المجلة الطبية البيطرية العراقية 35 (1): 129 – 134 ، 2011

دراسة تأثير مستخلصات بعض النباتات في نمو جرثومة السل ومقارنتها مع مضاد Ethambutol

ميسون صباح عباس
وحدة الأمراض المشتركة - كلية الطب البيطري / جامعة بغداد

قبل للنشر في شباط 2011

الخلاصة

هدفت هذه الدراسة بحث دور المستخلصات الكحولية للنباتات الاتية (بذور الحلبة *Trigonella foenumgraecum* والكبابة *Piper cubeba* والفلفل الاسود *Piper nigrum* والكافور Camphora والمر *Commiphora molmol* وبذور الكرفس *Apium graveolens* والفول السوداني *Arachis hypogaea* وبذور الكتان *Linum usitatissumun* وبذور الكمون *Cuminum cyminum* وبذور اليانسون *Pimpinella anisum* وبذورالحبة الحمراء *Lepidium sativum* ، حضرت المستخلصات الكحولية للنباتات واستخدمت بتركيز 200 ملغم / مل وجرى اضافة 0.2 مل من كل مستخلص لكل 10 مل من الوسط الزرعي بالاضافة الى وسط زرعي حاوي على احد مضادات السل Ethambutol (0.2 مل / 10 مل من الوسط الزرعي) ووسط زرعي خال من اي اضافة للسيطرة وجرى زرع كل من هذه الاوساط بثلاثة قطرات من العالق الجرثومي الحاوي على 1ملغم /مل وبتركيز 10^8 من جرثومة السل المعزولة من احد المصابين بمرض السل وبعدها تم حضن الاوساط الزرعية في درجة 37 مئوية في الحاضنة واستمرت القراءة اسبوعياً لأكثر من 4 اسابيع واظهرت النتائج ظهور نمو جيد على الاوساط الزرعية السيطرة خلال 2-3 اسبوع اما الاوساط الزرعية الحاوية على المستخلصات (الفول السوداني وبذورالحبة الحمراء وبذورالحلبة ووبذورالكمون والمر) لم يظهر فيها اي نمو جرثومي وكذلك بالنسبة للوسط الزرعي الحاوي على المضاد الحيوي Ethambutol لم يظهر فيه اي نمو جرثومي في حين ا ظهرت الاوساط الزرعية الحاوية على الفلفل الاسود وبذور اليانسون اقل من 5 مستعمرات جرثومية مما يشير الى حساسية جرثومة السل للمستخلصات المذكورة اعلاه واظهرت الاوساط الزرعية الحاوية على الكبابة وبذور الكرفس والكافور نمواً جرثومياً اكثر من 5 مستعمرات واظهر الوسط الزرعي الحاوي على بذور الكتان نمواً غزيراً لجرثومة السل وهذا يشير الى مقاومة جرثومة السل للمستخلصات اعلاه .

Study the effect of some plants extracts on growth of *Mycobacterium tuberculosis* in Comparison with Ethambutol

Maysoon Sabah Abbas
Zoonotic Diseases Unit – College of Veterinary Medicine / Baghdad University

Summary

This study was conducted to investigate the inhibition role of alcoholic extracts of plants Trigonella foenumgraecum , Piper cubeba , Piper nigrum, Camphora , Commiphora molmol, Apium graveolens , Arachis hypogaea , Linum usitatissumun , Cuminum cyminum , Pimpinella anisum , Lepidium sativum , alcoholic extracts of plants used was prepared and used of concentration 200 mg/ml and add 0.2 ml of each extracts to 10 ml of media and 0.2 ml of Ethambutol to 10 ml of media the drug for mycobacteria and media with out any adding for controls. Cultural media were inoculated with 3 drops of bacterial suspension (1mg /ml) in concentration 10^8 cfu/ml from patient suffering from tuberculosis and after incubation on 37 °C the result read weekly up to 4 weeks . the results showed good growth on the control slopes , which was evident within 2-3 weeks and no growth on the cultural media

contain (Arachis hypogea , Cuminum cyminum , Commiphora molmol, Trigonella foenumgraecum , Lepidium sativum , Ethambutol) it while the media contain (Piper nigrum , Pimpinella anisum showed than 5 colonies the growth inhibition was recorded that means sensitivity of mycobacteria to the extracts mention above, while media contain (Piper cubeba , Camphora , Apium graveolens). showed growth more than 5 colonies and media contain Linum usitatissumun showed good growth which means resistant of mycobacteria to the extract mentioned above .

Key word : *Mycobacterium* , Ethambutol , plants extracts

E.mail : samir_75_74@yahoo. com

المقدمة

السل من الأمراض المزمنة المعدية تسببه أنواع متعددة من جرثومة السل (Mycobacteria) . ان إعداد المرضى المصابين بالسل في تزايد مستمر في العالم ولذا فهنالك حاجة لمواد مضادة لجرثومة السل فعالة تكون بديلة عن تلك المتوفرة حاليا . لذا كان التوجه نحو النباتات الطبية لدراستها ومعرفة موادها الفعالة ودورها في تثبيط نمو جرثومة السل (1) .

تلعب النباتات الطبية دورا مهما في حياة الشعوب و خاصة دول العالم الثالث حيث إن هذه الشعوب تستخدم النباتات في حياتهم اليومية ولعدة استعمالات في وجبات الطعام والطب الشعبي (2)

تعود الحلبة الى عائلة Papilionaceae . فهي تحتوي على اللسثين والكولين الذي يساعد في اذابة المواد الدهنية ويحوي معادن وفيتامينات (A , D) ويحوي ايضآ على para amino benzoic acid ونيورين وبايورتين ويحتوي على 20 – 30 % من البروتينات الغنية بالتربتوفان والايسين وفلوريدات وفلافونويدات واحماض امينية حرة وصابونين وكلايكوسيدات وزيوت طيارة . (3) اما الكبابة فتعود الى عائلة الفلفلية Piperaceae وتحوي زيتآ عطريآ مكونآ من تربينات احادية Monoterpenes و Sabinene و - thujene – carene وتحتوي Sesquiterpenes Cadinene و Cubebene و Germacrene واوكسيدات وكحول Cubebol (4) ويعود الفلفل الاسود للعائلة الفلفلية وهو غني بالعديد من المركبات الفعالة من قلوريدات وليمونين وزيوت عطرية ونشأ و رواتين . (5) ويعود الكافورالى عائلة Lauraceae وهو غني بالزيوت وله فعالية مثبطة للبكتريا والفطريات . (6)

واظهر التحليل الكيمائي للمستخلصات المثيلية (Methanolic exract) لنبات المر العائد لعائلة Lauraceae وجود المركبات الفينولية والقلويدات والصابونين (Saponines) وجدت بدرجة اقل في المستخلصات الكحولية (Ethyl acetate) . (7) ينتمي الكرفس الى عائلة Apiaceae ويحتوي على لوتيوان (Luteolin) وكيرستين (Quercetin) وفلافونيدات (Flavonoids) ومضادات اكسدة غير معروفة ويحتوي ليمونين وفتاليدات (Phthalin) وكومارينات (Coumarines) . (8) ويعود الفول السوداني الى عائلة Fabaceae ويحتوي عل احماض امينية مثل palmitic acid و oleic acid و بروتينات وفيتامينات B6 و B2 و B1 ويحتوي على اللسثين والارجنين بنسب عاليه (9) .اما الكتان يعود الى عائلة Linaceae ويحتوي على الكاربوهيدرات ودهون وفيتامينات (B9 و B6 و B5 و B3 و B2 و B1) ويحتوي كالسيوم ومعادن مثل المغنسيوم وبوتاسيوم وزنك (10) . وينتمي الكمون الى عائلة Lauraceae ويحتوي على cinnamaldehyole وهي من المركبات الفعالة الموجودة فيه واكدت الدراسات بان هذا المركب هو السبب في فعالية الكمون المضادة للبكتريا (11) .

اما اليانسون يعود الى عائلة Umbelleferia و تحتوي على الزيوت الطيارة ويتكون من pinene و dipentene و hydroquinone و Methylchaicol و cineol و terpineol و safrole (12) . تحتوي بذور الحبة الحمراء العائدة لعائلة Brassicaceae على مركبات كيميائية عدة منها الفاتوكوفيرول (α- tocopherol) وحامض الاسكوربك (Ascorbic acid)، و Benzyl- isothiocyanate ،و بيتاستوستيرول (β- sitosterol)، واليود، ونياسين، وحامض لينولك (Linoleic acid) والفلافونويدات والكومارين وكلايكوسيدات الكبريت والتربينات الثلاثية وستيرول (13) ان تطور المقاومة للمضادات الحيوية المستعملة ضد جرثومة السل دعت الى حاجة ماسة ومستمرة للكشف

عن مضادات ميكوبية جديدة ذات تراكيب كيميائية متنوعة واليات عمل قيمة والبحث عن العديد من البدائل من النباتات الطبية من اجل دراسة فعاليتها المضادة لجرثومة السل والحصول على علاجات طبيعية لتقوية المناعة وزيادة استجابة المرضى المصابين بالسل للعلاج لذا كان هدف البحث الدور التثبيطي لبعض المستخلصات الكحولية للنباتات في تثبيط نمو جرثومة السل ومدى تاثير التركيز المستخدم في التاثير التثبيطي للمستخلصات .

المواد وطرائق العمل

تم تحضير المواد الاتية :-

1 - **النباتات المستعملة** : اختبرت حساسية جرثومة السل لأحدى عشر نوع من النباتات وهي (بذور الحلبة ، الكبابة ، الفلفل الاسود ، الكافور ، المر ، بذور الكرفس ، الفول السوداني ، بذور الكتان ، بذور الكمون ، بذور اليانسون ، بذور الحبة الحمراء) . جرى الحصول على هذه النباتات من الاسواق المحلية لمدينة بغداد وثم تصنيفها في الهيئة العامة لفحص وتصديق البذور / قسم النبات / المصادر الوراثية / بنك الجينات وتم طحنها بصورة ناعمة ووضعت في قناني زجاجية نظيفة .

2 - **المستخلصات النباتية** : حضرت المستخلصات الكحولية للنباتات بالطريقة التالية : اخذ (100) غم من المسحوق النباتي الجاف وثم وضعه في دورق مخروطي سعة (1000) مل واضيفت له (500) مل كحول اثيلي بتركيز (70 %) وترك منقوعآ لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة الغرفة بعد ذلك رسب المزيج باستخدام جهاز الطرد المركزي 3000 دورة / دقيقة لمدة 15 دقيقة وجمع المحلول ثم رشح باستخدام ورق الترشيح Whatman No. 1 وبخر المحلول بجهاز المبخر الدوار (Rotary vaceum evaporator) بدرجة حرارة (40) درجة مئوية لحين الحصول على شكل كثيف حيث تم تجفيفه في الحاضنة بدرجة حرارة (37) درجة مئوية خلال (3 – 4) يوم وحفظ المسحوق الناتج في الثلاجة لحين الاستعمال (14)

3 - - **المحلول الخزين (stock solution) :** تم تحضير المحلول الخزين من المستخلص الكحولي للنباتات بإذابة كل (1) غم من المسحوق الجاف للنباتات في (5) مل ماء مقطر معقم بتركيز (200) ملغم / مل ورشح المحلول باستعمال Whatman membrane filter (0.22) وتم قياس الاس الهيدروجني له (14) .

4 - **المضاد الحيوي** : تم استعمال المضاد الحيوي (EMB) Ethambutol وحضر محلول (EMB) باذابة (100) مايكروغرام من المضاد الحيوي (EMB) في (1) مل من الماء المقطر المعقم وبعد ان يتم الذوبان يكمل الى (5) مل ماء مقطر واخذ 0.2 مل من المحلول واضيف الى (10) مل من الوسط الزرعي (10) .

5 - **البكتريا المستعملة :** تم استعمال جرثومة السل لعزلة مشخصة ومفحوصة لأحد المرضى المصابين بالسل حيث تم استخدام الوسط الزرعي الخاص بنمو جرثومة السل Stonebrink Media وثم اضافة (0.2) مل من كل مستخلص لكل (10) مل من الوسط الزرعي في قنينة زجاجية محكمة الغلق Screwcapped bottles بالاضافة الى وسط زرعي خالي من اي اضافة للسيطرة .

6 - العالق الجرثومي : حضر العالق الجرثومي بمقدار (1) مايكروغرام من الجراثيم في (1) مل من الماء المقطر المعقم ومزج العالق بشكل جيد في جهاز (Vortex Mixer) ولمدة (2) دقيقة واستخدم العالق بتركيز (10^8)

7 - **الزرع الجرثومي :** جرى زرع كل من الاوساط الحاوية على المستخلصات والمضاد الحيوي والسيطرة تم زرعها بثلاثة قطرات من العالق الجرثومي وبعدها تم حضن الاوساط الزرعية (Stonebrink Media) في درجة حرارة (37) درجة مئوية في الحاضنة واستمرت القراءة اسبوعياً لاكثر من (4) اسابيع (طريقة محورة عن المصدر رقم (16) .

النتائج

اظهرت النتائج نمو جيداً على الاوساط الزرعية للسيطرة خلال 2 – 3 اسبوع اما الاوساط الزرعية الحاوية على مستخلصات فكانت نتائجها كما هو موضح في جدول رقم 1

جدول (1) يبين النمو الجرثومي على الاوساط الزرعية المختلفة

الرقم	الوسط الزرعي	نتائج القراءة
1	الوسط الزرعي الحاوي علىمضادEthambutol	لايوجد اي نمو جرثومي
2	الوسط الزرعي الحاوي على الفول السوداني	لايوجد اي نمو جرثومي
3	الوسط الزرعي الحاوي على بذور الحبة الحمراء	لايوجد اي نمو جرثومي
4	الوسط الزرعي الحاوي على بذور الحلبة	لايوجد اي نمو جرثومي
5	الوسط الزرعي الحاوي على بذور الكمون	لايوجد اي نمو جرثومي
6	الوسط الزرعي الحاوي على المر	لايوجد اي نمو جرثومي
7	الوسط الزرعي الحاوي على الفلفل الاسود	4 مستعمرات جرثومية
8	الوسط الزرعي الحاوي على بذور اليانسون	3 مستعمرات جرثومية
9	الوسط الزرعي الحاوي على الكبابة	15 مستعمرة جرثومية
10	الوسط الزرعي الحاوي على الكافور	18 مستعمرة جرثومية
11	الوسط الزرعي الحاوي على بذور الكرفس	20 مستعمرة جرثومية
12	الوسط الزرعي الحاوي على بذور الكتان	25 مستعمرة جرثومية

المناقشة

بينت نتائج الدراسة بان الفول السوداني وبذور الحبة الحمراء وبذور الحلبة وبذور الكمون والمر كانت لها الاثر التثبيطي الواضح على نمو جرثومة السل وهذا يعود الى مكونات هذه النباتات وتاثيرها الواضح في تثبيط النمو الجرثومي حيث ان الفول السوداني يحتوي على تراكيز عالية من الارجنين وهو من الاحماض الامينية التي تساعد في انتاج اول اوكسيد النايتروجين ومنع البكتريا من النمو والتكاثر كما اشارة اليه الدراسات الحديثة في استخدام الفول السوداني في معالجة حالات التدرن الرئوي الحادة (17) . وأشارت المصادر الى ان بذور الحبة الحمراء لها فعل مضاد لنمو البكتريا وذلك من خلال ما تحتويه من benzylisothiocyanate (13) . واظهرت بذور الحلبة تثبيط واضحآ في نمو جرثومة السل وهذا ربما يعود الى المركبات الكيميائية الموجودة في الحلبة مثل اللايسين وتربتوفان والياف وصابونين وكومارين والاحماض اذ ان الفينولات معروفة بخصائصها المضادة للبكتريا من خلال اعاقة حركة البروتون وبالتالي تسبب تسرب المكونات داخل الخلوية وتثبيط الانزيمات وتجلط المكونات السايتوبلازمية (18) . واظهرت بذور الكمون تثبيط واضحآ وفعال في منع نمو جرثومة السل وهذا يعود إلى الأحماض الامينية والمواد الفعالة التي يحتويها الكمون والتي تعيق وظائف عمليات الايض للخلايا البكترية (19) . كما اظهر المر تثبيط واضح لنمو جرثومة السل من خلال تأثير المواد الموجودة فيه مثل oleo – gum resin وهذه المادة تستعمل في علاج السعال (20) . واظهر الفلفل الأسود وبذور اليانسون نموا اقل من 5 مستعمرات جرثومية حيث يعد وجود اقل من 5 مستعمرات لجرثومة السل في الوسط ألزرعي تعد الجرثومة حساسة للمستخلصات كما تم الإشارة إليه من قبل الباحث (16) . إما بالنسبة للمستخلصات النباتية لبذور الكرفس والكافور والكبابة والكتان فقد أظهرت نمو أكثر من 5

مستعمرات جرثومية مما يشير إلى مقاومة جرثومة السل لهذه المستخلصات كما تم الإشارة إليه من قبل الباحث (16) . إن النتائج السلبية قد تعزى إلى إن المركبات الفعالة قد تكون موجودة بكميات غير كافية في المستخلص الخام لإعطاء فعالية بالجرع المستخدمة وحتى اذا كانت المادة الفعالة موجودة بكميات عالية فربما تكون هنالك مكونات اخرى تظهر تاثيرات مضادة للتاثير الايجابي للعوامل الفعالة بايولوجين او يعزى إلى مستويات قليلة في المواد الفعالة اذ انها تحتوي على مواد فعالة تكون ذات تاثير فعال عندما تستخدم في تجارب مختبرية على الحيوانات بشكل أفضل من استخدامها في الأوساط الزرعية او قد يعزى عدم التأثير الى طريقة التحضير او الخزن او اجراء الفحص او تاثير النبات على البلعمة من خلال قتل البكتريا بشكل مباشر (9) و (21) . وفي دراستنا تم اعتماد المصدر (16) في طريقة العمل مع شي من التحوير حيث استخدم الباحث (16) تراكيز متعددة للنباتات المستخدمة في دراستنا في حين استخدمنا في دراستنا تركيز واحد ولكل المستخلصات وبالنسبة للعالق الجرثومي استخدم الباحث (16) قطرة واحدة من العالق الجرثومي في حين استخدمنا في دراستنا 3 قطرات من العالق الجرثومي وبالتالي كانت النتائج مختلفة وخاصة بالنسبة للكبابة والكافور وبذور الكرفس حيث ان هذه النباتات كانت ذات نتائج فعالة وبتراكيز معينة في تثبيط نمو جرثومة السل في دراسة الباحث (16) . ان زيادة حجم الجراثيم المستخدمة ادت الى اختلاف في نتائج التثبيط الجرثومي . مما تقدم يتبين لنا بان المستخلصات النباتية كانت فعالة تجاه جرثومة السل ولذا ننصح باجراء دراسات موسعة حول هذه النباتات واستخدامها بتراكيز مختلفة ومحاولة استخلاصها باكثر من نوع ومقارنة تاثيرها مع المستخلص الكحولي المثيلي ولغرض استعمالها كعلاجات بديلة للمضاد الحيوي والتاكيد على تناول هذه النباتات ضمن التغذية المتوازنة .

References

1- Newton S M Lauc and Wright C W (2009) . Areview of antimycobacterial natural products Res J Phytother . 14 (5) : 303- 322 .

2- Abdel Gadir W S Mohamed F and Bakhiet A O (2007) . antibacterial activity of Tamarindus indica fruit and Piper Nigrum seeds Res J microbial 2 (11) : 824 – 830 .

3- Khan F V Durrani F R Sultan A Khan R V and Naz S (2009) . effect of fenugreek (Trigonella foenum – graecum) seed extract of visceral organs of broiler chicks ARPN J Agri Bio Sci Vol 4 N o 1 .

4- The Free Encyclopedia (2009) . Cubeb . from Wikipedia .

5- Johann S Pizzolatti M C Donnici C L and Resen M A (2007) . antifungal properties of plants used in Brazillian traditional medicine against clinically relevant fungal pathogens Braz J Microbiol 38 (4) : 1 – 8 .

6- Lee J Lim J Sim S and Park D (2008) . antibacterial effects of Stulipalin B isolated from *spiraea thunbergii sieb* on Escherichia coli amgior food borne pathogenic microorganism J Med plants Res 2 (3) : 59 – 65 .

7- Abdallah E M Khalid A S and Ibrahim N (2009) . antibacterial activity of oleo – gum resins of *Commiphora Molmol* and *Boswellia papyrifera* against methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Scientific Research and Essays 4 (4) : 351 – 356 .

8- Kolarovic J Popovic M Mikov M Mitic R and Gvozdenovic L (2009) . protactive effects of celery juice in treatments with doxorybicin . molecules 14 ; 1627 – 1638

9- Parekh J and Chanda S (2008) . antibacterial activity of agueous and alcoholic extracts of 34 indian medicinal plants against some Staphylococcus SPP Turk J Biol . 32 ; 63 – 71 .

10- Chen J Wang L Thompson L V (2006) . flax seeds and its components reduce metastasis after surgical excision of solid human breast tumor in nude mice Cancer Lett 234 (2) : 175 – 188 .

11- Laikangban R Devi M D Singh S R (2009) . antibacterial efficacy of elite medical plants on urolithiasis inducing flora J of food Agri Enivi 7 (2) : 40 – 45 .
12- Akhtar A Deshmukh A A Bhonste A V Kshiirsagar P M Koleka M A (2008) . In vitro antibacterial activity of Pimimella anisum fruit extracts against some pathogenic bacteria Veterinary World 1 (9) : 272 – 274 .
13- Radwan H M EL- Missiry M M AL – Said W M and Ismail A S. (2007) . Investigation of the glucosinolates of Lepidium Sativum growing in Egypt and Their biological activity Res Med Med . Sci . 2 (2) : 127 – 132 .
14- Anessiny G and Perez C (1993) . Screening of plants used Agreen line folk medicine for antimicrobial activity J Ethnapharmacol 39 : 119 -128 .
15- EL – Baghdad J R Lazrag Z Ibrahimey Z Bouayad R Guinet A and Benslimane (1997) . survey of primary drug resistance of mycobacterium tuberculosis in Casabluea Morocco Int J Tuberc and lung Dis 1 (4) : 309 – 313
16- Grange J M Daveu R W (1990) . detection of antituberculous activity in plant extract J of app bact 68 ; 587 – 591 .
17- http://www.fastonline.org/CD3WD_40/JF437/27-706-pdf.Podobno . (Internet).
18- Randhir R Lin Y T and Shetty K (2004) . phenolisc , their antioxidant and antibacterial activity in dark germinated Fenugreek sprouts in response to peptid and phytochemical elicitors Asia Pac J Clin Nutri 13 (3) : 295 – 307 .
19- Nanasombat S and Lohasupth awee P (2005) . antibacterial activity of crude ethanolic extracts and essential oils of spices against salmonella and other enterobasteria khitl sci Tech J 5 (3) : 527 – 537 .
20- Khan A (2006) . A loe and Myrrh : modern day analysis of to ancient herbs Tarig Magazine 11 (2) : 36- 37 .
21- Davey R W Mc Gregor J A and Grange J M (1990) . Screening tests for antibacterial substances in plant extracts Comp Med Res . 4 ; 1-7 .