The antimicrobial activity of aqueous extracted plant dyes from *Rubia tictorium l., Punica granatum l. And Mentha piperita l.* Aganist some types of pathogenic bacteria

التأثير التثبيطي للصبغات النباتية المستخلصة مائيا من نباتات الفوة (*Rubia tictorium L*) و الرمان (*Punica granatum L*) والنعناع(*Mentha piperita L*) على بعض انواع البكتيريا المرضية

سند شامل عمر الدوري*
جامعة كربلاء / كلية العلوم / قسم علوم الحياة
E.mail : sindsajad@yahoo.com

الخلاصة //

تم في هذه الدراسة الكشف عن الفعالية التثبيطية للصبغات النباتية المستخلصة من جذور نبات الفوة *Rubia tintorum L.* , اوراق النعناع *Mentha piperita* وقشور الرمان *Punica granatum* ضد بعض الاحياء المجهرية الممرضة *Streptococcus pneumonia , Bacillus subtilis , Proteus mirabilis* و *Pseudomonas aeruginosa* على الوسط الزرعي الصلب وعلى النسيج القطني . حيث اظهرت النتائج قدرة الصبغات المستخلصة من النباتات الانفة الذكر على تثبيط نمو الاحياء المجهرية قيد الدراسة على الوسط الزرعي الصلب, حيث اظهر الرمان اعلى قطر تثبيطي والذي تراوح بين (2.6-2.4 cm) . كذلك اظهر النسيج القطني الذي تم تصبيغه بهذه الصبغات قدرته ايضا على اختزال النمو المايكروبي والذي تراوح نسبته بين(16-58%) وبنسب متفاوتة ضد جميع البكتيريا الممرضة .

Abstract

This study was designed to evaluate the antibacterial activity of aqueous plant dyes extracted from *Rubia tictorium l (roots)., Punica granatum l.(shell)And Mentha piperita l(leaves).*against some pathogenic bacteria *Streptococcus pneumonia , Bacillus subtilis, Proteus mirabilis, Pseudomonas aeruginosa* by using cup plate agar diffusion method . This test was applied on both solid media and cotton texture to make a comparison on the effect of antibacterial activity to whole extract. The results revealed that all dyes extract had the ability to inhibit the growth of tested bacteria on which Punica granatum showed a high inhibition zone at range (2.4-2.6 cm) on the solid media and a good microbial growth reduction on the cotton texture in a various ratio.

مقدمة

يعتبر القطن والصوف من أهم المواد الاولية التي تدخل في صناعة الألبسة والمنسوجات , لذا كان الاهتمام ومنذ عقود ماضية منصب على إيجاد طريقة لحماية المنسوجات القطنية والصوفية من مهاجمة الأحياء المجهرية لما يوفره طبيعة تركيب النسيج المكون من الكيراتين والسليلوز وغيره من المواد البيئية الملائمة من ظروف الأوكسجين , الرطوبة, الحرارة والغذاء لنمو الأحياء المجهرية.(1)

يعاني الكثير من الناس من مختلف الحساسيات في الجلد جراء الملابس التي يرتدونها وعوامل الحرارة والغبار.. الخ، ولهذا فإن راحة الكثير من الناس وخصوصا المرضى تعتمد إلى حد كبير على اختيار الملابس المريحة، لأن الملابس يمكن أن تكون مهيجة للحساسية أو للتفاعلات الوقائية في البشرة. وإذا كانت معظم الدراسات تشير بإصبع الاتهام إلى مساحيق الغسيل ومادة النسيج، فإن دراسة ألمانية جديدة أعلنت براءة هذه العوامل لتلقي عبء مسؤولية الحساسية على الأصباغ. (2)

تلعب بعض الاصباغ دورا في نشوء الحساسية بفعل تفاعلها مع الأشعة فوق البنفسجية ، كما تضيف صناعة الأنسجة بعض المواد، في نهاية عملية صناعة الأنسجة القطنية ، هدفها منح القماش شكله النهائي وهي مواد قد تطلق مادة الفورمالديهايد من خلال تفاعلها مع مساحيق الغسيل او مع الأشعة فوق البنفسجية . وتحدث حساسية التماس عادة في مناطق الجلد التي يلبس عليها الإنسان ملابس ضيقة أو في مناطق الجلد التي تتعرق اكثر من غيرها. وتعتمد حساسية التماس على معادلة دقيقة بين حساسية البشرة ورقة القماش المستخدم وطراوته، ومعروف ان المعانين من حساسية الجلد لا يطيقون الصوف كمثل في حين لا يطيق المعانون من اكزيما التماس الملابس الثقيلة اطلاقا. (3)

هناك العديد من المواد الكيميائية التي اضيفت الى هذه الانسجة لتكسبها صفة المقاومة ضد النمو المايكروبي مثل (Phenol, Quaternary ammonium salts, Organometalic) (4). هذه المركبات الصناعية تكون معقدة وتحتاج الى فترة طويلة ليتم تحللها ورجوعها الى الطبيعة مما تسبب تلوث بيئي كبير من جهة ومن جهة اخرى تكون غير ثابتة على النسيج, وتسبب الحساسية للانسان. لذا كان من الضروري ايجاد البديل المناسب لهذه المواد الا وهو استخدام النباتات لاستخلاص الاصباغ الطبيعية منها ولما تمتاز به من قوة الثباتية على المنسوج , لها القدرة على تثبيط نمو الاحياء المجهرية لما تحويه من مركبات فعالة واخيرا لا تسبب التحسس الجلدي عند الانسان.(5).

لقد استخدمت جذورنبات الفوة *Rubia tictorium L.* لاحتوائه على مشتقات الانثراكوينون والذي استخدم كـ (antiinfalmmatory , antibacterial , antidiuretic drug) (6) , وقشور الرمان *Punica granatum L.* لما يحويه من التانينات والذي له تأثير ضد مايكروبي (7) واخيرا اوراق النعناع *Mentha piperita L.* والذي يحتوي على مركبات المنثول , الليمونين والكارفون وغيرها من المواد والتي ايضا تمتلك فعالية تثبيطية لنمو العديد من الاحياء المجهرية (8)

لذا كان الهدف من هذه الدراسة هو:-

استخلاص الصبغات من النباتات السابقة الذكر (جذور الفوة , قشور الرمان واوراق النعناع) وفحص الحساسية الضد ميكروبية لهذه الصبغات تجاه بعض الاحياء المجهرية المرضية مثل (*Pseudomonas aeruginosa* , *Proteus mirabilis* , *Streptococcus pneumonia* , *Bacillus subtilis*) على الوسط الصلب.واخيرا تصبيغ النسيج القطني بهذه الصبغات وفحص الحساسية الضد مايكروبي تجاه الاحياء المجهرية الانفة الذكر.

المواد وطرائق العمل

1- العزلات البكتيرية

تم الحصول على العزلات البكتيرية الاتية مشخصة تشخيصا اوليا من مستشفى الحسيني في كربلاء .هذه العزلات استخدمت لاختبار فعالية المستخلصات النباتية ضدها . وهي *Streptococcus pneumonia* و *Bacillus subtilis* و *Pseudomonas aeruginosa* و *proteus mirabilis*

اجري على العزلات الاختبارات التشخيصية التاكيدية وشملت: الخصائص المظهرية و الفحوصات الكيموحيوية (اختبار الكاتاليز, اختبار الحركة ,اختبار استهلاك السترات ,. اختبار استهلاك اللاكتوز ,. اختبار تحلل الدم و النمو على درجة حرارة 42 درجة مئوية وفق ما جاء به (9)

2- العينات النباتية

أ- جمع العينات النباتية .

جمعت مجموعة من العينات النباتية قشورالرمان *Punica granatum* ,اوراق النعناع *Mentha piperita* قيد الدراسة من مناطق مختلفة في محافظة كربلاء ونقلت الى المختبر وغسلت بالماء المقطر المعقم ثم وضعت على اوراق ترشيح كبيرة في مكان مفتوح وفي تيار هوائي مناسب وبدرجة حرارة المختبر حتى تجف , وأجريت عليها عملية التقليب بصورة مستمرة لمنع التعفن .

اما جذور الفوة *Rubia tictorium* فقد تم الحصول عليها بواسطة الشراء من معشب الهندية في محافظة كربلاء ثم سحقت العينات النباتية بعد تجفيفها بواسطة الطاحونة للحصول على المسحوق.

ثم وضعت في اكياس جافة من النايلون, حفظت في الثلاجة لاستعمالها في الاستخلاص والتصبيغ والدراسة المايكروبية.

ب- استخلاص العينات النباتية .

تم تحضير المستخلص المائي حسب طريقة (10) حيث تم اخذ 20غم من الوزن الجاف للنبات بعد طحنه ووضع في دورق زجاجي سعة 1000مل يحتوي على 400 مل من الماء المقطر البارد وترك العالق مع التحريك في حمام مائي هزاز لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 40 درجة مئوية , بعدها رشحت المستخلص باستخدام عدة طبقات من الشاش الطبي ووزع في اطباق مفتوحة لتجف , ثم كشطت المادة الجافة وجمعت في حاويات نظيفة لغرض استخدامها لاحقا .

ج - استخلاص الصبغات النباتية .

اتبعت الطريقة الموصوفة من قبل (11) في استخلاص الصبغات النباتية , حيث تم اذابة 10 غم من كل من مسحوق الفوة , الرمان ،النعناع في 300 مل ماء مقطر وترك ليغلي لمدة نصف ساعة على درجة حرارة 100 درجة مئوية , ثم رشح المحلول الساخن بواسطة (قطعة شاش نظيفة وعقم المستخلص بالترشيح (milipore filter 0.45µm) .

D - تصبيغ النسيج القطني

صبغ النسيج القطني حسب طريقة (12)

1- حضر حمام الصباغة الحاوي على 300 مل ماء مقطر , 5 قطرات حامض الكبريتك , 5 مل من محلول 10% كبريتات الصوديوم مع 0.5 غم من صبغة الفوة , الرمان ،النعناع .كل على حدة

2- ادخل الى الحمام قطعة من النسيج القطني بوزن 0.5غم

3- حركت كل الحمامات بمحرك مغناطيسي لمدة 10دقائق في درجة حرارة (80-90) م.

4- اخرجت كل قطعة نسيج من حمامها بالقضيب وتم غسلها تحت الماء وتركت لتجف

3- اختبار فحص الحساسية الضد مايكروبية

- تحضير العالق البكتيري

تم تلقيح العالق البكتيري (50µl) للبكتريا المستخدمة قيد الدراسة في انابيب اختبار تحوي 5مل من المرق المغذي وحضنت لمدة 18ساعة بدرجة حرارة 37 م.

- اختبار الفعالية الضد مايكروبية للمستخلصات النباتية على الوسط الصلب .

اتبعت طريقة الانتشار well diffusion (13) لاختبار حساسية العزلات البكتيرية ازاء المستخلصات النباتية ,حيث صب 20مل من غراء مولر هنتون Muller Hinton agar في اطباق نظيفة ومعقمة , لقح الوسط الزرعي بالعالق البكتيري بنشر 100مايكروليتر من كل مزرعة من المزارع البكتيرية باستخدام الناشر الزجاجي glass spreader , ثم عمل حفرة محيطية بقطر 0.05 بأستخدام الثاقب الفليني بعدها اضيفت المستخلصات في كل حفرة وبواقع 50 مايكروليتر لكل حفرة باستخدام Micropipette. حضنت الاطباق على درجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة ، قيس قطر منطقة التثبيط بأستخدام المسطرة . تعاد نفس الخطوات السابقة لكن باستخدام المضاد الحيوي chloramphenicol كسيطرة موجبة .

- اختبار الفعالية الضد مايكروبية للصبغات النباتية على النسيج القطني

تم وزن 0.05 غم من النسيج القطني الغير مصبوغ والنسيج القطني المصبوغ بصبغة الفوة , الرمان , النعناع ووضع كل نسيج في انبوبة اختبار حاوية على 5 مل من المرق المغذي (Nutrient broth) ثم لقح كل انبوب ببكتيريا قيد الدراسة (عمر 24 ساعة) وحضنت على درجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة .

اختزال النمو البكتيري للانسجة المصبغة ثم حسابه باستخدام المعادلة الاتية:(14)

$$R = 100 (A – B) / A$$

حيث ان R = يمثل النسبة المئوية لاختزال النمو البكتيري .

A = القراءة على 660nm للوسط الزرعي الملقح بالبكتريا والنسيج الغير مصبوغ

B=القراءة على 660nm للوسط الزرعي الملقح بالبكتريا والنسيج المصبوغ .

النتائج والمناقشة

- الفحوصات البايوكيميائية التأكيدية

لغرض التأكد من الانواع البكتيرية قيد الدراسة والتي استخدمت بوصفها سلالات اختبار محلية , والتي شملت مجموعتين, مجموعة البكتيريا الموجبة لصبغة الكرام وتمثلت بـ *Streptococcus pneumonia, Bacillus subtilis* ومجموعة البكتيريا السالبة لصبغة الكرام مثل *Proteus mirabilis, Pseudomonas aeruginosa* .

تم اجراء عدد من الفحوصات التاكيدية التقليدية ومنها مظهر المستعمرات (Colonial morphology) واشكال الخلايا البكتيرية و اجراء بعض الفحوصات البايوكيميائية المبينة في الجدول (1) . تمت مقارنة نتائج الفحوصات المبينة في الجدول المذكور اعلاه وفق (9).

وقد جاءت النتائج متطابقة ومتوافقة , الامر الذي يدل على نقاوة عزلات الاختبار لقد تم اختيار هذه العزلات بالذات لانها من البكتيريا التي لها القدرة على احداث الامراض بشكل واسع فمثلا بكتيريا *Streptococcus pneumonia* تعد احد مسببات التهاب الرئة للانسان وهي مرتبطة بالتهاب القصبات الرئوية (15) اما بكتيريا *Bacillus subtilis* المكونة للسبورات فهي من ملوثات الهواء المعروفة (Logan and Berkely,1984). في حين تعد *Proteus mirabilis* من اهم مسببات التهاب المسالك البولية والمثانة والاسهال والالتهابات القيحية (16).بينما تعد *Pseudomonas aeruginosa* ذات الانتشار الواسع المسبب الرئيسي لعدوى المستشفيات والتهابات الجروح والحروق والتهابات المسالك البولية والجهاز التنفسي والاذن والعين (17)

- الفعالية الضد مايكروبية للصبغات النباتية على الوسط الصلب

اظهرت الصبغة المستخلصة من جذور الفوة فعالية تثبيطية ضد كل الانواع البكتيرية حيث كان قطر منطقة التثبيط ضد بكتيريا *Streptococcus pneumonia* و *Bacillus subtilis* (1.3و 1 سنتمتر) على التوالي , اما *Proteus mirabilis* و *Pseudomonas aeruginosa* فقد كان قطر منطقة التثبيط لكل منهما (0.7و 0.6 سنتمتر) على التوالي . بينما الصبغة المستخلصة من النعناع فقد كان قطر منطقة التثبيط له ضد *Streptococcus pneumonia* 1.8 سنتمتر وضد *Bacillus subtilis* 1.5 سنتمتر اما *Proteus mirabilis* فقد كان قطر منطقة التثبيط 2 سنتمتر و *Pseudomonas aeruginosa* 2.4 سنتمتر . اخيرا اظهر مستخلص الرمان فعالية تثبيطية اقوى من المستخلصين السابقين حيث كان قطر منطقة التثبيط ضد *Streptococcus pneumonia* , *Bacillus subtilis* , *proteus mirabilis* و *Pseudomonas aeruginosa* (2، 2.6، 2.5 ، 2.4 سنتمتر) على التوالي.

ان سبب التباين في هذه النتائج يعتمد على عدة عوامل لعل اهمها نوع المستخلص من حيث نوع المركبات الفعالة المتواجدة في النبات والطريقة المتبعة في الاستخلاص وقطبية المذيب اضافة الى النوع البكتيري الذي يقع تحت تاثير المستخلص .

- الفعالية الضد ميكروبية للصبغات النباتية على النسيج القطني

من المهم دراسة التاثير التثبيطي للصبغات النباتية على النسيج القطني لما اظهرته الصبغات المستخلصة من نباتات الفوة , النعناع والرمان من تاثير تثبيطي جيد على نمو البكتيريا المستخدمة قيد الدراسة على الوسط الزرعي الصلب . حيث اظهرت النتائج اختزال في نمو البكتيريا على النسيج القطني بنسبة تتراوح ما بين (19-58%) لجميع الصبغات النباتية المستخلصة ضد جميع البكتيريا الممرضة قيد الدراسة 6غلا فقد اعطت الفوة اقوى اختزال في نمو *Pseudomonas aeruginosa* حيث كانت النسبة 58% بينما *Proteus mirabilis* و *Streptococcus Pneumonia* فقد كانت نسبة اختزال نموهما 36% اما الـ *Bacillus subtilis* فقد كان 16%.

اما النعناع فقد كانت نسبة اختزاله لنمو بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* 24% و *proteus mirabilis* 40% اما *Streptococcus pneumonia* و *Bacillus subtilis* فقد كانت نسبة اختزال نموها (38,45 %) على التوالي .

تمتاز الانسجة القطنية والصوفية التي تصنع منها الملابس بحساسيتها للهجوم المايكروبي لما يوفره من مساحة سطحية كبيرة ورطوبة كافية للالتصاق المايكروبي عليها , وهذا غالبا ما يؤدي الى تكون رائحة كريهة في الملابس , تحسس جلدي , اصابات جلدية اضافة الى تلف المنسوج , هذه الاسباب كلها جعلت من الضروري ايجاد طريقة مناسبة لحماية هذه المنسوجات من الهجوم المايكروبي. لذا فقد استخدمت الطبيعة لحل هذه المشكلة من خلال استخدام النباتات لاستخلاص الصبغات التي تمتلك تاثير تثبيطي على نمو الاحياء المجهرية . هناك العديد من النباتات التي اظهرت صبغاتها نتائج مذهلة على نمو الاحياء المجهرية مثل *Acacia catechu, Rubia cordiofolia, Rumex maritimus* ضد البكتيريا المرضية الشائعة *مثل Echerichia coli, Bacillus subtilis, Klebsiella pneumonia, Pseudomonas aeruginosa,* وغيرها من الاحياء المجهرية الاخرى. (14).

نستنتج من هذه النتائج ان الصبغات النباتية التي استخلصت من جذور الفوة , قشور الرمان واوراق النعناع لها تاثير تثبيطي على نمو الاحياء المجهرية قيد الدراسة في كلا الحالتين (الوسط الصلب والنسيج القطني) على الرغم من ان الفوة قد اظهرت فعالية تثبيطية على النسيج القطني اقوى مما أظهرته على الوسط الصلب وهذا قد يعود الى ثباتية الصبغة على النسيج القطني اقوى من ثباتية كل من صبغة النعناع والرمان.

جدول (1): الفحوصات البايوكيميائية التاكيدية للانواع البكتيرية قيد الدراسة

الاختبار / *النتيجة*	*Streptococcus pneumonia*	*Bacillus subtilis*	*Proteus mirabilis*	*Pseudomonas aeruginosa*
صبغة الكرام	+	+	-	-
الشكل	Cocci	Cocci	Rod	Rod
فحص الكاتاليز	/	+	+	+
استهلاك السترات	/	-	+	+
استهلاك اللاكتوز	-	-	+	+
تحلل الدم	α-hemolytic +		-	-
الحركة	-	+	+	+
النمو عند 42م	-	-	-	+

جدول رقم (2) : الفعالية التثبيطية للمستخلصات النباتية ضد الانواع البكتيرية على الوسط الصلب.

Chloramphenicol	*الرمان*	*النعناع*	*الفوة*	*اسم البكتيريا*
	قطر منطقة التثبيط (cm)			
1.9	2.4	2.4	0.6	*Pseudomonas aeruginosa*
2	2.5	2	0.7	*Proteus mirabilis*
2.3	2	1.8	1.3	*Streptococcus pneumonia*
2.1	2.6	1.5	1	*Bacillus subtilis*

Resistance:≤1.5
Intermediate: 1.3-1.7
Sensitive:≥1.8

جدول (3): النسبة المئوية لاختزال النمو المايكروبي من قبل الصبغات النباتية على النسيج القطني.

	الفوة	النعناع	الرمان
Pseudomonas aeruginosa	58%	42%	42%
Proteus mirabilis	36%	40%	35%
Streptococcus pneumonia	36%	19%	45%
Bacillus subtilis	16%	39%	38%

References

1. Han S. ; Yang Y(2005). Antimicrobial activity of wool fabric treated with Curcumin. Dyes Pigments,64:157-161.
2. Haug S, Roll A, Schmid Gp, Johansen P, Wuthrich B, Kunding TM ,Senti G (2006). Coated textiles in the treatment of a topic dermatitis .Current Problems in Dermatology, 33: 144-151
3. Salah,S.M (2011).antibacterial activity and ultraviolet (UV) protection property of some Egyptian cotton fabric treated with aqeous extract from banana peel.Frican.J.Agricult.research .6(20):4746-4752
4. Yang Y, Corcoran L. Vorlicek K, Li S(2000). Durability of some antimicrobial treatments to repeated laundering , Text chem color An Dye stuff Rep, 32(4): 48-54.
5. Mehrabian S, Majd A, Majd (2000).Antimicrobial effects of three plants (Rubia tintorum , Carthamus tinctorius and juglans regia) on some airborn microorganisms. Aerobiologia, 16:455-458.
6. Swain, I. I. (1996). Comparative phytochemistry. New York, London: Academic press.
7. Machado T. ; Leal ICR ; Amaral ACF ; Santos KRN ;Silva MG; Kuster RM (2002). Antimicrobial Ella gitannin of Punica granatum fruits. J.Braz.chem.Soc 13(5):606-610.
8. Yadegarinia D ; Gachkar L. ; Rezari MB ;Taghizadeh M. Astaneh S.A. Rasooi H. (2006). Biochemical activities of Iranian Mentha piperita L. and Myrtus communis L. essential oils. Phytochemistry, 67(12), 1249-1255
9. Holt, J. G. ; Kreig,N.R.; Sheath,P. H. A.; Staley ,T. T. and Williams, S. T. (1994). Bergey's manual of determinative bacteriology .9th ed. Williams and Wilkns, USA.Ahmed,A. ; Khan,KA ; Sultan,S. ; Siddiqui,B.S. and Siddiqui, S.(1992). Study of the invitro antimicrobial activity of harmine , harmaline and their derivatives. J.Ethnopharmacol. 35(3): 289-294.
10. Calls A. ; Celik,G.Y. and Katircioglu,H.(2008). Antimicrobial effect of natural dyes on some pathogenic bacteria. African J. of biotech. Vol.8(2) pp.291-293
12. Gupta,D. ; Khare,S.K. and Laha,A.(2004).coloration technology.120 (4):167
13. Perez,C.; Pauli,M. and Bazerque,P.(1990).A antibiotic assay by the agar –well diffusion method, J. Actabiology.15:113-115.
14. Singh R. Jain A. Panwar S, Gupta,D ; Khare SK (2005). Antimicrobial activity of some natural dyes. Dyes Pigments , 66:99- 102
15. Jawetz,E. ; Melnick, J.L. and Adelberg, E.A.(1998). Review of medical microbiology. 25th ed . Appleton and Lange
16. Briody,A.B. and Gillis, E.R.(1984). Microbiology and infections disease . MeGraw-Hill book Company.
17. Day, D. F. (1980). Gentamycin in *Pseudomonas aeruginosa.* Current microbiology . 4:277.