------مجلة علوم الرافدين، المجلد 22، العدد 2، ص 28-39،2011------

دراسة تأثير المستخلص المائي المغلي للحلبة في بعض الأنواع البكتيرية

ناريمان صالح ناصر

قسم علوم الحياة

كلية العلوم

جامعة الموصل

(تاريخ الاستلام 7/ 11 / 2010 ؛ تاريخ القبول 21 / 2 / 2011)

الملخص

تضمنت الدراسة التأثير التثبيطي لمستخلص الحلبة المائي المغلي لبذور الحلبة في بكتريـا المكـورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* والمكورات السبحية *Streptococcus pyogenes* و العصيات القولونية *E. coli* خارج الجسم الحي (In vitro) وكذلك دراسة تأثير هذا المستخلص في بكتريـا *E. coli* داخل الجسم الحي (In vivo).

أظهرت النتائج امتلاك المستخلص الفعالية التثبيطية لهذه العزلات البكتيرية وكان التركيز المثبط الأدنى MIC ضد البكتريا *E. coli* 25 ملغم/سم^3 و 50 ملغم/سم^3 لكـل مـن بكتريـا *Staphylococcus aureus* و*Streptococcus pyogenes* كما تمت دراسة فعالية هذا المستخلص في علاج الإصابات التجريبية للفئران المختبرية المخمجة ببكتريا *E. coli* وعند المقارنة مع المضاد الحيوي الجنتامايسين اظهر المستخلص تـأثيراً واضحاً في التئام الجرح الناتج من الخمج البكتيري خلال 17 يوم مقارنة بمجموعة المسيطرة التي عولجـت بمضاد الجنتامايسين.

الكلمات الدالة: الفعالية التثبيطية للبكتريا، المستخلص النباتي، الحلبة.

Study the Effect of Boiled Aqueous Extract of *Trigonella foenum graceum* on some Bacterial Species

Nareman S. Nasir
Department of Biology
College of Science
Mosul University

ABSTRACT

The study includes the inhibitory effect of boiled aqueous extract of *Trigonella foenum graceum* seed *on Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, and *E. coli* (In vitro) and on *E. coli* (In vivo).

Result revealed an inhibitory effect of the extract on all the bacteria. The minimum inhibitory concentration (MIC) of this extract on *E. coli* was shown to be 25 mg/ml and 50 mg/ml for each of *Streptococcus pyogenes* and *Staphylococcus aureus*.

Also an in vivo evaluation of the extract in healing of experimental inflection models was studied. Results showed that the extract had considerable impact in healing, *E. coli* wound infection within 17 days as compared with the control group in which gentamycin was used.

Keywords: Anti bacterial activity, plant extract, *Trigonella foenum graceum.*

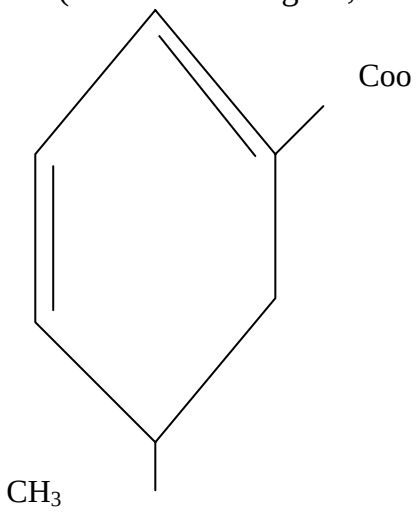
المقدمة

إن تاريخ المعالجة بالأعشاب قديم جدا يرجع إلى عهد السومريين والآشوريين إذ ازدهـرت معالجـة الأمراض بالأعشاب الطبيعية في عهد الملك آشور بانيبال (626-668 ق. م) واشتهر المـصريون القـدماء والهنود بمهارة في استخدام الأعشاب بالطب والعلاج (بيرم، 1989). كما انتشرت زراعة الأعشاب الطبيـة وكثرت استخداماتها في عصر الإسلام ومنها الحلبة. وقد ذكر ابن قيم الجوزية في كتابه الطب النبوي عـن رسول الله (صلى الله عليه وسلم) قال (استشفوا بالحلبة) وذلك لفوائدها الكثيرة (ابن قيم الجوزية، 1985).

والحلبة نبات عشبي طوله 20-60 سم يشبه نبات البرسيم، تتفرع من ساقه سويقات صغيرة تحمل كل منها ثلاث أوراق مسننة طولا نية وتظهر من قاعدة الساق قرون معقوفة طولها 10 سـم وتحمـل الأزهـار الصفراء الصغيرة التي تتحول إلى بذور صفراء ضمن القرون (رويحة، 1981).

وهـو يعـد مـن الأعـشاب الطبيـة الواسـعة الانتـشار إذ ينتمـي إلـى العائلـة البقوليـة Faba ceac-pea family (جامعة الدول العربية، 1988) وهو غني بالبروتينـات والـسكريات والـدهون والأملاح أهمها الحديد والكالسيوم والفسفور وبعض الفيتامينات مثل فيتامين D و C .

تمتاز بذور الحلبة باحتوائها على مادة غروية كما تحتوي على مركب قلويدي يـدعى Trigonelline شكل (1) وكولين Choline الذي يتواجد في زيت الحلبة الذي يعزى اليه المفعول الطبي، كما تحتوي علـى مواد صابونية ومواد ملونة وحامض النيكوتينك (Schella and Augesti, 1992) .



الشكل 1: الصيغة الكيميائية للتريجولين (Frazier and Wastoff, 1967)

يستخدم نبات الحلبة في علاج العديد من الأمراض التي تصيب الجهاز الهضمي والجهاز التنفسي والجهـاز البولي (Kornman *et al.*, 2001).

إن لبذور الحلبة تأثيراً في انخفاض كلوكوز الدم في الأشخاص السليمين والمصابين بداء السكر كمـا تعد مادة مضادة للأكسدة. (عبد الرسول، 2001؛ الحمداني، 2002 ؛ القطان، 2006). واظهر المـستخلص المائي المركز لنبات الحلبة فعالية تثبيطية على بكتريا حمى مالطا (السلطان، 1993). وقد اشـتق اسـم الحلبة من الحليب كونه يدر اللبن لدى المرضعات (Al-Shaikh *et al.*, 1999).

للحلبة تأثير مضاد للفطريات إذ أن لمادة الصابونين المتواجدة فيها فعالية تثبيطية عالية ضد أنواع من الفطريات الجلدية منها *Microsporum canis* والخميرة Candida. (AL- Ani *et al.*, 1996).

ولهذه المادة أيضا فعالية تثبيطية عالية لبكتريـا *E. coli Salmonella paratyphi* و *Staph aureus* (EL-Kady *et al.*, 1993)

وان زيـت الحلبـة يعـد مثبطـاً لنمـو البكتريـا الموجبـة *Staph. aureus* والـسالبة لـصبغة كرام *E. coli* (Jamil *et al.*, 2002).

ولعدم وجود دراسات حول تأثير مستخلص الحلبة على الأحياء المجهرية داخل الجسم الحي فقد قمنـا بأجراء هذه الدراسة حول تأثير مستخلص الحلبة المغلي في تثبيط نمو البكتريا *E. coli* داخل الجسم الحي.

المواد وطرق العمل

حضر المستخلص المائي لنبات الحلبة المغلي وذلك بنقل 10 غم من النبات الى 90سم^3 من الماء بدرجة الغليان 100 مْ وترك لمدة 15 دقيقة بعدها رشح المحلول خلال عدة طبقات من الشاش ثم وزع الراشح في أنابيب وتم تجميده ثم جفف المستخلص في جهاز التجفيد Lopholyzer للحصول على المستخلص الجاف. تم الحصول على البكتريا قيد الدراسة والتي شملت *E. coli* و*Streptococcus pyogenes*, *Staph. aureus* من قسم علوم الحياة/ كلية العلوم/ جامعة الموصل. وتم التأكد من تشخيصها بأجراء الفحوصات الكيموحيوية (Koneman, *et al*., 1997).

زرعت أنابيب من وسط المرق المغذي بالأنواع البكتيرية السابقة الذكر وحضنت بدرجة حرارة 37م° ولمدة 24 ساعة. وتم اختبار الفعالية التثبيطية لمستخلص الحلبة المائي باستخدام طريقة الانتشار بالأطباق In vitro طريقة (Bauer *et al*., 1966).

لقد حضر المعلق البكتيري في وسط المرق المغذي وبتركيز 1×10^8 خلية/ سم^3 وذلك بالمقارنة مع أنبوب السيطرة القياسي رقم 3. نقل 0.1 سم^3 من المعلق البكتيري ولقح باستخدام ماسحة قطنية على وسط Nutrient agar ثم حضنت الأطباق بدرجة حرارة 37م° لمدة 30 دقيقة لكي يحصل التشرب، بعد ذلك وضعت أقراص من ورق الترشيح Whatman No.1 بقطر 6ملم مشبعة بالتركيز 100ملغم/ قرص من المستخلص المائي لنبات الحلبة والذي حضر بإضافة 0.1 غم من المستخلص النباتي الى 1سم^3 من الماء المقطر المعقم ثم أضيف المزيج إلى قنينة حاوية على 100 قرص معقم (Wange and Hedin, 1985)، تم تثبيت الأقراص بوساطة ملقط معقم عل سطح الأطباق الملقحة وحضنت بدرجة حرارة 37م° لمدة 24 ساعة وتم قياس أقطار التثبيط حول القرص المشبع بالمستخلص النباتي.

تم تحديد التركيز المثبط الأدنى MIC لمستخلص الحلبة باستخدام طريقة الانتشار بالأقراص إذ حضرت التراكيز الآتية من المستخلص 1.56, 3.125. 6.25, 12.5, 25, 50, 100 ملغم/ سم^3. وحضرت أقراص المضادات المشبعة بهذه التراكيز بالطريقة السابقة نفسها، حدد التركيز المثبط الأدنى الذي هو أعلى تخفيف للمستخلص النباتي يمنع نمو البكتريا (Shareef, 1998).

دراسة الفعالية التثبيطية داخل أجسام الحيوانات المختبرية In vivo.

درس تأثير مستخلص الحلبة المائي المغلي على بكتريا *E. coli* داخل الجسم الحي (In vivo) بالاعتماد على طريقة (Stepinska *et al*., 1995) استخدم في هذه الدراسة 9 من ذكور وإناث الفئران البيضاء mice التي تم الحصول عليها من كلية الطب / جامعة الموصل بعمر 8-12 أسبوع وتراوحت أوزانها بين 15-20 غم وضعت في أقفاص بلاستيكية بواقع 3 حيوانات لكل قفص.

إحداث الخمج

خدرت الحيوانات بحقنها داخل الخاب بكل من Xylazine و Ketamine وبجرعة 5، 50 ملغم/كغم من وزن الجسم لكليهما على التوالي، ثم أزيل الشعر من الجهة الظهرية للحيوان وعقمت المنطقة باستخدام الايثانول بتركيز 70% بعدها استحدث شق بطول 1سم بوساطة مشرط معقم، قسمت الحيوانات إلى ثلاث مجاميع تتألف من ثلاث حيوانات لكل مجموعة حقنت جميعها بـ سم^3 من المعلق البكتيري الحاوي على 55×10^{11} خلية/ سم^3. إذ تم تحديد العدد باستخدام طريقة العد الحي Viable count وبعد 24 ساعة عوملت المجموعة الأولى المخمجة بكتريا *E. coli* بالمضاد الحيوي الجنتامايسين أما المجموعة الثانية فقد عوملت بالمرهم المحضر من مستخلص الحلبة والذي يتكون من (1غم من المستخلص المجفف مضاف اليه 9 غم من الفازلين أي بتركيز 100ملغم/ سم^3) تم متابعة الحيوانات لمدة 20 يوماً (Abo *et al.*, 2004)، تركت المجموعة الثالثة بدون علاج بوصفها مجموعة سيطرة موجبة (Control) .

الفحص البكتريولوجي

أخذت مسحات من الجروح المخمجة والمعاملة لمجاميع الحيوانات الثلاثة بوساطة مسحات معقمة بعد 1, 3, 7, 10, 14, 17,20 يوماً من التجربة. وتم إجراء تخافيف عشرية لغاية 10^{-5} اخذ 1سم^3 من التخفيف الأخير وزرع على وسط أكار ماكونكي Macconkey ager وحضنت بدرجة حرارة 37° م ولمدة 24 ساعة. ثم حسبت المستعمرات النامية (Stepinska. *et al*., 1995)

النتائج والمناقشة

تبين نتائج الجدول (1) حساسية البكتريا لمستخلص الحلبة المائي مقارنة مع الجنتامايسين إذ اظهر تأثيراً متوسطاً على كل من بكتريا *E. coli* و *Staph. aureuss* فيما كان تأثيره ضعيفاً في البكتريا *Streptococcus pyogenes* وهذا يتفق مع ما جاء به (El-Kady *et al*., 1993) إذ أوضح أن مادة الصابونيات المستخلصة من الحلية لها فعالية تثبيطية عالية على بكتريا *E. coli* و *salmonella paratyphi* و *Staph. aureus*.

كذلك تتفق مع ما جاء به (Jamil *et al*., 2002) فقد بين أن لزيت الحلبة تأثيراً مثبطاً لنمو البكتريا الموجبة لصبغة كرام *Staph.aureus* والسالبة لصبغة كرام *E. coli* وقد بين (Wicht and Bisset, 1994) فعالية الحلبة في علاج الدمامل والخراج النتن وفي التقليل من تهيج الجلد. إضافة إلى فائدتها في زيادة قوة بصيلات الشعر والتقليل من سقوطه.

قدر التركيز المثبط الأدنى (MIC) لمستخلص الحلبة ضد البكتريا قيد الدراسة ويوضح الجدول (2) إن التركيز المثبط الأدنى لمستخلص الحلية المغلي كان 25 ملغم/سم^3 لبكتريا *E. coli* صورة (1) و50 ملغم/سم^3

لكل من *Staph. aureus* , *Streptococcus pyogenes* . صورة (2) وصورة (3) لكلا النوعين على التوالي.

أجريت دراسة تجريبية لتأثير هذا المستخلص داخل الجسم الحي إذ تم معالجة الفئران المخمجة تجريبياً بجرثومة *E. coli* بالمستخلص المائي للحلبة صورة (4) توضح تأثير علاج الجروح المحدثة في مجموعات الفئران المخمجة للبكتريا *E. coli* ومقارنتها مع مثيلاتها من مجموعة الحيوانات المعالجة بالمضاد الحيوي الجنتامايسين صورة (6) ومجموعة السيطرة غير المعالجة صورة (5).

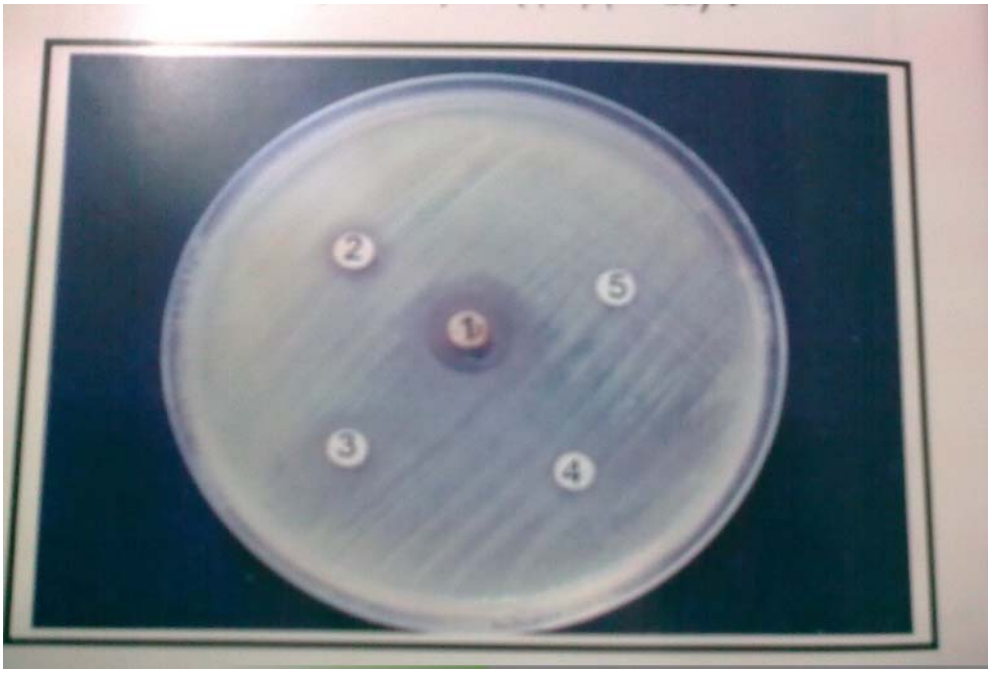
الجدول 1: حساسية البكتريا للحلبة ولمضاد الجنتامايسين مقاسة بالملم.

الأنواع البكتيرية / **المستخلص المائي والمضاد الحيوي الفياسي**	***E. coli***	***S. aureus***	***Streptococcus pyogenes***
حلبة مغلي	12	9	7
جنتامايسين	20	9	9

الجدول 2 : التركيز المثبط الأدنى (MIC) لمستخلص الحلبة المغلي على أنواع البكتريا بالملغم/سم^3.

الأنواع البكتيرية / **المستخلص النباتي**	***E. coli***	***S. aureus***	***Streptococcus pyogenese***
حلبة مغلي	25	50	50

صورة 1: تأثير المستخلص المائي المغلي للحلبة بتراكيز مختلفة في بكتريا *E. coli* :
1- 100 ملغم/ سم^3، 2- 50 ملغم/سم^3، 3- 25 ملغم/سم^3، 4- 12.5 ملغم/سم^3،
5- 6.25 ملغم/سم^3.



صورة 2: تأثير المستخلص المائي المغلي للحلبة بتراكيز مختلفة في بكتريا *Streptococcus pyogenes* :
1- 100 ملغم/ سم^3، 2- 50 ملغم/سم^3، 3- 25 ملغم/سم^3، 4- 12.5 ملغم/سم^3،
5- 6.25 ملغم/سم^3.

صورة 3: تأثير المستخلص المائي المغلي للحلبة بتراكيـز مختلفـة فـي بكتريـا *Staph.aureus* :
1- 100 ملغم/ سم^3، 2- 50 ملغم/سم^3، 3- 25 ملغـم/سـم^3، 4- 12.5 ملغـم/سـم^3،
5- 6.25 ملغم/سم^3.

صورة 4: فأرة معالجة بمستخلص الحلبة (بعد 15 يوم من المعالجة).

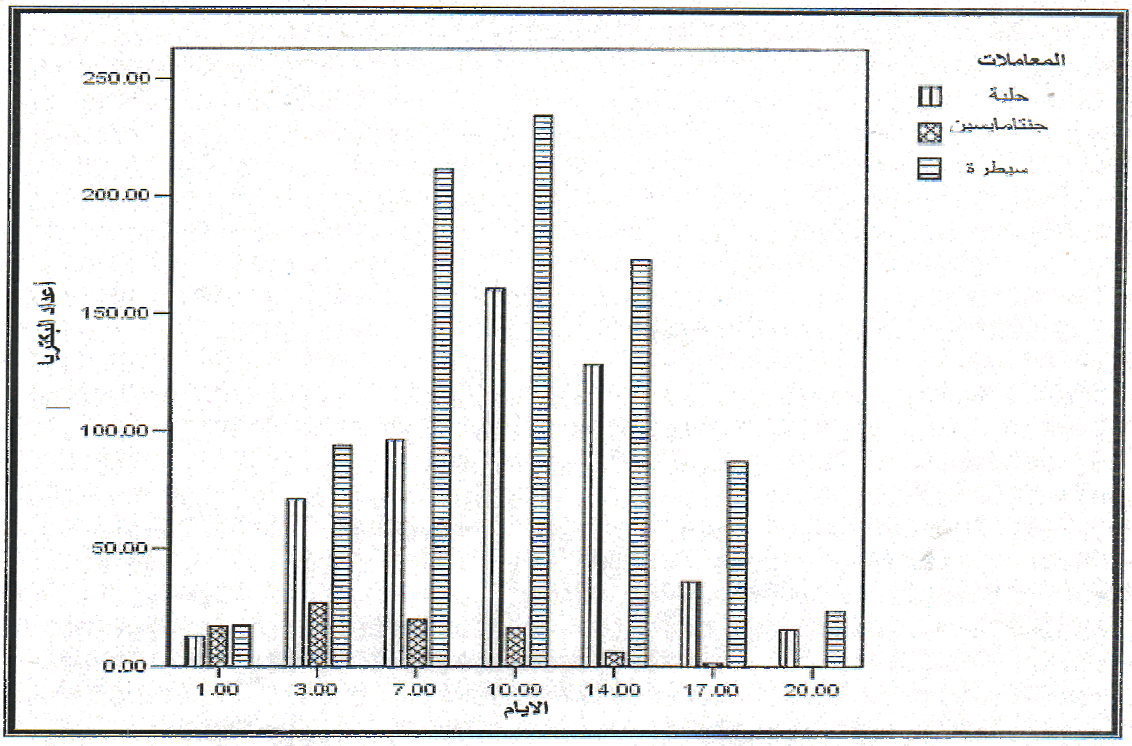
صورة 5 : فأرة بدون معالجة (سيطرة موجبة بعد 15 يوم من الإصابة).

صورة 6: فأرة معالجة بمضاد جنتامايسين (بعد 15 يوم للمعالجة).

وأظهرت النتائج أن الاستخدام الموضعي لمستخلص الحلبة المغلي في الجروح المحدثة في الفئران المخمجة ببكتريا *E. coli* أدى إلى حدوث زيادة في أعداد البكتريا المسببة للخمج خلال اليوم الأول والثالث والسابع والعاشر للإصابة لجميع المجموعات ما عدا المجموعة المعالجة بالجنتامايسين إذ بدأت أعداد البكتريا بالانخفاض في اليوم السابع بينما انخفضت أعداد البكتريا في المجموعة المعالجة بالحلبة ومجموعة السيطرة (بدون علاج) في اليوم الرابع عشر للإصابة والذي كان اكبر في مجموعة الحيوانات المعالجة بمستخلص الحلبة شكل (2) وكان انخفاض أعداد البكتريا واضحاً جداً في اليوم السابع عشر للإصابة في المجموعة المعالجة بالمضاد الحيوي إذ كانت أعداد البكتريا قليلة جداً في هذه المجاميع مقارنة بمجموعة السيطرة.

إن عملية شفاء الجرح الطبيعي تتم بثلاث مراحل هي الالتهاب، التكاثر و إعادة البناء، وتعتمد هذه العملية على كفاءة الدواء الموضعي وتكون وترسب الكولاجين.

يتكون المستخلص المائي للحلبة من 26 % مواد صمغية Muciluge و 5% زيوت ثابتة Fixeed oil و 22% زيوت طيارة Valatile oil ونوعين من القلويدات Alkaloid مثل ترايكونيلين *Trigonelline* وكولين *Choline* ومركبات أخرى مسؤولة عن اللون الأصفر لنبات الحلبة إضافة إلى مركبات الفوسفات واللسثين Lecithin والالبومين النووي وكميات من الحديد ومواد عضوية أخرى إضافة إلى مواد شبيهة بالقلويدات، كما تحتوي على 50% مواد بروتينية وفيتامينات (Mishkinsky *et al.*, 1977). وان لمادة الصابونيات المستخلصة من الحلبة ولزيت الحلبة أثرا مثبطاً لنمو البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام (Jamil *et al.*, 2002).



الشكل 2: أعداد البكتريا *E. coli* في المسحات المأخوذة من جروح الحيوانات المعالجة بالمضاد الحيوي والحلبة.

المصادر العربية

الحمداني، خالد حساني جرجيس (2002). تأثير ورق الزيتون وبذور الحلبة في بعض الصفات الفسلجية والإنتاجية في الأرانب، (رسالة ماجستير) كلية الزراعة والغابات، جامعة الموصل.

ابن قيم الجوزية، شمس الدين محمد (1985). الطب النبوي/ دار العلوم الحديثة، بيروت، لبنان.

القطان، منتهى محمود داؤد (2006). تأثير استخدام بعض مضادات الأكسدة في الأداء الإنتاجي وبعض الصفات الفسلجية للدجاج البياض. أطروحة دكتوراه/ كلية الزراعة والغابات/ جامعة الموصل.

السلطان، صبا عبد السلام (1993). التأثير المثبط لبعض المستخلصات النباتية على بكتريا حمى مالطا (دراسة مختبرية/ في الزجاج). رسالة ماجستير/ كلية العلوم/ جامعة الموصل.

بيرم، عبد الحسين (1989). التداوي بالأعشاب الطبية. الطبعة الأولى، التربية للطباعة والنشر والتوزيع.

جامعة الدول العربية (1988). النباتات الطبية والعطرية والسامة في الوطن العربي. المنطقة العربية للتنمية الزراعية.

رويحة، امين (1983). التداوي بالأعشاب. دار القلم، بيروت، لبنان، الطبعة السابعة.

عبد الرسول، انتصار منصور (2001). تأثير بذور الحلبة في بعض الصفات الفسلجية لذكور فروج اللحم المعامل بكبريتات الفناديل والاوكسيتوسين. رسالة ماجستير/ كلية الطب البيطري/ جامعة الموصل.

المصادر الاجنبية

Abo, A; Olugbuyiro, J. A. O.; Fama-kind, S. A. (2004). Ant – inflective and wound healing *Biomd*. Res., **7**, 85-87.

AL-Ani, A. J.; Nadir, M.T.; Al-khazragii, N.K. (1996). The antimicrobial activity of volatile oil isolated from some Iraqi plants. *J. AL-Anbar University*, **I**, 70-75.

AL-Shaikh, M. A.; AL-Mufarrij, S. L.; Mogawer, H. (1999). Effect of fenugreek seed *Trigonella foenum gracum* on lactation of dairy goats, King Saud University, Riyadh, Saudi Arabia, *J. Dairy Science*, **82** (54), 101.

Bauer, A.W; Kirby, W. A. M.; Sherris, J.S.; Turk, M. (1966). Antibiotic Susceptibility testing by standardized single disc method. *Am. J. Clin. Pathol*., **45**, 443-496.

EL-Kady, L.A.; AL Maraghy, M.S.; Mohammed, E. M. (1993). Antibacterial and anti dermatiophyte activities of some essential oils from Spices *Qater university Sci. J*. **13** (1), 63-69

Frazier, W.C. ; Westhoff, (1967). "Foods Microbiology" . 3rd edn, MC Graw- itill, New York, U.S.A.

Jamil, R. M. (2002). Antibacterial effects of extracts from *Trigonella foenum gracum*. *Jordan J. Appli. Sci*. 24-25.

Kornman, S.H.; Cohen, E.; preminiger, A. (2001). Pseudo maple syrap urin discrease deu to maternal prental ingestion of fenugreek. *J. Pacdiatr Child Health Amg*., **37**(4).

Koneman, E.W.; Allen, S. D.; Janda, W. A.; Schreck enberger, P.C. ; Winn, W.C. (1997). "Color Atlas and Text Book of Diagnostic Microbiology". 5th edn. Lippin cott – Raven Publishers, Philadelphia, USA.

Mishkinsky, J.S.; Goldsmied , A.; Joseph, B.A.; Sulman, F.G. (1977). Hypoglycemic effect of *Trigonella foenum gracum* and Lupius (Lequminosae) seeds and their major alkaloids in alloxan – diabetic and normalra pahlari – *med, J. Jan*; **8** (1), 14-25.

Schella, G.G.; Augesti, K.T. (1992). Antidiabetic effect of sally ly stein sulphoxide isolated from garlic, *Indian J. Exp. Bio*, **30**, 420-426.

Shareef, A.Y. (1998). The molecular effect of some plants extract on the growth and methabolism of some gram positive and gram negative bacteria. Ph. D. Thesis, College of Science., University of Mosul, Iraq.

Stepinska, M.; Grazymbowski, J.; Struzyna, J.; Olszowska, M.; Jablonka, H.; Chomicka, M.; Choiczewski, K. (1995). Mouse model of infected wound. *Acta Microbial*. *Pol*. **44**(1), 39-46.

Wange, S.K.; Hedin, P.A. (1985). Quercetin -3-0-galactosyl (1-6) gulucoside, a compound from narrow Leafreted with antimicrobial activity . *Phytochem*. **24**, 243-245.

Wichti, M. ; Bisset, N,G. (1994). "Foenumgracci Semen. Fenugreck Seeds, Trigonella, in Herbal Drugs and phytopharmacenticals". CRC Press, Stuttgart. pp. 203-205.