی آن علیه NCPF 3153 و ATCC 1677 *C. albicans* به ترتیب ۶/۲۵ و ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر بود (جدول ۳).

(MFC) علیه هر دو گونه *Candida albicans* مورد آزمایش ۱۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر بود. کمترین غلظت ممانعت‌کنندگی از رشد عصاره بر گونه *C. glabrata* CBS 2175، ۱۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر و کمترین غلظت قارچ‌کشی آن ۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر بود. کمترین غلظت ممانعت‌کنندگی از رشد و کمترین غلظت قارچ‌کشی عصاره بر گونه *C. krusei* CBS 573، به ترتیب ۰/۷۸ و

جدول ۳- میزان MIC و MFC عصاره متانولی گیاه کل پوره علیه گونه‌های مختلف کاندیدا مورد مطالعه (mg/ml)
Table3. MIC and MFC methanolic extract of *Teucrium polium* against candida species studied (mg/ml)

ایزوله مورد بررسی	عصاره متانولی کل پوره		فلوکونازول	
	کمترین غلظت ممانعت‌کنندگی (MIC)	کمترین غلظت قارچ‌کشی (MFC)	کمترین غلظت ممانعت‌کنندگی (MIC)	کمترین غلظت قارچ‌کشی (MFC)
<i>C. albicans</i> NCPF 3153	۶/۲۵	۱۲/۵	۳/۱۲	۶/۲۵
<i>C. albicans</i> ATCC 1677	۶/۲۵	۱۲/۵	۲۵	۵۰
<i>C. krusei</i> CBS 573	۰/۷۸	۱/۵۶	مقاوم	مقاوم
<i>C. glabrata</i> CBS 2175	۱۲/۵	۲۵	مقاوم	مقاوم

به‌عنوان تب بر و به‌منظور درمان اختلالات گوارشی استفاده می‌شود (Venditti, 2017). هدف از این تحقیق، ارزیابی اثر مهارى عصاره متانولی گیاه کل پوره بر رشد *C. albicans* NCPF 3153، *C. albicans* ATCC 1677، *C. glabrata* CBS 2175، *C. krusei* CBS 573 در شرایط آزمایشگاهی بود. بر اساس نتایج حاصل، عصاره متانولی ساقه و برگ گیاه کل پوره فعالیت ضد کاندیدایی علیه گونه‌های مختلف کاندیدای مورد بررسی در این تحقیق را نشان دادند. بیشترین قطر هاله ممانعت از رشد در عصاره متانولی گیاه در برابر *C. krusei* در رقت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر به ترتیب ۳۱ میلی متر بود از طرفی *C. glabrata* حساسیت کمتری نسبت به عصاره متانولی گیاه کل پوره نشان داد. به‌طوری‌که MIC برای *C. albicans* NCPF 3153، *C. albicans* ATCC 1677، *C. glabrata*، *C. krusei* به ترتیب ۶/۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵ و ۰/۷۸ میلی گرم بر میلی لیتر بود.

Rula و همکاران در سال ۲۰۱۱ فعالیت ضد کاندیدایی عصاره متانولی ۱۹ گیاه را علیه *C. albicans*، *C. glabrata* و *C. krusei* بررسی و *C. albicans* را حساس‌ترین و *C. glabrata* را

در سال‌های اخیر، مقاومت دارویی ناشی از مصرف آزول‌ها در درمان کاندیدیازیس موردتوجه قرار گرفته است. به‌طوری‌که گزارش‌هایی مبنی بر پیدایش ایزوله‌های مقاوم به آزول در بیماران که به مدت طولانی تحت درمان بوده‌اند وجود دارد؛ لذا بررسی فرآورده‌های طبیعی که دارای فعالیت ضدقارچی بر گونه‌های کاندیدا هستند، ضروری به نظر می‌رسد. همچنین فعالیت ضدقارچی منابع مختلف گیاهی مورد بررسی قرار گرفته است، این منابع به طور معمول با اثرات جانبی و هزینه کمتر، فعالیت ضدباکتریایی، ضدقارچی و ضدویروسی مؤثری را نشان می‌دهند (Marquez and Quave, 2020, Stević et al. 2014). مطالعات نشان می‌دهند که ترکیبات گیاهی در تهیه بسیاری از داروهای مدرن امروزی برای درمان عفونت‌های دستگاه گوارش، عفونت‌های ادراری، بیماری‌های قند و چربی خون و همچنین بیماری‌های پوستی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Ayaz et al. 2019, Hassan, 2017).

ازجمله گیاهان دارای خواص درمانی، گیاه مریم‌نخودی (کل پوره) است که در طب سنتی در مناطق غرب و جنوب ایران

عصاره‌های آبی و اتانولی گیاه کل پوره بر کاندیدا آلبيکنس و مالاسیزیا نشان داد که عصاره‌های مورد بررسی، بر گونه‌های مالاسیزیا اثر مهاری ندارند اما حداقل غلظت مهارکنندگی رشد علیه هر دو ایزوله NCPF 3153 و *C. albicans* ATCC 1677 برابر ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و حداقل غلظت قارچ‌کشی هر دو برابر ۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است (Nadimi et al. 2013). در مطالعه حاضر، حداقل غلظت مهارکنندگی رشد علیه هر دو ایزوله *C. albicans* ۶/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و حداقل غلظت قارچ‌کشی هر دو برابر ۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. در مطالعه بنیادپور نیز گیاه کل پوره علیه گونه‌های *C. albicans*، *C. glabrata* و *C. krusei* اثربخش بود، به طوری که در غلظت ۱۸۰ میکروگرم بر دیسک فطر هاله عدم رشد ۱۳ میلی‌متر گزارش شد (Bonyadpour et al. 2009). در مطالعه Alreshidi در سال ۲۰۲۰، MIC عصاره متانولی گیاه کل پوره علیه *C. albicans* ATCC 10231، و ایزوله بالینی *C. albicans* به ترتیب ۱۲/۵ و ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود، در این مطالعه علاوه بر اثر ضدکاندیدیایی اثر مهاری عصاره گیاه کل پوره بر *Aspergillus niger* و *Aspergillus fumigatus* گزارش شد (Alreshidi et al. 2020)؛ که با نتایج حاصل از مطالعه حاضر همخوانی دارد. علاوه بر مطالعات شرح داده شده، مطالعات Hassan El-Din (Hassan, Othman et al. 2017)، Saleh (Saleh et al. 2020) و Othman (Othman et al. 2017) فعالیت ضد قارچی گیاه کل پوره علیه قارچ‌های بیماری‌زای مختلف مانند آسپرژیلوس، کاندیدا، میکروسپوریوم و تریکوفیتون را نشان داده‌اند. امید است در آینده بتوان با بررسی مکانیسم اثر ضد قارچی گیاه کل پوره، بررسی فعالیت مهاری آن در مدل‌های حیوانی مبتلابه بیماری‌های ناشی از عفونت‌های قارچی، بررسی ترکیبات مؤثره موجود در گیاه و اثبات عدم سمیت ناشی از مصرف آن، از این گیاه جهت درمان عفونت‌های کاندیدیایی استفاده نمود.

بر اساس نتایج این تحقیق عصاره متانولی گیاه کل پوره دارای فعالیت ضد کاندیدیایی قابل ملاحظه‌ای است. در این مطالعه، اثر مهاری گیاه کل پوره بر رشد کاندیدا آلبيکنس، کاندیدا گلابراتا و کاندیدا کروزیی مشاهده شد.

مقاوم‌ترین گونه در برابر عصاره‌های مختلف گیاهی گزارش کردند. در این تحقیق علت تنوع در فعالیت عصاره‌ها تفاوت‌های ساختاری و شیمیایی آن‌ها، مکانیسم مواد فعال آن‌ها و یا به تفاوت در محل جداسازی آن‌ها گزارش شد (Darwish and Aburjai, 2011). Shahidi Bonjar در سال ۲۰۰۴ فعالیت ضد باکتریایی و ضد قارچی ۲۲۱ گونه از ۹۸ خانواده گیاهان دارویی را مورد بررسی قرار دادند. ۸۱ گیاه مورد بررسی فعالیت ضد باکتری و یا ضد قارچی در برابر یکی از میکروارگانیزم‌ها در ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نشان دادند اما گیاه کل پوره فعالیت را در برابر باکتری‌ها و قارچ‌های نشان نداد (Shahidi Bonjar et al. 2004). در مطالعه Khalil در سال ۲۰۰۹ فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های اتانولی گیاهان دارویی از جمله گیاه کل پوره بر *P. aeruginosa aureus* و *C. albicans* را بررسی نمود، در این بررسی گیاه کل پوره علیه *S. aureus* و *P. aeruginosa* فعالیت ضد میکروبی داشت ولی در برابر *C. albicans* فعالیت را نشان نداد (Khalil et al. 2009). در مطالعه Gulcin در سال ۲۰۰۳ اثر ضد میکروبی عصاره کلروفومی و استونی گیاه کل پوره در برابر یازده سویه باکتری و چهار سویه قارچ مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که هر دو عصاره در مهار رشد ارگانیزم‌ها به جز *E. coli* مؤثر هستند و فعالیت ضد باکتریایی قوی علیه *S. aureus* دارند. فعالیت ضد قارچی عصاره کلروفومی و استونی عصاره‌های این گیاه کمتر از فعالیت ضد باکتری آن‌ها بود (Gülçin et al. 2003). نتایج حاصل از مطالعات مذکور با مطالعه حاضر همخوانی ندارد. این اختلاف در نتایج می‌تواند به دلیل تفاوت در محل جمع‌آوری گیاه، زمان جمع‌آوری و واریته گیاه، تفاوت در روش‌های مورد بررسی شامل روش‌های عصاره‌گیری، تفاوت در کیفیت یا ترکیب گونه‌های گیاه و یا تفاوت در شرایط محیطی و تغییرات ژنتیکی باشد (Hashem, 2011). در سال ۲۰۱۰، Tarawneh عصاره متانولی چهار گیاه دارویی از جمله گیاه کل پوره را منبع بالقوه اقتصادی از ترکیبات ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدان طبیعی مانند پلی فنول‌ها، فلاونوئیدها معرفی کرد. در این مطالعه تفاوت‌ها در تأثیر بر میکروارگانیزم‌ها را به عواملی مانند آب‌وهوا، مرحله چرخه ترکیب خاک، اندام گیاه و سن رویشی گیاه وابسته توصیف شد (Tarawneh et al. 2010). بررسی

دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان کمال تشکر و قدردانی را دارند.

تشکر و قدردانی: مطالعه حاضر برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد میکروبیولوژی واحد فلاورجان، اصفهان با کد ۱۷۲۳۰۵۰۷۸۹۲۰۳۴ است. بدین وسیله نویسندگان از مسئولین

منابع

- Alreshidi M, Noumi E, Bouslama L, Ceylan O, Veettil VN, Adnan M, Danciu C, Elkahoui S, Badraoui R, Al-Motair KA. 2020.** Phytochemical screening, antibacterial, antifungal, antiviral, cytotoxic and anti-quorum-sensing properties of *Teucrium polium* L. aerial parts methanolic extract. *Plants* 9(11): 1418.
- Ayaz M, Ullah F, Sadiq A, Ullah F, Ovais M, Ahmed J, Devkota HP. 2019.** Synergistic interactions of phytochemicals with antimicrobial agents: Potential strategy to counteract drug resistance. *Chemico-biological interactions* 308: 294-303.
- Behmanesh B, Heshmati G, Mazandarani M, Rezaei M, Ahmadi A, Ghaemi E, Nosrat S B. 2007.** Chemical composition and antibacterial activity from essential oil of *Artemisia sieberi* Besser subsp. *Sieberi* in North of Iran. *Asian Journal of Plant Sciences* 6(3): 562-564.
- Berman J, Krysan DJ. 2020.** Drug resistance and tolerance in fungi. *Nature Reviews Microbiology* 18(6): 319-331.
- Bitew A, Abebaw Y. 2018.** *Vulvovaginal candidiasis*: species distribution of *Candida* and their antifungal susceptibility pattern. *BMC women's health* 18(94): 1-10.
- Bonyadpour B, Akbarzadeh M, Pakshir K, Mohagheghzadeh A. 2009.** In vitro susceptibility of fluconazole, clotrimazole and *Teucrium polium* smoke product on *Candida* isolates of vaginal candidiasis. *Armaghane danesh* 14(2): 87-96.
- Darwish RM, Aburjai TA. 2011.** Antimicrobial activity of some medicinal plants against different *Candida* species. *Jordan Journal of Pharmaceutical Sciences* 4(1): 70-9.
- Fadda ME, Podda G, Pisano MB, Deplano M, Cosentino S. 2008.** Prevalence of *Candida* species in different hospital wards and their susceptibility to antifungal agents: results of a three year survey. *Journal of preventive medicine and hygiene* 49(2): 69-74.
- Gavanji S, Larki B. 2017.** Comparative effect of propolis of honey bee and some herbal extracts on *Candida albicans*. *Chinese journal of integrative medicine* 23(3): 201-207.
- Gharaghani M, Ahmadi B, Taheripour Sisakht M, Ilami O, Aramesh S, Mouhamadi F, Barati Z, Roozmeh S, Mohammadi H, Nouripour-Sisakht S. 2018.** Identification of *Candida* species isolated from vulvovaginal candidiasis patients by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) in Yasuj southwestern Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology* 11(8): e65359.
- Gulcin I, Uguz M, Oktay M, Beydemir S, Kufrevioglu Ö. 2003.** Antioxidant and antimicrobial activities of *Teucrium polium* L. *Journal of Food Technology* 1(1): 9-16.
- Hashem, M. 2011.** Antifungal properties of crude extracts of five Egyptian medicinal plants against dermatophytes and emerging fungi. *Mycopathologia* 172(1): 37-46.
- Hassan SED. 2017.** Plant growth-promoting activities for bacterial and fungal endophytes isolated from medicinal plant of *Teucrium polium* L. *Journal of advanced research* 8(6): 687-695.
- Khalil A, Dababneh BF, AL-Gabbiesh AH. 2009.** Antimicrobial activity against pathogenic microorganisms by extracts from herbal Jordanian plants. *Journal of Food Agriculture and Environment* 7(2): 103-106.
- Kolaczowska A, Kolaczowski M. 2016.** Drug resistance mechanisms and their regulation in non-albicans *Candida* species. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 71(6): 1438-1450.
- Marquez L, Quave CL. 2020.** Prevalence and therapeutic challenges of fungal drug resistance: role for plants in drug discovery. *Antibiotics* 9(4): 150.
- Martins N, Barros L, Henriques M, Silva S, Ferreira IC. 2015.** Activity of phenolic compounds from plant origin against *Candida* species. *Industrial Crops and Products* 74: 648-670.
- Mergoni G, Percudani D, Lodi G, Bertani P, Manfredi M. 2018.** Prevalence of *Candida* species in endodontic infections: Systematic review and meta-analysis. *Journal of endodontics* 44(11): 1616-1625.e9.
- Nadimi M, Mohammadali Z, Madani M. 2013.** The effect of aqueous and ethanolic extracts of *Teucrium polium* on *Candida albicans* and two species of *Malassezia*. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences* 15(8): 34-38.
- Othman MB, SALah-Fatnassi K B H, Ncibi S, Elaissi A, Zourgui L. 2017.** Antimicrobial activity of essential oil and aqueous and ethanol extracts of *Teucrium polium* L. subsp. *gabesianum* (LH) from Tunisia. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 23(3): 723-729.
- Rouhi S, Ramazanzadeh R, Mohammadi S, Abodollahi A, Shakib P, Mohammadi B, Ahmadi A. 2020.** Antibacterial effects of *Artemisa aucheri* leaf and *Spirulina* Blue-Green

- algae aqueous and alcoholic extracts on the multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated from the patients with pneumonia. Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences 25(4): 124-139.
- Saleh I, Abd-Elgawad A, El Gendy A E-N, Abd El Aty A, Mohamed T, Kassem H, Aldosri F, Elshamy A, Hegazy M-E F. 2020.** Phytotoxic and antimicrobial activities of *Teucrium polium* and *Thymus decussatus* essential oils extracted using hydrodistillation and microwave-assisted techniques. Plants 9(6): 716.
- Seleem D, Pardi V, Murata R M. 2017.** Review of flavonoids: A diverse group of natural compounds with anti-*Candida albicans* activity in vitro. Archives of oral biology 76: 76-83.
- Shahidi Bonjar G, Aghighi S, Karimi Nik A. 2004.** Antibacterial and antifungal survey in plants used in indigenous herbal-medicine of south east regions of Iran. Journal of Biological Sciences 4(3): 405-412.
- Stević T, Berić T, Šavikin K, Soković M, Godevac D, Dimkić I, Stanković S. 2014.** Antifungal activity of selected essential oils against fungi isolated from medicinal plant. Industrial Crops and Products 55: 116-122.
- Tarawneh K, Irshaid F, Jaran A, Ezealarab M, Khleifat K. 2010.** Evaluation of antibacterial and antioxidant activities of methanolic extracts of some medicinal plants in northern part of Jordan. Journal of biological sciences 10(4): 325-332.
- Venditti A. 2017.** Secondary metabolites from *Teucrium polium* L. collected in Southern Iran. Arabian journal of medicinal and aromatic plants 3(2): 108-123.
- Wassel G, Ahmed S. 1974.** On the essential oil of *Teucrium polium* L. Die Pharmazie 29(1): 351-352.