تأثير مستخلصات بذور الحلبة على االبكتريا المعزولة من االلحوم والأسماك

سعاد خليل إبراهيم، سميرة مؤيد ياسين، رغد حامد ناصر

قسم علوم الحياة، كلية التربية للعلوم الصرفة (ابن الهيثم)، جامعة بغداد

E.mail :samirka_66@yahoo.com

Tel. 009647901526785

الخلاصة:

تم إجراء الكشف الكيميائي النوعي على المجاميع الفعالة المستخلصة من بذور نبات الحلبة و مستخلصاتها المائية والكحولية والزيتية ، أظهرت النتائج إحتواء بذور الحلبة على المجاميع الفعالة الرئيسية. بينما اختلفت مستخلصاته في محتواها من المجاميع الفعالة كماً ونوعاً. وكذلك تم تقويم الفعالية التثبيطية لمستخلصات بذور نبات الحلبة (المائية ، الكحولية و الزيتية) في العزلات البكتيرية الإختيارية و التي عزلت من اللحوم و الأسماك والتي تضمنت ثلاث عزلات سالبة لملون كرام *Salmonella typhimurium* و*Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa* وعزلة واحدة موجبة لملون كرام *Staphylococcus aureus* بطريقة الإنتشار بالحفر، لوحظ أن الفعالية التثبيطية للمستخلصات قد تنوعت باختلاف مذيب الإستخلاص والكائن الدقيق الإختباري. أعطى المستخلص الزيتي بتركيز 15% تفوقاً معنوياً على بقية المستخلصات في تثبيط عزلات البكتريا الإختبارية حيث بلغت أقطار مناطق تثبيط النمو (30, 25,28.22, 26.66, 24) مليمتر في بكتريا *E.coli* و *S. Typhimurium* و *P. aeruginosa* على التوالي يليه مستخلص الكحول الأثيلي بتركيز 15% بينما أظهر المستخلص المائي البارد بتركيز 15% أوطأ فعالية تثبيطية. و كانت بكتريا *S. typhimurium* مقاومة أعلى لفعالية مستخلصات المائي البارد بتركيز 25% مقارنة مع بقية العزلات الإختبارية. جرى إختبار فعالية المستخلص الزيتي بتراكيز تراوحت ما بين 1% الى 15% في عزلات البكتريا الإختبارية وأظهرت تراكيز (1، 2، 3)% فعالية تثبيطية جيدة ومتقاربة كما جرى إختبار فعالية المستخلص الزيتي بتراكيز من 0.5 % الى 2% في إختزال العدد الكلي للبكتريا الهوائية في نموذج اللحم والسمك فكانت متنوعة ولفترات الحفظ (2، 4، 6، 8، 10) أيام بعد معاملة اللحم والسمك بالمستخلص الزيتي بدرجة حرارة (2)°م ولدى مقارنة النموذج أعلاه بنموذج آخر غير معامل بالمستخلص الزيتي (سيطرة موجبة) ظهر أن قدرة المستخلص الزيتي بتراكيز 2% في اختزال خلايا البكتريا الهوائية كانت مطابقة للمواصفات القياسية للجهاز المركزي للتقييس والسيطرة النوعية في العراق الخاصة باللحوم الصالحة للإستهلاك البشري. دُرست الفعالية التثبيطية MIC و MBC ضد العزلات البكتيرية الإختبارية أعلاه فبلغ التركيز المثبط الأدنى (MIC) والتركيز القاتل الأدنى (MBC) للمستخلص الزيتي لبذور الحلبة والذي تم إختباره على العزلات البكتيرية المختبرة 0.5%.

الكلمات المفتاحية:

بذور الحلبة، المستخلص الزيتي، البكتريا، اللحوم، الأسماك

Antimicrobial effect of *Trigonella foenum graecum* Seed Extracts against Tested Bacteria Isolated from Meat and Fish

Suad K. Ibrahim, Samira M. Yaseen, Raghad H. Nasser

Department of Biology, College of Education for Pure Science Ibn Al-Haitham, University of Baghdad

Abstract:

A qualitative chemical test was performed on functional groups extracted from fenugreek plant and its extracts (aqueous, alcoholic and volatile oil). Results revealed that fenugreek seeds contain the main functional groups, while extracts are varied accorodihg to their content of functional groups qualitatively and quantitively. Moreover, inhibition activity was tested for extracts of fenugreek seeds (aqueous, alcoholic and volatile oil). against gram negative (*Salmonella typhimurium, Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*) and gram positive (*Staphylococcus aureus*) by the ager well diffusion method. Data have revealed that inhibition activity was different in accoradance with extract solvent and the tested microorgan. Oil extract (15)% give the most signficant difference comparing with other extracts in inhibition tested bacteria, whereby radial of inhibition zones were (24, 26.66, 28.22, 25 , 30) mm in *E. coli, S. aureus, S. typhimurium, P. aeuginosa* respectively, ethanol(alcohlic extract) (15)% was the second efficient extract while cold aqueous extract 25% gave the minimum inhibition activity. *S. typhimurium* showed the highest resistance towards cold aqeuous extract (25)% compared with other bacterial test. Further more, oiled extracts (1-5)% were tested against bacterial isolates. (1, 2, 3)% showed good inhibition activity. Oiled extract activity (from 0.5% to 2%)was tested in reduction the total number of bacteria in meat and fish, activity was varied during (2, 4, 6, 8, 10) day, after treatment of meat and fish with oiled extract at (2)°C comparing with other sample not treated by oiled extract (positive control). Result suggested that oiled extract 2% ability was the best in reduction of bacterial cells and correspondent with the central device for standardization and quantitiative control of meat safe for human consumption. Inhibition activity MIC and MBC was applied against bacterial tests above. The minimum inhibitor concentration (MIC) and the minimum killer concentration (MBC) for oiled extract of fenugreek seeds in tested bacterial was 0.5%.

Key word: Fenugreek seed, Oil extract, Bacteria, Meat, Fish.

المقدمة:

تعد اللحوم والأسماك مصدراً أساسياً لإمداد الإنسان بالبروتينات والدهون وبعض الفيتامينات والعناصر المعدنية، ويعد اللحم والسمك وسطاً مثالياً لنمو الكثير من الأحياء الدقيقة وذلك لتوفر الرطوبة والمركبات النتروجينية والعناصر الأساسية الأخرى وبعض الفيتامينات فضلاً عن سهولة تلوثه بمصادر التلوث المختلفة كالماء والهواء والتربة، لذلك توجد على اللحوم والأسماك الطازجة أعداد كثيرة من الأحياء الدقيقة، تحفظ اللحوم والأسماك في الثلاجة لفترات زمنية محددة، حيث يقلل التبريد من نشاط الأحياء الدقيقة المسببة للتلف والفساد. إن نمو أغلب الأحياء الدقيقة يكون بطيئاً عندما تكون الحرارة أقل من 10°م، ولغرض إطالة حفظ اللحوم والأسماك فقد تم التفكير باستخدام مستخلصات نباتية مثل مستخلصات نبات الحلبة، وهي مستخلصات طبيعية تحتوي على عدد من المركبات الفعالة [1].

نبات الحلبة Fenugreek (*Trigonellafoenumgraecum*L.) يعود الجنس إلى العائلة البقولية Leguminoceae، وهو نبات حولي يصل طوله إلى 60 سم، له أوراق ثلاثية الوريقات مسننة الحواف وتظهر أزهارها التي يميل لونها إلى الأبيض في منتصف الصيف ويعد الموطن الأصلي للنبات جنوب أوربا وآسيا [2].

تمتاز بذور الحلبة باحتوائها على مركب قلويدي يدعى الترايكونيلين، والكولين الموجود في زيت الحلبة والذي يعزى إليه المفعول الطبي، وحامض النيكوتينيك، وكذلك تحتوي على مواد صابونية ومواد ملونة فضلاً عن احتوائها على اللايسين وبروتينات غنية بالحامض الأميني التربتوفان، تصل نسبة البروتين في بذور الحلبة إلى 20% [3، 4، 5] ، كما تحتوي بذور الحلبة على الفينولات، وهي مركبات بايوكيميائية لها خصائص مضادة للبكتريا من خلال إعاقة قوة حركة البروتون مسببة بذلك تسرب المكونات داخل الخلوية وتثبيط الأنزيمات ونقل الإلكترون وعملية الفسفرة التأكسدية وتجلط المكونات السايوتبلازمية [4].

يستخدم نبات الحلبة في علاج العديد من الأمراض التي تصيب الجهاز الهضمي والتنفسي والبولي [6]، تمتلك بذور الحلبة وأوراقه خواصاً مضادة للبول السكري وخواصاً مضادة للأكسدة ويمتلك هذا النبات فعالية لحماية المعدة ومضادة للروماتيزم فضلاً عن خواص أخرى تغذوية وعلاجية [2]. وقد اشتق اسم الحلبة من الحليب كونه يدر اللبن لدى المرضعات [8].

للحلبة تأثير مضاد للبكتريا وإن زيت الحلبة يعد مثبطا لنمو البكتريا الموجبة والسالبة لملونكرام [8]، ولهذه المادة فعالية تثبيطية عالية لبكتريا *E.coli* و*Salmonellaparatyphi* و*Harrenus*[9].

المواد وطريقة العمل:

1-جمع العينات النباتية: تم الحصول على بذور الحلبة من معشب الزهراء للتداوي بالأعشاب الطبية وعلاج الأمراض المستعصية ، صنفت البذور من قبل الأستاذ الدكتور علي الموسوي (كلية العلوم ، جامعة بغداد)، طحنت البذور الجافة بمطحنة كهربائية معقمة لحين استخدامها لاحقاً.

2-تحضير المستخلصات النباتية:

أ-**المستخلص المائي البارد (25)%:** اعتمدت الطريقة التي أعتمدها [10] في تحضير المستخلصات المائية لنبات الحلبة وكالآتي: أخذ (50) غم من مسحوق المادة الجافة لبذور كل نبات على حدة ووضع في دورق خاص سعته 1000 مل وأضيف إليه 500 مل من الماء المقطر المعقم وترك الدورق في حاضنة هزازة لمدة 24 ساعة في حرارة 37°م بعدها رشح المستخلص المائي باستخدام قمع بخنر يحوي على قطعة من الشاش الطبي ثم باستخدام أوراق الترشيح. عرض الراشح للطرد المركزي بسرعة 2500 دورة/دقيقة لمدة (15) دقيقة، جرى بعده تركيز الراشح باستخدام جهاز المبخر الدوار Rotatory evaporator عند حرارة (45)°م وللحصول على مسحوق جاف وضع النموذج شبه الجاف في خزن عند حرارة (20-30)°م لحين

الحصول على جفاف تام للنموذج وحفظه في الثلاجة لحين الاستعمال.

ب-المستخلص الكحولي (15)%: حضر وفقاً لما ذكر في [10] واتبعت خطوات تحضير المستخلص المائي البارد نفسها ما عدا استخدام الكحول الأثيلي بتركيز (15)% بدلاً من الماء.

ج-المستخلص الزيتي (15)%: أجريت عملية الإستخلاص بواسطة جهاز كلافنجر Clavenger المخصص لإستخلاص الزيوت العطرية من الأجزاء النباتية وباستخدام طريقة التقطير المائي الموصوفة من قبل [11].

3- جمع العينات البكتيرية وعزلها: تم الحصول على العزلات البكتيرية الممرضة من 500 مسحة لمرضى مصابين بالحروق Burns infections وبأعمار مختلفة تراوحت بين (15-60) سنة جرى تشخيصها ثم فحصها مجهرياً لعرض وصف شكل الخلايا من خلال تصبيغها بصبغة Gram stain ثم الكشف عن تأثير المستخلصات النباتية في نمو البكتريا المرضية بطريقة الإنتشار في الحفر The agar-well diffusion method [12].

4-التحليل الإحصائي: حللت البيانات وفق التباين ANOVA (Analysis of variance) باتجاهين وذلك باستخدام البرنامج الإحصائي الجاهز (spss) [13].

النتائج والمناقشة:

إن نتائج الفحوصات الكيموحيوية لسلالات البكتريا الإختبارية *Salmonella typhimurium* و *Escherichiacoli* و *Pseudomonasareuginosa* وعزلة واحدة موجبة لملون كرام *Staphylococcusaureus* كما وضح في جدول (1) . أظهرت النتائج أن المستخلص المائي البارد والكحولي والزيتي لبذور نبات الحلبة لها فعالية تثبيطية متباينة لأغلب أنواع البكتريا المدروسة حسب نوع المستخلص المستخدم ونوع البكتريا ، جدول (2) ، ومن خلال معدلات أقطار مناطق التثبيط Inhibition zone وجد أن المستخلص الزيتي (بتركيز 15%) أظهر فروقاً معنوية في تثبيط نمو جميع الأنواع البكتيرية عند مستوى إحتمالية (P<0.001)، ووجد تأثيراً معنوياً في نمو الأنواع البكتيرية الثلاث وبمعدلات أقطار تثبيط (24، 26.66، 28.22) ملم لكل من أنواع البكتريا (*E.coli*، *S. aureus*، *S. typhimurium*، *P. aeruainosa*) على التوالي بينما لم يلاحظ وجود فروق معنوية بين أنواع البكتريا الأربع للمستخلص الزيتي نفسه.

أظهر المستخلص الكحولي (15%) لبذور الحلبة فروقاً معنوية في تثبيط نمو البكتريا السالبة لملون كرام من نوع *E.coli* و *P. aeruginosa* والبكتريا الموجبة من نوع *S.aureus* بمعدلات أقطار تثبيط بلغت (11.67، 16.00، 16.60) ملم على التوالي عند مستوى إحتمالية (P<0.001)، في حين لم يظهر المستخلص أي فعالية تثبيطية اتجاه البكتريا السالبة لملون كرام من نوع *S. typhimurium*، كما لم يلاحظ وجود فروق معنوية بين أنواع البكتريا الثلاث للمستخلص الكحولي نفسه.

أما المستخلص المائي البارد (25%) لبذور الحلبة فقد أظهر أوطأ فعالية تثبيطية مقارنة مع المستخلص الزيتي والكحولي، حيث بلغت معدلات أقطار التثبيط (12، 10، 8، 6) ملم لأنواع البكتريا *E.coli*، *S. aureus* ، *S. typhimurium*، *P. aeruainosa* على التوالي عند مستوى إحتمالية (P<0.001) ولم يلاحظ وجود فروق معنوية بين أنواع البكتريا الأربع للمستخلص المائي البارد نفسه. إن مقارنة الفعالية التثبيطية للمستخلصات الثلاث أظهرت تفوقا معنوياً للمستخلص الزيتي على بقية المستخلصات يليه مستخلص الكحول الأثيلي بتركيز 15% بينما أظهر المستخلص المائي البارد بتركيز 25% أوطأ فعالية تثبيطية، جدول (2) . إن نتائج الفعالية التثبيطية للمستخلص الزيتي (15%) على أنواع البكتريا المدروسة تتفق مع نتائج [2] الذي أكد على احتواء المستخلص الزيتي على مركبات تربينية فيحصل تجاذب ما بين هذه المركبات الكارهة للماء (المحبة للدهون) Hydrophobic والمركبات الدهنية

الموجودة في الزيوت مما يؤدي إلى تمزق الأغشية في خلايا البكتريا وموتها.

إتفقت النتائج المستحصل عليها مع نتائج [4] التي أكدت على أن ميكانيكية عمل الزيوت تتضمن خصائص مضادة للأحياء المجهرية Antimicrobial، حيث أن الزيوت أو مكوناتها تذوب في الأغشية الدهنية للأحياء المجهرية مما يؤثر على الفعالية الأيضية للخلايا وبالتالي يؤدي إلى تثبيطها.

من جانب آخر أكد كل من [5] و[8] على أن لزيت الحلبة تأثيراً مثبطاً لنمو البكتريا الموجبة لملون كرام *S.aureus* والسالبة لملون كرام *E.coli*، كما أكد [14] على أن للحلبة فعالية في علاج الدمامل والخراج فضلاً عن الأمراض الجلدية التي تسببها البكتريا، إضافة إلى دور الحلبة في تقوية بصيلات الشعر والتقليل من سقوطه.

كما إتفقت نتائج الفعالية التثبيطية للمستخلص الكحولي (15%) مع نتائج [2] الذي أكد على أن الكحول الأثيلي من المذيبات ذات القطبية العالية Highpolarity، وتعود الفعالية التثبيطية له إلى إحتوائه على مركبات فينولية ومركبات قلويدية حيث أن هذه المركبات لها قابلية عالية على الذوبان في الكحول وبشكل يفوق ذوبانها في الماء اعتماداً على القطبية، إن هذه المركبات لها القدرة على التداخل مع الحامض النووي DNA لخلايا البكتريا مؤدية إلى قتلها [2].إن الفعالية التثبيطية الواطئة للمستخلص المائي البارد لبذور الحلبة بتركيز 25% تتفق أيضاً مع [2] الذي أكد على أن المستخلص المائي لنبات البقدونس لم يظهر أي فعالية مضادة للبكتريا.

إن المستخلص الزيتي لبذور نبات الحلبة يمتلك فعالية تثبيطية أفضل من بقية المستخلصات وذلك لاحتواء المستخلص الزيتي على جميع المجاميع الفعالة لنبات الحلبة مما يجعله يمتلك فعالية تثبيطية عالية [15] ، وقد أكد [16] أن سبب الإختلاف في الفعالية بين المستخلصات النباتية يعود إلى نوع المستخلص والطريقة المتبعة في الإستخلاص وقطبية المذيب المستخدم.

أظهرت نتائج جدول (3) الفعالية التثبيطية للمستخلص الزيتي لبذور الحلبة في البكتريا الإختبارية (مرحلة أولى : حيث تراوح تركيز المستخلص الزيتي مابين 5% إلى 15%) حيث أظهرت جميع تراكيز المستخلص الزيتي(15%) تأثيراً تثبيطياً معنوياً ($P<0.001$) لكل أنواع البكتريا الإختبارية، إذ بلغت أقطار معدل التثبيط (19، 15، 14) ملم للعزلات البكترية (*S. typhimurium, S.aureus, E.coli*) على التوالي، في حين بلغ معدل أقطار التثبيط للمستخلص الزيتي 10% (22، 18، 17، 16.67) ملم لكل من (*E.coli*، *S.aureus*، *S. typhimurium*، *P. aeruginosa*) على التوالي، بينما أعطى المستخلص الزيتي 15% أعلى فعالية تثبيطية حيث بلغ معدل الأقطار (24، 20.67، 22.00، 19.67) ملم للعزلات البكتيرية (*E.coli*، *S. aureus*، *Sal. typhimurium*، *P. aeruginosa*) على التوالي.تشير النتائج إلى زيادة الفعالية التثبيطية اتجاه البكتريا مع زيادة تركيز المستخلص الزيتي، حيث أن المستخلص الزيتي 15% كان الأفضل في تثبيط جميع أنواع البكتريا الإختبارية وعند مستوى إحتمالية ($P<0.001$) ويليه المستخلص الزيتي 10% وعند مستوى إحتمالية ($P<0.001$). إن هذه النتائج تتفق مع ما ذكره [2] والذي أكد على أنه مع زيادة تركيز المستخلص الزيتي لبذور الحلبة تزداد الفعالية التثبيطية اتجاه البكتريا، ومن ناحية أخرى نجد أن هذه النتائج تتفق أيضاً مع ما ذكره [17] والذي أكد على وجود علاقة طردية بين تركيز المستخلص النباتي وقطر التثبيط. إن زيادة تركيز المستخلص يعني زيادة كمية المركبات الفعالة بايوكيميائياً والتي بدورها تكون أساس الفعالية التثبيطية للمستخلص اتجاه العزلات البكتيرية. أكدت الدراسات على احتواء بذور الحلبة على الفلافونات (أحد أصناف المركبات متعددة الفينول) والتي لها فعالية مضادة للبكتريا والالتهاب من خلال تمزيق الأغشية الخلوية عن طريق تكوين معقدات مع البروتينات الخارجية الموجودة فيها. إن الفينولات بشكل عام يكمن دورها في تثبيط الأنزيمات المسؤولة عن التفاعلات الأيضية الأساسية عن طريق تداخلها غير المتخصص مع البروتينات مما يؤدي

إلى مسخ البروتين ومن ثم عدم قدرة البكتريا على الإستمرار. إن الفلافونات تكمن أهميتها الطبية في حماية الطبقة المخاطية للجلد من خلال منع تكوين الآفات Lesions بواسطة عوامل النخر Necrosis المختلفة فضلاً عن احتواء الحلبة على مركبات فعالة تؤدي دوراً هاماً في شفاء الجروح وهي القلويدات والسيترولات، فالقلويدات لها فعالية قاتلة للأحياء المجهرية وذلك لقدرتها على التداخل مع DNA الخلية [18].

إن نتائج جدول (4) تؤكد العلاقة الطردية ما بين تركيز المستخلص الزيتي والفعالية التثبيطية تجاه العزلات البكتيرية الموجبة والسالبة كمرحلة ثانية (حيث تراوح تركيز المستخلص الزيتي ما بين 1% إلى 5%) ، كما أظهر فروقاً حساسة كبيرة في خفض أعداد الخلايا المكونة لمستعمرات البكتريا الهوائية حيث بلغت أقطار التثبيط (10، 9، 9، 15) ملم للعزلات البكتيرية *E.coli*، *S. aureus*، *S. typhimurium*، *P. aeruginosa* عند معاملتها بالمستخلص الزيتي 1% في حين بلغ معدل أقطار التثبيط المستخلص الزيتي 1.5% (11، 9، 9، 18) لأنواع البكتريا(*E.coli*، *S.aureus*، *S. typhimurium*، *P. aeruginosa*) على التوالي، أما أقطار التثبيط بواسطة المستخلص الزيتي 2% فقد بلغت (11، 10، 12، 19) ملم للعزلات (*E.coli*، *S.aureus*، *S. typhimurium*، *P. aeruginosa*)على التوالي، أما عن المستخلص الزيتي 2.5% فقد بلغ معدل الأقطار التثبيطية له (13، 12، 11.33، 19) ملم للعزلات البكتيرية (*E.coli*، *S. aureus*، *S. typhimurium*، *P. aeruginosa*)ملم على التوالي، بينما بلغ معدل الأقطار التثبيطية عن طريق المستخلص الزيتي 3% (13.67، 12.33، 11.67، 20) ملم لأنواع البكتريا (*E.coli*، *S.aureus*، *S. typhimurium*، *P. aeruginosa*) وقد أعطى المستخلص الزيتي 4% فعالية تثبيطية أعلى من التراكيز التي ذكرت أعلاه ضمن المرحلة الثانية، حيث بلغ معدل الأقطار (14.30، 13، 12، 20.35) ملم للبكتريا (*E.coli*، *S.aureus*، *S. typhimurium*، *P. aeruginosa*) على التوالي. أما المستخلص الزيتي 5% فقد كان الأكثر فعالية تثبيطية ضمن المرحلة الثانية، وبمستوى إحتمالية ($P<0.001$) فقد كان التأثير معنوياً، حيث بلغ معدل الأقطار (14.67، 14، 12.70، 21) ملم للعزلات البكتيرية *E.coli*، *S.aureus*، *S. typhimurium*، *P. aeruginosa* على التوالي. إن هذه النتائج تتفق أيضاً مع ما ذكره كل من [2] و [17].

كما أوضح تحليل الكروموتوغرافيا لزيت الحلبة احتوائه على أحماض شحمية مشبعة وغير مشبعة وهي حامض البالمتيك وحامض الأوليك وحامض الستياريك والتي تعد من المضادات البكتيرية والفطرية الطبيعية.

نلاحظ حصول زيادة في العدد الكلي للبكتريا الهوائية للتراكيز (0.5-1.5%) مع زيادة فترات الحفظ، جدول (5)،حيث ازداد من (85×10^5) في اليوم الثاني للحفظ الى (65×10^6)في اليوم العاشر للتركيز 0.5% للمستخلص الزيتي، في حين إرتفع من (88×10^5) لليوم الثاني للحفظ إلى (45×10^7) لليوم العاشر للحفظ وللتركيز 0.7%، بينما إزداد عن (55×10^5) لليوم الثاني إلى (70×10^6) لليوم العاشر للتركيز 0.9% وكذلك ازداد عدد البكتريا اللاهوائية من 50×10^4 إلى 65×10^4 للتركيز 1% لليومين الثاني والعاشر على التوالي. أما عن تأثير التركيز 1.5% للمستخلص الزيتي لبذور الحلبة فإن عدد البكتريا الكلي ازداد من 19×10^3 لليوم الثاني إلى 45×10^3لليوم العاشر للحفظ، بينما ازداد عدد البكتريا من 20×10^3 إلى 28×10^4 للتركيز 1.75% وعن مستوى أحتمالية أقل من 0.01 وكذلك نلاحظ ارتفاع العدد الكلي للبكتريا الهوائية بزيادة فترة الحفظ للتركيز 2% للمستخلص الزيتي، حيث ارتفع من 128×10^2 لليوم الثاني للحفظ إلى 28×10^4 لليوم العاشر وعن مستوى إحتمالية أقل من 0.001، إن فعالية المستخلص الزيتي بتركيز 2% في اختزال أعداد البكتريا الهوائية كانت مطابقة للمواصفات القياسية الصادرة عن الجهاز المركزي للتقييس والسيطرة النوعية في العراق الخاصة باللحوم الصالحة للإستهلاك البشري.

تكون البكتريا متفاوتة المقاومة لعملية التبريد و التجميد بإختلاف نوعها ومرحلة النمو وفيما إذا كانت

خلاياها خضرية أو بوغية والأخيرة هي الأكثر مقاومة، وأن فساد الأغذية المحفوظة بالتبريد هي من المجاميع المحبة للبرودة Psychrophiles، فقد يكون احتواء عينات اللحم البقري أصلاً على أعداد كبيرة من هذه البكتريا المحبة للبرودة مما أدى إلى إرتفاع العدد الكلي للبكتريا بزيادة فترة الحفظ للتراكيز (0.5-1.75)% للمستخلص الزيتي [2].إن نتائج جدول (5) أثبتت أن التركيز 2% من المستخلص الزيتي لبذور الحلبة هو الأكفأ بين التراكيز وذلك لكفاءته في تثبيط جميع البكتريا الإختبارية حيث يمكن تطبيق فعاليته في حفظ اللحم البقري.

إن تأثير تركيز المستخلص النباتي في اختزال عدد البكتريا يتفق مع [11] الذي ذكر أن التراكيز العالية لمستخلص الجرجير المائي كانت فعالة بحيث قللت عدد البكتريا طيلة مدة الخزن.

مما تقدم تبين لنا أن المستخلصات النباتية كانت فعالة اتجاه العديد من أنواع البكتريا المدروسة لذا ننصح بإجراء دراسات موسعة حول النباتات الطبية ومحاولة استخلاصها بأكثر من نوع من المستخلصات ومقارنة المستخلص المائي والكحولي والزيتي لغرض استعمالها كعلاجات بديلة للمضادات الحيوية.

جدول (1): الإختبارات الكيموحيوية لسلالات البكتريا الإختبارية.

المعاملة وتركيزه	*E. coli*	*S. aureus*	*S. typhimurium*	*P. aeruginosa*
	معدلات أقطار مناطق التثبيط للمليمتر ± الخطأ القياسي			
السيطرة	صفر	صفر	صفر	صفر
25% المستخلص المائي البارد	12±057 د	10±0.57 د	8±57 د	6±0.55 د
15% المستخلص الكحولي	11.67±0.33ب	16.60±0.33ب	صفر	16.00±0.57 ب
15% المستخلص الزيتي	24±0.57 أ	26.66±0.33 أ	28.22±0.22 أ	30.25±0.57 أ

* إشارة(N) لم يجر الإختبار

جدول (2): الفعالية التثبيطية لمستخلصات بذور الحلبة على البكتريا الإختبارية

نوع الفحص	*S. aureus*	*E.coli*	*P. aeruginosa*	*S. typhimurium*
ملون كرام	+	−	−	−
الأوكسيديز	−	−	+	+
الكتاليز	+	+	+	+
إنتاج الأندول	N	+	+	−
إنتاج صبغة الهيموسياتين	N	−	+	−
إنتاج H_2S	−	−	−	+

* المعدلات التي تحمل حروف متماثلة ضمن العمود الواحد لا تختلف معنوياً

* الإحتمالية عند مستوى أقل من 0.001

*المعدلات الثلاثة مكررات ± الخطأ القياسي

جدول(3): الفعالية التثبيطية لتراكيز مختلفة منالمستخلص الزيتي لبذور الحلبة في البكتريا الإختبارية (مرحلة أولى : حيث تتراوح تراكيز المستخلص الزيتي مابين5% إلى 15%)

تركيز المستخلص الزيتي%	البكتريا الأختبارية			
	معدلات أقطار مناطق التثبيط (مليمتر) ± الخطأ القياسي			
	E.coli	*S. aureus*	*S. typhimurium*	*P. aeruginosa*
السيطرة	صفر د	صفر د	صفر د	صفر د
5	19.00± 0.33 أ	15±0.57 أ	14±0.55 أ	13±0.71 أ
10	22.00±0.57 ج	18.00±0.57 ج	17.00±0.57 ج	16.67±0.66 ج
15	24.00±0.57 ب	20.67±0.33 ب	22.00±0.57 ب	19.67±0.33 ب

* المعدلات التي تحمل حروف متماثلة ضمن العمود الواحد لا تختلف معنوياً

* الإحتمالية عند مستوى أقل من 0.001

*المعدلات الثلاثة مكررات ± الخطأ القياسي

جدول (4): الفعالية التثبيطية لتراكيز مختلفة من المستخلص الزيتي لبذور الحلبة في البكتريا الإختبارية (مرحلة ثانية: حيث تتراوح تراكيز المستخلص الزيتي مابين 1% إلى

تراكيز المستخلص الزيتي%	البكتريا الإختبارية			
	E. coli	*S. aureus*	*S. typhimurium*	*P. aeruginosa*
	معدلات أقطار التثبيط			
سيطرة	صفر ز	صفر هـ	صفر هـ	صفر هـ
1	0.22±10 هـ	0.1±9 هـ	0.57±9.00 ج د	0.57±15.00 دهـ
1.5	0.57±11.00 هو	0.33±9.00 د	0.57±4.00 ج	0.57±18.00 ج د
2	0.57±11.00 د هـ	0.57±10.00 ج د	0.57±12.00 ب	0.57±19.00 ج
2.5	0.57±13.00 ج د	0.57±12.00 ج	0.33±11.33 ب	0.57±19.55 ب ج
3	0.33±13.67 ب ج	0.33±12.33 ب	0.33±11.67 ب	0.22±20.00 أ ب
4	0.33±14.30 أ ب	13 أ ب	0.33±12.00 ب	0.33±20.35 أ
5	0.33±14.67 أ	0.57±14.00 أ	0.57±12.70 أ	0.15+21 أ

(%5

* المعدلات التي تحمل حروف متماثلة ضمن العمود الواحد لا تختلف معنوياً
* الإحتمالية عند مستوى أقل من 0.001
*المعدلات الثلاثة مكررات ± الخطأ القياسي

فترات الحفظ باليوم	معدلات العد الكلي للبكتريا الهوائية	تركيز المستخلص الزيتي لبذور الحلبة							السيطرة
		%0.5	%0.7	%0.9	%1.0	%1.5	%1.75	%2	
صفر		صفر	صفر	صفر	صفر	صفر	صفر	صفر	$10^{7}\pm10^{7}\times35$
2		$10^{3}\times150\times1 \pm10^{3}\times85$	$10^{3}\times150.70\times1 \pm10^{3}\times88$	$10^{3}\times2 \pm10^{4}\times55$	$10^{4}\times1 \pm10^{4}\times50$	$10^{3}\times5.55 \pm10^{4}\times19$	$10^{3}\times5.77 \pm10^{4}\times20$	$10^{3}\times5.77 \pm10^{4}\times128$	$10^{3}\times5663.4 \pm10^{3}\times30$
4		$10^{3}\times2001 \pm10^{4}\times30$	$10^{4}\pm10^{4}\times20$	$10^{3}\times110.07 \pm10^{3}\times40$	$10^{3}\times55.6 \pm10^{4}\times35$	$10^{4}\times1 \pm10^{4}\times32$	$10^{3}\times5.95 \pm10^{4}\times25$	$10^{3}\times1.55 \pm10^{4}\times100$	$10^{8}\pm10^{7}\times31$
6		$10^{3}\times2081 \pm10^{4}\times35$	$10^{4}\pm10^{4}\times25$	$10^{3}\times110.3 \pm10^{3}\times45$	$10^{3}\times55.74 \pm10^{4}\times40$	$10^{4}\pm10^{4}\times30$	$10^{3}\times5.55 \pm10^{4}\times20$	$10^{3}\times1.33 \pm10^{4}\times18$	$10^{3}\times11547 \pm10^{3}\times50$
8		$10^{3}\times2081.7 \pm10^{4}\times45$	$10^{3}\pm10^{3}\times30$	$10^{4}\times152.3 \pm10^{3}\times55$	$10^{3}\times152.2 \pm10^{4}\times45$	$10^{3}\times11.35 \pm10^{4}\times30$	$10^{4}\times1 \pm10^{4}\times23$	$10^{3}\times153 \pm10^{4}\times20$	$10^{3}\times173205.8 \pm10^{3}\times40$
10		$10^{4}\times2886 \pm10^{4}\times65$	$10^{3}\times577 \pm10^{7}\times45$	$10^{3}\times115.4 \pm10^{4}\times70$	$10^{4}\times10 \pm10^{4}\times65$	$10^{3}\times15.2 \pm10^{3}\times45$	$10^{3}\times11.5 \pm10^{4}\times28$	$10^{3}\times1.53 \pm10^{4}\times28$	$10^{3}\times157752 \pm10^{7}\times75$

المعدلات التي تحمل حروف متشابهة ضمن العمود الواحد لا تختلف معنوياً

الإحتمالية عند مستوى أقل من 0.001

المعدلات الثلاثة مكررات ± الخطأ القياسي

جدول (5) : تأثير المستخلص الزيتي لبذور الحلبة على الأعداد الكلية للبكتريا الهوائية في اللحم البقري و لفترات حفظ مختلفة.و قد بلغ التركيز المثبط الأدنى(MIC) والتركيز القاتل الأدنى (MBC)0.5 للمستخلص الزيتي لبذور الحلبة والذي تم إختباره على العزلات البكتيرية المختبرة %.

المصادر

1. Schella, G. G.& Augesti, K. T. (1992). Antidiabetic effect of Sallyly Stein sulphoxid isolated from garlic. Indian J. Exp. Bio., 30: 420-426.

2. محسن عجينة، صبا جعفر؛ حسن، لمى خيري؛ حكيم، إبتهاج مصطفى وعلي، تغريد إبراهيم (2012). تأثير مستخلصات بذور الحلبة *Trigonella foenum graecum* في نمو بعض أنواع البكتريا ودورها في إطالة مدة حفظ اللحم بالتبريد. مجلة مركز بحوث التقنيات الإحيائية، المجلد السادس، العدد الثاني. 20-27.

3. عباس، ميسون صباح (2011). دراسة حساسية بعض البكتريا المرضية للمضادات الحيوية والمستخلصات النباتية. مجلة الأنبار للعلوم البيطرية، المجلد الرابع، العدد الثاني، 7-14.

4. Hili, P.; Evans, C. S. & Veness, R. G. (1997). Antimicrobial action of essentiaal oil; the effect of dimethyl sulphoxide on the activity of cinnamon oil.

5. ناصر، ناريمان صالح (2011). دراسة تأثير المستخلص المائي المغلي للحلبة في بعض الأنواع البكتيرية. مجلة علوم الرافدين، المجلد 22. العدد 2: 28-39 صفحة.

6. Kornman, S. H.; Cohen, E. & Preminiger, A. (2001). Pseudo maple sxrap urin discrease due to maternal prenatal ingestion of fenugreek. J. Pacdiaki Child Health Amg., 37(4).

7. Al-Shaikh, M. A.; Al-Mufarriy, S. L.; Mogawar, H. (1999). Effect of fenugreek ssed *Trigonella foenum gracum* lactation of dairy goats. King Sudia University Riyadh,Sudia Arabia. J. Dairy Sci., 82 (54): 101.

8. Jamil, R. M. (2002). Antibacterial effect of extract from *Trigonella foenum gracum*. Jordan. J. App//. Set., 24-25.

9. Al-Kady, I. A.; El-Maraghy, M. S. & Mohammed, E. M. (1993). Antibacterial and antidermatophyte activities of some essential oils from spices. Qatar. Univ. Sci. J., 13(1): 36-69.

10. Anesini, C. & Perez, C. (1993). Screening of plant used in Argentina folk medicine for antimicrobial activity. 39(2): 229-239.

11. إحسان، سعد علي (1999). دراسة بعض العوامل المؤثرة في لصفات الكمية والنوعية للزيوت العطرية في النعناع والبطيخ. كلية الزراعة. جامعة بغداد./أطروحة دكتوراه

12. Adiguzel, A., Gulluce, M., Sengul, M., Ogutcu, H., Sahin, F., and Karaman, I., (2005). Antimicrobial effects of *Ocimum basilicum* (Labiatae) extract.Turkey J. Biol., 29: 155-160..

. مطبوعات الجامعة. دار الشريف 13Spp. العقيلي، صالح رشيد والشايب، محمد سلول (1998). إستخدام البرنامج الإحصائي للطباعة.

14. Al-Ani, A. J.; Nadir, M. T.& Al-Khazragii, N. K. (1996). The antimicrobial activity of volatile oil isolated from some Iraqi plants. J. Al-Anbar. Univ. I., 70-75.

15. Musaiges, A. O. & Miladi, S. S. (1997). The state of food and nutrition in the nearcast countries. 42-43. FAO regional office for the east. Cairo Egypt. FAO. Rome.

16. الذهب، أزهار عمران (1998). الفعالية التضادية لمستخلصات نباتية عراقية في بعض البكتريا الممرضة. رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة بابل.

17. شهاب، زينة هاشم(2012). تقييم الكفاءة التثبيطية لبعض المستخلصات المائية والكحولية لنبات البابونج، الصبار والحلبة في نمو بكتريا *Staphylococcus aureus* المعزولة من الجروح. مجلة كلية التربية الأساسية/ العدد الخامس والسبعون. ص: 719-728.

18. Phillipson, J. D. and Oneill, M. J. (1987). Newleads to the treatment of protozoal infections based on natural product molecules. Acta. Pharm. Nord., 1: 131-144.