الكشف عن فعالية المركبات الفينولية المستخلصة من اجزاء مختلفة لنخلة التمر ضد الجراثيم المسببة لالتهاب الاجفان Conjungtivites

منى عبد المطلب يحيى

مركز ابحاث النخيل

الخلاصة

اظهرت نتائج الزرع الجرثومي ل 62 مسحة اخذت من حالات التهاب الاجفان التلوث ببكتريا *Staph epidermides , Staph aureus* وبنسبة (30% , 45%) على الترتيب من المجموع الكلي للعزلات . تم استخلاص المركبات الفينولية و ايجاد النسبة المئوية لها من اجزاء من نخلة التمر صنف الزهدي (الثمار ، النوى ، نسيج الجمارة) ولم تظهر النتائج وجود فروقات معنوية في النسبة المئوية للمركبات الفينولية المتواجدة في تلك الاجزاء .

واظهرت نتائج الكشف عن الفعالية التثبيطية لمزيج المركبات الفينولية صنف الزهدى فعالية تثبيطية ضد كل من بكتريا *Staphyllococcus aureus, staphyllococcus epidermidis* عند التراكيز(100% , 40,80 , 20, 10) مايكرو غرام/ مل كالتالي (11.00,13.00 ,14.67, 21.00, 26.33) (, 11.00, 11.76, 14. 33, 18.33, 24.00) على الترتيب وبينت النتائج عدم سمية تلك المركبات الفينولية لجسم الانسان. اوضحت دراسة حساسية الجرثومة للمضادات الحيوية Vancomycinl،Tobramycin، Chloramphenicol ان معدلات المقاومة لكل من بكتريا فعالية تثبيطية ضد كل من بكتريا *Staphyllococcus aureus, , staphyllococcus epidermidis* كانت (% 25.11%,8.22%,38.32)(٩.٤١%،٥.١٢% ، ،٢٣.٣١%) على التوالي .

المقدمة

. ان ثمارالنخيل *Phoenix Dactylifera* عبارة عن كتلة حية مليئة بالمواد الغذائية وهي تشهد في كل مرحلة من مراحل نموها وتطورها سلسلة من التفاعلات الكيميائية والتغيرات الفسيولوجية (2006), Fao تحتوي ثمار نخلة التمر على المركبات الفينولية phenolic compound والتي تلعب دورا مهما في نكهة الثمار ولونها ومن اهم المركبات الفينولية البسيطة مادة التانينات Tanin والتي تتواجد بكثرة في اثمارغيرالناضجة وتتناقص تدريجيا بتقدم الثمار بالنضج وهي على نوعين احدهما نوع ذائب ويغلب وجودها في الثمار الغير ناضجة وتكون معدومة في الثمار تامة النضج اذ تتحول الى مركبات تانين غير ناضجة الطه ،(٢٠٠٥) والفينولات هي مركبات ثانوية يقوم النبات بانتاجها ولها صفات ضد مايكروبية (الموسوي، 2006) وقد يعزى السبب في الفعالية العالية للمركبات الفينولية الى ان تلك المركبات هي مركبات اروماتية حاوية على مجاميع هايدروكسيل(حرة و متعددة) وان القدرة التثبيطية لهذه المركبات تزدد بزيادة هذه المجاميع فمثلاالمركبان(Catechal , Pyrogallol) هما من المركبات الفينولية الهايدروكسيلية يكون المركب الاول اكثر سمية من الاخير بسبب ان الاخير catechal يمتلك مجموعتين بينما الاول يمتللك ثلاثة مجاميع هايدروكسيلية مما يزيد من قدرته التثبيطية للاحياء المجهرية الموسوي,(٢٠٠٦) . Conjungtiva او الملتحمة هي عبارة عن الغشاء المخاطي الذي يغطي الجفن الداخلي للعين و الذي يمتد ليغطي جزء من كرة العين (Jain , 1990) وان مرض التهاب الاجفان conjungtivitis قده تكون مسبباته بكتيرية او فايروسية (Tetz , etal., 1997) وان التهاب الاجفان الذي تكون مسبباته بكتيرية ينتتج عنه افرازات على شكل مواد قيحية تتراوح بين متوسطة الى افرازات شديدة قد تستمر خلال اليوم (Tarabishy ,et al ., 2008) ان المضاعفات التي تحدث في اغلب حالات الالتهاب الملتحمية تكون محدودة الا اذا لم تعالج فا نها قد تسبب العمى(Smith ,1997) اظهرت الدراسات الحديثة ان لكل من بكتريا , *Staphyllococcus aureus, staphyllococcus epidermidi* المسببة لالتهاب العين القابلية على افرازعوامل factor لها القدرة على الالصاق بالمضادات الحيوية antibiotic وذلك كوسيلة دفاعية في خلايا المضيف (١٩٩٩),. Costerton *et al* وان الهدف من هذه الدراسة هو لكشف الفعالية التثبيطية للمركبات الفينولية المستخلصة من اجزاء من نخلة التمر ضد الجراثيم المسببة لالتهاب الاجفان .

المواد وطرق العمل

اجريت هذه الدراسة خلال موسم النمو للعام(٢٠١٠) في احد بساتين قضاء ابي الخصيب التابع الى محافظة البصرة . اما الثمارفقد اخذت من اشجار نخيل التمر متقاربة بالعمر والنمو خلال مرحلة تكوين الخلال وبثلاثة مكررات (ثلاثة فسائل) من صنف الزهدي . جلبت العينات بتاريخ ٢٠١٠/٧/٢٠ وتم استاصال الجمارة من رؤوس فسائل نخيل التمرالمتصلة بامهاتها بعمر ٣ ٤ سنوات وبثلاث مكررات اما النوى (البذور) فقد استخرجت من الثمار(الخلال) ومن ثم غسلت جيدا بالماء المقطر المعقم لازالة بقايا الثمرة منها وبعدها جففت وطحنت وحفظت بعلب بلاستيكية محكمة .

استخلاص المركبات الفينولية من اجزاء من نخلة التمر *Phoenix Dactylefera*

وزن 20 غم من كل جزء من الاجزاء المدروسة (الثمار ، نسيج الجمارة ، مسحوق البذور) من نخلة التمر (صنف الزهدي) ووضعت في قمع مخروطي ثم اضيف اليها 100 مل منHCL (2%) ووضع في حمام مائى لمدة اربعين دقيقة بعدها رشح المستخلص باستخدام جهاز المضخة الساحبة و اوراق ترشيح نوع Whatman no -1 بعدها قيس حجم الراشح و اضيفت اليه الكمية نفسها من الايثر ومن ثم اعيد المزيج الى الحمام المائي لمدة 40 دقيقة بعدها اخرج المزيج وركز باستخدام جهاز المبخر الفراغي الدوار Rotary Vacum (Evaporator) وبعد الحصول على المستخلص الجاف وضع في قناني بلاستيكية معقمة محكمة السد وترك في الثلاجة بدرجة حرارة 5c لحين الاستخدام وقدرت النسبة المئوية للمركبات الفينولية حسب طريقة (Gayon,(1972 على اساس النسبة المئوية الوزن الطري وحسب طريقة pearson (1970) .

عزل وتشخيص الجراثيم المرافقة لحالات التهاب الاجفان

جلبت العينات من مستشفى الموانيء العامة التي سجل فيها ٥٠حالة التهاب الاجفان وتم جمع العينات باستعمال المسحة المعقمة (sterile swap).

بعداخذ العينات السريرية (clinical samples)اضيفت الى وسط (Brain –Hart-Infution –Broth) وحضنت لمدة h(24- 18)بدرجة حرارة 37C بعد ذلك زرعت على وسط (Sheep – Blood – Agar) 5% ووسط Mac Conky- Agar وشخصت كل من] جرثومة

Forbes , *et al* ., حسب الاختبارات المعروفة (*Staph .aureus, Staph Epidermidis*)
.(2007)

تحديد فعالية المركبات الفينولية ضد الجراثيم قيد الدراسة

استخدمت طريقة (Agar –Well – Diffusion) (1990)., perez et al لتحديد فعالية المستخلصات الفينولية المستخلصة وذلك بصب 20 مل من الوسط Muller – Hinton – Agar) لكل طبق زجاجي ثم لقح الوسط(M-H-A) ب 0.1 مل من العالق الجرثومي ذي الكثافة الضوئية 0.1 على طول موجي 540 نانو متر باستخدام جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer وذلك باستخدام ناشر زجاجي معقم (Spreader) تركت الاطباق مدت 15- 30دقيقة لحين الجفاف بعدها عملت 3 حفر بقطر 8 ملم لكل حفرة باستخدام ثاقب معدني معقم واخيرا اضيفت 100 مايكرو لترمن المستخلص الفينولي في الحفرة الاولى والمضاد الحيوي Chloramphenicol فى الحفرة الثانية وعينة سيطرة control

في الحفرة الثالثة وبنفس المقدارباستخدام ماصة دقيقة ذات اغطية محكمة .حضنت الاطباق بدرجة حرارة 37درجة مئوية ولمدة 24 ساعة في الحاضنة ثم اخرجت الاطباق وقيس قطر

منطقة التثبيط(Inhibition Zone) علما ان منطقة التثبيط هي المنطقة الخالية من النموالجرثومي ،

حساب السمية الخلوية للمستخلصات الفينولية

استخدمت كريات الدم الحمراء للانسان فى حساب السمية الخلوية(Celluler – Toxicity) لحساب السمية الخلوية للمستخلصات الفينولية المستخلصة من كل من بذوروثمارونسيج الجمارة لنخلة التمر والتى ابدت فعالية ضد البكتريا قيد الدراسة وذلك طبقا لطريقة، Xain-gue and Ursella)

1994) حيث تم تحضير سلسلة من التخافيف للمستخلص الفينولي باستخدام Phosphate buffered saline (pbs) (1l1 , 1l10,1l100, 1000 l 1)استخدم للمستخلص الفينولى معامل سيطرة موجبة (تحتوي على pbs فقط) ومعامل سيطرة سالبة تحتوى 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 النهائي ا مل حضنت الانابيب في الحاضنة بدرجة حرارة 37c ولمدة نصف ساعة اجري بعدها الطرد المركزى بواسطة جهاز (Centrifuge) لكل التخافيف المحضرة و لمدة خمس دقائق تم بعدها ملاحظة التحلل الدموي (hemolysis) .

حساسية البكتريا المسببة لالتهاب الاجفان تجاه بعض المضادات الحياتية

تم استخدام ثلاثة انواع من المضادات الحياتية بشكل اقراص (Antibiotic disc) وذلك لمقارنة فعاليتها تجاه البكتريا المسببة لالتهاب الاجفان نوع (biomaanalse (Turkey ,Vancomycin(10mcg),Tobramycin(10mcg), Cloramphenicol (30mcg)

التحليل الاحصائي

استخدم التحليل العشوائي الكامل CRD وحللت النتائج احصا ئيا باستخدام اختبار اقل فرق

معنوي المعدل Revised R LSD وعلى مستوى احتمال ($p<0.05$) (الراوي و خلف الله , ١٩٨٠) .

النتائج و المناقشة

عزل البكتريا من مصدر الاصابة

اظهرت النتائج في جدول 1 ان 30 من العزلات (Isolates) والتي شخصت كونها جرثومة موجبة لملون كرام شخصت كونها جرثومة *Staph aureus* في 45% من الحالات الموجبة للاصابة (possitave cases) يليها جرثومة(*Staph epidermides* 30% حيث وجد بان مصدر الاصابة بالتهاب الاجفان لا يمكن تحديده الا اذا كانت نسبة البكتريا الموجودة اعلى من 20% فقد تظهر البكتريا احيانا بسبب الجذب الالكتروني الساكن للعدسات الداخلية للعين واظهرت دراسات عديدة ان كل من بكتريا *Staph aureus , staph epidermides* مرتبطة بالتهاب الاجفان conjungtivitis : Alsamary,(2007); Locatelli *et al* (1994) Huphes&Hill (1997)., Tetze ,*et al* ;(2003).

جدول 1 النسبة المئوية لكل من بكتريا *Staph epidermides* ، *Staph aureus* المعزولة من عينات ماخوذة من مرضى مصابين باتهاب الاجفان Conjungtivitis

+

الانواع البكتيرية	عدد حالات الاصابة	% للحلات الموجبة (40)	%للعزلات الكلية (62)
Staph aureus	18	45%	29%
Staph Epidermides	12	30%	19,4%
المجموع الكلى	30	75%	48.4%

استخلاص المركبات الفينولية

بينت نتائج تقدير المركبات الفينولية للاجزاء المدروسة عدم وجود فروقات معنوية في النسبة المئوية للمركبات الفينولية المتواجدة فيها كما يبينها جدول 2 اذ كانت النسبة المئوية للمركبات الفينولية لكل من الثمار و نسيج الجمارة ثابتة ومقدارها ٨٥ بينما انخفضت النسبة قليلا في مسحوق النوى اذ بلغت٨٤ و هذا ما اكدته دراسات عديدة في التشابه في محتوى تلك الاجزاء من المواد الفينولية Al- Al ogaidy& Al – Mutlak (1986) , الطه ,(2005).

جدول 2 محتوى اجزاء نخلة التمر صنف الزهدي (النوى ، نسيج الجمارة ، الثمار (الخلال)) من المواد الفينولية والنسبة المئوية لكل منها

الجزء النباتي المستخدم	المواد الفينولية %
الثمار (الخلال)	85 b
نسيج الجمارة	85 b
مسحوق النوى	84 b

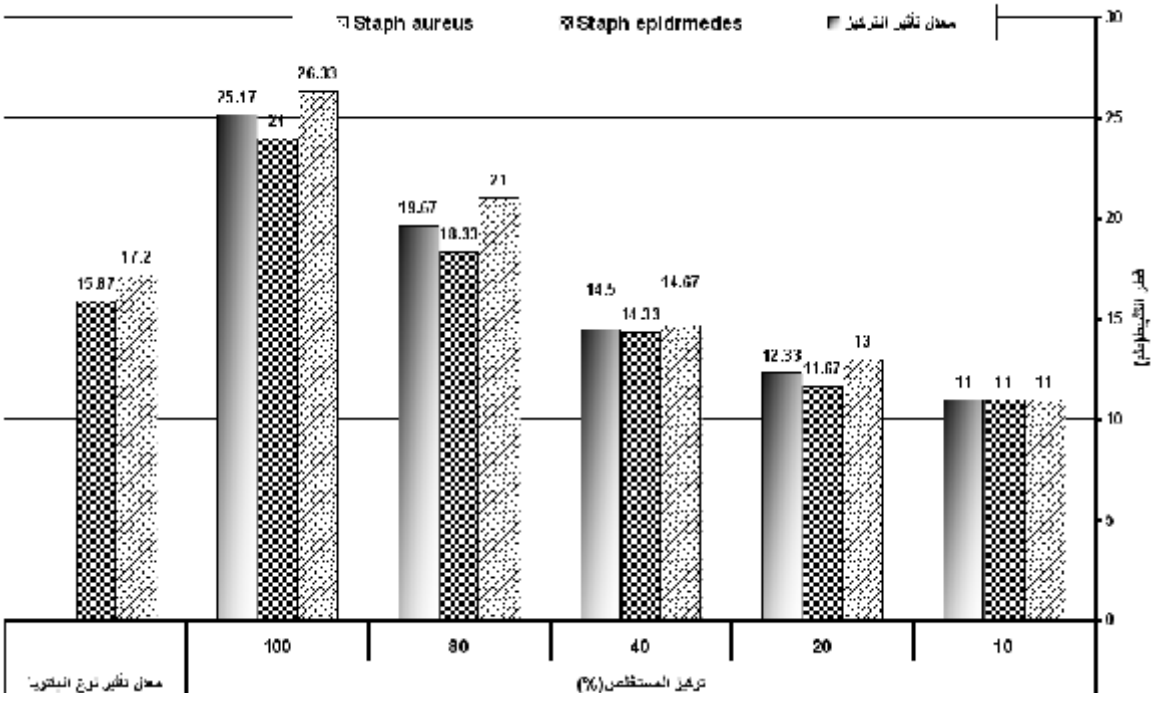
تشير الحروف المتشابهة الى عدم وجود فروقات معنوية بين الاجزاء الثلاثة من نخلة التمر وبمستوى احتمال 0.05

تحديد فعالية المركبات الفينولية المستخلصة من نخلة التمر ضد البكتريا المعزولة من التهاب الاجفان

يوضح الشكل 1 وجود فروقات معنوية في معدل تاثير نوع الجرثومة حيث اظهرت جرثومة*Staph aureus* حساسية اعلى تجاه المستخلصات الفينولية المستخدمة ضدها حيث بلغ معدل قطر منطقة التثبيط لها 20 .17ملم بينمااظهرت جرثومة *Staph epidermides* حساسية اقل تجاه تلك المستخلصات حيث بلغ معدل تاثرها بقطر تثبيط ٢٧. ١٥ملم . ان جرثومة *Staph aureus* تمتاز بقدرتها على احداث اصابات شديدة بسبب قدرتها على افراز السموم (Toxin) وكذلك افرازها انزيمات , Hyaloronidase , syndrome Toxin , Coagulase, Leucocidin , (Forbes , *et al* ., 2007) .

.كذلك اظهر الشكل وجود فروقات معنوية في معدل تاثير التركيز حيث اظهر التركيز 100 للمستخلصات الفينولية اعلى معدل تاثير وبلغ ٢٥.١٧ملم بينما اظهر التركيز ١٠ اقل قطر تثبيط للبكتريا وبلغ 00.ملم١١ وقد يعزى السبب في الفعالية العالية للمركبات الفينولية الى ان تلك المواد هي مركبات اروماتية حاوية على مجاميع هايدروكسيل (حرة و متعددة) وان القدرة التثبيطية لهذه المركبات تزداد بزيادة هذه المجاميع الموسوي ،(٢٠٠٦) كذلك يشير الشكل الى وجود فروقات معنوية في التداخل الحاصل بين كل من معدل تاثير نوع البكتريا ومعدل تاثير التركيزللمستخلص الفينولي اذ تشير النتائج الى ان اعلى قطر تثبيط لبكتريا Staph areus كان عند التركيز ١٠٠ من المستخلص الفينولي والذي بلغ ٢٦.٣٣ ملم

R.L.S.D 0.05، لنوع البكتريا=٠.٧٨ ،للتركيز= ١.٢٤ ،للتداخل=١.٧٥



السمية الخلوية للمركبات الفينولية المستخلصة من نخيل التمر

يظهر جدول ٣ عدم امتلاك المركبات الفينولية المستخلصة من نخيل التمر اي سمية على كريات الدم الحمراء للانسان RBC وقد استدل على ذلك بعدم حصول اي تحلل دموي لسلسلة التراكيز المحضرة لتلك المستخلصات حيث ان من المعلوم ان بعض المركبات الفينولية النباتية هي سامة بطبيعتها (الموسوي ,٢٠٠٦) وبما ان الدراسة الحالية تبحث عن الكشف عن الفعالية التثبيطية للمركبات الفينولية الستخلصة من نخلة التمر ضد الجراثيم الممرضة لاستخدامها كمضادات حيوية لذلك كان من الضروري جدا التاكد من عدم سميتها لخلايا المضيف Who,(2002)

جدول ٣ السمية الخلوية للمركبات الفينولية المستخلصة من نخيل التمر

تركيز المستخلص الفينولي	التحلل الدموي
1:1200mg lml	-
١:١٠	-
١ :١٠٠	-
١:١٠٠٠	-
Negative control	-
Positive control	+
Solvent control	+

حساسية الجراثيم المسببة لالتهاب الاجفان تجاه بعض المضادات الحياتية

يوضح جدول ٤ ان كل من بكتريا Staph epidermidis , Staph aureus تمتلك معدل مقاومة ضعيفة تجاه المضاد الحيوي Vancomycin بينما طورت كل منهما مقاومة عالية تجاه المضاد الحيوي Cloramphenicol وقد اشارت دراسة (2003) Locatelli *et al.*, الى الفعالية العالية للمضاد الحيوي Vanco mycin ضد بكتريا Staphyiococcus واشارت

دراسة Petersdrof *et al* (1990) القابلية العالية لبكتريا Staphylococci على تطوير المقاومة للمضاد الحيوي chloramphenicol بشكل متجدد .

جدول ٤ معدل المقاومة للجراثيم المسببة لالتهاب الاجفان تجاه بعض المضادات الحياتية

المضاد الحيوي (Antibiotic)	معدل المقاومة لبكتريا Staph epidermides	معدل المقاومة لبكتريا Staph areus
Vancomycin	8.22%	5.12%
Tobramycin	38.32%	9.41%
Coramphenicol	25.11%	23.31%

المصادر

- الموسوي ، منى عبد المطلب يحيى ، (2006) . الفعالية الضد جرثومية لمستخاصات بعض النباتات البرية العراقية ، رسالة ماجستير ، كلية التربية ، قسم علوم الحياة ، جامعة البصرة .العراق .
- الابريسم ، وسن فوزي فاضل ، (2009) ، تاثير الرش بالاثيفون في البناء البايو كيميائي والتشريحي لثمار السدر *Zizipgus Mauritana Lamk* وحاصل الشجرة في صنفى التفاحي و الجبجاب خلال مراحل النمو و النضج . رسالة ماجستير ، كلية الزراعة ، جامعة البصرة ، العراق .
- الطه , هدى عبد الكريم ,(٢٠٠٥).دراسة التغيرات في محتوى الثمار خلال مراحل النضج وعلاقتها بالسكريات والمواد الفينولية في راس نخيل التمر صنف ام الدهن قسم البستنة و النخيل – كلية الزراعة –جامعة البصرة العراق.
- الراوي ، خاشع محمود و عبد العزيز محمد خلف الله (١٩٨٠) . تصميم و تحليل التجارب الزراعية ، كلية الزراعة و الغابات ، جامعة الموصل ، العراق .

- Al- Ogaidi , H. K. And H.H.Mutlak (1989) .The phenolic compound of four of date cultivars during **maturity stages .Date palm J4 (2) 191-203 .**
- Alsamary , I. E ,(2007) . Astudy of antimicrobial activity of plant extract on bacterial bathogenes isolated from eye infection (
- sconjungtivites)the internet journal of microbiology 4(1) : 1-8
- Awad , M.A . (2007) .Increasing the rate of ripeningof date palm friut (*Phoenix dactylifera.L)* Helali by priharvest and post harvest treatment .
- Forbes B. A , Sahm , D.F and wressfled . (2007) . Diagnostic microbiology 12 ed . Baily and scotts. Mosby company . USA .
- Hughes , D . S and Hill (1994) Infectious endphthalmities after catact surgery . Brit . j . opthalm0t , 78-227-232 .
- Jain , M, R (1990) Daignosis and managmentof ocular in flammation . Zhaded . India .

- Locatelli , C.I ; Kwitik O .S and simonetti, (2003) Conjungtival endogeneous microbial hn patients sub mitted to cataract surgery , Brazilian journal of microbiology . 34:203-209 .
- Smith , M .A .(1997) . Treatment of Expermental methecillin Resistant *staph Epidermedes* . j . Infect . Dis – 175—462-4660.
- Tarabish A .B ; Bennie , A.and geneg , (2008) bacterial conjungtivites clevel and clinical journalof medicine (.(75)(7):507 -512.
- Tetz M . R ; Klen , U and Vokker. (1997) . Staphylococcus – associated blepharokerato – conjungtivitis.Ophthalmologe. 94:189-190 .
- Petersdrof,R.G.;Minchew,H. B; Keen, W.R and Bennett (1960).The sensitivity of hemolytic Staphyllococci to aseries of antibiotic.Arch.Int.med.105:398-412.
- Pearson,D. (1970)The chemical analyses of food . sixth edition .PP;280-281.
- Perez,C,;Pauli , M and Bazergue , P .(1990) . An antibiotic Assay by the Agar- Well difution method .J.Acta Biologiae et medicine Expermental is ., 15:113:115 .
- Xian-gno ,H.and Ursella,M.(1994). Antifungal compounds from Solanum nigrescence.J. Ethnopharm.,43; 173-177

The activites of phenolic compound wich extracted from date palm

against bacteria isolated from (conjungtivites)

•

Muna A. Y. `Al-Mussawii

Date palm Research Center . Basra univercity

summary

The result of bacterial culturing of 62 swabs taken from eye infection(conjungtivitis) revealed the isolation of each Staphyllococcus aureus ,Staphyllococcus epidermidis in (30%, 45%)respectively of the total isolates inhibitory activites of mixture of phenolic compound wich extracted from date palm partes (frut, seed , meristel) against each of Staphyllococcus aureus ,Staphyllococcus epidermidisin at concentrationes(10, 20,40, 80,100)mglml was(11.oo,11.76,,14.33,18.33,24.00) (11.00,13.00,14.67,21.00,26.33)

And the result show that there was no toxicity in this phenolic compound Staphyllococcus aureus and ,Staphyllococcus epidermides showed resistance rate about (31.31%, 5.12%, 9.41%,), (25.11%,8.22%,38.32%) antibacterial activities against antibiotics Chloramphinicol,Vancomycin Tobramycin` .