دراسة تأثير التآزر بين الفينولات المستخلصة من الشاي الأخضر و المضاد الحيوي النستاتين ضد فطر *Rhodotorulla sp.*

مشعل علي محمد

قسم علوم البيئة ، كلية علوم البيئة وتقناتها ، جامعة الموصل ، الموصل ، العراق

(تاريخ الاستلام: ٢ / ١٢ / ٢٠١٠ ---- **تاريخ القبول:** ٢٦ / ١٠ / ٢٠١١)

الملخص

في هذه الدراسة تم استخلاص الفينولات من الشاي الاخضر *Camella sineses* ودراسة تأثيرها في الفطر *Rhodotorulla sp.* اذ يثبط نمو الفطر بنسبة ٨٧% عند التركيز ٤٠٠ ميكروغرام/مل وبنسبة ٦٢% عند التركيز ١٠٠ مايكروغرام/مل وكان تأثير النستاتين لوحده عند التركيز ١٠٠ مايكروغرام/مل بنسبة ٧٢% وعند التركيز ٥٠ مايكروغرام/مل بنسبة ٦٣% وقد اظهرت دراسة التألف درجات مختلفة من التأثير، اذ ثبط نمو الفطر عند التركيز 100 مايكروغرام/مل بنسبة .80%ولم يظهر اي تأثير عند التراكيز ٢٥ ، ٥٠ مايكروغرام/مل على التوالي .وكان هناك حالات تضاد للتألف بين الفينولات والنستاتين.

المقدمة

ان نبات الشاي الاخضر *Camella sineses* مشروب شائع في انحاء العالم و يشربه حوالي 20% من البشر (١). الشاي له اهميه طبية كمضاد للتأكسد وللتقليل من الأصابة بالسرطان وضغط الدم ويحتوي الشاي الأخضر على الكثير من المركبات الكيمياويه مثل الكافيين caffeine, theobrmaine, triterpenes وزيوت طياره وغيرها من المركبات، ومنها الفينولات التي هي مجموعه من المركبات العضويه والانثراكينونات والفلافينويدات (٢) والتي لها تاثير في نموالعديد من الأحياء المجهرية ومنها الفطريات لذلك فقد تم استخلاصها كحوليا ودراسة تاثير عقارnystatin منفردا على الفطر ثم بعد ذلك ممزوجا مع مستخلص الفبنولات وتحديد درجة التداخل بينهم .

وتهدف الدراسة إلى :

١.دراسة تاثير فينولات الشاي الاخضر في نمو الفطر .

٢.معرفة درجة التآزربين فينولات الشاي الأخضر وعقارالنستاتين .

طريقة العمل :

تم استخلاص الفينولات من الشاي الاخضر بأخذ 40غرام من مسحوق الشاي الأخضر بأستخدام مذيب بنسبة (٩ ميثانول : ١ ماء) ، بعدها تم الاستخلاص بنسبة (١ ماء : ١ ميثانول) . في كلتا الخطوتين يترك المستخلص الى اليوم الثاني بعد ذلك يرشح المستخلصان ويبخران بجهاز المبخر الدوار الى الثلث ثم بعد ذلك يتم الفصل بقمع الفصل الخاص بالكلوروفيل حيث يضاف الكلوروفورم الى المزيج بنسبة (1:1) مع المزج اذ تظهر طبقتان (كلوروفورم + مائي) تؤخذ طبقة الماء وتجفف لنحصل بعد تجفيفها بجهاز lyophilizer على مسحوق داكن هو الفلافينويدات التي تم الكشف عنها بأستخدام محلول كلوريد الحديديك بتركيز ١% الذي يعطي لون اخضر او ازرق عند مزجه مع محاليل تحتوي على الفينولات (٤) .

إختبار الحساسية :

وقد تم إختبار تأثير هذا المستخلص في نمو الفطر *Rhodotorulla* والذي تم الحصول عليه من قسم علوم الحياة في كلية العلوم / جامعة الموصل. وقد درس التاثير المضاد للمايكروبات بطريقة الانتشار بالاقراص (٥) ، إذ تزرع الأحياء المجهرية (البكتريا والخمائر) بأنواعها في وسط المرق المغذي nutrient broth وحضنت بدرجة حرارة 37م ° لمدة ٢٤ ساعة قبل يوم من اجراء التجربة .ثم حضرت تراكيز مختلفة من مستخلص الشاي (12.5,25,50,100) ملغم /مل وتمت اضافة ١ مل من كل تركيز من هذه التراكيز الى انابيب يحوي كل منها على ١٠٠ قرص من ورق الترشيح (Whatman No. 1) وبقطر (٦) ملم وبعد تعقيمها بجهاز المعقام . بعد ذلك تم تلقيح عدد من الاطباق الحاوية على وسط الاكار المغذي Nutrient agarووسط اكار السابروويد Sabaurauds dextrose agarب (0.1)مل من المعلق الجرثومي ونشر على سطح الوسط الغذائي ثم يوضع في كل طبق قرص لكل تركيز من المادة المراد دراستها بعد ذلك وضعت الاطباق في الحاضنة بدرجة 37م ^{5} لمدة 24ساعة ويستدل على النتيجة بقياس قطر المنطقة الخالية من النمو والمحيطة بالقرص وتم اجراء مقارنة مع المضادات الحيوية (Nystatin).

حساب درجة التداخل لمعامل الارتباط لاقطار للمستعمرات الفطرية لمزيج المستخلصات النباتية :

تم ذلك كما في المعادلة التالية :

معامل الارتباط بين أقطار التثبيط للمستعمرات الفطرية لمزيج المستخلصات النباتية =

قطر التثبيط لمستخلص (أ) في المزيج قطر التثبيط لمستخلص (ب) في المزيج
———— + ————
قطر التثبيط لمستخلص (أ) لوحده قطر التثبيط لمستخلص (ب) لوحده

ان درجة التداخل تحدد وفقا لقيمة معامل الارتباط بين اقطار التثبيط للمستعمرات ,فاذا كانت القيمة تساوي (1)فأنه يعني ان هناك حالة اضافة additive اما اذا كانت قيمة معامل الارتباط اقل من (0.05) فأنه يعني ان هناك تأزرا مؤكدا significant synergistاما اذاكانت قيمة معامل الارتباط (0.9 -0.5)اي هناك احتمال وجود تأزر متوقع اما القيمة (١-١,٩) فأن هناك تضادا جزئيا partial antagonism واذا كانت اكبر من (٢) فإن هناك تضاداً antagonism (٦و٧).

النتائج والمناقشة

يوضح جدول (١) أن استخدام النبات مفردا يعطي تصورا عن التأثير الا ان تداخله مع مركبات كيميائيه يعطي تصورا عن التأثير المتداخل لكليهما معا .لذلك اظهرت الدراسة بعد استخلاص الفينولات من الشاي الأخضر ودراسة تأثيرها في نمو خميرة *Rhodotorulla* . يتبين من الجدول (١) بأن المستخلصات الفينولية من الشاي الأخضر ثبطت نمو الفطر عند التركيز 600mg/mL بقطر تثبيط (١٦) ملم وأعدت نسبة تثبيط ١٠٠% ، في حين نسبة التثبيط ٨٧% عند التركيز 400mg/mL و ٦٢% عند التركيز ١٠٠ مايكروغرام/مل . بينما عند التركيز ٢٥ مايكروغرام\مل و ١٢,٥ مايكروغرام\مل لم يظهر اي تاثير . لوحظت فروق معنوية حسب اختبار دنكن عند مستوى احتمال ٠,٠٥% بين المعاملات وهذه النتائج تتفق مع (8)الذي ذكر ان الفينولات لها تأثيرات عاليه ضد كل من الخمائر والبكتيريا وكذلك تتفق مع (9)الذي ذكر ان الفينولات تؤثر في اغلب الأحياء المجهرية.

جدول (٢) : في حين تبين دراسة تأثير النستاتين هو مضاد فطري في نمو الفطر *Rhodotorulla sp* .واذ يثبط نمو الفطر عند التركيز 100بنسبة 72%من التثبيط الاعلى وبنسبة 63%عند التركيز 50مايكروغرام /مل لم تختلف .ويختلف كل من التركيز 25,100مايكروغرام/مل عند مستوى احتمال 0.05حسب اختبار دكن واختلف معنويا عن التركيز 200مايكرو غرام/مل ولم يظهر الاختبار اي تاثير للفطر عند التركيز 12.5, 25مايكرو غرام/مل .وهذه النتيجه تبين اتفاقا مع (10,8)بأن مضاد النستاتين ذو تاثير قليل ضد الخمائر .

جدول (1) دراسة تاثير فينولات الشاي الاخضر في فطر *Rhodotorulla spp*عند درجة حرارة 27م° ولمدة 24ساعة.

التركيز التركيز (mg/L)	قطر التثبيط	النسبة المئوية للتثبيط
600	1547± 16	a100
400	1.4530± 14	b87
200	1.1457 ± 12	b75
100	1.1547± 10	d62
50	1.547± 8	e 050
25	0	e 0
12.5	0	e 0
السيطرة	0	0

الاحرف المتشابة تشير الى عدم وجود فرق معنوي والاحرف المختلفة تشير الى وجود فروق معنوية حسب اختبار دنكن عند مستوى احتمال 0.05وحسبت النسبة المئوية بالاعتماد على اعلى تركيز.

الجدول (٢) دراسة تاثير عقار النستاتين في *Rhodotorulla sp.* عند درجة حرارة ٢٥ م°

التركيز (mg/L)	قطر التثبيط	النسبة المئوية
200	11	a 100
100	8	b 72
50	7	b 63
25	0	c 0
12.5	0	c 0

الاحرف المتشابة تشير الى عدم وجود فرق معنوي والاحرف المختلفة تشير الى وجود فروق معنوية حسب اختبار دنكن عند مستوى احتمال 0.05 وحسبت النسبة المئوية بالاعتماد على اعلى تركيز.

الجدول (٣) دراسة تاثير التآزر بين مستخلص الفينولات مع عقار النستاتين ضد الفطر *Rhodotorulla spp*عند درجة حرارة 27م° ولمدة 24ساعة.

التركيز (mg/L)	التآزر	قطر النسبة
200	10 + 1.547	a 100
100	8 + 0.5774	b 80
50	0	b 0
25	0	b 0

الاحرف المتشابة تشير الى عدم وجود فرق معنوي والاحرف المختلفة تشير الى وجود فروق معنوية حسب اختبار دنكن عند مستوى احتمال 0.05وحسبت النسبة المئوية بالاعتماد على اعلى تركيز.

الجدول (٤) دراسة معامل الارتباط بين اقطار التثبيط ضد الفطر *Rhodotorulla spp.*

التركيز (mg/L)	معامل الارتباط	الحالة
200	1.7	تضاد
100	1.8	تضاد
50	0	لايوجد
25	0	لايوجد

تم دراسة تاثير التآزر اذ يتبين من الجدول (3) دراسة تاثير التألف بين

مستخلص الفينولات والنستاتين عند درجة حرارة 37م ^{5}في وسط S.D.Aولمدة 24 ساعة اذا كان قطر التثبيط لنمو الفطر 10 ملم وهو اعلى تثبيط في حين تثبيط نمو الفطر عند 100مايكروغرام/مل بنسبة % 80 بالتثبيط الاعلى وكان قطر التثبيط 8ملم ولم يظهر اي تاثير عند التركيز 50مايكروغرام/مل و 25مايكروغرام/مل ولم يكن هناك اختلاف معنوي بين 200و 100وقد ذكر (8) ان استخدام مزيج من النباتات ضد الفطريات يعطي درجات من التداخل مختلفة في التثبيط اما الجدول (4) فيظهر معامل الارتباط بين اقطار المستعمرات .وجودحالة تضاد جزئي عند التركيز 200 مل اذا كانت قيمة معامل الارتباط اكبر من 8 كان التاثير عند التركيز 50 مايكروغرام/مل . اتفقت مع (11)اذ اشار الى ان هناك درجات مختلفة من التداخل في استخدام التالف وقد اختلفت الدراسة اختلافا كليا مع (12)الذي اشار الى ان اي مزج للنباتات يودي الى زيادة فعالية كليهما ضد الاحياء المجهرية .ان ألأختلاف في التاثيرفي الفينولات التي تحتويها النباتات يعود الى ان محتوى الفينولات من المركبات الفينوليه التانينات tanins , والفلافينويدات flavenoids ,, catechinsاذ ان هذه المركبات موجوده في كل من الشاي الاسود والاخضر (13)لذلك كان مستخلص الفينولات من الشاي الاخضر اقل تاثير في نمو الخمائر من الفينولات من الشاي الاسود اذ اشار (8)الى ان الفينولات كان تاثيرها جيد ضد الخمائر .وان المضاد النستاتين الذي ثبط نمو الفطر وكان اقل تاثيرا مقارنة مع مستخلص الفينولات هذا يتفق مع (8) وكذلك ذكرت (14) ان تاثير النستاتين كان ضعيفا ضد الفطر Candida albicansاذ ان استخدام المزج اعطى في البحث تضادا الذي يشير الى حدوث تنافر بين مكونات المركب الممزوج مع المركب الاخر اي تنافس في الارتباط مع المواقع الفعالة في جدار الفطر اي ان ارتباط مركبات النستاتين قلل تاثير الفينولات التي كان تاثيرها اكبر قبل المزج اي ان المزج ادى الى حدوث تضاد في التاثير بين النستاتين والفينولات ضد الفطر .اي ان التداخل يعتمد كليا على ميكانيكية تاثير كليهما التي قد توثر على الجدار او العمليات الايضية والانزيمات المهمة .(16,15) . ويستنتج من الدراسة أعلاه :

١.الفينولات المستخلصة من الشاي الاخضر ذات تاثير في نمو الفطر قيد الداراسة

٢.حصول إنخفاض في تاثير الفينولات المتألفة مع النستاتين اي حدوث تضاد بين كل منهم .

المصادر:

1. Metz N.; Lobstein A.; Schneider Y.; Gosse F.; Schleiffer R.; Anton R. and Raul F. (2000). Suppression of azoxymethane - induced preneoplastic lesions and inhibition of cyclooxygenase – 2 activities in the colonic mucosa of rats drinking a crude green tea extract. Nutrition and cancer. 38(1):60-64.

2. Evans W.C. (1997) Trease and Evans pharmacognasy. (14th edition).PPW.B. Saunders Company, a division of Harcourt brace and company, Asia, pp: 225-227.

3. Zakaria, M. (1991).Isolation and charactezation of active compound from medicinal plants. Journal of Ethnopharmacol, 6:15-20.

4. Harborne, J. B. (1973). Phytochemical methods .chapman and holl. London.

5. Bauer, A.W.; Kirbay, W.A.M.; Sherris, J.S. and Turk, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. Amer.J. Clin. Pathol. 45: 493-496.

6. Koneman, E. W.; Allen, S.D.; Dowell, V.R.; Janda, W.M.; Sommers, H.M. and Winn, W.C. (1997).Color atlas and text book of diagnostic microbiology 14th edition ,J. B. Lippincott com. , Philadelphia , U.S.A.

7. Sammarai, A. B. (1980). Chemotherapy of infection by herpes virus hominess. PhD. thesis Sheffield univ. U.K.

٨. العنزي ,مشعل علي .(2008) ,دراسة تأثير الفينولات في نمو بعض الخمائر والبكتريا ,مجلة تكريت للعلوم ,العدد (1) :المجلد 137.

9.Farag , R. S. ; Daw , Z. Y. ; Hewed , F. M. and El-Baroty , G.S.A. (1998) Antimicrobial activity of acme Egyptian spice essential oils. J. Food prot. 52: 665-669.

١٠. سعيد ,عمر فخري ;منال فوزي ;مشعل علي محمد (2007) , دراسة تأثير التربنويدات في نمو بعض اجناس الخمائر والبكتريا .مجلة التربية والعلم ,المجلد .176

١١.العنزي ,مشعل علي (2001) ,دراسة تأثير التألف بين مستخلص الثوم ومستخلصات عدة نباتات طبية ضد بعض الفطريات الممرضة للانسان ,رسالة ماجستير كلية العلوم ,جامعة الموصل .

١٢.احسان شفيق، الجنابي ;محمد هاشم ، السامرائي ;مؤيد عبد الاله .(2001) .تاثير بعض المستخلصات النباتية على بعض البكتريا المسببة لالتهاب المجاري البولية ، المؤتمر للعلوم الطبية الحياتية 24-26)نيسان .(كلية العلوم الطبية والسانده ، جامعة الزرقاء الاهلية ، الاردن .

13. Saeed, Omar Fakhri, (2004) The Effect of Green and Black tea extracts on different cell lines in vitro. Thesis .Submitted for College of Pharmacy, University of Mosul. Iraq.

١٤. الرجبو، مها أكرم محمد .(2005) دراسة تاثير مستخلصات نبات الزعتر على بعض الفطريات طروحة دكتوراة .قسم علوم الحياة / كلية العلوم، جامعة الموصل.

15. Laurence, D. R.; Bennett, P.N. and Brown, M. J. (1997). Clinical pharmacology. 8th edition Churchill Livingston, New York, USA.

16. Neal, M. J. (1997).Medical pharmacology at glance. 3rd edition. Blackwell Science.

Studying the Effect of Synergism between phenols extracted from green tea plant and those extracted from antibiotic nystatin against fungus *Rhodotorulla sp.*

mishal ali Mohammad
Dept. of Env. Sci , Coll. of Env. Sci. and Tech , University of Mosul, Mosul, Iraq
(**Received:** 2 / 12 / 2010 ---- **Accepted:** 26 / 10 / 2011)

Abstract
In this study, phenolic compounds had been extracted from green tea (camella sineses) and their effects on Rhodotorulla sp. Inhibited the growth at %87 in 400 mg\ml and %62 at 100 mg\ml and the effect of nystatin was 100 mg\ml with %72 as alone. In concentration 50 mg\ml the ratio was %63. The study showed the corresponding in various degrees and inhibited the growth of fungi. In concentration 100 mg\ml with %80 and it didn't has any effect on 50, 25 mg\ml and it was antagonism between phenolic and nystatin.