Kufa Journal for Veterinary Medical Sciences Vol.4 No.2 (2013) 5-11

Kufa Journal for Veterinary Medical Sciences
www.vet.kufauniv.com

تأثير المستخلصات الكحولية (للكمون، النعناع والزعتر) وخليطها الثلاثي والثنائي على نمو البكتريا المعوية (*Salmonella entridius* ، *Brucella abortus* ، *E.coli*) في الاطباق

م. م. زينة فؤاد صالح الحسناوي

فرع الاحياء المجهرية ،كلية الطب البيطري، جامعة القادسية
E-mail: Zeena_20002005@yahoo.com

الخلاصة:

هدفت الدراسة الحالية الى معرفة تأثير المستخلصات (الكمون والنعناع والزعتر وخلائطها) الكحولية ضد نمو الجراثيم المعوية السالبة لصبغة كرام, *Salmonella entridius* ، *E. coli* , *Brucella abortus* وبواقع تركيز (10ملغم/مل) وتم استخدام طريقة الانتشار وبحفر الاكارAgar well diffusion method.

تم الكشف عن مكوناته الكيميائية اذ احتوت بذور الكمون على الفلافونيدات والزعتر على الراتنجات والصابونيات بينما اوراق النعناع احتوت على التانينات والفلافونيدات .

اظهرت بكتريا *Brucella abortus* اكثر حساسية للمستخلصات الكحولية للنعناع يليه الكمون وبنفس قوة التثبيط للخليط الثلاثي والخليط الثنائي (الكمون والنعناع)و(الكمون والزعتر)ومستخلص الزعتر بقطر هالة التثبيط (38,66، 26,66، 24 ، 19,33، 8,66) ملم على التوالي .

في حين اظهرت بكتريا *E. coli* حساسية للخليط الثنائي (النعناع والزعتر) بقطر هالة التثبيط 26,66ملم ولخليط (الكمون والزعتر) بقطر هالة التثبيط 17,33ملم والمستخلص الكحولي للكمون بقطر هالة التثبيط 9,33ملم .

لكن بكتريا *Salmonella entridius* اظهرت تحسساً فقط للمستخلص الكحولي لخليط (الكمون والزعتر) بقطر هالة التثبيط 16,66ملم .

الكلمات الافتتاحية : كمون، الخليط، بروسيلا، هالة التثبيط، حساسية.

Effect of alcoholic extracts (*Cuminum cyminum,Thymus vulgaris* and *Menthe pulegium*) and tri mixed and di mixed extracts on enterobactericea (*E. coli , Brucella abortus, Salmonella entridius*) growth in vitro

Assit teacher: Zeena Fouad Saleh Al-hisnawy

Microbiology branch, Vet. Medicine College, Al-Qadiysia University

Abstract

The present study aimed to determine the effect of alcoholic extracts of (*Cuminum cyminum,Thymus vulgaris* and *Menthe pulegium*) activity against some of enterobactericea of gram negative stain (*E. coli* , *Brucella abortus Salmonella entridius)* ,at a varying concentration of 10 mg/ml by using agar well diffusion methods.

Different chemical detection methods indicate that *Cuminum cyminum* contained Flavonoids, *Thumus vulgaris* contained Reins and Saponins while *Menthe pulegium* contained Flavonoids.

The result showed that *Brucella abortus* more sensitive for antimicrobial activity alcoholic extract of *Menthe pulegium* and equal to tri mixed alcoholic extracts and di mixed, one of(

Cuminum cyminum and *Menthe pulegium*), *Cuminum cyminum* alcoholic extract and *Thymus vulgaris* alcoholic extract that showed zone inhibitions of (38.66, 26.66 , 24, 19.33, 8.66) mm respectively.

E. coli was found to be sensitive for di mixed alcoholic extract of (*Menthe pulegium* and *Thumus vulgaris*) rcoreded zone inhibition 26.66mm although sensitive from di mixed of (*Cuminum cyminum* and *Thumus vulgaris*) alcoholic extract by zone inhibition 17.33mm while *Cuminum cyminum* alcoholic extract showed zone inhibition of 9.33mm.

Bacteria *Salmonella entritidis* was found only sensitive for di mixed of (*Cuminum cyminum* and *Thumus vulgaris*) alcoholic extract recorded zone inhibition 16.66mm.

المقدمة:

ازداد في الآونة الاخيرة القلق من المقاومة الجرثومية بعد الاستعمال المتكرر للمضادات الحيوية ضد الجراثيم ومن ضمنها المعوية وتزداد الاتجاه لاستخدام المستخلصات النباتيه للتخلص من الجراثيم المسببة لتلك الامراض (1).

شكلت المستخلصات النباتية اساساً للعديد من التراكيب والمستحضرات الصيدلانية وبدائلاً للأدوية والعلاجات الطبيعية (2).

ازداد الاهتمام باستخدام منتجات الاعشاب في العالم كله ، ففي الولايات المتحدة وصلت هذه الزيادة الى 380% بين عام 1990-1997 ان بعض هذه الاعشاب تحتوي على مواد فعالة مثل الزيوت العطرية والفينولات والالدهايدات والقلويدات وغيرها كان له العديد من التطبيقات العلاجية ضد امراض عديدة تسببها البكتريا والاعفان او الفايروسات (3) .

اشارت مؤخراً المستخلصات النباتية باعتبارها مصدراً للمنتجات الطبيعية فهي تملك مواصفات وقاية وحماية عند استخدامها بدائلاً علاجية في الكثير من العلاجات والعديد من المسببات المرضية بالإضافة الى انها تعد مواد حافظة للغذاء (4) .

اهم المواد الفعالة للنعناع على مواد فعالة هي المنثون وتربينات ومشتقات زيتية ثانيات والحامض الفاليبرياني وفلافونيات ولها تأثير ضد جرثومة *Helobacter pylori* المسببة للقرحة وكذلك لها تأثير ضد الجراثيم *E.coli* ، *Salmonella entridius* (3) .

وكذلك الكمون يحتوي على مواد فعالة مثل (فلافونيدات الاينثول والسيامين) بينما يحتوي الزعتر على مواد فينولية اهمها الثايمول والكارفكول كما يحتوي على مواد راتنجية وصابونيات (5).

وقد هدفت هذه الدراسة الى الحصول على مستخلص نباتي من مصادر نباتية متوفرة بالاسواق المحلية او خليط هذه المستخلصات يمتلك كفاءة تثبيطيه ضد مضاد للبكتريا المرضية المسببة للعديد من الامراض كبدائل عن المضادات الحياتية المستخدمة في علاج تلك الامراض.

المواد وطرق العمل:

1. الجراثيم المستخدمة في الدراسة

تم الحصول على الجراثيم المستخدمة في الدراسة من مختبر الامراض المشتركة في كلية الطب البيطري جامعة القادسية.

2. جمع النباتات وتحضيرها .

تم الحصول على اوراق النعناع وبذور الكمون ونبات الزعتر من الاسواق المحلية وتم تصفيتها من الشوائب وبكمية 2كغم لكل نوع ثم طحنت كل على حدة وتم اجراء الاستخلاص والاختبارات اللازمة عليها .

3.الكشف عن المجاميع والمركبات الفعالة الموجودة في الاجزاء النباتية قيد البحث .

تم الكشف عن الراتنجيات والصابونيات والتايتات ومواد راتنجية على طريقة (6) فكشف الكلايكوسيدات حسب طريقة الشيخلي وجماعته (7) والفلافونات حسب (8) واخيراً للرقم الهيدروجيني كما ورد في (9) .

4.الحصول على المستخلصات الكحولية من المصادر النباتية

حسب طريقة (10) اذ استعمل الكحول الاثيلي تركيزه 95% اذيب 100غم من مسحوق كل نبات على حدة في 200مل من الاثيلي اي بنسبة (2:1) (مسحوق نباتي : كحول اثيلي) وقد تم خلطه جيداً بواسطة خلاط كهربائي وبعد وضعه في حاضنة هزازة في درجة حرارة 28م لمدة 24 ساعة بعدها رشح المزيج باستخدام اوراق ترشيح نوع wattman no.1 جمع الراشح ركز بالجهاز المبخر الدوار في درجة حرارة 40م الى ان تم تبخر كمية معينة من الكحول وجمعها وبعد وضع المركز في اطباق ذات مساحة سطحية كبيرة وتم تجفيف الكحول المتبقي في فرن كهربائي في درجة حرارة 40م الى ان تبخر الكحول كلياً ، وبعد الحصول على مسحوق من المستخلص الكحولي تم تحضير التركيز 10ملغم/مل من الماء المقطر.

وعقم عبر اوراق ترشيح خاصة تستخدم للتعقيم ذات ثقوب بقطر 0.02 مايكروميتر واختصرت تسمية المستخلصات الايثانولية للكمون (ك) والزعتر(ز) والنعناع (ن) والخليط للكمون والزعتر (ك ز) ، الكمون والنعناع (ك ن) والنعناع والزعتر (ز ن) والكمون والنعناع والزعتر (ك ن ز).

5. دراسة تأثير المستخلصات الكحولية النباتية على البكتريا الاختبارية :-

استخدمت طريقة الانتشار بالحفر كما ورد في (9) حيث تم تلقيح سطح الاكار muller Hinton بمستعمرات البكتريا الاختيارية كل بكتريا على انفراد حيث تم نشر 0.1 مل من العالق البكتيري حيث لم استخدم ناشر زجاجي معقم بعدها تم عمل الحفر (wells) ذات قطر 6ملم في كل طبق حيث وضعت 3-4 حفر في اماكن محدودة تم تعليمها على الطبق من الخارج وقد وضع في كل حفرة 0,5 مل من المستخلص الكحولي لكل نوع من الاجزاء النباتية باستخدام ماصة دقيقة خاصة وبلغ تركيز المستخلص الكحولي لكل نوع من الاجزاء النباتية 10ملغم /مل مع الاخذ بنظر الاعتبار وضع صفر للعينة للضابطة control وقد حمل بنفس الحجم الماء المقطر وقد تم تعقيم المستخلص الكحولي لكل نوع من الاجزاء النباتية بمرشحات ميكروبية معقمة خاصة بقطر 0,02 مايكروميتر واستخدم المضاد الحيوي (السيفالكسين 10ملغم) للمقارنة بمعدلات التثبيط.

النتائج والمناقشة:

1. الكشف عن المجاميع والمركبات الفعالة الموجودة في بعض اجزاء النباتات قيد الدراسة

يبن الجدول (1) كشفا اوليا كيمائيا عن المركبات والمجاميع الفعالة في نباتات الدراسة .

جدول رقم (1) المركبات الفعالة.

المركب الفعال	الكاشف المستخدم	دليل الكاشف	الكمون	النعناع	الزعتر
التانينات Tannins	خلات الرصاص 1% كلوريد الحديديك1%	ظهور هلامي ظهور لون اخضر مزرق	– –	+ +	– –
الصابونيات Saponins	أ-رج المستخلص المائي ب- كلوريد الزئبق	رغوة كثيفة لمدة طويلة ظهور راسب ابيض	– –	– –	+ +
فلافونويدات Flavonoids	كحول اثيلي/NaoH	ظهور لون اصفر	+	+	–
راتنجات Resins	ايثانول 95% ماء محمض بال 4%Hcl	تكون عكارة	–	–	+

(وجود المادة + ،عدم وجود المادة -)

وجد ان الكمون والزعتر لا يحتويان على التانينات على عكس النعناع لكن الكمون والنعاع يحتويان على الفلافونيدات على عكس الزعتر الذي يحتوي على مادة الصابونيات والراتنجات وهذه النتائج تتفق مع (11) حيث جاءت بعض النتائج متفقة مع نتائج الدراسة الحالية باحتواء بذور الكمون واوراق النعناع على الفلافونيدات التي تعد من المركبات الفعالة الاساسية كما اكد نفس المصدر احتواء الزعتر على الصابونيات، وكذلك وجد (12) ان النعناع يحتوي على التانينات والزعتر على الراتنجات .

2.تأثير المستخلصات النباتية الكحولية في تثبيط بكتريا الاختبار

جدول رقم (2) يبين معدلات اقطار هالات التثبيط للمستخلصات النباتية الكحولية وخليطها بتركيز 10ملغم /مل على بعض البكتريا المعوية

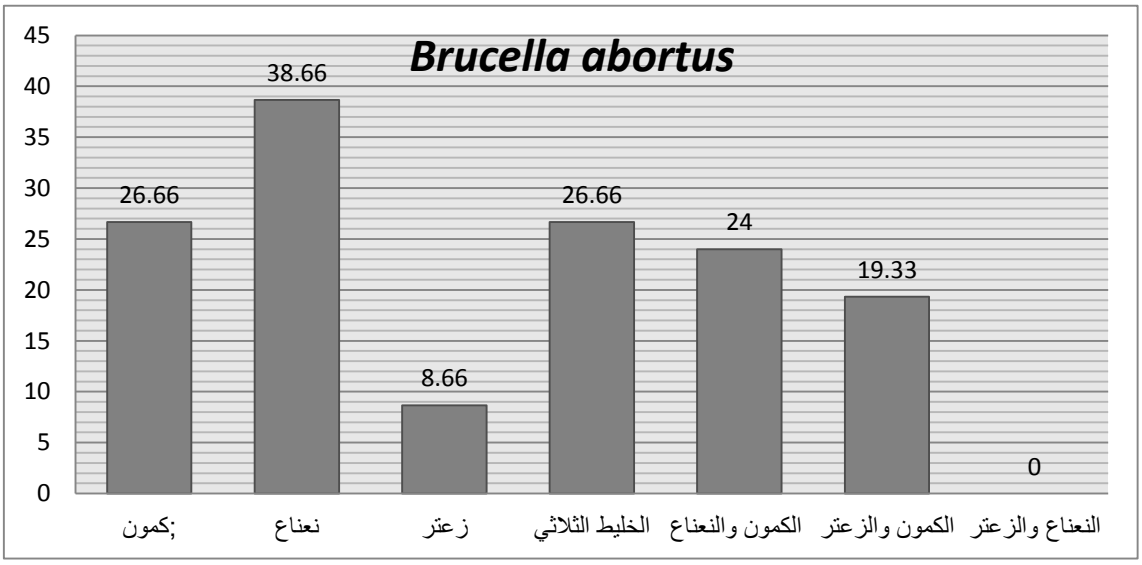
.

نوع المستخلص	*Brucella abortus*	*E .coli*	*Salmonella entritidis*
الكمون	26,66±1,76	9,33±0,66	0±0
النعناع	38,66±1,76	0±0	0±0
الزعتر	8,66±0,66	0±0	0±0
الخليط الثلاثي	26,66±1,76	0±0	0±0
خليط الكمون+ نعناع	24±1,15	0±0	0±0
خليط الكمون +زعتر	19,33±1,76	17,33±0,66	16,66 ±1,76
خليط النعناع +زعتر	0±0	26,66±1,76	0±0
السيفالكسين 10ملغم/مل	18	18	18

يبين الجدول (2) معدلات اقطار هالة التثبيط التي احدثها المستخلص الكحولي للنباتات بتركيز 10 ملغم/مل كحول اثيلي مطلق ضد البكتريا المختبرة حيث اظهر المستخلص الكحولي للنعناع والكمون والزعتر وتأزراتها الثلاثية والثنائية تأثيرا مثبطا على بعض البكتريا الاختيارية حيث سجل النعناع اعلى متوسط قيم لهالة التثبيط ضد بكتريا *Brucella abortus* وبلغ 38,66ملم في حين لم يؤثر على باقي انواع البكتريا اما بالنسبة لمستخلص الكحولي للزعتر فقد كان تأثيره فقط على بكتريا *Brucella abortus* بمعدل قطر هالة التثبيط 8,66 ملم بينما كان المستخلص الكحولي للكمون ذو تأثير تثبيطي ضد بكتريا *E. coli* و *Brucella abortus* بمعدلات هالة التثبيط (و9,33و 26,66)ملم على التوالي، لكن كانت التأزر الثلاثي ذو تأثير على بكتريا *Brucella abortus* بمعدل قطر هالة التثبيط 26,66ملم .

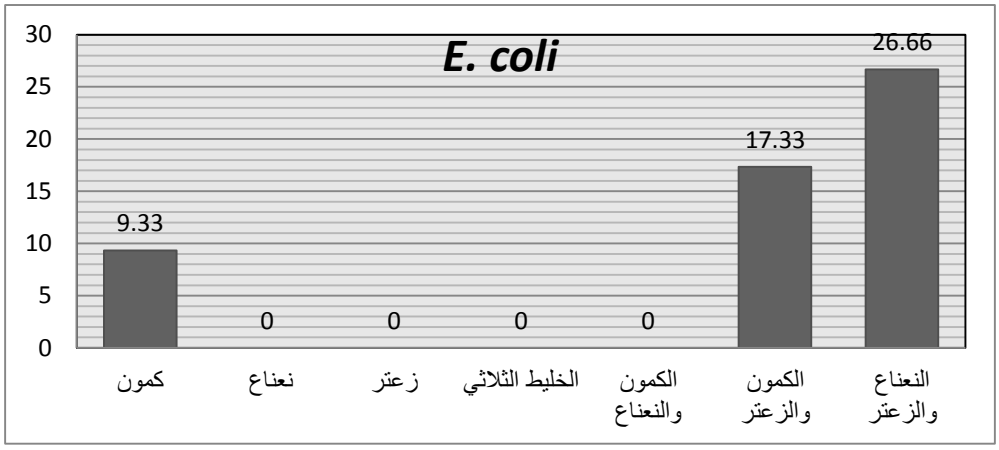
اما بالنسبة للخلائط الثنائية فكان خليط الكمون والنعناع الكحولي ذو تأثير تثبيطي على بكتريا *Brucella abortus* بمعدل قطر هالة التثبيط 24ملم في حين لم تأثر على باقي بكتريا الاختيارية في حين اثرخليط الثنائي للكمون والزعتر الكحولي كان ذو تأثير تثبيطي على *Brucella abortus* و*E. coli* و *Salmonella entritidis*بمعدلات لقطر هالة التثبيط (19,33، 17,33 و 16,66) ملم على التوالي في حين كان الخليط الثنائي الكحولي للنعناع والزعتر ذو تأثير تثبيطي فقط على *E. coli* بمعدل قطر هالة التثبيط (26,66)ملم.

شكل رقم (1) يبين معدلات التثبيط للمستخلصات مقاسة بالملمترات لبكتريا *Brucella abortus*



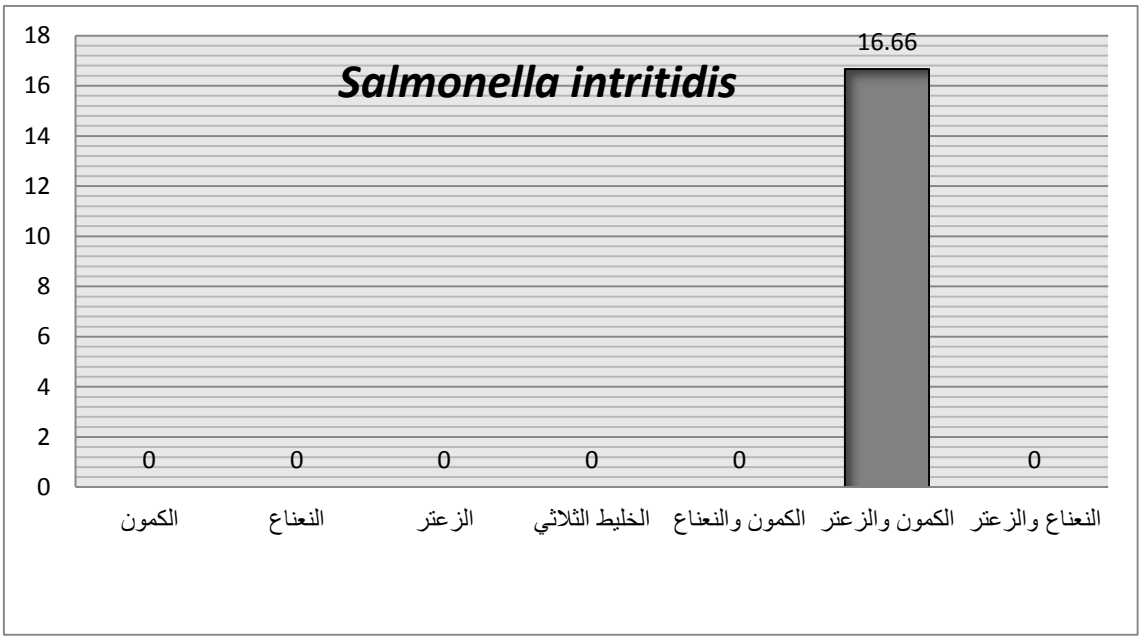
يوضح الشكل رقم (1) تأثير المستخلصات على نمو بكتريا *Brucella abortus* حيث كان تسلسل الكفاءة لها كما يلي (ن > ك = الخليط الثلاثي > ك ن > ك ز > ز).

شكل رقم (2) يبين معدلات التثبيط للمستخلصات مقاسة بالملمترات لبكتريا *E. coli*



اما بالنسبة لبكتريا *E. coli* فكان تأثير المستخلصات لتثبيط النمو كما هو مبين بالشكل رقم (2) حيث كان تسلسل الكفاءة لها كما يلي (ن ز > ك ز > ك).

شكل رقم (3) يبين معدلات التثبيط للمستخلصات مقاسة بالملمترات لبكتريا *Salmonella entritidis*



يبين الشكل رقم (3) تأثير المستخلصات الكحولية على نمو بكتريا *Salmonella entritidis* اذ كان فقط لمستخلص المتأزر الثنائي للكمون والزعتر ذو كفاءة تثبيطيه.

اظهرت نتائج التحليل الاحصائي تحت مستوى احتمال ($p \leq 0.05$) حيث اظهرت عدم وجود فرق معنوي بين مستخلص الكحولي للكمون والتأزر الثلاثي والثنائي للكمون والنعناع لكن وجد فرق معنوي لبقية المستخلصات المستخدمة بالدراسة بتأثيرها التثبيطي على بكتريا *Brucella abortus*.

بينما اظهرت النتائج الاحصائية بتأثير المستخلصات الكحولية على بكتريا *E. coli* بعدم وجود فرق معنوي بين المستخلص الكحولي للنعناع والزعتر والتأزر الثلاثي وتأزر الكمون والنعناع لكن وجد فرق معنوي بين بقية انواع المستخلصات المستخدمة بالدراسة، لكن اظهر التحليل الاحصائي بوجود فرق معنوي بين المستخلص الكحولي المتأزر الثنائي للكمون والزعتر وبقية انواع المستخلصات وبعدم وجود فرق معنوي بينهم.

يمكن تفسير كفاءة المستخلص الكحولي للنعناع في تثبيط اكبر عدد من البكتريا يعود الى محتواه العالي من الفلافونيدات من نوع rutin و quercitrin و hyperoside والتي لها دور مهم في تثبيط نمو البكتريا التي تعمل على تثبيط الانزيمات المسؤولة عن التفاعلات الايضية الاساسية بتداخلها غير المتخصص مع البروتينات مما يؤدي الى مسخ البروتين protein denaturation ومن ثم عدم قدرة البكتريا على الاستمرار (14,13)، بينما فسر (15) فعالية هذا النبات لاحتوائه على مادة التانين الفعالة في تثبيط البكتريا والفايروسات لقدرتها على تحفيز الخلايا البلعمية (phagocytic cell) وله فعالية لتحطيم البروتينات والتراكيب الاخرى المتواجدة على جدار الخلية البكترية التي تستخدمها للالتصاق.

ان المستخلص الكحولي للزعتر فعالية تثبيطيه عالية ضد الجراثيم واشار الباحث (16) ان للمستخلص الكحولي للزعتر فعالية تثبيطيه على الجراثيم الموجبة والسالبة لصبغة كرام وهذا ما اتفق مع الدراسة الحالية، كذلك اثبتت الدراسة التي قام بها (17) لمستخلص الكحولي للزعتر فعالية تثبيطيه عالية من خلال القدرة على تثبيط تصنيع الحامض النووي الرايبوزي RNA لبعض انواع الجراثيم وان هذه الفعالية تعتمد على التركيب الكيميائي للزعتر حيث يحتوي على الثايمول Thymol بنسبة 24,7% و pacyman بنسبة 36%كمركبات اساسية (18) وهذا ما اتفق مع الدراسة الحالية بتثبيط مستخلص الزعتر لبكتريا *Brucella abortus* .

ان للمستخلص الكحولي للكمون فعالية من خلال ميكانيكية تثبيط نمو الجراثيم بتأثير يعود الى وجود مواد فعالة من ضمن تركيب الكمون مثل الفينول والالدهايدات التي تمتلك عوامل تثبيطيه لأنزيمات الاكسدة والتي تؤثر على مجموعة تفاعلات التنفس الخلوي او من خلال سلسلة تصنيع البروتين للبكتريا(20,19) .

اما بالنسبة للخليط الثنائي للنعناع والزعتر فقد اظهر اعلى تأثير على جرثومة *E .coli* وكما مبين بالشكل (2)وهذا ما اتفق مع (21) ، وكذلك اثبتت الدراسة التي قام بها (22)بأن خليط الكمون والزعتر اعلى تأثير على جرثومة *Salmonella entritidis* وكما موضح بالشكل (3)، في حين لم تظهر الخلائط تأثير اعلى على جرثومة *Brucella abortus* مقارنة بالمستخلصات الكحولية المنفردة وكما مبين بالشكل (1) وهذا اتفق مع (22).

المصادر:

1.Oiye,s.o. and Muroki ,n.m.(2002) use of spices in food. The Journal of food technology in Africa . 7:39-44.

2.Lis,B.M and Dens , S.G (1997). Bioactivity of selected plant essential oil against *Listeria monocytogenes* . Journal of Applied Bacteriology. 82:759-762.

3.EL Astal, Z.Y ; Ashour , A. and Kerrit, A.A.M.(2005). Antimicrobial activity of some medicainal plant extracts in Palestine. Pak Jmed.sci. 21(2):187.193.

4. Cowan , M.M(1999). Plant produots as Antimicrobial Agents . Clinical Macrobiology Reviews. 12(4).564-582.

5. Dem.; De Ak.; Mukhopadyay , R.; Banerjee ,AB. And Miro, M.(2003). Antimicrobial activity of Cuminum Cyminum L.Ars Fharmaceutia 44(3).

6.Shihata , I.M.(1951).Apharmacological study of Anagallis arrensis M. D .Vet. Thesis. Cairo university.

7.الشيخلي ، محمد عبد الستار . عبد الجليل ،فريال حسن والعزاوي ، حسن فياض (1993). الكيمياء الحياتية . الجزء العملي . كلية العلوم . الجامعة المستنصرية .

8. Jaffer, H.J.; Mahmod , M.J.; Jawad ,A. and AL-Naib, A.(1983). Phytochemical and biological . Screening of some Iraqi plan fitoterapia Lix 299 .

9. الجنابي ، نضال محمد صالح (2004) . تأثير بعض المستخلصات النباتية كمضادات اكسدة ومكروبية في بعض الانظمة الغذائية . اطروحة دكتوراه – كلية الزراعة . جامعة بغداد .

10. Harbrne , J.B.(1973). Phytochemical method. Champman and Hall. London , new york.

11.Shin.K.H.;Ch.;H.J.;Lim, S.S;Ch,S.H; Moon, H.I and Yu, J.H.(1997). Antimicrobial activities of volatile essential oil from Korean aromatic plants. Nat . prod. Sci . 3:141-147.

12. Mashhadian N.V. and Rakhsh andeh ,H.(2005) Antimicrobial and antifungal effect – off Nigella sativa extract against. S.aureus, P. aeroginosan and C.albicans, Pak.J. Med. Sci -21 (1):47-52.

13. حياوي وغسان ؛ المسيحي وحياة حسين ؛ قاسم ، رولا محمد جميل (1999) علم العقاقير والنباتات الطبية . مكتبة دار الثقافة والنشر والتوزيع / عمان .

14. Mason ,T.L. And Wasserman, B.P. 1987. In activation of red beta glucan synthase by native and oxidized phenolic compounds phytochemistry 26: 2197-2202.

15. Cowan, M.M. 1999.Plant products as antimicrobial agents J. clinical biology. American society for microbiology, Miami university. Oxford. Ohio. 12(4) 564-582.

16.Lennette E.H; Balows, A; Hoster, W.J and Shadomy (H.J (edits)1987.Manual of clinical microbiology 4th,Amer. Soc, microbial Washington .

17. النعمان ، اديبة يونس شريف (1998) التأثير الجزيئي لبعض المستخلصات النباتية على نمو وايض عدد من الجراثيم الموجبة والسالبة لصبغة كرام. رسالة دكتوراه، كلية العلوم ، جامعة الموصل.

18.Saimary, L.E; Balcer, S.S; Khadaier, BY; Abass, Y.K.(2007).Efficiency of antimicrobial agent extract from Thymus vulgaris (laminceae) the intemet Journal of nutrition and wellness V.(4)N.1.

19.Agaoglu, S;N Dostibil and S-Alemdar (2007). Antimicrobial activity of some spices used in the meat industry. Bull Vet inset pulawy, 51:53-57.

20.Nansobat, S. and P.Lohasupthawee. 2005 . Antimicrobial activity of crude ethanol extract and essential oils of spices agents salmonella and other entero bacteria kmitl Sci. Tech. J.5(3): 527-538.

21.Alkinpelu DA., Onakoya TM., (2006). Antimicrobial activities of medical plant used in folklore remedies in south-westren. African Journal of Biotechnology 5,1078-1081.

22.Atab DA., Erdourul OT. (2003). Antimicrobial activities of various medicinal and commercial plant extract. Turkish Journal of Biology 27,157-162.