تاثيــر زيــت الحـلـبة على نموالفــطريات (*Candida ,Aspergillus* و *Penicillium*) المعزولة من مناطق مختلفة من جسم المرضى المصابين بامراض فطرية في مدينة الناصرية

صالح جبار بطاح[1]، آفاق حميد ناصر[2] ، أسماء كاظم عجيل[3]

[1]دائرة صحة ذي قار، وزارة الصحة

[2،3]قسم علوم الحياة، كلية التربية للعلوم الصرفة، جامعة ذي قار

الخلاصة

شملت الدراسة 10 انواع من الفطريات المرضية من اصل ثلاثة اجناس هي (*Candida ,Aspergillus* و *Penicillium*) عزلت من مناطق مختلفة لجسم الانسان وقد تمت معاملة انواع الفطريات المعزولة (79 عينة) بزيت الحلبة , اذ اظهرت النتائج ان نسبة العزلات المتحسسة لزيت الحلبة 80% من عزلات الاذن (28\35) ونسبة (71.87) من عزلات القناة التنفسية (23\32) وبنسبة 45% لعزلات الجلد (4\9) ,اما العين والافرازات المهبلية سجلت نسبة 50% (10\20) و 70% (14\20) على التوالي, وقد وجد ان الفطران *Aspergillus niger* و *Aspergillus flavus* اكثر تاثرا بزيت الحلبــة بقياس (16 ملم) لمنطقة تثبيــط النمو امــا الفطــران الاقــل تاثرا فهمــا *A. fumigatus* و *Pencillium sp.* بقياس (12ملم) لمنطقة تثبيط النمو. وعند قياس النسبة المئوية لفعالية زيت الحلبة بالنسبة للجنس *Aspergillus* اظهرت العزلات من منطقة القناة التنفسية تحسسا لزيت الحلبة بنسبة 85% واقلها منطقة الجلد بنسبة 33.3% .في حين لوحظ ان عزلات الاذن كانت اكثر تحسسا لزيت الحلبة بنسبة 88.8% واقلها عزلات العين بنسبة 60% لجنس *Candida*, اما بالنسبة للجنس *Pencillium* اظهرت عزلات الاذن اعلى نسبة تحسس 83.3% واقلها عزلات الجلد بنسبة 40% .

المقدمة

الفطريات وهي كائنات دقيقة غير ذاتية التغذية تعيش بصورة تطفلية أو رمية أو تكافلية حيث تتكاثر بسرعة و بامكانها ان تصيب الانسان فتسمى بالاصابة الفطرية (Mycosis) (Borges &Walmsley, 2000) والتي يمكن تصنيفها اعتمادا على نوع النسيج المصاب وطريقة دخول الفطر الى المضيف وهي (١) (Superficial) وهذه الاصابة تحدث للجلد والشعر والاظافر وكذلك الفم والمهبل, (٢) (Subcutaneous) وهذه يكون مكان حدوثها في الادمة وتحت الجلد وفي المناطق المجاورة, (٣) (Systemic) وتكون هذه الاصابات بشكل عميق في الاعضاء الداخلية كالجهاز الهضمي والرئتين, (٤) (Opportunistic) وتحدث مثل هذه الاصابات فقط للاشخاص المصابين بنقص المناعة, كالمصابين بالإيدز و متعاطي الادوية المثبطة للمناعة, وكذلك متناولي مضادات البكتريا الشديدة التأثير لفترات طويلة اضافة الى مرضى السكري , وكل هذا بدوره يؤدي إلى فرط نمو الفطريات (Brown & Gow,1999; Gioconda & Richard, 2008).

تعـالج الاصـابة الفطريـة باسـتخدام المضـادات الفطريـة (Anti-Fungal) ولكـن فـي الاونـة الاخيـرة زادت مقاومـة الفطريات الممرضة ضد تلك المضادات ، ويمكن ان يحدث هذا بآليتين همـا الطفرات الجينيـة والتكيـف الوظيفي , وهـذا مـا دعا المختصين للبحث عن مصادر جديدة للمضـادات المايكروبيـة تستعمل بوصفها بدائل عن المضـادات التقليديـة وتمثلت المصـادر الجديدة باستعمال المستخلصـات النباتية كمضادات مايكروبية (Guo *et al*., 2004) ومنهـا استعمال نبـات الحلبـة (*Trigonella foenum-graecum*) لمـا تمتلكـه من مجاميع مختلفـة ذات فعاليات بايولوجيـة مضـادة للاحيـاء المجهريـة والالتهابـات ,حيث ان للحلبـة اهميـة علاجيـة فـي امراض : التهـاب المعدة والقرحـات المعديـة, التهـاب المفاصـل، التهـاب الشعيبات، الحمى، الأمراض التناسلية الذكورية, وبعض امراض الجلد وكذلك تستعمل كمدرر لحليب الامهـات اضـافة الـى ذلك انها تساهم في تنشيط الشهية وزيادة الوزن وكعلاج للسكري وفي السنوات الاخيرة اكتشـف دراسـات بـان الحلبـة تمتلك نشـاط مضـاد للسـرطان .وتسـتعمل علـى شـكل زيـت او بـذور او اكلهـا مباشـرة (Michael & Kumawat, 2003; Péter *et al*., 2004).

ويذكر في دراسة اجريت في الهند قام بها (Rathri *et al*.,1980) ان الزيت الثابت و المواد الغير متصوبنة للحلبـة لها تاثير مضاد للبكتريا سواء الموجبه او السالبة جرام وكذلك مضاد وموقف لنمو الفطريات الضاره الدقيقه لكن بدرجة اقل

من المواد القياسية المستخدمة لهذا الغرض ,لذا لوحظ ان الخبز المدعم بدقيق الحلبه لايتعرض لتعفن بعكس الخبز العادي (Abdo & Al-Kafawi,1969; Péter *et al*., 2004) , ولذلك نفذت هذه الدراسة التي تهدف الى معرفة مدى تأثير زيت الحلبة على بعض الفطريات المرضية .

المواد وطرائق العمل

جمع العينات

تم جمع العينات من مناطق مختلفة من اجسام مصابين بامراض فطرية في مستشفى الامام الحسين التعليمي في مدينة الناصرية وتمثلت هذه العينات بـ مسحات من (الاذن , الجلد , العين ,الافرازات المهبلية) و قشع من (القناة التنفسية), ثم نقلت الى المختبر لغرض تشخيصها .

زرعت العينات على وسط Sabouroad Dextrose Agar (SDA) بامرار المسحات القطنية مباشرة او باستخدام العيدان الخشبية المعقمة وحضنت الاطباق في الحاضنة بدرجة حرارة 37 مْ لمدة تتراوح بين 4-14 يوم.

التشخيص المختبري للعينات

بالنسبة للاعفان (Molds) اعتمدت الصفات الزرعية المظهرية للمستعمرات بالاضافة الى الصفات المجهرية وبالاعتماد على المصادر (De Hoogde & Guarro , 1995; Midgley *et al*.,1997) اما بالنسبة للخمائرشخصت باستخدام الاختبارات البايوكيميائية بالاعتماد على(Roberts, 1990; Ellis, 1994; Collee *et al*., 1996) .

طرائق العمل

اولا:- اللقاح الفطري (Fungal Inoculum) :-

بالاعتماد على ماورد في (McGinnis, 1980) تم تحضير اللقاح بنقل جزء من المستعمرات النامية على وسط (SDA) بعد تنشيطها وذلك باستخدام ابرة معقمة ووضعها في انبوبة محكمة الغلق (Vial) حاوية على 5 مل من المحلول الفسلجي (Normal saline) ورج المحلول جيدا ثم حسبت اعداد الخلايا الفطرية (الابواغ) باستخدام جهاز عد الخلايا (Haemocytometer) للحصول على تركيز 105 بوغ \مل .

ثانيا :- تحضير زيت الحلبة :

حضر حسب الطريقة التي اوردها الدلالي والحكيم (1987) وكالاتي :

1. وزن 5 غم من بذور الحلبة ووضع في داخل كشتبان الاستخلاص ثم غطيت العينة بكمية من الصوف الزجاج Glass wool بعدها وضع الكشتبان داخل وحدة الاستخلاص.
2. وضعت كمية من الايثر في وحدة الاستخلاص كافية لان تحدث شفطا اوتماتيكيا الى المذيب وارجاعه الى الدورق , كررت ثلاث مرات.
3. نصب الجهاز على سطح كهربائي ساخن Hot plate مع ربط المكثف من الاعلى والسماح للماء بالمرور فيه واستمر بالاستخلاص لنهاية عشرة مرات شفط اوتماتيكي Automatic siphoning.
4. قطعت الحرارة ثم ربط الجانب الثاني من المكثف في الدورق ثم استمر في التقطير لاسترجاع معظم الايثر و الاحتفاظ به.
5. وضع الدورق في فرن هوائي درجة حرارته 105مْ لمدة 10دقائق مع فتح باب الفرن قليلا للسماح للايثر بالخروج والا فان البيروكسيدات المتكونة في الايثر ستسبب التفرقع.
6. بردت في المجففة وبعدها وزنت المحتويات ومن الفرق بالوزن للدورق قبل وبعد الاستخلاص حصلنا على كمية الدهن الخام .
7. الحسابات: الدهن الخام (%) = (وزن الدهن \ وزن العينة) x 100 .

ثالثا :- طريقة الانتشار بالحفر (The agar well diffusion) :

ويتم فيها قياس الفعالية او القدرة التثبيطية لزيت الحلبة ضد نمو الاعفان والخمائر المعزولة (Prize *etal*.,1990).

تم اخذ 0.2 مل من اللقاح الفطري ونشرت على سطح وسط Emmon's Sabouraud Dextrose Agar (ESDA) المحضر سابقا في اطباق بتري باستخدام قضيب زجاجي بشكل حرف (L-spreader) وتركت الاطباق بعد تلقيحها لمدة 30 دقيقة , كذلك عملت حفر بقطر 5 ملم في الوسط الملقح بواسطة الثاقب الفلين (Casals, 1979) , اضيف

0.1 مل من زيت الحلبة الى كل حفرة باستخدام ماصة دقيقة (Micropipette) , حضنت الاطباق بدرجة حرارة 37 م° لمدة تتراوح بين يومين الى ثلاثة ايام ثم قيست قطر منطقة التثبيط للنمو (Inhibition zone) بوحدات المليمتر .

النتائج والمناقشة

جدول (١): النسبة المؤية لفعالية زيت الحلبة بالنسبة لموقع اخذ العينة

موقع العينة	عدد العزلات المتحسسة	نسبتها المئوية (%)	عدد العزلات غير المتحسسة	العدد الكلي
الاذن	28	80	7	35
القناة التنفسية	23	71.87	9	32
الجلد	4	45	5	9
العين	10	50	10	20
الافرازات المهبلية	14	70	6	20
العدد الكلي	79		37	116

جدول (٢): الاجناس الفطرية المعزولة ونسبتها المئوية حسب نوع بؤرة الخمج الفطرية واستجابتها لزيت الحلبة

الاجناس الفطرية المعزولة	الاذن		القناة التنفسية		الجلد		العين		الافرازات المهبلية		العدد الكلي	النسبة المؤية
	العدد	%	العدد	%	العدد	%	العدد	%	العدد	%		
Aspergillus	15	53.57	12	52.17	2	50	4	40	-	-	33	41.77
Penicillium	5	17.85	3	13.04	2	50	3	30	-	-	13	16.45
Candida	8	28.57	8	34.78	-	-	3	30	14	100	33	41.77
العدد الكلي	28	100	23	100	4	100	10	100	14	100	79	100

جدول (٣): مناطق تثبيط نمو الفطر مقاسة بالملم نتيجة استخدام زيت الحلبة

الانواع الفطرية المعزولة	مناطق تثبيط النمو (ملم)
Aspergillus niger	16
A. flavus	16
A. fumigatus	12
A. candidus	14
A. terreus	14
Penicillium sp.	12
Candida albicans	15
C. parapsilosis	15
C.tropicalis	13
C. krusei	15

جدول (٤): النسبة المئوية لفعالية زيت الحلبة بالنسبة للجنس *Aspergillus* اعتمادا على موقع اخذ العينة

موقع العينة	عدد العزلات المتحسسة	عدد العزلات غيرالمتحسسة	العدد الكلي	النسبة المؤية (%)
الاذن	15	4	19	78.94
القناة التنفسية	12	2	14	85.71
الجلد	2	4	6	33.3
العين	4	4	8	50
العدد الكلي	33	14	47	70.21

جدول (٥): النسبة المئوية لفعالية زيت الحلبة بالنسبة للجنس *Candida* اعتمادا على موقع اخذ العينة

موقع العينة	عدد العزلات المتحسسة	عدد العزلات غيرالمتحسسة	العدد الكلي	النسبة المؤية (%)
الاذن	8	1	9	88.8
القناة التنفسية	8	2	10	80
العين	3	2	5	60
الافرازات المهبلية	14	6	20	70
العدد الكلي	33	11	44	75

جدول (٦): النسبة المئوية لفعالية زيت الحلبة بالنسبة*للجنس* *Penicillium* اعتمادا على موقع اخذ العينة

موقع العينة	عدد العزلات المتحسسة	عدد العزلات غيرالمتحسسة	العدد الكلي	النسبة المؤية (%)
الاذن	5	1	6	83.3
القناة التنفسية	3	3	6	50
الجلد	2	3	5	40
العين	3	4	7	42.85
العدد الكلي	13	11	24	54

اظهرت النتائج 79 عزلة متحسسة من مجموع 116عزلة من مناطق مختلفة من جسم الانسان وكان توزيع هذه العزلات بواقع 35 عينة من الاذن اظهرت 28 عزلة حساسيتها لزيت الحلبة وبنسبة 80% و 32 عينة من القناة التنفسية ابدت 23 عزلة حساسيتها لزيت الحلبة بنسبة (71.87) اما بالنسبة للجلد اظهرت 4 عزلات حساسيتها لزيت الحلبة من اصل 9 عينات بنسبة 45% اما العين والافرازات المهبلية سجلت نسبة 50% (10\20) وبنسبة 70% (14\20) على التوالي . جدول (١) و(٢)

الجدول رقم (٣) يوضح ان اكبر مناطق تثبيط النمو لوحظت عند *Aspergillus niger* و *A. flavus* بقياس (16 ملم) وهذا من الممكن ان نلاحظه في دراسة (Pritee *et al*., 2007) حيث وجد ان الزيت المستخلص من بذور الحلبة له فعالية قاتلة للفطريات بشكل معنوي ضد الفطرين (*A. niger* و *A. fumigatus*) واصغر مناطق تثبيط النمو كانت للفطرين *A. fumigates* و *Penicillium spp.* بقياس (12 ملم). وربما يرجع ذلك التفاوت في التحسس لزيت الحلبة الى عوامل الضراوة التي يمتلكها كل نوع ومنها مقاومة المضادات او المثبطات .

وعند قياس النسبة المئوية لفعالية زيت الحلبة بالنسبة للجنس *Aspergillus* اظهرت العزلات من منطقة القناة التنفسية تحسسا لزيت الحلبة بنسبة 85% واقلها منطقة الجلد بنسبة 33.3% جدول (٤), في حين اظهر جدول (٥) ان عزلات الاذن كانت اكثر تحسسا لزيت الحلبة بنسبة 88.8% تليها عزلات القناة التنفسية بنسبة 80% واقلها عزلات العين بنسبة 60% عن قياس النسبة المئوية لفعالية زيت الحلبة بالنسبة للجنس *Candida* وكذلك الحال بالنسبة للجنس *Penicillium* اظهرت عزلات الاذن اعلى نسبة تحسس 83.3% واقلها عزلات الجلد بنسبة 40% جدول (٦).

في الحقيقة ان اغلب البحوث لم تشير بشكل واضح الى انواع الفطريات التي تتاثر بزيت الحلبة بل اكتفت بذكر الفعالية المضادة للفطريات بشكل عام .

اما بالنسبة لاسباب تاثير زيت الحلبة على الفطريات فهي عديدة حسب ماشار اليه الباحثون, حيث وجد بعضهم ان الحلبة تحتوي على بروتين يسمى ديفينسن (Defînsin) والذي يتكون من سلسلة ببتيدية غنية بالـ (Cyctine) وتختلف آلية تاثير هذا البروتين على الفطريات اذ يعمل كمثبط لنمو الفطريات من خلال ايقاف تكوين الابواغ (Spores) كما هو الحال بالنسبة لفطر الـ *Phaeoisariopsis personata* او منع نمو المايسيليوم (Mycelium) كمـــا فـــي فطـــر الـ *solani* *Rhizoctonia.* . (Sudar & Kirti , 2006; Sauvaire *et al.*,1976).

وكذلك وجد ان الحلبة تحتوي على فلافونايد , الكولايد , مواد صابونية و كلايكوسيدات ولكل من هذه المكونات على حده او بشكل مجتمع تاثير مضاد للطفيليات والبكتيريا والفطريات (Farman *et al.*, 2009; Khanra *et al.*, 2010).

وقد اشار (Pritee *et al.*, 2007;Singh, 1999) بان زيت الحلبة يحتوي على الزيوت الدهنية [palmitic acid و stearic acid و linoleic acid و oleic acid و metalinic acid (benzenesulfonic)] والحامض الدهني الاخير معروف بانه سام للفطريات على الرغم من عدم معرفة طبيعته السمية لحد الان, وقد اكد هؤلاء الباحثين الى امكانية اعتبار تلك الزيوت مضادات فطرية طبيعية ولكن بعد دراسات مستفيضة. في حين اوضحت دراسة اخرى بان الـ Coumarin و الـ Kaempferol هي مواد ذات تاثير مضاد للفطريات (Alkofahi *et al.*, 1996),وهاتين المادتين هما جزءا من مكونات الحلبة, اما (Mccutchtchen *et al.*, 1994) بعدما عزلوا السابونين (saponin) والكلايكونات (glycones) استدلوا على وجود تاثير مزدوج لهما في تثبيط الفطريات.

من هنا يتبين لنا ان اغلب مكونات الحلبة لها قوة ضدية للفطريات , لذلك يمكن ان تكون الحلبة مصدر مهم للمواد الفعالة بيولوجيا التي يمكن استخدامها في تطوير افضل واحدث الادوية المضادة للفطريات (Armis, 2007; Ching-Ling, 2005).

المصـــادر

- Abdo, M & Al-Kafawi, A. (1969). Experimental studies on the effect of *Trigonella foenum-graecum*. Planta Med., 17(1): 14-18.
- Alkofahi, A.; Batshoun, A.; Owais, W. & Najib, W. (1996). Biological activity of some Jordanian medicinal plant extracts. Phytotherapeutics, 67: 435-442.
- Armis, Z. (2007). Antifungal properties of fenugreek. British science journal, 15:786-788.
- Borges-Walmsley, M. & Walmsley, A. (2000). cAMP signalling in pathogenic fungi: control of dimorphic switching and pathogenicity. *Trends Microbiol.*, 8:133-140.
- Brown, A. & Gow, N. (1999). Regulatory networks controlling Candida albicans morphogenesis. Trends Microbiol., 7: 333-338.
- Casals,J.B.(1979).Tablet Sensitivity testing of pathogenic fungi.Journal of clini.Patholo.32:719
- Collee ,J.; Fraser, A.; Mnrmion, B. & Simmons, A. (1996).Practical Medical Microbiology. 14^{th} .ed. Churchill Livingstone, London. Pp:106,716.
- De Hoogde, G. & Guarro, J. (1995). Atlas of clinical fungi. Center albureau voor shimmel cultures and universital Rovivai virgill, Espain, 720p.
- Ellis, D. (1994). Clinical mycology. The human opportunistic mycoses. Gillingham printers pty. Ltd , Austeralia 166p.
- Farman, U.; Durrani, R.; Asad S.; Rifat U. & Shabana, N.(2009). Effect of Fenugreek (*Trigonella Foenum-Graecum*) Seed Extract on Visceral Organs of Broiler Chicks. ARPN Journal of Agricultural and Biological Science, Vol. 4, NO. 1.
- Gioconda, S. & Richard, A. (2008). Pathogenic Fungi,Insights in Molecular Biology. Caister Academic press, pp.264

- Guo, C.; Kwakkel, P.; Soede, J.; Williams, A & Verstegen, W. (2004). Effect of a Chinese herb medicine formulation, as an alternative for antibiotics, on performance of broilers. Brit. Poult. Sci., 45: 793-797.
- Khanra, R.; Chatterjee, A.; Singh, B. ; Goel, A. & Sen, K.(2010). Antimicrobial activity of ethanolic extrct of Trigonella foenum-graecum .International Research Journal of Pharmacy, 1:181-183
- Mccutchtchen, A.; Ellis, S.; Hancock, R. & Towers, G. (1994). Antifungal screening of medicinal plants of British Columbian native peoples. J. Ethanopharmacol., 44(3): 157-169.
- Mc Ginnis, M.(1980).laboratory hand book of medical mycology. Academic press, New York, U.S.A, 66p.
- Michael, D. & Kumawat, D. (2003). Legend and archeology of fenugreek, constitutions and modern applications of fenugreek seeds. International-Symp., USA. pp. 41-42.
- Midgley,G.;Clayton,Y.M.&Hay,R.J.(1997).Diagnosis in color medical mycology.
- Ching-Ling, D. (2005). Advantages and disadvantages of Fenugreek J. Environ. Sci. (China), 24:234-236
- Péter, S. ; Sándor, M. & András, K. (2004). Comparative Test of Fenugreek / Trigonella Foenum-Graecum L. / Varieties. Journal of Central European Agriculture, Vol. 5 , No. 4, pp. 259-262.
- Pritee, W.; Mahendra, R.; Deshmukh, S. & Marta, C. (2007).Bio-activity of oils of Trigonella foenum-graecum and Pongamia pinnata. African Journal of Biotechnology, Vol. 6 (13): 1592-1596
- Prize, C.; pauli. M. & Bazerque, P.(1990). Anantibiotic assay by the agar-well-diffusion method . J. Actabiologiae, 15:113-45.
- Rathri, N.; Chatterjee, A. & Parkashi, S. (1980). The Treatise of Indian Medicinal plants, volume IV. New Delhi: Publication and Information Directorate CSIR
- Roberts,G.D.(1990).Laboratory method in basic mycology In :Baily &Scotts: Diagnostic Micro.(ed.E.J.Barren&S.M.Fingolld).The C.V.Mosby Co.
- Sauvaire, Y. ; Baccou, I. & Besancon, P. (1976). Nutritionale value of the proteins of a leguminous seed Fenugreek (Trigonella foenum-graecum L.). Nutrition reports International, Vol. 14. No.5.
- Singh, G. (1999). Studies on the biocidal activities of certain essential oils. JMAPS, 21: 1119-1130.
- Sudar, O. & Kirti, P. (2006). Cloning, Characterization and Antifungal Activity of Defensin Tfgd1 from Trigonella foenum-graecum L. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 39, No. 3, pp. 278-283.
- الدلالي , باسل كامل والحكيم , صادق حسن (1987) . تحليل الاغذية. دار الكتب للطباعة والنشر. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. جامعة الموصل.

Effect of Fenugreek Oil on Growth of the Fungi (*Aspergillus, Candida& Penicillium*) Were Collected from Different Regions of Body of Patients with Fungi Infections in Nasseriyia City

Salih J. Battah[1] , Afaq H. Nasir [2], Asma'a k. Ajeel [3]

[1] *Thi-Qar Health Office, Ministry of Health*

[2,3] *Biology Department, Education College for Pure Science, Thi-Qar University*

Abstract

In this study 10 pathogenic fungi species of three genus (*Aspergillus*, *Candida* & *Penicillium*) were collected from different regions of human body and these isolated fungi (79 sample) were treated with fenugreek oil, the results showed that the percentage of sensitive isolates for fenugreek oil are 80% of ear isolates (28/35) , (71.87) of respiratory tract isolates (23/32), 45% of skin isolates (4/9), finally eye and vaginal secretions isolates had sequently 50% (10/20) and 70% (14/20).

(*Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus*) were the most sensitive for fenugreek oil with inhibition zone (16 mm),while (*Aspergillus fumigatus* and *Pencillium sp*.) were the less sensitive with inhibition zone (12 mm).

The percentage of fenugreek oil activity in cases of *Aspergillus* genus, showed 85% of respiratory truct isolates are sensitive for fenugreek oil and the less sensitive (33.3%) of skin isolates. The ear isolates were the most sensitive with percentage (88.8%) and the less sensitive (60%) of eye isolates in cases of *Candida* genus. While the cases of *Penicillium* genus appeared most sensitivity (83.3%) for fenugreek oil in ear isolates and less sensitivity (40%) in skin isolates.