تأثير مستخلص التانين لبعض النباتات في فعالية بعض البكتريا المرضية

أسامة إبراهيم أحمد بري أحمد خورشيد فاتن محمد نواب الدين
كلية الزراعة ، جامعة كركوك

الخلاصة

تم دراسة تأثير المستخلصات المائية لكل من بلوط العفص *Quercus infectoria* وأوراق الشاي *Camellia sinensis* وقشور ثمار الرمان *Punica granatum* L. إضافة إلى التانين النقي Tannic acidعلى نمو أربع عزلات من البكتريا المرضية السالبة والموجبة لصبغة كرام ، شملت كل من بكتريا (*Escherichia coli* و *Klebsiella pneumonia* و*Proteus mirabilis* و *Staphylococcus aureus*) بطريقة الإنتشار بالحفر وهذه العزلات تم الحصول عليها من مختبر التحليلات المرضية في مستشفى كركوك العام في مدينة كركوك .

أظهرت النتائج تأثيرات متباينة للمستخلصات المائية المستخدمة في الدراسة ، فقد أظهر مستخلص قشور الرمان أكبر فعالية تثبيطية تجاه جميع عزلات البكتريا الأربعة المختبرة يليها في التأثير مستخلص بلوط العفص ومن ثم التانين النقي في حين لم يظهر مستخلص أوراق الشاي تأثيرات عالية تجاه عزلات البكتيريا وإنعدم كلياً التأثير التثبيطي لها في بكتيريا *Staphylococcus aureus* ،وقد كانت بكتريا*Escherichia coli* أكثر حساسية من بقية أنواع البكتريا الأخرى .

المقدمة

تعتبر النباتات ذات الخصائص الطبية مصدراً رئيساً للعقاقير والمواد الفعالة التي تدخل في تحضير الأدوية والمستلزمات الطبية (Macura ، ١٩٩١) ، وقد زاد الإهتمام في السنوات الأخيرة بالنباتات الطبية من حيث إستخدامها كمصادر أولية رئيسية لإنتاج العديد من العقاقير ، كما تناولت كثير من الدراسات الحديثة تأثير المستخلصات النباتية في القضاء على المسببات المرضية وبالتالي إمكانية إستخدامها في علاج بعض الأمراض الناتجة من بعض الإصابات ومنها الإصابات البكتيرية المختلفة (Kyung وLee ، ٢٠٠١) و(Jamil وآخرون، ١٩٩٩) .

أصبحت ظاهرة مقاومة البكتريا للمضادات المختلفة وكنتيجة للإستخدام الواسع والعشوائي لهذه الأدوية في الآونة الأخيرة من الظواهر ذات التأثير السلبي طبياً وصناعياً مما فسح المجال لزيادة المقاومة من قبل البكتريا تجاه هذه المضادات (Giraud وآخرون ،٢٠٠٢) ، كما وأن إرتفاع أسعار المضادات الحيوية دفع الباحثين أيضاً للبحث عن بدائل متوفرة وبأسعار زهيدة ليست لها أية تأثيرات سلبية وذات قدرة على مقاومة الجراثيم وإستناداً لما ذكر أعلاه وضعت هذه الدراسة مستهدفة فحص فعالية المستخلصات المائية لكل من بلوط العفص وأوراق الشاي وقشور ثمار الرمان ذات الإستخدام المباشر من قبل الإنسان كغذاء وشراب فضلاً عن إستخدام التانين النقي كمقارنة ضد بعض أنواع البكتيريا المرضية ودراسة مدى قدرتها التثبيطية .

مواد وطرائق البحث

تحضير المستخلصات النباتية : اعتمدت الطريقة المتبعة من قبل كل من عبد الكريم وآخرون (١٩٩٨) لإتمام عملية الإستخلاص حيث جففت عينات النباتات المراد إستخدام مستخلصاتها المائية في الهواء الطلق داخل مختبر الكيمياء التابع لكلية الزراعة / جامعة كركوك ولمدة سبعة أيام متتالية ، طحنت بعدها العينات إلى دقائق صغيرة تمر من خلال منخل (١٦ مش) (المش:عدد الثقوب / سم^{٢}) وتستقر على منخل آخر (٦٠ مش) ، تم بعدها عملية الإستخلاص بإستخدام جهاز الـ Sexholate Apparatus ولأربعة مكررات تجريبية بغية الحصول على كمية كافية من المستخلص للخطوات اللاحقة وإستخدم الماء المقطر كمذيب لمحتوى الأجزاء النباتية من المواد ، ترك بعدها المستخلص داخل حاوية وبمعزل عن الضوء في مكان بارد لمدة ٢٤ ساعة لترسيب ما تحتويه من شوائب وأخذت عينة من المستخلص لغرض الكشف عن وتقدير نسبة التانين في مكونات المستخلص ،حيث عوملت المستخلصات المائية بمادة خلات الأثيل Ethyl Acetate (كمذيب للتانين) ولعدة مرات جرى بعدها

فصل المستخلص عن المذيب الحاوي على مادة التانين بإستخدام عمود الفصل . ولعدم توفر جهاز المبخر الدوار لغرض إزالة مادة خلات الآثيل أستخدم طريقة التجفيف الهوائي بعيداً عن الضوء للعينات حيث ترسب الناتج بهيئة مسحوق بني مائل إلى الإحمرار في قعر الحاوية ، تم معاينة الناتج لغرض الكشف عن مادة التانين إستناداً للطريقة المتبعة من قبل (الزيد بكي ، ٢٠٠٢) حيث عومل الراسب بكل من الماء المقطر والإيثانول ٩٥% ومزيج من الكحول الأثيلي – الأيثر والكلوروفوم والبنزين المختبري ومحلول كلوريد الحديديك ١% فضلاً عن معاملته بالمحاليل المائية لكل من هيدروكسيد الصوديوم ١% و كاربونات الصوديوم ١% لبيان مدى ذوبان المادة المترسبة ، كما تم إستخدام رقائق (TLC) لغرض تأكيد النتائج .

تم تثبيت تركيز (١٠) % لكل المستخلصات المراد دراسة تأثيرها بالإعتماد على الطريقة المتبعة من قبل كلٍ من عبد الله ويوحنا (١٩٩٥) والمتضمنة إستخدام المكثاف للحصول على الوزن النوعي Hydrometer وبالإستعانة ببعض المعادلات الرياضية :

$$\text{البومي} = ١٤٥ - \frac{١٤٥}{\text{الوزن النوعي}}$$

$$\text{الوزن النوعي} = \frac{\text{التركيز}}{١٠٠} + ١$$

تحضير اللقاح البكتيري : أجريت الفحوصات التأكيدية لعزلات بكتريا الإختبار إستناداً لما ذكر في كل من (Koneman وآخرون ، ١٩٨٨ ؛ Barron وSydney ، ١٩٩١ ؛ Gupte ، ١٩٨٨ ؛ Lennette وآخرون ، ١٩٧٤) ، تم تنشيط العزلات المختبرة بإستخدام الوسط الغذائي Nutrient Broth بدرجة حرارة ٣٧م° ولمدة ١٨–٢٤ ساعة ، أستخدمت الطريقة المذكورة من قبل الباحثين (Mahmood وآخرون ، ١٩٨٩) في تحضير اللقاح البكتيري وهي طريقة الإنتشار بالحفر (Agar – Well diffusion method) وذلك بتنمية البكتريا المنشطة على وسط الأكار المغذي Nutrient Borth وحضنها بدرجة ٣٧ مْ لمدة ٢٤ ساعة ، تم بعدها نقل (٤ -٥) مستعمرات معزولة ونقية من كل نوع من أنواع البكتيريا المستخدمة في الدراسة وتحت ظروف التعقيم إلى أنبوبة إختبار تحتوي على ٥ مل من الوسط الغذائي Nutrient Agar ثم حضنت بدرجة حرارة ٣٧ م° لمدة (٤ – ٦) ساعة بعدها تم تلقيح سطح الأكار المغذي بواسطة ماسحة قطنية معقمة من العالق البكتيري وتتركت الأطباق بدرجة حرارة الغرفة لمدة ١٥ دقيقة لغرض إمتصاص اللقاح ، عملت حفر بقطر (٦ ملم) على سطح الوسط الزرعي بواسطة الثاقب الفليني ، وبواسطة ماصة دقيقة تم وضع ٢٠٠ مايكروليتر من كل مستخلص معقم قيد الدراسة داخل الحفر ، حضنت الأطباق بدرجة حرارة ٣٧ مْ ولمدة (٢٤) ساعة ، بعد ذلك تم قراءة النتائج بقياس قطر منطقة التثبيط حول كل حفرة والتي تمثل منطقة عدم النمو البكتيري .

النتائج والمناقشة

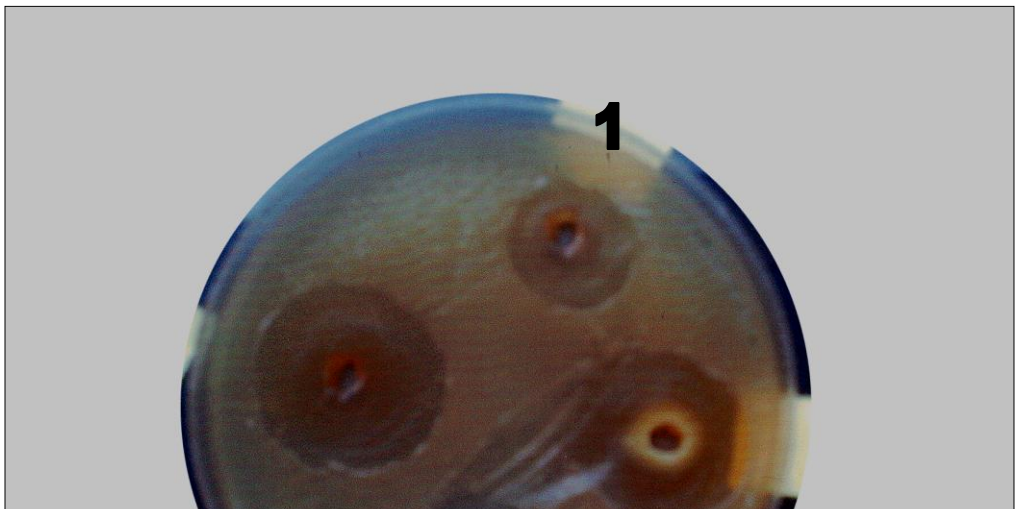
بعد إتمام عملية الإستخلاص ومعاينة المسحوق الناتج للعينات المختبرة تبين أن المسحوق ذو لون بني يميل للإحمرار ذات أس هيدروجيني قدره (٦,٣ ± ١) ويذوب في الماء المقطر والإيثانول ٩٥% ومزيج الإيثانول – بنزين ٢:١ ومزيج الكحول الأثيلي – الإيثر وفي المحاليل القاعدية لكل من هيدروكسيد الصوديوم ١% وملح كاربونات الصوديوم ١% ولا يذوب في الغيثر والكلوروفورم والبنزين المختبري كما إنه يكون راسب أسود عند المعاملة بمحلول كلوريد الحديديك مما يؤكد كون المادة المترسبة لمستخلصات عينات التجربة مادة تانين نقي إستناداً للمواصفة المبينة من قبل الزيد بكي (٢٠٠٢) و Schmidt (١٩٥٦) . وقد اظهرت نتائج الدراسة أن المستخلصات المائية للنباتات أحتوت جميعها على مادة التانين وبنسب جيدة في مستخلصاتها حيث بلغت (٢١,٨ ، ٣٧,٢ ، ١٤,٥) % لكل من مستخلص بلوط العفص و قشور ثمار الرمان وأوراق الشاي

على التوالي وقد كانت المستخلصات ذات تأثيرات متباينة في العزلات البكتيرية قيد الدراسة وهذا يعتمد على نوع المستخلص ومحتواه من المركبات مضافاً للتانين المتواجد فيه ، فضلاً عن نوع البكتيريا .

ويبين التحليل الإحصائي لنتائج الدراسة بأن العوامل المدروسة (نوع المستخلص النباتي بمستوياته الأربعة) و (نوع البكتيريا) كانت ذات تاثير عال على الفعالية التثبيطية لنمو البكتيريا ، ولدى تقييم مدى تأثير كل عامل على إنفراد في هذه الصفة بإستخدام إختبار دنكن (جدول رقم ١) وجد بأن المستخلص المائي لقشور الرمان كان ذا فعالية تثبيطية عالية إذ أعطت أقطار تثبيط أكبر ولجميع العزلات البكترية المختبرة في هذه الدراسة ، حيث بلغ أقطار التثبيط لبكتريا (*Escherichia coli* و *Klebsiella pneumonia* و *Proteus mirabilis* و *Staphylococcus aureus*) (٣٢ ، ٢٧ ، ٣٠ ، ٢٠) ملم على التوالي ، ويلاحظ من الجدول (١) بأن التأثير الأكثر كان للمستخلص المائي لقشور الرمان على بكتريا *Escherichia coli* وقد يعزى زيادة التثبيط بصورة عامة للمستخلص لزيادة تركيز محتوى التانين في المستخلص المائي حيث يبلغ ٣٧,٢% من نسبة المستخلص .

كما لوحظ أيضاً من النتائج أن الإستخلاص المائي لأوراق الشاي أعطت معدلات تثبيط متدنية بلغت (١٨ ، ٢٠ ، ١٥ ، R) ملم ضد بكتريا (*Escherichia coli* و *Klebsiella pneumonia* و *Proteus mirabilis* و *Staphylococcus aureus*) على التوالي مقارنة مع المستخلصين الآخرين في حين أظهرت النتائج تبايناً في فعالية مستخلص بلوط العفص تجاه عزلات البكتيريا الأربعة وكان الإتجاه العام حساسية متوسطة لهذه العزلات للمستخلص إذ أظهرت *Escherichia coli* و*Proteus Sp.* حساسية أعلى تلتها بكتيريا *Klebsiella Sp.* في حين كانت بكتيريا المكورات *Staphylococcus anreus* هي الأقل حساسية من بين تلك العزلات إذ لم يتجاوز قطر التثبيط ١٥ ملم .

أما بخصوص التأثير التثبيطي لمحلول التانين النقي Tanic acid المستخدم لغرض المقارنة فقد كانت (١٨ ، ٢٣ ، ٢٠ ، ١٥) ملم لكل من بكتريا (*Escherichia coli* و *Klebsiella pneumonia* و *Proteus mirabilis* و *Staphylococcus aureus*) على التوالي وعليه فقد يعزى أيضاً تفوق تأثير مستخلص قشور الرمان الحاوي على نسبة جيدة من التانين النقي لإحتواء المستخلص المائية للأجزاء النباتية على مركبات فينولية وغير فينولية أخرى غير التانين ساهمت في زيادة التثبيط (Browning ، ١٩٦٧) علماً بان فعالية التثبيط للمستخلص بلوط العفص قد تقارب مع تأثير المحلول المائي لمركب التانين النقي . إن طريقة الإستخلاص ونوع المذيب المستخدم قد تؤدي إلى إحتواء المستخلص على مواد متعددة قد يؤثر سلباً على فعالية المركبات المثبطة من خلال تكوين معقدات خلال فترة الإستخلاص أو الخزن مع مركبات التانين المتواجدة مما تثبط من فعالية المقاومة .



2

4

3

صورة (١) : مناطق تثبيط نمو بكتريا *Proteus mirabilis* بالمستخلصات المائية للنباتات
(١: مستخلص أوراق الشاي ٢: مستخلص قشور الرمان ٣: مستخلص بلوط العفص ٤: التانين النقي)

جدول (١) : أقطار مناطق تثبيط نمو البكتيريا بالمستخلصات المائية للنباتات مقاساً بالملم

المستخلصات النباتية المستخدمة	البكتيريا المستخدمة			
	Escherichia coli	*Klebsiella pneumonia*	*Proteus mirabilis*	*Staphylococcus aureus*
أوراق الشاي	١٨ ملم د	٢٠ ملم ج د	١٥ ملم هـ	R و
قشور ثمار الرمان	٣٢ ملم آ	٢٧ ملم ب	٣٠ ملم آب	٢٠ ملم ج د
بلوط العفص	٢٢ ملم ج	١٩,٤ ملم ج د	٢٠ ملم ج د	١٥ ملم هـ
التانين النقي	١٨ ملم د	٢٣ ملم ب	٢٠ ملم ج د	١٥ملم هـ

R : ليس لها تأثير تثبيطي .

نستنتج من خلال هذه الدراسة أن مستخلص قشور ثمار الرمان له تأثير واسع في التثبيط من فعالية البكتيريا المرضية (سواءً السالبة منها لصبغة كرام أم الموجبة) لذا بالإمكان الإستفادة منها كمادة علاجية ليست لها أي تأثيرات سلبية على الإنسان حيث يتناولها الإنسان ثمار الرمان ومنذ القدم كأحد أنواع الفواكه عوضاً عن المضادات الحيوية والكيميائية .

التوصيات

إستناداً للنتائج المستحصلة من هذه الدراسة نوصي بالتوسع في دراسة مستخلصات النباتات وتحديد المركبات الذائبة عند الإستخلاص المائي ، وبالتوسع في دراسة الفعالية التثبيط لأنواع أخرى من العزلات البكتيرية المرضية لغرض إستخدامها في المعالجة على نطاق أوسع بدلاً عن المواد الكيميائية في المعالجة .

المصادر

١- الزيد بكي ، أسامة إبراهيم . (٢٠٠٢) . إستخدام مستخلص قلف أشجار اليوكاليبتوس *Eucalyptus camaldulensis* لاصقاً للألواح الحبيبية المضغوطة ، أطروحة دكتوراه ، قسم الغابات ، كلية الزراعة ، جامعة الموصل .
٢- عبد الكريم ، محمد و بديع علي أحمد و إسماعيل نجم عبد الله . (١٩٩٨) . الأهمية الإقتصادية لأورام العفص المتكونة بواسطة زنابير الأورام على أشجار البلوط في شمال العراق ، مجلة التربية والعلم . (العدد ٣٧) لسنة ١٩٩٩ .
٣- عبد الله ، مظهر عمر و عادل هرمز يوحنا (١٩٩٠) . دراسة إستخلاص حامض التانين التجاري والنقي من قلف أشجار اليوكاليبتوس وإختبار كفاءته الدباغية والدوائية ، جامعة الموصل . كلية الزراعة والغابات .
٤- Barron , E.J. and Sydney , M.F. (١٩٩١) Baily and Scott's Diagnostic Microbiology , ٨th ed . , C.V. Mosby Company , St. Louis , Battimore Philadelphia , Tornoto .
٥- Browning , B.L. (١٩٦٧) . Methods of Wood Chemistry . Volume .١ . Institute of paper chemistry .APPLETON , Wisconsin , inter science publishers , A division of John Wiely & sons .
٦- Giraud , A. ; Matic , I. ; Radman , M. ; Fons , M. & Taddei , F. (٢٠٠٢) . Mutator bacteria as a risk factor in treatment of infections disease . AAC . ٤٦ (٣) I ٨٦٣ - ٨٦٥ .
٧- Gupte , S. (١٩٨٨) The short text book of medical microbiology , ٣rd ed . Philadelphia .
٨- Jamil , R. M. ; Abu – Al- Futuh , Hasan M. ; Al-Essa, L. Yand Sheikh . (١٩٩٩) . Antibacterial effects of extracts from menthe longifolia . J. JAPPI . (١) , ١-٧ .
٩- Koneman , E.W. ; Stephen , D.A. ; Dowell , V.R. ; William , M.J. and Herbert , M.S. (١٩٨٨) . Color atlas and text book of diagnostic microbiology , ٣rd ed . Washington , C. Winn, Jn.
١٠- Kyung , K. H. and Lee, Y.C. (٢٠٠١) . Antimicrobial activities of Sulfur compounds Drived from S.A.I.K. (En) YL –L Cysteine Sulfoxides in Allium and Brassica .
١١- Lennette , E.H. ; Spanding , E.H. and Truant , J.P. (١٩٧٤) . manual of Clinical Microbiology , ٢nd ed. American Society for microbiology Washington .
١٢- Macura , M.D. (١٩٩١) . Fungal resistance to antimycotic drugs . Agrowing problem . Int. J. Dermatol . ٣٠ : ١٨١ – ١٩٣ .
١٣- Mahmood , M.J. ; jawad , A.J. ; Hussain A.M.; Al- Omeri M. and Al-Naib , A. ([١٩٨٩) In vitro antimicrobial activity of salsola rosmarinus and Adiantum capillusrveneris . int , J. Crude . Drug . Res. ٢٧ : ١٤ – ١٦ .

Effect Of Tannin's Extraction On Activity Of Some Pathogenic Bacteria

Osama Ibrahim Ahmed Pary Ahmed Khorsheed Fatin Mohamed Nowabaldin
College Of Agriculture – University Of Kirkuk

Abstract

This study investigate the effect of extraction for each of (*Quercus Infictoria* , *Punica granatum* L. fruit cortex , *Klebsiella pneumonia* & Tanic acid .) on the activity of four positive & negative pathogenic isolates for Gram stain , the include (*Escherichia coli* , *Klebsiella preumonia* , *Proteus mirabilis*& *Staphylococcus aureus*) using well – diffusion agar , isolates were taken from the microbiological Department of laboratory in Kirkuk \ general hospital , the extracts gave greater inhibition activity against the whole four bacteria isolates , the *Escherichia coli* bacteria were more susceptible from other bacteria type , *Punica granatum* L. fruit cortex extraction also showen more activity to discouragement bacteria than other extraction type .