دراسة فاعلية مادة البروبولس المحلي ضد نمو الانواع المختلفة لخميرة المبيضات في الزجاج

علي محمد غازي المحنة
كلية الطب البيطري /جامعة القادسية

الخلاصة

أجريت هذه الدراسة لمعرفة التأثير التثبيطي لكل من المستخلص الكحولي و المائي لمادة البروبولس المحلي على نمو الانواع التابعة لجنس المبيضات وهي (*C.albicans , C.tropicalis , C.krusei*) في الاطباق والانابيب الزرعية أظهرت النتائج ان للمستخلص الايثانولي لمادة البروبولس المحلي في جميع تراكيزه المستخدمة قيد الدراسة (٢٥ ، ٥٠ ، ٧٥ ، ١٠٠ ملغم/ مل) تأثيراً مثبطاً ملحوظاً على نمو الانواع السابقة الذكر وكان النوع *C. albicans* الاكثر تحسساً تلاها النوع *C.tropicalis* ثم النوع *C.krusei* في حين أظهر المستخلص المائي تأثيراً محدوداً في نمو الانواع الثلاثةسجل التركيز ١٠ ملغم / مل كأدنى تركيز مثبط للمستخلص الايثانولي للبروبولس على نمو الانواع الثلاثة لجنس المبيضات في حين سجل التركيز ٢٠ ملغم / مل كأقل تركيز قاتل له ضد نمو خميرة *C.albicans* والتركيز ٢٥ ملغم / مل ضد نمو خميرة كل من *C.tropicalis* و *C.krusei* في الانابيب الزرعية.

المقدمة

أحتلت نواتج النحل في الآونة الاخيرة حيزاً مهماً من أهتمام الاطباء والباحثين لما تتمتع به هذه المنتجات من قيمة غذائية عالية من جهه وفاعليات بايولوجية وعلاجية منوعة من جهه أخرى وتشمل هذه النواتج العسل والغذاء الملكي وسم النحل وحبوب الطلع والبروبولس(صملغ النحل) ويعد الاخير واحداً من اهم النواتج من الناحية الطبية والعلاجية لما يحتوية من مجاميع كيميائية فاعلة كالفلافونويدات والفينولات والتربينات وغيرها.البروبولس هو منتج طبيعي غير سام صمغي القوام متباين اللون يجمع من قبل شغالات نحل العسل من مصادر نباتية متنوعة واستخدم في الطب الشعبي منذ قرون (1).كلمة البروبولس مشتقة في الاصل من كلمتين أغريقيتين (pro) وتعني قبل و(polis) تعني المدينة فيكون معناها الكامل مقدمة المدينة أو الحصن اذ يستخدمة النحل في تضييق مداخل خلاياه خصوصاً في فصل الشتاء 2) .

(استخدم البروبولس من قبل الناس منذ زمن مبكر ولاغراض مختلفة خاصة في المجال الطبي والعلاجي بسبب خواصه المضادة للمايكروبات (3).أظهر البروبولس مداً واسعاً من الفاعليات البايولوجية كالفعل المطهر والخواص المضادة للالتهاب والفعل المضاد للمايكروبات المختلفة والفعل المضاد للطفيليات والفعل المضاد للاكسدة(4,2) أكثر من ٢١٠ مركب كيميائي مختلف تم عزله وتشخيصه من عينات البروبولس المختلفة لحد الان تنتمي الى مجاميع كيميائية مختلفة كالاحماض الاليفاتية والاحماض الاروماتية والاحماض الدهنية والكاربوهيدرات والالدهايدات والكيتونات والكاليكونات والاسترات و الاحماض الامينية والتربينات (4) والفيتامينات ومواد اخرى غير عضوية (5).هدفت الدراسة الحالية الى تقييم فاعلية مادة البروبولس المحلي في تثبيط نمو عدد من الانواع التابعة لجنس المبيضات في الزجاج.

المواد وطرائق العمل

العزلات المستخدمة

في هذه الدراسة استخدمت ١٢ عزلة من خميرة *C.albicans* و ١٠ عزلات لكل من *C.tropicalis* و *C.krusei* تم الحصول عليها من المختبر المركزي في مستشفى الديوانية التعليمي والمعزولة من خمجات مختلفة شخصت وحفظت في اكار مائل من وسط السابرويد دكستروز بدرجة حرارة الثلاجة لحين الاستخدام.

تحضير المستخلص الايثانولي والمائي للبروبولس

جمعت مادة البروبولس المحلي من مناحل مدينة الديوانية خلال شهري تشرين الاول والثاني ، طحنت بإستعمال المطحنة الكهربائية ثم تم تحضير المستخلص الايثانولي والمائي للبروبولس وذلك بأضافة ٢٠ غم من البروبولس المطحون الى ١٢٠ مل من الايثانول (٧٠%) لغرض الحصول على المستخلص الايثانولي أو في الماء لغرض الحصول على المستخلص المائي وترك الخليط مدة أسبوع على أن يرج يومياً لعدة دقائق ، رشح الخليط بإستعمال ورق ترشيح نوع Whatman No.1 وبخر الراشح بجهاز المبخر الدوار بدرجة حرارة ٤٠ ° م لحين الحصول على المستخلص ، حضر منه ٤ تراكيز متدرجة بإستعمال مادة الاثيلين كلايكول هي ٢٥ ، ٥٠ ، ٧٥ ، ١٠٠ ملغم / مل ولكل من المستخلص الايثانولي والمائي لمادة البروبولس.

أختبار حساسية الخمائر لمستخلصات البروبولس

تم أختبار فاعلية المستخلص الايثانولي والمائي للبروبولس المحلي بطريقة الاقراص الورقية إذ تم أختيار ورق الترشيح Whatman No.3 لهذا الغرض وعمله بشكل أقراص ورقية بقياس ٦ ملم بعدها تم تحميلها بالتراكيز المختلفة للمستخلص الايثانولي والمائي للبروبولس ، في الوقت نفسه تم تحضير العالق الخميري وذلك بنقل ٥ – ١٠ مستعمرات خميرية من وسط السابرويد دكستروز الصلب المحضر سابقاً الى وسط السابرويد دكستروز السائل وحفظ في الحاضنة

بدرجة حرارة ٢٨ ° م لمدة ١٨ ساعة بعدها تم مقارنة النمو بالمرق المحضر مع محلول ماكفرلند القياسي الذي يعتمد على درجة تعكر العالق الفطري في حساب عدد الخلايا الخميرية المتوقعة في ١ مل من العالق إذ تم عد الخلايا الفطرية مقارنة الى الانبوب رقم (٢) الحاوي على ٣ × ١٠^٨ خلية / مل وبإستخدام مسحة قطنية معقمة تم أخذ جزء من المرق الخميري المحضر وزراعته على سطح طبق فحص الحساسية إذ تم تدوير سطح الطبق بزاوية ٦٠ ° ولثلاثة مرات مع المسح على سطح الطبق وذلك لضمان أنتشار الزرع بصورة متساوية على سطح الطبق ، ترك ليجف بالحاضنة مدة ١٥ دقيقة بعدها تم وضع الاقراص الورقية المحملة بتراكيز البروبولس على سطح طبق فحص الحساسية ، حضنت الاطباق بدرجة حرارة ٢٨ ° م مدة ١٨ ساعة ثم تم قياس أقطار تثبيط النمو محسوبة بالملم.

أختبار MIC و MBC

حضر ١٢ تخفيف متسلسل للمستخلص الايثانولي لمسحوق البروبولس بإستخدام المرق المغذي وكالاتي ٢.٥ ، ٥ ، ٧.٥ ، ١٠ ، ١٢.٥ ، ١٥ ،١٧.٥ ، ٢٠ ، ٢٢.٥ ، ٢٥ ، ٢٧.٥ ، ٣٠ ملغم / مل ، أضيف لكل أنبوب ٠.١ مل من العالق الفطري والحاوي على ٣ ×١٠^٨ خلية / مل مع تحضير أنبوبة حاوية على المرق المغذي فقط ممثلة سيطرة (١) وانبوبة حاوية على مستخلص البروبولس فقط ممثلة سيطرة (٢) وتعاد التجربة في حالة عدم ظهور عكورة في سيطرة (١) او ظهورها في سيطرة (٢) ، تم حضن الانابيب بدرجة حرارة ٣٧ ° م مدة ٤٨ ساعة وحدد التركيز المثبط الادنى بإنه اقل تركيز من المستخلص يمنع نمو واضح للخميرة ، في الوقت نفسة حدد التركيز القاتل الادنى على أنه أقل تركيز من المستخلص يمنع نمو الخميرة بنسبة ٩٩.٩% .

النتائج

بينت النتائج إن للمستخلص الايثانولي لمادة البروبولس المحلي تأثيراً مثبطاً ملحوظاً على نمو أنواع الخميرة التابعة لجنس المبيضات المستخدمة قيد الدراسة مع تباين هذا التأثير أعتماداً على نوع الخميرة . إذ كانت خميرة *C.albicans* الأكثر تحسساً لتخافيف المستخلص وأعطت قطراً من تثبيط النمو مقدارها ٩.١±0.8 ، ١٠.٣±١ ، 12.2 ±1.1، 14.7±0.7 ملم عند التراكيز ٢٥ ، ٥٠ ، ٧٥ ، ١٠٠ ملغم / مل على التوالي تلتها خميرة *C.tropicalis* التي أعطت قطراً من تثبيط النمو مقدارها ٨.٢±0.5 ، 9.1 ±٠.٧، ١١ ±0.9، ١٢ ±0.٤ملم عند التراكيز ٢٥ ، ٥٠ ، ٧٥ ، ١٠٠ ملغم / مل على التوالي في حين كان النوع *C.krusei* أقل تأثيراً واعطت أقطاراً من تثبيط النمو ٨ ±0.4، ٩.٢±٠.٨ ، ١٠.٥±0.3 ، ١١.١±٠.٧ ملم عند التراكيز ٢٥ ، ٥٠ ، ٧٥ ، ١٠٠ ملغم / مل على التوالي (جدول ١).كما يبين الجدول نفسه ان للمستخلص المائي لمادة البروبولس المحلي تأثيراً محدوداً على نمو الانواع الثلاثة لخميرة المبيضات إذ كان قطر تثبيط النمو للنوع *C.albicans* ٧ ، ٩.١ ±0.8ملم عند التراكيز ٧٥ ، ١٠٠ ملغم/ مل على التوالي في حين لم تكن لتراكيز المستخلص المائي اي تأثير على النوعين *C.tropicalis* و *C.krusei* فيما عدا التركيز ١٠٠ ملغم / مل الذي اعطى قطراً من تثبيط النمو مقداره ٨± 0.9، ٨.٢ ± ٠.٧ملم على التوالي فيما لم يكن للاثيلين كلايكول تأثيراً يذكر على نمو الانواع الثلاثةسجل التركيز ١٠ ملغم / مل كأقل تركيز مثبط للمستخلص الايثانولي للبروبولس على نمو الانواع الثلاثة التابعة لجنس المبيضات في حين سجل التركيز ٢٠ ملغم / مل كأقل تركيز قاتل لنمو خميرة *C.albicans* والتركيز ٢٥ ملغم / مل لنمو كل من خميرة *C.tropicalis* و *C.krusei* في الانابيب (جدول ٢).

جدول (١) تأثير المستخلص الايثانولي والمائي للبروبولس المحلي على تثبيط نمو انواع من خميرة المبيضات في الاطباق الزرعية

التركيز (ملغرام/مل)	المستخلص الايثانولي			المستخلص المائي		
	C.albicans	*C.tropicalis*	*C.krusei*	*C.albicans*	*C.tropicalis*	*C.krusei*
٢٥	٩.١±٠.٨	٨.٢±٠.٥	٨±٠.٤	–	–	–
٥٠	١٠.٣±١	٩.١±٠.٧	٩.٢±٠.٨	–	–	–
٧٥	١٢.٢±١.١	١١±٠.٩	١٠.٥±٠.٣	٧	–	–
١٠٠	١٤.٧±٠.٧	١٢±٠.٤	١١.١±٠.٤	٩.١±٠.٨	٨±٠.٩	٨.١±٠.٧
الاثيلين كلايكول	–	–	–	–	–	-

– تعني لا يوجد قطر تثبيط

جدول(٢) تأثير المستخلص الايثانولي للبروبولس المحلي على نمو انواع من خميرة المبيضات في الانابيب

التركيز (ملغرام / مل)	المستخلص الايثانولي		
	C.Albicans	*C.tropicalis*	*C.krusei*

٢.٥	−	−	−
٥	−	−	−
٧.٥	−	−	−
١٠	+	+	+
١٢.٥	+	+	+
١٥	+	+	+
١٧.٥	+	+	+
٢٠	++	+	+
٢٢.٥	++	+	+
٢٥	++	++	++
٢٧.٥	++	++	++
٣٠	++	++	++

− فعل غير مؤثر + فعل مثبط للخميرة ++ فعل قاتل للخميرة

المناقشة

تبين من نتائج الدراسة الحالية ان لكل من المستخلص الايثانولي والمائي لمادة البروبولس المحلي تأثيراً على نمو الخميرة التابعة لجنس المبيضات المستخدمة في الدراسة الحالية مع اختلاف هذا التأثير اعتماداً على نوع المستخلص ، نوع الخميرة والتركيز المستخدم.فقد اظهرالمستخلص الايثانولي لمادة البروبولس المحلي فعلاً مميزاً في تثبيط نمو جميع العزلات التابعة للانواع الثلاثة لجنس المبيضات التي استخدمت في هذه الدراسة وكان النوع *C.albicans* الاكثر تأثراً لتراكيز المستخلص تلاها النوع *C.tropicalis* ثم النوع *C.krusei* الا إن هذا التفاوت في التأثير بين الانواع الثلاثة لم يكن مهماً من الناحية الاحصائية وعند مستوى احتمالية ٠.٠٥ هذه النتائج عززت دراسات سابقة بهذا الصدد على الرغم من أختلاف مصدر البروبولس والتي أشارت الى مقدرة البروبولس في تثبيط نمو الفطريات المرضية وخصوصاً جنس المبيضات في الزجاج والحي (6,7,8,9).إن الفعل المؤثر الذي ابداه المستخلص الايثانولي للبروبولس ضد خميرة المبيضات يشير الى المركبات الفاعلة المتنوعة الموجودة في مادة البروبولس المحلي والتي يمكن استخلاصها بإستخدام مادة الايثانول فقد ذكر(10) ان فعل البروبولس المضاد للمايكروبات يأتي من وجود المركبات القطبية Polar compounds خصوصاً الفينولات والفلافونويدات واستراتها واشار الباحث Cafarchia وجماعته الى ان لمركبات Cinammic acid والفلافونويدات الدور الرئيسي في الفعل المضاد للفطريات لمستخلصات البروبولس (7).إن ميكانيكية عمل مادة البروبولس ضد الفطريات وباقي الاحياء المجهرية غير معروفة على وجه الدقة ،الباحثان Takaisi-Kikuni و Schilcher لاحظا في دراستهم على مادة البروبولس وبإستخدام المجهر الالكتروني ان عملية الانقسام الخلوي للمايكروبات تتوقف بوجود مستخلص البروبولس وأقترحا ان للمركبات الفعالة في مادة البروبولس القدرة على تثبيط انقسام مادة DNA والتي تؤدي الى أيقاف عملية الانقسام الخلوي للمايكروبات (11). كما لوحظ ان هناك علاقة طردية بين تراكيز المستخلص المختلفة المستخدمة في الدراسة ومعدل قطر تثبيط نمو الخمائر والذي يعزى في الغالب الى زيادة المادة او المواد المثبطة لنمو الخميرة بزيادة التركيز المستخدم.كما لوحظ ان للمستخلص المائي لمادة البروبولس المحلي تإثيراً محدوداً على نمو انواع خميرة المبيضات ولم تظهر التراكيز حتى ٧٥ ملغم/مل اي فعالية تذكر ويعزى السبب في ذلك الى محدودية الماء في استخلاص المركبات الطبية الفعالة ضد نمو الفطريات بصورة عامة فقد ذكر Harborne ان للماء القدرة على اذابة عدد من المركبات الفعالة كالفينولات وعدد محدود من الكلايكوسيدات والفلافونويدات (12).

المصادر

1.Burdock,G.A.(1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. Food Chem..Toxicol.36:347-363.

2.De-Almedia,E.C. and Menezes,H. (2002).Anti-inflammatory activeity of propolis extract.J. Venom.Anim.Toxins.8:140-156.

3.Crane,E.(1997).Bees and beekeeping: Science Practical and World Resources.Cornstock puib. USA.PP593.

4.Marcucci,M.C.(1995). Propolis:chemical composition, biological properties and therapeutic activity. Apidologie.26:83-99.

5.Nikolaev,A.B.(1978).Remarkable hive product:propolis scientific data and suggessions concerning its composition, properties and possible use in therapeutics. Apimondia.Bucharest.

6.Kujamgiev,A.;Tsvetkova,I.;Sevkedjieva, Y.;Bankova,V.; Chiristov, R. and Popov,S.(1999). Antibacterial , antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin.J.Ethnopharmacol.64:235-240.

7.Cafarchia,C.;Milillo,M.;Losacco, V. and Puccini,V. (1999). Antifungal activity of Apulia region propolis. Parasitologia.41:587-590.

8.Ota,C.;Unterkircher,C.;Fantinato,V. and Schimizu,M.(2001).Antifungal activity of propolis on different species of candida. Mycoses. 44: 375-378.

9.Sforcin,J.M.;Junior,A.F.;Lopes,C.A.;Fun ari,S.R. and Bankova, V. (2001). Seasonal effect of Brazilian propolis on *Candida albicans* and *Candida tropicalis*.J. Venom. Anim. Toxins.7:139-144.

10. Ghislberti, E.L. (1960). Propolis: a review. Bee World.60:59-84.

11. Takaisi-Kikuni,N.B. and Schilcher,H. (1994).Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. Planta. Med.60:222-227.

12. Harborne,J.B.(1973).Phytochemical Methods.Science Paper Backs. Chapman and Hall.

Study of local propolis activity against growth of different species of candida in vitro

A.M. Gh.Al-mohana
Coll.of Vete.Med./ Univ.of AL-Qadisyia

Abstract

This study was designed to investigate the inhibitory effects of ethanolic and aqueous extract of local propolis substance on growth of some species of candida (*C.albicans* , *C.tropicalis* , *C.Krusei*).The result indicated that the ethanolic extract of local propolis in all concentration used in present study (25,50,75,100 mg / ml) had noticeable effect on the growth of candida species, *C.albicans* was more sensitive followed by *C.tropicalis* then *C.krusei* while aqueous extract showed limited effect on growth of candida species.The result indicated that the MIC of ethanolic extract of propolis was 10mg/ml for allcandida species used in present study while MBC was 20 mg/ml for *C.albicans* and 25 mg/ml for each *C.tropicalis* and *C.Krusei* in tubes.