دراسة فعالية مستخلص ثمرة نبات البمبر *Cordia myxa* المائي والكحولي على بعض انواع البكتريا المرضية وخميرة *Candida albicans*

علياء محمد عبد الهادي*

استلام البحث 18، حزيران، 2010
قبول النشر 26، تشرين الاول، 2010

الخلاصة:
نفذت الدراسة الحالية لمعرفة فعالية مستخلص ثمرة البمبر ***Cordia myxa*** في نمو وفعالية الانواع الاتية من البكتيريا المرضية *Escherichia coli , Pseudomonas aeruginosa, Proteus Spp., Klebsiella pneumoniae , Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes ,Bacillus subtilus* فضلا عن خميرة المبيضات البيضاء *Candida albicans*.
اظهرت النتائج تفوق المستخلص الكحولي الميثانولي لثمرة البمبر تفوقا معنويا مقارنة مع المستخلص المائي اذ كان تاثيره مثبط تجاه نمو وفعالية هذه الانواع ، وكان التركيز المثبط الادنى Minimum inhibitory concentration (MIC) للانواع البكتيرية كالتالي:
عند معاملة كل من بكتريا (*Escherichia coli* ، *Streptococcus pyogenes* ، *Staphylococcus aureus*) بالتراكيز (50 ،75، 100، 125 ،150 ، 200) مايكروغرام / مليليتر كان التركيز المثبط الادنى هو(15 ، 19،10) ملم على التوالي اما *Proteus Spp.* فظهر التركيز المثبط الادنى عند التركيز 125 مايكروغرام / مليليتر وكان قطر منطقة التثبيط هو 6 ملم .
في بكتريا *Pseudomonas aeruginosa, Bacillus subtilus* , وجد ان للتراكيز(3.1 ، 6.2 ،12.5 ،25 ، 50) مايكروغرام / مليليتر تاثير ايجابي على الانواع البكتيرية اذ كان التركيز المثبط الادنى لهذه الانواع هو (6، 5) ملم على التوالي .
اما بكتريا *Klebsiella pneumoniae* فقد عوملت بالتراكيز (3.1، 6.2 ، 12.5 ، 25 ،50 ، 75 ، 100 ، 125 ،150 ، 200) مايكروغرام / مليليتر وكان التركيز المثبط الادنى عند التركيز 6.2 اذ كان قطر منطقة التثبيط هو 10ملم .
بالنسبة للخميرة والمستخلص المائي البارد والحار فلم تظهر اي نوع من التثبيط سواء على البكتريا اوالخميرة ..
وبينت نتائج التحليل الاحصائي فقد اشارت الى ان للمستخلص النباتي تاثير مثبط على نمو وفعالية البكتريا وكان التاثير ذو فروق معنوية للتراكيز المختلفة .

الكلمات المفتاحية : نبات البمبر ، مضاد بكتيري ، مضاد فطري .

المقدمة :

يعود نبات البمبر *Cordia myxa* الى العائلة Boraginaceae [1] ، وهو من النباتات شبه الاستوائية المستزرعة في وسط وجنوب العراق وبشكل خاص في البصرة ، اما موطنه الاصلي هو اسيا الاستوائية ، وشجرة البمبر من الاشجار المستديمة الخضرة ، وهي متوسطة الحجم اذ يبلغ ارتفاعها (5-7) م [2] .
يتميز هذا النبات بكون ثماره صفراء اللون تغمق كلما نضجت ، ملساء ، ذات نواة حجرية ، حلوة المذاق قريبة الشبه بثمار الكوجة [3] في داخلها سائل لزج كانه صمغ شفاف سكري ، تمتاز الثمار بكونها ذات قيمة غذائية ودوائية عالية وذلك لمحتواها العالي من فيتامين ج ، السكريات والبروتينات التي تفوق ثمار الفاكهة ذات النواة الحجرية الاخرى [4].
من ناحية التركيب الكيميائي والمكونات الفعالة فيحتوي البمبر على القلويدات وهي اهم ما في النبات من مواد دوائية تتكون نتيجة الفعاليات الايضية اما وظيفتها فمنهم من يقول انها وسيلة دفاع للنبات بسبب سميتها التي تمنع الحشرات وغيرها عن النبات وتؤثر القلويدات على الانسان تاثيرات دوائية عظيمة فمنها المسكنات ، المنشطات ، موسعات الاوعية ومضادات الطفيليات [5]. كما ويحتوي على الفلافونويدات وهي من المضادات البكتيرية [6].
الفينولات تتكون من حلقة اروماتية حاملة لمجموعة هيدروكسيل(-OH)او اكثر ولا تقل نسبة الفينولات في النبات عن 15% من الوزن الجاف [7].وهي قابلة للذوبان في الماء وتوجد في فجوات الخلايا ، تعزز هذه المركبات مقاومة النبات ضد

*قسم علوم الحياة كلية العلوم للبنات جامعة بغداد

الاحياء المجهرية والحشرات ومن امثلتها الكومارينات ذات التاثير المضاد للبكتريا والفطريات والفايروسات [8]. اما السابونين توجد هذه المجموعة من السكاريدات في معظم النباتات واهم خواصها مضادة للبكتريا [4].

اما فائدة هذه الثمار فهي مفيدة للشعر وحويصلاته كونه يحتوي على اغلب انواع الفيتامينات ، منظم جيد للمعدة ، في الهند تستخدم في الطب الشعبي كما تستخدم الناضجة في الطبخ اما النصف ناضجة فتستخدم في المخللات. ويستخدم بصورة دقيقة لعلاج امراض الصدر واصابات الجهاز البولي[9]. كما يستخدم كمضاد للديدان ، للالتهابات المعوية ، للاسهال ،للديدان الشريطية ، للالتهابات المفاصل ، ويستخدم كمدرر ، مسكن ، منشط للكبد ، يخفف السعال والالم الصدرية ، كما ويعالج تقرحات التجويف الفموي [10].

وتشير البحوث الى انها مضادة الى التهاب القولون الحاد [3] ، في تنزانيا تستخدم الثمرة كعلاج الديدان الحلقية (ring worm) اما في منطقة مالي و cote فتستخدم الاوراق في علاج الجروح والقرحة وايضا للتخلص من طفيلي الترايبونسوما والمحلول يستخدم للتخلص من التسي تسي اما الكامرون يستخدمون المسحوق المجفف لعلاج العظام المكسورة وعلاج الامراض الجلدية [11] .

المواد وطرائق العمل :

1- الاوساط الزرعية : تم تحضير الاوساط الزرعية المدرجة في ادناه حسب تعليمات الشركة المجهزه ، وتم ضبط الاس الهيدروجيني لها على الرقم (7) وجرى تعقيمها وهذه الاوساط :-

*وسط المرق المغذي (Nutrient Broth (NB وهو مجهز من شركة Oxoid ، استخدم هذا الوسط لتنمية عزلات بكتيريا شملت كل من (الموجبة والسالبة لصبغة كرام) وتنشيطها وحضر باذابة 13 غم في 1000 مليلترمن الماء المقطر .

*وسط الاكار المغذي (Nutrient Agar (NA وهو مجهز من شركة Biolife استعمل هذا الوسط لدراسة فعالية مستخلص ثمرة البمبر تجاه العزلات البكتيرية وكذلك لحفظ العزلات وحضر باذابة 23 غم في 1000 مليلترمن الماء المقطر.

*وسط اكار السبروید Sabouraud Dextrose (SDA) Agar وهو مجهز من شركة Mast Diagnostics استخدم هذا الوسط لتنمية وحفظ عزلات خميرة *Candida albicans* ولفحص حساسيتها تجاه المستخلص النباتي وحضر باذابة 50 غم 1000 مليلترمن الماء المقطر.

*وسط بطاطا دكستروز السائل Potato Dextrose Broth (PDB) وحسب تعليمات شركة (Oxoid) وحضر الوسط مختبريا وعقم بنفس الطرق السابقة لتنمية الخميرة وعمل التخافيف .

2- جمع العزلات البكتيرية وخميرة *Candida albicans*

تم الحصول على العزلات البكتيرية والخميرة من مختبر كلية العلوم للبنات / جامعة بغداد ، والتي كان قد تم عزلها من عينات مرضية وتم تشخيصها باجراء مجموعة من الفحوصات الكيموحيوية.

3- تحضير عالق البكتريا وخميرة *Candida albicans*

حضر عالق البكتريا والخميرة وذلك بنقل جزء من مزروع النوع البكتيري والخميرة النامية على اوساطها الصلبة الى انبوبة اختبار حاوية على 10 مليليتر من الوسط السائل (NB) للبكتريا و (PDB) للخميرة . وبعد مدة حضانة 18 ساعة وبدرجة حرارة 37 م ، عملت تخافيف نصفية للمزروع وحددت الكثافة الضوئية باستخدام جهاز المطياف الضوئي (Spectrophotometer) وعلى طول موجي 450 نانوميتر.

4- تهيئة عينات ثمار نبات البمبر

تم الحصول على ثمار نبات البمبر *Cordia myxa* في شهر تموز من منطقة البياع في بغداد ، نظفت الثمرة من الاتربة العالقة بها باستخدام المناديل الورقية ، ثم ازيلت البذور عن الثمرة بعد ذلك جففت بنشرها فوق قماش في مكان لا تصله الشمس وبدرجة حرارة الغرفة ، بعد ان جف الثمر تماما تم تقطيعه الى قطع صغيرة الحجم .

5- استخلاص ثمار نبات البمبر

جرى الاستخلاص بعدة طرق :

1- المستخلص الكحولي : تم وزن 30غم من مسحوق ثمرة البمبر ووضع في جهاز الاستخلاص السوكسليت، مع 300 مليليتر من الكحول المثيلي 97 % في درجة حرارة 60 م لمدة 7 ساعات ثم رشح وجفف المستخلص ، ووزن وحفظ في الثلاجة بدرجة4 م لحين الاستخدام. اتبعت هذه الطريقة على وفق ما جاء في [12] .

2- المستخلص المائي

تم وزن 30 غم من مسحوق ثمرة نبات البمبر واذيب بـ 300 مليلتير من الماء المقطر ووضع في حمام مائي بدرجة حرارة 35 م لمدة 24 ساعة ، بعد ذلك رشح المستخلص باستخدام ورق الترشيح (whatman) ثم نبذ الراشح بقوة 2500 دورة /دقيقة لمدة 10 دقائق بجهاز الطرد المركزي اخذ الرائق واهمل الراسب ثم جفف المستخلص ووزن ووضع في الثلاجة بدرجة 4 م. اتبعت هذه الطريقة على وفق ما جاء في [13] .

تم التعقيم باستخدام ورق ترشيح ذو ثقوب بقطر (0.2 Mm).

6- الكشف عن المركبات الفعالة في مستخلص ثمار البمبر

*الكشف عن القلويدات وتم باستخدام كاشف دراجندوف [14]حيث يتكون لون برتقالي عند معاملة المستخلص بالكاشف دلالة على وجود القلويدات .
*الكشف عن الفلافونات وذلك باخذ كمية من المستخلص ووضعه على ورق ترشيح ثم اضيفت قطرات من حامض Hcl وفحص باشعة Uv] [15،وظهور لون بني دلالة على وجود الفلافونويدات .

7- دراسة تاثير مستخلص ثمار البمبر على نمو وفعالية الانواع البكتيرية وخميرة المبيضات البيضاء

اتبعت في ذلك طريقة التخافيف الدقيقة باستخدام الوسط الغذائي السائل (Broth Micro dilution method) [16] وتمت كالاتي :-

1- اذيب (0.5 غم) من المستخلص الكحولي في (2.5 مليلتر) من DMSO (dimethyl sulfoxide). بعد ذلك عقمت مجموعة من الانابيب الزجاجية واجريت طريقة التخفيف المتسلسل المضاعف باستخدام قانون التخفيف حيث كان اعلى تركيز هو 200 ملغرام/ مليليتر واقل تركيز هو 6.25 ملغرام / مليلتر فكانت النسب المئوية للمستخلص النباتي في الانابيب وكالاتي :

(3.1 6.25،12.5،25،50،75،100،125،150،200) ملغرام / مليلتر على التوالي.

2- تم تحضير وسط زرعي يحوي على انواع بكتيرية مختلفة (N.A) وبالنسبة للخميرة (PDB) للزرع.

3- تم تعقيم اوراق ترشيح قطرها 6 ملم باستخدام المؤصدة Autoclave لمدة 15 دقيقة.

4- تم تشبيع اقراص الترشيح بالتراكيز المختلفة للمستخلص النباتي ولمدة 24 ساعة .

5- تم زرع البكتريا والخميرة في الوسط المغذي بطريقة التخطيط المستمر وبعد ¼ ساعة وضعت الاقراص المشبعة بالتراكيز المختلفة من المستخلص على المزروع وحضنت لمدة 24 ساعة تحت درجة حرارة 37م وعملت مكررات لكل تركيز .

6- حسبت عدد المستعمرات لكل تركيز وقورنت مع معامل السيطرة الحاوي على جميع المكونات السابقة فيما عدا اضافة المستخلص النباتي .

8-تحديد التركيز المثبط الادنى (MIC) للمستخلصات النباتية ضد البكتريا المعزولة

حضرت سلسلة من التخافيف النصفية من التركيز النهائي (200) ملغم /مليليتر للمستخلص النباتي في انابيب اختبار معقمة تراوحت قيمها (25، 50، 75،100 ، 125 ،150 ،175 ،200)ملغم /مليليتر ، وقد استخدم وسط المرق المغذي (N.broth) لاجراء التخافيف ، لقحت الانابيب بمقدار (0.1) مليليتر من العالق البكتيري حسب التخافيف المحضرة مسبقا .
حضنت الانابيب بدرجة 37 م ولمدة (24) ساعة وقرات النتائج بمقارنتها مع انبوب السيطرة (1) ويحتوي على المرق المغذي ملقح بالبكتريا فقط ، وانبوب سيطرة (2) يحوي مرق مغذي مع مستخلص بدون البكتريا .

9- اختبار حساسية المضادات الحيوية Ampicillin ، Ceftriaxone ، Cephalothin ، Amoxicillin تجاه عزلات البكتريا والفطريات المدروسة :

استعملت المضادات الحيوية المجهزة من شركة Bio-analyse ، اذ اختبرت حساسية البكتريا والخميرة تجاه المضادات الحيوية وذلك باستعمال طريقة الانتشار بالحفروبعدة تخافيف بلغت (6.2 ، 12.5 ، 25 ،50) ملغم /مليليتر من المضاد الحيوي ، اعتبرت كسيطرة موجبة وتم وضع 200 مايكروليتر من المضاد في كل حفرة ، وضعت الاطباق في الحاضنة لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37م وقيست مناطق التثبيط للمضادات الحيوية وتمت مقارنتها بمناطق التثبيط للتراكيز النباتية المستعملة مقاسة بالملميتر.

10- التحليل الاحصائي :

حللت النتائج احصائيا باستخدام اختبار دنكن متعدد الحدود لمعرفة (Duncan Test) ، (17) لمعرفة معنوية تاثير التراكيز وتحت اي مستوى من مستويات الاحتمالية كان للمستخلص تاثير فعال.

النتائج والمناقشة :

اظهرت النتائج ان للمستخلص الميثانولي لثمار البمبر فعالية عالية ضد البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام في حين لم يكن هناك اي تاثير فعال ضد فطر المبيضات البيضاء ، اما فعالية المستخلص المائي الحار والبارد فلم يكن له اي نتيجة مثبطة سواء على البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام او على خميرة المبيضات البيضاء . كما موضح بالشكل (1 ، 2):

شكل رقم (1 ، 2) يمثل تاثير المستخلص النباتي على بكتريا Escherichia coli واخرى تمثل انواع من المضادات الحيوية المستخدمة ضد البكتريا.

جدول (1) اقطار مناطق التثبيط مقاسة بالملمتر باستعمال تراكيز مختلفة لمستخلص البمبر الكحولي .

Cordi myxa Extrction. / Bcteria name	200 mg	150 mg	125 mg	100 mg	75 mg	50 mg	25 mg	12.5 mg	6.2 mg
E.Coli	21 e	17 d	16 c	16 c	15 b	- a	- a	- a	- a
Staphylococcus aureus،	23 d	20 c	19 b	- a	- a	- a	- a	- a	- a
Pseudomonas aeruginosa	20 g	18 f	- a	- a	- a	17 e	12 d	11 c	5 b
Bacillus subtilus	- a	- a	- a	- a	- a	13 e	11 d	10 c	9 b
klebsiella pneumoniae	22 h	21 g	20 f	20 f	19 e	18 d	13 c	11 b	10 a
S.aureus	23 e	20 d	19 c	18 b	- a	- a	- a	- a	- a
Proteus spp	8 d	7 c	6 b	- a	- a	- a	- a	- a	- a
Streptococcus	19 f	18 e	16 d	14 c	10 b	- a	- a	- a	- a

- تمثل اقطار منطقة التثبيط مقاسة بالملمتر

اما من الناحية الاحصائية فقد تمت معاملة الانواع البكتيرية بالتراكيز المذكورة سابقا من المستخلص الميثانولي ، واشارت نتيجة التحليل الاحصائي ان تاثير المستخلص النباتي على الخلايا البكتيرية ذا فروق معنوية ($p \leq 0.05$) ابتداءا من التركيز 6.2 مايكروكرام /ملليتر في بعض الانواع في حين لم يكن هذا التركيز ذا تاثير معنوي في انواع اخرى وكما هو موضح بالجدول اعلاه.

اذ لوحظ ان التراكيز(6.2 ، 12.5، 25، 50) ملغم لم يكن لها اي تاثير فعال تجاه بكتريا *E.coli* و*Streptococcus* في حين كان للتراكيز (75 ، 100، 125 ، 150، 200) ملغم فروق معنوية واضحة وكما مشار اليها في الجدول .(1)

واما في بكتريا *Pseudomonas*. لوحظ ان التراكيز (75، 100، 125) ملغم لم تظهر اي فروق معنوية مقارنة بالتراكيز الاخرى التي اظهرت ايضا تفاوت في درجة الفعالية ضد البكتريا .

كذلك يمكن ملاحظة بكتريا *Bacillus subtilus* التي لم تظهر اي فعالية في التراكيز العالية مقارنة بالتراكيز الواطئة التي كانت مثبطة وبشكل فعال.

في بكتريا *Klebsiella pneumoniae* كانت للتراكيز المختلفة فعالية جدا عالية وذات تاثير معنوي واضح ابتداءا من الاقل تركيز الى الاعلى تركيز.

اما في بكتريا *S.aureus* و *Proteus* *لوحظ ان التراكيز الواطئة لم تظهر اي فعالية معنوية بالمقارنة مع التراكيز العالية التي اظهرت فروق معنوية واضحة تجاه الخلايا البكتيرية.*

لم تشر اي من البحوث الى نبات البمبر من ناحية تاثيره على البكتريا فقط بحث واحد ذكر ان هذا ثمرة النبات بعد استخلاصها باستخدام الميثانول لم تعطي اي فعالية ضد البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام .

نتائج البحث مطابقة لما ذكر سابقا [4] .كونه مضاد فعال لانواع البكتريا لاحتوائه على Scopoletin .

المصادر :

1- الكاتب ،يوسف منصور. 2000.تصنيف النباتات البذرية .الطبعة الثانية .وزارة التعليم العالي والبحث العلمي .دار الكتب للطباعة والنشر . جامعة الموصل .

2- مالك ، سحر عبد العباس ؛ المياحي ، منال زيباري 2006 .دراسة التطور الجنيني واسباب فشل انبات بذور نبات البمبر / كلية الزراعة / جامعة بغداد

3- عثمان، اسعد خالد ؛ عبد الباسط عودة ابراهيم ؛ طه ياسين العيداني 1989 . دراسة التطور الثمري لنبات البمبر في منطقة البصرة ، التغيرات الفيزياوية ، مجلة البصرة للعلوم الزراعية 2 (2) : 21-26 .

4- عسكر ، منال عبد الله 1994. دراسة كيميائية ومظهرية لثمار وبذور نبات البمبر الذي ينمو في العراق ، رسالة ماجستير ، كلية الزراعة ، جامعة البصرة

5- الحاج توفيق يحيى ، 2003 النبات والطب البديل ، الدار العربية للعلوم ، بيروت ص 94-105 .

6- Fu, P.P.,Yang, Y.C. Xia ; Q. Chou,M.C.; Y.Y.,Lin G. 2002. "pyrrolizidine alkaloids-tumorigenic components in chinese herbal medicines and dietary supplements "Journal of food and drug analysis, 10 (4)198-211.

7- Hunter, M.D., and L.A.Hull 1993. Variation in concentration phloridizin and phloretin apple foliage . phytoch., 34:125-154.

8- Thornes,R.D., 1997 . Clinical and biological observation associated with coumarins , p256. In R. Okennedy and R.D.thornes (ed.) coumarins :biology application and modification . John wiley and sons .Inc. New York. N.Y.

9- Kuppast I.J. ; Vasudeva P.; Chandra K.; Satsh K.V. 2009 .Anti ulcer effect of cordial dichotoma fruits forst fruits against gastric ulcers , Journal of pharmacology 7(1) 15

10-Afzal M., Obuekwe C., khan A.R., and Barakat H. 2007 . Antioxidant activity of *cordia myxa L*. and its hepatoprotective potential . EJEAFChe ,6 (6) ,(2109-2118).

11 -Al Awadi, F.M.,Srikumar , T.S., Anim, J.T. & Khan, I. 2001 .Anti-inflammatory effects of *cordia myxa* fruit on experimentally induced colitis in rats.Nutrition 17(5):391-396.

12- - Deshmukh, S.D. and Bork.M.N., 1975,. Studies on the insecticidal properties of indigenous plant products India . J.Ent. 37 (1):11-18.

13 - Anesini, C. and Perc . Z.C. , 1993,. Screening of plants used in Argenine folk medicin for Antimicrobial activity . J. Ethno. Pharm. 39(2)119-128.

14 -Stahl, E. 1969.Thin layer chromatography, a laboratory hand book, New York springer pp:460.

15- Jaffer., H.L., Mahmed. M.J.,Jawad. A.M., Naji.A.and AL-Naib. A.1983. Phytochemical and Biological screening of some Iraqi.Fitoterapia.Pp.299.

16- سركيس ، جورج جوناثان والراوي ، قاسم محمد علي وكاطع ، جاسم محمد 1980. تشخيص المركبات العضوية (الطرق الكيمياوية). مطبعة جامعة بغداد .

17- Duncan.J.I. 1955 . Multiple F-test Multiple range test.Biomietric. 1(1):1-42.

The effect of methanol and water plant extracts of *Cordia myxa* on Some pathogenitic bacteria and *Candida albicans*

Alyaa . M. Abdul Hadi*

*Department of Biology, College of Women Science, University of Baghdad

Abstract

this study aimed to study the effect of ***Cordia myxa*** extract on the growth and activities of the following types of bacteria : *Escherichia coli , Pseudomonas aeruginosa, Proteus Spp., Klebsiella pneumoniae , Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes , Bacillus subtilus*, and the yeast *Candida albicans* .the results showed an inhibitory effect of the methanol extract on both the growth and activity of the tested microbes .this was reflected by the minimum inhibitory concentration (MIC) of different type of bacteria and the yeast.