دراسة الفعالية التثبيطية المايكروبية لبعض المستخلصات النباتية لنبات البفسج *Viola odorata L.* في نمو بعض أنواع البكتريا المرضية

Study of antimicrobial activity of some active secondary compounds for *Viola odorata* on growth for some types of bacteria

بشرى محمد جابرعلوش   شذى ذنون أحمد
كلية العلوم للبنات / جامعة بغداد

Bushra M.Jaber Alwash   Shatha T.Ahmed
Science collage for women/ Baghdad University

المستخلص

أجريت الدراسة لمعرفة الفعالية التثبيطية للمستخلص الكحولي (الميثانولي) والقلويدي والفلافونويدي لاوراق وجذورنبات البفسج *Viola odorata* وبالتراكيز(1، 1.5، 2، 2.5، 3) ملغم /مليليترلكل مستخلص تجاه بعض العزلات البكتيرية متمثلة بـ *Staphylococcus aureus*، *Bacillus subtilis*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Escherichia coli* *Klebsiella sp.* وذلك بأستخدام طريقة الانتشار بالأقراص (Disk diffusion method) حيث تم تقدير الفعالية التثبيطية المايكروبية للمستخلصات تجاه العزلات اعلاه بقياس قطر منطقة التثبيط . أظهرت النتائج وجود تباين في الفعالية التثبيطية لكل مستخلص تجاه مختلف العزلات ، حيث أظهرت القلويدات فعالية تثبيطية عالية ضد كل أنواع البكتريا مقارنة بالمستخلص الكحولي والفلافونويدي على التوالي ، وقد تزايدت الفعالية التثبيطية بازدياد التركيز إذ أعطى التركيز الأخير 3 ملغم / مليليتر أعلى قدرة تثبيطية وكانت بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* هي الأكثر تأثرا حيث بلغ معدل قطر منطقة التثبيط 25 مليمتر بينما كانت بكتريا *E.coli* هي الأقل تأثرا حيث بلغ قطر منطقة التثبيط 10 مليمتر . في حين أعطى المستخلص الكحولي أعلى قدرة تثبيطية تجاه بكتريا *S.aureus* حيث بلغ معدل قطر منطقة التثبيط 21مليمتر مع انعدام وجود تأثير تثبيطي لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* و *Klebsiella* sp. اما بالنسبة للفلافونويدات فقد أظهرت أعلى قدرة تثبيطية تجاه بكتريا *Pseudomonas* حيث بلغ معدل قطر منطقة التثبيط 13 مليمتر مع انعدام التأثير التثبيطي لبكتريا *Klesiella Sp.* , *E.coli* .

Abstract

The study was conducted to track the inhibitory activity of methanolic, flavinoid and alkaloid extracts of *Viola odorata* with concentrations (1, 1.5, 2, 2.5, 3) mg/ml on some bacterial species represented by S. *aureus, Bacillus subtilis, Pseudomonas aeruginosa, E.coli and Klesiella* sp, by using disk-diffusion method and estimated inhibitory activity of extracts on bacteria by measuring the Diametric of zone inhibition. The results showed a difference in the effect of each extract for the types of bacteria, the alkaloid gave a strong inhibitory ability against all types of bacteria compared with the methanolic extract and flavinoid respectively; this activity was enhanced with the increasing of extracts concentrations and the (3) mg/ml concentration gave highest activity, *Pseudomonas aeruginosa* was the most effective one, where the diameter of zone inhibition (25) mm at this concentration while *E.coli* was the least testing bacteria effective by the concentration and the diameter of zone inhibition was (10) mm. Methanolic extract showed antimicrobial highest activity on S. *aureus,* the diameter of zone inhibition was (21) mm with no antimicrobial activity on *Pseudomonas aeruginosa* and *Klesiella* sp, while the flavinoid showed highest activity on *Pseudomonas aeruginosa*, the diameter of zone inhibition was (13) mm with no antimicrobial activity against *Klesiella* sp. and *E.coli*.

Created with nitro PDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

المقدمة

نبات البنفسج *Viola odorata* L. نبات عشبي زهري زاحف من عائلة الـ Violaceae ، ازهاره بنفسجية او بيضاء احيانا ذات تويج خماسي البتلات وذات رائحة عطرية تظهر في فصلي الربيع والخريف ،وله اوراق قلبية الشكل مسننة ، جذوره ليفية ،اصله من اسيا واوربا وينتشر في العديد من الدول كونه ينمو في اغلب انواع الترب ، فيزرع في الحدائق وفي الاسيجه الشجيرية[2,1]. ويطلق على البنفسج عدة تسميات مثل بنفشه Bnafshah، بنوشه Bnausha ، بنفسج عطر[3,2] .

يعد نبات البنفسج احد النباتات ذات الاستخدامات الطبية الواسعة منذ القدم وذلك لاحتوائه على العديد من المركبات الفعالة ، كالقلويدات والفلافونويدات والزيوت الطيارة والصابونيات ، ذات الاهمية الطبية حيث استخدم كملين ومقيء ومقشع [4,3] . كما ويستخدم في علاج الحروق وخافض للحرارة وضغط الدم ، وعلاج الربو وامراض الجهاز التنفسي ، ومضاد للكثير من الالتهابات الناتجه عن البكتريا ومضاد للسرطان خصوصا سرطان عنق الرحم والثدي والغدد اللمفاوية [5,4] ، كما وتعد ازهار البنفسج مصدرا للعطور والالوان .

ونظرا لأحتواء الأجزاء المختلفة من النبات على مواد فعالة لها الأثر في تثبيط وقتل الكائنات الحية المجهرية . هدفت هذه الدراسة إلى تقييم فعالية المستخلص الميثانولي والقلويدي والفلافونويدي لاوراق وجذور نبات البنفسج تجاه بعض العزلات البكتيرية باستخدام طريقة الانتشار بالأقراص (Disk diffusion method) .

المواد وطرائق العمل:

1. عملية الاستخلاص

جمع العينات النباتية: تم جمع اوراق وجذور نبات البنفسج خلال فترة شهر حزيران وتموز من مشاتل مدينة بغداد ، ثم شخصت العينات في معشب كلية العلوم / جامعة بغداد . غسلت الاجزاء النباتية وجففت في الظل بعيدا عن الرطوبة وبدرجة 30- 40 م ولمدة 10 ايام ، طحن النبات وخزن لحين الاستخدام .

تحضير المستخلص الكحولي: وزن 50 غم من اوراق وجذور النبات ، واجريت عملية الاستخلاص باستخدام 300 مل من الميثانول (95%) لمدة 10 ساعات .

تحضير المستخلص القلويدي: وزن 50 غم من النبات واجريت عملية الاستخلاص حسب[6] .

تحضير المستخلص الفلافونويدي: وزن 50 غم من النبات واجريت عملية الاستخلاص حسب[7] .

تم تجفيف المستخلص (الميثانولي ، القلويدي ، الفلافونويدي) باستخدام المبخر الدوار .

الكشف عن المركبات الكيميائية

1- **الكشف عن القلويدات :** اتبعت الطريقة كما ورد في [7] .

2- **الكشف عن الفلافونويدات :** استخدمت الطريقة المتبعة كما ورد في [8] .

2. تحضير الأوساط الزرعية

حضرت الأوساط الزرعية المدرجة في أدناه حسب النشرة المرفقة من قبل الشركة المجهزة (Oxoid) ، عدل الرقم الهيدروجيني للأوساط عند الرقم (7) ومن ثم عقمت بجهاز المؤصدة عند درجة حرارة 121م وضغط 15 باوند /انج^2 ولمدة (15) دقيقة ، واشتملت الأوساط على :

1. وسط الأكار المغذي Nutrient Agar (NA)
2. وسط المرق المغذي Nutrient Broth (NB)
3. وسط أكار مولر –هنتون Muller –Hinton Agar

العزلات البكتيرية

تم الحصول على العزلات البكتيرية المختبرة والمشخصة من مختبرات مركز التقنيات الإحيائية / جامعة النهرين

تحضير عالق البكتريا

حضر عالق البكتريا وذلك بنقل جزء من المزروع البكتيري النامي على الأوساط الزرعية الصلبة للأنواع البكتيرية قيد الدراسة إلى أنابيب اختبار حاوية على (10) مل من الوسط (NB) وبعد مدة حضانة (18) ساعة وبدرجة حرارة 37م عملت تخافيف للمزروع وحددت الكثافة الضوئية للمزروع باستخدام جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer وعلى طول موجي قدره (420) نانوميتر .

3. تأثيرفعالية المستخص الميثانولي والفلافونويدات والقلويدات لنبات البنفسج تجاه الأنواع البكتيرية المختبرة

حضر المحلول الاساس (Stock solution) بإذابة 0.2غم لكل من المسحوق الجاف للمستخلصات الثلاثة (الميثانولي ، القلويدي ، الفلافونويدي) كلا على انفراد في 4 مليليتر من الماء المقطر المعقم للحصول على تركيز

Created with nitro PDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

50 ملغم / مليليتر وعقم بالترشيح باستخدام مرشحات بقطر 0.2Mμ ، ثم حضرت منه التراكيز النهائية (1 ، 1.5 ، 2 ، 2.5 ، 3) ملغم /مل وتم ذلك بأضافة (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6) مليليتر من المحلول الاساس لكل مستخلص الى (9.8, 9.7, 9.6, 9.5, 9.4) مليليتر من الماء المقطر المعقم على التوالي ليصبح الحجم النهائي لكل تركيز 10 مليليتر .

استخدمت طريقة الأنتشار بالأقراص (Disk diffusion method) لمعرفة تأثير كل مستخلص تجاه البكتريا قيد الدراسة ، إذ لقح وسط أكار مولر –هنتون بواسطة (مسحة) معقمة (Sterile swab) من العالق البكتيري ، وشبعت أقراص من ورق الترشيح المعقمة نوع Whatmann No.1 وبقطر 6 ملم بـ 50 مايكرولتر من كل تركيز من التراكيز المختلفة ولكل مستخلص ووزعت على سطح وسط أكار مولر- هنتون باستخدام ملقط معقم مع ترك قرص واحد كسيطرة مشبع بالماء المقطر المعقم فقط ، حضنت الأطباق بدرجة حرارة (37) م لمدة (24) ساعة ، حددت فعالية المستخلصات بقياس قطر منطقة التثبيط حول كل قرص [9] .

التحليل الأحصائي

حللت النتائج إحصائيا بالأعتماد على البرنامج SAS (2004) في تحليل نتائج تأثير التراكيز المختلفة من المستخلص الميثانولي والقلويدات والفلافونويدات في الأنواع المختلفة من البكتريا قيد الدراسة ، وقورنت الفروق بين المتوسطات باختبار LSD(Least Significant Difference) وحساب الاختلافات المعنوية بينها وعند مستوى المعنوية المحدد للاختبار (P= 0.05) [10] .

النتائج والمناقشة

جدول (1): نتائج الكشف العام عن المركبات الكيميائية الفعالة في المستخلص قيد الدراسة

المركب	الكاشف	المادة المتكونة
القلويدات	كاشف ماير	راسب ابيض
	كاشف واغنر	راسب بني
الفلافونويدات	كاشف شينودا	ظهورلون احمر لفترة طويلة.
	كاشف Wilson-Taubock	ظهور لون اخضر يرىبوضوح عند فحصه تحت الاشعة فوق البنفسجية بطول365 نانوميتر

يتضح من الجدول اعلاه وجود القلويدات والفلافونويدات التي تم استخلاصها من نبات البنفسج ، كما أظهرت نتائج التحليل الأحصائي وجود فعالية تثبيطية واضحة لكل من المستخلص الميثانولي والفلافونويدات والقلويدات لنبات البنفسج ضد معظم أنواع البكتريا قيد الدراسة ، ولكن أظهرت القلويدات فعالية عالية تجاه كل أنواع البكتريا مقارنة بالمستخلص الميثانولي والفلافونات على التوالي وظهرت فروقا معنوية واضحة بينهم ولاسيما التراكيز الثلاثة الأخيرة (2 ,2.5, 3) ملغم /مل وكما هو موضح في جدول (2).

جدول(2): مقارنة بين متوسطات أقطارمناطق التثبيط مقاسة بالمليمترللبكتريا بتأثير المستخلصات الثلاثة تحت تأثير التراكيز (2،2.5،3) ملغم /مل

الأنواع البكتيرية	تركيز المستخلص	نوع المستخلص: القلويدات	الميثانولي الخام	الفلافونويدات	LSD
	2	0	15	0	2.505*
S. aureus	2.5	12	19	0	2.782*
	3	15	21	10	3.048*
	2	15	0	0	2.505*
Bacillus subtilis	2.5	18	14	7	2.985*
	3	21	17	9	3.461*
	2	0	7	0	1.047*
E.coli	2.5	8	8	0	1.255*
	3	10	11	0	2.373*
Pseudomonas	2	18	0	0	2.670*
aeruginosa	2.5	21	0	10	3.522*
	3	25	0	13	3.849*
Klebsiella Sp.	2	8	0	0	1.163*
	2.5	12	0	0	1.847*
	3	16	0	0	2.657*

المتوسطات التي تحمل حروف مختلفة ضمن الصف الواحد تختلف معنويا فيما بينها.

* (P< 0.05) ns: non- significant, LSD: Least Significant Difference

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

كما أظهرت النتائج أيضا وجود علاقة طردية بين تراكيز المستخلصات ومعدل قطر منطقة التثبيط حيث تدرجت الزيادة في معدلات أقطار التثبيط بزيادة التركيز المستخدم لكل مستخلص ، وإن هناك فروقا معنوية واضحة بين تراكيز المستخلص تحت مستوى احتمالية P<o.o5 .

يلاحظ في جدول (3) ان المستخلص الميثانولي لنبات البنفسج له تأثير واضح في معدل نمو الأنواع البكتيرية من Gram –positive وهي *S.aureus* و*Bacillus subtilis* حيث بلغ معدل قطر التثبيط (21,17) ملم على التوالي عند التركيز 3 ملغم /مل في حين لم تظهر الأنواع البكتيرية الأخرى من Gram-negative أي حساسية تجاه التراكيز المختلفة من المستخلص باستثناء *E.coli* .

لقد جاءت نتائج هذه الدراسة متوافقة مع العديد من الدراسات الحديثة التي تم فيها اختبار فعالية المستخلصات الميثانولية المختلفة ومن ضمنها نبات البنفسج تجاه العديد من الكائنات الحية المجهرية [12,11,5] ، حيث كان لها الاثر الفعال في تثبيط البكتريا الموجبة وبعض الأنواع من البكتريا السالبة .

جدول(3): متوسطات أقطارمناطق التثبيط مقاسة بالمليمترللبكتريا بتأثيرالمستخلص الميثانولي لنبات البنفسج

الأنواع البكتيرية	التركيز (ملغم /مل)						LSD
	0	1	1.5	2	2.5	3	
S. aureus	0	0	0	15 b	19 a	21 a	3.163 *
Bacillus subtilis	0	0	0	0	14 b	17 a	2.887 *
E.coli	0	0	0	7 b	8 b	11 a	2.014 *
Pseudomonas aeruginosa	0	0	0	0	0	0	0.00 ns
Klebsiella Sp.	0	0	0	0	0	0	0.00 ns

المتوسطات التي تحمل حروف مختلفة ضمن الصف الواحد تختلف معنويا فيما بينها. (P< 0.05) * ns: non-significant, LSD: Least Significant Difference

اظهرت النتائج الموضحة في جدول (4) ان الفلافونويدات لها تأثيرا اقل في معدل نمو الانواع البكتيرية من G^+ وهي *S.aureus* و*Bacillus subtilis* مقارنة بالمستخلص الميثانولي حيث بلغ معدل قطر التثبيط (10، 9) ملم على التوالي عند التركيز 3 ملغم /مل في حين لم تظهر الأنواع البكتيرية الأخرى من G^- أي حساسية تجاه التراكيز المختلفة من الفلافونويدات باستثناء *Pseudomonas aeruginosa* حيث بلغ معدل قطر التثبيط (13) ملم .

إن هذه النتائج جاءت متفقة مع العديد من الدراسات التي تم فيها اختبار فعالية الفلافونويدات لوحدها تجاه العديد من البكتريا والتي أظهرت إن لها اثر فعال في تثبيط البكتريا الموجبة بالإضافة إلى بكتريا *Pseudomonas* [14,13] ويمكن أن تعزى القابلية في التثبيط على قدرة المركبات على تثبيط عمل إنزيم DNA gyrase او التأثير على وظيفة الغشاء السايتوبلازمي [16, 15].

جدول(4): متوسطات أقطار مناطق التثبيط مقاسة بالمليمترللبكتريا بتأثيرالفلافونويدات لنبات البنفسج

الأنواع البكتيرية	التركيز (ملغم /مل)						LSD
	0	1	1.5	2	2.5	3	
S. aureus	0	0	0	0	0	10	2.051 *
Bacillus subtilis	0	0	0	0	7 b	9 a	1.688 *
E.coli	0	0	0	0	0	0	0.00 ns
Pseudomonas aeruginosa	0	0	0	0	10 b	13 a	2.793 *
Klebsiella Sp.	0	0	0	0	0	0	0.00 ns

ان هذه النتائج تتفق مع دراسات أخرى أكدت فيها إن المستخلص الكحولي أفضل من الفلافونويدات في قدرته على تثبيط البكتريا لاحتواء المستخلص الكحولي على العديد من المركبات الثانوية الفعالة وأهمها الصابونيات والكلايكوسيدات والفينولات والسترويدات والقلويدات بالاضافة الى الفلافونويدات والتي لها الأثر الفعال في تثبيط أنواع كثيرة من الكائنات الحية المجهرية [18,17] ، وقد يعود السبب في انعدام التأثير التثبيطي لبعض

Created with nitro PDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

أنواع البكتريا إلى الاختلاف في النوع أو السلالة البكتيرية أو لطبيعة الجدار حيث تمتلك البكتريا السالبة جدارا خارجيا له حاجز ذاتي يمثل بغشاء مكون من مادة LPS وبروتينات معقدة ودهون فوسفاتية تمنع دخول الكثير من المواد المضادة الى داخل خلية البكتريا .

اخيرا أظهرت القلويدات تأثيرا واضحا وقويا في معدل نمو كل الأنواع البكتيرية من G^+ و G^- وهي *Pseudomonas aeruginosa*،*Bacillus subtilis* ، *Klebsiella sp.*، *S.aureus* ، *E.coli*. حيث بلغ معدل اقطار التثبيط (25،21،16،15،10) ملم على التوالي مقارنة بالسيطرة وكما هو موضح في جدول (5) وهذا يتفق مع نتائج العديد من الدراسات التي اوضحت ان للقلويدات تأثيرا تثبيطيا عاليا تجاه كل انواع البكتريا السالبة والموجبة من خلال تداخلها مع سلسلة التفاعلات الايضية اللازمة لنمو الكائن الحي وتكاثره وقد يؤثر قسم من القلويدات على بناء RNA وDNA وكذلك تثبيط القنوات والنواقل الايونية [20, 19] .

جدول(5): متوسطات أقطار مناطق التثبيط مقاسة بالمليمتر للبكتريا بتأثيرالقلويدات لنبات البنفسج

LSD	التركيز (ملغم /مل)						الأنواع البكتيرية
	3	2.5	2	1.5	1	0	
2.736	15	12	0	0	0	0	***S. aureus***
*	a	b					
3.562	21	18	15	0	0	0	***Bacillus subtilis***
*	a	ab	b				
2.338	10	8	0	0	0	0	***E.coli***
*	a	b					
3.985	25	21	18	0	0	0	***Pseudomonas aeruginosa***
*	a	b	b				
2.582	16	12	8	0	0	0	***Klebsiella* Sp.**
*	a	b	c				

المصادر

1. British Herbal Pharmacopeia (1996): British Herbal Medicine Association Publisher.
2. Townsend, C.C. and Gustine. (1980): Flora of Iraq .Ministry of Agriculture and Agrarian Reform .Republic of Iraq .Vol.4.
3. PDR for Herbal Medicines (1998): Medical Economic Company, 1st Ed, New Jersey, pp.1216-1217.
4. Yang, Y (2003): The Use of Violets in Traditional Chinese Medicine .The Violet Society Journal.Vol.5, issue 4.
5. Arora,D.S and Kuur,G.J.(2007): Antibacterial activity of some Indian medicinal plants.J.Nat.Med .61:313-317.
6. The British Pharmacopeia Codex (2006): Viola odorata .Published by direction of the council of the pharmaceutical society of Great Britain, 1911.
7. حسان منجد ومحمد عصام حسن اغا . (1998):كيمياء العقاقيروالاستخلاص (الجزء العملي) . منشورات جامعة دمشق .
8. Wagner, H., Bladt, S. and Zgainsk, E.M.(1984):Plant drug analysis. Springer-Verlag:Berlin, Heldeberg, New York.Tokio.
9. NCCLs (National Committee for Clinical Laboratory Standards). (2002)Methods for dilution, antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, Approved standards-M100-S12. Wayen Pa, USA.
10. SAS. (2004): SAS/STAT Users Guide for Personal Computers. Release 6.12.SAS Institute Inc., Cary, NC. USA. (SAS=Statistical Analysis System).
11. Shahidi banjar, G.H. (2004): Evaluation of antibacterial properties of Iranian medical -plants against *Micrococcus luteus*, Serratia *marcescens*,*Klebsiella pneumoniae* and *Bordetella bronchoseptica.*Asian J. plant sciences.3 (1): 82-86.

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

12. Pasha,C; Shaik Sayeed, M.D; Sadath Ali, M.d and Ziaullah, K. (2009): Antisalmonella Activity of Selected Medicinal Plants. Turk J Biol, 33: (59-64).

13. Kosalec, I; Pepeljnjak, S; Bakmaz,M. and Vladimir –Knezevi, S. (2005):Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis products. Acta Pharm. 55(4):423-30.

14. Nishino, C; Enoki, N; Tawata, S; Mori, A and Kobayashi, K. and Masako Fukushima (1987): Antibacterial Activity of Flavonoids against *Staphylococcus epidermidis*, a Skin Bacterium. Agric. BioL Chern, 51 (1): 139-143.

15. Cushnie,T.P.and Lamb,A.J.(2006): Antimicrobial activity of Flavonoid. Int. J. Antimicrob Agents.27 (2):181.

16. Saravanakumar, A; Venkateshwaran, K; Vanitha,J ; Ganesh, M; Vasudevan, M and Sivakumar,T.(2009): Evaluation of antibacterial activity, phenol and flavonoid contents of *Thespesia populnea* flower extracts . Pak. J. Pharm. Sci., Vol.22 (3): 282-286

17. Farah, M; AL-Heali, G; Zohair, I; Rahemo, F. (2006): The Combined Effect of Two Aqueous Extracts on the Growth of *Trichomonas vaginalis*, *in vitro*. Türkiye Parazitoloji Dergisi, 30 (4): 272-274.

18. Samra,B; Ghulam, D.; Farrukh, H. and Parveen, S.(2006):Elemental Composition of *Viola odorata* Linn. Pak.J.PL.Sci.,12(2):141-143.

19. Okwu, D, E. and Igara, E.C. (2009): Isolation, characterization and antibacterial activity of alkaloid from *Datura metel* Linn leaves. Afr .J. Pharmacy and Pharmacology Vol. 3(5). 277-281.

20. Karou, D. Savadogo, A. Canini, A. Yameogo, S.Montesano, C. Simpore.

21. J. Colizzi, V and Traore, A.S. (2006): Antibacterial activity of alkaloids from *Sida acuta*. Afr. J. Biotech.Vol. 5 (2): 195-200.

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional