التأثير التثبيطي لمستخلصات قشور ثمرة الرمان على نمو جرثومة اللسترية Listeria monocytogenes مختبريا

م. د. هدى عبد الهادي علي النصراوي
وحدة بحوث الإمراض المشتركة- كلية الطب البيطري/ جامعة القادسية

الخلاصة

شملت الدراسة الحالية الكشف عن حساسية جرثومة اللسترية Listeria monocytogenes لمستخلصات قشور ثمرة الرمان المائية والكحولية (الايثانولية والميثانولية) في الاطباق الزرعية بأستخدام طريقة الانتشار بحفر الاكار Agar well diffusion method وبينت النتائج حساسية الجرثومة المذكورة لتخافيف المستخلصات الثلاثة المستخدمة قيد الدراسة وهي (٢٥، ٥٠، ٧٥، ١٠٠ ملغم/ مل) وسجلت النتائج تبايناً في التأثير التثبيطي حسب نوع للمستخلص والتخفيف المستخدم اذ كانت الجرثومة أكثر تحسساً لتخافيف للمسخلصتين الكحولية الايثانولية والميثانولية لقشور ثمرة الرمان مقارنة مع تخافيف المستخلص المائية، ظهر ذلك من خلال الاهمية الاحصائية لمعدلات اقطار تثبيط النمو الذي ابدته الجرثومة للتخافيف المختلفة للمسخلصات وإن التأثير التثبيطي للمسخلصات الثلاثة ازداد بزيادة التركيز المستخدم إذ كان أكبر أقطار تثبيط النمو عند التركيز ١٠٠ ملغم/ مل في حين إظهر التركيز ٢٥ ملغم/ مل إقل اقطار تثبيط النمو للمسخلصات الثلاثة المستخدمة في الدراسة.

المقدمة

يعد مرض Listeriosis من الامراض المشتركة المهمة، شديدة الخطورة ذات الاهمية الصحية والاقتصادية، ينتقل المرض الى الانسان والحيوان عن طريق الغذاء الملوث بجرثومة Listeria monocytogenes مسببة حالات تسمم غذائي لذا تعد من المشاكل المهمة في مجال الصناعات الغذائية،وكما تسبب المرض في الانسان والحيوانات الحقلية والبرية والطيور (Weis and Seeliger, 1976). تتصف جرثومة اللسترية بأنها عصيات هوائية اختيارية موجبة لصبغة كرام يبلغ طولها (1-1.5) مايكرون وقطرها (0.4-0.5) مايكرون غير مكونة للابواغ ولا تحتوي على محفظة، متحركة بدرجة حرارة (10-25ْ م) (Buchanan and Gibbons, 1974) وتعد هذه الجراثيم واسعة الانتشار في الطبيعة ولها القدرة على العيش والتكاثر في مدى واسع من درجات الحرارة (1-45ْم) وكذلك تحت أس هايدروجيني وضغط ازموزي مختلف (Forbes *et al*., 1998).

توجه الاهتمام حديثاً الى استعمال الادوية المعزولة من الاعشاب والنباتات المختلفة كمواد علاجية ضد الجراثيم المرضية لضمان فاعليتها من جهة ولامانها واقتصاديتها من جهة اخرى (Glombitaz *et al*., 1994). وعلى مر العصور أثبتت النباتات والاعشاب الطبية قدرتها الفاعلة في معالجة الكثير من الامراض وبأثار جانبية محدودة لا تكاد تذكر مقارنة مع الادوية الكيمياوية ذات التأثيرات الجانبية المتعددة (المياحي،2001).

ومن بين هذه النباتات الرمان Punica granatum ويعرف بالانكليزية بأسم Pomegranate الذي ينتمي الى العائلة الرمانية Punicaceae ويزرع في معظم البلدان العربية خصوصاً حوض البحر

الابيض المتوسط والعراق وبلاد الشام (سعدي واخرون،1988) وتستخدم قشور ثمرة الرمان في مجال الطب الشعبي في علاج قرحة المعدة والامعاء، كما ان نقيع ومسحوق القشور والساق والجذور يستخدم في علاج الاسهال او الديزنتري لانها تعمل على تغيير طبيعة بروتينات الامعاء كما ويقلل من ارتشاح السوائل فضلاً عن انه يقتل الجراثيم ويمتص السموم الجرثومية (سعدي واخرون، 1988 ; Borton, 1986). واشير الى ان نقيع القشور يستخدم بمفرده او مخلوطاً مع الرز لعلاج الآم المعدة والتهابات الامعاء والقولون (Watt and Breyer- Brandwijk, 1962) كما وتستخدم عصارة ونقيع القشور والسيقان لعلاج كثرة الافرازات المهبلية وذلك لخواصها القاتلة للجراثيم والفطريات (الجنابي،1996 ; Borton, 1986). ووجد الباحث Moneam واخرون (1988) ان لعصارة ثمار الرمان فعلاً قاتلاً على نمو الجراثيم المرضية. واظهرت خلاصة قشور الرمان تأثيراً فاعلاً ضد الجراثيم الموجودة في امعاء الجرذان المخبرية المصابة (عبد الحسين،2001) ونظراً للاهمية الطبية والعلاجية التي تتمتع بها خلاصات قشور ثمرة الرمان اجريت هذه الدراسة للكشف عن التأثير التثبيطي لمستخلصات قشور ثمرة الرمان المختلفة على نمو جرثومة اللسترية Listeria monocytogenes مختبريا.

المواد وطرائق العمل

جرثومة الاختبار

في الدراسة الحالية تم استخدام جرثومة Listeria monocytogenes التي تم الحصول عليها من وحدة الامراض المشتركة– كلية الطب البيطري/ جامعة بغداد وجرى التأكد من خواصها الزرعية وصفاتها الكيميوحيوية حسب ما جاء به (Quinn *et al*., 1998) وتم حفظ العترة في اكار مائل من وسط نقيع القلب والدماغ وذلك بدرجة حرارة الثلاجة (4ْم) لحين الاستخدام.

تحضير لمستخلصات قشور ثمرة الرمان

تم جمع كمية من قشور الرمان من الاسواق المحلية في مدينة الديوانية، تم تنظيفها من المواد العالقة بها وذلك بغسلها وتجفيفها ثم طحنت بأستعمال المطحنة الكهربائية لحين الحصول على مسحوق ناعم، وزن 50 غم من المسحوق ووضع في دورق حجمي سعة (1000مل) وأضيف اليه 500 مل من الماء المقطر لغرض الحصول على المسخلص المائية، وضع الدورق على سخان مغناطيسي بدرجة حرارة 500ْ م وترك ليمتزج جيداً بوساطة مازج مغناطيسي مدة 24 ساعة، بعدها رشح المزيج بأستعمال ورق ترشيح من نوع Whatmann No.2 وبخر بجهاز المبخر الدوار بدرجة حرارة 60ْ م وبضغط منخفض لحين الحصول على المسخلص، وبنفس الطريقة تم تحضيرالمستخلصات الكحولية الايثانولية والميثانولية فيما عدا استعمال الايثانول والميثانول كمذيب بدلاً من الماء المقطر.

تحضير التراكيز المختلفة لمستخلصات قشور ثمرة الرمان

حضر محلول خزين لكل نوع من انواع المستخلصات الثلاثة المستخدمة قيد الدراسة وذلك بإذابة ١غم في 10 مل من الماء المقطر للحصول على التركيز 100 ملغم/ مل، حضرت منه بقية التراكيز وهي 25، 50، 75 ملغم/ مل.

تحضير العالق الجرثومي

حضر العالق الجرثومي بنقل الجرثومة من الخزين الاصلي وزرع بطريقة التخطيط على السطح المائل للوسط المغذي، ووضعت في الحاضنة بدرجة حرارة 37ْ م لمدة 24 ساعة، ثم غسل النمو من السطح المائل بأستخدام 10 مل من المرق المغذي ورج العالق جيداً ونقل الى انبوبة اختبار نظيفة وتم تقدير العدد الكلي للجرثومة وذلك من خلال مقارنة النمو في المرق المحضر مع محلول ماكفرلاند القياسي وقد تم اختيار الانبوب الحاوي على ٣×١٠ ^٨ خلية/ مل.

اختبار حساسية الجرثومة لمستخلصات قشور ثمرة الرمان

تم اختبار القابلية التثبيطية لمستخلصات قشور ثمرة الرمان ضد نمو جرثومة اللسترية في الاطباق الزرعية بطريقة حفر الاكار Agar well diffusion method اذ تم اضافة 20 مل من وسط المولر هنتون والمحضر من بذر 0.1 مل العالق الجرثومي المحضر في الفقرة السابقة لكل 100 مل من وسط المولر هنتون الصلب بعد ان يتم تبريده بأستعمال حمام مائي بدرجة حرارة 45ْ م، ثم عمل 5 حفر في كل طبق وضعت في اربعة منها التراكيز المختلفة للمستخلصات الثلاثة لقشور ثمرة الرمان وفي الحفرة الخامسة وضعت المادة المذيبة المستخدمة في تحضير التراكيز وبمقدار 0.1 مل لكل تركيز، ثم حضنت الاطباق الزرعية بدرجة حرارة 37ْ م مدة 24 ساعة ثم تم قياس قطر تثبيط النمو حول كل حفرة محسوباً بالملم.

النتائج والمناقشة

تعد هذه الدراسة الاولى من نوعها اذ لم يتم الحصول على دراسات حول تأثير مستخلصات قشور ثمرة الرمان على نمو وتكاثر جرثومة Listeria monocytogenes في الشبكة الدولية للمعلوماتية Internet او على المستوى المحلي. اذ تبين من نتائج الدراسة الحالية ان لمستخلصات قشور ثمرة الرمان المائية والكحولية (الايثانولية والميثانولية) فعلاً مثبطاً ملحوظاً على نمو جرثومة Listeria monocytogenes في الاطباق الزرعية بأستخدام طريقة حفر الاكار Agar well diffusion method وقد لوحظ وجود تباين في حساسية الجرثومة المذكورة للمستخلصات المختلفة اعتماداً على نوع وتخفيف خلاصة قشور ثمرة الرمان المستخدمة في الدراسة ويوضح جدول (١) معدلات أقطار تثبيط نمو جرثومة Listeria monocytogenes لثلاث مكررات مع الخطأ القياسي لتخافيف المستخلصات الثلاثة لقشور ثمرة الرمان، اذ اظهرت اقطاراً من تثبيط النمو الجرثومي عند التراكيز (25، 50، 75، 100 ملغم/ مل) مقدارها (0.3± 20.33) ملم، (1 ±22) ملم، (1.7± 24.66) ملم، (1.6 ± 31.33) ملم على التوالي للمستخلص المائية لقشور ثمرة الرمان وكما موضح

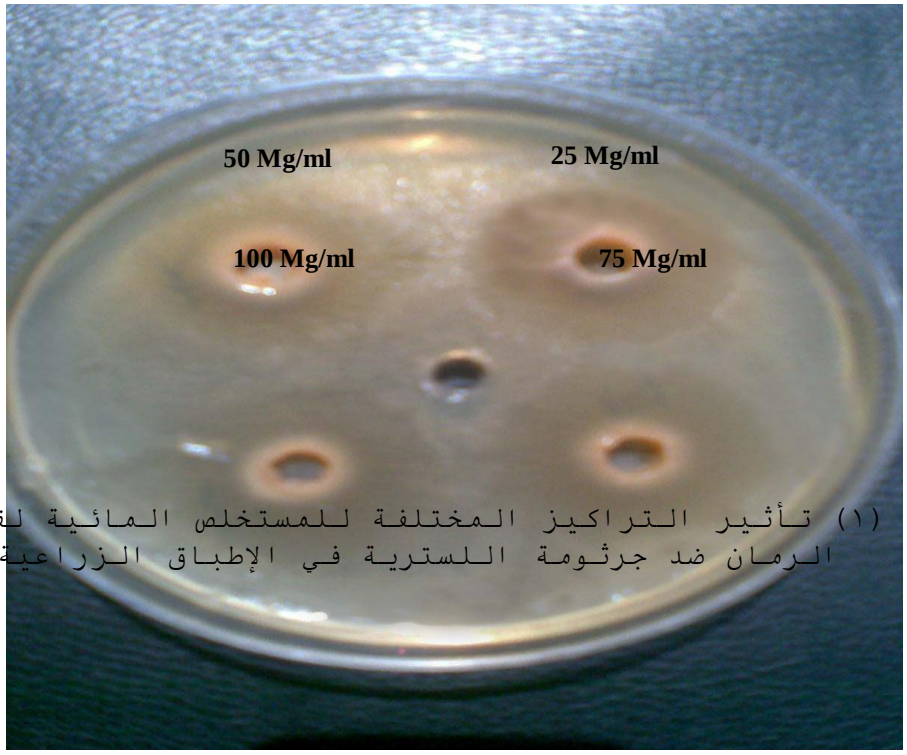
في صورة (١) و(0.6± 23.33) ملم، (0.3 ± 24.66) ملم، (0.00 ± 27) ملم، (0.33 ± 29.66) ملم على التوالي للمستخلص الكحولية الايثانولية كما موضح في الصورة (2) و (0.33 ± 24.66) ملم، (0.00± 27) ملم، (0.33 ± 27.6) ملم و (0.33 ± 28.33) ملم على التوالي للمستخلص الكحولية الميثانولية وكما موضح في الصورة (3).

وهذه النتائج تؤكد ما توصلت اليه بعض الدراسات التي اكدت على فاعليتها قشور الرمان ومستخلصاته ضد الجراثيم الممرضة من غير جرثومة Listeria monocytogenes إذ سجلت عبد الرحمن، (1995) التأثير المضاد للجراثيم لمنقوع قشور ثمرة الرمان بجانب عدد من النباتات والمواد الكيمياوية على الجراثيم الموجبة لصبغة كرام والجراثيم السالبة لصبغة كرام كما اشارت باقر (1997) الى تأثير قشور ثمرة الرمان على الجراثيم المرضية، وقد أعطت مستخلص ثمار الرمان تأثيراً مبيداً لانواع عدة من الجراثيم الممرضة فضلاً عن الفعل المضاد للجراثيم لمستخلص قشور الرمان (Watt and Breyer- Brandwijk, 1962). وأتفقت عدد من الدراسات على ان مادة العفصيات (tannins) الموجودة في اجزاء شجرة الرمان المختلفة وخصوصاً قشور الرمان هي المادة الفاعلة ضد الجراثيم وبقية الاحياء المجهرية الممرضة (Cowan, 1999 ; Hussein *et al*., 1997; Scalbert, 1991). وذكر Samuelsson (1999) الى ان منسوب العفصيات العالي في قشور ثمرة الرمان يؤدي الى تغيير طبيعة بروتينات الجراثيم وبالنتيجة ال قتلها. كما واشارت التحليلات الكيميائية لمستخلصات قشور ثمرة الرمان واحتواءها على نسبة جيدة من الفلافونويدات flavonoids والتربينات الثلاثية triterpens والفينولات phenols والمعروفة في فعلها المضاد للمايكروبات (Voravuthikunchai *et al*., 2005) وبالنتيجة فأن الفعل المضاد للجراثيم لخلاصة قشور الرمان تعود الى الفعل التأزري للمركبات المذكورة اعلاه وهذا يؤكد ما بينته نتائج الدراسة في ان الفعل المثبط لمستخلصات الثلاثة لقشور ثمرة الرمان المستخدمة ضد جرثومة L. monocytogenes يتناسب تناسباً طردياً مع زيادة المادة او المواد الفاعلة ضد نمو الجراثيم وذلك بزيادة التركيز المستخدم وخصوصاً من مادة العفصيات.

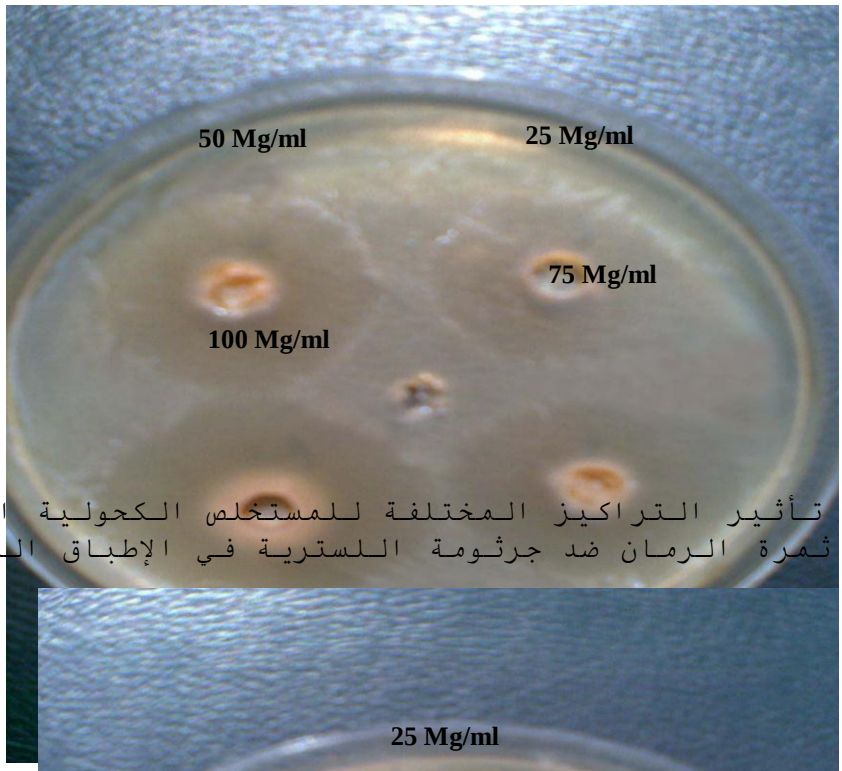
جدول (١) يوضح تأثير مستخلصات قشور ثمرة الرمان في تثبيط نمو جرثومة **Listeria monocytogenes**.

نوع مستخلص قشور ثمرة الرمان	قطر منع النمو لجرثومة L. monocytogenes بـ (ملم)				
	التركيز ملغم/ مل				
	25	50	75	100	ماء مقطر
مائية	20.33±0.3	22±1	24.66±1.7	31.33±1.6	–

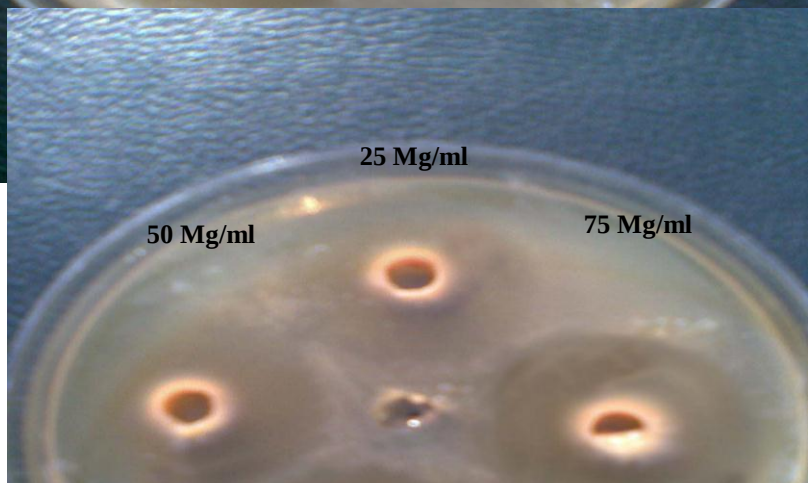
كحولية ايثانولية	23.33±0.6	24.66±0.3	27±0.00	29.66±0.3	–
ميثانولية	24.66±0.3	27±0.00	27.6±0.33	28.33±0.33	–



صورة (١) تأثير التراكيز المختلفة للمستخلص المائية لقشور ثمرة الرمان ضد جرثومة اللسترية في الإطباق الزراعية.



صورة (2) تأثير التراكيز المختلفة للمستخلص الكحولية الايثانولية لقشور ثمرة الرمان ضد جرثومة اللسترية في الإطباق الزراعية.



100 Mg/ml

صورة (3) تأثير التراكيز المختلفة للمستخلص الميثانولية لقشور ثمرة الرمان ضد جرثومة اللسترية في الإطباق الزراعية.

المصادر العربية

- **الجنابي، علي عبد الحسين. (1996).** تأثير بعض المستخلصات النباتية على نمو بعض الفطريات الممرضة لجلد الانسان. أطروحة ماجستير، كلية العلوم. الجامعة المستنصرية.
- **المياحي، عبد الرضا اكبر علوان. (2001).** النباتات الطبية والتداوي بالاعشاب. ط (١)، مركز عبادي للدراسات والنشر، صنعاء، 291 ص.
- **باقر، ميعاد غالب. (1997).** تأثير قشور الرمان وبعض النباتات الطبية المضادة للجراثيم والفطريات المرضية. رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة البصرة.
- **سعدي، شكري ابراهيم، عبد الله، القاضي محمد، صالح عبد الكريم. (1988).** النباتات الطبية والعطرية والسامة في الوطن العربي. جامعة الدول العربية والمنظمة العربية للتنمية الزراعية. الخرطوم59-61 ص.
- **عبد الرحمن، غادة يونس. (1995).** تأثير بعض النباتات الطبية والمواد الكيمياوية على نمو الجراثيم المرضية. المجلة العراقية للعلوم البيطرية. المجلد الثامن. 108 ص.
- **عبد الحسين، منذر عبد الواحد. (2001).** الامراض المتسببة عن طفيلي الزحار الاميبي Entamoeba. histolytica وتأثير قشور ثمرة الرمان المضادة للطفيلي في الجرذان المختبرية. رسالة ماجستير، كلية العلوم. جامعة البصرة، 86 ص.

المصادر الاجنبية

- **Borton, S. D. (1986).** Advanced in medicinal phytochemistry. Center De Recherche Pierre faber. P64.
- **Buchanan, R. E. and Gibbons, N. E. 1974**: In Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th ed. The Williams and wilkins co., Baltimore.
- **Cowan, M. M. (1999).** Plant products as antimicrobial agents. Clin. Microbiol. Rev. 12: 564-582.
- **Forbes, B. A.; Sahm, D. F. and Weissfeld, A. S. (1998).** Enterobacteriaceae proteus In: Baily and Scotts Diagnostic Microbiology. 10th ed. Mosby company. U.S.A.
- **Hussein, S. A.; Barakat, H. H.; Merfort, I. and Nawwar, M. A. (1997).** Tannins from the leaves of p. granatum. Phytochemistry. 45:

819-823.

- **Glombitaz, K. W.; Mahran, G. H.; Mirhon, Y. W.; Michel, K. G. and Motawi, T. K. (1994)**. Hypoglycemic and antihyperglycemic effects of zizyophus spinachrist in rats. Plan. Med., 60: 244-247.
- **Moneam, N. M.; EL-Sharaky, A. S. and Badrel din, M. (1988).** Oestrogen content of pomegranate seeds J. chromatogr. 2: 438-442.
- **Samuelsson, G. (1999).** Drugs of natural origin. Swedish pharmaceutical press, Sweden.
- **Scalbert**,**A. (1991).** Anti microbial properties of tannins. Phytochemistry. 30: 3875-3883.
- **Quinn, P. J.; Carter, M. E.; Markey, B. K. and Carber, G. R. (1998). Clinical veterinary Microbiology, Mosby, London.**

Voravuthikunchi,S.Sririrak,T.Limsuwan,S.;Supawita,T.;Iida,and Honda,T.(2oo5).Inhibitory effects of active compounds from punica granatam pericarp on verocytotoxin production by enterohemorrhagic Escherichia coli o157:H7.J.Health Scienece.51:590-596

Watt, I. and Breyer. Brandwijk, M. (1962). The medicinal and poisons of souther and eastern Africa. Livingston L. td. Edinburgh and London. PP: 875-876.

- **Weis, J. and Seeliger, H. P. R. (1976).** Incidence of Listeria monocytogenes in nature. APPI. Microbiol. 30:29-32.

The Inhibition Effect of Pomegranate Peel on Listeria monocytogenes growth *in Vitro*

AL-Nassrawi, Huda A. A.
Zoonotic research units- Vet. Med. Colloge / AL-Qadiysia University

Abstract

The present study included determination of sensitivity of Listeria monocytogenes to a pomegranate peel (Punic granatum) extract watery and alcoholic(ethanolic and mothanolic) extracts by application of Agar wells diffusion method. Results showed the susptibility of Listeria to different dilution of the three extracts which used in this study (25, 50, 75, and 100) mg/ml. Inhibitory effect of Listeria to differ extracts according to types and dilutions of mentioned extracts. Bacteria was more sensitive to alcoholic extracts as compare with aqueous extract. This appears from significant important of inhibition diameter of bacterial growth to differ dilutions of extracts. The diameter of inhibitory zone significantly increases with high

concentration of extract used. The wider inhibitory zone of bacterial growth appeared at (100) mg/ml dilution and the lowest one at (25) mg/ml dilution.