# تأثير مستخلص قشور الرمان على تثبيط نمو بعض الجراثيم السالبة والموجبة لصبغة كرام

**عبير عبد الغني محمد الجميلي**

**المعهد التقني / قسم التحليلات المرضية/ الموصل – العراق**

**الخلاصة**

تضمنت الدراسة اختبار الفعالية التثبيطية للمستخلص المائي الكحولي لقشور ثمرة نبات الرمان Punica granatum L. ( pomegranate ) على نمو بعض العزلات السريرية الممرضة للإنسان باستخدام كل من تقنية العكارة والأقراص الورقية ( paper disck ) المعاملة بتخفيفات (2.5,5,7.5,10,15,20) ملغم/مل على التوالي من المستخلص المائي والكحولي لقشور ثمرة الرمان . كما نم استخدام المضاد الحيوي (cefotaxime) لغرض المقارنة كعينة سيطرة . وتشير النتائج إلى أن أعلى تأثير تثبيطي للمستخلص المائي ضد كل من بكتريا Pseudomonas aeroginosa , Streptococcus pyogens , Escherichia coli عند التخفيف (20) في حين لم يظهر المستخلص الكحولي أي تأثير تثبيطي ضد البكتريا . كذلك أشارة نتائج اختبار العكارة إلى العلاقة العكسية ما بين التراكيز ونمو الجراثيم إذ كلما زاد التركيز قل نمو الجراثيم .

**المقدمة :**

تعتبر النباتات الطبيعية مصدراً مهماً للعديد من المواد الصيدلانية منذ لقدم والى يومنا هذا يستخدمها الناس في علاج العديد من الأمراض وذلك لاحتوائها على عدد كبير من المركبات ذات الفعالية الحيوية (vanisree *et al.*,2004) . ويعد الرمان وهو ثمار شجرة الرمان Punica granatum واحداً من تلك النباتات ذات الأهمية الطبية وموطنه الأصلي جنوب غرب أسيا أو في قرطاجة وتنتشر زراعته تجاريا في معظم الأقطار الغربية وشمال غرب الهند (2005،البراهيم). تحتوي حبوب ثمرة الرمان على نسبة عالية من الماء تقدر حوالي 81% إضافة إلى العديد من المواد الأخرى منها السكريات والبروتينات والدهون والألياف وفيتامين C كذلك تحتوي على العديد من العناصر منها الكالسيوم والفسفور والحديد والثيامين والرايبوفلافين( 1976، عازر ) (Watt,Breyer 1962) . أما القشرة الخارجية لثمرة الرمان فهي تحتوي على حامض العفص Tannic وهي مادة قابضة يستعمل مسحوقها كمضاد ممتاز لمعالجة الإسهال ، ومغلي القشور يعمل كمواد طاردة للديدان خاصة الدودة الوحيدة لاحتوائه على العديد من المواد القلويدية ومنها pelletierine . كذلك وجدت هذه

المادة مع قلويدات أخرى هي isopellefierine , N-methylisopellelierine ethyl , ethylpelleticrin , pseudopelleticrin ، في جذور وسيقان شجرة الرمان (Mahmoud *et al* .,1994 ; Moneam *et al*., 1988; Hussein *et al* .,1997) وقد لوحظ في العديد من الدراسات بان ثمرة الرمان لها فعل قاتل ومثبط لنمو الميكروبات السالبة والموجبة لصبغة كرام وعدد من الفطريات مثل T.rubrum , tonsuran (1998، الجنابي) (Prashanth *et al*., 2001) ونظراً لأنواع المركبات الكيماوية التي تحويها ثمار الرمان وفوائدها الكثيرة في معالجة العديد من الأمراض لذا يهدف البحث الحالي إلى تقيم المستخلصات المائية والكحولية لثمرة الرمان على الجراثيم الممرضة للإنسان في مدينة الموصل .

## المواد وطرائق العمل.

**الرمان:**- تم الحصول على ثمار الرمان من الأسواق المحلية لمدينة الموصل وجرى التحقق من صنف النبات في كلية التربية / قسم علوم الحياة .

**العزلات الجرثومية** :- عزلت جراثيم Pseudomonas aeroginosa , Streptococcus pyogens , Escherichia coli عن طريق اخذ مسحات من حالات المصابين بالحروق والراقدين في مستشفى الزهراوي التعليمي في مدينة الموصل نقلت المسحات باستخدام الوسط الناقل N.broth إلى المختبر وتم زراعتها على الأوساط الغذائية الخاصة لعزل الجراثيم . كما شخصت الجراثيم المعزولة من خلال ملاحظة الصفات الشكلية والفحوصات الكيموحيوية استناداً إلى (Koneman et al.,1997) كذلك تم إجراء فحص حساسية الجراثيم المعزولة للمضادات الحيوية والمستخلصات النباتية على وسط الاكار المغذي N.broth لاختبار العكارة .

## تحضير المستخلص النباتي المائي .

حضر المستخلص المائي لقشور ثمرة نبات الرمان عن طريق مزج (40) غم من القشور المسحوقة بشكل جيد وباستخدام جهاز Blender مع 60 سم$^3$ من D.W بنسبة 4-1 وزن/حجم حرك المزيج لمدة ساعة بواسطة المحرك الكهرومغناطيسي (magnatic stirrer) لسحق جدران الخلايا النباتية ثم ترك المزيج في الثلاجة لمدة 24 ساعة

لغــرض النقــع رشح المزيج بعدها من خلال طبقات الشاش للتخلص من الأجزاء غير المسحوقة وبقايا الألياف . ثم جفف المستخلص المائي بالتجميد تحت ضغط مخلخل بواسطة جهاز التجفيد (lypholizer) المجهز من شركة (Edwards) بعد ذلك تم حفظ عينات المستخلص الجاف في قناني زجاجية ذات أغطيــة محكمــة في ظروف خالية من الرطوبة وتحت التجميد لحين الاستخدام (Riose *et al*.,1987) .

**تحضير المستخلص النباتي الكحولي .**

اتبعت طريقة (Grand *et al*.,1988) في تحضير المستخلص الكحولي إذ تمت عملية الاستخلاص بسحق النبات مع المذيب (Methanol) بنسبة (1غم/5مل V/W) رج المزيج بشكل جيد ولمدة 1-2 ساعة باستخدام المحرك الكهرومغناطيسي (Magnatic Stirrer) ثم ترك بعد ذلك المزيج في الثلاجة لمدة (24) ساعة لغرض النقع ، رشح بهدها خلال عدة طبقات من الشاش لتخلص من الجزيئات غير الذائبة وأجريت عملية تبخير المذيب باستخدام جهاز المبخر الدوار (Rotary Vacuum evaporator) عند درجة حرارة لا تزيد عن 40م° استمرت عملية التبخير هذه لحين إزالة لمذيب الموجود في المزيج بشكل كامل وبذلك تم الحصول على المستخلص النباتي الكحولي وهو على هيئة طبقة سميكة وأخيراً جفف هذا المستخلص بعملية التجفيد .

**تعقيم المستخلصات المائية الكحولية .**

تم تعقيم المستخلص المائي والكحولي عن طريق إذابة المستخلص النباتي المائي ألجاف مع الماء المقطر وبنسبة (1غم/5مل V/W) للحصول على تركيز قياسي 200ملغم/مل ،مرر المحلول المائي من خلال ورق ترشيح قياس (0.22) الذي يمنع مرور الجراثيم ، واعتمد هذا التركيز القياسي في تحضير التخافيف . أما المستخلص الكحولي فقد تم تعقيمه بطريقة البسترة عند درجة حرارة 62 م° لمدة 10 دقائق وبهذا تم الحصول على التركيز القياسي ومنه تم تحضيرالتخافيف(1998، النعمان) .

**اختبار الفعالية الحيوية للمستخلصات .**

استخدمت طريقتين لاختبار حساسية الجراثيم للمستخلصات النباتية :

**أولاً : – طريقة اختبار الحساسية بالأقراص Sensitivity test method .**

اتبعــت الطريقــة (Leven *et al* ., 1997) المعتمدة على طريقة (Vandpitte *et al* .,1991) إذ تم تلقيح وسط المرق المغذي بمستعمرات مفردة من الجراثيم السابقة الذكر وبشكل منفرد ثم حضن الوسط بدرجة حرارة 37م° ولمدة (18-24) ساعة بعد ذلك أجريت سلسلة من التخافيف بالمحلول الملحي الفسلجي Normal saline وتم الحصول على تركيز يعادل 10 خلية /مل مقارنة مع الأنبوب رقم (1) من أنابيب ماكفرلاند القياسية ( Macfr land No1 ) نشر واحد من المعلق الجرثومي على سطح الاكار المغذي الاعتيادي باستخدام الناشر الزجاجي المعقم وتركت الأطباق لمدة 30 دقيقة في الحاضنة . ثبتت الأقراص الورقية المحضرة من ورق الترشيح Watman (No1) والمشبعة بتراكيز مختلفة من المستخلص المائي والكحولي المراد اختباره على سطح أطباق الاكار وحضنت عند 37م° ولمدة 24ساعة بعد ذلك تم قياس مناطق التثبيط وقورنت مع المضاد الحيوي القياسي Cefotaxime كعينة سيطرة موجبة (Todar, 2002).

**ثانيا:- طريقه اختبار العكارة Turbidity test method**

أضيف (0.1) مل من المستخلص النباتي و بتراكيز مختلفة إلى أنابيب حاويه علــى ( 9.8 ) مل من المرق المغذي ثم لقحت هذه الأنابيب بمقدار ( 0.1 ) مل من العالق الجرثومي بتركيز 10خليه جرثوميه/ مل وبمعدل خمس مكررات لكل تركيز من المستخلصات، حضنت الأنابيب عند درجه حرارة 37م° ولمدة (14-16) ساعة، بعدها تم قياس العكارة باستخدام جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer نوع (Aple) عند الطول ألموجي (595) نانوميتر، ولتحديد مدلى تأثير المستخلصات ألنباتيه على نمو الجراثيم قورنت النتائج مع عينه السيطرة المحضرة من أضافه (0.1) مل من العالق الجرثومي المخفف و(0.1) مل من المذيب إلى (9.8) مل من وسط المرق المغذي. وتم تحديد التركيز المثبط الأدنىMIC باستخدام اختبار العكارة إذ حضرت سلسله من التخافيف (2.5,5,75,10,15,20) ملغم/مل من المستخلص لقحت بالجراثيم وان أعلى تخفيف أدى إلى منــع نمــو الجراثيــم مقارنــه مع عينة السيطــرة هــو التركيز المثبط الأدنى MIC (1998، النعمان) .

**النتائج والمناقشة**

تظهر أهمية قشور الرمان من خلال النتائج التي تم الحصول عليها في الدراسة الحالية إذ تشير النتائج إلى الدور الفعال الذي تقوم به المستخلصات المائية لقشور الرمان على قتل وتثبيط نمو الجراثيم السالبة والموجبة لصبغة كرام كما مبين في الجدول رقم (1) إذ كان أعلى تأثير عند التخفيف 7.5 ملغم/مل للمستخلص المائي على جرثومة Pseudomonas aeroginosa وقد بلغ قطر التثبيط الكامل 24 ملم ، تتفق هذه النتيجة مع ما توصل إليه (Hussein *et al.*,1997) ، في حين اظهر نفس التخفيف 20 ملغم/مل تأثير تثبيطي واضح ضد كل من جراثيم Streptococcus pyogens وجراثيم Escherichia coli إذ بلغ قطر التثبيط 21 ملغم و 14ملغم على التوالي . كما موضح ذلك في الشكل (3,2,1) بالنسبة للأنواع الثلاثة من الجراثيم ، وهذا ما أشار إليه كل من (Hussein *et al.*,1997;Saeed and Tariq 2006 ) إذ ربما يعود السبب في التأثير السلبي على نمو الجراثيم إلى واحد أو أكثر من المكونات الكيماوية التي تحتويها قشور الرمان ، إذ أن تواجد المواد العفصية مثل Tannine قد يؤثر على طبيعة البروتينات في الجراثيم مما يؤدي إلى قتلها أو ربما يؤثر على الغشاء البلازمي مغيراً بذلك خواصه الوظيفية مما يؤدي إلى تثبيط نمو الجراثيم (Sumner *et al.*,2005 ; Ghazouli *et al* .,1999 ; Scalbert ,1991) كذلك تواجد البولي فينول Polyphenol والفلافونويدات flavonoids وellagic acid في المستخلصات المائية للنبات والتي لها تأثير قاتل ضد الجراثيم (Seeram *et al* .,2005 ;Gil *et al*., 2000) كما تبين النتائج من خلال الجدول رقم (2) عدم كفاءة المستخلص الكحولي بتراكيزه المختلفة على تثبيط نمو الجراثيم السالبة والموجبة لصبغة كرام مقارنة مع التأثير التثبيطي للمستخلص المائي والمضاد الحيوي cefotaxime عينة السيطرة الموجبة ، ربما يعود السبب في ذلك إلى تأثير المذيب الكحولي على المركبات الكيماوية لقشور الرمان مما قد يؤدي إلى فقدان قابليتها في التأثير التثبيطي ضد الجراثيم ولهذا يكون المستخلص المائي ذو فعالية عالية في القتل والتثبيط (Ghazouli *et al*,.1999) . ويشير الجدول رقم (3) إلى نتائج العكارة للتخافيف المختلفة للمستخلص المائي لقشور الرمان المثبط لنمو الجراثيم السالبة والموجبة لصبغة كرام قيد الدراسة ، إذ يتضح زيادة التثبيط للجراثيم مع زيادة تراكيز المستخلص المائي كما أشارت إلى ذلك النتائج إذ أعطى اقل تركيز 2.5 ملغم/مل (التركيز المثبط الأدنىMIC) من المستخلص المائي القراءات التالية

(1.022,1.180,0.698) عند الطول ألموجي (595 NM.) لكل من Escherichia coli , Pseudomonas aeroginosa , Streptococcus pyogens على التوالي في حين تستمر القراءات بالنزول تدريجياً مع زيادة التركيز حتى تصل أدناها عند التركيز (20ملغم/مل) إذ بلغت (0.356,0.173,0.150) عند الطول ألموجي (595 nm.) لكل من Escherichia coli , Pseudomonas aeroginosa, Streptococcus pyogens على التوالي ، جاءت هذه النتائج منفقة مع كل من (1998، النعمان ؛ 2001، السليمان ) . تبين هذه النتائج بدرجة عالية تأثير المستخلص المائي لقشور الرمان في تثبيط أو قتل الجراثيم السالبة والموجبة لصبغة كرام على حد سواء .

**جدول (1) تأثير المستخلص المائي لقشور ثمرة نبات الرمان بتراكيز مختلفة على أنواع من البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام ( قطر دائرة التثبيط مقاس بالملم )**

| البكتريا | تركيز المستخلص المائي لقشور ثمرة نبات الرمان ملغم/مل | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 20 | 15 | 10 | 7.5 | 5 | 2.5 |
| **Escherichia coli** | 14 | 10 | 8 | 7 | – | – |
| **Streptococcus pyogens** | 21 | 18 | 16 | 10 | – | – |
| **Pseudomonas aeroginosa** | 24 | 21 | 19 | – | – | – |

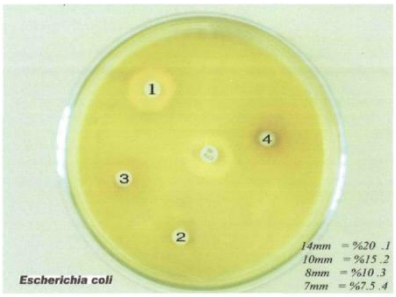
**الجدول (2) الفعالية التثبيطية لمستخلصات قشور ثمرة الرمان على أنواع مختلفة من البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام مقارنة بالمضاد الحيوي cefotaxime**

| البكتريا | المستخلص الكحولي | المستخلص المائي | cefotaxime |
|---|---|---|---|
| **Escherichia coli** | – | 14 | 14 |
| **Streptococcus pyogens** | – | 21 | 10 |
| **Pseudomonas aeroginosa** | – | 24 | 11 |

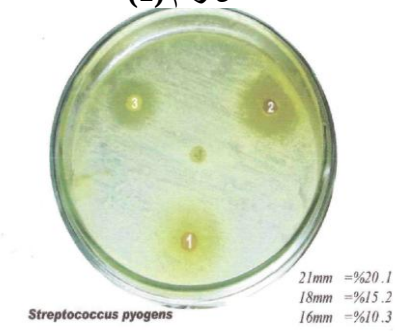
**جدول (3) يبين نتائج اختبار العكارة**

| البكتريا | تركيز المستخلص المائي لقشور ثمرة نبات الرمان ملغم/مل | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 20 | 15 | 10 | 7.5 | 5 | 2.5 |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *0.698* | *0.381* | *0.193* | *0.173* | *0.165* | *0.150* | **Escherichia coli** |
| *1.180* | *1.050* | *0.828* | *0.420* | *0.251* | *0.173* | **Streptococcus pyogens** |
| *1.022* | *0.744* | *0.602* | *0.366* | *0.361* | *0.356* | **Pseudomonas aeroginosa** |




**الشكل رقم (1)**




**الشكل رقم (2)**

**الشكل رقم (3)**

## References


- Ghazouli, K., Kheunouf, S., Amira, S.etal .(1999). Effect of aqueos extracts from Quercus ilex L.root bark , punica granatum L. fruit peel and Artemisia herba - alba leaves on ethanol induced gastric damage in rats . Phytother.Res.13: 42-45 .
- Gil, M . I., F.A .TOMAS -Barberan , B .Hess - pierce , D . M . Holcrofi and A .A . Kader. ( 2000). Antioxidant activity of pomegranate juice and its elation ship with phenolic composition and processing J . Agric food chem. .48:4581-4589.
- Grand , A.; Woudergem , P.A.; Verportes , R. and Pousset, J.L.(1988). Anti infection phytotherapies of tree-savannahsengl (West- Africa) II-Antimicrobial activity of 33 species . J. Ethnopharmacol.,22:25-31 .
- Hussein , S.A.M.; Barakat, H.H .; Merfort,I. and Nawwar , M.A.M. (1997).Tannins from the leaves of Punica granatum phytochemistry 45:819-823 .
- Koneman,E.W.;Allen,S.D.;Dowell,V.R;Janda,W.M.;Sommer,H.A. and Winn,W.C. (1997) .Color Atlas Textbook of Diagnostic Microbiology. 4 ed.T.B.Lippinaott comp.,phil a delphia.
- Levwn M. , Vandenberghe D.A. , Metens F. , Vlietinck A. and Lammens E. (1997). Screening of higher plants for biological activites . I. Antibacterial activity . Planta . Medica . 36 : 311-321 .

- Mahmoud ,a.;Nawwar ,M.; Sahar ,A.; Hussein ,M. and Merfort ,I.(1994). NMR spectral analysis of polyphenols from Punica granatum . phytochemistry , 36: 793-798.
- Moneam ,N.M., el-sharaky ,A.S. and Badreldin ,M.(1988). Oestrogen content of pomegranate seeds .J.chromatogr 438(2)438-442 .
- Nascimento .g.g.f .,Lacatelli .j., Freitas .p.c ., Silva . G.L.(2000). Antibacterial activitz of plant extracts and phytochemical on antibiotic-resistant bacteria. Braz. J.microbiol . 31 :247-256.
- Prashanth ,D. ; Asha ,M.K. and Amit , A.(2001). Antibacterial activity of Punica granatum .71(2):171-173.Bangalore. India .
- Riose , J .L. ; Recio , M.C. and Villar , A. (1987). Anti microbial activity of selected plant employed in the Spanish mediterrane and area J. Ethnopharmacol ., 21:139-152 .
- Saeed sabahat and tariq perween . (2006). Effect of some seas and vegetable and fruits on the growth of bacteria .pakis.j.Biolog . scien . 9(8) : 1547-1551
- Sato , Y; Odetain , H.; Singyouchi, K.; Ohtsubo ,T.; Kihara , M.;Shibata , H. and Higuti, T. (1997). Extraction and purification of effective antimicrobial methicillin-resistant Staphylococcus.Biol.Pharm Bull.20:401-404.
- ScalbertA.(1991). Antimicrobial properties of tannins . Chemistry . 30 :3875-3883.
- Seeram , N. P ,, L . S . Adams , S . M . Henning , y . N iu , y. Zharg ,M .G. Nair ,and D . Herber . (2005) . Invitro antiproliferation , apoptotic and antioxidant activites of punicalagin , ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enh anced in combination with other polphenols as found in pomegranate juice . J . Nutr. Bioche . 16 (6) : 360-367 .
- Sumner,M.D.,M.Flliott.eller,G.Weidner,J.J.Daubenmier,M.H.chew, R.Marlin,C . J .Raisin and D.Ornish.( 2005) . Effect of pomegranate juice consumption my ocardial per Fusion in patients with coronary heart disease . Am J.cardio .96:810-814 .
- Todar ,. K . (2002 ) . Staphylococcus . J. Med. Microbiol., 1-9 .
- Vandpitte J., Engloback . K., Piotep . P. and Heuk . C. (1991). Basic laboratory procedures in clinical bacteriology . Word Health Organization , Geneva .

- Vanisree , M.; Lee , C.Y.; Lo , S.F.; Nalawade , S.M.; Lin , C. and Tsay ,H.S. (2004).Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue culture . Bot. Bull. Acad. Sin. 45:1-22.
- Watt, J . M .and Breyer -Brandwijk , M . G .(1962).The medicinal and poisons plants of southern and eastern Africa. E. and S. Livingston Ltd .Edinburgh and London Pp 875- 876 .
- البراهيم ، جهان بنت سعود بنت راشد ،(٢٠٠٨) : تأثير عصير الرمان ضد البكتريا المسببة لالتهابات الجروح .ASS.Univ.Bull.Environ.Res.Vol.11 No2
- الجنابي ، علي عبد الحسين صادق ،(١٩٩٦) : تأثير بعض المستخلصات النباتية على نمو بعض الفطريات الممرضة لجلد الإنسان . رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، الجامعة المستنصرية ، العراق .
- النعمان ، أديبة يونس شريف ،(١٩٩٨) : التأثير الجزيئي لبعض المستخلصات النباتية على نمو وايض عدد من الجراثيم الموجبة والسالبة لصبغة كرام ، أطروحة دكتوراه ، كلية العلوم جامعة الموصل ، العراق .
- سليمان ، صبا مؤيد ،(٢٠٠١) : التأثير التثبيطي لعدد من النباتات الطبية وبعض مكوناتها الفعالة في بعض أنماط السالمونيلا المعزولة من المرضى المصابين بالإسهال ، رسالة ماجستير ، كلية التربية ، جامعة الموصل ، العراق .
- عازر ، نوار ايريس ،(١٩٧٦) : الغذاء والتغذية ، دار المطبوعات الجديدة – الإسكندرية ، مصر ، ص ٤٨١–٥٠٠ .

# The Inhibition Effect of Punica Granalim Extract on the Groth of some $G^-$ and $G^+$ Bacteria

*Abeer A. Muhammad*
*Technical Institute , AL – Mousl*

## Abstract

The present study includes the test of the decreasing activity for the watery and alchoholic extract of Punica granatum on the growth of some clinical samples which can attack humans, using paper disc technology with (2.5,5,7.5,10,15,20)mg/ml respectively. also it used the antibiotech cefotaxime to compare as a control sample . results refer to the highest impact of the watery extract against both Pseudomonas aeroginosa , Streptococcus pyogens , Escherichia coli was (20) whereas no impact have been seen in alchoholic one against those bacteria . also we have the reversive relation between concentrations and the growth of germs , whenever the concentration increases , the number of germs decreases .