تأثير المستخلصات الخام لنبات السماق في تثبيط نمو والتصاق بكتريا Pseudomonas aeruginosa و E. Coli المعزولة سريرياً من المرضى المصابين بالتهاب المجاري البولية الحاد

بيداء حسين علوان
سوزان اسماعيل
عادل حمدان علوان
الجامعة المستنصرية – كلية العلوم

الخلاصة:

تم في هذه الدراسة قياس فعالية نوعين من مستخلصات نبات السماق (المائي الحار والكحولي الحار) كمضادات حيوية على نوعين من البكتريا المعزولة سريرياً وهي بكتريا Pseudomonas aeruginosa وبكتريا E. Coli باستخدام طريقة الحفر بالأ گار ومقارنة النتائج مع قرص المضاد الحيوي لـ Tetracyclin.

أظهرت النتائج أن الاختلاف في قطر منطقة التثبيط يعتمد على نوع البكتريا ونوع المستخلص وتركيزه، إذ استخدمت التراكيز 5, 10, 20, 40 ملغم/مل في هذه الدراسة وأظهرت أن معدل قطر التثبيط تراوح بين 0 – 14 ملم، 0 – 17 ملم على التوالي بالمستخلص المائي الحار، أما بالمستخلص الكحولي الحار فقد تراوح معدل قطر منطقة التثبيط بين (0 – 20) ملم، (0 – 18.2) ملم على التوالي.

كما قيست فعالية مستخلص السماق الكحولي الحار عند التركيز 40 ملغم/مل في تثبيط التصاق ثلاث عزلات البكتريا Pseudomonas aeruginosa وعزلتين لبكتريا E. Coli على الخلايا الطلائية المعزولة من الانسان، وبحساب معدل البكتريا الملتصقة على الخلايا الطلائية كانت النتائج كالآتي: 10.2 خلية بكتيرية، 7.0 خلايا بكتيرية (على التوالي).

وبشكل عام تشير النتائج أن لمستخلص السماق الكحولي الحار تأثيرا كبيرا كمضاد حيوي على البكتريا المعزولة سريرياً.

Effect of Rhus Coriaria crude extract on Inhibition and adhesion of Pseudomonas aeruginosa and E. Coli clinically isolated from patients infected with cute urinary tract inflimation

Abstract:

In this study the effect of two types of Rhus Coriaria (Hot water, Hot Ethanol) extracts were measured as antibiotics against two types of clinically isolated bacteria Pseudomonas aeruginosa and E. Coli by using Agar well diffusion method, the results were compared with antibiotic Tetracycline disk.

The results show that difference in inhibition zone diameter depends on the type of bacteria, the type of extract and the extract concentration, the concentration (5, 10, 20, 40) mg/ml were used in this study and the results show that the inhibition zone diameter for the two types of bacteria are between 0 - 14 mm and 0 -17 mm respectively by using hot water extract, whereas the inhibition zone diameter for the same two types of bacteria are between (0 -20) mm and (0 – 18.2)mm respectively.

Moreover, the effect of hot ethanol extract, in the concentration 40 mg/ml was measured in inhibition of bacterial adhesion for three Pseudomonas aeruginosa strains and two E. Coli strains on epithelial cells isolated from human. To calculate the average of adhered bacteria on epithelial cells, the results are: 10.2 bacteria cells, 7.0 bacteria cells respectively.

Generally speaking, the results show that the hot ethanol extract is an effective antibiotic on clinically isolated bacteria.

المقدمة:

عرف في الوقت الحاضر لبعض أنواع النباتات القدرة على إنتاج مركبات مختلفة، يكون لها القدرة في الدفاع عن نفسها ضد مختلف أنواع الممرضات (1)، لذا جاء الاهتمام بالنباتات الطبية لتجنب المشاكل التي قد تصاحب الاستخدام المتكرر والطويل للمضادات (2) خاصة تلك المستخدمة بالغذاء والحوامض أو نكهات بالإضافة إلى فعالياتها الضد مايكروبية (3). ومن هذه النباتات اختير السماق لاختبار فعاليته الضد مايكروبية ضمن هذه الدراسة.

السماق Rhus coriaria نبات من ذوات الفلقتين (Dicotyledonea) يعود إلى الفصيلة البطمية (Terebinthaceae) يكون بشكل أشجار أو شجيرات صمغية راتنجية. عرف السماق منذ زمن طويل، إذ وجد ما يقارب (120) نوعا منتشرة تلقائياً في الأراضي الكلسية الجافة أو الطينية الكلسية في المناطق الحارة (4).

التركيب الكيميائي للسماق يختلف حسب نوع السماق ومصدره وإليه ترجع سميته ورائحته الصمغية والراتنجية الخاصة به، هذا علماً أن نسبة التركيب تتغير تبعاً لأجزاء النبات نفسه، إذ تحتوي الثمار على نسبة عالية من حامض الليمون والخل والماليك وهذا ما يكسبها طعماً حامضاً لاذعاً كما تضم المالات القلوية (Malate Alkaline)، أما عصارة السماق فتحتوي على كحول سام جداً، وتضم خميرة اللاكّاز (La case) المؤكسدة والسريعة الانحلال بالماء بالإضافة إلى مادة الأربان (Arbane) والكالاكتان (galactan) كما يحتوي على كحول فائق السمية يعرف باسم الـ Carole أو Toxicodendrol (5).

استخدم السماق كـ (anti inflammatory ، anti viral ، anti septic ، anti dysenteric)، ومن المعلومات المتوفرة عن التأثير الفعال للسماق في الخلايا البكتيرية جاءت هذه الدراسة (6).

المواد وطرائق العمل:

❖ تقدير فعالية مستخلص نبات السماق ضد البكتريا

تم تحضير نوعين من مستخلص السماق وكما يلي:

١- المستخلص المائي الحار Hot water extract

أذيب (30 غم) من مسحوق نبات السماق في (100 مل) من الماء المقطر المغلي لدرجة حرارة (100 م°) وترك لمدة ½ ساعة، رشح بعدها خلال ورقة ترشيح، جفف الراشح في الحاضنة بدرجة 37 c° لمدة 48 ساعة للحصول على المسحوق الجاف للسماق (7). استخدم المسحوق في تحضير التراكيز المطلوبة.

٢- المستخلص الساخن بالكحول الأثيلي Hot ethanol extract

اعتمدت نفس الطريقة السابقة في تحضير المستخلص المائي الحار، ثم استخدم الكحول الاثيلي في تحضير التراكيز المطلوبة من المسحوق الجاف.

❖ **اختيار العزلات:**

اختيرت (16) عزلة بكتيرية (8) منها البكتريا Pseudomonas aeruginosa و (8) منها لبكتريا E. Coli، عزلت من المرضى الراقدين في مستشفى الشهيد عدنان للجراحات التخصصية لمرضى يعانون التهاب مجاري بولية حاد، شخصت العزلات اعتماداً على الصفات الزرعية والكيميائية الحيوية، كما فحصت مجهرياً للتعرف على شكلها وتفاعلها مع صبغة كرام.(8)

❖ **اختبار تكوين الغشاء الرقيق (Pellicle):**

نميت العزلات البكترية في وسط المرق المغذي (Nutrient broth) ثم تم حضنها في أنابيب اختبار في درجة حرارة (37 c°) لمدة (18 ساعة) يلاحظ بعد انتهاء مدة الحضن تكون الغشاء الرقيق على سطح المرق المغذي من عدم تكونه إذ أن العزلات المهدبة تكون هذا الغشاء والعزلات غير المهدبة لا تكونه (9).

❖ **تحضير عالق الخلايا الطلائية للانسان:**

تؤخذ عينة وسطية من الادرار الوسطي (Mid stream urine) لنساء حوامل غير مصابات بالتهاب المجاري البولية، وتنبذ بسرعة 1000 دورة بالدقيقة لمدة 5 دقائق، يغسل الراسب الذي يحتوي على الخلايا الطلائية بدارئ الفوسفات الملحي (PBs) ثم تغسل بنفس الدارئ.(10)

❖ **اختبار الالتصاق البكتيري:**

للتعرف على دور الاهداب في عملية الالتصاق البكتيري بالخلايا الطلائية للانسان نجري الاختبار التالي:

تم مزج (0.05 مل) من مزروع بكتيري لكل عزلة من العزلات المدروسة وهو بعمر (18 ساعة) في وسط Trypticase Say broth مع 0.5 مل من عالق الخلايا الطلائية وبعد الحضن بدرجة (37 c°) ولمدة (60 دقيقة)، يغسل العالق بواقع (4 مرات) باستخدام دارئ الفوسفات الملحي (PBs) للتخلص من البكتريا غير الملتصقة، تؤخذ قطرة من العالق ويوضع على شريحة زجاجية ثم تجفف وتثبت وتصبغ بصبغة گرام (11).

❖ **اختبار تأثير مستخلصات السماق على نمو العزلات البكتيرية:**

قيست الفعالية الضد مايكروبية لمستخلص السماق اعتماداً على طريقة الانتشار (الحفر بالاگار).

حضر العالق البكتيري بنفس درجة عكورة ثابت العكرة القياسي (0.5) للعزلات البكتيرية لبكتريا Pseudomonas aeruginosa ولعزلات بكتريا E. Coli إذ لقح سطح الاطباق المحتوي على وسط Muller hinton Agar بواسطة sterile swab من العالق البكتيري بعدها تم عمل حفر (wells) في الوسط الزرعي بواسطة الثاقب الفليني المعقم (cork borrar) بقطر (5 ملم)، أضيفت (0.05 مل) من محلول المستخلص إلى كل حفرة، إضافة إلى استخدام قرص قياسي لمضاد الـ Tetracycline (30 mg) واعتماده كعامل سيطرة.

من خلال هذه الطريقة اختبرت فعالية المستخلص، بالتراكيز (5، 10، 20، 40) ملغم/مل على نمو البكتريا، حضنت الأطباق بدرجة حرارة (37 c°) لمدة (24 ساعة)، تم بعدها قياس قطر منطقة تثبيط النمو حول كل حفرة بالمليمتر (12).

❖ **تثبيط الالتصاق البكتيري باستخدام مستخلص السماق:**

إن تثبيط الالتصاق البكتيري يعد الخطوة المهمة الأولى في منع حدوث إصابات كبيرة، ولتثبيط هذه العملية اختير السماق بديلاً عن المضادات الحيوية، إذ يتضمن هذا الاختبار تنمية العزلات البكتيرية بتركيز (40) ملغم/ملم لمستخلص السماق الكحولي الحار وحسب ما جاء في (13).

النتائج والمناقشة:

أجريت هذه الدراسة لتقدير فعالية مستخلصات نبات السماق على بكتريا E. Coli وبكتريا Ps. aeruginosa اللتان تعدان مسببات رئيسية لالتهابات المجاري البولية (Urinary Tract Infection) إذ استخدمت طريقة الانتشار بالاگار (طريقة الحفر) وأظهرت النتائج أن المستخلص المائي الحار لنبات السماق له فعالية كبيرة عند التركيز (40) ملغم/ملم ضد بكتريا الـ E. Coli و Pseudomonas aeruginosa، وبمعدل قطر لمنطقة التثبيط (17 – 14) ملم على التوالي، يليها التركيز (20) ملغم/ملم وبمعدل قطر لمنطقة التثبيط (10.2 – 8.5) ملم على التوالي، فيما لم يكن هناك أي تأثير لتركيز (10 ,5) ملغم/مل على كلا العزلتين، تم مقارنة النتائج مع قرص السيطرة الـ Tetracycline الذي كان قطر منطقة التثبيط له (6 – 3.8) ملم على التوالي. جدول رقم (1). كما كان للمستخلص الكحولي الحار لنبات السماق تأثير على بكتريا E. Coli وبكتريا Ps. aeruginosa، إذ بلغ معدل قطر منطقة التثبيط عند التركيز (40) ملغم/ملم (20 – 18.2) ملم على التوالي يليها التركيز (20) ملغم/ملم وبمعدل قطر لمنطقة التثبيط (13.4 – 11.1) ملم، أما التركيز (10) ملغم/ملم فكان قطر منطقة التثبيت (5 – 0) ملم على التوالي، إذ لم يؤثر هذا التركيز على بكتريا Ps. Aeruginosa، فيما لم يكن للتركيز (5) ملغم/ملم أي تأثير على العزلتين جدول رقم (2).

من نتائج هذه الدراسة تبين أن للمستخلصات النباتية تأثيرا كبيرا وفعالا وبدون تأثيرات جانبية مقارنة بالأدوية الشائع استخدامها بالوقت الحاضر إضافة إلى تقليل ظهور السلالات

المقاومة (14)، كما تبين أن للمستخلص الكحولي الحار تأثير واسع الطيف على كلتا العزلتين وكلاهما سالبة لصبغة كرام وهذه النتائج تتفق مع ما جاء بـ (15).

جدول1: تاثير المستخلص المائي الحار لنبات السماق على بكتريا التهاب المجاري البولية الحاد

تراكيز المستخلص + السيطرة	عزلات بكتريا E. Coli	عزلات بكتريا Ps. aeruginosa
(ملغم/ملم)	معدل اقطار مناطق التثبيط (ملم)	
40	17	14
20	10.2	8.5
10	0	0
5	0	0
* Tetracycline	6	3.8
ماء معقم مقطر	0	0

*السيطرة

جدول رقم (2)

(تأثير المستخلص الكحولي الحار لنبات السماق على بكتريا التهاب المجاري البولية الحاد)

تراكيز المستخلص + السيطرة	عزلات بكتريا E. Coli	عزلات بكتريا Ps. aeruginosa
(ملغم/ملم)	معدل اقطار مناطق التثبيط (ملم)	
40	20	18.2
20	13.4	11.1
10	5	0
5	0	0
* Tetracycline	6.3	3.9
ماء معقم مقطر	0	0

*السيطرة

يمكن تفسير هذه النتائج بالاعتماد على ما يحتويه المستخلص الكحولي من مركبات فعالة مثل القلويات ومواد كحولية سامة، تمتلك تأثيراً مثبطاً لنمو بعض الأحياء المجهرية (16)، كما وجد أن للقلويات فعالية قاتلة للأحياء المجهرية بسبب تأثيرها على الحامض النووي وتحطيم الغشاء البلازمي للخلية البكتيرية ومسخ البروتينات الموجودة فيه أو أنها قد تتداخل مع سلسلة التفاعلات الأيضية اللازمة لنمو الكائن المجري (17).

كما أظهرت نتائج هذه الدراسة أن المستخلص السماق الكحولي الحار تأثير كبير على عملية الالتصاق البكتيري للعزلات المهدبة التي اختيرت في هذه الدراسة إذ انخفض معدل الالتصاق بشكل واضح بعد ظهور فروق معنوية عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.01$).

فبعد إجراء فحص تكوين الغشاء الرقيق للكشف عن العزلات المهدبة، اختيرت ثلاث عزلات لبكتريا Ps. aeruginosa وعزلتين لبكتريا E. Coli وهي:

P1, P4, P5, E2, E8

أجري اختبار تثبيط الالتصاق البكتيري لهذه العزلات على الخلايا الطلائية المعزولة من الانسان باستخدام تركيز (40) ملغم/ملم للمستخلص الكحولي الحار لنبات السماق وبحساب 50 خلية طلائية وحساب عدد الخلايا البكتيرية لكلا العزلتين الملتصقة عليها وأخذ معدل الخلايا البكتيرية الملتصقة وكما موضح بالجدول الآتي: جدول رقم (3)

جدول (3) معدل عدد الخلايا البكتيرية الملتصقة على 50 خلية طلائية بشرية

معدل الخلايا البكتيرية الملتصقة			
العزلات البكتيرية	المستخلص الكحولي الحار للسماق (40) ملغم/ملم	Tetracyclin	الماء المقطر
Ps. aeruginosa	* 10.2 ∓ 1.48	39.0 ∓ 4.3	100%
E. Coli	* 7.0 ∓ 1.35	36.0 ∓ 4.2	100%

(P ≤ 0.01)*وجود فروق معنوية عند

من نتائج الجدول رقم (3) يتضح وجود فروق معنوية (P ≤ 0.01) بين معدل التصاق العزلات البكتيرية المهدبة المنماة في وسط يحتوي على تركيز (40) ملغم/ملم من مستخلص السماق الكحولي الحار وبين معدل التصاق نفس العزلات المنماة في وسط زرعي خال من المستخلص، وهذا يُظهر أن للمستخلص فعالية عالية في تثبيط الالتصاق البكتيري من خلال التأثير القوي له في إحداث خلل في تخليق العوامل المسؤولة عن الالتصاق مثل الـ Pili (18).وبهذا يمكن منع الخطوة الأولى لإحداث الإصابة دون اللجوء إلى استخدام المضادات الحيوية التي قد تتسبب في حدوث تأثيرات جانبية خطيرة.

References:

1. Cowam MM., 1999 – Plant Products as Antimicrobial Agents. Clinical Microbiology Reviews, 12: 264-582.
2. Emori TG., Gaynes RP., 1993 – An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. Clinical Microbiology Reviews, 6: 428-442.
3. Beuchat LR., Golden DA., 1989 – Antimicrobial occurring naturally in foods. Food Technology, 43: 134-142.

4. Duke JA., JoBogenschutz-Godwin M., Du Cellierd J., Du Ke P-AK., CRC Handbook of Medical Plant CRC press, Boca Raton, 2003, 269-270.
5. Lauk L., Caccamof., Special AM., Tempera G., Ragusa S., Pante G., 1998 - Antimicrobial activity of Rhus coriaria L. leaf extract. Phytotherapy Research, 12: S152-S153.
6. Nimril LF., Meqdam MM., Al Kofahi A., 1999 – Antibacterial Activity of Jordanion Medicinal plants. Pharmaceutical Biology, 37: 196-201.
7. Anesini, C. & Perez, C., 1993 – Screening of plants used in Argentin Folk Fedicine for antimicrobial activity. J. of Ethnopharma. 39 (201: 119-128).
8. Holt, H, G; Krieg N, R; Sneat, H, P, A. (1994). Bergey's manual of determinative bacteriology, 9th , ed. , Williams & Wilkins, Baltmore, USA.
9. Cole, E.C., Rutala, W.A., Carson, J.L. and Alfano, E.M. (1989). Pseudomonas pellicle in disinfectant testing: electron microscopy pellicle removal and effect on test results. Appl. Eurron. Microbiology, 5: 511-513.
10. Lomberg, H., Cedergen, B., Loffer, H., Nilsson, B., Carlstorm, A.S. and Eden, C.S. (1986). Influence of blood group on the availability of receptors for attachment of Uropathogenic Escheria Coli. Infect – Immun. 51: 919-629.
11. البراك، عبد العظيم ياسين عبود (١٩٩٧). دراسة جرثومية ومناعية جرثومية العقدية. مجموعة – أ المعزولة من المرضى البشر المصابين بالتهاب اللوزتين الحاد، اطروحة دكتوراه، كلية الطب البيطري، جامعة بغداد.
12. Baron, E.J. & Fine gold, S.M. (1994). Bailey and Scott's diagnostic Microbiology. 9th ed. Dennis C. Carson (ed) Mosby.
13. Obritsch, M. Fish DN, Maclaren et al. (2005). Nosocomial infections due to multi drug – resistant pseudomona aeniginosa: epidemiology and treatment option. Pharmacotherapy, 10: 1353-1364.
14. Abu-Shanab B., Adwan G., Abu-Safiya et al. (2005). Antibacterial activity of Rhus coriaria.L extracts growth in Palestine Islamic Univ. Gaza (Natural Sciences Series), 13: 147-153.
15. Abu-Shanab B., Adwan G., Abu-Safiya et al. (2004). Antibacterial activity of some plant extracts utilized in popular medicine in Palestine. Turk Biol 28: 99-102.
16. Cowman, M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. Clin. Microbial. Rev., 12 (4): 564-582.
17. Phillipson, J.D. and Oneill, M.J. (1987). New loads to the treatment of protozoal infections based on natural products molecules Acta. Pharm. Nord; 1: 131-144.
18. Ka wamura- Sato, K., Inuma, Y.; Hasegawa, T.; Horii, T.; Yamashino, T. and Ohata, M. (2000). Effect of subinhibitory concentration of macrolides on expression of Flagellin in P. aeruginosa and Proteus mirabilis. Antimicrobe agents Chemother. 44: 2869-2872.