

Evaluation of Anticandidal Effects of *Allium saralicum*

Faranak Bidad¹, Mahboobeh Madani^{1*}, Seyed Mohammad Masoumi²

¹Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

²Department of Biology, Razi University, Kermanshah, Iran.

*Corresponding Author:
Mahboobeh Madani,
Department of Microbiology,
Falavarjan Branch, Islamic
Azad University, Isfahan,
Iran.

Email:
mmadani66@gmail.com

Received: 22 Jun, 2016

Accepted: 21 Aug, 2016

Abstract

Background and Objectives: *Candida* species is one of the main fungal pathogens in immunodeficient, organ transplantation, and cancer patients. Resistance to antifungal therapy, is observed in *Candida* species, such as *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida tropicalis*. For this purpose, screening of the medicinal plants and investigation of their antifungal effect is necessary. This study was conducted with the aim of *in vitro* evaluation of inhibitory effect of *Allium saralicum* on *Candida* species.

Methods: In this descriptive-comparative study, *Allium saralicum* plant was collected from Shahoo mountain in Kermanshah, and extracted using soxhlet apparatus. Antifungal activity of methanol and petroleum ether extracts, were investigated against *C. albicans*, *C. glabrata* and *C. tropicalis*. Well diffusion method was used as a screening method, and minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC), were determined. Results were analyzed by nonparametric Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests.

Results: In this research, the highest inhibition zone of *Allium saralicum* extracts against all species, was observed in concentration of 250mg/ml, and inhibition zone diameter decreased with decrease in concentration. MIC and MFC results showed that *C. albicans* is more sensitive to the petroleum ether extract, while *C. tropicalis* growth was significantly inhibited by the methanol extract. The results of both extracts was equal for *C. glabrata*.

Conclusion: According to the results of this research, methanol and petroleum ether extracts of *Allium saralicum* have antifungal activity against *Candida* species. Therefore, this plant can be used as a natural antimicrobial source.

Keywords: *Candida*; *Allium saralicum*; Extract; Antifungal activity.

ارزیابی اثرات ضد کاندیدی گیاه آلیوم سارالیکوم

فرانک بیداد^۱، محبوبه مدنی^{۱*}، سید محمد معصومی^۲

چکیده

زمینه و هدف: گونه‌های کاندیدا، عوامل اصلی قارچی بیماری‌زا در بیماران نقص سیستم ایمنی، پیوند اعضا و سرطانی هستند. مقاومت به درمان‌های ضدقارچی در گونه‌های کاندیدا مانند کاندیدا آلیکنس، کاندیدا گلابراتا و کاندیدا تروپیکالیس مشاهده می‌شود. بدین منظور غربالگری گیاهان دارویی و بررسی اثر ضدقارچی آنها ضروری است. این تحقیق با هدف ارزیابی آزمایشگاهی اثر مهار آلیوم سارالیکوم بر گونه‌های کاندیدا انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی-مقایسه‌ای، گیاه آلیوم سارالیکوم از کوه شاهو در کرمانشاه، جمع‌آوری و به‌وسیله دستگاه سوکسله عصاره‌گیری شد. فعالیت ضدقارچی عصاره‌های متانولی و پترولیوم اتری بر علیه گونه‌های کاندیدا آلیکنس، کاندیدا گلابراتا و کاندیدا تروپیکالیس بررسی گردید. از روش انتشار چاهک به‌عنوان روش غربالگری استفاده شد و حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی تعیین گردید. نتایج با استفاده از آزمون ناپارامتری کراسکال والیس و من‌ویتنی آنالیز شدند.

یافته‌ها: در این تحقیق، بیشترین قطر هاله ممانعت از رشد عصاره‌های آلیوم سارالیکوم بر همه گونه‌ها، در غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده گردید و با کاهش غلظت، قطر هاله ممانعت از رشد کاهش یافت. نتایج MIC و MFC نشان داد کاندیدا آلیکنس بیشتر به عصاره پترولیوم اتری حساس است؛ درحالی‌که رشد کاندیدا تروپیکالیس به‌طور چشمگیری با عصاره متانولی مهار شد. نتایج هر دو عصاره برای کاندیدا گلابراتا یکسان بود.

نتیجه‌گیری: براساس نتایج این تحقیق، عصاره‌های متانولی و پترولیوم اتری آلیوم سارالیکوم، دارای اثرات ضد کاندیدیایی بوده و این گیاه قابلیت استفاده به‌عنوان منبع طبیعی ضد میکروبی را دارد.

کلید واژه‌ها: کاندیدا؛ آلیوم سارالیکوم؛ عصاره؛ فعالیت ضدقارچی.

^۱گروه میکروبی‌شناسی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

^۲گروه علوم زیستی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات:

محبوبه مدنی، گروه میکروبی‌شناسی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:

mmadani66@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۵/۴/۱

تاریخ پذیرش: ۹۵/۵/۳۰

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Bidad F, Madani M, Masoumi SM. Evaluation of anticandidal effects of *Allium saralicum*.

Qom Univ Med Sci J 2017;11(6):10-26. [Full Text in Persian]

مقدمه

کاندیدا/آلبیکنس، مهم‌ترین و معمول‌ترین ساکن دستگاه تناسلی، دهان و لوله گوارش انسان است. سایر گونه‌های کاندیدا، گاهی جزئی از فلور طبیعی جلد و مخاط محسوب می‌شوند که در مجموع، قدرت بیماری‌زایی محدودتری داشته و از طریق منابع خارجی به بدن راه می‌یابند. گونه‌های کاندیدا، عامل طیف وسیعی از بیماری‌ها از جمله عفونت‌های جلدی، جلدی - مخاطی، واژینیت، بالانیت، عفونت‌های گوارشی، تنفسی، همچنین عفونت‌های سیستمیک (مسبب آسیب‌پذیری بیماران بستری در بخش مراقبت‌های ویژه، بیماران تحت شیمی‌درمانی یا گیرندگان داروهای سرکوب‌کننده سیستم ایمنی و بیماران دارای نقص سیستم ایمنی) می‌باشند. در صورت تغییر شرایط میزبان مانند مصرف آنتی‌بیوتیک، دیابت، سن، استفاده از قرص‌های ضدبارداری، مصرف سیگار، استفاده از دندان مصنوعی، داروهای تضعیف‌کننده سیستم ایمنی و شیمی‌درمانی؛ کاندیدا بیماری‌زا می‌شود. در ایالات متحده آمریکا، کاندیدا به‌عنوان چهارمین علت شایع عفونت‌های بیمارستانی گزارش شده و علت ۹۰٪ از مرگ‌ومیرها می‌باشد. در واقع، ۹۰٪ از عفونت‌های تهاجمی قارچی توسط گونه‌های بیماری‌زا کاندیدا ایجاد می‌شود (۵-۱). استفاده از داروهای ضدقارچی جهت پیشگیری و درمان، سبب پیدایش گونه‌های مقاوم به دارو شده است. افزایش گزارشهای متعدد شکست در درمان با داروهای ضدقارچی رایج باعث تشویق محققان جهت یافتن داروهای جدید، همچنین بررسی اثر ترکیب داروهای مختلف برای دستیابی به نتایج بهتر شده است. امروزه، موارد مقاومت گونه‌های مختلف کاندیدا به ترکیبات دارویی آزولی و عدم موفقیت در درمان، در حال افزایش است. لذا تحقیق جهت یافتن ترکیبات دارویی جدید، مؤثر و کم‌ضرر برای انسان، ضروری به‌نظر می‌رسد. تمایل مردم جهان به استفاده از داروهای با منشأ طبیعی، همچنین تأکید سازمان بهداشت جهانی به جایگزینی تدریجی مواد طبیعی با مواد شیمیایی، موجب شده تا در کشورهای پیشرفته، سرمایه‌گذاری و تولید انبوه گیاهان دارویی در سطوح صنعتی صورت گیرد (۶، ۷). یکی از گیاهان دارویی ارزشمند گونه‌های مختلف، جنس آلیوم است که در ارتفاعات غرب و جنوب غرب ایران، معمولاً در فصل بهار به‌صورت

خودرو می‌روید. تقریباً تمامی گونه‌های جنس آلیوم دارای پیاز خوراکی بوده که در این بین، پیاز و سیر از بقیه شناخته‌شده‌تر هستند. تعدادی از پیازهای وحشی جنس آلیوم، نام‌های محلی مشابه از نظر اهالی استان کرمانشاه دارند. سورانه نام محلی آلیوم سارالیکوم است. براساس منابع علمی جدید و بررسی سایت مربوط به باغ گیاه‌شناسی کیو (سال ۲۰۱۰)، این گیاه با نام علمی *Allium saralicum* توسط Reinhard M. Fritsch نامگذاری شده است. خواص دارویی این گیاه شامل درمان بیماری‌های گوارشی، درمان و کاهش دردهای رماتیسمی، سرماخوردگی، دفع سنگ کلیه، درمان قاعدگی دردناک و ترشحات غیرطبیعی واژن، تسکین درد و مشکلات پس از زایمان است. گزارشهای متعددی از آنالیز اسانس و بررسی اثرات ضد میکروبی سایر گونه‌های آلیوم مانند سیر و پیاز خوراکی وجود دارد (۸، ۹). باتوجه به ارزش دارویی گیاهان متعلق به جنس آلیوم و استفاده سنتی از گیاه آلیوم سارالیکوم در درمان عفونت‌ها، در این تحقیق اثرات ضد کاندیدی آلیوم سارالیکوم بررسی شد تا به‌طور علمی اثر دارویی گیاه ثابت شود.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی - مقایسه‌ای، ابتدا گیاه آلیوم سارالیکوم در بهار سال ۱۳۹۳ از کوهستان "شاهو" (بلندترین قله استان کرمانشاه در غرب ایران و از کوه‌های زاگرس) جمع‌آوری شد. نظر به اینکه گیاه مذکور با چند گونه دیگر در ایران دارای نام مشابه در کتب گیاه‌شناسی موجود می‌باشد، لذا جهت شناسایی و نامگذاری به کشور آلمان فرستاده شد و توسط Reinhard M. Fritsch، شناسایی و نامگذاری شد. این گیاه در سایت GBFI با شماره شناسایی ۵۸۲۶۹۸۴ ثبت شده است. به‌منظور حذف گل و لای، گیاه را به آرامی شسته و تمامی قسمت‌ها (شامل گل، برگ، ساقه و پیاز) به‌صورت جداگانه در دمای اتاق در سایه قرار گرفت تا خشک شود. سپس به‌وسیله آسیاب برقی، پودر شد تا عمل عصاره‌گیری و نفوذ حلال به داخل گیاه راحت‌تر صورت گیرد. لازم به ذکر است تمام قسمت‌های گیاه به نسبت مساوی با یکدیگر مخلوط و آسیاب شدند. به‌منظور عصاره‌گیری، ۵۰ گرم از مخلوط پودر تهیه‌شده از گیاه را در کاغذ صافی نرم و تمیز پیچیده، سپس با ۲۵۰ میلی‌لیتر متانول، عصاره‌گیری به روش

سوکسله انجام شد. مراحل به همین ترتیب برای عصاره پترولیوم اتر نیز صورت گرفت. عصاره‌ها تا زمان استفاده و انجام آزمایشها در ظروف دربسته، در یخچال و در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند (۱۰). نمونه‌های استاندارد *کاندیدا آلیکنس* (ATCC 1677)، *کاندیدا گلابراتا* (CBS 2175) و *کاندیدا تروپیکالیس* (CBS 94) از دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهیه و به آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه فلاورجان انتقال یافتند.

از نمونه‌های *کاندیدا آلیکنس* (ATC 1677)، *کاندیدا گلابراتا* (CBS 2175) و *کاندیدا تروپیکالیس* (CBS 94) استاندارد برای انجام تست‌های تعیین حساسیت به انواع عصاره‌ها استفاده شد. در شرایط استریل هریک از قارچ‌ها را بر روی محیط کشت سابورو دکستروز آگار (شارلو، اسپانیا)، کشت داده، سپس در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. از نمونه‌های قارچی به‌طور جداگانه، سوسپانسیون معادل ۰/۵ مک‌فارلند، تهیه گردید (۱۱).

برای تهیه محلول عصاره متانولی و پترولیوم اتر، ابتدا ۱ میلی‌لیتر از محلول دی متیل سولفو کساید به ۹ میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه شد. بدین ترتیب رقت ۱۰٪ دی متیل سولفو کساید به دست آمد. به‌منظور تهیه عصاره گیاه با غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نیز ۱ گرم از هر عصاره به‌طور جداگانه در ۴ میلی‌لیتر از دی متیل سولفو کساید ۱۰٪ حل شد. برای هر عصاره، ۶ لوله در نظر گرفته شد و در آنها از محلول دی متیل سولفو کساید ۱۰٪ به میزان ۲ میلی‌لیتر ریخته شد. ۲ میلی‌لیتر از لوله دارای غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به لوله دوم انتقال یافت و بعد از مخلوط کردن، ۲ میلی‌لیتر از محلول لوله دوم به لوله سوم وارد شد و از لوله سوم به لوله چهارم، سپس به لوله پنجم و از لوله پنجم به لوله ششم انتقال داده شد. از لوله ششم، ۲ میلی‌لیتر محلول دور ریخته شد. بدین ترتیب سری رقت‌های به‌دست‌آمده برای هر عصاره ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۵ و ۷/۸۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود (۱۲، ۱۳). جهت مقایسه اثر عصاره‌های مختلف و تأثیر ضدقارچی آنها به همراه استانداردسازی روش‌های مختلف تست‌های تعیین حساسیت قارچ، اثر آنها با فلوکونازول (Pfizer co. Belgium) مقایسه گردید.

از پودر فلوکونازول، محلولی در دی متیل سولفو کساید تهیه شد و غلظت‌های ۲۵۰، ۱۲۵، ۶۲/۵، ۳۱/۵، ۱۵/۷۵ و ۷/۸۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. محلول فوق ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه نگهداری شد، سپس برای انجام آزمایشها به‌عنوان نمونه شاهد مورد استفاده قرار گرفت (۱۴). جهت انجام این تست برای مخمرهای *کاندیدا*، از محیط کشت سابورو دکستروز آگار استفاده گردید. به فاصله ۲ سانتی‌متری از یکدیگر و لبه پلیت، با استفاده از پیت پاستور چاهک‌هایی به قطر ۵ میلی‌متر در محیط کشت ایجاد شد. در یکی از چاهک‌ها، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر و در دیگری، مقدار ۱۵۰ میکرولیتر از هریک از غلظت‌های عصاره اضافه شد. پس از جذب عصاره‌ها در محیط کشت، میزان ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه‌شده از هریک از گونه‌های *کاندیدا* (۰/۵ مک‌فارلند) بر روی محیط کشت، به‌صورت یکنواخت کشت چمنی داده شدند و محیط‌های کشت به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۲۷-۲۵ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. سپس وجود یا عدم وجود هاله ممانعت از رشد در اطراف چاهک‌ها بررسی گردید. از محلول حاوی فلوکونازول به‌عنوان شاهد مثبت و از دی متیل سولفو کساید به‌عنوان شاهد منفی استفاده شد. این آزمایشها برای هر عصاره و هر میکروارگانیزم، ۳ بار تکرار گردید. برای تعیین MIC انواع عصاره‌ها، از روش ماکرودیالوژن استفاده شد. مراحل انجام کار بدین ترتیب بود که برای هر عصاره و هر قارچ ذکرشده در تحقیق، به‌طور مستقل ۱۱ لوله استریل حاوی ۲ میلی‌لیتر محیط کشت سابورو دکستروز برات (شارلو، اسپانیا) تهیه شد. قبل از انجام آزمایش، نمونه سوسپانسیون هریک از قارچ‌ها، معادل ۰/۵ مک‌فارلند تهیه گردید (دقیقاً قبل از مصرف تهیه شد تا از رشد و تقسیم در دمای آزمایشگاه جلوگیری شود). ۲ میلی‌لیتر از محلول عصاره در لوله شماره ۱ ریخته شد و بعد از میکس کردن، ۲ میلی‌لیتر از لوله شماره ۱ برداشته و در لوله شماره ۲ ریخته شد و مراحل کار به‌همین منوال تا لوله دهم ادامه داشت. در ادامه، ۲ میلی‌لیتر از لوله دهم دور ریخته شد. در لوله یازدهم عصاره‌ای وارد نشد و به‌عنوان لوله شاهد رشد در نظر گرفته شد. از سوسپانسیون قارچی تهیه‌شده، ۲۰ میکرولیتر به تمام لوله‌ها اضافه گردید. پس از تکان دادن لوله‌ها و قرار دادن آنها به مدت ۲۷ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد در انکوباتور، کدورت

قارچ‌های کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا گلابراتا و کاندیدا تروپیکالیس) تعقیبی من‌ویتی با تعدیل بونفرونی (جهت مقایسه دوه‌دو میان غلظت‌ها در هر قارچ) استفاده گردید.

یافته‌ها

براساس نتایج به‌دست آمده از آزمون کراسکال والیس؛ در هر سه مخمر کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا گلابراتا و کاندیدا تروپیکالیس، اختلاف معنی‌داری بین قطر هاله عدم رشد در غلظت‌های مختلف عصاره متانولی مشاهده گردید ($p < 0/1$). براساس نتایج به‌دست آمده از آزمون تعقیبی من‌ویتی با تعدیل بونفرونی نیز در مقایسه‌های دوتایی بین غلظت‌ها، قطر هاله عدم رشد در غلظت بیشتر، به‌طور معنی‌داری بزرگتر بود (جدول شماره ۱).

حاصل از رشد میکروارگانیزم‌ها با لوله شاهد، مقایسه و ثبت گردید. تمامی مراحل ذکرشده برای هر عصاره و هر میکروارگانیزم، ۳ مرتبه تکرار شد. برای تعیین MFC، از اولین لوله‌ای که کدورت در آن مشاهده شده بود و ۳ لوله قبل از آن، میزان ۲۰ میکرولیتر برداشته و بر روی محیط کشت سابورو دکستروز آگار کشت داده شد، پس از انکوبه کردن در دمای ۲۵-۲۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت، نتیجه بررسی شد. آزمایش برای محلول فلوکونازول، به‌عنوان شاهد مثبت و دی‌متیل سولفوکساید ۱۰٪ به‌عنوان شاهد منفی نیز انجام شد. آزمایشها در شرایط دقیقاً یکسان صورت گرفت تا نتایج مقایسه گردد (۱۷-۱۴). در این مطالعه از آزمون کراسکال والیس (به‌منظور مقایسه مقادیر قطر هاله عدم رشد در غلظت‌های مختلف عصاره‌های متانولی و پترولیوم اتری آلیوم سارالیوم بر علیه

جدول شماره ۱: قطر هاله عدم رشد غلظت‌های مختلف عصاره متانولی گیاه آلیوم سارالیوم بر علیه کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا گلابراتا و کاندیدا تروپیکالیس

غلظت (میلی گرم بر میلی لیتر)	میانگین \pm انحراف معیار	میانگین \pm انحراف معیار	میانگین \pm انحراف معیار	قارچ
۲۵۰	۱۷/۰ \pm ۱/۰	۱۰/۰ \pm ۰/۰	۵/۰ \pm ۰/۰	کاندیدا آلبیکنس
۱۲۵	۱۵/۳ \pm ۰/۵	۱۳/۰ \pm ۰/۰	۹/۰ \pm ۰/۰	کاندیدا گلابراتا
۶۲/۵	۱۴/۰ \pm ۱/۵	۱۰/۰ \pm ۰/۰	۰/۰ \pm ۰/۰	کاندیدا تروپیکالیس

قطر هاله ممانعت از رشد فلوکونازول در غلظت ۶۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر برای گونه‌های کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا گلابراتا و کاندیدا تروپیکالیس به ترتیب برابر ۱۵، ۱۰ و ۱۲ میلی متر و در غلظت ۲۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر برابر ۲۵، ۱۴ و ۱۸ میلی متر بود. هاله ممانعت از رشد برای هیچ‌یک از گونه‌های کاندیدا به‌وسیله دی‌متیل سولفوکساید ایجاد نشد.

براساس نتایج به‌دست آمده از آزمون کراسکال والیس؛ در هر سه مخمر کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا گلابراتا و کاندیدا تروپیکالیس، اختلاف معنی‌داری بین قطر هاله عدم رشد در غلظت‌های مختلف عصاره پترولیوم اتر مشاهده شد ($p < 0/1$). براساس نتایج به‌دست آمده از آزمون تعقیبی من‌ویتی با تعدیل بونفرونی نیز در مقایسه‌های دوتایی مابین غلظت‌ها، قطر هاله عدم رشد مربوط به عصاره پترولیوم اتری بر علیه گونه‌های کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا گلابراتا و کاندیدا تروپیکالیس در غلظت بیشتر، به‌طور معنی‌داری بزرگتر بود (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۲: قطر هاله عدم رشد غلظت‌های مختلف عصاره پترولیوم اتر گیاه آلیوم سارالیوم بر علیه کاندیدا آلبیکنس، کاندیدا گلابراتا و کاندیدا تروپیکالیس

غلظت (میلی گرم بر میلی لیتر)	میانگین \pm انحراف معیار	میانگین \pm انحراف معیار	میانگین \pm انحراف معیار	میانگین \pm انحراف معیار	قارچ
۲۵۰	۲۰/۰ \pm ۰/۰	۱۶/۰ \pm ۱/۰	۱۲/۳ \pm ۱/۵	۶/۶ \pm ۵/۰	کاندیدا آلبیکنس
۱۲۵	۱۷/۳ \pm ۲/۰	۱۱/۳ \pm ۲/۳	۰/۰ \pm ۰/۰	۰/۰ \pm ۰/۰	کاندیدا گلابراتا
۶۲/۵	۱۶/۳ \pm ۱/۵	۱۱/۰ \pm ۱/۷	۶/۶ \pm ۲/۰	۰/۰ \pm ۰/۰	کاندیدا تروپیکالیس

۱۰ میلی متر گزارش شد. نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر و مطالعه Tosun و همکاران، خواص ضد میکروبی گیاهان متعلق به جنس آلیوم را تأیید می کند و از مقایسه مقادیر قطر هاله عدم رشد، به نظر می رسد اثر مهار آلیوم سارالیکوم در مقایسه با آلیوم روتاندوم قوی تر بوده است (۱۰). در اکثر تحقیقات انجام شده، رابطه مستقیم بین افزایش غلظت عصاره یا اسانس استخراج شده با اثر مهارکنندگی بر روی رشد میکروارگانیسم ها وجود دارد و در اندک مواردی نیز با کاهش غلظت، نتایج مطلوب تری حاصل شده است. در تحقیق حاضر با افزایش غلظت عصاره ها، نتایج بهتری کسب شد. ارزیابی اثرات ضد میکروبی گیاه آلیوم آتروویولاسئوم توسط دهپور و همکاران نشان داد عصاره متانولی حاصل از گیاه آلیوم آتروویولاسئوم دارای اثرات متوسط مهارتی، در حدود ۱۶ میلی متر قطر هاله عدم رشد می باشد (۱۹). Bagiu و همکاران، اثرات ضدقارچی ترکیبات شیمیایی گیاه آلیوم یورسینوم را با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)، بررسی و آلیسین موجود در گیاه سیر را شناسایی کردند. ترکیبات دی آلیل دی سولفات و دی آلیل تری سولفات با استفاده از روش GC-MS شناسایی شدند. ترکیبات سولفور از سنتز RNA، DNA، پروتئین و پلی ساکاریدها در قارچ ها و باکتری ها جلوگیری می کند. ترکیبات شناسایی شده در این تحقیق که اثرات ضدقارچی گیاه به آن نسبت داده شده است، در اکثر تحقیقات انجام شده در گیاهان جنس آلیوم نیز یافت شده و به نظر می رسد تأثیر مهارتی عصاره های گیاه آلیوم سارالیکوم مورد استفاده در این تحقیق نیز به دلیل وجود ترکیبات ضد کاندیدی موجود در خانواده آلیوم بوده است (۲۰). Avato و همکاران نشان دادند ترکیبات تشکیل دهنده اسانس سیر شامل: دی آلیل دی سولفید (۱۵٪) و دی آلیل تری سولفید (۳۸٪) بوده و تأثیرات ضدباکتری آن، کمتر از ضدقارچی است. تحقیقات آنها مشخص کرد ماده مؤثر ضد میکروبی همان دی آلیل دی سولفید است (۲۱). Motesi و همکاران با بررسی اثر آلیوم سنیوم بر ضد کاندیدا آلیکنس، نشان دادند این گیاه دارای اثرات ضد کاندیدی می باشد. در مطالعه دیگری، عصاره گیری با استفاده از روش حمام اولتراسوند انجام گرفت و عصاره های آبی، اتانولی، اتیل استات و هگزان استخراج شدند (۲۲).

برای تعیین MIC و MFC مربوط به هر یک از عصاره های متانولی و پترولیوم اتری گیاه آلیوم سارالیکوم؛ اولین رقت لوله ای که بعد از گذشت ۲۴ ساعت کدورت در آن مشاهده گردید به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و یک لوله قبل از آن، به عنوان MFC در نظر گرفته شد. کشت این نمونه بر محیط کشت SDA منفی بود. نتایج به دست آمده از روش ماکرو دایلوژن در جدول شماره ۳ ارائه شده است.

نتایج MIC و MFC فلوکونازول برای کاندیدا آلیکنس، کاندیدا تروپیکالیس؛ ۱۵/۷۵ و ۳۱/۲۵ و برای کاندیدا گلابراتا؛ ۳۱/۲۵ و ۶۲/۵ بود.

جدول شماره ۳: میانگین مقادیر MIC و MFC

فارج	عصاره	MFC	MIC
کاندیدا آلیکنس	متانولی	۱۲۵	۶۲/۵
	پترولیوم	۶۲/۵	۳۱/۲۵
کاندیدا گلابراتا	متانولی	۱۲۵	۶۲/۵
	پترولیوم	۱۲۵	۶۲/۵
کاندیدا تروپیکالیس	متانولی	۶۲/۵	۳۱/۲۵
	پترولیوم	۱۲۵	۶۲/۵

بحث

نیاکان ما پایه گذاران اصلی شاخه های مهمی از علوم، به ویژه علم پزشکی و آموزش آن در دنیا بوده و سرزمین ایران، سهمی گران در میراث فرهنگی و علمی جهان دارد. طب سنتی ایرانی، یکی از شاخص ترین منابع پزشکی سنتی جهان است و این موضوع را می توان از گستردگی کتب و قدمت بالای منابع طب سنتی ایران استنباط کرد. نگرش طب سنتی ایران به علم طب و درمان بیماری ها؛ در درجه اول نگرش پیشگیرانه، سپس درمانی است (۱۸). در این تحقیق، عصاره های متانولی و پترولیوم اتری گیاه آلیوم سارالیکوم؛ فعالیت ضد کاندیدی علیه کاندیدا آلیکنس (ATCC 1677)، کاندیدا گلابراتا (CBS 2175) و کاندیدا تروپیکالیس (CBS 94) را نشان داد. Tosun و همکاران با بررسی اثر ضد کاندیدی آلیوم روتاندوم نشان دادند قطر هاله عدم رشد در روش انتشار در دیسک بر علیه کاندیدا آلیکنس (ATCC 10231) برای عصاره متانولی گیاه آلیوم روتاندوم، ۱۵ میلی متر بوده است. قطر هاله عدم رشد در مورد کاندیدا گلابراتا (ATCC 6258)، ۱۵ میلی متر و در مورد کاندیدا کروزه ای،

Sangetha و همکاران با استفاده از میکروسکوپ الکترونی TEM و SEM، اثرات عصاره کاسیا استیکتایلیس را بر بیوفیلم کاندیدا آلیکنس نشان دادند. در این تحقیق به وضوح اثر عصاره و میزان تخریب بیوفیلم کاندیدا آلیکنس پس از تأثیر عصاره گیاه بر بیوفیلم دیده شد (۲۳). Furletti و همکاران با بررسی اثر مهاری اسانس دو گیاه آلایوم توبروزوم، کوریاندروم ستیوم بر کاندیدا آلیکنس (CBS 562) و کاندیدا تروپیکالیس (CBS 94)، نشان دادند هر دو گیاه دارای اثرات مهاری بر رشد بوده، ولی گیاه آلایوم توبروزوم، فعالیت ضدقارچی قوی‌تری را نشان داد. همچنین اسانس گیاه کوریاندروم ستیوم بر علیه بیوفیلم کاندیدا دارای فعالیت مهاری بود. ایجاد تغییرات در دیواره قارچ و اندامک‌های داخلی در اثر اسانس نیز نشان‌دهنده تأثیر ضد میکروبی این گیاه بود و وجود ترکیبات ضد میکروبی در گیاه را تأیید کرد (۲۴). تحقیق انجام شده توسط رزاق پرست و همکاران نشان داد عصاره آبی سیر بر علیه کاندیدا آلیکنس، کاندیدا دابلینینسیس، کریپتوکوکوس ثوفورمنس و ملاسزیا فورفور (MIC برابر ۶۴-۰/۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) دارای اثر مهاری است (۲۵). در مطالعه حاضر عصاره‌های گیاه آلایوم سارالیکوم دارای اثر مهاری علیه گونه‌های کاندیدا آلیکنس، کاندیدا گلابراتا و کاندیدا تروپیکالیس بودند، همچنین کاندیدا تروپیکالیس به عصاره متانولی گیاه و کاندیدا آلیکنس به عصاره پترولیوم اثر حساس تر بودند. Lemar و همکاران با بررسی عوامل ضد کاندیدیایی عصاره سیر تازه با استفاده از روش Multiwall Plate Reader، تأثیر گیاه سیر و از دست رفتن ساختار قارچی و خروج اندامک‌های حیاتی مخمر را نشان دادند که در نهایت، موجب مرگ سلول قارچی شد (۲۶). امیری با بررسی عصاره‌های آبی، اتانولی، اتری و متانولی گیاه آلایوم جسدیانوم، نشان داد عصاره اتانولی گیاه از اسانس و سایر عصاره‌های آبی و متانولی، اثرات ضد میکروبی قوی‌تری دارد (۹). عصاره گیاه آلایوم سارالیکوم مورد استفاده در این تحقیق دارای اثرات ضد قارچی برای گونه‌های کاندیدا آلیکنس، کاندیدا گلابراتا و کاندیدا تروپیکالیس بود. احتمالاً استفاده از اسانس گیاه آلایوم سارالیکوم به جای عصاره، نتایج متفاوتی خواهد داشت که نیاز به بررسی دارد.

جعفری ندوشن و همکاران، تأثیر مهاری عصاره آبی سیر را بر گونه‌های کاندیدا تروپیکالیس، کاندیدا گلابراتا و کاندیدا آلیکنس بررسی کردند که نتایج نشان داد کاندیدا تروپیکالیس، حساس‌ترین گونه می‌باشد. در این تحقیق مشخص گردید کاندیدا گلابراتا و کاندیدا آلیکنس در مقایسه با کاندیدا تروپیکالیس، حساسیت کمتری به عصاره سیر دارند (۶). در تحقیق حاضر کاندیدا تروپیکالیس به عصاره متانولی گیاه و کاندیدا آلیکنس به عصاره پترولیوم اثر حساس تر بودند و تأثیر فلوکونازول بر گونه‌های کاندیدا، بیش از عصاره‌های مورد بررسی بود.

Ankri و Mirelman با بررسی اثر مهاری آلایسن موجود در سیر تازه با استفاده از روش ماکرودایلوژن بر گونه‌های کاندیدا آلیکنس، کاندیدا تروپیکالیس، کاندیدا گلابراتا، کاندیدا کروزه‌ای به این نتیجه دست یافتند که آلایسن ترکیب اصلی مسئول برای جلوگیری از مهار رشد قارچ‌ها می‌باشد. همچنین از تولید مایکوتوکسین، آفلاتوکسین در اسپرژیلوس پاراسیتیکوس، ممانعت به عمل می‌آورد. براساس نتایج MIC (۰/۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، تأثیر ترکیبات ضدقارچی استخراج شده از گیاهان دارویی بیشتر از عصاره گیاهی بود. نتایج MIC مربوط به تأثیر آلایسن بر نمونه‌های کاندیدا آلیکنس جدا شده از بیمار نیز بهتر از عصاره بود (۲۷). این در حالی است که در تحقیق رزاق پرست و همکاران، هنگامی که از عصاره سیر تازه استفاده شده بود، حداقل غلظت مهارکنندگی در محدوده ۳-۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود که نشان‌دهنده تأثیر بهتر گیاه تازه می‌باشد (۲۵). مدنی و همکاران با بررسی فعالیت عصاره و شیرابه تغلیظ شده گیاه آلایوم جسدیانوم، نشان دادند شیرابه (عصاره گیاه تازه)، دم کرده و عصاره آبی این گیاه دارای اثر مهاری بر رشد کاندیدا آلیکنس می‌باشد (۲۸). شیرانی و همکاران نیز تأثیر اسانس آلایوم جسدیانوم را بر کاندیدا کروزه‌ای نشان دادند (۲۹). نتایج تحقیق حاضر، تأثیر عصاره‌های متانولی و پترولیوم اتری گیاه آلایوم سارالیکوم را علیه کاندیدا آلیکنس، کاندیدا گلابراتا و کاندیدا تروپیکالیس برای اولین بار نشان داد. بررسی عصاره‌های متانولی و پترولیوم اتری گیاه آلایوم سارالیکوم بر نمونه‌های بالینی کاندیدیازیس در شرایط *in vivo* امکان استفاده از این گیاه را جهت درمان نشان خواهد داد.

نتیجه گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان داد گیاه آلیوم سارالیکوم که در تحقیقات پیشین اثرات ضدباکتریایی یا ضدقارچی آن مورد توجه نبوده، دارای اثرات ضدقارچی می باشد. ارزیابی ها نشان دادند عصاره های متانولی و پترولیوم اتری گیاه دارای اثرات ضدقارچی می باشد. لذا به نظر می رسد با توجه به مشکلات پیش روی جامعه پزشکی در درمان و کنترل عفونت ها، توجه و بررسی بیشتر بر روی این منابع ارزشمند، کم ضرر، ارزان و در دسترس حایز اهمیت است.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از پروفسور فریتش برای شناسایی گیاه، مسئولین هرباریوم دانشگاه رازی کرمانشاه، همچنین مسئولین دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان و تمامی عزیزان که در انجام این تحقیق ما را همراهی نمودند، سپاسگزاری می نمایم.

References:

- Kinghorn GR. Vulvovaginal candidosis. *J Antimicrob Chemother* 1991;28 Suppl A:59-66.
- McCormack WM Jr, Zinner SH, McCormack WM. The incidence of genitourinary infections in a cohort of healthy women. *Sex Transm Dis* 1994;21(2):63-4.
- Khosravi A. Fungal disease and immune response. Tehran: Tehran University Pub; 2004. [Text in Persian]
- Samsam Shariyat H. Fraction of natural extracts for medical plants. 2nd ed. Esfahan: Mani Pub; 2003. [Text in Persian]
- Sudbery P, Gow N, Berman J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* 2004;12(7):317-24.
- Jafari Nodoushan AA, Dehghani M, Mirbagheri SM. In vitro antifungal effect of aqueous garlic (*Allium sativum*) extract and its combination with fluconazole against five common clinical candida isolated from candidiasis lesions. *J Kerman Univ Med* 2003;14(3):153-62. [Full Text in Persian]
- Morshhauser J. The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1587(2-3):240-8.
- Masoumi SM. The Plants of Kermanshah. Kermanshah: Kowsar Pub; 1997. [Text in Persian]
- Amiri H. Evaluation of different ingredient essential oil and extracts of *Allium jedsianum* Bois. *Q J Med Plants* 2006;5(1). [Full Text in Persian]
- Tosun a, Bahadir o, Altanlar n. Antimicrobial activity of some plants used in folk medicine in Turkey. *Turkish J Pharm Sci* 2006;3:167-76.
- Olila D, Olwa-Odyek, Opuda-Asibo J. Antibacterial and antifungal activities of extracts of *Zanthoxylum chalybeum* and *Warburgia ugandensis*, Ugandan medicinal plants. *Afr Health Sci* 2001;1(2):66-72.
- Pirnia M, Edalatian Dovom MR, Tabatabaee Yazdi F, Shahidi F. The antibacterial effects of the aqueous and ethanolic extracts of *Cordia myxa* L. Fruit on *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, and *Salmonella typhi*. *Qom Univ Med Sci J* 2015;9(4):39-48. [Full Text in Persian]
- Arzhang M, Dakhili M, Farahani F. Investigation of chemical compounds and anti-microbial activity of essential oil of *Melissa officinalis* L. *Qom Univ Med Sci J* 2015;9(1-2):7-13. [Full Text in Persian]
- Afarin H, Dakhili M, Zofaghari MR. Comparison of the antimicrobial effect of *Vitex agnuscastus* essential oil with common antibiotics in vitro. *Qom Univ Med Sci J* 2015;9(3):12-9. [Full Text in Persian]

15. Ncube B, Finnie J.F, Van Staden J. In vitro antimicrobial synergism within plant extract combinations from three South African medicinal bulbs. *J Ethnopharmacol* 2012;39(1):81-9.
16. TSAO S, YIN M. In-vitro antimicrobial activity of four diallyl sulphides occurring Naturally in garlic and Chinese leek oils. *J Med Microbiol* 2001;50(7):646-9.
17. Taghizadeh Armaki M, Farahbakhsh E, Hossein Yadegari M, Rajabi Bazl M, Katirae F. Evaluating the sensitivity of *Candida Albicans* isolates from oral candidiasis of AIDS Patients to fluconazole by micro dilution broth and disk diffusion methods. *J Isfahan Med Sch* 2011;29(158):1368-137. [Full Text in Persian]
18. Esfahani MM, Zolfaghari B, Karimi H, Ghannadi A. Traditional Iranian Medicine; A valuable source to introduce medicinal functional foods. *J Islamic Traditional Med* 2012;3(1):77-94. [Full Text in Persian]
19. Dehpour A, Babakhani B, Khazaei S, Asadi M. Chemical composition of essential oil and antibacterial activity of extracts from flower of *Allium atroviolaceum*. *J Med Plants Res* 2011;5(16):3667-72.
20. Bagiu RV, Vlaicu B, Butnariu M. Chemical composition and in Vitro antifungal activity screening of *Allium ursinum* L. (Liliaceae). *Int J Mol Sci* 2012;13(2):1426-36.
21. Avato P, Fanizzi FP, Rosito I. The genus *Thapsia* as a source of petroselinic acid *Lipids* 2001;36(8):845-50.
22. Motsei ML, Lindsey KL, van Staden J, Jäger AK. Screening of traditionally used South African plants for antifungal activity against *Candida albicans*. *Elsiver. J Ethnopharmacol* 2003;86(2-3):235-41.
23. Sangetha S, Zuraini Z, Suryani S, Sasidharan S. In situ TEM and SEM studies on the antimicrobial activity and prevention of *Candida albicans* biofilm by *Cassia spectabilis* extract. *Micron* 2009;40(4):439-43.
24. Furletti VF, Teixeira IP, Obando-Pereda G, Mardegan RC, Sartoratto A, Figueira G. M, et al. Action of *Coriandrum sativum* L. Essential Oil upon Oral *Candida albicans* Biofilm Formation. *Evid Based Complement Alternat Med* 2011;2011:985832.
25. Razzak parast A, Shams Ghahfarokhi M, Yadegari M, Razaghi Abyaneh M. The effect of aqueous garlic extract individually and in combination with fluconazole, itraconazole and Ketoconazole on pathogenic yeasts. *J Gorgan Univ Med Sci* 2009;11(1):49-56. [Full Text in Persian]
26. Lemar KM, Turner MP, Lloyd D. Garlic (*Allium sativum*) as an anti-*Candida* agenta comparison of the efficacy of fresh garlic and freeze-dried extracts *J Appl Microbiol* 2002;93(3):398-405.
27. Ankri S, Mirelman D. Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes Infect* 1999;1(2):125-9.
28. Madani M, Khosravi AR, Shirani M. Comparison of the In vitro effect of different *Allium jedsianum* extracts on *candida* spp. *J Biology Sci* 2010;3(1):63-71. [Full Text in Persian]
29. Shirani M, Madani M, Khosravi AR, Hoseindoust SR. Evaluation of Antifungal activity of essential oil of *Allium jedsianum* on *Malassezia furfur* and *candida Krusei*. *Jundishapour J Microbiol* 2013;Special Edition.