A study of effect of ethanolic extract of propolis on growth of *in vitro Staphylococcus aureus*

دراســـــة تأثير المستـــــخلص الكـحولـي للبربولس في نمو بكتريا المكـــورات العنقـــوديـة الذهبيـــة خارج الجسم الحي .

م.م. بشرى عباس الزبيدي / جامعة الكوفة / كلية التربية للبنات

الخلاصة //

تضمنت هذه الدراسة معرفة تأثير المواد الفعالة المستخلصة بالكحول الاثيلي من مادة البربولس propolis في تثبيط نمو بكتريا المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* خـارج الجسم الحي *in vitro* وذلك لأهميتها ألسريريه بصفتها من البكتريا المرضية المسببة للعديد من الأخماج في الإنسان. وأجريت هذه الدراسة في مختبر الأحياء المجهرية التابع لقسم علوم الحياة في كلية التربية للبنات في جامعة الكوفة للفترة من الاول من اذار ولغاية الخامس عشر من حزيران لعام 2008 .

وقد بينت نتائج الكشف التمهيدي للمستخلص الكحولي للبربولس انه يحتوي على مواد فعالة مثـــــل القلويـــدات alkaloids والمركبات الفينولية التي تضم الفلافونات flavonids والكومارين coumarin والتانينـات tannins وكما يحتوي على التربنيات terpin وبلغ اعلى معدل للقطر التثبيطي للمستخلـص الكحولـــي (23) ملـم عند التركيـــــز (100)ملغم/ مل.

Abstract

This study was aimed to find the effect of the active components in propolis which were extracted by ethyl-alcohol on inhibition of the growth of *Staphylococcus aureus* for it is clinical importance us the causative agent of numerous disease. The present study was conducted in microbiology laboratory Department of biology of education of girls college ,of Kufa University in 1\3 at 15\6\2008. This study proved from the preliminary chemical (filtration) test that; the ethanolic extractof propolis contains phenolic compounds(Flavonids,Tannins,Coumarin).Alkaloids and terpin ,the propolis extract was effected in inhibition growth of *S. aureus* and the highest inhibition zone diameter was (23)mm in concentration (100)mg\m1.

KEY WORDS

Propolis , bee glue *Staphylococcus aureus*

ألمقدمة //

تعد البكتريا المرضية *Staphylococcus aureus* من أكثر الاحياء المجهرية المسببة لأخماج الأنســان والحيـــوان علـــى حد ســـواء و هي المسبب الرئيسي للكثير من الحالات المرضية والوفيات في كل من اصابات المستشفيات والمجتمع المكتسبة ويزداد خطر الاصابة في حالات النقص المناعي (1)، وان أمراضية بكتريا المكورات العنقودية الذهبية ناتجة من مكونات جدارها الخلوي الذي بواسطته تقاوم ميكانيكيـــات الدفاع الطبيعية للمضيف وبذلك تثبت هذه البكتريا نفسها مشتركة مع قابليتها لأنتاج الذيفانات والانزيمات التي لها دور في تطور الإصابة وظهور الأعراض . وهناك عوامل اخرى تشترك في الامراضية كالفيروسات او وجود امراض مزمنة او إصابات الجلد والحروق وغيرها (2) .

وهذه البكتريا واسعة الانتشار في الطبيعة توجد في الفم والدم والجزء الأعلى من القناة التنفسية والغدد اللبنية والقناة التناسلية والتي تسبب الالتهابات والتقيحات (3)(4) وتكون اكبر نسبة لحاملي هذه البكتريا في المستشفيات بين المنتسبين والمرضى اذ يكون محيطها محملا بهذه البكتريا حيث تسبب التهابات موضعية متقيحة فعدت المسبب الخطير لأصابات المستشفيات في الولايات المتحدة (5) وتتميز بكتريا المكورات العنقودية الذهبية بمقاومتها الطبيعية للعديد من المضادات الحيوية كونها تمتلك آليات مختلفة تساعدها على المقاومة منها أنتاج الإنزيمات القادرة على تحويل جزيئة المضاد الحيوي إلى مادة غير فعالة كذلك تغير موقع الهدف الذي يعمل عليه المضاد الحيوي بالطفرات الوراثية وغيرها من الآليات التي سببت فشل المضادات الحيوية في القضاء على هذه البكتريا . كما أن الاستخدام الواسع للمضادات الحيوية وبشكل عشوائي ودون أتمام العلاج أدى إلى تفاقم المشكلة (6)(7) ،مما دعا المختصين للبحث عن مصادر جديدة للمضادات الميكروبية تستعمل كبدائل عن المضادات التقليدية ولجأ الكثير من العلماء و الباحثين إلى الطبيعة للحصول على مواد طبيعية كالنباتات والأعشاب والمواد الطبيعية واستخدامها كمضادات حيوية لمقاومة هذه البكتريا(8)(9)(10).

وقد اعتمدت هذه الدراسة على استخدام مادة البربولس propolis ويسمى ايضا العكبر ، صمغ النحل . باعتبارها مادة طبيعية غير سامه تنتجها شغالات نحـــل العســـل *Apis mellifera* من قلف وبراعم بعض النباتات تستعملها في تضييق مدخل الخلية في فصل الشتاء وتثبيت الأقراص الشمعية في سقوف الجحور التي تسكنها وتعقيم العيون السداسية التي تضع فيها الملكه البيض(11) وقد استعملت هذه المادة منذ القرن التاسع عشر في علاج الجروح والحروق والأورام الخبيثة ويعتقد أنها علاج ناجـــح لكثير من الأمراض كالبرد والتهاب اللثة وقرحة المعدة (11) وذلك لما تمتلكه من تركيب كيميائي معقد يختلف باختلاف المصدر النباتي ، ولكنها في أكثر الأحيان تحتوي على العديد من الفيتامينات و المعادن و صموغ وشمع العسل وزيوت طياره وحبوب لقاح ومواد عضويه وقد أمكن تجزئة هذا المواد والتعرف على مكوناتها العديدة التي غالبيتها فلافونات و أحماض عضويه(12)وقد أكدت العديد من الدراسات ان مادة البربولس ذات فعل تضادي واسع للعديد من البكتريا و الفطريات و الفايروســات (13).

وعلى ضوء ماتقدم لغرض التعرف على الفعالية البايولوجيه للمستخلص الكحولي لمادة البربولس propolis ضد بكتريا المكورات العنقودية الذهبية بدلا من المضادات الحياتية أجريت هذه الدراسة. الهدف من الدراسة

- استخلاص المواد الفعالة في مادة البربولس بالكحول الاثيلي .
- اختبار الفعالية التضادية للمواد المفصولة على تلك البكتريا في الوسط ألزرعي .

المواد وطرق العمل Material and Method :-

السلالات البكتيرية bacterial strains

تم الحصول على7عزلات لبكتريا المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* مشخصة من مختبرالبكتريولوجي في مستشفى الحكيم في النجف معزولة من وسط غراء الدم من تقيحات مرضى مصابين بحروق من الدرجة الثانية و الثالثة.

مادة البربولس propolis

جمعت كميه كافيه من مادة البربولس من المناحل الموجودة في محافظة النجف الاشرف وتركت لتجـف بدرجـة حـــرارة الغرفة 25م ° وذلك لعدة أيام ، ثم سحقت بالمطحنة وحفظت في الثلاجة لحين الاستعمال .(10)

تحضير المستخلص الكحولي لمادة البربولس

تم تحضير المستخلص بوزن 20غم من المادة الجافة وتم إضافة 400مل من الكحول الاثيلي بتركيز 95% ووضعت في جهاز الساكسوليت لمدة 24ساعة ثم وضعت المادة المستخلصة في أطباق وتركت لتجف في الحاضنة بدرجة حرارة 40 م° (10).

الكواشف التمهيدية الترسيبية (الاستدلالية) لمجاميع المركبات الكيميائية الثانوية لمادة البربولس في المستخلص الكحولي :وتشمل

أ- كواشف التربينات Terpenoid reagents

١) كاشف الرغوة Foam reagent

يستعمل هذا الكاشف للدلالة على وجود الصابونين برج قنينة محكمة الإغلاق تحتوي على مستخلص كلورفورم او مائي للنموذج وعند ظهور رغوة كثيفة فوق سطح المستخلص توصف النتيجة موجبة (14)

2) كاشف كلوريد ألزئبقيك HgCL2 reagnt

يستعمل هذا الكاشف للدلالة على وجود الصابونين اذ يضاف (1-2) مل من كلوريد ألزئبقيك إلى (5) مل من المستخلص الكوروفورم عند ذلك يظهر راسب أبيض دليلا على وجود المواد التربينية (15).

ب - كواشف الفينولات Phenols reagents

١) كاشف خلات الرصاص Lead acetate reagent

يفيد في الكشف عن التانينات اذ تضاف كمية من الكاشف إلى كمية من المستخلص الكحولي او المائي فيظهر راسب ابيض هلامي القوام (16) .

٢) كاشف كلوريد الحديديك 1 % FeCI3 reagent

يفيد في الكشف عن التانينات اليسيرة وذلك بإضافة كمية من الكاشف الى كمية مساوية من المستخلص المائي فيظهر راسب اخضر مزرق (14) .

ج - كواشف القلويدات Alkaloids reagents

١) كاشف ماير Mayer's reagent

يفيد في الكشف عن عموم القلويدات ، يتم الكشف باخذ (1-2) مل من الكاشف الى 5 مل من المستخلص النباتي الذي تم الحصول عليه بالماء او الكحول فيظهر راسب ابيض الى اسمر (17) .

٢) كاشف حامض التانيك 1% Tannic acid reagent

يستعمل الحامض التانيك1% لترسيب القلويدات اذ يضاف من (1-2) مل من الحامض المحضر الى 5 مل من المستخلص المائي والكحولي فيظهر تعكر ابيض (18) .

تحضير تركيز المستخلص الكحولي

لغرض تحضير المحلول الخزين Stock solution للمستخلص الكحولي اخذ 2غم من مسحوق المستخلص واذيب في 10مل من الماء معقم فأصبح لدينا محلول خزين بتركيز (200)ملغم/مل،تم ترشيح المحلول باستخدام أوراق الترشيحMillipore No.1 للتخلص من الملوثات الجرثومية الموجودة فيه استخدم هذا المحلول كمصدر لعمل التراكيز (100,50) ملغم/مل (19).

دراسة تأثير المستخلص الكحولي للبربولس في نمو البكتريا .

تم اخذ(4 – 5) مستعمرات نقية ونقلت باستخدام عروة الناقل الى أنابيب اختبار حاوية 5 مل من الماء المقطر ولحين ظهور العكورة عندها تم مقارنة الانابيب مع انبوبة ماكفرلاند القياسية رقم 5 وباستعمال الماء المقطر تم تعديل كثافة الأنابيب حتى تساوي كثافة انبوبة ماكفرلاند وباستعمال ماسحة قطنية معقمة نشرت البكتريا على وسط غراء مولر هنتون الصلب وتركت الأطباق لمدة 15 دقيقة لتجف بعدها تم عمل حفرة بواسطة الثاقب الفليني Crock porer بواقع ثلاث حفر لكل تركيز حفرة بعدها أضيف تركيز معين من المستخلص الكحولي للبربولس بكل حفرة حضنت الأطباق بدرجة حرارة 37° لمدة 24ساعة في الحاضنة ثم قرأت النتائج بقياس قطر منطقة التثبيط (17).

التحليل الإحصائي //

حللت النتائج على وفق نموذج التجارب العاملية باستعمال التصميم تام التعشية (.L.S.D) على مستوى احتمال(0.05) لاختبارمعنوية الفروق بين التراكيز(19) ٠

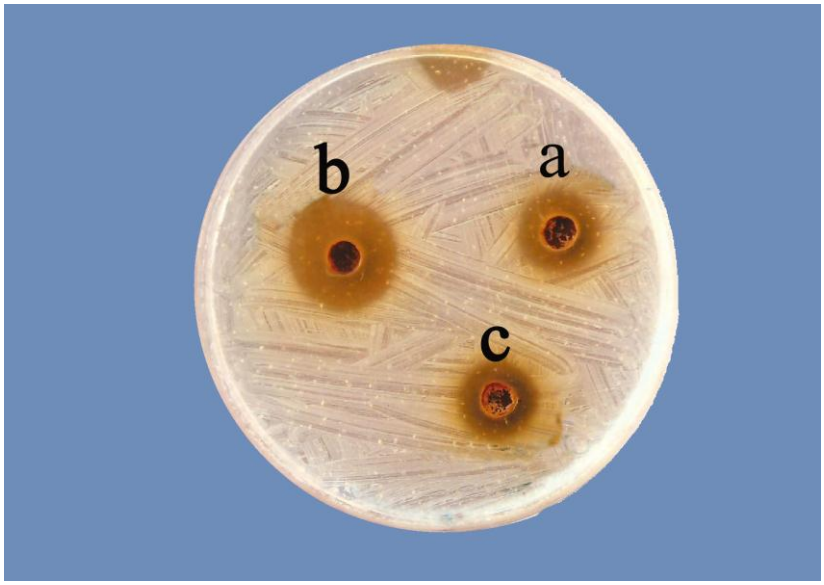
النتائج والمناقشة

أوضحت نتائج الكشف التمهيدي ان مادة البربولس propolis تحتوي على العديد من المركبات الفعالة ومن أهمها الفينولات phenolic compounds وتضم الفلافونات (Flavonids والكومارين coumarin والتانينات tannins) والقلويدات alkaloids والتربينات terpins جدول رقم (1).

كما أظهرت النتائج ان بكتريا المكورات العنقودية الذهبية كانت حساسة للمستخلص الكحولي للبربولس ،اذ بلغ معدل أقطار التثبيط للتراكيز (50، 100 ، 200)ملغ/ مل,(16، 23 ،19)ملم على التوالي شكل (١)وجدول رقم (٢).

جدول (١) : الكشف الكيميائي التمهيدي عن المركبات الفعالة في المستخلص الكحولي لمادة البربولس.

الكواشف	ت	اسم الكشف	النتيجة
كواشف الفينولات	1	1% خلات الرصاص	++
	2	1% كلوريد الحديديك	+++
	3	1% هيدروكسيد البوتاسيوم	++
كواشف القلويدات	4	كاشف ماير	++
	5	كاشف دركندروف	++
	6	كاشف حامض التانيك	+
كواشف التربينات	7	كلوريد الزئبقيك	+
	8	كاشف الرغوة	+



شكل (١) التأثير المضاد لنمو بكتريا المكورات العنقودية الذهبية على وسط مولر هنتون الصلب للمستخلص الكحولي للبربولس a / تركيز 50 ملغ / مل, b / تركيز 100 ملغ / مل , c / تركيز 200 ملغ /مل

جدول (٢) : تركيز المستخلص الكحولي للبربولس معدل قطر منطقة التثبيط لبكتريا المكورات العنقودية الذهبية

تركيز المستخلص الكحولي للبربولس ملغم\مل	معدل قطرمنطقة التثبيط لبكتريا المكورات العنقودية الذهبية(ملم)
50	16
100	23
200	19
L.S.D.(0.05)	2.7

وقد يعزى التأثير المثبط للمستخلص الكحولي لمادة البربولس الى وجود المركبات الفينولية التي لها فعالية تثبيطية على الجراثيم السالبة والموجبة لصبغة كرام (20) حيث تقوم الفينولات بمسخ البروتين في الكائن الحي المجهري وايقاف فعل الانزيمات المسؤولة عن التفاعلات الايضية الاساسية وبالتالي عدم قدرة الكائن الحي على الاستمرار(21)وخاصة مركبات الفلافونات Flavonids والتي يعدها الباحثون من أهم المركبات الرئيسية ذات الفعالية البيولوجية في البر بولس(22)(23) واليها تعزى الخواص المضادة للالتهابات في هذه المادة(24)(25).كما اضهرت الدراسة ان التركيز 100 ملغم كان اكثر التراكيز تأثيرا في ثبيط نمو البكتريا وقد يعود هذا التاثير الى وجود الفلافونات ضمن هذا التركيز هو الذي يلعب دورا في فعاليةخلاصة البربولس فقد وجد ان تركيز الفلافونات يختلف بشكل كبير من عينة الى اخرى حسب مصدرها الجغرافي (26).

وقد اتفقت نتائج هذه الدراسه مع ماتوصل اليه الباحث Gonsales واخرون عام 2006 الذي اثبت ان المستخلص الكحولي للبربولس ذو تاثير مضاد للبكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام ويرجع هذا التاثيرالى مايحتوية البربولس من فلافونات(27) كما اتفقت مع Oksuواخرون عام 2005الذي وجدفي دراسه اجراها على ارانب تم حقنها ببكتريا المكورات العنقودية الذهبية ان للمستخلص الكحولي للبربولس كان مضادا فعالا ضد هذه البكتريا والالتهابات الناتجة عنها(28).

كماوجدت بعض الدراسات ان خلاصه البربولس اظهرت فعاليه قويه ضد انواع عديدة من البكتريا المقاومة للمضادات الحيوية (29) والفطريات والفيروسات والابتدائيات (30) كما وجد ان التانينات تعد سامة للفطريات الخيطية والخمائر والبكتريا من خلال ارتباطها بجدار تلك الأحياء مسببة منع نموها (31) كماقد تعزى الفعالية التثبيطية لمادة البربولس الى وجود القلويدات التي تعد من المركبات الكيميائية الفعالة في النباتات الطبية وهي واحدة من نواتج الايض الثانوي للبروتينات وهي مركبات نايتروجينية قاعدية تنتشـــر فـــي كل من المملكتين النباتية و الحيوانية (14)يتصف العديد منها بخواص دوائية **pharmacological**

properties تساعد في علاج الجروح والحروق وأشار عدد من الباحثين إلى أن لها تأثير في تخفيف الآلام و وارتخاء التشنجات وبعضها ذات فعل تضادي واسع للجراثيم (32).

الاستنتاجات والتوصيات //

من خلال نتائج الدراسة الحالية نستنتج بان المستخلص الكحولي للبربولس كان فعالا في تثبيط نمو بكتريا المكورات العنقودية الذهبية لذا نوصي بعمل مزيد من الأبحاث التي تتناول الكشف عن المركبات الفعالة في البربولس والتي لها فعالية مضادة للبكتريا واختبار هذة الفعالية ضد الانواع المختلفة من البكتريا المرضية.

References

1.Gesham, H.D. , Lowrance. J. H., Caver. T.E. , Wilson. B.S., Cheung. A.L. and Lindberg. F.P .2000.Survivial of *staphylococcus aureus* inside Neutrophils contributes to infection. *J Immunology*;164:3713-3722.

2.Etinne, J., Brun.Y.and Fleurette. J.1988. Characterization of clinically significant isolates of *Staphylococcus* epidermidis from patients with Endocarditis . J . *Clin Microbiol* . 26(4):613-617.

3.Collee, J.G.,Fraser. A.G., Marmion . B.P., and Simmons. A. Mackie and McCartney .1996. Practical Medical Microbiology 14th edition .church :I Livingstone , NEW York .

4.Jean, P.,Darbas. H., Jean. A. and Boyer. G.1989. pathogencity in tow Cases of *Staphylococcus* . Shellfire a recently described species . *J . Clin . Micro* . 27:2110-2119.

5.Smith,T.2003.The emergence of vancaomycin resistance *Staphylococcus aureus* (Vrsa) .Internet at WWW. Omedon – couk /shadow .

6. Aledort, J. , Laxminaran. R., Howard D,Seiguer. E. and Weldon .S.2000. International works sho pon antibiotic resistantce. Global policies and Option center for Interation Development. Harvard University:1 -22.

7.Wise, R. , Hart. T., Cars. O., Strenleus. M., Helmuth. R. and others .1998. Antimicrobial Resistance .*B M J*.317:609-610 .

8. Almasaudi, S.B. (1991) .Antimicrobial resistance and gene transfer in *Staphylococcus*

9. Russel,A.D.(1997).Plasmids and bacterial resistance *zzzzzzzureus*J.Appl.Bacteriol.70:279-290 to biocides *J.Appl.Microbiol*. 83:155-165.

10. Dolci ,P. and Ozino,O.I.2003. Study of the in vitro sensitivity to honey bee propolis of microbiology,53:233-243.

11. Brumfitt, W.,Hamilton – Miller .J.M.T. and Franklin. I .1990. Antibiotic activity of natural Products :1.propolis . *Microbios* :19-29.

12. Strenl, E.,Vohpert.R.and Eltner. E.F . 1994.Biochemical activities of propolis extracts . III . Inhibition of denydrofolate reductase . *Z. Natur forsch* (c) . 49:39-43.

13. Grange, J.M.and Davey. R.W.1990.Antibacterial properties of propolis(bee glue).*JR. SOC. MED* . 83:159-160.

14. Harborn, G.B.1984.Phytochemical Methods .A guide to modern techniques of plants analysis second Ed. Chapman and hall. London, New York .

15.المختار ، انتصار جواد عبد .(1999) . دراسة الخصائص الدوائية لبعض النباتات الطبية في بعض الديدان الطفيلية في الفئران المختبرية رسالة ماجستير - علوم - كلية الطب البيطري - جامعة بغداد .

16. السلامي، وجية مظهر. (1998) . تأثير مستخلصات نباتي المديد و الهندال في الأداء الحياتي لحشره من الحنطة *Schizaphis graminum* . اطروحة دكتوراه - كلية العلوم - جامعة بابل.

17. الرماحي ، سهير عبد الكريم حبيب . (2006) . دراسة الفعالية التضادية لمستخلصات اوراق نباتي اليوكالبتوس و الزعتر في جرثومة *Staphylococcus aureus* خارج جسم الفئران البيض وداخله . رسالة ماجستير - كلية التربية للبنات - جامعة الكوفة .

18.الدرويش ، مصطفى . (1983) . موجز في علم العقاقير الطبية . ، طـ ٢ ، الهيئة العامة للتعليم و التدريس في وزارة الصحة .

19 .الراوي،خاشع محمود وخلف الله ،عبد العزيز محمد.2000 .تصميم وتحليل التجارب الزراعية. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي.دار الكتب للطباعة والنشر جامعة الموصل .488.

20 .الاسدي، اخلاص حاتم عبد الامير .(2000). تأثير الكلتين المعزول من بذور الحبة السوداء *Nigella sativa* في مستوى السكر و كلسترول و بروتينات مصل الدم . رسالة ماجستير . كلية الطب البيطري - جامعة بغداد .

21.ألسلامي ، نبراس يحيى عبدا لله .2000 .دراسة تاثير مستخلص نباتي الياس*Myrtus communis L.* والثوم *Allium stavium L* في بكتريا *Pseudomonas*. رسالة ماجستير - كلية التربية للبنات - جامعة الكوفة .

22.Amoros, M., Lurton. E., Boustie. J.,Gime.L., Savvajer. F. and Cormier. M. 1994.Comparison of the anti – herpes simplex virus activity of propolis and 3.methyl – but . 2eny l caffeate. *Joarnal of Natural products* . 57:644-647.

23.Bonhevi, J.S. and Jorda. R.E. 1994. The composition active components and bacteriostatic activity of propolisin dietetics . *J. Am . Oil Chem. Soc*71:532-538.

24. Burdock, G.A.1998. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis *Food Chem Toxicol* . 36:347-363.

25.Ghisalberti, E.L . 1979. Propolis :a review .Bee world .60:59-84.

26..Kumer, N.,Mueen Ahmed,K.K., Raman dang and Ahmed Husain.2008. Antioxidant and antimicrobial activity of propolis from Tamil Nadu zone. *Journal of medicinal Plant Resaech* .2(12):361-364

27.Gonzales,G.Z.,Orsi. R.O.,Fernandes Junior. A., Rodregues.P.and Funari.S.R.C. 2006. Antibacterial activity of propolis collected in deferent regions of Brazil . *j .Venom. Anim. Toxions incl. Trop.Dis.*12(2):590-596.

28.Oksu,H.,Duran.,n.Tamer.C,.Cetin.m.andSilici.s.2005.Eeffect of propolis in the treatment of experimental Staphylococcus aureus keratitis in rabbits .*Ophthalmic.* 37:328-334.

29.Stan,S.,Szymon.D.,Krystian.W.K.,Marek.R.,Anna.T.and Jashovam.S.1999.Synergism between ethanolic extract of propolis (EEP) and anti –tuberculosis drugs of Mycobacteria.*Z.Naturforsch*.54:549-553.

30.Ahmed, G. and Faten, K.A. 2000 .Egyptian propolis: 1-Antimicrobial activity and chemical composition of upper Egypt propolis. *Z.Naturforsch.*56:82-88.

31.Jones,G.A., Macalliser.T.A., Muri.A.D.and Cheng .K.J. 1984. Effects of sainfion Conobrychis and proteolysis by four of luminal Bacteria.Appl .*Envirom – Microbial* .60:1374-1378.

32.Tyler,V.E.,Brady.L.D.and Robbes .1988. pharmacology 9th .ed .Philadelphia.