مجلة جامعة تكريت للعلوم الزراعية المجلد(13) العدد(1)–(2013)
ISSN-1813-1646

دراسة الكفاءة التثبيطية لزيت القرنفل Clove oil وزيت الزعتر Thymus oil ومستخلص الزوائف الزنجارية *Pseudomonas aeroginosa* ومستخلص فطر الـ*Aspergillus niger* على نمو بعض من الفطريات الجلدية

خليل ابراهيم بندر
قسم علوم الحياة – كلية العلوم – جامعة تكريت

الخلاصة

أظهرت النتائج الحالية أن هنالك اختلافات واضحة في التاثير ما بين المستخلصات وما بين التراكيز المختلفة على نمو الفطريات الجلدية المعزولة *Piedraia hortai* و *Microsporum ferrugihium* و *Trichophyton mentographyte* و *Candida ablicans* وقد تفوق زيت القرنفل Clove oil على بقية المستخلصات اذ كانت نسبه التثبيط 100% بالنسبه للفطرين *Microsporum ferrugihium* و *Trichophyton mentographyte* خاصه عند التركيزين 30و40 ملغم/مل بينما كانت نسبه التثبيط لزيت الزعتر 100% عند التركيز 40 ملغم /مل بالنسبه للفطر *Piedraia hortai* .وأظهر التركيزين 10 و 20 ملغم/مل تاثيراً اقل ولكافة المستخلصات وتفوق زيت الزعتر Thyme oil على بقية المستخلصات في تاثيره على نمو فطر الخميرة *Candida albicans* اذ بلغ قطر هالة التثبيط 22 مل عند التركيز 40 ملغم/مل اما مستخلص بكتريا الزوائف الزنجارية ومستخلص الفطر *Aspergillus niger* فقد أظهرا ايضا قدرة تثبيطية ولكن بنسبة اقل بالمقارنة مع كلا الزيتين. وأظهر فطر *Candida albicans* مقاومة ضد مستخلص البايوسيانين وعند كافة التراكيز.

الكلمات الدالة : زيوت نباتية ، فطريات

للمراسلة : خليل ابراهيم بندر علوم الحياة–كلية العلوم–جامعة تكريت

الاستلام: 7-2-2012
القبول : 19-3-2012

Study the inhibitory efficiency of clove oil and thyme oil and extract of *Pseudomonas aeroginosa* and the fungus *Aspergillus niger* on the growth of some dermatophyte fungi

K.I.Bander
Department of Biology-College of Science-Tikrit University

KeyWords: Antioxidant , orange m fruits

Correspondence: K.I.Bander

Department of Biology-College of Science-Tikrit University

Received: 7-2-2012
Accepted: 19-3-2012

Abstract

Different extracts and concentrations used in this study showed different effect on growth of the dermatophytes used *Piedraia hortai*, *Microsporum ferruginium*, *Trichophyton mentographyte* and *Candida albicans* .High inhibitory effect on these dermatophytes was shown by clove oil compared with the rest of the extract.Thyme oil came second in its inhibitory effect ,particularly at concentration 30-40 mg/ml *Candida albicans* was highly affected by Thyme oil than by other extracts.Extracts from *Pseudomona aeruginosa* and *Aspergillus niger* showed less inhibitory effect on the studied dermatophytes than that caused by clove and Thyme oils.However Candida albicans showed resistance to pyocyanin extract.

المقدمة

ان الفطريات الجلدية Dermatophytes التي تسبب مجموعة من الامراض الجلدية يطلق عليها اسم Dermatomycoses من اكثر انواع الفطريات الممرضه شيوعاً واوسعها انتشاراً في العالم اذ تسبب العديد من الاصابات الجلدية للانسان والحيوان على حد سواء ، وتصل هذه الفطريات للانسان اما بصورة مباشرة عن طريق الاتصال المباشر مع الحيوانات المصابة او الحاملة لها او بصورة غير مباشرة عن طريق حمل سبورات هذه الفطريات بالهواء ، اذ يجري انتقالها من مكان لاخر فضلاً عن وجودها في التربة اذ تستطيع المكوث فيها لأشهر أو سنوات (Roberts , 1983). ان استعمال المضادات الحيوية في معالجة الامراض الجلدية لاسيما الصناعية منها تعمل على تثبيط او قتل الاحياء المجهرية المسببة للامراض الجلدية عند استخدامها بتراكيز معينة (Hugo and Russel , 1989) ولكن بالمقابل لوحظ ان لهذه المضادات تاثيرات جانبية خطيرة على وظائف الاعضاء في الجسم العائل منها الكبد والطحال والبنكرياس والقلب فضلاً عن خفض كفاءة الجهاز المناعي (Xia and Kong , 1998) بالاضافة الى كونها مكلفة مادياً ، لهذا كانت الاتجاهات الحديثة الى استخدام بدائل رخيصة وأمينة منها استخدام النباتات الطبية سواء تلك المزروعة منها او النامية بشكل طبيعي ، حيث اشارت اغلب الدراسات ، ان المادة الفعالة المستخلصة من النباتات تعطي نتائج افضل من المادة نفسها المصنعة كيميائيا والتي ترافقها تاثيرات جانبية (السامرائي ، 2009).اضافة الى ذلك اشارت بعض دراسات ان لبعض النواتج خارج خلوية لبعض أنواع البكتريا والفطريات لها تاثيرات مثبطة واسعة المدى في نمو جراثيم مختلفه (Pei , 1999) فقد لوحظ ان البايوسيانين الذي تفرزه بكتريا الزوائف الزنجارية *Pseudomonas aeroginosa* ذو فعالية تثبيطية ضد العديد من الجراثيم وقد ذكرت فعاليته بكونه مضاداً حيوياً لاول مرة من قبل العالمان (Emmerich and Low , 1899) اذ وجدا ان الزرع القديم للزوائف الزنجبارية يمنع نمو عد من الجراثيم السالبة والموجبة لصبغة كرام وكان المؤشر لهذا الفعل هو صبغة البايوسيانين ،وفي دراسة للتكريتي (2009) سجل التاثير التثبيطي لهذه الصبغة على عدد من البكتريا والفطريات وأوضحت الدراسة التي قام بها Pera *et al* (2006) أن النواتج خارج خلوية لفطر *Aspergillus niger* تحتوي العديد من الانزيمات والمواد التي تلعب دوراً في تحليل الطبقة الدهنية الموجودة في الاغشية الخلوية للاحياء المجهرية وقد لاحظت الباحثة نعمان (2011) التاثير المثبط لمستخلصات *A.niger* في بعض انواع من الاحياء المجهرية المعزولة من الاطفال الرضع.الهدف من الدراسة الحالية هو تقييم الكفاءة التثبيطية لبعض الزيوت النباتية والنواتج خارج خلوية لبكتريا الزوائف الزنجبارية *Pseudomonas aeroginosa* وفطر الـ*Aspergillus niger* على بعض أنواع من الفطريات الجلدية والخمائر المعزولة من المرضى المراجعين للمستشفيات والعيادات الخاصة في محافظة صلاح الدين.

المواد وطرائق البحث

العينات النباتية :

تم الحصول على زيت القرنفل (*Syzygium aromaticum*) Clove oil وزيت الزعتر (*Thymus vulgaris*) Thyme oil من معمل عماد لصناعة الزيوت النباتية–الموصل وتم مزج الزيوت كل على حدة بمادة Tween 80 بتركيز 0.05% وبعد ذلك خففت بالماء المقطر المعقم وحضرت منها التراكيز المختلفة 10 ، 20 ، 30 ، 40 ملغم/مل.

بكتريا الزوائف الزنجارية *Pseudomonas aeroginosa* :

تم الحصول على بكتريا الزوائف الزنجبارية من قسم علوم الحياة–كلية العلوم–جامعة تكريت وقد تم اعادة تشخيصها مرة ثانية اعتمادا على الصفات المظهرية والمجهرية والاختبارات الكيموحيوية وحسب ما جاء به (Stephen and Hawkey , 2006) .

اعتمدت طريقة Essar *et al* (1990) لانتاج صبغة البايوسيانين وذلك بأخذ 5 مل من العينة النامية على وسط الزوائف السائل وتم ترسيب الخلايا بعملية الطرد المركزي بسرعة 3000 دورة بالدقيقة ، وأهمل الراسب وأخذ الراشح وأضيف اليه 3 مل من الكلوروفورم ورج جيداً وبعد ذلك اخذت الطبقة العليا من الراشح وأضيف اليها 1 مل من حامض الهيدروكلوريك 0.2N ووضعت في جهاز الطرد المركزي بسرعة 3000 دورة بالدقيقة لمدة 5 دقائق وبعد ذلك اخذت الطبعة العليا من الراشح واضيف اليها بورات هيدروكسيد الصوديوم ، يلاحظ تكون طبقة زرقاء الى الاسفل تمثل صبغة البايوسيانين وضعت بعدها في طبق بتري وتركت لتجف تحت درجة حرارة الغرفة.ولتحضير التراكيز المختلفة يتم أخذ 1 غم من صبغة البايوسيانين ويضاف اليها 10 مل ما مقطر معقم للحصول على محلول بتركيز 100 ملغم/مل ويتم تحضير بقية التراكيز من هذا التركيز وهي 10 ، 20 ، 30 و 40 ملغم/مل .

مستخلص الفطر *Aspergillus niger* :

تم الحصول على عزلة محلية من فطر الـ*A.niger* وذلك عن طريق أخذ 1غم من تربة كلية العلوم وأضيف اليها 99 غم من ماء مقطر معقم داخل دورق زجاجي حجم 250 مل ورجت جيداً وبعدها أخذ 1 مل من المزيج واضيف الى9مل ماء مقطر معقم ثم اجريت عليه سلسلة تخافيف ولغاية 10^{-5} أخذ 0.1 مل من التخفيف

10^{-4} و10^{-5} وزرعت كلاً على حدة على وسط البطاطا دكستروز آجار(PDA)Potato dextrose agar المحضر سابقاً . ثم حضنت الاطباق داخل حاضنة بدرجة حرارة 25م لمدة 2–8 أيام وبعدها فحصت المستعمرات النامية ونقيت عزله الفطر *A.niger* وذلك باعادة زراعتها على وسط (PDA) الى ان يتم الحصول على عزله نقية من الفطر المذكور (Benson , 2001).

وحفظت في الثلاجة بدرجة حرارة 4م لحين الاستخدام مع تنشيطها كل اسبوعين وذلك باعادة زراعتها على وسط PDA وتحت نفس الظروف السابقة.

الفطريات الجلدية :

تم الحصول على عينات الفطريات الجلدية من المرضى المراجعين للمستشفيات والعيادات الخاصة في مدينة تكريت وجرى تشخيصها بالفحص المجهري المباشر اولاً ومن ثم زرعت العينات المأخوذة من المرضى على وسط سابرويد Sabourad agar (SDA) المضاف اليه chlromphenicol cyclohexamide وحضنت الاطباق بدرجة حرارة 28م ولمدة (2–20) يوماً وفحصت النموات بشكل دوري مع اجراء تنقية العزلات بشكل مستمر على وسط (SDA) وبعد تمام التنقية ، يجري تشخيص الفطر وذلك من خلال ملاحظة شكل المستعمرة (غائرة ، بارزة) ولونها ونسجتها وشكل الهايفات والسبورات بالاعتماد على المصادر الاتية في التشخيص (Emmons *et al* , 1997 , Frey *et al* .,1979 , Kwon-chung and Bennett , 1992 , Kane and Summerbell ,1999 , deHoog and Guarro,1999 ,.Suhonen *et al* 1999) وتم تشخيص الفطريات الجلدية الاتية : *Piedraia hortai* و *Microsporum ferruginium* و *Trichophyton mentogrophyte* و *Candida albicans*.

اما بالنسبة لفطر الخميرة فقد تم فحص الاطباق بعد مرور 24 ساعة واجري عليها اختبارات عدة منها تكوينها للانبوب الجرثومي والابواغ الكلاميدية وانتاجها لانزيم البروتيز واعتمدت المصادر الاتية في التشخيص (Larone , 1995 and Ahear *et al* .,1968).

تعقيم المستخلصات :

عقمت جميع التراكيز المحضرة سابقاً وكل على حده وذلك من خلال امرارها عبر اوراق ترشيح معقمة ذات قطر 0.22 مايكروميتر.

اختبار تاثير المستخلصات على نمو الفطريات الجلدية :

اتبعت طريقتين لدراسة تاثير المستخلصات :

1–طريقة تخفيف الاكار :

اعتمدت طريقة Kady *et al* (1993) لقياس تاثير المستخلصات في نمو الفطريات الممرضة *Piedraia hortai* و *Microsporum ferruginiun* و *Trichophyton mentogrophyte* اذ مزج الوسط الغذائي (SDA) الخالي من المضاد البكتيري مع التراكيز المحضرة سابقا كل على حدة وبعد تصلب الوسط وضع اللقاح الفطري في مركز الطبق (Faraj *et al* 1990.,) المأخوذ من حافة مستمرة فطرية بعمر 7 أيام. حضنت الاطباق داخل حاضنة بدرجة حرارة 25م ولمدة 7 أيام وتم قياس قطر المستعمرات النامية بأخذ معدل قطرين متعامدين وقد استخدمت ثلاث مكررات لكل تركيز .

2–طريقة الانتشار في الحفر :

اتبعت طريقة Perez *et al* (1990) وكما يلي تم صب 20 مل من الاكار المغذي في أطباق بتري ، ولقحت الاطباق بفطر الخميرة *Candida albicans* وذلك بنشر 0.1 مل من مزروع الخميرة ثم تركت الاطباق لتجف في درجة حرارة الغرفة ثم عملت حفر في الاطباق بقطر 5 مل في الوسط المزروع بفطر الخميرة بوساطة ثاقب فليني معقم ، وأضيف 0.2 مل من التراكيز المحضرة مسبقاً وكل على حدة الى هذه الحفر. وعملت ثلاث مكررات لكل تركيز ، وحضنت الاطباق بدرجة حرارة 37م لمدة 24 ساعة ، وبعدها تم قياس قطر هالة التثبيط.

النتائج والمناقشة

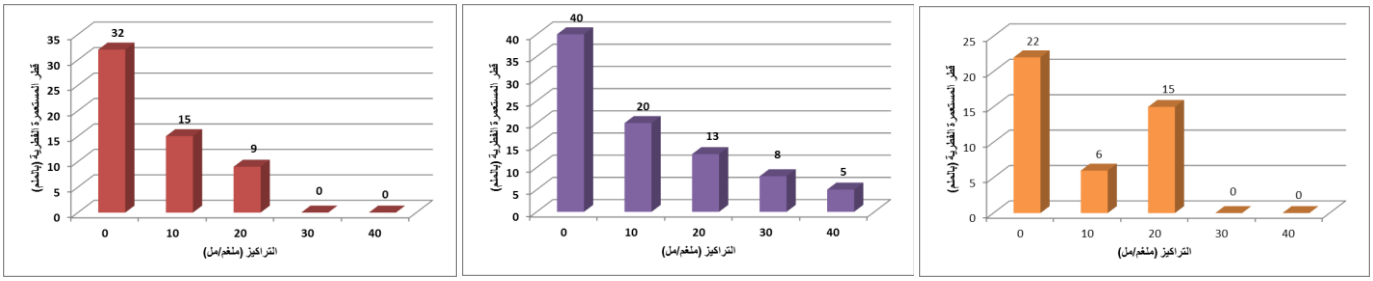
أظهرت النتائج المبينة في الاشكال (1–5) ان هنالك اختلافات واضحة في التاثير ما بين المستخلصات وما بين التراكيز المختلفة على نمو الفطريات الجلدية قيد الدراسة. فقد أظهرت النتائج ان لزيت القرنفل Clove oil قدره تثبيطية عالية اذ كانت نسبه التثبيط 100% بالنسبه للفطرين *Microsporum ferrugihium* و *Trichophyton mentographyte* خاصه عند التركيزين 30و40 ملغم/مل بينما كانت نسبه التثبيط لزيت الزعتر 100% عند التركيز 40 ملغم /مل بالنسبه للفطر *Piedraia hortai* وكما هو واضح في الشكل (2,1). وأظهر التركيزين 10 و 20 ملغم/مل نسباً تثبيطية اقل في كلا الزيتين. وبلغ قطر هالة التثبيط 22 مل عند التركيز 40 ملغم/مل بالنسبة للفطر *Candida albicans* شكل(5) ويمكن ان تعزى القابلية التثبيطية لهذه الزيوت الى قدرتها في التداخل مع وظيفة الغشاء السايتوبلازمي وخصوصاً مع قوة حركة البرتون (Proton motive force) وألية النقل الفعال Active transport وبالتالي حدوث خلل في الفعاليات الايضية الخلوية (Naidu *et al* .,2000) أو أن لهذه الزيوت القدرة على التفاعل مع بروتينات الغشاء الخلوي مما

يسبب تغييراً في نفاذية الغشاء الخلوي وبالتالي حدوث خلل في الفعاليات التنفسية ومجمل الفعاليات الايضية داخل خلايا الخيط الفطري فضلاً عن اعاقة ارتباط انزيم succinate dehydrogenase مع NADH اضافة الى ايقاف عملية الفسفرة التأكسدية وسلسلة نقل الالكترونات التي تجري داخل الخلايا خلال عملية التنفس (Knobloch *et al* .,1986).

اما بالنسبة لتاثير مستخلص البايوسيانين المعزول من بكتريا الزوائف الزنجارية ومستخلص الفطر *Aspergillus niger* والموضحة في الشكلين (3 و 4) فقد أظهرت قدره على التثبيط ولكن بنسبة اقل مقارنة مع زيت القرنفل والزعتر مع ملاحظة انه لم يكن هنالك تاثير لمستخلص البايوسيانين في تثبيط فطر الخميرة *Candida albicans* شكل (5) ولوحظ ان اعلى نسب تثبيط جاءت ايضا عند التركيزين 30 و 40ملغم/مل ، أن هذه النتائج جاءت متوافقة مع دراسة Hassett *et al* (1992) الذي اشار الى ان لصبغة البايوسيانين فعالية مضادة للبكتريا والفطريات والاوالي وأشار Stephen and Hawkey (2006) ان البكتريا المنتجة لهذه الصبغة تستفاد منها في التخلص من الاحياء المجهرية المضادة او المنافسة لها . وان عدم ظهور تاثير لمستخلص البايوسيانين على فطر الخميرة *Candida albicans* قد يعود الى التباين الذي تظهره الاحياء المجهرية في امتصاص الصبغة او ان مركبات الايض الثانوي لهذه الخميرة تقوم باختزال تاثير هذه الصبغة.

اما بالنسبة لمستخلص فطر *A.niger* فقد تعود الى القدرة التثبيطية لهذا الفطر لكونه يقوم بانتاج طيف واسع من الانزيمات المحللة منها انزيمات cellulases و lipases و lactase و pectinases والـــacid proteases وكذلك انتاجه للعديد من الاحماض العضوية مثل citric acid و gluoconic acid و malic acid (Pera *et al* .,2006 and Ward , 1992).

وأشار Hameed ,(2010) ان التثبيط قد يعود الى ان المركبات الفعالة المنتجة من هذا الفطر قد تعمل على اعاقة انتفاخ السبورات وبالتالي انباته او أن هذه المركبات تقيد النمو الشعاعي للمستعمرة الفطرية ، بسبب انتاج خيوط فطرية مشوهه لاتنمو بصورة طبيعية.

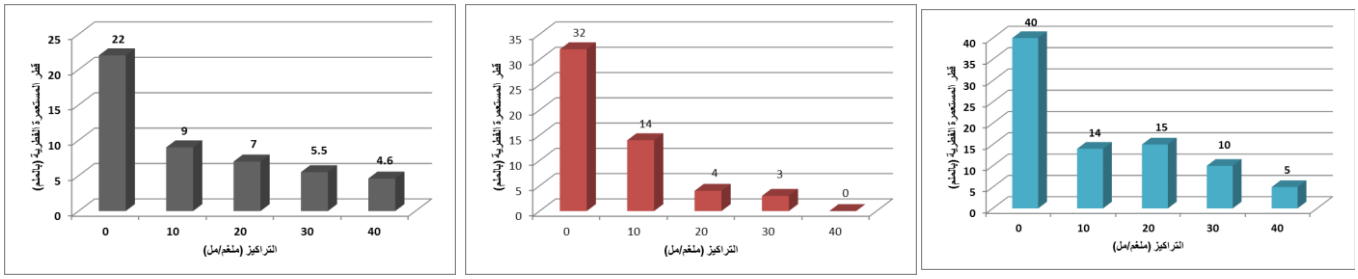


شكل (1) تاثير زيت القرنفل في نمو الفطريات :

(A) *Trichophyton mentogrophyte*.و

(B) *Piedraia hortai*.و

(C) *Microsporum ferruginium*.

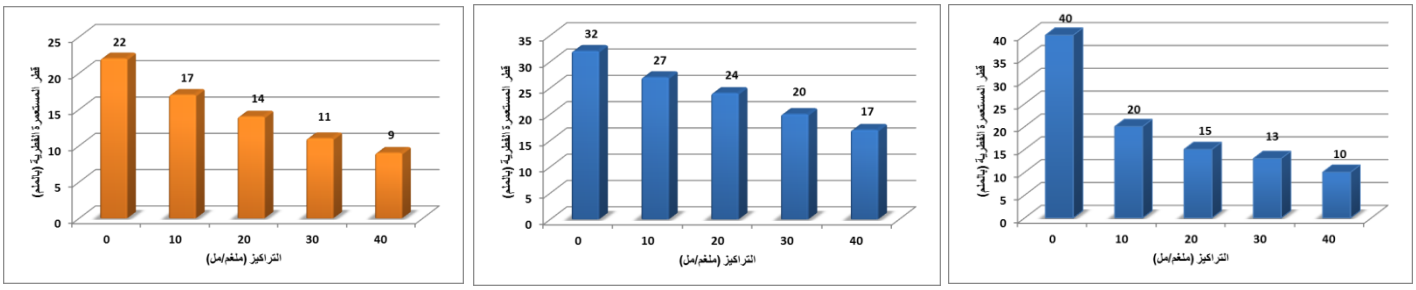


شكل (2) تاثير زيت الزعتر في نمو الفطريات :

(A) *Trichophyton mentogrophyte*.و

(B) *Piedraia hortai*.و

(C) *Microsporum ferruginium*.

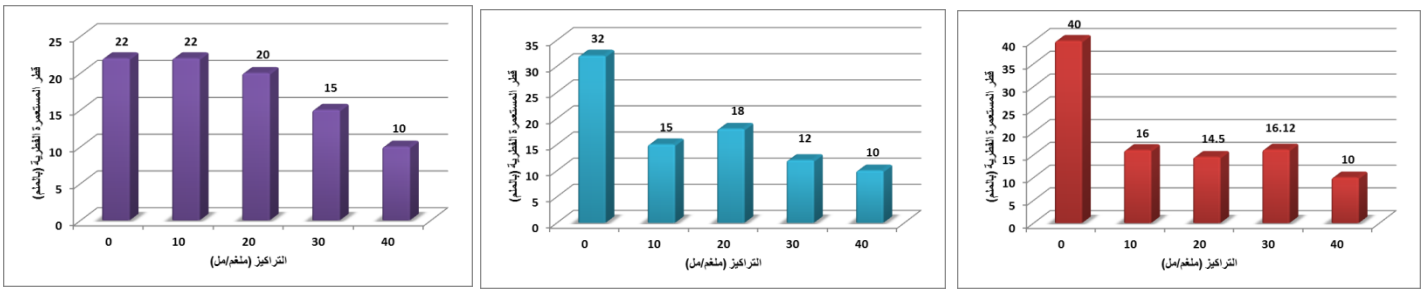


شكل (3) تاثير مستخلص البابوسيانين في نمو الفطريات :

(A) *Trichophyton mentogrophyte*.و

(B) *Piedraia hortai*.و

(C) *Microsporum ferruginium*.

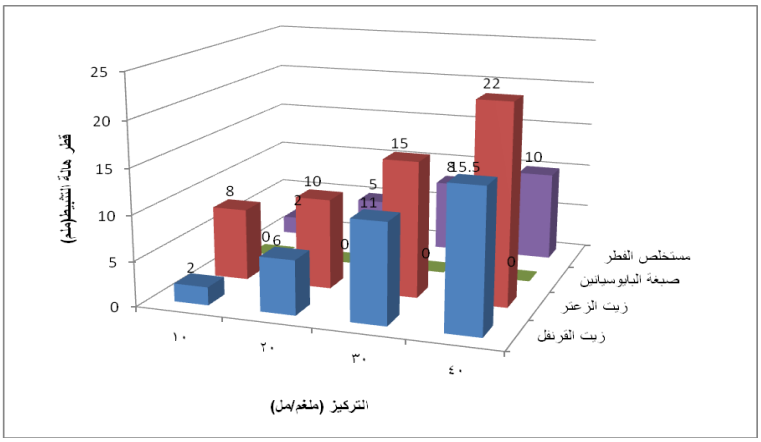


شكل (4) تاثير مستخلص فطر الـ*A.niger* في نمو الفطريات :

(A) *Trichophyton mentogrophyte*.و

(B) *Piedraia hortai*.و

(C) *Microsporum ferruginium*.



شكل (5) تأثير المستخلصات المختلفة على نمو فطر خميرة *Candida albicans*

المصادر

التكريتي ، ابراهيم عبد الرحمن الطيف (2009) دراسة بكتروبيولوجية ووراثية لبكتريا الزوائف الزنجبارية المعزولة من اخماج بشرية مختلفة. رسالة ماجستير كلية العلوم –جامعة تكريت.

السامرائي ، بثينة عبد الخالق عقيل (2001) تاثير مستخلصات نبات الدفلة على نمو بعض الفطريات الجلدية المعزولة من مرضى مدينة سامراء .رسالة ماجستير –كلية العلوم – جامعة تكريت.

نعمان ، سجى جمال (2011) مقارنة بين استخدام مستخلصات العفص ومستخلص الفطر *Aspergillus niger* في تثبيط الفطريات والبكتريا المرضية المعزولة من الاطفال الرضع المصابين بحاله اسهال.رسالة ماجستير –كلية العلوم –جامعة تكريت.

Ahearn , D.G. Meeyers , S.p and Nichols , R.A. (1968) .Extracellar proteases of yeast and yeast like fungi.Microbiology 16 , 1370-1374 .

Benson , (2001). Microbiological applications lab manual 8th ed. The McGraw-Hill companies USA.

deHoog ,G.S.and Guarro,J.(1995)Atlas of clonical fungi.

Ellabib , M.S. and Khalifa , Z.M.(2001). Dermatophytes and other fungi associated with skin myroses in tripoli , Libya , Ann. Med. 21(34) : 193-195.

Emmerich , R. and Low , V.O.(1899). Akteriologische enzymeals ursacheder erworbenen immunitat and die heilugvon infection kran kheitin durch dieselben.Z. immunitats forsch 31: 1.

Emmons , C.W. ; Binford , C.H. ; Utz , J.P. and Chung , K.J. (1977). Medical my cology second edition printed in the United State of America.

Essar ,D.W., Eberly , L.,Hadero,A.,.and Crawford I.P.(1990) Identification and characterization of genes for second anthrailates synthase in *Pseudomonas aeruginosa* interchangeability of the two anthrailate synthases and evolutionary implication .J.Bacteriology :172(2)884_900.

Faraj , M.K. (1990). Regulation of mycotoxin formation in zea mays.Ph.D. Thesis Department of bioscience and biotechnology University of Strathelyed , Glascow , UK.

Frey , D. ; Oldfield , R.T. and Bridger , R.C. (1979). Dermatophytoses . In : A color atlas of pathogenic fungi wolf Medical Public Publication Ltd, pp:20-71.

Hameed ,Nazeeh Maher .(2010).In Vitro Evaluluation of the *Activity of Aspergillus niger* Extract on the viability of *Staphylococcus aureus* and Protoscolices of Hydatid cyst M.S.c thesis college of science.

Hassett,D.J.,charniga,L.,Bean ,K.,Ohman ,D.E.,and Cohen,M.S.(1992).Response of *Pseudomonas aeruginosa* to pyocyanin :mechanism of resistance ,a manganese-cofactored superoxide dismutase .Infection and immunology ;60:328-336 .

Hugo , W.B. and Russel , A.D.(1989). Pharmaceutical microbiology 4th ed Black well Scientific Publications , London.

Kady , I.A. EL-Maragh , S.S. and Mohamed E.M. (1993). Antibacterial and antidermatophytes activities of some essential oils form species .Qatar Uni. Sci. J.B. (1) : 9-63.

Kane , J. and Summerbell R.C. (1999)Trichophyton Microsporum Epidermatophyton and agent of superficid mycosis In : Mannual of clinical microbiology 17th ed .Edited by Murrage P.R. (ed) Washington.

Knobloch , K. ; Weis , N. and Weigand , H.(1986).Mechansim of antimicrobial activity of essential oil.Plauta medica, 52:556.

Kwon-chung , K.J.K. and Bennett , J, E.(1992). Medicals mycology.Williams and Wilkins .London.

Larone , D.H.(1995). Medically important fungi : a guid and identification 3th ed .Asm. press washtngton, D.C.(Abst).

Naidu , A.S., Bidlack , W.R. and Crecelius , S.(2000). Phyto antimicrobials In : Natural antimicrobial system, by Aidu A.S. (ed) (RC press , New York , 325-417).

Pei , S.J. (1999) Modernize traditional medicine and inheritance of Ethno-medicine in china ethnobotany 3:27-35.

Pera , Licia , M. ; Cintia M. Romeros Mario O. Baigor and Guillermo R. Castro (2006) Catalytic properties of lipase extracts from *Asperigillus niger* .Food Technol. Biotechnol.44(2) :247-252.

Perez , L. ; Pauli , M. and Bazequre , P.(1990). Antibiotic assay by the agar-well diffusion method. J. od Actabiology 15:113-115.

Roberts , D.T.(1983). Fungal skin infection .J. Medic. Int. (28) :1328-1330.

Stephen , H.G. and Hawkey , M>a>(2006) Principly and practice of clinical bacteriology , 2nd John wiley and sons Ltd p.427-443.

Suhonen , R.E. Dawber , R.P. and Ellis D.H.(1999) Fungal infection of superficial mycoses in medical mycology Apractical approach superficial Tinea infections .Am. Fam. Physiciam 65(10): 2095.

Ward , O.P.(1989) Fermentation biotechnology prentice Hal , Engle wood cliffs NJ. Kubicek and Rohr M.1986 citric acid fermentation. J.Biotech Vol. 3(4) : 331-373.

Xia , Q. and Kong , J. (1998). Methods used in ethnomedicine studies in applied Ethnobotany proceeding of the national traning work shop on applied Ethnobotany in China.