تاثير المستخلص الزيتي لاوراق حشيشة الليمون Cymbopogon citratus في نمو الخمائر والبكتريا المعزولة من افواه الاطفال المصابين بداءالسلاق الفمي

عصام فاضل الجميلي* ؛ خالد عبد الرزاق حبيب و سرى مؤيد عبد المجيد****

* فرع التقنية الاحيائية، معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الاحيائية، جامعة بغداد.

** قسم علوم الحياة ، كلية العلوم للبنات، جامعة بغداد.

الخلاصة

جمعت 120 عينة من افواه الاطفال المصابين بداء السلاق الفمي والذين تراوحت اعمارهم بين حديثي الولادة ولغاية 10 سنوات للمدة بين شهر حزيران 2004 حتى كانون الاول 2004 .

شخصت خمسة انواع عائدة لجنس المبيضات هي Candida albicans و C.tropicalis و C.kefyr و C.glabrata و C.guillermondii وستة انواع بكتيرية وهي Staphylococcus aureus و S.epidermidis و Streptococcus pyogenes و S. pneumoniae و Escherichia coli و Klebsiella spp. .

استخلص زيت حشيشة الليمون بطريقة التقطير المائي Hydrodistillation ، واستخدمت طريقة الانتشار بالحفر Agar Well Diffusion Method لدراسة تاثير المستخلص الزيتي لحشيشة الليمون في تثبيط نمو الخمائر والبكتريا المعزولة، اذ بلغت اعلى نسبة تثبيط 100% للمستخلص الزيتي عند التركيز 20% لجميع انواع المبيضات المعزولة في حين تفاوتت نسب التثبيط بالنسبة للبكتريا عند هذا التركيز حيث بلغت 35.7% و34.5% و 28.3% ضد البكتريا Staphylococcus aureus و Streptococcus pyogenes و Escherichia coli على الترتيب.

المقدمة

رغم التقدم العلمي الذي حدث في علم الكيمياء والذي فتح الطريق لتصنيع الكثير من العقاقير والمواد الكيمياوية التي تدخل في صناعة الأدوية إلا ان للمستخلصات النباتية خصوصية وأفضلية في هذا المجال فالنبات الواحد يحتوي اكثر من مادة فعالة تعمل مع بعضها في صيغة من التكامل والتوازن لعلاج المرضى وهذه الميزة لا تتوفر في العقاقير المصنعة مختبرياً فضلاً عن تأثيراتها الفسيولوجية العالية، كما ان للمواد الكيمياوية تأثيرات جانبية عند الاستخدام المتكرر والتي لا تظهر آنياً بل بعد مدّة طويلة من استخدام الدواء [1].

حشيشة الليمون نبات عشبي معمر Perennial عائد الى العائلة النجيلية Graminaceae، عطر الرائحة، يكثر انتشاره في المناطق الاستوائية وشبه الاستوائية من آسيا كما يزرع في امريكا الجنوبية وافريقيا[2].

استخدم نبات حشيشة الليمون لعلاج العديد من الامراض كالروماتيزم وعرق النسا وبعض حالات الصلع[3]، واستخدم هذا النبات ايضاً كمادة معطرة وطاردة للغازات والديدان المعوية ومعالجة حالات الزكام والدزنتري والام الرأس فضلاً عن كونهِ عقاراً مهدئاً للاعصاب [4]، كما اجريت العديد من الدراسات لمعرفة تأثير الزيت الطيار لنبات حشيشة الليمون في تثبيط نمو الخمائ ر والبكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام[5و4].

اجريت هذه الدراسة لمعرفة تاثير المستخلص الزيتي لنبات حشيشة الليمون في تثبيط نمو الخمائر والبكتريا المعزولة من افواه الاطفال المصابين بداءالسلاق الفمي (Oral candidiasis) الناتجة من الاصابة الاغشية المخاطية المبطنة للفم بالفطريات التي تسببها الانواع التابعة لجنس المبيضات من نوع C.albicans.

المواد وطرائق العمل

شملت الدراسةُ الحالية جْمعَ 120 مس ــحةً فميةً (Oral Swab) من أطفال يعانون من التهابات فمي ة والمراجعون للعيادة الاستشارية لمستشفى أطفال العلوية في محافظة بغداد تتراوح أعمارهم بين حديثي الولادة (اقل من سنة) ولغاية 10 سنوات ولفترة من شهر حزيران 2004 حتى كانون الاول 2004 ، وتحت أشراف أطباء

اختصاص، كما أخذت 30 مسحة فمية من أطفال اصحاء (غير مرضى) بوصفها مجموعة سيطرة . زرعت العينات مباشرة بعد نقلها الى المختبر على اربعة اوساط زرعية صلبة هي وسط خلاصة الشعير Malt Extract Agar (MEA) لتنمية عزلات جنس المبيضات .Candida spp فضلاً عن زرعها على وسط آكار الدم ووسط أكار الماكونكي لتنمية عزلات البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام واكار الجوكليت لتنمية العزلات البكتيرية الموج بة اللاهوائية بوجود 5–10 % ثاني اوكسيد الكاربون باستخدام طريقة التخطيط Streaking لضمان الحصول على مستعمرات نقية منفردة وحضنت جميع الاطباق التي تم زراعتها بدرجة حرارة 37م^0 مدّة 24–48 ساعة.

تشخيص عزلات الخمائر

شخصت العزلات مبدئياً اعتماداً على المظهر الخارجي للمستعمرات المتمثل بالحجم واللون والشكل وارتفاع حافات المستعمرات على الوسط الزرعي حسب ماجاء في Buckley [6] ثم درست صفات الخلايا مجهرياً بعمل شريحة زجاجية لمستعمرة نقية مع قطرة من المحلول الفسيولوجي وغطيت بغطاء الشريحة وفحصت بالمجهر الضوئي. كما تم اجرى الاختبارات الكيموحيوية وفقا طريقة الموصوفه من قبل[6].

الاختبارات الكيموحيوية : اجريت وفقا للطرائق الموصوفة في [6 و 7 و 8].

1- اختبار تكوين انبوب الانبات

اجري هذا الاختبار بتلقيح انابيب اختبار صغيرة حاوية على 0.5 مليلتر مصل دم انسان بجزء صغير من مستعمرة المبيضات ، وحضنت الانابيب مدّة 2–3 ساعات بدرجة حرارة 37م^o ثمّ أُخذت قطرة من العالق ووضعت على شريحة زجاجية نظيفة وفحصت بالمجهر الضوئي لملاحظة تكون انبوب الانبات[8,7].

2- اختبار تكوين الابواغ المتدثرة

أجري هذا الاختبار للتحري عن قدرة الخميرة لتكوين الابواغ المتدثرة والخيوط الفطرية الكاذبة بطريقة الزرع على الشريحة الزجاجية، حضر طبق بتري زجاجي حاوٍ ورقة ترشيح وقضيباً زجاجياً بشكل حرف V وشريحة زجاجية، وعقم الطبق ومحتوياته بالفرن الحراري بدرجة حرارة 180م^o مدّة 1–2 ساعة، نشرت بضع قطرات من وسط آكار طحين الذرة المعقم مع 80 Tween على الشريحة الزجاجية المعقمة، ولقح الوسط بعمل ثلاثة شقوق متوازية على سطح الاكار بجزء صغير من مستعمرة الخميرة وغطي بغطاء الشريحة المعقم ، وأُضيف بضع قطرات من الماء المقطر المعقم على ورقة الترشيح للمحافظة على الرطوبة وحضنت الاطباق بدرجة حر ارة 28مْ مدّة 48–72 ساعة [8 و 12].

3- اختبار تخمر الكاربوهيدرات(السكريات)

حضرعالق الخميرة بتلقيح 5 مليلتر من محلول ملحي فسيولوجي بمستعمرة الخميرة النامية مدّة 24 ساعة، اضيف الى الانابيب الحاوية وسط التخمر ، 0.5 مليلترمن المحاليل السكرية بشكل منفصل ، لقحت الا نابيب باضافة 0.2 مليلترمن عالق الخميرة وحضنت مدّة 24–48 ساعة بدرجة حرارة 28م^o، تمثلت النتيجة الموجبة بتغير لون الوسط الارجواني الى الاصفر مع تكون غاز في انبوب درهام.

4- اختبار تمثيل الكاربوهيدرات(السكريات)

حضر عالق الخميرة كما ورد في الفقرة السابقة ، صب وسط تمثيل الكاربوهيدرات في اطباق بتري وترك ليتصلب، لقح الوسط بعالق الخميرة المحضر باستخدام مسحة قطنية معقمة، وتركت الاطباق لتجف ثم عمل حفر في الوسط باستخدام ثاقب فليني معقم، وأُضيف 0.1 مليلتر من المحاليل السكرية في كل حفرة، حضنت الأطباق بدرجة حرارة 28م^o مدّة 24–48 ساعة، وسجلت النتيجة الموجبة بتغير لون الوسط البنفسجي الى اللون الاصفر مع ظهور نمو كثيف حول الحفر الحاوية المحلول السكري

5- اختبار النمو السطحي

أُجري هذا الاختبار بتلقيح أنابيب اختبار نظيفة حاوية وسط خلاصة الشعير السائل بجزء من مستعمرة الخميرة وحضنت الاطباق بدرجة حرارة 28 م^o مدّة 24 ساعة، واُستخدم هذا الاختبار لملاحظة النمو السطحي

تشخيص عزلات البكتريا

بعد ظهور النمو على وسط اكار الدم ووسط اكار الماكونكي واكار الجوكليت، درست الصفات المظهرية للمستعمرات البكتيرية النامية والمتمثلة بالحجم واللون والشكل وقابلية المستعمرات لتخمير سكر اللاكتوز في وسط

اكار الماكونكي وتحليل الدم في وسط آكار الدم، كما درست صفات الخلايا مجهرياً بتصبيغها بصبغة كرام للتعرف على شكل الخلايا وطبيعة اصطباغها بصبغة كرام كما شخصت الانواع البكتيريـــة المختلفة اعتماداً على طرائق التشخيـــص المختلفة الواردة في [8 و9 و10 و11 و12].

أ- البكتريا الموجبة لصبغة كرام

أختبار انزيم الكاتليز

اجري هذا الاختبار بنقل جزء من مستعمرة البكتريا الى شريحة زجاجية نظيفة حاوية قطرة من المحلول الفسيولوجي ومزجهما معاً ثمّ أُضيف اليه قطرة من محلول بيروكسيد الهيدروجين تركيزه 3%، وعُدّ ظهور فقاعات غازية نتيجة موجبة للفحص ودليلاً على قدرة البكتريا لأنتاج انزيم الكاتليز الذي يحفز تحرير غاز الاوكسجين (O_2) من تحليل الجذر السام لبيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) .

إختبار انزيم التجلط

اجري الفحص بطريقتين

طريقة الشريحة الزجاجية

مزج جزء من المزروع البكتيري مع قطرة من المحلول الملحي الفسلجي الموضوع على شريحة زجاجية ثم اضيف قطرة من البلازما ومزج مع المستعمرة البكتيرية، ظهور التجلط بعد 5-10 ثواني دليل على ايجابية الفحص وقد قورنت النتائج مع السيطرة الحاوية على قطرة من المحلول الفسلجي و المزروع البكتيري فقط.

طريقة الانابيب

اجري هذا الاختبار بنقل 0.1 مليلتر من المزروع البكتيري المنمى في الوسط المغذي السائل بدرجة حرارة 37م° مدّة 24 ساعة الى إنبوب إختبار ثمّ إضيف 0.5 مليلتر من بلازما دم إنسان، حضن بدرجة حرارة 37 م° مدّة 4 ساعات مع مراعاة الفحص كل ساعة كما تركت الأنابيب ذي النتيجة السالبة مدّة 24 ساعة بدرجة حرارة الغرفة لملاحظة البكتيريا المنتجة للخثرة ببطىء وقد قورنت النتائج مع انبوبة السيطرة الحاوية على المحلول الفسلجي والعالق البكتيري فقط.

النمو على وسط المانيتول الملحي

تم تلقيح الوسط بالمزروع البكتيري وحضن مدّة 24 ساعة بدرجة حرارة 37م°، وتتمثل النتيجة الموجبة بتغير لون الوسط الى الاصفر الذهبي نتيجةً لتخمير سكر المانيتول.

انتاج الانزيم الحال للدم

زرعت العزلات البكتيرية على وسط اكار الدم ثمّ حضنت الاطباق بدرجة حرارة 37م° مدّة 24 ساعة، بعدها لوحظت مناطق التحلل حول المستعمرات النامية هل تحلل كامل نوع بيتا β اوجزئي نوع الفا α او عدم وجود اي تحلل.

اختبار الحساسية للباستراسين

اجري الفحص بوضع قرص الباستراسين على وسط اكار الدم بعد نشر عالق البكتريا المراد فحصها ، حضنت الاطباق بدرجة حرارة 37م° وبوجود 5-10% ثاني اوكسيد الكاربون مدّة 24-48 ساعة، وسجلت النتيجة الموجبة بتثبيط نمو البكتريا حول القرص وبقطر لا يقلّ عن 12 مليمتر.

اختبار الحساسية للاوبتوكين

أُجري الفحص بوضع قرص الاوبتوكين الى وسط اكار الدم بعد نشر عالق البكتريا المراد فحصه على الوسط، حضنت الاطبـــاق مـــدّة 24-48 ساعة بدرجـــة حرارة37م° وبوجود 5-10 % ثاني اوكسيد الكاربون ، وسجلت النتيجة الموجبة بتثبيط نمو البكتريا حول القرص وبقطر لا يقل عن 15 مليمتر.

ب- لبكتريا السالبة لصبغة كرام

الكشف عن انتاج الاندول

لقحت الانابيب الحاوية وسط الببتون بالمزروع البكتيري ثم حضنت مدّة 24 ساعة بدرجة حرارة 37م°، وعند انتهاء مدّة الحضن أُضيف عدة قطرات من كاشف كوفاكس الى كل انبوب مع الرج الجيد، ظهور حلقة حمراء في اعلى الوسط يدل على النتيجة الموجبة

اختبار احمر المثيل

جري هذا الاختبار بتلقيح الانابيب الحاوية على الوسط الزرعي (MRVP) بالمزروع البكتيري، حضنت الانابيب بدرجة حرارة 37م° مدّة 48-72 ساعة وبعد إنتهاء مدّة

الحضن اضيف 5 قطرات من كاشف احمر المثيل لكل انبوب مع الرج، ظهور اللون الاحمر مباشرةً دلّ على النتيجة الموجبة بالتحلل الكامل للسكريات وانتاج الحامض.

اختبار الفوكس بروسكور

لقح الوسط الزرعي (MRVP) بالمزروع البكتيري وحضن بدرجة حرارة 37م^{o} مدّة 48 –72 ساعة، ثمّ أُضيف 1 مليلتر من محلول هيدروكسيد البوتاسيوم KOH بتركيز 40 % و3 مليلتر من محلول α-Naphthol بتركيز 5 % الى كل انبوب مع الرج، ظهور اللون الوردي خلال 2–5 دقائق ثم يصبح غامقاً خلال 30 دقيقة يدل على النتيجة الموجبة.

اختبار استهلاك السترات

لقح وسط السترات المائل بالمزروع البكتيري وحضن مدّة 24–48 ساعة بدرجة حرارة 37م^{o} ، تحول لون الوسط الأخضر الى الأزرق وظهور النمو على خطوط الزرع يدلّ على النتيجة الموجبة.

الكشف عن كبريتيد الهيدروجين

أُجري الكشف بتلقيح وسط Kligler's Agar بالمزروع البكتيري وحضن مدّة 24 ساعة بدرجة حرارة 37م^{o} ، تحول لون الوسط الأحمر الى الأصفر وتكون راسب اسود يدلّ على النتيجة الموجبة.

الكشف عن انزيم اليوريز

تم الكشف عن هذا الانزيم بتلقيح وسط اليوريا المائل بالمزروع البكتيري وحضن مدّة 24 ساعة بدرجة حرارة 37م^{o}، ظهور اللون الوردي يدل على النتيجة الموجبة.

اختبار قابلية الحركة

لقحت الانابيب الحاوية الوسط نصف الصل ب بالمزروع البكتيري وحضنت مدّة 24–48 ساعة بدرجة حرارة 37م^{o}، إنّ انتشار النمو خارج حدود الطعنة يدل على النتيجة الموجب.

اختبار تخمر السكريات

لقحت الأنابيب الحاوية وسط تخمر السكريات بالمزروع البكتيري ثم حضنت مدّة 24–48 ساعة بدرجة حرارة 37م^{o}، تحول لون الوسط الاحمر الى الاصفر وظهور فقاعات غازية في انبوب درهام دلّ على النتيجة الموجبة

الكشف عن انزيم الاوكسيديز

نقلت كمية من النمو البكتيري بواسطة عيدان خشبية معقمة الى ورقة ترشيح مشبعة بمحلول كاشف Tetramethyl-p-paraphenylen diamine dihydrocloride، تلون المستعمرات البكتيرية باللون البنفسجي دلّ على النتيجة الموجبة.

إستخلاص الزيت الطيار

استخدم لهذه الدراسة نبات حشيشة الليمون Cymbopogon citratus، وتم الحصول على اوراق نبات حشيشة الليمون من الحديقة النباتية لقسم علوم الحياة / كلية العلوم/ جامعة بغداد في الجادرية، وصنفت على انها حشيشة الليمون، جففت الاوراق في الظل ثمّ قطعت الى قطع صغيرة وحفظت في قناني زجاجية لحين الاستعمال اتبعت طريقة Goren واخرون [13] و Bankole &Joda [14]

لاستخلاص الزيت الطيار لنبات حشيشة الليمون بطريقة التقطير المائي Hydrodistillation باستخدام جهاز التقطير الكلافنجر.

اختبار فعالية الزيت الطيار في تثبيط نمو انواع المبيضات

استخدمت طريقة الانتشار بالحفر اعتمادا على [15و16]

–حضر عالق الخميرة بتركيز 1.5 x 10^{8} خلية حية/مليلتر بإتباع طريقة[11] بنقل جزء من مستعمرة الخميرة النامية على وسط (MEA) الى إنبوب اختبار حاوٍ 10 مليلتر وسط (MEB) المعقم، وحضن مدّة 24 ساعة بدرجة حرارة 28–30م^{o}. بعد انتهاء مدّة الحضن عملت سلسلة من التخفيفات العشرية للمزروع الخميري، وحددت الكثافة الضوئية للمزروع المخفف باستخدام جهاز المطياف الضوئي على طول موجي 540 نانوميتر، وسحب 0.1 مليلتر من كلّ تخفيف وزرع على وسط (MEA) باستخدام ناشر معقم، وحضنت الاطباق مدّة 24 ساعة ثم حسب عدد الخلايا.

حضرت التراكيز (1، 2، 5، 7.5، 10، 15، 20)% للزيت الطيار لنبات حشيشة الليمون وذلك بأذابة (10، 20، 50، 75، 100، 150، 200) مايكروليتر من الزيت على الترتيب بالمذيب العضوي داي ميثل سلفوكسايد Dimethyl Sulphoxide (DMSO) لتكملة الحجم الى 1 مليلتر.

نشر 0.2 مليلترمن عالق الخميرة على وسط (MEA) بماسحة قطنية معقمة Swab بشكل متساوي وبجميع الاتجاهات ثمّ تركت الاطباق لتجف. عمل حفر بقطر 8 مليمتر في الوسط الصلب باستخدام ثاقب فليني معقم وبمعدل حفرة واحدة لكل طبق .أُضيف 0.1 مليلتر من التراكيز المحضرة سابقا في كل حفرة فضلاً عن معامل السيطرة(DMSO) للمقارنة، استخدام ثلاث مكررات لكل تركيز .حضنت الاطباق بدرجة 28-30م^{o} مدّة 24 ساعة حددت فعالية كل تركيز بقياس قطر منطقة التثبيط حول كل حفرة بالمليمتر.

اختبار فعالية الزيت الطيار في تثبيط نمو الانواع البكتيرية المعزولة

استخدمت الطريقة السابقة نفسها بأستثناء بعض التغييرات

-حضر العالق البكتيري بتركيز x1.5 10^{8}خلية حية/مليلتر كما حضر في الفقرة السابقة باستخدام الوسط المغذي السائل (NB) وسط نقيع القلب و الدماغ السائل (BHIB) بدلاً من وسط خلاصة الشعير السائل (MEB) لغرض التنمية وحضن لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37م^{o} وحددت الكثافة الضوئية للمزروع ا لبكتيري المخفف على الطول الموجي 600 نانوميتر.

-استخدم الوسط المغذي الصلب (NA) ووسط اكار الدم (BA) بدلاً من وسط خلاصة الشعير الصلب (MEA) لإختبار فعالية التراكيز المختلفة للزيت الطيار في نمو العزلات البكتيرية وحضنت الاطباق لمدة 24-48 ساعة بدرجة حرارة 37 .

التحليل الاحصائي

تم تحليل البيانات الناتجة احصائياً وفق التصميم العشوائي الكامل CRD واستخدم اختبار تحليل التباين ANOVA لمعرفة الفروق وتاثير المعاملات المختلفة المتبوعة باختبار دنكن [17] للمقارنة بين المتوسطات وذلك باستخدام البرنامج الجاهز (SPSS) الاصدار 10 [18] .

النتائج والمناقشة

تشخيص انواع المبيضات والبكتريا المعزولة

بعد اجراء الاختبارات التشخيصية المختلفة شخصت خمسة انواع تعود الى جنس المبيضات (الجدول 1) هي Candida albicans و C.tropicalis وC. glabrata و C. kefyr وC. guilliermondii، وستة انواع بكتيرية هي Staphylococcus aureus وS.epidermidis و Streptococcus pyogenes وS.pneumoniae و Escherichia coli و Klebsiella spp .بالاعتماد على الصفات الظاهرة على الطبق والصفات المجهرية، والاختبارات الكيموحيوية الموضحة في الجدولين (2 و 3).

جدول (1)

بعض المظاهر البايولوجية والاختبارات الكيموحيوية لانواع جنس المبيضات المعزولة

انواع المبيضات	تكوين انبوب الانبات	تكوين الانواع المتثمرة	خاصية النمو السطحي	اختبار تخمر الكاربوهيدرات					اختبار تمثيل الكاربوهيدرات					
				Glu	Gala	Lact	Suc	Mal	Glu	Suc	Lact	Tre	Raff	SS
Candida albicans	+	+	-	+	V	-	-	+	+	+	-	+	-	+
Candida tropicalis	-	-	+	+	+	-	V	+	+	+	-	+	-	+
Candida glabrata	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
Candida Kefyr	-	-	-	+	+	V	+	-	+	+	+	-	+	-
Candida guilliermondii	-	-	-	+	V	-	+	-	+	+	-	+	+	-

Glu = glucose , Lact = Lactose , Suc = Sucrose
Tre = Trehalose , Raff = Raffinose , Mal= Maltose
SS= Soluble Starch , Gala = Galactose , V= Variable

جدول (2)

الاختبارات الكيموحيوية المستخدمة لتشخيص البكتريا الموجبة لصبغة كرام

الاختبارات	S. aureus	S. epidermidis	S. pyogenes	S. pneumoniae
1- صبغة كرام	g +ve	g +ve	g +ve	g +ve
2- فحص الكاتليز	+	+	-	-
3- نوع تحلل الدم	β	-	β	α
4- النمو على وسط المانيتول الملحي	+	-	-	-
5- انتاج انزيم التجلط Coagulase	+	-	-	-
6- فحص الحساسية للباستراسين Bacitracin	-	-	+	-
7- فحص الحساسية للاوبتوكين Optochin	-	-	-	+

β: تحلل الدم نوع بيتا + : النتيجة موجبة
α: تحلل الدم نوع الفا – : النتيجة سالبة

جدول (3)

الاختبارات الكيموحيوية المستخدمة لتشخيص البكتريا السالبة لصبغة كرام

الاختبارات	Escherichia coli	Klebsiella spp.
1- صبغة كرام	g -ve	g -ve
2- فحص الاوكسيديز	-	-
3-انتاج الاندول	+	-
4- اختبار احمر المثيل	+	-
5- اختبار الفوكس بروسكور	-	+
6- اختبار استهلاك السترات	-	+
7- اختبار تحليل اليوريا	-	+
8- النمو على سطح اكار الكلكر Kligler's Agar وانتاج H_2S	A/A with gas H_2S-	A/A with gas H_2S-
9- اختبار قابلية الحركة	-/+	-
10- اختبار تخمر السكريات		
A- الكلوكوز	+	+
B- اللاكتوز	+	+
C- سكروز	+	+
D- زايلوز	+	+
E- كالكتوز	-	-
F- مانيتول	+	+
G- مالتوز	+	+

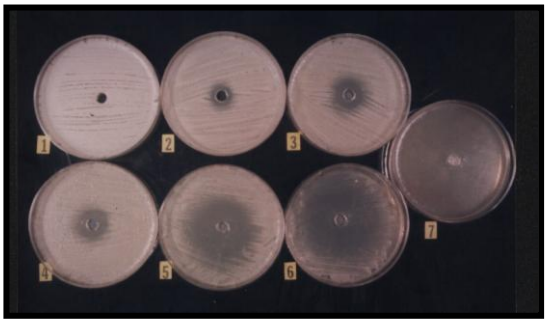
A/A = Acid / Acid

فعالية زيت نبات حشيشة الليمون ضد انواع المبيضات.Candida spp

اظهرت النتائج و جود تأثير مثبط لجميع تراكيز المستخلص الزيتي لنبات حشيشة الليمون ضد انواع المبيضات قيد الدراسة، اذ لوحظ وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمالية $P<0.05$ بين التراكيز المختلفة المثبطة لانواع المبيضات ومعاملة السيطرة، فقد احدث زيت حشيشة الليمون انخفاضاً في نمو الخميرة C. albicans اذ بلغ قطر هالة التثبيط 8 مليمتر وبنسبة تثبيط 9.7% عند التركيز 1% وازدادت اقطار هالة التثبيط للخميرة بزيادة التراكيـــز حتى بلغ قطرها 82 مليمتراً وبنسبة تثبيط 100% اي لم يظهر نمو في الطبق عند التركيز 20% مع ملاحظة وجود فروقات معنوية في معدلا ت اقطار هالة التثبيط ولجميع التراكيز المستخدمة(شكل 1)، كذلك الحال بالنسبة للخميرة C.tropicalis فقد احدث التركيز 1% فعالة تثبيطية اقل اذ بلغ قطر هالة التثبيط 7 مليمتر وبنسبة تثبيط 8.5%، ثم ازدادت النسب المئوية للتثبيط بزيادة تراكيز زيت حشيشة الليمون إذْ بلغت 45.5% و 58.9% و100% عند التراكيز 10% و15% و20%، أمّا الخميرة C.kefyr فتأثرت هي الاخرى بجميع تراكيز زيت حشيشة الليمون فبلغ قطر هالة التثبيط 9.67 مليمتر وبنسبة تثبيط 11.7% عند التركيز 1%، وقد ازدادت نسب تثبيط هذه الخميرة بزيادة تراكيز الزيت مع ملاحظة وجو د فروقات معنوية في معدلات اقطار هالة التثبيط لجميع التراكيز المستخدمة، وقد تأثرت

خميرتي C. glabrata و C. guilliermondii بجميع تراكيز الزيت المستخدمة مع ملاحظة عدم وجود فروقات معنوية بين معدلات اقطار هالة التثبيط لكلتا الخميرتين، وبصورة عامة أظهر الزيت الطيار لنبات حشيشة الليمون أعلى فعالية تثبيطية ضد الخميرة C. albicans ثمّ بالمرتبة الثانية الخميرة C. kefyr فالخميرتين C.glabrata و C. guilliermondii واخيراً الخميرة C.tropicalis (جدول 4).

اظهرت نتائج الدراسة الحالية بان للمستخلص الزيتي لنبات حشيشة الل يمون فعالية تثبيطية عالية ضد خميرة المبيضات Candida spp والانواع البكتيرية E.coli و S. aureus و S .pyogenes المعزولة (الجدولان 4،5) ويمكن ان تعزى قابلية الزيت الطيارة لحشيشة الليمون في تثبيط الخمائر والانواع البكتيرية الى الخاصية التي يمتلكها وهي خاصية الالفة للدهون Lipophilic property [19] التي تمكنه من اذابة الاغشية بالاضافة لكون زيت حشيشة الليمون يحوي مركبات تربينية احادية تعمل على تحليل الغشاء الخلوي ومن ثمّ حدوث خلل في الفعاليات الايضية الخلوية[20]، كما اوضح Knobloch [21] ان دور الزيت الطيار في تثبيط نمو الاحياء المجهرية يعود الى اضعاف الفعاليات الايضية الابتدائية فضلاً عن ايقاف عملية الفسفرة التأكسدية الايضية وسلسلة انتقال الالكترونات التي تجري في عملية تنفس الخلية بسبب المجاميع الفعالة التي تتداخل مع التركيب البروتيني للانزيمات الذي يؤدي الى ايقاف عملها.

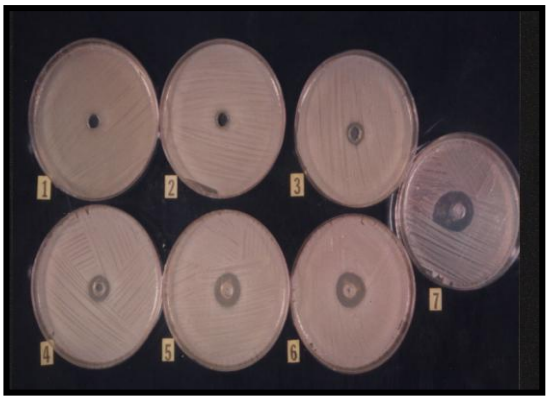


شكل (1) اختبار فعالية زيت نبات حشيشة الليمون ضد خميرة Candida albicans

1. Control (DMSO)
2. تركيز 1%
3. تركيز 2%
4. تركيز 5%
5. تركيز 10%
6. تركيز 15%
7. تركيز 20%

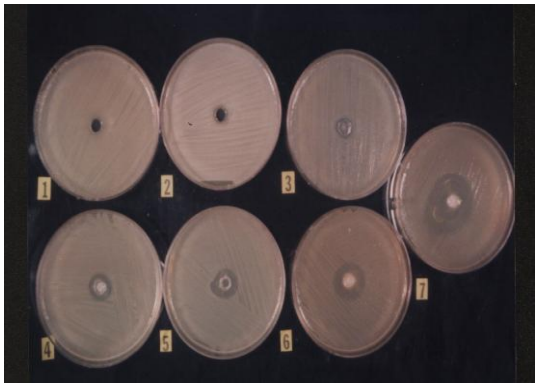
فعالية زيت نبات حشيشة الليمون ضد البكتريا Escheriehia coli و Staphylococcus aureus و Streptococcus pyogenes

اظهرت النتائج وجود تأثير مثبط للمستخلص الزيتي لحشيشة الليمون ضد الانواع البكتيرية المدروسة ففي التركيز 1% كانت اقطار هالة التثبيط 2 مليمتر و2.67 مليمتر و2 مليمتر وبنسب تثبيط 2.5% و3.2% و2.4% للبكتريا E. coli و S. aureus و S. pyogenes على الترتيب، واستمرت نسب التثبيط بالتزايد كلما زاد تركيز المستخلص الزيتي حتى بلغت اقطار هالة التثبيط 22.67 مليمتراً و 29.33 مليمتراً و28.33 مليمتراً وبنسب تثبيط 28.3 % و35.7 % و34.5 % للبكتريا E.coli وS. aureus و S. pyogenes على الترتيب عند استخدام التركيز 20%، لم يظهر التحليل الاحصائي اي فرق معنوي بين معاملة التركيز 1% ومعاملة السيطرة لجميع انواع البكتريا المدروسة، في حين ظهرت فروقات معنوية بين التراكيز المختلفة، ففي البكتريا E.coli كانت الفروقات معنوية بين جميع التراكيز المستخدمة باستثناء التركيزين 1و2 % فلم يظهر بينهما اي فرق معنوي، اما البكتريا S. aureus فلم تظهر هي الاخرى فرقاً معنوياً بين التركيزين 1و2 % وكذلك التركيزين 10و20 % أمّا بقية التراكيز فلوحظ وجود فروقات معنوية فيما بينها، وفي البكتريا S.pyogenes فلم يلاحظ فرق معنوي بين التركيزين 1و2% في حين ظهرت فروقات معنوية بين بقية التراكيز المستخدمة الشكل (2 و3) و (الجدول 5).



شكل(2) اختبار فعالية زيت نبات حشيشة الليمون ضد البكتريا Escherichia coli

1. Control (DMSO)
2. تركيز %1
3. تركيز %2
4. تركيز %5
5. تركيز %7.5
6. تركيز %10
7. تركيز %20



شكل(3) اختبار فعالية زيت نبات حشيشة الليمون ضد البكتريا Staphylococcus aureus

1. Control (DMSO)
2. تركيز %1
3. تركيز %2
4. تركيز %5
5. تركيز %7.5
6. تركيز %10
7. تركيز %20

المصادر

[1] الشحات، نصر ابو زيد النباتات والاعشـــاب الطبيـــة ، دار البحار، بيروت.

[2] E. Lewinsohn; N. Dudai; Y. Tadmor; I Katzir; U. Ravid; E. Putievsky and D.M. Joel. Histochemical localization of Citral accumulation in Lemon grass Leaves (Cymbopogon citratus (Dc.) Stapf, Poaceae). Ann. of Bot. 81, 1998, pp. 35-39.

[3] الدجوي، علي، النباتات الطبية والعطرية 1986، مكتبة مدبولي، مصر.

[4] R. S.Pereira; T.C. Sumita; M.R. Furlan; A.O.C. Jorge and M. Ueno. Antibacterial activity of essential oils on microorganisms isolated form urinary tract infection. Rev. Saude Publica., 38 (2), 2004, pp. 1-4.

[5] P. Hili; C.S. Evans and R.G. Veness. Antimicrobial action of essential oils: The effect of dimethyl sulphoxide on the activity of Cinnamon oils. Lett. in Appl. Microbiol, 24, 1997,pp. 269 -275 .

[6] H.R. Buckley. Identification of yeasts in: Medical Mycology. a practical approach. Evan, E.G.V. & M.D. Richardson (eds) .1989, IRL press. Oxoford Univ. press. pp. 97-110

[7] F.C. Odds 1979. Candida and Candidosis. Leicester University press. London, 1979. pp.381-385 .

[8] J.C. Collee; A.G. Fraser; B.P. Marmanin and A. Simmons. Mackie & MacCartney, Practical Medical Microbiology. 14th ed. the Churchill Livingstone, NewYork 1996.

[9] R. Cruickshank; J.P. Duguid; B.P. Marmion and R.H.A. Swain. Medical Microbiology. 12th ed. Vol. 2 Churchill Livingstone, London .1975.

[10] E.J. Baron; L.R. Petterson and S.M. Finegold. Bailey and Scotts, Diagnostic Microbiology. 9th ed. Mosby Company. USA.1994.

[11] R.M. Atlas; A.E. Brown & L.C. Parks Laboratory Manual Experimental Microbiology Mosby, St. Louis, London. 1995.

[12] B.A. Forbes; D.E. Sahm and A.S. Weissfeld. Bailey & Scott‘s, Diagnosis Microbiology. 10thed. Mosby, Inc. London 1998.

[13] A.C. Goren; G. Topcu; G. Bilsel and M. Bilsel. The Chemical Constituents and Biological activity of essential oil of Lavandula stoechas spp. stoechas. Verlag der Zeitschrift fur Natur for Schung Tubingen. 2002, pp.797-800.

[14] S.A. Bankole and A.O. Joda. Effect of Lemon grass (Cymbopogon citratus Stapf.) powder and essential oil on mould deterioration and aflatoxin contamination of melon seeds (colocynthis citrullusl) Afr. J. Biotechnol., 3 (1). 2004, pp. 52-59 .

[15] M.U. Rahman and S. Gul. Antibacterial activity of hydrodistilled essential oil of Psammogeton canescens N. O. Umbelliferae. Biotechnol. Vol.1 No.1. 2002, pp. 55-60.

[16] G.H.S. Bonjar. 2004. Antiyeast activity of some plants used in traditional Herbal - medicine of Iran. J. Biol. Sci., vol. 4No.2, 2004. pp. 212-215.

[17] J.I. Duncan.1955. F. Multiple .F-Test Multiple Range Test. Biomeric, vol.1 No.1, 1955, pp. 1-42.

[18] العقيلي، صالح ارشد ومحمد سامر الشايب، استخدام البرنامج الاحصائيSPSS. منشورات دار الحكمة ، جامعة الاردن، 1998، 397 صفحة.

[19] D.E.Conner. 1993. Naturally occurring compounds in: Antimicrobials in foods Davidson, P.M. & A.L. Branen (eds). Dekker, New York .1993.

[20] E.O. Lima. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil from Brazilian plants. Fitoterapia. LXIII .vol. 3, 1992. pp, 266-268.

[21] K. Knobloch; N. Weis and H. Weigand. 1986. Mechanism of Antimicrobial activity essential oil. Planta medica, vol. 52, 1986.pp.556.

Abstract

120 samples were collected from children who infected with oral thrush. The age between new bron and 10 years with the proide June 2004 unlit Dec 2004.

Five candida species which belong to C.albicans; C.tropicalis; C. guillermobdii; C.glabrata; C. kefyr and six bacteria isolated which is Staphylococcus aureus; S. epidermidis; Streptococcus pyogenes; S. pneumoniae; Escherichia coli; Klebsiella spp.

The oil extracted by hydrodistillation method using Glvengar apparatue; agar well diffusion method were used to study the effect oil extract against yeasts and bacteria isolated, the highest percent of inhibition was 100% for all candida species within 20% concentration of lemon grass and 35.7%, 34.5% and 28.3% for Staphylococcus aureus; Streptococcus pyogenes and Escherichia coli respectively with in 20% concentration.