University of Benghazi
Faculty of Education Al marj
Global Libyan Journal

جامعة بنغازي
كلية التربية المرج
المجلة الليبية العالمية

العدد العاشر - أكتوبر 2016

دراسة تأثير المواد الفعالة المستخلصة من بذور الخردل الأبيض Brassica alba بواسطـــة مذيب الكلـــــوروفورم على بعض الأنواع البكتيرية الممرضة

أ. رمضان محمد عبدالرحمن بوحنتيشة.

(عضو هيئة تدريس بقسم الأحياء - كلية التربية - جامعة عمر المختار – البيضاء - ليبيا)

University of Benghazi
Faculty of Education Al marj
Global Libyan Journal

جامعة بنغازي
كلية التربية المرج
المجلة الليبية العالمية

العدد العاشر - أكتوبر 2016

دراسة تأثير المواد الفعالة المستخلصة من بذور الخردل الأبيض Brassica alba بواسطـــة مذيب الكلـــــوروفورم على بعض الأنواع البكتيرية الممرضة

الملخص:

أجريت دراسة تطبيقية لمعرفة مدى تأثير مستخلصات الكلوروفورم Chloroform extract لبذور نبات الخردل الأبيض *Brassica alba* على ثلاثة أنواع من البكتيريا وهي: البكتيريا العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* والبكتيريا الغائطية *Escherichia Coli* وبكتيريا الليستيريا ذات النشوء الخلوي وحيد النواة *Listeria monocytogene* ، وذلك عند استخلاص مكوناتها النشطة الفعالة على ثلاثة فترات زمنية مختلفة (24 – 48 – 72 ساعة) وقد بينت هذه الدراسة أن للمستخلصات تأثيراً مثبطاً وبنسب متباينة على أنواع البكتيريا محل الدراسة ، حيث ظهر أن المستخلص ذو الفترة الزمنية 72 ساعة كان الأقوى من حيث التأثير التثبيطي . وكانت النتائج المتحصل عليها من خلال هذه الدراسة قريبة إلى حدٍ ما من تلك النتائج التي بينتها القدرة التثبيطية لكلٍ من المضاد الحيوي الإمبيسيلين Ampicillin والسيفاتكسين Cephataxin على نفس الأنواع البكتيرية سالفة الذكر . حيث أظهرت الدراسة قيماً تقريبية للتراكيز المنخفضة المثبطة لكل مستخلص ، وكذلك تبين أنه ما من سمية مطلقة لهذه المستخلصات Extracts على دم الإنسان Human blood.

Abstract

An Empirical Study was conducted to find out what the impact of Chloroform extract of the seeds of the plant white mustard (Brassica alba) on three types of bacteria namely: Staphylococcus aureus and Escherichia Coli and Listeria monocytogene, so when you draw effective active ingredients in three different time periods (24- 48 - 72 hours), this study has shown that the inhibitory effect of extracts and varying percentages of the types of bacteria under study, where he appeared to extract a time period of 72 hours was the strongest in terms of the inhibitory effect. The results obtained through this study close to some extent from those results outlined by the inhibitory capacity of each of the antibiotic Ampicillin and antibiotic Cephataxin on the same aforementioned bacterial species. The study showed an approximate values of each extract low inhibitory concentrations, as well as showing that there is no absolute toxicity of thes extracts e on human blood.

المقدمـــــة *Introduction*

عثر الإنسان الأول على كثير من الأعشاب العطرية Aromatic herbs وتوصل إلى معرفة خصائصها الحيوية، وقام باستخدامها في عمليات التطبيب وتعطير الجسم (رياض 1969 م). ومع مرور الزمن تطور استعمال الأعشاب حيث بدأت الشركات الدوائية الكبرى في صناعة وتقليد ما يماثل المركبات الطبيعية صناعياً (منصور 1990 م). وقد أثبتت التجارب أن المادة الفعالة Active ingredient المخلقة معملياً لا تعطي نفس التأثير الفسيولوجي Physiological effects الذي تعطيه ذات المادة المستخلصة من النباتات الطبيعية (أبوزيد 2000م) ، لذلك آثرنا في هذا البحث أن ندرس تأثير مستخلصات بذور الخردل الأبيض كنبات طبيعي لمعرفة ما مدى تأثير مكوناته الطبيعية على حيوية بعض الأنواع البكتيرية الممرضة ومقارنة ذلك مع النتائج التي تظهر من خلال تجربة التأثير التثبيطي لنوعان من المضادات الحيوية المستخدمة على نفس الأنواع البكتيرية المستهدفة بالدراسة ، وكذلك محاولة معرفة ما مدى سُمّية هذه المستخلصات وتأثيرها على دم الإنسان . وبما أن هذه الدراسة تخص نبات الخردل الأبيض فقد وجب وصفه وإعطاء نبذة تعريفية بسيطة عنه .

نبات االخردل الأبيض *Brassica alba (Mustard)* :

هو نبات حولي شتوي أوراقه بسيطة ريشية التعــرق Pinnate venation متبادلة، الأزهار صفراء ذهبية ينتج عنها خرادل تحمل من 10- 12 بذرة (سلامة 1994م) حيث تحتوي بذور هذا النبات على زيوت ثابتة ومواد هلامية علاوة على 25% بروتين (kelmanson *et al.*,2000) .

الهدف من هذه الدراسة *The aim of this study* :

1. أول أهداف هذه الدراسة هو معرفة مدى التأثير التثبيطي لمستخلصات الكلوروفورم لبذور الخردل الأبيض *Brassica alba* على ثلاثة أنواع من البكتيريا وهي :

Staphylococcus aureus ، *Escherichia coli* ، *Listeria monocytogene* .

2. تحديد التراكيز المثبطة الدُنيا لكل مستخلص .
3. اختيار أفضل زمن استخلاص ذي تأثير مثبط لنمو الأنواع البكتيرية التي شملتها الدراسة.
4. مقارنة النتائج المتحصل عليها بالنتائج التثبيطية التي تظهرها مضادات الأمبيسيلين Ampicillin والسيفاتكسين Cephataxin على نفس الأنواع البكتيرية موضع الدراسة .
5. اختبار سُمّية Toxicity مستخلصات بذور الخردل الأبيض على دم الإنسان .

تحضير البذور والبكتيريا لإجراء الاختبار *Seedbed preparation and bacteria to take the test* :

جمعت البذور من الأسواق المحلية الليبية Local market وغسلت بمادة الهيبوكلورايت 3% ثم أعيد غسلها بالماء المقطر للتخلص من أثر المادة المعقمة ، بعد ذلك وضعت في فرن عند درجة حرارة 30 درجة مئوية لمدة 5 دقائق وذلك للتخلص من الرطوبة ، ثم طحنت وحفظت في أوعية زجاجية معقمة محكمة الإغلاق (Al-delaimy & Ali, 1969) .

الأنواع البكتيرية التي شملتها الدراسة *Bacterial species studied*:

اشتملت الدراسة على الأنواع البكتيرية الآتية :

Staphylococcus aureus موجبة الجرام وبكتيريا *Escherichia Coli* سالبة الجرام والبكتيريا *Listeria monocytogenes* موجبة الجرام . وقد تم الحصول على هذه الأنواع مُعَرّفة من حيث الجنس والنوع من معمل تحليل مستشفى مركز بنغازي الطبي .

طريقة العمل *Methods* :

تحضير المستخلصات *Prepare extracts* :

تمت عملية استخلاص المادة الفاعلة حسب طريقة (Farag *et al.*, 1993) وذلك بإضافة 10 جرام من مسحوق البذور إلى 200 مل من مذيب الكلوروفورم ، ثم وضعت في الجهاز الهزاز بسرعة 100 دورة في الدقيقة تحت درجة حرارة الغرفة لجعل المستخلص أكثر تجانساً على ثلاث فترات زمنية مختلفة (24 – 48 – 72 ساعة) ، بعد ذلك أخذت المستخلصات الناتجة ، وتم تبخير كل منها على حِدَة باستخدام جهاز التبخير Rotary evaporator ، ثم جفف الراشح في الفرن الكهربائي بدرجة 40 درجة مئوية لغرض الحصول على المادة الخام الجافة على هيئة مسحوق ، ثم بعد ذلك أُخذ مقدار 2 جرام من المادة الخام الجافة وأذيبت في 100 مل من (ماء مقطر مرتين) بحيث يصبح تركيز المحلول الأساسي 2% أو ما يعادل 20 ملغم / مل .

اختبار التراكيز المثبطة الدُنيا *concentrations* Test minimum inhibitory :

حُددت التراكيز المثبطة الدُنيا لمستخلصات بذور الخردل الأبيض ضد الأنواع البكتيرية المستخدمة في هذه الدراسة حسب طريقة (National Committee for clinical Laboratory Standards) حيث حضر محلول من كل مستخلص وذلك بإذابة 10.25 ملجم من المستخلص في 4 مل من المذيب Di methyl sulfoxaid (DMSO) وحضرت سلسلة من التخافيف المتتابعة Serial dilutions على النحو التالي :

(128، 64 ، 16، 8 ، 4 ، 2 ، 1 ، 0.5 ، 0.25 ، 0.125 ، 0.06 ، 0.03) مايكرو جرام / مل ، ثم مُزج 1 مل من كل تخفيف من التخافيف السابقة مع 9 مل من وسط Muller Hintion Agar (MHA) الملقح بمُعلق بكتيري لكل نوع من أنواع البكتيريا المختبرة على حِدَة بتركيز $10^6 \times 1$ خلية بكتيرية / مل حسب ما ذكر (Colle *et al.*, 1996) ، ثم بعد ذلك تم تحضين الأطباق في درجة حرارة الغرفة لمدة 24 ساعة وسجلت بعد ذلك النتائج وحدد التركيز المثبط الأدنى لكل مركب .

المعاملة بالمستخلص Treatment by abstract:

جرى تحضير 120 طبق بتري معقم يحتوي كلاً منها على الوسط الغذائي Muller Hintion Agar وحُضر حسب تعليمات الشركة المنتجة له (Freitas & Silve 2000) ، لُقح الوسط الغذائي بـ 0.1 مل من المعلق البكتيري تركيزه $10^6 \times 1$ خلية بكتيرية / مل . نُشر بعد ذلك باستخدام ناشر زجاجي Glass spreader ، تُركت بعدها الأطباق لمدة 40 دقيقة ثم حُفرت أربع حفر بقطر 8 ملم لكل حفرة باستخدام ثاقب زجاجي معقم وأضيف 100 ميكرون من المستخلص النباتي تركيزه 0.10 ملغ/ مل في كل حفرة باستخدام الماصة الدقيقة Micropipette ، حُضنت جميع الأطباق في درجة حرارة 37 درجة مئوية ثم أُختير 30 طبق من كل نوع بكتيري وقيس قطر منطقة التثبيط وقورنت النتائج مع نتائج التأثير التثبيطي للمضاد الحيوي أمبيسيلين Ampicillin كمضاد حيوي للبكتيريا الموجبة وكذلك مضاد السيفاتكسين Cephataxin كمضاد حيوي لجميع الجراثيم (Yoon *et al.*, 2007) .

اختبار تحديد السُمّية الخلوية Testing to determine the cellular toxicity :

تم تحديد السمية الخلوية Cytotoxicity لمستخلصات بذور الخردل الأبيض وذلك بحسب ما ذكر (Xian *et al*., 1994) ، إذ حضر محلول رينجر الفسيولوجي Ringer solution المعقم ، وذلك بإذابة 0.9 جم من كلوريد الصوديوم (NaCl) مع 0.09 جم من كلوريد البوتاسيوم (KCL) مع 0.024 جم من كلوريد الكالسيوم ($CaCl_2$) و 0.03 جم من بيكربونات الصوديوم ($NaHco_3$) و 0.2 جم جلوكوز في 100 مل من الماء المقطر . تم إضافة 18 مل من محلول رينجر الفسيولوجي إلى 2 مل من دم مسحوب من إنسان ثم حضرت التخافيف التالية (1:1 ، 1:10 ، 1:100 ، 1:1000) للمستخلصات باستخدام ماء مقطر ، ثم وضع 0.8 مل من كل تخفيف في أنبوبة اختبار معقمة وأضيف لكل أنبوب 0.2 مل من الدم ليصبح الحجم الكلي لكل أنبوب 1 مل ، بعد ذلك حُضنت الأنابيب في الحاضنة بدرجة حرارة 37 درجة مئوية ثم تركت لمدة 72 ساعة لملاحظة التحلل الدموي Haemolysis .

النتائج والمناقشة *Results & Discussion*

أشارات النتائج المدونة في الجدول (1) إلى مدى تأثير وفعالية المستخلص البذري على عموم الأطباق البكتيرية حيث تم إعداد 120 طبق بتري كما ذُكر سلفاً واختير منها 90 طبق لإجراء الاختبار أي 30 طبق لكل نوع بكتيري ، فكان متوسط عدد الأطباق الذي تأثر تثبيطياً بالمستخلص على بكتيريا *Staphylococcus aureus* 22 طبق تقريباً وعلى بكتيريا *Escherichia Coli* 27 طبق تقريباً ، أما فيما يتعلق ببكتيريا *Listeria monocytogenes* فقد بلغ متوسط عدد الأطباق التي تأثرت بالمستخلصات 26 طبق تقريباً، وهذا يرجع في حقيقة الأمر لعدم نمو مجموعة من الأنواع البكتيرية في بعض الأطباق وفساد البعض الآخر من جراء التلوث Contamination .

جدول (1) : يوضح فعالية المستخلصات المحضرة وعدد الأطباق البكتيرية التي أبدت استجابة تثبيطية

البكتيريا	عدد الأطباق المختبرة	عدد الأطباق التي أبدت استجابة للمستخلصات			المتوسط
		مستخلص 24 س	مستخلص 48 س	مستخلص 72 س	
Staphylococcus aureus	30	20	23	23	22
Escherichia Coli	30	28	28	26	27
Listeria monocytogenes	30	28	26	26	26

حيث س : ساعة .

يوضح الجدول (2) نتائج التأثير المثبط للتراكيز الدُنيا للمستخلصات الثلاثة (24 ، 48 ، 72 س) لبذور الخردل الأبيض حيث أظهر المستخلص الأول

تركيز مثبط أدنى ضد البكتيريا *St. Aureus* والبكتيريا *E. Coli* والبكتيريا *Li. Monocytogenes* بلغ 2.0 ، 2.0 ، 3.0 مايكرو جرام / مل على التوالي ، في حين قلت نسبة التراكيز المثبطة المنخفضة لمستخلص الـ 48 ساعة لتكون 0.5 ، 0.5 عند اختبارها على البكتيريا *E. Coli* والبكتيريا *Li. Monocytogenes* ، فيما لم تتغير نسبة التركيز المثبط الأدنى للمستخلص عند اختباره على بكتيريا *St. Aureus* *والبالغة* 3.0 مايكرو جرام / مل .

وقد زاد التركيز المثبط في الانخفاض عند استخدام مستخلص الـ 72 ساعة ليصل إلى 0.25 ، 0.125 ، 0.25 مايكرو جرام / مل على التوالي .

ويُعزي ظهور هذه النتائج إلى أن المركبات الفعالة والتي ورد ذكرها في فقرات سابقة والتي يحتوي بعضاً منها على مجاميع هيدروكسيل حرة ومتعددة يزداد تركيزها بزيادة الرج وبتالي تكون مقدرتها التثبيطية قوية حتى في أدنى تركيزها ، وهذا يتفق مع ما خلُص إليه (حسين 1981م)، في حين أن التقليل من زمن الرج يساعد على تكوين أواصر هيدروجينية بين مجاميع الهيدروكسيل الحرة والمتعددة للمستخلص مع مجاميع الكبريت للبروتينات الموجودة في بذور الخردل مما يؤدي إلى تغير طبيعة البروتينات الخلوية التي تساعد على ترسيب مجاميع الهيدروكسيل وبتالي تفقدها جزء من قدرتها التثبيطية عندما تكون تراكيزها منخفضة وهذا يتوافق مع ما بينه (Feeny, 1998).

جدول (2) : يوضح التراكيز المثبطة الدُنيا للمستخلصات المنوطة بالدراسة .

البكتيريا	مستخلص 24 س	مستخلص 48 س	مستخلص 72 س
Listeria monocytogenes	2.0	0.5	0.25
Escherichia Coli	2.0	0.5	0.125
Staphylococcus aureus	3.0	3.0	0.25

حيث س : ساعة .

أما الجدول (3) فيوضح أن مستخلصات بذور الخردل الأبيض أبدت تأثيراً مثبطاً بنسب متفاوتة ضد الأنواع البكتيرية الداخلة في هذه الدراسة ، وكان التأثير التثبيطي الأقوى لمستخلص 72 ساعة في حين كان التأثير التثبيطي الأضعف لمستخلص 24 ساعة ، ويرجع ذلك إلى أن تركيز المواد الفعالة أو المؤثرة على الأنواع البكتيرية قد زاد بنسبة أكبر في مستخلص 72 ساعة منه في مستخلص 24 ساعة وهذا يتفق مع ما ذكره Youssef, (1995). أما محلول الـ 48 ساعة فقد مثل الحالة الوسطية من حيث التأثير ، ويرجع السبب في هذا التأثير التثبيطي إلى أن المواد الفعالة المستخلصة من البذور محل الدراسة ومن اشهرها القلويات والفلافونويدات والفينولات والجلايكوسيدات كما ذكر (Abdul-Rahman, 1995) تلعب دوراً أساسياً في عملية تثبيط تخليق البروتين Protein synthesis أو في التأثير على نفاذية Permeability الجُدر الخلوية للخلايا البكتيرية كما وأن لها قدرة على تحليل الحامض النووي DNA وهذا يتوافق مع ما ذكره (Desta, 1993).

جدول (3) :

يوضح فعالية المستخلصات ضد أنواع البكتيرية ومقارنتها مع تأثير نوعان من المضادات الحيوية .

اسم البكتيريا	مستخلص 24 س	مستخلص 48 س	مستخلص 72 س	Ampicillin	Cephataxin
Listeria monocytogenes	9	19	25	42	18
Escherichia Coli	11	20	25	--	28
Staphylococcus aureus	7	15	30	34	20

قطر التثبيط مقاس بوحدة (ملم) . حيث س : ساعة .

أما من ناحية السُمية فلم تُظهر المستخلصات الثلاثة أي سمية خلوية تذكر عند اختبارها على دم الإنسان . حيث أنها لا تسبب تحلل كريات الدم أو أي تغير أخر ملحوظ على عينة الدم وذلك خلال فترة الاختبار التي تُقدر بحوالي 72 ساعة ، وهذا يتوافق مع ما ذكرته منظمة الصحة العالمية World Health Organization (WHO) في إحدى تقاريرها الصادرة في عام 2000 .

References

1. **أبوزيد ، الشحات نصر** (1988م) . النباتات العطرية ومنتجات الزراعية والدوائية . الدار العربية للنشر والتوزيع القاهرة ، مصر .
2. **حسين ، فوزي طه قطب** (1981م) . النباتات الطبية ، زراعتها ومكوناتها . دار المريخ للنشر ، الرياض ، السعودية .
3. **رياض ، نجيب** (1969م) . الطب المصري القديم . دار الكرنك للنشر والتوزيع ، القاهرة ، مصر .
4. **سلامة ، فوزي محمود** (1994م) . تصنيف النباتات الزهرية . الدار العربية للنشر والتوزيع ، القاهرة ، مصر .
5. **منصور ، عثمان محمد** (1990م) . المستخلص في الطب النباتي والطبيعي . دار عمار للنشر والتوزيع ، عمان ، الأردن .

1. **Abdul-Rahman, G.Y.**(1995)Effect of some medicinal plants and chemicals on the growth of pathogenic bacteria. j. ver. Sci. 8 (2): 101-108
2. **Al-delaimy , K.S. and Ali, S. H.** Antibacterial action of vegetable extracts on the growth of pathogenic bacteria . J . vet . Sci . Food agric. ,21, 110 – 112 .
3. **Colle, J., Fraser , A., Marmion , B., and Simmans .A. Mackie and Mc- Cartney**. (1996). Practical medical microbiology . 14th ed . Churchill Livingston . New York , USA. 978 pp.
4. **Desta**. **B.** (1993). Ethiopian traditional herbal drugs : Antimicrobial activity of 63 medicinal plant. J . Ethnopharmacol., 39 : 129 – 139 .
5. **Farag, I. A., El-Maraghy , S. M. and Mustafa, M. E.** (1993). Antimicrobial activity of some essential oils from spices. Qatar university Sci. J. 1, 63-69 .
6. **Feeny, P**. (1998) . Inhibitory effect of Oak Leaf tannins on the hydrolysis of proteins by trypsine. J . Phytochemistry , 8 : 2119- 2126.
7. **Freitas, F. C., Silva, G. L.** (2000) . Antimicrobial activity of plant extracts and photochemical on antibacterial resistance bacteria Braz, J . Microbial 31(4) : 21- 30
8. **Kelmanson, J. E., Jager, A. K. and staden, J. V. Zulu .(2000).** Medicinal plants with Antimicrobial activity . J . Ethno phar., 69 : 241 – 246 .
9. **National Committee for clinical Laboratory Standards .** (1997) . Methods for diluition antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically . Approved standard **.** M7 – A4 **.** National committee for clinical Laboratory standards . Wayne . PA. USA.

10. **World Health Organization (WHO) .** (2000) . Guidelines for levels and kinds evidence to support claims for therapeutic goods ; WHO Geneva. Annex, V., P. 39 – 45 .
11. **Xian – guo, H. and Ursella, M.** (1994). Antifungal compounds from solanu nigrescens. J. Ethnopharm.,43: 173 - 177 .
12. **Yoon, Y., Belk, K. E., Smith, G. C., and Sofos, J. N.** (2007) . Antimicrobial activity of epsilon – polylysin against E. Coli , Salmonella typhimurium and Listera monocytogenes in various food extracts. J. of food Sci. 72 (8): M330 -4 .
13. **Youssef, M. S.** (1995). Mycoflora and mycotoxin of some medicinal plants and their Antimicrobial acivities in Egypt. Ph . D. Thesis, fac. Sci. Sohag, South Valley Univ. Egypt.