التأثير التثبيطي لمستخلصي الكركديه والتمرهند في عدد من الممرضات الجرثومية

نوار طلال حامد الصفاوي

قسم علوم الحياة، كلية التربية، جامعة الموصل، الموصل، جمهورية العراق

(استلم ٢٥ / ٤ /٢٠٠٧ ، قبل ١٩ / ٩ /٢٠٠٧)

الملخص:

تضمنت الدراسة اختبار الفعالية المضادة للأحياء المجهرية وبتراكيز مختلفة للمستخلصات المائية والكحولية والأسيتونية والكلوروفورمية لنباتي الكركديه *Hibiscus sabdariffa l.* والتمرهند *Tamarindus indica* تجاه ٥ انواع من الممرضات الجرثومية وهي *Staphylococcus aureus,Proteus vulgaris ,Pseudomonas aeruginosa,Klebshella pneumona, Bacillus subtilis* باستخدام طريقة الانتشار في الأكار مقارنة بالمضادات الحيوية القياسية ،إذ أظهرت جميع الجراثيم استجابة تجاه اغلب المستخلصات قيد الدراسة وبنسب متفاوتة .اظهرت جرثومة*Klebshella pneumona* اعلى استجابة لجميع المستخلصات تلتها الأنواع الجرثومية الأخرى.تم فصل مكونات المستخلص الأيثانولي لكلا النباتين بواسطة التحلل الحامضي وبأستعمال خلات الأثيل وتم تشخيص بعض المركبات الفعالة من الجزء المفصول بواسطة تقنية كروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة Thin Layer Chromatogrphy (T.L.C) اذ تم تشخيص بعض الحوامض من الجزء المفصول بالأيثانول وتم تشخيص حامض الماليك والتارتاريك بواسطة تقنية (T.L.C) وذلك بمقارنة قيم معدل سرعة الجريان (Rf) لها مع القيم الموجودة في الجداول المرجعية .كما تم التحري عن التأثير التثبيطي لهذين الحامضين على الجراثيم قيد الدراسة وذلك بأستخدام طريقة الأنتشار عبر الأكار .بلغ التركيز الأدنى المثبط Minimum Inhibitory Concentration (MIC) للمستخلصات النباتية والحوامض المفصولة منها لأغلب الأنواع الجرثومية قيد الدراسة مابين (2.0-0.0625) ملغم/سم.

المقدمة:

عرف الأنسان منذ فجر التاريخ الأعشاب الطبية وفوائدها العلاجية المختلفة وبالرغم من التطور الهائل في علم الأدوية وظهور اعداد هائلة من الأدوية في شتى مجالات العلاج فأن الحقبة الماضية شهدت عودة الى استخدام الأعشاب الطبية في علاج الأمراض كواحدة من اهم فروع الطب البديل (١).

من النباتات الطبية التي شاع استعمالها نبات الكركديه *Hibiscus sabdariffa L* كمشروب حامضي يحلى بالسكر ويستخدم لمقاومة نزلات البرد في الشتاء كما يعمل كمدرر للبول وملين ومطهر للأمعاء وخافض لضغط الدم كما يستخدم كمساعد في خفض درجة الحرارة .ويعتبر مهدىء للاعصاب ومقوي للقلب(٣،٢) كما يعتبرمضاداً لجراثيم والفطريات وللتأكسد والأورام والالتهاب كما يعتبر طارد للديدان (٥،٤).

اما نبات تمر الهند *Tamarindus indica L.* فأن الجزء الأكثر استخداماً من النبات هو الثمرة الناضجة.ومن خصائصه الطبية ان منقوعه يستخدم كشراب بارد منعش في فصل الصيف وملين ومن المستحسن شربه عند الإفطار للصائمين، يستعمل مغلياً كالشاي ضد الحميات اذ يحضر مركب من نقيعه مع الحليب بنسبة ١–٤ ويسمى مصل التمر هندي الذي يفيد في إزالة الحموضة الزائدة من الجسم. ويستعمل محلول الثمار المركز بديلاً للمحلول السكري في عمل بعض المستحضرات الدوائية (٢،١).و في بعض البلدان العربية تستعمل الأوراق ككمادة توضع على الأعضاء المصابة بالروماتيزم وللجروح والحروق وكذلك تستعمل الأوراق لمعالجة الدمامل والأورام ومفيدة في حالات الحمى الصفراوية والتهاب الملتحمة (٦،١).ولكثرة وشيوع استعمال هذين النباتين كمشروبات متداولة في البيئة الشعبية العراقية فقد كانت فكرة هذا البحث للتعرف على كفاءة هذين النباتين وقابليتهما التثبيطية في نمو بعض الممرضات الجرثومية ،وبالنظر لاحتواء هذين النباتين على نسبة عالية من الحوامض لذا حاولنا تشخيص بعض منها ودراسة التأثير التثبيطي لها.

المواد وطرائق العمل:

١ –النباتات الطبية

أ– نبات الكركديه *Hibiscus sabdariffa L*

من النباتات التي تنتمي للعائلة الخبازية Malvaceae ويسمى ايضاً بالشاي الأحمر الجزء المستعمل طبياً هوالكأس والأجزاء تحت الكأس بعد تجفيفها ،كذلك الأوراق والبذور وموطن هذا النبات الأصلي هو مصر والسودان ومناطق في مقاطعة او ولاية كوجرات الهندية ،واليوم يزرع في كثير من البلاد العربية، ويزرع اليوم في الحدائق المنزلية لمدينة الموصل وعلى نطاق واسع اما في مناطق الوسط العراقي كربلاء والنجف وبغداد فأنه يزرع على نطاق تجاري ،يباع منه كوؤس الأزهار اما طرية او مجففة (٩،٨،٧)،.

ب– التمر الهند *Tamarindus indica L.*

ينتمي الى العائلة البقولية Leguminosae والجزء الأكثر استخداماً هو الثمرة الناضجة والتي تكون عبارة عن قرن مبطط منحن قليلاً وله قشرة رقيقة بداخلها لب بني لحمي حامض المذاق(١٠).

٢ –الأوساط الغذائية:

استعمل المرق المغذي Nutrient broth(oxoid) لغرض اجراء تخافيف اللقاح الجرثومي ،كما استخدم وسط الأكار المغذي Nutrient agar(oxoid) لغرض فحص حساسية العزلات الجرثومية للمضادات الحيوية والمستخلصات النباتية.

٣ –الأحياء المجهرية المستخدمة في الدراسة:

تم الحصول على العزلات الجرثومية من كلية العلوم /قسم علوم الحياة /جامعة الموصل.

٤– تحضير المستخلصات النباتية Preparation of Plant Extracts:

تحضير المستخلصات المائية Preparation of Aqueous Extracts

تم تحضير المستخلصات المائية وذلك بسحق نبات الكركديه بوساطة طاحونة كهربائية ،اما نبات التمرهند فأستخدم في حالته الطرية بعد ازالة البذور منه.مزج ٤٠ غم من النموذج النباتي كلاً على حده واضيف الى كل منهما ١٦٠سم^3 من الماء المقطر المعقم أي بنسبة (٤:١) وزن:حجم سحق الأنموذج النباتي بجهاز السحق (Blender) داخل حمام ثلجي ولمدة ساعة واحدة ثم حرك المزيج بوساطة المحرك المغناطيسي Stirer ولمدة ٦٠ دقيقة بغية تفجير جدران الخلايا النباتية.ترك المزيج في الثلاجة لمدة ٢٤ ساعة لغرض النقع ،رشح المزيج من خلال عدة طبقات من الشاش ثم استكمل الترشيح بوساطة قمع بخنر بأستخدام اوراق ترشيح Whatmann (No.1.جفف المستخلص الناتج بالتبريد تحت ضغط مخلخل بأستخدام جهاز التجفيد Lyophilizer ثم حفظت العينات في قناني زجاجية ذات غطاء محكم وحفظت بالتجميد لحين استخدامها(١١).

تحضير المستخلصات الكحولية الخام Prepration of Crud Alcoholic Extracts:

اتبعت طريقة الباحث Grand واخرون (١٢) والمحورة عن الطريقة الاساسية للباحث Verporte واخرون (١٣) وذلك بمزج ٤٠ غم من النموذج النباتي الكركديه والتمر هند(بعد ازلة البذور منه)وكلاً على حده.ثم اضيف ٤٠٠سم^3 من الكحول الاثيلي تركيز ٩٥% داخل حمام ثلجي وباستخدام المحرك الكهربائي Stirrer ولمدة (٥-٦)ساعات ترك بعدها المزيج في الثلاجة لمدة ٢٤ ساعة للنقع،رشح بعدها خلال عدة طبقات من الشاش.اخذ الراشح وتم تبخير الأيثانول بأستخدام جهاز المبخر الدوار Rotary Vacum Evaporator وبدرجة حرارة لاتزيد على ٤٠مْ. اخذت الطبقة المتكونة من المستخلص الخام وجففت بالتجفيد ثم وضع في قناني زجاجية ذات غطاء محكم وحفظ بالتجميد لحين استخدامها .

تحضير المستخلصات العضوية غير الأيثانولية Preparation of Organic Extracts Other Than Ethanol:

تم وضع ٥٠ غم من النموذج النباتي داخل Thumble جهاز الأستخلاص المستمر Soxhelt وتم اختيار نوعين من المذيبات العضوية وهي الكلوروفورم (٦٢) مْ،والاسيتون (٦٠) مْ أجريت عملية الفصل بدرجات حرارية مختلفة بحسب درجة غليان كل مذيب على ان لاتزيد على ٨٠ مْ حيث أضيف ٥٠٠سم^3 من المذيب الأول الى النموذج النباتي في جهاز الاستخلاص المستمر وسخن الجهاز بوساطة حمام مائي ،تم الاستخلاص بمعدل ١٠ ساعات يومياً إذ تستمر عملية الاستخلاص إلى أن يصبح المذيب المستخدم عديم اللون ثم يوضع المذيب الثاني ويبدأ الاستخلاص بنفس الطريقة .يتم بعدها تركيز المستخلص بجهاز المبخر الدوار وبدرجة حرارة لاتزيد على ٤٠مْ وبعد تبخر جميع المذيب المستخدم في الاستخلاص يلاحظ تكون طبقة ثخينة من المستخلص ،تؤخذ هذه الطبقة وتحفظ قناني محكمة الإغلاق وتحفظ في الثلاجة لحين استخدامها(١٤).

فصل بعض الحوامض الفعالة باستخدام التحلل الحامضي Acid Hydrolysis:

بعد تحضير المستخلص الأيثانولي للنموذجين النباتين ولكون هذين المستخلصين يحتويان على نسبة عالية من الحوامض الفعالة والتي ترتبط تأصرياً مع السكريات لذا تم اجراء عملية التحلل الحامضي للمستخلصات الأيثانولية من اجل الحصول على هذه الحوامض بشكل حر وخالية من السكريات وذلك بالأعتماد على طريقة الباحث Harborn (١٥) إذ تم اخذ ٢غم من المستخلص الأيثانولي للنموذج النباتي ثم اضيف اليه ٢٠٠مل من حامض الهيدروكلوريك (HCL) تركيز ٢مولاري وضع بعدها المزيج داخل حمام مائي بدرجة (٦٠-٩٠) مْ ولمدة نصف ساعة مع التحريك برد المزيج ثم وضع في قمع الفصل واضيف اليه (١٠٠سم^3 × ٢) خلات الأثيل ورج جيداً فلوحظ تكون طبقتين ،اخذت الطبقة العليا(خلات الأثيل) واتي تكون حاوية على الحوامض وثم التخلص من الطبقة السفلى الحاوية على السكريات .ركزت الحوامض بجهاز المبخر الدوار للحصول على مستخلص خلات الأثيل وحفظ في الثلاجة لحين استعماله.

الكشف عن الحوامض الفعالة للمستخلصات باستخدام تقنية كروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة(TLC):

تم الكشف عن الحوامض الفعالة بتقنية كروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة باستخدام الألواح الزجاجية المغطاة بمادة هلام السيليكا Silica gel والمجهزة من شركة Merck وبسمك (٠,٠٢٥)ملم وبالأبعاد (٢٠×٢٠)سم^3 حيث نشطت الصفائح قبل الأستخدام بتسخينها لمدة ساعة داخل الفرن Oven وبدرجة حرارة (١٠٠) مْ تركت لتبرد لتصبح بدرجة حرارة المختبر ،بعدها تم تحميل الألواح بعينة السيطرة القياسية المتوفرة لحامض الماليك والتارتاريك للمقارنة مع عينات مستخلص خلات الأثيل وعلى شكل بقع Spots باستخدام انابيب شعرية Capillary tube على احد طرفي اللوح وعلى امتداد خط وهمي حدد كنقطة بداية .وضع اللوح داخل Tank بشكل عمودي وحسب الطريقة التصاعدية (Ascending Process) وملامسة لنظام المحلول المستخدم(16)Methanol-5M NH_4OH(4:1) .تم تغطيت الحاوية بالغطاء الخاص بها وتركت لحين اكتمال صعود المحلول(المذيب) مسافة لاتقل عن ١٣ سم بعدها رفع اللوح من الحاوية وترك بصورة افقية ليجف بدرجة حرارة المختبر لمدة(٥)دقائق تم بعدها اظهار البقع بوساطة تعريضها للكاشف المتكون من بخار اليود وذلك بوضعها في Tank اخر حاوي على بلورات اليود المبللة بالماء (١٥).

اختبار الفعالية البايولوجية للمستخلصات النباتية والحوامض المفصولة منها:

بعد تحضير المستخلصات النباتية المائية والكحولية والعضوية لنباتي الكركديه والتمرهند تم تحضير محاليل بتركيز (400,200,100,50,25,12.5,6.25) ملغم/سم^3 وباستخدام المذيب المناسب لها وذلك باستخدام الماء المقطر المعقم مع المستخلصات المائية واستعمال Dimethyl Sulphoxide(DMSO) مع المستخلصات الكحولية والعضوية .عقمت المستخلصات المائية بتمريرها خلال المرشحات الغشائية Membrane Filters 0.22µg وعقمت المستخلصات الكحولية والعضوية بطريقة البسترة بدرجة حرارة (٦٢) مْ ولمدة (١٠-١٥) دقيقة.اعتمدت طريقة الباحث Bauer واخرون (١٧)لأختبار الفعالية التثبيطية للمستخلصات النباتية والحوامض الفعالة تجاه الجراثيم قيد

الدراسة.اذ تم تلقيح وسط المرق المغذي بمستعمرات منفردة من الجراثيم المدروسة وحضنت بدرجة ٣٧ مْ ولمدة (١٨–٢٤)ساعة ،خفف العالق الجرثومي باستخدام المحلول الملحي الفسلجي Normal Saline وبالمقارنة مع انبوب السيطرة القياسي لمحلول ماكفرلند الذي يعادل ^{٨}١٠ خلية/سم^{٣} .تم نقل (٠,١) سم^{٣} من العالق الجرثومي المخفف ونشر على وسط الأكار المغذي بشكل متجانس باستخدام ماسحة قطنية معقمةCotton Swab حضنت ألأطباق لمدة ٣٠ دقيقة وبدرجة ٣٧ مْ لكي يحصل التشرب.اعتمدت طريقة الحفر Agar Well Wells Diffusion Method لدراسة تأثير المستخلصات النباتية والحوامض المفصولة على الجراثيم المدروسة اذ تم عمل ثقوب في الأكار المغذي باستخدام Stainless Steel Borer وبقطر ٦ ملم ،وضع في كل حفرة مقدار ٠,١ مللتر من كل تركيز من المستخلصات النباتية والحوامض المفصولة (١٨).حضنت الأطباق بدرجة حرارة (٣٧) مْ ولمدة (١٨–٢٤)ساعة ،قيست بعدها أقطار مناطق التثبيط بالملم حول كل حفرة وقورنت مع المضادات الحيوية القياسية وحسب توصيات منظمة الصحة العالمية (١٩).

تحديد التركيز الأدنى المثبط Determination of Minimum Inhibitory(MIC):

تم تحديد التركيز الادنى المثبط للمستخلصات النباتية والحوامض المفصولة من النباتات قيد الدراسة والذي هو اقل تركيز يمنع نموالجراثيم،حيث استخدم اختبار العكارة إذ حضرت التراكيز (٤٠٠،٢٠٠،١٠٠،٥٠،٢٥،١٢,٥،٦,٢٥) ملغم/سم^{٣} من كل مستخلص ومن الحوامض المفصولة حيث أضيف(٠,١) سم^{٣}من كل تركيز الى أنبوبة حاوية على (٩,٨) سم^{٣} من المرق المغذي ولقحت بـ(٠,١) سم^{٣} من العالق الجرثومي تركيز (^{٨}١٠) خلية/ سم^{٣} وحضنت الأنابيب بدرجة(٣٧) مْ ولمدة (١٤–١٨)ساعة قيست بعدها العكارة باستخدام جهاز المطياف الضوئي على طول موجي(٥٩٥)نانوميتر وبالمقارنة مع عينة السيطرة المكونة من (٩,٨) سم^{٣} من المرق المغذي و(٠,١) سم^{٣} من العالق الجرثومي و(٠,١) سم^{٣} من المذيب المستخدم لأذابة المستخلص النباتي او الحوامض المفصولة (٢٠).

النتائج والمناقشة:

اشارت النتائج التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة الى اختلاف التاثير المضاد للمستخلصات المستخدمة والحوامض المفصولة على نمو الجراثيم قيد الدراسة وهذا الاختلاف يتوقف على نوع المستخلص وتركيزه ونوع الجراثيم مقارنة بالمضادات الحيوية وكما يظهر في الجدول رقم(١).

جدول (١): الفعالية التثبيطية للمستخلصات النباتية والحوامض المفصولة في الجراثيم قيد الدراسة مقارنة بالمضادات الحيوية القياسية (قطر دائرة التثبيط مقاساً بالملم)

نوع المعاملة تركيز ٤٠٠ملغم/سم^{٣}	الجراثيم				
	Staphylococcus aureus	*Proteus vulgaris*	*Pseudomonas aeruginosa*	*Klebshella pneumona*	*Bacillus subtilis*
المستخلص المائي للكركديه	41	22	22	34	23
المستخلص الكحولي للكركديه	33	27	27	40	25
المستخلص الأسيتوني للكركديه	25	22	22	30	25
المستخلص الكلوروفورمي للكركديه	0	0	0	0	0
المستخلص المائي للتمرهند	15	18	16	28	25
المستخلص الكحولي للتمرهند	٣٩	23	17	26	23
المستخلص الأسيتوني للتمرهند	28	30	23	34	22
المستخلص الكلوروفورمي للتمرهند	0	0	12	25	0
مستخلص خلات الأثيل للكركديه	17	15	13	20	14
مستخلص خلات الأثيل للتمرهند	16	0	16	18	17
Chlormphenicol 30mg/disc	18	13	11	13	12
Gentamycin10mg/disc	12	17	8	12	18
Rifadin 30mg/disc	18	17	0	8	16

(٠) تشير الى عدم وجود فعالية تثبيطية

الجدول (١) نلاحظ ان جميع العزلات الجرثومية أظهرت استجابة تجاه اغلب المستخلصات والحوامض المفصولة ،فقد اظهر المستخلص المائي للكركديه والتمر هند تأثيراً تثبيطياً جيدا ضد الجراثيم قيد الدراسة كما أعطت استجابة عالية تجاه المستخلص الكحولي والأسيتوني للكركديه والتمر هند ،بينما أظهرت الجراثيم استجابة متباينة تجاه المستخلص الكلوروفورمي ولم تظهر كل من جرثومة *Staphylococcus aureus* و *Proteus vulgaris* استجابة للمستخلص الكلوروفورمي للكركديه بالإضافة الى ان جرثومة *Bacillus subtilis* لم تظهر استجابة للمستخلص الكلوروفورمي للتمر هند .كما تباينت الجراثيم في استجابتها لمستخلص خلات الأثيل للكركديه والتمر هند واخفقت جرثومة *Proteus vulgaris* في الاستجابة لمستخلص خلات الأثيل للتمر هند.

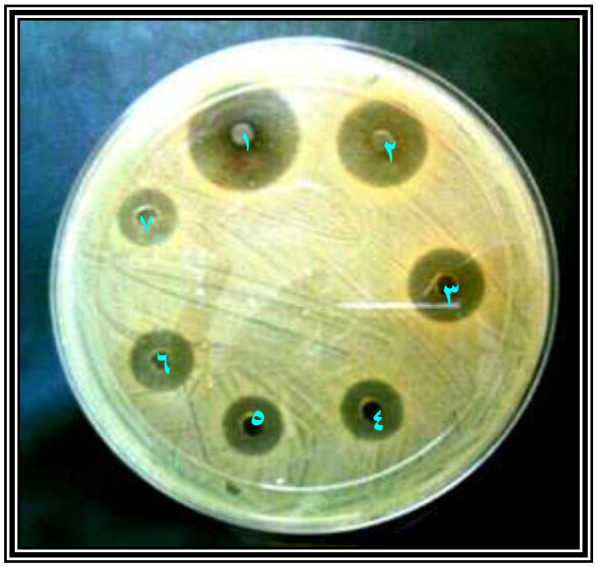
جدول (٢) التاثير التثبيطي لمستخلصات الكركديه بتراكيز مختلفة في الجراثيم قيد الدراسة (قطر دائرة التثبيط مقاس بالملم)

الأنواع الجرثومية	نوع المعاملة	تركيز المستخلصات (ملغم/سم^3)						
		٤٠٠	٢٠٠	١٠٠	٥٠	٢٥	١٢,٥	٦,٢٥
Staphylococcus aureus	مستخلص مائي	٤١	٤٠	٣٥	٢١	٢٠	٢٠	١٨
	مستخلص كحولي	٣٣	٢٥	٢٢	١٨	١٧	١٧	١٦
	مستخلص اسيتوني	٢٥	٢٤	٢٠	١٤	٩	٠	٠
	مستخلص كلوروفورمي	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠
Proteus vulgaris	مستخلص مائي	٢٢	١٩	١٤	١١	٠	٠	٠
	مستخلص كحولي	٢٧	٢٢	١٨	١٠	٨	٨	٠
	مستخلص اسيتوني	٢٢	١٨	١٥	١٠	٠	٠	٠
	مستخلص كلوروفورمي	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠
Pseudomonas aeruginosa	مستخلص مائي	٢٢	١٩	١٥	١٣	٧	٠ت	٠
	مستخلص كحولي	٢٧	١٨	١٥	٧	٠	٠	٠
	مستخلص اسيتوني	٢٢	١٦	١٣	١٠	٨	٧	٠
	مستخلص كلوروفورمي	١٠	٧	٦	٠	٠	٠	٠
Klebshella pneumona	مستخلص مائي	٣٤	٣٠	١٨	١٤	١١	١٠	٨
	مستخلص كحولي	٤٠	٣١	١٨	٩	٨	٧	٠
	مستخلص اسيتوني	٣٠	٢٦	٢٠	١٦	١٢	١٠	٨
	مستخلص كلوروفورمي	٢١	٢٠	١٩	١٩	١٨	١٥	١٢
Bacillus subtilis	مستخلص مائي	٢٣	١٩	١٥	١٢	١٠	٠	٠
	مستخلص كحولي	٢٥	١٩	١٨	٧	٠	٠	٠
	مستخلص اسيتوني	٢٥	٢٣	١٥	١٢	١٢	٧	٦
	مستخلص كلوروفورمي	١٥	١٤	١٢	١٢	١٠	٩	٧

(٠) تشير الى عدم وجود فعالية تثبيطية

من نتائج الجدول (٢) اظهر المستخلص المائي للكركديه تأثيراً تثبيطياً عالياً ضد جميع الجراثيم قيد الدراسة حيث أعطت جرثومة *Staphylococcus aureus* أعلى استجابة للمستخلص المائي ثم للمستخلص الكحولي وكما هو موضح بالصورة رقم (١) وربما يعود الفعل التثبيطي العالي للمستخلص المائي للكركديه لاحتوائه على عدد من المواد الفعالة الذائبة في الماء والتي لها القابلية على النفاذ خلال الجدار الخلوي للجراثيم .كما أظهرت جرثومة *Klebshella pneumona* استجابة عالية تجاه جميع المستخلصات وخاصة تجاه المستخلص الكحولي وكما هو موضح في الصورة رقم (٢).بينما أعطت كل من جرثومة *Pseudomonas aeruginosa* و*Proteus vulgaris* و*Bacillus subtilis* استجابة متقاربة تجاه جميع المستخلصات وقد يعزى الفعل التثبيطي للمستخلصات المائية والكحولية والأسيتونية الى قدرة مذيبات هذه المستخلصات الى إذابة المواد الفعالة في النبات والمؤثرة في نمو الجراثيم من خلال التأثير في الجدار الخلوي وقدرتها على اختراقه أو علاقة هذه المستخلصات بإنزيمات الجرثومة أو تأثيرها على DNA والرايبوسومات والفعاليات المختلفة للجراثيم.كما أظهرت جرثومة *Staphylococcus aureus* استجابة كبيرة لكل من المستخلص المائي والكحولي والأسيتوني وبهذا نتفق مع ما بينه الباحث الجرجري (٢١) عند استخدامه المستخلص المائي والكحولي والأسيتوني لهذا النبات على جرثومة *Staphylococcus aureus* المعزولة من اللوزتين فضلاً عن ما ذكرهHamadi (٢٢) عند استخدامه المستخلص المائي والكحولي لهذا النبات على جرثومة *Staphylococcus aureus*. وقد يعزى الفعل التثبيطي لذا النبات ربما لامتلاكه أحماض عضوية متعددة ومنها Malic acid,Citric Asqurbic acid,Hibsicic acid acid,Tartaricacid, حيث بين (23)ان هذا النبات يحوي مواد مضادة للميكروبات وخاصة لجراثيم *Escherichia coli* و*Staphylococcus aureus* .وفي دراسة

اجراها (٢٤) بين ان للكركديه تأثيرات مميته لعصيات السل *Mycobacterium tuberculosis* كما قد يعزى الفعل التثبيطي العالي للمستخلص الأسيتوني لهذا النبات على اغلب الجراثيم قيد الدراسة الى قابليته في تثبيط الأنزيمات نتيجة تثبيط عمل بناء البروتين وترسيبه وهذا يتفق مع ماتوصل اليه الباحث Mansouri (٢٥) الذي اثبت ان للمستخلص الأسيتوني للعفص له فعالية مضادة للجراثيم *Escherichia coli*, *Bacillus cerus*,*Pseudomonas aeruginosa*



صورة(١): تاثير المستخلص الكحولي لنبات الكركديه بتراكيز مختلفة في جرثومة*Staphylococcus aureus*. ١- (٤٠٠ ملغم/سم^3)، ٢- (٢٠٠ ملغم/سم^3)، ٣- (١٠٠ ملغم/سم^3)، ٤- (٥٠ ملغم/سم^3)، ٥- (٢٥ ملغم/سم^3)، ٦- (١٢,٥ ملغم/سم^3)، ٧-(٦,٢٥ ملغم/سم^3).

*Staphylococcus aureus*وكذلك فعالية مضادة ضد إنتاج السموم.أخفقت جرثومة *Staphylococcus aureus* وجرثومة *Proteus vulgaris* في إظهار استجابة تجاه المستخلص الكلوروفورمي وربما يعود السبب الى فشل المكونات الفعالة الذائبة في الكلوروفورم في اختراق الجدار الخلوي لهاتين الجرثومتين لما أبدته هذه الجراثيم من أساليب المقاومة.

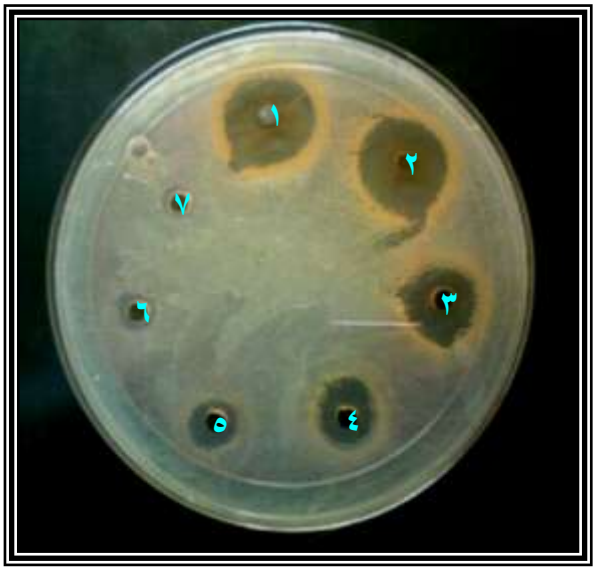
صورة(٢): تاثير المستخلص الكحولي لنبات الكركديه بتراكيز مختلفة في جرثومة*Klebsiella pneumonia*. ١- (٤٠٠ ملغم/سم^3)، ٢- (٢٠٠ ملغم/سم^3)، ٣- (١٠٠ ملغم/سم^3)، ٤- (٥٠ ملغم/سم^3)، ٥- (٢٥ ملغم/سم^3)، ٦- (١٢,٥ ملغم/سم^3)،٧-(٦,٢٥ ملغم/سم^3).

جدول (٣): التاثير التثبيطي لمستخلصات التمر هند بتراكيز مختلفة في الجراثيم قيد الدراسة (قطر دائرة التثبيط مقاس بالملم)

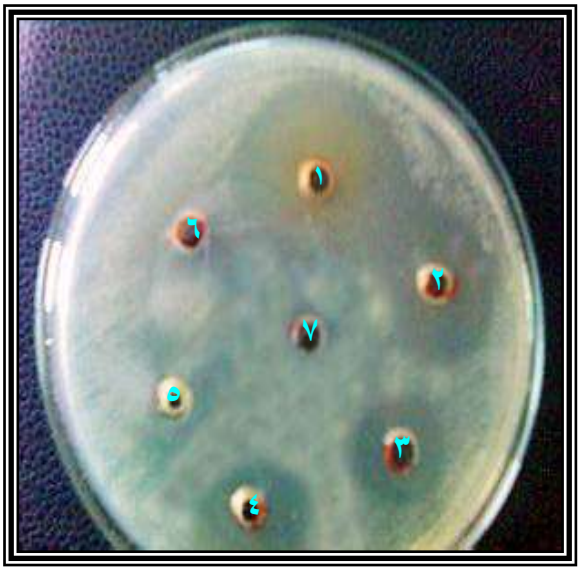
الأنواع الجرثومية	نوع المعاملة	تركيز المستخلصات (ملغم/سم^3)						
		٤٠٠	٢٠٠	١٠٠	٥٠	٢٥	١٢,٥	٦,٢٥
Staphylococcus aureus	مستخلص مائي	١٥	٩	٧	٦	٠	٠	٠
	مستخلص كحولي	٢٨	٢٦	٢١	١٩	١٥	١٢	٩
	مستخلص اسيتوني	٢٨	٢٦	٢٠	١٤	١٣	١١	٩
	مستخلص كلوروفورمي	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠
Proteus vulgaris	مستخلص مائي	١٨	١٠	٨	٠	٠	٠	٠
	مستخلص كحولي	٢٣	١٨	١٤	١٣	١٢	١٠	٠
	مستخلص اسيتوني	٣٠	٢٢	١٩	٠	٠	٠	٠
	مستخلص كلوروفورمي	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠
Pseudomonas aeruginosa	مستخلص مائي	١٦	١٣	٠	٠	٠	٠	٠
	مستخلص كحولي	١٧	١٤	١٢	١٠	٨	٧	٧
	مستخلص اسيتوني	٢٣	١٥	١٣	٧	٧	٧	٦
	مستخلص كلوروفورمي	٢٠	١٦	١٥	١٣	١١	٠	٠
Klebshella pneumona	مستخلص مائي	٢٨	٢١	١٥	١١	٧	٠	٠
	مستخلص كحولي	٣٩	٢٣	١٧	١٧	١١	٠	٠
	مستخلص اسيتوني	٣٤	٢٧	١٨	١٥	١١	٠	٠
	مستخلص كلوروفورمي	٢٥	٢٢	٢١	٢٠	١٥	١٢	١٠
Bacillus subtilis	مستخلص مائي	٢٥	٢٠	١٤	١١	٠	٠	٠
	مستخلص كحولي	٢٣	٢٠	١٨	١٥	١٤	١١	١٠
	مستخلص اسيتوني	٢٢	١٩	١٨	١٤	١٣	١٠	٧
	مستخلص كلوروفورمي	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠

(٠) تشير الى عدم وجود فعالية تثبيطية

من نتائج الجدول (٣)يظهر ان مستخلصات التمر هند (المائية ،والكحولية ،والأسيتونية ،والكلوروفورمية) اظهرت تاثيراً تثبيطياً اقل مما اظهرته مستخلصات نبات الكركديه وتباينت ايضاً الجراثيم قيد الدراسة في استجابتها لهذا النبات واخفقت كل من جرثومة *Staphylococcus aureus* وجرثومة *Proteus vulgaris* و *Bacillus subtilis* في استجابتها للمستخلص الكلوروفورمي وقد يعزى ذلك الى عدم قدرة الجدار الخلوي لهذه الجراثيم على تنفيذ المستخلص او عدم قدرة الكلوروفورم على اذبة المكونات الفعالة الموجودة في النبات ،بينما اظـهرت جرثومـة *Klebshella pneumona* و *Pseudomonas aeruginosa* استجابه لجميع المستخلصات وربما يعزى الفعل التثبيطي لهذا النبات الى احتوائه على مابين (16-18%) احماض منها Malic acid, Citric acid, Tartaric acid ومواد عفصية قابضة وسترات البوتاسيوم واملاح معدنية كما يحتوي على فيتامين B_3 وزيوت طيارة .كما اثبتت الدراسات الحديثة احتواء التمرهند على مواد مضادة للجراثيم قادرة على ابادة الكثير من السلالات الجرثومية المختلفة(٢٦).كما اشار (٢٧) الى ان للتمرهند استعمالات علاجية قيمة اكدت بالتجربة وبشكل خاص القيمة المضادة للجراثيم والفطريات حيث اوصى الباحث باستعمال التمر هند لتحسين مياه الشرب.وكما جاء في (١٠) ان نبات التمر هند من النباتات التي تحوي كليكوسيدات وصابونيات وقد يكون لهذه المواد فعالية مضادة للاحياء المجهرية .وفي دراسة اجراها الباحث (٢٨) وجد ان للمستخلص المائي والكحولي والكلوروفورمي للتمر هند تاثيراً كبير مضادا للالتهابات في الفئران.وكما يظهر بالجدول اعلاه ان جرثومة *Staphylococcus aureus* وجرثومة *Klebshella pneumona* اظهرت استجابة كبيرة تجاه المستخلص الكحولي لهذا النبات وكما هو موضح بالصورة رقم (٤،٣) ثم تلتها الأنواع الجرثومية الأخرى.كما كانت استجابة الجراثيم عالية تجاه المستخلص الأسيتوني.تباينت الجراثيم في الأستجابة للتراكيز الواطئة للمستخلصات فمنها لم تتحسس لهذه التراكيز وربما يعود السبب الى عدم قدرة الجدار الخلوي لهذه الجراثيم على تمرير هذه التراكيز.



صورة (٣): تاثير المستخلص الكحولي لنبات التمر هند بتراكيز مختلفة في جرثومة *Staphylococcus aureus*. ١- (٤٠٠ ملغم/سم^3)، ٢- (٢٠٠ ملغم/سم^3)، ٣- (١٠٠ ملغم/سم^3)، ٤- (٥٠ ملغم/سم^3)، ٥- (٢٥ ملغم/سم^3)، ٦- (١٢,٥ ملغم/سم^3)، ٧- (٦,٢٥ ملغم/سم^3).



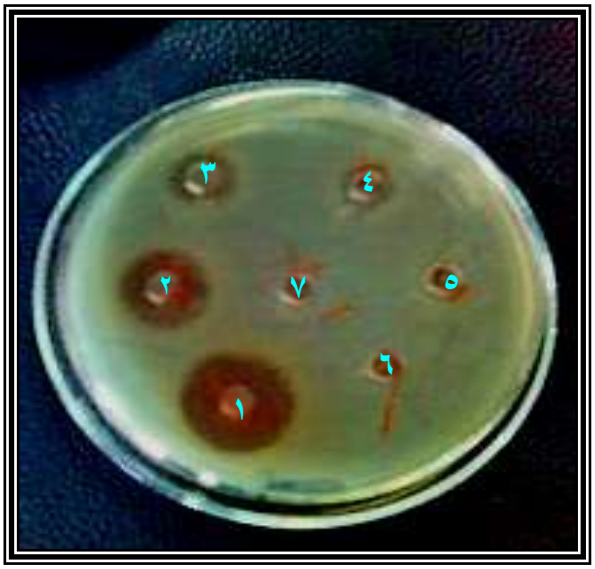
صورة (٤): تاثير المستخلص الكحولي لنبات التمر هند بتراكيز مختلفة في جرثومة *Klebsilla pneumonia*. ١- (٤٠٠ ملغم/سم^3)، ٢- (٢٠٠ ملغم/سم^3)، ٣- (١٠٠ ملغم/سم^3)، ٤- (٥٠ ملغم/سم^3)، ٥- (٢٥ ملغم/سم^3)، ٦- (١٢,٥ ملغم/سم^3)، ٧- (٦,٢٥ ملغم/سم^3).

جدول(٤): التاثير التثبيطي للحوامض المفصولة لمستخلصي الكركديه والتمر هند بتراكيز مختلفة في الجراثيم قيد الدراسة (قطر دائرة التثبيط مقاس بالملم)

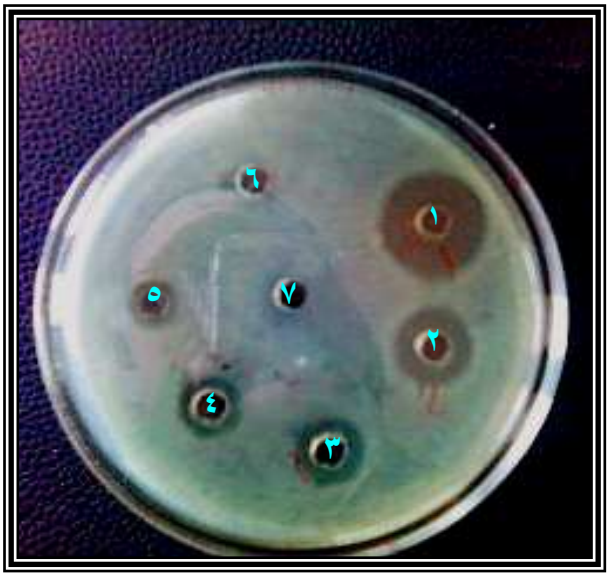
النبات	الجراثيم	التراكيز (ملغم/سم^3)						
		٤٠٠	٢٠٠	١٠٠	٥٠	٢٥	١٢,٥	٦,٢٥
مستخلص الكركديه	*Staphylococcus aureus*	١٧	١٥	١١	٧	٧	٧	٠
	Proteus vulgaris	١٥	١٠	٧	٠	٠	٠	٠
	Pseudomonas aeruginosa	١٣	١٢	١٠	٨	٧	٠	٠
	Klebshella pneumona	٢٠	١٨	١٥	١١	٠	٠	٠
	Bacillus subtilis	١٤	١١	٩	٨	٠	٠	٠
مستخلص التمر هند	*Staphylococcus aureus*	١٦	١٥	١٢	١٠	٧	٠	٠
	Proteus vulgaris	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠
	Pseudomonas aeruginosa	١٦	١٣	٧	٧	٠	٠	٠
	Klebshella pneumona	١٨	١٦	١٥	١٤	١٣	٠	٠
	Bacillus subtilis	١٧	١٥	٨	٠	٠	٠	٠

(٠) تشير الى عدم وجود فعالية تثبيطية

من نتائج الجدول رقم(٤) يلاحظ ان تاثير مستخلص خلات الأثيل الحاوي على حامض التاريتاريك والماليك وحوامض اخرى اقل من تاثير المستخلصات المائية والكحولية والاسيتونية والكلوروفورمية وكما يظهر في الصورة (٦،٥) وقد يرجع السبب في ذلك الى ان فعالية الحوامض المفصولة من النباتين تزداد عند وجودها مع مركبات فعالة اخرى توجد في المستخلص فاحدهما يزيد من فعالية الأخر فتزداد بذلك الفعالية التثبيطية التازرية Synergism وهذا يتفق مع ما بينه الباحث (٢٩) الذي وجد ان تاثير بعض الحوامض المفصولة من نبات القريص*Urtica urens* كان اقل من تاثير المستخلصات الكحولية والأسيتونية في جراثيم *Pseudomonas aeruginosa* و *Eschericia coli* و *Proteus mirabilis* المعزولة من المرضى المصابين بالتهابات المجاري البولية.



صورة (٥): تاثيرمستخلص خلات الأثيل الحاوي على حامض Malic acid وTartaric acid لنبات الكركديه بتراكيز مختلفة في جرثومة *Staphylococcus aureus*. ١-(٤٠٠ ملغم/سم^3)، ٢-(٢٠٠ ملغم/سم^3)، ٣-(١٠٠ ملغم/سم^3)، ٤-(٥٠ ملغم/سم^3)، ٥-(٢٥ ملغم/سم^3)، ٦-(١٢,٥ ملغم/سم^3)،٧(٦,٢٥ ملغم/سم^3).



صورة (٦): تاثيرمستخلص خلات الأثيل الحاوي على حامض Malic acidو Tartaric acid لنبات الكركديه بتراكيز مختلفة في جرثومة *Klebsiella pneumonia*. ١- (٤٠٠ ملغم/سم^3)، ٢- (٢٠٠ ملغم/سم^3)، ٣- (١٠٠ ملغم/سم^3)، ٤- (٥٠ ملغم/سم^3) ،٥- (٢٥ ملغم/سم^3)، ٦- (١٢,٥ ملغم/سم^3)، ٧- (٦,٢٥ ملغم/سم^3).

جدول (٥): التركيز الأدنى المثبط(MIC) ملغم/سم^3 لمستخلص الكركديه والتمر هند والحوامض المفصولة منها على الجراثيم قيد الدراسة (ملغم/سم^3).

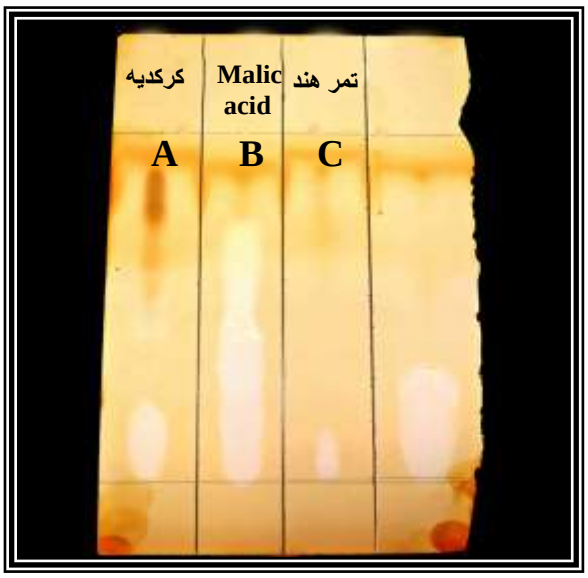
الانواع الجرثومية	نوع المعاملة				
	مستخلصات نبات الكركديه				
	مستخلص مائي	مستخلص كحولي	مستخلص اسيتوني	مستخلص كلوروفورمي	مستخلص خلات الآثيل
Staphylococcus aureus	٠,٠٦٢٥	٠,٠٦٢٥	٠,٢٥	–	٠,١٢٥
Proteus vulgaris	٠,٥	٠,١٢٥	٠,٥	–	١,٠
Pseudomonas aeruginosa	٠,٢٥	٠,٥	٠,١٢٥	١,٠	٠,٢٥
Klebshella pneumona	٠,٠٦٢٥	٠,١٢٥	٠,٠٦٢٥	٠,٠٦٢٥	٠,٥
Bacillus subtilis	٠,٢٥	٠,٥	٠,٠٦٢٥	٠,٠٦٢٥	٠,٥
	مستخلصات نبات التمر هند				
	مستخلص مائي	مستخلص كحولي	مستخلص اسيتوني	مستخلص كلوروفورمي	مستخلص خلات الآثيل
Staphylococcus aureus	٠,٥	٠,٠٦٢٥	٠,٠٦٢٥	–	٠,٢٥
Proteus vulgaris	١,٠	٠,١٢٥	١,٠	–	–
Pseudomonas aeruginosa	٢,٠	٠,٠٦٢٥	٠,٠٦٢٥	٠,٢٥	٠,٥
Klebshella pneumona	٠,٢٥	٠,٢٥	٠,٢٥	٠,٠٦٢٥	٠,٢٥
Bacillus subtilis	٠,٥	٠,٠٦٢٥	٠,٠٦٢٥	–	١,٠

من نتائج الجدول (٥)يظهر ان التركيز الآدنى المثبط للمستخلصات النباتية والحوامض المفصولة منها تراوحت مابين (٠,٠٢٥-٢)ملغم/سم^3.

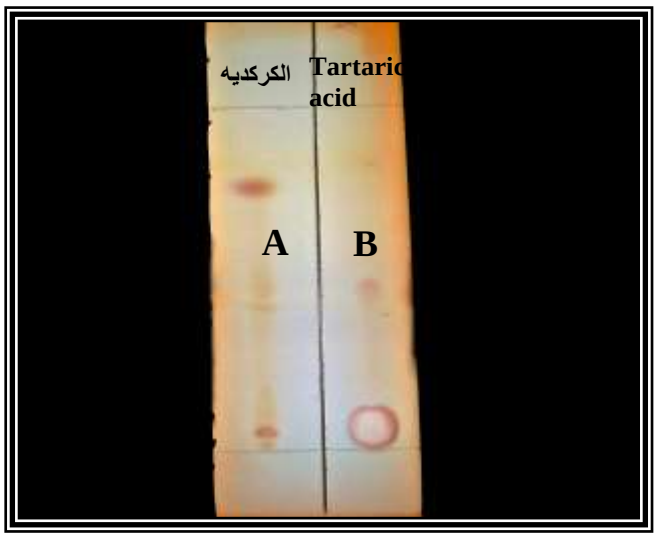
اعتمدت تقنية كروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة TLC للكشف عن الحوامض المفصولة من نباتي الكركديه والتمر هند بقياس معدل سرعة الجريان للحوامض(Malic acid,Tartaric acid) وبعد اظهار بوساطة كاشف بخار اليود السابق ذكره في المواد وطرائق العمل وقياس Rf للبقع التي ظهرت بلون قهوائي في المواقع (٠,٥-٠,٨) في المذيب Methanol-5µ NH4OH(4:1) على التوالي بعد وضع الالواح في درجة(١٠٠)م في الـOven ولمدة ١٠ دقائق وكما هو موضح في الجدول (٦) والصورة (٧،٨).

جدول (٦): قيم الـRf لبغض الحوامض المفصولة من نبات الكركديه والتمر هند وسرعة الجريان باستخدام المذيب(Methanol-5µ NH4OH(4:1 بتقنية TLC.

الحامض	Rf المقاسة	Rf القياسية	لون البقعة بعد اضافة الكاشف
Tartaric acid	٠,٥	٠,٣	قهوائي
Malic acid	٠,٨	٠,٦	قهوائي



الصورة (٧): البقع الظاهرة لحامض Malic acid من مستخلص خلات الأثيل لنبات الكركديه والتمر هند وعينة النموذج القياسية للـ Malic acid باستخدام تقنية (T.L.C). A بقع حامض Malic acid للكركديه ، B عينة النموذج القياسية ، C بقع حامض Malic acid للتمرهند .



الصورة (٨): البقع الظاهرة لحامض Tartaric acid من مستخلص خلات الأثيل لنبات الكركديه وعينة النموذج القياسية للـ Tartaric acid باستخدام تقنية (T.L.C) . A بقع حامض Tartaric acid للكركديه ، B عينة النموذج القياسية

المصادر:

١. عرفة، حسام.الاعشاب للحسن والعلاج والتحنيط. website.www.Islam on line.net.(2002).

٢. قطب،فوزي طه.النباتات الطبية زراعتها ومكوناتها.دار المريخ للنشر،الرياض(١٩٨١).

3.Townsend,C.C.and Guest,E.Flora of Iraq.vol.4,Ministry of Agriculture Reform,Baghdad (1980).

4. El-Shabrawy,O.;Arbid,M.and El-Nazer,H.Effect of *Hibiscus sabdariffa* on blood picture sperm quality and genital organs of rats Egypt.J. Vet .Sci.,25(1) (1988).pp:41-47

5. Unnamed.*Hibiscus sabdariffa* flower extract.chemical toxicology.(2000).pp.411-416.www.cosmeticsscop.com.

6. Unnamed.*Tamarindus indica*. www.Pioneerherbs.com. (2000).

7. James ,M.S.Roselle *Hibiscus Sabdariffa L*.Institute of Food and agricultural Sciences,Uninversity of Florida.(1994).

8. Roden,E.D.;David,P.and Small,T.Effect of nitrogen nutrition on roselle.In:J.Janick and J.E.Simon(eds).New Crops.Wiley,New york..(1993).pp.583-584.

9.Amusa,N.A,Ashaye,O.A.,Aiyegbayo,A.A.,Oladapo,M.o.Oni,M.O.and Afolabi,O.O.Microbiological and nutritional quality of hawked sorrel drinks(Soborodo)(the Nigerian locally brewed soft drinks)widely consumed and notable drinks in Nigeria.J.of food.Agriculture& Environment vo.3(3&4).(2005).pp:47-50.

١٠. المنظمة العربية للتنمية الزراعية. النباتات الطبية والعطرية والسامة في الوطن العربيةالخرطوم. (١٩٨٨).

11. Riose, J.L. ; Recio, M.C. and Villar, A. Antimicrobial activity of selected plant employed in the sponish mediterranean area. J. Ethnopharmacol., (1987). 21:139-152.

12. Grand, A. ; Woudergem, P.A. ; Verpoortes, R. and Pousset, J.L. Anti-infections phytotherapies of tree-savannah sengal (West-Africa), II-Antimicrobial activity of 33 species. J. Ethnopharmacol., (1988). 22:25-31.

13. Verpoorte, R. ; Tginastoi, A. ; Vandoorn, H. and Svendsen, A.B. Medical plant of serinam, 1-

Antimicrobial activity and some medicinal plant. J. Ethnopharmacol. . (1982).,5: 221-226.

١٤. الرمضاني ، طلعت راجح. دراسة كيميائية لبعض النباتات العراقية التي تنموفي المنطقة الشمالية. رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، جامعة الموصل ، العراق. (١٩٩٩).

15.Harbone,J.B.Phytochemical methods,Chapmanand Hall.Ltd.Newyork,USA.(1973).

16.Knapp,E.and Rohdewald,I.Z.Anal.Chem.(1964).211,49.

17.Bauer,A.W.;Kirbay,W.A.M;Sherris,J.S.and Turk,M.Antibiotic susceptibility by astandarized single disc method.American,J.Clin.Pathol.(1966).,45:pp493-496.

18.Balows,A.and Wandepitte,J.Bench level procedure Manual on basic bacteriology,(1987).W.tto/Lab/87.1.

19. Vandepitte, J. ; Engback, K. ; Piot, P. and Heuk, C. Basic laboratory procedures in clinical bacteriology. World Health Organization, Geneva. (1991).

20.Walokun,B.A.;Gbenle;G.O.;Adewole,T.A.andkinsinde,K.A.Shigellocidal properties of three Nigerian medicinal plants:Ocimum gratissimum Terminalia avicennoides and Momordia.Balsamina.J.Health popul.Nutri,(2001),19(4):331-335.

21. الجرجري،محمد طه محمود.التاثير البايولوجي لمستخلصات بعض النباتات وعدد من المواد الكيميائية على جرثومة *Staphylococcus aureus* المعزولة من حالات مرضية وغير مرضية.رسالة ماجستير،كلية التربية،جامعة الموصل.(٢٠٠٢).

22. Hamadi,J.Y.Pharmacological studies of some Iraqi plants with special reference to their antimycotic and antibacterial activities.M.Sc.Thesis,Univ.Cairo,Egypt(1978).

23. Pozo,D.D.;Brenes,C.H.;andTalcott,S.T.Antioxidant and antimicrobial properties of *Hibiscus Sabdariffa L*.as affected by the presence of naturally occurring cofactors.Fruit and Vegetable products.Chicago.,45G-2.(2003).

24. Morton,J.(Roselle)in :Fruits of waem climates.Mimi,USA. .(1987)pp:281- 286.

25. Mansouri,S.Inhibitory effects of some Iranian medicinal plants on production of toxins in the bacteria.J.Pharmacol.Bio.(2000).39:365-370.

26. Limyati.D.A.; and Juniar.B.L.L.Jamu Gendong,a kind of traditional medicine in Indonesia:the microbial contamnation of its raw materials and endproduct. J.Ethnopharmacology.(1998).63(3):201-208.

27.Lanhers.M.C.;Fleurentin.J.and Guillemni.Fleurentin.J.and Guillemni.F *Tamarindus indica L*.Ethnopharmacologia .(1996).18:42-57.

28.Rimbau.V.;Cerdan.C.;Vila.R.and Iglesias .J.Antiinflammatory activity of some extracts from plants used in the traditional medicine of North-African countries.Phytotherapy. (1999).13(2):128-132.

29. الجميلي،بسام حسين ايوب.التاثير التثبيطي لبعض المستخلصات النباتية في بعض انواع الجراثيم المعزولة من المجاري البولية للانسان.رسالة ماجستير،كلية التربية،جامعة الموصل. (٢٠٠٥).

Inhibitory effect of *Hibiscus sabdariffa L.& Tamarindus indica* against some pathogenic bacteria

Nawar Talal saffawi

Department of Biology, College of Education, University of Mosul, Mosul, Iraq

Abstract:

this study has involved the antibacterial activity of different concentrations of extracts of Hibiscus sabdariffa L.& Tamarindus indica has been tested against five species of pathogenic bacteria including: Staphylococcus aureus,Proteus vulgaris, Pseudomona, aeruginosa, Klebsiella pneumonia, Bacillus subtilis by using agar diffusion technique comparing with antibiotics. All bacteria showed response against extracts with different ratios. Klebsiella pneumonia showed maximum response of all extracts then followed by the other kinds of bacteria. The ethanolic extract constituents of both plants were isolated by using acid hydrolysis and ethylacetate. The identification of some active complexes isolated from ethanolic fraction was carried out by using thin layer chromatography (T.L.C) technique. Some acids isolated from ethanolic fraction like Malic acid and Tartaric acid were identified by using (T.L.C) technique by comparing its rates of flow (Rf) with the value of reference tables. Inhibitory effect of these isolated acids upon the germs were examined by using agar diffusion method. Moreover, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of plant extracts under study and the isolated acids amounted between the (2.0-0.0625) mg/cm^3.

.