مجلة العلوم البحثة والتطبيقية
Journal of Pure & Applied Sciences
www.Suj.sebhau.edu.ly ISSN 2521-9200
Received 02/03/2019 Revised 20/04/2019 Published online 01/05/2019

دراسة تأثير المستخلصات الكحولية لقشرة ثمار الرمان (*Punica granatum*)علي البكتيريا *Streptococcus pyogenes* و *Staphylococcus aureus*

صالحة عيسى محمد [1] و *عبدالهادي علي البصير[2]
قسم النبات – كلية العلوم – جامعة سبها، ليبيا
قسم الأحياء الدقيقة – كلية العلوم – جامعة سبها، ليبيا
*للمراسلة: abd.albaser@sebhau.edu.ly

الملخص الغرض من هذه الدراسة هو معرفة تأثير المستخلصات الكحولية لقشور ثمار الرمان علي نوعين من البكتيريا المسببة لالتهاب اللوزتين *Staphylococcus aureus* و *Streptococcus pyogenes* المعزولتان من طلبة مدارس منطقة المنشية بمدينة سبها جنوب ليبيا ومقارنة تأثيرها مع تأثير المضادات الحيويةالتجارية. حُضِرت المستخلصات باستخدام ثلاثة أنواع من المذيبات العضوية (الكلوروفورم، الهكسان والميثانول) حيث استخدمت أربعة تراكيز لكل مستخلص (25%–50%–75%–100%). أظهرت النتائج مقاومة بكتيريا *Staphylococcus aureus* لستة أنواع من المضادات الحيوية المختبرة وخاصةً المضاد الحيوي الميثيسيلين الأمر الذي يشير بأن هذه العزلة MRSA، في حين ان بكتيريا *Streptococcus pyogenes* كانت حساسة لجميع المضادات المستخدمة في هذه الدراسة،كما بيّنت النتائج الفعالية التثبيطية للمستخلصات،حيث أظهرت النتائج أن لمستخلصات (الكلوروفورم، الميثانول)تأثير تثبيطي عالي ضد البكتيريا المختبرة فاق تأثير المضادات الحيوية خاصةً ضد MRSA التي توصي منظمة الصحة العالمية بإيجاد مضادات حيوية جديدة لهذه البكتيريا، في حين لم تبيّن النتائج أي تأثير لمستخلص الهكسان على هذه البكتيريا. تضمنت الدراسة أيضاً الكشف عن المجاميع الفعالة الموجودة في قشور الرمان.

الكلمات المفتاحية: التهاب اللوزتين، المضاد الحيوية، تأثير القاتل، قشور الرمان.

Study of the Effect of Alcoholic Extracts of Pomegranate peels (Punicagranatum) on Staphylococcus aureus and Streptococcus pyogenes

Salihah Eisay Mohammed[1] & *Abdulhadi Ali Albaser[2]
Department of plant sciences, faculty of sciences, sebha university, Libya
Department of Microbiology, faculty of sciences, Sebha university, Libya
*Corresponding author: abd.albaser@sebhau.edu.ly

Abstract The purpose of this study is to know the effect of alcohol extracts of pomegranate fruits on two types of bacteria causing tonsillitis (*Staphylococcus aureus&Streptococcus pyogenes*) and compare their effect with the effect of commercial antibiotics. The extracts were obtained using three types of organic solvents (chloroform, hexane and methanol). Four concentrations were tested of each extract (25% -50% -75% -100%). *Staphylococcus aureus* was shown to be resistant to six tested antibiotics, particularly methyciline, indicating that this isolate was MRSA. *Streptococcus pyogenes* were sensitive to all antibiotics used in this study. The results showed the inhibitory efficacy of the extracts. (Chloroform, methanol) has a high inhibitory effect against the tested bacteria, which outweighs the effect of antibiotics especially against MRSA, which the WHO recommends to find new antibiotics for these bacteria, while the results did not show any effect of the hexane extract on These bacteria. The study also included the detection of active groups found in pomegranate husks.

Keyword: Tonsillitis, antibiotic, killer effect, pomegranate peels.

المقدمة

ينتج التهاب اللوزتين Tonsillitis نتيجة تفاعل الأنسجة اللمفاوية للوزتين مع العوامل المسببة للالتهاباتكالبكتيريا مثل المكورات المسبحية القيحية *Streptococcus pyogenes* والتي تعرف بأنها المسبب الرئيسي لاخماج اللوزتين البكتيري[1] ،أيضا نتيجة مسببات بكتيرية أخرى مثل *Staphylococcus aureus*،ان للمستحضرات الطبية دورهام في القضاء علي الإخماد إلا انها تُحدث أثاراً جانبية مختلفة، اكتسبت العديد من الميكروبات مقاومة ضد طيف واسع من هذه المستحضرات وهذا مادفع الباحثين للاهتمام بمستخلصات النبات الطبية لاحتوائها على مواد طبيعية فعالة والتي يمكن ان تعزّز من الصحة أو تخفف من المرض لفعاليتها في تثبيط نمو الاحياء المجهرية ،ومنها قشور الرمان الذي يتمتع بفعالية كبيرة في

التأثير على العديد من الأمراض مثل تقرحات الفم والالتهابات البلعومية وفي حالات الاسهال [2]تحتوي قشور الرمان على الكلايكوسيدات والفينولات والراتنجات والصابونيات والكومارينات والفلافونويدات والقلويدات والتانينات [3, 4]

نبات الرمان

تعمر شجرة الرمان حوالي 50 عاما ،يصل ارتفاعها الي 6 امتار لها اغصان متفرعة غالباماتكون حاملة للأشواك *لها زهور جذابة صغيرة لامعة رمحية الشكل .كما تتميز ثمارها المعروفة بتيجانها الكأسية وتتراوح ألوانها من الأصفر الي الأحمر الغامق* ، الثمرة كروية تحمل تاجا،قشرة الثمرة جلدية القوام *تحتوي الثمرة علي العديد من البذور المحاطة بحويصلات العصير المتعددة الاضلاع والمرصوصة بتداخل عجيب*،[5]

الاسم العلمي:*Punicegranat*

الفصيلة: الرمانية: *Punicoceae*

الأجزاء الطبية: قشرة الثمرة ، الثمرة

المواد وطرق العمل

تمّ الحصول على قشور ثمار نبات الرمان المجففةمن الأسواق المحلية بمدينة سبها، طُحِنت هذه القشور ثمحُفظت إلى حين الإستخدام.

تحضير المستخلصات

أضيف مسحوق قشور الرمان (20 جرام)إلى المذيب العضوي (450 ملي) الميثانول والكلوروفورم والهكسان بتركيز 95% كل منها على حده، ووضعت في أنابيب زجاجية معتمة محكمة الغلق ثم حفظت في درجة حرارة الغرفة لمدة 6 أيام مع الرج 3-2 مرات يوميا لمدة 30 دقيقة، رُشِح بعدها المزيج باستخدام ورق الترشيح wattman paperرقم (1) والصوف الزجاجي وذلك للحصول على مستخلص خالي من الرواسب،ثم بُخّر المستخلص بواسطة المبخر الدوار rotary evaporator عند ضغط متخلخل ودرجة حرارة 65°م بالنسبة للميتانول أما الكلوروفورم عند 61°م وأخيراً الهكسان عند 69°م.إستخدم أربعة تراكيز من كل مستخلص (25-50-75-100%)،ونُقلت إلى أنابيب زجاجية معقمة معتمة محكمة[6]

الكشف عن المجاميع الفعالة

تمّ الكشف عن المواد الفعالة بغستخدام جهاز الاشعة تحت الحمراء IR spectraفي قرص بروميد البوتاسيوم.

عزل وتعريف السلالات الميكروبية

عُزِلت السلالات الميكروبية من طلبة ثلاث مدارس من منطقة المنشية بمدينة سبها جنوب ليبيا، حيث أخذت مسحات بواسطة الماسح القطني المعقم من طلبة تظهر عليهم أعراض الإلتهابات، نُقِلت بعدها المسحات المعزولة إلى المعمل ثم نُمِيت على الوسط الغذائية التالية Nutrient agar, Macconky agar, Blood agar, Mueller Hinton agar, Mannitol salt agar ثم حُضِنت على درجة حرارة 37°م لمدة24ساعة.

اختبارات التعريف

أُجري على البكتيريا النامية بعض الإختبارات المورفولوجية والبيوكيميائيةوالتي شملت الصفات المظهرية morphology colonies وذلك بناءً علي خصائص مستعمراتها characteristics coloniesووصفها على الاوساط الانتقائية الشائعةselective medium ،والفحص المجهري microscopic examination باستخدام صبغة غرام.مستعمرات المكورات العنقودية الذهبية *S.aureus* تظهربلون رمادي علي وسط اجار الدم،أما على وسط المانيثول الملحي فتكون صفراء ذهبية نتيجة تخميرها لسكر المانيتول، اما *Streptococcus pyogenes* فتظهر مستعمراتها كروية الي بيضاوية موجبة لصبغة جرام علي شكل سلاسل مختلفة في الطول وتظهر باللون الابيض علي Blood agarوتتميز بقدرتها علي تحليل كريات الدم تحليل كامل (8) والإختبارات الكيموحيوية Biochemical test، كما اختبرت البكتيريا في مقدرتها على إفراز إنزيمات الكتاليز والاوكسيديز و اليوريز وانزيم التجلط ،الاندول، وإختبار تخمر السكريات [9،21].

تقييم التأثير المضاد للمستخلصات

استخدمت طريقة الانتشار في الحفر بالغراء agar well-diffusion method كالاتي :

حُضِر المُعلّق البكتيري بنفس درجة عكورة ثابت العكارة القياسي (0.5) لعزلات بكتيريا *s.aureus,str.pyogenes*، حيث نقلت مستعمرة بواسطة أبرة ذات العقدة وعُلقتفي ماء مقطر معقم(5 ملي) ورجت بvortex حتى تكونت عكارة ،وقورنت العكارة التكونة بالأنبوبة بمؤشر ماك فولاند mafarland. وتحت ظروف التعقيم أخذ بماسح قطني معقم من كل معلق بكتيري (يحتوي تقريبا علي 10 خلية بكتيرية / مل)وفردت علي الاطباق البترية المحتوية علي الوسط المغذي Mueller Hinton agar ،والمحضرة حسب وصف الشركة المصنعة وتركت لمدة 5 دقائق في درجة حرارة الغرفة لكي يحصل التشرب.ا ستخدم الثاقب فليني borer cork(4mm) في عمل حفر(holes) صغيرةوبمسافات متباعدة وبواقع أربعة حفر في كل طبق في الوسط المغذي الصلب والمُلّقح سابقاً بالبكتيريا ،عبئت الحفر بمحلول المستخلص (200 µl) حسب

التراكيز المختبرة ،استخدم الماء المقطر المعقم كشاهد (Control).

حضنت بعدها الأطباق على درجة (37 °م لمدة 24 ساعة)،ظهور منطقة خالية من النمو البكتيري inhibition zone حول الحفر المحتوية علي المستخلص اعتبرت دليل علي تأثير المستخلص على البكتيريا المختبرة، أما عدم ظهور مثل هذه المنطقةفاعتبرت النتيجة سلبية. حجم وعرض منطقة التثبيط يختلف حسب درجة حساسية الميكروب ،بدأ من منطقة تثبيط أوسع في حال التأثير مثبط أو قاتل ، الي منطقة تثبيط ضيقة اوغير موجودة في حال المقاومة ،هذا وتم أخذ المتوسط لثلاث تكرارات [9،10].

فحص حساسية الميكروبات للمضادات الحيوية

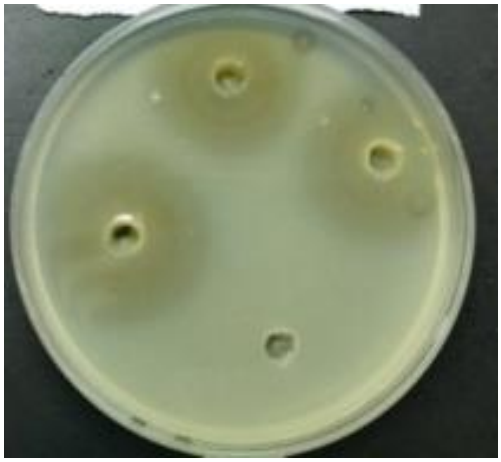
استخدمت طريقة (disc diffusion method)، حيث وُضِعت أقراص المضادات الحيوية جدول رقم (1) علي سطح الوسط الغذائي الصلب وذلك بعد تلقيحه بالبكتيريا ،حُضنت الأطباق لمدة 24ساعة في درجة حرارة 37 درجة مئوية وتم قياس أقطار مناطق التثبيط بعد انتهاء فترة التحضين [11،12].

جدول (1): المضادات الحيوية المستخدمة في الاختبار

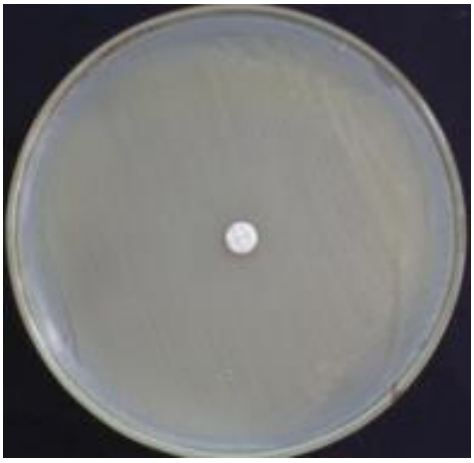
المضاد الحيوي المختبر
Methicillin
Tetracycline
Chloramphenicol
Gentamicin
Cephalexin
Sulphamethoxazole
Oxacillin
Erythromycin
Ampiciilin
Neomycin

النتائج والمناقشة

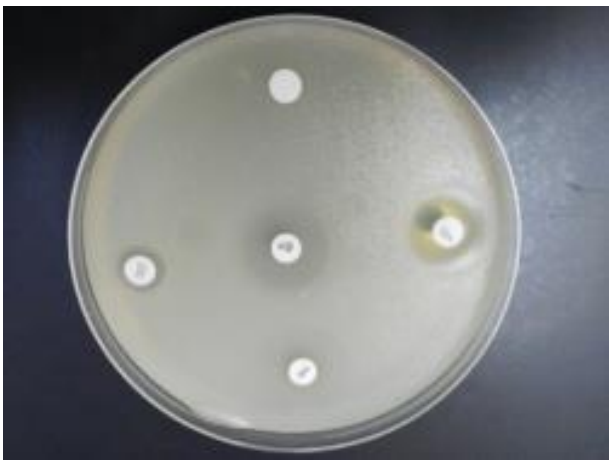
اظهرت نتائج الكشف عن المجاميع الفعالة في النبات و كانت الامتصاصات ما بين 1024 الي 3882سملوحظ ظهور امتصاصات عند مناطق 3882-3814، 3691، 3296، 2924، 1610 ، 1326 و 1024سم[7] هو دليل وجود المجموعات الوظيفية(Functional groups).بيّن الفحص المجهري انها موجبة لصبغة جرام كروية في شكل عناقيد،وعندتنميتها علي وسط Mannitol sat agar فظهرت باللون الذهبي، وبلون أبيض رماديعلي وسطBlood agar، موجبة لاختباراتالكتاليز،اختبار انزيم التجلط واليوريز، تخمر سكر اللاكتوز،سالبة لإختبارات الاوكسيديز والاندول،وهذا دليل على أنهاStaphylococcsaureusاماالبكتيريا الأخرى فبين الفحص المجهري على أنهاموجبة لصبغة جرام، كروية الي بيضاوية في سلاسل، ولن مستعمراتها بيضاء اللونعند تنميتها علىالوسط الغذائيBlood agarسالبة لاختباراتالكتاليز، الاوكسيديز وايضا سالبة لانزيمي التجلطواليوريز،وهذا يشير على أن انهاStreptococci pyogenes.أظهرت النتائج المتحصل عليها في هذه الدراسةأنللمستخلصات الثلاثة المختبرة فعالية مضادة للميكروبات المعزولة في هذه الدراسة. أظهرت النتائج تباين واضح لعامل التركيز والمذيب المستخدم في التأثير علي نمو البكتيريا حيت بلغ اقصي حد تأثير عند كل التراكيز من مستخلصالميثانول شكل(1) فقد كان له تأثير واضح علىنمو السلالاتين المختبرتين بالاخص *Staphylococcus aureus* هذه السلالة المعزولة أظهرت مقاومة للمضاد الحيوي الميثسيلين شكل (2) وبعض المضادات حيوية الأخري شكل (3)،



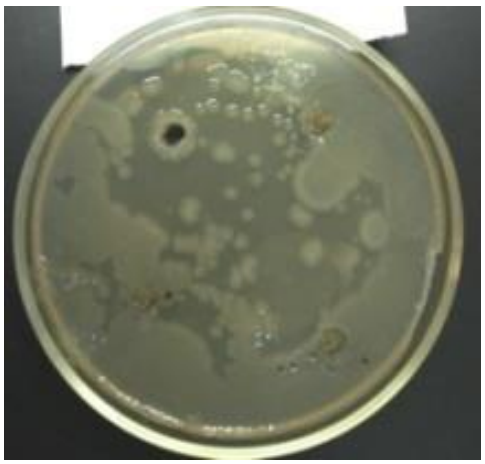
شكل (1) الرمان بالميثانول



شكل(2)الميثاسلين



شكل(3) مضادات الحيوية



شكل (5) الرمان بالهكسان

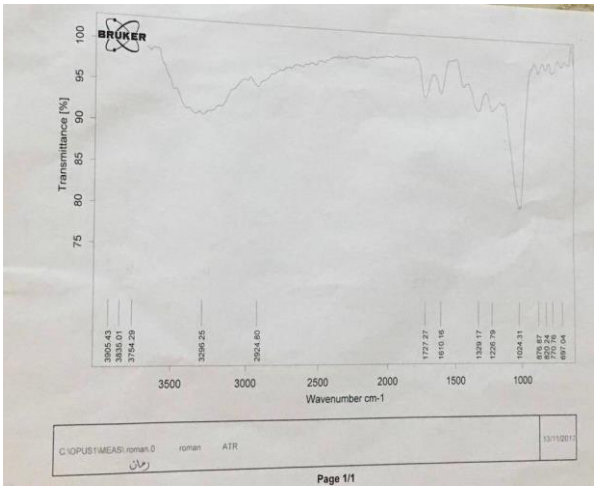
مما يشير على أنها MRSA(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) بالمقابل فكانت حساسة لمستخلص قشور الرمان بالكحول الميثيلي (الميثانول) شكل (1) وهذا يدل على أن هذا المستخلص ذو كفاءة عالية على هذا النوع من البكتيريا التي تشجع منظمة الصحة العالمية على البحث وإيجاد مضادات حيوية لهذه البكتيريا [22]إليه مستخلص قشورالرمان بالكلوروفورم،

شكل (4).*Stereptococcapyogenes*.عند التحضينوهذه النتيجة مطابقة لما توصلاليه (رشيد قيثار،2002)،[13] **الرمان بالكلوروفورم (4)**

علي السلالتين في حين ظهر نمو كثيف،وانعدم التأثير في كل التراكيز لمستخلص الهكسان،

هذا يدل دلالة واضحة علي ان قشور الرمان عند التراكيز العالية وبمذيبات مختلفة القطبية يكون لها تأثير عالي في منع نمو البكيريا المختبرة في حين تنخفض هذهالفعالية باختلاف التركيز والمذيب المستخدم في عملية الإستخلاص وربما يرجع السبب في ذلك إلي وجود المواد الفعالة والمضادة والقابضة التي تعمل علي تثبيط النمو ويتفق هذا مع ماجاء به (مالك صباح حبيب 2002)،وايضا ماذكره (حميد شهباء ،محمد أمنة) [14]. ويتفق ايضا مع (jeeju2004)[15] واتفق ايضا مع (madan2009) [16]. إن زيادة فعالية المستخلص قد تعود ايضا الي تأثير المستخلص علي عمل احد وظائف الخلية الميكروبية مما سبب في منع عملية الانقسام والتكاثر واحداث اختلال في نفاذية الأغشية السيتوبلازمية وتثبيط تصنيع البروتين داخل الخلية وتثبيط الفعالية الأنزيمية وحركة الجراثيم ،حيت ان هذه الألية مشابهة لألية عمل المضادات الحيوية ،فقشور الرمان هي احد العلاجات الطبيعية لاحتوائها علي مادة قابضة taninicasid حمض العفصلذا يستخدم مسحوق القشور المجففة كمضاد جيد للأسهال والزحار (الدوسنتاريا)،وكمرقيء للنزوف الهضمية ،ويستعمل مغلي القشور كطارد للديدان وخاصة الدودة الوحيدة لاحتوائه علي مادة البلليترين ،أوضح الكشف الكيميائي للمركاات الفعالّة في النبات احتوائه علي الجلايكوسيدات والفلافونيدات والفينولات والراتنجات والقلويدات والتانينات والصابونيات اضافة الي احتوائه علي بعض المعادن مثل الفسفور والبوتاسيوم والكالسيوم والمنجنيز والحديد والاسترات الدوائية التي لها فعالية تثبيطية علي الجراتيم الموجبة والسالبة[17]كما انه ذو مخزون مثالي من المواد الفعالة والاحماض الامينية والعضوية وتحدد كمية المادة الفعالة في

النباتات الطبية والعلاجية كفاءة هذه الثمار في كبح الاحياء المجهريه، [19,1 8]



شكل(6) يمثل ترددات الاشعة تحت الحمراء للمجاميع الفعالة لقشور الرمان بتقنية (FTIR)

وفيما يخص مقاومة الميكروبات للمضادات الحيوية فقد بينت النتائج ان سلالة *Staphyloococcai,aureus* كانت أكثر حساسية للمضادات Gentamicilin,cephalexin,Erthromiciln,chloramphe nicol, اما السلالة البكتيرية *sterptococcai,pyogenes* فقد اشتركت معها بنفس الحساسية للمضادات اضافة الي gentamicin,erythromycin,chloramphenicol,clavam oxcillintetracycline,sulphamethoxazole، ظاهرة مقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية ظاهرة بيلوجية مهمة جدا تعني ان الميكروب بهذا المضاد عند تعرضه له ففي الوقت الذي توجد فيه سلالة حساسة من جنس بكتيري معين لمضاد حيوي نجد سلالات من نفس الجنسكيفت نفسها معهااصبحت مقاومة وغير متأثرة تنشأ هذه السلالة نتيجة لجينات المقاومة.

كما و تم تاكيد تفوق وكفاءة المستخلصات الطبيبة النباتية علي المضادات الحيوية اذا ما استعملت بشكل صحيح ودقيق[20]

المراجع

[1]- j-E.L.corry.Handbook of microbiological media vol ,22,on.1.(1994).

[2]- Akhmetsadykova<,s.H .,B-aubekova,A.,konuspayeva,G.,Akhmetsadykova ,N-,F-aye,B.andloissau,G,(2015).

[3]- Geisman,T.chemistry of Havonoids,macimillanco.,New York,pp-90-101-(1962).

[4]– عبدالقافي ،انعام عبدالمنعم عبدالحميد (2001).التأثير التثبيطيلعددمنالنباتاتالطبيةفيبعضانواعالجرا ثيمالمعزولةمنالجروحالخمجية .

[5]– قبيسي ،حسان (1998)،النباتات والأعشاب الطبية .دار الكتب العلمية ،بيروت ،لبنان.

[6]- Bogdadi, H. A. A. ,Kokoska, .,Havlik, G, Kloucek, p. ,Rada, V. andvorisek, K.(2007).In Vitro antmicrobial active of some Libyan Medicinal plant Extracts L.

[7]- Manickam Murugan, VeerabahuRamasamy Mohan, (2014). Phytochemical, FT-IR and antibacterial activity of whole plant extract of Aervalanata (L.) Juss. Ex. Schult, Journal of Medicinal Plants Studies, Journal of Medicinal Plants Studies, 2, (3) ,(51-57).

[8]– ابوضاحي ،يوسفمحمد،1989.تغذية النبات العلمي ،بيت الحكمة .جامعة بغداد

[9]- S.IVancagic,I: MiLeuic ,and. D.cenic – Milosevic.in vitro antibacterial activity of propolis extracts on 12 different bacteria in conditittions of 3 various phvalues,ArchBiolSci,vol 62 on 4 pp 915-934 (2010) 0.

[10]- S .Silici and S.Kutlutluca,Chemical Composition and antibacterial activity of propoliscollecied by three different races of honeybees in the s ame region,Ethnopharmacol,vol,99,no.1,pp 69-73,(2005).

[11]- K.poole ,Effux – mediated antimicrobial resistance in Anti biotic Discovery and Development .(2014).

[12]– شاهين ،عمر ورند عمر شاهين (2008).المضادات الحيوية ،دار الفكر العربي –عمان/ الاردن .

[13]– قيتار رشيدمجيد ،صباح مالك حبيب الشطي (2002).تأثير الفعالية التضادية للمستخلصات النباتية علي نمو بعض الأحياء المجهرية / جامعة البصرة

[14]– امنة ،محمد علي ،شهباء حميد مجيد (2006). التأثير المثبط لقشور الرمان تجاه بعض الاعفان و البكتيريا.

[15]- voravuthikunchaiS,lortheeranuwat at A,Jeeju W, sririrak T, phongpaichit S, supawita T;(2004). Effective medicinal plants against Enterohaemorrhagic E. coli.

[16]- Mzadan L.B (2009) Micro biology and biochemistry manglampublicayions, Delhi-India

[17]– خلف الله، عبدالعزيز محمد .النباتات الطبية والعطرية والسامة في الوطن العربي، جامعةالدول العربية، المنظمة العربية للتنمية الزراعية ،الخرطوم، دارمصرللطباعة (1988).

[18]- Parekh J, Jadaja S, chanda S;Etficacy of Aqueous and methanol Extracts of some medicinal plants for potential Antibacterial Activey.2005.

[19]- prashanth ,D ;Asha, M. K, and Amit, A.(2001)

[20]– المحنة ،ايناس كريم هادي (2002).تأثير مستخلصات بعض النباتات العراقية علي الأحياء المجهرية المعزولة من مناطق جسمية مختلفة.

[21]- Brown, A. E . (2007). Benson, s Micro Biological Application-s 10 the published by McgrawHill, new York ,USA.

[22]- https://www.who.int/news-room/detail/29-01-2018-high-levels-of-antibiotic-resistance-found-worldwide-new-data-shows