التأثير المضاد للمستخلصات المعزولة من بذور نبات الحلبة *Trigonella graecum foenum* وبكتريا *Sinorhizobium meliloti* و *Escherichia coli* القياسية على نمو ثلاثة أنواع من البكتريا المرضية

اريان محمد حامد

قسم علوم الحياة / كلية التربية

جامعة الموصل

الاستلام **القبول**

2012 / 03 / 28 **2012 / 06 / 06**

Abstract

The present study investigates the inhibitory effect of the oil extracted from *Trigonella foenum-graecum* seeds and Exopolysaccharides (EPS) which is isolated from the symbiotic bacteria, namely, *Sinorhizobium meliloti* and the standard bacteria, *i.e. Escherichia coli*. The study conducted by utilizing an unified concentration of 200 mg/ml in the growing of three types of pathogenic bacteria which are *Escherichia coli and Proteus miribilis* and *Staphylococcus aureus*.

The results of the study show that there is a sort of matching between the oil extracted from *Trigonella foenum-graecum* seeds and the extract Exopolysaccharides (both types) with the utilized standard samples by means of the TLC technique. Similarly, the study testified the chemical structure of these three extracts by using the spectrum infrared rays. It has been shown that the oil extracted from *Trigonella foenum-graecum* seeds consists of the group O=C-OH and the group C=H aromatic and alkyl. Similarly it also contains the group of acids, aster and thin aromatic. Whereas EPS (with both types) consists of alcohol OH and the carboxyl group C-OH and CH aliphatic in addition to aster and ether compounds and the two groups of carbonyl C=O that belong to Glucuronic and Pyruvate acids. All these compounds had a lethal effect on the growth of bacteria.

The results also show the biological activity of the above mentioned extracts. The first, Exopolysaccharides (EPS) *that* is extracted from the bacteria *Sinorhizobium meliloti,* comes in the first position with antimicrobial activity on the growth of the pathogenic bacteria *Proteus miribilis*. Secondly, comes EPS isolated from the bacteria *Escherichia coli*, then comes the oil extracted from *Trigonella foenum-graecum* seeds especially on the growth of *Proteus miribilis* and *Staphylococcus aureus*. These results were registered with a significant value estimated to 0.0627 and 0.2453 respectively compared with a comparative sample at significant degree ($p \leq 0.05$).Whereas the bacteria *Escherichia coli* showed a weak sensitivity against the third extract compared with the first and second extracts.

الخلاصة:

تضمنت الدراسة التأثير التثبيطي للزيت المستخلص من بذور نبات الحلبة *Trigonella foenum-graecum* وعديد السكريات الخارجي Exopolysaccharides (EPS) المستخلص من كل من البكتريا التعايشية *Sinorhizobium meliloti* والبكتريا القياسية *Escherichia coli* باستخدام تركيز واحد 200 ملغم/ مل ، في نمو ثلاثة أنواع من البكتيريا المرضية *Escherichia coli* و *Proteus miribilis* و *Staphylococcus aureus* .

أشارت الدراسة إلى تطابق نتائج الزيت المستخلص من بذور نبات الحلبة والمركب EPS المستخلص وبنوعيه مع العينات القياسية المستخدمة باستخدام تقنية TLC. بالإضافة الى الكشف عن التركيب الكيمياوي لهذه المستخلصات الثلاثة باستخدام طيف الأشعة تحت الحمراء IR وتبين ان الزيت المستخلص من بذور نبات الحلبة يحتوي على مجموعة O=C- OH ومجموعة C=H مط ارواماتي و مط الاكيل ومجموعة الحامض و الاستر بالإضافة إلى ثني الارواماتي. اما EPS وبنوعيه فانه يحتوي على مجموعة الكحول OH ومجموعة الكاربوكسيل C-OH ومجموعة CH الالفاتية ومركبات الاستر والايثر ومجموعتين الكاربونيل C=O العائدة الى كل من الحامض الكلوكيورونيك Glucuronic acid وحامض البايروفيت Pyruvate acid وكان لهذه المركبات تأثير قاتل على نمو البكتريا.

كما وأظهرت النتائج الفعالية البايولوجية للمستخلصات المذكورة أنفا اذ ان المستخلص الأول Exopolysaccharides (EPS) المعزول من البكتريا *Sinorhizobium meliloti* كان من أفضل المستخلصات المستخدمة في تأثيره كمضاد مايكروبي على نمو البكتريا المرضية *Proteus miribilis*، يليه الثاني EPS المعزول من *Escherichia coli* ثم الزيت المستخلص من بذور نبات الحلبة لا سيما على نمو كل من البكتريا*Proteus miribilis* و

Staphylococcus aureus بدلالة القيمة المعنوية التي بلغت 0.0627 و0.2453 على التعاقب قياسا بعينة المقارنة عند مستوى ($p \leq 0.05$). في حين أبدت البكتريا *Escherichia coli* حساسية ضعيفة للمستخلص الثالث مقارنة بالمستخلص الأول والثاني.

المقدمة:

أشارت دراسات عديدة أن النباتات الطبية غنية بالمكونات الفعالة حيويا مثل القلويدات والصابونيات والزيوت الطيارة والفينولات والعفصيات والفلافونويدات والكلايكوسيدات وغيرها ذات الفعالية المضادة للأحياء المجهرية (1). ومن هذه النباتات، نبات الحلبة: وهو من ذوات الفلقتين وينتمي إلى تحت العائلة الفراشية Papilionaceae العائدة إلى العائلة البقولية Leguminaceae (2). والمكونات الرئيسية لنبات الحلبة هي الأليياف والفلافونويدات Flavonoids وعديد السكريات Polysaccharides والسابونين Saponins والزيوت الثابتة Fixed oils وبعض القلويدات مثل الترايكونيلين Trigonelline والكولين Choline(4,3) والمتواجد في زيت الحلبة والذي يعزى إليه غالبا المفعول الطبي لهذا النبات (5). اما بذور هذا النبات فغنية بالأحماض الأمينية والحوامض الدهنية والفيتامينات والسابونين Saponins وكذلك تحتوي على كمية كبيرة من حامض الفوليك Folic acid بنسبة 84mg/100g، بالإضافة إلى مكونات أخرى مثل,Gitogenin, Disopenin, Neogitogenin, Homorientin Saponaretin, Neogigogenin, Trigogenin, (7,6).

تعد بكتريا *Sinorhizobium meliloti* أحد أفراد عائلة Rhizobiaceae المستوطنة للتربة والتي تمتاز بكونها بكتريا عصوية سالبة لصبغة كرام لها القدرة على تكوين العقد الجذرية المثبتة للنتروجين الجوي على جذور مجموعة من النباتات البقولية هي:الجت *Medicago sativa* والحلبة *Trigonella foenum graecum* والبرسيم الحلو *Melilotus* (8), وعلى إنتاج نوعين من مركب عديد السكريات الخارجي Exopolysaccharides هما:EPSI Succinoglycan الحامضي وEPSII Galactoglucan (9).

اما العائلة المعوية Enterobacteriaceae التي تستوطن افرادها القناة الهضمية للإنسان والحيوانات فتتضمن عدة أجناس مرضية من أهمها *Escherichia* و *Proteus* و *Shigella* و *Klebsiella* و *Salmonella* (10،11). تعتبر *Escherichia coli* من السلالات الممرضة التي تسبب التهاب المجاري البولية والتهاب السحايا الولادي فضلا عن التهاب الغشاء الداخلي للبطن وتلف الأنسجة والتهاب الثدي والالتهاب الرئوي(12). وتم اكتشاف عدة أنواع من عديد السكريات الخارجي في هذه البكتريا ومن ضمنها النوع, الشائع المميز Serotype–specific lipopolysaccharide (LPS) O-antigen وColanic acid

وCapsular K-antigen ومكونات أخرى منها bacterial cellulose glucan –β – (1-4) و (PGA) polymer β-N-acetylglucosamine– (1-6) التي تشارك في تكوين الارتباطات الخلوية للأغشية الحياتية (13،14،15). اما بكتريا *Proteus mirabilis* فتسبب التهابات المجاري البولية (Urinary Tract Infection (UTI، والمثانة والكلية (16).

في حين تستعمر جرثومة المكورات العنقودية *Staphylococcus aureus* التي تعود إلى عائلة Staphylococcaceae (17،18), جلد الإنسان خاصة في المنطقة الحوضية والمستقيم (19) وكذلك تستعمر منطقة البلعوم والأمعاء والقناة التناسلية (21،20)، وتسبب تكوين الدمامل والخراجات, بالإضافة إلى إصابات ذات الرئة والتهاب الثدي والتهاب أغشية الدماغ (السحايا) ونخاع العظام, كما وتسبب التسمم الغذائي بإفراز Enterotoxins إلى الغذاء الملوث بها (22).

ان الصراع مستمر بين البكتريا التي تطور مقاومتها لمضادات الحيوية باستمرار والباحثين الذين يعملون جاهدين لإيجاد مضادات فعالة جديدة، لان اي مضاد تم ادخاله للاستعمال الطبي ظهرت له مقاومة خلال 10−15سنة وأحياناً اقل من ذلك. من جانب اخر فان المستوى البطئ لإنتاج وتطوير مضادات جديدة مقارنة مع التطور السريع لمقاومة البكتريا لمضادات الحيوية يمكن ان يقود إلى عصر ما بعد مضادات الحيوية(Post antibiotic era) مما يعطي نظرة متشائمة. من الأمثلة على التطور السريع لمقاومة البكتريا للمضادات ما يلاحظ مع بكتريا *Streptococcus pyogenes* التي تمكنت من تطوير مقاومة لمضادي البنسلين والارثرومايسين، وبكتريا *Staphylococcus aureus* التي طورت مقاومة واسعة لمعظم المضادات الحديثة (23).

لذلك تهدف الدراسة الحالية الى التعرف على التأثير المضاد لكل من زيت بذور نبات الحلبة و عديد السكريات الخارجي (EPS) المعزول من كل من البكتريا *S.meliloti* والبكتريا *E.coli* على نمو ثلاثة أنواع من البكتريا المرضية.

المواد وطرائق العمل:

البكتريا المستخدمة:

استخدمت بكتريا التربة التعايشية *Sinorhizobium meliloti* المعزولة من العقد الجذرية المتكونة حقليا على نبات الجت والبكتريا القياسية *Escherichia coli* السلالة *JM83* التي تم الحصول عليها من الدكتور خالد دحام احمد/ قسم علوم الحياة/ كلية التربية، بالإضافة إلى ثلاث أنواع من البكتريا المرضية وهي *Escherichia coli* و*Proteus mirabilis* و

Staphylococcus aureus المعزولة من أخماج جروح عدوى المستشفيات والمشخصة في كلية التربية / قسم علوم الحياة/ وحدة البحوث.

2. النبات:

استخدمت بذور نبات الحلبة *Trigonella foenum-graecum* L. التي تم الحصول عليها من الأسواق المحلية.

3. تحضير المستخلص النباتي:

تم استخلاص الزيت من بذور نبات الحلبة *Trigonella foenum-graecum* باستخدام جهاز الاستخلاص المستمر Soxhlet، وذلك باخذ وزن معين من هذه البذور المطحونة وذلك بعد تجفيفها عند درجة 40 م ثم توضع داخل ثمبل Thumble مثبت بجهاز الاستخلاص ويكون متصلاً بدورق زجاجي حاوٍ على المادة المذيبة والمتمثلة بالأثير البترولي ومع مكثف لتبريد الجهاز، وتكرر عملية الاستخلاص بمعدل 10 مرات ثم تبخر المادة المذيبة باستخدام جهاز المبخر الدوار Rotary vaccume evaporoator وبدرجة 40 م ليبقى الزيت فقط ويتم حفظه في قنينة نظيفة لحين استخدامه، وتحسب نسبته وذلك بتطبيق القانون الآتي:

$$\text{نسبة الزيت} = \frac{\text{وزن الدورق مع العينة} - \text{وزن الدورق وهو فارغ}}{\text{وزن العينة الأصلية}} \times 100$$ ، (24).

4. فصل الأحماض الدهنية Fatty acid separation:

اعتمدت طريقة Kaufmann & Makus (1960) وHarborne (1973)،(25،26) في فصل الأحماض الدهنية Fatty acids من زيت بذور نبات الحلبة وذلك باستخدام تقنية كروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) Thin Layer Chromatography وبأبعاد 20 × 20ملم وسمك 0.025 ملم وبحسب الخطوات الآتية:

تم وضع 2غم من KOH في دورق زجاجي وأضيف لها مزيج من (الميثانول والماء) بنسبة 2:3, حجم/حجم، ثم أضيف إلى الزيت ووضع في دورق زجاجي يحتوي على ماء وعلى مصدر حراري ولمدة 90 دقيقة، وتستمر الإضافة إلى أن يتم الحصول على مزيج قاعدي لا يقل عن pH = 9 وذلك باستخدام جهاز pH-meter. ثم أضيف لهذا المزيج 10-15 مل من الأيثر ووضعت معاً في قمع الفصل ورجت جيداً ثم تركت لحين اكتمال عملية الفصل، لحين الحصول على طبقتين، الطبقة العليا تمثل الأحماض التي لم يحصل فيها تحلل Unsapoifiable، وأما الطبقة السفلى التي هي عبارة عن ملح الحامض وضعت في بيكر

وأضيف لها حامض H_2SO_4 المخفف، إلى أن تم الحصول على pH=2 ، ثم وضع المزيج في قمع الفصل مع الرج، وترك فيه لحين الحصول على طبقتين تمثل الطبقة العليا الأحماض الدهنية التي سيتم الكشف عنها.

5. الكشف عن الأحماض الدهنية المفصولة:

تم تشرب لوحة TLC وذلك بغمرها في مزيج مكون من : 5مل من زيت البارافين و 95مل من الأيثر البترولي وتركت فيه لمدة ساعة واحدة، ثم رفعت وتركت لمدة 24 ساعة لتجف بدرجة حرارة المختبر.

ثم عمل run بوضع قطرة من الحامض الدهني المفصول على خط البداية الموجود على لوحة TLC، التي وضعت في جار Tank يحتوي على مزيج متكون من (ميثانول: بنزين: ماء) بنسبة 7: 2: 1, حجم/حجم/حجم، وعند صعود المزيج لمسافة 13سم تقريباً رفعت اللوحة من الجار وجففت بعد1−2 ساعة بدرجة حرارة المختبر، وبعدها غمرت لوحة TLC في 15 مل من محلول (الأمونيا NH_4OH : الإيثانول) بنسبة 5 : 95 لمدة 5 دقائق ثم غسلت بالماء المقطر وبعد تمام جفافها تم تحديد مواقع البقع المنفصلة للأحماض الدهنية ومقارنتها مع بقع الأحماض الدهنية القياسية (Stearic acid, Palmatic acid, Oleic acid) عن طريق تسليط الأشعة فوق البنفسجية U.V. عليها (26).

6. استخلاص عديد السكريات الخارجي (EPS) Exopolysaccharides :

اعتمدت طريقة Ervin and Hubbell (1985)، (27) في عزل EPS من كل من البكتريا التعايشية *S. meliloti* وبكتريا *E. coli*.

7. تحديد نوعية الوحدات السكرية لعديد السكريات الخارجي Exopolysaccharides:

تم تحديد نوعية الوحدات السكرية لـEPS المستخلص من كل من البكتريا *S.meliloti* والبكتريا *E.coli* ومقارنتها مع السكريات القياسية (N-acetylglucosamin، كلوكوز، فركتوز، كالاكتوز) وحسب الطريقة الموصوفة من قبل Amemuraواخرون (1985), (28).

8. قياس سرعة الجريان Rate of flow (Rf):

اعتمدت تقنية كروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) لقياس سرعة جريان الأحماض الدهنية وعديد السكريات الخارجي EPS وبنوعيه ومقارنتها مع سرعة الجريان للعينات القياسية، حسب الطريقة المذكورة من قبل Mikes (1979)، (29)، وباستخدام المعادلة الآتية.

$$\text{المسافة التي قطعتها العينة (النموذج)} \quad .$$

سرعة الجريان (Rf) = المسافة التي قطعها المذيب

9. تشخيص المجاميع الوظيفية باستخدام تقنية طيف الأشعة تحت الحمراء (Infrared (IR:

تم تشخيص الوحدات السكرية لعديد السكريات الخارجي EPS المستخلص من البكتريا *S. meliloti* وبكتريا *E. coli* والأحماض الدهنية التي تعود إلى الزيت المستخلص من بذور نبات الحلبة باستخدام طيف الأشعة تحت الحمراء IR وباستخدام جهاز Infrared Spectrophotometer موديل Model Tensor 27 Bruker Co, Germany.

10. الفعالية البايولوجية للمستخلصات:

10_1. تحضير محلول ماكفرلاند (أنبوبة رقم 0.5) Macfrland Solution:

ويتكون من

محلول (A):

وذلك بإذابة 1.175غم من كلوريد الباريوم $BaCl_2$ في 100مل من الماء المقطر.

محلول (B):

تم بإضافة 1 مل من حامض الكبريتيك المركز H_2SO_4 إلى 100 مل من الماء المقطر. سحب 0.5 مل من محلول A واضيف إلى 9.95مل من محلول B، واستعمل للمقارنة في إعطاء عدد تقريبي للخلايا البكتيرية 1.5×10^8 خلية/مل عند إجراء فحص الحساسية تجاه المستخلصات المحضرة (30).

10_2. تحضير اللقاح البكتيري:

نقلت 1−2 مستعمرة من عزلات البكتيرية الثلاثة كل على حدة إلى أنابيب اختبار حاوية على 5 مل من وسط المرق المغذي Nuterient broth وحضنت عند درجة 37 ْم في الحاضنة الهزازة لمدة 24 ساعة. ثم خففت النماذج باستخدام المحلول الفسلجيNormal saline واستمرت عملية التخفيف إلى أن تم الحصول على معلق بكتيري يحتوي ما يقارب 1.5×10^8 خلية/مل بالمقارنة مع محلول ماكفرلاند أنبوبة رقم 0.5.

10_3. تحضير المستخلصات وتعقيمها:

تم إعداد المستخلصات المفصولة (الزيت من بذور نبات الحلبة و عديد السكريات الخارجي EPS من كل من بكتريا *S.meliloti* وبكتريا *E. coli*) وذلك بإذابة 1 غم من المستخلص EPS في 5 مل من الماء المقطر المعقم ,كما اخذ من الزيت 1 مل ووضع في 5 مل من مادة Dimethyl Sulfoxid (DMSO) للحصول على تركيز قياسي 200 ملغم/مل, وعقمت المستخلصات باستخدام المرشحات الغشائية Membrane filter 0.22µ لمنع مرور

الجراثيم من خلالها وحفظت النماذج في قناني معقمة بشكل محكم بدرجة 4ْ م لحين استخدامها (31).

10_4. اختبار الفعالية البايولوجية للمستخلصات:

أجري اختبار الفعالية الحيوية للمستخلصات المفصولة بإضافة 0.1 مل من كل مستخلص بشكل منفرد إلى أنابيب حاوية على 9.8 مل من المرق المغذي Nutritient broth بعدها لقحت بـ 0.1 مل من العالق البكتيري المحضر في الفقرة 10_2 والذي يحتوي على 10^8 خلية/سم^3 وبمعدل ثلاث مكررات من كل نوع، حضنت الأنابيب في درجة 37ْ م لمدة 18–24 ساعة، ثم قيست العكارة باستخدام جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer نوع (CE 1021 ، 1000SERIES CECIL,) وعند الطول الموجي 595 نانوميتر لتحديد مدى تأثير المستخلصات في نمو البكتريا بالمقارنة مع عينة السيطرة التي تشتمل على أنبوبتي سيطرة الأولى حاوية على مستخلص فقط بدون عالق بكتيري والثانية حاوية على العالق البكتيري بدون مستخلص(32).

التحليل الإحصائي:

حللت البيانات إحصائياً باستخدام طريقة التحليل الإحصائي SPSS وطريقة التباين ANOVA.

النتائج والمناقشة :

الكشف عن الأحماض الدهنية المفصولة من زيت بذور نبات الحلبة *Trigonella foenum graecum* L. – باستخدام تقنية الطبقة الرقيقة TLC:

أوضحت نتائج الجدول (1) أنه كان هناك تقارب بين سرعة جريان الزيت المستخلص من بذور الحلبة التي بلغت قيمته0.27 وسرعة جريان الحامض الدهني Oleic acid التي كانت 0.31 ونسبة قليلة من كل من الحامض الدهني Palmatic acid التي كانت سرعة الجريان له 0.40 و Stearic acid التي بلغت سرعة الجريان له 0.46 وكانت هذه النتائج مطابقة لما جاء به الباحث Wagh وآخرون (2007) الشكل (1)،(33).

الجدول (1): قياس سرعة الجريان (Rf) للأحماض الدهنية المفصولة من زيت بذور نبات الحلبة

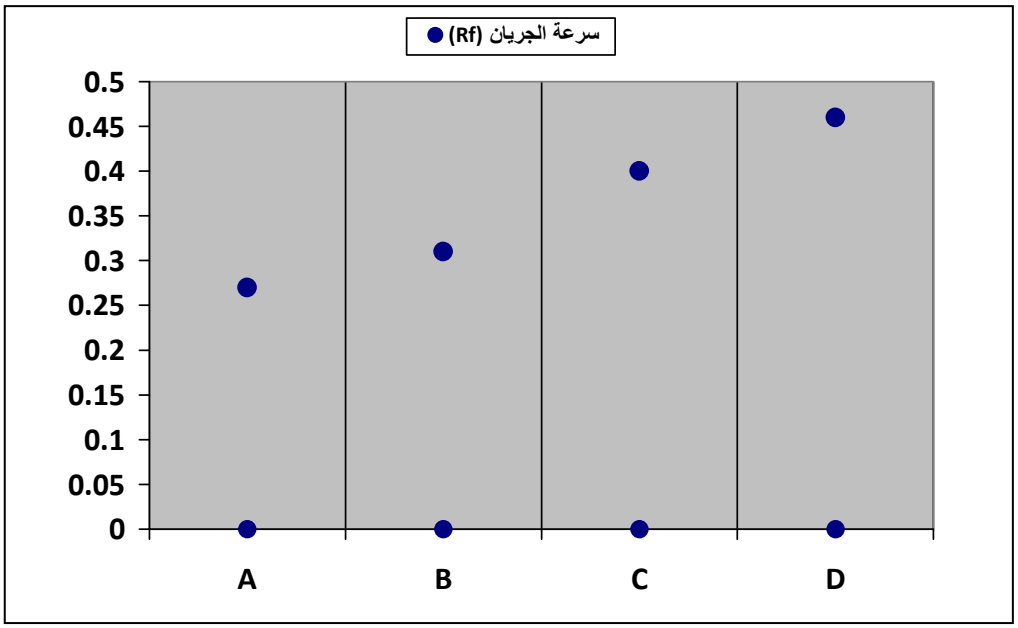
الأحماض الدهنية	سرعة الجريان (Rf)
زيت الحلبة	0.27
Oleic acid	0.31

Palmatic acid	0.40
Stearic acid	0.46

التركيب الكيمياوي للزيت المستخلص من بذور نبات الحلبة-*Trigonella foenum-graecum* L.:

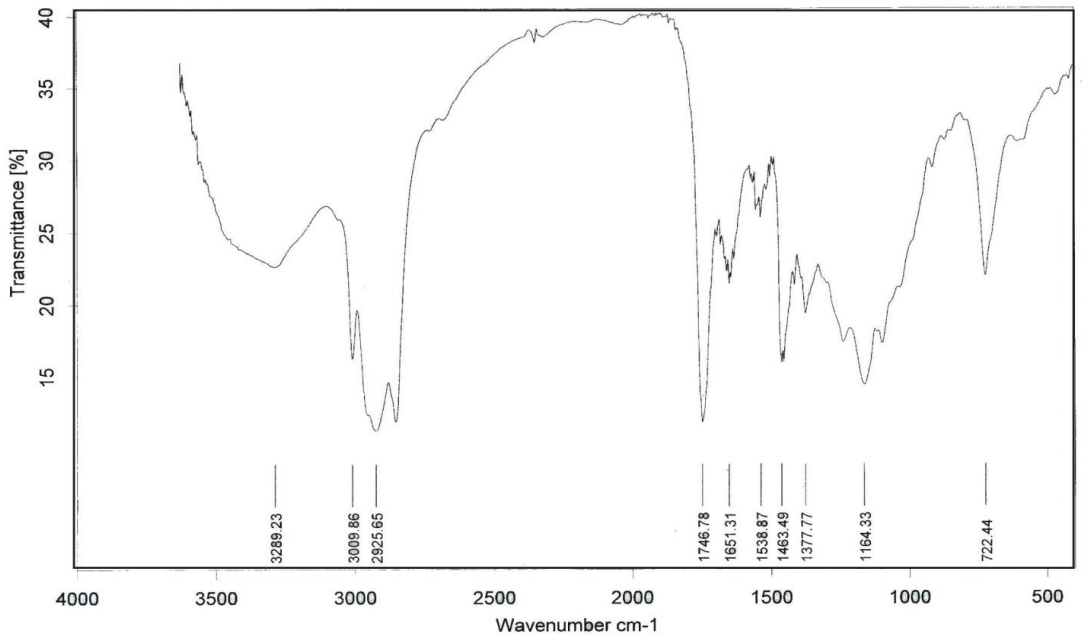
عند تشخيص المجاميع الوظيفية الموجودة في الزيت المستخلص من بذور نبات الحلبة بواسطة استخدام طيف الأشعة تحت الحمراء IR تبين انه يتكون من المركبات الكيمياوية الآتية:

مجموعة O = C – OH عند امتصاص ($3289\ Cm^{-1}$) ومجموعة C – H مط أروماتي عند امتصاص ($3009\ Cm^{-1}$) ومجموعة C – H مط الكيل عند امتصاص ($2854Cm^{-1}$) و ($2859\ Cm^{-1}$) ومجموعة الحامض والأستر– O = C عند امتصاص ($1746\ Cm^{-1}$) ومجموعة ثني أروماتي C–H عند امتصاصي ($1538Cm^{-1}$،$1401Cm^{-1}$)، كما هو واضح في الشكل (2).



الشكل (1): الأحماض الدهنية المفصولة من زيت بذور نبات الحلبة باستخدام تقنية TLC

A : زيت الحلبة
B : Oleic acid
C : Palmatic acid
D : Stearic acid



الشكل (2): طيف الأشعة تحت الحمراء (IR) للزيت المفصول من بذور نبات الحلبة *Trigonella foenum graecum*.

تحديد التركيب السكري لعديد السكريات الخارجي Exopolysaccharides (EPS) المعزول من كل من البكتريا *S. meliloti* والبكتريا غير المرضية *E. coli*:

أظهرت نتيجة تحديد التركيب السكري لـEPS المعزول من بكتريا *S. meliloti* بتقنية الطبقة الرقيقة TLC (الجدول 2) أن الوحدات الأساسية المكونة له هي N-acetylglucos amine والكلوكوز والفركتوز، إذ كانت سرعة الجريان للسكريات الثلاثة متساوية والتي بلغت قيمتها (0.62) وهي مقاربة جداً لسرعة جريان المركب EPS التي بلغت (0.63) مع وجود نسبة ضئيلة من سكر الكالاكتوز التي بلغت (0.53)، وهذا ما أشار إليه العديد من الباحثين (36,35،34)، في حين ظهرت نتيجة المركب EPS المعزول من البكتريا غير المرضية *E. coli* السلالة *JM*83 بأنه يتكون من سكر الكالاكتوز التي كانت سرعة الجريان له (0.53) وهي مقاربة لسرعة جريان المركب EPS التي بلغت قيمته (0.58) ونسبة أقل من كل من الفركتوز والكلوكوز وإن أسيتايل كلوكوز أمين وقد تم الإشارة إلى ذلك من قبل كل من Zogaj وآخرون (2001) و Gottesman & Majdalani (2005) الشكل (3)، (37،13).

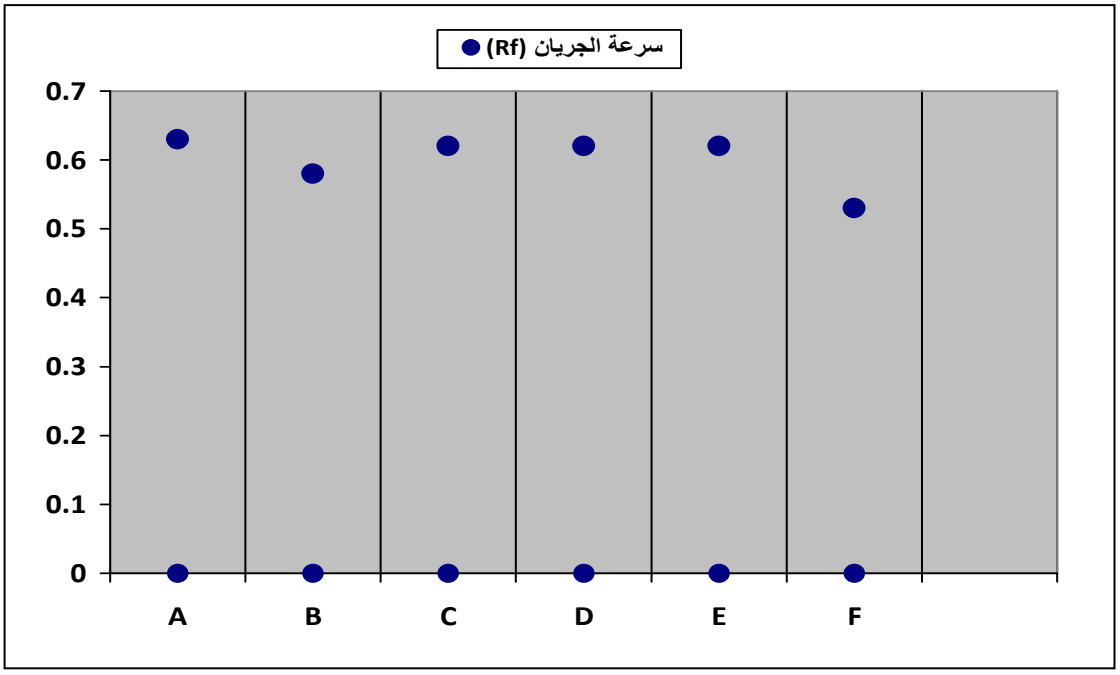
الجدول (2): قياس سرعة الجريان (Rf) للسكريات المفصولة بتقنية الطبقة الرقيقة TLC من المركب EPS المعزول من كل من بكتريا *S. meliloti* والبكتريا غير المرضية *E. coli* السلالة *JM*83:

السكريات	سرعة الجريان (Rf)
EPS المعزول من *S. meliloti*	**0.63**
EPS المعزول من *E. coli*	**0.58**
الوحدات السكرية القياسية	---
N-a-cetyl glucosamine	**0.62**
Glucose	**0.62**
Fructose	**0.62**
Galactose	**0.53**

التركيب الكيمياوي لعديد السكريات الخارجي Exopolysaccharides (EPS) المستخلص من كل من بكتريا *S.meliloti* و بكتريا *E.coli*:

تبين عند التشخيص بواسطة قياس طيف الأشعة تحت الحمراء IR الشكل (4)، أن التركيب الكيمياوي للمركب الأول EPS المعزول من *S.meliloti* ظهر أنه يحتوي على مجموعة الكحول OH– عند امتصاص ($3523\ Cm^{-1}$) ومجموعة الكاربوكسيل C – OH – عند امتصاص ($3390\ Cm^{-1}$) ومجموعة CH الأليفاتية عند امتصاص ($2990\ Cm^{-1}$) العائدة إلى مجموعة CH_3 ومركبات الاستر O=C–O–C عند امتصاص ($1672\ Cm^{-1}$) ومجموعة C = O acid– عند امتصاص ($1627\ Cm^{-1}$) ومجموعة الأيثر C – O – C عند امتصاص ($1055\ Cm^{-1}$), وقد اشار العديد من الباحثين منهم Aman واخرون (1981) و einhold Rواخرون (1994)، (35،38) عند دراستهم لتركيب EPS المعزول من هذه البكتريا انه يتكون من اغلب التراكيب التي تم الإشارة إليها في هذا البحث.

بينما كانت نتيجة تشخيص المركب الثاني EPS المعزول من *E.coli* الشكل (5)، بأنه يحتوي على مجموعة الكحول OH– عند امتصاص ($3550\ Cm^{-1}$) ومجموعة الكاربونيل عن امتصاص ($3386\ Cm^{-1}$) ومجموعة C–H (Streteic) عند ($2959\ Cm^{-1}$) ومجموعتي الكاربونيل C=O– في كل من حامض كلوكيورونيك Glucuronic acid وحامض بايروفيت Pyruvate acid عند امتصاصي ($1750\ Cm^{-1}$،$1710\ Cm^{-1}$) على التوالي، أما الآصرة العائدة إلى مركبات الأستر فكانت عند امتصاص ($1626\ Cm^{-1}$) ومجموعة الأيثر C – O – C عند امتصاص($1055\ Cm^{-1}$)، وقد تطابقت نتائج التركيب الكيمياوي في هذا المركب مع نتائج الباحث Yilong Ren واخرون (2002)، (39).



الشكل (3): المجاميع السكرية المفصولة من EPS المستخلص من كل من بكتريا *S.meliloti* و *E.coli* باستخدام تقنية TLC

A : EPS المعزول من *S. meliloti*

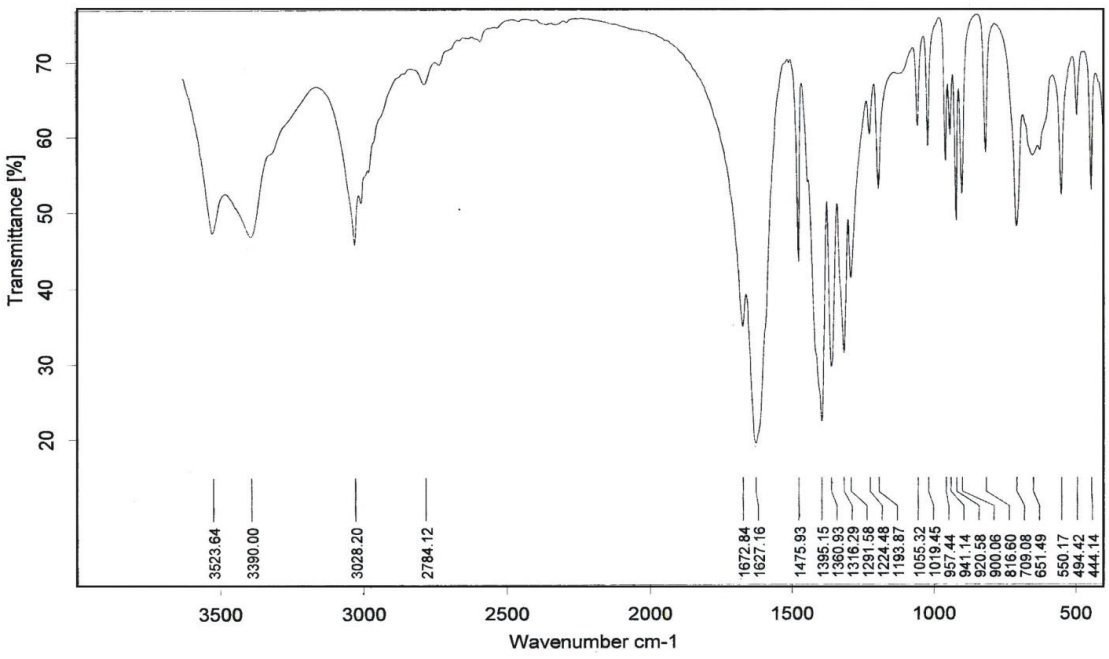
B : EPS المعزول من *E. coli*

C : N-a-cytyl glucosamine

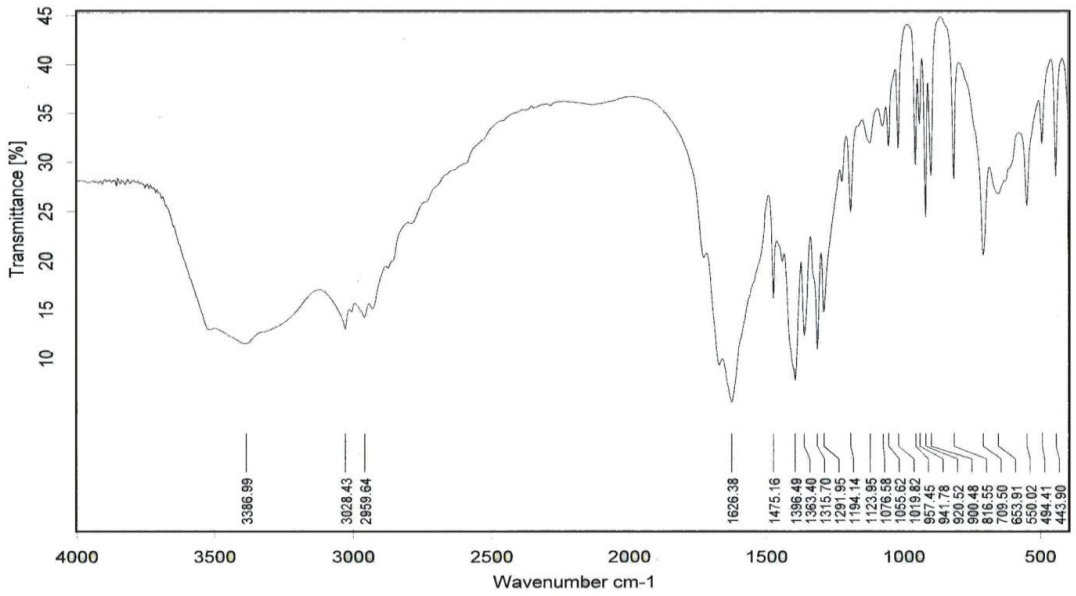
D : Glucose

E : Fructose

F : Galactose



الشكل (4): طيف الأشعة تحت الحمراء (IR) لعديد من السكريات الخارجي EPS المستخلص من البكتريا *S. meliloti* .



الشكل (5): طيف الأشعة تحت الحمراء (IR) لعديد السكريات الخارجي EPS المستخلص من البكتريا *E.coli* .

الفعالية البايولوجية للمستخلصات :

أظهرت نتائج الدراسة أن مستخلص EPS المعزول من بكتريا *S. meliloti* كان من أفضل المستخلصات في تأثيره كمضاد مايكروبي على نمو البكتريا المرضية *P. mirabilis*، يليه مستخلص EPS المعزول من بكتريا *E. coli*، ثم مستخلص الزيت المعزول من بذور الحلبة، لاسيما على نمو البكتريا *P. mirabilis* و *S. aureus* بدلالة القيمة المعنوية لكل منهما حيث بلغت 0.0627 و 0.2453 على التعاقب قياساً بعينة المقارنة وعند مستوى (P ≤0.05).

ويبين التحليل التباييني Anova حدوث فروقات معنوية بين المستخلصات الثلاثة عند مستوى($P \leq 0.05$).

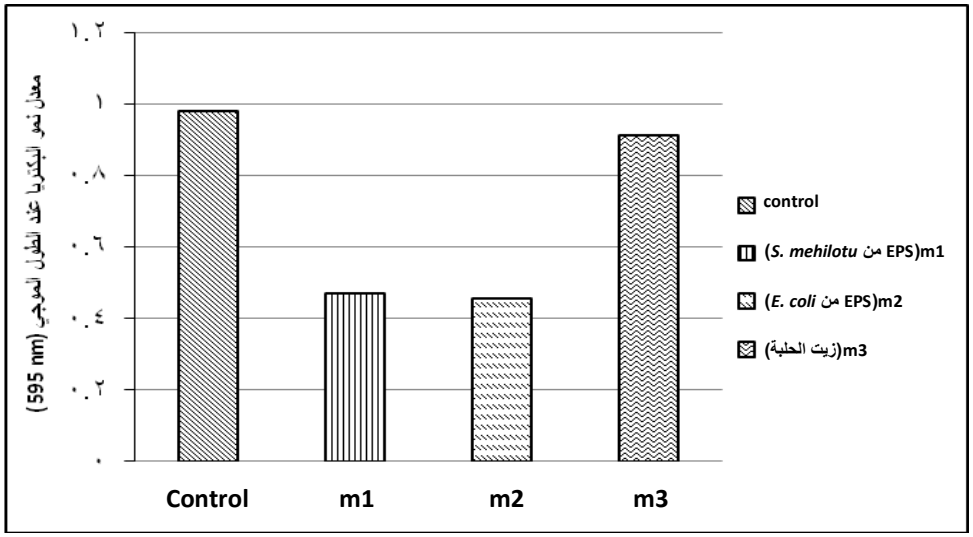
حيث يوضح الشكل (A-6) الفعالية التثبيطية للمستخلص الأول والثاني على نمو البكتريا *E. coli* والتي كانت أكثر من المستخلص الثالث حيث بلغت 0.4887 ، 0.4503 ، 0.9097 على التوالي.

أما الشكل (B- 6) فيوضح التأثير التثبيطي للمستخلص الأول على نمو البكتريا *P. mirabilis* مقارنة ببقية المستخلصات وبدرجة معنوية بلغت 0.0627 عند مستوى (P ≤ 0.05).

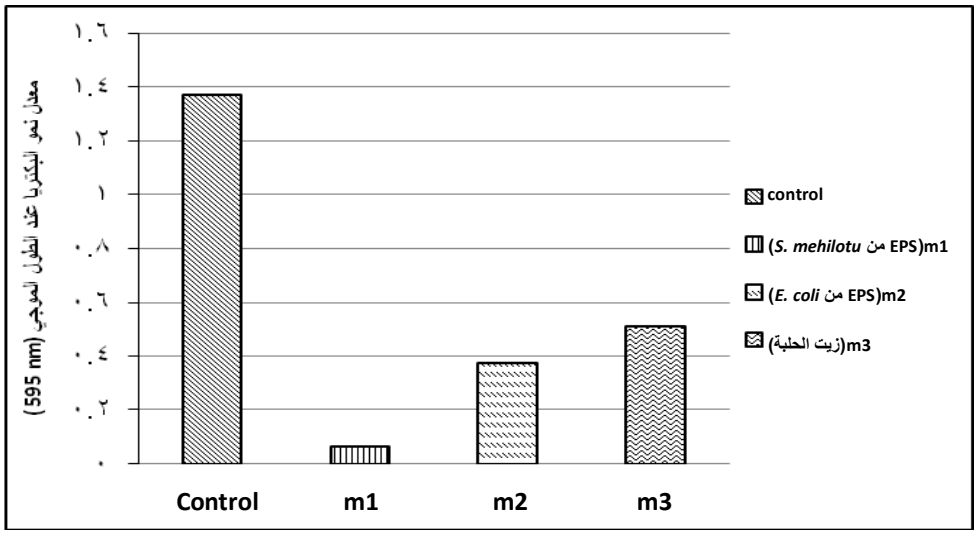
في حين أظهر المستخلص الثاني (EPS المعزول من بكتريا *E. coli*) تأثيراً تثبيطيا عالياً ضد البكتريا المرضية *S. aureus* عند نفس المستوى وبدرجة معنوية بلغت 0.2453 (الشكل C- 6).

ويعزى التأثير المثبط للمستخلص المعزول من بذور نبات الحلبة على نمو البكتريا الموجبة لصبغة كرام *S. aureus* والسالبة لصبغة كرام *P. mirabilis, E. coli* إلى وجود مواد أساسية في بذور الحلبة مثل سترويد السابوجنين والدايزوجنين والقلويدات الأساسية الترايكونيلين (40). بالإضافة إلى المفعول الطبي لمادة الكولين Choline المتواجدة في زيت نبات الحلبة (5)، وتاثيرها السلبي في احداث أضطراب في الجهد الكهربائي على جانبي الأغشية الحيوية للأحياء المجهرية الحساسة لها مما يؤدي إلى توقف عمليات إنتاج الطاقة عبر الأغشية وبالتالي ظهور تأثيرها القاتل نحو الأحياء المجهرية (41), كما اوضحت الدراسات ان لهذا المركب خصائص مضادة للجراثيم Antibacterial agent, وقد يعزى سبب ذلك الى وجود الحلقة الاروماتية الحاوية على مجموعة (OH) القطبية والفعالة والتي تمتلك قابلية التفاعل والارتباط بواسطة الاواصر الهيدروجينية مع المجاميع الفعالة للانزيمات المساعدة Coenzymes(42،43).

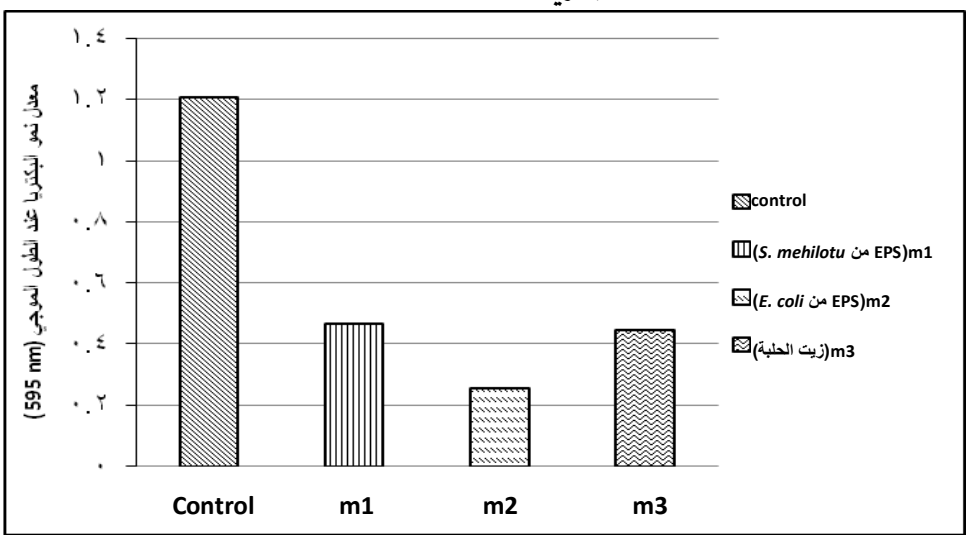
كما وتطابقت نتائج البحث مع ما جاء به Jamil (2002) ،(44) أن زيت الحلبة يعد مثبطاً لنمو البكتريا الموجبة *S. aureul* والسالبة لصبغة كرام *P. mirabilis* و*E. coli* ،كما تبين من النتائج أن البكتريا الموجبة لصبغة كرام *S. aureus* كانت أكثر حساسية من البكتريا السالبة لصبغة كرام *E.coli* والتي تعزى غالباً إلى وجود طبقة الميورين في الغشاء الخارجي من جدران الخلايا السالبة لصبغة كرام تمنع نفوذ ومرور المواد الفعالة المضادة من خلالها بكفاءة عالية إلى داخل الخلية. أما بالنسبة لسبب اختلاف حساسية جرثومتي *P. mirabilis* و *E. coli* فيعتقد أن سببه هو اختلاف حساسية الجراثيم للمركبات النباتية.



A. البكتريا *Escheriehia coli*



B. البكتريا *Proteus mirabilis*



C. البكتريا *Staphylococcus aureus*

الشكل (6): الامتصاصية للأنواع البكتيرية الثلاثة (*Proteus mirabilis* ، *Staph. aureus* ، *E.coli*) عند الطول الموجي (595) نانوميتر مطروحاً منها امتصاصية الوسط المدعم بالمستخلص الخالي من التلقيح.

باختلاف السلالات (45)، لذلك يمكن القول ان هذه المستخلصات يمكن توظيفها كبديل عن المضادات الحيوية عند الإفراط في تناولها لمعالجة الامراض التي تسببها هذه البكتريا.

ومن المعروف ان عديد السكريات الخارجي (EPS) Expolysacchride يتالف من سكريات احادية منها الكلوكوز والفركتوز والكالاكتوز وبما ان الكلوكوز يحتوي على مجموعة الالديهايد والتي تتأكسد الى مجموعة الكاربوكسيل فانه ينتج حامض كلوكونيك Gluconic acid بينما ينتج حامض كلوكورنيك Glucuronic acid عندما تتاكسد مجموعة الكحول الأولية (46), بالاضافة الى وجود مجاميع عضوية اخرى مثل مجموعة الكاربوكسيل COOH- ومجموعة الكحول OH- . ويعزى التأثير التثبيطي لهذه الأحماض العضوية على نمو البكتريا وذلك لقابليتها على اختراق جدار الخلية البكتيرية وإعاقة الفعالية الفسيولوجية الطبيعية لهذه الخلايا من خلال تأثيرها على اختلال التوازن الايوني مابين داخل الخلية وخارجها، وعندما تتحلل هذه الاحماض فانها ستؤدي الى ارتفاع الدالة الحامضية للوسط الغذائي النامية فيه هذه البكتريا وبالتالي اضعافها او توقف نموها.اما الجزء الايوني من الاحماض العضوية الذي لا يستطيع التسرب الى داخل البكتريا فسوف يتراكم على سطح البكتريا مؤديا الى زيادة الضغط الازموزي ومن ثم يعيق العديد من العمليات الايضية، لذا فان هذ الأحماض بحالتها المتحللة وغير المتحللة ذات قابلية تثبيطية مهمة على نمو البكتريا (47،48).

المصادر

1) Oran S. A. and Raies A. Dirasat pure Sci., 27(1):71- 73(2000).

2) Acharya S.N., Thomas J.E. and Basu S.K., Crop Sci. 48: 841-53 (2008).

3) Yoshikawa M., Murakami T., Komatsu H., Murakami N., Yamahara J., Matsuda H., Chem Pharmacol Bull ., 45: 81-7(1997).

4) Toppo F. A. and Akhand R., Asian J. Pharma. Clin. Res., 2: 4 (2009).

5) Schella G. G. and Augesti K. T., Indian J. Exp. Bio., 30: 420-426 (1992).

6) Rastogi and Mehrotra, B.N., "Compendium of Indian Medicinal Plants", PID, New Delhi, volume II, Page No. 422 (1990).

7) "The Wealth of India-A Dictionary of Indian Raw Materials and Industrial Procedures", National Institute of Science and Communication, Council of scientific and Industrial Research, New Delhi, India, Vol. X:Sp-W, Page No.299-305 (1998).,

8) Hirsch, A.M., Developmental biology of legume nodulation. New Phytol., 122:211-237 (1992).

9) Becker A., Ru¨ berg S., Baumgarth B., Bertram-Drogatz P.A., Quester I. and Puhler A., J. Mol. Microbiol. Biotechnol., 4(3): 187–190 (2002).

10) Jawetz E.; Brooks G. F.; Butel J. S. and Morse S. A., "Jawetz Melnick and Adelberg's Medical Microbiology". 21st ed., Appleton and lange, California , USA (1998)

11) Henry J.B., "Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods". 20th ed., W.B. Funders company, USA (2001).

12) Todar K., "Pathogenic *E. coli*". Online Textbook of Bacteriology**.** University of Wisconsin–Madison Department of Bacteriology. http:// www. Textbook of bacteriology.net/e.coli.html. Retrieved 2007-11-30.

13) Zogaj X., Nimtz M., Rohde M., Bokranz W. and Romling U.,. Mol. Microbiol., 39: 1452–1463 (2001).

14) Wang X., Preston J. F., 3rd and Romeo T., J. Bacteriol., 186: 2724–2734 (2004).

15) Whitfield C., Annu. Rev. Biochem., 75:39–68 (2006).

16) Wassif Ch., Cheek D. and Belas R. J. Bacterol., 177 (20): 5790-5798 (1995).

17) Kluytmans J., van Belkum A., Verbrugh H.. Clin. Microbiol. Rev. **10** (3): 505–20 (1997).

18) Ryan K.J. and Ray C.G., (editors) "Sherris Medical Microbiology" (4th ed.) McGraw Hill (2004).

19) Faden H., Lesse A.J, Trask J., Hill J.A., Hess D.J., Dryja D., "Importance of Colonization Site in the Current Epidemic of Staphylococcal Skin Abscesses". *Pediatrics* (2010).

20) Milstone A.M, Song X, Coffin S, Elward A., *Infect. Control Hosp Epidemiol*., 31(7):766-8(2010).

21) Nakamura M.M, McAdam A.J, Sandora T.J, Moreira K.R, Lee G.M., J. Clin. Microbiol .,48(8):2957-9(2010).

22) Todar K., Pathogenesis of *S. aureus* infections. www. Textbook of bacteriology.net (2011).

23) المرجاني، محمد فرج،المضادات الحيوية المقاومة البكتيرية للمضادات الحيوية، الطبعة الأولى، عمان، دار دجلة للنشر، المملكة الاردنية الهاشمية (2011).

24) دلالي، باسل كامل والحكيم، صادق حسين. تحليل الاغذية، دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة الموصل. (1987).

25) Kaufmann, H.P. and Makus Z., Chromatographic impregnation of some fatty acids from some plant. Feete, Seifen, Anstichm., 62, I (1960).

26) Harborne, J. B. (1973). Phytochemical method. Vol. I, p: 140.

27) Ervin S.E. and Hubbell D.H., Appl. Environ. Microbiol., 49:61-68 (1985).

28) Amemura A., Hashimoto T., Koizumi K. and Utamura T., J. Gen. Microbiol.,131:301-307 (1985).
29) Mikes O., "Chromatographic and Allied Methods". John wily and sons, INC. New York (1979).
30) Barry A. L., "The Antimicrobic Susceptibility Test": Principles and Practices Lea and Fetiger Philadelphia (1976).
31) Srinivas D., Nathan S., Suresh T. and Perumasamy O.J., s Ethnopharmacol, 74:217-220 (2001).
32) النعمان، اديبة يونس شريف، رسالة دكتوراه، كلية العلوم، جامعة الموصل.(1998). 32.
33) Wagh P., Rai1 M., Deshmukh S.K. and Durate M. C. T., Afri. J.Biotech., 6 (13):1592-1596 (2007).
34) Jannsson P.E., Kenne L., Lindberg B., Ljuuggren H., Lonngren J., Ruden U. and Svensson S., J. Am. Chem. Soc., 99:3812-3815 (1977).
35) Aman P., McNeil M., Franzen L-E., Darvill A. G., Albersheim P., Carbohydr. Res., 95:263–282 (1981).
36) Her G.R., Glazebrook J., Walker G.C., Reinhold V.N., Carbohydr. Res., 198:305-312 (1990).
37) Majdalani N. and Gottesman S., Annu Rev Microbiol., 59:379–405 (2005).
38) Reinhold B. B., Chan S. Y., Reuber T. L., Marra A., Walker G. C. and Reinhold V. N., J. Bacteriol., 176:1997–2002 (1994).
39) Yilong Ren, Peter R. Ellis, Ian W. Sutherland and Simon B., Ross-Murphy. Carbohydr. Poly., 52(2):189-195 (2002).
40) Mehrafarin A., Qaderi A., Rezazadeh Sh ., Naghdi Badi H . , Noor mohammadi Gh . and Zand E. , J.Medicinal Plants., 9:35 **(2010)**.
41) Cowan, M.M., Clin. Microbial. Rev., 12:564-582 (1999).
42) El-Kady I.A., Mohamed S.S. and Mostafa E.M., Qatar University Sci.J.,13(1):61-63 (1993).
43) Al-Ani A.B., Nadir M. and Al-Khazraji N., Al-Anbar University J., 1(1):82-86 (1996).
44) Jamil R. M., J. Appli.Sci., 24-25 (2002).
45) الجميلي، بسام حسين ايوب، مجلة تكريت للعلوم الصرفة، مجلد 15، عدد 3 (2010).
46) ال فليح، خولة احمد، مدخل الى الكيمياء الحياتية، الطبعة الثانية، دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة الموصل (2000).
47) Patanen, K. H.; Mroz, Z., "Organic Acids for Preservation". In Block, S. S.. Disinfection, sterilization & preservation (5th ed.). Philadelphia: Lea Febiger (1999).
48) Applications for lacticacid. http:// www. purac. com/purac _com/ 67cbf5490d8 3dc4 8dafbd96cab841b1.php.