مجلة جامعة بابل / العلوم الصرفة والتطبيقية/ العدد (4) / المجلد (15) : 2008

الفعالية التضادية للمستخلص الكحولى لنباتى الشعير والسلق فى نمو البكتريا السبورية *Clostridium perfringens*

انغام جاسم محمد على

المعهد التقنى –الكوفة

الخلاصة

أجريت هذه الدراسة لعزل وتشخيص البكتريا *Clostridium perfringens* باستخدام الاوساط الزرعية التقليدية تحت ظروف لاهوائية اعتمادا على الصفات الزرعية والمظهرية بالإضافة إلى إجراء الفحوصات البايوكيمياوية ومقارنتها بالسلالات القياسية لغرض التعرف والحصول على عزلات نقية لبكتيريا الاختبار.

كما بينت الدراسة فصل وتنقية المركبات الطبية لنباتى للشعير والسلق وباستعمال المذيب العضوي الايثانول 70% , كما وتم اختبار حساسية البكتريا *Clostridium perfringens* لسلسلة من التراكيز المختلفة لكلا المستخلصين , فأظهرت النتائج أن مستخلص الشعير ذات كفاءة عالية بالتركيز(1,2 mg /ml)عند القراءة الخامسة بينما كان مستخلص السلق كفاءة تثبيطية بالتركيز 2 mg عند القراءة الخامسة .

ولوحظ عند مزج المركبين هناك كفاءة تثبيطية عالية في التركيز(2-A + 1-B-mg/ml) بالقراءة الثالثة وهذا يدل على ان هناك تازر بين المركبات الطبية لكلا المركبين في التاثير على نمو البكتريا

Abstract

During this study ,*Clostridium perfringens* were isolated and identified by using selective medium under anaerobic condition. The morphological and the biochemical characters were done and compared with standard strains for purified the bacterial test .

The results showed that the chemical compounds of *Hordeum vulgar L.*and *Beta sativum var .Cicla* were separated and purified by using ethanol 70% as a solvent .

The testing bacteria were sensitive to *Hordeum vulgar L.* (A) and *Beta vulgaris var .Cicla* (B) extracts in different concentrations. Also , A- compound were effected on the bacterial growth in (1 , 2 mg / ml) at the five reading , while the bacterial growth of *Cl .perfringens* were affected in (2mg / ml) only at the five reading .

The combination of both (A and B) compounds were appeared high activity on the bacterial growth in (2mg / ml) at the third reading . The results referred to the synergism between the chemical compounds of both extracts.

المقدمة

عصيات البكتيريا *Clostridium perfringens* كبيرة الحجم موجبة لصبغة كرام تنتهي العصيات بنهايات عريضة مثخنة الزوايا توجد بشكل مفرد محاطة بغلاف يساعد على الامراضية وتحتوي على ابواغ بيضوية الشكل ذات موقع طرفي غير متحركة (Collee, *et al*, 1996). تمتاز هذه البكتريا بقوة تخميرها للسكريات منتجة الغاز وتحلل البروتينات تظهر المستعمرات على وسط اكار الدم بشكل كامل ولها القدرة على تخمر الاكتوز يتواجد هذا النوع من البكتريا الاهوائية في امعاء الحيوانات والانسان بصورة متعايشة وقد تنتقل من التربة الملوثة الى الجروح و تسبب تلوثها و تصبح وسط لاهوائي مسببة مرض Gas gangrene بعد انقسام ونمو البكتريا في الجروح وتقوم هذه العصيات بتحرير الغاز نتيجة لتخمر سكر الكلوكوز في الانسجة المصابة, و تتميز الجروح بالرائحة النتنة مع حدوث اصواتا نتيجة لتجمع الغاز في منطقة الاصابة, تفرز هذا النوع من البكتريا عددا من الذيفانات الخارجية Exotoxin وخاصة السم (A) المسبب الى الموات الغازي في الانسان (Kenneth, 2002 ; Jawets, *et al*,1998)

تعد بكتريا *Clostridium perfringens* من المسببات الرئيسية الخطرة التي تسب الامراض الى الانسان كونها بكتريا لاهوائية منتجة للسبورات ومقاومة لعدد من المضادات الحيوية لذا اجريت الدراسة عليها من خلال اختبار الخليط النباتى للشعير والسلق (المركبات الفعالة) فى النمو البكتيري.

يعتبر الشعير من النباتات الحاوية على بعض المركبات ذات الاثر الطبي نظرا لاحتواء اغلفة البذرة على مجموعة من الانزيمات مثل الاماليز والبكتنيز المسؤولة عن تحليل البروتين نظرا عن احتواءه على بعض العناصر الكيميائية مثل +Ca و +K مما يجعله يمتلك فعالية بايولوجية ضد الممرضات عن طريق تحليل جدارالكبسولة (Smith ,. 2002; Baron & Fingold, 1994).

اما السلق فهو من النباتات الورقية الغنية بالعناصر الغذائية وخاصة الحديد الذي يتداخل مع التركيب الفسلجي للبكتريا وكذلك احتوائه على الصبغات المهمة بايولوجيا (Smith ,. 2002; Al- Rawi ,& Chakravarty,1988).

كما اكد (Al-Shama *et al* 1981) بان مستخلص السلق له دور مثبط في نمو البكتريا الموجبة لصبغة كرام . ايضا يحتوى السلق على مادة سكرية لها القابلية على ربط المركبات الفعالة والتصاقها في منطقة الاصابة مما يؤدي الى دور علاجي افضل . (Difco, 1984;Harbone,1984;Al-Shmma,*etal*, 1981) .

وان الهدف من هذة الدراسة هو تحديد فعالية مزيج المستخلصين (الشعير والسلق) فى نمو البكتيريا السبورية *Clostridium perfringens* .

المواد وطرائق العمل

***جمع العينات**

تم الحصول على البكتريا *Clostridium perfringens* من فضلات الحيوانات (الخيول)حيث عزلت وشخصت بأستعمال الاوساط الزرعية التقلدية مثل اكار الدم Blood agar.ودرست اشكال المستعمرات وخصائصها الزرعية مثل لون المستعمرة وتحلل الدم وانتاج الصبغات كما درست الخواص الخلوية للجراثيم عن طريق تصبيغ الجراثيم بصبغة كرام والصبغة الخاصة بالسبورات(صبغةالبرت) لمعرفة شكل الخلية وحركتها (Collee, *et al* 1996).

***الاختبارات الكيموحيوية**

أجريت الاختبارات الكيموحيوية للبكتريا للتعرف على صفاتها والتاكد من نقاوتها عند مقارنتها مع السلالات القياسية بعد زرعها على وسط Coked meat medium وتحفظ لغرض الاستعمال (*et al* 1996 Collee,).

***تحضير العالق الجرثومي**

حضر العالق الجرثومي باخذ 4-5 مستعمرة بكتيرية من مستنبت جديد ثاني في وسط الاكار الدم و المحضون لمدة 24 ساعة بدرجة 37 م بعدها عدل المعلق بواسطة المحلول الفسلجي للحصول على عكارة مساوية لانبوب ماكفر لاند رقم 0.5 المستخدم في اختبار الحساسية واختبار MIC .

تحديد قيمة MIC (Minimum inhibition concentration):-

حدد اقل تركيز مثبط MIC من مستخلصات المركبات الفعالة في نمو البكتريا حسب الطريقة الواردة في (Collee ,*et al*,1996)

1 - تحضير للمستخلص الكحولى للشعير والسلق :-

A - وزن المستخاص الكحولي 70% لنبات السلق , 2 -mg /ml.

B- وزن المستخاص الكحولي 70% لنبات الشعير, 2-mg / ml.

2- تحضير سلسلة من التخافيف لمستخلص (A& B)

3- تحضير سلسلة من culture media في كل مجموعة(17)انبوب حيث كان لكل تركيز ثلاث مكررات, Control (-) + Control (+)

- يحتوى الانبوب على الوسط الزرعى Coked meat medium + Bacterial inoculation = Control (+).

- يحتوى الأنبوب على الوسط الزرعى + المستخلص باعلى تخفيف = (-) Control .

4- يحتوي كل انبوب من الانابيب على 5 مل من الوسط الزرعي Cocked meat medium اضافة الى اللقاح البكتيري ثم يضاف لكل انبوب 1ml من التخافيف المذكورة كل حسب تركيزه ,تحضن الانابيب ثم تقرا النتائج وكما موضح في الجداول الاحقة .

- قراءة النتائج كانت بالايام التالية :

1-Day ⟶ 3- Day ⟶ 5- Day ⟶ 7-Day ⟶ 9- Day ⟶ 13-Day

***تاثير محاليل المركبات الطبية في نمو البكتريا**

لتحديد قيمة MIC وحضرت التراكيز (0.125, 0.25, 0.5, 1,2) ملغم/مل واختبرت على النمو الخضري للبكتريا وتكوين السبورات لكلا النوعين (A,B) السلق والشعير اضيف كل تركيز من التراكيز اثبت و كل انبوب حاوي على 5 ml مل من الوسط الغذائي السائل ثم أضيف له 0.1 من العالق الجرثومي المقارن بانبوبة ماكفرلاند 0.5 وحضن بدرجة 37م لمدة 24 ساعة (Collee ,*et al*,1996). اخذ Loop Full من الزرع البكتيري مع المزيج وفحص مجهريا وسجلت النتائج .(Sexena , *et al*, 1995).

النتائج والمناقشة

ظهرت البكتريا *Clostridium perfringens* موجبة صبغة كرام ,صغيرة الحجم ,قصيرة نسبيا مثخنة وتنتهي بنهايات مربعة ,كما لوحظت الخلايا انها تنتظم بشكل مفرد ومحاطة بغلاف أما الابواغ فانها ذات شكل بيضوي طرفية الموقع,وغير متحركة,ومن خلال اجراء الفحوصات البايوكيمياوية على البكتيريا ظهرت ان لها القدرة على تخمير السكريات وخاصة الكلوكوز مع انتاج الغازوالنمو اللاهوائي. وأيضا تمتلك البكتريا القدرة على تحلل الدم الكامل عند زرعها على اكار الدم عند تحضينها لاهوائيا بدرجة 37م لمدة 24 ساعة كما أنها تخمر سكر الاكتوز بشكل سريع مع انتاج غاز ويسمى العملية بالتخمر (Collee ,*et al*,1996).

تأثير مزيحات النباتات الطبية في نمو *Clostridium perfringens*

نلاحظ في الجدول (1) تأثير مستخلص الشعير على نمو البكتريا *Cl. perfringens* خلال مدة زمنية أمدها (13) يوم (2 يوم بين كل قراءة واخرى) .في القراءة الاولى عند التركيز (mg)2 هناك نمو كثيف للخلايا الخضرية فقط مع نمو اكثف لبقية التراكيز مع ظهور قليل للسبورات في التراكيز (g /ml 1و 2).

اما القراءة الثانية أظهرت قلة نمو الخلايا الخضرية في التركيزين (mg 1و mg 2) مع زيادة كثافة السبورات,وبينت التراكيز الأخرى أن هناك كثافة فى النمو الخضري مع انعدام تكون السبورات.

واوضحت القراءة الثالثة قلة فى نمو الخلايا الخضرية مع زيادة عدد السبورات في نفس التراكيز الاولى مع ثبوت النمو في التراكيز الاخرى وظهور السبورات كما هو الحال في القراءة الرابعة. ويلاحظ في القراءة الخامسة

انعدام فى نمو الخلايا الخضرية في التركيزين(1mg /ml و 2) وقلتها في التراكيز الاخرى ونقصان فى تكون السبورات فى نفس التراكيز وزيادتها في التراكيز الاخرى .

وتبين القراءة الاخيرة انعدام الخلايا الخضرية في التراكيز الثلاثة الاولى مع قلتها في التراكيز الاخرى وانعدام السبورات في التركيزين الاولين مع بقاء وجودها في التراكيز الاخرى (Laurance, *et al*, 1997).

جدول (1) تاثيرالمستخلص(A) فيِ نمو البكتيريا *Cl .perfringens*

زمن القراءات	التركيز mg/ml / النمو الجرثومي	0.125	0.25	0.5	1Mg	2Mg	Con. +	Con -
1-day	النمو الخضري	VHG	VHG	VHG	HG	HG	–	VHG
	نمو السبورات	–	–	–	Few	Few	–	–
3-day	النمو الخضري	HG	HG	MG	SG	SG	–	VHG
	نمو السبورات	–	–	Few	SG	SG	–	Few
5-day	النمو الخضري	HG	HG	HG	SG	SG	–	VHG
	نمو السبورات	SG	SG	SG	MG	MG	–	Few
7-day	النمو الخضري	MG	MG	SG	SG	SG	–	VHG
	نمو السبورات	HG	HG	HG	SG	SG	–	SG
9-day	النمو الخضري	SG	SG	SG	–	–	–	VHG
	نمو السبورات	HG	HG	HG	SG	SG	–	SG
13-day	النمو الخضري	SG	SG	-	–	–	–	VHG
	نمو السبورات	HG	HG	HG	–	–	–	SG

VHG = Very high growth
HG = High growth
Mg = Medium growth
SG = Slight growth

يوضح الجدول (2) تأثير محلول السلق في نمو البكتريا إذ لوحظ زيادة التركيز 2mg وكان له تأثير في النمو الخضري في القراءة الاولى مع ظهور السبورات وباستمرار الفترة الزمنية كما لوحظ اختفاء النمو الخضري والسبورات في القراءة السادسة عند التركيزين الاول والثاني.

جدول (2) تاثير المستخلص(B) فيِ نمو البكتيريا *Cl .perfringens*

زمن القراءات	التركيز / النموالجرثومي	0.125	0.25	0.5	1Mg	2Mg	Con. +	(Con. -
1Day	النمو الخضري	VHG	VHG	VHG	HG	HG	–	VHG
	نمو السبورات	–	–	–	–	-	–	–
3Day	النمو الخضري	HG	HG	MG	MG	SG	–	VHG
	نمو السبورات	–	–	Few	SG	SG	–	Few
5Day	النمو الخضري	HG	HG	HG	SG	SG	–	VHG
	نمو السبورات	HG	HG	SG	MG	MG	–	Few
7Day	النمو الخضري	MG	MG	SG	SG	SG	–	VHG
	نمو السبورات	HG	HG	HG	SG	SG	–	SG
9Day	النمو الخضري	SG	SG	SG	–	–	–	VHG
	نمو السبورات	HG	HG	HG	SG	SG	–	SG
13 Day	النمو الخضري	SG	SG	SG	–	–	–	VHG
	نمو السبورات	HG	HG	HG	–	–	–	SG

تأثير مزيج المستخلصات(A+ B) فى النمو البكتيري

تم مزج تراكيز مختلفة من محلول الشعير مع تركيز ثابت من السلق (1 mg /ml) وسجلت النتائج كما في الجدول (3) إذ لوحظ في القراءة الاولى نمو خضري مع وجود خلايا حاوية على السبورات الوسطيةفي التركيزين الاولين .

أصبحت السبورات في القراءة الثانية أكثر كثافة في كلا التركيزين مقارنة بالتراكيز الاخرى واختفت في القراءة الثالثة الخلايا الخضرية في التراكيز (1,2 mg /ml) مع وجود عدد قليل منها في التراكيز الاخرى, واستمر وجودها حتى القراءة الخامسة. أما السبورات فلوحظ قلة عددها مقارنة بالقراءة السابقة.

وكمااوضحت القراءة الخامسة قلة كثافة السبورات في التراكيز الثلاثة الاولى وازدياد كثافتها في التراكيز الاخرى. ولوحظ في القراءة السادسة انعدام نمو الخلايا الخضرية في التراكيز الثلاثة الاولى فضلا عن انعدام نمو السبورات في التركيزين الاولين مع نموها في التراكيز الباقية مقارنة بمجموعة السيطرة (Smith ,. 2002; Laurance, *et al*, 1997) .

وقد تعود الفعالية التثبيطية للشعير الى انخفاض الاس الهيدروجيني إذ تقوم الحامضية المرتفعة بالقضاء على الجراثيم (Jawets ,*et a l*1998).

كذلك اثبت مستخلص الشعير فعالية تثبيطية ضد بكتيريا الاختبار بفروق معنوية عالية تحت مستوى احتمالية P.s 0.01 وتعود الفعالية الى وجود الزيوت الطيارة وبعض المركبات التربينية مثل Apegenin ,Leuteotin , Matricin (Al- Rawi& Chakravarty ,1988; Shihata ,1951).

واثبت مستخلص السلق فعالية تثبيطية فى النمو الجرثومي وبكفاءة اقل من الشعير نظرا لقلة المواد الفعالة خاصة المركبات القلويدية والتى تمتلك قدرة تثبيطية عالية فى نمو الجراثيم الممرضة ويعود هذا التباين فى درجة التاثير الى نوع الجرثومة ونوع المواد الفعالة الموجودة فى المستخلص (Mitsher ,*et al*, 1972).

كما أن المزيج لمستخلصي(A+B) كفاءة تثبيطية عالية فى النمو الجرثومى نظر لتازر Synergism بين المركبات الفينولية مع المركبات التانينية في كلا المركبين . وان المادة الفينولية تقوم بمسخ البروتين وايقاف عمل الانزيمات المسؤولة عن التفاعلات الايضية الاساسية وبالتالى عدم قدرة الكائن المجهرى على النمو والاستمرار (Jawets , *et al* ,1998) .

وأكدت الدراسات التي قام بها (Harsh & Nag,(1984 بان المركبات الفينولية تملك دور كبير في ايقاف نمو السبورات فى البكتيريا .

جدول (3) النمو البكتيري مع المستخلص B+A مقارنة بالسيطرة

زمن القراءات	التركيز / النمو الجرثومي	A-0.125 + B-1mg\ml	0.25 + B-1mg\ml	0.5 + B-1mg\ml	1Mg B-1mg\ml	2Mg B-1mg\ml	Con. +	Con. -
1Day	النمو الخضري	VHG	VHG	VHG	HG	HG	–	VHG
	نمو السبورات	–	–	–	Few	Few	–	–
3Day	النمو الخضري	HG	HG	MG	MG	SG	–	VHG
	نمو السبورات	–	–	Few	SG	SG	–	Few
5Day	النمو الخضري	HG	HG	HG	–	–	–	VHG
	نمو السبورات	HG	HG	MG	MG	MG	–	Few
7Day	النمو الخضري	MG	MG	SG	-	-	–	VHG
	نمو السبورات	HG	HG	SG	SG	SG	–	SG
9Day	النمو الخضري	SG	SG	SG	–	–	–	VHG
	نمو السبورات	HG	HG	SG	SG	SG	–	SG
13 Day	النمو الخضري	SG	SG	-	–	–	–	VHG
	نمو السبورات	HG	HG	SG	–	–	–	SG

References

Al- Shamma, A. Darck, S.Flynn, D.L; Mitscher,L.A; Park ,Y.H;Rao,G.s.r.(1981). Antimicrobial agent from higher Plants .J. of. Nat. Prod. 42: pp 633-642.

Al-Rawi, A. and Chakravarty, H.L.(1988). Medical plants of Iraq. Ministry of Agriculture and Irrigation. 2nd Ed Baghdad.

Baron And Finegold. (1994). Bialy and Scott's Diagnostics Microbiology. 19thEd. Msby yearbook.

Collee , J.G. ; Fraser, A.G; Marmion, B.P.; Simmons, A.(1996):Maki and McCartney practical medical microbiology'.14th ed. Churchill living st U.S.A.

Difco manual of dehydrated culture media and reagent for microbiology and clinical laboratory procedures. (1884).10th Ed. Difco laboratories- Detroit, Michigan, U.S.A.

Harbone, J.B. (1984). Photochemical methods. Aguide to modern techniques of plants analysis. 2nd. Ed. London ,New York, Chapman and Hall.

Harsh, M. L. and Nag, T.N.(1984). Antimicrobial principles from in vitro tissue culture of peganum harmala. J. of .Nat. Prod. 47(2).365-367.

Jawetez, E; Melnck, J.L. and Adelberg, E.A (1998). Medical microbiology. 21. Ed. Appleton and Lang.

Kenneth.T. (2002) . Mechanisms of Bacterial Pathogenicity: Bacterial Endotoxin. University of Wisconsin .Mid Micro–P:237-245.

Laurance, D.R. Bennet, P.N. and Brown. M.J. (1997).Clinical pharmacology.8th. Ed. Churchill.L.IV. Ingston.

Mitscher, L.A; Leu, R; Bathala, M.S, Wu,W.N; Beal , J.L. and White, R. (1972). Antimicrobial agents from higher plants-1-Lioydia. 35(2);pp 157- 166.

Saxena, G; Faemer, S; Hancock, R.E. W. and Towers, G.H.N. (1995). Antimicrobial compounds from Alnus rubra. Int. J. of pharmcognosy, 33(1), pp33-36.

Smith, M. (2002) . An in vitro approach to investigate medicinal chemical synthesis by three herbal plant . Plant Cell Tissue . Org. Cult., 40:105- 111.