الفعالية التثبيطية لبعض المركبات الفينولية في مستخلصات نخيل التمر *Phoenix dactylifera L.* ضد انواع مختلفة من خميرة *Candida* Spp. المسببة لداء المبيضات المخاطي .

لونا قحطان محسن

مركز ابحاث النخيل - جامعة البصرة

الخلاصة:

عزلت ثلاثة انواع من الخمائرهي *Candida albicans* و*Candida sp.* و*C.tropicalis* من٦٠ عينة من حالات الاصابة بداء المبيضات المخاطي وبنسب ظهور بلغت ٥٠و٤٠و١٠% على التوالي ولهدف معرفة تأثير بعض مستخلصات نخيل التمرتم استخلاص المركبات الفينولية وايجاد النسبة المئوية لها من اجزاء مختلفة من نخلة التمر صنف الزهدي كانت الثمار و النوى و نسيج الجمارولم تظهر النتائج وجود فروقات معنوية في النسبة المئوية للمركبات الفينولية المتواجدة في تلك الاجزاء. واظهرت نتائج الكشف عن الفعالية التثبيطية لمزيج المركبات الفينولية صنف الزهدي فعالية تثبيطية جيدة ضد الخمائر *C.albicans* و*Candida sp.* و *C. tropicalis* عند التراكيز١٠و٢٠ و٤٠ و٨٠ و١٠٠ مايكروغرام/مل وكانت نتائج التثبيط كالاتي ١٠.٧٨ و١٥.٨٩ و٢٣.٣٣ و٣٢.٨٩ و٤٥.٢٢ على التوالي.

وبينت النتائج ايضا عدم سمية المركبات الفينولية المعزولة لجسم الانسان .

الكلمات المفتاحية: مستخلصات نخيل التمر، خمائر *Candida Spp.*،الفعالية التثبيطية.

المقدمة:

تمثل نخيل التمر *Phoenix dactylifera* كتلة حية مليئة بالمواد الغذائية وهي تشهد في كل مرحلة من مراحل نموها وتطورها سلسلة من التفاعلات الكيميائية والتغيرات الفسيولوجية (شبانة وجماعته ، ٢٠٠٦) تحتوي ثمار نخلة التمر على المركبات الفينولية Phenolic compound والتي تلعب دورا مهما في نكهة الثمار ولونها ومن اهم المركبات الفينولية البسيطة مادة التانينات Tannins والتي تتواجد بكثرة في الثمار غير الناضجة وتتناقص تدريجيا بتقدم الثمار بالنضج وهي على نوعين احدهما نوع ذائب ويغلب وجودها في الثمار غير الناضجة وتكون معدومة في الثمار تامة النضج اذ تتحول الى مركبات تانين غير ناضجة (الطه ، ٢٠٠٥) والفينولات مركبات ثانوية يقوم النبات بإنتاجها ولها صفات ضد مايكروبية (الموسوي ، ٢٠٠٦) وقد يعزى السبب في الفعالية التثبيطيه العالية الى ان تلك المركبات هي مركبات اروماتية حاوية على مجاميع هايدروكسيل (حرة ومتعددة) وان القدرة التثبيطية لهذه المركبات تزداد بزيادة هذه المجاميع فمثلا المركبان Pyrogallol و Catechal هما من المركبات الفينولية الهيدروكسيلية يكون المركب الاول اكثر سمية من الثاني كون بسبب ان الثاني يمتلك مجموعتين بينما الاول يمتلك ثلاثة مجاميع هيدروكسيلية مما يزيد من قدرته التثبيطية للأحياء المجهرية (الموسوي ، ٢٠٠٦). يعرف داء المبيضات بأنه اصابة فطرية اولية او ثانوية تحدث بوساطة انواع الجنس *Candida Spp*. وهذه الاصابة ربما تكون حادة او معتدلة او مزمنة ، يسبب الممرض اصابات موضعية في الفم والبلعوم والجلد والمهبل والأصابع والأظافر والقصبة الهوائية ومن الممكن ان ينتشر داخل الجسم ويصيب الرئتين والقناة المعدية المعوية او اصابات جهازيه اخرى اذ يسبب حالات تسمم الدم والتهاب شغاف القلب الداخلي والتهاب السحايا (محسن ، ٢٠٠٧) والممرض هو خميرة بيضوية الشكل رقيقة الجدران صغيرة الحجم من ٤-٦ مايكرون وتكون بشكل خلايا مفردة وهي من الخمائر الشبيهة بالفطريات التي تنتج غزل فطري كاذب وتتكاثر بالتبرعم Budding(kolarik , 2004) يضم الجنس *Candida* اكثر من ١٠٠ نوع والنوع *Candida albicans* هو اكثر الانواع شيوعا ويكون دائما مصاحبا للانسان و الحيوان وقد عزل من مصادر اخرى مثل التربة وهويعد العامل الرئيس المسبب لداء المبيضات(محسن ، ٢٠٠٧) لذا هدفت هذه الدراسة هو لمعرفة تأثير المركبات الفينولية المستخلصة من اجزاء مختلفة من نخلة التمر ضد *Candida sp*. المسببة لداء المبيضات المخاطي في الاطفال ومعدل تثبيطها بهذه المستخلصات مختبريا.

المواد وطرائق العمل:

جمعت عينات من اجزاء مختلفة من نخيل التمراذ اخذت الثمار من اشجار نخيل تمر متقاربة بالعمر والنمو اثناء مرحلة تكوين الخلال وبثلاث مكررات (ثلاث نخلات) من صنف الزهدي ، اما الجمار فقد تم استئصاله من رؤوس فسائل نخيل تمر بعمر ٣-٤ سنوات وبثلاث مكررات من الصنف نفسه، اما النوى فقد استخرجت من الثمار (الخلال) المأخوذ من صنف الزهدي ومن ثم غسلت جيدا بالماء المقطر لازالة بقايا الثمرة منها وبعدها جففت وطحنت وحفظت بعلب بلاستيكية محكمة في مكان جاف وبدرجة حرارة الغرفه.

استخلاص المركبات الفينولية من اجزاء مختلفة من نخلة التمر

استخدمت طريقة (Pearson,1970) لتقدير كمية المركبات الفينولية الكلية فقط بغض النظر عن المركبات الاخرى وذلك بوزن٢٠غم من كل جزء من الاجزاء المدروسة (الثمار ونسيج الجمار ومسحوق البذور) من نخلة التمر صنف الزهدي ووضعت في قمع مخروطي ثم اضيف اليها ١٠٠ مل من حامض HCL(٢%) ووضع في حمام مائي لمدة اربعين دقيقة بعدها رشح المستخلص باستخدام جهاز المضخه الساحبة واوراق ترشيح نوع WhatmanNo.1 بعدها قيس حجم الراشح واضيفت اليه الكمية نفسها من الايثر ومن ثم اعيد المزيج الى الحمام المائي لمدة ٤٠ دقيقة بعدها اخرج المزيج وركز باستخدام جهاز المبخر الفراغي الدوار(Rotary Vacuum Evaporator) وبعد الحصول على المستخلص الجاف وضع في قناني بلاستيكية معقمه محكمة السد وترك في الثلاجه بدرجة حرارة 5م لحين الاستخدام وقدرت النسبة المئوية للمركبات الفينولية الكلية حسب طريقة (Gayon,1972) وعلى اساس النسبة المئوية للوزن الطري .

عزل و تشخيص خمائر.***candida*** **spp المسببة لداء المبيضات المخاطي**

جمعت ٦٠ عينة من اطفال مصابين بداء المبيضات المخاطي (القلاع) من الفم بوساطة مسحة قطنية معقمة (Sterilized cotton swab) ثم نقلت الى المختبر وزرعت على وسط السابروبد دكستروز

اكار(SDA) الحاوي على المضاد الحيوي كلورامفينيكول (٢٥٠ملغم/لتر)، وحضنت في الحاضنة وشخصت الخمائر اعتمادا على المفاتيح التصنيف (McGinnis,1980 وBuckley,1989وEllis,1994) **وحسبت النسبة المئوية لظهور الانواع الخميرية حسب المعادلة التالية:**

$$\text{النسبة المئوية للظهور} = \frac{\text{عددالعينات التي ظهر فيها الجنس او النوع الخميري}}{\text{العدد الكلي للعينات}} \times 100$$

تحديد فعالية المركبات الفينولية ضد الخمائر المعزولة

استخدمت طريقة الانتشار بالحفر (Agar-Well-Diffusion) (1990), perez *et al* لتحديد فعالية المستخلصات الفينولية المستخلصة وذلك بصب ٢٠ مل من وسط PDA لكل طبق زجاجي ثم لقح وسط PDA ب 0.1 مل من العالق الخميري ذي الكثافة الضوئية 0.1 مل على طول موجي ٤٥٠ نانو متر باستخدام جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer وذلك باستخدام ناشر زجاجي معقم (Spreader) تركت الاطباق مدة ١٥-٣٠ دقيقة لحين الجفاف بعدها عملت ٣ حفر بقطر ٨ ملم لكل حفرة باستخدام ثاقب معدني معقم واخيرا اضيفت ١٠٠ مايكرو لتر من المستخلص الفينولي في الحفرة الاولى والمضاد الحيوي Chloramphenicol في الحفرة الثانية وعينة سيطرة Control في الحفرة الثالثة وبنفس المقدار باستخدام ماصة دقيقة ذات اغطية محكمة. حضنت الاطباق بدرجة حرارة ٣٧ درجة مئوية ولمدة ٢٤ ساعة في الحاضنة ثم اخرجت الاطباق وقيس قطر منطقة التثبيط (Inhibition Zone) علما ان منطقة التثبيط هي المنطقة الخالية من النمو الخميري.

حساب السمية الخلوية للمستخلصات الفينولية

استخدمت كريات الدم الحمراء للانسان في حساب السمية الخلوية (Celluler- Toxicity) لحساب السمية الخلوية للمستخلصات الفينولية من كل من بذور و ثمار و نسيج الجمار لنخلة التمر والتي ابدت فعالية ضد الخمائر قيد الدراسة وذلك طبقا لطريقة(Xain- gue and Ursella,1994) اذ تم تحضير سلسلة من التخافيف للمستخلص الفينولي باستخدام Phosphate buffered saline (Pbs) (mg\ml 1\1000,1\100,1\10,1\1) استخدم للمستخلص الفينولي معامل سيطرة موجبة (تحتوي على Pbs فقط) ومعامل سيطرة سالبة تحتوي على ماء الحنفية المعقم بعدها وضع 0.8 مل من كل تخفيف في انبوبة اختبار معقمة واضيف لكل انبوبة 0.2 مل من كريات الدم الحمراء المعزولة ليصبح الحجم النهائى١ مل حضنت الانابيب في الحاضنة بدرجة حرارة 37 م ولمدة نصف ساعة اجري بعدها الطرد المركزي بوساطة جهاز الطرد المركزي (Centrifuge) لكل التخافيف المحضرة ولمدة خمس دقائق تم بعدها ملاحظة التحلل الدموي(Haemolysis).

التحليل الاحصائي

استخدم التحليل العشوائي الكامل CRD وحللت النتائج احصائيا باستخدام اختبار اقل فرق معنوي المعدل R LSDوعلى مستوى احتمال ($p<0.05$) (الراوي و خلف الله ،١٩٨٠).

النتائج و المناقشة:

عزل الخمائر من العينات المصابة

اظهرت النتائج في جدول رقم (١) عزل ثلاث انواع من الخمائرمن الفم وهي *C.albicans* التي اعطت اعلى نسبة ظهور وكانت 50% تليها .*Candida sp* وكانت نسبة ظهورها 40% ، واعطت *C.tropicalis* اقل نسبة ظهور بلغت 10%، وقد تعزى هذه النسب العالية الى ان خميرة *C.albicans* موجودة طبيعيا في الفم والمسؤول الاول عن الاصابة بداء المبيضات كما انها تسبب اصابات انتهازية ثانوية في الاشخاص المصابين بأمراض اخر(McGinnis,1980 و1994, Ellis). وفي دراسة قام بها DiSilverio وجماعته (1989) كانت الخميرة *C.albicans* هي المسبب الرئيس لداء المبيضات المخاطي ، وفي دراسة اخرى قام بها Al-Duboon ,(1997) ظهر ان الخميرة *C.albicans* المسبب الرئيس لداء المبيضات ، وفي دراسة قامت بها محسن (2007) ظهر ان *C.albicans* هي المسبب الرئيس لداء المبيضات تليها *C.tropicalis* .

جدول(١)انواع الخمائر المعزولة واعدادها والنسب المئوية لظهورها

الخمائر المعزولة	عدد العزلات	النسبة المئوية لظهورها
C.albicans	15	50%
CandidaSp.	12	40%
C.tropicalis	3	10%
المجموع	30	

تقدير المركبات الفينولية

بينت نتائج تقدير المركبات الفينولية الكلية للاجزاء المدروسة عدم وجود فروقات معنوية في النسبة المئوية للمركبات الفينولية المتواجدة فيها كما مبين في جدول رقم (٢) اذ كانت النسبة المئوية للمركبات الفينولية لكل من الثمار ونسيج الجمار ثابتة ومقدارها 83% بينما انخفضت النسبة قليلا في مسحوق النوى اذ بلغت 82 %اما النسبة المتبقية قد تكون عبارة عن بعض المركبات الشبيهة بالفينولات او مواد مشوبة اخرى ،وهذا ماكدته دراسات عديدة التشابه في محتوى تلك الاجزاء من المواد الفينولية (الطه ، ٢٠٠٥ والموسوي ، ٢٠١١).

جدول(٢) المحتوى الكلي للمواد الفينولية من اجزاء مختلفة من نخلة التمر صنف الزهدي والنسبة المئوية لكل منها

الجزء النباتي المستخدم	المواد الفينولية %
الثمار(الخلال)	83
نسيج الجمار	83
مسحوق النوى	82

$$N.S=R.L.S.D_{0.05}$$

الفعالية التثبيطية للمركبات الفينولية

اظهرت النتائج المبينة في جدول (٣) عدم وجود فروق معنوية في معدل تأثير نوع الخميرة حيث اظهرت *C.tropicalis* حساسية عالية تجاه المستخلصات الفينولية المستخدمة ضدها اذ بلغ معدل تأثرها بقطر تثبيط 25.80 بينما اظهرت كل من *C.albicans* و.sp *Candida* حساسية اقل تجاه تلك المستخلصات اذ بلغ معدل تأثرهما بقطر تثبيط25.67 و25.40ملم على التوالي.

كما اظهرت النتائج وجود فروقات معنوية في معدل تأثير التركيز اذ اعطى التركيز 100% للمستخلصات الفينولية اعلى معدل تأثيراذ بلغ 45.22 ملم بينما اظهر التركيز10% اقل معدل تأثير اذ بلغ 10.78 ملم،كما اشار الجدول الى وجود فروقات معنوية في التداخل الحاصل بين كل من معدل تأثير نوع الخميرة ومعدل تأثير التركيز للمستخلص الفينولي اذ اشارت النتائج الى ان اعلى قطر تثبيط لخميرة *C.tropicalis* عند التركيز 100% من المستخلص الفينولي الذي بلغ 47.00 ملم واقل قطر تثبيط للخميرة ذاتها عند التركيز 10% من المستخلص الفينولي اذ بلغ 9.33 ملم.

وقد يعزى السبب في الفعالية العالية للمركبات الفينولية ضد الخمائر كون تلك المواد هي مركبات اروماتية حاوية على مجاميع هيدروكسيل (حرة و متعددة) وان القدرة التثبيطية لهذه المركبات تزداد بزيادة هذه المجاميع (الموسوي ، ٢٠٠٦)، كما ان المركبات الفينولية تعمل على تثبيط نمو الخلايا من خلال التأثير على نشاط الجدار الخلوي وترسيب بروتوبلازم الخلية وبالتالي موتها (Tranjano *et.al*., 2010 و Gende *et.al*. ,2008).

وذكر Burt(2004) ان المركبات الفينولية تعمل على دنترة (Denaturation) وتحطيم المركبات البروتينية الموجودة في الخلية وتثبيط العمل الانزيمي فيها.

وفي دراسة قامت بها (الموسوي ، ٢٠١١) حول فعالية المركبات الفينولية المستخلصة من اجزاء مختلفة لنخلة التمر ضد الجراثيم المسببة لالتهاب الاجفان اظهرت المركبات الفينولية المستخلصة فعالية تثبيطية عالية ضد الجراثيم المعزولة.

جدول(٣) يبين فعالية المركبات الفينولية الكلية المستخلصة من اجزاء نخلة التمر ضد الخمائرالمعزولة

نوع الخميرة	معدل قطر التثبيط (ملم)	
	التركيز (%)	

	10	20	40	80	100	معدل تأثرنوع الخميرة
C.albicans	12.00	19.00	21.67	31.00	44.67	25.67
CandidaSp.	11.00	15.33	23.67	33.00	44.00	25.40
C.tropicalis	9.33	13.33	24.67	34.67	47.00	25.80
متوسط تأثير التركيز	10.78	15.89	23.33	32.89	45.22	

$R.L.S.D_{0.05}$ لنوع الخميرة=0.97 للتركيز=1.25 للتداخل=2.18

السمية الخلوية للمركبات الفينولية

يبين جدول (٤) عدم وجود اي تأثير سمي يذكر للمركبات الفينولية المستخلصة من نخيل التمر اي سمية على كريات الدم الحمراء للانسان Red Blood Cells وقد استدل على ذلك بعدم حصول اي تحلل دموي (Haemolysis) لسلسة التراكيز المحضرة لتلك المستخلصات فمن المعلوم ان بعض المركبات الفينولية النباتية هي سامة بطبيعتها (الموسوي ، ٢٠٠٦). وفي دراسة قامت بها الموسوي (٢٠١١) ظهرت عدم سمية المركبات الفينولية على كريات الدم الحمراء للانسان. ونظرا لان بعض الدراسات الحديثة استخدمت المركبات الفينولية كمضادات حيوية وهذا يوكد عدم سميتها لخلايا المضيف (Who,2000).

جدول (٤)السمية الخلوية للمركبات الفينولية المستخلصة من نخيل التمر

تركيز المستخلص الفينولي mg/ml	التحلل الدموي
1:1200	-

1:10	–
1:100	–
Negative control	–
Positive control	+
Solvent control	+

الاستنتاجات:

١. الفعالية التثبيطية للمركبات الفينولية المستخلصة من اجزاء مختلفة من نخلة التمر صنف الزهدي جيدة ضد خمائر .*Candida* Spp .

٢. عدم سمية المركبات الفينولية المستخلصة لجسم الانسان لعدم حصول تحلل دموي Haemolysis .

التوصيات:

١.دراسة الفعالية التثبيطية للمركبات الفينولية المستخلصة من اجزاء مختلفة من نخلة التمر على انواع اخرى من الفطريات الممرضة للانسان .

٢. استخدام المركبات الفينولية كمضادات فطرية داخل الجسم الحي *in vivo* .

المصادر:

الراوي،خاشع محمود وعبد العزيز محمد خلف الله (١٩٨٠). تصميم وتحليل التجارب الزراعية ،كلية الزراعة والغابات ، جامعة الموصل ،مؤسسة الطباعة والنشر،العراق ،٤٨٨صفحة.

الطه ، هدى عبد الكريم (٢٠٠٥). دراسة التغيرات في محتوى الثمار خلال مراحل النضج وعلاقتها بالسكريات والمواد الفينولية في راس نخيل التمر صنف ام الدهن–رسالة دكتوراه، كلية الزراعة – جامعة البصرة.

الموسوي ، منى عبد المطلب يحيى (٢٠٠٦). الفعالية الضد جرثومية لمستخلصات بعض النباتات البرية العراقية ، رسالة ماجستير ، كلية التربية ، قسم علوم الحياة ، جامعة البصرة ، العراق ٨٥ صفحه.

الموسوي ، منى عبد المطلب يحيى (٢٠١١). الكشف عن فعالية المركبات الفينولية المستخلصة من اجزاء مختلفة لنخلة التمر ضد الجراثيم المسببة لالتهاب الاجفان . مجلة البصرة لابحاث نخلة التمر ، المجلد ١، العدد ٢، ص ١٢٤-١٣٧.

شبانة ، حسن عبد الرحمن و عبد الوهاب ، زايد و عبد القادر ، اسماعيل سنبل (٢٠٠٦).ثمار النخيل ، فسلجتها ، جنيها ، تداولها والعناية بها بعد الجني. منظمة الاغذية والزراعة للامم المتحدة (FAO) ، روما ، ايطاليا.

محسن ، لونا قحطان (٢٠٠٧). داء المبيضات الجلدي المخاطي في الاطفال الرضع في محافظة البصرة ، رسالة ماجستير ، كلية التربية ، جامعة البصرة ، العراق ،٦١ صفحة

Al- Duboon,A.H.(1997).A study on superficial cutaneous mycoses in Basrah (Iraq),Ph.Dthesis, College of Science, University of Basrah. 163p.

Buckley ,H.R. (1989)Identification of yeasts.In:Medical mycology .Apractical approach.Evans,E.G.and Richaroach,M .D. (eds) I.RL.Press,Oxford University press. P:47- 109.

Burt,S.(2004). Essential oils:their antibacterial properties and potiential applications in food –a review.International Journal of food Microbiology,v.94,p.223- 253.

Di Silverio , A . ;Mosca , M., Brandozzii , G. and Gatti, M. (1989). Superficial mycoses observed at the department of dermatology of the University of Pavia . A 13- year survey . Mycopathologia 105 :11-17.

Ellis, D.H.(1994) . Clinical mycology . The human opportunistic mycoses .Pfizer,New York .166p.

Gayon,P.R.(1972).Plant phenolics 1st ed Oliver and Boye.Edinburge p:254.

Gende,L.B.,Floris,Fritz,R.&Ecuaras,M.J.(2008).Antimicrobial activity of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) essential oil and its main components against *Paenibacillus larvae* from Argentine *Bulletin of Insectology* 61(1):1-4.

Kolarik,J(2004).Candidiasis over view and full Index , Doctor Fungus.

Mc Ginnis ,M.R. (1980).Laboratory hand book of medical mycology Academic press,New York ,USA, 661p.

Pearson,(1970).The chemical analysis of food.sixth edition.Pp;208-281.

Perez,C.;Pauli,M.and Bazergue,P. (1990) An antibiotic assay by the Agar –Well diffusion method.J. Acta Biologiae et Medicine Expermentalis.,15:113-115.

Trajeno,V.N.,Linda,E.O.,Travassos,A.E.,&Souza,E.L.(2010).Inhibit-ory effect of the essential oil from Cinnamomum zeylancium Blume leaves on some food related bacteria .Cienc.Tecnol.Aliment.,Campians,30(3):771-772,Jul.-set.

WHO.(2000).General guidelines for methodologies on research and evalution of traditional medicine.WHO.Geneva.p:3-11.

Xian- gno, H.and Ursella,M. (1994).Antifungal compounds from *Solanum nigrescence* J.Ethopham,43:173- 177

The inhibition activity of some phenolic compounds extracted from date palm *Phoenix dactylifera L.* against several species of *Candida Spp.* the causal agant of mucocandidiasis.

Lnuna Qahtan Muhsin

Date Palm Reserch Center- Basrah University

Summary

Three species of *Candida* Spp.were isolated and identified as *Candida albicans ,Candida Sp*. and *C. tropicalis* from 60 infection patients with mucocandidiasis with isolation percentage of 50,40 and 10%respectively.Several phenolic compounds has been extracted from different parts of date palm including fruits,seeds and meristels of the zahdi cultivar.

Results showed non significuns differences among these parts in their phenolic content. The inhibition activity of the total phenols against the yeasts *C. albicans , Candida sp*.and *C. tropicalis* proved high inhibition activites at concentration of 10,20,40,80 and100% mg/ml which were10.78,15.89,23.33,23.8 and 45.22 respectively.

Also results showed that the tested phenolic compounds had no toxic effect on the humman body .

Key words:dat palm extracts, Candida Spp. Yeasts,the inhibition activity.