

دراسة تأثير المستخلص المائي لقشرة ثمار الرمان *Punica granatum L.* على البكتريا المعزولة من مرضى التهاب اللوزتين في محافظة ديالى

م.م.عباس ياسين حسن*
أ.د.عباس عبود فرحان
د.ماجد محمد محمود
جامعة ديالى/ كلية التربية
جامعة ديالى/ كلية التربية
الجامعة المستنصرية/ كلية العلوم

الخلاصة

الغرض من هذه الدراسة هو معرفة تأثير المستخلص المائي لقشرة ثمار الرمان *Punica granatum L.* على البكتريا المعزولة من مرضى التهاب اللوزتين في محافظة ديالى ، دلت نتائج الدراسة إن للمستخلص المائي الحار لقشرة ثمار الرمان تأثيراً معنوياً وبالتركيز (١٠ ، ٢٠ ، ٤٠ ، ٨٠ ، ١٦٠) ملغم/مل ضد كل من عزلات بكتريا *Streptococcus pyogenes* و *Staphylococcus aureus* بأقطار تثبيط (٩,٠ ، ١١,٢ ، ١٢,٧ ، ١٤,٠ ، ١٥,٠) ملم و (١١,٥ ، ١٥,٠ ، ١٧,٢ ، ٢٠,٢ ، ٢٣,٠) ملم على التوالي، ومن ناحية اخرى كان للمستخلص المائي البارد لقشرة ثمار الرمان تأثيراً آخر بأقطار تثبيط (٠ ، ٨,٠ ، ١٠,٢ ، ١١,٣ ، ١٣,٠) ملم و (٩,٨ ، ١٣,٤ ، ١٥,٣ ، ١٨,٠ ، ٢٠,٠) ملم على التوالي.

المقدمة

تعد اللوزتين من الأنسجة للمفاوية المهمة في الدفاع عن الجسم، فلها أهمية كبيرة في حماية كل من الممر التنفسي والممر الهضمي من دخول العوامل المخمجة مثل البكتريا والرواشح (Govan *et al.*,1983). ويحدث التهاب اللوزتين Tonsillitis نتيجة تفاعل الأنسجة للمفاوية للوزتين مع العوامل المسببة للالتهابات كالبكتريا مثل المكورات المسبحية القبحية *Str. pyogenes* التي تعد المسبب الرئيسي لأخماج اللوزتين البكتيري (Heynen, 1996; Shah, 2004). وقد أكدت ذلك دراسة العاني (2001) بعزل بكتريا *Str. pyogenes* بنسبة (9%) من مجموع العزلات التي أخذت من الأطفال المصابين بالتهاب اللوزتين وبأعمار (1-15) سنة. إن لهذه البكتريا (المكورات المسبحية القبحية) قدرة كبيرة على إصابة الإنسان بالعديد من الأمراض التي قد تؤدي أحياناً إلى وفاته، وذلك لإنتاجها عوامل متعددة تساهم في ضراوتها،ومن أهمها

*البحث جزء من رسالة ماجستير للباحث الأول.

أنظمة التحلل (Streptolysin O,S) التي تعمل على تحلل الدم (Forbes *et al.* 1998). كما أن الأصابة بالتهاب اللوزتين قد تحدث أيضاً نتيجة مسببات بكتيرية أخرى مثل *S. aureus* (Stenfors *et al.*, 1997). إن للمستحضرات الطبية المختلفة دوراً هاماً في القضاء على مصادر الخمج غير أنها قد تحمل أحياناً آثاراً جانبية مختلفة، كما أن هنالك العديد من المايكروبات قد اكتسبت مقاومة ضد طيف واسع من هذه المستحضرات مما أدى إلى استخدام المستخلصات النباتية والأعشاب الطبية الفعالة والمثبطة لنمو الأحياء المجهرية، ومنها مستخلص قشرة ثمار الرمان *Punica granatum L.* الذي يتمتع بقابلية كبيرة على التأثير في العديد من الأمراض إذ أكدت المصادر العلمية فعاليته في حالات الإسهال واستعماله ضد تقرحات الفم والالتهابات البلعومية (Townsend and Guest, 1980). وذكر Al- Rawi and Chakravarty وحسين (1979) بأن قشرة ثمار الرمان تحتوي على التانين Tannin والراتنج Resin والسكر Sugar والقلويدات Alkaloids وتستخدم في حالات الإسهال والزحار وطررد الديدان وخصوصاً الديدان الشريطية. بالإضافة إلى ذلك فإن خلاصة الرمان تأثيرات طبية أخرى، فقد ذكر (Kim *et al.* 2002) تأثيرها الفعال على خلايا الأورام السرطانية لثدي الإنسان، واستخدمت في حالات الأخمج الخارجية لحمائر الـ *Candida* التي تسبب الخمج لعم الإنسان (Vasconcelos *et al.*, 2003).

طرائق العمل

عزل وتشخيص البكتريا:

تم أخذ مسحات باستخدام مسحة قطنية معقمة لمرضى مصابين بالتهاب اللوزتين Tonsillitis، ثم زرعت العينات مباشرة من خلال تمريرها على سطح وسط غراء الدم أو وسط غراء أزيد الدم وباستخدام الناقل Loop نشرت على سطح الوسط الصلب لتأمين الحصول على مستعمرات منفردة من البكتريا المحتمل وجودها في المسحات. حضنت الأطباق مع توفير (5-10%) من غاز ثاني أوكسيد الكربون بحرارة (37) م° لمدة 24 ساعة للحصول على معدل أعلى للنمو. وقد تم التشخيص اعتماداً على الصفات الزرعية والمجهريّة والاختبار الكيموحياتيّة (Cruickshank *et al.*, 1975; Baron and Finegold, 1990).

تقدير فعالية مستخلصات قشرة ثمار الرمان ضد البكتريا:

تم تجهيز ثمار الرمان من الأسواق المحلية في محافظة ديالى، وصنف من قبل الأستاذ الدكتور علي الموسوي المشرف على المعشب النباتي لكلية العلوم بجامعة بغداد على أنه *Punica granatum L.*، فصلت القشرة وتركت في المختبر لمدة أسبوع واحد بدرجة (25) م° لغرض تجفيفها. استعملت مطحنة كهربائية لطحن القشرة والحصول على مسحوق حفظ في قناني زجاجية.

تحضير المستخلصات:

أ- المستخلص المائي البارد Cold water extract

أضيف (15) غم من مسحوق قشرة ثمار الرمان الى (100) مل من الماء المقطر (الجنابي، 1996) ووضع المزيج في الحاضنة الهزازة بدرجة (37) م ولمدة (24) ساعة، رشح المستخلص باستخدام أوراق ترشيح (Whatman no.1,2,3,6) نبذ الراشح بجهاز النبذ المركزي لمدة (10) دقائق بالسرعة (2500 دورة/دقيقة)، جفف المستخلص في الحاضنة بدرجة حرارة (37) م لمدة (٧٢) ساعة للحصول على مسحوق جاف (Anesini and Perez,1993;Fehri et al.,1994)، حضرت التراكيز المطلوبة أنياً بأذابة وزن محدد من المسحوق في حجم معلوم من الماء المقطر وتم تعقيمها باستخدام مرشحات غشائية (Millipore filter 0.45).

ب- المستخلص المائي الحار Hot water extract

وضع (15) غم من مسحوق قشرة ثمار الرمان في (100) مل من الماء المقطر المغلي بدرجة حرارة (100) م وترك لمدة نصف ساعة في حاضنة هزازة ثم رشح خلال ورق ترشيح (Whatman no.1,2,3,6) جفف المستخلص كما في الطريقة أعلاه واستخدم المسحوق في تحضير التراكيز المطلوبة. تأثير مستخلصات قشرة ثمار الرمان في نمو البكتريا:

استخدمت طريقة الانتشار في الحفر بالغراء

Agar well-diffusion method وكما يأتي:

حضر العالق البكتيري بنفس درجة عكورة ثابت العكرة القياسي (0.5) لعزلات بكتريا *S. aureus* ، *Str.pyogenes*، لقع وسط الغراء المغذي بواسطة قطيلة معقمة من العالق البكتيري الخاص ببكتريا *S. aureus* ولقع وسط أساس غراء الدم من العالق البكتيري الخاص ببكتريا *Str.pyogenes* . عملت حفر في الأوساط الزرعية بواسطة ثاقب فليبي معقم بقطر (5) ملم. اضيف اليها (100) مايكروليتر من محلول المستخلص ، وقد جرى اختبار فعالية المستخلص للتراكيز الاتية (160,80,40,20,10) ملغم/مل على نمو البكتريا ، كما عملت حفرة وضع فيها ماء مقطر معقم اعتمدت كسيطرة (control). حضنت الأطباق بدرجة حرارة (37) م لمدة (24) ساعة، تم بعدها قياس قطر منطقة تثبيط النمو وحول كل حفرة بالمليمتر (Mahmoud et al.,1989; Baron and Finegold, 1994).

حللت البيانات إحصائياً وفق اختبار T (T- test)، كما تم استخدام تحليل التباين الأحادي (One way analysis of variance) والمقارنات المتعددة (Multiple comparisons) بطريقة الفرق المعنوي الاصغر

(Least Significance Differences) لمعرفة وجود فروق معنوية بين المعاملات المختلفة. ثبتت النتائج بشكل (المعدل الحسابي \pm الخطأ المعياري). النتائج والمناقشة:

نتائج اختبار الفعالية ضد مايكروبيية لقشرة ثمار الرمان
(*Punica granatum L.*)

اجري اختبار تقدير فعالية مستخلصات قشرة ثمار الرمان على كل من بكتريا المكورات المسبحية القححية *Streptococcus pyogenes* وبكتريا المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* لما لهما من دور في اخماج اللوزتين ، وذلك باستخدام طريقة الانتشار في الحفر بالغراء (Agar well- diffusion method).

تبين من خلال النتائج ان للمستخلص المائي الحار لقشرة ثمار الرمان فعالية عالية ضد بكتريا *Str. pyogenes* عند تركيز (١٦٠) ملغم/مل، فبلغ معدل قطر منطقة التثبيط (١٥,٠) ملم تليها التراكيز (٢٠, ٤٠, ٨٠) ملغم /مل وبمعدل اقطار تثبيط (١٤,٠, ١٢,٧, ١١,٢) ملم على الترتيب ، في الوقت الذي كان التأثير الاقل عند تركيز (١٠) ملغم/مل اذ بلغ معدل قطر منطقة التثبيط (٩,٠) ملم جدول (١). هذا وقد كانت الفروقات في اقطار التثبيط للتراكيز المختلفة معنوية ($p < ٠,٠٥$).

من جانب آخر أظهرت نتائج الاختبار ان للمستخلص المائي البارد تأثيراً كذلك على بكتريا المكورات المسبحية القححية فقد سجل تأثيراً تثبيطياً بمعدل قطر منطقة تثبيط قدره (١٣,٠) ملم وذلك عند التركيز (١٦٠) ملغم /مل تليها التراكيز (٢٠, ٤٠, ٨٠) ملغم/مل وبمعدل اقطار تثبيط (١١,٣, ١٠,٢, ٨,٠) ملم على الترتيب، في حين لم يكن هنالك تأثيراً يذكر عند تركيز (١٠) ملغم/مل جدول (٢).

جدول (١) تأثير المستخلص المائي الحار لقشرة ثمار الرمان على بكتريا

Str. pyogenes

التركيز ملغم/مل	معدل قطر منطقة التثبيط ملم \pm الخطأ المعياري
0.00	$٠,٠٠ \pm ٠,٠٠$ *(f,e,d,c,b)
١٠	$٠,١٦ \pm ٩,٠٠$ *(f,e,d,c,a)
٢٠	$٠,٢١ \pm ١١,٢٠$ *(f,e,d,b,a)
٤٠	$٠,١٥ \pm ١٢,٧٠$ *(f,e,c,b,a)
٨٠	$٠,٢٥ \pm ١٤,٠٠$ *(f,d,c,b,a)
١٦٠	$٠,٢٩ \pm ١٥,٠٠$ *(e,d,c,b,a)

- العلامة * دليل على وجود فرق معنوي عند مستوى ($P < 0.05$)

- الحروف (f,e,d,c,b,a) تمثل التراكيز (٠، ١٠، ٢٠، ٤٠، ٨٠، ١٦٠) ملغم/مل على التوالي

جدول (٢) تأثير المستخلص المائي البارد لقشرة ثمار الرمان على بكتريا

Str. pyogenes

التركيز ملغم/مل	معدل قطر منطقة التثبيط ملم \pm الخطأ المعياري
0.00	٠,٠٠ \pm ٠,٠٠ *(f,e,d,c)
١٠	٠,٠٠ \pm ٠,٠٠ *(f,e,d,c)
٢٠	٠,٣٤ \pm ٨,٠٠ *(f,e,d,b,a)
٤٠	٠,١٧ \pm ١٠,٢٠ *(f,e, c,b,a)
٨٠	٠,٢٧ \pm ١١,٣٠ *(f, d,c,b,a)
١٦٠	٠,٠٩ \pm ١٣,٠٠ *(e,d,c,b,a)

- العلامة * دليل على وجود فرق معنوي عند مستوى (P<0.05)

- الحروف (f,e,d,c,b,a) تمثل التراكيز (٠، ١٠، ٢٠، ٤٠، ٨٠، ١٦٠) ملغم/مل على التوالي

وعند مقارنة النتائج المتعلقة بتأثير المستخلص الحار والبارد احصائياً وجد ان هنالك فروقا معنوية (P<0.05) لصاح المستخلص المائي البارد، وقد يعزى ذلك الى اثر الماء الساخن في استخلاص المواد الفعالة، وهذا ما لمحت اليه دراسة المسعودي (٢٠٠١) التي اشارت الى ان للمستخلص المائي الحار لقشرة ثمار الرمان فعالية اكثر من المستخلص المائي البارد تجاه المشعرات الفأرية *Trichomonas muris*. ان التأثير الفعال للمستخلص المائي لقشرة ثمار الرمان بشكل عام ربما يعود الى احتوائها على مادة التانين (Tannin)، فقد ذكر (Segura et al. 1990) ان الصفات الدوائية الموجودة في الرمان تعود الى مادة التانين.

بينت الدراسة كذلك ان للمستخلص المائي الحار لقشرة ثمار الرمان تأثيراً مضاداً لبكتريا العنقوديات الذهبية *S. aureus* اذ سجل تأثيراً تثبيطياً بمعدل قطر قدره (٢٣,٠) ملم عند التركيز (١٦٠) ملغم/مل تليه التراكيز (٨٠، ٤٠، ٢٠، ١٠) ملغم/مل وبمعدل اقطار تثبيط (٢٠,٢، ١٧,٢، ١٥,٠، ١١,٥) ملم على الترتيب جدول (٣). وكذا الحال باستخدام المستخلص المائي البارد وان تأثير المستخلص يعتمد على التركيز أيضاً، فقد وجد ان للتراكيز (١٠، ٢٠، ٤٠، ٨٠، ١٦٠) ملغم/مل معدلات اقطار تثبيط متباينة (٨,٩، ٤,١٣، ٣,١٥، ٠,١٨، ٠,٢٠) ملم على الترتيب جدول (٤).

جدول (٣) تأثير المستخلص المائي الحار لقشرة ثمار الرمان على بكتريا

S. aureus

التركيز ملغم/مل	معدل قطر منطقة التثبيط ملم \pm الخطأ المعياري
0.00	*(f,e,d,c,b) ٠,٠٠ \pm ٠,٠٠
١٠	*(f,e,d,c,a) ٠,٤١ \pm ١١,٥٠
٢٠	*(f,e,d,b,a) ٠,٣٠ \pm ١٥,٠٠
٤٠	*(f,e,c,b,a) ٠,١٧ \pm ١٧,٢٠
٨٠	*(f, d,c,b,a) ٠,١٠ \pm ٢٠,٢٠
١٦٠	*(e,d,c,b,a) ٠,١٢ \pm ٢٣,٠٠

- العلامة * دليل على وجود فرق معنوي عند مستوى ($P < 0.05$)
- الحروف (f,e,d,c,b,a) تمثل التراكيز (٠, ١٠, ٢٠, ٤٠, ٨٠, ١٦٠) ملغم/مل على التوالي

جدول (٤) تأثير المستخلص المائي البارد لقشرة ثمار الرمان على بكتريا *S. aureus*

التركيز ملغم/مل	معدل قطر منطقة التثبيط ملم \pm الخطأ المعياري
0.00	*(f,e,d,c,b) ٠,٠٠ \pm ٠,٠٠
١٠	*(f,e,d,c,a) ٠,١٥ \pm ٩,٨٠
٢٠	*(f,e,d,b,a) ٠,١٦ \pm ١٣,٤٠
٤٠	*(f,e,c,b,a) ٠,٢٣ \pm ١٥,٣٠
٨٠	*(f,d,c,b,a) ٠,١٨ \pm ١٨,٠٠
١٦٠	*(e,d,c,b,a) ٠,٠٤ \pm ٢٠,٠٠

- العلامة * دليل على وجود فرق معنوي عند مستوى ($P < 0.05$)
- الحروف (f,e,d,c,b,a) تمثل التراكيز (٠, ١٠, ٢٠, ٤٠, ٨٠, ١٦٠) ملغم/مل على التوالي

وفي حالة مقارنة النتائج المتعلقة بتأثير المستخلصين الحار والبارد ضد بكتريا *S. aureus* وجد ان هنالك فروقاً معنوية ($p < 0.05$) لصالح المستخلص المائي الحار أيضاً.

يمكن تفسير آلية عمل التانينات والمركبات الفينولية الموجودة في قشرة ثمار الرمان على قابليتها لترسيب البروتينات الموجودة في الغشاء الخلوي او في داخل الخلية الحية عند نفاذها من خلال الغشاء وتكوين أو اصر هيدروجينية بين مجاميع الهيدروكسيل الفينولية الحرة والمتعددة (Phenolic hydroxyl) والمركبات النتروجينية او البروتينات وبالتالي تثبط فعالية بعض الانظيمات الضرورية في الكائن الحي (Reed, 1995; Covington, 1997).

يلاحظ بصورة عامة بان المكونات الفعالة للنباتات الطبية تتأثر في كمياتها ونوعياتها بظروف تنمية النباتات (Reynolds *et al.*, 2001)، كما يتفاوت تأثير هذه المركبات على الأحياء المجهرية اعتماداً على التراكيز المستعملة من المستخلصات واعداد البكتيريا الخاضعة للفحص، فضلاً عن ظروف اجراء التجربة (Varel and Vincent, 2002).

المصادر العربية

* الجنابي، علي عبد الحسين (١٩٩٦). تأثير بعض المستخلصات النباتية على نمو بعض الفطريات الممرضة لجلد الإنسان. رسالة ماجستير، كلية العلوم-الجامعة المستنصرية.

* حسين، فوزي طه قطب (١٩٧٩). النباتات الطبية: زراعتها ومكوناتها. الدار العربية للكتاب، تونس.

* العاني، ندى عربي حمدو (٢٠٠١). دراسة تأثير المستضد الخارق المنتج من بكتريا *Streptococcus pyogenes* المعزولة من الاطفال على بعض الخلايا المناعية. رسالة ماجستير، كلية العلوم-الجامعة المستنصرية.

* المسعودي، هيام خالص (٢٠٠١). استخدام مستخلصات الثوم وقشور ثمار الرمان في معالجة الفئران البيضاء المصابة بالمسحرات الفأريّة *Trichomonas muris*. رسالة ماجستير، كلية العلوم-جامعة بابل.

المصادر الأجنبية

* Al-Rawi, A. and Chakravarty, H.L. (1988). Medicinal plants of Iraq. 2nd ed. Ministry of Agriculture and Irrigation, Baghdad.

* Anesini, C. and Perez, C. (1993). Screening of plants used in Argentin folk fedicine for antimicrobial activity. J. Ethnopharma., 39 (20) : 119-128.

* Baron, E. J. and Finegold, S. M. (1990). Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 8th ed, C.V. Mosby Co., USA.

* Baron, E. J. and Finegold, S. M. (1994). Diagnostic Microbiology. 9th ed, The C.V. Mosby Co., USA.

* Covington, A.D. (1997). Modern tanning chemistry. J. Chem. Soc. Rev., 26:73-146.

- * Cruickshank, R. ; Duguid, J.P. ; Marmion, B.P. and Swain, R.H. (1975). Medical Microbiology. 12th ed. Churchill Livingstone, London.
- * Fehri, B. ; Aiache, J. ; Memmi, A. ; Korbi, S. and Lamaison, J. (1994). Hypotension, Hypoglycemia, Hypouricemia recorded after repeated administration of aqueous leaf extract of *Olea europae* L. J. Pharm. Belg., 49(2): 101-108.
- * Forbes, B. A. ; Sahn, D. F. and Weissfeld, A.S. (1998). Diagnostic Microbiology. 10th ed. Mosby, Inc. Baltimore, Toronto.
- * Govan, A. D.; Macfarlane, P.S. and Callander, R. (1983). Pathology illustrated. Sheckwan Tong Ltd, New York.
- * Heynen, G. (1996). Evaluation of the efficacy safety and toleration of Azithromycin, penicillin treatment of acute streptococcal pharyngitis in children. Pediatric. Infect. Dis. J., 15: 791-795.
- * Kim, N. D. ; Mehta, R. ; Yu, W. ; Neeman, I. ; Livney, T. ; Amichay, A. ; Poirier, D. ; Nicholls, P. ; Kirby, A. ; Jiang, W.; Mansel, R. ; Ramachandran, C. ; Rabi, T. ; Kaplan, B. and Lansky, E.(2002). Chemopreventive and adjuvant therapeutic potential of pomegranate (*Punica granatum*) for human breast cancer. Kluwer Academic Publishers, 71: 203-217.
- * Mahmoud, M. J. ; Jawad, A. J. ;Hussain, A. M. ;Al-Omeri, M. and Al-Naib, A. (1989). *In vitro* antimicrobial activity of *Salsola rosmarinus* and *Adiantum capillusveneris*. Int. J. Crude. Drug. Res., 27: 14-16.
- * Reed, J. D. (1995). Nutritional toxicology of tannins related polyphenols in forage legumes. J. Ani. Soc., 73: 1516-1528.
- * Reynolds, S.J.; Black, D.W.; Borin, S.S.; Breuer, G.; Burmeister, L.F.; Fuortes, L. G.; Smith, T.F.; Stein, M.A.; Subramanian, P.; Thorne, P.S. and Whitten, P. (2001). Indoor environmental quality in six commercial office buildings in the midwest United States. Appl. Occup. Environ. Hyg., 16: 10650-10677.

* Segura, J.J.; Morales-Ramos, L. H.; Verde-Star, J. and Guerra, D.(1990). Inhibicion del crecimiento de *Entamoeba histolytica* Y, *E. invadens* producida por la raiz del granado (*Punica granatum L.*). Arch. Invest. Med.(Mex.), 21:235-239.

* Shah, U.K. (2004). Tonsillitis and peritonsillar abscess. [http:// www.emedicine.com](http://www.emedicine.com).

* Stenfors, L. E.; Fredriksen, F.; Raisanen, S. and Myklebust, S. (1997). Identification of *Streptococcus pyogenes* on tonsillar epithelium during infection. Acta Otolaryngol. (Stockn), 529 (Supl):212-214.

* Townsend, C.C. and Guest, E. (1980). Flora of Iraq. The botany directorate, ministry of agriculture and agrarian reform, Vol. 4. Baghdad, Iraq.

* Varel, I. and Vincent, H. (2002). Carvacrol and thymol reduce swine waste odor and pathogens: stability of oils. Curr. Microbiol., 44: 38-43.

* Vasconcelos, L.C.; Sampaio, M.C.C.; Sampaio, F.C. and Higino, J.S. (2003). Use of *Punica granatum* as an antifungal agent against candidosis associated with denture stomatitis. Braz.J. Microbiol., 46 Issue (5-6): 192. (Abstract).

Abstract

The aim of this study is to know the effect of *Punica granatum L.* pericard aqueous extract on bacteria isolated from tonsillitis patients in Diyala province.

The results revealed a significant effect of *Punica granatum L.* hot aqueous extract at the concentrations (10,20,40,80,160) mg/ml against each isolate of *Streptococcus pyogenes* and *Staphylococcus aureus* with inhibition zones (9.0, 11.2, 12.7, 14.0, 15.0)mm and (11.5, 15.0, 17.2, 20.2, 23.0)mm respectively. Whereas, other inhibitory effects were observed using cold aqueous extract with inhibition zones (0, 8.0, 10.2, 11.3, 13.0)mm and (9.8, 13.4, 15.3, 18.0, 20.0)mm respectively.