دراسة حساسية بعض البكتريا المعزولة من اصابات تنفسية في الإنسان لبعض المستخلصات النباتية

كفاح عودة الجبوري، بان صاحب الناصري وهناء صالح عبد علي
كلية الطب البيطري/ جامعة بغداد

الخلاصة

تم في هذه الدراسة مقارنة الكفاءة التثبيطية لأربعة من المستخلصات النباتية الكحولية والمائية وهي: مستخلص الفول السوداني، الحلبة، الحبة الحمراء والكافور مع بعض المضادات البكتيرية الشائعة ضد مجموعة من العزلات الجرثومية هي: اثنان من البكتريا السالبة لصبغة كرام هي: *Actinobacillus lignieresii* والزوائف الزنجارية *Pseudomonas arigenosa* ، وثلاثة عزلات موجبة لصبغة الكرام هي: *Staphylococcus aureus* و *Streptococcus pneumoniae* و *Lactobacillus spp* من مرضى التهابات القناة التنفسية.

أظهر تالدراسة كفاءة المستخلص الكحولي للكافور تجاه جميع أنواع البكتريا المعزولة سواء الموجبة أو السالبة لصبغة كرام، وكانت بذور الحبة الحمراء أكثر فعالية ضد جرثومة المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* وسجلت أعلى قطر تثبيط في التجربة وهو 20 ملم فيما لم تكن لها فعالية تذكر تجاه العديد من الجراثيم الأخرى مثل عصيات القولون *Escherichia. coli* .

أمابالنسبة إلى مستخلصات الحلبة فقد أحدثت تثبيطاً متميزاً ضد جرثومة الـ*Staphylococcus aureus* و المكورات السبحية الرئوية *Streptococcus pneumoniae* اما بالنسبة لمستخلص الفول السوداني فقد كانت له نتائج تثبيطه أقل بكثير مقارنة بالمستخلصات الأخرى إذ لم يعطِ المستخلص المائي له أي كفاءة تثبيطية.

Study of the sensitivity of some pathogenic isolated from respiratory infection in human against same plant extracts

K. A. Al- Jboriy, B. S. Al- Anasary and H. S. A. Ali
College of Veterinary Medicine\ University of Baghdad

Abstract

In this study a comparison between alcoholic and aqueous extracts of four types plants was done in a point of bacterial growth inhibition.

These plants were *Archis hypogaea, Lepidium sativum, Cinnomomum camphora* and *Trigonella gracaecum.*

The results showed the efficiency of alcoholic extract of *Cinnomomum camphora* against all types of bacterial isolates in which they are: tow Isolates of gram positive bacteria: *Actinobacillus lignieresii* and *Pseudomonas arigenosa and* three isolates of gram negative bacteria: *Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumoniae* and *Lactobacillus spp.*

While *Lepidium sativum* extract was more efficient against *Staph. aureus* with a zone of inhibition 20 mm in diameter, but with no efficiency against other intestinal isolate such as *E. coli.*

Trigonella gracaecum extract showed good ability of inhibition against *Stuph. aureus* as well as *Strept. Pneumoniae*.

Archis hypogaea extract showed less bacterial inhibition except against *strept. pneumoniae*.

المقدمة

إن الفشل المتزايد في العلاجات الكيميائية للمسببات المرضية أدى إلى إيجاد بدائل عديدة منها الأعشاب والنباتات الطبية وذلك لفعاليتها ضد الأحياء المجهرية، لقد توجه العديد من الناس الآن إلى استعمال الأعشاب الطبية بسبب الآثار الجانبية والتكلفة الباهظة للأدوية الكيميائية المصنّفة فضلا عنظهور المقاومة الميكروبية للمضادات الحيوية، وا يجاد علاجات طبيعية لتقوية المناعة، وا نّ ازدياد مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية سجل في كل أنحاء العالم(1، 2).

إ نّ الاستعمال المتكرر والخاطئ للمضادات الحيوية ضد الجراثيم أد ى إلى ظهور مقاومة لهذه الادويةوانّ حساسية المسببات المرضية للمضادات الحيوية يختلف مع الوقت والموقع الجغرافي ولذا فمن الضروري دراسة حساسية العزلات للمضادات الحيوية(3).

ينتمي الفول السوداني *Archis hypogaea* إلى عائلة Fabaceae ويتركب كيميائيا من حامض بالمتك (Palmitic acid) وحامض الاولك (Oleic acid)، وبروتين، وفيتامين B_1 وB_2 و B_6، ويحوي الليسثين (Lecithin)، ومن استعمالاته العلاجية: للربو وآلام البطن والتهاب القصبات والإمساك(4). أما نبات الحلبة *Trigonella gracaecum* فهو معروف بخصائصه العلاجية، إذ يقلل نسبة السكر بالدم، ويعتبر مضاد ميكروبي ومضاد للالتهابات ومضاد للتقيؤ، وتعود الحلبة إلى العائلة البقولية Legaminaseae، وتحتوي على اللسيثين والكولين الذي يساعد في إذابة الكولسترول والمواد الدهنية، ويحوي معادن وفيتامين B المركب وحديد وفوسفات و(PABA) Para Amino Benzoic Acid وفيتامين A و D، ويحوي أيضاً نيورين (Neurin) وبايوتين (Biotin) و Trimethylamine الذ ي يحفز الشهية(5).

تعود الحبةالحمراء *Lepidium sativum* لعائلة Barassicaceae وتحتوي بذورها على مركبات كيميائية عدّة منها الفا– توكوفيرول (alpha-tocopherol) وحامض الاسكوربك (Ascorbic acid) و alpha-isothiocyante وبيتاستوسيترول (Beta-sitosterol) واليود ونياسين و حامض لينولك (Lenoleic acid) (4).

وأشار رضوان وجماعته (6) إلى احتواءالحبة الحمراء على الفلافونويدات (Flavonoids) والكومارين (Coumarins) و كلايكوسيدات الكبريت (Sulphur glycosides) والتربينات الثلاثية (Triterpenes) وسيترول وقلويدات (Alkaloids).

ينتمي الكافور *Cinnomomum camphora* إلى العائلة الفلفية Riperaceae إنّ زيت الكافور له فعالية تثبيطية لنمو الفطريات، ويلعب دوراً مهماً بامتلاكه تأثيراً معاكساً للتهيج (Counter irritant) (7).

لقد صممت هذه الدراسة من اجل ايجاد بدائل للمضادات الحيوية من المستخلصات النباتية والتي يمكن استعمالها كمواد مثبطة للبكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام.

المواد وطرائق العمل

1. **البكتريا المستخدمة:** استخدمت خمسة عزلات بكتيرية عزلت من 25 من مرضى الإصابات التنفسيةالذين يراجعون العيادة الخارجية في مستشفى اليرموك التعليمي في مدينة بغداد، ضمت اثنان من البكتريا السالبة لصبغة كرام هي: *Actinobacillus lignieresii* والزوائف الزنجارية *Pseudomonas arigenosa* ، وثلاثة عزلات موجبة لصبغة الكرام هي: *Staphylococcus aureus* و *Streptococcus pneumoniae* و *Lactobacillus spp*.

2. **الأوساط الزرعية المستخدمة:** تم تحضير جميع الأوساط الزرعية حسب تعليمات الشركات المصنعة لها.

ت	اسم الوسط الزرعي	اسم الوسط بالانكليزي	اسم الشركة المنتجة	الغرض من استعماله
1	وسط فول الصويا الصلب	Tryptic Soy Agar	Oxoid	لتنمية العزلات
2	وسط الماكونكي	MacConkey agar	Merck	الكشف عن تخمر سكر اللاكتوز
3	وسط اساس الدم الصلب	Blood Agar base	Merck	الكشف عن تحليل كريات الدم الحمراء
4	وسط مولر هنتون الصلب	Muller Hinton agar	Oxoid	اختبار الحساسية
5	وسط مرق فول الصويا	Tryptic soy broth	Oxoid	لتنمية العزلات
6	وسط مرق اليوريا	Urea Broth	Difco	تحلل اليوريا
7	وسط مرق النايتريت	Nitrate broth	Difco	ختزال املاح النترات
8	وسط ماء الببتون	Pepton water	Difco	الكشف عن اختبار الاندول
9	مرق المثيل الاحمر والفوكس بروسكاور	MR- VP broth	Difco	استخدام سكر الكلوكوز– إنتاج الأحماض العضوية
10	وسط الحركة	Sulphide- Iodol Motility agar (SIM)	Difco	الكشف عن الحركة
11	وسط سترات سيمونز الصلب	Simmon's Citrate agar	Difco	استخدام السترات مصدر للكاربون

3. **تحضير المستخلصات النباتية:** جرى الحصول على الفول السوداني، وبذور كل من الحلبة والحبة الحمراء والكافور من الأسواق المحلية لمدينة بغداد. حضرت المستخلصات الكحولية الأثيلية للنباتات المختلفة حسب طريقة (8) وكما يلي:-

جرى طحن البذوركل على حِدة بصورة ناعمة ووضعت في قنانٍ زجاجية نظيفة.

أُخذ 100 غم من المسحوق النباتي الجاف ووضع في دورق سعة 1000مل وأُضيفَ إليه 500 مل كحول أثيلي تركيزه 70%ذقُ ع لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة الغرفة، ورسب المزيج بواسطة جهاز الطرد المركزي بسرعة 3000 دورة/ دقيقة لمدة 15 دقيقة.

جمع المحلول وتم ترشيحه باستخدام ورق ترشيح من نوع Whatman No.1، وجرى تبخيره بجهاز المبخر الدو ّار Vacuum evaporator بدرجة حرارة 40 ْ م لحين الحصول على شكل كثيف وبعدها جُ فِ فَ في الحاضنة بدرجة 37 ْ م خلال 3–4أيام وبعدها حُ فِظ في الثلاجة لحين استعماله، وحضر محلول خزين (Stock solution) من المستخلص النباتي بإذابة كل 1غم في 5 مل ماء مقطر معقم بتركيز 200 ملغم/ مل، وجرى قياس الأس الهيدروجيني له، ورشح المحلول بواسطة ورق Whitman membrane filter قياسµg 45، وجرى تشبع أقراص من ورق الترشيح بالمستخلص الكحولي للنباتات المختلفة.

4. **المضادات الحيوية المستخدمة:** جرى استخدام ستة أنواع من المضادات الحيوية ضمت:

Vancomycin (VA 30 µg) ، Ceftazidime (CAZ 30 µg) ،Tobramycin (TOB 10 µg) ، Ofloxacin (OFX 5 µg) ، Cefaclor (CEC 30 µg) ،Ampicillin (Am 10 µg) جهزت المضادا ت الحيوية المذكورة من شركة (Hi media) التركية.

5. **إجراء فحص الحساسية:** قبل إجراء الفحص زرعت البكتريا المراد فحص حساسيتها على وسط أكار الدم (Blood agar) لمدة 24– 48 ساعة لغرض تقويتها والتأكد من نقاوتها(9). أخذت مستعمرات قليلة مفردة نقية من سطح أكار الدم بواسطة ناقل الجراثيم Loop معقم، ووضعت في أنبوبة اختبار تحتوي على 4 مل من المرق المغذي (Nutrient broth) حيث تكون عُتمة العالق البكتيري قريبة من عتمة انبوب مكفرلند (Macfarland tube) رقم 0.5 الذي يحتوي على 1×10^8 CFU/ ml، زرعت أطباق بتري حاوية على أكار مولر هنتن (Mueller Hinton agar) بعد 1–2 ساعة بالعالق البكتيري بواسطة مسحة قطنية (Swab) وجرى تخطيط الاكار من جميع الجهات لكي تتوزع الكمية بالتساوي، وتركت الأطباق لتجف ثم وضعت أقراص المضادات الحيوية بواسطة ملقط معقم، إذ وضعت 4 أقراص مضادات في كل طبق بمسافات متساوية بين قرص وآخر وحضنت الأطباق في الحاضنة بدرجة 37° م لمدة 24–48 ساعة(10).

أُتبعت الطريقة نفسها للمستخلصات النباتية، عندما استخدمت أوراق ترشيح قصت بحجم 5 ملم وشبعت بالمستخلصات المختلفة. جرى قياس قطر منطقة التثبيط حول أقراص المضادات الحيوية والأقراص المشبعة بالمستخلصات النباتية بالمليمتر بواسطة المسطرة الاعتيادية(11).

النتائج والمناقشة

تبين الجداول 1 و2 اقطار التثبيط ضد الجراثيم المستخدمة في هذه الدراسة حيث يلاحظ كفاءة المستخلص الكحولي للكافور تجاه جميع انواع البكتريا المدروسة سواء الموجبة أو السالبة لصبغة كرام، فكان أقل قطر تثبيط (8 ملم) تجاه أنواع العصيات اللبنية (*Lactobacillus spp*)، والزوائف الزنجارية، وسجل قطر تثبيط بلغ 9ملم في كلٍ من عصيات لكنيرسي (*Actinobacillus lignieresii*) والمكورات السبحية الرئوية (*Strept. pneumoniae*)، بينما كان أعلى قطر تثبيط في (*Staphylococcus aureus*) الذي وصل إلى 15 ملم وتوافقت دراستنا الحالية مع ما توصل إليه(7) إذ كانت هذه النتيجة مقاربة لما سجله فقد كان قطر منطقة التثبيط 19 ملم تجاه المكورات العنقودية الذهبية.

فيما يتعلق بمستخلص بذور الحبة الحمراء، كانت جراثيم المكورات العنقودية الذهبية (*Staph. aureus*) الأكثر حساسية له مقارنة بالبكتريا الأخرى ومقارنة بالمستخلصات الكحولية للنباتات الأخرى، فقد سجلت فعالية تثبيطية بلغت 20 ملم، اذا انها لم تتوافق مع ما أشار إليه(10) إلى أن المستخلص الكحولي المثيلي والمائي لبذور الحبة الحمراء لم تعطِ نتيجة ايجابية تجاه العديد من الجراثيم المعوية.

كذلك لم تتوافق مع ما توصل إليه(4) إذ لم تُظهر فعالية عند دراسة قدرتها التثبيطية في جرثومتي المكورات العنقودية الذهبية (*Staph. aureus*) والمكورات العنقودية الجلدية (*Staph. Epidermidis*)، وقد علل الباحثان الأخيرين ذلك إلى إن المركبات الفعالة قد تكون موجودة بكميات غير كافية لإظهار فعالية في المستخلصات الخام، أو ربما تكون هناك مركبات أخرى تُظهر تأثيرات مضادة (antagonistic) للعوامل الفعالة بايولوجياً ، أو قد

تكون المستخلصات فعالة ضد أنواع جرثومية مختلفة عن المستخدمة بالدراسة، إذ ان دراستنا هذه كان مستخلص الحبة الحمراء فعالاً أيضاً تجاه المكورات السبحية الرئوية (*Strept. pneumoniae*) فقد أعطى قطر تثبيط 7 ملم.

كان مستخلص الحلبة كفوءً في تثبيط جرثومتي المكورات العنقودية الذهبية (*Staph. Aureus*) والمكورات السبحية الرئوية (*Strept. pneumoniae*)، وبقطري تثبيط 20 ملم و10 ملم على التوالي، وبذلك تكون الحلبة مشابهة للحبة الحمراء من حيث التأثير التثبيطي على هاتين الجرثومتين وهذا يتفق مع ما أشار إليه(12)الذي بيّن إن زيت الحلبة قد أظهر تثبيطاً قوياً تجاه (*Staph. aureus*).

سُجِلَتْ أقل أقطار تثبيط لنمو جرثومتي المكورات العنقودية الذهبية (*Staph. Aureus*) والمكورات السبحية الرئوية (*Strept. pneumoniae*) بلغت 7 ملم و8 ملم بالترتيب عندما استخدم مستخلص الفول السوداني وكما هو واضح، هذه النتائج كانت أخفض مقارنة بالمستخلصات النباتية الأخرى، ولم يسجل نتيجة مهمة تُذكر تجاه البكتريا الأخرى المدروسة وقد اتفقت دراستنا مع ما أوضحه الباحثان(4)إن المستخلص المائي للفول السوداني لم يعطِ أي نتيجة عندما اختبرت فعاليته ضد المكورات العنقودية الذهبية (*Staph. aureus*)، لكنه سجل قطر تثبيط 3 ملم عندما استخدم المستخلص الاثيلي له.

من خلال دراستنا الحالية تبين وجود مستخلصات نباتية لها القابلية على تثبيط النمو الجرثومي. ان قابلية المستخلصات المستخدمة في هذه الدراسة تتفاوت بشدتها وحسب نوع الجرثومة، نوصي بإجراء دراسة تطبيقية على الحيوانات المختبرية للتعرف على الفعالية المفترضة للمستخلصات النباتية حسب نتائج هذه الدراسة المختبرية، كما ونوصي باختبار فعالية المستخلصات النباتية المستخدمة في هذه الدراسة لمعرفة قدرتها التثبيطية على نمو انواع اخرى من البكتريا وكذلك دراسة مستخلصات اخرى ومقارنتها مع مضادات حيوية في القابلية على تثبيط النمو الجرثومي.

جدول (1) أقطار تثبيط المضادات الحيوية للبكتريا مقاسة بـ ملم (mm)

البكتريا(Bacteria) / المضاد البكتيري (Antibacterial)	TOB	CAZ	VA	AM	CEC	OFX
Lactobacillus lignieresii	17	19	8	9	19	25
Lactobacillus spp	35	-	21	12	-	16
Pseudomonas arigenosa	19	-	-	9	10	25
Staphylococcus aureus	-	13	15	12	18	28
Streptococcus pneumoniae	15	-	16	10	14	19

جدول (2) أقطار تثبيط المستخلصات النباتية للبكتريا مقاسة بـ ملم (mm)

البكتريا(Bacteria) المستخلص النباتي (Plant extract)	الكافور	الحبة الحمراء	الحلبة	الفول السوداني
Lactobacillus lignieresii	9	5	5	5
Lactobacillus spp	8	5	5	5
Pseudomonas arigenosa	8	5	5	5
Staphylococcus aureus	15	20	20	7
Streptococcus pneumoniae	9	7	10	8

المصادر

1. Shahidi-Bonjar, G. H. (2004 a). Evaluation of antibacterial properties of Iranian medical –plants against *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae* and *Bordetella bronchoseptica*. Asian J. Plant Sci., 3(1):82-86.
2. Shahidi-Bonjar, G. H. (2004 b). Screening for antibacterial properties of some Iranian plants against two strains of *Escherichia coli*. Asian J. Plant Sci., 3(3):310-314.
3. Ndip, R. N.; Ntiege, E. A.; Ndip, L. M.; Nkwelang, G.; Akoochere, T. K. & Akenji, N. T. (2008). Antimicrobial resistance of bacterial agents of the upper respiratory tract of school children in Buea, Cameroon.J.Health Popul.Nutr.,26(4):397-404.
4. Parekh, J. & Chanda, S. (2008). Antibacterial activity of aqueous and alcoholic extracts of 34 Indian medical plants against some *Staphylococcus spp*. Turk. J. Biol., 32: 63-71.
5. Khan, F. U.; Durrani, F. R.; Sultan, A.; Khan, R. V. & Naz, S. (2009). Effect of Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seed extract on visceral organs of broiler chicks. ARPN. J. Agri and Biol. Sci., 4(1).
6. Radwan, H. M.; El- Missiry, M. M.; Al-Said, W. M. & Ismail, A. S. (2007). Investigation of the glucosinolates of *Lepidium sativum* growing in Egypt and their biological activity. Res. Medicine and Medi. Sci., 2(2): 127-132.
7. Vidya, T. J. & Vidya, P. (2000). Antimicrobial activity of Scavon Vet. Cream. The Veterinarian: (2000) (24), August, 16.
8. Anessiny, G. & Perez, C. (1993). Screening of plants used a green lime. Folk medicine for Antimicrobial activity. J. Ethnopharmacol., 39: 119-128.
9. Qunin P. J.; Con, M. E.; Maky, B. & Goter, G. R. (1998). Brucella species clinical Vet. Microbiology Morsby year book Eurpe Limited published, 261-264.
10. Harley, J. P. & Prescott, L. M. (2002). Exercise 43: The effects of chemical agents on bacteria II: Antimicrobial agents (Kirby-Bauer Method). In: Laboratory Exercises in Microbiology. 5th Ed. The Mc Grow-Hill Companies.
11. Parekh, J. & Chanda, S. (2007). In vitro screening of antibacterial activity of aqueous and alcoholic extracts of various Indian plant species against selected pathogens from Enterobacteriaceae. African J. Microbiol. Res., 1(6): 92-99.
12. Wagh, P.; Rai, M.; Deshmukh, S. K. & Durate, M. C. T. (2007). Bio- activity of oils of *Trigonella foenum-graecum* and *Pongamia pinnata*. African J. Biotechnol., 6(13): 1592-1596.