

بررسی اثر ضد قارچی عصاره گل بیدمشک (*Salix egyptica*) بر قارچ مالاسزیا پکی‌درماتیس (ATCC 10231) و مقایسه‌ی آن با کلوتریمازول

آرین نعمتی نژاد^۱، عیسی غلام‌پور عزیزی^{۲*}

۱- دانش‌آموخته دکتری دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران.
۲- استادیار، گروه قارچ‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران.

دریافت مقاله: ۲۰ شهریور ۱۴۰۱، بازنگری: ۷ آبان ۱۴۰۱، پذیرش نهایی: ۸ آبان ۱۴۰۱

چکیده

مالاسزیا پکی‌درماتیس به‌عنوان یک مخمر فرصت‌طلب، بر روی پوست انسان و حیوان به صورت فلور طبیعی وجود دارد و در صورت ضعف سیستم ایمنی ایفای نقش می‌کند. گل بیدمشک (*Salix egyptica*) دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی، کاهنده کلسترول و نیز برای درمان درد و التهاب مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این مطالعه اثر مهاری عصاره‌ی آبی، اتانولی و متانولی گل این گیاه بر مالاسزیا پکی‌درماتیس مورد بررسی قرار گرفت. این مخمر از مرکز کلکسیون میکروبی شهریار با کد مشخصه (ATCC 10231) تهیه گردید. در این مطالعه تجربی، از گل بیدمشک با دستگاه سوکسله، عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی تهیه گردید. روش انتشار دیسک و چاهک، تعیین حداقل غلظت بازدارندگی از رشد (MIC) و تعیین حداقل غلظت کشندگی (MFC)، جهت ارزیابی اثرات ضد قارچی این عصاره‌ها بر مالاسزیا پکی‌درماتیس در آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفت. میانگین میزان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) بر روی قارچ مالاسزیا پکی‌درماتیس برای عصاره اتانولی $8/3 \times 10^3$ ، برای عصاره متانولی $1/2 \times 10^4$ و برای آبی $1/4 \times 10^4$ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شدند. میانگین میزان حداقل غلظت کشندگی (MFC) در عصاره اتانولی $20/8 \times 10^4$ ، برای عصاره متانولی $1/6 \times 10^4$ و برای عصاره آبی 5×10^4 میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شدند. بر اساس نتایج این مطالعه، عصاره‌های الکلی و آبی گل بیدمشک دارای فعالیت ضد مالاسزیا پکی‌درماتیس می‌باشد. با این وجود از کلوتریمازول وضعیت تر می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: چاهک، دیسک، کلوتریمازول، گل بیدمشک، مالاسزیا پکی‌درماتیس

مقدمه

پیشرفت‌های حاصله در شناسایی عوامل باکتریال و ویروسی بیماری‌زا و همچنین کنترل و درمان بیماری‌های حاصله از آنها، در دو دهه اخیر برجسته و تحسین برانگیز بوده است. بیماری‌های قارچی، همه ساله خسارات سنگینی به بهداشت جامعه بشری وارد می‌کند. مصرف داروهای ضد قارچ، احتمال مسمومیت دارویی یا مقاومت دارویی را سبب می‌شود (۱، ۲). استفاده از عصاره‌های گیاهی، جهت حفظ مواد غذایی در برابر فساد، توسط عوامل بیماری‌زا از جمله عوامل قارچی، مورد توجه قرار گرفته است. متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی، مانند عصاره‌های گیاهی، از نظر اثرات ضد میکروبی‌شان مورد بررسی قرار گرفته‌اند و مشخص شده است که اغلب عصاره‌های گیاهی استخراج شده از گیاهان دارویی، دارای خواص ضد قارچ، ضد انگل، ضد باکتری و ضد ویروس می‌باشند (۳-۷).

بیدمشک (*Pussy willow*) درخت یا درختچه‌ای زینتی است که سنبله‌های آن پر مانند بوده و در آغاز فصل بهار به عمل می‌آید. نام علمی آن *Salix egyptica* بوده و دارای گل‌های زرد کم‌رنگ دم‌گره‌ای است (۸). این گیاه بومی منطقه خاورمیانه است و برخلاف نام علمی آن (بید مصری) بسیاری از گیاه‌شناسان منشأ آن را ایران معرفی کرده‌اند. خاستگاه بیدمشک در جهان: ایران، جنوب شرقی آناتولی، جنوب شرقی ماورای قفقاز، عراق، افغانستان و پاکستان است و در ایران در مناطق آذربایجان، شمال ایران (گرگان، مازندران و گیلان)، اصفهان، کرمان، شیراز و یزد می‌روید. از گذشته، گیاه بیدمشک به دلیل دارا بودن خواص دارویی خود مورد استفاده قرار گرفته است، که از جمله این خواص می‌توان به در مان دارویی برای کم‌خونی و سرگیجه که به‌عنوان یک کاردیوتونیک عمل می‌کند، اشاره کرد و اخیراً متوجه خاصیت

آنتی‌اکسیدانی این گیاه شده‌اند. همچنین کاهنده کلسترول می‌باشد و برای درمان درد و التهاب مورد استفاده قرار می‌گیرد. در طب سنتی عصاره پوست بیدمشک خاصیت تب‌بر، ضد التهاب و ضد درد دارد که به‌طور عمده مربوط به وجود گلیکوزیدهای سالیسیلیک، یعنی سالیسین و سالیکورتین است (۹-۱۱). در واقع، تجویز خوراکی عصاره برای تسکین کمردرد توصیه می‌شود. همچنین این گیاه دارای اثرات ضد دیابت، ضد سرطان، ضد باکتری، ضد التهاب، ضد هیپاتیت، ضد چاقی، سیستم‌توکسیک، ضد انگل می‌باشد و دارای ترکیباتی از جمله سالیسیلیک اسید، فلاونول، فلاوین، فنولیک گلیکوزید می‌باشد (۱۲).

مالاسزیا پکی‌درماتیس گونه‌ای از مخمرهای لیپوفیلی و غیر وابسته به لیپوبلی است. در پوست سگ‌ها، گربه‌ها و سایر حیوانات اهلی و وحشی و نیز انسان وجود دارد. بر اثر عدم تعادل میکروبی و اختلالات سیستم ایمنی میزبان، این مخمر ممکن است بیماری‌زا شود، عمدتاً باعث اوتیت خارجی و درماتیت سبورئیک در سگ‌ها و گربه‌ها و نیز بیماری پوستی انسانی می‌شود. مشتقات آزول (نظیر کلوتریمازول) به‌طور گسترده‌ای برای درمان ضایعات مرتبط با این مخمر مورد استفاده واقع می‌شود. با این حال، آزمایشات نشان داده است که حساسیت این مخمر نسبت به این داروهای ضد قارچی کاهش یافته است (۱۳، ۱۴).

با بررسی پژوهش‌های انجام شده در داخل و خارج کشور، در خصوص آنتی‌باکتریال بیدمشک، پژوهش‌هایی به ثبت رسیده، اما در خصوص فعالیت ضد قارچی این گیاه کم کار شده است (۱۵، ۱۶). البته تحقیقاتی در زمینه خواص ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی این گیاه انجام شده است. تحقیق اثرات آنتی‌باکتریال عصاره‌های آبی و اتانولی پوست ساقه این گیاه روی سه گونه باکتریایی گرم‌مثبت:

بررسی اثر ضد قارچی عصاره گل بیدمشک (*Salix egyptica*) بر قارچ مالاسزیا پکی درماتیس ...

متانولی و اتانولی آن تهیه گردید. بعد از عصاره‌گیری آنها را در انکوباتور ۵۵ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده تا به‌طور کامل خشک شوند (۱۸). عصاره‌ها با ۰/۵ گرم پودر و ۴/۵ سی‌سی دی‌متیل سولفوکساید رقیق شدند (۱۹).

تهیه سوسپانسیون مخمیری: مالاسزیا

پکی‌درماتیس از مرکز کلکسیون میکروبی شهریار با کد مشخصه (ATCC 10231) تهیه گردید. سوسپانسیون این مخمر از کشت تازه در لوله‌های استریل حاوی سرم فیزیولوژی با استفاده از روش اسپکتروفتومتریک تهیه شد که در واقع در هر سی‌سی آن 1×10^6 سلول مخمیری (10^6 cfu/ml) وجود دارد (۲۰، ۲۱). برای انجام تست حساسیت مخمر به عصاره‌ها و داروی کلوتریمازول، با استفاده از انتشار دیسک با مقادیر ۴۰، ۵۰، ۶۰ و ۷۰ میکرولیتر، ابتدا ۱۰ میکرولیتر مخمر به محیط کشت سابورو دکستروز آگار به‌صورت کشت سفراهی اضافه شد و بدین طریق تست حساسیت با استفاده از چاهک برای عصاره‌ها و داروی کلوتریمازول، با مقادیر ۸۰، ۹۰، ۱۰۰ و ۱۱۰ میکرولیتر هم انجام شد (۴، ۲۲).

باسیلیوس سرئوس، استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس مقاوم به متیسیلین و سه گونه باکتریایی گرم‌منفی: اشریشیاکلی، سودونامو آئروژینوزا و سالمونلا تیفی‌موریوم انجام شده است که نشان‌دهنده خاصیت آنتی‌باکتریال آن می‌باشد (۱۷).

با توجه به اهمیت روزافزون عفونت‌های فرصت‌طلب مالاسزیا به‌ویژه در میزبانان با ایمنی تضعیف شده و قدرت ضد میکروبی عصاره‌های گیاهی و با توجه به عوارض داروهای شیمیایی و مقاومت میکروارگانیسم‌ها، این تحقیق با هدف تعیین اثر مهارى عصاره‌های گل بیدمشک بر روی این مخمر انجام شد. در این تحقیق عصاره‌های آبی و الکلی گل بیدمشک بر روی مالاسزیا پکی‌درماتیس به روش دیسک و چاهک مورد بررسی قرار گرفتند و MIC و MFC این عصاره‌ها همراه با مقایسه داروی کلوتریمازول مورد آزمایش قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

تهیه گیاه و عصاره‌گیری: بعد از تهیه گل بیدمشک و گرفتن تأییدیه آن از دانشکده کشاورزی ساری، در سایه خشک و با آسیاب برقی، پودر آن تهیه شد. به‌وسیله دستگاه سوکسله عصاره آبی،



تصویر ۱- تست حساسیت عصاره‌های گل بیدمشک و دارو در انتشار دیسک



تصویر ۲- تست حساسیت عصاره‌های گل بیدمشک و دارو در انتشار چاهک

کشت سابورو دکستروز براس (SDB) صورت گرفت
(۲۳، ۳) (جدول ۱).

تعیین MIC: کمترین غلظت مهارکنندگی رشد
(MIC) به حداقل غلظت ماده ضد مخمری با محیط

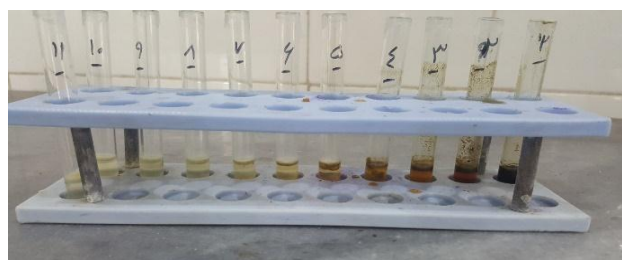
جدول ۱- روش انجام MIC

شماره لوله	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱
محیط SDB	۱ سی‌سی	۱ سی‌سی	۱ سی‌سی	۱ سی‌سی	۱ سی‌سی	۱ سی‌سی	۱ سی‌سی	۱ سی‌سی	۱ سی‌سی	۱ سی‌سی	۱ سی‌سی
عصاره ۱/۱۰ رقیق شده ماده مؤثره مربوطه	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	-
سوسپانسیون مخمری	۱۰ λ	۱۰ λ	۱۰ λ	۱۰ λ	۱۰ λ	۱۰ λ	۱۰ λ	۱۰ λ	۱۰ λ	۱۰ λ	۱۰ λ
تیتراژ یا مقدار ماده مؤثر g μ	5×10^4	25×10^3	125×10^2	۶۲۵۰	۳۱۲۵	۱۵۶۲/۵	۷۸۱/۲۵	۳۹۰/۶۲	۱۹۵/۳۱	۹۷/۶۵	۰

تمام لوله‌ها در انکوباتور ۲۵-۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت تقریباً ۷۲ ساعت قرار داده شدند و بعد از این مدت کدورت لوله‌ها را با لوله شماره بازده که به‌عنوان لوله شاهد می‌باشد سنجیده شده و جواب لوله‌ها گزارش شدند.

تیتراژ لوله اول 1×10^5 تقسیم بر ۲ می‌شود یعنی 5×10^4 میکروگرم بر میلی‌لیتر. برای تیتراژ لوله دوم این مقدار نصف شد. اگر عصاره‌ها با رقت ۱/۵ رقیق شوند، برای لوله اول تیتراژ برابر است با 1×10^5 و تیتراژ لوله دوم 5×10^4 می‌باشد (۵).

از آنجایی که مقدار ماده مؤثره عصاره 1×10^6 میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. چون عصاره‌ها ۱/۱۰ رقیق شدند پس 1×10^6 میکروگرم بر میلی‌لیتر در ۱۰ میلی‌لیتر است. در نتیجه برای ۱ میلی‌لیتر، 1×10^5 میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. پس در لوله اول این مقدار نصف شدند و نتیجه می‌گیریم که



تصویر ۳- تعیین MIC عصاره گل بیدمشک روی مالا‌سزیاپکی در ماتیس

تعداد مخمرها در پلیت‌ها به دست می‌آید. کمترین غلظتی که در آن رشدی مشاهده نشد یا به عبارتی کمترین غلظتی را که تعداد مخمرها از یک هزارم تعداد اولیه کمتر شده باشد، به‌عنوان MFC در نظر گرفته می‌شود (۶، ۲۴).

آنالیز آماری: در این مطالعه برای بررسی اختلاف میانگین میان گروه‌ها از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۸ استفاده شد. اختلاف میان گروه‌ها با

تعیین MFC: جهت تعیین حداقل غلظت کشندگی (MFC) مخمر، مقدار 10λ (که واجد 10^4 مخمر می‌باشد) از لوله MIC و سایر لوله‌های فاقد کدورت برداشته و در محیط کشت Sabouraud Dextrose Agar کشت داده می‌شود و پس از گذشت زمان لازم در پلیت‌ها CFU تعیین می‌شود، به این ترتیب که کلونی‌ها را شمرده و در ۱۰۰ (عکس ضریب رقت) ضرب می‌نماییم. به این ترتیب

استفاده از آنالیز واریانس یکطرفه و تست تعقیبی Tukey مورد بررسی قرار گرفت. مقادیر $p \leq 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد (۲۵).



تصویر ۴- تعیین MIC عصاره اتانولی گل بیدمشک روی مالاسزیا پکی درماتیس

نتایج

در روش چاهک (با مقادیر ۸۰، ۹۰، ۱۰۰ و ۱۱۰ میکرولیتر)، میانگین قطر هاله ممانعت از رشد، برای عصاره اتانولی به‌ترتیب ۱۰/۶۷، ۱۲، ۱۴/۶۷ و ۸/۶۷ تعیین شد (جدول ۴). برای عصاره متانولی ۱۰/۳۳، ۱۳ و ۱۰/۶۷ میلی‌متر (جدول ۵)، برای عصاره آبی ۱۰، ۱۲/۳۳، ۱۳ و ۱۴/۶۷ میلی‌متر (جدول ۶)، و برای داروی کلوتریمازول ۳۸/۳۳، ۴۴/۳۳، ۴۸/۳۳ و ۵۴ میلی‌متر تعیین شدند (جدول ۱۱). هیچ‌کدام از عصاره‌ها در حجم‌های مختلف از نظر قطر هاله عدم رشد، تفاوت معنی‌داری با همدیگر نشان ندادند ولی در مقایسه با کلوتریمازول به‌طور معنی‌داری هاله کوچکتری داشتند (جدول ۱۲ تا ۱۵).

نتایج MIC برای عصاره‌های اتانولی، متانولی و آبی بیدمشک با سه تکرار و میانگین آنها در جدول ۲ و نیز نتایج MFC برای این عصاره‌ها در جدول ۳ آمده است. MIC و MFC این عصاره‌ها، تفاوت معنی‌داری با همدیگر نداشتند. در روش دیسک (با مقادیر ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰ میکرولیتر)، میانگین قطر هاله ممانعت از رشد، برای عصاره اتانولی به‌ترتیب ۱۰/۶۷، ۱۲، ۱۴۳/۳۳ و ۱۷ میلی‌متر (جدول ۷) و برای عصاره متانولی به‌ترتیب ۱۱، ۱۳/۳۳، ۱۴/۳۳ و ۱۵ میلی‌متر (جدول ۸)، و برای عصاره آبی ۹، ۱۰، ۱۱ و ۱۱/۶۷ میلی‌متر (جدول ۹)، و برای داروی کلوتریمازول به‌ترتیب ۴۶، ۴۸، ۵۰/۶۷ و ۵۰/۳۳ میلی‌متر تعیین شدند (جدول ۱۰).

جدول ۲- نتایج MIC عصاره‌های آبی، اتانولی، متانولی گل بیدمشک روی مالاسزیا پکی درماتیس

MIC بار اول	عصاره اتانولی	لوله شماره ۳ تیتراژ آن $125 \times 10^2 \mu g$
	عصاره متانولی	لوله شماره ۳ تیتراژ آن $125 \times 10^2 \mu g$
	عصاره آبی	لوله شماره ۲ تیتراژ آن $25 \times 10^3 \mu g$
MIC بار دوم	عصاره اتانولی	لوله شماره ۴ تیتراژ آن $625 \mu g$
	عصاره متانولی	لوله شماره ۳ تیتراژ آن $125 \times 10^2 \mu g$
	عصاره آبی	لوله شماره ۴ تیتراژ آن $625 \mu g$
MIC بار سوم	عصاره اتانولی	لوله شماره ۴ تیتراژ آن $625 \mu g$
	عصاره متانولی	لوله شماره ۳ تیتراژ آن $125 \times 10^2 \mu g$
	عصاره آبی	لوله شماره ۳ تیتراژ آن $125 \times 10^2 \mu g$
MIC میانگین	عصاره اتانولی	$8/3 \times 10^3 \mu g$
MIC میانگین	عصاره متانولی	$1/2 \times 10^4 \mu g$
MIC میانگین	عصاره آبی	$1/4 \times 10^4 \mu g$

جدول ۳- نتایج MFC عصاره های آبی، اتانولی، متانولی گل بیدمشک روی مالاسزیا پکی درماتیس

MFC بار اول	عصاره اتانولی	پلیت ۲ تیترا آن $25 \times 10^3 \mu g$
	عصاره متانولی	پلیت ۳ تیترا آن $125 \times 10^2 \mu g$
	عصاره آبی	پلیت ۱ تیترا آن $5 \times 10^4 \mu g$
MFC بار دوم	عصاره اتانولی	پلیت ۲ تیترا آن $25 \times 10^3 \mu g$
	عصاره متانولی	پلیت ۳ تیترا آن $125 \times 10^2 \mu g$
	عصاره آبی	پلیت ۱ تیترا آن $5 \times 10^4 \mu g$
MFC بار سوم	عصاره اتانولی	پلیت ۳ تیترا آن $125 \times 10^2 \mu g$
	عصاره متانولی	پلیت ۲ تیترا آن $25 \times 10^3 \mu g$
	عصاره آبی	پلیت ۱ تیترا آن $5 \times 10^4 \mu g$
MFC میانگین	عصاره اتانولی	$20/8 \times 10^4 \mu g$
MFC میانگین	عصاره متانولی	$1/6 \times 10^4 \mu g$
MFC میانگین	عصاره آبی	$5 \times 10^4 \mu g$

جدول ۴- نتایج سه بار تکرار چاهک عصاره اتانولی گل بیدمشک روی مالاسزیا پکی درماتیس

چاهک عصاره اتانولی	80 لاندا	90 لاندا	100 لاندا	110 لاندا
بار اول	12mm	13mm	13mm	14mm
بار دوم	12mm	14mm	13mm	16mm
بار سوم	8mm	9mm	10mm	14mm
میانگین	10.6mm	12mm	12mm	14.6mm

جدول ۵- نتایج سه بار تکرار و میانگین چاهک عصاره متانولی گل بیدمشک روی مالاسزیا پکی درماتیس

چاهک عصاره متانولی	80 لاندا	90 لاندا	100 لاندا	110 لاندا
بار اول	9 mm	12mm	12mm	14mm
بار دوم	8mm	10mm	10mm	12mm
بار سوم	9mm	9mm	10mm	13mm
میانگین	8.6mm	10.3mm	10.6mm	13mm

جدول ۶- نتایج سه بار تکرار و میانگین چاهک عصاره آبی گل بیدمشک روی مالاسزیا پکی درماتیس

چاهک عصاره آبی	80 λ	90 λ	100 λ	110 λ
بار اول	8mm	11mm	11mm	13mm
بار دوم	12mm	13mm	14mm	15mm
بار سوم	10mm	13mm	14mm	16mm
میانگین	10mm	12.3mm	13mm	14.6mm

جدول ۷- نتایج سه بار تکرار و میانگین دیسک عصاره اتانولی گل بیدمشک روی مالاسزیا پکی درماتیس

دیسک عصاره اتانولی	40 λ	50 λ	60 λ	70 λ
بار اول	12mm	12mm	15mm	19mm
بار دوم	12mm	14mm	15mm	17mm
بار سوم	8mm	10mm	13mm	15mm
میانگین	10.6mm	12mm	14.3mm	17mm

بررسی اثر ضد قارچی عصاره گل بیدمشک (*Salix egyptica*) بر قارچ مالاسزیا پکی درماتیس ...

جدول ۸- نتایج سه بار تکرار و میانگین دیسک عصاره متانولی گل بیدمشک روی مالاسزیا پکی درماتیس

دیسک عصاره متانولی	40 λ	50 λ	60 λ	70 λ
بار اول	12mm	13mm	13mm	14mm
بار دوم	11mm	14mm	15mm	16mm
بار سوم	10mm	13mm	15mm	15mm
میانگین	11mm	13.3mm	14.3mm	15mm

جدول ۹- نتایج سه بار تکرار و میانگین دیسک عصاره آبی گل بیدمشک روی مالاسزیا پکی درماتیس

دیسک عصاره آبی	40 λ	50 λ	60 λ	70 λ
بار اول	8mm	9mm	10mm	12mm
بار دوم	9mm	11mm	12mm	12mm
بار سوم	10mm	10mm	11mm	11mm
میانگین	9mm	10mm	11mm	11.6

جدول ۱۰- نتایج سه بار تکرار و میانگین دیسک کلوتریمازول روی مالاسزیا پکی درماتیس

کلوتریمازول دیسک	40 λ	50 λ	60 λ	70 λ
بار اول	41mm	46mm	47mm	50mm
بار دوم	50mm	50mm	55mm	62mm
بار سوم	47mm	48mm	50mm	54mm
میانگین	46mm	48mm	50.6mm	55.3mm

جدول ۱۱- نتایج سه بار تکرار و میانگین چاهک کلوتریمازول روی مالاسزیا پکی درماتیس

کلوتریمازول چاهک	80 λ	90 λ	100 λ	110 λ
بار اول	35mm	40mm	45mm	50mm
بار دوم	40mm	45mm	50mm	56mm
بار سوم	40mm	48mm	50mm	56mm
میانگین	38.3mm	44.3mm	48.3mm	54mm

داد. به عبارت دیگر بیشترین هاله عدم رشد برای حجم ۱۱۰ مشاهده شد ولی این افزایش تنها با حجم ۸۰ تفاوت معنی‌داری داشت و این مقدار هاله با حجم‌های ۹۰ و ۱۰۰ تفاوت معنی‌داری نشان نداد. هاله عدم رشد برای حجم‌های ۹۰ و ۱۰۰ تفاوت معنی‌داری با دیگر حجم‌های مورد استفاده نشان نداد. در عصاره اتانولی هاله عدم رشد با تغییرات حجم مورد استفاده روند افزایشی نشان داد ولی این تغییرات معنی‌دار نبود. به عبارت دیگر تمام حجم‌ها

تحلیل چاهک: در دو عصاره متانولی و آبی هاله عدم رشد روند افزایشی با تغییرات حجم مورد استفاده نشان داد. آنالیز آماری با آزمون ANOVA تفاوت معنی‌داری در سطح ۰/۰۱ برای عصاره‌ی متانولی و سطح ۰/۰۴۶ برای عصاره‌ی آبی نشان داد. آنالیز Tukey برای هر دو عصاره متانولی و آبی یکسان بود و نشان داد که کمترین هاله عدم رشد در حجم ۸۰ میکرولیتر بود. اثر حجم ۸۰ بر هاله عدم رشد تنها با حجم ۱۱۰ تفاوت معنی‌داری نشان

به‌طور معنی‌داری کوچکتر بود. قطر هاله عدم رشد برای حجم ۹۰ تنها با حجم ۱۱۰ تفاوت معنی‌داری نشان داد. حجم ۱۱۰ بیشترین هاله عدم رشد را نشان داد ولی تنها در مقایسه با حجم‌های ۸۰ و ۹۰ افزایش معنی‌داری داشت.

اثر یکسانی بر هاله عدم رشد داشتند. در کلوتریمازول تفاوت معنی‌داری در هاله عدم رشد بین حجم‌های مختلف مشاهده شد به نحوی که کمترین هاله برای حجم ۸۰ مشاهده شد اما قطر هاله برای حجم ۸۰ تفاوت معنی‌داری با حجم ۹۰ نشان نداد ولی در مقایسه با غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۱۰

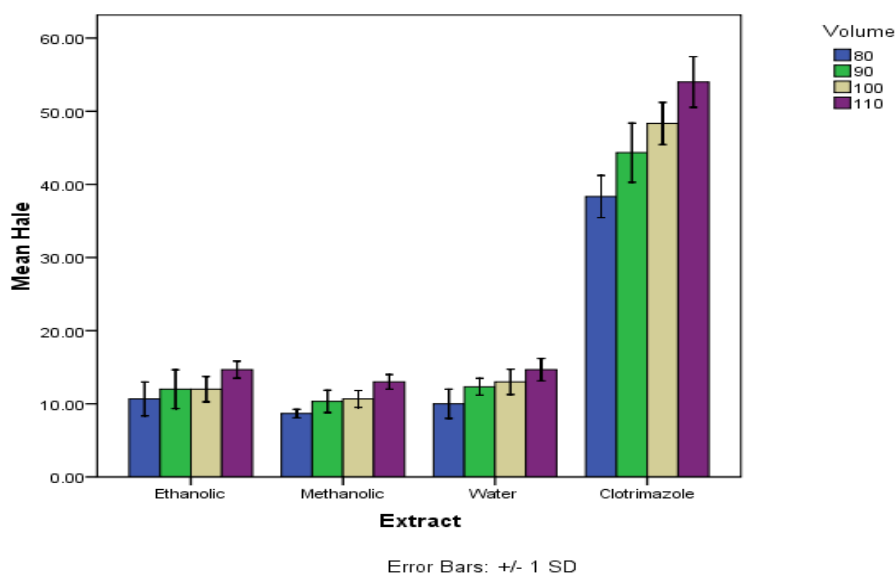
جدول ۱۲- مقایسه اثر غلظت‌های مختلف عصاره‌های اتانولی، متانولی، آبی و کلوتریمازول بر هاله عدم رشد در روش چاهک

p-Value	۱۱۰	۱۰۰	۹۰	۸۰	
0.189	14.67±1.15	12.00±1.73	12.00±2.65	10.67±2.31	اتانول
0.01	13.00±1.00 ^b	10.67±1.15 ^{a,b}	10.33±1.53 ^{a,b}	8.67±0.58 ^a	متانل
0.046	14.67±1.53 ^b	13.00±1.73 ^{a,b}	12.33±1.15 ^{a,b}	10.00±2.00 ^a	آبی
0.003	54.00±3.46 ^c	48.33±2.89 ^{b,c}	44.33±4.04 ^{a,b}	38.33±2.89 ^a	کلوتریموزول

* ردیف‌هایی که با حروف متفاوت نشان داده شدند تفاوت معنی‌داری در سطح ۰,۰۵ دارند

ندادند ولی در مقایسه با کلوتریمازول به‌طور معنی‌داری هاله کوچکتری داشتند.

هیچیک از عصاره‌ها در حجم‌های مختلف از نظر هاله عدم رشد تفاوت معنی‌داری با همدیگر نشان



نمودار ۱- بررسی هاله عدم رشد روش چاهک

جدول ۱۳- مقایسه عصاره‌های اتانولی، متانولی، آبی و کلوتریمازول بر هاله عدم رشد در هر کدام از حجم‌ها

p-Value	کلوتریموزول	متانل	اتانول	آبی	
<0.001	38.33±2.89 ^b	8.67±0.58 ^a	10.67±2.31 ^a	10.00±2.00 ^a	۸۰
<0.001	44.33±4.04 ^b	10.33±1.53 ^a	12.00±2.65 ^a	12.33±1.15 ^a	۹۰
<0.001	48.33±2.89 ^b	10.67±1.15 ^a	12.00±1.73 ^a	13.00±1.73 ^a	۱۰۰
<0.001	54.00±3.46 ^b	13.00±1.00 ^a	14.67±1.15 ^a	14.67±1.53 ^a	۱۱۰

بررسی اثر ضد قارچی عصاره گل بیدمشک (*Salix egyptica*) بر قارچ مالاسزیا پکی درماتیس ...

حجم‌ها نشان ندادند. در عصاره متانولی نیز حجم ۴۰ کمترین هاله را به‌طور معنی‌داری نشان داد. ولی حجم ۴۰ با حجم‌های ۶۰ و ۷۰ تفاوت معنی‌داری نشان داد و با حجم ۵۰ تفاوت معنی‌داری نشان نداد. از سوی دیگر قطر هاله عدم رشد برای حجم ۵۰ تفاوت معنی‌داری با حجم‌های ۶۰ و ۷۰ نشان نداد. آنالیز آماری با آزمون ANOVA در کلوتریمازول تفاوت معنی‌داری در قطر هاله عدم رشد بین حجم‌های مختلف نشان نداد ($p=0.135$).

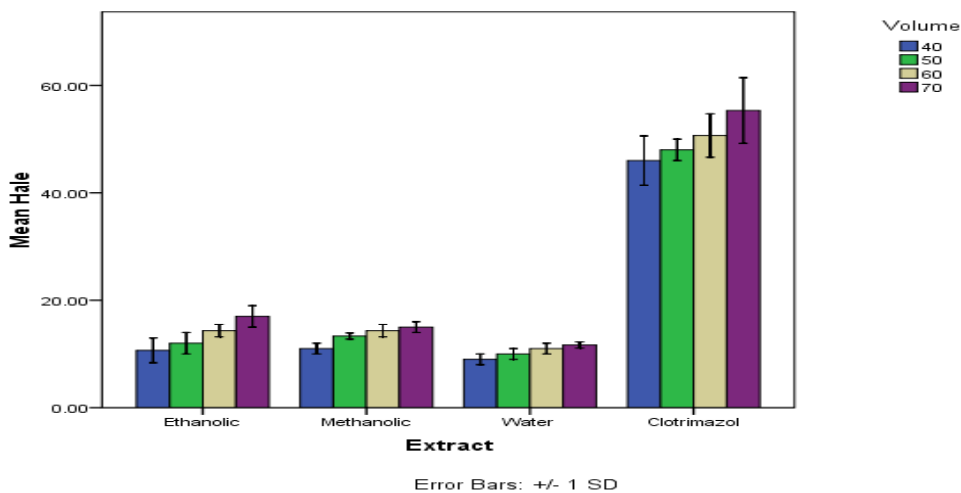
تحلیل دیسک: در تمامی عصاره‌ها یک روند افزایشی در هاله عدم رشد با افزایش حجم عصاره‌های مصرفی مشاهده شد و حجم ۴۰ کمترین هاله را به‌طور معنی‌داری نشان داد. در عصاره اتانولی و آبی تغییرات مشابهی در قطر هاله عدم رشد مشاهده شد به نحوی که علی‌رغم روند افزایشی در هاله عدم رشد تفاوت معنی‌دار تنها بین حجم‌های ۴۰ و ۷۰ مشاهده شد. حجم‌های ۵۰ و ۶۰ تفاوت معنی‌داری در قطر هاله عدم رشد با یکدیگر و دیگر

جدول ۱۴- مقایسه اثر غلظت‌های مختلف عصاره‌های اتانولی، متانولی، آبی و کلوتریمازول بر هاله عدم رشد در روش دیسک

p-Value	۷۰	۶۰	۵۰	۴۰	
0.017	17.00±2.00 ^b	14.33±1.15 ^{a,b}	12.00±2.00 ^{a,b}	10.67±2.31 ^a	اتانول
0.004	15.00±1.00 ^b	14.33±1.15 ^b	13.33±0.58 ^{a,b}	11.00±1.00 ^a	متانل
0.032	11.67±0.58 ^b	11.00±1.00 ^{a,b}	10.00±1.00 ^{a,b}	9.00±1.00 ^a	آبی
0.135	55.33±6.11	50.67±4.04	48.00±2.00	46.00±4.58	کلوتریموزول

ندادند ولی در مقایسه با کلوتریمازول به‌طور معنی‌داری هاله کوچکتری داشتند.

هیچ یک از عصاره‌ها در حجم‌های مختلف از نظر هاله عدم رشد تفاوت معنی‌داری با همدیگر نشان



نمودار ۲- بررسی هاله عدم رشد روش دیسک

جدول ۱۵- مقایسه عصاره‌های اتانولی، متانولی، آبی و کلوتریمازول بر هاله عدم رشد در هر کدام از حجم‌ها

p-Value	کلوتریموزول	متانل	اتانول	آبی	
<0.001	46.00±4.58 ^b	11.00±1.00 ^a	10.67±2.31 ^a	9.00±1.00 ^a	۴۰
<0.001	48.00±2.00 ^b	13.33±0.58 ^a	12.00±2.00 ^a	10.00±1.00 ^a	۵۰
<0.001	50.67±4.04 ^b	14.33±1.15 ^a	14.33±1.15 ^a	11.00±1.00 ^a	۶۰
<0.001	55.33±6.11 ^b	15.00±1.00 ^a	17.00±2.00 ^a	11.67±0.58 ^a	۷۰

بحث و نتیجه‌گیری

پیشگیری از خسارات ناشی از مالاَسزیا یکی درماتیس نیازمند یک برنامه و کنترل همه‌جانبه و وسیع است. به دلیل اینکه مشکلات ناشی از این قارچ می‌تواند خطرات جدی برای بهداشت انسان‌ها و حیوانات ایجاد کند و با توجه به این که این قارچ هم در انسان و هم در حیوانات بیماری‌زایی ایجاد می‌کند و به‌عنوان بیماری مشترک شناخته می‌شود، بنابراین از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد. بررسی عوامل تأثیرگذار بر آنها با انجام آزمایشات گسترده می‌تواند در پیشگیری و درمان آن کمک کننده باشد و همچنین از نظر اقتصادی نیز دارای اهمیت است چرا که هزینه‌ها جهت درمان آن صرف می‌شود. پس با یافتن ترکیبی ارزان و کارآمد و از همه مهم‌تر ایمن برای درمان آن دارای اهمیت است.

با توجه به طرح کلی آزمایش و رعایت تمامی نکات اصولی، قارچ مالاَسزیا یکی درماتیس در تست حساسیت به عصاره گل بیدمشک با استفاده از دیسک و چاهک توانست هاله‌ی ممانعت از رشد ایجاد کند. با در نظر گرفتن خواص مفید عصاره بیدمشک در مطالعات مختلف، در این مطالعه نیز تأثیر قارچ‌کشی آن در رقت‌های بالا در تست تعیین MIC و MFC مشخص شده است. تست دیسک و چاهک نیز نتایج قابل توجهی داشته است.

در مقایسه با پژوهشی که در سال ۲۰۱۳ توسط ستی (۲۶) که عصاره اتانولی بیدمشک روی *Fusarium oxysporum* انجام شد در غلظت‌های ۲، ۵، ۱۰ و ۲۰ درصد، اندازه‌ی هاله‌ها ۷/۹۵، ۷/۶۰، ۷/۶۲ و ۶/۳۷ میلی‌متر مشاهده گردید، در دیسک که به میزان ۴۰، ۵۰، ۶۰ و ۷۰ لاندا از عصاره اتانولی با رقت ۰/۱ گرم بر میلی‌لیتر استفاده شد اندازه هاله به‌طور میانگین ۱۰/۶۷، ۱۲، ۱۴/۳۳ و ۱۷ میلی‌متر گزارش شد که جواب معنی‌داری در هر دو تحقیق به دست آمد. پس می‌توان گفت عصاره‌ی

اتانولی اثر ضد قارچی مناسبی نشان داد که با تحقیق حاضر مطابقت داشت. در تحقیقی که توسط پوپووا و کالوا (۱۵) با عصاره آبی بیدمشک روی برخی باکتری‌های گرم‌مثبت و منفی و کاندیدا/آلبیکس انجام شد، در انتشار دیسک با مقادیر ۴۰، ۵۰، ۶۰ و ۷۰ لاندا به‌ترتیب به‌طور میانگین ۹، ۱۰، ۱۱ و ۱۱/۶۷ میلی‌متر، هاله ممانعت از رشد گزارش شد و تفاوت معنی‌دار مشاهده شد. در صورتی که در گزارش حاضر در حجم‌های مختلف (p=0.032) تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. اما در رابطه با روش چاهک در تمام حجم‌ها تفاوت معنی‌داری مشاهده شد. در تحقیقی که در سال ۲۰۱۴ توسط زرجر (۱۶) انجام شد، مشخص شد که عصاره‌ی متانولی بیدمشک اثر ضد قارچی مناسبی از خود نشان داد که در مقایسه با این تحقیق تفاوت معنای‌داری در مقایسه با حجم‌های ۴۰، ۶۰ و ۷۰ از خود نشان داد. همچنین در روش چاهک در همه غلظت‌ها تغییرات معنی‌دار بود. گونزالس الامیلا و همکاران در سال ۲۰۱۹ اثر این گیاه را روی *اشریشیاکلی*، *استافیلوکوک اورئوس* و *لیستریا منوسیتوژنز* بررسی کردند که بالاترین اثر مربوط به *استافیلوکوک* و *لیستریا* بود (۲۷). بنابراین این تحقیق هم همانند مطالعه حاضر اثر ضد میکروبی عصاره‌های بیدمشک را نشان داد.

به‌طور کلی نتایج مطالعه حاضر اثر ضد مخمری گل بیدمشک را روی مالاَسزیا یکی درماتیس ثابت کرد. تمام غلظت‌های استفاده شده از عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی تأثیر مهاری بر رشد این مخمر داشتند، بنابراین عصاره‌های مذکور حاوی ترکیبات ضد قارچی می‌باشند. گمان می‌شود که این گیاه می‌تواند اثرات ضد قارچی نیز داشته باشد و با توجه به اینکه طب سنتی و استفاده از گیاهان دارویی همواره شامل مزیت‌هایی است که مورد توجه قرار می‌گیرد، امید است تا در پیشگیری و درمان

استفاده از این ترکیب نیازمند بررسی‌های بیشتر و استفاده از تجهیزات گسترده‌تری دارد که از عوامل محدودکننده در این مطالعه بود.

سپاسگزاری

این تحقیق پایان‌نامه دانشجویی دکتری دامپزشکی می‌باشد. از تمامی کسانی که ما را در اجرای این پژوهش یاری رسانده‌اند، به‌خصوص عوامل و کارکنان آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل تشکر به عمل می‌آید.

References

- 1- Banerjee S, Banerjee R, Pradhan N. A comparative study on antimicrobial activity of leaf extract of five medicinal plants and commonly used antibiotics. *Am J Phytomed Clin Ther.* 2014; 2(6): 788-95.
- 2- Velegraki A, Cafarchia C, Gaitanis G, Iatta R, Boekhout T. Malassezia infections in humans and animals: pathophysiology, detection, and treatment. *PLoS pathogens.* 2015; 11(1):e1004523.
- 3- Azam TA, Gholampour AI, Hashemi M, Farhadi L, Servatyari K, Rouhi S. Inhibitory effect of aquatic and alcoholic extracts of *Artemisia sieberi* on growth of *Candida albicans*: an in vitro study. *Qom University Medical Science Journal.* 2018; 12(6): 39-47. [In Persian]
- 4- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology.* 2008; 2(46): 446-75.
- 5- Gholampourazizi I, Rouhi S, Zandi S, Kashefi H, Hassanzadeh Miandasteh S. Antifungal effect of *Melia azedarach* alcoholic and aquatic extract on *Malassezia furfur*. *Current Research in Medical Sciences.* 2016; 1(2): 11-7.
- 6- Najafi M, Gholampourazizi I, Hashemi Karouei M, Khani D, Rouhi S. Investigation of the anti-growth effect of hydroalcoholic extract of *Artemisia deserti* on *Malassezia furfur* isolated from clinical specimen. *Razi Journal of Medical Sciences.* 2018; 25(1): 100-6. [In Persian]
- 7- Yazdani M, Jookar Kashi, F., Toluei, Z., Rahimi-Moghaddam, A. Evaluation of

عفونت‌های قارچی بتوان از این گیاه بهره جست. با توجه به حضور همیشگی قارچ‌ها به‌ویژه خانواده مالاسزیای در محیط زیست و خطر بیماری‌زایی در انسان و حیوان، پیشگیری و کنترل رشد این قارچ مد نظر همگان قرار دارد. استفاده از ترکیبات فاقد عوارض جانبی و مؤثر با منشاء گیاهی همواره دیدگاه پژوهشگران بسیاری را منعطف کرده است. لذا با بروز مقاومت‌های دارویی و تأثیرات جانبی داروهای سنتتیک و شیمیایی، گل بیدمشک به‌عنوان یک ضد قارچ می‌تواند به جوامع بشری سودرسان باشد.

- phytochemical, cytotoxic, antioxidant and antibacterial activity of *Melissa officinalis* L. from Marivan region. *Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants.* 2020; 8(1): 16-30. [In Persian]
- 8- MA. F. Plants and Gardens: Tehran; Karang. 2007. [In Persian]
 - 9- Bonaterra GA, Kelber O, Weiser D, Metz J, Kinscherf R. In vitro anti-proliferative effects of the willow bark extract STW 33-I. *Arzneimittelforschung.* 2010; 60(06): 330-5.
 - 10- Ebrahimian J, Khayatkashani M, Soltani N, Yousif QA, Salavati-Niasari M. Catechin mediated green synthesis of Au nanoparticles: Experimental and theoretical approaches to the determination HOMO-LUMO energy gap and reactivity indexes for the (+)-epicatechin (2S, 3S). *Arabian Journal of Chemistry.* 2022; 15(5): 103758.
 - 11- Enayat S, Banerjee S. Comparative antioxidant activity of extracts from leaves, bark and catkins of *Salix aegyptiaca* sp. *Food Chemistry.* 2009; 116(1): 23-8.
 - 12- Tawfeek N, Mahmoud MF, Hamdan DI, Sobeh M, Farrag N, Wink M, et al. Phytochemistry, pharmacology and medicinal uses of plants of the genus *Salix*: an updated review. *Frontiers in pharmacology.* 2021; 12: 593856.
 - 13- Carrillo-Muñoz AJ, Rojas F, Tur-Tur C, de los Ángeles Sosa M, Diez GO, Espada CM, et al. In vitro antifungal activity of topical and systemic antifungal drugs against *M. alassezia* species. *Mycoses.* 2013; 56(5): 571-5.
 - 14- Lee J-H, Lee J-S. Inhibitory effect of plant

essential oils on *Malassezia pachydermatis*. *Journal of Applied Biological Chemistry*. 2010; 53(3): 184-8.

15- Popova TP, Kaleva MD. Antimicrobial effect in vitro of aqueous extracts of leaves and branches of willow (*Salix babylonica* L.). *Int J Curr Microbiol Appl Sci*. 2015; 4: 146-52.

16- Zarger MSS, Khatoon F, Akhtar N. Phytochemical investigation and growth inhibiting effects of *Salix alba* leaves against some pathogenic fungal isolates. *World J Pharm Pharmacol*. 2014; 3: 1320-30.

17- Gandamkarzadeh M GMA, Kamalinejad M., Mahboubi A. Antibacterial effects of ethanolic and aqueous extracts of *Salix aegyptiaca* L on three species of gram-positive and gram-negative bacteria. *2nd International Conference on Medicinal Plants, Organic Agriculture, Natural Resources and Pharmaceutical*. 2007.

18- Tarbatinejad P, Seyede, M. Mirtaghi, F. L., Hanieh, B. Comparison of antibacterial effect of ethanolic extract of *Mentha longifolia* leaves in different habitats of northern Iran. *Journal of Medicinal Plants Ecophytochemistry*. 2014; 7(3): 57-67.

19- Alhasan DA, Husein HA, Dawood AQ. In Vitro Antimicrobial Activity of The Filtrate Crude Extract Produced by *Aspergillus niger*. *University of Thi-Qar Journal of Science*. 2019; 7(1): 66-71.

20- Ashrafi Tamai I, Zahraei Salehi T, Khosravi A, Sharifzadeh A, Balal A. Chemical composition and anti-candida activity of *Trachyspermum ammi* essential oil on azoles resistant *Candida albicans* isolates from oral cavity of HIV+ patients. *Journal of Medicinal Plants*. 2013; 12(46): 137-49. [In Persian]

21- Michael A, Vishnu C, Ana E, Mahmoud A, Linda L, Frank C. NCCLS, Reference Method

for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard, M27-A2. Wayne, PA: CLSI. 2002.

22- Espinel-Ingroff A, Pfaller M. Susceptibility test methods: Yeasts and filamentous fungi. *Manual of clinical microbiology*. 2006; 9(2):1972-86.

23- Safarkar R, Bonabi R, Massiha A, Rezaei Nazifi M, Sotoudeh R. An Evaluation of the Inhibitory and Synergistic Effects of Alcoholic Extract of *Stachys Byzantina* on Standard Strains under in vitro Conditions. *Journal of Babol University of Medical Sciences*. 2017; 19(5): 39-46. [In Persian]

24- Ghada A, Fawzy Areej M, Al-Taweel, Nahla AM. In Vitro Antimicrobial and Anti-Tumor Activities of Intracellular and Extracellular extracts of *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* var. *Columinari* *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2011; 1(3): 980-7.

25- Sajadi Kabodi P, Bakhshi D, Moghadamnia A, Sefidgar A. The antibacterial effects of methanol extract of *Ammi majus* on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Journal of Babol University of Medical Sciences*. 2017; 19(1): 36-42. [In Persian]

26- Sati S, Singh H, Badoni P, Sati M. Screening of fungicidal activity of *salix* and *triumfetta* species of garhwal himalaya. *AJPCT*. 2013; 1: 486-9.

27- González-Alamilla EN, Gonzalez-Cortazar M, Valladares-Carranza B, Rivas-Jacobo MA, Herrera-Corredor CA, Ojeda-Ramírez D, et al. Chemical constituents of *Salix babylonica* L. and their antibacterial activity against gram-positive and gram-negative animal bacteria. *Molecules*. 2019; 24(16): 2992.

The Antifungal Effect of *Salix egyptica* Extract on *Malassezia pachydermatis* (ATCC 10231) and its Comparison with Clotrimazole

Arian Nematinezhad¹, Issa Gholampour Azizi^{2*}

1- Graduate student, Faculty of Veterinary Medicine, Babol Branch, Islamic Azad University, Babol, Iran.

2- Department of Mycology, Faculty of Veterinary Medicine, Babol Branch, Islamic Azad University, Babol, Iran.

Receive: September 11, 2022; Revise: October 29, 2022; Accept: October 30, 2022

Summary

Malassezia pachydermatis, as an opportunistic yeast, exists on the skin of humans and animals and takes effect if the immune system is weak. *Salix egyptica* flower has antioxidant and cholesterol-lowering properties, and it is also used to relieve pain and inflammation. In the study, the inhibitory effects of aqueous, ethanolic, and methanolic extracts of this plant on this yeast were investigated. Aqueous, ethanolic, and methanolic extracts were prepared with a Soxhlet extractor. The disk and well diffusion, the determination of minimum inhibitory concentration (MIC), and the determination of minimum fungal concentration (MFC) were studied in the laboratory to evaluate the antifungal effects of these extracts on *Malassezia pachydermatis*. This yeast prepared of the collection microbial center shahriar with code ATCC 10231. The mean minimum inhibitory concentrations (MIC) on *Malassezia pachydermatis* were 8.3×10^3 µg/ml for ethanolic extract, 1.2×10^4 µg/ml for methanolic, and 1.4×10^4 µg/ml for aqueous. MFC 20.8×10^4 µg/ml was in ethanolic extract, 1.6×10^4 µg/ml in methanolic extract, 5×10^4 µg/ml in aqueous extract. Findings indicate that alcoholic and aqueous extracts of Pussy willow have anti- *Malassezia Pachydermatis* effects, however, lower than Clotrimazole.

Key words: Clotrimazole, Disc, *Malassezia Pachydermatis*, *Salix egyptica* flower, Well