مجلة جامعة تكريت للعلوم الزراعية المجلد(13) العدد(4)–(2013)
ISSN-1813-1646

دراسة التأثير التثبيطي لتراكيز مختلفة من المستخلص المائي لبذور العنب ووقت التعرض على اعداد بعض انواع البكتريا المرضية

عمر قاسم محمود ، امين سليمان بدوي واحمد اسماعيل النزال
كلية الزراعة – جامعة تكريت

الكلمات الدالة:
التأثير التثبيطي, بذور العنب, الوقت.

للمراسلة:
عمر قاسم محمود
قسم علوم الأغذية –كلية الزراعة –جامعة تكريت

الاستلام :
27-6-2012
القبول:
10-4-2013

الخلاصة

اجريت هذه الدراسة لملاحظة التأثير التثبيطي للمستخلص المائي لبذور العنب بثلاث تراكيز (50, 100, 200 ملغم/مل) وتأثيرها على اعداد ثلاثة انواع من البكتريا هي *Salmonella paratyphi* , *Staphylococcus. aureus* و بكتريا *Escherichia coli* . مزجت ثلاثة تراكيز من هذا المستخلص كل تركيز لوحده مع انواع البكتريا لثلاثة فترات زمنية وهي 20, 40, 60 دقيقة لملاحظة تأثير عامل الوقت والتركيز على قابلية المستخلص لتثبيط الانواع البكتيرية قيد الدراسة .واستخدمت طريقة عد البكتريا بالأطباق المصبوبة, كما اجري الكشف النوعي للمركبات الفعالة في المستخلص المائي لبذور العنب.اظهرت النتائج بأن لمستخلص بذور العنب تأثير معنوي على الانواع البكتيرية الثلاثة قيد الدراسة, كما بينت النتائج بأن لزيادة تركيز المستخلص تأثير تثبيطي معنوي على اعداد البكتريا, كما ان لزيادة فترة بقاء خلايا البكتريا مع المستخلص تأثير تثبيطي معنوي على اعداد الخلايا خصوصا بكتريا *Salmonella. Paratyphi* و *Staphylococcus. aureus* بينما بكتريا *E. coli* اقل تحسسا بالنسبة لتركيز لكن بكتريا *Staphylococcus. aureus* اقل من النوعيين الاخريين حساسية تجاه الوقت.اما نتائج المركبات الفعالة فأن مستخلص بذور العنب يفتقر الى الصابونيات والكومارين لكنه يحتوي على كل من التانينات والراتنجات والفلافونويدات والفينولات والكلايكوسيدات.

Study the inhibitory effect of different concentrations from the aqueous extract of grape seeds and exposure time on some pathogenic bacteria

Omar Kasim Mahmood , Amin Soliaman Badawy and Ahmed Ismael AL-Nazzal
College of Agriculture-Tikrit University

KeyWords:
Inhibitory effect, Grape Seeds, Time

Correspondence:
Omar Kasim Mahmood

Dept. of Food Science-College of Agri. Tikrit University

Received:
27-6-2012
Accepted:
10-4-2013

Abstract

This study was conducted to show the inhibitory effects of the aqueous extract of the grape seeds of three concentration (50, 100, 200 mg/ml) on the viable numbers of *E.coli, Salmonella. paratyphi,* and *Staphylococcus aureus*. These concentration of the extract mixed with the bacterial species for three periods of time (20, 40,60 min) to notice the exposure time effect of the extract on the bacterial species inhibition. The results showed that there is a significant inhibition for grape seed extracts on the three species of bacteria. Also, the result showed that there is also significant inhibitory effects for the increase of the concentration of the extract . Also, the inhibitory effect increase with exposure time increase especially with *Salmonella. paratyph* and *Staphylococcus aureus*, however, *E.coli* showed less sensitivity concentration the time but *E.coli* more sensitivity concerning the time,but,E.coli more sensitive concerning the concentration of the extract. Moreover, the result showed that the extract have no Sabonification and Coumarin, but it is contain Tannins, Resin, Flavonoids, phenol and Glycoside compounds .

بحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الأول

المقدمة

تضم المملكة النباتية العديد من الاصناف النباتية والتي تعد مصدرا للكثير من النواتج الطبيعية (Natural Products) ذات التأثير التثبيطي لأنواع مختلفة من الاحياء الدقيقة ، فقد استخدمت عصائرها ومنقوعاتها ومستخلصاتها في معالجة العديد من الامراض المعدية بوصفها مضادات حياتية طبيعية ضد العديد من انواع البكتريا والفطريات (Al-Shamma and Mitscher ,, 1979) اثبتت العديد من الدراسات ان النباتات تحتوي على العديد من المكونات الفعالة التي لها تأثيراً مضاداً على الاحياء المجهرية وان المركبات المعزولة من النباتات تعد من الجزيئات البيولوجية المعقدة المهمة في الوقت نفسه في عمليات العلاج، اذ ان النباتات غنية بالعديد من المركبات الحيوية (Biological Compounds) مثل القلويدات (Alkaloids) و الفينولات (Phenols) و الصابونيات (Saponins) و الزيوت الطيارة (Volatile Oils) و الفلافونويدات (Flavonoids) و الكلايكوسيدات (Glycosides) و العفصيات (Tannins) وغيرها من المركبات والتي لها فعالية مضادة للأحياء المجهرية (Oran and Raies, 2000). ويهدف هذا البحث لإلقاء الضوء على التأثير المثبط لمستخلص بذور العنب التي تستخرج بوفرة كناتج عرضي تالف من جراء تصنيع مختلف عصائر العنب وملاحظة تأثير تراكيز مختلفة من العصير واوقات التعرض لعدد من الانواع البكتيرية المرضية.

المواد وطرائق البحث

1- **العزلات البكتيرية :** تم الحصول على العزلات البكتيرية المختبرة والمشخصة كل من بكتريا *E.coli* و *Staph. aureus* من جامعة الموصل/ كلية العلوم/قسم علوم الحياة, أما عزلة *S. paratyphi* فتم الحصول عليها من جامعة تكريت/كلية التربية للبنات.

2- **تحضير المستخلص المائي لبذور العنب:**تم تحضير المستخلص المائي لبذور العنب حسب طريقة (Riose واخرون, 1987) وذلك بسحق 40غم من البذور النظيفة بواسطة طاحونة كهربائية واضيف الى النموذج النباتي 160مل من الماء المقطر المعقم أي بنسبة 4:1 (وزن : حجم) ثم سحق النموذج باستخدام جهاز الخلاط الكهربائي من نوع (Ultra-Turax blender, Germany) وتركت العينات لمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة 4 ْم لغرض النقع، ثم رشح بواسطة طبقات عدة من الشاش ثم عُرّض الراشح إلى الطرد المركزي بقوة 3000 دورة/دقيقة لمدة 10دقائق (Louriva واخرون 1989 و Channoum , 2000) ، ثم رشحت مرة أخرى باستخدام قمع بخنر (Buchner Funnel وباستخدام ورق ترشيح (WhatmanNo.2) تحت التفريغ باستخدام مضخة تفريغ (Sliding van rotary vacuum pump) والمجهزة من شركة (Vacum Brand GMBH Co., Germany)، وبذلك تم الحصول على المستخلص المائي الخام للبذور، وبعد تجميد المستخلص بالمجمدة جفد بالتجفيد على درجة حرارة – 50 ْم تحت الضغط المخلخل بجهاز (Lypholizer) (GFL, German) وحفظت العينات في عبوات بلاستيكية محكمة الغلق تحت التجميد لحين الاستخدام.

3- **تعقيم المستخلص:**يؤخذ 1غم من المستخلص المجفد ويذاب في 5مل من الماء المقطر المعقم فيكون تركيز المستخلص 200ملغم/مل، بعد ذلك يعقم المستخلص بالترشيح بواسطة مرشحات غشائية (membrane filter) بقطر 0.22 مايكروميتر تحت التفريغ بحيث نحصل على مستخلص معقم، بعد ذلك تحضر التراكيز المطلوبة من هذا المستخلص حسب معادلة التخفيف التالية: $N_1 V_1 = N_2 V_2$ (النعمان، 1998).

4- **الكشف النوعي عن بعض المكونات الفعالة في مستخلص بذور العنب:** تم دراسة الكشف النوعي عن المركبات الفعالة التي يحتمل وجودها في المستخلص المائي لبذور العنب وكما يأتي :-

4–1 الكشف عن التانينات (العفصيات) Tannins : اتبعت الطريقة الواردة في (Newall وآخرون, 1996) أذ دل ظهور اللون الأخضر المزرق على وجود التانينات.

4–2 الكشف عن الراتنجات Resins : اتبعت الطريقة المذكورة في (Newall وآخرون, 1996) وأستدل على وجود المواد الراتنجيه بظهور العكارة (Turbidity).

4–3 الكشف عن الصابونيات Saponins :تم الاستدلال على وجود الصابونيات بإتباع ألطريقة المذكورة في(Newall وآخرون, 1996) وتم الاستدلال على وجود الصابونيات بظهور رغوة كثيفة تبقى لفترة طويلة.

4–4 الكشف عن الفلافونات Flavonoids : تم الكشف عن الفلافونات حسب الطريقة الواردة في(Jaffer وآخرون, 1983) وأستدل من ظهور اللون الأصفر على وجود الفلافونات.

4–5 الكشف عن الفينولات Phenols : أتبعت الطريقة الواردة في (Harborne, 1984) للكشف عن الفينولات وكان ظهور اللون الأخضر المزرق دليلا على وجود المركبات الفينولية.

4–6 الكشف عن الكلايكوسيدات Glycosides : أتبعت الطريقة الواردة في(Newall وآخرون, 1996)اذ إن ظهور الراسب الأحمر كان دليل على وجود الكلايكوسيدات.

4–7 الكشف عن الكومارين Coumarin : أتبعت الطريقة الواردة في (Geissman, 1962) وكان الدليل على وجود الكومارين هو ظهور ورقة الترشيح بلون أصفر– مخضر.

5– اختبار التأثير المثبط لمستخلص بذور العنب على الانواع البكتيرية قيد الدراسة :

تم اختبار تأثير مستخلص بذور العنب بثلاث تراكيز على الأنواع البكتيرية الثلاثة قيد الدراسة واستخدم في هذه التجربة طريقة العد الميكروبي في الطبق وكان حساب المستعمرات الجرثومية على أساس وحدة تكوين المستعمرة (CFU/ml) وكما ذكر في (WHO,1996), واستخدم في هذه التجربة عامل وقت التعرض لمعرفة تأثير ترا كيز المستخلص على البكتريا بمرور الوقت, اذ نشطت الانواع البكتيرية قيد الدراسة على وسط المرق المغذي (Nutrient broth) لمدة 24 ساعة وتم معرفة اعدادها عن طريق اخذ 0.1 مل من المزرعة قبل اضافتها مع المستخلص ووضعت في طبق بتري معقم وفارغ وصب عليه الوسط المغذي (Muller hinton agar) وهو بدرجة حرارة 45°م وحرك الطبق على شكل الرقم الانكليزي (8) لكي يتجانس المزيج ثم تركت الأطباق ليتصلب الوسط ثم وضعت في حاضنة على درجة حرارة 37 °م لمدة 18– 24 ساعة ثم حسب عدد المستعمرات النامية في كل طبق وحسبت أعداد البكتريا الكلي في 1 مل من العينة بضرب عدد المستعمرات في مقلوب التخفيف المستخدم واعتبرت كسيطرة للمقارنة مع اعداد البكتريا المضاف لها مستخلص, , بعد ذلك تم اخذ 1 مل من مستخلص بذور العنب ذو التركيز الاول (50ملغم /مل) وأضيف أليه 1مل من معلق بكتريا *E. coli* ومزجا في انبوبة اختبار ثم تركت الأنبوبة للفترات التالية 40,20 و60 دقيقة وفي نهاية كل فترة تم أخذ0.1 مل من المزيج المحتوي على بكتريا ومستخلص ووضع في طبق بتري معقم وفارغ وصب عليه الوسط المغذي Muller hinton (agar) وهو بدرجة حرارة 45°م وحرك الطبق على شكل الرقم الانكليزي (8) ثم وضعت في حاضنة على درجة حرارة 37 °م لمدة 18– 24 ساعة ثم حسب عدد المستعمرات النامية في كل طبق وحسبت أعداد البكتريا الكلي في 1مل من العينة (Rand وآخرون, 1979).

كذلك عوملت الأنواع البكتيرية الأخرى بنفس المستخلص وبالتراكيز الثلاثة أيضا وبنفس الطريقة.

التحليل الإحصائي :

تم تحليل نتائج التجارب باستخدام طريقة النموذج الخطي العام (General Linear Model) ضمن البرنامج الإحصائي الجاهز (SAS, 2001), كما أجري اختبار دنكن (Duncun, 1955) لتحديد معنوية الفروقات ما بين متوسطات العوامل المؤثرة على الصفات المدروسة عند مستوى احتمالية (P 0.05 >).

النتائج والمناقشة :

بينت نتائج الكشف النوعي للمجاميع الفعالة لمستخلص بذور العنب احتوائه على التانينات والراتنجات والفينولات والفلافونويدات والكلايكوسيدات وعدم احتوائه على الصابونيات والكومارين كما في جدول (1), هذه النتائج تتفق مع ما ذكره كل من: Puupponen-pim et al.2005 , Naz ,et al 2007 and Kriebel et al 2009

جدول (1) المكونات الاساسية لمستخلص بذور العنب

ت	المواد الفعالة	مستخلص بذور العنب
1	التانينات Tannins	+
2	الراتنجات Resins	+
3	الصابونيات Saponins	_
4	الفلافونات Flavonoids	+
5	الفينولات Phenols	+
6	الكلايكوسيدات Glycosides	+
7	الكومارين Coumarin	_

بينت نتائج التحليل الاحيصائي لوجود فروقات معنوية عند مستوى احتمالية (5%) في معدل اعداد الانواع البكتيرية كما في جدول (2) حيث يلاحظ من الجدول ان جميع انواع البكتريا كان حساسة لمستخلص بذور العنب, اذ يتبين من متوسط النسبة المئوية للتخفيض العام بأعداد كل انواع البكتريا لمستخلص بذور العنب كان 77%. , ويلاحظ أيضا من الجدول ان اعلى متوسط للنسبة المئوية للتخفيض بالأعداد كانت مع بكتريا *paratyphi S.* وبلغت 84.7, في حين ان اقل متوسط لنسبة التخفيض بلغ 72.7 مع بكتريا *E.coli*,

جدول (2) تأثير ثلاث تراكيز من مستخلص بذور العنب بأوقات مختلفة على إعداد ثلاثة أنواع من البكتريا

نوع البكتريا	فترة التعرض (دقيقة)	تركيز مستخلص بذور العنب (ملغم/لتر) صفر	50	100	200	متوسط اعداد البكتريا CFU/ml	متوسط الاعداد بالنسبة للوقت	% التخفيض بالأعداد بالنسبة للوقت	متوسط % للتخفيض بالأعداد	متوسط % التخفيض العام للمستخلص بالنسبة للتركيز
Staph.aureus	صفر	24400	24400	24400	24400		-	-	73.7	77
	20	24400	19600	10400	7900		15575 A	67.6		
	40	24400	17850	9400	6400		14512.5 B	73.8		
	60	24400	15200	8500	4960		13265 C	79.7		
	متوسط اعداد البكتريا بالنسبه للتركيز	-	19262.5 a	13175 b	10915 c					
	% التخفيض بالاعداد بالنسبة للتركيز	-	37.7	65.2	79.7					
	متوسط % التخفيض بالاعداد بالنسبة للتركيز	60.8								
S. paratyphi	صفر	16300	16300	16300	16300		-	-	84.7	
	20	16300	11200	5300	3400		9050 A	79.1		
	40	16300	6400	4500	2350		7387.5 B	85.6		
	60	16300	3850	3950	1720		6455 C	89.4		
	متوسط اعداد البكتريا بالنسبه للتركيز	-	9437.5 a	7512.5 b	5942.5 c					
	% التخفيض بالاعداد بالنسبة للتركيز	-	76.4	75.8	89.4					
	متوسط % التخفيض بالاعداد بالنسبة للتركيز	80.5								
E.coli	صفر	7530	7530	7530	7530		-	-	72.7	
	20	7530	6020	2240	2320		4527.5 A	69.2		
	40	7530	1950	1760	2050		3322.5 B	72.8		
	60	7530	1800	1520	1800		3162.5 B	76.1		
	متوسط اعداد البكتريا بالنسبه للتركيز	-	4325 a	3262.5 b	3425 b					
	% التخفيض بالاعداد بالنسبه للتركيز	-	76.1	79.8	76.1					
	متوسط % التخفيض بالاعداد بالنسبة للتركيز	77.3								
	متوسط % التخفيض العام للمستخلص بالنسبة للتركيز	72.9								

- المتوسطات التي لها نفس الحرف في كل عمود لا تختلف معنويا حسب اختبار دنكن عند مستوى احتمالية 5%.

المصادر

annoum, M.A. (2000). Inhibition of *Candida* adhesion to buccal epithelial cells by an aqueous extract of *Trigonella foeumgraecum* (garlic). J. of Applied Bacteriology. 78: 150-160.

Duncun, D. B. (1955). Multiple Range and F. test. Biometric. 11:42.

Geissman, T. A. (1962) . Chemistry of flavonoids compounds . Macmillan Co. , New York.

Harborne, J. B. (1984) . Phytochemical Methods , A guide to modern techniques of plant analysis . 2nd. ed. Chapman and Hail Ltd. , London , New York .

Jaffer, H. J. ; Mahmoud, M. J. ; Jawad, A. M. ; Naji, A. and AL-Naib, A. (1983) . Phytochemical and fitoterapia . LIX , 229 .

Kriebel, B. and Eblen, B.S.(2009). Science Base to support the Antimicrobial action of Raisins. South Bethel Anenue Kingsuburg,Center for Chemical Regulation and Food safety.

Louriva , D,B . ; Lpvenhar, M.; Kamins , R. and Tandeng , H.K . (1989) .Garlic *Allium stivum* the treatment of experiment of crptococcosis . J . Medical and veteringry Mycology , 27 : 253 – 256.

Naida, A.S.; bidlack; W.R. and Crceline ,(2000). hytoantimicrobials in :natural food Antimicrobial System Aidu , A.S .eds, CRC New York, 325-417.

Naz, S.; Siddiqi, R.; Rasool, S.A.and Sayeed, S.A.(2007). Antibacterial activity directed isolation of compounds from punica granatum. J. Food Sci. 72. PpM 341-M344.

Newall, C. A.; Anderson, L. A. and Phillipson, J. D. (1996). Herbal Medicine, Aguid for Health Care Professional, London, The Pharmaceutical Press.

Oran, S.A. and Raies, A. (2000). Antimicrobial activity of *Globular arabica* Jaub and spach *Globular alypum L.* (Globulariaceae). Dirasat. Pure. Sci., 27(1): 71–73.

Perumalla, A.V.S. and Hettiarachchy N. S. (2011) Green tea and grape seed extracts-Potential applications in food safety and quality. Food Research International, 44, Pp: 827–839.

Puupponen-pimia, R.; Nohynek, L.; Alakomi, H. L. and Oksman-Caldentey, K.M. (2005) Bioactive berry compounds-novel tools against human pathogens. Appl. Microbial Biotechnol. 67, Pp: 8-18.

Rand, M.C. ; Greenberg ,Arnold.E. ; Taras, Michael .J., (1979). Standard Methods For Examination Of Water and Wastewater .14th ed , American Public Health Association.

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

Rotava, R.; Zanella, I.; da Silva, L. P.; Manfron, M. P.; Ceron, C. S. (2009). Antibacterial, antioxidant and tanning activity of grape by-product. Ciencia Rural, 39, 941-944.

SAS Version, Statistical Analysis System (2001). SAS Institute Inc., Cary, NC. 27512-8000, U.S.A.

Shoko, T.; Soichi, T.; Megumi, M. M.; Eri, F.; Jun, K.; and Michiko, W. (1999). Isolation and identification of an antibacterial compound from grape and its application to foods. Nippon Nogeikagaku Kaishi, 73, 125-128.

WHO (WorldHealthOrganization) . (1996) .Guide line for drinking water quality. 2th . ed. Vol.2. Health crimteria and other supporting information. Geneva.