الفعالية التثبيطية للمستخلص الكحولي لقشرة ثمار الرمان (*Punica granatum*) تجاه بعض الأنواع التابعة للأجناس ***Lactobacillus*** و***Clostridium*** المعزولة من براز الإنسان

احمد طلال حكمت **عمر مؤيد العبيدي**

قسم علوم الحياة

كلية العلوم

جامعة الموصل

تاريخ الاستلام	تاريخ القبول
2013/05/19	2013/10/02

ABSTRACT

This study showed isolation and diagnosis of 70 isolates of intestinal flora that isolated from feces of healthy people in Mosul city / Iraq, distributed to 40 isolates from beneficial bacteria *Lactobacillus* spp. and 30 isolates from harmful bacteria *Clostridium* spp., this include species of beneficial bacteria : *L. acidophilus*, *L. casei* subsp. *casei*, *L. pentosus*, *L. reuteri*, *L. ruminis*, *L. fermentum*, *L. gasseri*, *L. helveticus*, *L. plantarum*, *L. paracasei* subsp. *paracasei*, *L. salivarius*, *L. casei* subsp. *rhamnosus* and *L. johnsonii*, as well as the species of harmful bacteria included into *C. butyricum*, *C. difficile*, *C. cadaveris*, *C. septicum*, *C. ramosum*, *C. histolyticum*, *C. tertium*, *C. perfringes* and *C. clostridiiforme*, adopted cultural qualities, microscopic and biochemical tests to get the results.

Inhibitory effectiveness of the variable constrations 4, 8 and 12 mg. from alcoholic (methanol) extract of peeled fruits of pomegranate (*Punica granatum*) against the isolated bacteria was studied. The method of disks in the measurement of the effectiveness was adopted. Results showed that the plant extract has a powerful effect against pathogenic bacteria represented by *Clostridium* spp. while lower activity against bacteria *Lactobacillus* spp.

الخلاصة

بينت هذه الدراسة عزل وتشخيص 70 عزلة من الفلورا المعوية المعزولة من براز الأشخاص الأصحاء ضمن مدينة الموصل/العراق موزعة الى 40 عزلة للبكتريا النافعة

Lactobacillus spp. و30 عزلة للبكتريا الضارة .*Clostridium* spp اذ تضمنت الانواع التابعة للبكتريا النافعة الى *L. acidophilus* و*L. casei* subsp. *casei* و*L. pentosus* و*L.* *reuteri* و*L. ruminis* و*L. fermentum* و*L. gasseri* و*L. helveticus* و *L.* *plantarum* و*L. paracasei* subsp. *paracasei* و*L. salivarius* و *L. casei* subsp. *rhamnosus* و*L. johnsonii* ، فضلاً عن ذلك تضمنت الانواع التابعة للبكتريا الضارة إلى *C. butyricum* و*C. difficile* و*C. cadaveris* و*C. septicum* و*C. ramosum* و *C.* *histolyticum* و*C. tertium* و*C. perfringes* و*C. clostridiiforme* ، اعتمدت الصفات الزرعية والمجهرية والاختبارات الكيموحيوية في الحصول على النتائج. درست الفعالية التثبيطية لتراكيز مختلفة 4 ، 8 و12 ملغم من المستخلص الكحولي (الميثانول) لقشرة ثمار الرمان (*Punica granatum*) تجاه البكتريا المعزولة واعتمدت طريقة الأقراص في قياس تلك الفعالية ، أظهرت النتائج أن المستخلص النباتي له تأثير قوي تجاه البكتريا الضارة المتمثلة بـ .*Clostridium* spp بينما كانت فعاليته قليلة تجاه البكتريا النافعة المتمثلة بـ *Lactobacillus* .spp.

المقدمة

أشارت معظم نتائج الباحثين إلى الدور الكبير التي تلعبه الفواكه في إحداث تأثيرات ايجابية على الصحة العامة للإنسان ولهذا عدت الفواكه من متطلبات الحياة الصحية ، ويعد الرمان من الفواكه التي تستخدم في النواحي العلاجية وان كل جزء منه له خواص علاجية مختلفة إذ تستعمل قشوره في علاج أمراض البطن والإسهال نتيجة لتحسينه للبيئة الميكروبية في القناة الهضمية للكائن الحي نظراً لاحتوائه على مواد فعالة ميكروبياً كحامض Ellagic acid الذي يمتاز بفعاليته التثبيطية للأحياء المجهرية الممرضة كالبكتريا والفطريات والخمائر والديدان وفضلاً عن ذلك تحتوي قشور الرمان على عناصر غذائية كالمعادن والأحماض الامينية التي تنشط نمو البكتريا المفيدة في القناة الهضمية [1 ، 2].

أظهرت العديد من الدراسات [3، 4، 5] إن لقشور الرمان فعالية مثبطة قوية تجاه البكتريا المرضية *E. coli* ، *Bacillus subtilis* ، *Bacillus cereus* ، *Staphylococcus aureus* ، *Pseudomonas aeruginosa* ، *Enterobacter aerogens* ، *Serratia marcescens* ، *Brucella* spp. ، *Listeria monocitogenes* ، *Yersinia enterocolitica* والخمائر *Saccharomyces cerevisiae* بينما أظهرت دراسات أخرى [6، 7، 8] ان لقشور الرمان فعالية مثبطة قليلة تجاه البكتريا المفيدة.

يحتوي براز الإنسان السليم على العديد من بكتريا الفلورا المعوية والتي تتواجد بصورة طبيعية في القناة الهضمية للمضيف وتختلف من شخص لآخر ومن كائن لآخر بحسب طبيعة الغذاء الذي يتناولوه وطبيعة التوافق مابين المستقبلات الموجودة على سطح البكتريا والقناة المعوية للمضيف وغيرها من العوامل، إن البعض من هذه البكتريا تكون نافعة للمضيف كالعصيات اللبنية *Lactobacillus* spp. إذ تعد كخط دفاعي ضد الإصابة بالكائن الممرض من خلال إفرازها لمواد ذات فعالية مضادة كالبكتريوسينات وفضلاً عن ذلك تساهم في تحسين المناعة الخلوية والخلطية للمضيف بينما البعض الآخر من البكتريا تكون ضارة كالبكتريا *Clostridium* spp. والتي تسبب حالات مرضية عندما تتهيأ لها الظروف الملائمة لذلك [9].

أشارت العديد من الدراسات [10 ، 11 ، 12] إلى دور قشرة ثمار الرمان في إحداث تحويرات ايجابية في الفلورا المعوية للكائن الحي وذلك من خلال تثبيط البكتريا المرضية الانتهازية ونتيجة لذلك يحدث تنشيط للبكتريا النافعة المعوية والذي سيؤثر ايجابيا على صحة المضيف من خلال التقليل من حدوث حالات الانتفاخ والإسهال وغيرها من الأمراض ، لذا اجري هذا البحث بهدف دراسة دور قشرة ثمار الرمان في إحداث تأثيرات ايجابية على بعض الفلورا المعوية للإنسان.

المواد وطرائق العمل

المواد:

1. العينات البكتيرية : جمعت 200 عينة من براز الأشخاص الأصحاء بعمر 22 – 38 سنة من مناطق مختلفة ضمن مدينة الموصل/جمهورية العراق.
2. النبات المستخدم : جمع 4 كيلوغرام من ثمرة الرمان *Punica granatum* من الأسواق المحلية لمدينة الموصل.

طرائق العمل :

اولاً: العزل والتشخيص :

استخدمت الأوساط الانتقائية MRS agar (India ، HIMEDIA) و Egg yolk agar (UK ، Oxoid) لغرض عزل البكتريا *Lactobacillus* spp. و*Clostridium* spp. على التوالي ، كذلك تم استخدام الصبغات (صبغة كرام وصبغة السبور) والاختبارات الكيموحيوية والصفات الزرعية في التشخيص واستناداً إلى Starr وآخرون [13].

ثانياً: تحضير المستخلص النباتي :

بعد الحصول على ثمار الرمان تم اخذ قشوره وجففت عن طريق تحضينها بدرجة حرارة 30 م^{o} لمدة 7 أيام وبعد انتهاء فترة التحضين تم سحقها واخذ 100 غرام منه ومزج مع 200

مليليتر من الميثانول بتركيز 99.9 % عن طريق خلاط كهربائي لمدة 30 دقيقة وثم رشح المزيج باستخدام ورق الترشيح بقطر 0.22 مايكرون للثقوب ولثلاث مرات يومياً وعلى فترة 30 يوم وفي كل مرة تم استعمال ميثانول جديد ، وبعد الانتهاء من ذلك تم تعريض المزيج للتبخير لغرض الحصول على المسحوق الجاف وبعدها تم عمل ثلاث تراكيز من المستخلص الكحولي [4، 8] و12 ملغم/مل واستخدم الميثانول لهذا الغرض [6].

ثالثاً: قياس الفعالية الضد جرثومية :

استخدمت أقراص معقمة وغمرت بتراكيز مختلفة من المستخلص الكحولي لقشور ثمار الرمان وحضنت بدرجة حرارة 37 م^{o} لمدة 20 دقيقة ووضعت على سطح الوسط Mueller-Hinton agar (UK ، Oxoid) الملقح بـ 0.1 مل من المعلق البكتيري بعمر 18 ساعة إذ تم نشر المعلق بالفرش السطحي والتحضين بدرجة 37 م^{o} ولمدة 24 ساعة وتحت ظروف لاهوائية وتم عمل ثلاث مكررات من كل عزلة بكتيرية وبعدها قيست أقطار مناطق التثبيط وقورنت مع عينة السيطرة (قرص مشبع بالماء المقطر المعقم) [14].

النتائج والمناقشة

- **البكتريا** ***Lactobacillus*** **spp. (العصيات اللبنية)** :

بينت نتائج الدراسة إلى إمكانية عزل وتأكيد تشخيص 40 عزلة موزعة إلى 13 نوع بكتيري من جنس العصيات اللبنية إذ أظهرت نتائج الفحص المجهري باستخدام الصبغات (صبغة كرام وصبغة السبور) أنها عصيات موجبة لصبغة كرام وغير مكونة للسبورات واما صفاتها الزرعية على وسط MRS agar اظهرت ان شكل المستعمرات البكتيرية كانت صغيرة ومستديرة وبلون ابيض بينما نتائج الاختبارات الكيموحيوية موضحة بالجدول 1 [13 ، 15]. يوضح الجدول 2 عدد ونسب تلك العزلات إذ بلغت أعلى نسبة عزل 12.5% بالنسبة للأنواع البكتيرية *L. acidophilus* و*L. fermentum* و*L. plantarum* على التوالي وأما اقل نسبة عزل بلغت 2.5% بالنسبة لبكتريا *L. helveticus* و*L. johnsonii* على التوالي، أظهرت دراسة مقدمة من قبل Tancrede [16] إلى إمكانية عزل الأنواع البكتيرية التابعة لجنس العصيات اللبنية من براز الإنسان والحيوان إذ تعد البكتريا جزءاً من الفلورا المعوية للإنسان والحيوان.

الجدول (1) : نتائج الاختبارات الكيموحيوية المستخدمة في تشخيص العصيات اللبنية في هذه الدراسة.

نوع الاختبار / نوع العصيات اللبنية		*L. acidophilus*	*L. casei* subsp. *casei*	*L. pentosus*	*L. reuteri*	*L. ruminis*	*L. fermentum*	*L. gasseri*	*L. helveticus*	*L. plantarum*	*L. paracasei* subsp. *paracasei*	*L. salivarius*	*L. casei* subsp. *rhamnosus*	*L. johnsonii*
الكاتاليز		−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
الاوكسيديز		−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
نزع NH_3 من الارجنين		−	−	−	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−
تحلل الاسكولين		+	+	+	−	+	−	+	−	+	+	+	+	−
تخمر السكريات	**السيلوبايوز**	+	+	+	−	+	−	+	−	+	+	−	+	+
	الكالاكتوز	+	+	−	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+
	اللاكتوز	+	+	+	+	−	+	−	+	+	+	+	+	+
	المالتوز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	المانيتول	−	+	+	−	−	−	−	−	+	+	+	+	−
	الميليبايوز	−	−	+	+	+	+	−	−	+	−	+	−	−
	الارابينوز	−	−	+	+	−	+	−	−	+	−	−	−	−
	المليزيتوز	−	+	+	−	−	−	−	−	+	+	−	+	−
	الرايبوز	−	+	+	+	−	+	−	−	+	+	+	+	−
	الزايلوز	−	−	−	−	−	+	−	−	+	−	−	−	−
	الرامنوز	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	+	+	−
	السوربيتول	−	+	+	−	−	−	−	−	+	+	+	+	−
	السكروز	+	+	+	+	+	−	+	−	+	+	+	−	+
اختزال النترات		−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
الاندول		−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
الحركة		−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−

(+) النتيجة الموجبة للاختبار

(−) النتيجة السالبة للاختبار

الجدول (2) : نوع وعدد ونسب العزلات التابعة لجنس *Lactobacillus* المعزولة في هذه الدراسة.

النسبة المؤية %	عدد العزلات	نوع العزلة
12.5	5	*Lactobacillus acidophilus*
7.5	3	*Lactobacillus casei* subsp. *casei*
5	2	*Lactobacillus pentosus*
7.5	3	*Lactobacillus reuteri*
7.5	3	*Lactobacillus ruminis*
12.5	5	*Lactobacillus fermentum*
7.5	3	*Lactobacillus gasseri*
2.5	1	*Lactobacillus helveticus*
12.5	5	*Lactobacillus plantarum*
10	4	*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*
5	2	*Lactobacillus salivarius*
7.5	3	*Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*
2.5	1	*Lactobacillus johnsonii*
%100	40	**المجموع**

اشارت النتائج المدونة بالجدول 3 ان المستخلص الكحولي لقشرة ثمار الرمان لايمتلك قدرة تثبيطية تجاه الانواع البكتيرية *L. acidophilus* و *L. pentosus* و *L. reuteri* و *L. gasseri* بينما تتنوع قدرة المستخلص النباتي تجاه بقية الانواع البكتيرية فعند التركيز 4 ملغم/مل من المستخلص النباتي لوحظ ان الانواع البكتيرية *L. casei* subsp. *casei* و *L. fermentum* و *L. plantarum* و *L. paracasei* subsp. *paracasei* و *L. casei* subsp. *rhamnosus* و *L. johnsonii* لاتتأثر بالقدرة التثبيطية لمستخلص قشرة الرمان اذ بلغت نسبها 66.7 ، 60 ، 80 ، 75 ، 66.7 و100% على التوالي. فيما يخص الانواع الاخرى *L. ruminis* و *L. helveticus* و *L. salivarius* فكانت متأثرة بالقدرة التثبيطية للمستخلص النباتي بنسبة 100%. اما عند التركيز 8 ملغم/مل من المستخلص النباتي لقشرة الرمان لوحظ ان نسب العزلات التي لاتتأثر بالقدرة التثبيطية للمستخلص النباتي والمتمثلة بالانواع البكتيرية *L. casei* subsp. *casei* و *L. fermentum* و *L. plantarum* و *L. paracasei* subsp. *paracasei* و *L. casei* subsp. *rhamnosus* اذ بلغت 33.3 ، 60 ، 60 ، 50 و66.7 % على التوالي بينما تأثرت بقية الانواع بالقدرة التثبيطية للمستخلص بنسبة 100 % ، عند استخدام المستخلص النباتي بتركيز 12 ملغم/مل لوحظ ان نسب العزلات التي لم تتأثر بالقدرة التثبيطية لذلك

المستخلص والمتمثلة بالانواع البكتيرية *L. fermentum* و *L. plantarum* و *L. paracasei* subsp. *paracasei* و *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* بلغت 40 ، 60 ، 50 و 33.3 % على التوالي واما بقية الانواع البكتيرية قيد الدراسة اظهرت تأثرها بنسبة 100 % وهذا يشير الى ان القدرة التثبيطية للمستخلص الكحولي لقشرة ثمار الرمان ترتفع بزيارة التركيز المستخدم ، توضح الصورة 1 القدرة التثبيطية للتراكيز المختلفة من المستخلص الكحولي لقشرة الرمان تجاه البكتريا *L. plantarum*.

الجدول (3) : العدد والنسب لبعض الانواع التابعة لجنس *Lactobacillus* المتأثرة بالفعالية التثبيطية للمستخلص الكحولي لقشرة ثمار الرمان.

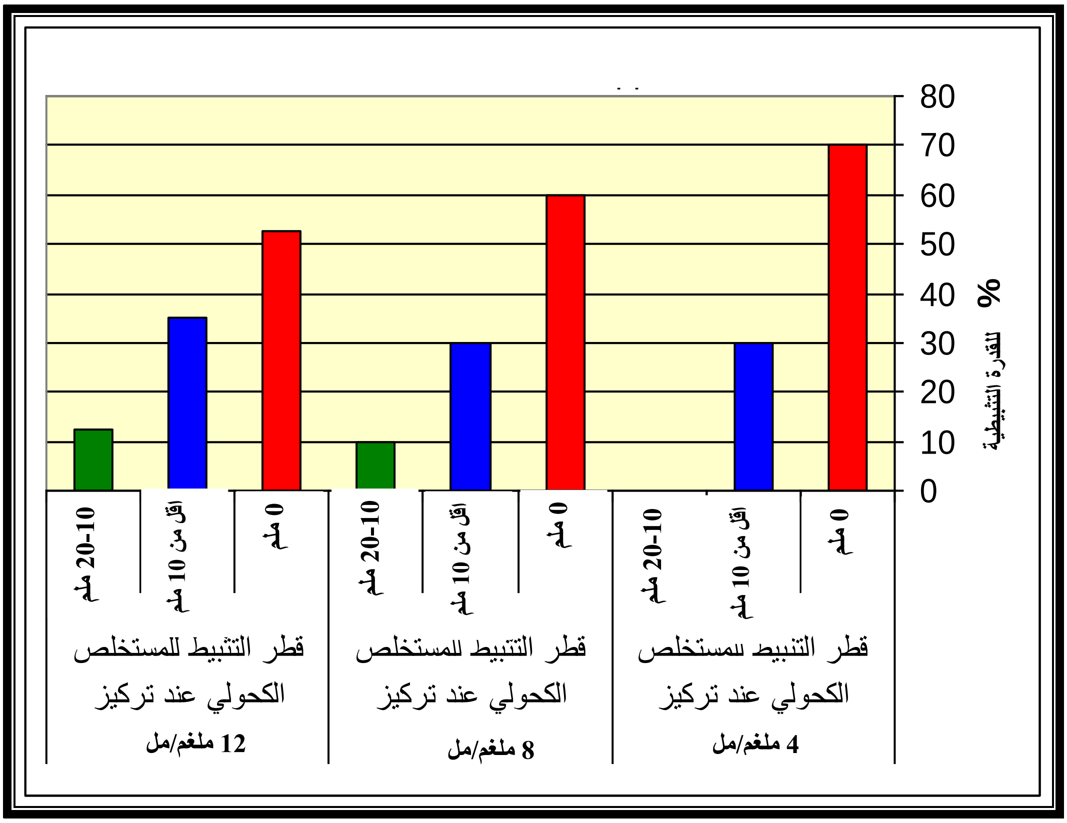
نوع البكتريا	قطر التثبيط للمستخلص الكحولي عند تركيز 4 ملغم/مل			قطر التثبيط للمستخلص الكحولي عند تركيز 8 ملغم/مل			قطر التثبيط للمستخلص الكحولي عند تركيز 12 ملغم/مل		
	0	اقل من 10 ملم	10–20 ملم	0	اقل من 10 ملم	10–20 ملم	0	اقل من 10 ملم	10–20 ملم
L. acidophilus	5 (%100)	0	0	5 (%100)	0	0	5 (%100)	0	0
L. casei subsp. *Casei*	2 (%66.7)	1 (%33.3)	0	1 (%33.3)	2 (%66.7)	0	0	3 (%100)	0
L. pentosus	2 (%100)	0	0	2 (%100)	0	0	2 (%100)	0	0
L. reuteri	3 (%100)	0	0	3 (%100)	0	0	3 (%100)	0	0
L. ruminis	0	3 (%100)	0	0	3 (%100)	0	0	3 (%100)	0
L. fermentum	3 (%60)	2 (%40)	0	3 (%60)	1 (%20)	1 (%20)	2 (%40)	2 (%40)	1 (%20)
L. gasseri	3 (%100)	0	0	3 (%100)	0	0	3 (%100)	0	
L. helveticus	0	1 (%100)	0	0	1 (%100)	0	0	0	1 (%100)
L. plantarum	4 (%80)	1 (%20)	0	3 (%60)	0	2 (%40)	3 (%60)	0	2 (%40)
L. paracasei subsp. *Paracasei*	3 (%75)	1 (%25)	0	2 (%50)	2 (%50)	0	2 (%50)	2 (%50)	0
L. salivarius	0	2 (%100)	0	0	1 (%50)	1 (%50)	0	1 (%50)	1 (%50)
L. casei subsp. *Rhamnosus*	2 (%66.7)	1 (%33.3)	0	2 (%66.7)	1 (%33.3)	0	1 (%33.3)	2 (%66.7)	0
L. johnsonii	1 (%100)	0	0	0	1 (%100)	0	0	1 (%100)	0

ذكرت دراسة مقدمة من قبل Puupponen-Pimia وآخرون [17] إن مستخلصات ثمار الرمان لاتمتلك قدرة تثبيطية تجاه البكتريا العلاجية المتواجدة كفلورا معوية وبخاصة العصيات اللبنية *Lactobacilli* وإنما يكون التأثير على هذه البكتريا من خلال تكوين معقدات بين التانينات (احد مكونات ثمار الرمان) وبين العناصر الغذائية الموجودة في البيئة التي تعيش بها

وبخاصة البروتينات والكاربوهيدرات والايونات المعدنية Fe و Cu مما يؤدي بالنتيجة الى قلة توفر تلك المغذيات للخلايا البكتيرية والذي يؤثر سلباً على العديد من الفعاليات الحيوية البكتيرية.

الصورة (1) : القدرة التثبيطية للتراكيز المختلفة من المستخلص الكحولي لقشرة الرمان تجاه البكتريا *Lactobacillus plantarum*.

يوضح الشكل 1 وعند التركيز 4 ملغم/مل من المستخلص الكحولي لقشرة ثمار الرمان أن هنالك 28 عزلة تابعة للعصيات اللبنية وبنسبة 70 % لم تتأثر بالقدرة التثبيطية للمستخلص وأما بقية العزلات والمتمثلة بنسبة 30 % تأثرت وبلغ قطر التثبيط اقل من 10 ملم وبزيادة تركيز المستخلص الكحولي نلاحظ ارتفاع عدد ونسب العزلات المتأثرة فعند تركيز 8 ملغم/مل فان عدد ونسب العزلات لبكتريا *Lactobacillus* spp. التي لم تتأثر بالقدرة التثبيطية للمستخلص انخفضت إلى 24 عزلة بنسبة 60 % وأما عند تركيز 12 ملغم/مل أصبحت 21 عزلة بنسبة 52.5 % ويتضح من خلال هذه النتائج إن قشرة ثمار الرمان لها تأثير تثبيطي قليل تجاه البكتريا المفيدة المتمثلة بـ *Lactobacillus* spp.، أشارت دراسة قام بها Parvez وآخرون [18] إلى أن بكتريا *Bifidobacterium* spp. و *Lactobacillus* spp. لها تأثيرات نافعة للإنسان واستخدمت في النواحي العلاجية لعلاج العديد من الحالات المرضية.



الشكل (1) : النسب المؤية للقدرة التثبيطية للتراكيز المختلفة من المستخلص الكحولي لقشرة ثمار الرمان تجاه العصيات اللبنية.

إن نتائج الدراسة الحالية تكون قريبة من دراسة Bialonska واخرون [10] التي أشارت إلى الفعل التثبيطي القليل لمواد التي يحتويها الرمان تجاه البكتريا النافعة *Lactobacillus* spp. و *Bifidobacterium* spp. المعزولة من القناة الهضمية للإنسان.

– **البكتريا *Clostridium* spp. :**

بينت نتائج الدراسة الحالية عزل وتأكيد تشخيص 30 عزلة موزعة إلى 9 أنواع بكتيرية تابعة لجنس *Clostridium* إذ أوضحت نتائج الفحص المجهري باستخدام الصبغات أنها عصيات موجبة لصبغة كرام ومكونة للسبورات ويكون موقع السبور في نهاية الخلية البكتيرية للأنواع *C. difficile* ، *C. cadaveris* ، *C. ramosum* ، *C. tertium* بينما بقية الأنواع البكتيرية يكون موقع السبور Subterminal وأما نتائج الاختبارات الكيموحيوية بما فيها التفاعلات على الوسط الزرعي Egg Yolk agar فموضحة بالجدول 4 [19 ، 13].

الجدول (4) : نتائج الاختبارات الكيموحيوية المستخدمة في تشخيص بكتريا *Clostridium* في الدراسة الحالية.

نوع البكتريا / نوع الاختبار		*Clostridium butyricum*	*Clostridium difficile*	*Clostridium cadaveris*	*Clostridium septicum*	*Clostridium ramosum*	*Clostridium histolyticum*	*Clostridium tertium*	*Clostridium perfringes*	*Clostridium clostridiiforme*
الحركة		+	−	+	+	−	+	+	−	−
الاندول		−	−	+	−	−	−	−	−	−
اختزال النترات		−	−	−	+	−	−	+	+	−
تحلل الاسكولين		+	+	−	+	+	−	+	−	+
تحلل الجيلاتين		−	−	+	+	−	+	−	+	−
تحلل الكاسين		−	−	−	−	−	+	−	−	−
تخمر السكريات	**الكلوكوز**	+	+	+	+	+	−	+	+	+
	المانيتول	−	+	−	−	+	−	+	−	−
	اللاكتوز	+	−	−	+	+	−	+	+	+
التفاعلات على وسط Egg yolk	**الليكثينيز**	−	−	−	−	−	−	−	+	−
	اللايبيز	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	تحلل البروتين	−	−	−	−	−	−	−	−	−

(+) : نتيجة الاختبار ايجابية.

(−) : نتيجة الاختبار سلبية.

يوضح الجدول 5 عدد ونسب العزلات لبكتريا *Clostridium* اذ بلغت اعلى نسبة عزل 23.3 % لبكتريا *C. butyricum* واقل نسبة عزل بلغت 3.3 % لبكتريا *C. difficile* واما لبقية الانواع البكتيرية تراوحت النسب مابين 6.7 – 16.7 % ، تعد بكتريا *Clostridium* spp. جزءاً من خليط الفلورا الجرثومية المتواجدة في القناة الهضمية للانسان والحيوان وعزلت من البراز ومسحات المستقيم وخزعات الامعاء وتشكل معظم الانواع البكتيرية التابعة لها اضراراً على صحة المضيف وذلك لكونها انتهازية الاصابة [20].

الجدول (5) : نوع وعدد ونسب العزلات التابعة لجنس *Clostridium* المعزولة في الدراسة الحالية.

النسبة المؤية %	عدد العزلات	نوع العزلة
23.3	7	*Clostridium butyricum*
3.3	1	*Clostridium difficile*
13.3	4	*Clostridium cadaveris*
10	3	*Clostridium septicum*
16.7	5	*Clostridium ramosum*
6.7	2	*Clostridium histolyticum*
13.3	4	*Clostridium tertium*
6.7	2	*Clostridium perfringes*
6.7	2	*Clostridium clostridiiforme*
%100	30	**المجموع**

اظهرت النتائج في الجدول 6 ان المستخلص الكحولي لقشرة ثمار الرمان يمتلك قدرة تثبيطية تجاه الانواع البكتيرية التابعة لجنس *Clostridium* والمتواجدة كفلورا معوية في الانسان باستثناء النوع البكتيري *C. butyricum* الذي لم يتأثر بجميع التراكيز المستخدمة للمستخلص النباتي والسبب قد يعود الى دور قشور ثمار الرمان في تحفيز نموالبكتريا العلاجية (البكتريا التي لها تأثيرات ايجابية على صحة الكائن الحي المضيف وتتواجد في القناة الهضمية للانسان وايضاً تتواجد في المنتجات التخمرية) والذي يكون هذا النوع من ضمنها [20].

بينت نتائج الجدول 6 وعند استخدام مستخلص قشور ثمار الرمان وبتركيز 4 ملغم/مل ان العزلات الخمسة لبكتريا *C. ramosum* لم تتأثر بالقدرة التثبيطية لذلك المستخلص في حين تأثرت عزلات بكتريا *C. cadaveris* و *C. septicum* وبنسب 50 ، 33.3 % على التوالي. اما عند التركيز 8 و12 ملغم/مل لمستخلص قشور الرمان اظهر فقط النوع البكتيري *C. ramosum* عدم تأثره بالقدرة التثبيطية للمستخلص النباتي بنسبة 40 % بينما الانواع الاخرى البكتيرية تأثرت بنسبة 100% ، توضح الصورة 2 القدرة التثبيطية للتراكيز المختلفة من المستخلص الكحولي لقشرة ثمار الرمان تجاه البكتريا *C. ramosum*.

إن القدرة التثبيطية لقشرة ثمار الرمان قد يعود سببها إلى احتوائها على التانينات والمركبات الفينولية المتعددة ، إذا تعمل التانينات على تكوين معقدات مع البروتينات الموجودة في الجدار الخلوي البكتيري وبذلك تقلل من نفاذية الجدار للمواد التي تحتاجها البكتريا من البيئة الخارجية وفضلاً عن ذلك فان التانينات تعمل على التقليل من ضخ الايونات المعدنية من خارج البكتريا باتجاه الداخل نتيجة لتكوين معقدات أيونية معدنية ثابتة خارج الخلايا البكتيرية مما يؤثر على فعالية العديد من الأنزيمات ، بينما يكون عمل المركبات الفينولية عن طريق تخفيض تركيز

الأس الهيدروجيني وتثبيط عمل العديد من الأنزيمات البكتيرية من خلال عملها كعوامل أكسدة [22].

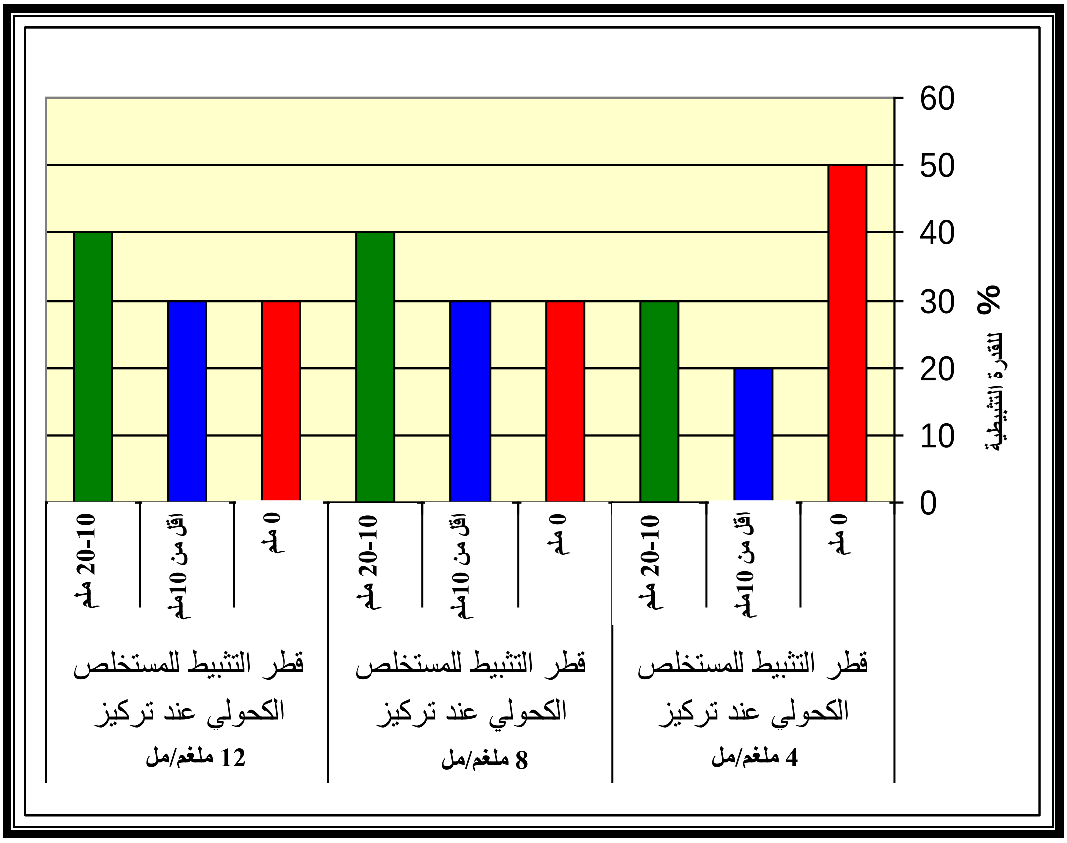
الصورة (2) : القدرة التثبيطية للتراكيز المختلفة من المستخلص الكحولي لقشرة ثمار الرمان تجاه البكتريا المرضية *Clostridium ramosum*.

الجدول (6) : العدد والنسب لبعض الأنواع التابعة لجنس *Clostridium* والمتأثرة بالفعالية التثبيطية للمستخلص الكحولي لقشرة ثمار الرمان.

نوع البكتريا	قطر التثبيط للمستخلص الكحولي عند تركيز 4 ملغم/مل			قطر التثبيط للمستخلص الكحولي عند تركيز 8 ملغم/مل			قطر التثبيط للمستخلص الكحولي عند تركيز 12 ملغم/مل		
	0	اقل من 10 ملم	10-20 ملم	0	اقل من 10 ملم	10-20 ملم	0	اقل من 10 ملم	10-20 ملم
C. butyricum	7 (%100)	0	0	7 (%100)	0	0	7 (%100)	0	0
C. difficile	0	0	1 (%100)	0	0	1 (%100)	0	0	1 (%100)
C. cadaveris	2 (%50)	2 (%50)	0	0	4 (%100)	0	0	4 (%100)	0
C. septicum	1 (%33.3)	0	2 (%66.7)	0	1 (%33.3)	2 (%66.7)	0	1 (%33.3)	2 (%66.7)
C. ramosum	5 (%100)	0	0	2 (%40)	1 (%20)	2 (%40)	2 (%40)	1 (%20)	2 (%40)
C. histolyticum	0	0	2 (%100)	0	0	2 (%100)	0	0	2 (%100)
C. tertium	0	1 (%25)	3 (%75)	0	1 (%25)	3 (%75)	0	1 (%25)	3 (%75)
C. perfringes	0	1 (%50)	1 (%50)	0	0	2 (%100)	0	0	2 (%100)
C. clostridiiforme	0	2 (%100)	0	0	2 (%100)	0	0	2 (%100)	0

يوضح الشكل 2 تأثير المستخلص الكحولي لقشرة ثمار الرمان تجاه بكتريا *Clostridium* spp. اذ نلاحظ أن عدد ونسب العزلات التابعة لهذه البكتريا والتي لم تظهر أي تأثر تجاه المستخلص الكحولي تكون 15 (50%) و9 (30%) و9 (30%) عند التراكيز 4 ، 8 و12 ملغم/مل لمستخلص قشرة الرمان، على التوالي. أما فيما يخص القدرة التثبيطية للمستخلص الكحولي للرمان نلاحظ أن قطر حلقة التثبيط عند تركيز 4 ملغم/مل لـ 6 عزلات بنسبة 20 % كانت اقل من 10 ملم ولـ 9 عزلات بنسبة 30 % كانت مابين 10-20 ملم وأما عند تراكيز 8 ، 12 ملغم/مل بلغ قطر حلقة التثبيط لـ 9 عزلات بنسبة 30 % اقل من 10 ملم بينما بلغ القطر لـ 12 عزلة بنسبة 40 % مابين 10-20 ملم عند نفس التراكيز للمستخلص الكحولي ونستنتج من ذلك أن المستخلص النباتي لثمرة الرمان له تأثير قوي على البكتريا *Clostridium* spp. وسبب ذلك قد يعود إلى احتواء المستخلص على 3-O-methylgallic acid و Gallic acid التي تمتاز بان لها تأثير تثبيطي قوي تجاه بكتريا *Clostridium* spp. [23] ، وان نتائج الدراسة الحالية تكون مقاربة للنتائج التي حصل عليها Puupponen-Pimia وآخرون [12] إذ أوضحت دراستهم ان قشور ثمار الرمان يمتلك فعالية مثبطة تجاه البكتريا المرضية المعوية

Salmonella enterica ، *E. coli* ، *S. aureus* وبالنتيجة سيقلل من مخاطر الأمراض المعوية بينما لايؤثر على البكتريا النافعة *Lactobacillus* spp. المتواجدة في القناة الهضمية.



الشكل (2) : النسب المؤية للقدرة التثبيطية للتراكيز المختلفة من المستخلص الكحولي لقشرة ثمار الرمان تجاه بكتريا *Clostridium*.

المصادر

1. Adams, L.S. ; Seeram, N.P. ; Aggarwal, B.B. ; Takada, Y. ; Sand, D. and D. Heber, J. Agric. Food Chem. 54: 980–985 (2006).
2. Adhami, V.M. and Mukhtar, H., Free Radic Res. Oct; 40(10):1095-104 (2006).
3. Endo, E.H. ; Ueda-Nakamura, T. ; Nakamura, C.V. and B.P.D. Filho, Molecules, 17: 10094- 10107 (2012).
4. Yehia, H.M. ; Elkhadragy, M.F. and A.E. Abdul Moneim, Afr. J. Microbiol. Res., 4(22): 3664-3668 (2011).
5. Machado, T.B. ; Leal, I.C.R. ; Amaral, A.C.F. ; Santos, K.R.N. ; Silva, M.G. and R.M. Kuster, J. Braz. Chem. Soc., 13: 606–610 (2002).
6. Abdollahzadeh, Sh. ; Mashouf, R.Y. ; Mortazavi, H. ; Moghaddam, M.H. ; Roozbahani, N. and M. Vahedi, J. Dent. Uni. Med. Sci., 8(1): 1-6 (2010).

7. Gohari, A.R. ; Saeidnia, S. ; Mollazadeh Moghaddam, K. ; Yassa, N. ; Malmir, M. and A.R. Shahverdi, DARU, 18(1): 69-73 (2010).
8. Naz, S. ; Siddiqi, R. ; Ahmad, S. ; Rasool, S.A. and S.A. Sayeed, J. Food Sci., 72(9): 341-346 (2007).
9. Gibson G.R. and Roberfroid M.B., J. Nutr. 125: 1401-1412 (1995).
10. Bialonska, D. ; Kasimsetty, S.G. ; Schrader, K.K. and D. Ferreira, J. Agric. Food Chem., 57:8344–8349 (2009).
11. Goel, G. ; Puniya, A.K. ; Aguilar, C.N. and K. Singh, Naturwissenschaften, 92: 497-503 (2005).
12. Puupponen-Pimia, R. ; Nohynek, L. ; Alakomi, H.L. and K.M. Oksman-Caldentey, Appl. Microbiol. Biotechnol., 67: 8–18 (2005).
13. Starr, M.P. ; Stolp, H. ; Truper, H.G. ; Balows, A. and H.G. Schlegel, The Prokaryotes. A Handbook on Habitats, Isolation, and Identification of Bacteria. Two volumes, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Germany (1981).
14. Sadeghian, A. ; Ghorbani, A. ; Mohamadi-Nejad, A. and H. Rakhshandeh, AJP, 1(2):67-73 (2011).
15. Sharpe, M.E., Identification of the lactic acid bacteria. In: Identification Methods for Microbiologists. In: Skinner, F.A. (Eds). pp. 233-259. London: Academic press, UK (1979).
16. Tancrede, C., Eur J Clin. Microbiol. Infect. Dis., 11(11):1012-1015 (1992).
17. Puupponen-Pimia, R. ; Nohynek, L. ; Meier, C. ; Kahkonen, M. ; Heinonen, M. ; Hopia, A. and K.M. Oksman-Caldentey, J. Appl. Microbiol., 90, 494–507 (2001).
18. Parvez, S. ; Malik, K.A. ; Ah Kang, S. and H.Y. Kim, J. Appl. Microbiol., 100: 1171–1185 (2006).
19. Murray, P.R. ; Baron, E.J. ; Jorgensen, J.H. ; Louise, M.R. and M.A. Pfaller, Manual of Clinical Microbiology, 9th ed. American Society for Microbiology, Washington D.C. USA (2007).
20. Fanaro, S. ; Chierici, R. ; Guerrini, P. and V. Vigi, Acta. Paediatr suppl., 441: 48-55 (2003).
21. Puupponen-Pimia, R. ; Nohynek, L. ; Hartmann-Schmidlin, S. ; Kahkonen, M. ; Heinonen, M. ; Maatta-Riihinen, K. and K.M. Oksman- Caldentey, J. Appl. Microbiol., 98, 991–1000 (2005).
22. Vasconcelos L.C. ; Sampaio, M.C. ; Sampaio. F.C. and J.S. Higino, Mycoses, 46:(5-6):192-6 (2003).
23. Lee, H.C. ; Jenner, A.M. ; Low, C.S. and Y.K. Lee, Res. Microbiol., 157: 876–884 (2006).