دراسة التأثير الضد مايكروبي لبعض مستخلصات نبات الخردل الاسود

شيماء جبار ريسان

قسم علوم الحياة/ كلية التربية / جامعة البصرة

ISSN –1817 –2695
الاستلام 2006/9/24, القبول 2006/12/10

الملخص :

تم في هذه الدراسة تحديد التاثير التثبيطي للمستخلصات الكحولية والفلافونويدية والكلايكوسيدية لبذور نبات الخردل الاسود *Brassica nigra* على الجراثيم القياسية الموجبة لصبغة كرام *Staphylococaus aureus ATCC* 25922 والسالبة لصبغة كرام *Escherichia coli ATCC* 25922 و *Pseudomonas aeruginosa ATCC* 27853. وتم تحديد التاثير التثبيطي لهاعلى (100) عزلة جرثومية موجبة لصبغة كرام *Staphylococcus aureus* وسالبة لصبغة كرام (*Proteus vulgaries, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli*).

اظهرت نتائج الدراسة ان المستخلص الفلافونويدي والكلايكوسيدي لنبات الخردل الاسود يمتلك تاثيراً تثبيطياً على نمو الجراثيم القياسية والمرضية في حين لم يظهر المستخلص الكحولي لنبات الخردل الاسود أي تاثير تثبيطي على نمو الجراثيم المستخدمة في الدراسة.وتم تحديد التركيز المثبط الادنى *Minimum Inhibitory Concentration* MIC لكل من المستخلصات الفلافونويدية والكلايكوسيدية على الجراثيم القياسية .اظهرت نتائج الدراسة ان الـ (MIC) للمستخلص الفلافونويدي والكلايكوسيدي ضد الجراثيم القياسية الموجبة لصبغة كرام هو (0.5, 2) مايكروغرام /مل على التوالي و الجراثيم السالبة لصبغة كرام لجرثومة *E. coli* هو (0.125, 0.25) مايكروغرام /مل على التوالي والـ *P. aeruginosa* هو (0.25, 1) مايكروغرام /مل على التوالي. كما تم تحديد السمية الخلوية للمستخلص الفلافونويدي والكلايكوسيدي باستخدام كريات الدم الحمراء. ولم تظهر هذه المستخلصات تاثيراً سمياً عند التركيز (200) ملغم/مل .

المقدمة :

ان الاعشاب الطبية عديدة وشائعة الاستخدام في الطب الشعبي، وقد درس التاثير التثبيطي لبعض منها على نمو الجراثيم من قبل العديد من الباحثين في انحاء مختلفة من العالم لقدرتها العالية على تثبيط نمو بعض انواع الجراثيم (5). ان التاثير التثبيطي لهذه النباتات ربما يرجع الى احتوائها على بعض المركبات الفعالة مثل الفينولات ومشتقاتها التي تعد من المثبطات القوية للجراثيم (11) وتعد المملكة النباتية مصدراً اساسياً للمركبات الفعالة الضد مايكروبية (1,4). وبما ان الدراسة الحالية تهدف الى دراسة تاثير مستخلصات نبات الخردل للاسود على بعض انواع الجراثيم، لذا اقتضى تقديم وصف مبسط للنبات المستخدم في هذه الدراسة.

نبات الخردل الاسود *Brassica Nigra*

وهو نبات عشبي حولي ينتمي للعائلة الصليبية crucifera تكمن فعاليته في احتواء بذوره على مركبات زيتية بنسبة (30.35 %) فضلاً عن الكلايكوسيدات ومركبات فينولية وانزيمات وغيرها من المركبات الفعالة بايولوجياً (حسين، 1981).

هدف الدراسة *The aim of Study*

نظراً لكون نبات الخردل الاسود من النباتات الطبية المهمة والمستخدمة في علاج الكثير من الحالات المرضية ومنها الجرثومية ولم تحظَ بدراسة مستفيضة لذلك فقد هدفت الدراسة الحالية الى دراسة التأثير التثبيطي للمستخلصات المحضرة من هذه النباتات على بعض انواع الجراثيم.

PDF Created with deskPDF PDF Writer - Trial :: http://www.docudesk.com

المواد وطرائق العمل :

1 – جمع العينات النباتية

جمعت بذور نبات الخردل الاسود من الاسواق المحلية، وتم التحقق من تشخيصها في قسم علوم الحياة – كلية التربية من قبل المدرس المساعد علي عبود شريف.

2 – تحضير المستخلصات : المستخلص الكحولي

حضر المستخلص الكحولي لبذور نبات الخردل الاسود حسب طريقة (2) . إذا أضيف (50) غم من المسحوق النباتي الى (400) مل من مذيب الايثانول (70%) في دورق مخروطي . وترك على القلاب الممغنط (Magnetic stirrer) عند درجة حرارة الغرفة لمدة (24) ساعة ، رشح المستخلص بأستخدام اوراق ترشيح (Whatman No.1) ، ركز الراشح باستخدام المبخر الفراغي الدوار (Rotary Vacuum Evaporator) ، جفف المستخلص بدرجة حرارة الغرفة وجمع المستخلص الجاف في قناني معقمة.

الكشوفات النوعية :

اجريت عدة كشوفات نوعية اولية للتعرف على المكونات الكيميائية الاساسية في المستخلص الكحولي لبذور نبات الخردل الاسود (جدول (1)).

المستخلص الفلافونويدي

حضر المستخلص الفلافونويدي من بذور نبات الخردل الاسود حسب طريقة (2) . إذا أضيف (50) غم من المسحوق النباتي الى (500) مل من الايثانول تركيز (80%)، ترك بعدها الخليط على القلاب الممغنط (Magnetic stirrer) لمدة (24) ساعة . رشح الخليط بأستخدام اوراق الترشيح (Whatman No.1) ، وأضيف الى الراشح (50) مل من خلات الرصاص Leadacetate تركيز (1%) ، وترك لمدة (15) دقيقه . ثم رشح المزيج وعومل الراسب مع (50) مل أسيتون و (60) مل من حامض الهيدروكلوريك HCl ، بعدها رشح وجفف الراشح بدرجة حرارة الغرفة وجمع المستخلص الجاف وحفظ في قناني معقمة.

المستخلص الكلايكوسيدي

حضر المستخلص الكلايكوسيدي من بذور نبات الخردل الاسود حسب ما ذكر في (7) .اذ اضيف (50) غم من المسحوق النباتي الى (400) مل من حامض الخليك (2%)، وضع الخليط في حمام مائي لمدة (8) ساعات ثم رشح الخليط وخلط الراشح مع (n – BaoH) المشبع بـ (NaCl) (50 x 3) مل وجفف الرشح بدرجة حرارة الغرفة وجمع المستخلص الجاف في قناني معقمة.

3 – تعقيم المستخلصات المحضرة

عقمت المستخلصات المحضرة بتمريرها عبر مرشحات غشائية ذات قطر (0.2) مايكرومتر نوع (Whatman, U. K).

4 – الغربلة الاولية للمستخلصات المحضرة

قيمت قابلية المستخلصات المحضرة من نبات الخردل الاسود على تثبيط النمو الجرثومي باستخدام السلالات القياسية الموجبة لصبغة كرام *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 والسالبة لصبغة كرام *Escherichia coli* ATCC 25922 و *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 حسب طريقة (12) اذ استخدمت طريقة Agar – Well Diffusion وتضمنت تحضير وسط Mullar Hintion Agar حسب تعليمات الشركة المجهزة وصب في اطباق بتري بعدها لقح الوسط بـ (0.1) مل من العالق الجرثومي تركيز ($1x10^6$) خلية بكتيرية /مل. نشر العالق الجرثومي باستخدام ناشر زجاجي، تركت الاطباق لمدة (30 - 15) دقيقة. عمل (4 - 3) حفر بقطر (8) ملم لكل حفرة باستخدام ثاقب فليني معقم واضيف (100) مايكروليتر من المستخلص النباتي تركيزه (0.150) غم /مل في كل حفرة باستخدام Micropipet، حضنت الاطباق بدرجة حرارة (37) ^{o}م وقيس قطر منطقة التثبيط. قورنت النتائج مع المضاد الحياتي Ampicillin كعينة سيطرة موجبة لجراثيم *S. aureus* والمضاد الحياتي Cephataxin كعينة سيطرة لجميع الجراثيم.

العالق الجرثومي

حضر العالق الجرثومي بتركيز (1×10^6) خليه بكتيريه / مل بطريقة مكفرلاند . حسب ما ذكر في (3) ، إذ تم أضافة (0.05) مل من $BaCl_2$ (1%) إلى (9.95) مل من H_2SO_4 ، قورن كثافة العالق الجرثومي المحضر مع أنبوبة مكفرلاند.

PDF Created with deskPDF PDF Writer - Trial :: http://www.docudesk.com

التراكيز المثبطة الدنيا

حددت التراكيز ألمثبطه الدنيا للمركبات ألمستخلصه من نباتي الخردل الاسود ضد السلالات القياسية الموجبة والسالبة لصبغة كرام التي ذكرت في فقرات سابقة حسب طريقة (National committee for clinical 10) اذ حضر المحلول الخزين (Stock solution) لكل مركب من اذابة (10.240) ملغم من المستخلص في (4) مل من المذيب Di methyl sulfoxaid (DMSO) . وحضرت سلسلة من التخافيف :
(0.03, 0.06, 0.125, 0.25, 0.5, 1,2,4,8,16,32,64,128) مايكروغرام /مل ومزج (1)مل من كل تخفيف من التخافيف اعلاه مع (9) مل من وسط (MHA)، حضنت الأطباق هوائياً بدرجة حرارة (37) ^{o}م ولمدة (24) ساعة، سجلت النتائج وحدد التركيز المثبط الادنى لكل مركب .

5 – تحديد فعالية المركبات المستخلصة ضد العزلات السريرية

حددت فعالية المركبات المستخلصة من نبات الخردل الاسود ضد (100) عزلة جرثومية عزلت من مواقع سريرية مختلفة في دراسة سابقة، حسب طريقة (12) التي ذكرت سابقاً.

6 – تحديد السمية الخلوية

تم تحديد السميه الخلويه للمركبات المستخلصه من نبات الخردل الاسود حسب طريقة and (14) . إذ حضر محلول رنير الفسيولوجي (Ringer Soliution) المعقم ، من أذابة (0.9) غم NaCl ، (0.092) غم KCl ، (0.024) غم $CaCl_2$ ، (0.03) غم $NaHCO_3$ ، (0.200) غم glucose في (100) مل من الماء المقطر . تم أضافة (18) مل من محلول رنير الفسيولوجي الى (2) مل من الدم المسحوب من الإنسان. حضرت التخافيف التالية (1:1 , 1:10 , 1:100, 1:1000) . أستخدم لكل مستخلص معامل سيطره سالبة تحتوي على Normal saline فقط ومعامل سيطرة موجبة (تحتوي على ماء الحنفيه) . ثم وضع (0.8) مل من كل تخفيف في أنبوبة أختبار معقمه ، وأضيف لكل أنبوب (0.2) مل من الدم ليصبح الحجم النهائي لكل أنبوب (1) مل حضنت الانابيب في الحاضنة بدرجة حرارة (37) ^{o}م مع مراقبتها كل نصف ساعة لمدة (6) ساعات بعدها تركت إلى اليوم التالي لملاحظة التحلل الدموي وسجلت النتائج .

النتائج والمناقشة

الدراسة الكيميائية

اظهرت نتائج التحليل الكيميائي ان المستخلص الكحولي لبذور نبات الخردل الاسود تحتوي على العديد من المركبات الفعالة بايولوجيا مثل القلويدات، فلافونويدات، فينولات، كلايكوسيدات و احماض امينية كما موضح في الجدول (1). يمكن ان يعزى ذلك الى قطبية المذيب التي تلعب دوراً هاماً في استخلاص العديد من المركبات الفعالة وترسيب اكبر كمية ممكنة منها اثناء عملية الاستخلاص(8).

جدول (1) : يوضح نتائج الكشوفات النوعية الاولية لبعض مكونات بذور نبات الخردل الاسود في المستخلص الكحولي.

نوع الكشف	اسم الكاشف	النتيجة
كشف القلويدات	كشف دراندكروف	+ كشفاً موجباً
	كشف ماير	+ كشفاً موجباً
	كشف واكنر	+ كشفاً موجباً
كشف الكلايكوسيدات	كشف بندكت	+ كشفاً موجباً
كشف الفلافونويدات	K oH (SN)	+ كشفاً موجباً
كشف الفينولات	$Fe\ cl_3$	+ كشفاً موجباً
كشف الاحماض الامينية	كشف الثندهايدرين	+ كشفاً موجباً

الفعالية المضادة للجراثيم

PDF Created with deskPDF PDF Writer - Trial :: http://www.docudesk.com

توضح الجداول (2) و (3) ان المستخلص الكحولي لبذور نبات الخردل الاسود لم يبدِ أي تاثير مثبط ضد السلالات القياسية والعزلات المرضية الموجبة والسالبة لصبغة كرام، وقد يعزى هذا الى الفعالية التضادية بين المركبات الفعالة الموجودة في هذا المستخلص مما يؤثر على فعالية المستخلص، بينما ابدى المستخلص الفلافونويدي لبذور نبات الخردل الاسود فعالية تثبيطية ضد جميع الجراثيم المستخدمة في هذه الدراسة وترجع فعالية هذه المركبات الى وجود مجموعة الكاربونيل (C = O) ومجموعة او اكثر من مجاميع الهيدروكسيل مما يزيد من تركيز الشحنة السالبة في المركب وتصبح اكثر فعالية، اذ تعمل على ترسيب بروتينات الجدار الخلوي وتحليله (Reed, 1995). وهذا يتفق مع دراسة (9,11). فقد لاحظ ان المركبات الفلافونويدية المستخلصة من بعض النباتات الطبية تمتلك فعالية ضد مايكروبية واسعة الطيف. اما البياتي وجماعته (2001) فقد اثبت ان المركب الفلافونويدي يمتلك فعالية تثبيطية ضد الجراثيم الموجبة والسالبة لصبغة كرام.كما واظهر المستخلص الكلايكوسيدي تاثيراً فعالاً ضد جميع الجراثيم المستخدمة في الدراسة وقد يعزى السبب الى وجود تفاعل بين المجموعة الفعالة للمركب الكلايكوسيدي والبروتينات الخلوية ونتيجة لهذا التفاعل فمن الممكن ان يتأيض المستخلص الكلايكوسيدي الى نواتج سمية تؤثر على نمو الجراثيم. اثبتت جميع البحوث التي اهتمت بدراسة نبات الخردل الاسود ان المركبات الكلايكوسيدية تمتلك تاثيراً مثبطاً قاتلاً ضد الجراثيم (Reed, 1995).

جدول (2) : يوضح فعالية المستخلصات المحضرة من نباتي الخردل الاسود ضد السلالات القياسية

اسم النبات المحلي	نوع المستخلص والمادة	*S. aureus*	*E. Coli*	*Ps. aeruginosa*
الخردل الاسود	مستخلص كحولي	ــــــــــ	ــــــــــ	ــــــــــ
	فلافونويد	20*	25*	15*
	كلايكوسيد	30*	25*	20*
ــــــــــ	Ampicillin (10µg/disc)	43	ــــــــــ	ــــــــــ
ــــــــــ	Cephataxin (30µg/disc)	34	28	18

* اقطار التثبيط مقاسة بوحدة (ملم)

جدول (3) : يوضح فعالية المركبات المستخلصة من نباتي الخردل الاسود ضد العزلات السريرية

العزلات	عدد العزلات	عدد العزلات الموجبة		اقطار التثبيط (ملم)
		فلافونويد	كلايكوسيد	
S. aureus	25	20	18	(20 – 28)
E. Coli	25	22	25	(18 – 30)
Ps. aeruginosa	25	15	20	(15 – 22)
Pro. vulgaries	25	25	25	(20 – 25)

التركيز المثبط الادنى

يوضح الجدول (4) التراكيز المثبطة الدنيا للمستخلص الفلافونويدي والكلايكوسيدي لبذور نبات الخردل الاسود ، اذ اظهر المستخلص الفلافونويدي تركيز مثبط ادنى ضد السلالات القياسية الموجبة لصبغة كرام *S. aureus* والسالبة لصبغة كرام *E. coli* و *Ps. aeruginosa* وبلغ (2 ,0.25 ,1) مايكرو غرام /مل على التوالي.

اما المستخلص الكلايكوسيدي فقد كان التركيز المثبط الادنى ضد السلالات القياسية الموجبة لصبغة كرام *S. aureus* هو (0.5) مايكرو غرام /مل، اما السلالات القياسية السالبة لصبغة كرام *E. coli* و *Ps. aeruginosa* فكان التركيز المثبط الادنى لها هو (0.125 ,0.25) مايكرو غرام /مل على التوالي. ويعزى ذلك الى ان المركبات الفلافونويدية هي مركبات اروماتية حاوية على مجاميع هيدروكسيل حرة ومتعددة وان القدرة التثبيطية لهذه المركبات تزداد بزيادة هذه المجاميع وذلك من خلال تكوين اواصر هيدروجينية بين مجاميع الهيدروكسيل (الحرة والمتعددة) للمركب ومجاميع الكبريت للبروتينات مما يؤدي الى تغيير طبيعة البروتينات الخلوية مسببة ترسيبها وفقدان وظيفتها (6). اما الكلايكوسيدات فهي عبارة عن مركبات عضوية تتكون من جزء سكري واخر غير سكري. فالجزء غير السكري في الكلايكوسيدات المستخلصة من بذور نبات الخردل الاسود هي مركبات كلايكوسيدية كبريتية تدعى *Signrin* ، ويرجع التاثير الضد مايكروبي لهذا لجزء. بينما الجزء السكري يساعد الجزء غير السكري على امتصاصه من قبل الكائن الحي (حسين ، 1981).

PDF Created with deskPDF PDF Writer - Trial :: http://www.docudesk.com

جدول (4) : يوضح التراكيز المثبطة الدنيا للمركبات المستخلصة من نباتي الخردل الاسود

اسم النبات المحلي	المركب	*S. aureus*	*E. Coli*	*Ps. aeruginosy*
الخردل الاسود	فلافونويد	2.0	0.25	1.0
	كلايكوسيد	0.5	0.125	0.25

السمية الخلوية

لم تظهر المركبات المستخلصة أي سميّة خلوية عند اختبارها باستخدام كريات الدم الحمراء. وان مثل هذه النتائج ضرورية تشير الى امكانية استخدامها للاغراض العلاجية (13).

المصادر العربية

1- البياتي ، رياض وسلمان الجنابي ، مصعب المدرس دراسة تأثير مستخلصات أوراق نبات النعناع البري في منطقة تلعفر على نمو بعض الأحياء الدقيقه . مجلة علوم المستنصريه ، 2 / (1) : 77 – 86 .(2001) .

2- حسين ، فوزي طه قطب النباتات الطبية، زراعتها ومكوناتها، دار المريخ للنشر، الرياض.(1981) .

References

1- Abdul – Rahman , G.Y., Effect of some midcinal plants and chemicals on the growth of pathogenic bacteria .J. vet . Sci . 8 (2) : 101 – 108 . (1995).

2- Al-Assadi , I.J., Study of hypoglycemic and anti hypergly cemic action of *Olea eupaea* in animals and human . Ph.D. Thesis , coll. Sci. Bas. Univ. Iraq. (2001).

3- Colle , J . ; Fraser , A . ; Marmion , B . and Simmans , A . Mackie and Macartney practical medical microbiology . 14th ed . Churchill Living ston . New York , USA. 978 pp. (1996).

4- Desta , B., Ethiopian traditional herbal drugs : Antimicrobial activity of 63 medicinal plants . J. Ethnopharmacol ., 39 : 129 – 139 . (1993).

5- Elshrck, Y. M., Towati, F. M. and Marawan, " The Effect of Naspoli Leaves Wxtract on some Microorganism Growth " . J. of Basic and applied Science(1), 41. (1993).

6- Feeny , P., Inhibtory effect of Oak Leaf tannins on the hydrolysis of proteins by trypsine . J. Phytochemistry , 8:2119 – 2126 . (1998).

7- Gayon , P.R. Plantphenolics 1st ed oliverand Boye. Edinburge P : 254 .

8- Kelmanson , J.E., Jager , A.K. and staden , J.V. Zulu medicinal plants with antibacterial activity . J. *Ethno phar* ., 69 : 241 – 246. (1972), (2000).

9- Kuo , S.M. Antiproliferative potency of structurally distinct dietary flavonoid on human colon cancer . J. cancer Lett , 12 : 41 – 48 . (1996) .

10- National Committee for clinical Labaratory Standards .Methods for dilution anti microbial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically . Approved standard M7 – A4 . National committee for clinical Labaratory standards . Wayne . PA. USA. (1997).

11- Ohemeng, S. A, Schwenderr, K. P. and Barrett, J. F," DNA g yase Inhibitory and Antibacrerial Activity of some Flavones " , J. Bioorganic and Medical Chemistry Letters, (3), 41. (1993)

12- Perez , C.; Pauli , M. and Bazerque , P. An antibiotic assay by the agar – well diffusion method . J. Actabiologiae ., 15:113 – 115 . (1990).

13- World Health Organization (WHO), Guielines for leveles and kinds of evidence to support claims for therapeutic goods; WHO Geneva, Annex V., P. 39 – 45.(2000).

14- Xian – guo , H. and ursella , M. Antifungal compounds from Solanum nigrescens . J. Ethnopharm., 43 : 173 – 177 .(1994).

PDF Created with deskPDF PDF Writer - Trial :: http://www.docudesk.com

Abstract

The antibacterial activity studies of the Alcoholic , Flavonoides and glycoside extracts of the plant *Brassica Nigra* (Seeds) on Gram positive standard strain represented by *Staphylococcus aureus* and Gram negative standard strain represented by *Escherichia Coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, also antibacterial activity studied on (100) isolated included Gram positive strain represented by *S. aureus* and Gram negative standard strain represented by *E. Coli , Ps. aeruginosa* and *Proteus vulgaries.*

The results show that the flavonoid and glycoside extract of the plant *Brassica Nigra* had antimicrobial activity against Gram positive and Gram negative strain in this studies, but alcoholic extract of the plant *Brassica Nigra* was no antibacterial activity on all strain.

The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined. The results showed that the (MIC) of the flavonoid and glycoside extract on Gram positive standard strains *S. aureus* was (2, 0.5) µg/ml respectively, and Gram negative standard strain represented by *E. Coli* was (0.25, 0.125) µg/ml respectively and *Ps. aeruginosa* was (1,0.25) µg/ml respectively. The celluler cytotoxicity of flavonoide and glycoside extract was determined by observation of its effect on RBCs. The results found that all these extracts didn't show any cytotoxicity on the concentration (200) mg/ml.

PDF Created with deskPDF PDF Writer - Trial :: http://www.docudesk.com