تقييم الكفاءة التثبيطية للمستخلصات المائية والكحولية لنباتات الكمون والحلبة والحبة السوداء والحبة الحلوة في نمو بكتريا *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli*

طيف ماجد عبد الحسين
شذى عبد الله الليثي
ايمن جاسم مهدي
زينة مطلك محسن
جامعة كربلاء / كلية الزراعة

استلم في :19/ نيسان/2016، قبل في: 19 / تموز /2016

الخلاصة

نفذت تجربة مختبرية في مختبرات كلية الزراعة /جامعة كربلاء لعام 2016 لمعرفة الكفاءة التثبيطية للمستخلصات المائية والكحولية لبذور نباتات الكمون والحلبة والحبة السوداء والحبة الحلوة في نمو بكتريا *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus*. أظهرت النتائج ان المستخلصات الكحولية وبالتركيزين 10 و20 مايكروغرام/مل أعطت اكبر منطقة تثبيط نمو من المستخلصات المائية ولكلا النوعين من البكتريا فقد اعطى المستخلص الكحولي للكمون اكبر مناطق تثبيط النمو وللتركيزين بلغت 23 و26 ملم على الترتيب لبكتريا *Staphylococcus aureus* بينما لبكتريا *Escherichia coli* اعطى المستخلص الكحولي لتركيز20مايكروغرام/مل والمستخلص الكحولي للحبة الحلوة لتركيز 10 مايكروغرام/مل اكبر مناطق تثبيط نمو بلغت 19.5 مل و16 ملم على الترتيب مقارنة مع بقية انواع المستخلصات .

الكلمات المفتاحية: الكفاءة التثبيطية، مستخلصات مائية، مستخلصات كحولية

المقدمة

كانت وما تزال وستبقى النباتات الطبية وسيلة مهمة وناجحة من وسائل العلاج لدى الحكماء والأطباء والمختصين، قد شكل العلاج النباتي الطبي الأساس في النتائج التجريبية لمئات والالاف السنين لأنه مصدرا مهما للمركبات الحيوية الفعالة ذات القيمة العلاجية للعديد من الأمراض على الرغم من قلة اعداد النباتات التي اختبرت فعاليتها، تزايد الطلب تجارياً على النباتات الطبية بسبب كثرة الأضرار الجانبية للأدوية الكيمياوية ومخاطرها فضلا عن إن النباتات الطبية تعد المصدر الرئيس لإنتاج العقاقير الطبية النباتية وكمصدر للمواد الفعالة المستخدمة في تحضير العديد من المستحضرات الدوائية[1و2] ومن النباتات الطبية التي شاع استعمالها نبات الكمون *Cuminum cyminum* L الذي يعود الى العائلة الخيمية يحتوي على الزيوت الطيارة وتشكل نسبتها 2-5% ويكون الدهايد الكمون Cumin aldehyde نسبة 40-65% من الزيت، ويحتوي على التربينات Terpenes والكحول الكوميني Cuminic alcohol والباينينات Pinen ويستعمل في الطب البديل كطارد للغازات وعلاج سوء الهضم[3] أوضح [9] ان الدهايد الكمون Cumin aldehyde الموجود في البذور يعمل كمثبط لأنواع مختلفة من البكتريا و الاعفان وبعض الخمائر. اما نبات الحلبة *Trigonella foenum graecum* L. هو نبات عشبي طبي يعود الى العائلة البقولية التي تستعمل في علاج بعض الامراض منها تخفيض ضغط الدم ونسبة السكر وعلاج الالتهابات [8] تعد بذور الحلبة مصدراً غنياً للمعادن والفيتامينات والبروتينات فضلا عن احتوائها على القلويدات مثل الكولين والترايجوناللين والكلايكوسيدات مثل الدايوسجنين ومواد هلامية [4و5و10]. من أشهر النباتات وأكثرها استخدام نبات الحبة السوداء. *Nigella sativa* Lيعود الى العائلة الشقيقة تحتوي البذور على الزيت الثابت الذي نسبته 30 – 35 % والزيت الطيار الذي نسبته 0.5 – 1.5 % [3] ومن أهم المركبات الفعالة في الزيت الطيار مركب Nigellone ومركب ثيموكينون Thymoquinone فضلاً عن احتوائه على القلويدات والصابونيات وراتنجات وتساعد الحبة السوداء في الهضم ومدرره للبول والحليب ومهيجة وفاتحة للشهية ومقوية و منشطة وطاردة للديدان [6و12]. ذكر [11] ان مستخلص البذور مضاد لبكتريا *S. aureus*.اما نبات الحبة الحلوة *Foeniculam vulgar L.*هو نبات عشبي حولي عطري يعود الى العائلة الخيمية ، إذ يستعمل كمضاد للالتهابات والمغص المعوي والانتفاخات والاضطرابات التنفسية [13] وهذا يرجع الى احتواء البذور على المواد الفعالة منها الزيوت الطيارة بنسبة 3-6٪ التي يكون الانيثول Anethole معظم مكوناته وبلغت 26-42% وكحولات وفينولات والديهايدات فضلاً عن احتوائها على كلايكوسيدات وصابونيات ومواد سامة [14] هدف الدراسة الى معرفة الكفاءة التثبيطية للمستخلصات المائية والكحولية للنباتات الطبية المستخدمة أعلاه في تثبيط نمو بكتريا *S.aureus*و*E.coli*.

المواد وطرائق العمل

نفذت هذه التجربة في مختبرات كلية الزراعة /جامعة كربلاء استعمل التصميم العشوائي الكامل (CRD) بمكررين وبثلاث عوامل لكل منهما، العامل الأول نوع النباتات الطبية وشملت الحلبة*Trigonella foenum - graecum* L و الكمون *Cuminum cyminum* L والحبة السوداء*Nigella sativa* L. الحبة الحلوة *Foeniculum vulgare*.Mill ، اما العامل الثاني تركيزين 10مايكروغرام/مل و20 ماكروغرام/مل والعامل الثالث نوع المستخلص وهما كحولي ومائي

- العينات النباتية :- جلبت بذور النباتات الطبية من المكاتب الزراعية وتم تنظيفها من الشوائب والبذور الغريبة المرافقة لها بعدها انتقيت البذور سليمة وطحنت الى مسحوق ناعم باستخدام مطحنة كهربائية.
- المستخلصات النباتية

• المستخلص المائي

اخذ وزن 40 غم من كل النباتات أعلاه واضيف اليها 140مليلتر من الماء المقطر وضعت في جهاز المازج (Shaker) لمدة 24 ساعة ثم تم ترشيحه باستعمال ورق الترشيح للتخلص من الرواسب وبعدها تم تجفيفه باستعمال الاوفن وعلى درجة الحرارة 45م.

• تحضير المستخلصات الكحولية

نفس طريقة تحضير المستخلصات المائية باستبدال الماء المقطر بكحول الايثانول 70% (100مليلتر)

- الكشف الكيميائي :-

أ- كشف القلويدات حسب طريقة [16]
ب- كشف كلايكوسيدات حسب طريقة [15]
ت- كشف التاينتنات حسب طريقة [7]
ث- كشف الصابونيات حسب طريقة[7]
ج- كشف الستيرويد[17]
ح- كشف الفينولات [18]

- دراسة الفعالية التثبيطية للمستخلصات أعلاه في نمو بكتريا *S. aureus*و*E.coli*

• مصدر الاحياء المجهرية

تم الحصول على العزلات البكترية مشخصة ونقية من مختبر الصحة المركزي /كربلاء.

- الأوساط الزراعية

استعمل وسط Mueller Hinton broth and Agar السائل والصلب في تقدير الفعالية التثبيطية للمستخلصات المائية والكحولية، إذ حضر حسب تعليمات الشركة المجهزة من شركة (Himedia) في تنمية وحفظ العزلات البكترية .

- تحضير تراكيز من المستخلصات النباتية المائية والكحولية المستعملة في الدراسة

حضر المحلول الخزين بإذابة 0.5 ملغرام من المستخلص في 25 مليلتر من المستخلص مذيب (10% ايثانول) إذ أصبح التركيز 20مايكروغرام/مل، ومنه تحضر 10 مايكروغرام /مل بأخذ 5 مل من التركيز الخزين واضافة 5 مليلتر من المذيب.

- دراسة الفعالية التثبيطية للمستخلصات النباتية المائية والكحولية المستعملة في الدراسة وبتراكيز مختلفة في العزلات البكترية قيد الاختبار

استعملت طريقة اختبار الحفرة Well assay بحسب ما ورد ذكره[19] وعلى النحو الاتي :حضر الوسط Mueller Hinton agar وزرع الوسط في اطباق بتري وكان حجم الوسط المذاب المصبوب في الاطباق بين 23-25مل بعد تصلب الوسط نقل 0.1 مل من الأوساط الزراعية السائلة المنماة فيها انواع البكتريا وزرعت باستعمال قضيب زجاجي منحني معقم وحضنت في درجة حرارة 37م لمدة ساعتين ،أخرجت الاطباق من الحاضنة وثقبت باستخدام الة تثقيب الفلين ، وكان قطر الحفرة 5 ملم وضع 0.05 مل من المستخلصات بتركيز 10 مايكروغرام/مل و 20 مايكروغرام/مل نقلت الى الثلاجة وتركت لمدة ساعتين بعدها نقلت للحاضنة 37م لمدة 18 ساعة تم قياس منطقة التثبيط بوحدات الملم والمسطرة منقوص منه حجم الحفرة. كررت العملية مرتين واستخدمت 4 حفر لكل معاملة.

- حللت البيانات احصائيا بتحليل التباين وقورنت المتوسطات باستعمال اقل فرق معنوي عن مستوى احتمالية 0.05[20].

النتائج والمناقشة

تأثير المستخلصات المائية للنباتات الطبية في نمو بكتريا *E.coli* و*S.aureus*

أظهرت النتائج في الجدول (2) والشكل (1و2) وجود فروق معنوية ($P<0.05$) بين انوع المستخلصات المائيه والتراكيز في قطر منطقة التثبيط لبكتريا *S.aureus* و*E.coli* ، وضح شكل(1) ان مستخلص الحبة الحلوة وبتركيز 10 مايكروغرام/مل اعطى اكبر منطقة تثبيط نمو بلغت 16 ملم مقارنة مع مستخلص الحبة السوداء عند نفس التركيز الذي اعطى 0 ملم ويرجع السبب الى احتوائها على نسبة عالية من الفينولات تؤدي الى عدم قدرة البكتريا على الاستمرار من خلال تثبيط الانزيمات المسؤولة عن تفاعلات الايض الأساسية ومسخ البروتينات [21].واعطى مستخلص الكمون لتركيز 20 مايكروغرام/مل اكبر منطقة تثبيط نمو بلغت 13.5 ملم مقارنة مع مستخلص الحبة السوداء عند نفس التركيز الذي اعطى 0 ملم ويرجع السبب الى الزيوت الطيارة والتربينات التي لها القدرة على تثبيط عمل الاحياء المجهرية [23]. بينما شكل (2) اظهر تأثير مستخلص الحلبة عند التركيز10 مايكروغرام/مل اكبر منطقة تثبيط نمو في نمو بكتريا *E.coli* بلغت 6ملم مقارنة مع مستخلص الحبة الحلوة ومستخلص الكمون اللذان اعطى اقل منطقة تثبيط نمو بلغت 1 ملم ويعزى السبب الى ويرجع سبب ذلك الى وجود القلويدات والاحماض الدهنية المشبعة والغير مشبعة التي لها دور في قتل الاحياء المجهرية من خلال تداخلها مع DNA [22] . وأعطى مستخلص الكمون عند التركيز 20 مايكروغرام/مل اكبر منطقة تثبيط نمو بلغت 11ملم مقارنة مع مستخلص الحبة السوداء عند نفس التركيز بلغت 0 ملم ويرجع سبب ذلك الى احتوائها على التربينات مثل الثايمول والكارفوكول التي لها تاثير على الاحياء المجهرية [24].

تأثير المستخلصات الكحولية للنباتات الطبية في نمو بكتريا *E. coli* و*S. aureus*

أوضحت النتائج في الجدول (3) والشكل (3و4) وجود فروق معنوية ($P<0.05$) بين انوع المستخلصات المائيه والتراكيز في قطر منطقة التثبيط لبكتريا *S.aureus* و*E.coli* ، فقد بين الشكل (3) ان مستخلص الكمون وبتركيز 10 و 20 مايكروغرام/مل اعطى اكبر منطقة تثبيط نمو بلغت 23 و26 ملم على الترتيب مقارنة مع مستخلص الحبة السوداء عند نفس التركيزين الذي اعطى 0 ملم ويرجع سبب تبيط البكتريا الى وجود المركبات الفعالة التي يحتوي عليها الكمون مثل الزيوت الطيارة والتربينات والفينولات [25]. بينما شكل(4) اعطى مستخلص الحبة الحلوة عند التركيز10 مايكروغرام/مل اكبر منطقة تثبيط نمو بكتريا *E.coli* بلغت 16ملم مقارنة مع مستخلص الحبة السوداء عند نفس التركيز الذي اعطي 0 ملم ويعود سبب ذلك الى وجود المركبات الثانوية مثل الفلافونيدات والكلايكوسيدات والفينولات وان الفلافونيدات تمتلك فعلا حيويا قويا[26]. وأعطى مستخلص الكمون عند التركيز 20 مايكروغرام/مل اكبر منطقة تثبيط نمو بلغت 19.5ملم مقارنة مع مستخلص الحبة السوداء عند نفس التركيز بلغت 0 ملم ويرجع سبب ذلك الى احتوائها على المركبات الهيدروكابونية والكحولية مثل Cuminaldihyde, Cuminicalcohol [23].

لوحظ ان هنالك اختلاف في التأثير المثبط لتراكيز المستخلصات نفسها على الكائن المجدي ،إذ وجد ان هنالك اختلاف في درجة تأثير التراكيز باختلاف نوع الكائن المجدي والتركيز ونوع المستخلص المستعمل وتبين النتائج ان البكتريا الموجبة لصبغة كرام والمتمثلة ب S.aureus اكثر حساسية لتراكيز المستخلصات مقارنة بالبكتريا السالبة لصبغة كرام والمتمثلة ب E.coli وهذا يعود الى الاختلاف في التركيب الكيميائي للجدار الخلوي البكتيري ،إذ ان مكونات وتركيب الجدار

الخلوي للبكتريا الموجبة لصبغة كرام ابسط من التركيب الخلوي للبكتريا السالبة لصبغة كرام ومن ثم يكون من السهولة مهاجمته واختراقه من قبل الجزيئات الغريبة كالمستخلصات المستعملة قيد الدراسة [26].

المصادر

1- المياح ، عبد الرضا علوان . (2001) . النباتات الطبية والتداوي بالاعشاب . مركز عبادي للدراسات والنشر - صنعاء – اليمن.

2- السعدي، علي حمود وباسم كاظم بريسم ومنى نجاح الطريحي. (2013) النباتات الطبية. دار الرضون للنشر والتوزيع – عمان.

3- الشحات، نصر أبو زيد. 2000. الزيوت الطيارة. قسم الزراعة وانتاج النباتات الطبية والعطرية شعبة البحوث الصيدلية والدوائية المركز القومي للبحوث بالقاهرة. الدار العربية للنشر والتوزيع ع ص 257.

4- قطب، فوزي طه. (1981) . النباتات الطبية زراعتها مكوناتها. دار المريخ للنشر. الرياض.

5- تقي، رامي علي وامنة نعمة التويثي وصفاء عبد لطيف المعيني. (2010). الكشف الكمي والنوعي لبعض المركبات الفعالة لبذور الحلبة المحلية *Trigonella foenum – graecum* المجلة العراقية للتقانات الحياتية 396-385:(3)9.

6- النجار ، عبد الرحمن (1997) أسرار جديدة عن حبة البركة ، دار ألأخبار اليوم – القاهرة

7- محمود، مهند جميل.(2008). كيمياء النباتات الطبية.المكتبة الوطنية ببغداد.ص5-6.

8- Sur, P.; Das, M.; Gomes, A.; Vedasiromoni, J.R.; Sahu, N.P.; Banerjee, S.; Sharma, R.M and Ganguly, D.K. 2001. *Trigonella foenum graecum* (Fenugreek) seed extract as an antineoplastic agent.Phytother Res.,15(3):257-259.

9-De M.: De AK. ; Mukhopadyay, R. ; Banerjee, AB. And Miro, M. 2003. Antimicrobial activity of *Cuminum cyminum* L . Ars pharmaceutica , uu (3) , PP: 257-269.

10- Newall, C. A.; Anderson, L. A. and Phillipson, J. D.(1998). Herbal Medicines AGuide for Health care professional. 2nd ed. London. *The pharmaceutical Press*,PP: 117-118.

11- Akgul , A . Antimicrobial activity of black cumin (*Nigella sativa*) essential oil . Gazi Journal of Faculty of Pharmacology , 6: 63 – 66 (1989).

12- Micheal,L.A.C.(2003). *Nigella sativa* .L commonly known as "Love in the Mist"abeautiful middile eastern herb with many Uses .Islam on line .Net.

13- Hansel, R. Keller, k. and Rimpler, H. (1993). Foeniculum . Hagers Handbuch Der Pharmazeutishen . New York : 156-810 .

14- Marotti, M.and R. Piccaglia. 1992. The Influence of distillation condition on the essential composition of three varieties of (*Foeniculum vulgare* Mill.). Journal of essential oils Reseaech. (USA). 4 (6) : 569 – 576.

15-Shiata, I.M. (1951). A pharmacological study of *Anagallis arvensis* M.D.Vet. Thesis Cairo University

16-Harbone, J. (1973). Phytochemical methods. Chapman and Hall. London.

17-Al-Abid, M.R., (1985). Zurrzusamme mse turungder Abschla B membrane in *Phoenixdactylifera*. Wurzburg University . Wuzzburg, F.R. of Germany, 153-140

18-Adeday ,O.; Aderson , W.; Young ,M.; Sncickus,V.; patil;P. and kolawole,D.(2001). Photochemistry and antibacterial activity of *san flower* pharmuct.Biol.,39:1-5.

19-Gupt,P.K.,MitalB.K.,andGargS.K,1996.Characterizationof lactobacillus acidophilus strains for use as dietary adjunct international J.Food Mic.29(7).

20- Steel, R.G.D. and J.H. Torrie, 1981. Principles and Procedures of Statistic .Mcgraw.Hill book Co., Inc.N.Y.pp.485.

21-Hamburger, H.and Hostettmann, K.(1991).The link between phytochemistry and Medicine.Phytochemistr,30:3864-74.

22-Phillipson, J.D and Oneill , M.J. (1987) . Newleads to the treatment of protozoal infections based on natural product molecules Acta.Pharm. Nord; 1; 131-144.

23-De M.; De A.K.; Mukhopadyay, R.; Banerjee, A.B. and Miro, M. (2003). Antimicrobial activity of *Cuminum cyminum* L. Ars Fharmaceutica .44 (3): 257- 269

24- Cowan , M.M.1999. Plant products as antimicrobial agents . Clinical Microbiology Reviews . 12(4) : 564-582.

25- Yan J.H, Tang K.W, Zhong M. Deng N.H. (2002): Determination of chemical components of volatile oil from *Cuminum cyminum* L. by gas chromatography-mass spectrometry . SePu. Nov; 20(6):569-72. (English abstract)

26. Brantner, A.; Males, Z.; Pepeljnjak, A. and Antolic, A. **1996,** *Antimicrobial activity of Pliurus spinachristi mill.* J. Ethnopharmacol., 52: 119-122.

27-Franklin,T.J.and G.A.Snow.1981.Biochemistry of antimicrobial,chapman and Hll:London

جدول (1) المركبات الفعالة الموجودة ضمن المستخلصات الكحولية للنباتات الطبية المدروسة

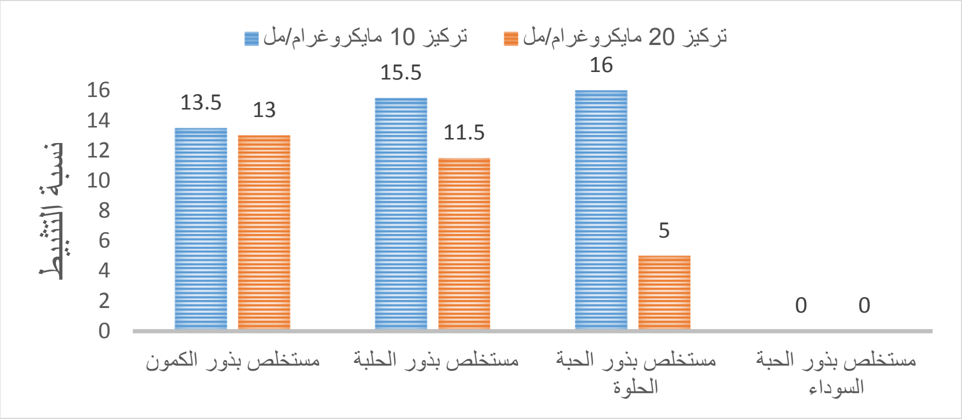
الكواشف	الكمون	الحلبة	الحبة الحلوة	الحبة السوداء
القلويدات	-	+	+	+
كلايكوسيدات	+	+	+	+
صابونيات	+	+	-	+
تاينينات	-	-	+	+
فينولات	+	+	+	+
ستيرويد	+	+	+	+
فلافونيدات	+	+	+	+

جدول(2) أقطار مناطق تثبيط النمو(ملم) للمستخلصات المائية في بكتريا S. aureus وE. Coli

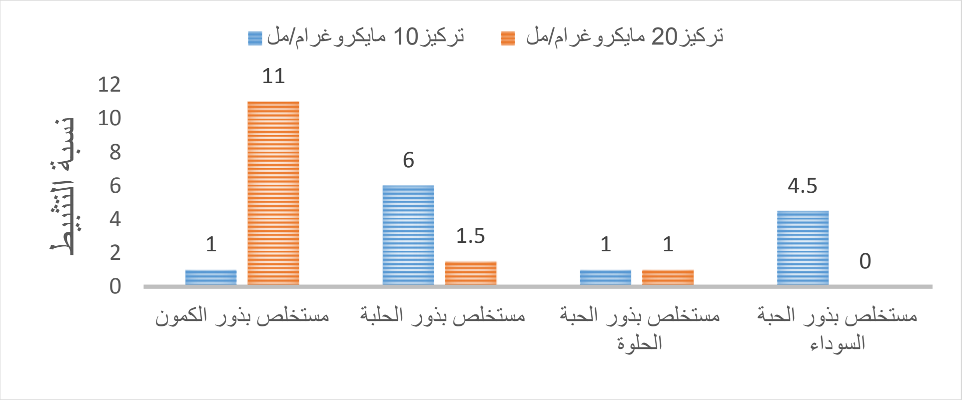
قطر دائرة تثبيط (ملم)				المستخلصات النباتية
E. coli		*S. aureus*		
التركيز مايكروغرام/مل		التركيز مايكروغرام/مل		
20	10	20	10	
11	1	13	13.5	مستخلص بذور الكمون
1.50	6	11.5	15.5	مستخلص بذور الحلبة
1	1	5	16	مستخلص بذور الحبة الحلوة
0	4.5	0	0	مستخلص بذور الحبة السوداء
0.98	0.98	4.46	11.49	L.S.D

جدول(3) أقطار مناطق تثبيط النمو(ملم) للمستخلصات الكحولية في بكتريا *S. aureus* و*E. Coli*

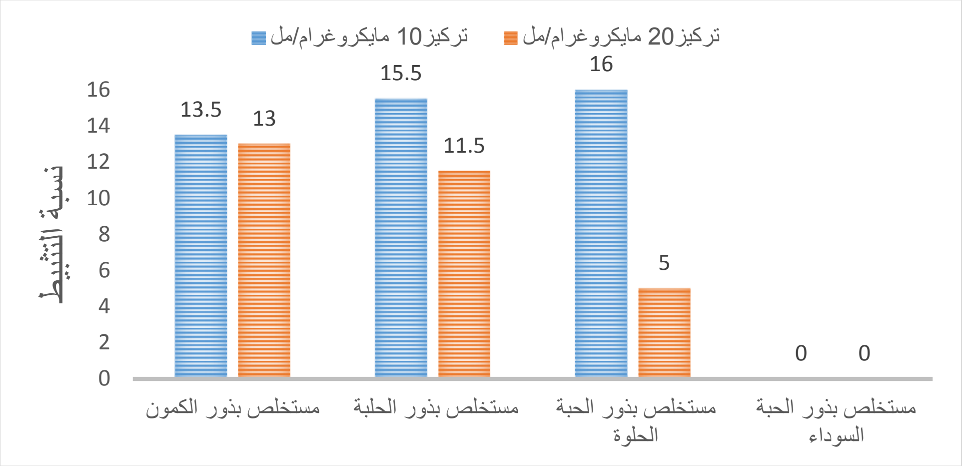
قطر دائرة التثبيط (ملم)				المستخلصات النباتية
E. coli		*S. aureus*		
التركيز مايكروغرام/مل		التركيز مايكروغرام/مل		
20	10	20	10	
19.5	13	26	23	مستخلص بذور الكمون
13.5	15.5	17.5	14.5	مستخلص بذور الحلبة
2	16	25.5	18	مستخلص بذور الحبة الحلوة
0	0	0	0	مستخلص بذور الحبة السوداء
3.1	11.4	7.9	10.9	L.S.D



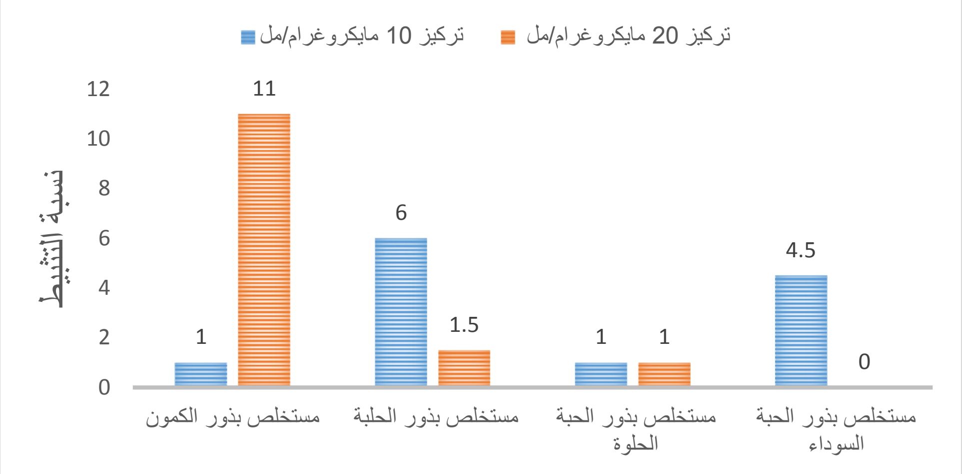
شكل (1) اقطار مناطق تثبيط النمو في بكتريا *S. aureus* باستخدام انواع من المستخلصات المائية



شكل (2) اقطار مناطق تثبيط النموفي بكتريا *E. coli* باستخدام انواع من المستخلصات المائية



شكل (3) اقطار مناطق تثبيط النموفي بكتريا *S. aureus* بأستخدام انواع من المستخلصات الكحولية



شكل (4) اقطار مناطق تثبيط النمو في بكتريا *E. coli* باستخدام انواع من المستخلصات الكحولية

Evaluation of Inhibitory Efficiency for Some Aqueous and Alcoholic Extracts of Cumin, Fenugreek, Sweet Fennel and Black Cumin in Growth of *Escherichia Coli* and *Staphylococcus Aureus Bacteria*

Taif Majid Abdulhussein
Shatha Abdullah Allaithi
Aemen Jassim Mahdi
Zeina Motlik Mouhsen

College of Agriculture/ University of Kerbala

Received in:19 /April/ 2016, Accepted in:19/ July/ 2016

Abstract

A factorial experiment was conducted at the laboratories of the College of Agriculture – Kerbala University during 2016. The aim was inhibitory efficiency for some aqueous and alcoholic extracts of Cumin, Fenugreek, Sweet Fennel and Black cumin in growth of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus bacteria*. Results of Lab the extracts alcoholic, Concentrations 10, and 20 µg/ml giving to the highest percentage of inhibition from water extracts for both types of bacteria. Alcoholic extract of cumin highest percentage inhibition and concentration reached 23 and 26 mm, respectively, for the bacterium *Staphylococcus aureus*, while the bacteria *Escherichia coli* giving the alcoholic extract of the concentration of 20 µg/ml and extract alcohol for sweet concentration of 10 µg/ml highest rate was 19.5 mm and 16 mm respectively compared with other types of extracts.

Kay words: inhibitory efficiency, aqueous extracts, alcoholic extracts.