الفعالية التثبيطية للمستخلصات المائية والكحولية لمادة اللبان Frankinens تجاه جراثيم العنقوديات

محسن ايوب عيسى العكيدي ، عبداللطيف ذنون الخزرج ، محمد عبدالرزاق ، ليث لؤي توفيق

قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة الموصل ، الموصل ، العراق

(تاريخ الاستلام: ٤ / ٤ / ٢٠١١ ---- تاريخ القبول: ٢٨ / ٦ / ٢٠١١)

الملخص:

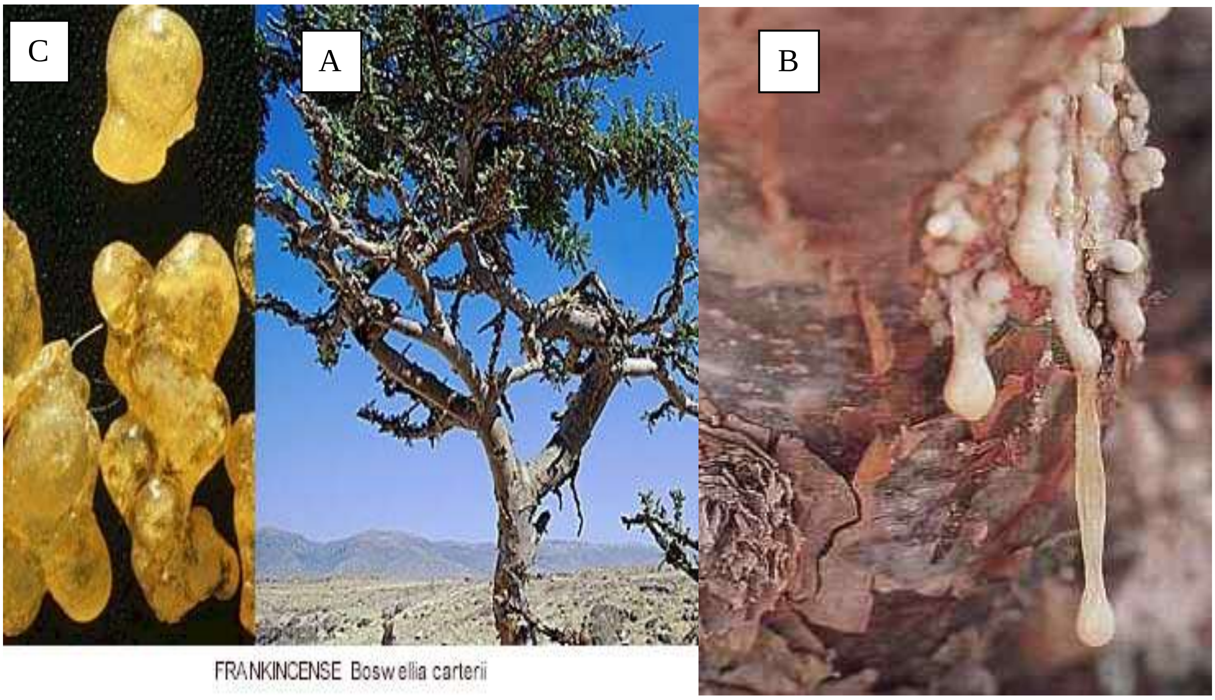
جري هذا البحث بهدف دراسة الفعاليات التثبيطية للمستخلصات المائية والكحولية لمادة اللبان **Frankinens** تجاه جراثيم العنقوديات الذهبية ***S.aureus*** المقاومة للمثسلين والعنقوديات السالبة لانزيم التجلط**Coagulase Negative Staphylococci (CoNS)** (***S.epidermis*** و***S.saprophyticus***) والمقارنة مع التأثير التثبيطي لعدد من المضادات الحيوية تجاه هذه الجراثيم .اظهرت النتائج إن المستخلص الكحولي هو أكثر تأثيرا من المستخلص المائي وان جرثومة ***S.aureus*** كانت أكثر تأثرا من جراثيم **CoNS** عند التركيز 200 ملغم /مل ، وان زيادة التركيز إلى ٤٠٠ ملغم /مل وخفضه الى ١٠٠ ملغم /مل رافقه ارتفاع ونقصان كذلك في الفعالية التثبيطية للمستخلصات على التوالي . وبالمقارنة مع التأثير التثبيطي للمضادات الحيوية المدروسة على هذه الجراثيم فان المستخلص الكحولي بتركيز ٤٠٠ ملغم /مل حقق أفضلية على عدد من هذه المضادات خاصة التي قاومتها جرثومة ***S.aureus*** وكان المستخلص مقارب في تأثيره بقية المضادات التي اثرت على هذه الجرثومة .

المقدمة:

إن تطور المقاومة الجرثومية للعلاجات وخاصة المقاومة المتعددة Multidrug resistant فضلا عن الآثار الجانبية السلبية لبعض هذه العلاجات والكلفة العالية لتحضيرها وإنتاجها وغيرها من الأسباب كلها أدت الى توجه الأنظار إلى البدائل أو الطب البديل لتجاوز هذه المشكلات ولعل حقل النباتات الطبية يعد من أهم البدائل التي تدرس باستمرار وفي معظم دول العالم [1][2] وتستخدم مادة اللبان Oliban (Frankinens) في الطب الشعبي منذ عصور قديمة وتسمى كذلك لبان ذكر ، وكندر ،الشحري وغيرها والتي يتم الحصول عليها من شجرة اللبان ***Boswellia spp.*** من العائلة Burseraceae المنتشرة في بعض بلدان الجزيرة العربية مثل اليمن وعمان بالإضافة الى الدول الأفريقية كالصومال والسودان وجنوب مصر وغيرها حيث تعد شجرة اللبان ذات اهمية اقتصادية في هذه البلدان، طولها لا يزيد عادة عن ثلاث امتار ومشوكة اوراقها صغيرة مدببة تشبه اوراق نبات الآس ، واللبان هو عبارة عن العصارة اللبنية التي تستخرج بواسطة عمل جروح على سيقان أنواع هذه الشجرة حيث تجفف هذه العصارات وتصبح بشكل قطع صغيرة مختلفة الأشكال يدعى القسم النقي من هذه القطع باللبان ذكر،الصورة (١) ويعد اللبان من المواد المشهورة التي تباع وتتواجد في محلات العطارة والاعشاب الطبية العربية، واستخدم اللبان في الطب الشعبي لمعالجة أمراض كثيرة أهمها الأورام والقروح الملتهبة و الزحار والأمراض الصدرية كالسعال والربو وضيق التنفس فضلا عن الجذام وكمقوي للقلب وغيرها كما ان له استخدامات غير طبية اهمها واكثرها رواجا هي صناعة البخور [3][4][5] . من الناحية الكيميائية يتألف اللبان من أحماض غروية تمثل حوالي (٥٦-٦٥%) و موادة صمغية (٢٠-٣٦%) وزيوت طيارة (٤-٨%) ويعتقد ان المواد الفعالة فيه تعود الى الأحماض الغروية والتي تسمى مجتمعة Baswellic acids ، وقد درس التاثيرالمناعي لبعض هذه المركبات ووجد ان لها تاثيرا ايجابيا، فضلا عن امكانية استخدامها في علاج الاورام وحالات السرطان والروماتيزم وغيرها من خلال قدرتها على تثبيط بعض المواد الداخلة في تحفيز نشوء هذه الامراض [6][7][8]

تعد جراثيم العنقوديات خاصة النوع ***Staphylococcus aureus*** والأنواع السالبة لإنزيم التجلط **Coagulase Negative Staphylococci (CoNS)** من أهم الجراثيم المسببة للإصابات المختلفة في الإنسان والحيوان، وهي تمثل مشكلة صحية مهمة خاصة في ما يسمى بعدوى المستشفيات Hospital acquired infection حيث توضح التقارير الوبائية انتشار النوع ***S.aureus*** المقاوم لمضاد المثسلين **Methicillin Resistant *S.aureus* (MRSA)** بصورة واضحة في هذه الإصابات وان قابلية الجرثومة على المقاومة المتعددة للعلاجات مع هذه الانتشار الواسع لها يثير القلق لذا فالعمل البحثي مستمر في محاولة لإيجاد العلاجات المناسبة والفعالة لمثل هذه السلالات من الجراثيم [9][10].

ISSN:1813 – 1662



صورة (١): شجرة اللبان *Boswellia spp* (A) و استخلاص اللبان من الشجرة (B) اللبان النقي (C) [11].

وقد اجري هذا البحث بهدف دراسة الفعالية المضادة للجراثيم لمادة اللبان تجاه جرثومة العنقوديات من خلال تحضير مستخلصات مائية وكحولية لهذه المادة وبالتالي إمكانية استخدامها في العلاج البديل تجاه الأمراض المرتبطة بهذه الجرثومة .

المواد وطرائق العمل:

المواد:

* **مادة اللبان :** تم الحصول على مادة اللبان من السوق المحلية في مدينة الموصل – محافظة – نينوى – العراق .

العزلات الجرثومية:** العزلات الجرثومية المستخدمة في هذه الدراسة وهي ***S.aureus ، ***S.saprophyticus S.epidermis*** حصل عليها من قسم علوم الحياة – كلية العلوم – جامعة الموصل وتم تأكيد تشخيصها باعتماد الاختبارات الزرعية والبايوكيمياوية الملائمة وحسب [12][13].

***المضادات الحيوية** أقراص المضادات الحيوية المستخدمة في هذه الدراسة مصنعة من شركة Bioanalysis Ltd Turkey والموضحة مع تراكيزها في الجدول (١).

جدول (١) : أنواع وتراكيز المضادات الحيوية المستخدمة في هذه الدراسة .

المضاد الحيوي	التركيز(مايكرو غرام/قرص)
Vancomycin	٣٠
Ampicillin	١٠
Tetracyclin	٣٠
Ciprofloxacin	٥
Methicillin	٥
Cefotaxim	٣٠
Clindomycin	٢

طرائق العمل :

***تحضير المستخلصات المائية**

حضر المستخلص بالاعتماد على طريقة [14] حيث مزج ٤٠غرام من مسحوق مادة اللبان مع ١٦٠ مل من الماء المقطر وسحق النموذج باستخدام جهاز السحق Blender حرك بعدها المزيج بواسطة المحرك الكهربائي Magnetic stirrer لمدة ٦٠ دقيقة ثم ترك المزيج في الثلاجة لمدة ٢٤ ساعة لغرض النقع رشح بعد ذلك خلال عدة طبقات من الشاش ثم اجري الطرد المركزي المبرد بسرعة ٢٠٠٠ / دورة / دقيقة لمدة ١٥ دقيقة ثم اخذ الراشح وجفف بالتبريد تحت ضغط مخلخل بجهاز التجفيد Lyophilizer المجهز من شركة Edwards– المانيا ، حفظت العينات بعد جفافها في قناني زجاجية ذات غطاء محكم في ظروف خالية من الرطوبة لحين الاستخدام .

***تحضير المستخلصات الكحولية:**

حضر المستخلص استنادا إلى [15][16] وذلك بمزج ٥٠ غرام من مسحوق مادة اللبان مع ٢٥٠ مل من كحول الايثانول ٩٥% ثم اتبعت نفس الخطوات السابقة وتم التخلص من المذيب باستخدام جهاز المبخر الدوار Rotary Vaccum Vaporation المجهز من شركة Electrothermal الانكليزية بعدها تم تجفيف الناتج بجهاز التجفيد وحفظ في قناني زجاجية محكمة الغلق لحين استخدامها .

***تحضير التراكيز المختلفة للمستخلص:**

اخذ ٠,٢ غرام و ٠,٤غم و ٠,٨غم من مسحوق مستخلص مادة اللبان لإذابتها في ٢ مل من المذيب لتحضير التراكيز (٤٠٠،٢٠٠،١٠٠)

ملغم / مل على التوالي ففي حالة المستخلص المائي عقم باستخدام المرشحات الغشائية بقطر ٠,٤٥ مايكرون ،وفي حالة المستخلص الكحولي استخدمت مادة (DMSO) Dimethyl Sulfoxide كمذيب وعقم المستخلص بطريقة البسترة بدرجة ٦٢ م° لمدة ١٥ دقيقة

***اختبار الفعالية التثبيطية:**

اعتمدت طريقة Kirby-Bauer والموصوفة من قبل [17] لهذا الاختبار حيث حضر المعلق البكتيري في وسط المرق المغذي وبتركيز ١٠^٨ خلية / مل بالمقارنة مع أنبوب ماكفرلاند رقم ١ ثم نقل ٠,١ مل من المعلق البكتيري ولقح باستخدام ماسحة قطنية معقمة على طبق يحوي وسط اكار مولر–هنتون Muller-Hinton agar (Oxoid) حضنت الأطباق بدرجة ٣٧ م° لمدة نصف ساعة لغرض التشرب بعد ذلك وضعت أقراص من ورق الترشيح (What man No.1) بقطر ٦ ملم مشبعة بالتراكيز المختلفة للمستخلصات من خلال غمرها في هذه المستخلصات وثبتت الأقراص بواسطة ملقط معقم على سطح الأطباق الملقحة وحضن بدرجة ٣٧ م° لمدة ٢٤ ساعة ، بعد نهاية التحضين تم ملاحظة وقياس أقطار التثبيط حول الأقراص المشبعة بالمستخلص واجري اختبار الحساسية للمضادات الحيوية بإتباع نفس الطريقة أعلاه وباستخدام أقراص المضادات الحيوية المبينة في الجدول (١) .

النتائج والمناقشة :

يوضح جدول (٢) نتائج الاختبار الأولي للفعاليات التثبيطية للمستخلصات المائية والكحولية لمادة اللبان تجاه الجراثيم المدروسة ضمن تراكيز ٢٠٠ملغم/ مل حيث يلاحظ ان الفعالية التثبيطية للمستخلص الكحولي كانت أفضل بالمقارنة مع المستخلص المائي مما يعكس إمكانية أفضل للمذيب الكحولي في استخلاص المواد الفعالة والمؤثرة على الجراثيم الموجودة ضمن تركيب مادة اللبان حيث تؤكد عدة دراسات على أفضلية المذيب الكحولي في استخلاص المواد الفعالة من النباتات الطبية [15][18].كذلك يلاحظ إن جرثومة العنقوديات الذهبية المقاومة لمضاد المثلسين كانت حساسيتها أعلى تجاه هذا المستخلص مقارنة بجراثيم ***CoNS*** والتي لم تتأثر بالمستخلص المائي مطلقا .إن حساسية النوع ***S.aureus*** هذه تعد مؤشرا مهما إذا ما عرفنا الأهمية الامراضية والوبائية لهذه السلالات المقاومة للمثلسين محليا وعالميا والتي تشكل حوالي ٤٠–٧٠% من العنقوديات المنتشرة في وحدات العناية المركزة في المستشفيا[19] و هي تطور مقاومتها للمضادات الحيوية باستمرار مما يستدعي دائما البحث عن بدائل للتغلب عليها مع الأخذ بنضر الاعتبار أهمية جراثيم **CoNS** التي أصبحت في السنوات الأخيرة تشكل مشكلة صحية مهمة بسبب انتشارها الواسع مسببة العديد من الأمراض فضلا عن مقاومتها المتزايدة للعلاجات والمطهرات [1].

جدول (٢) : التاثير التثبيطي الاولي(قطر التثبيط بالملم) لمستخلصات اللبان المائية والكحولية بتركيز ٢٠٠ملغم/ مل.

المستخلص/ الجرثومة	*S.aureus*	*S.epidermis*	*S.saprophyticus*
المستخلص المائي	٧	٦	٦
المستخلص الكحولي	١٢	١٠	٨

ولبيان تأثير الزيادة أو النقصان في التركيز الأولي المدروس لمادة اللبان (٢٠٠ ملغم/ مل) على الفعالية التثبيطية له تم زيادة التركيز الى ٤٠٠ ملغم/ مل كتركيز أعلى واستخدام التركيز ١٠٠ ملغم/ مل كتركيز أدنى ، ويوضح الجدول (٣) أقطار التثبيط الناتجة من استخدام هذه التراكيز على الجراثيم المدروسة ، حيث يلاحظ في حالة المستخلص الكحولي إن زيادة أو نقصان التركيز أدى الى زيادة و نقصان الفعالية التثبيطية بصورة واضحة وان النوع ***S.saprophyticus*** قد فقد حساسيته بصورة كاملة عند التركيز الادنى مما يؤكد احتواء هذا المستخلص على المواد الفعالة المثبطة ، بينما في حالة المستخلص المائي فان زيادة التركيز لم يرافقه زيادة ملموسة في الفعالية التثبيطية الامر الذي يرجح ان الماء هو ليس المذيب الملائم لاستخلاص المادة الفعالة الموجودة ضمن تركيب مادة اللبان. ان الزيادة في الفعالية التثبيطية مع زيادة التركيز يمهد لإمكانية استخدام تراكيز أعلى من مستخلص اللبان خاصة وان بعض الدراسات تؤكد على عدم وجود سمية لهذا المستخلص عند استخدامه في تجارب الحيوانات المختبرية [20] . والمعروف ان التركيب الكيمياوي لمادة اللبان يتألف بصورة عامة من زيوت طيارة وأحماض غروية وصمغ ولكن يعتقد إن الفعالية المهمة لهذه المادة تعود الى وجود أحماض Boswellic acides والتي تعمل بالإضافة الى كونها مضادة للالتهابات كمضاد للسرطان والحساسية وغيرها [6][21]. ولمقارنة التأثير التثبيطي للمستخلص الكحولي الأعلى لهذا المستخلص(٤٠٠ ملغم/ مل) مع عدد من المضادات الحيوية يوضح الجدول (٤) أقطار التثبيط الخاص بعدد من هذه المضادات تجاه العزلات المدروسة حيث يلاحظ تباين التأثير ، وان جراثيم ***CoNS*** كانت بصورة عامة أكثر حساسية من جرثومة ***S.aureus*** المقاومة للمثلسين والتي لابد أنها أكثر تطورا من ناحية قابليتها على مقاومة العلاجات [1] ، وانها قاومت بصورة مطلقة كل من مضادات Ampicillin و Cefotaximو Methicillin ، كما يلاحظ من الجدول أيضا إن مضادي Ampicillin و Cefotaxim لم يظهرا أي فعالية تذكر تجاه الجراثيم المدروسة .

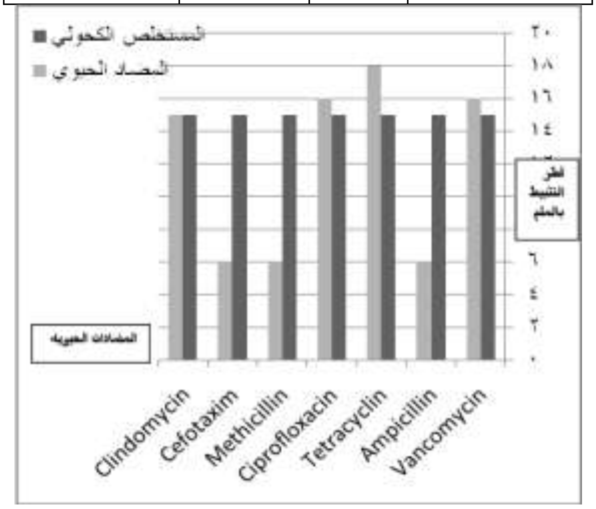
جدول (٣) التأثر التثبيطي (قطر التثبيط بالملم) للمستخلصات المائية والكحولية لمادة اللبان بتركيز ٤٠٠ و ١٠٠ ملغم / مل اتجاه الجراثيم المدروسة

الجرثومة /المستخلص		S.aureus	S.epidermis	S.saprophyticus
المستخلص المائي	٤٠٠ ملغم/ مل	٧	٦	٦
	١٠٠ ملغم/ مل	٦	٦	٦
المستخلص الكحولي	٤٠٠ ملغم/ مل	١٥	١١	١٠
	١٠٠ ملغم/ مل	٩	٧	٦

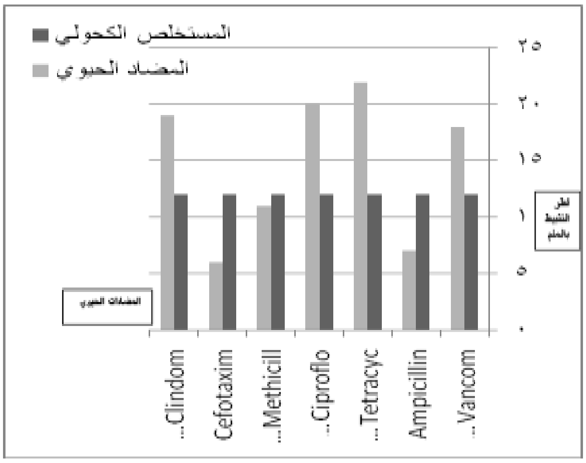
وعند الأخذ بنظر الاعتبار نتائج التركيز(٤٠٠ ملغم/ مل) للمستخلص الكحولي لمادة اللبان ،وملاحظة الاشكال (١ و٢ و٣) فان تأثيره التثبيطي على جرثومة ***S.aureus*** كان أفضل من المضادات التي قاومتها ومقاربا في تأثيره المضادات الحساسة لها وان زيادة تركيز مادة اللبان ربما تبعه أفضليه في التثبيط على بقية المضادات ايضا ،كذلك الحال بالنسبة لجراثيم ***CoNS*** التي تفوق فيها المستخلص على ذات المضادات وهي Ampicillin و Cefotaximو Methicillin إن الحصول على مادة مثبطة لجرثومة العنقوديات وخاصة النوع ***S.aureus*** المقاوم للمثسلين يعد مسألة مهمة جدا سيما ان تفوق المستخلص كان على انواع المضادات الحيوية التي قاومتها الجرثومة مما يفتح الباب أمام دراسات أخرى على هذه الجرثومة أو غيرها من اجل للتأكد وبشكل دقيق من التركيز الملائم من خلال دراسة الفعاليات التثبيطية والعلاجية في الجسم الحي (*In vivo*) باستخدام الحيوانات المختبرية،فضلا عن اجراء دراسات تحليلية لمعرفة المركب الفعال في مادة اللبان تجاه الجراثيم وربما استخدام مذيبات أخرى لاستخلاص المادة الفعالة وبالتالي تثبيت القابلية العلاجية لهذه المادة بصورة دقيقة ومن ثم امكانية استخدامها كعلاج ملائم للجراثيم الحساسة له .

جدول (٤) التأثير التثبيطي(قطر التثبيط بالملم) للمضادات الحيوية المستعملة تجاه الجراثيم المدروسة .

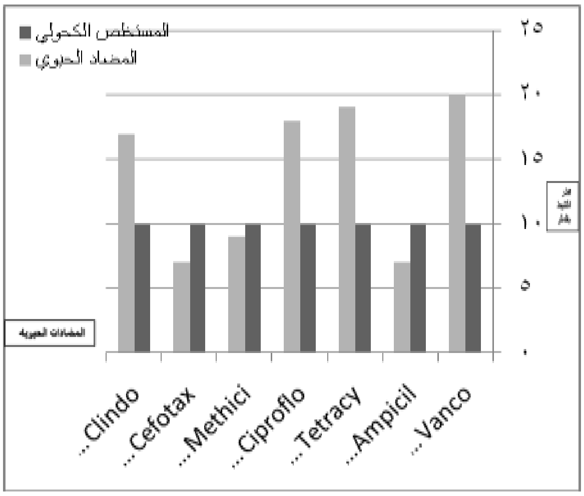
المضاد الحيوي/ الجرثومة	S.aureus	S.epidermis	S.saprophyticus
Vancomycin	١٦	١٨	٢٠
Ampicillin	٦	٧	٧
Tetracyclin	١٨	٢٢	١٩
Ciprofloxacin	١٦	٢٠	١٨
Methicillin	٦	١١	٩
Cefotaxim	٦	٦	٧
Clindomycin	١٥	١٩	١٧



شكل(١): مقارنة التاثير التثبيطي لمستخلص اللبان الكحولي (٤٠٠ملغم/مل) و المضادات الحيوية المدروسة تجاه جرثومة *S.aureus*.



شكل(٢): مقارنة التاثير التثبيطي لمستخلص اللبان الكحولي (٤٠٠ملغم/مل) و المضادات الحيوية المدروسة تجاه جرثومة *S.epidermis* .



شكل(٣): مقارنة التاثير التثبيطي لمستخلص اللبان الكحولي (٤٠٠ملغم/مل) و المضادات الحيوية المدروسة تجاه جرثومة *S.saprophyticus*.

References

1. Walsh FM, Amyes SG (2004). Microbiology and drug resistance microorganisms of fully resistant pathogens. ***Current Opinion in Microbiol***. 7: 439-444.
2. WHO (2002). Traditional medicine. Report, EB111/9, World Health Organization, Geneva.
3. Bonjar, S.(2004). Evaluation of antibacterial properties of some Medicinal plants used in Iran. ***J. Ethnopharmacology***,. 94:301-305.
4. Ali, N.A., W.D. Julich, C.Kusnick and U. Lindequist,(2001). Screening of Yemeni medicinal plants for antibacterial and cytotoxic activities .***J. Ethnopharmacol.,*** 74:173-179.
5. Miller A, Morris M, (1998). *Plants of Dhofar, the Southern Region of Oman: Traditional, Economic,and Medicinal Uses.* Office of the Advisor for Conservation of the Environment, Diwan of Royal Court, Sultanate of Oman.
6. Huang M, Badmaev V, Ding Y, Liu Y, Xie J, Ho C, (2000). Anti-tumor and anticarcinogenic activities of triterpenoid, beta-boswellic acid. ***BioFac*** 13:225-30.
7. Badria F, Mikhaeil B, Maatooq G, Amer M, (2003). Immunomodulatory triterpenoids fromthe oleogumresin of *Boswellia carterii* Birdw. ***Z. Naturforsch*** 58c:505-16.
8. Gupta V, Gupta A, Parihar A, Ludtke r, Safayhi H, Ammon H., (1998). Effects of b*oswellia serrata* gum resin in patients with bronchial asthma: results of adouble-blind, placebo-controlled, 6-week clinical study. ***Eur J Res*** 3:511-14.
9. Ferrara AM (2007). Treatment of hospital-acquired pneumonia caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. ***Int.J. Antimicrob***. Agents. 30: 19-24.
10. Hiramatus K, Cui L, Kuroda M, Ito T (2001). The emergenceand evaluation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. ***Trends Microbiol***. 9 (10): 486-493.
11. Shelowan,D, (1998)Plant monograph *Boswellia spp.* , ***Alternative Medicine Review***, 3(4):306-7.
12. Koneman, E.W. ; Allen, S.P. and Janda, W.C. (2006). Color atlas and text book of diagnostic microbiology. 6th . Lippincott-Willams and Wilkins puplishers. Philadelphia, U.S.A.
13. Lennette, E.H. ; Balows, A. ; Hausler, W.J. and Snadomy, H.J. (1985). Manual of clinical microbiology. 4th ed. American Society for Microbiology, Washington D.C., USA
14. Riose, J.L.; Reeio, M.C. and villar, A.(1987). Antimicrobial activity of selected plants employed in the Spanish Mediterranean area.***J Ethnopharmacol***., 21:139-152.
15. Adomi, p.o.(2006). Antibacterial activity of aqueous and ethanol extracts of the stem bark of Alstonia boonei and Morinda lucida. ***Sci. Res. Essays***., 1(2): 50-53
16. EL-Astal, Z.Y.; Ashour, A. and Kerrit, A.A.M. (2006). Antimicrobial activity of some medicinal plant extract in palestine. Park.***J . Med. Sci***., 21(2): 187-193.
17. National Committee for Clinical Laboratory Standards (2002). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, NCCLS document M100-S12, Wayne, PA, USA.
18. Eloff JN (1997). Which extract should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? ***J. Ethnopharmacol***. 60: 1-8.
19. Petinaki E, Miriagou V, Tzouvelekis LS, Pournaras S, Hatiz F, Kontos F,Maniati M, Maniatis AN (2001). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the hospitals of Central Greece. ***Int. J. Antimicrob. Agents***.18: 61-65.
20. Schauss A, Milholland R, Munson S, (1999). Indian frankincense (*boswellia serrata) g*m resin extract: a review of therapeutic applications and toxicology. ***Nat Med J,*** 2(2):16-20.
21. Holmes, P, (1999). Frankincense oil. ***Int J Arom*** 9(4):56-61.

Antimicrobial activity of aqueous and alcoholic extracts of Frankinens against Staphylococci

Muhsin A. Essa , Abdulatif T. Khazraji , Mohamad A. Ibrahim , Laith L. Tawfeek

Biology Dept., Science collage, Mosul university , Mosul ,Iraq

(**Received:** 4 / 4 / 2011 ---- **Accepted:** 28 / 6 / 2011)

Abstract:

This research was conducted to study the inhibitory activity of Frankinens against staphylococci , Methicillin Resistant ***S.aureus*** (MRSA) and **Coagulase Negative Staphylococci (CoNS)**) ***(S.epidermis , S.saprophyticus)*** and compared with inhibitory activity of some antibiotics The results showed that alcoholic extract was more effective than aqueous extract and ***S.aureus*** was most effective with these extracts at 200 mg/ml concentration and it was found that increasing the extract concentration to 400 mg/ml and decreasing concentration to 100 mg/ml accompanied by increasing and decreasing of extract inhibition activity and when comparing with some studied antibiotics it was found that alcoholic extract (at 400 mg/ml) have superior effect than many antibiotics which ***S.aureus*** resistant and it was comparable in its effect to other antibiotics .