فاعلية خلاصات قشور ثمرة الرمان على نمو بعض مسببات الاسهال الجرثومية عند الاطفال

اسامة صالح مهدي الزبيدي هدى عبد الهادي علي علي محمد غازي المحنه
وحدة بحوث الامراض المشتركة / كلية الطب البيطري- جامعة القادسية

الخلاصة

اجريت هذه الدراسة لغرض تقييم الفاعلية التثبيطية لخلاصات قشور ثمرة الرمان المائية والكحولية الايثانولية والميثانولية ضد نمو بعض مسببات الاسهال الجرثومية عند الاطفال وتبين من نتائج الدراسة حساسية جرثومتي الاختبار (الاشيريكيا القولونية ، الشيكيلا) لتخافيف الخلاصات الثلاثة المستخدمة قيد الدراسة (100,75,50,25) ملغم / مل مع تباين هذا التاثير حسب نوع الجرثومة والتركيز المستخدم . اذ تبين وباستخدام طريقة حفر الاكار ان جرثومة الشيكيلا كانت اكثر تحسساً للتخافيف الخلاصات الثلاثة مقارنةً مع جرثومة الاشريكيا القولونية ظهر ذلك من خلال الاهمية الاحصائية لاقطار منع النمو الذي ابدته جرثومة الشيكيلا للتخافيف المختلفة مقارنةً مع جرثومة الاشيريكيا القولونية وان فاعلية الخلاصات ازدادت بزيادة التركيز المستخدم .

كما بين التحليل الاحصائي لاستخدام تحليل التباين واقل فرق معنوي عدم وجود فرق مهم احصائي وعند مستوى احتمالية (0.05) بين فاعليات الخلاصات الثلاثة في نمو جرثومتي الاختبار.

The inhibitory effect of pomearanate peel extract against some bacterial species causing diarrhea in children

Unit of zoonotic disease – College of veterinary medicine / Al-Qadiysia university
Al-Zobedi,Osama.S. Ali,Hada.A. Al-Mohana,Ali.M.

Abstract

This study was designed to evaluate inhibitory effect of three pomegranates (*punica granatum*) peel extracts (watery, ethanolic and methanolic extracts) against growth of some pathogenic bacteria that cause diarrhea in the children.Results showed sensitivity of tested bacteria (*Escherichia coli* and *Shigella* spp.) for concentrates of three extracts which used in this study (25,50,75,100) mg\ml with variation of activity according to the type of bacteria and the concentration used.

Using agar gel diffusing method, *Shigella* was more sensitive to three extracts of pomegranates peel, these appear from significant important of inhibition diameter of growth of *Shigella* compare with *E.coli* and this activity was increased with the concentration.

Statistical analysis by using anova test and LSD showed no differences at($p < 0.05$) among the three extracts in inhibiting the growth of both bacteria in the culture media.

المقدمة

يعد الاسهال من المشاكل الصحية الخطرة ذات الانتشار الواسع في جميع دول العالم اذ يكون الأطفال دون سن الخامسة اكثر عرضة للإصابة به مسبب نسبة عالية من الوفيات وحسب ما أشارت اليه منظمة الصحة العالمية (WHO,2000,Gupte,1996) .يعرف الإسهال بأنه طرح متكرر للبراز السائل وبمعدل يزيد عن ثلاث مرات يوميا (Mims *et al*.,1998) يتسبب الاسهال عن عدد كبير من المسببات التي قد تكون عوامل غير معدية non-infectious agent أو عوامل معدية infectious agent وتعد الأخيرة من أهم مسببات الاسهال وأكثرها أهمية إذ أنها تشمل مجموعة كبيرة من الاحياء المجهرية (مسببات جرثومية ، فايروسية ، فطرية وطفيلية) والتي تدخل إلى القناة الهضمية للإنسان والحيوان عن طريق الأغذية والاشربة الملوثة بها مؤدية إلى حدوث التهاب معوي (Jawets *et al*.,1980) تعد المسببات الجرثومية من العوامل الرئيسية

لحدوث الاسهال وبالأخص أفراد العائلة المعوية كالاشريكيا القولونية والسالمونيلا وجنس الشيكيلا التي ينتج عنها إنتاج عوامل الضراوة المهمة في إحداث المرض وظهور الأعراض كالذيفانات الداخلية enterotoxins والتي تسبب اخماج خطيرة قد تؤدي إلى الموت (Forbes *et al*.,1998) .

إزداد الاهتمام مؤخراً بالنباتات والأعشاب الطبيعية التي تملك خواصاً مضادة للجراثيم نتيجةً للمشاكل الحقيقية المتأتية من الاستخدام العشوائي والمفرط للمضادات الحيوية المختلفة مما أدى إلى ظهور الكثير من العزلات الجرثومية المقاومة لأغلب المضادات الحيوية كمقاومة المكورات العنقودية الذهبية *S.aureus* للميثاسلين methicillin (Voravuthikunchai and kitpipit,2003) ومقاومة جرثومة المتقلبات proteus spp. لمضادات البيتالاكتام (Pagine *et al*., 1998) والمقاومة التي أبدتها جرثومة *Helicobacter pylori* (Voravuthikunchai *et al*.,2004) والمقاومة المتعددة التي أبدتها جرثومة *Klebsiella pneumoniae* (Hermandez-Alles *et al*., 1999).

الرمان هو ثمار شجرة Punica granatum ويعود إلى العائلة الرمانية موطنه الأصلي جنوب غرب أسيا ويزرع في معظم المناطق العربية خصوصاً حوض البحر الأبيض المتوسط والعراق وبلاد الشام (سعدي،1988 ; قطب وفوزي ،1981). تمتلك الأجزاء المختلفة لشجرة الرمان فاعليات طبية متنوعة واستخدمت بصورة واسعة في مجال الطب الشعبي في عدد كبير من بلدان العالم (Chidambara *et al*.,2002) وأشارت دراسات عديدة إن لقشور ثمرة الرمان خواصاً علاجية متعددة منها فعلها المضاد للأكسدة (Singh *et al* .,2002) والفعل المحفز للجهاز المناعي (Gracious *et al* .,2001) والتأثير القاتل لليرقات الضارة (Morsy *et al*,.1998) والفعل المضاد للسرطان (Mavhjanav *et al* .,1997) والفعل المضاد للمايكرو بات (Navarro *et al* .,1997) والتأثير الخافض لسكر الدم (Khalil , 2004) .

انصب اهتمام هذه الدراسة في الكشف عن التأثير التثبيطي لخلاصات قشور ثمرة الرمان المختلفة ضد نمو بعض من مسببات الإسهال الجرثومية في الأطفال.

طرائق العمل

جمع وإعداد قشور الرمان للدراسة

تم جمع كمية من ثمار شجرة الرمان من الأسواق المحلية في مدينة الديوانية خلال شهر آب ، فصلت القشور عن باقي أجزاء الثمرة وتم تنظيفها من الأتربة العالقة بها ، جففت القشور في الظل بدرجة حرارة (21° م) ثم طحنت بأستعمال المطحنة الكهربائية لحين الحصول على مسحوق ناعم وبعدئذ حفظ في أكياس بلاستيكية لحين الاستعمال .

تحضير خلاصات قشور الرمان

تم تحضير الخلاصة المائية لقشور ثمرة الرمان باستخدام الصفيحة الحارة المحركة لقطعة المغناطيس (المجهزة من شركة Heidolph) بدرجة حرارة الغرفة لمدة (24 ساعة) وذلك بإضافة (500 مل) من الماء المقطر لكل (50 غم) من مسحوق القشور المحضر في الفقرة السابقة بعدها رشح المزيج باستخدام ورق ترشيح نوع Whatmann No.2 وبخر الراشح باستخدام جهاز المبخر التفريقي الدوار Rotary evaporator (المجهز من شركة Buchi) بدرجة حرارة (60 م°) وبضغط منخفض لحين الحصول على الخلاصة وبالطريقة نفسها تم تحضير الخلاصة الكحولية الايثانولية والميثانولية فيما عدا استخدام الايثانول والميثانول كمادة مذيبة بدلاً من الماء ومنها تم تحضير أربع تراكيز متسلسلة لكل من الخلاصات الثلاثة وهي (100,75,50,25 ملغم /مل).

جراثيم الاختبار

استخدمت الجراثيم التالية لغرض دراسة فاعلية خلاصات قشور ثمرة الرمان في الأطباق الزرعية وهي :-

١. جرثومة الاشريكيا القولونية. *Escherishia coli*
٢. جرثومة الشيكيلا. *Shigella Spp.*

تم الحصول على العزلات الجرثومية من مستشفى الولادة والأطفال التعليمي في الديوانية ، والمعزولة من براز أطفال يعانون من أعراض الإسهال ، نقلت العزلات إلى مختبر وحدة الأمراض المشتركة – كلية الطب البيطري / جامعة القادسية تم تشخيصها وحفظت على سطح مائل من أكار نقيع الدماغ والقلب لحين الاستخدام .

تحضير العالق الجرثومي

تم تحضير الجراثيم المذكورة أعلاه بإعادة زراعتها من الخزين الأصلي إلى وسط أكار الدم (المجهز من شركة Oxoid) ومنها نقلت إلى وسط الاكار المغذي المائل ثم غسل النمو الجرثومي من السطح المائل باستخدام (10 مل) من المرق المغذي ثم رج العالق وتم تعيين العدد الكلي للجراثيم بمساعدة جهاز المطياف الضوئي (المجهز من شركة LKB) .

اختبار حساسية الجراثيم لخلاصات قشور الرمان

تم اختبار فاعلية تراكيز متسلسلة من خلاصات قشور الرمان (المائية ،الايثانولية والميثانولية) ضد نمو بعض الجراثيم المسببة للإسهال في الأطفال باستخدام طريقة الانتشار بالحفر (Agar well diffusion method) آذ تم إضافة (20مل) من وسط مولر هنتون (المجهز من شركة Oxoid) والمحضر من بذر (0.1 مل) من العالق الجرثومي المحضر في الفقرة السابقة لكل (100 مل) من وسط المولر هنتون الصلب بعد تبريده باستخدام حمام مائي بدرجة حرارة (45° م) ، ثم عملت (5 حفر) في كل طبق ووضعت في (4) منها التراكيز المختلفة للخلاصات الثلاثة لقشور ثمرة الرمان وفي الحفرة الخامسة وضعت المادة المستخدمة في تحضير التراكيز (الماء المقطر) وبمقدار (0.1 مل) لكل تركيز بعدها حضنت الأطباق بدرجة حرارة (37 °م) مدة (24) ساعة ثم تم قياس نطاق منع النمو حول كل حفرة .

النتائج

توضح النتائج التي تم الحصول عليها في الدراسة الحالية حساسية جرثومتي الاشيريكيا القولونية وجرثومة الشيكيلا لخلاصات قشور الرمان المائية والكحولية الايثانولية والميثانولية مع تباين في هذه الحساسية حسب نوع الخلاصة ، نوع الجرثومة وتخفيف خلاصة قشور ثمرة الرمان المستخدمة قيد الدراسة. يوضح جدول (1) معدلات أقطار المناطق الخالية من النمو الجرثومي حول الحفر المعمولة في الوسط الزرعي لخمسة مكررات مع الخطأ القياسي لتخافيف الخلاصات الثلاثة لقشور ثمرة الرمان وباستخدام طريقة الانتشار بحفر الاكار(Agar well diffusion method) وقد بينت النتائج وجود فرق معنوي مهم إحصائيا وعند مستوى احتمالية (0.05) في معدلات منع النمو بين الأنواع الجرثومية المستخدمة قيد الدراسة إذ ظهر إن جرثومة الشيكيلا كانت أكثر تحسساً للتخافيف مقارنةً مع جرثومة الاشيريكيا القولونية وأعطت أقطارا من منع النمو وعند التراكيز (100,75,50,25 ملغم / مل) مقدارها (19.2±0.2) ، (21.6±0.3) ، (24±0.5) ، (27.8±0.4) ملم على التوالي للخلاصة المائية و (19.6±0.3) ، (21.8±0.5) ، (23.2±0.5) ، (28.8±0.4) للخلاصة الايثانولية و(20.4±0.4) ، (22.4±0.7) ، (23.8±0.4) ، (28.6±0.4) ملم على التوالي للخلاصة الميثانولية. إما مايخص جرثومة الاشريكيا القولونية فكانت اقل تأثرا لتخافيف الخلاصات الثلاثة وأعطت أقطارا من منع النمو وعند التراكيز (100,75,50,25 ملغم / مل) مقدارها (17.2±0.2) ، (19.4±0.3) ، (19.8±0.2) ، (23.2±0.2) ملم على التوالي للخلاصة المائية لقشور ثمرة الرمان و(16.6±0.3) ، (19.8±0.2) ، (20.6±0.3) ، (24±0.3) على التوالي للخلاصة الايثانولية و (17.4±0.3) ، (19) ، (20.8±0.2) ، (23.4±0.5) ملم للخلاصة الميثانولية كما لوحظ إن الفعل المثبط الذي أبدته الخلاصات الثلاثة ازداد بزيادة التخفيف المستخدم في حين لم يظهر الماء المقطر الذي استخدم كمادة مخففة أي تأثير يذكر في الأطباق الزرعية صورة (1،2).

جدول (1) تأثير خلاصات قشور ثمرة الرمان في تنشيط نمو بعض مسببات الإسهال الجرثومية في الأطباق الزرعية

نوع الجرثومة	نوع خلاصة قشور الرمان	قطر منع النمو بـ (الملم) التركيز ملغم /مل				
		25	50	75	100	ماء مقطر
الاشيريكيا القولونية *E.coli*	مائية	17±0.2	19.4±0.3	19.8±0.2	23.2±0.2	٠
	ايثانولية	16.6±0.3	19.8±0.2	20.6±0.3	24±0.3	٠
	ميثانولية	17.4±0.3	19±	20.8±0.2	23.4±0.5	٠
الشيكيلا *shigella Spp*	مائية	19.2±0.2	21.6±0.3	24±0.5	27.8±0.4	٠
	ايثانولية	19.6±0.3	21.8±0.5	23.2±0.5	28.8±0.4	٠
	ميثانولية	20.4±0.4	22.4±0.7	23.8±0.4	28.6±0.4	٠

صورة (1) تأثير خلاصات قشور ثمرة الرمان في تثبيط نمو جرثومة الاشريكيا القولونية في الاطباق الزرعية

صورة (2) تأثير خلاصات قشور ثمرة الرمان في تثبيط نمو جرثومة الشيكيلا في الاطباق الزرعية

المناقشة

تبين من خلال نتائج الدراسة الحالية ان لقشور ثمرة الرمان قيمة طبية وعلاجية عالية وذلك من خلال فاعلية خلاصاتها المختلفة (المائية والكحولية الايثانولية والميثانولية) على تثبيط نمو بعض الجراثيم المرضية المهمة المسببة للاسهال عند الاطفال (الاشريكيا القولونية ، الشيكيلا) اذ تبين تأثير كافة الخلاصات المستخدمة قيد الدراسة على تثبيط نمو جرثومتي الاختبار في الاطباق الزرعية وباستخدام طريقة حفر الاكار Agar well

diffusion method مع اختلاف هذا التاثير اعتماداً على نوع الجرثومة والتخفيف المستخدم وكما موضح في الجدول رقم (1) وايدت ما توصل اليه نتائج هذه الدراسة مع نتائج الدراسات القليلة التي تم الحصول عليها في هذا الصدد والتي قيمت فيها فاعلية قشور ثمرة الرمان ضد الجراثيم المرضية والمنشورة على شبكة المعلومات الدولية (Internet) اذ لم يتم الحصول على دراسات كافية حول هذا الموضوع اذ وجد الباحث Moneam وجماعته (1988) ان لعصارة ثمار الرمان فعلاً قاتلاً للجراثيم المرضية ، كما اعطت خلاصات ثمار الرمان تأثيراً مبيداً لانواع عدة من الجراثيم المرضية بتخفيف 60:1 فضلاً عن الفعل المضاد للجراثيم لخلاصة قشور الرمان (Watt and Breyer-Brandwijk ,1962) كما لوحظ في دراسة محلية قامت بها الباحثة عبد الرحمن (1995) التأثير التثبطي لمنقوع قشور الرمان بجانب منقوع نبات ثمار السرو ومادتي الشب وزبدة البحر على نمو اربعة انواع من الجراثيم وهي : (*staphylococcus aureus , streptococcus pyogenes , E . coli* , Klebsiella spp) وكان التأثير اكبر على الجراثيم الموجبة لصبغة كرام منه على الجراثيم السالبة لصبغة كرام كما اثبت الباحث Voravuthikunchai وجماعته (2004) الفاعلية المضادة لخلاصة قشور ثمرة الرمان الايثانولية على نمو جرثومة الاشريكيا القولونية . يستخدم منقوع قشور الرمان في معالجة الاسهال في مجال الطب الشعبي في كثير من بلدان العالم (Chidambara *et al*.,2002) وقد ورد ذكر قشور ثمرة الرمان بجانب لحاء الساق والجذور كعلاج مسجل في دستور الادوية الامريكي (USP) للاعوام من 1920 ولغاية 1950 واشير الى ان قشور الرمان والساق والجذور تحتوي على مادة pelletierine وبنسبة 5.2% وعلى مادة Pseudopelletierine بنسبة 17.9% و isopelletierine بنسبة 0.15 فضلاً عن مادة methylpelletierine (Watt and Breyer –Brandwijk , 1962) تعود الفاعلية المضادة للجراثيم وبقية الاحياء المجهرية المرضية لمادة قشور ثمرة الرمان الى احتواء الاخيرة على عدد من المركبات الكيميائية الفاعلة والمسجلة فاعليتها ضد الجراثيم اذ اثبتت الدراسات احتواء اجزاء شجرة الرمان على مادة التانينان (tannins) من نوع gallotannins وان القشور والسيقان والجذور تحتوي على ما لايقل عن 25% من التانينان (Voravuthikunchai *et al*.,2004) كما وتم عزل اربع انواع من القلويدات الفاعلة من خلاصات قشور ثمرة الرمان وهي قلويد Pelletierine الذي يعرف بأسم punicine وقلويد iso Pelletierine وقلويد Ethylpelletierine وقلويد pseudopelletierine الذي يعرف باسم methylgrantanine . كما اشار التحليل الكيميائي للخلاصة الايثانولية لقشور الرمان احتواءها على كل من الستيرولات steriols والفلافنويدات Flavonoids والتربينات الثلاثية triterpens والفينولات phenols والتانينات tannins (Voravuthi Kunchai *et at* .,2005) وتعد الاخيرة من المركبات المهمة المعروفة في فعاليتها ضد المايكروبات (Sealbert , 1991) .

كما لوحظ ان الفعل المثبط للخلاصات الثلاثة لقشور ثمرة الرمان المستخدمة قيد الدراسة على العزلات الجرثومية المسببة للاسهال تتناسب تناسباً طردياً مع زيادة التركيز المستخدم واظهرت نتائج الدراسة وجود فروقات مهمة احصائياً وعند مستوى احتمالية 0.05 في معدلات اقطار تثبيط النمو بين التراكيز المختلفة ويعود السبب في ذلك الى زيادة المادة او المواد الفاعلة ضد الجراثيم بزيادة التركيز المستخدم في الغالب وخصوصاً مادة التانينان .

المصادر

* عبد الرحمن، غاده يونس . (1995) . تاثير بعض النباتات الطبية والمواد الكيمياوية على نمو الجراثيم المرضية . المجلة العراقية للعلوم البيطرية . المجلد الثامن . ص 101-108
* سعدي ، شكري إبراهيم ؛ عبد الله ، القاضي ومحمد ، صالح عبد الكريم . (1988) . النباتات الطبية والعطرية والسامة في الوطن العربي . جامعة الدول العربية ، المنظمة العربية للتنمية الزراعية . الخرطوم .ص59-61 .
* قطب ، فوزي طه . (1981) . النباتات الطبية زراعتها ومكوناتها . دار المريخ للنشر . الرياض . ص31 .
* Chidambara , K . ; Jayaprakasha , G . K . and Singh , R . P . (2002) . Studies on antioxidant activity of pomegranate (Punica granatum) Peel extract using in vivo models . J . Agric . Food chem . 50 :4791-4795.

* Forbes , B . A .; Sahm , D . F . and Weissfeld , A . S . (1998) . Enterobacteriaceae proteus In : Baily and Scott's Diagnostic Microbiology . 10th –ed . Mosby company . USA .

* Gracious , R . R .; Selvasubramanian , S . and Jayasundar . S .(2001) . Immunomodulatory activity of punica granatum in rabbit apreliminary study . J . Ethnopharm . 78 : 85-89 .

* Gupte , S .(1996) . The Short Textbook of Pediatrics . 7th –ed . Brothers Medical Publishers . LTD. India .

* Hermandez – Alles , 5 .; Alberti , S .; Alvarez , D .; Domenech – Sanchez , A .; Tomas , J . and Benedi , V . (1999) . Porin expression in clinical isolates of klebsiella pneumoniae . Microbiol . 145 : 673 – 679 .

* Jawets,E.;Melinch,J.A.;Adelberg,E.A.;Brooks,G.F. and Butel,J.S.(1980). Medical Microbiology. 9th ed.Appeltonad Large.California.US.

* Khalil,E.A.(2004).Antidiabetic effect of an aqueous extract of pomegranatum L.peels in normal and alloxan diabetic rats.J.Egypt of hosp.Med. 16:92-99.

* Mavhjanav,S.M.;Islambekov,S.Y.;Karimdzhanav,A. and Alsmailov,A. (1997).Polyphenols of pomegranate peels show marked antitumor and antiviral action . Khim.Prir.Soedin.33:124.

* Mims , C .; Plyfair , J .; Rott , I .; Wakelin , D .; Willams , R . and Anderson , R . (1998) . Medical Microbiology . Mmosby . London .

* Moneam,N.M.;El-Sharaky,A.S. and Badreldin,M.(1988).Oestrogen content of pomegranate seeds.J.Chromatogr.2:438-442.

* Morsy , T . A . ; Mazyad , S . A . and El-Sharkawy , A . (1998) . The larvicidal activity of solvent extracts of three medicinal plant aganits third instar larvae of chrysomyia albiceps . J . Egypt . Soc . Parasitol . 28 :699 .

* Navarro,V.;Villarrwal,M.;Rojas,G. and Lozoya,Y.(1996).Antimicrobial evaluation of some plants used in mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases.J.Ethnopharma.53:143.

* Pagine , L .; Migliavacca , R .; Rallecchi , L .; Matti , C .; Rossolini , G .(1998) . Emerging extrabilis . J . Clin . Microbiol . P 1549-1552 .

* Scalbert , A .(1991) . Antimicrobial properties of tannins . phytochemistry . 30 : 3875-3883 .

* Singh,R.P.;Chidambara,M. and Jayaprakasha,G.K.(2002).Studies on antioxidant activity of pomegranate (punica granatum) peels and seeds extracts using in vitro models.J.Agric.Food chem.50:81-86.

* Voravuthikunchai , S . P . ; Brusentsev , S . ; Mitchell , H . (2004) . Efficacy of crud extracts of Thai medicinal plants on antibiotic – resistant *Helicobacter pylori* strains isolated from peptic ulcers . Microbiol . Infect . 10 :334 .

* Voravuthikunchai , S . P . and Kitpipit , L . (2003) . Activities of crude extracts of Thai medicinal plants on methicillin – resistant staphylococcus aureus . J . Clin . Microbiol . Infect . 9 :236 .

* Voravuthikunchai,S.;Lortheeranuwat,A.;Jeeju,W.;Seirirak,T.;Phongpaichit, S.and Supawita,T.(2004).Effective medicinal plants against Entero-haemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7.J.Ethno-pharmacology.94:49-54.

* Voravuthikunchi,S.;Sririrak,T.;Limsuwan,S.;Supawita,T.;Iida,T.and Honda,T.(2005).Inhibitory effects of active compounds from punica granatam pericarp on verocytotoxin productionby Enterohemorrhagic *Escherichia coli* o157:H7.J.Health Scienece . 51:590-596 .

* Watt ,J.and Breyer-Brandwijk,M.(1962).The medicinal and poisons of southern and eastern Africa . Livingston Ltd . Edinburgh and London .pp875-876.

* WHO .(2000) . Reading on diarrhea : Study manual . WHO . Geneva , Switzerland .