Journal of Shaheed Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 18, No. 6, Jan-Feb 2011
Pages: 521-530

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۱۸، شماره ٦، بهمن و اسفند ۱۳۸۹
صفحه: ۵۳۰-۵۲۱

جمع آوری و شناسایی قارچ دارویی Phellinus conchatus از ایران و بررسی خواص ضد باکتریایی عصاره‌های متانولی تام و عصاره‌های جزئی آن

فریبا حکم اللهی[۱]، حسن رفعتی[۲]، حسین ریاحی[۳]، محمدحسین حکیمی[۴]، آتوسا علی احمدی[۵]، هاجر حیدری[۶]، فاطمه حقیرالسادات[۷]، مصطفی عظیم زاده[۸]، سعید علی موسی زاده[۹]

۱- کارشناسی ارشد سیستماتیک گیاهی، دانشگاه شهید بهشتی تهران
۲- استادیار گروه مهندسی شیمی، پژوهشکده گیاهان دارویی، دانشگاه شهید بهشتی تهران
۳- استاد دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی تهران
۴- استاد دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه یزد
۵- استادیار گروه زیست شناسی، پژوهشکده گیاهان دارویی، دانشگاه شهید بهشتی تهران
۶- کارشناسی ارشد شیمی گیاهی، پژوهشکده گیاهان دارویی، دانشگاه شهید بهشتی تهران
۷- کارشناسی ارشد فیزیولوژی گیاهی، دانشگاه شهید بهشتی
۸- کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه تهران
۹- کارشناسی ارشد سیستماتیک گیاهی، موسسه تحقیقات جنگل و مرتع پاسند مازندران

تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۱۰/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۷/۲۳

چکیده

مقدمه: ماکرومیست ها منابع جدیدی برای کشف ترکیبات جدید دارویی با اثرات مختلف بیولوژیک به شمار می‌آیند. Phellinus conchatus قارچی دارویی متعلق به خانواده Hymenochaetaceae می‌باشد. گونه‌های این قارچ علاوه بر داشتن خاصیت‌های آنتی‌اکسیدان، ضد سرطان و ضد باکتری در طب سنتی برای درمان بسیاری از بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد.

روش بررسی: در این تحقیق جمع‌آوری و شناسایی قارچ P. conchatus با استفاده از خصوصیات ماکرومورفولوژیکی و میکرومورفولوژیکی، روابط میزبانی و پراکنش انجام گرفت و سپس عصاره‌گیری جهت انجام آزمون زیست سنجی(Bioassay) علیه باکتری‌های گرم-منفی و گرم-مثبت به روش‌های انتشار روی دیسک، تعیین حداقل غلظت مهارکننده رشد(MIC) و حداقل غلظت کشنده (MBC) باکتری‌ها انجام پذیرفت.

نتایج: عصاره‌های متانولی تام و کلروفرمی اثرات بازدارنده روی ۳ باکتری Staphylococcus aureus، Pseudomonas aeruginosa و Bacillus cereus نشان می‌دهند و در مورد عصاره بوتانولی، نتایج MIC و MBC به ترتیب برای باکتری‌های مذکور (۱، 2mg.disk)، (۲، 4 mg.disk) و (۸، ۱۶mg.disk) مشاهده شدند.

نتیجه گیری: نتایج نشان می‌دهند که عصاره های مختلف به ویژه عصاره بوتانولی قارچ دارویی Phellinus با دارا بودن مواد موثر، باعث نشان دادن خواص ضد باکتریایی قوی این عصاره علیه باکتری‌ها به خصوص باکتری بیماریزای مهم Pseudomonas Aeruginosa شده است.

واژه‌های کلیدی: Phellinus- خواص ضد باکتری- خواص آنتی اکسیدانی- قارچ‌های دارویی- بومی ایران

*نویسنده مسئول؛ تلفن: ۰۳۵۱۸۲۴۶۸۷۲، پست الکترونیکی: fariba_hokmollahi@yahoo.com

www.SID.ir

مقدمه

استفاده از قارچهـای دارویـی تاریخچـه‌ای طـولانی در طـب سنتی شرق دارد. بـسیاری از قـارچهـایی کـه بـه طـور سـنتی استفاده می شوند، دارای ویژگی‌های دارویی مهمی هـستند(۱). در میان قارچها، قارچ هـای ماکروسـکوپی بازیدیومیـست دارای منابع عظیم درمانی و عناصر مفید و فعال بـه لحـاظ بیولوژیـک هستند. تقریباً ۷۰۰ گونه از بازیدیومیـست هـا وجـود دارنـد کـه دارای فعالیـت هـای دارویـی مهمـی مـی باشـند. در بـسیاری از کشورهای مختلف دنیا تلاش در جهت استفاده از قارچها و کشف متابولیت‌های آن‌ها برای درمان انواعی از بیماری‌ها در حال انجـام است. قارچ ها مشهور به داشتن مواد موثر برای فعالیت های ضـد قارچ، ضد التهاب، ضد سرطان، ضد ویروس، ضد باکتری، حفاظت کننده کبد، ضد دیابت و غیره هستند(۲). Hwang و همکـاران، ماده‌ای ضد قارچ به نام Phellinsin A از گونـه‌هـای Phellinus جدا کردند که قادر است آنزیم‌های سنتز کننده کیتـین I و Π قارچ Saccharomyces cerevisiae را با مقـدار IC50 ۷۶µg/ml مهار کند، این ماده همچنین قادر است رشد بسیاری از قارچهـا را مهار کند(۳). اولین مطالعات روی توانـایی بازیدیومیـستها بـه عنـوان منـابع آنتـی بیوتیـک بـه وسـیله Anchel، Hervey و Wilkins در سال ۱۹۴۱ انجام شد، ایـن محققـان عـصاره‌هـای فروتینگ بادی و میسلیوم بیشتر از ۲۰۰۰ گونه را مورد آزمایش و بررسـی قـرار دادنـد و موفـق بـه جداسـازی و شناسـایی Pleuromutilin، دی ترپنی که به طـور ویـژه ای بـرای درمـان آلودگی های میکوپلاسم در حیوانات مـوثر اسـت، شـدند(۴). از این ترکیب برای تولید اولین آنتی بیوتیک اقتـصادی بـا منـشاء بازیدیومیست‌ها استفاده شد(۵،۶). فعالیت ضد باکتریایی عصاره آبی P. gilvus به روش انتشار روی دیسک، علیـه سـه بـاکتری E. coli ATCC25922، L. plantarum ATCC14917 و K. pneumonia ATCC10031 از هشت باکتری مـورد آزمـایش، نشان داده شده و هاله‌های عدم رشد سنجیده شده اسـت. عـصاره این قارچ اثرات بازدارنده خوبی علیه باکتری‌ها گرم-منفـی از خـود نـشان داد(۷). عـصاره اتیـل اسـتاتی فروتینـگ بـادی گونـه‌هـای Phellinus برزیلی اثری بازدارنده روی رشد باکتری B. cereus ATCC11778 داشتند(۸). ترکیبهای زیست دارو از بـسیاری از گونـه‌هـا بـه ویـژه P. igniarius، P. linteus و P. robusticus گزارش شده‌اند(۹). در میان آن‌ها P. linteus به‌طـور وسـیعی در طب سنتی چین مورد استفاده قرار می‌گیـرد(۱۰). قـارچهـای ایـن گروه جهت ایمنی- درمانی در کشورهای کره و روسـیه نیـز مـورد استفاده قرار مـی‌گیرنـد(۷). ترکیبـی بـه اسـم Phellinone، کـه مشتقی از فورانون‌ها می‌باشد از میـسلیوم (کـشت مـایع) قـارچ P. linteus جدا شده است که دارای فعالیت ضد بـاکتری علیـه باکتری Bacillus subtilis ATCC1090 می‌باشد(۱۱). با توجـه به گرایش روز افزون بشر به درمان توسط مواد طبیعی، قارچهـا می‌توانند منبعی مناسب برای تـأمین این خواسته باشند. مـؤثر بودن، ارزان بودن و سهولت استفاده (تهیه و مصرف) قارچهـا از مزایای آن‌ها در درمان به شمار می‌رود.

در سال‌های اخیر جمـع‌آوری اطلاعـات و تحقیـق در زمینـه قارچهای دارویی در ایران پیشرفت چشمگیری داشـته اسـت، از جمله این تحقیقات می‌توان به گزارش و معرفی بزرگترین قارچ خـوراکی بـا خاصـیت دارویـی در مراتـع ییلاقـی اسـتان مازندران(۱۲)، کشت برخی از قارچهای دارویی (شیتاگه، گنودرمـا لوسیدم، هریسیوم و پلوروتوس ارینگی)(۱۳) و همچنین شناسایی قـارچ(Ganoderma lucidum (Basidiomycota از ایـران و بررسی خواص ضد باکتریایی آن(۱۴) اشاره کرد.

انگیزه جمع‌آوری و شناسایی گونـه‌هـای جـنس Phellinus، اهمیت دارویی گونه‌های این جـنس و نیـز کمبـود تحقیقـات و اطلاعات در زمینه شناسایی این گونه‌ها و بررسی فعالیـت‌هـای بیولوژیکی آنتی اکسیدانی و ضد باکتریایی آنهـا در ایـران بـوده است، که زمینه بررسی‌های گـسترده‌ای را در ابعـاد مختلـف در ارتباط با این گروه از قارچها فراهم می‌آورد.

هدف از این تحقیق جمع‌آوری و شناسایی قارچ دارویی مهم Phellinus conchatus از زیستگاه‌هـای طبیعـی آن در منـاطق شمالی ایران و بررسی خواص آنتی باکتریال به روش‌های انتشار روی دیسک، تعیین حـداقل غلظـت مهارکننـده رشـد(MIC) و حداقل غلظت کشنده(MBC) باکتری‌هـا بـود. همچنـین بـرای

Archive of SID
www.SID.ir

درک بهتر علت خاصیت ضد باکتریایی این قارچ، مقدار مواد فنولی نیز ارزیابی گردید.

روش بررسی

جمع آوری و شناسایی نمونه‌های قارچی

به منظور انجام مطالعه پژوهشی- کاربردی، نمونه‌های مختلف قارچها در تابستان و پاییز سال ۱۳۸۷ از شهرهای شمالی ایران(بهشهر، ساری، عباس آباد و نور) از روی میزبان‌های مختلف جمع‌آوری شدند. در هر مرحله نمونه ها به آزمایشگاه قارچ شناسی دانشگاه شهید بهشتی منتقل و پس از کدگذاری در پاکت‌های کاغذی گذاشته شدند و سپس مورد شناسایی قرار گرفتند. بررسی‌های صورت گرفته بر روی نمونه‌ها عبارت بودند از: ۱- شناسایی گونه‌ها با استفاده از ویژگی‌های ماکرومورفولوژیکی و میکرومورفولوژی فروتینگ بادی، ۲- تعیین نقاط پراکندگی، ۳- نام میزبان‌ها، ۴- اطلاعات هرباریومی نمونه‌ها و ۵- کد هرباریومی آنها.

موارد بررسی شده با کلیدهای شناسایی Natarajan & Kolandavelu, 2001 و Larsen & Cobb–Pulle, 1990) و همچنین با پایگاه داده Cbs Aphyllophorales(به نشانی اینترنتی www.cbs.knaw.nl/databases/) تطبیق داده و نمونه‌ها شناسایی شدند(۱۵،۱۶).

عصاره گیری از فروتینگ بادی گونه P. conchatus

به منظور تهیه عصاره متانولی تام و عصاره‌های با قطبیت متفاوت، بر روی ۹۰ گرم از قارچ پودر شده با دستگاه (Blender Tomás Cuerda Inc. Puerto Rico) مقدار ۸۰۰ میلی‌لیتر متانول۷۵٪ ریخته شد و به مدت ۴۸ ساعت در یک ظرف در بسته در دمای آزمایشگاه نگه داری شد. سپس عصاره حاصل صاف شده و به وسیله دستگاه تبخیر کننده دوار(Yamato co, Japan) در فشار کاهش یافته در دمای۴۰ درجه سانتیگراد تغلیظ گردید تا عصاره متانولی(M) به دست آید. مقداری از عصاره متانولی خشک برای تهیه عصاره متانولی کنار گذاشته شد و بخش اعظمی از عصاره متانولی خشک در ۶۰ میلی‌لیتر آب حل شده و طی ۳ بار استخراج و هر بار با اضافه کردن ۲۰ میلی‌لیتر کلروفرم، برش کلروفرمی(MC) به دست آمد. برای بدست آوردن برش بوتانولی (MB)، مقدار ۶۰ میلی‌لیتر بوتانول نرمال طی ۳ مرتبه (۲۰×۳ میلی لیتر) به بخش آبی باقیمانده اضافه شد. جهت بررسی خواص ضد باکتری، غلظت‌های مختلف از عصاره‌ها استفاده شدند. جهت ساختن عصاره‌های یکنواخت و کاملاً محلول، دستگاه Ultrasonic bath (Elmasonic, Germany) مورد استفاده قرار می گیرد.

آزمون زیست سنجی (بررسی فعالیت ضد باکتریایی)

در این آزمون از عصاره متانولی تام و عصاره‌های بدست آمده با قطبیت متفاوت فروتینگ بادی گونه P. conchatus، جهت بررسی فعالیت ضد باکتریایی علیه ۵ باکتری (۳ باکتری گرم-مثبت و ۲ باکتری گرم-منفی) استفاده شد. مشخصات باکتری‌ها مورد استفاده در بررسی فعالیت ضد باکتریایی در جدول(۱) آمده است. این باکتری‌ها از آزمایشگاه میکروبیولوژی پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی تهیه شدند.

جدول ۱: مشخصات باکتری‌های مورد استفاده

نام باکتری	شماره استاندارد	واکنشGRAM
Bacillus cereus	PTCC1015	مثبت
Enterococcus faecalis	ATCC29120	مثبت
Staphylococcus aureus	PTCC1431	مثبت
Escherichia coli	PTCC1399	منفی
Pseudomonas aeroginosa	PTCC1431	منفی

روش‌های بررسی فعالیت ضد باکتری

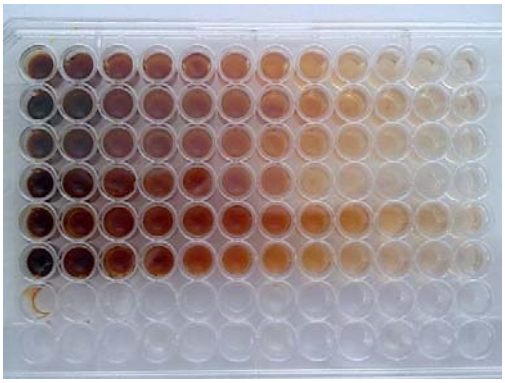
دو روش انتشار روی دیسک و روش رقت سازی در حجم کم از میان روش‌های مختلف انتشار و رقت‌سازی در بررسی اثرات ضد باکتری در این تحقیق استفاده شد(۱۷). جهت تعیین MIC و MBC از عصاره‌ها، سری رقت تهیه می‌شود و سپس تعداد مشخص و یکسانی از باکتری مورد نظر به آن‌ها اضافه می‌شود. جهت انجام تست MIC (حداقل غلظت بازدارنده رشد باکتری) برای عصاره قارچها، به کمک قطر هاله عدم رشد، غلظت اولیه جهت رقت سازی عصاره‌ها تعیین شد و به دلیل کمبود عصاره‌ها، روش رقت‌سازی با حجم کم در میکروپلیت مورد استفاده قرار گرفت(۱۷،۱۸).

Archive of SID
www.SID.ir

روش رقت‌سازی با حجم کم در میکروپلیت(Microbroth dilution)

کشت از باکتری‌های استوک در پلیت NA برای جداسازی کلنی‌های تک و سپس گرماگذاری در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت حداقل ۱۸ و حداکثر ۲۲ ساعت انجام شد. به عبارت دیگر باید طوری برنامه‌ریزی شود که از زمان کشت در پلیت تا زمان تهیه سوسپانسیون میکروبی حداقل ۱۸ ساعت گذشته باشد و بیشتر از ۲۲ ساعت هم نگذشته باشد.

با توجه به غلظت مناسب به دست آمده جهت رقت سازی، غلظت اولین چاهک از میکروپلیت‌های الایزا (تصویر ۱) تعیین و معادل این غلظت برای اولین چاهک سری رقت انتخاب و سری رقت از همین چاهک ساخته شد، سپس سوسپانسیون میکروبی به تمامی چاهک‌ها افزوده و در نهایت به داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد انتقال داده شد. بعد از مدت ۲۴ ساعت نتیجه MIC خوانده شد. از لوله کنترل مثبت (حاوی محیط کشت و سوسپانسیون میکروبی بدون افزودن عصاره) برای خواندن CFUاستفاده شد(۱۸،۱۹).



تصویر۱: میکروپلیت الایزا جهت انجام روش رقت سازی با حجم کم در میکروپلیت

تعیین حداقل غلظت کشنده باکتری‌ها (MBC: Minimum Bactericidal Concentration):

به معنای کمترین غلظتی از عصاره (برحسب mg.ml) است که باعث کشته‌شدن ۹۹/۹۹ درصد تعداد باکتری اولیه‌ای می‌شود که در آزمایش مورد بررسی قرار گرفته است.

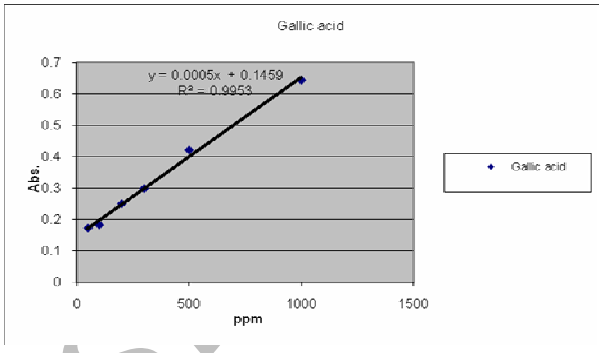
برای انجام تست MBC به دلیل اینکه عصاره رنگی می‌باشد و خواندن MIC غیر ممکن می باشد، بنابراین از همه چاهک‌ها به میزان ۱۰۰ میکرولیتر بر روی پلیت حاوی محیط کشت NA برده شد و به کمک لوپ روی پلیت پخش شد. پلیت‌ها به انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد انتقال یافت تا بعد از ۲۴ ساعت نتیجه خوانده شود. پس از یک شب انکوباسیون، تعداد کلنی‌های رشد یافته درسطح پلیت را شمارش و برحسب واحد CFU.ml تعیین شده همین کار را در مورد چاهک کنترل مثبت نیز انجام شد و نتیجه مورد مقایسه قرار گرفت. از آن جایی که حتی داروهای باکتریسیدال نیز همیشه به طورکامل قادر به از بین بردن باکتری‌ها نمی باشد؛ لذا غلظتی از عصاره که باعث از بین رفتن ۹۹/۹٪ باکتری شود به عنوان MBC در نظر گرفته می‌شود. بنابراین چاهکی که حاوی کمتراز ۵۰CFU.ml یا کمتر از CFU ۵ در پلیت باشد به عنوان MBC تعیین می‌گردد(۱۸،۱۹).

اندازه‌گیری مقدار کل ترکیبات فنولی(Total phenol content)

شناسایی و اندازه‌گیری متابولیت‌های ثانویه قارچ به روش‌های فیتوشیمیایی مورد بررسی قرار می‌گیرد. عموماً برای اندازه‌گیری مقدار کل ترکیبات فنولی از روش Follin-Ciocalteu استفاده می‌شود. برای این منظور مقدار ۰/۴ گرم گالیک اسید خشک در ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درصد حل شده و سپس با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسید. بدین ترتیب محلول مادر تهیه شد، که برای رسم منحنی کالیبراسیون مقادیر ۰، ۱، ۲، ۳، ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌لیتر از محلول مذکور به بالن‌های ژوژه ۱۰۰ میلی لیتری منتقل و هر یک با آب مقطر به حجم رسید. این محلول‌ها به ترتیب دارای غلظت‌های ۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر گالیک اسید بودند. در این آزمایش ۲۰ میکرولیتر از عصاره‌های مختلف قارچ‌ها با غلظت ۱۰ گرم بر لیتر، با ۲ میلی لیتر آب مقطر و ۱۰۰ میکرولیتر از معرف Folin-Ciocalteu مخلوط شدند. بعد از ۳ دقیقه، ۳۰۰ میکرولیتر از محلول Na2CO3(٪۷) به آنها اضافه شد و محلول‌ها به مدت ۲ ساعت تکان داده شدند. نهایتاً جذب محلول‌ها در ۷۶۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد. مقدار کل ترکیبات فنولی عصاره‌ها با استفاده از منحنی استاندارد گالیک اسید محاسبه شد(نمودار ۲). پس از رسم منحنی کالیبراسیون گالیک اسید، معادله خطی منحنی به دست

Archive of SID
www.SID.ir

می‌آید که با قراردادن مقادیر جذب به دست آمده از عصاره‌ها در این معادله می‌توان غلظت معادل گالیک اسید از عصاره‌ها را به دست آورد. غلظت به دست آمده بر حسب ppm می‌باشد. پس از تبدیل ppm به میلی‌گرم گالیک اسید، نتیجه نهایی بر حسب میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم خشک عصاره گزارش می‌شود(۲۰).



نمودار(۱): منحنی استاندارد گالیک اسید جهت اندازه گیری ترکیبات فنولی قارچ P. conchatus

آنالیز آماری شامل تجزیه واریانس داده‌ها با سه تکرار برای تیمارهای دوزهای مختلف به کارگیری عصاره و همچنین مقایسه میانگین به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن بود که توسط نرم افزار SAS نسخه ۹ انجام پذیرفت.

نتایج

شناسایی جنس و گونه قارچ مورد نظر

با استفاده از روش‌های شناسایی مرسوم و نظر اساتید محترم در این زمینه از جنس و گونه قارچ‌های مورد نظر اطمینان حاصل شد.

نتایج بررسی خواص ضد باکتری عصاره‌های متانولی تام و عصاره‌های بدست آمده با قطبیت متفاوت فروتینگ بادی P conchatus بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های این قارچ به دو روش انتشار روی دیسک و رقت سازی با حجم کم در میکروپلیت‌های الایزا انجام شد.

نتایج حاصل از روش انتشار روی دیسک

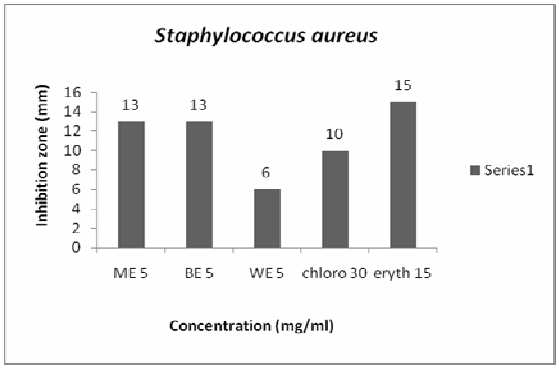
نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که عصاره‌های متانولی و بوتانولی این قارچ بر خلاف عصاره آبی آن که اثر بازدارندگی کمتری دارد، دارای بیشترین اثر ضد باکتری در محیط کشت مولر هینتون آگار می‌باشد. در جدول ۲ متوسط قطر هاله عدم رشد(میلی‌متر) برای ۵ نوع باکتری مورد آزمایش و سه نوع عصاره و دو آنتی بیوتیک کنترل مشاهده می‌شود. از میان ۵ نوع باکتری مورد بررسی، عصاره‌ها بر روی سه نوع باکتری خواص بازدارندگی نشان دادند (باکتری‌های S. aureus، B. cereus و P. aeruginosa) و بر دو نوع دیگر تاثیری نداشتند (E. coli و E. feacalis)، بنابراین جهت تعیین حداقل غلظت بازدارنده و کشنده رشد باکتری‌ها به ترتیب آزمایش‌های MIC و MBC تنها بر روی سه باکتری S. aureus، B. cereus و P. aeruginosa انجام شد که پاسخ مثبتی داده بودند.

همانگونه که در جدول ۲ مشاهده می‌شود و پیش از این بحث شد، تنها سه نوع از ۵ نوع باکتری خواص ضد باکتری عصاره بر آنها تاثیر داشت که به منظور نشان دادن بهتر و مقایسه راحت‌تر عصاره‌ها و آنتی بیوتیک‌ها، نمودار هایی برای این سه نوع باکتری رسم گردید. نمودارهای ۲، ۳ و ۴ به ترتیب اثر عصاره‌های مختلف علیه باکتری‌های S. aureus، B. cereus و P. aeruginosa را نشان می‌دهند. در این نمودارها ME عصاره متانولی، BE عصاره بوتانولی، WE عصاره آبی، Chloro 30 آنتی‌بیوتیک کلرآمفنیکل ۳۰ میکروگرم و Eryth 15 آنتی‌بیوتیک اریترومایسین ۱۵ میکروگرم می‌باشند.

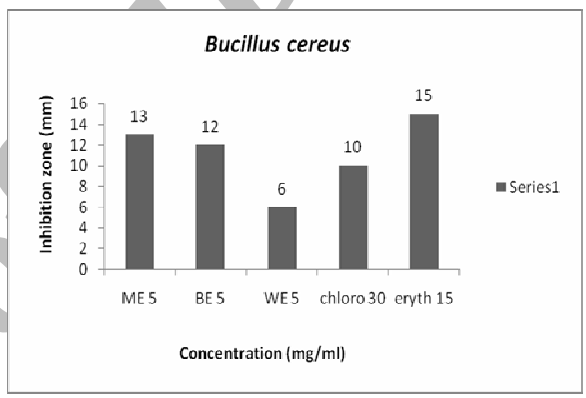
جدول (۲): متوسط قطر هاله عدم رشد(میلی متر)

نوع باکتری	باکتری	عصاره متانولی(ME) 5mg.ml	عصاره بوتانولی(BE) 5mg.ml	عصاره آبی (WE) 5mg.ml	کلرآمفنیکل (chloro) 30µg.ml	اریترومایسین (eryth) 15µg.ml
گرم منفی	P.aeroginosa	۱۰	۸	۸	۱۶	۹
	E. coli	-	-	-	۲۷	-
گرم مثبت	S. aureus	۱۳	۱۳	۶	۱۰	۱۵
	E. feacalis	-	-	-	۲۲	۱۲
	B. cereus	۱۳	۱۲	۶	۱۰	۱۵

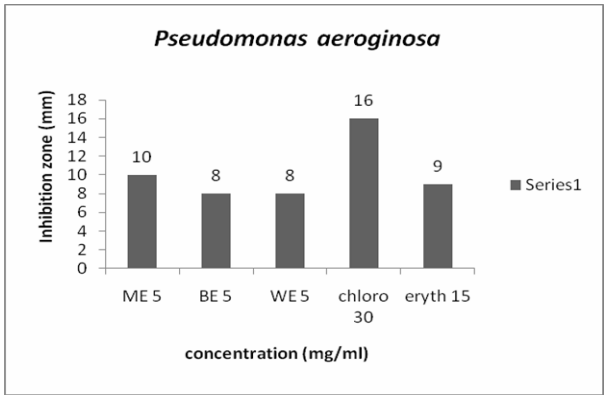
Archive of SID
www.SID.ir



نمودار۲: اثر عصاره‌های مختلف قارچ دارویی P. conchatus علیه باکتری Staphylococcus aureus

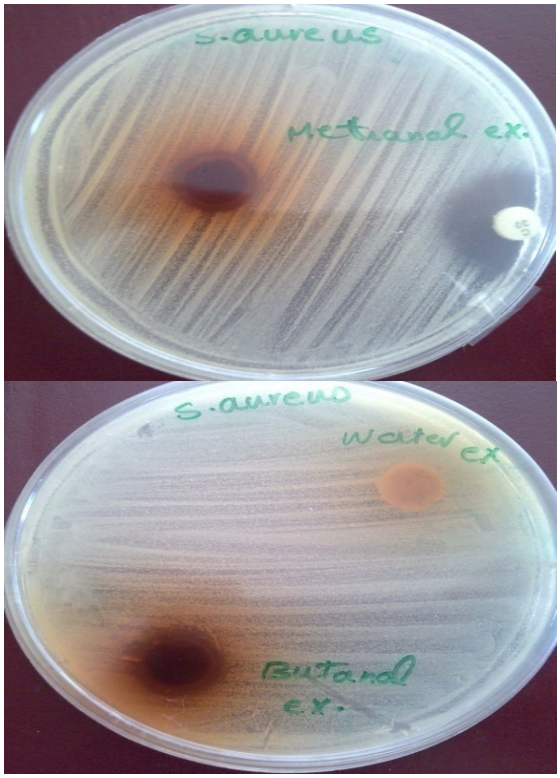


نمودار ۳: اثر عصاره های مختلف قارچ دارویی P. conchatus علیه باکتری Bacillus cereus



نمودار ۴: اثر عصاره‌های مختلف قارچ دارویی P. conchatus علیه باکتری Pseudomonas aeruginosa

تصویر(۳) آزمایش‌های ضد باکتریایی انتشار روی دیسک را نشان می‌دهد، همانگونه که مشاهده می‌شود عصاره‌های متانولی و بوتانولی بیشترین قطر هاله عدم رشد را در مورد باکتری S. aureus با قطر هاله ۱۳ میلی متر از خود نشان می‌دهند.



تصویر۳: بالا، هاله عدم رشد عصاره متانولی و شکل پایین، هاله‌های عدم رشد عصاره‌های آبی و بوتانولی ۱۴ علیه باکتری S. aureus

نتایج MBC (کم‌ترین غلظتی از عصاره برحسب mg.ml است که باعث کشته‌شدن ۹۹/۹۹ درصد تعداد باکتری اولیه‌ای می‌شود) و MIC (حداقل غلظت بازدارنده رشد باکتری) برای سه باکتری مورد آزمایش و سه نوع عصاره مورد در جدول ۳ نمایش داده شده‌اند.

جدول ۳: نتایج MIC و MBC قارچ P. conchatus

M (متانولی)	MB (برش بوتانولی)	MC (برش کلروفورمی)
S. aureus		
MIC (mg.ml)	۲	۱	۴
MBC (mg.ml)	۴	۲	۸
B. cereus		
MIC (mg.ml)	۵/۰	۵/۰	۵/۰
MBC (mg.ml)	۰۱	۱	۰۱
P. aeruginosa		
MIC (mg.ml)	۲	۲	۸
MBC (mg.ml)	۴	۴	۱۶

Archive of SID
www.SID.ir

مقدار کل ترکیب‌های فنولی بر اساس مقادیر جذب عصاره‌های مختلف (M، MC، MB و MW) واکنش داده با معرف Follin-Ciocalteu و مقایسه آن با محلول‌های استاندارد گالیک اسید هم ارز بدست آمد. نتایج این آزمایش‌ها با سه بار تکرار در جدول(۴) آمده است. در مورد گونه P. conchatus عصاره بوتانولی دارای بالاترین مقدار ترکیبات فنولی (84.87±0.73 mg GA.gr extract) می‌باشد.

جدول ۴: مقدار کل ترکیبات فنولی عصاره‌های قارچ P. conchatus

ردیف	عصاره	مقدار کل ترکیبات فنولی (میلی‌گرم GA بر گرم عصاره)
۱	متانولی تام(M)	۸۰/۳۴±۱/۵۹
۲	برش کلروفورمی(MC)	۱۲/۳۴±۰/۱۲
۳	برش بوتانولی(MB)	۷۳/۸۷±۰/۸۴
۴	برش آبی(MW)	۲۷/۶۷±۰/۱۲

نتیجه‌گیری

علی‌رغم حضور گسترده آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده و آنالوگ‌های نیمه سنتزی آنها، تحقیقات مستمر برای کشف ترکیب‌های ضد میکروبی در حال انجام است. بسیاری از داروهایی که هم اکنون مورد استفاده قرار می‌گیرند بسیار گران هستند و یا به آسانی قابل دسترس نیستند، گروهی بزرگی از آنتی بیوتیک‌ها هم به دلیل ایجاد مقاومت در عوامل بیماری‌زا، دیگر قابل استفاده نیستند. بنابراین ضرورت تولید داروهای ارزان‌تر و جدیدتر به وضوح مشاهده می‌شود. کشف مواد جدید که فعالیت‌های پایدار علیه میکروارگانیسم‌های مضر را دارند، هدف محققان در حال حاضر و آینده می‌باشد(۲۱).

در این تحقیق، از فروتینگ بادی‌های جمع آوری شده گونه P.conchatus جهت بررسی خواص ضد باکتریایی استفاده شد. در در روش انتشار روی دیسک، عصاره‌ها با غلظت ۵mg.ml مورد استفاده قرار گرفتند و عصاره‌های متانولی و بوتانولی بیشترین اثر را به ترتیب روی باکتری‌های S. aureus، B. cereus و P. aeruginosa داشتند. در روش تعیین حداقل غلظت مهارکننده رشد(MIC) و حداقل غلظت کشنده(MBC) باکتری‌ها، عصاره‌های بوتانولی و متانولی با داشتن مقدار MIC=2 mg.ml و ۴ =MBC mg.ml علیه باکتری P. aeruginosa نتیجه بسیار خوبی را نشان دادند. در مطالعه‌ای، فعالیت ضد باکتری عصاره های متانولی تام سه قارچ بازیدیومیست به نام‌های G. lucidum، N. floccose و همچنین P. rimosus از جنوب هند، به روش انتشار روی دیسک و روش رقت‌سازی با حجم کم در میکروپلیت بررسی شد، عصاره متانولی P. rimosus علیه همه باکتری‌ها فعالیت ضد باکتری نشان داد و در مقایسه با دو قارچ دیگر کمترین MIC با مقدار ۰/۵mg.ml را دارا بود(۲۱) که نشان از نزدیک بودن اثر ضد باکتریایی عصاره متانولی این قارچ با عصاره متانولی P. conchatus ایرانی با داشتن(MIC: 1.5 mg.ml) می‌باشد.

همچنین بررسی خواص ضد باکتری عصاره آبی قارچ Ganoderma lucidum ایرانی به روش انتشار روی دیسک، نشان می‌دهد که عصاره آبی این قارچ با غلظت ۵۰۰ mg/ml خاصیت بازدارنده رشد دارد در حالی که بررسی خواص ضد باکتری گونه P. conchatus ایرانی به روش انتشار روی دیسک، نشان دهنده این مطلب است که عصاره متانولی این قارچ تنها با غلظت ۵mg.ml خاصیت بازدارنده رشد دارد، بنابراین بررسی‌ها و تحقیقات بیشتری جهت شناسایی مواد موثره عصاره‌ها مورد نیاز می‌باشد(۱۴). با توجه به اینکه عصاره‌های بوتانولی و متانولی این گونه قارچ دارای بیشترین اثرات ضد باکتری و بیشترین ترکیبات فنولی بودند، می‌توان اینطور نتیجه گرفت که علاوه بر ترکیبات غیر قطبی (اکثر ترپن‌ها)، ترکیب‌های قطبی(فنول‌ها، فلاونوییدها) نیز می‌توانند با مکانیسم‌های خاصی دارای فعالیت ضد باکتریایی باشند.

مطالعات Sheena و همکاران این فرضیه را اثبات می‌کند، آنها دریافتند که عصاره متانولی قارچ P. rimosus علیه همه باکتری‌های مورد آزمایش فعالیت ضد باکتری نشان داد، سپس با انجام آنالیزهای شیمیایی این عصاره، به وجود ترکیبات پلی‌فنولی، فلاونوئیدها، ترپن‌ها و کوئینون‌ها (رده ای از ترکیب‌های پلی فنولی) پی بردند(۲۱). ترکیبات فنولی می‌توانند باعث اختلال در غشاء سیتوپلاسمی از طریق ایجاد

Archive of SID
www.SID.ir

اختلال در پمپ انتقال پروتون PMF(Proton motive force) و جریان الکترون(Elecron flow) و انعقاد محتویات سلول شوند(۲۲). همچنین اندازه گیری میزان کل ترکیبات فنولی نشان داد که این گونه به میزان قابل توجهی فنول در ساختمان سلولی خود دارد که می‌توان از آن جهت مصارف دارویی بهره جست.

بررسی خواص درمانی P. conchatus ایرانی شامل بررسی اثرات ضد قارچی، ضد التهاب، ضد ویروسی، ضد باکتری و به ویژه ضد سرطان از جمله کارهایی است که می‌تواند در مطالعات آینده مورد بررسی قرار گیرد.

سپاسگزاری

بر خود لازم می‌دانیم از جناب آقای دکتر فروتن (مرکز تحقیقات کشاورزی مازندران) که در جمع‌آوری نمونه‌های قارچی به ما کمک کردند کمال سپاسگزاری را داشته باشیم.

منابع:

1- Ohno T, Takahashi Y, and Tanabe H. ***Inhibitory effect of oral intake of natural Phellinus linteus fruit body on growth and pulmonary metastasis of B16/BL6 melanoma.*** Journal of Natural Medicines 2007; 61(4): 438-42.

2- Ajith TA, Janardhanan KK. ***Indian medicinal mushroom as a source of antioxidant and antitumor agents.*** J Clinical Biochemi Nutrition 2007; 40 (3): 157-62.

3- Hwang EI, Yun BS, Kim YK, Kwon Bm, Kim HG, Lee HB, et al. ***Phellinsin A, a novel chitin synthase inhibitor produced by Phellins sp. PL3.*** J Antibiotics 2000; 53(9): 903-11.

4- Sandven P. ***Epidemiology of canidemia.*** Rev Iberoam Micol 2000; 17: 73-81.

5- Brizuela MA, Garciam L, Perez L, Mansur M. ***Basidiomycetos: nueva fuente de metabolites secundarios.*** Rev Iberoam Micol 1998; 15: 69-74.

6- Kavanagh F, Hervey A, Robbins WJ. ***Antibiotic substances for basidiomycetes. 6. Agrocybe dura.*** Proc Natl Acad Sci USA 1950; 36: 102-6.

7- Sittiwet C, Puangpronpitag D. ***Antibacterial activity of Phellinus gilvus aqueous extract.*** International Journal of Pharmacology 2008; 4(6): 500-2.

8- Rosa LH, Machado KM, Jacob CC, Capelari M, Rosa CA, Zani CL. ***Screening of Brazilian Basidiomycetes for antimicrobial activity.*** Mem Inst Oswaldo Cruz 2003; 98(7): 967-74.

9- Ikekawa T, Nakanishi M, Uehara N, Chihara G, Fukuoka F. ***Antitumor action of some Basidiomycetes, especially Phellinus linteus.*** Gann 1968; 59: 155-7.

10- Ying JZ, Mao XL, Ma QM, Zong YC, Wen HA. ***Illustration of Chinese medicinal fungi.*** Beijing: Science Press; 1987.p. 579-82.

11- Yeo WH, Hwang EI, So HS, Lee SM. ***Phellinone, a new furanone derivative from the Phellinus linteus KT&G PL-2.*** Arch Pharm Res 2007;8: 924-6.

12- Mossazade SA. ***Report and introduce of the biggest edible mushroom with medicinal effect on Mazandaran province.*** The abstracts from the first national research of rangelands management;1381; p. 114. [persian]

Archive of SID
www.SID.ir

13- Sargazi F. ***Collection of some medicinal mushroom (shitakae, Ganoderma lucidum & Pleurotus eryngii) and investigation of biological and chemical effects of Ganoderma lucidum.*** Tehran: University of Shahid Beheshti; 2007. p. 125. [persian]

14- Keypour S. ***Identification of Ganoderma lucidum (Basidiomycota) from Iran and investigation of antibacterial effects.*** Tehran: University of Shahid Beheshti; 2008. p. 64. [persian]

15- Natarajan K, Kolandavelu K. ***Resupinate Aphyllophorales of Tamil Nadu, India.*** Centre for advanced study in Botany, University of Madras; 1998.p. 133.

16- Larsen MJ, Cobb-Poulle LA. ***Phellinus(Hymenochaetaceae)- A survey of the world taxa.*** Synop Fung: 1990; 3.p. 1-206.

17- Woods GL, Washington A. ***Antimicrobial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods.*** In: Murray, PR, editors. Manual of clinical microbiology. US: ASM Press; 1995.p. 2101-6.

18- ***National committee for clinical laboratory standards, methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically.*** 5 th ed. Approved Standard, M7-A5. Wayne, PA: NCCLS, 2000.

19- Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. ***Color atlas and text book of diagnostic microbiology.*** 5 th ed. US: lippin Cott williams & wilkins; 1997.p. 321.

20- Slinkard K, Singleton VL. ***Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods.*** American Journal of Enology and Viticulture 1977; 28:49-55.

21- Sheena TA, Ajith A, Mathew T, Janardhanan KK. ***Antibacterial activity of three macrofungi, Ganoderma lucidum, Navesporus floccose and Phellinus rimosus occurring in south India.*** Pharmaceutical Biology 2003;41(8): 564-7.

22- Sara B. ***Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods (review).*** International Journal of Food Microbiology 2004; 94(3): 223-53.

Archive of SID

www.SID.ir

Collection and Identification of a Medicinal Mushroom, Phellinus Conchatus in Iran and Investigation of the Antibacterial Activity of Total Methanol Extract and Fractional Extracts

F. Hokmollahi(MSc)[*1], H. Rafati(PhD)[2], H. Riahi(PhD)[3], M. Hakimi(PhD)[4], A. Aliahmadi(PhD)[5], H. Heydari(MSc)[6], F. Haghirosadat(MSc)[7], M. Azimzade(MSc)[8], S. Mosazade(MSc)[9]

[1,6,7]*Department of Biological Sciences, Shaheed Beheshti University, Tehran, Iran*
[2,3,5]*Medicinal Plants Research Institute, Shaheed Beheshti University, Tehran, Iran*
[4]*Faculty of Natural Resource, Yazd University, Yazd, Iran*
[8]*Department of Agronomy and Plant Breeding Sciences, University of Tehran, Tehran, Iran*
[9]*Research Institute of Forest And Rangelands, Mazandaran, Iran*

Received: *13 Jan 2010* ***Accepted:*** *14 Oct 2010*

Abstract

Introduction: Macromycetes are considered as new resources for medicine with various biological properties. One of the most important medicinal fungi in Iran is Phellinus conchatus. This genus contains 359 species around the world of which 12 species are reported from the north regions of Iran. Phellinus species have anticancer, antioxidant and antibacterial effects. Moreover, they have been used in traditional medicines for treatment of several diseases. Due to the increasing bacterial resistance to existing antibiotics, it seems that research for new sources of antibiotics is necessary.

Methods: The purpose of this research was to collect and identify the species with respect to hosts, dispersal, macromorphological and micromorphological characters of the species, and their biological effect against Gram-negative bacteria and Gram-positive bacteria was evaluated using total methanol extract and it's fractional extracts(chloroform, butanol and water extracts) using disk diffusion method, minimum inhibitory concentrations(MICs) and minimal bactericidal concentrations(MBCs).

Results: The results of disk diffusion tests showed that all extracts except aqueous extract had growth inhibitory effects on three bacteria; Staphylococcus aureus, Bacillus cereus and Pseudomonas aeruginosa. The butanolic extract showed the best result in growth inhibition against the bacteria, especially on Pseudomonas aeruginosa . The MICs and MBCs of the butanol extract of these bacteria were(1, 2mg.disk), (2, 4 mg.disk) and(8, 16mg.disk), respectively.

Conclusion: The results show that different extracts, especially butanol extract have high antibacterial activities which indicate the presence of active components in this fraction. More fractionation studies are under way to isolate the antibacterial components in the butanolic extract.

Keywords: Anti- Bacterial Agents; Antioxidants; Plants, Medicinal; Iran; Methanol

****Corresponding author: Tel:+98 351 8246872, E mail: fariba_hokmollahi@yahoo.com***

Archive of SID

www.SID.ir