مقاله پژوهشی

مطالعه تاثیر عصاره الکلی بره موم (پروپولیس) حاصل از کندوهای زنبور عسل آذربایجان غربی علیه رشد قارچ‌های درماتوفیت و غیر درماتوفیت و آنالیز ترکیبات سازنده آن با روش GC-MS

دکتر عبدالغفار اونق[۱]، دکتر امیر توکمه‌چی[*۲]، مسعود ادیب حسامی[۳]، سمیرا ابراهیم زاده[٤]

تاریخ دریافت ۸۸/۱۱/۱۲، تاریخ پذیرش ۸۹/۱/۱۸

چکیده

پیش زمینه و هدف: بره موم ماده‌ای شبیه موم و از فرآورده‌های فرعی زنبور عسل بوده که خواص پزشکی آن اثبات شده است. هدف از بررسی حاضر مقایسه تاثیر عصاره الکلی بره موم جمع‌آوری شده از کندوهای زنبور عسل آذربایجان غربی علیه قارچ‌های درماتوفیت و غیر درماتوفیت می‌باشد.

مواد و روش کار: در این بررسی خواص ضدقارچی عصاره الکلی بره موم به‌طور مقایسه‌ای علیه قارچ‌های درماتوفیتی میکروسپوروم کنیس، میکروسپوروم ژیپسئوم، میکروسپوروم نانوم، تریکوفایتون روبروم، تریکوفایتون منتاگروفیتس و اپیدرموفایتون فلوکوزوم و نیز قارچ‌های غیر درماتوفیتی آسپرژیلوس نایجر، کاندیدا آلبیکنس و ساکارومایسس سرویسیه در حضور داروی استاندارد نیستاتین مطالعه شد. در این مطالعه ترکیب شیمیایی عصاره الکلی بره موم به کمک کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنجی (GC-MS) مورد تجزیه قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج حاصل نشان می‌دهد حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره الکلی بره موم علیه درماتوفیت‌ها از ۶۲/۵ µg/ml تا ۵۰۰ و در مورد قارچ‌های غیردرماتوفیتی از ۶۲/۵ µg/ml تا ۱۲۵ متغیر بود. مقایسه تاثیر عصاره علیه قارچ‌های مورد مطالعه هیچ‌گونه اختلاف آماری معنی‌داری را در سطح ۹۵درصد نشان نداد. در تجزیه شیمیایی عصاره ۲۶ ترکیب آلی مختلف شناسایی شد و فلاونوئیدها نسبت به سایر ترکیبات بیشترین ماده آلی آن را تشکیل دادند.

بحث و نتیجه‌گیری: باتوجه به خواص ضدقارچی مناسب عصاره الکلی بره موم، می‌توان نتیجه‌گیری نمود که این ماده طبیعی قادر است استفاده‌های زیادی در صنایع دارویی، آرایشی، بهداشتی و غذایی داشته باشد. اما جهت کسب نتیجه بهتر نیاز به انجام مطالعات آزمایشگاهی و میدانی بیشتری وجود دارد.

کلید واژه‌ها: عصاره الکلی بره موم، مهار کنندگی رشد، درماتوفیت، غیردرماتوفیت، GC-MS

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و یکم، شماره سوم، ص ۲۱٤-۲۰٦، پاییز ۱۳۸۹

آدرس مکاتبه: ارومیه، خیابان شهید بهشتی، دانشگاه ارومیه، پژوهشکده آرتمیا و جانوران آبزی، تلفن: ۰۴۴۱-۳۴۴۰۲۹۵

E-mail: atokmachi@gmail.com

مقدمه

ژل رویال[5] و بره موم[6] از جمله فراورده‌های فرعی زنبور عسل به شمار می‌روند که بشر طی قرن‌های گذشته همواره از آن‌ها در طب سنتی بهره گرفته است. بره موم عبارتست از یک ماده رزینی، سفت و قهوه‌ای رنگ که توسط زنبور عسل[7] از صمغ، جوانه و سایر بخش‌های گیاهان مختلف از جمله: اکالیپتوس، صنوبر، شاه بلوط، کاج، نارون، بید و سپید دار تهیه می‌شود. ماده اولیه پس از جمع آوری تحت تاثیر آنزیم بتا-گلوکوزیداز[8] مترشحه از غدد بزاقی زیر حلقی[9] زنبور عسل، هیدرولیز شده و حشره از بره موم حاصل برای مسدود نمودن درزها و شکاف‌های موجود در کندو استفاده

[۱] استادیار قارچ شناسی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

[۲] استادیار میکروبیولوژی، گروه پاتوبیولوژی و کنترل کیفی، پژوهشکده آرتمیا و جانوران آبزی، دانشگاه ارومیه (نویسنده مسئول)

[۳] دانشجوی دکتری حرفه‌ای دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

[٤] دانشجوی دکتری حرفه‌ای دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

[5] Royal Jelly
[6] Propolis
[7] Honeybee (Apis mellifera carnica)
[8] β-glucosidase
[9] Hypopharyngeal salivary glands

می‌کند (۱،۵). امروزه محققان کاربردهای پزشکی بسیار متنوعی را برای بره موم اثبات کرده‌اند، مانند درمان انواع بیماری‌های التهابی، بیماری‌های قلبی، دیابت شیرین، مسمومیت کبدی[1]، سرطان و غیره (۵).

ترکیب شیمیایی بره موم از نظر کیفی و کمی بسته به پوشش گیاهی هر منطقه متغییر است، اما به‌طور طبیعی از ۵۰ درصد صمغ (عمدتا فلاونوئیدها[2] و اسیدهای فنلی آن‌ها)، ۳۰ درصد موم، ۱۰ درصد روغن‌های فرار، ۵ درصد گرده گل و ۵ درصد انواع مختلف ترکیبات آلی تشکیل شده است.

پلی فنل‌ها به دلیل قابلیت مهار انواع آنزیم‌ها از نظر فارماکولوژیکی جزء فعال بره موم بوده و از این نظر مورد توجه هستند. همچنین مطالعات بالینی نشان داده است که پروپولیس حاوی غلظت‌های بالای فلاونوئیدها بوده که به دلیل داشتن خواص ضدمیکروبی به‌طور گسترده‌ای از آن برای تهیه مواد بهداشتی و دارویی استفاده می‌شود (۶).

درماتوفیت‌ها از جمله قارچ‌های رشته‌ای ایجاد کننده درماتوفیتوز یا کچلی بوده که براساس خصوصیات میکروسکوپی به سه جنس تریکوفیتون[3]، میکروسپوروم[4] و اپیدرموفیتون[5] تقسیم می‌شوند. این قارچ‌ها کراتین دوست بوده، با هجوم به بافت‌های کراتینی نظیر پوست، مو و ناخن باعث بروز بیماری می‌شوند (۱). همچنین در طی سه دهه گذشته، به موازات شیوع بیماری ایدز و برخی بیماری‌های مزمن، و نیز کاربرد روش‌های تهاجمی پزشکی در درمان و تجویز داروهایی که به نوعی در اختلال سیستم ایمنی انسان دخیل هستند، شیوع گروهی از عفونت‌های قارچی غیردرماتوفیتی سیستمیک و فرصت طلب از جمله اشکال مختلف آسپرژیلوس، کاندیدا، کریپتوکوکوس، هیستوپلاسما و غیره افزایش یافته است (۲).

در دهه ۱۹۹۰ مقاومت دارویی مشکلات مهمی را برای درمان برخی از بیماری‌های عفونی نظیر ایدز، سل و سایر بیماری‌های عفونی باکتریایی ایجاد کرد. این مسئله سبب افزایش بروز برخی از عفونت‌های قارچی شد، که عوامل دیگری نظیر تغییر وضعیت سیستم ایمنی در اثر مصرف داروهای سرکوبگر مثل کورتون‌ها، شیمی درمانی سرطان‌ها، پیوند بافت و مغز استخوان در این افزایش بی‌تاثیر نبود.

به دنبال افزایش میزان عفونت‌های قارچی نیاز به داروهای ضدقارچی جدید به‌دلیل عدم کارآیی داروهای قدیمی، اثرات جانبی آن‌ها و نیز مقاومت سویه‌های نو ظهور بیش از بیش احساس شد (۸).

مصرف بی‌رویه داروهای ضدقارچی جدید گذشته از احتمال بروز مقاومت دارویی در برابر آن‌ها، در اکثر موارد گران قیمت بوده و می‌توانند اثرات جانبی زیادی بر سلامت انسان داشته باشند. لذا طی ده سال گذشته تلاش برای یافتن داروهای ضدمیکروبی طبیعی به منظور پیشگیری از عوارض زیاد داروهای شیمیایی و نیز صرفه جویی اقتصادی افزایش یافته و در این رابطه بره موم گزینه خوبی می‌باشد.

مطالعات انجام شده توسط محققان نشان می‌دهد که عصاره الکلی بره موم دارای اثرات ضدقارچی مطلوبی علیه قارچ‌های درماتوفیت و غیردرماتوفیت است. برای مثال سیلیجی و همکاران نشان دادند که بره موم در مقایسه با کتوکونازول (داروی ضدقارچی) علیه گونه‌های مختلف کاندیدا که سبب عفونت‌های قارچی سطحی می‌شوند، موثرتر است (۲۶).

ضیاء و همکاران نیز ثابت کردند که عصاره الکلی بره موم می‌تواند رشد درماتوفیت‌های تریکوفیتون منتاگروفیتس[6]، تریکوفایتون روبروم[7] و تریکوفایتون وروکوزوم[8] را مهار سازد (۱). در مطالعه سکویرا و همکاران مشخص شد که رشد گونه‌های مختلف تریکوفایتون تحت تاثیر عصاره الکلی بره موم مهار می‌شود (۱۰). در حال حاضر مطالعات زیادی پیرامون اثرات ضدقارچی عصاره الکلی بره موم علیه قارچ‌های بیماری‌زا صورت گرفته است (۷،۱۱،۱۵،۱۶،۱۷،۲۱،۲۲،۲۴،۲۵)، اما مرور منابع علمی نشان می‌دهد تاکنون هیچ‌گونه مطالعه‌ای در ارتباط با مقایسه تاثیر عصاره الکلی بره موم علیه قارچ‌های درماتوفیت و غیردرماتوفیت انجام نشده است.

براساس مطالب ذکر شده می‌توان اهداف تحقیق حاضر را در چند مورد خلاصه کرد: مطالعه تاثیر عصاره الکلی بره موم جمع‌آوری شده از کندوهای زنبور عسل آذربایجان غربی بر رشد قارچ‌های درماتوفیت و غیر درماتوفیت، آنالیز ترکیب شیمیایی عصاره الکلی بره موم به کمک روش کروماتوگرافی گازی - طیف سنجی جرمی (GC-MS)[9]، یافتن حداقل غلظت مهار کننده[10] (MIC) و حداقل غلظت قارچ کشی[11] (MFC)عصاره الکلی بره موم علیه قارچ‌های مورد مطالعه.

[1] Hepatotoxicity
[2] Flavonoids
[3] Trichophyton
[4] Microsporum
[5] Epidermophyton
[6] Trichophyton mentagrophytes
[7] Trichophyton rubrum
[8] Trichophyton verrucosum
[9] Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)
[10] Minimal Inhibition Concentration
[11] Minimal Fungicidal Concentration

مواد و روش‌ها

الف) تهیه بره موم و عصاره الکلی:

بره موم مورد استفاده در این پژوهش از کندوهای زنبور عسل واقع در نواحی مختلف آذربایجان غربی جمع آوری شد. سپس نمونه‌ها در اسرع وقت به آزمایشگاه قارچ شناسی دانشکده دامپزشکی منتقل و تا زمان عصاره گیری در دمای ۴°C نگهداری شدند. در این بررسی تهیه عصاره الکلی مطابق روش بوسیو و همکاران انجام گرفت. به‌طور خلاصه، ابتدا قطعات بزرگ بره موم به قطعات ریز خرد شده سپس ۲۵ گرم از آن با ۲۵۰ میلی لیتر محلول اتانل ۸۰ درصد مخلوط و به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق در سطح افق تکان داده شد (۱۵۰ دور در دقیقه). سپس عصاره الکلی حاصل توسط کاغذ صافی نمره ۴۲ واتمن[1] دو بار صاف شده و به کمک دستگاه روتاری الکل آن تبخیر و عصاره الکلی خالص به‌دست آمد. سپس عصاره خالص بدست آمده توزین و محلول ۱۰درصد (وزن به حجم) آن در الکل ۸۰ درجه (Merck, Germany) تهیه و تا زمان استفاده در ظرف شیشه‌ای تیره و دمای ۴°C نگهداری شد (۱۸).

ب) آنالیز شیمیایی عصاره الکلی با GC-MS:

در این پژوهش از دستگاه کروماتوگرافی گازی (ترموفینیگان[2]، (ترموفینیگان[2]، آمریکا) مجهز به طیف سنج[3] برای آنالیز شیمیایی شیمیایی عصاره الکلی بره موم استفاده شد. ستون موئینه بکار رفته از جنس سیلیکای گداخته و به قطر داخلی ۰/۲۵ میلی متر و طول ۳۰ متر بود. برنامه حرارتی ستون شامل دمای اولیه ۱۰۰°C، دمای نهایی ۲۸۰°C بود و سرعت افزایش دما ۲۰°C در دقیقه تنظیم شد. دمای محفظه تزریق و ترانسفر لاین به ترتیب ۲۶۰°C و ۲۵۰°C بود. همچنین از گاز هلیوم با سرعت یک میلی لیتر در دقیقه و حجم تزریق یک میلی لیتر به عنوان حامل استفاده شد.

سیستم تله یونی مورد استفاده در طیف سنج دارای انرژی یونیزاسیون ۸۰ الکترون ولت بود. شاخص بازداری[4] هر پیک (ترکیب) با زمان بازداری[5] هیدروکربن‌های نرمال (C8-C40) تزریق شده در شرایط یکسان با تزریق عصاره الکلی بره موم، مقایسه و محاسبه شد. در نهایت همه ترکیبات بر اساس مقایسه طیف MS و شاخص بازداری آن‌ها نسبت به مقادیری که در منابع مختلف منتشر شده (مانند NIST[6]، Wiley و طیف‌های جرمی استاندارد) شناسایی شدند.

محاسبه کمی ترکیبات موجود در عصاره الکلی بره موم (تعیین درصد هر ترکیب) به کمک داده پرداز Xcalibur (ترموفینیگان، آمریکا) به روش نرمال کردن سطح[7] و نادیده گرفتن ضرایب پاسخ[8] پاسخ[8] مربوط به طیف‌ها انجام گرفت (۳).

ج) تهیه سویه‌های قارچی

در این مطالعه از قارچ‌های درماتوفیتی میکروسپوروم کنیس، میکروسپوروم ژیپسئوم، میکروسپوروم نانوم، تریکوفایتون روبروم، تریکوفایتون منتاگروفیتس و اپیدرموفایتون فلوکوزوم (تهیه شده از کلکسیون قارچی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه) و نیز قارچ‌های غیر درماتوفیتی آسپرژیلوس نایجر(PTCC 5011)، کاندیدا آلبیکنس (PTCC 5027) و ساکارومایسس سرویسه (ATCC 2601) استفاده شد. قارچ‌های مذکور در محیط کشت سابرو دکستروز براث (Merck, Germany) به مدت یک هفته و دمای ۲۵°C کشت داده شده و پس از رشد از آن‌ها برای تلقیح استفاده گردید.

د) آزمون‌های تعیین حساسیت

از روش‌های زیر برای مقایسه اثر ضد قارچی عصاره الکلی بره موم علیه قارچ‌های درماتوفیتی و غیردرماتوفیتی استفاده شد. لازم به ذکر است که همه آزمایشات سه بار تکرار گردید.

روش براث میکرو دایلوشن[9]: از این روش برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC[10]) و حداقل غلظت کشندگی (MFC[11]) استفاده شد.

به‌طور خلاصه، رقت‌های سریال نیم برابر از عصاره الکلی بره موم در میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ته گرد (از غلظت ۸۰۰۰ µg/ml در خانه اول تا ۱۵/۶۲ µg/ml در خانه دهم از ۱۲ خانه یک میکروپلیت) حاوی محیط کشت سابرودکستروز براث (Merck, Germany) تهیه گردید. یک میکروپلیت نیز به عنوان کنترل محیط و حلال (الکل ۸۰ درجه) اختصاص داده و رقت‌های مذکور در آن تهیه شد. در مرحله بعد سوسپانسیون قارچ‌های مورد مطالعه معادل لوله نیم مک فارلند ($1-2\times10^8$ CFU/ml) در سرم فیزیولوژی استریل تنظیم و غلظت‌های ثابتی از آن‌ها (طوری‌که در نهایت تراکم قارچ‌ها در هر خانه 10^5 CFU شود) به هر خانه اضافه و میکروپلیت‌ها به مدت ۱۰-۷ روز در دمای ۲۵°C انکوبه شدند. پس از انکوباسیون هر خانه با کنترل مقایسه و در صورت رشد نتایج ثبت می‌گردید.

[1] Whatman
[2] Thermofinigan
[3] TRACE 2000 / EI quadrapole
[4] Retention Index
[5] Retention Time
[6] National Institute of Standards and Technology
[7] Area Normalization Method
[8] Response Factors
[9] Micro-broth dilution method
[10] Minimum Inhibitory Concentration
[11] Minimum Fungicidal Concentration

طبق تعریف MIC برابر است با کم‌ترین غلظتی از بره موم که مانع رشد قارچ‌های مورد آزمایش گردد (غلظت آخرین چاهکی که در آن هیچ کدورتی ایجاد نشده باشد). برای هر قارچ از نیستاتین به عنوان کنترل مثبت داروی ضد قارچی استفاده شد (۲۷).

همچنین طبق تعریف MFC برابر است با حداقل غلظتی از بره موم که ۹۹/۹ درصد از تراکم اولیه قارچ را کاهش دهد. برای اندازه گیری آن همه خانه‌های فاقد کدورت روی محیط سابرودکستروز آگار (Merck, Germany) کشت داده شده و پلیت‌ها به مدت ۱۰-۷ روز در دمای ۲۵°C انکوبه شدند. پس از انکوباسیون کم‌ترین غلظتی از بره موم که در آن کلنی قارچی رشد نکرده بود به عنوان غلظت کشندگی MFC گزارش شد.

روش انتشار در آگار[1]: به منظور مقایسه تاثیر عصاره الکلی بره موم علیه قارچ‌های درماتوفیتی و غیردرماتوفیتی از روش انتشار در آگار (روش چاهک) نیز استفاده شد. جهت انجام این آزمایش در پلیت حاوی ۱۰ ml محیط سابرودکستروز آگار چاهک‌هایی به قطر ۶ cm و به تعداد سه عدد حفر شد. سپس به‌طور جداگانه هر کدام از قارچ‌های مورد مطالعه توسط سواب استریل (از سوسپانسیون 10^6 CFU/ml) بصورت خطی در تمام سطوح پلیت مربوطه کشت شدند. سرانجام چاهک‌ها توسط ۵۰ µl از رقت‌های نیم برابر عصاره الکلی بره موم پر و اجازه داده شد پلیت‌ها به مدت ۱۰-۷ روز در دمای ۲۵°C انکوبه شوند. پس از اتمام انکوباسیون به کمک خط کش قطر منطقه مهار رشد[2] اندازه گیری و ثبت گردید (۱).

ه) تجزیه و تحلیل‌های آماری

آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۵ برای ویندوز (SPSS، شیکاگو، ایلینویز، ایالات متحده آمریکا) انجام شد. اختلاف آماری بین گروه‌های آزمایشی با استفاده از آزمون تی‌تست و آنالیز واریانس یک طرفه[3] انجام گرفت؛ حدود اطمینان مطالعه ۹۵ درصد بود.

یافته‌ها

در این مطالعه خاصیت ضد قارچی عصاره الکلی بره موم علیه قارچ‌های درماتوفیتی و غیردرماتوفیتی با دو روش براث میکرودایلوشن و انتشار در آگار بررسی شد. نتایج حاصل از آزمون براث میکرودایلوشن یعنی حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MFC) در جدول ۱ و ۲ نشان داده شده است.

در مورد قارچ‌های درماتوفیتی میکروسپوروم کنیس، میکروسپوروم ژیپسئوم، میکروسپوروم نانوم، تریکوفایتون روبروم، تریکوفایتون منتاگروفیتس و اپیدرموفایتون فلوکوزوم حداقل غلظت مهار کنندگی عصاره الکلی بره موم به ترتیب ۱۲۵، ۵۰۰، ۵۰۰، ۵۰۰، ۶۲/۵ و ۱۲۵ میکروگرم در میلی لیتر و حداقل غلظت کشندگی به ترتیب ۶۲/۵، ۱۲۵، ۱۲۵، ۱۲۵، ۶۲/۵ و ۱۲۵ میکروگرم در میلی لیتر بود.

همچنین حداقل غلظت مهار کنندگی عصاره الکلی بره موم روی قارچ‌های غیر درماتوفیتی آسپرژیلوس نایجر، کاندیدا آلبیکنس و ساکارومایسس سرویسیه به ترتیب ۱۲۵، ۶۲/۵ و ۶۲/۵ میکروگرم در میلی لیتر و حداقل غلظت کشندگی آن به ترتیب ۲۵۰، ۱۲۵ و ۱۲۵ میکروگرم در میلی لیتر بود. لازم به ذکر است که کنترل حلال مورد استفاده در این مطالعه یعنی الکل ۸۰ درصد تاثیری روی قارچ‌های مورد مطالعه نداشت (براساس نتایج حاصل از این بررسی کم‌ترین غلظت مهارکنندگی آن بالاتر از ۸۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر می‌باشد).

میانگین منطقه مهار رشد ناشی از تاثیر عصاره الکلی بره موم علیه قارچ‌های درماتوفیتی و غیر درماتوفیتی در جدول ۳ نشان داده شده است. در مورد روش انتشار در آگار یک رابطه خطی وابسته به دوز از رقت‌های مختلف عصاره الکلی بره موم علیه همه قارچ‌های مورد مطالعه بدست آمد (نتایج نشان داده نشده است). برای مثال در مورد قارچ غیردرماتوفیتی آسپرژیلوس نایجر حداقل غلظتی از عصاره الکلی بره موم که اجازه داد قطر منطقه مهار رشد ایجاد گردد ۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر و در مورد میکروسپوروم کنیس ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر بود.

همچنین در بررسی حاضر ترکیب شیمیایی عصاره الکلی بره موم تهیه شده در الکل ۸۰ درصد به کمک روش کروماتوگرافی گازی- طیف سنجی جرمی (GC-MS) آنالیز شد، که نتایج حاصل از آن در جدول ۴ نشان داده شده است.

از جمله مهم‌ترین ترکیباتی که به کمک این روش شناسایی شدند شامل پینوستروبین[4]، دی هیدروکریزین[5]، کریزین[6] و نارینجنین[7] بود.

[1] Agar-well diffusion method
[2] Zone of Inhibition
[3] One way analysis of variance (ANOWA)
[4] Pinostrobin
[5] Dihydrochrysin
[6] Chrysin
[7] Naringenin

جدول شماره (۱): حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MFC) عصاره الکلی بره موم علیه درماتوفیت‌ها (µg/ml).

ماده	م. کنیس		م. ژیپسئوم		م. نانوم		ت. روبروم		ت. منتاگروفیتس		ا. فلوکوزوم	
	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
بره موم	۶۲/۵	۱۲۵	۱۲۵	۵۰۰	۱۲۵	۵۰۰	۱۲۵	۵۰۰	۶۲/۵	۶۲/۵	۱۲۵	۱۲۵
نیستاتین	۳۱/۲۵	۶۲/۵	۳۱/۲۵	۶۲/۵	۱۵/۶	۳۱/۲۵	۶۲/۵	۶۲/۵	۳۱/۲۵	۶۲/۵	۱۵/۶	۳۱/۲۵

جدول شماره (۲): حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MFC) عصاره الکلی بره موم علیه قارچهای غیردرماتوفیت (µg/ml).

ماده	آ. نایجر		ک. آلبیکنس		س. سرویسه	
	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
عصاره الکلی بره موم	۲۵۰	۱۲۵	۱۲۵	۶۲/۵	۱۲۵	۶۲/۵
نیستاتین	۱۲۵	۶۲/۵	۱۲۵	۶۲/۵	۱۲۵	۶۲/۵

جدول شماره (۳): میانگین قطر منطقه مهار رشد قارچها (mm) در اثر غلظت‌های مختلف عصاره الکلی بره موم و نیستاتین.

	گونه قارچی	رقت‌های بره موم×										نیستاتین
		۱۰	۹	۸	۷	۶	۵	۴	۳	۲	۱	
درماتوفیت	م. کنیس	-	-	۱۹	۱۹	۲۱	۲۳	۲۴	۲۸	۳۱	۳۴	۱۲
	م. ژیپسئوم	-	-	-	۸	۱۱	۱۵	۱۶	۲۰	۲۴	۳۰	۱۳
	م. نانوم	-	-	-	۷	۱۱	۱۴	۱۷	۱۹	۲۱	۲۵	۱۲
	ت. روبروم	-	-	-	۹	۱۲	۱۵	۱۶	۲۰	۲۳	۲۷	۱۰
	ت. منتاگروفیتس	-	-	۳۵	۳۵	۳۶	۳۸	۳۹	۴۰	۴۱	۴۴	۹
	ا. فلوکوزوم	-	-	-	۱۹	۲۱	۲۳	۲۴	۲۸	۳۱	۳۲	۱۳
غیر درماتوفیت	آ. نایجر		-	-	۱۷	۱۹	۲۲	۲۵	۲۶	۲۸	۳۱	۱۱
	ک. آلبیکنس	-	-	۲۹	۲۹	۳۰	۳۴	۳۵	۳۹	۴۱	۴۲	۹
	س. سرویسه	-	-	۲۹	۳۰	۳۲	۳۳	۳۶	۳۶	۳۸	۴۰	۱۰

*غلظت بره موم از رقت ۱۰-۱: µg/ml ۱۵/۶۲ و ۳۱/۷۵، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۴۰۰۰، ۸۰۰۰.

جدول ۴. ترکیب شیمیایی عصاره الکلی بره موم.

Compounds	درصد	Retention Time
Aldehydes		
2-Hydroxy-5-methylbenzaldehyde	2.22	9.77
Flavonoids		
5-Hydroxy-7-methoxy flavanone (pinostrobin)	8	15.14
5,7,40-Trihydroxy flavanone (naringenin)	3.14	15.53
5,7-Dihydroxy flavone (chrysin)	5.41	16.08
Dihydrochrysin	9.69	14.37
Aromatic acids		
3(3,4-Dihydroxyphenyl)-2-propenoic acid (caffeic acid)	5.09	13.51
Sesquiterpenes		
Cis-lanceol	2.22	10.15
Caryophyllene oxide	7.38	11.48
Eudesmol	7.38	10.57
6-Hydroxy-1-oxogermacr-4,10(15),11(13)-trien-12,8-olide	0.2	12.33
Triterpenes		
3,12-Oleandione	0.52	17.77
Alcohol		
1-Heptatriacotanol	2.16	12.25
Aliphatic hydrocarbons		
1,5,5-Trimethyl-6-methylene-cyclohexene	3.01	13.02
Alfaxalone	5.09	13.89
Aromatic hydrocarbons		
2-Amino-1-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl) ethanone	5.87	13.31
1,3,8-trihydroxy-6-methylanthracene-9,10-dione	4.27	16.54

بحث و نتیجه‌گیری

یافته‌های حاصل از این مطالعه نشان داد که عصاره الکلی بره موم حاصل از کندوهای زنبور عسل استان آذربایجان غربی دارای خواص ضدقارچی است. این یافته‌ها با نتایج سایر مطالعات که نشان دهنده اثرات ضد قارچی عصاره الکلی بره موم می‌باشد، مشابهت دارند (۱،۷،۱۰،۱۱،۱۶،۱۷،۲۱،۲۲،۲۴،۲۵).

مقایسه تاثیر این عصاره علیه قارچهای درماتوفیتی و غیردرماتوفیتی اختلاف آماری معنی‌داری را در حدود اطمینان ۹۵درصد آشکار نمی‌سازد. به عبارت دیگر عصاره الکلی بره موم تقریباً به یک نسبت از رشد قارچهای درماتوفیتی و غیردرماتوفیتی جلوگیری می‌نماید.

مطالعات قبلی نشان دادند حداقل غلظتی از بره موم (MIC) که مانع رشد قارچهای تریکوفایتون روبروم، تریکوفایتون منتاگروفیتس و اپیدرموفایتون فلوکوزوم می‌گردد به ترتیب µg/ml ۱۲۵، ۲۵۰ و ۱۲۵ می‌باشد (۲۲).

مقایسه نتایج مطالعه حاضر، با یافته‌های مطالعات این محققان هم‌خوانی داشته و اختلاف جزئی مشاهده شده می‌تواند ناشی از این مسئله باشد که ترکیب شیمیایی بره موم بسته به پوشش گیاهی هر منطقه نسبت به ترکیب شیمیایی بره موم سایر مناطق متفاوت است. همچنین نوع سویه قارچی مورد استفاده در مقایسه با سویه دیگر از همان گونه می‌تواند پاسخ متفاوتی از خود نشان دهد. از طرف دیگر نتایج بررسی حاضر نشان داد که عصاره الکلی بره موم می‌تواند با حداقل غلظت µg/ml ۱۲۵، ۵۰۰ و ۵۰۰ به ترتیب رشد میکروسپوروم کنیس، میکروسپوروم جیپسئوم و میکروسپوروم نانوم را مهار سازد. براساس دانسته‌های ما، تاکنون اطلاعات زیادی پیرامون تاثیر عصاره بره موم علیه گونه‌های مختلف میکروسپوروم وجود ندارد. از این رو لازم است مطالعات بیشتری توسط محققان دیگر و با استفاده از بره موم مناطق مختلف دنیا انجام گیرد.

آگورو و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که عصاره الکلی بره موم قادر نیست رشد گونه‌های مختلف قارچ آسپرژیلوس را مهار سازد (۱۱). اما نتایج مطالعه ما نشان می‌دهد که حداقل غلظت ۱۲۵µg/ml عصاره الکلی بره موم می‌تواند رشد قارچ آسپرژیلوس نایجر را مهار کند، این یافته با نتایج کویروگا و همکاران (۲۰۰۶) مطابقت دارد (۲۵). زیرا این محققان نیز ثابت کردند که غلظت µg/ml ۱۹/۴ عصاره خالص بره موم قادر است رشد آسپرژیلوس نایجر را مهار نماید. دلیل اختلاف نتایج آگورو و همکاران با یافته‌های ما و کویروگا و همکاران می‌تواند ناشی از نوع عصاره الکلی مورد استفاده باشد. آگورو و همکاران از متانل برای تهیه عصاره الکلی استفاده کردند، در حالی‌که در مطالعه حاضر و مطالعه کویروگا و همکاران از اتانل جهت تهیه عصاره الکلی بره موم استفاده شد. بر همین اساس توسی و همکاران ثابت کردند که حلال مورد استفاده جهت استخراج عصاره بره موم می‌تواند فعالیت ضد میکروبی آن را به‌طور معنی‌داری افزایش دهد (۹).

مکانیسم ضدقارچی بره موم توسط تاکایسی-کیکونی و شیلچر مطالعه شده است (۲۱). این محققان مشاهده کردند که بره موم از تکثیر مولکول DNA جلوگیری کرده و در نتیجه به‌صورت غیرمستقیم مانع تقسیم سلولی در قارچها می‌شود. همچنین ثابت شده است که خواص ضدقارچی بره موم به‌طور عمده ناشی از ترکیبات فلاونوئیدی[1] و اسید سینامیک[2] موجود در آن است. بنابراین استفاده از الکل اتیلیک موجب دست یابی بیشتر به این ترکیبات ضدقارچی در عصاره الکلی بره موم خواهد شد (۱۰).

تجزیه شیمیایی عصاره الکلی بره موم مطالعه شده در این بررسی نشان می‌دهد که فلاونوئیدها ۲۶/۲۴ درصد ترکیبات (جدول ۴) را شامل می‌شوند، به این ترتیب خواص ضدقارچی بره موم حاصل از کندوهای زنبور عسل آذربایجان غربی قابل توجیه است.

با توجه به اثراتی که عصاره الکلی بره موم این منطقه علیه قارچهای درماتوفیتی و غیردرماتوفیتی دارد، می‌توان نتیجه گیری نمود که این ماده طبیعی قادر است استفاده‌های زیادی در صنایع دارویی، آرایشی، بهداشتی و غذایی داشته باشد. با این وصف هنوز نیاز به انجام مطالعات آزمایشگاهی و میدانی بیشتری جهت اخذ نتیجه بهتر وجود دارد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از زحمات جناب آقای دکتر فرشاد خیری عضو هیات علمی پژوهشکده علوم زیستی، دانشگاه ارومیه به خاطر آنالیز شیمیایی عصاره الکلی بره موم تشکر و قدردانی می‌شود. همچنین پژوهشگران مراتب تقدیر و تشکر خود را از حمایت‌های مالی معاونت پژوهشی دانشگاه ارومیه، وزارت علوم، تحقیقات و فنآوری ابراز می‌دارند.

[1] Flavonoids
[2] Cinnamic Acid

References:

1. Zia M, Mannani R, Mahmoodi M, Bayat M, Mohaghegh F. The Effects of alcoholic extract of propolis obtained from Iran bee hives on the growth of trichophyton mentagrophytis, trichophyton rubrum and trichophyton verrucosum. J Isfahan Med Sci 2009; 27(95): 232-41. (Persian)
2. Diba K, Mir Hendi H, Khoramizadeh M, Jalalizand N. Identification of most important pathogenic Aspergillus species using conformational polymorphism of single stranded PCR. Urmia Med J 2009; 20(3): 164-71. (Persian)
3. Assareh MH, Jaimand K. Introduction of two species of Eucalyptus (E. torquata and E. leucoxylon) as a rich sources of 1,8-cineole. Pajouhesh and Sazandegi J 2004; 68: 22-6. (Persian)
4. Talei GHR, Meshkatolsadat MH, Mosavi SZ. Antibacterial effect of Fumaria parviflora Lam., Allium haementhaides, Tragopon carcifolus, Buxus hyrecana pojark extracts and Lorestan two native species of Thymus extract. J Guilan Univ Med Sci 2008; 10(1): 31-5. (Persian)
5. El-Bassuony AA. New prenilated compound from Egyptian propolis with antimicrobial activity. Rev Latinoamer Quím 2009; 37(1): 85-90.
6. Eshraghi S, Valafar Sh. Evaluation of inhibitory effects of Iranian propolis against filamentous bacteria. Pak J Med Sci 2008; 24(1): 56-60.
7. Fernandes FF, Dias ALT, Ramos CL, Ikegaki M, Siqueira AM, Franco MC. The in vitro antifungal activity evaluation of propolis G12 ethanol extract on Cryptococcus neoformans. Rev Inst Med Trop S Paulo 2007; 49(2): 93-5.
8. White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. Clin Microbiol Rev 1998; 11(2): 382-402.
9. Tosi B, Donini A, Romagnoli C, Bruni A. Antimicrobial activity of some commercial extracts of Propolis prepared with different solvents. Phytother Res 1996; 10: 335-6.
10. Siqueira ABS, Gomes BS, CambuimI, Maia R, Abreu S, Souza-Motta CM, et al. Trichophyton species susceptibility to green and red propolis from Brazil. Lett Appl Microbiol 2009; 48: 90-6.
11. Aguero MB, Onzalez M, Lima B, Svetaz L, Sanchez M, Zacchino S, et al. Argentinean Propolis from Zuccagnia punctata Cav. (Caesalpinieae) exudates: Phytochemical characterization and antifungal activity. J Agric Food Chem 2010; 58: 194-201.
12. Kosalec I, Pepeljinjak S, Bakmaz L, Vladimir-Knezevic S. Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis products. Acta Pharm 2005; 55: 423-30.
13. Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee Propolis (Propolis). Food Chem Toxicol 1998; 36: 347-63.
14. Gregoris E, Stevanato R. Correlations between polyphenolic composition and antioxidant activity of Venetian propolis. Food Chem Toxicol 2010; 48: 76-82.
15. Silici S, Koc AN. Comparative study of in vitro methods to analyze the antifungal activity of propolis against yeasts isolated from patients with superficial mycoses. Lett Appl Microbiol 2006; 43: 318-24.
16. Koc AN, Cilici S. Comparative study of in vitro methods used to analyse the antifungal activity of propolis against Trichophyton rubrum and Trichophyton mentagrophytes. Ann Microbiol 2008; 58 (3): 543-7.
17. Silici S, Koc NA, Ayangil D, Cankaya S. Antifungal activities of Propolis collected by different races of honeybees against yeasts isolated from patients with superficial mycoses. J Pharmacol Sci 2005; 99: 39-44.

18. Bosio K, Avanzini C, Avolio AD, Ozino O, Savoia D. In vitro activity of propolis against Streptococcus pyogenes. Lett Appl Microbiol 2000; 31: 174-7.
19. Kiehlbauch JA, Hannett GE, Salfinger M, Archinal W, Monserrat C, Carlyn C. Use of the National committee for clinical laboratory standards guidelines for disk diffusion susceptibility testing in New York state laboratories. J Clinic Microbiol 2000, 38(9): 3341-8.
20. Jorgensen JH, Lee JC. Microdilution technique for antimicrobial susceptibility testing of Haemophilus influenza. Antimicrob. Agents Chemother 1975; 8(5): 610-11.
21. Ota C, Unterkircher C, Fantinato V, Shimizu MT. Antifungal activity of propolis on different species of Candida. Mycoses 2001; 44: 375-8.
22. Soares MMSR, Cury AE. In vitro activity of antifungal and antiseptic agents against dermatophyte isolates from patients with tinea pedis. Braz J Microbiol 2001; 32: 130-4.
23. Pfalleri MA, Barry AL. Evaluation of a novel colorimetric broth microdilution method for antifungal susceptibility testing of yeast isolates. J Clinic Microbiol 1994; 32(8): 1992-6.
24. Koc AN, Silici S, Mutlu-Sariguzel F, Sagdic O. Antifungal activity of Propolis in four different fruit juices. Food Technol Biotechnol 2007; 45 (1): 57-61.
25. Quiroga EN, Sampietro DA, Soberon JR, Sgariglia MA, Vattuone MA. Propolis from the northwest of Argentina as a source of antifungal principles. Lett Appl Microbiol 2006; 101: 103-10.
26. Koc AN, Cilici S, Mistik S. Comparison of in vitro activities of antifungal drugs and propolis against yeasts isolated from patients with superficial mycoses. Ann Microbiol 2007; 57 (2):269-72.
27. Qaiyami S. Macro- and microdilution methods of antimicrobial Susceptibility Testing. In: Schwalbe R, Steele-Moore L, Goodwin AC, Editors. Antimicrobial susceptibility testing protocols. 1st Ed. New York: Taylor & Francis Group: 2007. P.75-81.