



تحديد الفعالية التثبيطية لمستخلص ثمار القطب الشائك العراقي تجاه بعض انواع بكتريا المكورات العنقودية الذهبية والكشف عن مركباته الفعالة

محمد جمال منصور الطائي* أحمد محمد تركي العيثاوي* رباح نجاح جبار**

* قسم علوم الحياة , كلية العلوم , جامعة الأنبار **مركز بحوث التقنيات الأحيائية/ جامعة النهريين

الخلاصة:

تم عزل وتشخيص 50 عزلة من بكتريا المكورات العنقودية الذهبية من مجموع 88 عزلة من المكورات بنسبة عزل 56.81% من عينات جروح، حروق، الأذن، إدرار، العيون، تقدمات ودمامل الجلد من المرضى في مستشفيات الرمادي التعليمي والنسائية والأطفال في الرمادي، ومستشفى اليرموك التعليمي في بغداد للفترة من آذار-آيار 2017، إذ تم تشخيص العزلات اعتماداً على صفاتها المجهرية والزرعية والكيموحيوية. حضرت سلسلة من تراكيز المستخلص الكحولي لثمار القطب الشائك (100, 50, 25, 12.5) ملغم / مل واختبرت فعاليته تجاه العزلات بطريقة الأنشاز حول الأقراص حيث بلغت معدلات اقطار التثبيط (0, 11.3, 16.6, 21.3, 25.6) ملم على التوالي وحدد التركيز المثبط الأدنى 12.5 ملغم / ملم. اظهرت نتائج تحليل كروماتوغرافيا الغاز-طيف الكتلة احتواء المستخلص على العديد من المركبات الكيميائية الفعالة اهمها الفانينول والبايرول واللوبيول والتاراكسيرون واحماض دهنية مشبعة وغير مشبعة والتي تلعب دوراً رئيساً في تثبيط نمو البكتريا واختزال قدرتها على تكوين الغشاء الحياتي، كما شخصت العديد من المجاميع الفعالة باستخدام تقنية طيف الاشعة تحت الحمراء. اختزل المستخلص الكحولي قدرة المكورات العنقودية الذهبية على تكوين الغشاء الحياتي باستخدام التركيز تحت المثبط الأدنى حيث تراوحت نسب التثبيط بين (50-81.4)%.

معلومات البحث:

تاريخ التسليم: 2018/2/9
تاريخ القبول: 2018/6/3
تاريخ النشر: 2019 / 1 / 3
DOI: 10.37652/juaps.2022.171705

الكلمات المفتاحية:

القطب الشائك،
المكورات العنقودية الذهبية،
الغشاء الحياتي،
كروماتوغرافيا الغاز-طيف الكتلة،
طيف الاشعة تحت الحمراء.

المقدمة:

ينتمي نبات *Tribulus terrestris* L. الى العائلة الحرملية Zygophyllaceae ، وهو عشب حولي زاحف متفرع يصل تفرعاته الى حوالي 70 سم، السيقان متفرعة ذات شعيرات طويلة ومبعثرة أما الاوراق فإنها متقابلة، ريشية، وواحدة من كل زوج اصغر من الاخرى، ذات وريقات (4-7) ازواج، الازهار منفردة ابطية، صفراء اللون، ثنائية

منها زوجان من الشوك الصلب الحاد، ينبت في شهر نيسان ويزهر ويكون اخضراً طوال الصيف ثم يجف ويموت (2) و (1).
ان الجزء الطبي الاساسي من النبات هو الثمار (Fruits) التي تحتوي العديد من المركبات الكيميائية النباتية Phytochemicals والتي توصف بأنها مواد ايض ثانوية Secondary metabolites والتي تمتاز بفعاليتها البيولوجية فتعمل مضاداً للإلتهابات البكتيرية والفطرية ومضاد سرطاني (3).

تعد المكورات العنقودية الذهبية من اهم واكثر مسببات الخمج المكتسب في المستشفيات Nosocomial infections، وتمتاز بمقاومتها العالية للمضادات الحياتية لإنتاجها إنزيمات البيتا لاكتاميز،

* Corresponding author at: College of Sciences/ University of Anbar E-mail address: mohammed2011biology@gmail.com

الجنس، متناظرة شعاعياً، أما الثمار فتكون كروية بقطر (6.5-8) ملم تتكون من مكورات مشعرة او لمساء تقريبا وعادة ما تكون مشوكة لكل

عدة اوساط من خلال ملاحظة قدرتها على النمو على وسط المانيتول الملحي الخاص ببكتريا المكورات العنقودية كذلك زرعت على وسط اكار الدم لتشخيص صفاتها المزرعية ولون وشكل المستعمرات النامية واستخدم الوسط CHROMagar™MRSA لتأكيد تشخيص المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للمثيلين (7). واجريت الاختبارات الكيموحيوية مثل الاوكسيديز والكتاليز والاندول والمثيل الاحمر والفوكاس بروسكاور واستهلاك السترات واختبار انتاج انزيم مخثر بلازما الدم والانزيم المحلل للحامض النووي DNA واختبار إنتاج الأستيتين اعتمادا على (8) و (9) و (10).

تحضير المستخلص الكحولي لثمار القطب الشائك:

جمعت الثمار وغسلت بصورة جيدة لازالة الغبار والأتربة التي تغطيها ثم تركت لتجف هوائيا بدرجة حرارة الغرفة مع مراعاة تقلبيها المستمر لمنع التعفن. بعد التأكد من جفافها هوائيا حولت الى مسحوق ناعم باستخدام مطحنة كهربائية وحفظت المواد المطحونة في الثلاجة بدرجة حرارة 4 م° لحين الاستخدام.

استخدمت طريقة (11) وكالاتي :

وزن 100 غم من المسحوق النباتي ووضع في دورق زجاجي سعة 1000 مل واضيف له 500 مل كحول اثيلي تركيزه 70 % ، ترك المزيج لمدة 24 ساعة في الحاضنة الهزازة بدرجة حرارة 37 م°، رشح المحلول بالشاش ثم وزع الراشح في انابيب جهاز النبد المركزي بسرعة 3000 دورة / دقيقة ولمدة 10 دقائق. اخذ الرائق واهمل الراسب ووضع بأطباق بتري زجاجية داخل فرن تجفيف بدرجة 37 م° وبعد تمام التجفيف قشط المستخلص وحفظ في الثلاجة لحين الاستخدام.

حضر محلول خزين من إذابة 1 غم من المسحوق الجاف في 2 مل من الماء المقطر المعقم للحصول على تركيز 500 ملغم / مل وعُد هذا التركيز هو التركيز الخزين الاساس ومنه حضرت تراكيز متدرجة

وتمتلك العديد من عوامل الضراوة كالمحفظة والإنزيمات والبروتين A والقدرة على مقاومة خلايا البلعمة وانتاجها السموم مثل السم المحلل لكريات الدم الحمراء والسم القاتل لخلايا الدم البيضاء (4)، وتمتاز بتكوينها للأغشية الحياتية Biofilm وهو المسؤول الأول عن الإصابات المزمنة لمقاومتها البلعمة والقتل بفعل المناعة الخلوية والخطية ومقاومة المضادات الحياتية ومقاومة المطهرات والمعقمات(5).

ولكون العديد من دول العالم تلجأ إلى استخدام العقاقير النباتية الأصل في معالجة العديد من الأمراض والإصابات الجرثومية الخارجية منها والداخلية والتي تصيب الإنسان والمستخلصة من الأجزاء المختلفة من النباتات (6) لذا اتجهت الدراسات العالمية الحديثة إلى استخدام النباتات الطبية ومنها نبات القطب الشائك *Tribulus terrestris* للقضاء على البكتريا المسببة للأمراض، واستقطب العلاج به اهتمام العديد من الباحثين نظراً لكونه علاجاً أميناً وليس له تأثيرات جانبية لذا هدفت دراستنا الى عزل وتشخيص بكتريا المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للمثيلين من عينات سريرية والكشف عن اهم المركبات الفعالة في مستخلص ثمار القطب الشائك وتقييم كفاءته كمضاد لتكوين الغشاء الحياتي في بكتريا *S. aureus*.

المواد وطرائق العمل:

جمع وتشخيص العزلات:

جمعت (220) عينة من المرضى الوافدين والراقدين في مستشفيات الرمادي التعليمي والنسائية والأطفال في الرمادي، ومستشفى اليرموك التعليمي في بغداد للمدة من آذار 2017 إلى آيار 2017، إذ شملت العينات التي جمعت تحت ظروف معقمة (جروح، حروق، الاند، إدرار، العيون، تقيحات ودمامل الجلد). تم تشخيص العزلات اعتمادا على الصفات الزرعية والمجهرية والاختبارات الكيموحيوية وبأستعمال

تأثير مستخلص ثمار القبط الشائك على تكوين الغشاء الحياتي لبكتريا *Staph. aureus* بطريقة الأليزا:

اتبعت طريقة (15) لأختبار تكوين الغشاء الحياتي وعلى النحو

الآتي:

حضر العالق البكتيري وقورن مع انبوبة ثابت العكورة القياسي (McFarland No. 0.5) ثم لفق العالق البكتيري في وسط نقيع القلب والدماغ السائل وحضن بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة، وحضرت انابيب من الوسط الزرعى حاوية على التراكيز تحت المثبط الأدنى Sub-MIC من المستخلص ولقحت بالعالق البكتيري وحضنت الانابيب لمدة 24 ساعة بدرجة 37 م° بعدها أضيف 200 مايكروليتر من المزروع لحفر أطباق المعايرة الدقيقة بواقع ثلاث مكررات لكل عزلة واعتبرت معاملة السيطرة، وأضيف 200 مايكروليتر من مزروع البكتريا المنمأة في الوسط الزرعى الحاوي على التركيز تحت المثبط الأدنى من المستخلص وحضنت الاطباق بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة، وبعد الحضن غسلت كل الحفر بالماء الملحي الفسلجي للتخلص من الخلايا البكتيرية غير الملتصقة، ثم أضيف 200 مايكروليتر من الميثانول بتركيز 99 % لكل حفرة ثم سكب الكحول وتركت الأطباق لتجف، ثم صبغت بصبغة البنفسج البلوري تركيزه 1 % لمدة 5 دقائق ثم ازيلت بعدها الصبغة وتركت لتجف تماما بعدها اضيف 160 مايكروليتر من حامض الخليك الثلجي 33 % لاستخلاص الصبغة من الخلايا الملتصقة وقيس طيف الامتصاص (OD) للخلايا البكتيرية الملتصقة والمصبغة بوساطة جهاز قارئ طبق المعايرة الدقيقة (Micro-plate reader) بطول موجي 630 نانوميتر لتحديد كفاءة العزلات في انتاج الغشاء الحياتي ومقارنتها بالخلايا البكتيرية المعاملة بالمستخلص بتطبيق المعادلة الواردة عن (16).

(O.D) للمعاملة

(%) للتثبيط = 1 - $\frac{\text{O.D}}{100}$

وكالآتي (3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100) ملغم / مل ثم تم تقدير السمية الخلوية للمستخلص النباتي حسب ما ورد في (12).

تحديد التركيز المثبط الأدنى (MIC) لمستخلص ثمار القبط الشائك: حدد التركيز المثبط الأدنى للمستخلص الكحولي الخام لثمار

القبط الشائك تجاه عزلات المكورات العنقودية الذهبية حسب طريقة

(13)، حيث حضرت أقراص ورق الترشيح نوع Whatman No. 3

بوساطة ثاقبة الورق بقطر 6 ملم والمعقمة بالمؤصدة وشبعت بالتراكيز

المختلفة من المستخلص النباتي ولمدة ساعة واحدة ثم تركت لتجف

تماما وبعدها نشر المعلق البكتيري على وسط مولر هنتون بطريقة

اختبار الحساسية المذكورة سابقا وتركت الأطباق لمدة 3-5 دقائق

لنتشرب العالق، وبعدها ثبتت الأقراص باستخدام ملقط معقم، وحضنت

الأطباق بدرجة حرارة 37 م° لمدة 18-24 ساعة، وحساب قطر منطقة

التثبيط (ملم) حول أقراص المستخلص وحدد MIC للمستخلص النباتي

الذي هو اقل تركيز يثبط النمو البكتيري.

تشخيص المركبات الكيميائية في مستخلص القبط الشائك بتقنية GC-MS:

شخصت المركبات الكيميائية لمستخلص ثمار القبط الشائك

بجهاز كروموتوغرافيا الغاز المتصل بجهاز طيف الكتلة Shimadzu

GC-MS-QP2010Ultra الياباني بإذابة 0.1 غم من المستخلص

في 10 مل من الكحول الأثيلي 99.9 % وتم الفحص في وحدة

الاطياف، قسم علوم الكيمياء، كلية العلوم، الجامعة المستنصرية.

التشخيص العضوي الطيفي FT-IR للمستخلص النباتي:

أستخدمت طريقة (14) في دراسة أطياف الأشعة تحت الحمراء

للمستخلص النباتي باستخدام تقنية Forier Transformation Infra

Red بجهاز Shimadzu 8300 في المختبر الخدمي، كلية التربية

للعلوم الصرفة / ابن الهيثم - جامعة بغداد.

شكل (1) عدد العزلات الكلية الموجبة لملون جرام والمكورات العنقودية

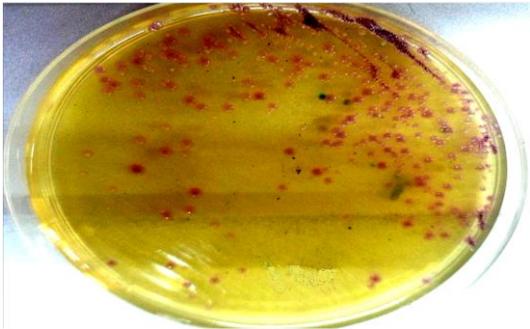
MSSA و MRSA



شكل (2) نمو بكتريا *Staph.aureus* على الوسط الانتقائي أكار المانيتول الملحي



شكل (3) نمو بكتريا *Staph.aureus* على وسط أكار الدم



شكل (4) نمو بكتريا *Staph.aureus* MRSA على وسط

CHROMagar

جدول (1) نتائج الأختبارات الكيموحيوية لعزلات *Staph.aureus* المعزولة

من حالات سريرية مختلفة

العزلة	الأختبار

(O.D) للسيطرة

التحليل الإحصائي:

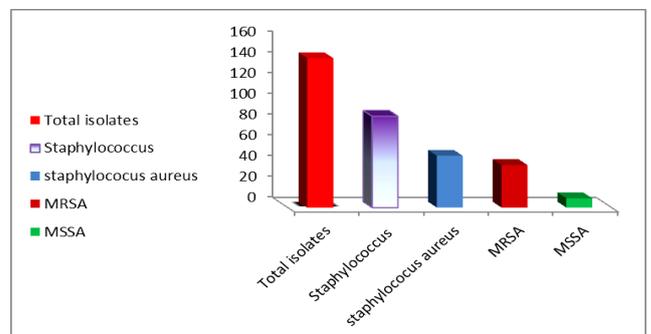
تم اجراء التحليل الإحصائي بإستخدام برنامج SPSS اصدار 22 وفقاً للتحليل الأحصائي ANOVA لمعرفة وجود فروقات معنوية ام لا وكذلك استخدام أقل فرق معنوي LSD عند مستوى احتمالية $P < 0.05$.

النتائج:

العزل والتشخيص

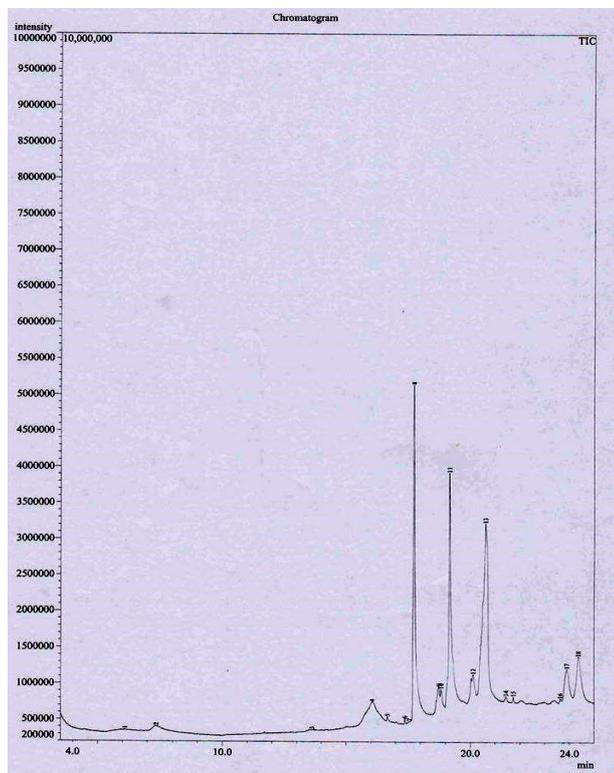
شخصت العزلات اعتماداً على نتائج الفحوصات البكتريولوجية والاختبارات الكيموحيوية واستخدام الاوساط الزرعية الانتقائية، إذ اعطت 202 عينة نموا موجبا من مجموع 220 عينه، إذ تم تشخيص 88 عزلة من المكورات 50 عزلة تعود لبكتريا *Staph.aureus* كانت 41 عزلة منها مقاومة و9 عزلات حساسة للمضاد الحياتي الميثيسيلين من مجموع 144 عزلة موجبة لملون جرام في حين كانت العزلات السالبة 58 عزلة كما موضح في الشكل (1).

ظهرت مستعمرات *Staph.aureus* ذات لون أصفر على وسط المانيتول الملحي الصلب كما في الشكل (2)، اما على وسط اكار الدم فقد كانت ذات لون رمادي كما في الشكل (3) تميزت مستعمرات *Staph.aureus* المقاومة للميثيسيلين MRSA على وسط CHROM agar باللون الوردي الغامق مائلا للبنفسجي وكما موضح في الشكل (4)، كما تميزت العزلات بأنتاجها لأنزيم مخثر البلازما Coagulase اما نتائج الاختبارات الكيموحيوية الأخرى فيوضحها الجدول (1).



المركبات حسب تسمية الاتحاد الدولي للكيمياء الصرفة والتطبيقية

.IUPAC



الشكل (5) نتائج تحليل كروماتوغرافيا الغاز - طيف الكتلة لمستخلص ثمار القصب الشائك الكحولي

جدول (3) أنواع المركبات الكيميائية التي شخصت بتقنية GC-MS

No	R.T	Name (IUPAC)	Chemical Formula	M.W g/mol	Peak Area%
1	6.09	1,3,5,7-Tetroxane	C ₄ H ₈ O ₄	120.104	1.17
2	7.34	4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-	C ₆ H ₈ O ₄	144.126	1.47
3	13.61	1,2,3,5-Cyclohexanetetrol, (1.alpha.,2.beta.,3.alpha.,5.beta.)	C ₆ H ₁₂ O ₄	148.158	0.37
4	16.05	3-O-Methyl-d-glucose	C ₇ H ₁₄ O ₆	194.183	8.50
5	16.67	Phytol;3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol	C ₂₀ H ₄₀ O	296.539	0.12
6	17.37	Palmitic acid; Methyl Palmitate; Hexadecanoic acid, methyl ester	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270.457	0.15
7	17.56	Pyrrrole[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(2-methylpropyl)	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₂	210.27	0.03
8	17.73	Pentadecanoic acid	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	242.403	24.77
9	18.73	Taraxerone	C ₃₀ H ₄₈ O	424.713	1.22
10	18.82	Linolic acid;9,12-Octadecadienoic acid (z,z)-	C ₂₁ H ₄₀ O ₂ Si	352.634	0.39
11	19.16	Stearic acid;	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284.484	20.29

+	Coagulase
-	Oxidase
+	Catalase
-	Indol
+	Methyl Red
+	Vogas Proskaur
+	Citrate utilization
+	Acetoin
+	DNase
+	Urease
+	Mannitol
+	Gelatinase

تأثير مستخلص ثمار القصب الشائك في نمو بكتريا *Staph.aureus* وتحديد التركيز المثبط الأدنى

أظهرت النتائج أن جميع العزلات حساسة بنسبة 100% للمستخلص بتركيز (25, 50, 100) ملغم/ مل وبلغ المعدل الكلي لأقطار التثبيط (25.6, 21.3, 16.6) ملم على التوالي اما التركيز المثبط الأدنى كان 12.5 ملغم/ مل إذ بلغ معدل أقطار مناطق التثبيط لجميع العزلات 11.3 ملم وكما موضح في الجدول (2) في حين لم تبد التراكيز (6.25, 3.125) ملغم/ مل اي فعالية تجاه العزلات البكتيرية.

جدول (2) تأثير المستخلص الكحولي لثمار القصب الشائك بتركيز مختلفة

في *Staph. aureus* ± الخطأ القياسي

معدل اقطار منطقة التثبيط لجميع العزلات (ملم) ± الخطأ القياسي	تركيز المستخلص الكحولي للثمار (ملغم/ مل)
25.6 ± 1.3	100
21.3 ± 1.1	50
16.6 ± 0.3	25
11.3 ± 0.7	12.5
0 ± 0.0	6.25
0 ± 0.0	3.125

تشخيص المركبات الكيميائية في المستخلص الكحولي باستخدام تقنية

GC-MS

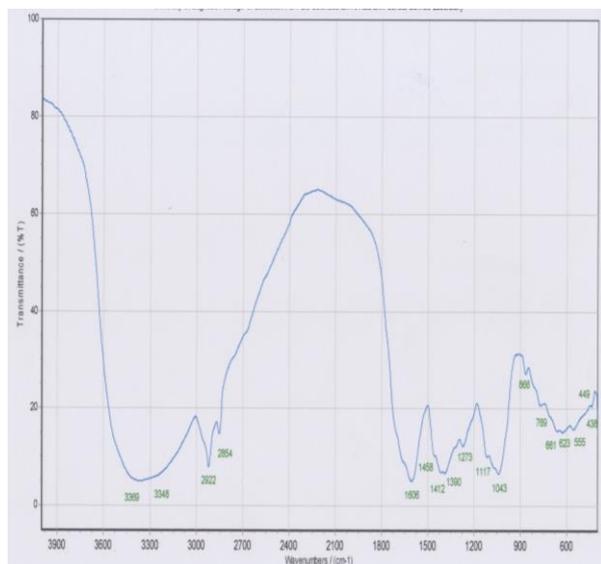
يوضح الشكل (5) نتائج تحليل كروماتوغرافيا الغاز - طيف

الكتلة للمستخلص وتم الكشف عن 18 مركب وكما موضح في الجدول

(3) وصيغها الجزيئية ووزنها الجزيئي والنسبة المئوية لمساحتها وزمن

الاحتجاز (دقيقة) لكل مركب من هذه المركبات, واعتمدت تسمية

N ويدل ظهور حزمتي أمتصاص عند المدى ($866- 661 \text{ cm}^{-1}$) تعود الى الاهتزاز الأحنائي الضعيف لأصرة $\text{C-H} =$ الأروماتية, اما عند المدى ($623- 438 \text{ cm}^{-1}$) ظهرت حزم أمتصاص متوسطة الشدة تعود الى مجموعة هاليد الألكيل (العطرية).



الشكل (6) طيف الأشعة تحت الحمراء FT-IR لمستخلص ثمار نبات القطن الشائك

تأثير مستخلص ثمار القطن الشائك الكحولي على قابلية تكوين الغشاء الحياتي لعزلات *S.aureus*

أظهرت النتائج أن جميع العزلات كانت منتجة للغشاء الحياتي لكن بدرجات سمك متفاوتة حيث تميزت العزلات ($S_1, S_2, S_3, S_4, S_6, S_7, S_9, S_{12}, S_{14}, S_{15}, S_{16}, S_{17}, S_{19}, S_{22}, S_{28}, S_{31}, S_{37}, S_{38}, S_{41}, S_{47}, S_{50}$) بإنتاجها لغشاء حيوي سميك والتي قيست باستعمال اطباق الاليزا, إذ سجلت العزلة S_{17} المعزولة من الحروق أعلى قيمة أمتصاصية (0.864) أي إنها العزلة الأكثر كفاءة في إنتاج الغشاء الحياتي في حين سجلت العزلة S_{35} المعزولة من العيون أقل قيمة أمتصاصية (0.158)، بينما كانت باقي العزلات منتجة للغشاء الحياتي بدرجات سمك متفاوتة. كما أظهرت النتائج الموضحة في الجدول (4) والشكل (7) ان مستخلص ثمار القطن الشائك يمتلك فعالية عالية في تثبيط تكوين الغشاء الحياتي لبكتريا *S.aureus*, إذ بلغ معدل النسبة

		Octadecanoic acid			
12	20.11	Lupeol; Fagarasterol; Clerodol	$\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$	426.729	3.12
13	20.60	Lupeol acetate; Lup-20(29)-en-3-ol, acetate, (3.beta.)-	$\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{O}_2$	468.766	27.02
14	21.43	2- Palmitoylglycerol; Hexadecanoic acid, 2-hydroxy-1- (hydroxymethyl)eth yl ester	$\text{C}_{19}\text{H}_{38}\text{O}_4$	330.509	0.22
15	21.73	Diisooctyl phthalate; 1,2- Benzenedicarboxyli c acid, diisooctyl ester	$\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{O}_4$	390.564	0.16
16	23.62	Erucamide13- Docosenamide, (Z)	$\text{C}_{22}\text{H}_{43}\text{NO}$	337.592	0.14
17	23.89	Methyl Elaidate; Elaidic acid methyl ester	$\text{C}_{19}\text{H}_{36}\text{O}_2$	424.713	4.44
18	24.36	Oleic acid; Cis-9- Octadecenoic acid	$\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$	282.468	6.42

التشخيص العضوي الطيفي للمجاميع الفعالة في مستخلص ثمار

القطن الشائك باستخدام تقنية FT-IR

تم تسجيل طيف الأشعة تحت الحمراء بمدى من الأطوال

الموجية يتراوح بين ($4000-500 \text{ cm}^{-1}$) كما في الشكل (6) الذي يبين

حزم الأمتصاص وقيست الأطياف للمستخلص النباتي باستخدام قرص

بروميد الباريوم KBr وفسرت النتائج حسب (17) حيث لوحظ ظهور

حزمة أمتصاص عريضة في المدى ($3369-3348 \text{ cm}^{-1}$) تعزى

الى تردد الاهتزاز الاتساعي لمجموعة الهيدروكسيل OH

الكاربوكسيلية, كما تميزت هذه الأطياف بظهور حزمتي امتصاص

قويتين عند ($2922, 2854 \text{ cm}^{-1}$) واللذان تعودان الى الاهتزاز

الاتساعي المتماثل وغير المتماثل على التوالي لمجموعة CH_2

الاليفاتية, وظهر حزم عند المدى ($1458-1390 \text{ cm}^{-1}$) تعود

الاهتزاز الاتساعي للأصرة (C-H) وظهرت حزمة أمتصاص قوية

وحادة عند العدد الموجي (1606 cm^{-1}) تعود الى الاهتزاز الأتساعي

لمجموعة (C=C) المزدوجة الأليفاتية, ويدل ظهور الحزم عند (1117-

1043 cm^{-1}) تعزى الى التردد الأتساعي للأصرة (C-O), اما حزمة

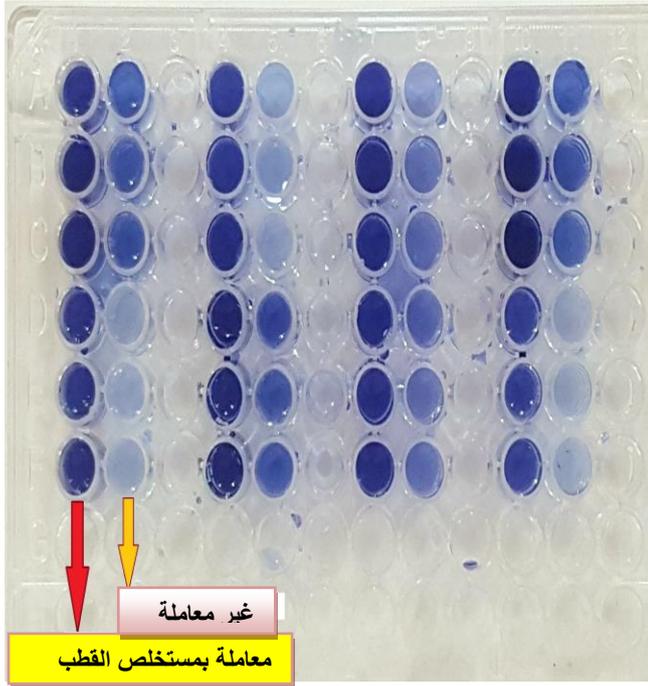
الامتصاص عند التردد الموجي (1273 cm^{-1}) تشير الى اصرة (C-

74.5	0.079	0.310	MSSA45
71.3	0.073	0.255	MSSA46
50.1	0.212	0.425	MSSA47
73.3	0.083	0.311	MSSA48
61.9	0.132	0.347	MSSA49
63.4	0.198	0.542	MSSA50
66.13 %	B0.136	A0.383	Mean
0.03			LSD

*تشير الأرقام إلى المعدلات الكلية للأمتصاصيات بطول موجي 630 نانومتر بواقع ثلاث

مكررات لكل عزلة

*تشير الحروف المختلفة بين الأعمدة إلى وجود فروق معنوية عند مستوى (P<0.05) بين معدلات المعاملات.



الشكل (7) فعالية مستخلص *T. terrestris* المضادة لتكوين الغشاء الحيواني بأستعمال اطباق الأليزا

المناقشة:

اظهرت نتائج العزل والتشخيص أن المكورات العنقودية الذهبية هي النوع السائد من جنس المكورات العنقودية إذ بلغت نسبتها 56.81% من مجموع أنواع المكورات المعزولة، وتتوافق هذه النسبة مع ما وجدته كلٌّ من (18) و(19) إذ عزلا المكورات العنقودية الذهبية بنسب (60, 54.3) % على التوالي.

أظهرت نتائج تحليل كروماتوغرافيا الغاز - طيف الكتلة وجود العديد من المركبات ذات الأهمية البايولوجية في تثبيط العديد من الأحياء المجهرية وأهمها مركب الفاييتول الذي تشير معظم الدراسات الى

المئوية للتثبيط (66.13) % اما اعلى نسبة تثبيط بعد المعاملة بمستخلص ثمار القطب الشائك كانت (80.4) % لعزلة S₂₀ المعزولة من الحروق بينما اقل نسبة تثبيط (50) % في عزلة S₂₈ المعزولة من ألتهاب الأذن.

جدول (4) النسب المئوية لتثبيط تكوين الغشاء الحيواني لبكتريا *Staph aureus*. باستخدام مستخلص ثمار القطب الكحولي بتركيز تحت المثبط الأدنى

تثبيط تكوين الغشاء الحيواني (%)	الامتصاصية (O.D)		العزلات
	Sub-MIC <i>T. terrestris</i>	بدون معاملة	
62.6	0.153	0.41	MRSA1
63.6	0.227	0.625	MRSA2
67.6	0.138	0.426	MRSA3
78.2	0.085	0.39	MRSA4
79.1	0.057	0.273	MRSA5
70.1	0.129	0.432	MRSA6
63.4	0.205	0.56	MRSA7
79.4	0.072	0.35	MRSA8
55.2	0.322	0.72	MRSA9
61.8	0.063	0.165	MRSA10
69.6	0.083	0.273	MRSA11
58.7	0.167	0.405	MRSA12
60	0.09	0.225	MRSA13
59.6	0.288	0.713	MRSA14
59.5	0.175	0.432	MRSA15
63.7	0.165	0.455	MRSA16
55	0.388	0.864	MRSA17
53.2	0.171	0.366	MRSA18
64.5	0.188	0.530	MRSA19
81.4	0.053	0.285	MRSA20
80.1	0.045	0.227	MRSA21
63.3	0.162	0.442	MRSA22
74.2	0.082	0.318	MRSA23
73.7	0.074	0.282	MRSA24
60.8	0.065	0.166	MRSA25
53.2	0.181	0.387	MRSA26
72.1	0.078	0.280	MRSA27
50	0.255	0.511	MRSA28
62	0.12	0.315	MRSA29
70.7	0.092	0.314	MRSA30
62.5	0.21	0.56	MRSA31
77	0.065	0.283	MRSA32
70.2	0.09	0.302	MRSA33
73.7	0.073	0.278	MRSA34
74	0.041	0.158	MRSA35
73.4	0.058	0.218	MRSA36
58.2	0.241	0.577	MRSA37
53.2	0.285	0.61	MRSA38
74.7	0.087	0.344	MRSA39
69	0.102	0.329	MRSA40
52.2	0.198	0.415	MRSA41
64	0.088	0.245	MSSA42
69.7	0.097	0.321	MSSA43
74.1	0.055	0.213	MSSA44

المركب 2, 5-Dimethyl pyrrole تجاه بكتريا (*Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis*) الموجبة وبكتريا (*E.coli, Klebsiella pneumonia*) السالبة لملون جرام وفطريات (*Candida albicans*) ووجد انه مضاداً جرثومياً جيداً، كما أن وجود المركب Taraxerone في المستخلص وهو من التربينات الثلاثية يعزز الفعالية ضد المايكروبية (26).

إن وجود المركبات الفلافونيدية (Lupeol, Lupeol acetate) المعروفة بفعاليتها التثبيطية لمجموعة كبيرة البكتريا والفطريات يعزز من فعالية المستخلص النباتي وأن ميكانيكية عمل هذين المركبين تثبيط بعض الانزيمات ذات الدور الايضي المهم في النمو والتكاثر وتمزيق الاغشية الخلوية أو التغيير الوظيفي لها (27).

أوضحت دراسة (28) ان الحامض العضوي Diisooctyl phthalate ذو طيف واسع الفعالية التثبيطية تجاه البكتريا الموجبة والسالبة لملون جرام ومجموعة من الفطريات المرضية، واختبرت فعاليته تجاه *Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, E. coli, Aspergillus flavus, Candida albicans, Fusarium oxysporum, Rhizoctonia solani* وكانت جميع هذه العزلات حساسة له بنسبة 100%.

إن انخفاض قيم الأمتصاصية للعزلات البكتيرية قيد الدراسة بعد معاملتها بالتركيز تحت المثبط الأدنى لمستخلص ثمار القطب الشائك يدل على ان المستخلص ثبط التصاق البكتريا على سطح البولي ستيرين لحفر طبق المعايرة الدقيق مما أدى الى حدوث الانفصال للغشاء الحياتي المتكون مسبقاً بفعل هذه البكتريا في حفر طبق المعايرة الدقيق (29).

أشارت دراسة (30) ان الالتصاق الأولي هو أهم خطوة لتكوين الغشاء الحياتي ويعتمد على عوامل اهمها الخصائص الفيزيائية والكيميائية للسطوح، خصائص البكتريا، والمكونات البيئية لذا فإن من

دوره في القتل المايكروبي واختزال قدرة البكتريا على تكوين الأغشية الحياتية، وهذا ما أكده (20) في دراسته التي اثبت فيها فعالية الفايترول الضد مايكروبية تجاه (*Aspergillus Niger, Candida albicans, E.coli, Staphylococcus aureus*) وتشير النتائج الى احتواء المستخلص على الأحماض الدهنية الاساسية المشبعة Palmitic acid وOleic acid وStearic acid وغير المشبعة Linolic acid وتنفقت مع دراسة (21) التي أجريت على المستخلص الكحولي لثمار القطب الشائك النامي في دولتي المغرب واليمن ودراسة التركيب الكيميائي و الفعالية المضادة للبكتريا.

يعمل الفايترول على حث تراكم مركبات الاوكسجين الفعالة (ROS) اهمها Superoxide (O_2^-) وبيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 وجذر OH مؤدياً الى اختلال التوازن بين هذه المركبات داخل الخلية البكتيرية ونظام الدفاع المضاد للأكسدة وبالتالي انخفاض اختزال الكلوتاثيون Glutathione مسبباً التلف الحاد للحامض النووي DNA (22).

أن أحتواء المستخلص النباتي على الاحماض الدهنية المشبعة (Stearic, Palmitic acid) وغير المشبعة (Linoleic acid, Oleic) يعزز من الفعالية التثبيطية لنمو البكتريا، وهذا ما أكده دراسة (23) التي اثبتت الفعالية التثبيطية لهذه الاحماض الدهنية تجاه سبعة انواع بكتيرية منها *Staphylococcus aureus* واربعة انواع من الفطريات وتتفق مع دراسة (24) التي أوضحت نتائجه فعالية الاحماض الدهنية المشبعة (Stearic acid, Palmitic acid) والغير مشبعة (Oleic, Linoleic) التثبيطية لنمو 12 سلالة من الاحياء المجهرية، كما تميز المستخلص النباتي بأحتواءه على الحامض الدهني Pyrrole الذي يمتلك ومشتقاته خصائص مثبطة وقاتلة لنمو البكتريا الموجبة والسالبة لملون جرام والفطريات وهذا ما بينه (25) حيث درست فعالية

5. Nathan K. A., Mark J. M., William C., Jeff G. L., Mary E. P., and Mark E. S. (2011). *Staphylococcus aureus* biofilms Properties regulation and roles in human disease. *Virulence*. Vol. 2(5): 445–459.
6. Saleh H., Azizollah J., Ahmadreza H., and Raham A. (2015). The Application of Medicinal Plants in Traditional and Modern Medicine: A Review of *Thymus vulgaris*. *International Journal of Clinical Medicine*. 6: 635-642.
7. Diederer, B; Duijn, I.; Belkum, A.; Willems, P. ; Keulen, P.; Kluytmans, J.(2005). Performance of chromagar MRSA medium for detection of methicillin-resistant *staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 43(4): 1925-1927.
8. Collee, G. J.; Faser, G. A.; Marmion, B. and Simmons, A. (1996). Mackie and McCartney. *Practical Medical Microbiology*. 14thed. Churchill Livingstone, New York.
9. Kloos, W.E. and Jorgensen, J.H. (1985). *Manual of clinical Microbiology*. 4th ed. Washington, D.C. U.S.A.
10. Baird, D. (1996). *Staphylococcus*: In *Practical Medical Microbiology*. (4th) ed. Collee, J.G. et al. (eds). Churchill Livingstone, Edinburgh, London. pp. 245-258
11. Anesini, C.; and Perez, C. (1993) Screening of Plants Used in Argentine Folk medicine For Antimicrobial Activity. *J. of Ethno Pharmacology* 39(2): 119-128.
12. Xin-guo H. and Ursella, M. (1994). Antifungal compounds from *Solanum nigrescens*, *J. Ethnopharm*; 43:173 – 177.
13. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). (2003). Performance standards for disks susceptibility testing;

أهم الميكانيكيات التي يعمل بها المستخلص بما يحتويه من مركبات فعالة كالفلافونيدات والقلويدات والتربينات هو تعطيل اللواصق الهايكروبية والإنزيمات مما يؤدي الى تغيير في السطح البكتيري ومنع التلامس المايكروبي فذلك يمنع نمو وتطور الغشاء الحيائي.

اكّد الباحثان (31) في دراسة أجريت في جامعة Sathyabama الهندية - قسم التقنيات الأحيائية ان المستخلصات النباتية الغنية بالمركبات الكيميائية الفعالة مثل Hexadecanoic acid, Pentadecanoic acid, Phytol, Stearic acid, Oleic acid تكون ذات فعالية تثبيطية عالية تجاه العديد من البكتريا وتعمل كمضاد لنظام تحسس النصاب (Anti-Quorum Sensing (Anti-QS).

References (المصادر)

1. Suresh R. Y., Sathyanarayana D., and Kannan K. (2016). A Recent Phytochemical Review – Fruits of *Tribulus terrestris* Linn. *J. Pharm. Sci. and Res.* Vol. 8(3): 132-140.
2. Dina Magdy Abd El-Hameed Ghanem. (2016). *Phytochemical and Biological Study of Tribulus terrestris and Fagonia arabica*. M. Sc. Thesis. Cairo University.
3. Gincy M. S., K. Mohan, and S. Indu. (2014). Comparative Phytochemical Analysis of Medicinal Plants Namely *Tribulus Terrestris*, *Ocimum Sanctum*, *Ocimum Gratissimum*, *Plumbago Zeylanica*. *European Journal of Biotechnology and Bioscience*. 2 (5): 38-40.
4. Justyna B., Olga Sokolova, and Przemyslaw Bozko. (2011). Characterization of Virulence Factors of *Staphylococcus aureus*: Novel Function of Known Virulence Factors That Are Implicated in Activation of Airway Epithelial Pro inflammatory Response. *Journal of Pathogens*. Volume 2011, Article ID 601905, 13 pages.

- (2015). Antimicrobial activity, toxicity and stability of phytol as a novel surface disinfectant.
21. Al Maofari A., Mennane Z., Hakiki A., Mosaddak M. and EL Hajjaji S. (2016). Chemical Compositions and Antibacterial Activity of Different Extracts of *Tribulus terrestris* growing in Morocco and Yemen. *Der Pharma Chemica*. 8(12):14-18.
22. Lee W., Woo E. R., and Lee D. G. (2016). Phytol has antibacterial property by inducing oxidative stress response in *Pseudomonas aeruginosa*. *Free radical research*. Vol. 50(12), 1309-1318.
23. Agoramoorthy G., Chandrasekaran M., Venkatesalu V., and Hsu M. J. (2007). Antibacterial and antifungal activities of fatty acid methyl esters of the blind-your-eye mangrove from India. *Brazilian Journal of Microbiology*. Vol. 38(4), 739-742.
24. Choi J. S., Park N. H., Hwang S. Y., Sohn J. H., Kwak I., Cho K. K., and Choi I. S. (2013). The antibacterial activity of various saturated and unsaturated fatty acids against several oral pathogens. *Journal of Environmental Biology*. Vol. 34(4), 673.
25. Varshney H., Ahmad A., Rauf A., Husain F. M., and Ahmad I. (2017). Synthesis and antimicrobial evaluation of fatty chain substituted 2, 5-dimethyl pyrrole and 1, 3-benzoxazin-4-one derivatives. *Journal of Saudi Chemical Society*. Vol. 21. S394-S402.
26. Ghosh P., Chakraborty P., Mandal A., Rasul M. G., Chakraborty M., and Saha A. (2011). Triterpenoids from *Schleichera oleosa* of Darjeeling foothills and their antimicrobial activity. *Indian journal of pharmaceutical sciences*. Vol. 73(2), 231.
- approved standard, 6th ed. PP: 100-113, Wayne, Pannsylvania, USA.
14. Silverstein, R. M.; Bassler, G. C.; and Morrill, T. C. (1991). *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 5th edition; Wiley: New York.
15. Dheepa M., Rashme V.L., and Appalaraju B. (2011). Comparison of biofilm production and multiple drug resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from a tertiary care hospital in South India. *Int J Pharm Biomed Sci*. Vol. 2 (4) pp.: 103-107.
16. Gudina E.J., Rocha V., Teixeira J.A. and Rodrigues L.R. (2010). Antimicrobial and anti-adhesive properties of a bio surfactant isolated from *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* A20. *Letters in Applied Microbiology*. Vol. 50 pp.:419–424.
17. Tietze, L. F., Eicher, T., Diederichsen, U., Speicher, A., and Schützenmeister, N. (2015). *Reactions and Syntheses: In the Organic Chemistry Laboratory*. John Wiley & Sons.
18. Tong S. Y., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L., and Fowler, V. G. (2015). *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical microbiology reviews*, 28(3), 603-661.
19. Shrestha, N. K., Scalera, N. M., Wilson, D. A., Brehm-Stecher, B., and Procop, G. W. (2011). Rapid identification of *Staphylococcus aureus* and methicillin resistance by flow cytometry using a peptide nucleic acid probe. *Journal of clinical microbiology*, 49(9), 3383-3385.
20. Ghaneian, M. T., Ehrampoush, M. H., Jebali, A., Hekmatimoghaddam, S., and Mahmoudi, M.

- a 96-well plate system. *Applied microbiology and biotechnology*. 100(9). 4135-4145.
30. Nostro, A., Guerrini, A., Marino, A., Tacchini, M., Di Giulio, M., Grandini, A. and Saraçoğlu, H. T. (2016). In vitro activity of plant extracts against biofilm-producing food-related bacteria. *International journal of food microbiology*. 238. 33-39.
31. Namasivayam, S. K. R., and Vivek, J. M. (2016). Anti-quorum sensing activities of medicinal plant extracts against quorum sensing mediated virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa*. *Der Pharmacia Lettre*. Vol. 8 (8):412-423.
27. Awolola G. V., Koorbanally N. A., Chenia H., Shode F. O., and Baijnath H. (2014). Antibacterial and anti-biofilm activity of flavonoids and triterpenes isolated from the extracts of *Ficus sansibarica* Warb. Sub sp. *sansibarica* (Moraceae) extracts. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*. Vol. 11(3), 124-131.
28. Anju K. M., Archana M. M., Mohandas C., and Nambisan B. (2015). An Antimicrobial Phthalate Derivative from *Bacillus Cereus*, the Symbiotic Bacterium Associated With A Novel Entomopathogenic Nematode, *Rhabditis* (*Oscheius*) Sp. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. Vol. 7(9).
29. Stiefel, P., Rosenberg, U., Schneider, J., Mauerhofer, S., Maniura-Weber, K., and Ren, Q. (2016). Is biofilm removal properly assessed? Comparison of different quantification methods in

Determination of the Inhibitory Efficacy of Iraqi *Tribulus Terrestris* l. Fruit Extract Against Some Types of *Staphylococcus Aureus* and Detection of Its Active Compounds

Mohammed J. Mansoor Al-Tae*, Ahmed M. Turke Al-Ethawi* Rebah N. Jabbar **

*College of Sciences/ University of Anbar

**Biotechnology Research Center, Al-Nahrain University, Baghdad

E-mail: mohammed2011biology@gmail.com

Abstract

A total number of 50 *Staphylococcus aureus* (56.81)% from 88 isolates of Staphylococci were isolated and identified from wounds, burns, ear, urine, eyes, pus and skin boils, in laboratories of Maternity and Child Teaching Hospital, Ramadi Teaching Hospital, and Al-Yarmouk Teaching Hospital in Baghdad for the period from March to May/2017. Isolates diagnosis depended on microbial, cultural, and biochemical characteristics. Concentrations series of *Tribulus terrestris* ethanolic extract were prepared at concentrations of 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, and 100 mg/ml with inhibition zones of 0, 0, 11.3, 16.6, 21.3, and 25.6 mm respectively, minimum inhibitory concentration determined as 12.5 mg/ml. The results of GC-MS showed that extract contains many active chemical compounds most important which phytol, pyrrole, lupeol, taraxerone, saturated and unsaturated fatty acids that play essential role in growth inhibition of bacteria and have ability to reduce biofilm production, also many active groups were identified by using fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) technique. Results showed that ethanolic extract reduced the ability of *S.aureus* to produce the biofilm by using sub – MIC of 50 – 81.4 %.

Key words: *Tribulus terrestris*, *Staphylococcus aureus*, Biofilm, GC-MS, FT-IR.