حساسية بعض أجناس البكتريا الممرضة للمستخلص المائي لثمار الآس المحلي *Myrtus communis*

د. سعد الدين ماجد الحفوظي
كلية التربية/قسم علوم الحياة

د. أديبة يونس شريف
كلية العلوم/قسم علوم الحياة

ضحى جاسم محمد
كلية التربية/قسم علوم الحياة

الاستلام 16 / 05 / 2007
القبول 03 / 06 / 2008

ABSTRACT

The present investigation aimed to evaluate the effect of aqueous Extract Of Fruits *Myrtus communis* at different concentration (3.1, 6.2, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400) mg/cm^3 on the growth and viability of eight pathogenic bacteria the following bacteria were sensitive to the extract (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*). while *Klebsiella pneumonia*, *Proteus vulgaris* and *Serratia marcescens* were resistant .

The results showed that the effect of the extract was proportionally increased. With increasing the concentrations up to 12.5 mg/cm$^{3.}$

However the DIZ (mm) values for the bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*). Were (17.54, 14.75, 12.66, 12.08 and 9.29) mm respectively Also the values of minimum inhibitory concentration MIC (mg / cm^3) for proceeding. Pathogenic species were (12.5, 25, 50, 50 and 100) mg/cm^3 respectively.

الخلاصـة

أجريت هذه الدراسة لبيان تأثير المستخلص المائي لثمـار الآس المحلـي *Myrtus communis* باستخدام ثمانيـة تراكيـز شـملت (3.1, 6.2, 12.5, 25, 50, 100, 200 و 400) ملغم / سم^3 في نمو وحيوية ثمانية أجناس من البكتريا المرضية. أظهرت خمسة منها حساسيه للمستخلص وهي *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* في حين لـم تظهـر

ثـلاثة أجنـاس أخـ ـرى وهـ ـي *Klebsiella pneumonia, Proteus vulgaris* و *Serratia marcescens* أية حساسية لـ ـجميع تراكيـز المـستخلص المـائي للـ ـثمار وأظـهرت النتـائج ازدياد تـأثير المستخلص المائي بزيادة التراكيـز مـن (12.5 ولغايـة 400) ملغم /سم^3 إذ بـدأت الزيـادة بمعـدل (127%, 429%, 610%, 729%, 821%) للتراكيز (25, 50, 100, 200 و400) ملغم / سم^3 على التوالي عند المقارنة مع ادنى تركيز مثبط MIC وهو (12.5) ملغم / سم^3 وتباينت أجناس البكتريا الخمسة في شـدة اسـتجابتها للمـستخلص المـائي لثمـار الآس اذ كانـت بالترتيـب *Staphylococcus aureus* , *Pseudomonas aeruginosa* , *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* و *Bacillus subtilis* . وبلغت أقطار دائرة التثبيط مقاساً بالملم وعلى التوالي (17.54, 14.75, 12.66, 12.08 و 9.29) وقيمة التركيز الادنى المثبط MIC مقاساً بالملغم /سم^3 وعلى التوالي ايضاً (12.5, 25, 50, 50 و 100).

المقدمـة

يعد الآس Myrtle او ما يسمى بالمرسين او شجرة السكر من الـشجيرات الدائمـة الخضرة ذات الأزهار البيضاء والثمار اللبيه السوداء الداكنة عند تمام نضجها وهي ذات مذاق حلو وهو يصنف ضمن العائلة المرسينية Myrtaceae. تنتشر زراعة هذا النبات في جميـع انحاء العراق في الحدائق العامة والخاصة والطرقات كاسيجة وشجيرات قابلة للتـشكيل كمـا وينمو برياً في شمال العراق في الاودية عند تجمعات المياه.

قدس الرومان أزهار هذا النبات في الطب الشعبي واعتبرها اليونانيون رمزاً للنـصر وقد اشتهر هذا النبات في الطب الشعبي العربي والعالمي و لازال استخدامه على نطاق واسع لحد الان كونه من اكثر النباتات الطبية قليلة الضرر الجانبي فهو يستخدم لعلاج التهابات اللثة والآسنان كما انه طارد للغازات ومفيد في علاج حالات النزف والتقرحات الداخليـة وفـ ـي عـلاج الروماتيزم وتدلي الرحم كمـا يـعتبر من المطهرات والمنـشطات للرئـة وأغـشية الأعضاء التناسلية والبولية ويستخدم في علاج التهابات القـصبة الهوائيـة والكلـى[1،2]. ان أغلبيـة البحوث التي أجريت على نبات الآس كانت على الأوراق فـ ـقد اشـار[3] الـى ان للمـستخلص المـائي لأوراق الآس فعاليـة تثبيطيـة ضـد الجـراثيم *Pseudomonas aeruginosa* , *Proteus vulgaris* , *Streptococcus pyogenes* , *Staphylococcus aureus* . اما[4] فقد استخدم المستخلص المائي لثمار الآس واشار الـى ان للتراكيز العالية (200) ملغم / سم^3 فعالية تثبيطيـة علـى جـراثيم *Staphylococcus aureus* , *Streptococcus pyogenes* , *Escherichia coli* .

أما فيما يتعلق بالثمار فان قلة البحوث التي أجريت عليها دفعتنا الـى اسـتخدام هـذا الجزء النباتي من الآس في هذا البحث. إذ ان الطعم الحلو للثمار الناضـجة الـسوداء اللـون يجعلها مستـساغة ومرغوبـة فـي الاكـل والاسـتعمال اكثـر مـن الاوراق فقـد اشـار كـل مـن[5، 6، 7] الـى ان ثمـار الآس والتـي يطلـق عليهـا حـب الآس (الحـبلاس) hab – ul – as ذات أهمية طبية لا تقل أهمية عن الأوراق فهي تستخدم في علاج الاسـهال والزحار ولوقف النزيف وعلاج الجروح والقروح.

المواد وطرائق العمل

أجريت هذه الدراسة في المختبرات البحثية لقسم علوم الحياة / كلية التربية / جامعة الموصل

أولاً : مصدر النبات

تم الحصول على ثمار الآس من بعض الحدائق الخاصة في مدينة الموصل بعد تمـام نضجها اذ اصبحت سوداء داكنة ذات مذاق حلو سكري خلال شهري كانون الثـاني وشـباط 2006 .

ثانياً : تحضير المستخلص المائي للثمار

تم ترك الثمار لتجف طبيعيا في حرارة الغرفة لمدة (25) يوماً ثم أكمل تجفيف الثمار عند درجة حرارة 40 ^{O}م لمدة 48 ساعة حسب طريقة[8] تم اخذ 100 غرام من المـسحوق الجاف ووضع في دورق زجاجي واضيف اليه 1000 سم^{3} من الماء المقطر مـع التحريـك المستمر على المحرك المغناطيسي لمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة الغرفة وبعد ذلك تم ترشيح المستخلص باستخدام ورق الترشيح whatman No.1 ، تم تجفيد المستخلص بجهاز التجفيـد Lyophilizar ثم وضعت العينات بعد جفافها في قنانٍ زجاجية محكمة السد وحفظـت فـي الثلاجة بالتجميد لحين الآستعمال حسب طريقة[9].

ثالثاً : البكتريا المستخدمة

استخدمت ثمانية أجناس من البكتريا المرضية وهي

1- *Escherichia coli* 2- *Staphylococcus aureus* 3- *Salmonella typhi*
4- *Klebsiella pneumonia* 5- *Bacillus subtilis* 6- *Pseudomonas aeruginosa*
7- *Serratia marcescens* 8- *Proteus vulgaris*

تم الحصول عليها من مختبرات الاحياء المجهرية لقسم علوم الحياة في كلية العلوم / جامعـة الموصل. (3)

رابعاً : اختبار الفعالية التثبيطية للمستخلص

تم اختبار الفعالية التثبيطية باتباع طريقة[11]، اذيب (2) غم مـن المـستخلص المـائي الجاف في (5) سم^3 من الماء المقطر المعقم وعقم بعملية البسترة واعتبـر هـذا المـستخلص القياس بتركـيز400 ملغم/ سم^3 واعتمـد في تحضير بـاقي التخـافيف 3.1, 6.2, 12.5, 25, 50, 100, 200 ملغم /سم^3 .

خامساً : الفعالية المضادة للمستخلص المائي والمضادات الحيوية على الأجناس المختلفة من البكتريا

اتبعت طريقة [12] المعتمدة على طريقة[13] اذ تم تلقيح وسط المرق المغذي بـ (2-3) مستعمرات مفردة من الجراثيم الثمانية السابقة الذكر كلا على حدة وحضنت عند درجة حرارة 37°م لمدة 18 ساعة، ولغرض دراسة تأثير المستخلص المائي في نمو الجراثيم تـم عمـل ثقوب في وسط الاكار المغذي بقطر (6) ملم. بعدها خففت المزرعة الجرثوميـة بـالمحلول الفسلجي للحصول على معلق بكتيري يحتوي على ما يقارب 10^8 خلية / سم^3 وبالمقارنة مـع الانبوب الثالث من انابيب ماكفر لاند القياسية ونقل (0.1) سم^3 من المعلق الجرثومي المخفف الى وسط الاكار المغذي ونشر على سطح الطبق باستخدام ماسحة قطنية معقمة. ثـم تركـت الاطباق لمدة (30) دقيقة لإتمام عملية التشرب. بعدها تم ملئ الحفـر بـ 0.2 سـم^3 مـن المستخلص المحضر بتركيز 400 ملغم / سم^3 وحضنت بدرجة حرارة 37 ^{O}م لمدة 24 ساعة ثم سجلت النتيجة الموجبة بملاحظة أقطار التثبيط حول الحفر وتم قياس اقطارها.

ولـغرض تحديـد التركيز الادنى المثبط حضرت التخـافيف 3.12, 12.5, 25, 50, 100, 200 ملغم/ سم^3 من المستخلص واعيدت عملية التلقيح بالانواع البكترية التي أظهـرت حساسية للمستخلص النباتي ووضعت التراكيز المذكورة في حفر طبقـة الاكـار وحـضنت الاطباق بدرجة حرارة 37°م لمدة 24 ساعة وسجل التركيز الادنى المثبط علـى انـه ادنـى تخفيف يمنع ظهور النمو.

وبـعد اخذ البيانات تـم تحليلهـا وفق التصميم العـشوائي الكامـل C.R.D. الـذي تضمن عـاملين الاول خمس أجناس من البكتريا ذات الاستجابة الموجبة للمـستخلص وهـي *Staphylococcus aureus* , *Pseudomonas aeruginosa* , *Salmonella typhi* , *Escherichia coli* , *Bacillus subtilis* . والعامل الثاني تضمن ثمانيـة تراكيـز (3.1, 6.2, 12.5, 25, 50, 100, 200 و 400) ملغم / سم^3 وبثلاث مكررات. كما استخدم اختبار دنكن[14] متعدد الحدود عند مستوى احتمال 0.05 لغرض ايجاد معنوية العلاقة بين العوامـل المؤثرة والصفات المدروسة. تم استخدام المضادات tetracycline و chloramphenicol و cephalexine و gentamicin كعينة سيطرة موجبة للجراثيم وذلك بحسب ما تـستخدم

في مختبر الصحة العامة والمعتمد على فحوصات منظمة الصحة العالمية كما فـي الجـدول (1).

جدول (1) : الفعالية التثبيطية لأعلى تركيز للمستخلص المائي لثمار الآس بمقارنته مع بعض المضادات الحيوية في نمو وحيوية أجناس البكتريا تحت الدراسة

ت	أجناس البكتريا	المستخلص المائي لثمار الآس بتركيز 400 ملغم / سم^3	Tetracycline 30 Mg / disc	Chloramphenicol 30 Mg / disc	Cephalexine 30 Mg / disc	Gentamycine 30 Mg / disc
		قطر دائرة التثبيط ملم (mm)				
.1	*S. aureus*	30.0	15	18	15	17
.2	*E. coli*	27.33	12	9	0	10
.3	*S. typhi*	30.0	13	15	0	12
.4	*B. subtilis*	29.33	11	12	12	14
.5	*P. aeruginosa*	30.66	0	10	0	12
.6	*S. marcescens*	0	0	12	11	13
.7	*P. vulgaris*	0	9	10	14	15
.8	*K. pneumonia*	0	9	7	0	15

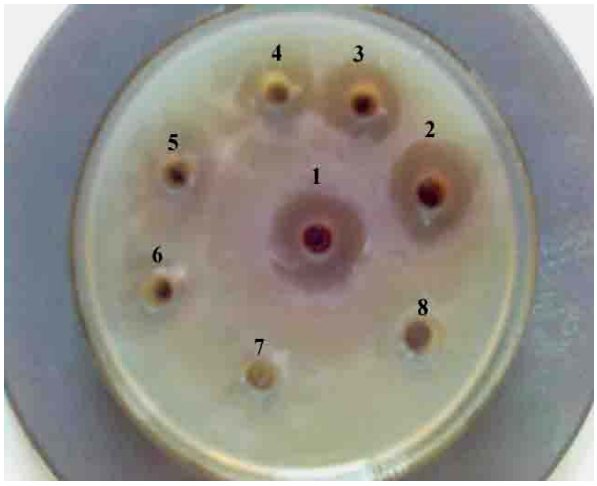
MIC Minimum Inhibitory Concentration Mg / cm^3
DIZ Diameter of Inhibition Zone mm

النتائج والمناقشة

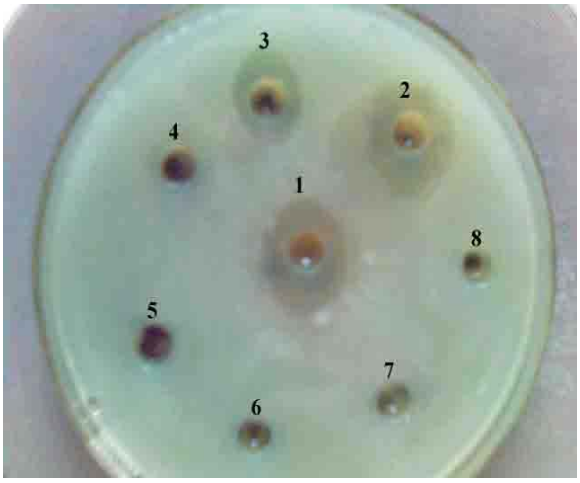
يتضح من الجدول (2) ان ادنى تركيز مثبط MIC للمستخلص المـائي لثمـار الآس يكون عند التركيز 12.5 ملغم / سم^3 اذ كانت اقل فعالية للمستخلص المائي لثمار الاس عند هذا التركيز وبمقارنته مع التراكيز 400, 200, 100, 50, 25 ملغم/سـم^3 مـع التركيـز 12.5 ظهرت زيادة معنوية قدرها 821%, 729%, 610%, 429%, 127% على التوالي وهـذه اشارة الى ان الجرعات القليلة من ثمار الآس تبدو ذات تأثير فعال في أجناس البكتريـا قيـد الدراسة وهذا يتماشى مع ما وجده[15] فـي دراسـته تأثير مستخلصات ثمار الآس في بعض أجنـاس البكتريا المرضية اذ اشار الى ان ادنى تركيز مثـبط MIC لكـل مـن البكتريـا *Bordetella bronchiseptica* و *Micrococcus luteus* بلـغ (7.5 و 3.75) ملغـم / سم^3 على التوالي، أما[4] فقد أشار من خلال دراسته تأثير المستخلص المائي لثمار الآس في حساسية بعض أجناس البكتريـا المرضية الى ان قيم الـ MIC مقاسة بملغم / سم^3 بلغـت (100, 100, 100, 200) للأجنـاس البكتيريـا *Staphylococcus aureus* , *Streptococcus pyogenes* , *Escherichia coli* و *Proteus mirabilis* على التوالي.

وتختلف نتائج[4] عن نتائج هذه الدراسة وهذا يعود الى اختلاف المصدر النباتي من حيث الموقع والموسم وفترة جمع الثمار اذ من المعلوم ان المواد الكيميائية الفعالة الموجودة في أي جزء نباتي تختلف في تركيزها وتواجدها من حيث الدلالات السابقة (الموقع وموسم وفترة الجني خلال ساعات النهار). وبينت الدراسة ان جراثيم *Staphylococcus aureus* و *Streptococcus pyogenes* و*Salmonella typhi* أظهرت اعلى حساسية للمستخلص عند التركيز (400) ملغم / سم^3 اذ بلغ قطر دائرة التثبيط (30) ملم تلتها الجرثومتين *Escherichia coli* و *Bacillus subtilis* إذ بلغ معدل قطر دائرة التثبيط لهما (29.33 و27.33) ملم على التوالي، كما موضح في الصور (1, 2, 3، 4، 5) على التوالي.

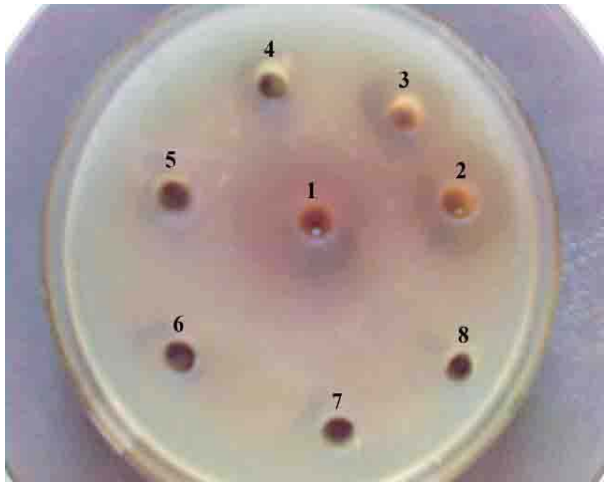
هذا مؤشر على أهمية استخدام هذه الثمار في التأثير في حيوية هذه البكتريا كما موضح في الشكل (1). وعلى الرغم من ان الدراسة شملت تأثير المستخلص المائي لثمار الآس على ثمانية أجناس من البكتريا المرضية فان التأثير المضاد كان في خمسة أجناس فقط وهي بالترتيب *Staphylococcus aureus* , *Pseudomonas aeruginosa* , *Salmonella typhi* , *Escherichia coli* و *Bacillus subtilis* اذ بلغ معدل قطر التثبيط لها DIZ (17.54 , 14.75 , 12.66 , 12.08 , 9.29) ملم ومعدل التركيز المثبط الأدنى MIC (12.5 , 25 , 50 , 50 , 100) ملغم / سم^3 وعلى التوالي أيضاً . أما الأجناس الأخرى وهي سالبة لصبغة گرام فقد كانت *Proteus vulgaris* , *Klebsiella pneumonia* و *Serratia marcescens* فلم تظهر أية استجابة لجميع تراكيز المستخلص ان تأثير المستخلص المائي لثمار الآس في حيوية أجناس البكتريا قيد الدراسة تعود إلى احتوائه على مركبات كيمائية فعالة فقد ذكر[5، 16] ان المكونات الكيميائية الفعالة في ثمار الآس هي الزيت الأساسي Essential oil الذي يحتوي على الزيت Myrtol و Myrcine والعفصيات Tannins والراتنجات Resins والحوامض والسكريات كما أشار[1] إلى احتواء ثمار الآس أيضاً على الراتنجات والفينولات ذات التأثير المثبط لنمو الجراثيم. وأوضح[10] ان الزيت الأساسي في الاس يحتوي على (32) مركب وان اكبر هذه المركبات نسبةً في الزيت هي , Linalyle acetate (4.6 %) Linalool (10.6%) , Limonene (21.2%) , α- Pinene (29.4 %) , Terpineole (3.1 %) , 1,8-Cineole (18 %) . كما اشار الى ان لهذه الزيوت القدرة على قتل البكتريا خلال (45) دقيقة.



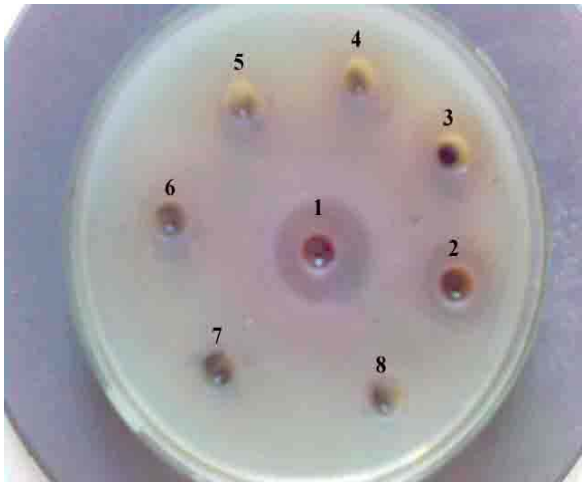
صورة (1): تأثير المستخلص المائي لثمار نبات الآس بتراكيز* مختلفة على جرثومة *Staphylococcus aureus*



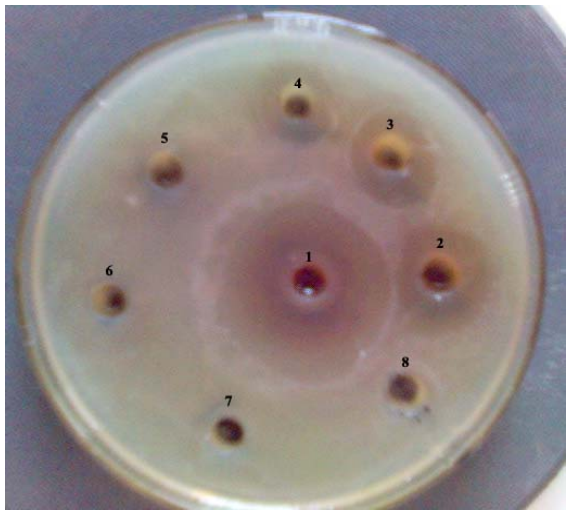
صورة (2): تأثير المستخلص المائي لثمار نبات الآس بتراكيز* مختلفة على جرثومة *Pseudomonas aeruginosa*



صورة (3): تأثير المستخلص المائي لثمار نبات الآس بتراكيز* مختلفة على جرثومة *Salmonella typhi*



صورة (4): تأثير المستخلص المائي لثمار نبات الآس بتراكيز* مختلفة على جرثومة *Escherichia coli*



صورة (5): تأثير المستخلص المائي لثمار نبات الآس بتراكيز* مختلفة على جرثومة *Bacillus subtilis*

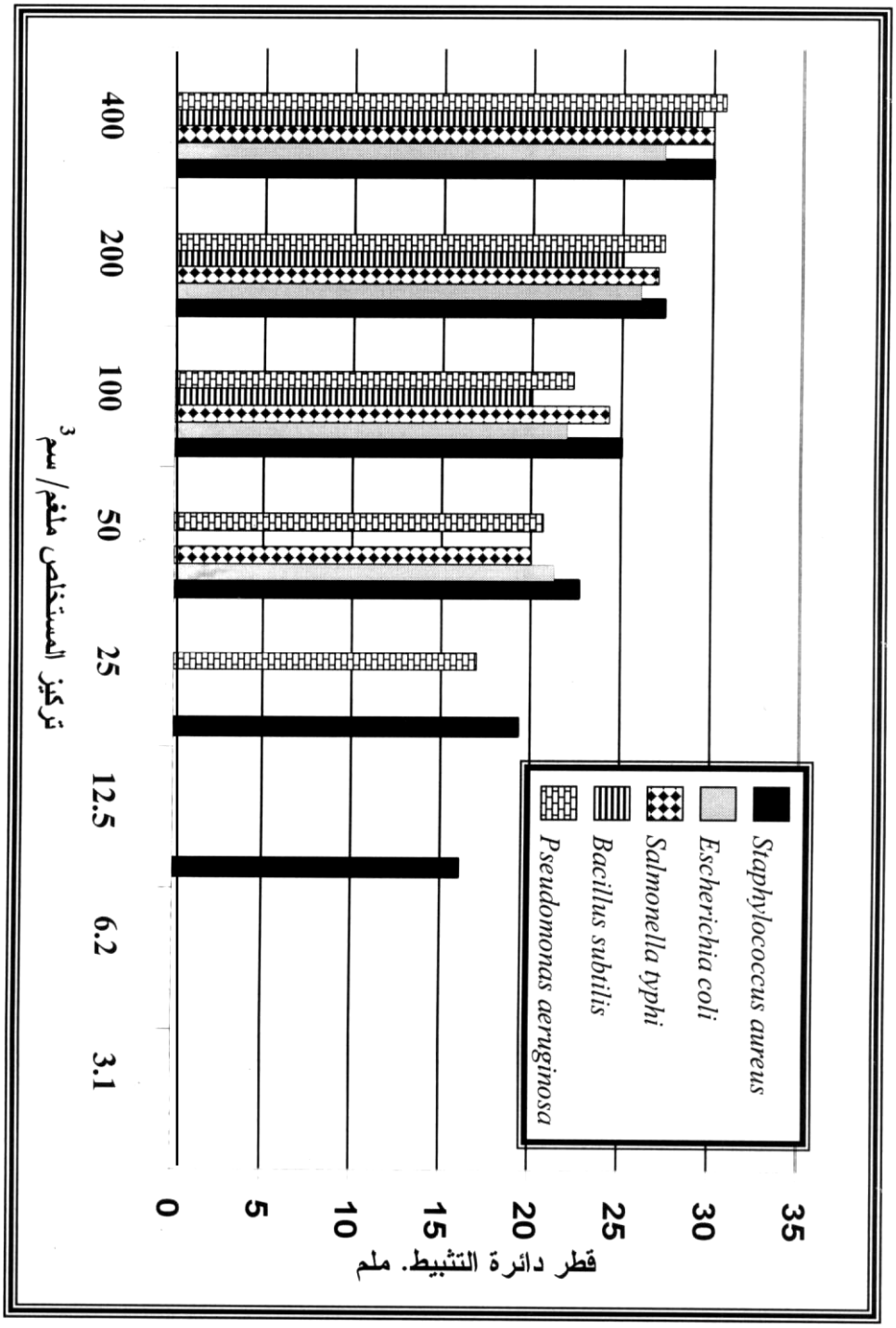
*الأرقام (1،2،3،4،5،6،7،8) تشير إلى التراكيز (400،200،100،50،25،12.5،6.2،3.1) ملغم/سم^3 على التوالي.

وأوضح[17] ان الفعالية المضادة للجراثيم والتي يمتلكها نبات الآس تعود الى وجود الفينولات المتعددة والتي تعمل على مسخ البروتينات وايقاف فعل الانزيمات المسؤولة عن سلسلة التفاعلات الايضية وبذلك يفقد الكائن المجهري حيويته كما ذكر[18]. ان الفعل التثبيطي للفينولات يعود الى وجود مجموعة الهيدروكسيل الفينولية والتي تكون آصرة هيدروجينية مع الجزء الفعال من الانزيم وكما قد تعزى الفعالية التثبيطية للثمار الى وجود العفصيات Tannins المعروفة بتثبيطها لنمو الجراثيم اذ تقوم بتكوين أواصر هيدروجينية مع البروتينات مما يحول دون بنائها وبذلك تعد العفصيات من اقوى القابضات التي تستعمل خارجياً في معالجة الجروح والحروق[19]. كما ذكرت احدى الدراسات لكل من[20] ان العفصيات تعد من الفينولات النباتية التي تمتلك فعالية مضادة للاكسدة Antioxidate وبالتالي فهي تعمل على تثبيط نمو الجراثيم.

جدول (2) تأثير المستخلص المائي لثمار الآس في قطر دائرة التثبيط DIZ لبعض أجناس البكتريا المرضية مقاساً بالملم مع إشارة مميزة لقيم MIC

أجناس البكتريا	التركيز ملغم / سم^3								المعدل
	3.1	6.2	12.5	25	50	100	200	400	
S. aureus	0.0 J	0.0 J	16.0 I	19.33* H	22.66 ED	25.0 C	27.33 B	30.0 A	17.54 A
E. coli	0.0 J	0.0 J	0.0 J	0.0 J	21.33* EFG	22.0 EF	26.0 EF	27.33 B	12.08 C
S. typhi	0.0 J	0.0 J	0.0 J	0.0 J	20.0* HG	24.33 CD	27.0 B	30.0 A	12.66 C
B. subtilis	0.0 J	0.0 J	0.0 J	0.0 J	0.0 J	20.0* HG	25.0 C	29.33 A	9.29 D
P. aeruginosa	0.0 J	0.0 J	0.0 J	17.0* I	20.66 HFG	22.33 EF	27.33 B	30.66 A	14.75 B
المعدل	0.0 G	0.0 G	3.2 F	7.26 E	16.93 D	22.73 C	26.54 B	29.33 A	

* تشير إلى قيم MIC لكل جنس من أجناس البكتريا



شكل (1) التأثير الحيوي للمستخلص المائي لثمار الآس في قطر دائرة التثبيط لبعض اجناس البكتريا المرضية (بالملم)

المصـــادر

1- مجيد، سامي هاشم ومهند جميل محمود. "النباتات والأعشاب العراقية بين الطب الشعبي والبحث العلمي" مجلس البحث العلمي بغداد (1988).

2- المنظمة العربية للتنمية الزراعية "النباتات الطبية والعطرية والسامة في الوطن العربي". جامعة الدول العربية. الخرطوم (1988).

3- Shareef, A.Y. Ph.D Thesis, College of Science, University of Mosul (1988). (In Arabic).

4- عبد الباقي، انعام عبد المنعم. رسالة ماجستير/ جامعة الموصل / كلية التربية (2001).

5- Chakravarty, H. L. Ministry of Agriculture and Agrarian Reform, Baghdad. (1976).

6- عاشور، عبد اللطيف "التداوي بالأعشاب والنباتات الطبية" مكتبة القران للطبع والنـشر والتوزيع، القاهرة، مصر (1985).

7- Evans, W. C., Treas and Evan's "Pharmacognosy" 4 th. ed. W. B. Saunders comp; UK (1997).

8- سعد الدين، شروق محمد كاظم. "الاعشاب الطبية" مترجم. دار الشؤون الثقافية, وزارة الثقافة والاعلام (1986).

9- Riose. J. L.; Rocio, M. c. and Villar, A.. J. Ethnopharma cology. 23:127 (1988).

10- Rasooli I. , M. L. Moosai , M. B. Rezaee and K. Jaimand. Journal of Agricultural Science Technology. Vol. 4 No. 384 (7-2007) (2002).

11- Kudi, A. C.; Umoh, J. U.; Edurie, L. O. and Gefu, J. (1999). J. Ethnopharma cology. 67: 225-228.

12- Leven, M.; Vanden Berghe, D. A.; Merten, F.; Vlietinek, A. and Lammens, E., Antibacterial activity planta medica 36:311-321(1997).

13- Vandepitte, J.; Engback, K.; Piot, P. and Heuk, C., Basic "laboratory procedures in clinical bacteriology world health organization" Geneva (1991).

14- الراوي، خاشع محمود وخلف الله، عبد العزيز محمـد. "تـصميم وتحليـل التجـارب الزراعية". وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. جامعة الموصل (1980).

15- Shahindi Bonjar G. H. Journal plant sciences 3(1):82-86 (2004) .

16- Outengco, D. C.; Dayap, L. A. and Capal, T. V. Actamanilana, 43: 19 -23 (1995).

17- الاسعدي، جنان غازي. رسالة ماجستير / جامعة الموصل / كلية العلوم (1988).

18- Farag, R. S.; Daw Z. Y.; Hewed, F. A. and El-Baroty G. S. A. Antimicrobial 52 (9): 665 – 669 (1989).

19- الروايدة، عبد الرؤوف "الوجيز في علم الدواء" الطبعة الأولى، مطـابع دار الـشعب، عمان (1981).

20- Makoto, I.; Suzuki, R.; Sakaguchi, N.; Li. Z. Takeda, T.; Ogihara, Y.; Jiang, B. Y. and Chen, Y. Biol. Pharm. Bull, 18 (11):1526-1530 (1995).