مجلة العلوم البحتة والتطبيقية
Journal of Pure & Applied Sciences
www.Suj.sebhau.edu.ly ISSN 2521-9200
Received 12/02/2020 Revised 20/05/2020 Published online 15/09/2020

دراسة الفعالية التثبيطية لمستخلص نبات الزنجبيل على بكتيريا *Staphylococcus aurues* المقاومة للمضاد الحيوي الميثاسلين (MRSA) و بكتيريا *Streptococcus pyogenes*

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

الملخص تضمنت الدراسة جمع عزلات من طلبة مدارس مدينة سبها تظهر عليهم أعراض التهاب الحلق ،أجريت الاختبارات المجهرية والكيموحيوية لتعريفها، أظهرت النتائج هذه وجود بكتيريا*Staphylococcus aureus* ودرس تأثير 9 مضادات حيوية علي البكتيريا المتحصل عليها ،حيث أظهرت نمط المقاومة المتعددة تجاه 6 من مجموع 9 مضادات ، جمع الزنجبيل وحُضِرت المستخلصات منه باستخدام ثلاثة مذيبات (الكلوروفورم – الميثانول – الهكسان)، استخدمت أربعة تراكيز من كل مستخلص (100,75,50,25%)، تباينت نتائج الفعالية التثبيطية للمستخلص باختلاف نوع المستخلص نفسه والتركيز المختبر حيث اظهرت نتائج مستخلصات الكلوروفورم والميثانول تأثير تثبيطي عالي تجاه البكتيريا MRSA فاق تأثير المضادات الحيوية، كما بينت الدراسة تأثير مستخلص الميثانول على بكتيريا *Streptococcus pyogenes* في حين لم تظهر أي نتيجة لمستخلص الهكسان على ايّ من البكتيريا المختبرة، تم الكشف عن المجاميع الفعالة الموجودة في نبات الزنجبيل.

كلمات مفتاحية : *Staphylococcus aureus*، *Streptococcus pyogenes* ،المضادات الحيوية، مستخلص الزنجبيل.

Study of the Inhibitory Effect of Ginger Extract on *Staphylococcus aureus* Resistant to Methicillin (MRSA) and *Streptococcus pyogenes*

*Salha Essa Mohammed[1] & Abdulhadi Ali Albaser[2]
[1]Department of Plant sciences, faculty of sciences, Sebha university, Libya
[2]Department of Microbiology, faculty of sciences, Sebha university, Libya
*Corresponding author: salh.Abubakr@sebhau.edu.ly

Abstract This study examined the effect of *Zingiber officinale* (ginger) extract on methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and on *Streptococcus pyogenes*. Extracts were prepared using three organic solvents (chloroform, methanol and hexane). Four concentrations of each extract were tested (25, 50, 75 and 100%). A comparison effect with nine commercial antibiotics on these bacteria was also investigated. The results showed that extracts of chloroform and methanol possess a higher inhibitory effect on MRSA than that of tested antibiotics. The study also showed the effect of methanol extract on *Streptococcus pyogenes* but not from hexane extract on both tested bacteria. The active groups present in the ginger extracts were detected by IR.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, antibiotics, Ginger extract.

المقدمة

المكورات العنقودية الصفراء *Staphylococcus aureus* من أشد أنواع البكتيريا مقاومة للمضادات الحيويةوتعرف بإسم MRSA نسبةًلمقاومتها للمضاد الحيوي الميثاسيلين Methicilin. يرجع سبب إحداث هذه البكتيريا للمرض لمقدرتها عليالانزيمات التيتكسبها القدرة علي التضاعف والانتشار داخل انسجة المضيف. فقد قاومت البنسيلين بإفرازها انزيم Penicillinase وقاومت الميث سيلين بتغيير تركيب جدارها وقاومت الفانكومايسين لاكتسابها جين المقاومة van A. تتواجد هذه البكتيريا بصورة طبيعية علي جسم الانسان وتنتهز فرصة ضعف المناعة للجسم لتصيبه بأمراض متعددة أخطرها الأمراض الجلدية وتعرف بانها اكلة لحوم البشر.[3][1][2]. اما المكورات السبحية القيحية *Streptococci pyogenes* تعد من المسببات الرئيسة لاخماج اللوزتين البكتيري و لها المقدرة علي أن تصيب الإنسان بالعديد من الأمراض ويرجع ذلك لانتاجها العديد من العوامل التي تساهم في ضراوتها والتي تعمل علي تحلل الدم [4]. في السنوات الأخيرة يهتم الباحثون في الكشف عن النباتات التي قد تكون لها فعالية ضد الجراثيم، الأعشاب والنباتات الطبية المستعملة للأغراض الطبية تستند علي فرضية ان النباتات تحتوي علي مواد طبيعية التي يمكن ان تعزز الصحة او تخفف المرض لكونها مصدر للمواد الفعالة فقد استخدمت النباتات الطبية ومكوناتها منذ الزمن القديم في معالجة العديد من الأمراض [6] من اهم النباتات الطبية

التي استخدمت في العلاج نبات الزنجبيل *Zingiber officinale* فهو نبات استوائي يحمل مكانة مهمة في طب الأعشاب وبشكل رئيسي في اسيا (الصين والهند) ثم انتشر في باقي الدول في العالم، الزنجبيلله رائحة عطرية قوية، طعمه حار و لاذع ، لونه اصفر خفيف.[7-9] .

المواد وطرق العمل

عزل و تعريف السلالات الميكروبية

جُمعت العينات (250 عينة) من طلبة مدارس مدينة سبها جنوب ليبيا وذلك بواسطة ماسح قطني مُعقم حيث أُخذت مسحات من اللوزتين ونقلت إلى المختبر الطبي المرجعي بمدينة سبها قسم الأحياء الدقيقة. نُميّت المسحات المأخوذة بطريقة التخطيط على أطباق بتري تحوي أحد الأوساط الغذائية الصلبة المُعقّمة Nutrient Agar, Chocolate Agar ثم حُضِنت على درجة حرارة 37 °م لمدة 24 ساعة. في اليوم التالي فُحِصت المستعمرات النامية ظاهرياً وبإستخدام المجهر المركب بعد إجراء صبغة جرام عليها.اختبرت العزلات المتحصل عليها على مقدرتها علىتخمير سكر المانيتول وذلك بتنميتها على الوسط الغذائي الصلب المانثيول الملحيMannitol salt Agarواعتبرت النتيجة موجبة لهذا الاختبار في حال ظهور المستعمرات باللون الأصفر الذهبي، كما اختبرت العزلات على مقدرتها على إنتاج أنزيم تخثر الدم Coagulaseو أنزيم الكاتاليز Catalaseوتحليلها لليوريا والدم،كما اختبرت البكتيريا على مقدرتها علي و تخميرها سكر السكرروز، اللا كتوز، مالتوز، مانيتول، جلوكوز.

جمع و تحضير مستخلصات الزنجبيل

تم جمع رايزومات نبات الزنجبيل وتجفيفها وطحنها بمطحنة كهربائية تم اخذت وزنة منه 20 جرام ووضعت في قنينات زجاجية نظيفة ومعقمة معتمة وتم أضافة 450 ملي من الميثانول والكلوروفورم والهكسان كلا علي حده ،تمت عملية الإستخلاص بإستخدام ثلاثة أنواع من المذيبات العضوية هي الميثانول ،الكلوروفورم والهكسان، حيث مُزج مسحوق نبات الزنجبيل (20 غرام) مع كل مذيب (450 ملي) على حدة وذلك في أنابيب زجاجية معتمة محكمة الإغلاق وتركتلمدة ستة أيام على درجة حرارة الغرفة مع الرج (2-3) مرات يومياً لمدة 30 دقيقة.رُشِح المزيج باستخدام ورق الترشيح Wattman paper 1 والصوف الزجاجي للحصول على المستخلص خالي من الرواسب. تمّ التخلص من المذيبات بواسطة جهاز المبخّر الدوّار Rotary evaporator عند ضغط متخلخل ودرجات حرارة (65°م) بالنسبة للميثانول أما الكلوروفورم فعند (61°م) وأخيراً الهكسان عند (69°م) [5]. استُخدِمت في هذه الدراسة أربعة تراكيز من كل مستخلص (25، 50، 75، 100 %).

تقييم التأثير المضاد لمستخلصات الزنجبيل

إستُخدِمت طريقة الإنتشار بالآجار (Well diffusion method) حضر المعلق البكتيري تحت ظروف التعقيم بملء عبوة إبرة التلقيح من البكتيريا المستهدفة حديثة النمو (24ساعة) ومزجها في أنبوبة إختبار محتوية علي ماء مقطر ومعقم (5 مل)ثمّ رُجت بواسطة الرجاجVortex حتي تكونت عكارة بالأنبوبةقورنت بعكارة مؤشر ماك فارلاند McFarland. تحت ظروف التعقيم وبواسطةُ مساح قطني معقم أُخِذت مسحة من هذا المعلق البكتيري ونُشِرت علي أطباق بتري المحتوية علي الوسط المغذي Muller Hinton (MH) Agar وتركت لمدة15دقيقة في درجة حرارة الغرفة لكي يحصل التشرب. بعدها وبواسطة ثاقب فليني Cork borer مُعقّم عملت حفر Holes بقطر (4 مم) في الوسط المغذي وبمسافات متباعدة وبواقع أربع حفر في كل طبق ،عبئت هذه الحفر بالمستخلص (200 ميكروليتر) من كل مستخلص وحسب التراكيز المختلفة ،مُلئت إحدى الحفر بالماء المقطر المعقم لتكون شاهد Control،حُضِنت بعدها الأطباق علي درجة حرارة 37°م لمدة 24ساعة ، ظهور منطقة خالية من النمو البكتيري Inhibition zone حول الحفر المحتوية علي المستخلص اعتبرت دليلاً علي تأثير المستخلص علي البكتيريا المختبرة.

حساسية البكتيريا المعزولة للمضادات الحيوية المختبرة

استخدمت طريقة (Disc diffusion method) ، حيث نُميت البكتيريا المراد إختبارهاوحُضِر المعلق البكتيري كما ذكر سابقاً، فُرِدت مسحة من هذا بواسطة ماسح قطني معقم على أطباق بتري تحوي الوسطالغذائي الصلب (MH) والمحضر حسب الشركة المصنعة (Oxoid)، وبواسطة ملقط معدني معقم ثُبتتأقراص المضادات الحيوية التجارية المختبرة (جدول 1) ثم حُضِنت الاطباق لمدة 24ساعة في درجة حرارة 37 م . تم قياس أقطار مناطق التثبيط بعد انتهاء فترة التحضين8]

جدول (1) : المضادات الحيوية (Oxoid) المستخدمة في الاختبار

المضاد الحيوي المختبر	التركيز (mg)
Sulphamethoxazole	25
Oxacillin	1
Erythromycin	15
Ampicillin	10
Tetracycline	30
Chloramphenicol	10
Cephalexin	30
Gentamicin	10
Neomycin	30

الكشف الكيميائي لبعض المركبات الفعالة في النبات قيد الدراسة

تم الكشف عن المركبات الفعالة باستخدام طيف الأشعة تحت حمراءIR .لوحظ ظهور امتصاصات عند مناطق 3305، 2925، 1641، 1372 و 1009 سم$^{-1}$ وهذه تدل على وجود

المجموعات الوظيفية, C-O-C C-C-O, C=N, CH, OH

على التوالي.[22-25] شكل (5)

النتائج والمناقشة

بيّنت نتائج الفحص الظاهري والمجهري أن المستعمرات كرويةذات لون رمادي علي وسط اجار الدم، وذات لون أصفر ذهبي علي وسط المانيثول الملحي نتيجة تخميرها لسكر المانيتول ، موجبة لصبغة جرام ومتجمعة علي شكل عناقيد. لها القدرة على إنتاج أنزيم الكاتاليز وأحدثت خثرة للبلازما لامتلاكها أنزيم Coagulase وعُرِفّت على أنها *Staphylococcus aureus* اما *Streptococcus pyogenes* فظهرت مستعمراتها بشكل كروي الي بيضاوي علي شكل سلاسل مختلفة في الطول ولونهاأبيض علي Blood agar موجبة لصبغة جراموتميّزت بمقدرتها علي تحليل كريات الدم تحليل جزئي، وسالبة لإختبارات Coagulase والأندول، الكتاليز ، الليوريز والمانيتول. تخمر سكر السكروز ،اللاكتوز، المالتوز، جلوكوز وجلاكتوز وهذه النتائج تؤكد أنها *Streptococcus pyogenes* [31] أظهرت النتائج المتحصل عليها في هذه الدراسة التباين بين المستخلصات الثلاثة لنبات الزنجبيل ضد السلالتين المستهدفة، حيث ظهر اقوي تأثير تثبيطي عند التراكيزالعالية (75%,100%) ، كان مستخلص الكلوروفورم ملفت للأنتباه فقد أعطي ا اأعلي تأثيراً ضد البكتيريا عند التركيز (50%) بمتوسط منطقة تثبيط بلغ (37.00+_5) علي *Staphylococcus* aureus يليه مستخلص الميثانول بمتوسط منطقة تثبيط (29.33+_5) علي*Streptococcus pyogens* اما التراكيز(50%)، (25%) فقد ظهر تباين في تأثير في كما في الشكل (1،2،3)

شكل (1) تركيز 75% *Staphylococcus* aureus

شكل (2)تركيز25% *strptococcai.pyogens*

شكل (3) تركيز 100%

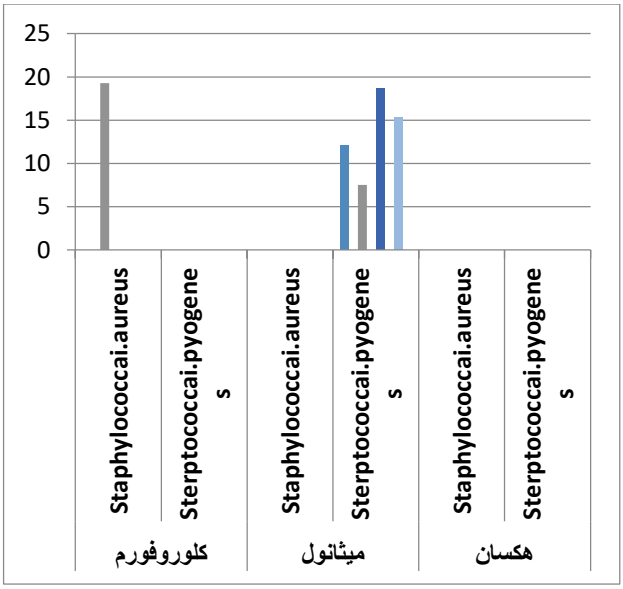
في حين لم تظهر النتائج أي تأثير لمستخلص الهكسان يعزي عدم الحساسية لبعض التراكيز لانخفاض تراكيز المجاميع الفعالة في هذه التراكيز ،وحساسية البكتيريا تزداد بزيادة التراكيز وهذه النتائج متفقة مع [9–10] و مما اتضح ان زيادة فعالية المستخلص يعتقد انها تعود الي تأثير المستخلص علي جدار الخلية البكتيرية لامتلاك النبات المركبات Gingerol,Shogoal اللذان يعطيانه الطعم اللاذع للزنجبيل حيت Gingerol هو احد المركبات الفينولية الذي له تأثير في خفض الشد السطحي لجدار الخلية البكتيرية وباتحاده مع المركبات الفينولية الأخري يعمل علي تمزيق الجدار الخارجي للخلية البكتيرية ناتج عنه فقد خاصية النفاذيةللغشاء بالتالي تسرب محتويات السيتوبلازم بما في فيها الاحماض النووية ونواتج الأيض والأيونات [11] ،**التفسير الثاني** ان التربينات من المركبات الأساسية في نبات الزنجبيل ولها ميكانيكية مشابهة للمركبات الفينولية وهي المسؤولة عن تمزيق الغشاء البلازمي وتلف محتويات الخلية [12]**التفسير الثالث** استناد علي [13]ان المركبات الفينولية والأنزيمات المحللة للبروتينات تعمل علي ترسيب بروتينات الغشاء الخارجي وترسب وفقدان لمحتويات الخلية ،**السبب الرابع** تأثير حمض الخليك في الأس الهيدروجيني للخلية حيت ان حالة الحامض الغير متأينة هي المسؤولة عن الفعالية التثبيطية لنبات الزنجبيل من خلال خفض الأس الهيدروجيني داخل الخلية مما أدي الي تحلل البروتينات

وفقد للطاقة وترسب محتوي الخلية وهذه النتائج مطابقة ل[14] اضافة ان نبات الزنجبيل يحتوي علي مادة ZINGIBAIN وهو نوع من الأنزيمات المحللة للبروتين وقدرتها علي تحليل البروتينات كيميائيا وان هذه الأنزيمات ذات فعالية عالية مضادة للالتهابات [15]ايضا احتوائه علي القلويدات وهي من اهم المجاميع الفعالة في العلاج وتأثيرها الفسيولوجي علي الكائن وان وجد بكميات قليلة *Staphylococcus aureus*[16] وجاءت هذه النتائج مطابقة ومتفقة مع [17-18].

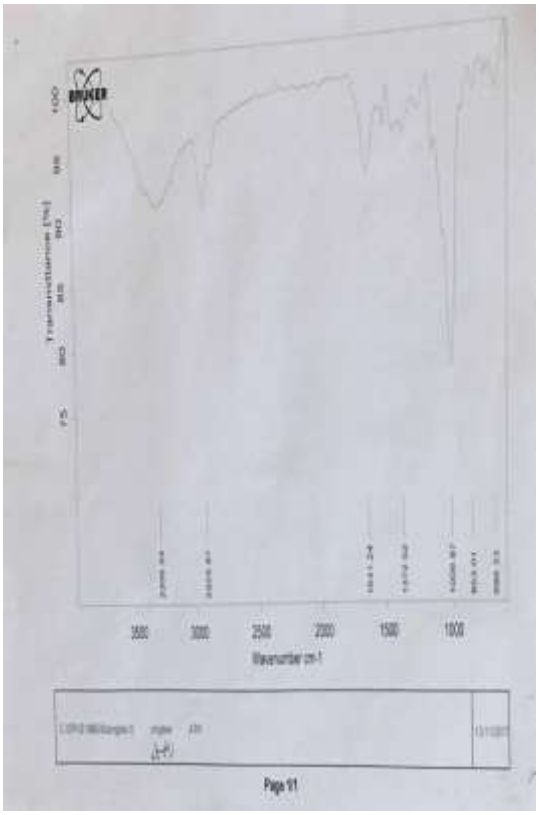
وفيما يخص مقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية فقد اظهرت النتائج ان سلالة البكتيريا كانت حساسة ل3مضادات من أصل(9) فقد كانت حساسة جدا ل Erythromiciln, chloramphenicol cephalexin, وهذا راجع لتركيب جدارها المعقد واحتوائها علي اشرطة كروموسومية التي لا تخص مقاومة مضاد معين وانما تحتوي محددات مقاومة اضافية للضراوة ومن اجل البقاء فمعظم سلالاتها تنتج محفظة متعددة السكريات التي تقاوم عملية البلعمة [19–21]. كما تم الكشف عن المجاميع الفعالة في نبات الزنجبيل بتقنية **IR** كما هو مبين في الشكل (5).

اما عن نتائج التحليل الاحصائي

نتائج تحليل التباين الاحادي دلت على وجود فروقا معنويا بين معدلات التثبيط تعزى لتركيز المستخلص حيث كانت القيمة الاحتمالية لإحصائي الاختبار اقل من 5% (sig < 005) وذلك باستخدام مذيب الميثانول كما هو موضح بالشكل (4)



شكل (4) اعمدة بيانية توضح التأثير التثبيطي لنبات الزنجبيل



شكل(5) يمثل ترددات الاشعة تحت الحمراء للمجاميع الفعالة للزنجبيل بتقنية (FTIR)

المراجع

[1]- Martinez .G.l .and Baguero Interactions among strategiesassociated with bacterial infections:pathogenicity.

[2]- SaxenaS :Banergee.g: garg .R and singhofficinale root. Damascus university of health Science 22 (1);161-169.

[3]- شاهين ،عمر ورند عمر شاهين – (2008) 0المضادات الحيوية ،دار الفكر العربي –عمان/الأردن0(

[4]- Heynen.G(1996) Evaluation of the efficacy safty and toleration of Azithromycin ,penicillin treatment of acute streptococcal pharyngitis in children pediatric Infect Dis J.,15:791-759.

[5]- 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.

[6]- parmar,V.2005.Herbal Medicines ;Its Toxic Effects and Drug Interactions.theindianAnaesthetists forum.p

[7]- Ejechi, B. O. Souzey, J. A. -27 and Akpomedaye, D. E. (1998). Microbial stability of mango (Mangiferaindica L.) juice preserved by combined application of mild heat and extracts of two tropical spices. J. Food Prot 61:725

[8]- AbouGabal A. A. Essawy, A. E. Abdel-Moneim, A. M. Hamed, S. S. and Elzergy, A. A. (2007). The protective effect of black seed (Nigella sativa) against carbon tetrachloride-induced chromosomal aberrations and ultrastructural

changes of bone marrow cells Arab. J. Biotech. (2):275-288.

[9]- Kobayashi, M. Tshida, Y. Shoji, N. and Okizumi, Y. (1988).Cardiotonic action of [8] – gingerol, an activator of the Ca++ pumping adenosine triphosphatase of sarcoplasmicreticulum, in guinea pig atrial muscle. J. PharmacolExpTher 246: 667.

[10]– رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، جامعة الانبار ،العراق تأثير مستخلص علي نمو انواع بكتيرية ممرضة ات عدد من النباتات.2004) ،شكرية علي محمد كريم زنكة

[11]- onmet–Aree,G.,Tomoko,S.,piyawan,G.g.ak,E 2006 .Antimicrobial properties and action of Galangal(Alpinia Galangal inn) on staphylococcus aureus .lwT –food Sci .technol.,39;1214-1220.

[12]- volk ,A.&-wheeler,M.F.1988.the basic of red Ginger (Zingiberofficinale roscoe) extract on the growth of mastitis causing bacterial isolates.microbiology . Eelangga .Jakarta,1;2

[13]- Masniaripoeloengan (2011). The effect

[14]– عبدالله ، مجاهد0 رنا (2015).تأثير مستخلصات نبات Zingiberofficinale والمضادات الحيوية ،جامعة بغداد، كلية التربية/ قسم علوم الحياة0

[15]– عواد ، عبدالعزيز فاطمة ((2010).دراسة تأثير الزنجبيل علي المحتوي البلازميدي والغشاء الحيوي لبكتيريا *Staphylococcus aureus* المعزولة من اسنان

[16]- ــJasim,T.M.,Alkamel,A.and Abdul Aziz,I (2016).Antimicrobial activity of Aqueous Zing berofficinale root. Damascus university of health Science 22 (1);161-169.

[17]– الصيدلية الخضراء امتشافات جديدة في المعالجة لامراض شائعة (2007)اية .ديوك ،جيمس

[18]- Martinez.j.L.andBaQuero .F. (2002). Interactions among Strategies associated with bacterial infections ; pathogenicity.

[19]- SaxenaS ;Banerjee .G; Garg .R and 23 Singh .M.(2014) .comparative study of Biofilm formation.

[20]- G.E.L corry.Handbook of microbiogical media vol.22 on1.(1994)..F.(2002)

[21]- Parmar,v.(2005).Herbal Medicines Its Toxic Effects and Drug Interactions.

[22]- ogala T,.Remes S,. andHaansuu p.(2000).Antimicrobil activity of some

[23]- sevgiturkergorgulu,musadoganferidesevercan (,2007) the charactacterization and differentiation of higher plants by fourier transform infrared spectroscopy

[24]- manickammurugan, yeerabaha Ramasamymohan ,2014phtochemical ,FT-IR and antibacterial activity of whole plant extract of Aervalanata (L,) guss EX schult, gournal of Medicinal plants studies ,gournal of medicinal plants studies,2,(3),(51-57).

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

[26]- 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).

[27]- Ejechi, B. O. Souzey, J. A. and Akpomedaye, D. E. (1998).Microbial stability of mango (Mangiferaindica L.) juice preserved by combined application of mild heat and extracts of two tropical spices. J. Food Prot 61:725-7

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

[29]- MohammedH.A.,Fadhil,A.,gomer,A.(2015).An tibacterial Activity of Azadirachtaindica (Neem) leaf Extract against Bacterial pathogens sudan .American gonmal of research communication, 3 (5).246-251

[30]- Mc Cann J. (2003). Herbal Medicine Handbook 2nd ed. Philadelphia: Lippincott

[31]– ابوضاحي ،يوسف محمد،1989.تغذيةالنبات العلمي ،بيتالحكمة .جامعةبغداد

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

[33]- AKhmetsadykova, S. H. ,B- aubekova., Konuspayeva -,G.,Akhmetsadyova ,N.,F-aye B. and loiseau ,G.(2015).lactic acid bacteria biodiversity in raw and frmentedcamal .