

دراسة تأثير المستخلصات الخام لنبات المرير *Sonchus oleraceus* على الجراثيم المرضية
في الزجاج *in vitro*

زينب رزاق زغير
كلية الطب البيطري/ جامعة بغداد

الخلاصة

صممت هذه الدراسة للتحري عن التأثير الوقائي والمرضي للمستخلصات الكحولية والمائية (البارد والحار) لنبات المرير *Sonchus oleraceus* على الجراثيم المرضية خارج الحسم. تم معاملة المستخلصات الثلاث خارج الجسم الحي على أنواع من الجراثيم المرضية وهي *Salmonella typhimurium* و *Pseudomonas aerogenosa* و *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* وذلك باستخدام تركيز 100 ملغرام لكل مستخلص وكذلك معاملة الجراثيم المرضية بمزيج من كل من المستخلصات الثلاث مع جرثومة *Lactobacillus* وبمقادير متساوية كل مستخلص على حدة، وذلك لغرض معرفة فرق التأثير السمي لهذه المستخلصات ، وقد أظهرت الدراسة التأثير السمي للمستخلصات على الجراثيم المرضية وكذلك وجود تأثيرات متباينة على نمو الجراثيم وكان أعلى تأثير للمستخلصات الثلاث على جرثومة *Pseudomonas aerogenosa* وخاصة المستخلص المائي الحار.

Study the effects of crude sonchus oleaceus extract on infectious agents in vitro

Z. R. Zgear
College of Veterinary Medicine\ University of Baghdad

Abstract

This study was designed to evaluate the prophylactic and pathological effect of the ethanolic (EE), cold aqueous (CAE), and hot aqueous (HAE) extracts of the *Sonchus oleraceus* on virulent bacteria *in vitro*, and on cancer cells growth as *in vivo*. *In vitro* study the three extracts was conducted on species of virulent bacteria including *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aerogenosa*, *Staph aureus* and *Escherichia coli* by using the concentration 100 mg for each extract, and also the virulent bacteria was dealt by mixing of each one of the three extracts with *Lactobacillus* in equal quantities, to know the differences of toxic effect of extracts. The study was manifested toxic effect of the three extracts on the virulent bacteria, also these extracts showed different effects on bacterial growth, and the highest effect for the three extracts were found on *Pseudomonas aerogenosa*, and the special effect was by hot aqueous extract.

المقدمة

يعد نبات المرير من الأعشاب والنباتات الحولية ، ولها سيقان منتصبية وتتفرع بالقرب من الأزهار الصفراء الشاحبة (1) وتعرف النبتة بنبات الشوك المنثور الناعم *sow-thistle* يحتوي نبات المرير على العديد من العناصر الغذائية مثل الصوديوم والبوتاسيوم والكالسيوم والمغنيسيوم والحديد والنحاس والزنك والمنغنيز بالإضافة إلى احتوائها على الأحماض الدهنية وفيتامين ج (vitamin c) والكاروتين وحامض الاوكزاليك، وهذا مما يجعل إمكانية استخدام هذا النبات لأغراض التغذية (2) أستعمل نبات المرير كمقوي عام في الطب الشعبي في العديد من بلدان العالم مثل البرازيل ، وعلى الرغم من هذا، هنالك معلومات علمية نادرة متوفرة بخصوص هذا النوع (3) ويحتوي نبات المرير على المكونات الكلايكوسيدية *glycosides* (4) والفينولات وتشمل الفلافونويدات *Flavonoid* (5). فعالية مضادات الأكسدة لمواد النبات تتعلق باحتوائها على المركبات الفينولية (6). الفينولات المتعددة *Polyphenols* تعد من الصنف المتباين من المركبات مع تنوع في فعاليتها المضادة للأكسدة (7). الفلافونويدات ممكن أن تعمل كجذور حرة كائنة وتنتهي بتفاعلات السلسلة الجذرية والتي تحدث خلال أكسدة الدهون *Triglycerides* (8). الفعاليات المضادة للأكسدة لمستخلصات النباتات الطبية والأعشاب لها علاقة بالمركبات الفينولية (9). وقد أظهر المستخلص الكحولي الخام لنبات المرير المرير فعالية مضادة للجراثيم *S.aureus* و *N .gohnorea B. subtilis* و *E. Coli* وكذلك أظهر فعالية سمية خلوية ضد بعض خطوط الخلايا (10). وقد صمم هذا البحث لمعرفة تأثير المستخلصات الخام لنبات المرير على بعض الجراثيم المرضية خارج الجسم في الفئران المخبرية.

المواد وطرائق العمل

- طريقة تحضير مستخلصات نبات المرير: تم تحضير المستخلصين الكحولي الايثيلي والمائي البارد من نبات المرير حسب طريقة (11)، أما المستخلص المائي الحار فقد حضر حسب طريقة (12).
- طرق فحص المركبات الفعالة في المستخلصات:
1. الكشف عن الدباغيات **Tannins**: يُحضر المحلول المائي 1% من كلوريد الحديدك وتضاف كمية منه إلى كمية مساوية لها من المستخلص النباتي، إن ظهور الراسب الأخضر المزرق دلالة على وجود الدباغيات (11).
 2. الكشف عن الفلافونويدات **Flavonoids**: يُجرى هذا الكشف بإضافة 4 مل من الكحول الأيثيلي 95% إلى 1 مل من المستخلص النباتي في أنبوبة اختبار، ثم توضع الأنبوبة في حمام مائي مغلي لمدة 25-30 دقيقة، بعد إخراجها من الحمام تضاف إليه قطرات قليلة من محلول هيدروكسيد البوتاسيوم 0.5 عياري، سيظهر لون داكن في حال وجود الفلافونويدات (11).
 3. الكشف عن الكلايكوسيدات **Glycosides**: أُجري هذا الكشف باستعمال كاشف فهلنك *Fehling reagent* الذي تم تحضير جزئيه A و B على النحو الآتي:
- محلول (A) حُضر من إذابة 17.32 غم من كبريتات النحاس في 200 مل من الماء المقطر إذابة جيدة، ثم أكمل المحلول بالماء المقطر حتى وصل حجمه إلى 250 مل.
- محلول (B) أُذيب 35 غم من هيدروكسيد الصوديوم مع 86.5 غم من ملح روشل في 100 مل من الماء المقطر، ثم أكمل الحجم حتى 250 مل بالماء المقطر.

- مُرِجَت أحجام متساوية من هذا الكاشف مع المستخلص النباتي، ثم وُضِع المزيج في حمام مائي مغلي لمدة 10 دقائق، إن ظهور الراسب الأحمر هو دلالة على وجود الكلايكوسيدات (13).
4. **الكشف عن التربينات Terpenes**: يتم إجراء الكشف بإضافة 1 مللتر من مادة *chloride antimon* 20% chloroform إلى 5 مللتر من المستخلص النباتي، وعندما يظهر راسب أبيض يدل على وجود مادة التربينات (11).
5. **الكشف عن القلويدات Alkaloids**:
 - كاشف ماير **Mayer's reagent**: يُحضَر الكاشف من استخدام المحلولين A و B على النحو الآتي:
 محلول A حُضِر بإذابة 1.58 غم من كلوريد الزئبقيك $HgCl_2$ في 60 مل من الماء المقطر. محلول B تم تحضيره بإذابة 5 غم من يوديد البوتاسيوم KI في 10 مل من الماء المقطر. قبل الكشف مباشرةً مُزج محلولاً A و B ثم أُكْمِل الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر، تم الكشف بمزج 1 مل من هذا الكاشف مع 5 مل من المستخلص النباتي في زجاجة ساعة، إن ظهور الراسب الأبيض دلالة على وجود القلويدات (14).
6. **الكشف عن الفينولات**: يتم بإضافة كميات متساوية من خليط (كلوريد الحديد المائي *aqueous ferric chloride* 1% مع *potassium iron cyanide* 1%) إلى المستخلصات الخام للنبات، وعند ظهور لون أزرق مخضر يدل على وجود الفينول (11).
- **الأوساط الزرعية**: استخدمت العترة الجرثومية *Salmonella typhimurium* و *Pseudomonas aerogenosa* و *Staph aureus* و *Escherichia coli* حيث تم الحصول عليها من وحدة الأمراض المشتركة وتم التأكد من صفاتها الكيموحيوية حسب طريقة (15).
- **طريقة عمل فحص الحساسية sensitivity test للمستخلصات الثلاث**: تم عمل فحص الحساسية لمستخلصات نبات المرير كالآتي:
 أ. تم اخذ 12 طبق للأوساط الزرعية من نوع *Nutrient agar*، حيث مسحت كل ثلاث أطباق لنوع واحد من الجراثيم الأربعة بقطرات العالق الجرثومي والمحضّر والمحسوب بطريقة أنبوب ماكفرلاند (الأنبوب الأول)، وبعد أن جفت الأطباق، تُقَبَط الأطباق بالة ثاقب الفلين (أربعة ثقوب لكل طبق).
 ب. كل نوع من المستخلصات الثلاث تم حقنها في حفرة واحدة من الأطباق الأربعة (كل طبق لنوع واحد من الجراثيم الأربعة)، بتركيز 100 ملغرام للمستخلص الواحد، والحفرة الثانية حقنت بخليط متساوي من المستخلص و جرثومة *lactobacillus*، (والحفرة الثالثة حقنت فقط بجرثومة *lactobacillus acidophillus*، والحفرة الرابعة حقنت بالماء المقطر للمستخلصين المائي البارد والحار، أما للمستخلص الكحولي فقد حقنت الحفرة الرابعة بالكحول الاتيلي 70% كمجاميع سيطرة). بعدها حضنت الأطباق جميعها في الحاضنة بدرجة 37 درجة مئوية لمدة 24 ساعة.

النتائج

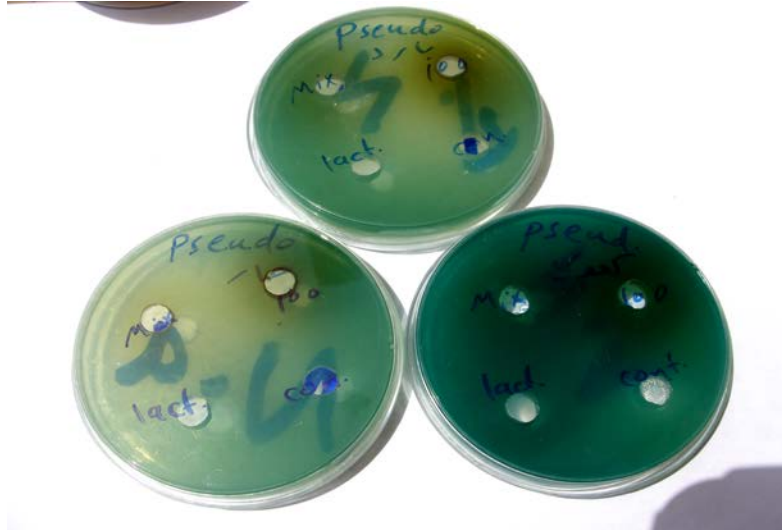
- **تحديد المركبات الفعالة لمستخلصات نبات المرير**: يشير جدول (1) إلى وجود الكلايكوسيدات glycosides في المستخلصات الثلاث لنبات المرير، المستخلص الكحولي يحتوي على الفلافونويدات flavonoid والتانين tannins، المستخلص المائي البارد يحوي على التانين بينما المستخلص المائي الحار لا يحوي على التانين، ومن الجدول يتبين أن المستخلص الكحولي أكثر فعالية من المستخلصات المائي البارد والحار.
- جدول (1) يوضح نتائج بعض المركبات الفعالة المحددة للمستخلصات الخام لنبات المرير

المستخلص المائي الحار	المستخلص المائي البارد	المستخلص الكحولي	المركبات الكيميائية
-	+	+	التانينات Tannins
-	-	+	الفلافونويدات Flavonoids
+	+	+	الكلايكوسيدات Glycosides
-	-	-	التربينات Terpenes
-	-	-	القلويات Alkaloids
-	-	-	الفينولات Phenols

- نتائج فحص الحساسية للمستخلصات الثلاث: يبين جدول (2) أن المستخلصات الخام لنبات المرير كان لها التأثير الأكبر على جرثومة *Pseudo. Aerogenosa*، حيث أعطى المستخلص المائي الحار أعلى تأثير وصل حجم قطر التثبيط إلى 31 ملم عند قياسه بالمسطرة على جرثومة *Pseudo. aerogenos* من بين كل الجراثيم، إضافة إلى ذلك فإن المستخلص الكحولي كان تأثيره على الجرثومة 27 ملم والمائي البارد 26 ملم، وجاء تأثير المستخلصات بالمرتبة الثانية على جرثومة *Staph aureus*، في حين كان التأثير متباين على جرثومتي *E.coli* و *Salmonella typhimurium*، حيث لم يؤثر المستخلص الكحولي على هاتين الجرثومتين، كما أن تأثير المستخلصات على هذه الجراثيم موضح في الأشكال (1، 2، 3) في حين لم يظهر تثبيط حول حفر و السيطرة.

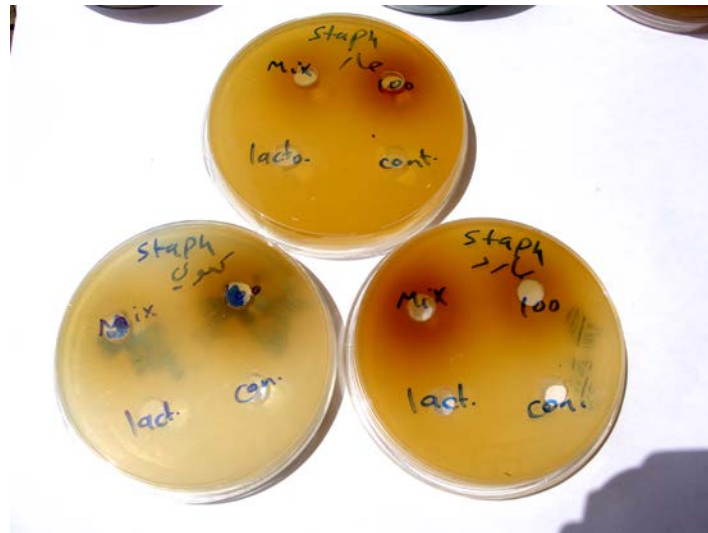
جدول (2) يوضح نتائج فحص الحساسية للمستخلصات الثلاث ضد الجراثيم المرضية

مائي حار		مائي بارد		كحولي		نوع المستخلص نوع البكتيريا
Mix (ملم)	100 mg (ملم)	Mix (ملم)	100mg (ملم)	Mix (ملم)	100mg (ملم)	
9	31*	20	26*	27*	20	<i>Pseudo. aerogenosa</i>
8	9	0	19	0	0	<i>E.coli</i>
8	10	18	20	0	0	<i>Salm. typhimurium</i>
10	12	19	14	15	18	<i>Staph aureus</i>



شكل (1) يوضح أطباق لجرثومة *Pseudomonas aeruginosa* وتأثير المستخلصات الخام لنبات المرير

عليها



شكل (2) يوضح أطباق لجرثومة *Staph aureus* وتأثير المستخلصات الخام لنبات المرير



شكل (3) يوضح أطباق لجرثومة *Salmonella typhimurium* وتأثير المستخلصات الخام لنبات المرير

المناقشة

استُعمل في هذه البحث المستخلصات الخام لنبات المرير وذلك لأنها دراسة أولية كان الهدف منها التحقق من امتلاك نبات المرير فعالية مضادة للجراثيم المرضية. اظهرت نتائج فحص المركبات الكيميائية للنبات على وجود التانين و glycosides والفلافونويدات. وجود مركب التانين في الخلايا النباتية يمنحها قوة تثبيطية ضد العديد من انزيمات المسببات المرضية. العديد من النباتات تحتوي على العديد من مركبات الكلايكوسيدات غير السامة والتي يمكن ان تحلل وتنتج الفينولات والتي تعد سامة للجراثيم المرضية (16). وكما هو مبين في جدول (1) يحتوي المستخلص الكحولي لنبات المرير على ا أكبر كمية من المركبات الفينولية Phenolic والفلافونويدات Flavonoid. وقد أوضحت الدراسات بان مستخلص نبات المرير ممكن أن يستخدم كمصدر مقوي من مضادات الأكسدة الطبيعي (17). أظهرت النتائج إمكانية مستخلصات نبات المرير المضادة للجراثيم، وبالأخص المستخلص الكحولي إذ يمتلك فعالية عالية نسبياً مقارنة بالمستخلصين المائي البارد والحار، وهذه القابلية قد تُسبب إلى قوة الكحول في تثويب المكونات النباتية أفضل من إمكانية الماء (18). الفعاليات المضادة للأكسدة لمستخلص نبات المرير، تشمل فعاليات الجذور الحرة الكانسة (17). مضادات الأكسدة تؤخر أو تمنع تأكسد المواد (19). وقد توجه الاهتمام نحو إيجاد مضادات الأكسدة طبيعياً في الغذاء أو تعويضها صناعياً في الأدوية والتي زادت إلى حد كبير، مما أدى ذلك إلى تحديد استعمال مضادات الأكسدة المصنعة نتيجة لأثارها الجانبية (20). لذلك الاهتمام توجه نحو عزل وتطوير مضادات الأكسدة الطبيعية من مصادر النبات، مضادات الأكسدة تشمل حامض الاسكوربيك والكاروتين carotenoids والتانين hydrolysable tannins والتي تلعب دوراً مهماً في منع الأمراض المستحثة من قبل الجذور الحرة (21). تقييم الفعالية السمية الخلوية لمستخلصات نبات المرير خارج الجسم الحي *in vitro*، إذ يبين جدول (2) أن المستخلصات الخام لنبات المرير كان لها التأثير الأكبر على جرثومة *Pseudo. aerogenosa* وبالمرتبة الثانية على جرثومة *Staph aureus*، في حين كان التأثير متباين على جرثومتي *E.coli* و *Salmonella typhimurium*، وهذا يتفق مع (22)، حيث اثبتت الفعالية المضادة للجراثيم لمستخلصات نبات المرير، ضد بعض الجراثيم المرضية مثل *E coli* و *S. aureus*، أما بالنسبة إلى تباين المستخلصات في التأثير السمي المضاد للجراثيم فقد يعود إلى تنشيط فعالية المناعة التثبيطية للخلايا للمفاوية T و B (23). أما بالنسبة إلى استخدام جرثومة *lactobacillus acidophillus* ومعرفة تأثيرها على نمو الجراثيم المرضية من جهة وكذلك مزجها مع مستخلصات نبات المرير لغرض معرفة تأثيرها على المستخلصات الثلاث من ناحية تقوية تأثير القوة التثبيطية للمستخلصات على نمو الجراثيم المرضية من جهة أخرى جاء من توجه بعض الدراسات الحديثة إلى القوة امتلاك جرثومة *lactobacillus acidophillus* قوة تثبيطية لنمو بعض الجراثيم وذلك لاحتوائها على حامض lactic acid (24). ومن هذه الدراسة ممكن ملاحظة الشكل المشترك للمستخلصات الثلاث لنبات المرير حول تثبيطها للجراثيم المرضية ومن المعتقد ان كل مستخلص يساهم بمكوناته الفعالة، حيث لوحظ ان المستخلصات اعطت نتائج متباينة بتأثيرها التثبيطي لنمو الجراثيم المرضية عند مزجها مع جرثومة *lactobacillus acidophillus*، إذ أدت إلى تنشيط المستخلص الكحولي مما زاد من قابليته التثبيطية على جرثومة *Pseudo. aerogenosa* و بنفس الوقت قللت جرثومة *lactobacillus acidophillus* من قابلية المستخلص المائي الحار على تثبيط نفس الجرثومة. من هذه النتائج نستطيع القول بانها تحتاج الى دراسة اكثر حول تنقية وتقييم للمركبات والمواد الفعالة لهذه المستخلصات بالاضافة الى الدراسة داخل الجسم الحي.

References

1. Quereshi, S. J.; Awan, A. G.; Khan, M. A. & Bano, S. (2002). Taxonomic study of the genus *Sonchus* L. from Pakistan. *J. of Biol. Sci.*, 2: 309– 314.
2. Guil-Guerrero, J.; Gimenez-Gimenez, L.; Rodriguez-arciai, A. & TorijaIsasa, M. E. (1998). Nutritional composition of *Sonchus* species (*S asper* L, *S oleraceus* L and *S tenerrimus* L). *J. of the Sci. of Food and Agri.*,76(4): 628-632.
3. Cardoso Vilela, F.; Soncini, R. & Giusti-Paiva, A. (2009). Anxiolytic-like effect of *Sonchus oleraceus* L. in mice. *J. of Medici. Food.*,124(2):325-327.
4. Shimizu, S.; Miyase, T.; Ueno, A. & Usmanghani, K. (1989). Sesquiterpene lactone glycosides and ionones derivative glycosides from *Sonchus asper*, *Phytochemistry*, 28: 3399- 3402.
5. Mansour, R. M.; Saleh, N. A. & Boulos, L. A. (1983). Chemotaxonomic study of the phenolics of *Sonchus*. *Phytochemistry*, 22: 489- 492.
6. Velioglu, Y. S.; Mazza, G.; Gao, L. & Oomah, B. D. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *J. Agric. Food Chem.*, 46:4113-4117.
7. Singh, R. P.; Murthy, K. N. C. & Jayaprakasha, G. K. (2002). Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using *in vitro* models. *J. Agric. Food Chem.*, 50:81-86.
8. Das, N. P. & Pereira, T. A. (1990). Effects of flavonoids on thermal autoxidation of palm oil: structure- activity relationships. *J. Am.Oil Chem.Soc.*, 67:255-258.
9. Cai, Y.; Luo, Q.; Sun, M. & Corke, H. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci.*, 74:2157-2184.
10. Elkhayat, E. S. (2009). Cytotoxic and Antibacterial Constituents from the Roots of *Sonchus oleraceus* L. Growing in Egypt. *Pharmacognosy Magazine.*, 5: 324-328.
11. Harborne, J. B. (1984). *Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis*. 2nd ed. Chapman and Hall New York. PP.1-4.
12. Timberlake, C. & Henry, B. (1988). Anthocyanins as Natural Food Colorants, *Plant Flavonoids in Botanical Medicine II: Biochemical Cellular and Medicinal properties*. PP. 107-121. Alan R. Liss.
13. Shihata, I. M. (1951). A pharmacological study of *Anagallis arvensis*. M.D. Thesis, Cairo University, Egypt.
14. Sousek, J.; Guedon, D.; Adam, T.; Bochorakova, H.; Taborska, E.; Valka, I. & Simanek, V. (1999). Alkaloids and organic acid content of eight *Fumaria* species. *Phytochemical Analysis*, 10:6-11. Cited in : Sa`eed, O.F. (2004). The effect of green and black tea extracts on different cell lines *in vitro*. M.Sc. Thesis, College of Pharmacy, University of Mosul, Mosul, Iraq.
15. Quinn, P. J.; Carter, M. E.; Markey, B. K. & Carter, G. R. (1998). Secondary biochemical tests for the identification of bacteria. *Cli. Vet. Microbiol.*, PP. 49- 54.
16. Aboaba, O. O. & Efuwape, B. M. (2001). Antibacterial properties of some Nigerian spices. *Bio. Res. Comm.*, 13: 183- 188.
17. Yin, J.; Kwon, G. J. & Wang, M. H. (2007). The antioxidant and cytotoxic activities of *Sonchus oleraceus* L. extracts. *Nut. Res. and Practice.*,1(3): 189-194.
18. Majorie, M. C. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.*, 12: 564-582.
19. Halliwell, B. (1995). Antioxidant characterization: methodology and mechanism. *Biochem. Pharmacol.*, 49:1341-1348.

20. Ito, N.; Fukushima, S.; Hasegawa, A.; Shibata, M. & Ogiso, T. (1983). Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole in F 344 rats. *J. Nat. Cancer Inst.*, 70:343-347.
21. Huxley, R. R. & Neil, H. (2003). The relationship between dietary flavonol intake and coronary heart disease mortality: a metaanalysis of prospective cohort studies. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 57:904-908.
22. Elkhayat, E. S. (2009). Cytotoxic and Antibacterial Constituents from the Roots of *Sonchus oleraceus* L. Growing in Egypt, 5: 324-328.
23. Okada, N.; Shirata, K.; Niwano, M.; Koshino, H. & Uramoto, M. (1994). Immunosuppressive activity of a monoterpene from *Eucommia ulmoides*. *Phytochemistry*, 37: 281– 282.
24. Okerek, A. & Montivella, A. (1991). Bacteriocin- mediated inhibition of *Clostridium botulinum* spore by lactic acid bacteria at refrigeration and abuse temperature. *Appl. Wnviron. Microbiol.*, 57 (12): 3423- 3428.