Mesopotamia J. of Agric. ISSN: 2224 - 9796 (Online) مجلــة زراعــة الـرافديـن
Vol. (46) No. (3) 2018 ISSN: 1815 - 316 X (Print) المجلد (46) العدد (3) 2018

تأثير مستخلص اللهانة الحمراء الخام في نمو كل من بكتريا *Escherichia coli* و Staphylococcus aureus

مهند ممتاز صالح الطالب صــلاح عمــر أحمــد
قسم علوم الأغذية / كلية الزراعة والغابات / جامعة الموصل / العراق
Email:Salah.omar15@yahoo.com

الخلاصة

ركزت الدراسة الحالية على معرفة تأثير نوعين من مستخلصات اللهانة الحمراء الخام. الأول مستخلص ميثانولي محمض بالـ HCL والثاني ميثانولي مستخلص 80%، في نمو كل من بكتريا Escherichia coli و Staphylococcus aureus في أوساط صلبة وسائلة باستعمال تراكيز 125 و250 و 500 مايكروليتر / معاملة والمقارنة مع المعاملة القياسية الخالية من المستخلص، حضنت المعاملات لمدد 24 و 48 و 72 ساعة بدرجة حرارة 30 ْم، أوضحت النتائج أن إضافة مستخلصي اللهانة بالتراكيز المستخدمة كافة سبب انخفاضاً معنوياً ($P\leq0.05$) في كل من بكتريا E.coli و Staph. aureus في الوسط الصلب إذ تراوحت نسب التثبيط لمستخلصي اللهانة الحمراء بين 42.59 – 92.17 و 40.04 – 86.60 % لنوعي البكتريا،على التوالي، أما في الوسط السائل فقد تراوحت النسب لمستخلصي اللهانة الحمراء بين 46.44– 96.26 و 44.45– 95.10%، على التوالي، وان اقل تركيز مثبط (MIC) حدث عند إضافة مستخلص اللهانة الميثانولي المحمض بـ HCl بواقع 200 مايكروليتر ضد بكتريا E.coli وهو يقل عن التركيز المثبط الأدنى لبكتريا Staph. aureus.

كلمات دالة: المستخلص الميثانولي، E.coli، Staph. aureus، اللهانة الحمراء، MIC.

تاريخ تسلم البحث: 2/17/ 2014، وقبوله 2017/12/17

المقدمة

تعد الأغذية وسط ملائم لنمو وتكاثر كثير من أنواع الأحياء المجهرية فهي تسبب مخاطر صحية وأضرارا اقتصادية عند تواجدها في الأغذية، تتعرض الأغذية مثل منتجات الألبان واللحوم والبيض ومنتجات غذائية مثل العصائر وغيرها إلى التلوث بأنواع مختلفة من الأحياء المجهرية مثل بكتريا Coliform وListeria و Salmonella و Clostridium perfringens وStaph. aureus وغيرها وذلك خلال إنتاج وحفظ وتداول هذه الأغذية (Ivana وآخرون، 2009)،

تعتبر بكتريا E.coli المتوطنة في أمعاء الإنسان والحيوان أهم وأكثر الأنواع الملوثة للأغذية لذلك يكون مصدرها براز الإنسان والحيوان التي تلوث الأغذية ولوحظ تلويثها لمنتجات اللحوم والألبان وغيرها (AL-Mutairi، 2011). ومما يزيد من مخاطر هذه البكتريا أن العديد من سلالاتها تكون مرضية (Vogt و Dippold، 2005).

تعتبر بكتريا Staph.aureus أحد الأنواع التي وجدت ملوثة لأنواع كثيرة من الأغذية وهي تسبب للتسمم الغذائي وتفرز العديد من أنواع السموم المعوية مما يجعل الاهتمام بهذه البكتريا بالغ الأهمية (Argudin وآخرون، 2010).

استخدمت العديد من المواد الحافظة لمنع نمو البكتريا الملوثة للأغذية إلا انه ونتيجة للمخاطر الصحية للمركبات الكيميائية الحافظة فقد اتجهت الدراسات إلى استخدام المواد الطبيعية في حفظ الأغذية منها المركبات الفينولية مما جعل من الممكن استخدامها في تثبيط نمو مجاميع كبيرة من البكتريا والفطريات إذ تشير الدراسات إلى أن للمركبات الفينولية فاعلية في تثبيط العديد من انواع البكتريا خاصة عند إضافتها بتراكيز عالية (Chakraborty وآخرون، 2007). وقد أكدت الدراسات أن لمستخلص اللهانة الحمراء تأثير مثبط للأحياء المجهرية السالبة والموجبة لصبغة كرام (Hafidh وآخرون، 2012).

تعتبر اللهانة الحمراء غنية بالمركبات الفينولية وخاصة المركبات الفلافونويدية ومنها الفلافونولات الـFlavonols والانثوسيابنينات Anthocyanins كما ان اللهانه غنية بالكاروتينويدات وحامض الأسكوربك وفيتامين A (Leja وآخرون،2010).

إن الهدف من الدراسة هو التعرف على الفعالية التثبيطية لمستخلصي اللهانة الحمراء (الميثانولي المحمض بـ HCL والميثانولي 80%) في بكتريا E.coli و Staph. aureus المنماة في أوساط صلبة وسائلة وقياس التركيز المثبط الأدنى(MIC) للمستخلصين ضد نوعي البكتريا أعلاه.

مواد البحث وطرائقه

اللهانه الحمراء: تم الحصول على اللهانه الحمراء Brassica oleracea من الأسواق المحلية لمدينه الموصل وهي من صنف Semena وأجري الغسل والتقطيع إذ بلغت مساحة القطع 0.5 سم2 ، جففت القطع في غرفة مظلمة ولمدة 7 أيام بدرجة حرارة 45م^5 ثم حفظت بعبوات بلاستيكية معتمة بالتجميد لحين الاستعمال (Hafidh وآخرون،2011).

البكتريا:- استخدمت عزلتين محليتين من بكتريا Escherichia coli و Staphylococcus aureus جرى الحصول عليهما من قسم علوم الحياة / كلية العلوم /جامعة الموصل.

تحضير المستخلصات: حضر نوعين من المستخلصات من اللهانه الحمراء وكالآتي:

مستخلص الميثانول المحمض: مزج 20 غرام من مسحوق اللهانه الحمراء المجففة مع الميثانول المحمض بـHCL (ميثانول محمض بـ (2.4) ملمول / لتر حامض HCL) وجرى المزج بنسبة 10:1 مسحوق: ميثانول محمض بـHCL حسب ماذكره Hafidh وآخرون (2011) إذ تم نقع المسحوق بالميثانول المحمض لمدة 3 أيام لاستخلاص المواد الفينولية ثم الترشيح وكررت عملية النقع والترشيح لمرتين وجفف المستخلص تماما بدرجة حرارة 40 ْم تحت التفريغ باستخدام المبخر الدوار Rotary evaporator وحفظ المستخلص بالتجميد لحين الاستعمال.

مستخلص الميثانول المائي: حضر المستخلص وفق الطريقة التي ذكرها Leja وآخرون (2010) اذ تم وزن 20 غرام من اللهانه الحمراء ثم أضيف لها 200 مل من كحول الميثانول (80%)، بعدئذ نقعت بالمذيب لمدة 3أيام ورشحت باستخدام ورق ترشيح نوع (mm155Cito test)، اخذ الراسب وكررت عملية الاستخلاص مرة ثانية وجمع الراشح ومزج جيدا ثم جفف بواسطة حمام مائي على درجة حرارة (40) م^5 وحفظ بالتجميد بعبوة معتمة لحين الاستعمال.

تقدير كمية المواد الفينولية الكلية في مستخلص اللهانة الحمراء: جرى تقدير الفينولات الكلية كحامض الكاليك Gallic acid في مستخلصات اللهانه الحمراء باستخدام جهاز HPLC نوع Shimadzu LC-2010 A أمريكي المنشأ وذلك باستخدام عمود فصل C18 أبعاده 150/406 مصدره شركة macherey nagel الأمريكية وباستخدام Detector نوع UV/Vis وعلى طول موجي 320 nm وباستخدام الميثانول الخاص بجهاز الـHPLC واستخدم حامض الكاليك القياسي لتحضير المحلول، جرى حقن المستخلصات المدروسة بعد إذابتها ثم اجري تقدير كمية المركبات الفينولية الكلية بجهاز الـ HPLC ووفق ما ذكره (Kaskoniene واخرون، 2009)

تحضير معلق البكتريا: نميت كل من بكتريا E.coli و Staph.aureus على حدا على وسط Nutrient broth المغذي السائل مصدره شركة Lab الانكليزي المنشأ إذ عقم الوسط بجهاز المؤصدة وبرد ثم لقح بالبكتريا وحضن بدرجة حرارة 30ْم لمدة 24 ساعة.

تأثير المستخلصات في نمو البكتريا:- درس تأثير مستخلصي اللهانه الحمراء في نمو كل من بكتريا E.coli و Staph.aureus في أوساط صلبة وسائلة وفق ما جاء في Eteghad وآخرون (2009) واجري اختبار الفعل التثبيطي للمستخلصات إذ اذيب مستخلص اللهانة الحمراء الجاف بالميثانول بنسبة 1:1 وكالآتي:

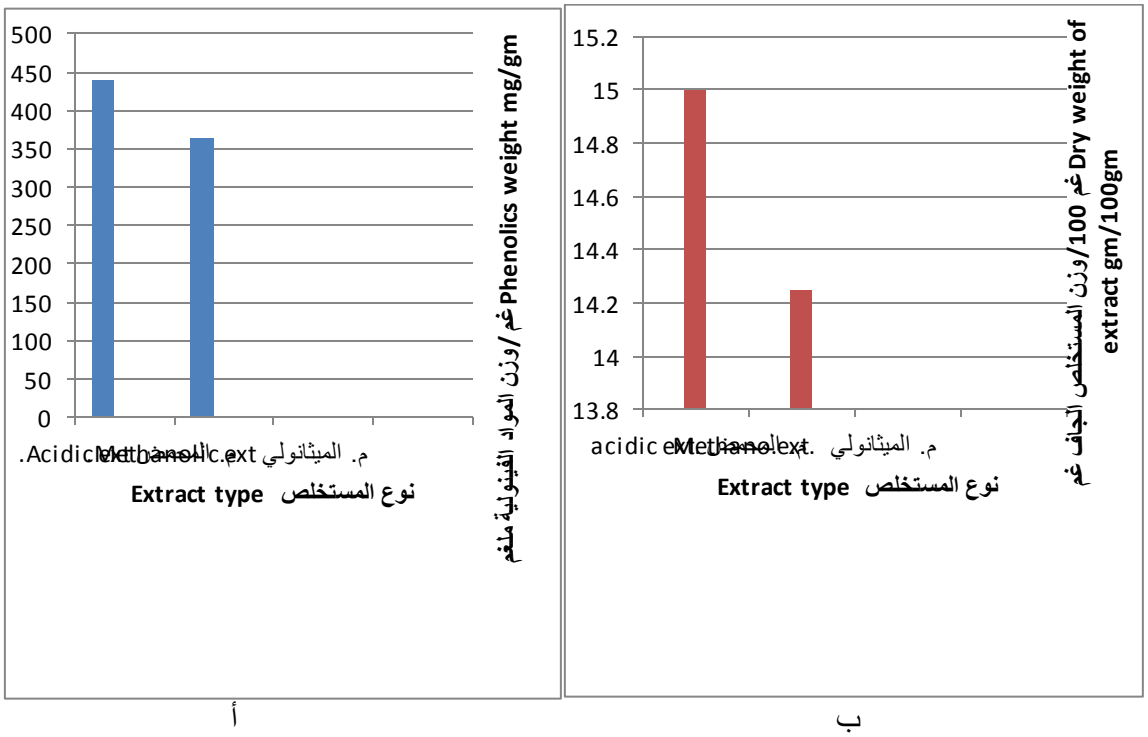
الوسط الصلب: نميت بكتريا E.coli في وسط Macconky agar مصدره شركة Lab انكليزي المنشأ فيما نميت بكتريا Staph.aureus في وسط Manitol salt agar مصدره شركة Lab انكليزي المنشأ، حضرت أطباق بتري معقمة تحتوي الوسطين (بيئة صلبة) ولقحت بـ 0.1 مل من مزرعة البكتريا السائلة بطريقة النشر على سطح الوسط الغذائي وجرى تثبيت أقراص معقمة في وسط الطبق وأضيف إلى القرص احد المستخلصين بتراكيز 125 و250 و500 مايكروليتر/ قرص فيما خلت المعاملة القياسية من أي مستخلص ثم حضنت الأطباق بدرجة 30ْم لفترات 24و48و72 ساعة وجرى حساب أقطار منطقة التثبيط الرائقة وحسبت النسب المئوية للتثبيط وفق ما ذكره (Ahmed وآخرون،2003).

الوسط السائل: استخدم في تنمية بكتريا E.coli و Staph.aureus الوسطين التغذويين ماكونكي السائل Macconky broth والمرق المغذي Nutrient broth لنوعي البكتريا، على التوالي، وبعد تعقيم وتبريد الوسطين لقحا بـ 1 مل من معلق البكتريا يحوي 610 خلية ثم أضيف مستخلصي اللهانة الحمراء إلى الوسط السائل وبتراكيز125 و250 و500 مايكروليتر/ معاملة فيما خلت المعملة القياسية من أي مستخلص، رجت الأنابيب بصورة جيدة ثم حضنت بدرجة حرارة 30ْم لمدة 24 و48 و72 ساعة بعد ذلك قدرت أعداد البكتريا النامية وحسبت النسب المئوية للتثبيط (Ahmed واخرون، 2003).

التركيز الأدنى المثبط للبكتريا MIC: جرى قياس التركيز الأدنى المثبط للبكتريا E.coli باستخدام وسط Macconky broth وبكتريا Staph.aureus باستخدام وسط Nutrient broth إذ جرى توزيع الوسطين في أنابيب اختبار بواقع 10 مل / أنبوبة ثم لقحت بـ 1 مل من معلق نوعي البكتريا وأضيف كل مستخلص بتراكيز من 50- 600 مايكروليتر/ انبوبة وحضنت الأنابيب بدرجة حرارة 35مْ لمدة 24 ساعة ولوحظت النموات من خلال ظهور العكارة بالمقارنة مع المعاملة القياسية Turnidge وآخرون (2003).
التحليل الإحصائي: تم تحليل البيانات إحصائيا باستخدام التصميم العشوائي الكامل CRD وإجراء اختبار دنكن للمقارنة بين المتوسطات عند مستوى احتمال 0.05، وباستخدام نظام SAS للتحليل الإحصائي (Anonymous، 2000).

النتائج والمناقشة

محتوى اللهانة الحمراء من المواد الفينولية الكلية ووزن المستخلص الجاف: تتفاوت المواد الغذائية في محتواها من المركبات الفينولية، وكذلك في كمية المستخلص المتحصل عليه خلال الاستخلاص.



أ ب

الشكل (1) محتوى المستخلصات الفنولية للهانة الحمراء من (آ) المواد الفينولية الكلية (ملغم/غم) و(ب) وزن المستخلص الجاف (غم/100 غم مادة جافة).

الشكل (2 – آ و ب) يبين ذلك فيتضح أن مستخلصي اللهانة الحمراء سواء الميثانولي المحمض بـ HCL أو الميثانولي 80% احتويا على فينولات كلية (مقدرة كحامض الكاليك Gallic acid) بتراكيز متفاوتة وكذلك كانت كمية المستخلص الجاف مختلفة،وبصورة عامة ازدادت كمية المواد الفينولية الكلية في التراكيز المستعملة في الدراسة بزيادة التركيز المضاف لذلك فان أعلى كمية للمواد الفينولية كان عند إضافة 500 مايكروليتر من مستخلصي اللهانة الحمراء إلى الوسط الصلب أو السائل وانخفضت كمية المواد الفينولية عند التركيزين 250 و 125 مايكروليتر، وهذا يتوافق مع ماوجده Lungu وآخرون (2010) الذين لاحظوا احتواء اللهانة الحمراء على المواد الفينولية الكلية (كحامض كاليك) بنسب عالية.
تاثير مستخلصي اللهانة الحمراء في بكتريا E.coli في الوسط الصلب: إن مستخلصي اللهانة الحمراء سواء الميثانولي المحمض أو الميثانولي كان لهما تأثيرا مثبطاً لنمو بكتريا E.coli في الوسط الصلب وكما هو موضح في الجدول (1) إذ أظهر نوعي المستخلص فعالية تثبيطية عالية بلغ أعلاها 92.17 و 84.89 % لنوعي المستخلص عند تركيز 500 مايكروليتر/ قرص، وبعد 24 ساعة من التحضين،على التوالي،

الجدول (1) النسب المئوية لتثبيط بكتريا E. coli بإضافة مستخلصي اللهانة الحمراء في الوسط الصلب
Table (1) Inhibition percentage of E.coli by adding two red cabbage extracts of cabbage in solid media.

المعدل mean	فترة التحضين (ساعة) Incubation period (hrs)			التركيز المضاف (مايكروليتر) Conc. µl	نوع المستخلص Extract type
	72	48	24		
0.00 ±0.0 g	0.00 ±0.0 l	0.00 ±0.0 l	0.00 ± 0.0** l*	معاملة المقارنة	المستخلص الميثانولي المحمض بـ (HCl) Acdic methanolic extr.
48.19 ±0.491 e	47.07 ±0.045 ij	47.91 ±0.315 hi	49.60 ±0.43 h	125	
77.74 ±0.621 C	75.95 ±0.725 f	78.36 ±0.39 e	78.03 ±0.295 e	250	
89.48 ±1.08 a	86.56 ±1.165 c	89.71 ±0.175 b	92.17 ±545 a	500	
0.00 ±0.0 g	0.00 ±0.0 l	0.00 ±0.0 l	0.00 ± 0.0 l	معاملة المقارنة	المستخلص الميثانولي (%80) Methanolic 80% extr.
44.82 ±856 f	42.59 ±0.525 k	45.24 ±1.31 j	46.64 ±0.71 ij	125	
73.44 ±0.928d	71.39 ± 1.15g	73.20 ±1.11g	75.72 ±0..965 f	250	
82.47 ±1.027 b	79.62 ±0.515 e	82.92 ±0.635d	84.89 ±0.97 c	500	
	50.39 ±8.372 c	52.17 ±8.658 b	53.49 ±8.855 a	المعدل mean	

* الأحرف المتشابهة لا تختلف معنويا عند مستوى احتمال 0.05
The same letters were not significantly different at the probability level of 0.05
** الخطأ القياسي Standard error

فيما بلغت الحدود الدنيا لنسب التثبيط 47.07 و42.59 % لنوعي المستخلص، على التوالي عند تركيز 125مايكروليتر/ قرص وبعد 72 ساعة من التحضين. وتشير نتائج الجدول إلى أن زيادة تركيز المستخلصين رفع معنوياً ($P\leq0.05$) من النسب المئوية للتثبيط وهذا يرجع إلى زيادة تراكيز المواد الفينولية والتي لها فعل مثبط للبكتريا المدروسة (الشكل 1) خاصة مركبات الفلافونويدات وخاصة الانثوسيانينات والتي تعد اللهانة الحمراء غنية بهما (Arapitsas و Turner، 2008) فيما حصل انخفاض في النسب المئوية لتثبيط بكتريا E.coli بإطالة مدة التحضين وقد يعزى هذا إلى أكسدة بعض المركبات الفينولية ذات الفعالية التثبيطية وفقدانها هذه الفعالية. فيما يتعلق بمعدل فترات التحضين حصل تبايناً معنوياً بينها إذ أن أعلى معدل كان 53.49% وذلك بعد 24 ساعة من التحضين. ثم انخفض معنويا إلى 52.17 و 50.39% بعد 48 و72 ساعة، على التوالي.أما معدل التراكيز المضافة فان الجدول أعلاه يوضح أن أعلى نسب التثبيط حصلت عندما أضيف أي من المستخلصين بواقع 500 مايكروليتر إذ بلغت نسب التثبيط 89.48 و82.47 % لمستخلصي الميثانول المحمض والميثانول 80%، على التوالي وانخفض المعدل بانخفاض تركيز المستخلص المضاف ويعزى هذا إلى انخفاض في الفينولات الكلية في المستخلصين. من الجدول أعلاه يلاحظ كذلك أن المستخلص الميثانولي المحمض أعطى فعالية أعلى في التثبيط بالمقارنة مع المستخلص الميثانولي 80% وهذا يرجع إلى قدرة حامض HCL على فصل المركبات الفينولية المرتبطة مع المكونات الأخرى وخاصة السكريات مما يجعلها ذات فعالية أكبر وهو ما يؤكده Arnnok وآخرون (2012) إذ وجدوا أن الميثانول المحمض بـ HCL أعطى أعلى كمية من المواد الفينولية. تاثير مستخلصي اللهانة الحمراء في بكتريا Staph.aureus في الوسط الصلب: يلاحظ من الجدول (2) ان البكتريا Staph.aureus

قد ثبط نموها معنوياً (P≤0.05) بتأثير مستخلصي اللهانة الحمراء (الميثانولي المحمض والميثانولي 80%) وبنسب متفاوتة بحسب التركيز المضاف وفترات التحضين. كانت أعلى معدلات التثبيط بعد 24 ساعة وبإضافة 500 مايكروليتر/ قرص إذ بلغت النسب المئوية للتثبيط ولنوعي المستخلص 86 و83.29 % على التوالي، أما أدنى نسب تثبيط بكتريا Staph.aureus فقد حصل عند إضافة المستخلص بتركيز 125 مايكروليتر/ قرص وبعد 72 ساعة من التحضين ووصلت نسب التثبيط لكلا المستخلصين، 42.16 و 40.04%، على التوالي، حصلت زيادة معنوية في نسب التثبيط بزيادة التركيز المضاف خاصة عند إضافة المستخلصين بتركيز 500 مايكروليتر/قرص وذلك لاحتواء المستخلصين على اعلي كميات المواد الفينولية (الشكل 1) وماتحتويه من مركبات متنوعة ذات تأثير مثبط للبكتريا

الجدول (2) النسب المئوية لتثبيط بكتريا Staph. aureus بإضافة مستخلصي اللهانة الحمراء في الوسط الصلب

Table (2) Inhibition percentage of Staph.aureus by adding two extracts of red cabbage in solid media.

المعدل Mean	فترة التحضين (ساعة) Incubation period (hrs)			التركيز المضاف (مايكروليتر) Conc. µl	نوع. المستخلص Extract type
	72	48	24		
0.00 ±0.0 g	0.00 ±0.0 n	0.00 ±0.0 n	0.00 ± 0.0** n*	معاملة المقارنة	المستخلص الميثانولي المحمض بـ (HCl) Acdic methanolic extr.
44.91 ±0.988 e	42.16 ±0.74l	45.20 ±0.475 k	47.37 ±0.445 j	125	
69.85 ±0.959 c	67.22 ±0.765 h	70.07 ±0.45 g	72.27 ±0.4 f	250	
84.70 ±0.829 a	82.40 ±1.05 cd	85.11 ±0.125 b	86.60 ±0.37 a	500	
0.00 ±0.0 g	0.00 ±0.0 n	0.00 ±0.0 n	0.00 ±0.0 n	معاملة المقارنة	المستخلص الميثانولي (%80) Methanolic 80% extr.
42.81 ±1.011 f	40.04 ±0.15 m	42.94 ±0.18 l	45.46 ±0.76 k	125	
68.08 ±1.218 d	64.66 ±0.455 i	68.44 ±0.875 h	71.14 ±0.315 fg	250	
81.18 ±0.817 b	78.99 ±0.105 e	81.25 ±0.62 d	83.29 ±0.58 c	500	
	46.93 ±7.9 c	49.12 ب ±8.175 b	50.77 ±8.374 a	Mean المعدل	

* الأحرف المتشابهة لا تختلف معنويا عند مستوى احتمال 0.05

The same letters were not significantly different at the probability level of 0.05

** الخطأ القياسيStandard error

كما حصل انخفاض معنوي في نسب تثبيط البكتريا السابقة بإطالة مدة التحضين وهذا ماظهر جلياً عند التحضين لمدة 72 ساعة إذ أعطت أقل نسب تثبيط البكتريا (للأسباب الواردة عند مناقشة الجدول 1) اذ انه مع إطالة فترة التحضين حصل زيادة في نمو البكتريا بدرجة اكبر خلال الـ 48 و72 ساعة بالمقارنة مع 24 ساعة. أما معدلات فترة التحضين فان أعلى معدلات نسب التثبيط كان بعد 24 ساعة وبلغ 50.77% لنوعي المستخلصين ثم انخفضت المعدلات لتصل بعد 48 و 72 ساعة إلى 49.12 و 46.93% على التوالي، اما معدلات التراكيز المضافة فان إضافة 500 مايكروليتر/ قرص أعطى أعلى معدلات نسب التثبيط إذ بلغت 84.70 و81.18%، على التوالي، ثم حصل انخفاض معنوي بانخفاض التراكيز المضافة من نوعي مستخلص اللهانة.

تاثير مستخلصي اللهانة الحمراء في بكتريا E.coli في الوسط السائل: يتضح من الجدول (3) أن هناك فروقاً معنوية ($P\leq0.05$) في النسب المئوية لتثبيط بكتريا E.coli وفق التراكيز المضافة وكذلك بين فترات التحضين. إذ أن إضافة أي من المستخلص الميثانولي المحمض والميثانولي للهانة الحمراء بتركيز 500 مايكروليتر/ معاملة ولمدة 24 ساعة من التحضين أعطى أعلى نسب تثبيط للمستخلصين في الوسط الغذائي السائل إذ بلغت 96.26 و93.11 %، على التوالي، فيما كانت ادني نسب التثبيط للبكتريا أعلاه ظهرت بعد 72 ساعة من التحضين وعند إضافة المستخلصين بتركيز 125 مايكروليتر/ قرص إذ بلغت 53.97 و46.44 %، على التوالي. ظهرت زيادة معنوية في نسب تثبيط البكتريا بزيادة التركيز المضاف من المستخلصين ويعزى هذا الى كمية المواد الفينولية في كل تركيز (الشكل 1) وبدا هذا جلياً عند إضافة نوعي المستخلص بتركيز 500 مايكروليتر/ معاملة إذ احتوي على أعلى كمية من المواد الفينولية الكلية، كما أن إطالة فترة التحضين خفضت من نسب التثبيط وللأسباب التي أوردت عند مناقشة الجداول (1 و2).

الجدول (3) النسب المئوية لتثبيط بكتريا E. coli إضافة مستخلصي اللهانة الحمراء في الوسط السائل.

Table (3) Inhibition percentage of E.coli by adding two extracts of red cabbage in liquid media

نوع المستخلص Extract type	التركيز المضاف (مايكروليتر) Conc. µl	فترة التحضين (ساعة) Incubation period (hrs)			المعدل Mean
		24	48	72	
المستخلص الميثانولي المحمض بـ (HCl) Acdic methanolic extr.	معاملة المقارنة	0.00 ± 0.0** n*	0.00 ±0.0 n	0.00 ±0.0 n	0.00 ±0.0 g
	125	56.62 ±0.295 j	54.80 ±0.535 k	53.97 ±0.945 k	55.13 ±0.574 e
	250	80.83 ±0.51 e	79.87 ±0.665 ef	78.51 ± 0.36fg	79.73 ±0.487 c
	500	96.26 ±0.605 a	94.15 ±0.04 b	94.07 ±0.05b	94.82 ±0.479 a
المستخلص الميثانولي (80%) Methanolic 80% extr.	معاملة المقارنة	0.00 ± 0.0 n	0.00 ±0.0 n	0.00 ±0.0 n	0.00 ±0.0 g
	125	48.85 ±1.69 l	47.29 ±0.58lm	46.44 ±0.21 m	47.53 ±0.644 f
	250	76.88 ±0.445 gh	76.12 ±1.065 hi	74.83 ±0.6 i	75.94 ±0.505 d
	500	93.11 ±0.545 bc	92.25 ±0.115 cd	91.23 ±0.115d	92.19 ±0.374 b
المعدل mean		56.57 ±9.298 a	55.56 ±9.171 b	54.88 ±9.087c	

* الأحرف المتشابهة لا تختلف معنويا عند مستوى احتمال 0.05

The same letters were not significantly different at the probability level of 0.05

** الخطأ القياسيStandard error

يبين الجدول السابق أن معدل فترات التحضين تفاوت معنوياً في المعاملات المختلفة بحسب فترة التحضين إذ أن أعلى نسب التحضين كانت بعد 24 ساعة إذ بلغت 56.57% ثم انخفضت معنويا إلى 55.56 و 54.88% بعد 48 و72 ساعة من التحضين على التوالي وقد يعزى هذا إلى أكسدة المواد الفينولية وفقدانها لفعاليتها التثبيطية ولاسباب جرى ذكرها عند مناقشة الجداول السابقة. أما معدل التراكيز المضافة من المستخلصين فانه بإضافة أي من المستخلصين بتركيز 500 مايكروليتر كان الأكثر فاعلية إذ بلغ لكل من المستخلص الميثانولي المحمض والميثانولي، على التوالي، 94.82 و92.19% ولكافة فترات التحضين. من الجدول السابق كذلك يتبين ان المستخلص المحمض أعطى نسب تثبيط أعلى من الميثانولي 80% وهذا

يرجع إلى فعالية حامض HCL في فك ارتباطات المركبات الفينولية بالسكريات أو المركبات الأخرى وجعلها حرة وفعالة.

تأثير مستخلصي اللهانة الحمراء في بكتريا Staph.aureus في الوسط السائل: إن المعاملة بمستخلصي اللهانة الحمراء وبتراكيز وفترات تحضين مختلفة أدى إلى إحداث تثبيط في نمو بكتريا Staph.aureus النامية في الوسط السائل ويبين الجدول (4) أن هناك تفاوتا معنويا ($P\leq0.05$) في نسب التثبيط، إن زيادة التثبيط كان له ارتباطا مع زيادة كمية المواد الفينولية في مستخلصي اللهانة الحمراء كما تبين من الشكل (1)، ويتضح من الجدول أعلاه أن اعلي نسبة تثبيط حدثت عند إضافة مستخلصي اللهانة الحمراء (الميثانولي المحمض والميثانولي) إذ بلغت أعلى نسب التثبيط 95.10 و91.14 % لكلا المستخلصين، على التوالي، وعند تركيز 500 مايكروليتر/ معاملة وبعد 24 ساعة من التحضين في حين أن اقل نسبة تثبيط حصلت عن استعمال التركيز 125 مايكروليتر/ معاملة لكلا المستخلصين حيث بلغت 46.21 و 44.45%، على التوالي، بعد 72 ساعة تحضين وللاسباب التي ذكرت في مناقشة الجداول السابقة.

يلاحظ من الجدول أن معدل فترات التحضين كان متفاوتاً إذ بلغ أعلى القيم بعد 24 ساعة تحضين ووصل الى53.77 % ثم حدث انخفاض فيه ليصل بعد 48 و72 ساعة إلى 52.98 و52.01 %، على التوالي. أما بالنسبة لمعدل التراكيز المستعملة من كلا المستخلصين فنجد من الجدول (4) أن أعلى قيم التثبيط كانت عند تركيز 500 مايكرو ليتر واعطى نسبة تثبيط 92.83 و90.29 % لكلا المستخلصين، على التوالي، ثم انخفضت المعدلات بانخفاض التركيز المضاف. كذلك يلاحظ من الجدول أعلاه أن المستخلص الميثانولي المحمض كان ذو فعالية اكبر من ناحية التثبيط بالمقارنة مع المستخلص الميثانولي80 %، وهذا يرجع لكون المواد الفينولية مرتفعة التركيز في المستخلص المحمض وذلك بسبب قدرة الحامض على الاستخلاص بنسب أعلى ولكونه يعمل على كسر الأواصر الكلايكوسيدية للمواد الفينولية مع السكريات (Michiels واخرون ،2012).

من الجداول (1و2 و3 و4) يتبين ان لمستخلص اللهانة الحمراء (الميثانولي المحمض بـHCL و الميثانولي 80%) تأثير مثبط لبكتريا E.coli و Staph.aureus واعتمدت نسب التثبيط على التركيز المضافة ومدة التحضين والنتائج تتفق مع ماذكره Hafidh وآخرون (2012) الذين لاحظوا أن لمستخلصي اللهانة الحمراء فعالية تثبيطية ضد بكتريا E.coli و Staph.aureus .

التركيز المثبط ألادنى لمستخلصي اللهانة الحمراء في نوعي البكتريا المدروسة: من الجدول (5) يتضح ا ن التركيز المثبط الأدنى لكل من بكتريا E.coli و Staph.aureus تفاوت بحسب نوع المستخلص وما يحتويه من فينولات كلية، إذ يلاحظ أن بكتريا E. coli ثبط نموها ابتداء من تركيز 200 مايكروليتر/ معاملة من مستخلص اللهانة الحمراء الميثانولي المحمض وكان هذا هو الأكثر فاعلية تثبيطية في حين أن مستخلص اللهانة الحمراء الميثانولي احتاج إلى 300 مايكروليتر/ معاملة لإحداث التثبيط مما يعطي دلالة على أن المستخلص الأول ذو فعالية تثبيطية أعلى من الأخر.

أما بالنسبة لبكتريا Staph.aureus فان الجدول يبين أن التركيز المثبط الأدنى الأكثر فعالية فهو مستخلص اللهانة الحمراء الميثانولي المحمض إذ حصل التثبيط عند تركيز 250 مايكروليتر/ معاملة في حين أن مستخلص اللهانة الميثانولي احتاج إلى 300 مايكروليتر/ معاملة لإحداث التثبيط.

الجدول (4) النسب المئوية لتثبيط بكتريا Staph. aureus بإضافة مستخلصي اللهانة الحمراء في الوسط السائل

Table (4) Inhibition percentage of Staph.aureus by adding two extracts of red cabbage in liquid media.

المعدل Mean	فترة التحضين (ساعة) Incubation period (hrs)			التركيز المضاف (مايكروليتر) Conc. µl	نوع المستخلص Extract type
	72	48	24		
0.00 ±0.0 g	0.00 ±0.0 m	0.00 ±0.0 m	0.00 0.0** m*	معاملة المقارنة	المستخلص الميثانولي المحمض بـ (HCl) Acdic methanolic extr.
46.94 ±0.41 e	46.21 ±0.445 jk	46.73 ±0.615 ij	47.90 ±0.66 i	125	
76.23 ±0.422c	75.02 ±0.135 f	76.56 ±0.345 e	77.13 ±0.395 e	250	
92.83 ±0.877a	90.61 ±0.375 c	92.79 ±1.115 b	95.10 ±0.265a	500	
0.00 ±0.0 g	0.00 ±0.0 m	0.00 ±0.0 m	0.00 ± 0.0 m	معاملة المقارنة	المستخلص الميثانولي (80%) Methanolic 80% extr.
45.05 ±0.345f	44.45 ±0.385 l	45.10 ±0.77 kl	45.62 ±0.59 j-l	125	
72.03 ±0.529d	70.75 ±0.64 h	72.06 ±0.5 gh	73.28 ±0.595 g	250	
90.29 ±0.446b	89.10 ±0.445 d	90.65 ±0.425c	91.14 ±0.585 c	500	
	52.01 ±8.778 c	52.98 ±8.963 b	53.77 ±9.09 a	المعدل Mean	

* الأحرف المتشابهة لا تختلف معنويا عند مستوى احتمال 0.05

The same letters were not significantly different at the probability level of 0.05

** الخطأ القياسي Standard error

الجدول (5) التركيز المثبط الادنى MIC لمستخلصي اللهانة الحمراء في بكتريا E.coli و Staph.aureus.

Table (5) Minimum inhibitory concentration (MIC) of red beet extracts on E.coli and staph.aureus.

600 -300		250	200	150	100	50	نوع المستخلص Extract type
-	-	-	-	+	+	+	E.coli+ مستخلص اللهانة الحمراء الميثانولي المحمض بـ HCl
-	-	+	+	+	+	+	E.coli + مستخلص اللهانة الحمراء الميثانولي
-	-	-	+	+	+	+	Staph.aureus+ مستخلص اللهانة الحمراء الميثانولي المحمض بـ HCl
-	-	+	+	+	+	+	Staph.aureus+ مستخلص اللهانة الحمراء الميثانولي

(+) دلالة على حدوث النمو Indication to growth

(-) دلالة على حدوث التثبيط Indication for inhibition

Mesopotamia J. of Agric. ISSN: 2224 - 9796 (Online) مجلــة زراعــة الـرافديـن
Vol. (46) No. (3) 2018 ISSN: 1815 - 316 X (Print) المجلد (46) العدد (3) 2018

EFFECT OF RED CABBAGE CRUDE EXTRACTS ON E. coli AND Staph.aureus GROWTH

Muhannad M. Al-Taleb Salah O. Ahmed
Food Sci.Dept. / College of Agric.& Forest./ Mosul Univ. / Iraq
Email: Salah.omar15@yahoo.com

ABSTRACT

The current study concentrated on effect of red cabbage crude extracts, first: acidified methanol extract by 2.4 mM/L HCl, second: of methanol 80 %, on growth of Escherichia coli and Staphylococcus aureus in solid and liquid media. Each extract was added in 125, 250, and 500 µL/ treatment , it was added to the fixed sterilized disks in solid medium or added to liquid medium, however, the control treatment freed of extracts. All treatments were incubated for 24, 48, and 72 hours at 30 oC when inhibition percentages were calculated and the minimum inhibition concentration (MIC) was measured for both bacteria. The results appeared that red cabbage crude extracts showed significant ($p<0.05$) change on E. coli and Staph. aureus inhibition in the solid media as the inhibition ratios on ranged between 42.59-92.17 and 40.04-86.60% , respectively , while the inhibition ratios in the liquid media between 46.44-96.26 and 44.45-95.10% for the two species of bacteria respectively. The lowest MIC occurred when adding acidified methanol by HCl of red cabbage especially against E. coli as inhibition happened at 200 µL and this lower than the concentration which inhibited Staph.aureus.

Key word: Methanolic extract , E.coli , Staph. aureus , Red cabbage. MIC.

Received: 17/2/2014, Accepted 17/12/2017

المصادر

Ahmed ,M.M.;O.F.Abdul-Aziz and H.S.Mohammad (2003). Effect of essential oils extracted from some spices and herbs on growth and aflatoxins production by Aspergillus parasiticus NRRL2999.Iraqi Journal Of Agriculturaral Science, 4(3):5-12.

Al-Mutairi, M.A. (2011). The Incidence of Enterobacteriaceae causing food poisoning in some meat products. Advance Journal of Food Science and Technology , 3(2): 116-121.

Anonymous (2001) Version Statistical Analysis System. SAS Institute Inc. Cary NC.

Arapitsas,P.and C.Turner (2008). Pressurized solvent and monolithic columm HPLC/DAD analysis of anthocyanins in red cabbage.Talanta ,74:1218-1223.

Argudín ,M.A.; M.C. Mendoza and M.R. Rodicio (2010). Food Poisoning and Staphylococcus aureus Enterotoxins. Toxins (Basel). 2010 July; 2(7): 1751–1773.

Arnnok, P., 1Ruangviriyachai, C., 1Mahachai, R., 2Techawongstien, S. and 1*Chanthai, S. (2012). Determination of total phenolics anthocyanin contents in the pericarp of hot chilli pepper and (Capsicum annuum L.). International Food Research Journal, 19(1): 235-243 (2012).

Chakraborty,D; S M Mandal, J Chakraborty, P K Bhattacharyaa, A Bandyopadhyay , A Mitra and Gupta (2007). Antimicrobial activity of leaf extract of Basilicum polystachyon (L) Moench. Indian Journal of Experimental Biology ,45 August ,pp. 744-748.

Eteghad,S.S.;H.Mirzaei;S.F.Pour (2009). Inhibitory effects of endemic Thymus vulgaris and Mentha piperita essential oils on Escherichia coli 0157:H7 Research Journal of Biological Science,4(3):340-344.

Hafidh, R.R.; A.S.Abdulamir; L.S.Vern; F.Abubaker; F.Abas; F.Jahanshiri and Z. Sekawi (2011). Inhibition of growth of highly resistant bacterial and fungal pathogens by natural products.The Open Microbiology Journal ,5: 96-106.

Hafidh,R.R.;A.S.Abdulamir and F.Abubaker (2012). Phenotype micro array profiling of the antibacterial activity of red cabbage. Functional Foods in Health and Disease ,2(6):212-227.

Ivana S, Bodgan A, Judith I, Tudor L, Stlian B, Tanase A, Popescu AN, Caplan DM and Danes M.(2009). Food microbial contamination: the main danger in the catering type food industry in Romania. Roman Biotechnology letters , 14: 4260-4266.

Kaskoniene,V.;A.maruka and O.Kornysova (2009).Quantitative and qualitative determination of phenolic compounds in honey.Chemical Technology, 3(52):74-80.

Leja,M. ; I. Kamińska,and A. Kołton (2010). Phenolic compounds as the major antioxidants in red cabbage. Folia Horticulturae Annual , 22/1 19-24.

Lungu, L.;C.V.Popa;M.Saviu;A.F.Danet and V.Dinoiu (2010). Antioxidant activity of Brassica Oleracea L.,Allium cepa L. and Beta vulgaris L.extracts. Review Chim.(Bucharest).61(10);911-914.

Michiels,J. A.; C. Kevers, J. Pincemail, J. O. Defraigne and J. Dommes (2012). Extraction conditions can greatly influence antioxidant capacity assays in plant food matrices. Food Chemistry, 130 (4): 986-993.

Turnidge , J.D.;M.J.Ferrraro and J.H.Jorgensen (2003). Susceptibility test methods: Genral considerations.In PR murray,E.J.Baron,J.H.Jorgensaon M.A.Pfaller. Manual of clinical microbiology.8th.ed. Whashington. American Society of Clinical Microbiology,P.1103.

Vogt RL, Dippold L (2005). "Escherichia coli O157:H7 outbreak associated with consumption of ground beef, June–July 2002". Public Health Report 120 (2): 174–178.