Iraqi Journal of Science
ISSN: 0067-2904
GIF: 0.851

الفعل التثبيطي لمستخلصات نبات الجريب فروت (Grapefruit) على نمو وقابلية إلتصاق بكتريا *Staphylococcus aureus*

ندى صباح رزوقي[1*] ، وسن حاتم الجميلي [1]، ورقاء يحيى المشهداني[2]

[1] قسم علوم الحياة ، كلية العلوم للبنات ، جامعة بغداد، بغداد، العراق

[2]معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الأحيائية للدراسات العليا ، جامعة بغداد، بغداد، العراق

الخلاصة

تم الحصول على 10 عزلات تعود لبكتريا ***Staphylococcus*** من مسحات سريرية مختلفة أخذت من المرضى المراجعين لمستشفى ابن النفيس التعليمي ومختبر الصحة العامة المركزي ،أعتمدت عدد من الفحوصات المظهرية والكيموحيوية لتمييز بكتريا ***S. aureus***عن الأنواع البكتيرية الأخرى وأظهرت النتائج أنها 8 عزلات وعند التحري عن قابليتها لإنتاج الطبقة اللزجة باستخدام طريقة اكار احمر الكونغو كانت العزلة SA5 فضلها في تكوين هذه الطبقة مقارنة ببقية العزلات من خلال ظهور مستعمراتها بلون وردي ووسط اكار احمر الكونغو بلون اسود . وعند دراسة الفعل التثبيطي لمستخلصات نبات الكريب فروت في نمو عزلة البكتريا*S.aureus* SA5 بينت النتائج ان المستخلص المائي لبذور نبات الجريب فروت وبتراكيزه المختلفة لم يظهر تأثير تثبيطي للنمو بينما وجد أن مستخلص العصير لهذا النبات كان ذو تأثير تثبيطي عند التراكير(100%،75%،50%) وبمعدلات أقطار تثبيطية(12ملم،10ملم،8ملم)على التوالي ،في حين أظهر مستخلص البذور(GSE) تأثير تثبيطي أقوى عند التراكيز (100%، 75%، 50%، 25%) وبمعدلات أقطار بلغت (15ملم، 12ملم، 9ملم، 7ملم) على التوالي ، كما تم اختبار قابلية التصاق العزلة البكتيرية SA5 على مادة الفولاذ المقاوم للصدأ حيث أظهرت النتائج أن عدد كبير من الخلايا البكتيرية المحضونة بوجود قطعة من مادة الفولاذ المقاوم للصدأ قد التصقت بسطح هذه المادة والذي كان بحدود 58×10^{5}خلية / مل وهذه مثلت معاملة السيطرة في حين انخفض عدد الخلايا الملتصقة بسطح هذه المادة إلى 24×10^{4} خلية / مل عند معاملتها بمستخلص البذور Grapefruit Seed Extract (GSE) .

كلمات مفتاحية : مستخلصات نبات الكريب فروت، الفعل التثبيطي، بكتريا ***S. aureus***

Inhibitory Effect of Grapefruit Extracts on the Growth and Adhesion Ability of *Staphylococcus aureus*

Nada S. Rzoqi[1]*, Wasan H. Jumaili[1], Warka Y. Al-Mashhadani[2]

[1]Department of Biology, College of Science for women,University of Baghdad, Baghdad,Iraq

[2]Institute of Genetic Engineering and Biotechnology Techniques for Graduate Studies,University of Baghdad, Baghdad,Iraq

Abstract

Ten isolates belong to the *Staphylococcus* bacteria from different clinical swabs were taken from patients in Ibn al-Nafis Hospital and Central Public Health laboratory, according to many morphological and biochemical tests that used to identify bacterial species *S. aureus*, the results showed that 8 isolates when

*Email: doctor_nada2003@yahoo.com

investigated their ability to produce a slime layer using Congo red agar method the results showed that SA5 isolate was the best compared to other isolates through change the color of colonies to the pink and Congo red agar -colored Black.

When examining the inhibitory effect of grapefruit extracts in the growth of isolated bacteria SA5 *S.aureus*, results showed that the aqueous extract of the seeds at different concentrations did not show any inhibitory effect on the bacterial growth while the juice extract of this plant had an effective antibacterial activity against SA5of *S.aureus* in different concentrations(50%,75%,100%) were the zones of inhibition reached (8 mm ,10mm,12mm) respectively, while plant seeds extract had more effective antibacterial activity against SA5 *S.aureus* in different concentrations(25%,50%,75%,100%) were the zones of inhibition reached (7 mm ,9mm,12mm,15mm) respectively; Also this study tested the adhesion ability of SA5 bacterial isolate on the stainless steel material where the results showed that a large number of bacterial cells up to 58×10^5cells / ml adhered to the surface of stainless steel piece as the control, while the number of bacterial cells that adherent to the surface of this material decreased to24×10^4cells/ ml when treated with GSE.

Keywords: grapefruit extracts, inhibitory effect, bacteria *S.aureus*

المقدمة

تزايد الاهتمام في الوقت الحاضر بالنباتات الطبية في معظم بلدان العالم لسهولة تداولها وبساطة استعمالها بشكل مركزات أو مستخلصات أو أقراص وحبوب جافة وكذلك احتوائها على مواد فعالة ذات تأثير فسلجي ، مع سرعة الشفاء الناتج عن هذا الاستخدام وعدم حدوث آثار جانبية .وأحد النباتات الطبية المهمة والمستخدمة في علاج كثير من الأمراض النبات المسمى الليمون الهندي (Grapefruit) والعائد لعائلة الحمضيات ،فقد استخدمت بذوره لعلاج العديد من الأمراض ومنها قرح الفم ، التهاب البلعوم ، نزلات البرد والتهاب الأنف ، التهاب الإذن الوسطى وفي علاج الحروق كما استعمل في علاج الالتهابات المهبلية والأنفلونزا والتسمم الغذائي وفي تطهير الجروح الطفيفة ، وقد لوحظ فعل زيت بذور هذا النبات في الشفاء من مرض الصدفية والاكزيما الجافة والثآليل وفطريات أصابع القدم [1، 2].

تعد بكتريا المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* من الممرضات الخطيرة للإنسان لامتلاكها العديد من عوامل الضراوة ومن أهمها البروتينات الخارج خلوية (Extracellular proteins) حيث تلعب هذه العوامل دوراً رئيساً في عملية التصاق واستيطان البكتريا لأنسجة المضيف وحصول الإصابات المرضية المختلفة [3]. وتعد هذه البكتريا مسبباً للعديد من الإصابات كتجرثم الدم (Bacteremia) ، التهاب شغاف القلب (Endocarditis) ، التهاب العظام (Osteomyelitis) ، ذات الرئة (Pneumonia) والتهاب المفاصل (septic arthritis) ، وكذلك تسبب هذه البكتريا التسمم الغذائي (food poisoning) ومتلازمة الصدمة السمية (Toxic shock syndrome) [3، 4].فضلا عن كونها المسبب الرئيس لعدوى المستشفيات (Nosocomial infections) والناتجة من التداخل الجراحي للمرضى الراقدين في المستشفيات و الإصابات المرتبطة بتلوث الأجهزة الطبية [4].والتي لوحظ ارتفاع في معدلات الإصابة بها في المستشفيات مما سبب انتشارها بشكل واسع خصوصاً في وحدات العناية المركزة (intensive care units (**ICUs**)) ولاسيما المستخدمين للقثاطر ، وان تلوث أدوات وأجهزة المستشفيات واستعمار البكتريا لأيدي الكادر الطبي في المستشفيات ، يساهمان في حدوث أوبئة بهذه البكتريا [5].لذا ظهرت الحاجة للسيطرة على تلك الأوبئة من خلال غسل اليدين قبل وبعد ملامسة المرضى وحاجياتهم واستخدام طرق فاعلة في عمليات التطهير والتعقيم لمختلف الأدوات والمعدات الطبية والجراحية وبالتالي زاد الاهتمام بالدراسات والبحوث حول التصاق بكتريا *S.aureus* على مثل هذه المواد لارتباطها الوثيق بحدوث الإصابات المختلفة. ولذا فقد هدفت هذه الدراسة للتحري عن الفعل التثبيطي لمستخلص نبات الجريب فروت في الحد من قابلية هذه البكتريا الممرضة لتكوين الطبقة اللزجة وتقليل كفاءتها بالالتصاق على سطح الأدوات الطبية والجراحية كمستخلص طبيعي يمكن استخدامه كمطهر او معقم للحد والسيطرة على الإصابات المتسببة بفعل هذه العزلات المرضية .

المواد و طرائق العمل

- جمع العينات

تضمنت هذه الدراسة جمع 10 مسحات من الأنف والجروح المتقيحة من المرضى في مستشفى ابن النفيس ومختبر الصحة العامة المركزي فضلا عن عزلة مشخصة من مختبر الأحياء المجهرية في قسم علوم الحياة –كلية العلوم للبنات .

- تشخيص العينات

تم تشخيص عزلات بكتريا ***S. aureus*** المعزولة من العينات التي جمعت في هذه الدراسة اعتماداً على الصفات المجهرية والزرعية وعددمن الفحوصات الكيموحيوية وحسب ما جاء في[6] .

-الكشف عن قابلية العزلات المشخصة قيد الدراسة على تكوين الطبقة اللزجة Slime layer.

اتبعت الطريقة الموصوفة من قبل فريمان وجماعته للتحري عن انتاج الطبقة اللزجة من قبل عزلات بكتريا ***S. aureus***، بتنميتها على الأطباق الحاوية على وسط غراء احمر الكونغو وبعد حضنها لمدة 24 ساعة عند درجة حرارة 37 مْ ظهور مستعمرات سوداء اللون على هذا الوسط دليل على انتاج هذه العزلات للطبقة اللزجة [7] .

- إختبار التصاق عزلة بكتريا *S.aureus* على مادة الفولاذ المقاوم للصدأ stainless steel

استخدمت العزلة البكتيرية*S.aureus* الكفوءة في انتاج الطبقة اللزجة لاختبار قابليتها على الالتصاق بمادة الفولاذ المقاوم للصدأ (stainless steel) الداخلة في صناعة العديد من المواد الطبية والجراحية ولقد اعتمدت لذلك طريقة كراسيا [8] مع إجراء بعض التحويرات عليها حيث نميت العزلة في وسط مرق نقيع القلب – الدماغ(BHI broth) لمدة 6 ساعات و بدرجة حرارة 37 مْ ثم رسبت الخلايا بإستخدام جهاز المنبذ المركزي بسرعة 3000 دورة / دقيقة لمدة 10 دقائق و غسل الراسب مرتين بدارئ الفوسفات الملحي ذي الأس الهيدروجيني 7 ثم علقت في المحلول نفسه ثم قيست كثافتها ضوئية على الطول الموجي (600 نانومتر) لحين الوصول إلى تركيز الخلايا 1 × 10^8خلية / مللتر وبنفس الوقت تم وضع قطعة واحدة من مادة الفولاذ المقاوم للصدأ يصل طولها إلى 1 سم في العالق البكتيري وبعد الحضن لمدة 24 ساعة عند درجة حرارة 37 مْ تم حساب أعداد الخلايا الملتصقة من خلال غسل القطعة بمحلول دارئ الفوسفات الملحي مع الرج لمدة 3 دقائق ثم حضرت عدة تخافيف من هذا المحلول (10^{-1} ، 10^{-2} ، 10^{-3}) واخذ 0,1 مل من التخفيف10^{-3} و نشر على طبق الاكار المغذي و حضن بدرجة 37 مْ لمدة 24 ساعة وثم حسبت أعداد البكتريا بطريقة عد المستعمرات الحية .

- تحضير مستخلصات نبات الجريب فروت grapefruit extracts

حضر مستخلص عصير النبات بعصر الثمرة لهذا النبات واخذ 10 مل من العصير بإزالة البذور والأغشية ورشح عبر مرشحات غشائية (Millipore)بقطر0,22مايكرومتر. ولتحضير مستخلص البذور المائي تم استعمال طريقة التقطير التجزيئي–Fractional (distillation) بجهاز الاستخلاص Ordinary reflux وذلك بوضع (10:1) نسبة مسحوق بذور جافة إلى ماء ، في حين حضر مستخلص البذور grapefruit seed extract (GSE) بعصر الثمرة كاملة بمحتوياتها (بذور seeds، لب pulp وأغشيه بيضاء white membranes)بعد إزالة القشور الخارجية السميكة للثمرة[8].

- الكشف عن تأثير مستخلصات نبات الجريب فروت في نمو بكتريا *S.aureus*

استخدمت طريقة الانتشار في الحفر(well diffusion method) وفق [9] حيث زرعت البكتريا المرضية والمعزولة في الوسط المغذي السائل وحضنت في درجةحرارة37 مْ لمدة 3ساعات،ثم نقل جزء من العالق البكتيري ولقح به وسط الأكار المغذي الصلب وذلك بنشر0,1مل منه بوساطة ناشر ، ثم تركت الأطباق لتجفف بالحاضنة في درجة حرارة37 مْ لمدة 15دقيقة . ثم عملت ثقوب بقطر5ملم بوساطة ثاقب فليني وبواقع (3–4) حفرة للطبق الواحد وملئت كل حفرة منهم بمقدار 0,1 مل من المستخلص النباتي قيد الدراسة والذي حضر بتراكيز مختلفة وتمثلت السيطرة بإضافة ماء مقطر معقم فقط وبعد حضن الأطباق في درجة حرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة تم تسجيل النتائج بقياس قطر مناطق التثبيط.

- الكشف عن تأثير مستخلص البذور في التصاق بكتريا *S.aureus* على مادة الفولاذ المقاوم للصدأ

اعتمدت لذلك طريقة كراسيا وجماعته [9]المحورة والتي مر ذكرها سابقا مع ملاحظة انه تم إضافة مستخلص البذور (GSE) 100% إلى العالق البكتيري بحجم مساوي لحجم العالق البكتيري .

النتائج والمناقشة

تم الحصول على8عزلات تعود لبكتريا ***S. aureus*** من مجموع 10 مسحات تعود لعينات سريرية مختلفة، أعتمدت عدد من الفحوصات المظهرية والكيموحيوية لتمييز بكتريا ***S. aureus*** عن الأنواع البكتيرية الأخرى وحسبما جاء في [10] والتي اتصفت بتفاعلها الموجب مع صبغة غرام وقابليتها على النمو على وسط أكار المانيتول الملحي وتخميرها لسكر المانيتول وإنتاجها لإنزيم Catalase وإنزيم Coagulase.

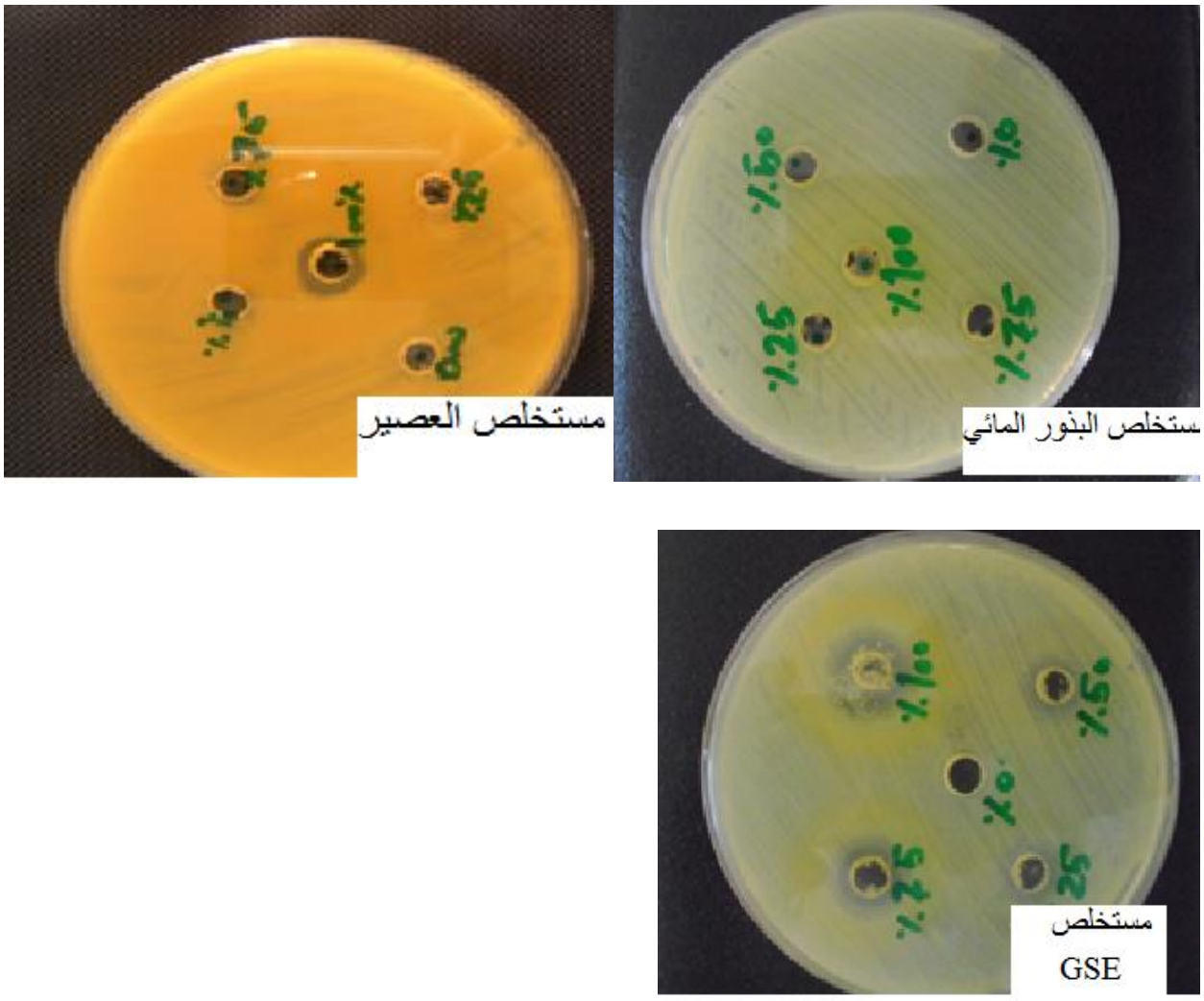
وعند التحري عن إنتاج الطبقة اللزجة من قبل هذه العزلات بينت النتائج أفضلية العزلة SA5في تكوينها لهذه الطبقة مقارنة ببقية العزلات من خلال ظهور مستعمراتها بلون وردي ووسط أكار احمر الكونغو بلون اسود شكل-1 . لقد بينت عدد من البحوث إمكانية استخدام وسط أكار احمر الكونغو كطريقة معتمدة للتحري عن إنتاج الطبقة اللزجة من قبل بكتيريا ***S. aureus*** [11، 12] حيث أن صبغة احمر الكونغو لها القابلية على تصبيغ السكريات المتعددة التي تتألف منها الطبقة اللزجة [7] .

شكل 1- إنتاج الطبقة اللزجة من قبل عزلات *S.aureus*باستعمال وسط أكار أحمر الكونغو.

وعند الكشف عن تأثير المستخلصات النباتية لنبات الجريب فروت في نمو عزلة البكتريا*S.aureus*SA5 بينت النتائج وكما موضح في الشكل-2 والجدول-1 ان المستخلص المائي لبذور نبات الجريب فروت وبتراكيزه المختلفة لم يظهر تأثير تثبيطي للنمو بينما وجد ان مستخلص العصير لهذا النبات كان ذو تأثير تثبيطي عند التراكير(100%،75%،50%) وبمعدلات أقطار تثبيطية(12ملم،10ملم،8ملم)على التوالي ،في حين أظهرمستخلص البذور(GSE) تأثير تثبيطي أقوى عند التراكيز (100%، 75%، 50%، 25%) وبمعدلات اقطار بلغت (15ملم، 12ملم، 9ملم، 7ملم) على التوالي كما موضح في الجدول أدناه، والذي يتفق مع نتائج عدد من البحوث في امتلاك هذا المستخلص النباتي الفاعلية التثبيطية ضد عدد من البكتيريا الممرضة ومنها بكتيريا *S.aureus* [14,13، 15] وذلك لما يحويه هذا المستخلص من مركبات فاعلة ذات تأثير مؤكسد للأحياء المجهرية ومن ضمنها البكتريا الموجبة لصبغة غرام ومن هذه المركبات النارنجين (Naringin) و الهسبردين (hesperidine) اللذان يعودان الى الفلافونيدات Flavonoids [14، 16] .

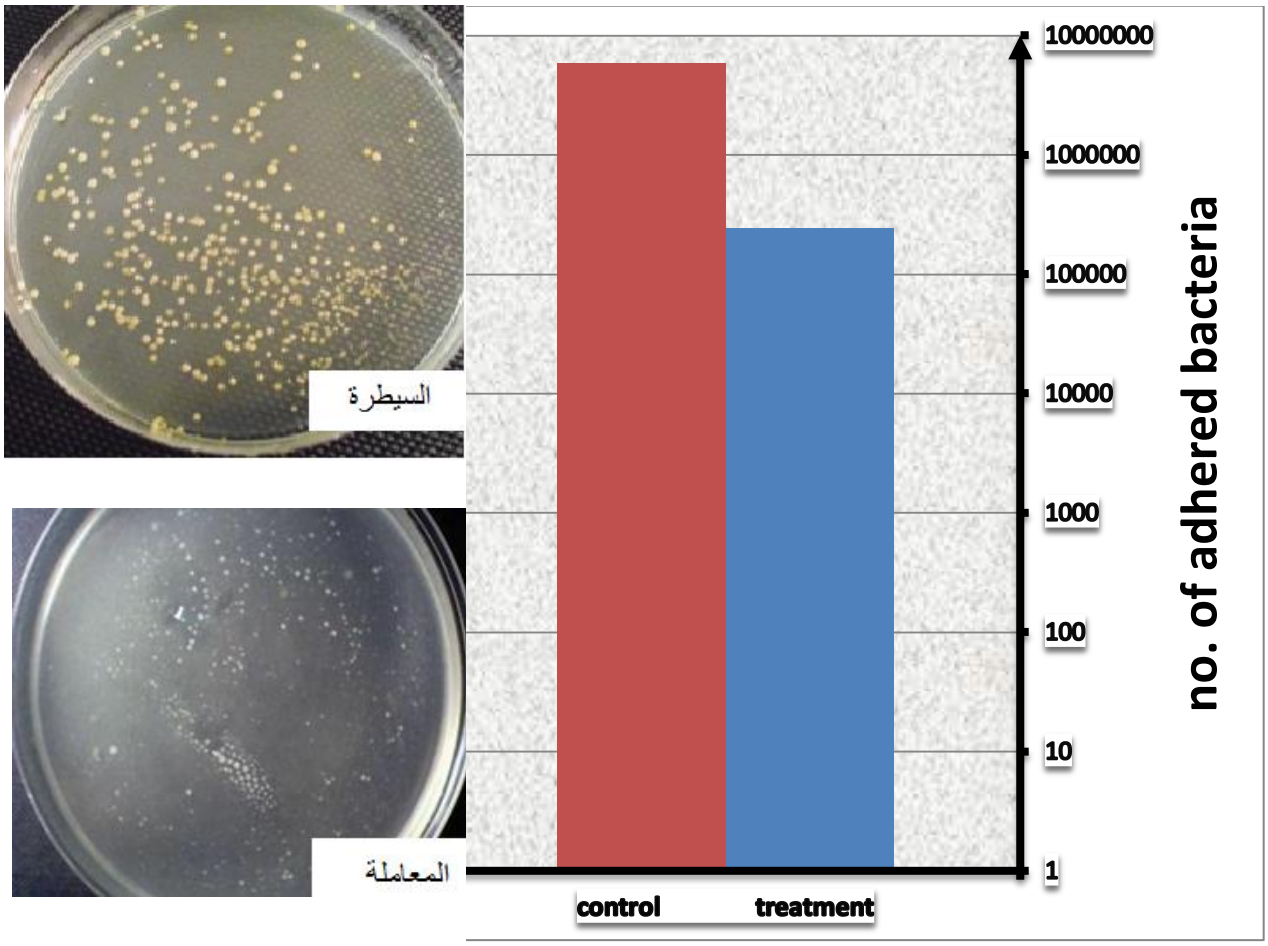
جدول 1- أقطار مناطق التثبيط (ملم)عند استخدام مستخلصات نبات الجريب فروت المختلفة بتراكيز متدرجة.

المستخلص	التركيز (%)	قطر منطقة التثبيط (ملم)
مستخلص البذور المائي	25	0
	50	0
	75	0
	100	0
مستخلص العصير	25	0
	50	8
	75	10
	100	12
مستخلصGSE	25	7
	50	9
	75	12
	100	15



شكل 2- تأثير مستخلصات نبات الجريب فروت في نمو عزلة البكتريا*S.aureus*SA5.

وعند اختبار قابلية التصاق العزلة البكتيرية SA5 على مادة الفولاذ المقاوم للصدأ أظهرت النتائج أن عدد كبير من الخلايا البكتيرية المحضونة بوجود قطعة من مادة الفولاذ المقاوم للصدأ قد التصقت بسطح هذه المادة والذي كان بحدود 58×10^{5}خلية / مل وهذه مثلت معاملة السيطرة في حين انخفض عدد الخلايا الملتصقة بسطح هذه المادة إلى 24×10^{4} خلية / مل عند معاملتها بمستخلص GSE(100%) (لكونه الأقوى تأثيراً في تثبيط نمو *S. aureus*) شكل-3 ، إن السبب في التصاق الخلايا البكتيرية بسطح مادة الفولاذ المقاوم للصدأ في معاملة السيطرة يعود إلى كونها تعد من المواد الأكثر جذباً للبكتريا لما تمتاز به من خشونة السطح [17]،إضافة إلى عدة عوامل تحفز هذا الالتصاق البكتيري ومنها عوامل بيئية كدرجة الحرارة، فترة التعرض والتركيز البكتيري؛ عوامل تتعلق بخصائص سطح المادة كالتركيب الكيميائي للمادة، شحنة السطح، ألفته للماء وخشونة السطح [18] أما السبب في انخفاض عدد الخلايا البكتيرية الملتصقة بهذه المادة عند معاملتها بالمستخلص النباتي يعود إلى تغير قيمة الأس الهيدروجيني PH حيث ان هذا المستخلص يحوي على مركبات النارنجين ذات أس هيدروجيني اقل من 2 والذي سيؤدي إلى تغيرات في شحنات سطح المادة الصلبة الملتصقة عليها البكتريا وبالتالي سيؤثر في عملية الالتصاق [19,17].فضلا عن عمل هذا المستخلص على الإخلال بالغشاء الخلوي ومحتويات سايتوبلازم الخلية البكتيرية عند التعرض له [20].



شكل 3- تأثير مستخلص GSE في التصاق عزلة البكتريا*S.aureus*SA5على مادة الفولاذ المقاوم للصدأ.

المصادر

1. ظاهر، سعدي محمد .**2003**. الأعشاب الطبية/ الطب البديل. *مجلة المستقبل*، 38:9-40 .
2. الشحات، نصر أبو زيد .**1986**. *النباتات والإعشاب الطبية*. دار البحار، بيروت .

3. Levinson, W., Jawetz, E**. 2002**. *Medical Microbiology&Immunology: Examination & Board Review.*7th ed. TheMcGraw -Hill Co., USA.
4. Nair**,**S . P ., Williams , R . J .and Henderson , B . **2000**. Advances in our understanding of the bone and joint pathology caused by *Staphylococcus aureus* Infection. *Oxford Journals , Rheumatology*. 39: pp: 821 – 834.
5. Diekema**,** D.J ., Pfaller, M.A ., Schmitz, F .J ., Smaye ,J ., Bell, J., Jones, R. N. and Beach, M. **2001**. Survey of infections due to *Staphylococcus* species.freguency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States for the Centery antimicrobial surveillance Program.,*Clin . Infect .Diss .*, 32, pp: 114 – 132 .
6. Forbes, B.A., Sahm, D.F. and Weissfeld, A.S. **2002**. *Baily and Scotts: Diagnostic Microbiology*. 11th ed. Mosby, Inc. Baltimore, USA.
7. Freeman**,**D.J.,Falkinar,F.R.and Kean,C.T.**1989**.New method for detection slime production by coagulase negative staphylococci,*J.Clin.Pathol*.,42, pp:872-874.
8. Von Woedtke**,** T., Schlüter, B.,Pflegel, P., Lindequist,, U. and Jülich, W.D. **1999**. Aspects of antimicrobial efficacy of grapefruit seed extract and its relation to preservative substances contained. *Pharm*.54, pp: 452-456.
9. Gracia**,** E., Fernandez, A., Conhello, p.and Lacleriga, P. L. **1977**.Adherence of *Staphylococcus aureus* slime –producing strain variants to biomaterials used in Orthopaedic surgery.*Int.Orthop*.,21(1), pp:46-51.
10. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) **.1997** . Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for Bacteria that grow aerobically .*Approved Standards M7-A4. National committee for clinical Laboratory Standards* .wayne , PA . USA.
11. Krukowski, H.,Szymankiewicz, M. and Lisowski, A. **2008.** Slime productionby *Staphylococcus aureus*strainsisolated from cases of bovine mastitis.*Polish J Microbiol*,. 57(3): 253-255.
12. Hammadi, K. M. and Yousif, A. A. **2014**. Detection of slime material in Staphylococcus aureus bacteria from ovinemastitis by transmission electron microscope and Congo red agar method. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*., 3(4), pp: 304-309.
13. Al–Âni, W.N.,Tawfik, N.O. and Shehab, E.Y.**2011**. Antimicrobial activity of grapefruit seeds extracts (*In vitro* Study).*Al–Rafidain Dent J*., 11(2), pp: 341-345.
14. Cvetnić, Z. and Vladimir – Knežević, S.**2004**. Anti-microbial activity of grapefruit seed and pulp ethanolic extract. *Acta Pharm*., 54, pp: 243 – 250.
15. Reagor, L.,Gusman, J., McCoy, L.,Carino,E.and Heggers, J.P.**2002**. The effectiveness of processed grapefruit seed extract as antibacterial agent: 1. An *in vitro* agar assay. *J Altern Complement Med*.,8, pp: 325 – 332.
16. Giuseppe, G.,Davide, B., Claudia, G.,Ugo, L. andCorrado, C.**2007.** Flavonoid composition of citrus juices. *Molecules*.,12, pp: 1641-1673.
17. Kouider,N., Hamadi, F., Mallouki, B., Bengoram, J., Mabrouki, M., Zekraoui, M., Latrache, H. and Ellouali,M.**2010**. Effect of stainless steel surface roughness on *Staphylococcus aureus* adhesion.*International Journal of Pure and Applied Sciences*,4(1), pp:1-7.
18. Katsikogianni, M. and Missirlis, Y.F.**2004**. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria material interactions.*Eur Cell Mater* ., 8, pp:37-57.
19. Fletcher**,**M. **1980**. The characteristics of interfaces and their role in microbial attachment ,In"*Microbial adhesion to surfaces* ,Berkely ,R.C.,Lynch,J.M. Melling,J.,Rutter , P.R.Vincent, B.,eds.,pp:67-78." Horwodlimited,USA.
20. Heggers, J.P.,Cottingham, J.,Gusman, J.,Reagor, L., McCoy, L.,Carino, E., Cox, R. and Zhao, J. **2002.**The effectiveness of processed grapefruit seed extract as an antibacterial agent: II. Mechanism of action and *in vitro* toxicity. *J Altern Complement Med*., 8, pp: 333 – 340.