

بررسی اثرات ضدباکتریایی عصاره آبی قارچ *Ganoderma lucidum* Karst. (Basidiomycota) از ایران

سمیه کی پور سنگسری^{۱*}، حسین ریاحی^۲، حسن رفعتی^۳، محمد فتی مراد علی^۴

- ۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه سیستماتیک گیاهی، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران
 - ۲- استاد، گروه زیست‌شناسی گیاهی، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران
 - ۳- استادیار، گروه فیتوشیمی، پژوهشکده گیاهان دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران
 - ۴- کارشناس ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، بخش بیوتکنولوژی میکروبی و ایمنی زیستی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج
- *آدرس مکاتبه: تهران، اوین، دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده زیست‌شناسی، کدپستی: ۶۳۱۱۳ - ۱۹۸۳۹
تلفن: ۲۲۴۳۱۶۶۴ (۰۲۱)، نمابر: ۲۲۴۳۱۶۶۴ (۰۲۱)
پست الکترونیک: skeypour@gmail.com

تاریخ تصویب: ۸۸/۴/۲۴

تاریخ دریافت: ۸۷/۳/۲۲

چکیده

مقدمه: گونه *Ganoderma lucidum* متعلق به خانواده *Ganodermataceae* یکی از قارچ‌های دارویی شناخته شده است، که دارای خواص دارویی مختلفی چون: کاهش فشار و قند خون، تقویت سیستم ایمنی، خاصیت ضدویروسی و ضدباکتریایی می‌باشد. هدف: با توجه به خواص دارویی متعدد نسبت داده شده به این قارچ و کمبود تحقیقات پیرامون *Ganoderma lucidum* ایرانی این مطالعه انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه خواص آنتی‌باکتریال عصاره آبی *Ganoderma lucidum* با چهار غلظت (۵۰، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) علیه سه گونه باکتری استاندارد گرم مثبت *Bacillus subtilis*، *Staphylococcus aureus* و *Enterococcus faecalis* و دو گونه باکتری استاندارد گرم منفی *Pseudomonas aeruginosa* و *Escherichia coli* به روش *Disk diffusion* مورد بررسی قرار گرفت. پلی‌ساکاریدهای تام^۱ موجود در عصاره آبی با روش فنول سولفوریک اسید اندازه‌گیری شد و جهت تعیین و شناسایی کیفی قندهای موجود در عصاره آبی از گاز کروماتوگرافی متصل به طیف‌سنج جرمی^۲ استفاده شد. نتایج: نتایج نشان داد که این عصاره دارای خواص ضدباکتریایی بر علیه باکتری گرم منفی *Pseudomonas aeruginosa* در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر می‌باشد. میزان پلی‌ساکارید تام در عصاره آبی ۳۷/۷۵۱ mg/g تعیین شد و مونوساکاریدهای موجود در عصاره شناسایی شدند.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق، این گونه به میزان قابل توجهی پلی‌ساکارید در ساختمان سلولی خود دارد که از آن می‌توان جهت مصارف دارویی منسوب به پلی‌ساکارید بهره جست، ولی جهت مصارف ضدباکتریایی به علت خاصیت ضعیف مهار رشد باکتری توصیه نمی‌شود.

کل‌واژگان: *Ganoderma lucidum*، خاصیت ضدباکتریایی، فنول سولفوریک اسید، پلی‌ساکاریدهای تام

¹ Total polysaccharide

² GC/MS



در این تحقیق با توجه به اهمیت این قارچ به لحاظ دارویی و مطالعات انجام شده بر روی سوش‌های چینی [۷] و کره‌ای [۸]، درصد برآمدیم تا به مطالعه خواص ضدباکتریایی عصاره آبی قارچ *G. lucidum* جمع‌آوری شده از ایران پرداخته و میزان پلی ساکاریدهای کل را بررسی کرده و به شناسایی قندهای موجود در عصاره آبی با استفاده از تکنیک GC/MS بپردازیم.

مواد و روش‌ها

قارچ‌های موردنظر در تیرماه ۱۳۸۶ از جنگل‌های منطقه سواد کوه (شیردره)، از اطراف درختان ممرز جمع‌آوری و جهت شناسایی به آزمایشگاه قارچ‌شناسی دانشگاه شهید بهشتی انتقال یافت. نمونه‌های جمع‌آوری شده با کلید Iranian

از مهم‌ترین مواد فعال بیولوژیک موجود در *G. lucidum* می‌توان به تری‌پرنوئیدها، پلی‌ساکاریدها، نوکلئوتیدها، استرول‌ها، استروئیدها، پروتئین‌ها اشاره کرد [۳]. در این میان

1 Context	2 Truncate
3 <i>Buxus hyrcanapojark</i> (Buxaceae)	
4 <i>Arpinus betalus</i> L. (Corylaceae)	
5 <i>Diospyros</i> sp. (Ebenaceae)	
6 <i>D. lotus</i> L. (Ebenaceae)	
7 <i>Parrotia</i> sp. (Hamamelidaceae)	
8 <i>Q. castaneaefolia</i> , <i>Quercus</i> sp. (Fagaceae)	
9 <i>Ulmus</i> sp. (Ulmaceae)	

غلظت‌های ۱۰۰ - ۱۰ میکروگرم بر لیتر گلوکز به عنوان استاندارد استفاده شد. عصاره آبی *G. lucidum* به روش جوشاندن استخراج شد، به یک میلی‌لیتر از آن، ۱ میلی‌لیتر از محلول فنول ۵ درصد و ۵ میلی‌لیتر از اسید سولفوریک غلیظ (۹۵ - ۹۸ درصد) اضافه شد. در نهایت جذب آن در طول موج ۴۷۰ نانومتر توسط دستگاه spectrophotometer UV-Visible مدل Shimadzu UV-1601pc خوانده و غلظت نمونه مجهول تعیین شد (سه تکرار).

شناسایی ترکیبهای قندی تشکیل دهنده عصاره

۵ میلی‌گرم از پودر به دست آمده از عصاره آبی، توسط ۱/۲۵ میلی‌لیتر تری فلورواستیک اسید ۲ مولار، به مدت یک ساعت در حمام روغن ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد هیدرولیز شد و حلال توسط روتاری جدا شد. جهت شناسایی ترکیبهای قندی تشکیل‌دهنده عصاره از روش ارایه شده توسط استونسن^۱ و فورنایوکس^۲ ۱۹۹۰ استفاده شد [۱۱] و در نهایت قندهای هیدرولیز شده با استیک انیدرید اسیتیل شده. ماده به دست آمده در استون حل شد. جهت آنالیز پلی ساکاریدهای قارچ *G. lucidum* از دستگاه گاز کروماتوگراف کوپل شده با طیف‌سنج جرمی شرکت Thermoquest-Finnigan مدل Trace مجهز به ستون DB به طول ۶۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه نازک ۰/۲۵ میکرومتر استفاده شد. دمای آون در مرحله ابتدایی ۶۰ درجه سانتی‌گراد بود که ۵ دقیقه در این دما نگاه داشته شد. پس از آن با سرعت ۱۰ درجه بر دقیقه به دمای ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد رسیده ۱۰ دقیقه در آن دما می‌ماند. سپس دما به ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد می‌رسد و ۱۰ دقیقه در این دما ثابت نگاه داشته می‌شود. در این آزمایش از گاز حامل هلیوم با سرعت ۱/۱ میلی‌لیتر بر دقیقه استفاده شد و از انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت استفاده شد. از نرم‌افزار Wiley version 7.0 و NIST version 1.7 جهت شناسایی طیف‌های جرمی قندها استفاده شد.

Ganoderma species شناسایی شدند [۱]. سپس قارچ‌ها در سایه و در دمای محیط خشک شده و با آسیاب به صورت پودر در آمدند. به ۱۰ گرم از پودر قارچ ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه جوشانده شد. سپس عصاره حاصل صاف و عصاره تا مرحله پودر شدن خشک شد [۹].

بررسی اثرات ضدباکتریایی

فعالیت ضدباکتریایی عصاره آبی *G. lucidum* بر روی ۲ باکتری استاندارد گرم منفی *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 85327، *Escherichia coli* ATCC 25922 و ۳ باکتری استاندارد گرم مثبت *Bacillus subtilis* ATCC 465، *Staphylococcus aureus* ATCC 25923، *Enterococcus faecalis* ATCC 29737 مورد بررسی قرار گرفت. باکتری‌های موردنظر از بخش میکروبیولوژی دانشکده علوم زیستی دانشگاه شهید بهشتی تهیه شدند. بدین‌منظور از کشت ۲۴ ساعته باکتری‌ها در محیط نوترینت آگار، سوسپانسیونی معادل با نیم مک فارلند تهیه شد. ۱ میلی‌لیتر از هر کدام از سوسپانسیون باکتری‌ها برداشته شد و به محیط کشت جامد مولر هیتتون آگار انتقال داده و به صورت یکنواخت در محیط کشت پخش شدند. دیسک‌های بلانک استریل با قطر ۶ میلی‌متر به ۲۰ میکرولیتر از عصاره آبی آغشته شدند. به عنوان شاهد، دیسک‌های بلانک به ۲۰ میکرولیتر (آب) آغشته شد. دیسک‌های جنتامایسین، اریترومایسین، کلرامفنیکل به ترتیب برای باکتری‌های گرم منفی، باکتری‌های گرم مثبت و هر دو گروه از باکتری‌ها جهت کنترل و مقایسه فعالیت باکتری‌ها مورد استفاده قرار گرفت. پلیت‌های دیسک‌گذاری شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند و پس از ۲۴ - ۱۸ ساعت قطر هاله ممانعت از رشد اندازه‌گیری شد. آزمایش‌ها ۳ مرتبه تکرار شدند و نتایج با آزمون ANOVA بررسی و معنی‌دار بودن آنها در سطح ۵ درصد مورد بررسی قرار گرفت.

اندازه‌گیری میزان پلی‌ساکاریدهای تام

برای اندازه‌گیری پلی‌ساکاریدهای تام از روش فنول سولفوریک اسید [۱۰] استفاده شد. در این آزمایش از

¹ Stevenson

² Furneaux



نتایج

بررسی اثرات ضد باکتریایی

شناسایی قندها با دستگاه GC/MS

قندهای استیل شده، به وسیله دستگاه گاز کروماتوگرافی کوپل شده با طیفسنج جرمی شناسایی شدند (شکل شماره ۱).

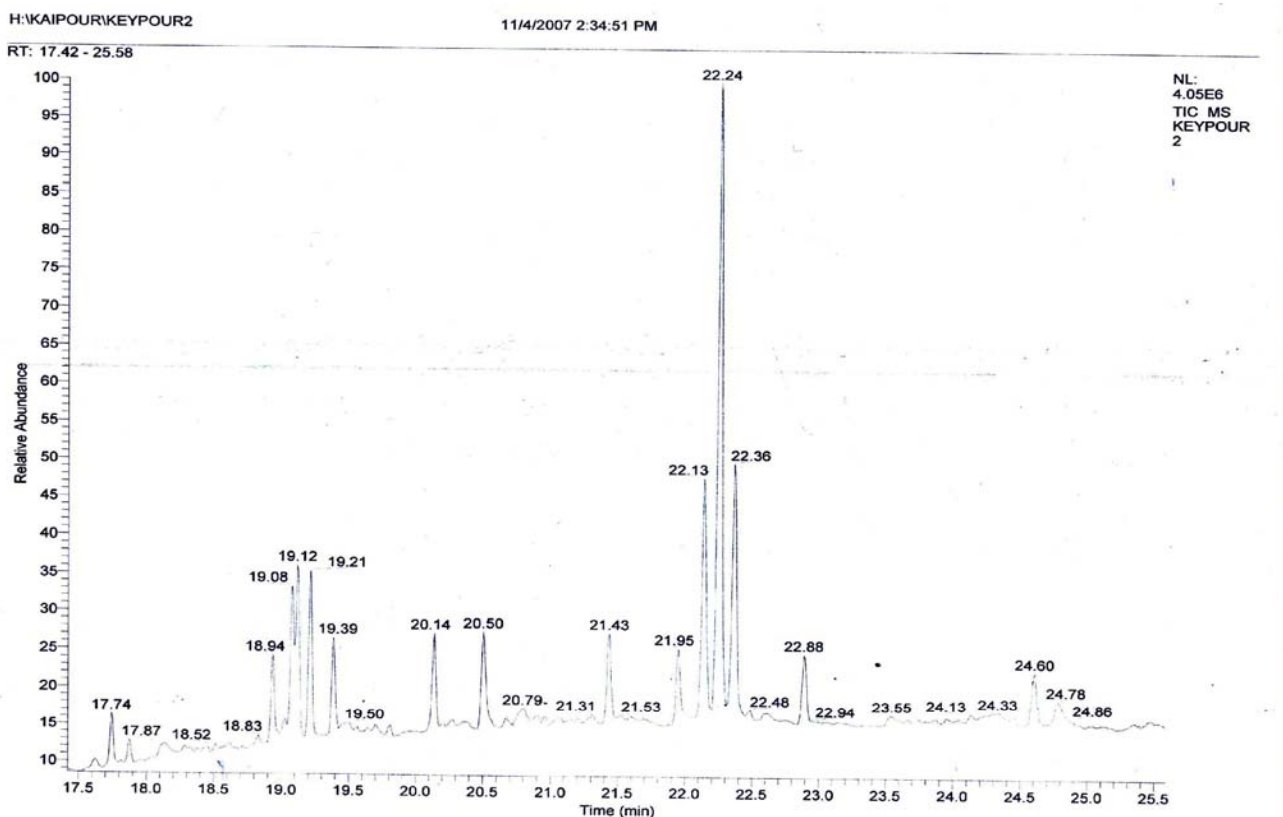
نتایج حاصل از بررسی اثرات ضدباکتریایی را در جدول شماره ۱ آورده شده است.

جدول شماره ۱ - متوسط قطر هاله عدم رشد باکتری‌های مورد استفاده

متوسط قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر)							نوع باکتری
G	E	C	۵۰۰	۲۵۰	۱۲۵	۵۰	
۲۳/۰۰±۱/۷۳	-	۱۲/۳۳±۰/۵۷	۱۲/۰۰±۰/۰	-	-	-	<i>P. aeruginosa</i>
۲۳/۶۶±۱/۵۷	-	۲۷/۶۶±۰/۵۷	-	-	-	-	<i>E. coli</i>
-	۲۳/۰۰±۰/۰	۲۳/۰۰±۱/۷۳	-	-	-	-	<i>S. aureus</i>
-	۱۲/۴۰±۱/۱۵	۲۲/۰۰±۰/۰	-	-	-	-	<i>E. faecalis</i>
-	۱۳/۶۶±۱/۵۱	۱۸/۳۳±۰/۵۷	-	-	-	-	<i>B. subtilis</i>

- = بدون هاله عدم رشد.

- غلظت عصاره بر حسب میلی گرم بر میلی لیتر و غلظت Gentamycin (G), Erythromycin (E), Chloramphenicol (C) به ترتیب ۳۰، ۱۵، ۱۰ µg/disk می باشد.



شکل شماره ۱- کروماتوگرام به دست آمده از آنالیز قندهای استیل شده توسط طیفسنج جرمی



در جدول شماره ۲ زمان بازداري و نام قندهای تشکیل‌دهنده عصاره آبی آورده شده است.

جدول شماره ۲- زمان بازداري (Ri) و نام قندهای تشکیل‌دهنده عصاره آبی

نام	زمان بازداري
1, 2, 3, 4, 5 - penta-O-acetyl-Xylitol	۱۹/۰۷
1, 2, 3, 4, 5 - penta-O-acetyl-6-deoxy-L-mannitol	۱۹/۱۳
Iditol, hexa-O-acetyl	۱۹/۳۷
Myo-inositol, hexaacetate	۲۱/۹۵
Sorbitol hexaacetate	۲۲/۱۲
D-Glucitol, hexaacetate	۲۲/۲۳
Galactitol, hexaacetate	۲۲/۳۴

اندازه‌گیری میزان پلی ساکاریدهای تام

میزان پلی ساکاریدهای تام بررسی شده با روش فنول سولفوریک اسید در عصاره آبی $37/751 \pm 1/11 \text{ g mg}^{-1}$ (به ازای ۱ گرم از پودر خشک قارچ) تعیین شد.

بحث

جنس *Ganoderma* دارای مواد موثره گوناگون با فعالیت‌های بیولوژیکی متنوع می‌باشد. از مهم‌ترین این مواد می‌توان به پلی ساکاریدها، تری ترپن‌ها، پروتئین‌ها و نوکلئوتیدها اشاره کرد. پلی‌ساکاریدها به علت دارا بودن ساختارهای گوناگونی چون ساختار خطی، انواع ساختارهای مارپیچ تک بعدی، دو بعدی، سه بعدی با وزن مولکولی مختلف و تفاوت در محلولیت در آب دارای خواص بیولوژیکی و دارویی متعددی هستند [۴]. در گذشته گیاهان دارویی حاوی پلی ساکارید، به صورت سنتی در سراسر جهان برای درمان انواع بیماری‌ها مانند تورم، درمان زخم‌ها، بیماری‌های کبدی، زخم معده مورد استفاده قرار می‌گرفتند. آزمایش‌ها نشان داده است که پلی ساکاریدهای گنودرما لوسیدم (GPS)، دارای خواصی چون خواص ضدتوموری، خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدباکتریایی، ضدویروسی می‌باشد [۵، ۱۲]، اما مکانیسم مربوط به عمل آنها تاکنون به خوبی شناخته نشده است [۱۲]. در این پژوهش خواص ضدباکتریایی

عصاره آبی قارچ *G. lucidum* مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت قندهای موجود در عصاره آبی شناسایی شدند. مطالعات نشان داد که عصاره آبی این گونه تنها بر ضدباکتری *Pseudomonas aeruginosa* دارای اثر ضد باکتریایی می‌باشد. آنالیزهای آماری در سطح ۵ درصد نشان داد که هاله عدم رشد تشکیل شده در غلظت 500 mg ml^{-1} با سایر غلظت‌های تهیه شده و با آنتی‌بیوتیک‌های شاهد دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشد. در مطالعه‌ای که در سال ۱۹۹۴ توسط یون^۱ و همکاران [۸]، بر روی اثر ضدباکتریایی عصاره آبی قارچ *Ganoderma lucidum* انجام گرفت نشان داده شد که این عصاره توانایی بازدارندگی از رشد ۱۵ باکتری گرم مثبت و گرم منفی را دارا است. یون و همکاران همچنین نشان دادند که توانایی بازدارندگی از رشد آنتی‌بیوتیک‌های دیگر در ترکیب با عصاره آبی بسیار بهتر از زمانی است که آنتی‌بیوتیک‌ها به تنهایی مورد استفاده قرار می‌گیرند. مطالعات فیتوشیمیایی محققین بر عصاره آبی سوش‌های مختلف مشخص نموده است که بیشترین ترکیبات موجود در عصاره آبی تهیه شده از *G. lucidum*، پلی ساکاریدها و به میزان بسیار کمتر آمینواسیدها می‌باشند [۷]. مونوساکاریدهای موجود در *G. lucidum* عبارت‌اند از: گلوکز، گالاکتوز، مانوز، زایلوز [۱۳]. شناسایی قندها با دستگاه GC/MS نشان داد که

¹ Yoon



ضدقارچی و ضدویروسی *G. lucidum* از جمله کارهایی است که می‌تواند در مطالعات آینده مورد توجه قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

بر خود لازم می‌دانیم از سرکار خانم دکتر افتخار (دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه شهید بهشتی)، که ما را از راهنمایی‌های ارزنده خویش بهره‌مند ساختند و باکتری‌های مورد استفاده را در اختیار ما قرار دادند کمال سپاسگزاری را داشته باشیم.

G. lucidum جمع‌آوری شده از ایران علاوه بر مونوساکاریدهای فوق‌الذکر دارای قندهایی چون سوربیتول، اینوزیتول، آیدیتول نیز می‌باشد. تفاوت نتایج به دست آمده در این بررسی ممکن است بر اثر تفاوت شرایط اکولوژیکی بین سوش بومی ایران و سوش‌های بررسی شده توسط دیگر محققین بوده باشد. همچنین اندازه‌گیری میزان کل پلی ساکاریدها نشان داد که این گونه به میزان قابل توجهی پلی‌ساکارید در ساختمان سلولی خود دارد که می‌توان از آن جهت مصارف دارویی بهره جست. بررسی خواص درمانی مختلف *G. lucidum* ایرانی، شامل: کاهش کلسترول و قند خون، تقویت سیستم ایمنی و کاهش فشارخون، بررسی اثرات

منابع

1. Moradali MF, Hedjaroude GA, Mostafavi H, Abbasi M, Ghods SH and Sharifi-Tehrani A. The genus *Ganoderma* (Basidiomycota) in Iran. *Mycotaxon*. 2007; 99: 251 - 69.
2. Ershad J. fungi of Iran. 2nd ed. Agricultural Research, Education and Extension Organization, Tehran. Iran. 1995, pp: 874 - 5.
3. Gao Y, Zhou Sh, Chen G, Dai X and Ye J. A phase I/II study of *Ganoderma Lucidum* (Curt.: Fr.) P. karst. Extract (ganopoly) in patients with advanced cancer. *Int. J. Med. Mushr.* 2002; 4: 207 - 14.
4. Moradali MF, Mostafavi H, Ghods SH and Hedjaroude GA. Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi). *Int. J. Immunopharmacol.* 2007; 7: 701 - 24.
5. Badalyan SM, Gharibyan NG and Kocharyan AE. Perspective in usage of bioactive substances of medicinal mushrooms in Pharmaceutical and cosmetic industry. *Int. J. Med. Mushr.* 2007; 9: 275 - 6.
6. Yang X, Chen Ch, Mi K and Yang Q. The potential use of limulus G test assay for evaluation of immunomodulatory activity of *Ganoderma* Polysaccarides. *Int. J. Med. Mushr.* 2007; 9: 219 - 20.
7. Li XL, Zhou AG and Li XM. Inhibition of *Lycium barbarum* polysaccharides and *Ganoderma Lucidum* polysaccharides against oxidative injury induced by 8. Irradiation in rat liver mitochondria. *Carbohydr. Polym.* 2007; 69: 172 - 8.
8. Yoon SY, Eo SK, Kim YS, Lee CHK and Han SS. Antimicrobial activity of *Ganoderma lucidum* extract alone and in combination with some antibiotics. *Arch. Pharm. Res.* 1994; 17: 438 - 42.
9. Roberts LM. Australian *Ganoderma*: Identification, Growth and antibacterial properties. Ph.D. thesis. Environment and Biotechnology Centre, School of Engineering and Science, Swinburne University of Technology. 2004, pp: 271 - 2.
10. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA and Smith F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.* 1956; 28: 350 - 6.
11. Stevenson THT and Furneaux RH. Chemical methods for the analysis of sulphated galactans from red algae. *Carbohydr. Res.* 1990; 210: 277 - 98.



12. Kim HS, Kacew S and Lee BM. In vitro chemopreventive effects of plant polysaccharides (*Aloe barbadensis* Miller, *Lentinus edodes*, *Ganoderma Lucidum* and *coriolus versicolor*). *Carcinogenesis*. 1999; 20: 1637 - 40.

13. Lai LSh and Yang DH. Rheological properties of hot-water extracted polysaccharides in Lingzhi (*Ganoderma Lucidum*). *Food Hydrocolloids*. 2007; 21: 739 - 46.

