التأثير التثبيطي لأوراق الحناء *Lawsonia inermis* على بعض الفطريات

م.م. زكريا سامي المولى
كلية العلوم – جامعة الموصل

تاريخ تسليم البحث : ٢٠١٠/٩/٢٢ ؛ تاريخ قبول النشر : ٢٠١٠/١٢/٢٩

ملخص البحث :

تم دراسة تأثير كل من المستخلصين المائي والكحولي لأوراق الحناء على ٤ أنواع من الفطر *Aspergillus* شملت *A. candidus* و *A. flavus* و *A. niger* و *A. tamarii* ، بالإضافة إلى عزلة من كل من الفطريات *Fusarium culmorum* و *Penicillium spp.* و *Pythium spp.* و *Trichophyton mentagrophytes* .

أظهرت النتائج ان هناك تأثيرا تثبيطيا لنمو الفطريات بشكل عام وان نسب التثبيط كانت ضعيفة عند استخدام المستخلص المائي لأوراق النبات وكان التركيز ٢٠ ملغم/مل أفضل تركيز مستخدم للتثبيط وتحققت أعلى النسب للتثبيط ضد الفطريات *A. tamarii* و *A. flavus* حيث بلغت (٥٦ و٤٩) % على التوالي بينما كانت نسب التثبيط اضعف لبقية الفطريات و لجميع التراكيز،أما الفطريات *Pythium spp.*، *T. mentagrophytes* و *Penicillium spp.* فلم تظهر أي تأثر باي تركيز من تراكيز المستخلص المائي.

بينت النتائج ان هناك تفوقا للمستخلص الكحولي على المستخلص المائي من حيث قدرته التثبيطية عند جميع التراكيز و كانت الفطريات *F. culmorum* و *Pythium spp.* الأشد تأثرا بالمستخلص الكحولي إذ حققتا نسب تثبيط بلغت ١٠٠% ولجميع التراكيز ،كما لوحظ ان التركيز ٢٠ ملغم/مل من المستخلص الكحولي كان الأفضل في تثبيط النمو لجميع الفطريات وأعطى نسبة تثبيط بلغت ١٠٠% لأربعة فطريات أخرى هي *A. candidus* و *A. tamarii* و *Penicillium spp.* و *T. mentagrophytes* كما حقق نسبة تثبيط ٨٩% للفطر *A. flavus* وكان الفطر الأقل تأثرا بهذا التركيز هو الفطر *A. niger* الذي أعطى نسبة تثبيط ٦٧ % ولم يظهر أي تأثر بالتركيز ين ٥ و ١٠ ملغم/مل من المستخلص الكحولي.

The inhibitory effect of henna *Lawsonia inermis* leaves on some fungi

Assistant. Lecturer Zakaria Sami Almola
College of Science / University of Mosule

Abstract:

The present study investigates the effect of water & alcoholic extracts of henna *Lawsonia inermis* leaves on four fungal species of *Aspergillus* including *A. candidus, A. flavus, A. niger* & *A. tamarii*, also it involves one fungal isolate of each of *Fusarium culmorum, Penicillium spp., Pythium spp*. & *Trichophyton mentagrophytes*.

The results prove that there is inhibitory effect against fungal growth in general, & the inhibition percents are weak when water extract of leaves is used.The concentrate 20 mg/ml is the best to be used for inhibition. The highest percents of inhibition prove to be achieved against fungal species of *A. tamarii* & *A. flavus.* These percents are (56 & 49) % respectively, while percents of inhibition are weaker concerning the rest of fungi & with all concentrates.The fungi of *Pythium spp., T. mentagrophytes* & *Penicillium spp.* show no response to any concentrate of water extract.

The findings show that alcoholic extract has priority to that of water in its ability of inhibition with all concentrates, & the fungi of *F. culmorum* & *Pythium spp.* prove to be more affected by alcoholic extract, they prove to achieve 100 % inhibition for all concentrates.Also, we can clearly notice that 20 mg/ml concentrate of alcoholic extract is the best for inhibition against all fungi. It proves to achieve 100 % inhibition against another four fungi which are *A. candidus, A. tamarii, Penicillium spp*. & *T. mentagrophytes* . Also, it shows an ability to reach 89 % inhibition against fungus of *A. flavus* . The fungus of *A. niger* shows to be less effected by this concentrate. It gives 67% of inhibition & it shows no response to 5 & 10 mg/ml concentrate of alcoholic extract.

المقدمة :

تتطفل الفطريات على النباتات المختلفة كأشجار الفاكهة والزينة ونباتات الخضراوات والمحاصيل المختلفة مسببة خسائر اقتصادية كبيرة فتعرقل نموها ومن ثم تؤثر على جودة المحصول بالإضافة إلى تطفلها على الإنسان و الحيوان مما يتسبب في بعض الأمراض الجلدية والباطنية والتهابات في المسالك التنفسية فمثلا فطر *Trichophyton* يسبب إصابة فروه الرأس والشعر والجلد بمرض القراع العسلي كما ان بعض أنواع فطر *Aspergillus* تسبب أمراض والتهابات مختلفة للأذن الوسطى للإنسان، هذا بالإضافة إلى الأضرار الأخرى للفطريات مثل تلف الأخشاب وتحللها وتحلل الألياف والورق والبضائع الجلدية والمنسوجات وتلف المواد الغذائية وتعفنها (ابوهيلة،١٩٨٧).

إن سوء استخدام المضادات الحيوية أو الإفراط في إعطائها للإنسان أو الحيوان أدى إلى أن سلالات من البكتريا والفطريات عملت على تطوير قابليتها لانتاج المواد التي تعطل فعل المضادات الحيوية أو تغير هدفها أو قابليتها لاختراق خلايا هذه المايكرو بات (Ali et al.,1995)،ومع هذه الزيادة الحاصلة في السلالات المقاومة للمضادات الحيوية المصنعة كيميائيا لجأ الإنسان إلى إيجاد البدائل المناسبة لهذه المركبات واستخدام المضادات النباتية الأصل التي تعد أكثر أمنا واقل ضررا من نظيرتها الكيميائية ومن هذه البدائل نبات الحناء *Lawsonia inermis* الذي يمتلك فعالية مضادة للمايكرو بات كالبكتريا والفايروسات والفطريات بالإضافة إلى الطفيليات (Babu & Subhasree,2009).

يستوطن الحناء في الكثير من المناطق الاستوائية لآسيا وشمال أفريقيا واستراليا،كما يزرع أيضا في مناطق من أمريكا ومصروا لهند وأجزاء من الشرق الأوسط (Muhammad & Muhammad,2005) ، والحناء نبات شجيري حولي أو معمر يمكث في الأرض ٣ سنوات وقد يمتد إلى ١٠ سنوات أو أكثر ، الجذر وتدي والساق قائمة متفرعة ، الأوراق بسيطة جلدية متقابلة على الساق وهي التي تحوي المواد الملونة ، النورة عنقودية والأزهار صغيرة بيضاء لها رائحة عطرية زكية (حسين، ١٩٨١).

تستخدم الحناء من الناحية الطبية كمضاد حيوي للفطريات والبكتريا ومضاد للنزيف بالإضافة لعلاج آلام الرأس ومخفض للضغط الدموي وأيضا له تأثير مسكن للآلام (Khattak et al,1985).

عند التحليل الكيميائي لمسحوق أوراق الحناء وجد انه يحتوي على٠.٥ – ١.٥ % من مادة اللاوسون Lawson (2-Hydroxy-1,4 Naphthaquinone) الذي يعد المكون الرئيسي الذي يعزى إليه خاصية اعطاء اللون الخاص بالحناء ; (Ahmed et al,2000 Vardamides et al,2001) كذلك فانه يحتوي على تراكيز عالية من المركبات التالية :

mucilage, anthraquinone, chrysophanic acid, tannic acid ، كما توجد مركبات ال mannite و gallic acid بتراكيز متوسطة ، اما مركبات ال cyanoglycosides و ال sterols و أو triterpenes فإنها تتواجد بكميات محدودة (Saadabi,2007).

تهدف الدراسة الحالية إلى التحري عن القدرة التثبيطية لمستخلص أوراق الحناء ضد مجموعة من العزلات الفطرية والتعرف على نوع المستخلص الأفضل لأوراق النبات في منع نمو مثل هذه الكائنات المضرة بالإنسان.

المواد وطرائق العمل :

١- الأنواع الفطرية :

استخدمت ٨ فطريات لدراسة التأثير التثبيطي لأوراق الحناء على الفطريات المختبرة تم الحصول عليها من قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة الموصل ، اثنتان منها ممرضة للإنسان وهي *Aspergillus niger* المعزولة من حالات التهابات الأذن و *Trichophyton mentagrophytes* المعزولة من إصابات جلدية أما الفطريات المتبقية فشملت عزلة من كل من *A. candidus* و*A.flavus* و *A. tamarii* المعزولة من بعض انواع المكسرات و *Fusarium culmorum* و*Penicillium spp.* المعزولة من أشجار الحمضيات بالإضافة إلى الفطر *Pythium spp.* المعزول من التربة.

٢- زرع وتنشيط الفطريات :

زرعت الفطريات على وسط Potato Sucrose Agar عدا النوعين *niger Aspergillus* و *Trichophyton mentagrophytes* حيث استخدم وسط Sabouraud Dextrose Agar لهذا الغرض وجرى التحضين في درجة حرارة٢٨ ^{o}م .

٣- جمع أوراق الحناء :

جمعت أوراق نبات الحناء (باعتبارها الجزء النباتي الأهم الذي يحتوي على المركبات الفعالة ذات التأثير البيولوجي) من شجيرات الحناء من مزارع في محافظة البصرة في جنوب العراق والتي يكثر فيها زراعة النبات المطلوب ،واختيرت الشجيرات المتقدمة في العمر وتم قطف الأوراق وقت الفجر، بعدها نظفت الأوراق وأزيلت الشوائب منها وجففت طبيعيا في الظل بعيدا عن ضوء الشمس بعد فرشها على أوراق جرائد.

٤- تحضير المستخلص المائي لأوراق الحناء :

حضر المستخلص المائي Water extract لأوراق الحناء حسب طريقة Riose وآخرين (١٩٨٧) حيث مزج ٤٠ غم من الأوراق (بعد سحق الأوراق بالهاون الخزفي و جعلها بشكل مسحوق ناعم) مع ٢٠٠ مل من الماء المقطر حيث كان المسحوق سريع الامتصاص للماء المقطر، هرس المزيج بعدها باستخدام خلاط كهربائي تحت التبريد ثم ترك المزيج بدرجة حرارة ٤°م لمدة ٢٤ ساعة لغرض النقع ، بعدها رشح المزيج باستخدام عدة طبقات من الشاش ثم عرض الراشح إلى جهاز الطرد المركزي نوع Remi centrifuge بسرعة ٣٠٠٠ د/دقيقة لمدة ١٠دقائق ، أجريت عملية ترشيح مرة أخرى بواسطة قمع بوخنر وباستخدام ورق ترشيح نوع Whatman No.1 تحت التفريغ ثم جفف المستخلص الناتج بالتبريد تحت الضغط المخلخل وباستخدام جهاز التجفيد Lyophilizer ، بعدها حفظت العينات في عبوات بلاستيكية محكمة الغلق تحت التجميد لحين الاستخدام.

٥- تحضير المستخلص الكحولي :

تم مزج ٤٠ غم من مسحوق أوراق النبات مع ٢٠٠مل من الكحول الاثيلي ثم اتبعت نفس خطوات تحضير المستخلص المائي إلى حد مرحلة التجفيف حيث جفف المزيج هنا بتركه في الهواء بعد صبه في أطباق مفتوحة على شكل طبقة رقيقة ، بعدها حفظت العينات في عبوات بلاستيكية تحت التجميد لحين الاستخدام.

٦- تحضير التراكيز القياسية للمستخلصات النباتية وتعقيمها :

اخذ ١ غم من كل من المستخلص المائي والكحولي المحضرين مسبقا (كل على حدى) وأذيب المستخلص المائي في ٥ غم من الماء المقطر المعقم بينما أذيب المستخلص الكحولي في ٥ غم من مادة Di Methyl Sulphoxide(DMSO) وبذا تم الحصول على ٢٠٠ ملغم/مل كتركيز قياسي من كل من المستخلص المائي والكحولي ، عقم المستخلص المائي باستخدام المرشحات الغشائية ٠.٢٢ مايكرون، أما المستخلص الكحولي فعقم بطريقة البسترة بدرجة حرارة ٦٢°م لمدة ١٥ دقيقة (النعمان،١٩٩٨).

٧- اختبار التأثير التثبيطي للمستخلصات النباتية :

حضرت التراكيز(٥،١٠،٢٠) ملغم/مل من كل من المستخلصين المائي والكحولي بإضافة أحجام محددة من التركيز القياسي ٢٠٠ ملغم / مل إلى أحجام محددة من الوسط الغذائي المعقم المستخدم لزراعة الفطر قبل تصلبه وبعد رج المزيج تم صبه في أطباق بتري بقطر ٩ سم

وبعد تصلب الأوساط في أطباقها زرعت الأطباق بأخذ قرص من حافة المستعمرة الفطرية بعمر أسبوع بواسطة ثاقب فلين Cork borer بقطر ٥ ملم ووضعه في مركز الطبق في ظروف معقمة ، بعدها حضنت الأطباق بوضع مقلوب بدرجة حرارة ٢٨°م لمدة أسبوع ، حضرت أطباق المقارنة بصب الوسط الغذائي المعقم لوحده بدون إضافة المستخلص النباتي.

أخذت النتائج بحساب متوسط قياس قطرين متعامدين لكل مستعمرة فطرية نامية وكانت كل معاملة بثلاث مكررات ، وحسبت النسبة المئوية للتثبيط عند كل تركيز من المستخلص النباتي باستخدام المعادلة التالية :

ت% =(س–م/س) *١٠٠

حيث ت% : النسبة المئوية للتثبيط

س : قطر المستعمرة الفطرية في معاملة المقارنة

م : قطر المستعمرة الفطرية في تركيز معين من المستخلص النباتي

تم إجراء التحليل الإحصائي لنتائج كل فطر من الفطريات المستخدمة في التجربة بصورة مستقلة باستخدام اختبار دنكن عند مستوى احتمال ٥% .

النتائج والمناقشة :

أظهرت نتائج البحث وجود تأثير تثبيطي لمستخلص أوراق الحناء على معظم الفطريات المختبرة بشكل عام قياسا لمعاملة المقارنة ، ويوضح الجدول (١) التأثير التثبيطي للمستخلص المائي لمسحوق أوراق الحناء على الفطريات المختبرة حيث وجد أن النسب المئوية للتثبيط ازدادت بزيادة تركيز المستخلص المائي ولجميع الأنواع الفطرية عدا الفطريات *Pythium spp.* ، *Trichophyton mentagrophytes* و *Penicillium spp.* اذ لم تتأثر بوجود المستخلص المائي لأوراق الحناء و عند جميع التراكيز ، كما لوحظ أن أفضل تأثير تثبيطي على نمو الأنواع الفطرية ظهر عند التركيز ٢٠ ملغم/مل خصوصا ضد الفطريات *A. tamarii* و *A. flavus* اذ بلغت النسب المئوية للتثبيط (٥٦ و ٤٩) % على التوالي ، بينما تأثرت الفطريات *F. culmorum* و *A. candidus* بدرجة اقل بالتركيز الأخير وكانت النسب المئوية للتثبيط (٢٩ و٢٤) % على التوالي ، وكان التأثير الأضعف عند نفس التركيز في الفطر *A. niger* اذ حقق نسبة تثبيط بلغت ٧ % فقط.

الجدول(١): التأثير التثبيطي للمستخلص المائي لأوراق الحناء على الفطريات المختبرة

العزلة الفطرية	قطر المستعمرة الفطرية في طبق المقارنة (سم)	تركيز المستخلص المائي (ملغم/مل)					
		٥		١٠		٢٠	
		قطر المستعمرة الفطرية (سم)	النسبة المئوية للتثبيط %	قطر المستعمرة الفطرية (سم)	النسبة المئوية للتثبيط %	قطر المستعمرة الفطرية (سم)	النسبة المئوية للتثبيط %
Aspergillus candidus	٥.٨ a	٥.٤ ab	٧	٥.٠ bc	١٤	٤.٤ c	٢٤
A. flavus	٩.٠ a	٨.٦ b	٤	٨.٢ c	٩	٤.٦ d	٤٩
A. niger	٩.٠ a	٨.٨ ab	٢	٨.٦ bc	٤	٨.٤ c	٧
A. tamarii	٩.٠ a	٨.٨ a	٢	٨.٤ b	٧	٤.٠ c	٥٦
Fusarium culmorum	٧.٦ a	٧.٢ ab	٥	٦.٨ b	١١	٥.٤ c	٢٩
Penicillium spp.	٨.٤ a	٨.٢ a	٢	٨.٠ a	٥	٨.٠ a	٥
Pythium spp.	٩.٠ a	٩.٠ a	٠	٩.٠ a	٠	٩.٠ a	٠
Trichophyton mentagrophytes	٤.٠ a	٤.٠ a	٠	٤.٠ a	٠	٤.٠ a	٠

كل قطر مستعمرة في الجدول يمثل معدل لثلاث مكررات

اقطار المستعمرات في الجدول أفقيا المتبوعة بأحرف متشابهة تدل على عدم وجود فروقات معنوية بينها حسب اختبار دنكن متعدد المدى عند مستوى احتمال ٥%

النسب المئوية للتثبيط مقربة إلى اقرب عدد صحيح

تشير نتائج الجدول (٢) أن هناك علاقة طردية بين تركيز المستخلص الكحولي لمسحوق اوراق الحناء والنسبة المئوية لتثبيط نمو الأنواع الفطرية المختبرة وكانت أكثر الأنواع الفطرية تأثرا بالمستخلص الكحولي هي الفطريات *F. culmorum* و *Pythium spp.* إذ اظهرا نسبة تثبيط ١٠٠% عند جميع تراكيز المستخلص الكحولي ، وكان التركيز ٢٠ ملغم / مل من المستخلص الكحولي الأفضل في تثبيط النمو لجميع الفطريات واظهر نسبة التثبيط ١٠٠% أيضا للفطريات *A. candidus* و *A. tamarii* و *Penicillium spp.* و *T.*

*mentagrophytes*وكانت أعلى نسبة لتثبيط الفطر *A. flavus* هي ٨٩ % عند التركيز الأخير، بينما كان الفطر *A. niger* الأكثر مقاومة للمستخلص الكحولي إذ لم يتأثر بالنمو إلا عند التركيز ٢٠ ملغم/مل حيث بلغت نسبة التثبيط ٦٧%.

الجدول(٢): التأثير التثبيطي للمستخلص الكحولي لأوراق الحناء على الفطريات المختبرة

العزلة الفطرية	قطر المستعمرة الفطرية في طبق المقارنة (سم)	تركيز المستخلص الكحولي (ملغم/مل)					
		٥		١٠		٢٠	
		قطر المستعمرة الفطرية (سم)	النسبة المئوية للتثبيط %	قطر المستعمرة الفطرية (سم)	النسبة المئوية للتثبيط %	قطر المستعمرة الفطرية (سم)	النسبة المئوية للتثبيط %
Aspergillus candidus	٣.٢ a	١.٨ b	٤٤	١.٢ c	٦٣	٠.٠ d	١٠٠
A. flavus	٩.٠ a	.٧.٠ b	٢٢	٣.٦ c	٦٠	١.٠ d	٨٩
A. niger	٩.٠ a	٩.٠ a	٠	٩.٠ a	٠	٣.٠ b	٦٧
A. tamarii	٦.٠ a	٣.٦ b	٤٠	١.٠ c	٨٣	٠.٠ d	١٠٠
Fusarium culmorum	٧.٦ a	٠.٠ b	١٠٠	٠.٠ b	١٠٠	٠.٠ b	١٠٠
Penicillium spp.	٩.٠ a	٤.٠ b	٥٦	٢.٠ c	٧٨	0.0 d	١٠٠
Pythium spp.	٩.٠ a	٠.٠ b	١٠٠	٠.٠ b	١٠٠	٠.٠ b	١٠٠
Trichophyton mentagrophytes	٧.٠ a	٢.٨ b	٦٠	١.٨ c	٧٤	٠.٠ d	١٠٠

كل قطر مستعمرة في الجدول يمثل معدل لثلاث مكررات

اقطار المستعمرات في الجدول أفقيا المتبوعة بأحرف متشابهة تدل على عدم وجود فروقات معنوية بينها حسب اختبار دنكن متعدد المدى عند مستوى احتمال ٥%

النسب المئوية للتثبيط مقربة إلى اقرب عدد صحيح

كما ذكر مسبقا فان هناك تأثيرا تثبيطيا واضحا لمسحوق أوراق الحناء على معظم الأنواع الفطرية المختبرة وهذا التأثير يمكن ان يعزى الى المركبات الفعالة الموجودة في أوراق الحناء حيث أن اللاوسون Lawson وهو المركب الرئيسي لمكونات الأوراق يمتلك خاصية المضاد الحيوي ضد المايكرو بات (Malekzadeh,1968) ، وأشار Tripathi وآخرون (١٩٧٨) أن أوراق الحناء تحوي مركبات النفثاكوينون ذات التأثير السام للفطريات ، كذلك لوحظ

أن للمستخلص الكحولي لأوراق الحناء تأثير اكبر في التثبيط من المستخلص المائي لأوراق الحناء وربما يعود ذلك إلى كون الكحول يعد مذيبا أفضل للمركبات الفعالة المستخلصة من الأوراق إذا ما قورن بالماء المقطر المستخدم في حالة المستخلص المائي مما يسهل امتصاص هذه المركبات بشكل أفضل من قبل الفطريات المختبرة.

المصادر :

١. ابوهيلة ، عبدا لله بن ناصر، ١٩٨٧. أساسيات علم الفطريات . مطابع جامعة الملك سعود، الرياض،543 صفحة.

٢. حسين ، فوزي طه قطب ،١٩٨١ . النباتات الطبية زراعتها ومكوناتها . دار المريخ للنشر، الرياض،355صفحة.

٣. النعمان ، أديبة يونس شريف ،١٩٩٨. التأثير الجزيئي لبعض المستخلصات النباتية على نمو وايض عدد من الجراثيم الموجبة والسالبة لصبغة كرام ، رسالة دكتوراه ، كلية العلوم ، جامعة الموصل.

4. Ahmed, S.; Rahman, A.; Alam, A.; Saleem, M.,; Athar, M., and Sultana, S.,2000. Evaluation of the efficacy of *Lawsonia alba* in the alleviation of carbon tetrachloride induced oxidative stress. J.Ethnopharmacol., 69 :157-164.

5. Ali ,B.H.; Bashr, A.K. and Tanira, M.O.M.,1995. Anti inflammatory,antipyretic and analgesic effect of *Lawsonia inermis L.*(henna) in rats. Pharmacol.,51 :356-363.

6. Babu, D.P. and Subhasree, R.S. ,2009. Antimicrobial activities of *Lawsonia inermis* – Areview. Acad.J.Plant Sci. 2(4) :231-232.

7. Khattak ,S.G.; Gilani, S.N. and Ikram, M. ,1985. Antipyretic studies on some indigenous Pakistani medicinal plants. J.Ethnopharmacol.,14 :45-51.

8. Malekzadeh ,F.,1968. Antimicrobial activity of *Lawsonia inermis L.* Appl.Microbiol.,16(4) :663-664.

9. Muhammad, H.S. and Muhammad, S.,2005. The use of *Lawsonia inermis Linn*.(henna) in the management of burn wound infection. African J.Biotech.,4(9) :934-937.

10. Riose,J.L.;Recio,M.C. and Villar ,A.,1987. Antimicrobial activity of selected plants employed in the Spanish Mediterranean area. J.Ethnopharmacol.21: 139-152.

11. Saadabi,A.M.A.,2007 . Evaluation of *Lawsonia inermis Linn.*(Sudanase Henna) leaf extract as an antimicrobial agents.Res.J.Biol.Sci.2(4) :419-423.

12. Tripathi ,R.D.; Srivastava, H.S. and Dixit, S.N.,1978. Afungitoxic principle from the leaves of *Lawsonia inermis Lhnn.*Experienta,15(34) :51-52.

13. Vardamides ,J.C.; Nkengfack, E.; Fomum, Z.T.; Ngando, T.M.; Vogler, T.M. and W.Kraus, W.,2001. Diterpenoids and limonoids from the stem of *Pterorhachis zenkeri*. Fitoterapia,72 :386-393.