مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (39) العدد (1) 2017
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (39) No. (1) 2017

تقييم الفعالية التثبيطية لمستخلصات أشنة Evernia prunastri تجاه أنواع ممرضة للإنسان من جنس .Aspergillus sp

الدكتورة نوال علي *
الدكتور نسيم زريق**
ميادة حسين***

(تاريخ الإيداع 9 / 8 / 2016. قبل للنشر في 30 / 1 / 2017)

□ ملخّص □

نفذ البحث لتقييم الفعالية التثبيطية لمستخلص الأسيتون، الإيتانول، الميتانول و الكلوروفورم لأشنة Evernia prunastri وبتراكيز (100،75،50،25) ملغ/مل تجاه ثلاثة أنواع ممرضة من جنس Aspergillus هي: A. niger , A. fumigatus , A. flavus . تباينت فاعلية المستخلصات الأربعة، حيث أبدى كلا المستخلصين الأسيتوني و الميتانولي فعالية تثبيطية ملحوظة تجاه الانواع الفطرية المدروسة، إذ تزايدت الفاعلية بازدياد تراكيزهما، فعند التركيز (100)ملغ/مل ثبط النمو كلّياً لكلّ من A. niger , A. fumigatus , A. flavus ، بينما وصلت نسبة التثبيط لمستخلص الإيتانول إلى (94.11، 78.82، 87.05)% على التوالي عند التركيز ذاته، أما بالنسبة لمستخلص الكلوروفورم فكان الأقل تأثيراً، حتّى عند التركيز (100) ملغ/مل، حيث بلغت نسبة التثبيط (62.35 ، 74.11، 68.23) % على التوالي مقارنة بالشاهد A. fumigatus.

اعتماداً على هذه النتائج يمكن الاستفادة من مستخلصات أشنة Evernia prunastri كمصادر حيوية طبيعية لمعالجة الإنتانات الفطرية مستقبلاً.

الكلمات المفتاحية: أشنة Evernia prunastri ، Aspergillus، داء الرشاشيات، مستخلصات.

*أستاذة – قسم علم الحياة النباتية – كلية العلوم – جامعة تشرين – اللاذقية – سورية.
**مدرس – قسم علم الحياة النباتية – كلية العلوم – جامعة تشرين – اللاذقية – سورية.
***طالبة دكتوراه – قسم علم الحياة النباتية – كلية العلوم – جامعة تشرين – اللاذقية – سورية.

مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (39) العدد (1) 2017
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (39) No. (1) 2017

Evaluating the inhibitory efficacy of the Lichen Evernia prunastri extracts against human pathogenic species of Aspergillus sp.

Dr. Nawal Ali*
Dr. Naseem Zreik**
Mayadah Hussein***

(Received 9 / 8 / 2016. Accepted 30 / 1 /2017)

□ ABSTRACT □

The research was carried out to evaluate the inhibitory efficacy of acetone, ethanol, and chloroform of Evernia prunastri lichen with concentrations of (25, 50, 75, 100) mg/ml. against three pathogenic species of Aspergillus sp. Which are: A. flavus, A. fumigatus and A. niger . The efficacy varied among the four extracts, where both the acetonic and methanolic showed noticeable inhibitory efficacy against the fungal species under study. The efficacy increased of both extracts, at concentration (100) mg/ml growth of A. flavus, A. fumigatus and A. niger was completely inhibited, whereas the inhibiton percentage for ethanol extract reached (87.05, 78.82, 94.11)%, respectively at the same concentration. As for the chloroform extract, it was the least effective, where the percentage at (100) mg/ml concentration reached (68.23, 74.11, 62.35) %, respectively, compared to the control.

Depending on these results, the extracts lichen of Evernia prunastri could be used as natural products to treat fungal infections in the future.

Key words: lichen Evernia prunastri, Aspergillus, Aspergillosis, extracts

* **Professor, department of botany, faculty of sciences, Tishreen university, Lattakia – Syria.**
** **Assistant professor, department of botany, faculty of sciences, Tishreen university, Lattakia – Syria.**
*** **PhD student, department of botany, faculty of sciences, Tishreen university, Lattakia – Syria.**

مقدمة:

تشكل الفطريات الممرضة للإنسان مشكلة صحية كبيرة في معظم بلدان العالم النامية منها والمتطورة على حدٍّ سواء، و سجلت السنوات الأخيرة ارتفاع ملحوظ في نسبة حدوث الإنتانات الفطرية، إذ أصبحت تعد سبباً شائعاً للوفاة خاصة لدى الأشخاص ضعيفي المناعة (Hospenthal & Rinaldi ,2015; Chakrabarti, 2005) .

يعد الجنس Aspergillus من الأجناس الفطرية الواسعة الانتشار في الطبيعة، إذ يضم أكثر من 200 نوعاً، إلا أنَّ أشد الأنواع إمراضيه للإنسان هي: A. fumigatus, A. niger , A. flavus. (Lamoth, 2016).

تنتقل العدوى إلى الإنسان عن طريق الأبواغ الكونيدية المنتشرة في الجو المحيط، مسببةً مجموعة من الأمراض تدعى **داء الرشاشيات** (Aspergillosis)، و يصيب هذا الداء أعضاء مختلفة في الجسم (كالعين، الرئة، الجيوب الأنفية و الأذن ...الخ) (Frandsen & Pennington, 2013) .

يعد **Aspergillus fumigatus** من الأنواع الأكثر شيوعاً وأشدها خطورةً، إذ يحتل المرتبة الثانية بين الفطريات المسببة للإصابات البشرية بعد فطر Candida albicans، فضلاً عن كونه السبب الرئيس في معظم حالات Aspergillosis (Frisvad & Larsen, 2016; Bertout et al., 2001) ، و تعتمد وبائية هذا الفطر وانتشاره بالدرجة الأساس لقدرته على إنتاج أبواغ كونيدية صغيرة الحجم وبأعداد كبيرة في نطاق واسع من الظروف البيئية(McCormick et al., 2010; Dagenais & Keller, 2009).

تكمن خطورة النوع **Aspergillus flavus** في إنتاجه أفلاتوكسينات، التي تعد من أهم السموم الفطرية والأكثر انتشاراً وخطورة على صحة الانسان والحيوان كونها مسرطنة و سميّة في آن واحد (Davari et al., 2015; Perrone et al., 2014)، كما أشار Hedayati et al., (2007) إلى أنّ النوع A. flavus يصيب الأعضاء التنفسية ويسبب للإنسان أمراضاً خطيرة ، كما يتميز هذا النوع في قدرته الإمراضية للنباتات ، خاصة فيما يخص عفن وفساد الحبوب المخزنة ,.al et (Salano 2016; Okun et al., 2015)

يعد النوع **Aspergillus niger** من أهم مسببات التهاب الأذن الفطرية Otomycosis (Szigeti et al., 2012)، و أشار Johan, (1999) إلى أن بعض الأمراض التحسسية التي تصيب الرئة و القصبات الهوائية ناتجة عن الإصابة بفطريات A. fumigatus, A. niger ، كما بيّن (Amitani et al. 1995) أن المزارع التي عزلت من المرضى المصابين بالتكيس الرئوي كانت تحتوي على 16 مستعمرة من فطر A. fumigatus و3 A. niger و1 من A. flavus ، كذلك أشار(Nayak et al., 2013) إلى أنّ المزارع التي عزلت من المرضى المصابين بالتهاب القرنية Keratitis كانت تحتوي على 21 مستعمرة من فطر. A. flavus ، 14 A. fumigatus، و15 A. niger

دفع انتشار داء الرشاشيات Aspergillosis على نطاق واسع في العالم الباحثين إلى مضاعفة الجهود للحيلولة دون انتشاره، ومن الجدير بالذكر أن استخدام الصادات، يساعد في القضاء على الأمراض الفطرية ومن بينها داء الرشاشيات، من تلك الصادات نذكر: Amphotericin, Caspofungin Fluconazole, Itraconazole (Öz et al., 2016; Müller et al., 2013)، إلا أن الاستخدام العشوائي لهذه الصادات غالباً ما يسبب العديد من الآثار الجانبية و زيادة مقاومة الفطريات الممرضة للصادات الحيوية، مما يستوجب ضرورة إيجاد بدائل جديدة يكون لها تأثير مفيد على الكائن الحي ودون التسبب في آثار غير مرغوب فيها (Rankovic et al., 2011) .

تحتل الأشن في الوقت الحاضر مكانة كبيرة في الحقل الطبي، فأصبحت موضع اهتمام العديد من الفرق البحثية، وهي أحد المصادر الرئيسة للعقاقير الطبية ومصدر للمواد الفعّالة التي تدخل في الصناعات الدوائية (Ramya and Thirunalasundari, 2014; Malhotra et al., 2007) ، كما و استخدمت الأشن منذ آلالف السنين لأغراض العلاج المختلفة كعلاج أمراض الرئة، المعدة و الأمراض الجلدية،....الخ، إضافة لما سبق تمّ اكتشاف فعالية بعض المركبات الأشنية كحمض Usnic Acid في معالجة الأمراض السرطانية، فضلاً عن تميز مستخلصاتها بفاعليتها التثبيطية العالية تجاه العديد من الفطريات الممرضة للإنسان، الحيوان والنبات .(Yang et al., 2016; Basile et al., 2015; Padhi & Tayung, 2015)

أهمية البحث و أهدافه:

نظراً لما تتميز به الأشن من أهمية طبية و صيدلانية، ولعدم وجود أبحاث سابقة في بيئتنا، أجريت الدراسة في مجال تقييم فاعلية الأشن في تثبيط نمو بعض الفطريات الممرضة للإنسان، لذلك هدف البحث إلى :

1. جمع أشنة Evernia prunastri من بعض مناطق الساحل السوري وتحديدها.
2. عزل الفطريات الممرضة A. niger , A. fumigatus , Aspergillus flavus من الإنسان.
3. اختبار فعالية مستخلصات أشنة Evernia prunastri (الأسيتونية، الإيتانولية، الميتانولية و الكلوروفورمية) في تثبيط نمو الخيوط الفطرية للأنواع المختبرة.
4. تحديد نوع المستخلص و التركيز الأكثر فعالية ضد الفطريات المختبرة .

طرائق البحث ومواده:

❖ جمع العينات:

جُمعت أشنة Evernia prunastri من مناطق مختلفة من الساحل السوري(بيت ياشوط، بشيلي وجوبة برغال)، خلال عامي (2014–2015) م، وضعت العينات في أكياس من البولي إيثلين، و أُحضرت إلى المختبر، صُنّفت وفقاً للمفاتيح التصنيفية: (Purvis et al., 1992, Dobson, 2000).

الصف: Ascomycetes

الرتبة: Lecanorales

الفصيلة: Parmeliaceae

الجنس: Evernia

النوع: Evernia prunastri

ينتمي هذا النوع للأشن الشجرية fruticose type، المشرة قصيرة (5–10) سم، كثيفة، متفرعة بنهايتها بشكل غير منتظم، ألوانها خضراء إلى خضراء زيتونية، رمادي مخضر، خضراء مصفرة، و توجد فوق جذوع و أغصان الأشجار بشكل مجموعات، الشكل(1).

شكل (1): أشنة *Evernia prunastri*

غُسلت أشنة Evernia prunastri من الشوائب والأتربة، وجُففت في الظل لمدة (4–7) أيام، ثمّ وضعت في فرن بالدرجة 35مْ حتّى ثبات الوزن، بعدها طُحنت باستخدام الخلاط الكهربائي، وحُفظ المسحوق بعبوات زجاجية معتمة لحين استعمالها في خطوات الاستخلاص اللاحقة.

❖ تحضير المستخلصات (الأسيتون، الإيتانول، الميتانول و الكلوروفورم):

أخذ 10 غ من مسحوق أشنة Evernia prunastri ووضع في أرلنيماير معقم، وأُضيف إليه 100 مل من كل من المذيبات السابقة كلٌّ على حده، يُغطى الأرلنيماير بورق من الألمنيوم، يُوضع على هزاز مغناطيسي لمدة ثلاث ساعات، ثمّ يحفظ في الظلام لمدة أسبوع، مع التحريك يومياً خلال هذه الفترة، بعدها تم ترشيحه، لفصل المستخلص عن المذيب. وأُخذ المستخلص وبُخر بجهاز المبخر الدوار بالدرجة 30 مْ، للحصول على محلول مركز، جُفف بالفرن عند الدرجة 35 مْ للحصول على مسحوق ناعم تمّ حفظه في الثلاجة عند الدرجة 4 مْ في عبوات زجاجية معقمة معتمة لحين الاستعمال.

❖ عزل الفطريات الممرضة:

تم الحصول على الفطريات المختبرة (A. niger, A.fumigatus , Aspergillus flavus) من مستشفى الأسد الجامعي في اللاذقية، حيث أُخذت العينات الممرضة وزرعت على الوسط الغذائي (SDA) Sabouraud Dextrose Agar وحُضنت في الدرجة (30) مْ، ولمدة أسبوع، بعدها تمّ عزل وتنقية الأنواع الفطرية المستخدمة، وحددت وفـق المفاتيح التصنيفيـة التالية: (Diba et al., 2007; McClenny, 2005; Domsch et al., 1980) ، ثمّ حُفظت في الثلاجة عند الدرجة 4 مْ في أنابيب تحتوي على الوسط المغذي Potato Dextrose Agar(PDA) ، لحين إجراء الدراسات اللاحقة عليها.

❖ اختبار الفعالية التثبيطية ل مستخلصات أشنة Evernia prunastri تجاه الفطريات الممرضة:

اختبرت فعالية مستخلصات أشنة Evernia prunastri (الأسيتونية، الإيتانولية، الميتانولية والكلوروفورمية) في تثبيط نمو المستعمرة لكلٍّ من الأنواع الثلاثة (Aspergillus flavus , A.fumigatus, A. niger) بطريقة الغذاء المسموم The Poison Food Technique (Nene and Thapilyal, 2002)، حُضرت تراكيز المستخلصات التالية: (25، 50، 75، 100) ملغ/مل، باستخدام المعادلة: $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$ ، ثمّ أضيف (1) مل من كل تركيز من التراكيز المذكورة إلى 10 مل من مستنبت بطاطا ديكستروز آغار (PDA) وحُرّك جيداً، ثمّ صُب في الأطباق، تُركت لتتصلب بدرجة حرارة الغرفة، بعد ذلك أخذت قطعة بقطر (5) مم من كل مستعمرة من الفطريات المدروسة بعمر أسبوع بوساطة إبرة معقمة وُضعت في منتصف كل طبق، أما الأطباق الشاهدة فتمت باستنبات الفطر على وسط (PDA) خالٍ من المستخلص، حُضنت الأطباق عند الدرجة (30) مْ، لمدة (7) أيام.

تمّ إجراء ثلاثة مكررات لكل مستخلص ولكل تركيز على حده وللأطباق الشاهدة أيضاً، بعدها حُسب متوسط أقطار نمو المستعمرات ومن ثمّ النسب المئوية للتثبيط وفق التالي:

$$\textbf{النسب المئوية للتثبيط} = \frac{\text{متوسط قطر مستعمرة الشاهد} - \text{متوسط قطر المستعمرة المعاملة}}{\text{متوسط قطر مستعمرة الشاهد}} \times 100$$

النتائج والمناقشة:

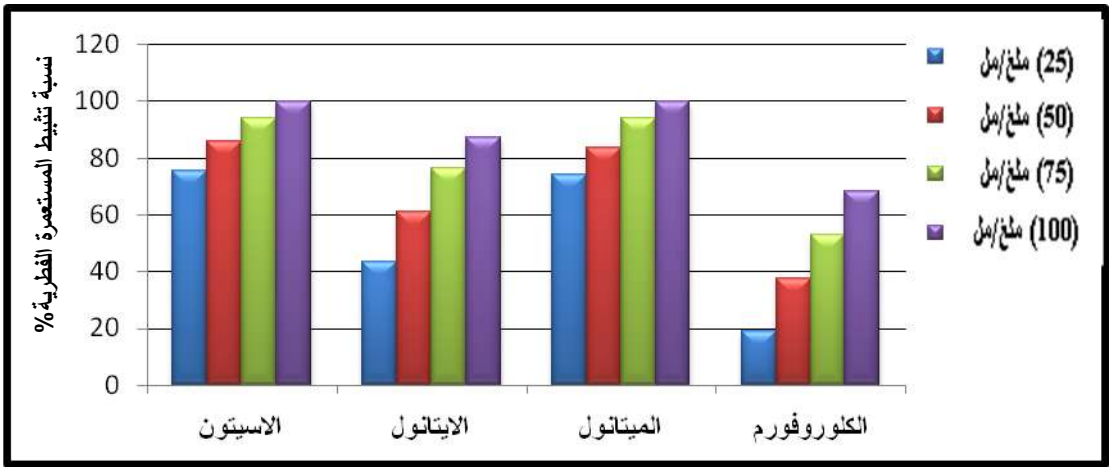
تشير النتائج في الجداول (1، 2، 3) بأن هناك تبايناً واضحاً في الفعالية التثبيطية لمستخلصات أشنة Evernia prunastri و تراكيزها المختلفة في نمو الفطريات المختبرة.

تبين النتائج في الجدول (1) التأثير الفعال لمستخلص الأسيتون، حيث وجد أن هناك فروق معنوية في نمو الفطر **Aspergillus flavus** عند جميع التراكيز بالمقارنة مع الشاهد، أظهر التركيز 100ملغ/مل تثبيطاً تاماً للنمو، بينما كان قطر المستعمرة عند التركيز (25 – 50– 75) ملغ/مل هو (21، 12، 5) مم على التوالي، وهذه القيم تعبر عن تثبيط نمو الفطر بنسب (75.29، 85.88، 94.11) % على التوالي بالمقارنة مع الشاهد، كما يلاحظ من الجدول (1) بأن مستخلص الميتانول كان تأثيره مماثلاً للأسيتون بالتركيزين (75– 100) ملغ/مل حيث ثبطت النمو بنسبة (94.11، 100) % على التوالي في حين كان متقارباً بالتركيزين (25، 50) ملغ/مل، حيث بلغت نسبة التثبيط (75.29، 85.88) % لمستخلص الأسيتون و (74.11، 83.52)% لمستخلص الميتانول على التوالي، بالنسبة لمستخلص الإيتانول كان تأثيره فعالاً عند التركيز (100) ملغ/مل إذ ثبط النمو بنسبة (87.05)%، في حين انخفضت نسبة التثبيط إلى(43.52)% عند التركيز(25) ملغ/مل، أما مستخلص الكلورفورم فكان تأثيره ضعيفاً عند التركيز(25) ملغ/مل إذ بلغت نسبة التثبيط (18.82)%، أما عند التركيز 100 ملغ/مل فقد كانت نسبة التثبيط (68.23) % بالمقارنة مع الشاهد.

الجدول(1): متوسط اقطار المستعمرات الفطرية (مم) والنسب المئوية لتثبيط Aspergillus flavus بوجود تراكيز مختلفة من مستخلصات (الأسيتون، الإيتانول، الميتانول و الكلوروفورم) لأشنة Evernia prunastri

الفطر	مستخلصات	الأسيتون		الإيتانول		الميتانول		الكلورفورم		L.S.D
		القطر	%	القطر	%	القطر	%	القطر	%	
A. flavus	الشاهد	a85	0	a85	0	a85	0	a85	0	11.31
	25 ملغ/مل	e21	75.29	bc48	43.52	e 22	74.11	a69	18.82	
	50 ملغ/مل	f12	85.88	de33	61.17	f14	83.52	b53	37.64	
	75 ملغ/مل	g5	94.11	ef20	76.47	g 5	94.11	cd40	52.94	
	100 ملغ/مل	g0	100	fg11	87.05	g0	100	e27	68.23	

* الحروف المتشابهة تدل على عدم وجود فروق معنوية عند مستوى دلالة 5%.



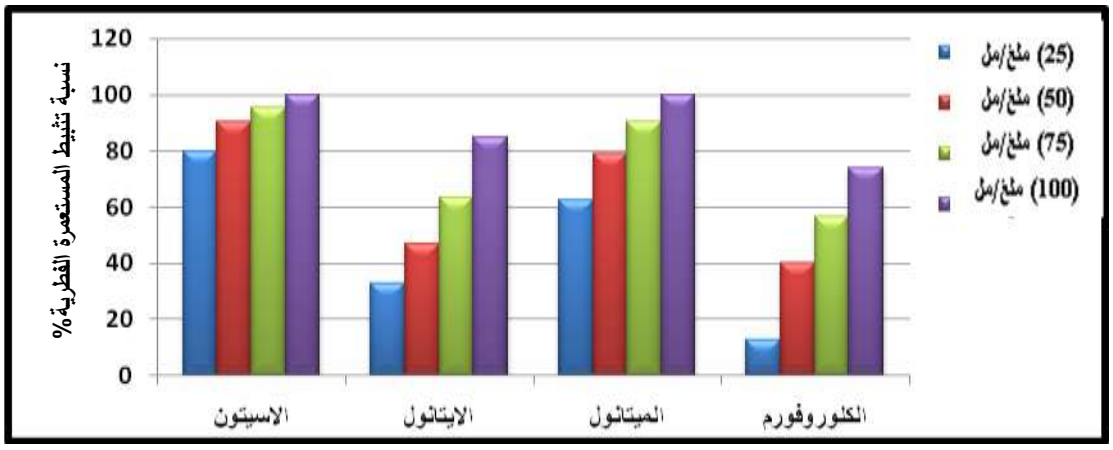
شكل(2): النسب المئوية لتثبيط المستعمرات الفطرية لـ Aspergillus flavus بوجود تراكيز مختلفة من مستخلصات (الأسيتون، الإيتانول، الميتانول و الكلوروفورم) لأشنة Evernia prunastri

أما بالنسبة للفطر **Aspergillus fumigatus** أظهرت النتائج الموضحة في الجدول (2) ومن إجراء التحليل الإحصائي للنتائج لوحظ أن هناك فروق معنوية بين جميع التراكيز والعينة الشاهد، كما تبيّن أنّ تأثير مستخلص الأسيتون و الميتانول متشابهاً حيث ثبط النمو بشكل كامل بالتركيز (100) ملغ/مل، كما كان تأثيرهما مرتفعاً بالتركيز (75) ملغ/مل، حيث كانت نسبة التثبيط 95.29 % لمستخلص الأسيتون مقابل 90.58 % لمستخلص الميتانول. أما مستخلص الإيتانول كان تأثيره واضحاً عند التركيز 100ملغ/مل إذ بلغ قطر التثبيط (18) مم وهذه القيمة تعبر عن تثبيط النمو بنسبة 78.82%، أما عند التركيز (25) ملغ/مل فلم تتجاوز نسبة التثبيط 32.94%، بالنسبة لمستخلص الكلوروفورم فعند التركيز (100)ملغ/مل كان تأثيره جيدا إذ بلغ قطر التثبيط (22) مم وهذه القيمة تعبر عن تثبيط بنسبة 74.11%، أما عند التركيز (25) ملغ/مل فكان ضعيف جدا إذ لم تتجاوز نسبة التثبيط 12.94%.

الجدول(2): متوسط اقطار المستعمرات الفطرية (مم) والنسب المئوية لتثبيط Aspergillus fumigatus بوجود تراكيز مختلفة من مستخلصات (الأسيتون، الإيتانول، الميتانول و الكلوروفورم) لأشنة Evernia prunastri

الفطر	مستخلصات	الأسيتون		الإيتانول		الميتانول		الكلوروفورم		L.S.D
		القطر	%	القطر	%	القطر	%	القطر	%	
A. fumigatus	الشاهد	a85	0	a85	0	85a	0	a85	0	7.81
	25 ملغ/مل	g17	80	c57	32.94	f 32	62.35	b74	12.94	
	50 ملغ/مل	h8	90.58	de45	47.05	g18	78.82	cd51	40	
	75 ملغ/مل	ij4	95.29	F 31	63.52	h8	90.58	f37	56.47	
	100 ملغ/مل	0j	100	g18	78.82	0j	100	g22	74.11	

* **الحروف المتشابهة تدل على عدم وجود فروق معنوية عند مستوى دلالة 5%.**



شكل(3): النسب المئوية لتثبيط المستعمرات الفطرية لـ Aspergillus fumigatus
بوجود تراكيز مختلفة من مستخلصات (الأسيتون، الإيتانول، الميتانول و الكلوروفورم) لأشنة Evernia prunastri

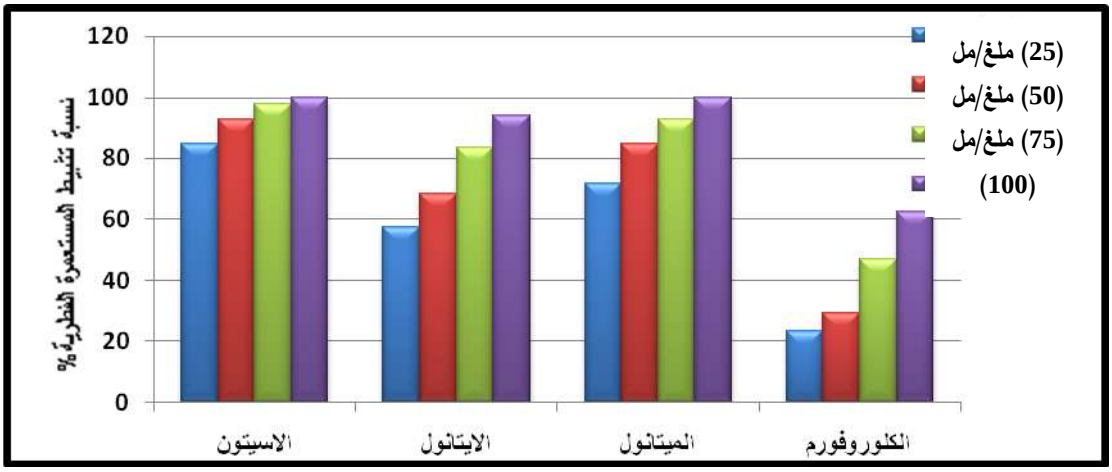
أثرت المستخلصات بشكل كبير في تثبيط النوع الفطري **Aspergillus niger** حيث وجد أن هناك فروق معنوية لنمو الفطر عند جميع التراكيز المستخدمة بالنسبة لعينة الشاهد، ويبين الجدول(3) أنّ مستخلص الأسيتون عند التركيز (100ملغ/مل) ثبط النمو بشكل كامل، وعند التركيز (75) ملغ/ مل، بلغ قطر مستعمرة الفطر بعد أسبوع من الزراعة (2) مم وهذا يشكل تثبيطاً في النمو بمقدار (97.64)% بالمقارنة مع الشاهد، و أبدت تأثيراً واضحاً عند التركيز (25) ملغ/ مل إذ بلغت نسبة التثبيط (84.70)%، كما تبيّن من الجدول (3) بأن مستخلص الميتانول له قدرة تثبيطية عالية تجاه الفطر المذكور حيث ثبط النمو بشكل كامل بالتركيز (100)ملغ/مل، كما كان تأثيره واضحاً بالتركيزين (50–75) ملغ/مل إذ بلغت نسبة التثبيط (92.94،84.70)% ، وحتّى بالتركيز (25) ملغ/مل كان تأثيرها جيد إذ بلغت نسبة التثبيط (71.76%) بالمقارنة مع الشاهد، أما تأثير مستخلص الإيتانول في الفطر المدروس فكان تأثيره مرتفعاً بالتركيز (100) ملغ/مل، حيث بلغت نسبة التثبيط 94.11%، أما بالتركيزين (75،50) ملغ/مل فبلغت نسبة التثبيط (83.52،68.23) % على التوالي، و بالتركيز (25) ملغ/ مل بلغ قطر المستعمرة (36 مم) وهذه القيمة تعبر عن تثبيط نمو الفطر بنسبة (57.64) % بالمقارنة مع الشاهد، بالنسبة لمستخلص الكلوروفورم كان أقلها

كفاءة في تثبيط الفطر، حيث بلغت النسبة (62.35)% بالتركيز (100) ملغ/مل، و في التركيز(25) ملغ/ مل كان ضعيف إذ لم تتجاوز نسبة التثبيط (23.52)%.

الجدول(3):متوسط اقطار المستعمرات الفطرية (مم) والنسب المئوية لتثبيط Aspergillus niger بوجود تراكيز مختلفة من مستخلصات (الأسيتون، الإيتانول، الميتانول و الكلوروفورم) لأشنة Evernia prunastri

الفطر	مستخلصات	الأسيتون		الإيتانول		الميتانول		الكلورفورم		L.S.D
		القطر	%	القطر	%	القطر	%	القطر	%	
A. niger	الشاهد	a85	0	a85	0	a85	0	a85	0	8.23
	25 ملغ/مل	i13	84.70	ef36	57.64	g24	71.76	b 74	23.52	
	50 ملغ/مل	ij6	92.94	g 27	68.23	i13	84.70	c60	29.41	
	75 ملغ/مل	j2	97.64	hi14	83.52	ij6	92.94	d 45	47.05	
	100 ملغ/مل	j0	100	j5	94.11	j0	100	fg32	62.35	

*** الحروف المتشابهة تدل على عدم وجود فروق معنوية عند مستوى دلالة 5%.**



شكل(4): النسب المئوية لتثبيط المستعمرات الفطرية لـ Aspergillus niger بوجود تراكيز مختلفة من مستخلصات (الأسيتون، الإيتانول، الميتانول و الكلوروفورم) لأشنة Evernia prunastri

كما تبيّن النتائج في الجدول (3،2،1) أن مستخلص الأسيتون كان أكثر تأثيراً في A. niger تلاه A. flavus ثمّ A. fumigatus أما مستخلص الميتانول كان أكثر تأثيراً في A. flavus تلاه A. niger ثمّ A. fumigatus، و مستخلص الإيتانول كان أكثر تأثيراً في A. niger تلاه A. flavus ثمّ A. fumigatus أما بالنسبة لمستخلص الكلوروفورم أثّر في A. fumigatus تلاه A. flavus ثمّ A. niger .

أن الاختلاف فيما بين المذيبات العضوية يمكن إرجاعها إلى قطبية المذيب التي تلعب دوراً هاماً في استخلاص بعض المركبات الفعّالة دون الأخرى مما يؤدي إلى ترسيب أكبر كمية ممكنة من المركبات أثناء الاستخلاص (Babiah et al. 2015).

كما تبين نتائج الجدول (1،2،3) أن مستخلص الأسيتون و الميتانول هما الأكثر فعالية مقارنة بالإيتانول والكلوروفورم ويمكن تفسير ذلك إلى قدرتهما على استخلاص العديد من المركبات الفعّالة بيولوجياً، و التي تمتاز بتأثيرها الفعّال في تثبيط الفطريات المدروسة، و أهم المواد الفعّالة التي تحتويها أشنة Evernia prunastri هي: evernic acid, usnic acid, atranorin, chloroatranorin، ولها يعزى الدور الأساسي في عملية التثبيط التي تتميز بها، حيث تبدي تلك المركبات فعالية عالية إزاء تثبيط طيف واسع من الفطريات، منها الأنواع المختبرة (Kosanić et al., 2013).

توافقت النتائج مع ما أشار إليه الباحث (Tiwari et al. 2011) (a) من حيث تفوق مستخلص الميتانول والأستون Parmotrema tinctorum في تأثيرهما على النوعين A.niger, A. flavus. ويتفق أيضاً مع (Tiwari et al. 2011) (b) إذ درس تأثير ثلاثة أنواع من المستخلصات الأسيتونية، الميتانولية والكلوروفورمية تجاه A. flavus , A. fumigatus فكان تأثير مستخلص الكلورفورم الأضعف، كما بينت دراسة قام بها الباحث (Kosanić et al., 2013) كفاءة مستخلص الأسيتون لأشنة Parmelia pertusa في تثبيط نمو النوعين A. flavus, A. fumigatus .

أكد الباحث (Kosanić et al., 2014) على الفعالية التثبيطية العالية لمستخلص الميتانول لأشنة Umbilicaria polyphylla تجاه الفطر A. flavus و التي تفوقت في تأثيرها على المضاد الفطري Ketoconazole، كما أشار (Karabulut et al., 2015) و(Stojanović et al., 2013) إلى القدرة التثبيطية العالية للمستخلص الميتانولي لأشنة Evernia prunastri تجاه طيف من الفطريات من بينها فطر A.niger ، الذي تجاوز تأثير المضاد الفطري Nystatin، هذا و يتفق أيضا مع (Mitrovic et al., 2011) الذي درس تأثير مستخلص الميتانول لأربع أنواع من الأشن تجاه طيف من الفطريات منها A. niger, A. flavus, A. fumigatus فكانت أشنة Evernia prunastri الأكثر تأثيراً و النوع A. niger الأكثر حساسية من بين الفطور المدروسة.

كما أشار (Babiah et al., 2014) (b) إلى فاعلية مستخلص الأسيتون و الميتانول تجاه النوعين A. niger , A. flavus ، وتتفق نتائج البحث أيضا مع دراسة (Babiah et al., 2014) (a) حيث تشير إلى فعالية مستخلص الميتانول و الأسيتون في حين كان مستخلص الكلورفورم أقل تأثيراً.

وجد (Rakovic et al., 2012) في دراسة التأثير التثبيطي لثلاثة أنواع من المستخلصات (الأسيتون، الميتانول و الماء) تجاه طيف من الفطريات منها A. flavus, A. fumigatus، التفوق العالي للأسيتون و الميتانول على المستخلص المائي ويتفق ذلك مع (Marijana et al., 2010) ، و أيضاً مع الباحث Bisht et al., (2014) الذي أشار إلى فعالية المستخلص الميتانولي مقارنة مع المائي تجاه فطر A. niger ، كما يؤكد ذلك الباحث (Mitrovic et al., 2014) الذي درس تأثير ثلاثة أنواع من المستخلصات الأسيتونية و الميتانولية و ايتل اسيتات لاشنة Pseudevernia fufuracea تجاه فطر A. flavus وكانت النتيجة تفوق المستخلصين الأسيتوني و الميتانولي في قدرتهما التثبيطية على مستخلص ايتل اسيتات و المضاد الفطري Fluconazole.

يعزى لتأثير التثبيطي لمستخلصات الأشن لاحتوائها على بعض المركبات الثانوية الفعالة مثل الفلافونيدات والفينولات و التي أثبتت فعّاليتها التثبيطية تجاه طيف واسع من الأحياء الدقيقة سواء الفطرية منها أو الجرثومية (Rakovic et al., 2014).

كما بيّن (Kosanić & Rankovic, 2015) أنّ فعالية العديد من الأشن تعزى إلى الفينولات التي تشكل المركبات الكيميائية الأساس في محتوى الأشن.

الاستنتاجات والتوصيات:

الاستنتاجات:

1 تباين تأثير مستخلصات أشنة Evernia prunastri (الأسيتونية، الإيتانولية، الميتانولية و الكلوروفورمية) في الفطريات المدروسة تبعاً لنوع الفطر، نوع المستخلص، و التراكيز المستخدمة.

2 يمتلك المستخلص الأسيتوني و الميتانولي لأشنة E. prunastri فعالية تثبيطية عالية تجاه جميع الفطريات المختبرة حتى في التراكيز المنخفضة.

3 كان المستخلص الأسيتوني والإيتانولي لأشنة E. prunastri الأكثر فاعلية في فطر A. niger، أما الميتانولي فهو الأكثر تأثيراً في A. flavus, ، بينما الكلوروفورم كان أكثر تأثيراً في A. fumigates .

4 تبيّن أن النوع A. niger, أكثر الأنواع الفطرية حساسية تجاه مستخلصات أشنة E. prunastri ، تلاه A. flavus ثم A. fumigatus.

التوصيات:

- دراسة تأثير مستخلصات الأشن في الصفات المورفولوجية و العمليات الحيوية للفطريات المدروسة.
- اختبار الفعالية التثبيطية تجاه فطريات ممرضة أخرى.
- إجراء دراسات أوسع عن مستخلصات الأشن وتحديد طبيعة المركبات الكيميائية التي تحتويها وفصلها لتحديد المادة الفعّالة، وذلك بهدف الحصول على صادات حيوية طبيعية من الأشن السورية بديلة للصادات المستخدمة في الوقت الحالي.

المراجع:

1. AMITANI, R.; MURAYAMA, T.; NAWADA, R.; LEE, W.J.; NIIMI, A.; SUZUKI, K.; TANAKA, E. AND KUZE, F: Aspergillus culture filtrates and sputum sols from patients with pulmonary aspergillosis cause damage to human respiratory ciliated epithelium in vitro. European Respiratory Journal, Japan, Vol. 1, N .8, 1995, 1681-1687.

2. BABIAH, P.S; UPRETI, D.K; JOHN, SA . Assessment of fungicidal potential of lichen Heterodermia leucomelos (L.) Poelt against pathogenic fungi. Current Research in Environmental & Applied Mycology, Vol. 5, N. 2, 2015, 92–100.

3. BABIAH, P. S.; UPRETI, D.K. AND JOHN S.A. An in vitro analysis of antifungal potential of lichen species Parmotrema reticulatum against phytopathogenic fungi. International journal of current microbiology and applied sciences, India, Vol .3, N ,12, 2014, 511-518. (a)

4. BABIAH, P. S.; UPRETI, D.K. AND JOHN S.A. Fungicidal Efficacy of a Foliose Lichen Flavoparmelia caperata (L.) Hale against Phytopathogenic Fungi. Int. J. Curr. Research in bioscences and plant biology, India, Vol.1, N. 5, 2014, 38-44. (b)

5. BASILE, A.; RIGANO D.; LOPPI, S.; DI SANTI ,A.; NEBBIOSO , A.; SORBO, S.; CONTE, B.; PAOLI, L.; DE RUBERTO, F.; MOLINARI , AM.; ALTUCCI, L.; BONTEMPO , P. Antiproliferative, Antibacterial and Antifungal Activity of the Lichen Xanthoria parietina and Its Secondary Metabolite Parietin . Int J Mol Sci, Italy; Vol .16, N.4,2015, 7861-75.

6. BERTOUT, S.; RENAUD, F. ; BARTON, R. ; SYMOENS, F.; BURNOD, J.; . PIENS, M.-A.; LEBEAU, B.; VIVIANI, M.-A.; CHAPUIS, F.; BASTIDE, J.-M.; GRILLOT,R.AND MALLIÉ, M. Genetic polymorphism of Aspergillus fumigatus in clinical samples from patients with invasive aspergillosis: Investigation using multipl typing methods. Journal of Clinical Microbiology, America, Vol . 39, 2001, 1731-1737.

7. BISHT, S.; SHARMA, S.; KUMAR, V.; KUMAR, M.; BISHT, S. S.; AND NAUTIYAL, B.P. Assessment of antimicrobial efficacy of secondary metabolites of lichen species from Uttarakhand temperate Himalayas, India. Journal of Natural Products, India, Vol. 7, 2014, 168-176.

8. CHAKRABARTI, A. Microbiology of systemic fungal infections. J Postgrad Med, India, Vol. 51, N.1, 2005, 16-20.

9. DAGENAIS, T. R.T. AND KELLER, N.P. Pathogenesis of Aspergillus fumigatus in Invasive Aspergillosis. Clinical microbiology reviews, 22(3), 2009, 447–465.

10. DAVARI, E.; MOHSENZADEH, M.; MOHAMMADI, GH AND REZAEIAN-DOLOEI, R. Characterization of aflatoxigenic Aspergillus flavus and A. parasiticus strain isolates from animal feedstuffs in northeastern Iran. Iran J Vet Res. Spring; Vol. 16, N. 2, 2015, 150–155.

11. DIBA, K.; KORDBACHEH, P.; MIRHENDI, SH.; REZAIE, S. AND MAHMOUDI, M.. Identification of aspergillus species using morphological characteristics. Pak. J. Med. Sci. Vol. 23, N. 6, 2007, 867-872.

12. DOBSON, F. Lichens an Illustrated Guide. The Richmond publishing Co. Ltd., England. 2000.

13. DOMSCH, K. A; GAMS, W; ANDERSON, T. H. Compendium of Soil Fungi. (vol1), Academic Press, London, 1980, pp859.

14. FRISVAD, J. C. AND LARSEN, TH.O. Extrolites of Aspergillus fumigatus and Other Pathogenic Species in Aspergillus Section Fumigati. Frontiers in Microbiology, Vol.6, 2016,1-14.

15. FRANDSEN, G. AND PENNINGTON, S. S. Abrams' Clinical Drug Therapy: Rationales for Nursing Practice**.** Lippincott Williams & Wilkins , 10th Edition, 2013, 1176.

16. HEDAYATI, M. T.; PASQUALOTTO, A. C. ;WARN P. A.; BOWYER, P. AND DENNING D. W. Aspergillus flavus: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. Microbiology, Vol.153, 2007, 1677–1692.

17. HOSPENTHAL, D. R. AND RINALDI, M. G. Diagnosis and Treatment of Fungal Infections. 2nd, 2015, Springer, p 299.

18. JOHAN, F. C.T. Aspergillus fumigatus and the human lung. Journal of Ethnopharmacology, India, Vol.110, 1999, 379-390.

19. KARABULUT, G . AND OZTURK, S. Antifungal activity of Evernia prunastri, Parmelia sulcata, Pseudevernia furfuracea var. Furfuracea. Pak. J. Bot., Vol. 47, N. 4, 2015, 1575-1579,

20. KOSANIĆ M. AND RANKOVIĆ B. Lichen Secondary Metabolites Bioactive Properties and Pharmaceutical Potential. Chapter 3. Lichen Secondary Metabolites as PotentialAntibiotic Agents . Springer International Publishing; 2015. p. 81-104.

21. KOSANIC, M.; MANOJLOVIC, N. ; JANKOVIC, S. ; STANOJKOVIC, T. AND RANKOVIC, B. Evernia prunastri and Pseudoevernia furfuraceae lichens and their major metabolites as antioxidant, antimicrobial and anticancer agents. Food and Chemical Toxicology, Vol.53 ,2013, 112–118.

22. KOSANIĆ, M. ; RANKOVIĆ B. AND STANOJKOVIĆ, T. Investigation of selected serbian lichens for antioxidant, antimicrobial and anticancer properties. The Journal of Animal & Plant Sciences, Vol. 23, N. 6,2013, 1628-1633.

23. KOSANIĆ, M; ŠEKLIĆ, D; MARKOVIĆ, S and RANKOVIĆ, B. Evaluation of antioxidant, antimicrobial and anticancer Properties of selected lichens from Serbia. Journal of Nanomaterials and Biostructures, Vol. 9, No. 1, 2014, 273 – 287.

24. LAMOTH, F. Aspergillus fumigatus-Related Species in Clinical Practice. Frontiers in Microbiology, Vol.7, 2016 , p.1-8.

25. MARIJANA, K.; RANKOVI, B. AND SUKDOLAK. S. Antimicrobial activity of the lichen Lecanora frustulosaand Parmeliopsis hyperopta and their divaricatic acid and zeorin constituents. African Journal of Microbiology Research , Vol. 4, N. 9, 2010, 885-890,

26. MALHOTRA, S; SUBBAN, R AND SINGH, A. Lichens- Role in Traditional Medicine and Drug Discovery. The Internet Journal of Alternative Medicine. Vol.5 N. 2, 2007,1-6.

27. MCCLENNY, N. Laboratory detection and identification of aspergillus species by microscopic observation and culture: the traditional approach. J. Med. & Vet. Mycol. Vol. 1, N. 43, 2005, 125-128.

28. MCCORMICK, A.; LOEFFLER, J. AND EBEL, F. Aspergillus fumigatus: contours of an opportunistic human pathogen, Vol. 12, N. 11, 2010, 35-43.

29. MITROVIĆ, T.; STAMENKOVIĆ, S.; CVETKOVIĆ, V.; TOŠIĆ, S.; STANKOVIĆ , M.; RADOJEVIĆ, I.; STEFANOVIĆ, O.; ČOMIĆ, L.; ĐAČIĆ, D ; ĆURČIĆ, M. AND MARKOVIĆ, S. Antioxidant, Antimicrobial and Antiproliferative Activities of Five Lichen Species. International Journal of Molecular Sciences, Vol.12, 2011, 5428-5448.

30. MITROVIĆ, T.; STAMENKOVIĆ, S.; CVETKOVIĆ, V.; Radulović2, n; Mladenović, M ; STANKOVIĆ , M.; Topuzović, M; Radojević3, I ; STEFANOVIĆ, O.; Vasić3, s.; Čomić, L. Platismatia glauca and pseudevernia furfuracea lichens as sources of antioxidant, antimicrobial and antibiofilm agents. EXCLI Journal, Vol.13, 2014:938-953.

31. MÜLLER, G. G.; KARA-JOSÉ, N. AND CASTRO, R.S. Antifungals in eye infections: drugs and routes of administration. Rev Bras Oftalmol, Vol. 72, N. 2, 2013, 32-41.

32. NAYAK, N.; SATPATHY, G; PRASAD,S; PANDEY, R. M; SHARMA, N; CHAWLA, B; TITYAL, J. S AND TANDON, R. In vitro susceptibilities of fungal isolates against amphotericin B and voriconazole in Aspergillus keratitis: A comparative study**.** Journal of Clinical Ophthalmology and Research , Vol. 1 , 2013, 83-86.

33. NENE, Y AND THAPILYAL, L . Poisoned food technique of fungicides in plant disease control .(3rd eds). Oxford and IBH Publishing Company, New Delhi. 2002

34. OKUN, D. O; KHAMIS, F. M; MULUVI, G. M; NGERANWA, J. J; FIDELIS, O; YONGO, M. O. AND KENYA, E. U. Distribution of indigenous strains of atoxigenic and toxigenic Aspergillus flavus and Aspergillus parasiticus in maize and peanuts agro-ecological zones of Kenya. Agric & Food Secur, Vol. 4, N. 14,2015, 1-10.

35. ÖZ, YASEMIN.; O ̈ ZDEMIR , H. G.; GO ̈KBOLAT, E.; KIRAZ, N.; ILKIT, M. AND SEYEDMOUSAVI S. Time-Kill Kinetics and In Vitro Antifungal Susceptibility of Non-fumigatus Aspergillus Species Isolated from Patients with Ocular Mycoses. Mycopathologia, V.181, 2016, 225–233

36. PADHI , S .; TAYUNG, K. In vitro antimicrobial potentials of endolichenic fungi isolated from thalli of Parmelia lichen against some human pathogens. Basic and applied sciences, V. 4, 2 0 1 5, 299–306.

37. PERRONE, G.; GALLO, A, AND LOGRIECO, A. F. Biodiversity of Aspergillus section Flavi in Europe in relation to the management of aflatoxin risk. Food Microbiology, Vol.5, 2014,1-5.

38. PURVIS, O.W.; COPPINS, B.J.; HAWKSWORTH, D.L.; JAMES, P.W.; MOORE, D.M.. The lichen flora of Great Britian and Ireland. Publications in association with the British Lichen Society, London, Natural History Museum. 1992

39. RAMYA, K. AND THIRUNALASUNDARI, T. Pharmaceutically relevant metabolites from Lichens of Kodaikanal, India. Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci, Vol. 3, N. 11, 2014, 779-788.

40. RANKOVIĆ, B ; KOSANIĆ, M ; STANOJKOVIĆ, T ; VASILJEVIĆ, P. AND MANOJLOVIĆ, N. Biological Activities of Toninia candida and Usnea barbata Together with Their Norstictic Acid and Usnic Acid Constituents. International Journal of Molecular Sciences., Vol.13, 2012, 14707-14722.

41. RANKOVIC, B.; KOSANIC, M.; MANOJLOVIC, N.; RANCˇIC, A . AND STANOJKOVIC, T. Chemical composition of Hypogymnia physodes lichen and biological activities of some its major metabolites. Med Chem Res, Vol.23, 2014, 408–416.

42. RANKOVIĆ, B. R; KOSANIĆ M. M; STANOJKOVIĆ T.P. Antioxidant, antimicrobial and anticancer activity of the lichens Cladonia furcata, Lecanora atra and Lecanora muralis. BMC Complementary and Alternative Medicine, Vol. 11, N. 97,1-8, 2011.

43. SALANO, E. N. Y; OBONYO , M. A; TOROITICH, F. J; ODHIAMBO, B . O. AND AMAN, B. O. Diversity of putatively toxigenic Aspergillus species in maize and soil samples in an aflatoxicosis hotspot in Eastern Kenya. African Journal of Microbiology Research. Vol. 10, N. 6, 2016, 172- 184.

44. STOJANOVIĆ, I ; RADULOVIĆ, N; CVETKOVIĆ, V; MITROVIĆ3, T AND SLAVIŠA STAMENKOVIĆ. Antimicrobial activity of methanol extracts of four parmeliaceae lichen species. Physics, Chemistry and Technology , Vol. 11, N. 1, 2013, 45 – 53.

45. SZIGETI, G; KOCSUBE, S ; DOCZI, I; BERECZKI; L; VAGVOLGYI, C. AND VARGA, J. Molecular Identification and Antifungal Susceptibilities of Black Aspergillus Isolates from Otomycosis Cases in Hungary. Mycopathologia , Vol.174, 2012,143–147.

46. TIWARI, P.; RAI, H.; UPRETI, D.K.; TRIVEDI, S. AND SHUKLA, P. Antifungal Activity of a Common Himalayan Foliose Lichen Parmotrema tinctorum (Despr. ex Nyl.) Hale. Nature and Science, Vol. 9, N. 9, 2011, 167-171.

47. TIWARI, P.; RAI, H.; UPRETI, D. KUMAR.; TRIVEDI, S. AND SHUKLA; P. Assessment of Antifungal Activity of Some Himalayan Foliose Lichens against Plant Pathogenic Fungi. American Journal of Plant Sciences, 2, 2011 , 841-846.

48. YANG, Y; NGUYEN, TH. TH; JEONG, M; CRIŞAN, F; YU, Y. H; HA, H; CHOI, K. ; JEONG5, H. G; JEONG, T. CH; LEE, K. Y; KIM, K. K; HUR, J AND KIM, H . Inhibitory Activity of (+) Usnic Acid against Non-Small Cell Lung Cancer Cell Motility. Journal PLoS ONE, Korea, Vol. 11, N. 1, 2016,1-16.