الفعالية التثبيطية لمستخلص القرنفل على نمو جراثيم Staphylococcus aureus و Esherichia

علي خضير جابر الركابي

علاء كريم نعيمة الخزاعي

كلية الزراعة / جامعة البصرة

الخلاصة: تم دراسة التركيب الكيميائي للقرنفل كما درس التأثير التثبيطي للمستخلصه الكحولي والمائي للقرنفل على نمو جراثيم Esherichia و Staphylococcus coli بعد خزن المستخلص لاسبوع، أسبوعين، ثلاثة أسابيع وأربعة أسابيع على درجات حرارة (٣٥،٢٠،٤) م^o اختبر المستخلص الماني بعد تنقيته جزئيًا بالديلزة بوزن جزئي لا يقل عن ٥٠٠٠ دالتن على نمو جرثومة S.aureus.

اظهرت النتائج فيما يتعلق بالتركيب الكيميائي أن نسبة البروتين ،الدهن، الرطوبة الرمادة الألياف والكريوهيدرات في نبات القرنفل كانت (٦,٥ . ٨,٤ ٦,٢ ٦٣,١,٧,٣,٦,٤)% على التوالي.

وفيما يخص الفعالية التشبيطية كان المستخلص المائي أكثر تأثيراً من المستخلص الكحولي في تثبيط نمو جراثيم S. aureus و E.coil انخفضت فعالية المستخلص بازدياد درجة حرارة الخزن من ٢٠م^o إلى ٣٠م^o وكذلك بازدياد فترة الخزن ولمدة أربعة أسابيع. أظهرت نتائج الديلزة أن الجزء ذات الوزن الجزئي القليل (أقل من ٥٠٠٠ دالتن) كان أكثر تثبيطاً من الجزء ذات الوزن الجزئي العالي (أكثر من ٥٠٠٠ دالتن) عند اختبارها على جرثومة S. aureus.

مقدمة:

تشكل النباتات في الوقت الحاضر مصدرًا مهمًا للغاية لأكثر من ٥٠% من المركبات الدوائية، إذ برهنت العديد من هذه النباتات على إمكانية استخدامها بشكل خام لامتلاكها فعالية بيولوجية عالية، كما أنها تكون أكثر أمانا من المستحضرات التخليقية (١٠).

يعتبر القرنفل أحد هذه النباتات التي تمتلك الخصائص المميزة وهي البراعم الزهرية الجافة لنبات Eugenia caryopylata الذي يتبع الفصيلة الآسية (Fam. Myrtaccae). موطن القرنفل جزيرة ماليزيا التي تسمى جزيرة القرنفل(Clov Island)، ويقدر إنتاج القرنفل في هذه المنطقة بما يكفي ثلاثة أرباع حاجة العالم منه (٢).

يستعمل القرنفل كتوابل لتحسين الطعم في المأكولات ومن الناحية الطبية يعتبر مسكناً موضعيًا لألام الأسنان، كما يستخدم مطهرًا معوياً (Intestinal antiseptic) وطارداً للغازات (Carminative) (٢)

يحتوي القرنفل على مركب يوجينول (Eugenol) وهو من المركبات الفينولية ذات الفعالية البيولوجية العالية، اضافة لاحتواء القرنفل على المركبين Caryophyllene و Eugenol Acetate ، إلا أن المركبين أقل فعالية بكثير من المركب الأول. هذه المركبات الثلاثة تتواجه في زيت القرنفل الذي يتكون من (١٤-٢١)% من نبات القرنفل (٨).

وقد اشارت بعض البحوث أن لزيت القرنفل فعالية تثبيطية على نمو جرثومة Pseudomonas aeruginos، ولاحظ زيادة هذه الفعالية بزيادة درجة حرارة الحضن من (٢١-٣٧) م^{o} بينما لاحظ (٨) أن لهذا الزيت تثبيط سريع على الفطريات Penicillium citrinum, Candida albicans

Trichophyton mentagrophytes, Aspergillus niger بزيادة تركيز زيت القرنفل في الوسط الغذائي (٣)

نظرا للأهمية الكبيرة لنبات القرنفل من ناحية قدرته على تثبيط الأحياء المجهرية، فقد استهدفت هذه الدراسة التعرف على قدرة مستخلص القرنفل الكحولي والمائي على تثبيط نمو جراثيم Esherichia coli و Staphylococus aureus.

المواد وطرائق العمل:

١-**نبات القرنفل** : تم الحصول على نبات القرنفل من الأسواق المحلية لمدينة البصرة سحق وطحن القرنفل بعد إزالة الشوائب منه.

٢-**تقدير المحتوى الكيميائي:** قدر محتوى القرنفل من البروتين. الرطوبة، الدهن الرماد الألياف والكاربوهيدرات وفقاً للطرق المذكورة في (٤).

٣-**العزلات الجرثومية** : تم الحصول على عزلات جراتيم من قسم علوم Esherichia coli, Staphylococcus aureusالأغذية والتقانات الإحيائية و المعزولة من لحوم الدواجن المستحصل عليها من الأسواق المحلية لمدينة البصرة. أستخدم تصبيغ كرام للتفريق بين الجراثيم السالبة والموجبة ، وأكمل التشخيص بالاعتماد على بعض الاختبارات الكيميو حيوية في كلية العلوم – قسم علوم الحياة جامعة البصرة استنادا لما ذكره (٦)

٤- **تحضير مستخلص القرنفل** : حضر المستخلص المائي للقرنفل حسب طريقة (١١) خلط ٥٠ غم من القرنفل المحضر سابقا مع ٥٠٠ مل ماء مقطر . وضع الخليط على محرك مغناطيس بدرجة ٢٥ م لمدة ١٨

ساعة، وحضر المستخلص الكحولي بنفس الطريقة أعلاه باستثناء استبدال الماء المقطر بكحول الايثانول وتركيزه ٩٩% وبمقدار ٥٠٠ مل بعدها رسب المزيج باستعمال جهاز الطرد المركزي بسرعة ٣٠٠٠ دورة / دقيقة ولمدة ١٥ دقيقة، ثم جمع الراشح وجفد بجهاز التجفيد (Freeze – dryer).

٥-تحضير تراكيز المستخلصين: حضرت عشرة تراكيز من كل من المستخلصين الكحولي والمائي المجفدين (٠,٥ ، ١,٠ ، ١,٥ ، ٢,٠ ، ٢,٥ ، ٣,٠. ٣,٥، ٤,٠، ٤,٥ ، ٥,٠) ملغم / مل .

٦- تقدير التركيز التثبيطي الأدنى ((Concentration Minimum Inhibitory). MIC: قدر التركيز التثبيطي الأدنى حسب طريقة ..(١١) و كما يلي : حضر الوسط الغذائي Nutrient agar وبرد لدرجة ٥٠ م وأضيف إليه التراكيز المختلفة من المستخلص بحيث يحتوي كل طبق زرعي ٢٠ مل من الوسط الغذائي مع تراكيز المستخلص . تركت الأطباق بدرجة حرارة الغرفة للتصلب / بعدها نقل (٣-٢) مستعمرة من الجراثيم النامية على الوسط الغذائي Nutrient agar بوساطة الناقل الحلقي (loop) إلى انبوبة اختبار تحتوي على الوسط الغذائي Nutrient brother وحضنت بدرجة حرارة ٣٥م لمدة ١٨ ساعة، بعدها خفف النمو بنسبة ٥١ في الوسط الغذائي المعقم Nutrient broth وحضن بدرجة ٣٥ لمدة (٤) ساعات تقريباً . بحيث يكون عدد خلايا البكتريا ١٠٦ الى ١,١×١٠ cfu/ مل. بعدها لقحت الأطباق الحاوية على الوسط الغذائي مع المستخلص وكدلك لفحت اطباق السيطرة التى لا تحتوى على المستخلص بواسطة ماصة دقيقة بحجم ١٠ ميكروليتر من المعلق الزرعي المخفف وعلى

شكل بقع على سطح الوسط الغذائي. احضن الاطباق بدرجة حرارة ٣٥ درجة مئوية لمدة ٢٠ ساعة بعد ذلك حدد تركيز التثبيط الأدنى وهو عبارة عن أقل تركيز من المستخلص الذي يحفز نمو البكتيريا.

٧-**خزن المستخلصات:** خزن المستخلصات المحضرة بعد تخفيفها إلى عشرة درجات حرارية (٤ ، ٢٠ ، ٣٥) م ولا ربع مدة (١، ٢ ، ٣ ، ٤) أسابيع. بعد ذلك، قدر (MIC) لهذه المستخلصات

٨-**تجزئة المستخلص:** جزء المستخلص المائي بتقنية الديلزة. قطر الأسطوانة الجافة باستخدام أكياس ديلزة (نوع) غسيل الكلى (٢٥,٥ مم) إلى جزأين، الجزء غير المديلز ويمثل المركبات ذات الوزن الجزيئي العالي أكبر من ٥٠٠٠ (دالتن والجزء المديلز ويمثل المركبات ذات الوزن الجزيئي أقل قليلاً من ٥٠٠٠ دالتن جفد الجزأين المديلز غير المديلز (بعد فترات الديلزة) في جهاز التجفيد.

حضرت التراكيز(١,٢٥ ، ٠,١٠٠ ، ٠,٧٥ ، ٠,٠٥ ، ٠,٢٥، ١,٥٠ ، ١,٧٥ ، ٢,٠٠ ، ٢,٢٥ ، ٢,٥٠) ملغم / مل من الجزء غير المديلز والمديلز.

٩-**التحليل الإحصائي:** أجري التحليل الإحصائي حسب الطريقة التي ذكرها (١) وقورنت النتائج باستخدام طريقة أقل فرقًا معنويًا.

النتائج والمناقشة:

أولا: تقدير المحتوى الكيميائي: يوضح الجدول (١) النسبة المئوية للبروتين، الدهن، الرطوبة، الأقمشة، الألياف والكاربوهيدرات في نبات القرنفل. انظر من جدول ارتفاع النسبة المئوية للدهن، وهكذا النسبة لها

علاقة كبيرة بالفعل التثبيطي لهذا النبات، وذلك لكون هذا الدهن عبارة عن الزيوت العطرية الطيارة تحتوي على المركبات الفينولية ذات الفعالية البيولوجية أهمها الايوجينول (Eugenol).

الجدول (١) المحتوى الكيميائي لنبات القرنفل *

المكونات	الرطوبة	البروتين	الدهن	الرماد	ألالياف	الكاربوهيدرات
النسبة المئوية	٦,٢	٦,٥	٨,٤	٦,٤	٧,٣	٦٣,١

*النتائج في الجدول تمثل المعدل لمكررين .

ثانيًا: تقدير الفعالية التثبيطية: يبين الجدولين (٢،٣) الفعالية التثبيطية للمستخلص الكحولي والمائي للقرنفل بعد الاستخلاص وبعد فترات خزنية ولدرجات حرارية مختلفة على جرثومة Staphylococcus aureus (الجدول ٢) وجرثومة Eshrichia Coil (الجدول ٣) يلاحظ من الجدولين تفوق الفعالية التثبيطية للمستخلص الكحولي مقارنة بالمستخلص الكحولي، وهذا قد يرجع إلى أن الفعالية التثبيطية تتمثل بالمركب الفينولي الايوجينول (Eugenol) وهو مركب ضعيف الحامضية، لذلك فإنه أكثر ذائبية في المذيبات القطبية فيذوب في الطور المائي. إضافة لذلك يحتوي القرنفل على التانينات (Tannins) بنسبة (١٠–١٣) وهذه المواد لها قدرتها على التواجد في الطور المائي. أما المركبات الفينولية مثل eugenol acetate و caryophyllene وهي مركبات متعادلة والتي تتواجد في المستخلص الكحولي، وهي مواد ذات فعالية تثبيطية واطئة مقارنة بالايوجينول (٨). ان فعالية الايوجينول تعود لاحتواءه على مجموعة الهيدروكسيل ذات الفعالية الجيدة في تشكيل الأواصر الهيدروجينية من تحديد المواقع الفعالة للأنزيمات الميكروبية وتثبيط عملها

(5)

لوحظ احصائياً وجود فروق معنوية (عند مستوى ٥%) بين الفعالية التثبيطية للمستخلص الكحولي والمائي، وعدم وجود فروق معنوية في الفعالية التثبيطية للمستخلص على جراثيم S.aureus و E Coil.

يلاحظ من الجدولين (٢ و٣) حدوث تغير طفيف في فعالية المستخلصين عند الخزن بدرجة٤م ولفترات زمنية مختلفة، في حين حصل انخفاض واضح في فعالية المستخلصين عند درجتي الحرارة ٢٠م^{o} و٣٥م^{o}، ولفترات زمنية مختلفة ، سبب هذا الانخفاض يرجع الى حصول تحولات كيميائية على المستخلص وخصوصاً على المادة الفعالة بارتفاع درجة الحرارة (٩) . ولوحظ اخصائياً وجود فروق معنوية بين المستخلص المخزون بدرجة ٤م من جهة والمخزن بدرجتي ٢٠م^{o} و٣٥م^{o}.

الجدول (٢) الفعالية التثبيطية للمستخلص الكحولي والمائي للقرنفل معبراً عنها بالتركيز التثبيطي* الأدنى (ملغم/مل) على بكتريا Staphylococcus aureus

درجة الخزن / فترة الخزن	٤م^{o}a		٢٠م^{o}b		٣٥م^{o}b
	المستخلص الكحولي	المستخلص المائي	المستخلص الكحولي	المستخلص المائي	المستخلص الكحولي
بعد الاستخلاص	٢,٥	١,٥	٢,٥	١,٥	٢,٥
أسبوع	٢,٥	١,٥	٣,٠	٢,٥	٤,٥
أسبوعين	٣,٠	١,٥	٣,٥	٢,٥	٥,٠
ثلاثة أسابيع	٣,٠	٢,٠	٣,٥	٣,٠	–
أربعة أسابيع	٣,٠	٢,٠	٤,٥	٤,٠	–

*النتائج في الجدول تمثل المعدل لمكررين

**الإشارة (–) تعني عدم ظهور فعالية تثبيطية لحد تركيز (٥,٠ ملغم/مل) .

الجدول (٣) الفعالية التثبيطية للمستخلص الكحولي والمائي للقرنفل معبراً عنها بالتركيز * التثبيطي الأدنى (ملغم/مل) على البكتريا Esherichia coli

درجة الخزن / فترة الخزن	٤م^{o} a		٢٠م^{o} b		٣٥م^{o} b
	المستخلص الكحولي	المستخلص المائي	المستخلص الكحولي	المستخلص المائي	المستخلص الكحولي
بعد الاستخلاص	٢,٠	١,٥	٢,٠	١,٥	٢,٥
أسبوع	٢,٥	١,٥	٣,٠	٣,٠	٤,٠
أسبوعين	٢,٥	٢,٠	٤,٠	٣,٠	٥,٠
ثلاثة أسابيع	٢,٥	٢,٠	٥,٠	٣,٥	–
أربعة أسابيع	٣,٠	٢,٠	–	–	–

*الأشار (-) تعني عدم وجود فعالية تثبيطية .
** النتائج في الجدول تمثل المعدل المكررين.

ثالثاً: الفعالية التثبيطية للمستخلص المائي المجزأ: يوضح الجدول (٤) الفعالية التثبيطية للمستخلص المائي بعد تجزئته بطريقة الديلزة ولفترات زمنية مختلفة، إذ يلاحظ تفوق الفعالية التثبيطية (معبرا عنها بالتركيز التشبيطي الأدنى) للجزء المديلز ذي الجزء الوزني الأقل من ٥٠٠٠ دالتن على الجزء غير المديلز ذي الوزن الجزيئي الأكبر من ٥٠٠٠ دالتن كما يلاحظ من الجدول أن الفعالية التثبيطية قد ازدادت بشكل واضح لحد ٤٨ ساعة ديلزة، بعدها أصبحت الزيادة طفيفة جدا، وهذا يدل على ان عملية الديلزة خلال ٤٨ ساعة للمستخلص المائي كافية للحصول على مستخلص ذي فعالية تثبيطية عالية ومثالية مقارنة بالمستخلص الأصلي. ترجع زيادة الفعالية التثبيطية عند أجراء طريقة الديلزة إلى احتجاز المركبات ذات الفعالية البيولوجية في الجزء غير المديلز وزيادة تركيزها في هذا الجزء مقارنة بالجزء المدينز ، إذ تتصف هذه المركبات بأنها ذات أوزان جزيئية واطئة (٧)، نتيجة لذلك لم يظهر الجزء المديلز أية فعالية تثبيطية عند التراكيز المستخدمة (٠,٢٥-٢,٥٠) ملغم / مل

الجدول (٤) الفعالية التثبيطية للمستخلص المائي المجزأ بطريقة الديلزة معبراً عنها بالتركيز التثبيطي الأدنى (ملغم/مل) على بكترياStaphylococcus aureus

فترة الديلزة / الجزء	٢٤	٤٨	٧٢	٩٦
غير الديلزة	٠,٧٥	٠,٥٠	٠,٥٠	٠,٥٠
المديلز *		–	–	–

إشارة (–) تعني عدم ظهور فعالية تثبيطية عند التراكيز المستخدمة.

المصادر:

١-الراوي، خاشع محمود وخلف الله عبد العزيز (٢٠٠٠). تصميم وتحليل التجارب.

٢-الزراعية، دار الكتب للطباعة والنشر، وزارة التعليم العالي، جامعة الموصل.

٣- حسين فوزي طه قطب. (١٩٨٠) نباتات طبيعية زراعتها ومكوناتها الدار العربية للنشر، مصر، القاهرة.

4- Briozzo, J.; Nunez, L.; Chirife, J.; Herszage, L.; Daquino, M. (1998).

5- Antimicrobial activity of clove oil dispersed in a concentrated sugar solution. J. Appl. Bacteriol., 76: 69-77.

6- Egan, H.; Kirk, R. S. and Sawyer, R. (1988). Pearson's Chemical analysis of food. 8th ed. Longman Scientific and Technical. pp. (25-35).

7- Farag, R. S.; Daw, Z. Y.; Hewed: F. M. and El-Baraty, G. S. (1989).

8- Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. J. Food protection, 52: 665-667

9-Holt, J. G.; Krieg, N. R.; Sneath, P. H. A.; Staley; J. T. and Williams, T. (eds.). (1994). Bergey's manual of

Determinative Bacteriology, 9th ed., William and Wilkins Company, Baltimore, U.S.A., pp. 293-483.

10. Maurice, M. I.; Angela, R. D. and Okunji, O. (1999).

New Antimicrobial of Plant Origin. J. Janick, ASHS Press, Alexandria, VA.

11. Nunez, L.; Doquino, M. and Chirife, J. (2001).

Antifungal properties of clove oil in sugar solution.

Brazilian J. Microbial., 32: 123-126.

12. Silva, O.; Duorte A.; and Dimentel, M. (1996).

Antimicrobial activity of Guinea Southern Burkina Faso.

International J. Food Sci. Nutr. 47: 41-53

Trivedi, N.A. and Hotchandoni, S.C. (2004).

13-Study of the antimicrobial activity of Eucalyptus oil. Indian J. Pharmacal., 36 (2): 93-95.

14-Twaij, A., Angela, R., and Silva, O. (1983). Some pharmacological, toxicological, and phytochemical investigations on centaure phylocephala.

J. Ehuopharmacol., 9: 47-55

Inhibitor Effect of Clove Extract (Eugenia caryophiata) on Staphylococcus aureus and Esherichia coil

Ali K. Al-Rikaby

Alaa K. AL-Kzaae

College of Agriculture – University of Basrah

Summary:

The chemical composition of clove (Eugenia caryophylata) was determined, and the inhibitory effect of aqueous and alcoholic extracts on the growth of Staphylococcus aureus and Esherichia coil after extraction was studied for one, two, three, and four weeks at 4, 20, and 35 °C storage. Aqueous extract was tested and partially purified by dialysis with a molecular weight cutoff at 5000 Dalton.

Results showed that protein, fat, moisture, ash, fiber, and carbohydrate were (6.5, 8.4, 6.2, 6.4, 7.3, and 63.1)%, respectively

The inhibitory effect of the aqueous extract was higher than the alcoholic extract on S. aureus and E. coli. The activity of the extracts decreased with the increase in temperature (20-35°C) and the duration of storage of four weeks. The results of the dialysis showed that the low molecular weight fraction (Mr. < 5000) was more inhibitory than the high molecular weight fraction (Mr. > 5000) when tested with S. aureus