الفعالية التثبيطية لقشور ثمار نبات الرمان *Punicagranatum* على بعض انواع من الكانديدا *Candida*.Sp

The inhibition activity of Punicagranatumpellon Some Type from Candida Sp.

محمد سامي فرحان
خليل ابراهيم بندر
قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة تكريت
ميلاد عدنان مزهر
قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة تكريت
Mohammed Sami Farhan
Khalil IbrahemBander
Biology Department/College of Science /Tikrit University
Melad Adnan Mezher
Biology Department/ College of Education for Pure Science/ Tikrit University

الخلاصة:

انجزت هذه الدراسة في مختبرات قسم علوم الحياة - كلية العلوم/ جامعة تكريت وتضمنت عمل مستخلصات كحولية ومائية لقشور نبات الرمان *Punicagranatum*رمان سليمي *P. granatumvar.nana*ونفذت الدراسة بمحورين المحاور الاول بيان تأثير المستخلص المائي والكحولي لقشور ثمار الرمان على الخمائر بأستخدام طريقة الانتشار في الحفر والمحور الثاني قياس تأثير المركبات المعزولة بصورة نقية من قشور الرمان بأستخدام تقنية ال Hplc. وتبين من النتائج تأثير كل من المستخلص المائي والكحولي للقشور وبجميع التراكيز وكانت العلاقة طردية اي كلما زاد التركيز ازداد التأثير المثبط لها. وكانت المستخلصات الكحولية أكثر فعالية من المستخلصات المائية بسبب نوعية وكمية المادة الفعالة المتحررة والمذابة بالكحول تكون اكبر مقارنة بلماء اذ كانت خميرة *C.incospicua* اكثر

تأثيرا بالرمان السليمي اذ بلغ قطر التثبيط ١٤,٧ملم. وبالنسبة لتأثير المركبات النقية المعزولة بوساطة تقنية Hplc فقد اختلف تأثيرها من مركب الى اخر اذ تم عزل خمس مركبات كيميائية وهي (Tannic acid, Ellagic acid, Gallic acid, Rutin, Qurtecin) وتم قياس فعاليتها التثبيطية تجاه الخمائر وبشكل عام فان التثبيط ازداد عند المزج حيث إن المركبات الفينولية تعمل بشكل ضعيف عندما تكون معزولة بشكل مفرد كائن.

كلمات مفتاحية: مستخلص، قشور رمان، كروماتوغرافيا السائل عالي الاداء HPLC، مركبات فينولية، Qurtecin Tannic acid, Ellagicacid, Gallicacid, Rutin,

Summary:

This Study was done in the laboratories of Science College,University of Tikrit, .the study includes prepare alcohol and aqueous extract for , Punicagranatumpell of P. granatumvar.nana.the study was carried out in two axes.the first axes statement of impact on yeast using the diffiusion method throughtdrilling.the Second axes measuring the effect of isolated compound from pomegranate pell by technique Hplc .Results Show effect of both alcohol and aqueous extract and with all concentration the relationship was positive the higher the concentration of the extract,the greater the inhibitory effect. alcohol extract were more effective than aqueous extract because of the quality and quantity of the active substance released and melted with alcohol is greater compared to water. As it was Yeast *C.incospicua*more in influential of P. granatumvar.nana The diameter of the inhibition 14.7 Mm. As for the effect of isolated compound by Hplc their effect varied from one compound to another.Five chemical compound were isolated (Tannic acid, Ellagic acid, Gallic acid, Rutin, Querciten) Was Its inhibitory efficacy was measured against Yeast. In general inhibition is increased when mixing whereas phenolic compound they work when they are isolated individually.

المقدمة:

يعد داء المبيضات Candidiasis اكثر الامراض شيوعا وهو اصابة فطرية اولية او ثانوية تحدث بواسطة انواع الجنس Candida spp وهذه الاصابة ربما تكون حادة Acute أو معتدلة Subacute ، أو مزمنة Chronic ، ويسبب مرض السلاق الفموي وهي اصابة موضعية في الفم Oral Thrush والبلعوم والجلد Skin Infection والمهبل مسببة داء المبيضات المهبلي Vagintis والاصابع والاظافر والقصبة الهوائية ومن الممكن ان ينتشر داخل الجسم فيصيب الرئتين والقناة المعوية أو أصابات جهازية system infection اذ ان وجود المبيضات في الدم تعد حالة مرضية تعرف بـــ Candimia او قد يكون التهاب شغاف القلب الداخلي Endocarditis والتهاب السحايا Meningitis ويختلف المظهر السريري للمرض حسب مكان الاصابة (١و٢ و٣)

يوجد حوالي (200) نوع عائد الى جنس Candida spp الا ان هناك حوالي (20) نوع فقط تكون مسؤولة عن داء المبيضات للانسان والحيوان (٤)، تعد المبيضات البيضاء *C. albicans* النوع الرئيسي المسبب للاصابة، ويأتي بعده الانواع الاخرى مثل *C. glabrata* ، *C. Krusei* ، *C. norvegenesis* ، *C. Kefyr* ، *C. Parapsilosis* ، *C. famata* ، *C. sphaerica* ، *C. guilliermondii* وغيرها (٥ ، ٦)

ان نجاح المبيضات في احداث الاصابة ناتج عن امتلاكها لعوامل الضراوة التي تمكنها من مقاومة الظروف المحيطة بها، اذ تمتلك القدرة على تحمل درجات الحرارة المرتفعة ٣٧ م^{o} وقابليتها على تغيير شكلها Dimorphism وانتاجها الانزيمات المحللة بالاضافة الى الالتصاق بجدار الخلايا واختراق انسجة المضيف من خلال افراز الانزيمات المحللة (٧)

وبما ان الخمائر تسبب الكثير من الامراض وظهرت في الاونة الاخيرة الكثير من الكائنات التي تتميز بمقاومتها للمضادات الحيوية وكذلك فان هذه المضادات والادوية لاتخلو من الاثار الجانبية والتأثيرات السامة لعدد من هذه المواد والعقاقير لذلك ظهرت الحاجة الى البحث عن مركبات جديدة وفعالة لعلاج الامراض ولهذا اتجهت الانظار الى النباتات الطبية وذلك لانتشارها الواسع وايضا لقلة الاثار الجانبية الناتجة من استعمال تلك المواد، فضلا عن تقليل مدة العلاج وتكلفتها (٨) ويعد العراق من بين الدول التي انتشرت فيها استعمال الطب الشعبي المتمثل بالنباتات الطبية للقضاء على الكثير من الكائنات التي تسبب الامراض الجرثومية.وكان هدف الدراسة بيان مدى فعالية قشور ثمار نبات الرمان *Punicagranatum* على بعض الاحياء المجهرية التي تصيب الانسان.

المواد وطرق العمل:

جمع عينات الخمائر:

تم الحصول على العينات من الدكتورة (اسودة محمد نوري) من عينات مصابة بكانديدا المهبل. حيث تم اخذ تلك العينات بواسطة سوابات (Swab) وجمعت من كل مريض ومن ثم زرعت.

- تنمية وتشخيص العزلات:

بعد الحصول على العينات تم تطبيق عدة خطوات حسب ما ورد في (٩) لفحص العزلات وتشخيصها:

١. دراسة العينات على الاوساط الزرعية

زرعت المسحات المأخوذة على وسط السايدرويد الصلب (SDA)، وتم تحضين الاطباق المزروعة بدرجة حرارة ٣٧ م^{o} لمدة (٢ – ٤ أيام).

٢. صبغ العينات:

اخذ بواسطة الناقل (Loop) جزء من المستعمرة النامية على وسط corn-meeal agar ووضعت على شريحة زجاجية ومزجت مع قطرة من صبغة اللاكتوفينول الزرقاء لملاحظة الخلايا والسبورات الكلاميدية وغطيت بغطاء الشريحة (Cover slide) وتم فحصها.

٣. تنمية العزلات على وسط chromo agar:

جميع العزلات حضنت على الوسط الزرعي SDA وبدرجة حرارة ٣٧ م^{o} لمدة ٤٨ ساعة، بعدها نقلت هذه العزلات على وسط chromo agar ثم حضنت بدرجة حرارة ٣٧ م^{o} ولمدة (٤٨ – ٧٢ ساعة) ان وسط chromo agar يعد وسط انتقائيا لعزل الخميرة وتنميتها وتحديد المستعمرة التابعة لعزلات المبيضات مثل *C. krusei* , *C. albicansC. glabrata* , *C. sphaerica* , *C. parapsilosis* , *C. kefyer* , *C.incospicua* من خلال شكل المستعمرات واللون الذي تنتجه العزلة (١٠) شخصت السلالات بموجب الشركة المصنعة التي تحدد المبيضات من خلال اللون والشكل الخارجي للمستعمرة.

جمع العينات النباتية:

جمعت ثمار الرمان Punicagranatum. رمان سليمي Punicagranatumvar.nana ونزعت القشور وتم غسلها بالماء المقطر لازالة الاتربة العالقة وبعد ذلك جففت العينات بدرجة حرارة الغرفة ثم طحنت العينات المجففة من خلال طاحونة كهربائية وحفظت في اكياس بلاستيكية محكمة لتجنب التلوث والرطوبة وكذلك حفظت في مكان مظلم بعيدا عن ضوء الشمس لحين الاستخدام. وقد حضر من العينة النباتية ثلاثة مستخلصات:

١. تحضير المستخلص المائي Preparation of Aqueous Extracts: تم مزج ٤٠ غرام من النموذج النباتي مع ١٦٠ مل من الماء المقطر المعقم وحرك المزيج بواسطة جهاز الهزاز Shaker، وترك المزيج بالثلاجة لمدة

٢٤ ساعة لغرض النقع. ثم رشح بعدها بواسطة عدة طبقات من الشاش للتخلص من الاجزاء النباتية غير المسحوقة والالياف المتبقية ثم رشح ثانية باستخدام وحدة الترشيح الدقيق Millipore ذات القطر $0.45\mu m$ لمنع مرور الجراثيم من الراشح. وضع بعد ذلك الخليط في فرن كهربائي عند درجة حرارة ٤٠ م^o حتى تبخر الماء باكمله وبقاء المستخلص في قاعة البيكر (١١). ثم وضع المستخلص في قناني زجاجية ذات غطاء محكم وحفظت بالتجميد لحين استخدامها.

٢. تحضير المستخلص الكحولي Preparation of Alcoholic Extracts:

- تحضير المستخلص الايثانولي

حضر المستخلص بنفس الطريقة السابقة المستخدمة في المستخلص المائي ماعدا استبدال المذيب بالكحول الاثيلي بتركيز ٩٥% (١١)

- تحضير المستخلص الاسيتوني

حضر المستخلص بنفس الطريقة السابقة المستخدمة في المستخلص الاثيلي ما عدا استبدال المذيب بالاسيتون بتركيز ٨٠% (11).

تعقيم المستخلصات وتحضير التخافيف:

لغرض استخدام المستخلصات في تجارب التثبيط، اعتمدت طريقة (12) في تحضير المحلول الخزين Stock solution وتعقيمه حيث اخذ ١ غرام من مسحوق المستخلص النباتي الجاف واذيب في ١٠ مل من الماء المقطر المعقم فأصبح لدينا محلول خزين بتركيز ١٠٠ ملغم/مل. عقم المحلول بالترشيح بأستخدام اوراق الترشيح (Whatman No.1) للتخلص من الملوثات الجرثومية الموجوده فيه والحصول على محلول خزين معقم واستخدم هذا المحلول كمصدر لتحضير التخافيف (75 , 25 , 50) ملغم/مل.

الكشف النوعي والكمي للمركبات الكيميائية باستخدام جهاز كروموتوغرافي السائل عالي الأداء HPLC:

تم اجراء هذا التحليل في (وزارة العلوم والتكنولوجيا / بغداد) حيث أتبعت الطريقة المذكورة من قبل (13) إذ استخدم عمود الطور الثابت من نوع Phenomenex وحجم الدقائق هو ٣mM والطور المتحرك عبارة عن ماء : حامض خليك بسرعة جريان ١ مل/ دقيقة على درجة حرارة ٣٠ مْ باستعمال الاشعة فوق البنفسجية على طول موجي ٢٤٥ نانومتر إذ أذيب 0.1 (غم) من العينة في 5 (مل) من المحلول المائي للميثانول . تم أجراء الطرد المركزي للعالق على سرعة 7500 (rpm) لمدة 15 (دقيقة) . العالق النقي خضع للمعاملة بالفحم لإزالة الصبغات وجففت ومن ثم أعيد تعليقها في 0.1 (مل/ دقيقة) من ميثانول HPLC بوساطة المازج ، يمرر الخليط من خلال مرشح ذي استعمال واحد ، بعدها يحقن 20 (مايكروليتراً) من النموذج في نظام HPLC .

دراسة الفعالة التثبيطية للمستخلصات النباتية والمركبات الكيميائية تجاه والخمائر:

استخدمت طريقة الانتشار في الحفر Agar well diffusion method لدراسة الفعالية التثبيطية للمستخلصات الكحولية والمائية لقشور الرمان punnicagranatum على العزلات البكتيرية والخمائر المذكورة سابقا. وتم نقل العالق البكتيري الى اطباق تحتوي على وسط اكار مولر- هنتون ونشر على سطح الوسط بواسطة السواب Swab معقم، وتركت الاطباق لتجفيف العالق، اما عالق الخمائر فقد تم زرعه وسط اكار السابرويد – دكتروز وبنفس الطريقة. تم بعدها عمل حفر بقطر ٥ ملم على سطح الوسط الزرعي الصلب بأستخدام الثاقب الفليني cork borer المعقم ثم نقلت التراكيز المحضرة من المستخلص النباتي (25 , 50 , 75 ، ١٠٠) ملغم/مل وكذلك المستخلصات الناتجة من HPLC الى الحفر وبحجم ١٠٠ مايكرو لتر في كل حفرة. حضنت الاطباق بدرجة ٣٧ م° لمدة ٢٤ ساعة، وقد حددت الفعالية التثبيطية للمستخلصات النباتية بقياس قطر التثبيط Inhibition zone حول الحفر المقاسة بالمليمتر (14).

النتائج والمناقشة:

الاختبارات الزرعية والمجهرية لتشخيص جنس المبيضات:

تم تشخيص جنس المبيضات وفقا لطريقة (15) اذ تم التعرف على المبيضات بالأعتماد على الصفات المظهرية وبقية الصفات الزرعية والفحوصات الكيموحيوية فظهرت افراد هذا الجنس بشكل مستعمرة بيضاء الى حليبية اللون ملساء ومحدبة عند تنميتها على وسط السابرويددكستروز اكار(SDA) مع الكلورامفينيكول Sabouraud Dextrose Agar chloramphenicol (SDAC) لمدة(٢-٣) ايام في درجة حرارة ٣٧ م° وتم فحص المستعمرة مجهريا بعد تصبيغها بصبغة اللاكتوفينول الزرقاء، ولوحظ أن الخلايا بدت كروية الشكل الى بيضوية إو طويلة مفردة ومتبرعمة ولوحظ وجود غزل فطري كاذب Psudohyphae احيانا وايضا تم فحص قابليتها لتكوين السبورات الكلاميدية بعد زرعها على وسط اكار طحين الذرة Corn_meal Agar (١٦).

تشخيص عزلات خميرة المبيضات بأستخدام الاختبارات الكيموحيوية:

التشخيص بأستخدام ال Chrom Agar :

يعد اختبار النمو على الوسط الزرعي Chrom Agar من الاختبارات الكيموحيوية الفعالة والسريعة في تشخيص إنواع المبيضات على مستوى اللون بعد التلقيح والحضن مقارنة مع الاختبارات الاخرى ، اذ اظهرت نتائج الاختبار مستعمرات بالوان مختلفة على وسط Chrom Agar حيث اظهرت مستعمرة *C.albicans* لونا اخضر(light green) بينما ظهرت خميرة *C.parapsilosis* باللون الابيض إما النوع *C.glabrata* فظهرت مستعمراته

باللون الوردي وظهرت بقية العزلات بالون مختلفة حمراء وبنية مختلطة وهذا يتفق مع (١٧،١٨،١٩)

صور رقم (١) توضح نمو الخمائر على وسط Chrome agar

التشخيص بأستخدام وسط الـ Corn Meal Agar(CMA) :

يستخدم هذا الوسط للكشف عن قابلية هذه المبيضات على تكوين الابواغ الكلاميدية ، حيث اظهرت النتائج التي تم الحصول عليها ان جميع المبيضات المدروسة لها القابلية على تكوين الابواغ الكلاميدية عند تنميتها على هذا الوسط عدا النوع *C.krusei* و *C.parapsilosis* والتي جاءت مطابقة لنتائج (٢٠) وكذلك نتائج (٢١) حيث تكونت الابواغ الكلاميدية ذات الجدران السميكة الدائرية الشكل عند نهاية الخيوط الفطرية والتي تكون اما بصورة مفردة او بشكل عناقيد cluster عند زراعة هذه المبيضات على وسط CMA وان السبب وراء تكوين هذه الابواغ هو حصول تجويع لهذه الخمائر وحصول نقص في المصادر الغذائية حيث ان هذه الابواغ تتكون عندما تكون الضروف غير ملائمة حيث يوصف هذا الوسط بأنه وسط تجويع للخمائر (٢٠)

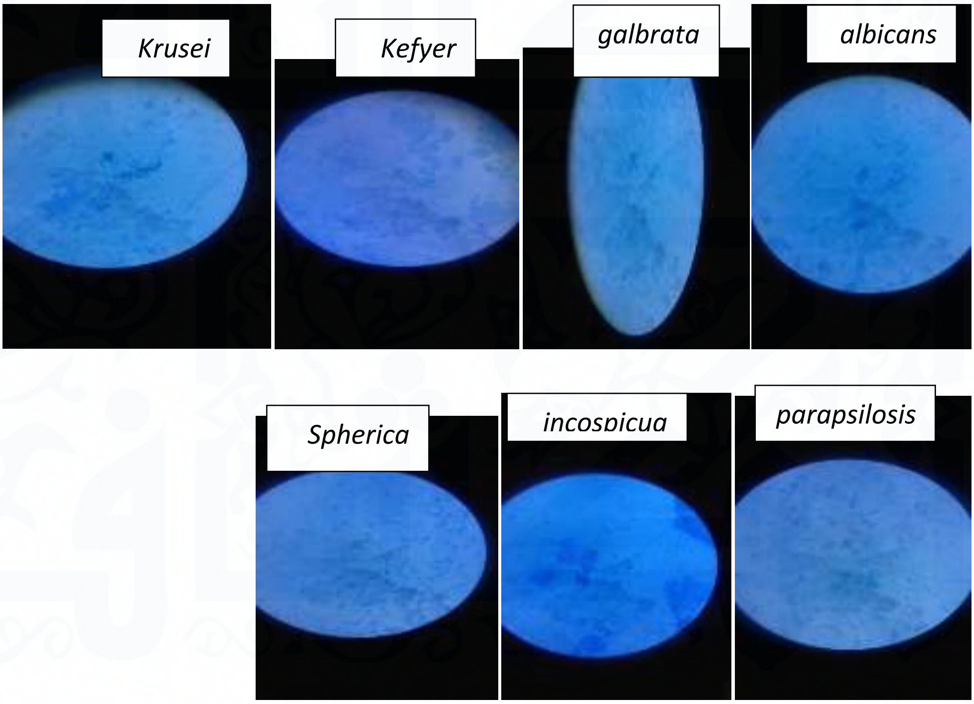
جدول (١) يوضح قابلية الخمائر على تكوين الابواغ الكلاميدية على وسط CMA

الخمائر	*C.albicans*	*C.glabrata*	*C.krusei*	*C.kefyr*	*C.parapsilosis*	*C.incopiscua*	*C.spheria*
النتيجة	+	+	−	+	−	+	+

+ تشير الى قابلية الخمائر على تكوين الابواغ الكلاميدية.

ـــــ تشير الى عدم قابلية الخمائر على تكوين الابواغ الكلاميدية.

صورة رقم (٢) توضح نمو الخمائر على وسط CMA وقابليتها على تكوين الابواغ الكلاميدية

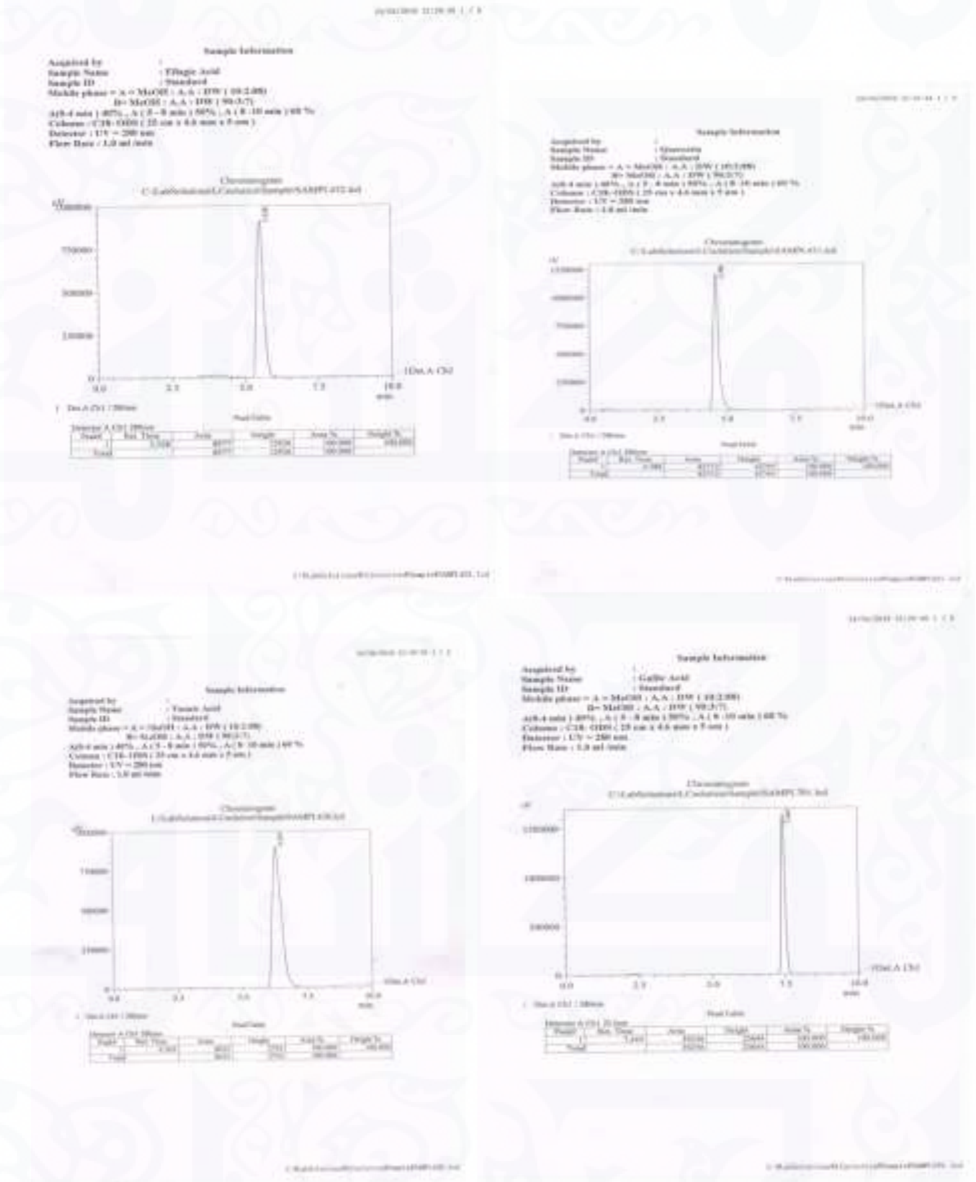


تشخيص المركبات المعزولة بواسطة HPLC:

كروموتوغرفيا السائل عالي الأداء هي تكنولوجيا لفصل المركبات التي تتوزع بين الطور المتحرك والثابت . HPLC يستعمل طور متحرك سائل لفصل المركبات في الخليط ، الطور الثابت يمكن أن يكون سائلاً أو صلباً حيث تذاب المركبات أولا تذوب في المذيب وبعدها تدفع من خلال عمود الكروموتوغرافي تحت الضغط . كمية الانحلال مهمة تعتمد على طول التفاعل بين المركبات المذابة والطور الثابت. التحليل بأستخدام جهاز الكروماتوغرافي السائل عالي الاداء (HPLC) **High-performance liquid chromatography** تم بواسطته الكشف عن المركبات من مستخلص قشور الرمان وتم تحديد زمن الاحتجاز حيث تم تحديد تلك المركبات اعتمادا على زمن الاحتجاز وبأستخدام محاليل قياسية لهذه المركبات حيث تم عزل المركب Tannic acid في زمن احتجاز (6.303 min) وعزل المركب Ellagic acid في زمن احتجاز(5.228 min) وعزل المركب Gallic acid في زمن احتجاز (7.445 min) وعزل المركب Rutin في زمن احتجاز (3.236 min) وعزل المركب qurtecin في زمن احتجاز (4.586 min) وهذا يتفق مع (٢٢،٢٣،٢٤) الذين عزلوا تلك المركبات من نباتات مختلفة مع الاختلاف في زمن

الاحتجاز والذي يعود الى الاختلاف في نوع الجهاز المستخدم والظروف التي اجرى تحتها الاختبار وصنف النبات الذي عزلت منه المركبات.

صور رقم (٣) توضح زمن الاحتجاز Retation time للمركبات المعزولة بتقنية HPLC



تأثير مستخلص ثمار قشور الرمان السليمي *P. granatumvar.nana* على الخمائر:

تم استخدام ثلاثة انواع من المستخلصات وهي المستخلص (الاسيتونيو الايثانولي والمائي) ويبين الجدول (٢) اقطار التثبيط لهذه المستخلصات والفروق المعنوية بين الخمائر من جهة وبين المستخلصات من جهة.حيث كان المستخلص الاسيتوني نسبيا هوه الاكثر فعالية ضد الخمائر اذ بلغ متوسط قطر التثبيط للمستخلص في خميرة *C.albicans*١٧,٥ ملم، *C.glabrata* بلغ متوسط قطر تثبيط المستخلص ١٣,٣ملم، في خميرة *C.Kefyr* بلغ متوسط قطر التثبيط للمستخلص ١٥,٠ ملم، *C.krusei* بلغ متوسط قطر تثبيط المستخلص ١٣,٣ ملم، خميرة *C.parapsilosis* بلغ متوسط قطر تثبيط المستخلص ١٤,٥ملم، *C.incospicua* بلغ متوسط قطر تثبيط المستخلص ١٥,٣ ملم، اما خميرة *C.spherica*بلغ متوسط قطر تثبيط المستخلص ١٣,٣ ملم. وكان المستخلص الاسيتوني اكثر تاثيرا من حيث إن المادة المستخدمة كمذيب لها دور فعال في استخلاص هذه المواد المثبيطة بحسب ما اشار اليه (٢٥،٢٦،٢٧,٢٨). المستخلص الايثانولي كان فعالاً ضد جميع انواع الخمائر وبكافة التراكيز حيث بلغ متوسط قطر التثبيط في خميرة *C.albicans* ١٤,٣ ملم، *C.glabrata* بلغ متوسط قطر تثبيط المستخلص ١٤,٣ملم، في خميرة *C.Kefyr* بلغ متوسط قطر التثبيط للمستخلص ١٥,٠ ملم،*C.krusei* بلغ متوسط قطر تثبيط المستخلص ١٢,٨ ملم، C.parapsilosis بلغ متوسط قطر تثبيط المستخلص ١٤,٥ ملم، ، *C.incospicua* بلغ متوسط قطر تثبيط المستخلص ١٤,٥ ملم، خميرة *C.spherica* بلغ متوسط قطر تثبيط المستخلص ٢٥,٥ ملم، اما المستخلص المائي فكان فعال ضد جميع الخمائر المستعملة في الدراسة ولكن بأقطار تثبيط إقل من المستخلص الكحولي حيث في خميرة *C.albicans* *بلغ متوسط قطر تثبيط المستخلص ١١,٨* ملم، *C.glabrata*بلغ متوسط قطر تثبيط المستخلص ١٣,٤ملم،خميرة*C.Kefyr* بلغ متوسط قطر التثبيط للمستخلص ١١,١،*C.krusei* بلغ متوسط قطر تثبيط المستخلص ١٢,٨ ملم، خميرة *C.parapsilosis* بلغ متوسط

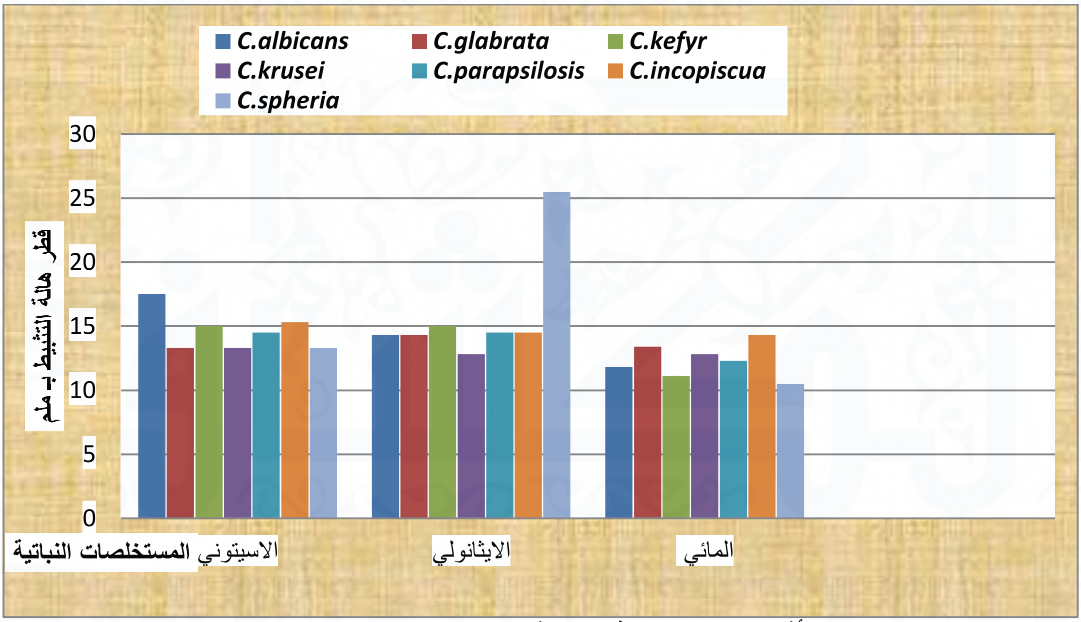
قطر تثبيط المستخلص ١٢,٣ ملم، *C.incospicua*بلغ متوسط قطر تثبيط المستخلص ١٤,٣ ملم، خميرة *C.spherica* بلغ متوسط قطر تثبيط المستخلص ١٠,٥ ملم. المستخلصات الكحولية كانت اكثر فعالية من المستخلصات المائية بسبب ان نوعية وكمية المادة الفعالة المتحررة والمذابة بالكحول تكون اكبر مقارنة بلماء اذ يعد الكحول مذيب ممتاز اضافة الى ذلك لكون المادة الفعالة المؤثرة تذوب في المذيبات العضوية اكثر من ذوبانها بالماء بحسب ما اشار اليه (٢٦) و(٢٩) و(٢٧). وتعود الفعالية المثبيطة لقشور الرمان الى احتوائها على العديد من المركبات الفعالة والتي تؤثر ايجابيا على العديد من الممرضات حيث تحتوي قشور الرمان على اعلى نسبة من مضادات الاكسدة مقارنة مع اجزاء اخرى من الفاكهة، اضافة الى احتوائها على مركبات الفينول Phenolic compound حيث تعمل الفينولات على تثبيط عمل الانزيمات كذلك احتوائها على القلويدات الفعالة والفلافونويدات وكذلك وجود المواد العفصية Tannins والذي هو عبارة عن gallotannins والذي يشمل Punicalin, Punicalagin, Granatine وتعود قدرة مركبات التانين الى تداخلها مع تركيب جدار الخلية ويعمل على تكوين اواصر هيدروجينية مع البروتينات مما يؤدي الى عدم بنائها (*25*). وبشكل عام كان التركيز ١٠٠% الاكثر فعالية في المستخلص الثلاثة المستعملة في الدراسة. وكانت خميرة C.spherica هي الاكثر تأثيرا بالمستخلص.

جدول رقم (٢) تأثير مستخلص ثمار قشور الرمان السليمي
على الخمائر *P. granatumvar.nana*

نوع الفطر	نوع المستخلص	التركيز%				متوسط المستخلص	المتوسط
		٢٥	٥٠	٧٥	١٠٠		
C.albicans	اسيتوني	١٤	١٦	١٨	٢٢	17.5 B	14.5A
	ايثانولي	١٠	١٢	١٧	١٨	14.3BC	
	مائي	١٠	١٢	١٢	١٣	11.8DE	
متوسط التركيز في		11.3c	13.3bc	15.7ab	17.7a		
C.glabrata	اسيتوني	١٢	١٣	١٣	١٥	13.3CD	13.7A
	ايثانولي	١٢	١٤	١٥	١٦	14.3BC	
	مائي	١٠	10.5	١٢	١٣	13.4CD	
متوسط التركيز في		10.7b	12.5ab	13.3a	14.7a		
C.Kefyr	اسيتوني	١١	١٣	١٨	١٨	15.0BC	13.7A
	ايثانولي	١٠	١٤	١٨	١٨	15.0BC	
	مائي	٩	١١	١٢	12.5	11.1DE	
متوسط التركيز في		10.0b	12.7b	16.0a	16.2a		
C.krusei	اسيتوني	١٦	١١	١٢	١٤	13.3CD	13.0A
	ايثانولي	١٣	١٣	١٧	١٨	12.8DE	

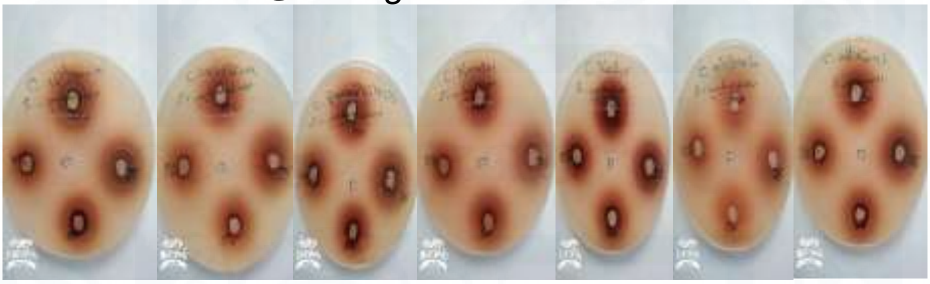
	مائي	١١	١١	١٤	١٥	12.8DE	
متوسط التركيز في		13.3ab	11.7b	14.3a	15.7a		
C.parapsilosis	اسيتوني	١٢	١٤	١٦	١٦	14.5BC	13.8A
	ايثانولي	١٠	١٢	١٦	٢٠	14.5BC	
	مائي	١٠	١٢	١٢	١٥	12.3DE	
متوسط التركيز في		10.7c	12.7bc	14.7b	17.0a		
C.incospicua	اسيتوني	١٢	١٤	١٧	١٨	15.3BC	14.7A
	ايثانولي	١٢	١٣	١٦	١٧	14.5BC	
	مائي	١٢	١٤	١٥	١٦	14.3BC	
متوسط التركيز في		12.0b	13.7b	16.0a	17.0a		
C.spherica	اسيتوني	١٠	١٢	١٥	١٦	13.3CD	16.4A
	ايثانولي	١٨	٢٢	٣٠	٣٢	25.5A	
	مائي	٨	١٠	١٢	١٢	10.5E	
متوسط التركيز في		12.0c	14.7b	19.0a	20.0a		

- **الحروف الكبيرة المتشابهة في العمود الواحد تعني عدم وجود فروقات معنوية بينها.**
- **الحروف الصغيرة المتشابهة في الخط الافقي تعني عدم وجود فروقات معنوية بينها.**



شكل (١) تأثير مستخلص قشور ثمار نبات الرمان السليمي *P. granatumvar.nana* على الخمائر

صورة رقم(٤) توضح تأثير المستخلص الاسيتوني لقشور ثمار نبات الرمان السليمي *P. granatumvar.nana* على الخمائر



صورة رقم (٥) توضح تاثير المستخلص الايثانولي لقشور ثمار نبات الرمان السليمي *P. granatumvar.nana* على الخمائر

صورة رقم (٦) توضح تأثير المستخلص المائي لقشور ثمار نبات الرمان السليمي *P. granatumvar.nana* على الخمائر

المركبات الكيميائية المعزولة بواسطة HPLC على الخمائر

استخدمت طريقة الانتشار في الحفر Agar-well diffusion method لقياس فعالية المركبات الفينولية وحسب (٣٠) فقد نشرت الخمائر في وسط Muller-Hinton Agar بأستخدام قطنة معقمة (Sterile Swab) وتركت لمدة ١٥ دقيقة ، وبعد ذلك عملت حفراً بقطر ٧ ملم بأستخدام ثاقب فليني معقم،واضيف ١٥٠ مايكروليتر من تلك المركبات لكل حفرة بأستخدام Pipete ثم حضنت الاطباق بدرجة حرارة (٣٧) لمدة ٢٤_٤٨ ساعة والجدول يوضح الفعالية التثبيطية لتلك المركبات وهي (qurtecin_Rutin_Ellagic acid_Gallic acid_Tannic acid) ومزيج تلك المركبات ضد الخمائر .المركب Tannic acid اظهر تأثيرا على جميع

الخمائر المستعملة في الدراسة حيث في خميرة *C.albicans*بلغ قطر التثبيط (١٠ملم) وفي خميرة *C.glabrata*(١٠,٥ملم) وفي خميرة *C.kyfer* بلغ(٩ ملم) وفي خميرة *C.Krusei* (١٠ملم) وفي خميرة *C.Parapsilosis*(١٢ ملم) وفي خميرة *C.incospicua*بلغ (١٢ ملم) وفي خميرة *C.Sphaericau*(١٠ملم) .

حيث إن التانينات تؤثر على طبيعة البروتينات في الجراثيم مما يؤدي الى قتلها إو ربما يؤثر على الغشاء البلازمي مغيرا بذلك خواصه الوظيفية مما يؤدي الى تثبيط نمو الجراثيم,(31,32) اما المركبات الفينولية Ellagic acid فقد اثر على خميرة *C.albicans*وبلغ قطر التثبيط (٩ ملم) وكذلك اثر على خميرة *C.Krusei*واظهر قطر تثبيط بلغ (١١ ملم) وكذلك اثر على خميرة *C.incospicua* وبلغ قطر التثبيط (١٠ ملم).اما المركب Gallic acid فلم يؤثر على خمائر *C.Krusei*و *C.Parapsilosis* و*C.Sphaericau*واثر على خميرة *C.albicans* وبقطر تثبيط (١١ملم) اما في خميرة*C.glabrata* فكان قطر التثبيط (١٣ملم) وفي خميرة *C.kyfer*بلغ قطر التثبيط (١٠ملم) وفي خميرة *C.incospicua* بلغ (١٤ملم). اما المركب Rutin فقد اثر فقط على خميرة *C.Krusei* وبلغ قطر التثبيط(١٠ملم).اما المركب qurtecin فكان مؤثرا فقط على خميرة *C.albicans* وهذه النتيجة متعارضة مع(33) .وتعمل بعض الفينولات مضادات اكسدة نظرا لأمتلاكها خصائص اخمادية وبالتالي تعمل كعوامل مختزلة إو مانحة للهيدروجين ولها قابلية على اخماد الجذور الحرة (34).اما الفلافونويدات فتعد مضادات اكسدة مهمة نظرا لأمتلاكها اليات عمل متنوعة (35) لعل اهمها:

١- تثبيط الانزيمات المسؤولة عن انتاج Superoxide anion مثل إنزيم Xanthine oxidase و Protein kinase فضلا عن قيامها بتثبيط الانزيمات المسؤولة عن توليد انواع الاوكسجين الفعالة(ROS) Reactive Oxygen Species

٢- إن عددا من الفلافونويدات يقوم بربط الفلزات الضئيلة (Trace metals) التي تلعب دورا هاما في ايض الاوكسجين

نظرا لأنخفاض جهد الاكسدة_الاختزال للفلافونويدات فأن الفلافونويدات (FL_OH) ثرموديناميكيا لها قابلية عالية على اختزال الجذور الحرة مثل Super oxidase و Oeroxyl و Alkoxyl و Hydroxyl وبذلك تعمل الفلافونويدات مانحات لذرة الهيدروجين .ان النتائج المستحصلة من هذه الدراسة تؤيد ماورد في دراسات سابقة فقد اشار (36) الى إن مستخلص قشور الرمان يتميز بأعطائه فعالية مضادة للاكسدة عالية وذلك في دراسة شملت (٦) انواع من النباتات واختير الرمان كأفضل مستخلص مضاد للأكسدة (٣٧). اما بالنسبة لعملية مزج المركبات فانها موضحة بالجدول حيث ان زيادة التثبيط عند المزج يؤيد ماذكره (٣٨) و (٣٩) في إن المركبات الفينولية تعمل بشكل ضعيف عندما تكون معزولة بشكل مفرد وإن فعاليتها تزداد عندما تتجمع معا اذ ان الفعالية للمركبات الفينولية ضد الخمائر والبكتريا تعود

الى مجموعة (OH السالبة) وإن هذه المركبات لها القابلية على الارتباط بالجزء الفعال من الانزيمات للخلية الفطرية والبكتيرية وبالتالي تعطيل الامتصاص الميكروبي والانزيمات والبروتينات الناقلة للغلاف الخلوي.

جدول رقم (٣) يوضح تأثير المركبات الكيميائية المعزولة بصورة نقية بواسطة HPLC على نمو الخمائر

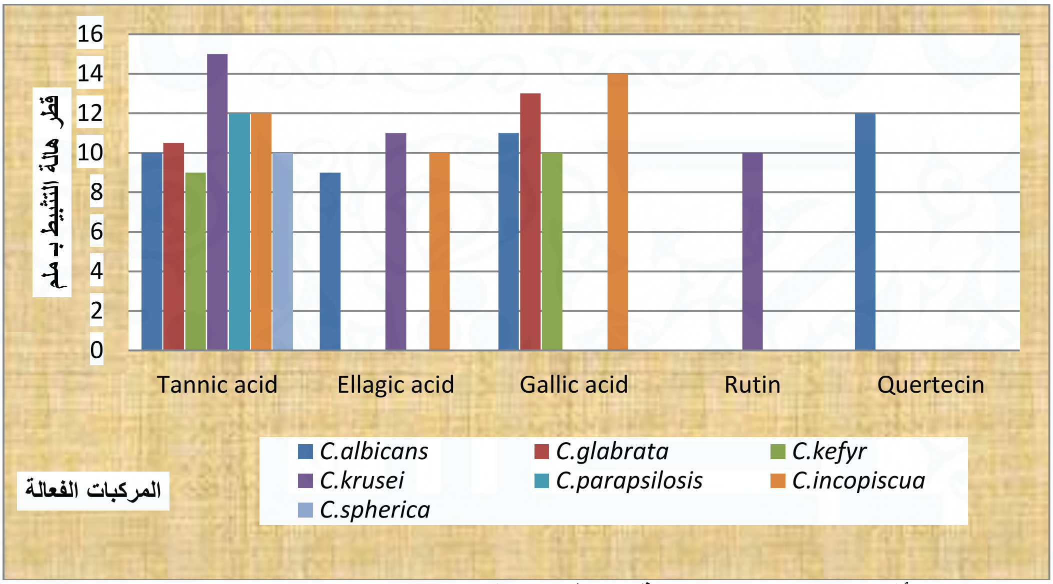
الخمائر	Tannic acid	Ellagic acid	Gallic acid	Rutin	Qurtecin
	قطر التثبيط (ملم)	قطر التثبيط (ملم)	قطر التثبيط (ملم)	قطر التثبيط (ملم)	قطر التثبيط (ملم)
1. *C. albicans*	10B	9A	11AB	—	12A
2. *C. glabrata*	10.5B	—	13A	—	—
3. *C. kefyr*	9B	—	10A	—	—
4. *C. krusei*	15A	11A	—	10A	—
5. *C. parapsilosis*	12AB	—	—	—	—
6. *C. incospicua*	12AB	10A	14A	—	—
7. *C. sphaerica*	10B	—	—	—	—

- **الحروف الكبيرة المتشابهة في العمود الواحد تعني عدم وجود فروقات معنوية بينها.**
- **الحروف الصغيرة المتشابهة في الخط الافقي تعني عدم وجود فروقات معنوية بينها.**

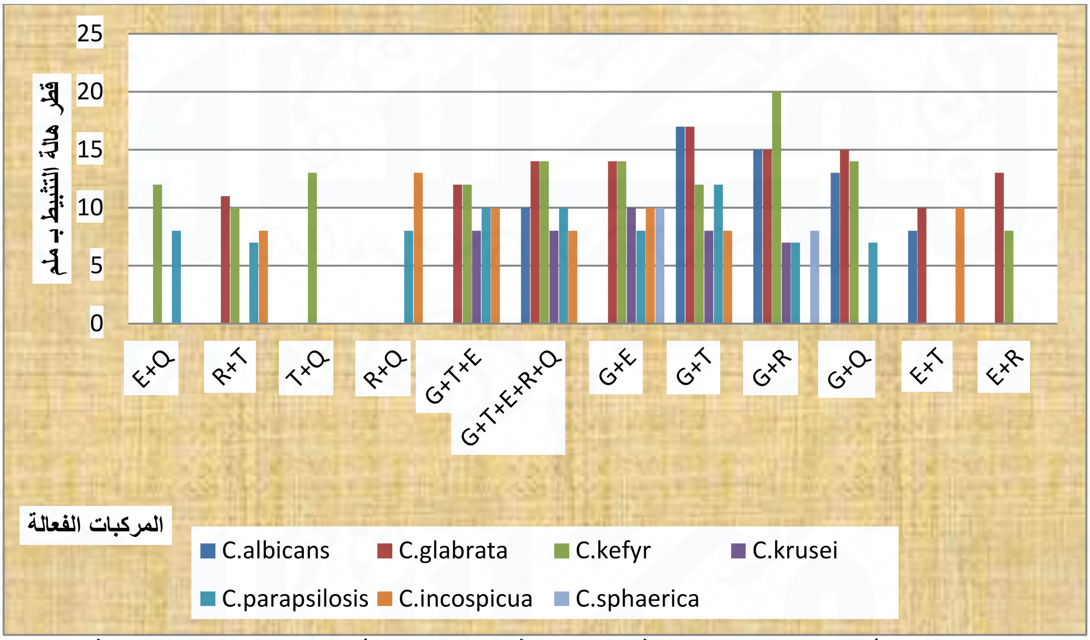
جدول رقم (٤) نتائج مزج المركبات الفعالة المعزولة من قشور الرمان بواسطة Hplc على نمو الخمائر

الخمائر							
C. albicans	***C. glabrata***	***C. kefyr***	***C. krusei***	***C. parapsilosis***	***C. incospicua***	***C. sphaerica***	المركبات
قطر التثبيط (ملم)	قطر التثبيط (ملم)	قطر التثبيط (ملم)	قطر التثبيط (ملم)	قطر التثبيط (ملم)	قطر التثبيط (ملم)	قطر التثبيط (ملم)	
—	—	12bc	—	8c	—	—	E+Q
—	11c	10cd	—	7c	8c	—	R+T
—	—	13bc	—	—	—	—	T+Q
—	—	—	—	8c	13ab	—	R+Q
—	12bc	12bc	8a	10bc	10bc	—	G+T+E
10c	13bc	14b	8a	10bc	8c	—	G+T+E +R+Q
—	15ab	14b	10a	8c	10dc	10a	G+E
17a	17a	12bc	8a	12ab	8c	—	G+T
15ab	15ab	20a	7a	7c	—	8b	G+R
13b	15ab	14b	—	7c	—	—	G+Q
8c	10c	10cd	—	—	10bc	—	E+T
—	13b	8d	—	—	—	—	E+R

- الحروف الكبيرة المتشابهة في العمود الواحد تعني عدم وجود فروقات معنوية بينها.
- الحروف الصغيرة المتشابهة في الخط الافقي تعني عدم وجود فروقات معنوية بينها.



شكل (٢) تأثير المركبات المعزولة من قشور ثمار نبات الرمان السليمي على بعض أنواع الخمائر الممرضة



شكل (٣) تأثير المركبات الفعالة المزدوجة على بعض أنواع الخمائر الممرضة

صورة رقم (٧) تأثير المركبات المعزولة بتقنية HPLC من قشور ثمار نبات الرمان السليمي على بعض أنواع الخمائر الممرضة

صورة رقم (٨) توضح تأثير المركبات الفعالة الممزوجة على بعض أنواع الخمائر الممرضة

المصادر References:

1. François, L. M. ; Duncan, w. and Bernhard, H. (2013). *Candidaalbicans* pathogenicity mechanisms. 4. (2). Pp: 119–128.
2. Kumar, M. B. and Edward, C.K. (2014). Robbins and Cotran Review of Pathology, Elisever. 6-7.
3. Monia, Ouederni, ; OzdenSanal. ; AydanIkinciog˘ ullari, IlhanTezcan. ; FigenDogum ; IthaisaSologuren, ; SigifredoPedraza-Sánchez, MelikeKeser, ; GonulTanir, and Chris Nieuwhof. (2014). Clinical Features of Candidiasis in Patients With Inherited Interleukin 12 Receptor β 1De ficiency. Clinical Infectious Diseases 58. (2). pp:204 – 13.
4. Al. hussainy, A. and Kadhim, M. (2014). Isolation and identification of dermatophytes fungi from under two year children in diaber location. 19. (3). 98-110 .

٥. كاظم، براء جواد (٢٠٠٨)، عزل وتشخيص الفطريات المسببة لاصابة الاذن الخارجية وحساسيتها للمضادات وبعض العوامل المساعدة ، رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، جامعة بغداد .

٦. محمد، نجوان عباس (٢٠١٢). التحري عن انواع المبيضات وبقية الممرضات المسببة لالتهاب المهبل لدى الساء اللاتي يستخدمن وسائل منع الحمل ، رسالة ماجستير كلية العلوم جامعة بغداد .

7. François, L. M. ; Duncan, w. and Bernhard, H. (2013). *Candidaalbicans* pathogenicity mechanisms. 4. (2). Pp: 119–128.

٨. حسين، فوزي طه قطب(١٩٨١). النباتات الطبية "زراعتها ومكوناتها". دار المريخ/مصر.

9. Ellen , J.B. ; Lance , R.P. and Sydney , M.F. 1994. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology , 9th ed. Mosby-year book , Inc. st – Louis , Missour , USA.
10. Hospenthal ,DR.; Beckius, ML.; Floyd, KL.; Horvath, LL and Murray, CK. (2006). Presumptive identification of Candida species other than C. albicans, C. krusei, and C. tropicalis with the chromogenic medium CHROMagar*Candida* 3(5). pp:1-10.
11. Al-Joboory, A. and Al-Rawi, M. (1994). Natural pharmacology. 1st ed. Baghdad , dar Al-Huriah .
12. Mitscher, L.A. ;Leu, R. ;Bathala, M.S. ;Beal, J.L. and White, R.(1972). Antimicrobial agents from higher plants . lioydia ; 35:157-166 .
13. Amani, T. (2012). Characterization of poly phenols in tunisian olive with anticancer capacity using liquid chromatography coupled to mass spectrometry , Doctoral thesis, university of Ezmir.

١٤. محمد،علي صادق. الموسوي، أنتصار حسين . (2007) . تأثير مستخلص أوراقنبا تحلق السبع الشجيري *Adhatodavasicia* ضد بعض أنواع البكتريا الملوثة للجروح بواسطة أستخدام أختبارالحساسية. مجلة أمسلمة للعلوم. 4 (١):47-54 .

15. Cletus, P. Kurtzman , Jack W. Fell ,(1998). The Yeasts, A Taxonomic Study,Fourth edition . New York . Oxford .
16. Bhavan, P.S. ; Rajkumar, R. ; Radhakrishnan, S. ; Seenivasan, C. and Kannan, S. (2010). Culture and identification of *Candida albicans*from vaginal ulcer and separation of enolase on SDS-PAGE. Inter. J. Bio. 2. (1). pp: 84-93.
17. David, E. ; Stephen, D. *et al*., (2007). Descriptions Of Medical Fungi, School Of Molecular & Biomedical Science University Of Adelaide, Australia, pp: 1- 240.
18. Nadeem, S. G. and Hakim, S. T. and Kazmi, S. U. (2010). Use of CHROMagar*Candida* for the presumptive identification of *Candida* species directy from clinical specimens in resource-limited setting. AjolLibian journal of medicine. Vol 5. (1). pp: 2-6.
19. Kumar, M. B. and Edward, C.K. (2014). Robbins and Cotran Review of Pathology, Elisever. 6-7.
20. Saroj, G.K., MallikaR.k., Sugatha,K., Vivek, H.,(2013).Speciation of *candida* using chromogenic and corn meal agar with determination of fluconazole sensitivity.

٢١. حبيب والسعدي(٢٠١٥). عزل وتشخيص بعض انواع خمائر ال *Candida Spp* ودراسة حساسيتها لبعض المضادات الفطرية. مجلة جامعة بابل للعلوم الصرفة والتطبيقية. ٣(٢٣).

22. Kais kassimGhaima, and Mohamad Ibrahim Nader Rami Ali Taqi(2013). Extraction and identification of phenol compounds from Bitter Melon *Momordicacharantia*fruits and their role as antioxidants. Journal of Biotechnology Research Center. Vol.7 No.1.
23. Al-Ghanimi, Ali AbdulkadhmJasim(2016). Extraction and Purification of Gallic Acid from *Eucalyptus camaldulensis*Leaves Journal of Babylon University/Pure and Applied Sciences/No.(9)/Vol.(24).

٢٤. علي إسماعيل عبيد، ورائد معلكحنون، ناهييوسفياسين، واثقستار عبد الحسين، حيدر راضي مالح. (٢٠١١). عزل الفينولات من بعض النباتات ودراسة فعالياتها المضادة للسرطان. المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية / الجامعة المستنصرية.

25. Hajoori, M.; Naik, M.; Naik, K. and Desai, S. (2014). Evaluation of antimicrobial activity of *Punicagranatum peel* extracts using different solvent system. *Internati. J. of Pharma. Screen. Method*. 4(1): 26-31.

26. Buwa LV, Staden JV: (2006). Antibacterial and antifungal activity of traditional medicinal plants used against venereal diseases in South Africa Journal of Ethnopharmacology 103:139-142.

٢٧. العاني، محمد قيس، عبد،، ادهام علي، تركي، احمد محمد (٢٠٠٣). تأثير بعض المستخلصات النباتية على نمو بعض الاجناس المرضيه البكتيرية والفطريه .مجله الانبار للعلوم الزراعية المجلد (1)، العدد (١):٨-١٣.

٢٨. السبهاني ، حازم صبار مطر (٢٠١٥). تأثير مستخلص نبات الـ *Panax ginseng* على بعض الاعفان و الخمائر المعزولة من اصابات مرضية مختلفة لبعض في مدينة بغداد . رسالة ماجستير ، كلية العلوم جامعة تكريت .

٢٩. زنكنه، شكريه علي محمد (2004).تأثير مستخلصات عدد من النباتات على نمو بعض انواع البكتريا المرضيه .رساله ماجستير، كليه انواع البكتريا المرضيه .رساله ماجستير، كلية العلوم، جامعة الانبار.

٣٠. الجابر ، غزوان طالب نوري (٢٠٠٨) . الفعالية ضد جرثومية لمستخلص أثنين من المركبات الفينولية لنبات السماق *Rhus*sp . مجلة أبحاث البصرة (العلميات) . العدد الرابع والثلاثون . الجزء الثاني . ص ٢٢-٣٢.

31. Sumner,M.D.,M.Flliott.eller,G.Weidner,J.J.Daubenmier,M.H.chew, R.Marlin,C. J .Raisin and D.Ornish.(2005) . Effect of pomegranate juice consumption my ocardial per Fusion in patients with coronary heart disease . Am J.cardio .96:810-814 .

32. Scalbert.A.(1991). Antimicrobial properties of tannins. Chemistry . 30:3875-3883.

33. Tiago, Carlos Alves, Isabel CFR Ferreira2, Lillian Barros2 , Sonia Silva, Joana Azeredol& Mariana Henriques, (2014). Antifungal activity of compounds identified in flowers from North Eastern Portugal against Candida species. Future Microbil. 9(2). 139-146.

34. Hakkim, F.L.;Arivazhagan, G. and Boopath, R.(2008). Antioxidant property of selected *Ocimum*species and their secondary metabolite content. J. Med. Plan. Res. 2: 250-25 .

35. Pietta , P. (2000). Flavonoids as antioxidants. J. Nat. Prod. 63, 1035 – 1042.

36. Vaya , J. ; Belinky , P. A. and Aviramm , M.(1997) . Antioxidant constituents from licorice roots: Isolation ,structure elucidation and antioxidant capacity toward LDL oxidation . Free Radical. Biol. Med. , 23(2) : 302-313.

37. Ghasemi, K.; Ghasemi, Y. and Ebrahimzadeh, M.A. (2009). Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues . Pak. J. Pharm. Scien.,.22 (3) : 277 – 281.

38. Aytul, Kareem Kan (2010). Antimicrobial and Antioxidant a ctivitiesof olive leaf extract and its` food applications .

GradueteSchoole of Enginering and Science of Izmir Technology. Master thesis.

٣٩. الاسدي، حنين عبد الامير، رمضان نجم عبد الله (٢٠١٥). الاستخلاص الكحولي لأوراق الزيتون العراقي وقياس فعاليتها المضادة للأكسدة والميكروبات. مجلة الانبار للعلوم البيطرية، المجلد (٨)،العدد (١).