تأثير مجموعة من المستخلصات النباتية ضد بكتريا
Staphylococcus aureus و *Klebisella pneumonia*

نبراس يحيى عبدالله
كلية العلوم / جامعة الكوفة

الخلا صة

هدف البحث الى دراسة تأثير المركبات الفعالة المستخلصة بالماء البارد من بذور نبات السماق و نبات الشلغم وعصير الليمون (الحلو والحامض) في تثبيط نمو بكتريا *Staphylococcus aureus* و *Klebsiella pneumonia* خارج الجسم الحي .

ومن دراسة تأثير المستخلصلت المائية للسماق والشلغم وعصير الليمون (الحلو والحامض) في نمو البكتريا وجد أن عصير الليمون الحامض كان أشد تأثيرا من المستخلص المائي للسماق في تثبيط نمو البكتريا ، اما المستخلص المائي للشلغم وعصير الليمون الحلو فلم يعط أي منهما تأثيرا مثبطا لنمو البكتريا .

وأوضحت التجربة أن اقل تركيز مثبط لنمو بكتريا *Staph.aureus* (MIC) كان لعصير الليمون الحامض اذا بلغت قيمته 3.12 ملغم/مل وقيمة التركيز القاتل (MBC) 6.5 ملغم/مل ،اما اقل تركيز مثبط لنمو بكتريا *Kle.pneumonia* فقد كان للمستخلص المائي للسماق أذ بلغت قيمته 6.25 ملغم/ مل أما قيمة التركيز القاتل الأدنى (MBC) فقد كانت 12.5 ملغم / مل ، وأعطى مزيج المستخلص المائي للسماق وعصير الليمون الحامض عند النسب (0.75+0.50) و (0.75 + 0.75) فعالية تضادية لنمو بكتريا *Staph.aureus* واعطى نفس المزيج فعالية تضادية لنمو بكتريا *Kle.pneumonia* عند النسبه (0.75 + 0.75) .

المقدمة :

تعد الأدوية المضادة للأحياء المجهرية Antimicrobial drugs من أهم اكتشافات الباحثين خلال القرن العشرين اذ انها قللت من نسب الوفيات بدرجة كبير ة كما انها عالجت الكثير من المشاكل الصحية الناتجة عن الأحياء المجهرية ، الا أنه في أواخر القرن اثبتت الدراسات أن الجراثيم بأمكانها أن تكتسب المقاومة لمثل هذه الأدوية بعد عدة اجيال ، أذ انها تنقل جينات المقاومة فيها فيما بينها وأستنتج العلماء ان التعاطي المفرط لمثل هذه الأدوية هو السبب الأساسي لظهور السلالات المقاومة للأدوية (Uwaezuoke and Aririatu , 2004).

أن ظهور وأنتشار المقاومة للمضادات الحيوية بين الجراثيم الموجبة لصبغة كرام والسالبة لها دفع الباحثين المهتمين بمجال العلاج الى اكتشاف بدائل علاجية للمضادات الحيوية ومن هذه البدائل النباتات الطبية وما تحتويها من مكونات فعالة مضادة للجراثيم مثل الفينولات Phenols والقلويدات Alkaloids والفلافونويدات Flavonoids والزيوت الأساسية Essential oils والراتنجات والعفصيات وغيرها من المواد الطبيعية التي اكدت جدارتها في علاج الأخماج الجرثومية فضلا عن أنه لاتوجد بحوث تؤكد امكانية الجراثيم على اكتساب صفة المقاومة لمثل هذه المكونات الفعالة (Essawi and Srour , 2000).

أتجهت الدراسات في السنوات الأخيرة الى التحري عن التأثير الحياتي للنباتات الطبية في الجراثيم المرضية ولاسيما السلالات ذات المقاومة المتعددة Multiple Drug Rrsistant مثل جرثومة *Klebsiella pneumonia* وحصل الباحثون على نتائج واضحة حول تأثير المركبات الفعالة لهذه النباتات في النمو البكتيري ، وأجريت هذه الدراسات على مجموعة من النباتات هي الشلغم والسماق والليمون الحامض والليمون الحلو والتي اختيرت اعتمادا على استخدامها في الطب الشعبي فمثلا تستعمل بذور نبات السماق كمضاد بكتيري ويعتبر كمادة قابضة ولذلك يستعمل في علاج الأسهال وفي علاج الدزنتري ومضاد للأعفان ومضاد للفايروسات ومقوي للكبد كما يعمل على حمايته ومسكن للآلام وفي علاج التقرحات (Duke *etal*. ,2003)في حين يستعمل الليمون الحامض كمادة مقوية ومنقية للدم وخافض للحرارة ومنشط لكريات الدم البيض ومدرر للبول ومخفض للضغط الدموي ومضاد للروماتيزم ويعالج الزكام والرشح والصداع والتهاب المجاري البولية ويستعمل في علاج الأسقربوط كما ان له تأثير فعال في تثبيط النمو البكتيري والفطري . (Chevallier,1996; Rudolf and Volker ,2000)

وقد هدف هذا البحث الى :ـ

1ـ دراسة الفعالية الحيوية للمواد الفعالة المستخلصة بالماء لنباتي الشلغم والسماق وكذلك عصير الليمون الحامض والحلو .

2ـ تحديد قيمة التركيز المثبط الأدنى MIC وقيمة التركيز المبيد الأدنى MBC للمستخلصات النباتية .

3ـ دراسة تأثير مزيج المستخلصات الفعالة ضد الجرثومتين قيد الدراسة .

المواد وطرائق العمل :

تم الحصول على عصير الليمون الحلو والحامض بنوعيه من عصر النبات الطازج بشكل مباشر والأحتفاظ به في الثلاجة لحين الأستعمال ، اما بالنسبة لنبات الشلغم فقد تم غسل الشلغم ومن ثم تقشيره وهرسه وقد حضر المستخلص المائي حسب طريقة (1994) Hernandez *et al.* كما حضر المستخلص المائي البارد لبذور السماق المطحونة بنفس الطريقة المستعملة لنبات الشلغم .

وتم اجراء الأختبارات التشخيصية التأكدية بنوع البكتريا والتي تم الحصول عليها من مختبرات مستشفى الصدر التعليمي .

دراسة تأثير المستخلصات النباتية في نمو البكتريا

تم دراسة تأثير الستخلصات النباتية في نمو البكتريا بطريقة الحفر وكما يلي :-

طريقة الأنتشار بالأكار :

اتبعت طريقة الأنتشار بالأكار بواسطة الحفر well(1985, Egrove) في اختبار حساسية البكتريا للمستخلص النباتي ، نشر o.1 مل من العالق البكتيري (لكل نوع من انواع البكتريا المستعملة في الدراسة) على الوسط ثم عمل 5 حفر بأقطار متساوية في الوسط Muller-Hinton الصلب وبقطر 6 ملم بواسطة الثاقب الفليني (Corkborer) وأضيف0.1 مل من المستخلص لكل حفرة من الحفر الأربعة ، ومن ثم تركت الأطباق لمدة 5-4 ساعات لأنتشار محاليل النباتات في الوسط الزرعي ثم حضنت بدرجة 37 م لمدة 24 ساعة قرأت النتيجة بقياس منطقة التثبيط Inhibition zone بواسطة المسطره المدرجة وقد كان تركيز العالق في كل عملية زرع من العمليات السابقة هو 1.5×10خلية /مل .

تحديد قيمة تركيز المثبط الأدنى MIC والتركيز القاتل الأدنى MBC

حضرت سلسلة من التراكيز (1.56 , 3.12 , 6.25 , 12.56 , 25 , 50) ملغم/ مل للمستخلصات ذات الفعالية المضادة في نمو بكتريا *Staph.aureus* و *Kle.pneumonia* ، حيث اخذ 0.1 مل من التركيز الأول واضيف الى انبوبة معقمة حاوية على 5 مل من الوسط الزرعي Nutrient broth ونقل 2.5 مل من المزيج (الوسط + المستخلص) الى انبوبة اخرى حاوية على 2.5 مل من الوسط السائل بحيث اصبح التركيز 25 ملغم / مل وهكذا الى الأنبوب السادس على التوالي وكان التركيز فيه 1.56 ملغم / مل .

بعدها لقحت الأنابيب Loop full من العالق البكتيري المقارن بانبوبة ماكفرلاند 0.5 وفضلا عن العالق ذلك تم تحضير انبوبتي سيطرة الأول مشتمل على مستخلص فقط بدون عالق بكتيري والآخر يحوي العالق الجرثومي بدون مستخلص ، وكررت هذه العملية لجميع المستخلصات التي لها تأثير مضاد في نمو كلا النوعين من البكتريا . بعدها حضنت الأنابيب لمدة 24 ساعة بدرجة 37 م وسجلت نتائج MIC على اساس ظهور العكورة Turbidity نظريا وعمليا وذلك بالزرع من كل الأنابيب التي لم تظهر فيها عكورة (نمو جرثومي) على اطباق معقمة حاوية على الوسط المغذي Nutrient agar الصلب وحضنت بدرجة 37 م لمدة 24 ساعة للتأكد من التركيز الذي لم يحدث فيه نمو جرثومي وعد التركيز الذي يقضي على الجاثيم نهائيا هو (MBC) (Working party report , 1991) .

اختبار حساسية البكتريا لمزيج المستخلصات النباتية

تم مزج محاليل المستخلصات التي اعطت فعالية في تثبيط نمو بكتريا *Kle.pneumonia* و *Staph.aureus* (وتشمل المستخلص المائي البارد لنبات السماق وعصير الليمون الحامض) مع بعضها بحيث نحصل على البسب الآتية :

(0.25 +0.25) ، (0.50 + 0.25) ، (0.75 + 0.25) ، (0.25 + 0.50) ، (0.50 + 0.50) ، (0.50 + 0.75) ، (0.25 + 0.75) ، (0.75 +0.50) و(0.75 + 0.75) .

أضيف كل محلول والذي يمثل احد النسب المذكورة الى انبوبة حاوية على 2.5 مل من الوسط المغذي السائل ثم اضيف اله 0.1 مل من العالق الجرثومي المقارن بأنبوبة ماكفرلاند رقم0.5 وحضنت لمدة 24 ساعة بدرجة 37 م (Collee , et , 1996) أخذ بواسطة Loop full من الزرع الجرثومي مع المزيج وتم زرعها بطريقة التخطيط على وسط الأكار الصلب وحضنت لمدة 24 ساعة بدرجة 37 م ثم سجلت النتائج على اساس ظهور او عدم ظهور النمو البكتيري (Garrod *etal.*,1968) .

النتائج والمناقشة

أظهرت نتائج التجربة وجود تأثيرات متباينةللمركبات الفعالة لنباتات السماق والشلغم والليمون الحامض والليمون الحلو في نمو بكتريا *Staph. aureus* و *Kle. Pneumonia* بمستوى أحتمالية $P < 0.05$

عصير الليمون الحامض أشد تاثيرا من المستخلص المائي للسماق في تثبيط نمو البكتريا اذ بلغ معدل قطر التثبيط لعصير الليمون الحامض 15.4ملم اما المستخلص المائي للسماق فقد بلغ معدل قطر التثبيط 13.6 ملم ، في حين لم يعطي أي من المستخلص المائي للشلغم والليمون الحلو أية فعالية تثبيطية (شكل 1) .

كما لوحظ من الدراسة وجود فروق بين الجرثومتين في مدى تحسسها لكل نوع نباتي ،فبالنسبة لعصير الليمون الحامض لوحظ ان بكتريا *Staph.aureus* كانت اكثر تحسسا من بكتريا *Kle.pneumonia* أذ بلغت معدلات

الأقطار التثبيط 17.4 ملم و 13.25 ملم على التوالي (شكل 2) ، أما بالنسبة للمستخلص المائي للسماق فقد لوحظ ان بكتريا *Kle.pnumonia* كانت اكثر تحسسا من بكتريا *Staph.aureus* أذ بلغت معدلات أقطار التثبيط 15 ملم و 12.3 ملم على التوالي (شكل 3).

كما أظهرت نتائج الدراسات وجود تباين واضح لعامل التركيز المستعمل في التأثيرعلى نمو البكتريا أذ أن التركيز المستعمل زاد من التأثير في تثبيط نمو البكتريا (شكل 4) . اما فيما يخص التداخل بين العوامل المدروسة الثلاثة (نوع النبات ، نوع البكتريا ، التراكيز) يتضح أن اعلى معدل قطر تثبيط كان من تداخل تأثير عصير الليمون الحامض في نمو بكتريا *Staph.aureus* عند التركيز 100 ملغم / مل اذ بلغ 2.5 ملم وأقل معدل قطر تثبيط كان لعصير الليمون الحامض في نمو بكتريا *Kle.pneumonia* عند التركيز 50 ملغم / مل أذ بلغ 10.5 ملم ، في هذه التداخلات نلاحظ اته كلما ازداد التركيز ازداد معدل قطر التثبيط فعصير الليمون الحامض اعطى تأثيرا مثبطا لنمو بكتريا *Staph.aureus* عند تركيز 50ملغم / ملم وقد بلغ معدل قطر التثبيط 14.3 ملم وزاد هذا التأثير عند تركيز 100 ملغم / مل وأصبح معدل قطر التثبيط 20.5 ملم ، كذلك بالنسبة لبكتريا *Kle.pneumonia* فقد بلغ معدل قطر التثبيط 10.5 ملم عند تركيز 50ملغم /ملم وزاد معدل قطر التثبيط عند تركيز 100 ملغم / ملم يصل الى 16 ملم ، اما بالنسبة للمستخلص المائي للسماق فقد أعطى فعلا تثبيطيا لبكتريا *Staph.aureus* عند تركيز 50 ملغم / مل وقد بلغ معدل قطر التثبيط 10.7 ملم وزاد هذا التأثير عند تركيز 100 ملغم / مل ليصل الى 10.7 ملم كذلك بالنسبة لبكتريا *Kle.pneumonia* فقثد بلغ معدل قطر التثبيط 12ملم عند تركيز 50ملغم / مل وزاد معدل قطر التثبيط عند تركيز 100 ملغم / مل ليصل الى 18 ملم (جدول 1).

ان فعالية عصير الليمون الحامض والسماق تعود الى احتوائها على نسبة من الحوامض وخصوصا الليمون وبالتالي فأن قيمة ال PH سوف تتجه نحو الحامضية وأن قيمة ال PH هذه ستؤثر على شحنة الحوامض الأمينية المكونة للبروتينات المتداخلة مع الببتيدوكلايكان المكونة لجدار الخلية البكتريا كما وأنه يؤثر على المواقع الفعالة لأنزيمات الجدار مما يؤدي الى حدوث خلل في وظائف الأنزيمات (Atlas,1995) .

كذلك يحتوي الليبمون على نسبة عالية من القلويات والتي تعمل على التداخل مع التفاعلات الأيضية اللازمة لنمو البكتريا (Tegos *et al* , 2002) كذلك يحتوي السماق على المواد التانينية والتي تتميز بكونها لها فعالية تثبيطية لنمو البكتريا بالأضافة الى أحتوائه على مواد مضادة للجراثيم والمتمثلة ب Myricetin وال Oxyguercetin (AL – Rawi and chakravarty ,1988) .

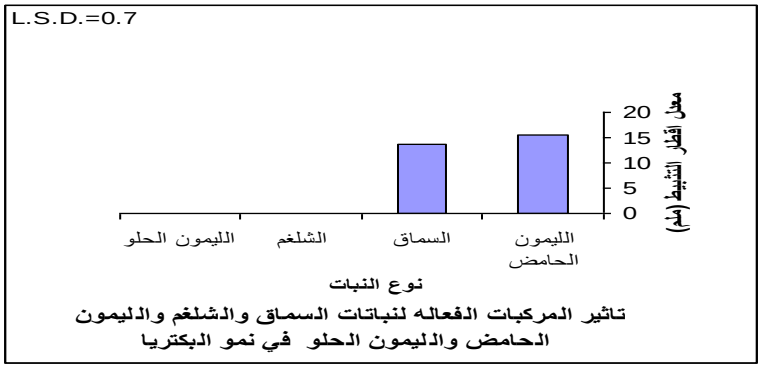
تحديد التركيز المثبط الأدنى (MIC) والتركيز القاتل ألأدنى (MBC) لمستخلص نبات السماق وعصير الليمون الحامض:.

أظهرت النتائج أن قيمة التركيز المثبط الادنى (MIC) والتركيز القاتل الادنى (MBC) تتفاوت أعتمادا على نوع النبات و البكتريا (جدولي 2و 3)

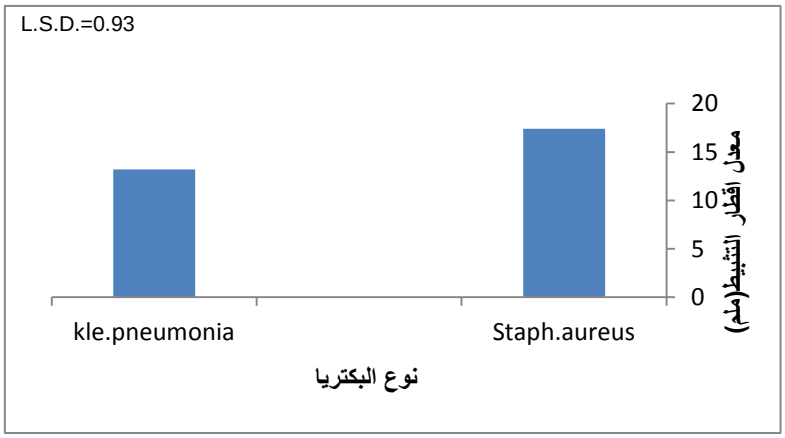
فبالنسبة لعصير الليمون الحامض وجد ان قيمة (MIC)ابكتريا *Staph. aureus* كانت 6.25ملغم/مل وقيمة (MBC) 12.5 ملغم/مل وقيمة (MIC) لبكتريا *Kle. Pneumonia* كانت 12.5ملغم/مل وقيمة (MBC) 25 ملغم/مل ، أما بالنسبة للمستخلص المائي لنبات السماق فقد كانت قيمة (MIC) لبكتريا *Staph. aureus* كانت 25 ملغم/مل وقيمة (MBC) 50ملغم/مل وكانت قيمة (MIC) لبكتريا *Kle. Pneumonia* 12.5ملغم/مل وقيمة (MBC) 25 ملغم/مل ، أما المستخلص المائي لنبات السماق فقد كانت قيمة لبكتريا (MIC) *Staph.aureus* كانت 2.5 ملغم / مل وقيمة (MBC) 50 ملغم/مل وكانت قيمة (MIC) لبكتريا *Kle.pneumonia* كانت 12.5 ملغم /مل وقيمة (MBC) 25 ملغم / مل .

تأثيرمزيجات المستخلصات في نمو البكتريا .

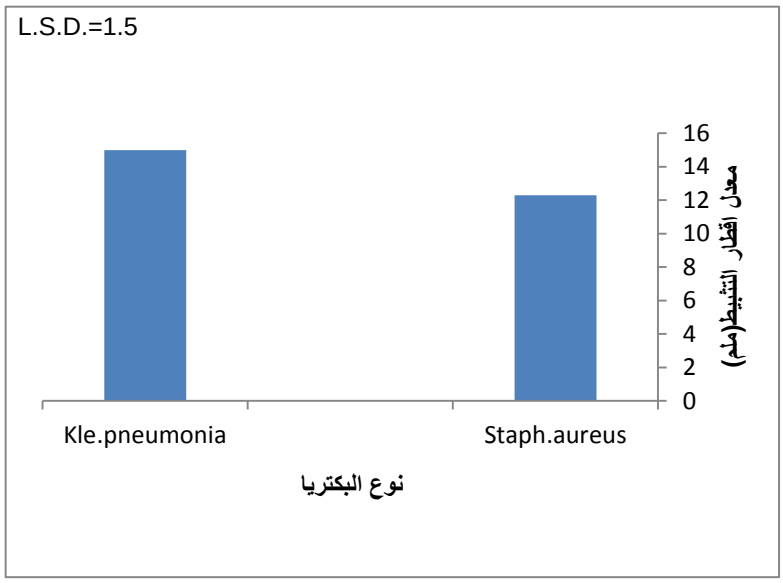
أظهرت نتائج الدراسة أن مزيج المستخلص المائي للسماق + عصير الليمون الحامض لم يعطي فعالية عالية ضد نمو بكتريا *Staph.aureus* أذ ان البكتريا كانت مقاومة لأغلب ولم تتحسس الا عند النسبة (0.75 + 0.75) كذلك بالنسبة لبكتريا *Kle.phermonia* فقد اظهرت هذه البكتريا مقاومة لجميع النسب تقريبا ما عدا النسبة (0.75 + 0.75) فقد كانت حساسة لها (جدول 4 , 5 على التوالي) ، أن سبب هذه المقاومة التي أبدتها البكتريا لأغلب نسب المزيج يعود الى عدم حدوث تآزر بين المركبات الفعالة في التباين والذي يزيد من فعالية المزيج في تثبيط البكتريا



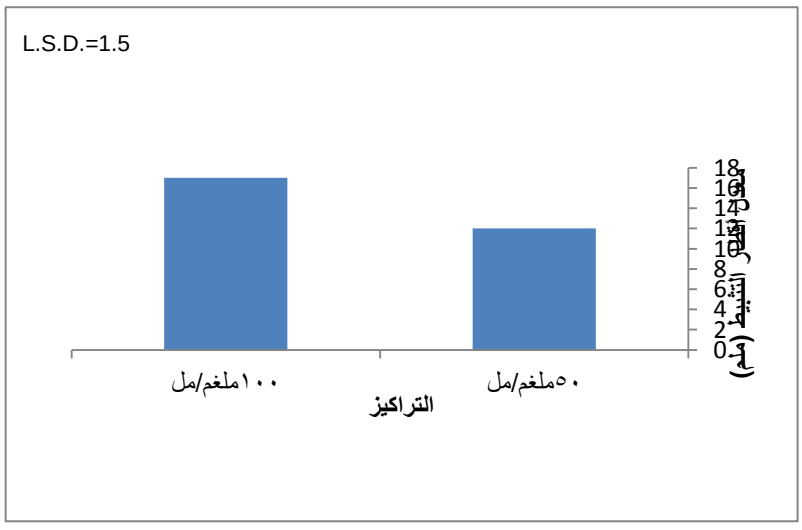
تاثير المركبات الفعاله لنباتات السماق والشلغم والليمون الحامض والليمون الحلو في نمو البكتريا



تاثير عصير الليمون الحامض في نمو البكتريا



تاثير المستخلص المائي للسماق في نمو البكتريا



تأثير تراكيز المستخلص المائي للسماق وعصير الليمون الحامض في نمو البكتريا

جدول (1) تأثيرتداخل تراكيز المستخلص المائي للسماق وعصير الليمون الحامض في نمو بكتريا Staph. *aureus* و *Kle. pneumonia*

نوع النبات	نوع البكتريا	التراكيز ملغم /مل	**معدل اقطار التثبيط ملم**
الليمون الحامض	***Staph.aureus***	**50**	14.3
		100	20.5
	Kle.pneumonia	**50**	10.5
		100	16
السماق	***Staph.aureu***	**50**	10.7
		100	13.7
	Kle.pneumoni	50	12
		100	18

L.S.D. لنوع النبات = 0.70 ، L.S.D. لنوع البكتريا =1.2 L S.D. للتراكيز = 1.5 ، L.S.D للتداخل = 1.6

جدول (2) قيمة التركيز المثبط الادنى MIC وقيمة التركيز القاتل الادنى MBC للمستخلص المائي للسماق

التراكيز (ملغم/مل) نوع البكتريا	1.6	3.12	6.25	12.5	25	**50**
Staph. aureu	+	+	+	+	–	–
Klp. pneumonia	+	+	+	–	–	–

جدول (3) قيمة التركيز المثبط الادنى MIC وقيمة التركيز القاتل الادنى MBC لعصير الليمون الحامض

التراكيز (ملغم/مل) نوع البكتريا	1.6	3.12	6.25	12.5	25	**50**
Staph. aureus	+	+	–	–	–	–
Kle. pneumonia	+	+	+	–	–	–

جدول (4) تأثير مزيجات عصير الليمون الحامض والمستخلص المائي للسماق في نمو بكتريا *Staph. aureus*

اليمون الحامض السماق	0.25	0.50	**0.75**
0.25	+	+	+

+	+	+	0.50
—	—	+	**0.75**

جدول (5) تأثير مزيجات عصير الليمون الجامض والمستخلص المائي للسماق في نمو بكتريا *Klebsiella pneumonia*

الليمون الحامض السماق	0.25	0.50	**0.75**
0.25	+	+	+
0.50	+	+	+
0.75	+	+	—

المصادر

Al-Rawi, A. & Chakravarty, H.L.(1988). Medical plant of Iraq. 2n edition , Ministry of Agriculture and Irrigation . Baghdad .Iraq .

Atlas, R.M. (1995). Principles of Microbiology. Mosby-Year book, Inc., St. Louis: 888 pp .

Chevallier, A.(1996). *The Encyclopedia of Medicinal Plants* Dorling Kindersley. London ISBN 9-780751-30314
An excellent guide to over 500 of the more well known medicinal herbs from around the world

Duke JA.;JoBogenschutz-Godwin M.;DuCellier J. and Duke P-K.(2003). CRC

Handbook of Medical Plant . CRC.

Egorove , N. S. (1985) . Antibiotics Scientific Approach. Mirpublishers. Moscow.

Essawi, T. and Srour, M. (2000). Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity, J. Ethnopharmacol. 70 : 343 – 349

Garrod , L. P. ; Lambert , H. P. and O'Grady , F. (1968) . Antibiotic and Chemotherapy . 4th ed. Churchiy Living Stone .Inc. Edinburgh , London and New York.

Hernandez , M. ; Lopez , R. ; Abanas , R. M. ; Paris , V. and Arias , A. (1994) .

Antimicrobial activity of *Visnea* *mocanera* Leaf extracts . J. Ethnopharmacology , 41 ; 115-119.

Rudolf, F.W. & Volker, F.(2000). Herbal Medicine . 2nd ed., revised And expanded

Tegos, G.; Stermilz, F.R.; Lomovskaya, O. & Lewis, K. (2002). Multidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials. Antimicrob. Agents Chemother., 46 (10): 3133-3141.

Uwaezuoke, J. C. and Aririatu, L. E. (2004). A survey of antibiotic resistant *Staphylococcus aureus* strains from clinical sources on Owerri, J. Appl. Sci. Environ., 8 (1) : 67 – 69.) .

Working Party the British Society for Antimicrobial Chemotherapy . (1991) . A guide to antibiotic sensitivity testing . J. Antimicrob. Chemothe ., 27 (Suppl. D) : 1-50 .

Effect of some plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumonia*

The aim of this experiment was to detect the effect of active compounds which extracted by water from seeds of *Rhus coraria* , *Brassica rapa* . juice of *Citrus limon* and juice of *Citrus limetta* in growth inhibition of *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumonia* in vitro .

It was found from this study that the juice of C.*limon* has higher effective than the aqueous extrat of *R.coraria* in inhibition of bacterial growth while neither aqueous extract of *B.rapa* nor juice of C.*limetta* gave any inhibition effect on bacteria .

Also this study show the lowest value of MIC of *Staph.aureus* was obtained by juice of *C.limon* which was 3.12 mg/ml and MBC was 6.25 mg/ml , while the lowest value of MIC of *Kle.pneumonia* was obtained by aqueous extract of *R.coriaria* which was 6.25 mg/ml and MBC was 12.5 mg/ml. The mixture of juice of *C.limon* andaquous extract of *R.coriaria* gave antagonistic activity against *Staph.aureus* at (o.75 +0.50) and (0.75 +0.75) , and the same mixture gave antagonistic activity against *Kle.pneumonia* at (0.75 +0.75) .