دراسة التأثير التثبيطي للراسب ألبروتيني للكركم على عدد من الجراثيم السالبة والموجبة لصبغة كرام [+]

STUDY THE INHIBITING EFFECT OF PRECIPITATED PROTEIN OF CURCUMA IN BOTH GRAMS NEGATIVE AND POSITIVE BACTERIA

هيثم عبد الله رجب محمد [*]

المستخلص:

هدفت الدراسة إلى معرفة مدى التأثير التثبيطي للراسب ألبروتيني لجذور نبات الكركم والتي لها أهمية في مجال استخدام الأعشاب الطبية حيث تمت الدراسة على مجموعة من البكتيريا السالبة والموجبة لصبغة كرام مثل بكتيريا *E. coli*، *Proteus vulgaris*، *Corynbacterium progenes*، *Klebsilla pneumonia*، *Bacillus cerus*, ، *Staphylococcus aureus* ، واظهر الراسب ألبروتيني الذي تم الحصول علية من جذور نبات الكركم الذي تم الحصول عليه من احد الأماكن المختصة في بيع النباتات والإعشاب الطبية في مدينة الموصل، وتم تصنيفه في كلية العلوم، قسم علوم الحياة / جامعة الموصل. تم الحصول على العزلات من احد المختبرات التخصصية ومختبر مستشفى الخنساء في مدينة الموصل وتم التأكد من جميع العزلات التي تم الحصول عليها بواسطة عدد من الاختبارات الكيموحيويه التشخيصية لكل نوع وكانت جراثيم*E. coli* سالبه لصبغة الكرام ،غير متحركة ،غير مكونه للابواغ ، ومخمرة للكلوكلوز، وسالبة لاختبارات اليوراز ، فوكس بروسكار ، والنترات ، وإنتاج كبريتيد الهيدروجين،وموجبة لاختبار المثيل الأحمر ،فضلا عن ذلك تعتبر جراثيم *Proteus vulgaris* سالبه لصبغة الكرام ،ومخمرة للكلوكلوز وموجبه لاختبار اليوراز، وإنتاج كبريتيد الهيدروجين، وسالبه لاختبارات الاندول، السترات ، وان جراثيم *Klebsilla Pneumonia* سالبه لصبغة الكرام غير متحركة ، ومخمره للكلوكوز، وموجبه لاختبارات الكاتالاز، اليوراز، السترات، فوكس بروسكاور ،وسالبه لاختبارات الاندول، المثيل الأحمر ، وان جراثيم *Staphylococcus aureus* من الجراثيم الموجبة الكرام ،غير المتحركة ،وغير المكونة للابواغ ، وتترتب بشكل عناقيد ، مخمره للكلولوز ، موجبه لاختبارات اليوراز، النترات ، وسالبه لاختبارات الاوكسيداز ، الاندول ، وتعتبر جراثيم *Corynebacterium pyogenes* من الجراثيم الموجبة لصبغة الكرام ،غير المتحركة ،وغير المكونة للابواغ وتكون متعددة الإشكال، مخمره للكلولوز وسالبه لاختبارات الاوكسيداز، الكاتالاز، الاندول ،النترات، المثيل الأحمر، وان جراثيم *Bacillus Cereus* موجبه لصبغة الكرام، مخمره للكلوكوز، وموجبه لاختبارات النترات، السترات، وسالبه لاختبار اليوراز.

وتم اختبار الفعالية التثبيطية للراسب ألبروتيني استخدام طريقة Kirby-Bauer method ، ولغرض تعقيم الراسب ألبروتيني تم إذابة (١) غرام من الراسب إلى (٥) مل من مادة ثنائي مثيل السلفوكسيد ثم عقم المزيج بطريقة البسترة بدرجة (٦٢) م لمدة (١٥) دقيقة ثم أضيف (١) مل من الراسب المحضر والمعقم إلى قنينة حاوية على (١٠٠) قرص معقم وتم تثبيت الأقراص على أكار المولر هنتون وحضنت الأطباق وتم قياس قطر تثبيط النمو بواسطة مسطرة بلاستيكية شفافة وقورنت النتائج بالمصادر العلمية حيث اظهر الراسب تأثيرا تثبيطيا متفاوتا على

[+] تاريخ استلام البحث ٢٠٠٩/٤/٢٢ ،تاريخ قبول النشر ٢٠١٠/٨/٢٤ .

[*] مدرس مساعد/ المعهد التقني / الموصل

الجراثيم المستخدمة في الدراسة وكان التأثير التثبيطي الأعلى علـــى جرثومـــة *E. coli* ، جرثومـــة ، *Proteus vulgaris* ، وجرثومة*Bacillus cerus* ، جرثومة *Staphylococcus aureus* ، واظهر الراسب تأثيرا تثبيطيا على *Klebsilla pneumonia* ولكن اقل من الأنواع السابقة الأخرى عند مقارنة النتائج مـــع عينـــات الـــسيطرة وقياس قطر التثبيط، ولم يظهر تأثير تثبيطي للراسب على جرثومة *Corynbacterium pyogenes* مقارنـــة مـــع عينات السيطرة المستخدمة في الدراسة وهي المضاد الحيوي Ciprofloxacin (٥) ملغم وهو المـــضاد الحيـــوي المفضل، Gentamycin (١٠) ملغم .

Abstract:

The aims of the study is to identify the inhibition activity of precipitated protein of Curcuma root plant on a group of bacteria, both Gram negative and positive such as: *E. coli*, *Proteus vulgaris*, *Corynebacterium pyogenes*, *Klebsiella pneumonia*, *Bacillus cerus* and *Staphylococcus aureus*. Precipitated protein was obtained from Curcuma root plant from a specified place in Mosul city, and was classified in the college of science/ Department. of Biological Sciences. Isolates are obtained from specialized Lab. And Al-Khansa hospital Lab. In Mosul city. All isolates were checked by many diagnostic biochemical tests. *E.Coli* is Gram negative, non-motile, non-spore forming, positive for glucose fermentation, negative to urease, nitrate, methyl red, voges proskauer, H_2s, production tests. *Proteus vulgaris*, Gram negative, positive for glucose fermentation, urease, H_2s, production tests, negative to citrate, indol tests. *Klebsila pneumonia* is a Gram negative, non-motile, positive for glucose fermentation, catalase, citrate, urease, voges proskauer tests, and negative for indol, methy red tests.

***Staphylococcus aurese*, Gram positive, non-motile, non-spore forming, and is arranged in clusters like groups, positive for glucose fermentation, urease, nitrate production tests, and it is negative to oxidase, indol tests. *Cornyebacterium pyogenes*, Gram positive, non-motile, non-spor forming, pleomorphic bacteria, positive for glucose fermentation, and negative for oxidase, indol, catalase, nitrate methyl red tests. *Bacillus ceruse*, Gram positive, positive for glucose fermentation, Nitrate, citrate, negative for urease test.**

In this study Kirby Bauer method was used to identify the inhibitory effect of precipitated protein. For sterilization, (1) gram of the precipitated protein was dissolved in (5) ml of dimethylsulphoxid and the mixture was sterilized by pasteurization in (62) c° for (15) minutes, and 1 cm of the sterilized mixture was added to a vial containing (100) discs, and was fixed on Miller Henton agar, then was incubated at 37 c° for 24 hours. Measuring the inhibition zone growth, the inhibition zone was different according to the type of bacteria. The higher effect of inhibition was observed on *E. coli*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus cerus, Staphylococcus aureus* ،the precipitated protein showed less inhibition effect on Klebsiella pneumonia than the previous types, and the precipitated protein didn't show inhibitory effect on *Corynbacterium pyogenes* when compared with the control sample which contained antibiotics, Ciprofloxacin (5) mg, it is the preferred , and Gentamycin (10) mg.

المقدمة:

استخدمت النباتات الطبية على نطاق واسع منذ الاف السنين لمعالجة بعض المشاكل الطبية بالإضافة إلى استخدام العديد من الشعوب للمستخلصات النباتية وخاصة تلك التي تمتاز بنكهة البهارات مثل نبات الكركم. وهو عشب هندي معمر من الفصيلة الزنجبيلية يستعمل سحيق جذوره تابلاً وصباغاً أصفراً فاقعاً. اشتق اسمه العلمي Curcuma من اللفظ العربي الكركم ، وهذا مأخوذ من لفظ فارسي معناه الأصفر، نسبة إلى الصبغة الناتجة من جذوره . ومن أسمائه أيضا: (هود) ، (كركب) محرف من كركم ، وعقيد الهند. وقد عرف الإنسان هذا النبات في الهند والصين والملايو وغيرها من البلاد في جنوب أسيا ، ونقله العرب والبرتغاليون إلى أوربا فاستعمل في الطب والأغذية وهو من أهم مواد التلوين في الهند . ووصف في الطب بأنه منبه خفيف وهاضم ومدرر للبول ومضاد لداء الحفر – الرشح – والآلام العظمية واضطرابات المرارة ، كما يستعمل لعلاج داء السكر [١]. كما يستعمل الكركم في الهند وآسيا على نطاق واسع لعلاج القرحة ، حيث أجريت دراسات في تايلاند أفادت بأنه اخذ على شكل كبسولات محضرة من الكركم تحتوي على (٢٥٠) ملغم بمعدل كبسولة ثلاث مرات يوميا لها دور مهم في علاج القرحة [٢]. وفي الوقت الحاضر الذي بدأ فيه اكتشاف وتصنيع المضادات الحياتية يعتقد الباحثون والعلماء في هذا المجال أن هذه المضادات سوف تقضي على البكتريا المرضية ، وتبين بعد فترة من الزمن خطأ اعتقادهم ، إذ أظهرت البكتريا قدرة على التكيف مع هذه المضادات ومن هنا أصبحت الحاجة ملحة للحصول على مركبات طبيعية تستخرج من النبات وتستخدم كمضادات حياتية[٣].

وعلى هذا الأساس جاءت فكرة البحث في بيان التأثير التثبيطي للراسب البروتيني المفصول من جذور نبات الكركم في نمو عدد من الجراثيم .

المواد وطرائق العمل:

جمع النبات المستعمل:

تم الحصول على جذور نبات الكركم من احد الأماكن المختصة ببيع النباتات والأعشاب الطبية في مدينة الموصل وتمت تصفيته في كلية العلوم / قسم علوم الحياة /جامعة الموصل

الاسم العربي: الكركم .

الاسم الانكليزي للنبات: Curcum

الاسم اللاتيني للنبات : Curcuma

فصل الراسب البروتيني:

وزن (٥٠٠) غم من جذور نبات الكركم بعد ذلك مزجت مع الماء المقطر وسحقت باستخدام آلة الفرم لمدة (١٥) دقيقة بعدها بإضافة النتروجين المسال ، وبعد ذلك حرك الخليط لمدة ساعتين تحت تأثير المحرك الكهربائي ثم رشح من خلال عدة طبقات من الشاش وفصل الراشح عن الشوائب المتبقية بجهاز الطرد المركزي المبرد لمدة (٢٠) دقيقة. ثم أضيف الأسيتون البادر إلى الراشح بنسبة (٦٠:٤٠) حجم:حجم على التوالي ببطء مع التحريك المستمر عند درجة حرارة ٤ درجة مئوية. ثم ترك المزيج في الثلاجة لمدة (٢٤) ساعة. فصل البروتين المترسب بجهاز الطرد المركزي المبرد لمدة (٢٠) دقيقة عند (6000xg) فالراسب يمثل الراسب البروتيني بعدها جفف كل منها باستخدام جهاز التجفيف بالتبريد للحصول على المادة بشكل مسحوق نقي[٤].

إختبار الفعالية التثبيطية للراسب ألبروتيني:

تم اختبار الفعالية التثبيطية للراسب ألبروتيني باستخدام طريقة Kirby-Bauer method ، حيث نقلت قطره (loop full) من مستعمرة نقية لكل نوع من الجراثيم المستخدمة في الدراسة إلى (١٠) مل من المرق المغذي المعقم وحضنت بدرجة (٣٧) درجة مئوية لمدة (٤-٥) ساعات ،ثم اخذ مسحه قطنية من العالق البكتيري وغمرت المسحة القطنية على الجزء العلوي لجدار الأنبوبة الداخلي ونشر العالق البكتيري على سطح أكار مولر – هنتون وبثلاث اتجاهات مختلفة لتكون طبقة رقيقة متجانسة من النمو الجرثومي على الوسط . وتركت الأطباق لمدة (٥ – ١٠) دقائق لتجف [٥]. ولغرض تعقيم الراسب ألبروتيني تم إذابة (١) غم من الراسب إلى (٥) مل من مادة ثنائي مثيل السلفوكسيد Dimethylsulphoxide (DMSO) ، ثم عقم المزيج بطريقة البسترة بدرجة (٦٢) مئوية لمدة (١٥) دقيقة[٦]. ثم أضيف (١) مل من الراسب المحضر والمعقم إلى قنينة حاوية على (١٠٠) قرص معقم [٧]. وتم تثبيت الأقراص على سطح أكار مولر–هنتون باستعمال ملقط معقم بالتلهيب الكحولي ، ثم تركت الأطباق لمدة (١٠) دقائق على المنضدة ثم حضنت بدرجة (٣٧) درجة مئوية لمدة (٢٤) ساعة. وتم قياس قطر تثبيط النمو بواسطة مسطرة بلاستيكية شفافة، وقورنت النتائج مع الجداول الخاصة بالمصادر العلمية[٨]. وقد تم استخدام المضاد الحيوي السايبروفلوكساسين (٥) ملغم ، جنتامايسين (١٠) ملغم.

النتائج والمناقشة:

من خلال الدراسة، أظهر الراسب البروتيني لجذور نبات الكركم تأثيراً تثبيطياً على أجناس البكتيريا السالبة والموجبة لصبغة كرام والمستخدمة في الدراسة. وكان التأثير التثبيطي الأعلى على جرثومة *E. coli* ، *proteus vulgaris* ، *Bacillus cerus* ، *Staphylococcus aureus* . واظهر الراسب البروتيني تأثيراً تثبيطياً على جرثومة *Klabsella pneumonia* ولكن بشكل اقل من بقية الأنواع السابقة الذكر، عند مقارنتها مع عينات السيطرة وقياس قطر التثبيط. إضافة إلى ذلك ، لم يظهر الراسب البروتيني تأثيراً تثبيطياً على جرثومة *Coryenbacterium pyogenis* علماً أن التركيز المستخدم في الدراسة للراسب البروتيني هو (١٠٠) ملغم/ملتر. بالإضافة إلى ذلك كانت عينات السيطرة المستخدمة في الدراسة هي السايبروفلوكساسين (٥) ملغم ، جنتامايسين (١٠) ملغم .

الراسب ألبروتيني Conc. (mg/ml)	*E. coli*	*Staphylococcus aureus*	*Bacillus cerus*	*proteus vulgaris*	*Klibsella pneumonia*	*Coryenbacterium pyogenis*
100	٤٢	٣٦	٣٥	٣٩	٣٣	١٢
Ciprofloxacin (5)	٣٦	٣٣	٣٢	٣٥	٣٠	٩
Gentamycin (10)	٢٨	٢٢	٢٥	٢٦	٢٠	٨

جدول يوضح التأثير التثبيطي للراسب ألبروتيني على نمو عدد من الجراثيم السالبة والموجبة لصبغة كرام (قطر دائرة التثبيط مقاس بالملم)

وهدفت الدراسة إلى معرفة مدى التأثير التثبيطي للراسب البروتيني لجذور نبات الكركم على مجموعة من الجراثيم وذلك لان الكركم يعد احد النباتات ذات الأهمية الحيوية والطبية وله دور في معالجة وشفاء حالات مرضية ويلعب دوراً مهماً في مناعة الجسم ، فضلاً عن انه يعتبر أحد العوامل المثبطة للنمو الجرثومي[٩ – ١٠]. وتبين من الدراسة التأثير الواضح على معظم العزلات البكتيريه التي قورنت نتائجها مع عينات السيطرة للمضادات الحياتية .

واظهر الراسب البروتيني تأثير على جرثومة *Staphylococcus aureus* وهذا ما توصل إليه Park وجماعته [١١]، في دراسة أجريت في كوريا الجنوبية حيث أشارت الدراسة إلى أن الكركم له دور تثبيطي لنمو جراثيم *Staphylococcus aureus* عند مقارنة النتائج مع عينات السيطرة . وفي دراسة أخرى أجريت في كوريا – وتحديدا في سيئول – من قبل Hwang & Rukayadiy [١٢] ، حيث أكدت الدراسة أن نبات الكركم له تأثير تثبيطي على جرثومة *Staphylococcus aureus* وتم في هذه الدراسة استخدام تراكيز مختلفة من الكركم وهي (٥ و ١٠ و ٥٠) ملغم/مل وفي أوقات مختلفة من التعرض (١، ١٠ ، ٣٠ ، ٦٠) دقيقة ، وكانت النتائج معتمدة على التركيز والوقت. والنتيجة التي تم التوصل إليها في هذه الدراسة هي أن الكركم عامل مثبت (Anti Bacterial Agent) لجرثومة *Staphylococcus aureus* .

ولقد توصل Zaidi وجماعته [١٣] في دراسة أجريت في اليابان هدفت إلى إيجاد نباتات لها القدرة على تثبيط نشاط ونمو جرثومة *heliocobacter pylori* والتي تسبب حالات مرضية مختلفة منها قرحة ألاثني عشر وسرطان المعدة . وتم اختيار (٧) عزلات للجرثومة واستخدم نبات الكركم لمعرفة مدى تأثيره على الجرثومة واستخدم تركيز يتراوح ما بين (٧,٨ – ٥٠٠) ug/ml ، وكانت النتائج تثبيط كلي للجرثومة بتركيز (٥٠٠) ug/ml ، وبشكل اقل عند استخدام تراكيز اقل .

وأشار Talwar وآخرون [١٤] إلى أن الكركم له دور مهم في تثبيط نمو العديد من العزلات المقاومة لجراثيم *Neissera gonorrhoeae* المقاومة للبنسيلين ، التتراسايكلين ، والسايبروفلوكساسين، والناليديكسيك أسيد. وفي الدراسة ذاتها كان للكركم دوراً تثبيطياً أيضا للـ candidia. فضلاً عن ذلك أكدت دراسة أجريت في المانيا من قبل Wessier وآخرون [١٥] على أن الصبغة الصفراء المشتقة من الكركم تعالج الخلايا وتقضي وتبطل التصاق الجراثيم بالخلية واضاف الباحثون في الدراسة إلى أن الكركم يعتبر مضاد بكتيري ومركب مضاد للسموم من دون أي اضرار او سموم خلوية cytotoxic effects .

في الدراسة، تم استخدام الجراثيم السالبة ، الموجبة لصبغة كرام وذلك لملاحظة التأثير التثبيطي للراسب البروتيني على النوعين. وتم استخدام نوعين من المضادات الحياتية لقياس ومقارنة مدى التأثير التثبيطي للراسب البروتيني الذي تم استخدامه بتركيز (١٠٠) ملغم/ مل . ولم اتمكن من مقارنة جميع النتائج التي تم التوصل إليها في البحث وذلك لعدم توفر دراسات حول التأثير التثبيطي للراسب البروتيني لبعض انواع الجراثيم التي تم استخدامها في الدراسة . كانت الغاية من اجراء البحث معرفة مدى التأثير التثبيطي للراسب البروتيني على انواع مختلفة من الجراثيم السالبة والموجبة لصبغة كرام.

وقد يعزى السبب في عدم ظهور تأثير تثبيطي للراسب البروتيني على بكتيريا *Coryenbacterium pyogenis* لأنها قد تكون احدى العتر المقاومة لهذا النوع من المركبات كما هو الحال في مقاومة بعض انواع الجراثيم للعديد من المضادات الحياتية. ويرجع ذلك إلى عدة اسباب أهمها الاستخدام المستمر وغير المنتظم للمضادات الحياتية علاوة على ذلك تلعب العوامل الجينية، مثل البلازميدات والترانسبوزونات ، والطفرات الوراثية دورا مهما ايضا في الزيادة المستمرة للمقاومة لمعظم المضادات الحياتية[١٦ – ١٧].

المصادر :

١- فراحة ، أحمد ، *قاموس الغذاء والتداوي بالنبات* ، دار النفائس، بيروت ، لبنان ، ص 579،1995.

٢- نادر ، نيبال ، *التداوي بالإعشاب الطبية* ، دار يوسف ، بيروت ، لبنان ، ص153،2005.

3- Digrak M., Ilcim A. and Alma M. H. "*antimicrobial activities of several parts of pinus bruta, Juniperus oxycedrus, Abies cilicia, cedrus libani and pinus nigra*." Phytother Res., 13: 584-587.1999.

4- Robyt, F. J., White, J. B. *Biochemical techniques*, theory and practice, Brookslcloe publishing company, Monterey, California, p.p 115-118.1987.

5- Baron, E. J. and Finegold, S. M. *Diagnostic Microbiology, 8th* Ed. C. V. Mosby Company, USA.1990.

٦- النعمان، اديبة يونس شريف، *التأثير الجزئي لبعض المستخلصات النباتية على نمو ايض عدد من الجـــراثيم* ،أطروحة دكتوراه ، كلية العلوم، جامعة الموصل.**1998**.

7- Todar, K. "Staphylococcus", *J. Med. Microbiol., 1-9.*2002.

8- collee j.G fraser A .G marmion B .P and simmons A.. *Makie and McCartney practical Medical Microbiology*. 14th ed ,Churchil Livinggston Inc, new York. 435-445.1996.

9- Ranjan, D. Squijor, A. Johnston TD, Wu G, Nagabhuskahn M. Am. Sug. Jan.*;* 64(1): 47-51; Discussion 51-2.1998

10- Priya s, Sudhakaran PR iIndia. *J Biochem Biophys,* , 45(5): 317-25.2008

11- Park BS, Kim JG, Kim MR, Lee SE, Takeoka GR, Oh KB, Kim JH. 1:*J Agric Fod Chem*. 16; 53 (23): 9005-9.2005

12- Rukayadi Y. Hwang JK. 1: *Lett Appl Microbiol*.; 42: (4): 400 – 4.2006

13- Zaidi SF., Yamada K, Kadowaki M, US mang hani K, Sugiyama T. *J: Ethanopharmacol.* 2009 Jan. 21; 121 (2): 286-91. Epud 2008.

14- Talwar GP, Dar Sa, Rai MK, Reddy KV, Mitra D. Kulkarni SV, Doncel GF, Buck CB, Schiller J T, Muralidhar S, Bala M, Agrawal SS, Bansal K, Verma .*J Antimicrob Agent*. 2008 Agu:32(2):180 -5. Epub 2008

15- Wessler S, Muenzner P, Meyer TF, Nauman M. *J: Biol Chem.*, May; 386(5): 481-90.2005.

١٦- حداد ، جاسب جاسم، *علم الاحياء المجهرية البيطرية*، *اساسيات علم الجـــراثيم* ، مطبعـــة دار الحكمـــة للطباعة والنشر، الموصل، العراق.1991

17- Konemom, E. W.; Allen S. D.; Janda W. M.; Schreckenberger, P. C. and Winn W. C. *Color Atlas and textbook of diagnostic microbiology*, 5th Ed. Lippinott-Raven publishers, Philadelphia, USA.1997.