# تاثيرالمستخلص المائي والكحولي لقشور ثمرة الرمان كمثبط لنمو جرثومة الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* في المختبر

صبا عبود علي
كلية الطب البيطري –جامعه القادسية

## الخلاصه

هدفت الدراسة الحالية معرفة تاثير مستخلص قشور ثمرة الرمان المائي والكحولي ضد نمو جرثومه *Pseudomonas aeruginosa* وبواقع اربعه تراكيز وهي (25,50,75,100) ملغم/ مل وتم استخدام طريقة الانتشار بحفر الاكارAgar well diffusion method حيث اظهرت النتائج تاثيرا تثبيطيا ازداد مع زياده التركيز المستخدم ونوع المذيب حيث كانت الجرثومه اكثر تحسسا لتخافيف المستخلص الكحولي للتراكيز المستخدمه مقارنه مع تحسسها لنفس التراكيز للمستخلص المائي ولوحظ ذلك التاثير من اختلاف اقطار التثبيط للتراكيز حيث كانت اكبر اقطار التثبيط عند التركيز100ملغم/مل (2±37ملم) و(1.34±35ملم) للمستخلصين الكحولي والمائي على التوالي, وتقل قيمة قطرالتثبيط تنازليا الى التركيز الاقل وهو25 ملغم/مل بمقدار (1.2±22) و(0.0±19) للمستخلصين الكحولي والمائي على التوالي.

## المقدمة

قدمت الصناعات الدوائية العديد من المضادات الحيوية في العقود الثلاث الاخيرة وعلى الرغم من ذلك تزداد مقاومة الجراثيم لهذه المضادات مع مرور الوقت لذلك اتجهت بعض الدراسات الى العلاج المستخدم من منتجات طبيعية مشتقه من النباتات الطبية (1) في السنوات الماضية اثبتت العديد من الدراسات وفي بلدان مختلفه فعالية مستخلصات النباتات كعلاج للامراض ومنها امراض الكلى (2) والتهابات الجروح (3) وحتى تاثيرها على امراض السرطان (4).من اهم النباتات في هذا المجال هو الرمان *Punica granatum* ويعود الى العائلة *Punicaceae* وهو من اقدم انواع الفواكه المعروفة وقد ذكر في القران الكريم تتم زراعته في جنوب اسيا مثل ايران وتركيا وبعض الدول العربية و شمال افريقيا (5,6).يستعمل الرمان في علاج العديد من الامراض حيث تحتوي قشرته على 25 %الى 28 % مواد عفصية Tanins واهم مركب كيميائي في هذه المجموعه هو بيونكالين Punicalin والذي يعرف باسم مركب كراناتاين Granatine D و مركب بيونيكا لاجين والذي يعرف ايضا باسم Granatine C (7).كما تحتوي القشرة على حامض التانيك Tanic acid وهو ماده قابضه لذا يستعمل مسحوق القشور المجففه كمضاد للاسهال والزحار ومغلي القشور كطارد للديدان لاحتوائه على مادة Peletierine (8).اما قشور الساق والجذورفتحتوي على مواد عفصية بنسبة 20% الى 25% كما تحتوي القشور على قلويدات بيريدنية ومن اهم هذه القلويدات الايزوبيليتيرين Isopelletierine وتحتوي البذورعلى مواد سكرية وحامض الليمون وفيتامينات (A,B,C) وبعض المعادن مثل الفسفور والبوتاسيوم (8,9) .هنالك الكثير من الدراسات التي تحرت عن فعالية مستخلص القشور او العصير او البذور لنبات الرمان ضد نمو العديد من الجراثيم المسببة للامراض ومنها دراسة (10) ضد الجراثيم المسببة للاسهال عند الاطفال, كما وجد (11) تاثيره التثبيطي ضد جرثومة اللسيتريا ولقد استخدمه (12) لمعرفة تاثيره على الفطريات وكذلك يعتبر الرمان مصدرا غنيا لاستخلاص مواد فعالة ضد الجراثيم ومنها جرثومة الزوائف الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* وهي جرثومة عصوية سالبة لصبغه كرام تعتبر من اشد

الجراثيم الممرضة التي لها القدرة على العيش في البيئات الرطبة ومقاومتها للعديد من المضادات والمعقمات وهي سبب رئيسي في عدوى المستشفيات nosocomial infection غالبا ما تكون الاصابات الناتجة عنها حاده وقوية وتهدد حياة المريض مع صعوبة معالجتها بالمضادات بسبب ظهور سلالات مقاومة للمضادات الحيوية اثناء العلاج وقد تعود قدرتها العالية على المقاومة الى وجود انظمة antibiotic efflux systems والتي تؤدي الى ظهورسلالات مقاومة للعديد من الادوية المستخدمة في علاج المرضى وهذه الانظمة عبارة عن آلية مسؤولة عن قذف المواد السامة والمضادات الحيوية خارج الخلية، ويعتبر هذا جزءا حيويا من عملية التمثيل الغذائي وتتم عن طريق نظم آلية الطاقة التي تعتمد على (النقل النشط) لضخ المواد السامة غير المرغوب فيها من خلال مضخات خارج الخلية ولقد عرفت اهمية هذه الالية في السنين الاخيرة ودورها الفعال في زيادة مقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية (13,14) .

## المواد وطرائق العمل

استخدمت جرثومة الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* في التجربة وتم الحصول عليها من مختبر الاحياءالمجهرية والطفيليات في كلية الطب البيطري /جامعة القادسية و تم التاكد من نقاوتها و خواصها الزرعية وصفاتها الكيمو حيوية حسب ما جاء به (15) ثم حفظت في نقيع الدماغ والقلب.

**تحضير العالق الجرثومي**

زرعت الجرثومة على وسط الاكار المغذي لمده (24 )ساعه بدرجه( 37) مْ ثم غسل النمو باستخدام (10) مل من المرق المغذي ونقل العالق الى انبويه اختبار معقمة وتم تعيين العدد الكلي للجراثيم بمقارنته مع محلول ماكفرلاند القياسي (0.5).

**تحضير المستخلص المائي والكحولي لقشور الرمان**

جمعت ثمار الرمان من الاسواق المحلية في مدينة الديوانية نظفت وغسلت وفصلت القشور عن الثمرة وجففت القشور في الظل وبعدها طحنت للحصول على مسحوق ناعم وزن منه (50)غم واضيف اليه (500 )مل من الماء المقطر كمذيب وباستخدام الصفيحة الحارة المحركة لقطعه المغناطيس تم مزج الخليط لمدة (24) ساعه وبعده رشح باستخدام ورق الترشيح من نوع واتمان رقم 2 .بخر الراشح باستخدام جهاز المبخر التفريقي الدوار بدرجه(60)مْ وبضغط منخفض لحين الحصول على المستخلص المائي(10).تم استخدام الايثانول كمذيب بدلا عن الماء المقطر في تحضير المستخلص الكحولي وباستخدام نفس خطوات العمل ثم حضرت اربعه تراكيز (100,75,50,25) ملغم/مل لكل مستخلص.

**طريقة عمل اختبار الحساسية للمستخلصين**

استخدمت طريقة حفر الاكار لمعرفة التاثير التثبيطي للمستخلص المائي والكحولي حيث استخدم وسط المولر هنتون الصلب وتم عمل 5 حفر في كل طبق زرعي بعد ان تم زرعه بالعالق البكتيري المحضر وبواقع ثلاث مكررات لكل مستخلص ثم وضعت التراكيز المحضرة( 25,50,75,100 ) ملغم|مل في الحفرة المخصصة لها مع وضع المادة المذيبة في الحفرة الخاصة حسب نوع المستخلص وبواقع( 0.1 ) مل لكل تركيز ثم حضنت الاطباق الزرعية بعد نصف ساعه بدرجه حرارة( 37)مْ لمده (24) ساعة تم قياس قطر التثبيط حول كل حفرة مقاسا بالملليتر .

## النتائج والمناقشة

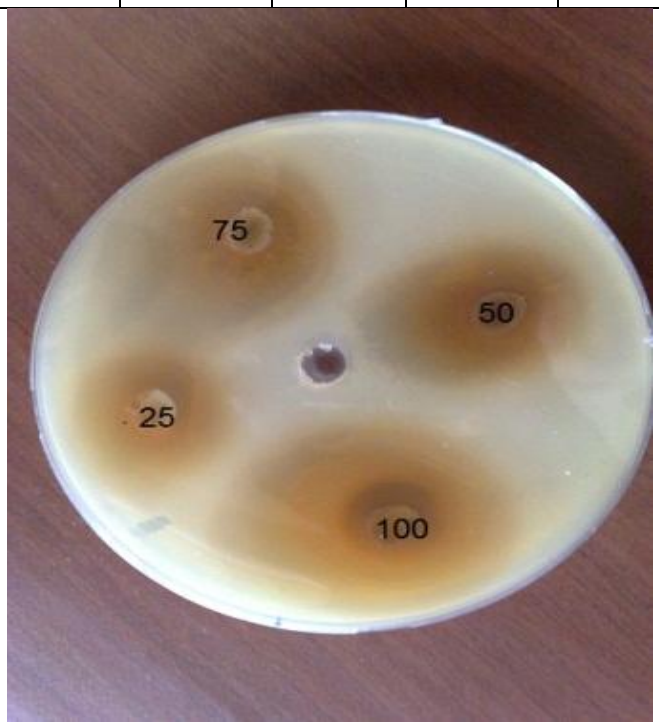
توضح الدراسة ان لمستخلص قشور الرمان المائي والكحولي تاثيرا مضادا لنمو جرثومة

*Pseudomonas aeruginosa* باستخدام طريقة الانتشار في اطباق الاكار مع تباين التاثير حسب نوع المستخلص والتركيز المستخدم لخلاصة قشور الرمان.

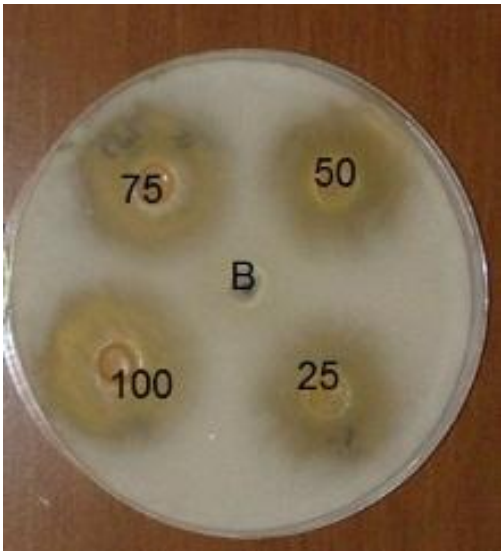
نلاحظ من الجدول (1) معدلات اقطار المناطق الخالية من النمو الجرثومي مقاسا بالملم مع الخطا القياسي للتخافيف المستخدمة بواقع ثلاث مكررات لكل مستخلص وكانت اقطار التثبيط عند التراكيز المستخدمة (25) (50), (75), (100) ملغم/ملم بمقدار(22±1.2) (25±1.7), (29±1.5) و(37±2) على التوالي للمستخلص الكحولي صورة رقم (1), وكذلك المستخلص المائي حيث كانت اقطار التثبيط (19±0.0),(22±1.24), (27±2) و (35±1.34) لكل من التراكيز المستخدمة ( 25,50,75,100)على التوالي صورة رقم (2).

جدول (1) التاثيرالتثبيطي للمستخلصين المائي والكحولي لقشور ثمرة الرمان على نمو جرثومة *Pseudomonas aeruginosa* في الاطباق الزرعية

| نوع المستخلص لقشور الرمان | قطر التثبيط لجرثومة *Pseudomonas aeruginosa* مقاسا بالمليمترمع الخطأ القياسي | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | التركيز ملغم/مل | | | | |
| | 25 | 50 | 75 | 100 | ماءمقطر |
| مائي | 0.0±19 | 1.24±22 | 2±27 | 1.34±35 | 0.00 |
| كحولي ايثانولي | 1.2±22 | 1.7±25 | 1.5±29 | 2±37 | 0.00 |




الصورة (1) تاثير التراكيز المختلفة لمستخلص قشور الرمان الكحولي على نموجرثومة *Pseudomonas aeruginosa*




الصورة (2) تاثير التراكيز المختلفة لمستخلص قشور الرمان المائي على نموجرثومة *Pseudomonas aeruginosa*

يلاحظ ان التاثير التثبيطي يزداد بزيادة تركيزالمادة حيث كان التركيز100ملغم/مل اكثر تاثيرا مقارنة مع بقية التراكيز تنازليا وكذلك كان تاثير التراكيز للمستخلص الكحولي اكثر تاثيرا من نفس التراكيز المستخدمة للمستخلص المائي والسبب في ذلك هو زياده كمية المواد المثبطة في المستخلص على نمو الجرثومة بزيادة التركيز كما ان المادة المستخدمة كمذيب لها دور فعال في استخلاص هذه المواد المثبطة .توضح النتائج اهمية مستخلص قشور الرمان في تثبيط نمو جرثومة*Pseudomonas aeruginosa* المسببة للعديد من الامراض الخطرة بالاضافه الى استمرار ظهور سلالات مقاومة للعديد من المضادات المستخدمة في العلاج كما اكدت العديد من الدراسات الاخرى تاثير مستخلصات ثمرة الرمان على العديد من الجراثيم السالبة والموجبة لصبغه كرام ومنها *E.coli* و *S.aureus*(3,5,7).بالاضافه الى الدراسات المحلية للعديد من مستخلصات الفواكه ومن ضمنها الرمان ومنهاماقام به (11) حيث استخدم مستخلص القشور المائي والكحولي على الجراثيم المسببه للاسهال عند الاطفال *E.coli* و , *Shigella* واثبت فعاليته التثبيطية لنمو تلك الجراثيم وكذلك (10) التي اثبتت تاثير المستخلص على جرثومة *Listeria monocytogenes* كما اوضح (12) فعالية المستخلص ضد الفطريات بسبب احتوائه على حامض الكالوتانيك Galotannic acid مما يجعله مفيدا في علاج الالتهابات الجلدية والاغشية المخاطيه واصابات الفم. وتعود الفعالية المؤثرة لقشور الرمان الى احتوائه على العديد من المركبات الفعالة التي تؤثرايجابيا على العديد من الامراض الخطرة ومنها السرطان حيث تحتوي قشورالثمرة على اعلى نسبة من مضاد الاكسدة مقارنه مع اجزاء اخرى من الفاكهة, بالاضافه الى احتوائه على مركبات الفينول الفعالةphenolic compounds المنتجة في عملية التمثيل الغذائي الثانوية secondary metabolism للنبات وهي من المواد النشطة وتعمل الفينولات على تثبيط عمل الانزيمات  بالاضافة الى القلويدات الفعالة ومنها pelletierine والفلافونيدات Flavonoids وكذلك وجود مادة العفصيات Taninns بنسبة 25% الى 28%وهي عبارة عن gallotannins والذي يشمل Granatine, Punicalagin, Punicalinوقد تعود قدرة مركبات التانين الى تداخلها مع تركيب جدار الخلية البكتيرية وبالتالي تثبيط نمو الجراثيم (16).

## المصادر


1. Cohen, M.L. (1992) Epidemiology of drug resistance: implications for a post antimicrobial era. *Science* 257, 1050-1055.
2. Khan, N. and Sultana, S. (2005) Chemomodulatory effect of *Ficus racemosa* extract against chemically induced renal carcinogenesis and oxidative damage response in Wistar rats. *Life Sciences*.77(11):1194-210.
3. Murthy, K.N.; Reddy, V.K.; Veigas, J.M.; Murthy, U.D.(2004). Study on wound healing activity of *Punica granatum* peel. *J. Med. Food, 7*, 256-259.
4. Kim, N.D.; Mehta, R.; Yu, W.; Neman, I.; Livney, T.; Amichay, A.; Poirer, D.; Nicholls, P.;Kirby, A.; Jiang, W.; Mansel, R.; Ramachandran, C.; Rabi, T.; Kaplan, B.; Lansky, E.(2002) . Chemopreventive and adjuvant tharapeutic potential of pomegranate (*Punica granatum*) forhuman breast cancer. *Breast Cancer Res. Tr. 71*, 203-217.
5. Ahmet, D. D; Mustafa, O.; Kenan, S. D.; Nurcan, E. and Coskun D.(2009). Antimicrobial Activity of Six Pomegranate (*Punica granatum* L.) Varieties and Their Relation to Some of Their Pomological and Phytonutrient Characteristics. *Molecules , 14*, 1808-1817
6. Gislene, G. F. Nascimento; Juliana, L.; Paulo, C. F.; Giuliana,L. S. (2000). Antimicrobial activity of plant extract and phytochemical on antibiotic resistant bacteria. Brazilian Journal of Microbiology ,31:247-256.
7. البراهيم، جنان سعود(2008).تأثير عصير الرمان ضد البكتيريا المسببة لالتهابات الجروح. مجلة جامعة بولتن البيئية.المجلد11. رقم2.ص:21-27.
8. Anupam, G.; Bidus K. D.; Arup, R.; Biplab,M. and Goutam, C. (2008): Antibacterial activity of some medicinal plant extracts. J.Nat Med., 62:259-262
9. Antonio, A.C.; Christopher A.; Lilia A.P.; Ernesto, F. and Cristóbal N. A. (2008): Microbial production of ellagic acid and biodegradation of ellagitannins. Appl Microbiol Biotechnol .78:189-199
10. الزبيدي، اسامة صالح; علي، هدى عبدالهادي; غازي، علي محمد.(2008). فاعلية خلاصات ثمرة الرمان على نمو بعض مسببات الاسهال الجرثومية عند الاطفال.مجلة القادسية.المجلد13. ص:25-31
11. النصراوي، هدى عبدالهادي.(2009). التاثير التثبيطي لمستخلصات قشور ثمرة الرمان على نمو جرثومة اللستيريا مختبريا. مجلة القادسية .ملحق ببحوث المؤتمر العلمي الثالث.ص:71-78
12. Shaokat , S.S;Hameed,H.A and, Mohammad, H.A (2007). Anti-fungal Activity of Punica Granatum I.peels Powder and Extractsfrom Pathogenic Samples. Iraqi J.Pharm.Sci., Vol.:16 (2).12-20.
13. Bambeke,F.V.; Balzi, E.; and Tulkens P. M. (2000) Antibiotic Efflux Pumps Biochemical Pharmacology, Vol.(60):457–470.
14. Adwan, G.;Abu-Shanab, B. and Adwan, K. (2009) In *vitro* Interaction of Certain Antimicrobial Agents in Combination with Plant Extracts Against Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* Strains

Middle-East Journal of Scientific Research 4 (3): 158-162.

15. Quinn,P.J.; Carter,M.E.;Markey,B.K. and Carter, G.R.(2004). Clinical veterinary microbiology. Mosby Elsevier Ltd.

16. A. Doss; H. M. Mubarack and R. Dhanabalan (2009) Antibacterial activity of tannins from the leaves of Solanum trilobatum Linn. Indian Journal of Science and Technology Vol.2 No.(2) ,:41-43.

# The effect of aqueous and alcoholic extracts of pomegranate peel as a growth inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa in vitro*

S. A. Ali
Coll.of Vet. Med. / Univ.of Qadisiyah
E.mail: iraqsaba@yahoo.com

## Abstract

Aim of this research is to study the effect of pomegranate peel watery and alcoholic extracts against *Pseudomonas aeruginosa* growth with four concentrations (25, 50, 75, and 100) mg /ml by using agar well diffusion method. The results showed an inhibitory effect which increased with the increasing of the concentration and the type of solvent the bacteria was more sensitive to alcoholic extract concentrations compared with the same concentrations of aqueous extracts It was observed that the effect of differing diameters inhibition of concentrations where the largest diameters inhibition when we focus on 100 mg/ml (37± 2 mm) and (35 ±1.34mm) for extractors alcoholic and water, respectively, and less value Descending to (25)mg/ml which was less effecting against the growth of bacteria by (22±1.2) and (19±0.0) of alcoholic and watery extractors, respectively.