دراسة تأثير مستخلصات نباتات الاخيلية الألفية والميرامية والسنامكي في نمو الفطر *Aspergillus ustus*

ندوة محمد خضر

قسم التمريض / المعهد التقني

الموصل

الاستلام	القبول
2011 / 12 / 22	2012 / 03 / 07

ABSTRACT

The fungus *Aspergillus ustus* was isolated from external ear inflammation. This fungus rarely infects human because it infects immunocompromised patients causing cutaneous, endocarditis and pneumonia infections. It is also a pathogenic plant and contaminating the crops. The effect of alcoholic extract of leaves of *Achillea millefolium* (yarrow), *Salvia officinalis* (sage) and *Cassia spp*.(seena), was tested by using four concentrations for each extract 5,10,15,20 mg/ml. Results were compared with the antifungal ketoconazole and with the biocontrol agents *Trichoderma viride* and *Trichoderma harzianum*. It is noticed that the highest percentage of inhibition was at concentration 20mg/ml for all the plant extracts used for inhibition percentage for *A. millefolium*, *S. officinalis* and *Cassia spp*.were 56.6%, 83.3% and 100% respectively. For ketoconazole the percentage of inhibition was 100% for all concentrations used in this study. The biocontrol agents *T. harzianum* and *T. viride* proved to have a high antagonistic ability against the pathogen. This proves that the alcoholic leaves extracts of these plants were more inhibitory for the fungus in addition to biocontrol agents.

الخلاصة

تم عزل الفطر *Aspergillus ustus* من التهابات الإذن الخارجية وهو نادرا ما يصيب الإنسان لأنه يصيب المضايف قليلة المناعة فيسبب إصابات جلدية وقلبية ورئوية،كما أنه ممرض للنبات وملوث للمحاصيل الغذائية فتم اختبار تأثير المستخلص الكحولي لأوراق نبات

الاخيلية الألفية *Achillea millefolium* والميرامية *Salvia officinalis* والسنا مكي *Cassia spp.* وبمعدل أربع تراكيز لكل مستخلص وهي 5 و10و 15و 20 ملغم/مل وقورنت النتائج مع المضاد الحيوي ketoconazole وكذلك المكافحان الحيويان *Trichoderma veridi* و *Trichoderma harzianum* فلوحظ إن أعلى نسبة تثبيط كانت عند تركيز 20 ملغم/مل لجميع المستخلصات النباتية المستخدمة للتثبيط حيث كانت النسب لنبات الاخيلية الألفية لنبات الميرامية لنبات السنامكي 56.6% و 83.3% و 100% على التوالي. أما بالنسبة للمضاد الحيوي ketoconazole فكانت نسبة تثبيط 100% عند جميع التراكيز المستخدمة في الدراسة وكانت القوة التضادية للمكافحان الحيويان عالية الكفاءة، وهذا يثبت أن المستخلص الكحولي لأوراق هذه النباتات كانت أكثر تثبيط للفطر بالإضافة إلى المكافحة الحيوية.

المقدمة

يعتبر فطر *Aspergillus* واسع الانتشار في الطبيعة حيث يعزل من التربة وبقايا النبات ومن الهواء (1). يحتوي هذا الجنس على أنواع كثيرة من الاعفان المنتشرة في الطبيعة، حيث يتواجد في البيئات الغنية بالأوكسجين والكاربون مثل السكريات الأحادية (الكلوكوز) والأطعمة النشوية مثل الخبز والبطاطا (2)، كما انه ممرض للنبات وملوث للمحاصيل الغذائية. بعض الأنواع يمكن أن تصيب الإنسان كإصابات الإذن الخارجية وإصابات الجلد والقرحة، أما البعض الآخر فتعتبر مصادر لمنتجات طبيعية يمكن أن تستخدم في تطوير العلاجات والأدوية (3) ومن أنواعه الفطر *Aspergillus ustus* وهو من الفطريات التي نادرا ما تصيب الإنسان، حيث تم تسجيل 15 حالة فقط لأنه يصيب مضايف قليلة المناعة فيسبب إصابات جلدية وقلبية ورئوية (4). يتواجد الفطر في الأطعمة والتربة والبيئات الداخلية أو المغلقة (5) وهو فطر سام ينتج بعض السموم الفطرية مثل austdiol و austin و A austacystin (4). بدأت في الآونة الأخيرة دعوة (العودة إلى الطبيعة من اجل صحة آمنة) وذلك من خلال التطبب بالأعشاب الأمينة الاستخدام للتقليل من الأخطار الناتجة عن الإفراط في استخدام العقاقير الطبية، لآن القيمة الحقيقية للمضادات الحيوية قد انخفضت اليوم بشكل حاد بسبب سوء الاستخدام لتلك الأدوية وظهور سلالات مقاومة للمضادات الحيوية مما أدى إلى الاتجاه إلى البدائل الطبيعية (6). ومن النباتات التي استخدمت في هذه الدراسة نبات السنامكي *Cassia spp.*:(Seena) ومن أسمائه أيضا Ringworm senna يتواجد في جنوب شرق أسيا وإفريقيا وشمال استراليا وأمريكا اللاتينية (7) وهو عشبه معمرة، غني بالمركبات الفعالة المضادة للبكتيريا والفطريات مثل القلويدات و الليكتين و السابرونين و الكلايكوسيد و السيانوجين والايزوفلافونيد. تستعمل عصارة الأوراق لعلاج الإصابات الفطرية الجلدية وتستخدم الجذور لعلاج الروماتيزم

وكملين قوي وقد يخلط مع عناصر أخرى للحصول على نتائج أفضل (8). أما الاخيلية الألفية: *Achillea millefolium* (Yarrow) تعرف أيضا بالاخيلية ذات الألف ورقة أو عشبة الجندي، وهو نبات معمر ينمو في التربة المحروثة والغابات المفتوحة (9). وهو نبات طبي واسع الانتشار وقد تم استخدامه على مدى 3000 سنة (10). يحتوي النبات على مواد فعالة مثل حامض السالسيليك والاسبارجين والتانين(11). يستخدم النبات لعلاج الجروح و الالتهابات وسوء الهضم ولمعالجة اضطرابات الجهاز التنفسي والأوعية الدموية القلبية (10). أما نبات الميرامية *Salvia officinalis*: (Sage) ومن أسمائه أيضا Garden sage وهو عبارة عن نبات عشبي معمر من العائلة الشفوية ويعتبر من أقدم النباتات التي تستخدم في الطب القديم والحديث وتشتهر به بلدان حوض البحر المتوسط ويوجد على مدار السنة. تحتوي الميرامية على مواد مضادة للأكسدة ومن أهم المركبات الفعالة في الميرامية، الزيت الطيار الذي يحتوي على مركب Thujone كما تحتوي الميرامية على الفلافونيدات و أحماض فينولية و مواد عفصية، حيث أن المادة الفعالة تعود إلى مركبات الزيت الطيار (12) ويستخدم الزيت المستخلص من الميرامية كدواء عشبي ويمتلك فعالية مضادة للبكتيريا والفطريات (13).

لذلك هدفت الدراسة الحالية إلى استخدام مستخلصات نباتات الاخيلية الألفية والميرامية والسنامكي لمكافحة الفطر *Aspergillus ustus* ومقارنتها مع المضاد الفطري Ketoconazole والمكافحة الحيوية باستخدام العاملين *Trichoderma harzianum* و *.richoderma viride*

المواد وطرائق العمل

عزل الفطر:- تم عزل الفطر *Aspergillus ustus* من مرضى مصابين بالتهاب الإذن الخارجية في مستشفى الزهراوي التعليمي في مدينة الموصل/شعبة الأنف والأذن والحنجرة، حيث جمعت مسحات من الأذن Ear swabs من المرضى بشكل عشوائي ولكلا الجنسين ولمختلف الأعمار وحفظت في وسط زرعي ناقل Transport medium نوع Stuart من شركة Oxoid لحين نقله إلى المختبر حيث زرعت في طبق بتري حاوي على وسط Sabouraud glucose agar (SGA) (14) وحضن عند درجة حرارة 28 ± 2°م ولمدة أسبوع مع استمرار ملاحظة النتائج وتسجيلها خلال فترة التحضين.

تشخيص الاعفان:

حضنت عزلات الفطر النامية على الوسط الزرعي PDA لمدة سبعة أيام ودرست الخواص العامة والمجهرية من حيث شكل المستعمرة ولونها وقوامها وشكل ولون الكونيدات وأبعادها ومن ثم أخذت عينة من كل مستعمرة ولقحت باستخدام تقنية تلقيح الأوساط الزرعية على ثلاث أوساط زرعية أساسية للتشخيص وهي:

1. وسط زابك مستخلص الخميرة والاكار Czapek Yeast Extract Agar (CYA)
2. وسط مستخلص الشعير والاكار Malt Extract Agar (MEA)
3. وسط نترات الكليسرول والاكار 25% Glycerol Nitrate Agar (G25 N)

وحضنت هذه المزارع عند درجات الحرارة 5°م و 25°م و37 °م ولمدة سبعة أيام (15) وكذلك شخصت باستخدام تقنية الزرع على الشريحة الزجاجية (16) وبالاعتماد على دليل التشخيص (17, 14).

تحضير المستخلص الكحولي للنباتات

تم الاستخلاص الكحولي لكل من الاخيلية الألفية والميرامية والسنامكي (التي تم الحصول عليها من الاسواق المحلية في مدينة الموصل) بنقع مسحوق الأوراق الجاف للنباتات في كحول الايثانول Ethanol بتركيز 99 % وبعد عملية السحق بجهاز Homogenizer ثم الحفظ بوعاء محكم الغلق بدرجة 4-8°م ولمدة ثلاثة أيام ثم رشح المستخلص بعدة طبقات من الشاش ثم ادخل في طرد مركزي بمعدل (2000) دورة/دقيقة للتخلص من البقايا النباتية وجفف المستخلص وذلك باستخدام جهاز التبخير الدوار Rotary evaporation ثم أذيب الوزن المعلوم منه بمقدار معلوم من Dimethyl sulphoxide (DMSO) وبذلك أصبح لدينا محلول قياسي معلوم التركيز مقدر بالملغم/مل وعقم المستخلص بالبسترة عند درجة حرارة 64°م ولمدة 15 دقيقة (18) وحضرت التراكيز 5 و10 و15 و 20 ملغم/مل من المستخلص مع الوسط (SGA) وباستخدام قانون التخفيف N1V1=N2V2 للحصول على أدنى تركيز مثبط (MIC) وكذلك استخدمت معاملة المقارنة وهي طبق بتري حاوي على الوسط الزرعي بدون أي إضافة ومن ثم اختبرت حساسية العزلات الفطرية تجاه هذا المستخلصات بزرع أقراص بقطر 6 ملم من مستعمرة الفطر بعمر 7 أيام واستخدام ثلاث مكررات لكل تركيز ومن ثم حضنت الأطباق بدرجة حرارة

28±2° م ولمدة 7 أيام ومن ثم سجلت النتائج على أساس شكل المستعمرة ولونها ودرجة نموها (قطر نمو المستعمرة مقارنة بالمستعمرة القياسية).

اختبار حساسية الفطر *Aspergillus ustus* للمضاد الفطري Ketoconazole

تم تحضير محلول بتركيز 20 ملغم/مل من الماء المقطر المعقم حيث اخذت حبة Ketoconazole والتي تحتوي 200 ملغم/مل من المضاد الفطري Ketoconazole المحضرة من قبل شركة Janssen pharmaceutica حيث أذيبت بـ10 مل من الماء المقطر

المعقم فاصبح لدينا محلول قياسي بتركيز 20ملغم/مل، وكما في الخطوات السابقة وفي ظروف تعقيم تم تحضير التراكيز 0.5 و1 و 1.5 و 2 و 3.5 و 4.5 ملغم/مل من الوسط الزرعي (SGA) والوسط الزرعي ((PDA ليتم الحصول على MIC)) للفطر الممرض تجاه المضاد الفطري Ketoconazole وذلك بزراعة أقراص فتية للفطر في وسط الأطباق الحاوية على تلك التراكيز وبثلاثة مكررات لكل تركيز مع وجود عينة المقارنة (بدون إضافة مضاد فطري) ومن ثم حضنت الأطباق بدرجة حرارة 28 ±2° م ولمدة 7 أيام ومن ثم سجلت النتائج.

اختبار القدرة التضادية بين المقاومان الحيويان الفطريان *Trichoderma harzianum* و *Trichoderma viride* ضد الفطر الممرض *Aspergillus ustus*

تم الاختبار بالزراعة المزدوجة للفطر ***A. ustus*** مع المكافح الحيوي ***T. harzianum*** و المكافح الحيوي ***T. viride*** كلا على حدا على الوسط الزرعي (PDA) في أطباق بتري معقمة بقطر 9 سم بوضع قرص من النمو الفطري قطر 4 ملم بشكل مقلوب مع قرص مماثل له من المقاوم الحيوي وكانت المسافة بين القرصين 4 سم تقريبا. نفذت التجربة بواقع ثلاث مكررات وحضنت الأطباق بالحاضنة على درجة 28±2°م وأخذت النتائج بعد أسبوع وقدرت درجة التضاد حسب سلم التقدير الخماسي الذي أعده (19) وذلك كما يأتي:

1- تغطي نموات الفطر المكافح كامل مساحة الطبق دون السماح للفطر الممرض بالنمو.
2- تغطي نموات الفطر المكافح ثلثي مساحة الطبق ويغطي الفطر الممرض الثلث الباقي.
3- تغطي نموات الفطر المكافح نصف مساحة الطبق ونموات الفطر الممرض تغطي النصف الآخر مع عدم وجود منطقة فاصلة بين المستعمرتين.
4- تغطي نموات الفطر المكافح ثلث مساحة الطبق في حين تغطي نموات الفطر الممرض الثلثين الآخرين.
5- الفطر المكافح غير نامي ونموات الفطر الممرض تغطي كامل الطبق.

النتائج والمناقشة

تم تشخيص الفطر *Aspergillus ustus* بالاعتماد على الأوساط الزرعية الثلاثة CYA و MEA و N25G وحضنت في درجات الحرارة 5 °م و 25°م و 37°م ولمدة سبعة أيام لمعرفة نمو أو عدم نمو المستعمرة ومقدار النمو (قطر المستعمرة) ووجود أو عدم وجود الإفرازات على سطح المستعمرة أو على خلفية الوسط الزرعي ووجود أو غياب الطور الجنسي Teleomorphs مع ملاحظة الصفات المزرعية للمستعمرات الفطرية كالشكل واللون والقوام، بالاعتماد على المفتاح التصنيفي لفطر ألـ *Aspergillus* (15). ومن تقنية الزرع على الشريحة

الزجاجية تم ملاحظة شكل وحجم الحويصلة Vesicle وترتيب الذنيبات عليها وشكل الكونيدات ولونها ومقارنتها مع المفاتيح التصنيفية (17,14).

من اجل التوصل إلى مضادات فطرية قوية وقليلة الأضرار الجانبية وذات كلفة قليلة، تم اختبار تأثير المستخلصات الكحولية لأوراق نباتات الأخيلية الألفية والميرامية و السنا مكي لمعرفة مدى قدرة هذه النباتات على تثبيط نمو الفطر *Aspergillus ustus*.. فالجدول (1) يمثل معدل أقطار مستعمرات هذا الفطر المعامل بالتراكيز المختلفة من المستخلصات الكحولية لأوراق نباتات الأخيلية الألفية والميرامية والسنا مكي يلاحظ من الجدول (2) أن النسبة المئوية لتثبيط المستخلصات الكحولية لنباتات الأخيلية الألفية والميرامية والسنا مكي على الفطر المدروس تزداد بزيادة تراكيز المستخلصات حيث كانت أعلى نسبة تثبيط 56.6% لنبات الأخيلية الألفية و 83.3% لنبات الميرامية و 100% لنبات السنا مكي عند التركيز 20ملغم/مل لجميع المستخلصات الكحولية وكما هو مبين في الشكل (1).

الجدول (1): تأثير المستخلص الكحولي لأوراق نباتات الأخيلية الألفية والميرامية والسنامكي على معدل أقطار مستعمرات الفطر *Aspergillus ustus* (سم).

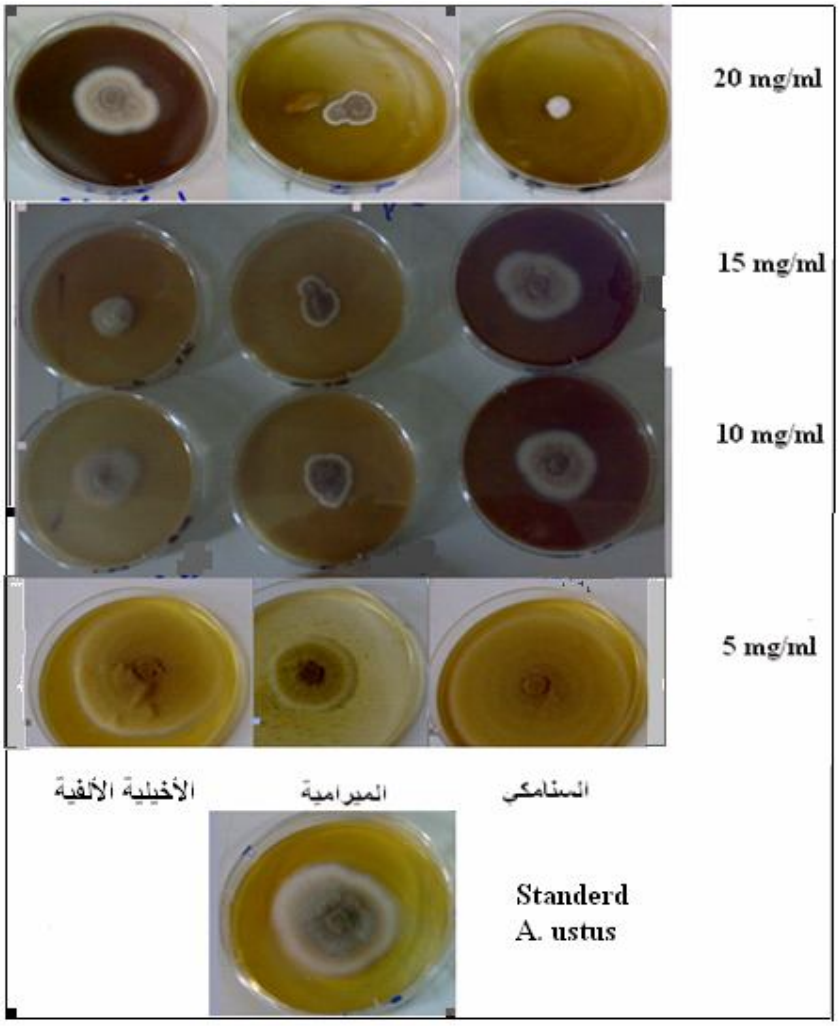
أسم النبات	التراكيز ملغم/مل				السيطرة
	5	10	15	20	
الأخيلية الألفية	5.6 A	3 B	2.8 B	2.6 B	6 A
الميرامية	2.8 B	1.7 B,C	1.5 C	1 C	6 A
السنا مكي	6.5 A	3 B	2.9 B	0 C	6 A

* الأحرف المتشابهة تدل على عدم وجود فروقات معنوية بينها عند مستوى احتمال 0.05 حسب اختبار دنكن

الجدول (2): النسبة المئوية لتأثير المستخلص الكحولي لأوراق نباتات الأخيلية الألفية والميرامية والسنامكي على مستعمرات الفطر *Aspergillus ustus* (سم).

أسم النبات	التراكيز ملغم/مل				السيطرة
	5	10	15	20	
الأخيلية الألفية	6.6 B	50 A	53.3 A	56.6 A	0 B
الميرامية	53.3 B	71.6 A,B	74.9 A	83.3 A	0 C
السنا مكي	13.8 C	50 B	51.6 B	100 A	0 D

* الأحرف المتشابهة تدل على عدم وجود فروقات معنوية بينها عند مستوى احتمال 0.05 حسب اختبار دنكن



الشكل (1): تأثير المستخلصات الكحولية لأوراق نباتات السنامكي والميرامية والأخيلية الألفية في نمو الفطر *Aspergillus ustus*

الجدول (3) يوضح تأثير المضاد الفطري Ketoconazole على معدل أقطار مستعمرات الفطرالمدروس بينما الجدول (4) يبين النسبة المئوية لتأثير هذا المضاد على مستعمرات الفطر، فلوحظ أن نسبة التثبيط للمضاد الحيوي كانت 100% في جميع التراكيز.

الجدول (3): تأثير المضاد الفطري Ketoconazole على معدل أقطار مستعمرات الفطر *A. ustus* (سم).

Ketoconazole	التراكيز ملغم / مل				السيطرة
	0.5	1	1.5	2	
	0 B	0 B	0 B	0 B	6 A

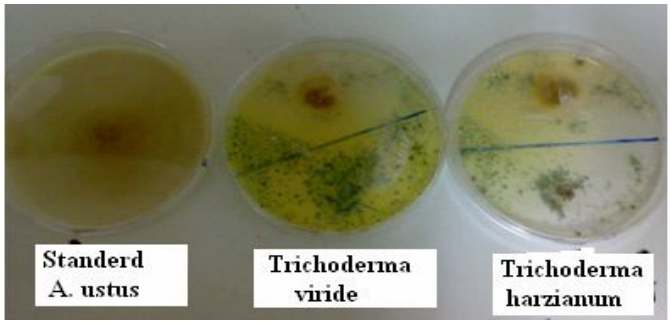
* الأحرف المتشابهة تدل على عدم وجود فروقات معنوية بينها عند مستوى احتمال 0.05 حسب اختبار دنكن

الجدول (4): النسبة المئوية لتأثير المضاد الفطري Ketoconazole على مستعمرات الفطر *A ustus* (سم).

Ketoconazole	التراكيز ملغم / مل				السيطرة
	0.5	1	1.5	2	
	100 A	100 A	100 A	100 A	0 B

* الأحرف المتشابهة تدل على عدم وجود فروقات معنوية بينها عند مستوى احتمال 0.05 حسب اختبار دنكن

وهذا يعني أن تأثير المضاد الفطري Ketoconazole كان أقوى تثبيطا من المستخلصات الكحولية لأوراق نباتات الأخيلية الألفية والميرامية وتساوى المضاد مع السنا مكي من حيث التثبيط بنسبة 100% ضد الفطر قيد الدراسة، وقد يكون السبب بأن المستخلص الكحولي يعتبر مادة خام فيه مواد فعالة مضادة للفطريات ولكنها غير مركزة فيكون تركيز هذه المواد الفعالة قليل جدا في المستخلص بحيث لم يعطي تثبيط كبير بتراكيز قليلة كما هو الحال في المضاد الفطري Ketoconazole، وقد أكد (10) أن نبات الأخيلية الألفية يحتوي على مركب اللينالول الذي يثبط عدد كبير من الفطريات مثل بعض أنواع *Aspergillus* والبكتيريا، كما أيد (13) أن الزيت المستخلص من الميرامية يمتلك فعالية مضادة للبكتيريا والفطريات و تحتوي الميرامية على بعض المركبات مثل Linalyl acetate و Terpineol التي لها فعالية تثبيطية للفطريات أما نبات السنا مكي فقد تساوى في تأثيره مع المضاد الفطري من حيث تثبيط النمو 100%، وقد أكد (20) أن نبات السنا مكي ثبط نمو العديد من الفطريات مثل بعض أنواع الفطر *Aspergills* والبكتيريا *Staphylococcus aureus* و *Bacillus subtilis* وخميرة *Candida albicans* وهذه القدرة التثبيطية للنبات ترجع إلى وجود كميات كبيرة من المركبات الفينولية. تم اختبار درجة التضاد بين المقاومان الحيويان الفطريان *T. harzianum* و *T. viride* مع الفطر *A.ustus* حيث أظهرت النتائج أن نموات الفطريات المقاومة تغطي كامل مساحة الطبق دون السماح للفطر الممرض بالنمو وهذا يعني أن التضاد 1 أو 100% حسب سلم (19) وكما هو مبين في الشكل (2)، فقد أكد (21) أن هذان المقاومان الحيويان لهما القدرة على تثبيط نمو وتطور الفطريات مثل انواع فطر *Aspergillus* و *F.solani* و *Alternaria sp.* و *M.phaseolina* لأنها تنتج مضادات حيوية وأنزيمات لها القدرة على تثبيط نمو الفطريات وتكوين السبورات.



الشكل (2): تأثير المقاومان الحيويان *Trichoderma harzianum* و *Trichoderma viride* في نمو الفطر *Aspergillus ustus*

المصادر

1) Schuster E., Dunn-Coleman N., Frisvad JC., and Van Dijck PW. "Applied Microbiology and Biotechnology". **59**: 426-35 (2002).
2) Kough J. Biotechnology Program Under the Toxic Substances Control Act (TSCA),USA. (1991).
3) Geiser D. "Sexual structures in *Aspergillus*: morphology, importance and genomics". Medical mycology: official publication of the international society for human and animal mycology 47: Suppl 1:S21-S26 (2009).
4) Panackal A. A., Imhof A., Hanley E. W. and Kiere, J. Emer. Infc. Dis. **12**: 403-408 (2006).
5) Houbraken J. , Due M. , Varga J. , Meijer M., Frisvad J. C. and Samson R. A. Stud. Mycol. **59**: 107-128 (2007).
6) القطان، منال بنت عثمان (2009). تأثير القسط الهندي *Costus speciosus* على الفطر *Aspergillus niger* و *A. fumigatus* وخميرة *Candida albicans* التي يصيب الجهاز التنفسي في الإنسان. جامعة أم القرى، مجلة العلوم التطبيقية، **1**(2):40 -51.
7) Phongpaichit S., Pujenjob N., Rukachaisirikul V. and Ongsakul M..J. Sci. Technol. **26**: 741-748 (2004).
8) Reezal I., Somchit M. N. and Abdul Rahim M. (GELENGGANGBESAR) Proceedings of the Regional Symposium Environmental and Natural Resources 10-11th Kuala Lumpur, Malaysia. 1:654-659 (2002).
9) Dodson C. and Dunmire W. "Mountain Wild Flower of the Southern Rockies", UNM Press, USA. ISBN 9780826342447 2007).
10) Tajik H., Jalali F. S., Sobhani A., Shahabazi Y. and Zadeh M. S. J. Ani. Veter.Advc. **7**: 508-511 (2008) .
11) Weakly A. S. Flora of the Carolines, Virginia, and Georgia, and Surrounding areas (2008). http://www.herbarium.une.edu/flora.htm
12) Sutton J. "The Gardens Guide to Growing *Salvias*". Workman Publishing Company, USA. p. 17. ISBN 9780881926712 (2004).
13) Pereira R. S., Sumita T. C., Furlan M. R., Olavo A. and Jorge C., Rev. Saude. Publica. **38**: 1-3 (2004).
14) DeHoog G.S. and Guarro J. "Atlas of Clinical Fungi". Universitat Rovurai Virgili, Spain. pp. 750 (1995).
15) Pitt J.I. and Hocking A.D. "Fungi and Food Spoilage" 2nd Ed. Academic press, Sydney, Australia. pp.593 (1997).
16) Koneman E.W., Roberts G.D. and Wright S.E. "Practical Laboratory Mycology". 2nd Ed. William and Wilkins, USA. pp. 153 (1979).
17) Kwon-Chang K.J. and Bennett J.E. "Medical Mycology". Lea and Febiger, Philadelphia, USA. London, UK. pp. 866 (1992) .
18) الرجبو، مها أكرم محمد علي (2004). دراسة تأثير مستخلصات نبات الزعتر *Thymus spp*. على بعض الفطريات، أطروحة دكتوراه، جامعة الموصل، الموصل، العراق، 30 .
19) Bell D.K., Well H.D., and Markhan C.R. Phytopathology 72:379-382 (1982).
20) Chatterjii S., Chatterjii S., and Dutta S. J. Of Med. Plants Res. **4**: 286-292 (2009).
21) Odebode A. C. J. Of Plant Prot. Res., **46**: 1-5 (2006).