

التأثير المشترك للمضادات الحيوية و بعض المستخلصات النباتية في حيوية بعض انواع البكتيريا

قيصر نعمه مظلوم الربيعي

كلية الطب-جامعة بابل

cesar2006.babil@gmail.com

الخلاصة

هدفت الدراسة الحالية الى اثبات إمكانية الاستفادة من المستخلصات النباتية المستخدمة بصورة واسعة في علاج الامراض البكتيرية في زيادة حساسية البكتيريا تجاه بعض المضادات الحيوية. تم اختبار تأثير ثلاثة انواع من المستخلصات النباتية للنباتات (*Eucalyptus spp*, *Allium sativum* and *Punica granatum*) على حيوية بكتيريا *Staphylococcus aureus*, كما استخدم نوع ثاني من البكتيريا السالبة لصبغة كرام هي *Pseudomonas aerogenosa* لمقارنة تأثير المستخلصات النباتية منفردة او بالتزامن مع المضادات الحيوية على كلا النوعين من البكتيريا.

جرى اولا تحديد التركيز المثبط الادنى للمستخلصات النباتية على كل بكتيريا حيث ظهر تباين كبير في حساسية الانواع البكتيرية تجاه المستخلصات النباتية وذلك نتيجة الاختلاف في تركيب الجدار البكتيري بين النوعين المستخدمين في الاختبار. ومن ثم جرى اختيار عدد من التراكيز دون مستوى التركيز المثبط الادنى Sub inhibitory concentrations لاختبار التأزر مع المضادات الحيوية وكذلك تم اختيار ثلاث انواع من المضادات الحيوية المختلفة من حيث ميكانيكية العمل و حساسية البكتيريا تجاهها, وبعد ذلك تم اختبار حساسية كل بكتيريا تجاهها بوجود تراكيز مختلفة من المستخلصات النباتية وبطريقة الانتشار في الاكار. اظهرت النتائج دلائل مشجعة على امكانية استخدام المستخلصات النباتية لزيادة حساسية البكتيريا تجاه المضادات الحيوية حيث زادت اقطار مناطق التثبيط بشكل كبير بوجود المستخلصات مقارنة مع اقطارها بدون المستخلصات. كما ان بعض المضادات التي لم يكن لها اثر يذكر على البكتيريا قد انتجت مناطق تثبيط واضحة. من خلال هذه الدراسة يمكن الاستنتاج ان مشكلة المقاومة البكتيرية للمضادات الحيوية التغلب عليها بطريقة بسيطة و غير مكلفة من خلال استخدام المركبات النباتية والتي تحتاج الى مزيد من الدراسة لتحديد انواعها وتراكيزها في الاجزاء النباتية وميكانيكية عملها بصورة دقيقة.

الكلمات المفتاحية: المستخلصات النباتية، المضادات الحيوية، التأثير المضاد للبكتيريا، علاج الالتهابات البكتيرية

Abstract

This study aimed to confirm the benefit utilization of plant extracts, widely used for the treatment of bacterial diseases, to increase bacterial sensitivity against some antibiotics. Three types of plant extracts were examined (*Eucalyptus spp*, *Allium sativum* and *Punica granatum*) on the viability of *Staphylococcus aureus* bacteria, another type of gram negative bacteria *Pseudomonas aerogenosa* were used to compare the effect of plant extract alone or along with antibiotics on the viability of both types of bacteria. First of all, minimum inhibitory concentration for the plant extracts on each type of bacteria were determined, large variation in bacterial sensitivity to every type of plant extract were observed, this result was due to the difference in cell wall composition between the two types of bacteria used in the test. After that, number of sub inhibitory concentrations used to determine the synergism with antibiotics. We choose three types of antibiotics; differ in their mode of action, and in bacterial sensitivity toward it, and then antibiotic sensitivity for each antibiotic was performed in the presence of different concentrations of plant extract by using agar diffusion method. The results shows good evidence on the capability of the utilization of plant extracts to increase bacterial sensitivity toward antibiotics appears as increasing of inhibition zones in the presence of plant extract comparing with its size without the extracts. Moreover, some antibiotics which have no effects on bacteria show clear inhibition zones. From this study, we conclude that the problem of bacterial resistance to antibiotics could be overcome by a simple and inexpensive method by using plant compounds which need more study to determine their types and concentrations in the plant parts and their mechanism of action accurately.

Keywords: plant extracts, antibiotics, effect antibacterial, therapy infection bacterial.

المقدمة

ان الامراض المعدية Infectious diseases تمثل العامل الاهم للامراضية والوفاة في المجتمعات البشرية خاصة في الدول النامية. و رغم الانتشار الواسع للادوية المضادة للبكتيريا خلال السنوات الاخيرة, الا ان المقاومة لتلك العلاجات من قبل الاحياء المجهرية قد اتسع نطاقها بشكل ما ادى الى بروز الحاجة الى الادوية البديلة وخاصة المنتجات الطبيعية (Betoni *et al*, 2006; Sani, 2014)

يجري البحث حاليا في استخدام المركبات الكيميائية النباتية phytochemical products كعوامل معدلة للمقاومة Abreu *et al.*, resistance-modifying agents (RMAs) لتقليل مقاومة المايكروبات للمضادات الحياتية (2012). يطلق مصطلح Phytochemicals على المركبات الكيميائية النباتية ومواد ليس من الضروري ان تكون ذات تأثير طبي معروف بل قد تكون جزيئات بنائية او خزين غذائي للنبات او جزيئات ضرورية لعملية الايض والعمليات الفسلجية الاخرى او مركبات ابيض ثانوي. تمتلك النباتات غالبا قدرة غير محدودة لتخليق المواد الطيارة aromatic substances واغلبها فينولات او مشتقاتها المؤكسدة, تعمل هذه المواد كعوامل حماية للنبات ضد الاحياء المجهرية والحشرات واكلات الاعشاب. وبعضها تعطي الرائحة المميزة للنبات واخرى مسئولة عن اللون او الطعم. وقد قسمت المواد المفيدة طبيا الى مجاميع هي :

1. Phenols and Polyphenols (Quinones, Flavones, flavonoids, Tannins)
2. Terpenoids and Essential Oils
3. Lectins and Polypeptides
4. Alkaloids
5. Mixtures
6. Other Compounds (polyamines, isothiocyanates, glucosides)

وتشكل المركبات الطبيعية المصدر الاول تجاريا للمستحضرات الطبية والادوية (Cowan, 1999; Cseke *et al* 2006).

رغم ان تأثير المركبات النباتية المضاد للبكتيريا امر مثبت علميا الا ان الميكانيكية التي تؤثر بها هذه المركبات لاتزال غير معروفة بشكل دقيق. لكن يبدو ان التفاعل الكاره للماء Hydrophobic interaction مهم في التفاعلات الخلوية للمايكروبات فهو يؤثر على السلوك الفيزيوكيميائي والحياتي للعديد من المواد. فمثلا وجد ان عملية التصاق البكتيريا المعوية على جدران الامعاء والذي هو ضروري لاحداث المرض مرتبط بخاصية كره الماء بالنسبة للجدار الخلوي للبكتيريا , وقد وجد ان العديد من المركبات النباتية تؤثر على هذه الخاصية ومنها المركبات الموجودة في مستخلص الرمان مما يقلل من التصاق البكتيريا على السطوح الخلوية ويسهل عملية ازلتها (Voravuthikunchai *et al*, 2006).

نظراً لانتشار المكورات العنقودية الذهبية بشكل واسع وازدياد نسبة السلالات المقاومة للمضادات الحيوية، استهدفت دراسات عديدة ايجاد بدائل للمضادات الحيوية من المستخلصات النباتية والتي يمكن استخدامها كمواد مثبطة لسلالات المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للمضادات الحيوية (Ashi, 2006). تعد السيطرة على انتشار البكتيريا المقاومة للمضادات الحيوية وعلاج الاصابات الناجمة عنها مشكلة منتشرة في جميع انحاء العالم. وبالخصوص فان بكتيريا methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) تشكل خطرا على المرضى والعاملين في المستشفيات حيث ان اعداد الالصابات بهذه البكتيريا في تزايد مستمر (Wilson & Cutler, 2004).

كشفت العديد من الدراسات ان اصابات الانسجة الرخوة soft tissue lesions تسببها عدة انواع من الاحياء المجهرية وفي اغلب الاحيان تكون هذه الاحياء من الفلورا الطبيعية الموجودة على الجلد. ومن اكثر الانواع البكتيرية اشتراكا في هذه الاصابات هي بكتيريا المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* و بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* (DeSimone et al, 1999). تعتبر *Staphylococcus aureus* المسبب الرئيسي للكثير من الاصابات المعدية وهي تسبب انواع مختلفة من الالتهابات والاصابات الجلدية والجهازية , وتعتبر من اسرع انواع البكتيريا اكتسابا للمقاومة ضد المضادات الحيوية. هذه البكتيريا الموجبة لصبغة كرام , تستوطن جلد الانسان واغشيته المخاطية بشكل واسع , غالبا ما تشارك في الاصابات الجلدية وهي هدف شائع للكثير من الادوية المضادة للبكتيريا (Weigelt, 2007) .

اما بكتيريا *Pseudomonas* فهي واسعة الانتشار في الطبيعة كبكتيريا رمية وممرضات نباتية وهناك اصناف قليلة ومنها *Ps. aeruginosa* قد تكون مسببات مرضية للانسان وتكون مسببا شائعا في الالتهابات المرضية المكتسبة في المستشفيات. تعزل من اماكن مختلفة من الجروح الملوثة والقروح السريرية ومن الاذن الوسطى ومن السبيل البولي , او من الاصابات العميقة في الجسم كاصابة الرئتين او الانتان الدموي (Brooks et al, 2006). هذه البكتيريا لها قدرة وراثية كبيرة على اكتساب المقاومة للمضادات الحيوية ونقلها . وهذا ما اوجد الحاجة الى البحث عن البدائل الجديدة للاساليب التقليدية في العلاج , وكان من الطبيعي ان تكون المركبات النباتية هي الانسب في هذا المجال بسبب سعة انتشارها وتوفرها وتنوعها وقدم استخدامها من قبل الانسان وقلة اثارها الجانبية على الانسان ورخص ثمنها مقارنة مع غيرها من المواد العلاجية . (Adwan et al, 2008) .

من الخصائص المميزة للمستخلصات النباتية هي انها متنوعة التأثير على الاحياء المجهرية بسبب تنوع المركبات التي تحتويها. فمثلا تحتوي قشرة الرمان على مادة التانين Tannin بنسبة (25%) وهي المادة الفعالة فيه كما اثبت المسح الكيميائي للمستخلص الكحولي للرمان وجود مواد اخرى مثل الفينولات والفلافينويدات. وهذه المركبات وان وجدت بتركيز واطئة نسبيا لكنها ذات تأثير واضح على المايكروبات (Voravuthikunchai et al, 2005).

من المستخلصات الشائعة الاستخدام منذ الاف السنين هو مستخلصات الثوم حيث استخدم لعلاج الكثير من الامراض. ويعتبر الالسين Allicin المادة الكيميائية الفعالة الرئيسية الموجودة في مستخلص الثوم. رغم ان التأثير الحيوي للثوم يعزى الى المركبات الحاوية على الكبريت sulphur-containing molecules, الا ان المركبات الصغيرة الاخرى الناتجة من ايض هذه المركبات اظهرت فعالية كبيرة ضد المايكروبات. يعود الاهتمام بهذا المستخلص النباتي الى سهولة اختراقه للاغشية الخلوية ولحد الان لم تسجل أي مقاومة بكتيرية مكتسبة لهذا المستخلص النباتي. وربما يعود ذلك الى تنوع نمط التأثير وتعدد الاهداف الداخلة خلوية (multiplicity of intracellular targets) التي تستهدفها كل جزيئة فعالة في المستخلص. وقد اكدت الدراسات ان اثنين من مكونات الثوم الفعالة (diallyl disulphide and allyl alcohol) من بين اقوى المركبات المسؤولة عن التنشيط المايكروبي (Lemar et al, 2005) . يعتبر الالسين مضاد مايكروبي فعال جدا لذلك استعمل الثوم لعلاج التهابات الجهاز التنفسي والسعال , والتهاب الامعاء وغيرها من المراض كما استعمل لعلاج التقرحات الجلدية والتهاب الاذن والمفاصل (Gruenwald et al, 2000).

استخدمت اوراق نبات اليوكالبتوس تقليديا لتسريع التئام الجروح ومعالجة الالتهابات البكتيرية والفطرية. وتبين ان لزيت اليوكالبتوس ومستخلصاته الاخرى فعالية ضد المايكروبات و ضد الاورام السرطانية. تحتوي اوراق نبات اليوكالبتوس على العديد من المواد الفعالة مثل essential oil , eucalyptic acid , eucalyptolic acid, oleanolic acid and ursolic acid (Ashour, 2008).

المواد وطرائق العمل

جمع النباتات

تم جمع ثلاثة انواع من النباتات الطبية هي الرمان *Punica granatum* والثوم *Allium sativum* واليوكالبتوس *Eucalyptus sp.* من مناطق مختلفة في مدينة الحلة. الجزء المستخدم من النباتات هي القشرة بالنسبة للرمان , البصيلات بالنسبة للثوم, والاوراق بالنسبة لليوكالبتوس.

طريقة الاستخلاص

جففت كمية مناسبة من كل نبات بواسطة الفرن بدرجة 40 م لمدة 3 ايام ثم وزنت الاجزاء النباتية المجففة ثم طحنت بواسطة الطاحونة الكهربائية, اذيب مقدار (200غم) من مسحوق النبات في (1000مل) من الماء المقطر المعقم البارد وترك المنقوع لمدة 24 ساعة في درجة حرارة الغرفة. جرى ترشيح المنقوع بواسطة الشاش للتحصل من الاجزاء الكبيرة من النبات, ثم رشح المحلول الناتج بواسطة ورق الترشيح (0.22 um) وجمع الراشح في اوعية زجاجية واستخدم الفرن لتجفيف المستخلص النباتي وبدرجة 40 م لمدة خمسة ايام لحين جفافه بصورة كاملة , ثم جمع المسحوق ووزن بواسطة الميزان الحساس ثم حفظ في اوعية معتمة ومعقمة وحفظ في الثلاجة بدرجة 4 م لحين استعماله (Sani et al., 2014). اما بالنسبة لمستخلص الثوم, فلم تجفف البصيلات بل تم سحق 50 غرام منها بواسطة الطاحونة الكهربائية ثم اكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر , وبعد مرور 24 ساعة تم ترشيح العالق بواسطة ورق الترشيح وحفظ الراشح في درجة 4 م لحين استعماله (Matthew,2009).

عزل البكتيريا وتشخيصها

عزل نوعين من البكتيريا المسببة لالتهاب الجلد و الجروح وهي بكتيريا *Staphylococcus aureus* و بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* من بعض المرضى الذين تم تشخيص اصابتهم الجلدية اعتمادا على العلامات السريرية الظاهرة, وتم تشخيص البكتيريا اعتمادا على الخصائص الزرعية والصفات المظهرية والاختبارات البايوكيميائية.

اختبار الفعالية المضادة للبكتيريا Antimicrobial activity test

قبل البدء باختبار التأثير المشترك مع المضادات الحياتية , تم اختبار فعالية كل مستخلص ضد نوعي البكتيريا المعزولة كل على حدة .

1- تحديد قيمة التركيز المثبط الادنى (MIC):

تم تحديد قيمة MIC لكل مستخلص نباتي على كل نوع بكتيري بطريقة الانتشار في الاكار, حيث تم اضافة تراكيز مضاعفة من المستخلصات النباتية الى اطباق بتري حاوية على كميات متساوية من الوسط الزرعي, ثم تم احتساب التركيز النهائي. واستخدمت اطباق حاوية على اوساط غذائية بدون مستخلصات نباتية كسيطرة Control. بعد مزج المستخلصات مع الوسط الذائب تركت الاطباق لتتصلب ثم لفحت بالبكتيريا قيد الدراسة بطريقة النشر Spreading من المزارع البكتيرية التي تم تنشيطها بزرعها على وسط مولر الصلب وحضنها بدرجة 37م لمدة

24 ساعة قبل استخدامها في التجربة. تم تسجيل التركيز الذي ثبط النمو الظاهري للبكتيريا في الاطباق (MIC). وتم اختيار اثنين او اكثر من التراكيز التي اعطت نسبة متوسطة من التثبيط (Sub-inhibitory concentration) لغرض استخدامها في دراسة التأثير المشترك مع المضادات الحيوية.

2- تقدير فعالية المضادات الحياتية على البكتيريا:

تم اختيار ثلاثة انواع من المضادات الحيوية لدراسة تأثيرها على البكتيريا والانواع المستخدمة جرى اختياره على اساس موقع التأثير في البكتيريا او ميكانيكية التأثير Site of action or mechanism of action. الانواع المستخدمة هي Tetracycline وهو مثبط بكتيري يعمل على تثبيط عملية تصنيع البروتين بواسطة الريبوسومات, Rifampin وهو يؤثر على عملية تصنيع الاحماض النووية, و Amoxicillin- Vancomycin الذي يتداخل مع عملية تصنيع جدار الخلية البكتيرية. جرى اختبار تأثير المضادات المذكورة اعلاه بطريقة الانتشار في الاكار Disk diffusion method او Kirby & Bauer method) حيث تم نشر البكتيريا على وسط Mueller Hinton agar ثم وضعت اقراص المضادات على سطح الاكار بلطف وحضنت الاطباق لمدة 24 ساعة ثم تم قياس اقطار مناطق التثبيط المتكونة وتم مقارنتها بالجدول العالمية. واستخدمت هذه القيم كمعامل سيطرة لمقارنتها مع اقطار مناطق التثبيط المتكونة بفعل التأزر بين المضادات والمستخلصات النباتية.

3- تقدير فعالية المضادات الحياتية بوجود المستخلصات النباتية:

تم إضافة تراكيز معينة من كل مستخلص نباتي الى طبق بتري ثم اضيف له كمية محسوبة من الوسط الزراعي Mueller Hinton agar للحصول على التراكيز المطلوبة لكل مستخلص وجرى مزجها بعناية. بعد تصلب الاوساط , لقع كل طبق باحد النوعين من البكتيريا. بعد ذلك وضعت اقراص المضادات الحيوية على سطح الاكار وعلى مسافات مناسبة ثم حضنت الاطباق لمدة 24 ساعة بدرجة 37 م . وبعد ذلك تم قياس منطقة التثبيط الناتجة وجرت مقارنتها مع منطقة التثبيط للمضادات المستعملة كسيطرة في الجزء الاول من التجربة. وتم عمل ثلاث مكررات لكل تركيز من تراكيز المستخلصات النباتية وتم احتساب معدل قطر منطقة التثبيط لكل مضاد.

4- التحليل الاحصائي: تم تحليل النتائج احصائيا باستخدام برنامج Sigma plot. استعمل فحص Student's t-test لتحديد الفرق المعنوي واعتبرت قيمة $p < 0.01$ فرقا معنويا.

النتائج والمناقشة

3-1 تحديد التركيز المثبط الادنى MIC

اظهرت النتائج تباين كبير في قيمة التركيز المثبط الادنى للمستخلصات النباتية المستخدمة في الدراسة , كما ان قيمة MIC لكل مستخلص تختلف باختلاف نوع البكتيريا . ويوضح الجدول رقم (1) نتائج MIC للمستخلصات النباتية لكل نوع بكتيري.

جدول رقم (1) التركيز المثبط الأدنى للمستخلصات النباتية ضد بكتيريا *Staphylococcus aureus* و

Pseudomonas aerogenosa

Bacteria	MIC mg/ml		
	<i>Allium sativum</i>	<i>Punica granatum</i>	<i>Eucalyptus spp</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	200	64	128
<i>Pseudomonas aerogenosa</i>	128	64	256

يلاحظ ان مستخلص الرمان كان الاكثر فعالية ضد البكتيريا حيث كانت قيمة MIC له اقل بكثير من قيمة ال MIC للثوم واليوكالبتوس كما ان تأثيره كان متساويا ضد بكتيريا *Staphylococcus aureus* و ضد *Pseudomonas aerogenosa*.

يحتوي المستخلص المائي لقشرة ثمرة الرمان مركبات كثيرة منها (Alkaloid, Tannins, Sterols, Volatile) (oils, Carbohydrates, Flavonoids, Glycosides, Resins, Balsams, Terpenes) (Egharevba et al, 2010).

من المعروف ان المواد الفعالة الرئيسية في مستخلص نبات الرمان هي tannin و polyphenoles ,التانين مركب ذائب في الماء غني بمجاميع الفينول phenolic groups ,قادر على الارتباط او ترسيب البروتينات الذائبة في الماء (Cseke et al,2006) وهذا مايفقدها وضيقتها الخلوية ويسبب توقف عمل الخلية من خلال تثبيط الانزيمات Enzyme inhibition , وتحطيم الغشاء البلازمي Membrane disruption , وتكوين المعقدات مع الجدار الخلوي Complex with cell wall او مع الايونات المعدنية Metal ion complexation او مع السكريات المتعددة complex with polysaccharide , تعود هذه الفعالية للتانين الى قدرته على الارتباط مع المركبات الاخرى بقوى تسمى nonspecific forces مثل الاواصر الهايدروجينية والواصر التساهمية وهذا ما يفسر فعاليته غير المتخصصة في تثبيط الانواع المختلفة من البكتيريا والفطريات وحتى الحشرات. اما مركبات الفينول فهي غنية بمجاميع الهايدروكسيل والتي تعزى لها سمية الفينول , حيث يعتقد انه كلما زاد عدد تلك المجاميع في المركب كلما زادت سميته. تتفاعل مجاميع الهايدروكسيل مع بعض المجاميع الفعالة التي توجد في الانزيمات مثل sulfhydryl groups مسببة تثبيطها او تتفاعل بصورة غير متخصصة مع البروتينات مما يفقد الاخيرة وضيقتها (Cowan, 1999).

يتضح من الجدول رقم (1) ان بكتيريا *Staphylococcus aureus* اكثر حساسية لمستخلص اليوكالبتوس من بكتيريا *Pseudomonas aerogenosa* . يعود ذلك الى ان البكتيريا السالبة لصبغة كرام اكثر مقاومة للمركبات الفعالة المسماة Essential oils الموجودة في اوراق نبات اليوكالبتوس, وهو ما اثبتته دراسات سابقة في هذا المجال (Ashour, 2008). المادة الفعالة في هذا النبات هي الزيوت الطيارة وخاصة الزيت المسمى cineole الذي يشكل حوالي 80-90% من مجموع المواد الفعالة في النبات, كما يحتوي هذا النبات ايضا على geraniol, limonene, alpha-pinenes, p-cymene, و camphene (Gruenwald et al, 2000) اضافة الى بعض انواع التانينات الذائبة في الماء مثل corilagin, (Cseke et al, 2006). الزيوت الطيارة هي نواتج ايض ثانوي غنية بمركبات مشتقة من مركب isoprene, تسمى تربينات terpenes وتوجد بشكل diterpenes او triterpenes او tetraterpenes , اذا

احتوت على عناصر اخرى , عادة الاوكسجين , فتسمى terpenoids. هذه المركبات فعالة ضد البكتيريا والفطريات والاولالي والفايروسات, لكن ميكانيكية هذا التأثير غير مفهومة بشكل كامل لكنها تتضمن تحطيم الغشاء الخلوي بواسطة المركبات الاليفة للشحوم lipophilic compounds وهذه المركبات اثبتت في دراسات عديدة فعالية عالية ضد البكتيريا الموجبة لصبغة كرام لكنها اقل فعالية ضد السالبة (Cowan, 1999).

اثبتت دراسات سابقة وجود مركبات فعالة كثيرة في مستخلص الثوم المائي منها التانينات tannins والتي تتوفر بكميات اكبر من غيرها اضافة الى (flavonoids, alkaloids, saponins, and cardiac glycosides) (Huzaifa et al, 2004). كذلك يحتوي الثوم على كمية لاباس بها من الزيوت الطيارة ذات المحتوى الكبريتي والتي اظهرت في دراسات عدة تأثيرا مضادا لانواع كثيرة من البكتيريا (Ross, 2003). ان الطريقة المستخدمة للحصول على مستخلص الثوم تختلف عن الطرق المستخدمة لاستخلاص المركبات النباتية الاخرى, ويعود ذلك الى ان هذا المستخلص قلق ويمكن ان يتحطم خلال ساعات قليلة بدرجة حرارة الغرفة في حالة الاستخلاص بالمذيبات العضوية , اما المستخلص المائي فهو اكثر ثباتية ويعود ذلك الى سببين , الاول هو ان الاواصر الهايدروجينية في الماء تتفاعل مع ذرات الاوكسجين الفعالة في الالسين مما يزيد من ثباتية الجزيئة, الثاني هو احتمال وجود مركبات ذائبة في الماء في الثوم المسحوق تساهم في ثباتية المستخلص . الا ان هذا التفاعل مع جزيئات الماء له تأثير سلبي على قدرة المستخلص على التأثير على البكتيريا بسبب تكوين مركب diallyl disulphide ذات الفعالية الاقل من الالسين النقي وهذا ما يفسر القيمة العالية للMIC لكلا نوعي البكتيريا المستخدمة في الاختبار رغم ان مادة الالسين معروفة بفعاليتها الشديدة ضد البكتيريا حتى بتراكيز واطنة. الالسين allicin مركب كبريتي مؤكسد oxygenated sulphur compound يتكون عندما تسحق بصيلة الثوم. يعتبر الالين Alliin هو المنشئ precursor الثابت للالسين ويخزن في النبات في حويصلات معزولة عن تأثير الانزيم alliinase او مايسمى alliin lyase وعند السحق يمتزج الالين مع الانزيم فيحوله الى الالسين (Cutler & Wilson, 2004).

3-2 تأثير المضادات الحياتية على البكتيريا بوجود المستخلصات النباتية

في هذه التجربة تم اختيار اكثر من تركيز لكل مستخلص نباتي , على ان يكون التركيز المستخدم اقل من قيمة التركيز المثبط الادنى لذلك المستخلص. كذلك تم اختيار ثلاثة انواع من المضادات الحياتية وتم اختبار حساسية البكتيريا تجاهها عند عدم وجود المستخلصات النباتية (الصف الاول) او بوجودها (الصفوف الاخرى) حيث تم مزجها مع الوسط الزراعي حسب التراكيز المحددة وكما هو مبين في الجدول رقم (2) والجدول رقم (3). تشير العلامة (*) الى ان الفرق معنوي بين قيم مجموعتي المعاملة والسيطرة, فيما تشير العلامة (-) الى عدم ظهور هالة التثبيط.

المضادات المستخدمة هي Tetracycline و Amoxycillin-Vancomycin و Rifampicin وهي تختلف في ميكانيكية تأثيرها على البكتيريا المستخدمة, كما ان البكتيريا تختلف في حساسيتها تجاه كل نوع منها. فالنتراسايكلين هو مضاد مثبط للبكتيريا الموجبة والسالبة , يرتبط مع 30S ribosomal subunit مما يعيق ارتباط aminoacyl tRNA بالموقع A في الريبوسوم والنتيجة توقف عملية تصنيع البروتين في الخلية. اما المضاد الثاني فهو مركب من مضادين قاتلين للبكتيريا هما الاموكسيسيلين والفانكوميسين وهذا المركب يستعمل عادة لعلاج الاصابات البكتيرية المقاومة لمضادات ال β -lactam وكذلك لحدث فعل تازري بين المضادين يقوي من تأثيرهما ويمنع تطور المقاومة لهما. هذين المضادين يعملان على التأثير على عملية تصنيع جدار الخلية البكتيرية عن

طريق الارتباط بمركب acyl-D-alanyl-D-alanine في 1518peptide-glycan مما يعيق اضافة وحدات بنائية جديدة في جدار الخلية حديث التكوين. تاثير هذا المضاد عموما على البكتيريا الموجبة لصبغة كرام. اما الريفامسين فيتداخل مع عملية تكوين mRNA على شريط الDNA (Greenwood, 2000).

من خلال ملاحظة الجدول رقم (2)، والذي يخص بكتيريا *P.aerogenosa* , يمكن ملاحظة التأثير التآزري للنتراسايكلين مع مستخلص الثوم بتركيز 100 ملغم/امل , ومع مستخلص الرمان بتركيز 50 ملغم/امل. كذلك يلاحظ ان مستخلص اليوكالبتوس لم يكن له تأثير بالتركيز الواطئ المستعمل , فيما كان تأثيره تضاديا مع النتراسايكلين بالتركيز العالية حيث نقصت اقطار مناطق التثبيط نقصا معنويا ملحوظا مقارنة مع قطر مجموعة السيطرة.

اما فيما يتعلق بالمضاد Ax-Van , فقد كانت البكتيريا مقاومة له , ولم يكن لمستخلصي الثوم والرمان اي تأثير على حساسية البكتيريا تجاهه. اما مستخلص اليوكالبتوس فقد زاد من حساسية البكتيريا له عند التركيز الاعلى المستخدم (90 ملغم امل). نفس الشيء يلاحظ بالنسبة للمضاد ريفامبين حيث ان جميع التراكيز المستخدمة من مستخلص اليوكالبتوس كانت فعالة في زيادة قيم اقطار التثبيط زيادة معنوية .

جدول رقم (2) حساسية بكتيريا *Pseudomonas aerogenosa* للمضادات الحياتية بوجود بعض

المستخلصات النباتية بتركيز دون التركيز المثبط الادنى

Bacteria	Plant extract Conc.(mg/ml)			Antibiotics Inhibition zone (mm)		
	Al	Pun	Euc	Te	Ax-Van	Ra
<i>Pseudomonas aerogenosa</i>	-	-	-	10	0	0
	20	-	-	10	0	0
	100	-	-	15*	0	0
	-	20	-	0	0	0
	-	50	-	12*	0	0
	-	-	3	10	0	9*
	-	-	30	9	0	7*
	-	-	90	8*	8*	10*

Al: *Allium sativum*, Pun: *Punica granatum*, Euc: *Eucalyptus spp*, Te: Tetracycline, Ax-Van: Amoxycillin-Vancomycin , Ri: Rifampicin , shaded row: control

جدول رقم (3) حساسية بكتيريا *Staphylococcus aureus* للمضادات الحيوية بوجود بعض

المستخلصات النباتية بتركيز دون التركيز المثبط الأدنى

Bacteria	Plant extract Conc.(Mg/ml)			antibiotics Inhibition zone (mm)		
	Al	Pun	Euc	Te	Ax-Van	Ra
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	10	0	9
	20	-	-	25*	22	8
	100	-	-	42*	10	8
	-	20	-	24*	0	0
	-	25	-	22*	45	12*
	-	-	3	17*	0	10
	-	-	30	24*	0	12*
	-	-	90	28*	0	19*

Al: *Allium sativum*, Pun: *Punica granatum*, Euc: *Eucalyptus spp*, Te: Tetracycline, Ax-Van: Amoxycillin-Vancomycin , Ri: Rifampicin , shaded row: control

النتائج الخاصة ببكتيريا *Staphylococcus aureus* المبينة في الجدول رقم (3) كانت اشد اثاره للانتباه, حيث لوحظ حدوث تأزر شديد وواضح خاصة بين المضاد تتراسايكلين والمستخلصات الثلاث. كذلك يلاحظ ان المضاد Ax-Van الذي لم تكن له فعالية ضد البكتيريا منفردا وهذا ما يلاحظ من انعدام هالة التثبيط, قد اظهر فعالية شديدة بوجود مستخلص الثوم والرمان. اما الريفامبسين فقد اظهر تأزرا واضحا مع مستخلص اليوكالبتوس والرمان فيما لم يتأثر بمستخلص الثوم. يجري في الالونة الاخيرة البحث حثيثا عن المركبات النباتية المضادة للبكتيريا لمواجهة البكتيريا العنقودية المقاومة للمضادات الحيوية المسماة Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) التي انتشرت على نطاق عالمي واسع (Chung et al, 2011) .

لوحظ ان للمركبات النباتية فعلا تأزريا مع المضادات الحيوية حتى ضد بعض الانواع المقاومة للمضادات. وهذه الفعالية توصف احيانا بانها فعالية تحويلية او تعديلية للمقاومة resistance modifying/modulating activity . فالمركبات النباتية تغير من نسبة تدفق المضاد الى داخل الخلية حيث ان المقاومة البكتيرية لاغلب المضادات الحيوية تاتي من عملية طرح المضاد او تفرغه خارج الخلية بعملية Antibiotic efflux وهي عملية مسيطر عليها وراثيا , وانظمة الطرح efflux systems هذه عبارة عن بروتينات غير متخصصة بنوع معين من الادوية non-drug-specific proteins بامكانها تمييز وضخ طيف واسع من المواد الكيميائية غير المرغوبة بدون تغيير او تحطيم للمركب. هذه العملية تقلل من تركيز العقار داخل الخلية الى مستوى غير ضار بها وبالتالي فان قيمة MIC لذلك العقار ستكون اعلى بكثير من المتوقع. هذا النظام يسمى Multi-drug resistance efflux pumps ويرمز له MDR ويوجد في البكتيريا الموجبة والسالبة ويشفر له اما كروموسوميا او بلازميديا . في البكتيريا السالبة لصبغة كرام , بالاضافة لوجود هذا النظام فان عملية نفاذ او دخول العقار الى داخل الخلية محدودة بسبب الغشاء ثنائي الطبقة المحيط بها والمسئول عن المقاومة الذاتية والمكتسبة الملاحظة في هذه المجموعة من البكتيريا . وقد وجد في دراسات حديثة ان بعض النباتات تنتج مواد مثبطة لعمل هذه المضخات (Efflux Pump Inhibitors (EPs)) بالاضافة الى المركب الفعال , مما يسهل دخول المادة الفعالة الى داخل البكتيريا الموجبة والسالبة حتى مع وجود تلك الانظمة الدفاعية. لذلك هناك ادلة على امكانية استخدام المستخلصات

النباتية لزيادة حساسية البكتيريا للمضادات الحياتية خاصة تلك المقاومة لها (Sibanda & Okoh, 2007) (Abreu *et al.*, 2012).

تمتلك بعض المركبات النباتية تأثيرا مباشرا على البكتيريا يشابه الى حد ما تأثير المضادات الحيوية المعروفة. فمثلا يثبط الالسين وهو المادة الفعالة في الثوم عملية تخليق الحامض النووي RNA تماما كما تفعل المضادات الحيوية. كما يثبط جزئيا عملية تخليق جزيئة DNA والبروتين (Eja *et al.*, 2007; Hemaiswary *et al.*, 2008).

المصادر

- Abreu, A.C., McBain, A.J., and Simoes, M. (2012). Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents. *Natural product reports*, 29(9), 1007-1021.
- Adwan, G.M., Abu-Shanab, B.A., Adwan, K.M. (2008): In vitro activity of certain drugs in combination with plant extracts against *Staphylococcus aureus* infections. *Pak J Med Sci* Vol. 24 No. 4
- Ashi, N.A.A. (2008): Inhibitory Effect of some Plant Extracts on *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Clinical Specimens. King Abdulaziz University. www.kau.edu.sa
- Ashour H. M. (2008): Antibacterial, antifungal, and anticancer activities of volatile oils and extracts from stems, leaves, and flowers of *Eucalyptus sideroxylon* and *Eucalyptus torquata*. *Cancer biology & therapy* 7.3: 399-403
- Betoni, J.E.C., Mantovani, R.P., Barbosa, L.N., Di Stasi, L.C., Junior, A.F. (2006): Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. 101(4): 387-390
- Brooks, G.F., Butel, J.S., and Morse, S.A. (2006): Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology, 23rd Edition. The McGraw-Hill Companies
- Chung, P.Y., Navaratnam, P. and Chung, L.Y. (2011): Synergistic antimicrobial activity between pentacyclic triterpenoids and antibiotics against *Staphylococcus aureus* strains. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 10:25
- Cowan, M.M. 1999): Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical microbiology reviews* p.564-582.
- Cseke, L.J., Kirakosyan, A., Kaufman, P.B., Warber, S.L., Duke, J.A., and Briellmann, H.L. (2006): Natural Products from Plants. Taylor & Francis Group, LLC, USA
- Cutler, R.R., and Wilson, P. (2004): Antibacterial activity of a new, stable, aqueous extract of allicin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *British journal of biomedical science*, 61 (2)
- DeSimone, N. A., Christiansen, C. and Dore D. (1999): Bactericidal Effect of 0.95-mW Helium-Neon and 5-mW Indium-Gallium-Aluminum-Phosphate Laser Irradiation at Exposure Times of 30, 60, and 120 Seconds on Photosensitized *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* In Vitro. *Phys. Ther.* Vol. 79, No. 9, pp. 839-846
- Egharevba, H. O., Kunle, O. F., Iliya, I., Orji, P. N., Abdullahi, M. S., Okwute, S. K., Okogun, J. I. (2010). Phytochemical Analysis and Antimicrobial Activity of *Punica granatum* L. (fruit bark and leaves). *New York Science Journal*; 3(12):91-98.
- Eja, M. E., Asikong, B. E., Aribi, C., Arikpo, G. E., Anwan, E. E., Enyi-Idoh K. H. (2007). A comparative assessment of the antimicrobial effects of garlic (*Allium*

- sativum) and antibiotics on diarrheagenic organisms. *Southeast Asian J. Trop Med Public Health*, 38: 343-348.
- Greenwood, D. (2000): *Antimicrobial Chemotherapy*, 4th Edition. Oxford University Press
- Gruenwald, J., Brendler, T., and Jaenicke, C. (2000): *PDR for herbal medicines*. Medical Economics Company, Inc.
- Hemaiswarya, S., Kruthiventi, A. K., & Doble, M. (2008). Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine*, 15(8), 639-652.
- Lemar, K.M., Passa, O., Aon, M.A., Cortassa, S., and Müller, C.T. (2005): Allyl alcohol and garlic (*Allium sativum*) extract produce oxidative stress in *Candida albicans*. *Microbiology* 151 (2005), 3257-3265
- Matthew, T. (2009). Efficacy of *Allium sativum* (garlic) bulbs extract on some enteric (pathogenic) bacteria. *New York Science Journal*, 2, 24-28.
- Ross, I. A. (2003) *Medicinal plants of the world: Chemical constituents, traditional and modern medicinal uses*. Humana Press Inc. 2nd ed. Totowa New Jersey. Pp. 33-102
- Sani, I. (2014). Application of Medicinal Plants to Overcome Antibiotic Resistance in Some Selected Multi-Drug Resistant Clinical Isolates. *Research and Reviews: Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2(4).
- Sani, I., Abdulhamid, A., and Bello, F. (2014). *Journal of Scientific and Innovative Research*, 3(5): 523-526.
- Sibanda, T., and Okoh A. I. (2007): The challenges of overcoming antibiotic resistance: Plant extracts as potential sources of antimicrobial and resistance modifying agents. *African Journal of Biotechnology* Vol. 6 (25), pp. 2886-2896.
- Voravuthikunchai, S.P., Limsuwan, S., and Mitchell, H. (2006): Effects of *Punica granatum* Pericarps and *Quercus infectoria* Nutgalls on Cell Surface and Hydrophobicity Cell Survival of *Helicobacter pylori*. *Journal of Health Science*, 52(2) 154-159
- Voravuthikunchai, S.P., Sririrak, T., Limsuwan, S., Supawita, T., India, T., and Honda, T. (2005): Inhibitory effect of active compound from *Punica granatum* Pericarp on Verocytotoxin Production by Enterohemorrhagic *Escherichia coli* *Journal of health science*, 51 (5) 590-596
- Weigelt, J.A. (2007): *MRSA*. Informa Healthcare USA, Inc.