ميسون منذر الحمندو

Saturday, December 25, 2010
4:40 PM

تأثير المستخلصات المائية والكحولية لقشور الرمان على أنتاج انزيم الهيمولايسين لبعض الانواع البكتيرية

ميسون منذر الحمندو * ديمة نزار فرج*

تاريخ قبول النشر 2010/3/1

الخلاصة

اختيرت أربعة عزلات بكتيرية محلية ,اثنان سالبة لصبغة غرام (*Escherichia coli* , *Pseudomonas aeruginosa*),واثنان موجبة لصبغة غرام(*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*),العزلات الاربعة منتجة لانزيم الهيموليسين.حدد التركيز المثبط الادنى للمستخلص المائي و الكحولي لقشور الرمان (*Punica granatum* L.) تجاه العزلات الاربعة ,وكان التركيز المثبط الادنى للمستخلص المائي 200 ml/mg لعزلات (*E.coli* , *P.aeruginosa*) و2 mg/ml و5 mg/ml لعزلات *S. aureus*, *B. cereus* على التوالي ,والتركيز المثبط الادنى للمستخلص الكحولي 50 mg/ml, 20 mg/ml, 1mg/ml, 0.5 mg/ml لعزلات *E. coli* , *P. aeruginosa*, *B. cereus*, *S.aureus* على التوالي .كانت المستخلصات المائية والكحولية مضعفة لانتاج انزيم الهيمولايسين لبكتيريا *E. coli* , *P. aeruginosa* في التراكيز تحت التركيز المثبط الادنى و مثبطة لانتاج لبكتيريا *B .cereus, S. aureus* .

الكلمات المفتاحيه: قشور الرمان ،الهيمولايسين

المقدمة:

تعد بكتيريا *E. coli* واحدة من اهم مسببات الاصابة المتأتية من المستشفيات فهي مسؤولة عن 90% من التهابات المجاري البولية في النساء والفتيات كما وتعد البكتيريا مسؤولة عن حالات الاسهال الاكثر شيوعا وانتشارا في العالم وهي احد مسببات تجرثم الدم (bacteremia)[1] , بكتيريا *P. aeruginosa* تسبب حالات مرضية مختلفة لاسيما للمرضى الراقدين في المستشفيات كأصابات الجهاز البولي ,ذات الرئة المكتسبة من المستشفيات ,اصابات الجروح ,الحروق,واصابات العين وغيرها [2], .تتراوح الاصابة ببكتيريا *S. aureus*بين اصابة موضعية للجلد مثل التهاب الجريبات (folliculitus) وتكوين الدمامل(carbuncle) ,الى الانتشار واحداث تجرثم الدم (bacteremia) وبالتالي اصابات لمختلف الاعضاء كالعظام والمفاصل والاحشاء الداخلية وهي احد مسببات التسمم الغذائي[3] .بكتيريا *B. cereus* واحدة من اهم مسببات التسمم الغذائي وهي من الانواع المنتهزة للفرص (opportunistic) اذ تسبب التهاب العين والتهاب بطانة القلب (endocarditis) وتجرثم الدم[3,1].

يعد انزيم الهيمولايسين عامل ضراوة مهم جدا للبكتيريا اذ يحلل كريات الدم الحمر وبالتالي يساعد على الانتشار واحداث الاصابة مسبب نخر وتحطم للانسجة [4], وتعد عزلة *S. aureus* المنتجة لانزيم الـ coagulase والمحللة للدم عزلة ممرضة وذات قدرة عالية على غزو الانسجة [1] منذ 5000 سنة وشجر الرمان يزرع في منطقة الشرق الاوسط ,فثمرة الرمان واسعة الاستخدام في الطب الشعبي الهندي والطب اليوناني القديم, قشور الرمان لها استخدام واسع كعلاج للاسهال وقابض للانسجة (Astringent) وطاردة للديدان (antihelmenthic) ومدررة للبول ونافعة للمعدة ومقوي للقلب ومبرد لحرارة الجسم [5], الثمرة مفيدة جدا في علاج الزحار والاسهال والقرحة [6] وينصح عادة بتناول ثمرة الرمان في فترة النقاهة بعد الاسهال كما تستخدم القشور المجففة لعلاج الام المعدة والاسهال ومعظم اصابات القناة الهضمية [7].وتعد مستخلصات مختلف اجزاء الثمرة ذات فعالية مضادة للأحياء المجهرية مثل *S. aureus, E. coli ,P. aeruginosa* ,*Salmonella paradysentriae* لاسيما المسببة لاصابات الجهاز الهضمي [8]و لمركبات التانين المستخلصة من القشور فعالية عالية ضد فيروس genetal herps [9] ,وفعالية ضد فيروس الانفلونزا [10] وتعد مستخلصات القشور ذات فعالية مضادة للأكسدة antioxidant (activity)[11],ولعصير الرمان دور فعال كمضاد لأنقسام ا لخطوط الخلوية (cell line) بنسبة 30-100% [12].

المواد وطرائق العمل:

1) جمعت قشور نبات الرمان *Punica granatum* وجففت في جو الغرفة ثم جففت في فرن كهربائي بدرجة حرارة 45-40م°,طحنت اولا بالهاون الخزفي ثم

*جامعة بغداد /كلية العلوم/قسم علوم الحياة

استخدمت مطحنة كهربائية صغيرة لغرض الحصول على مسحوق ناعم ,حفظ المسحوق في اكياس بلاستيكية نظيفة تم تعليمها باسم النبات وتاريخ الجمع ثم حفظت في مكان مظلم بعيد عن الرطوبة في درجة حرارة الغرفة [13].

2) حضر المستخلص المائي الساخن حسب [14] والمستخلص الكحولي حسب [15].
3) حضرت محاليل الخزين (stock solutions) للمستخلصات المائية والكحولية لقشور الرمان وعقمت باستحدام اغشية الترشيح .
4) استخدمت طريقة الانابيب (tube test)في تحديد التركيز المثبط الادنى (MIC) للمستخلصات النباتية قيد الدراسة [16].
5) حضرت التخافيف للمستخلصات المائية والكحولية من المحلول الخزين بنسبة حجم/حجم .
6) نشطت العزلات باستخدام وسط (Nutrient broth) وحضنت بدرجة 37مº لمدة 24ساعة.
7) خففت البكتيريا عشريا وتم اختيار التخفيف الثالث 10^{-3}لاحتواءه على($CFU10^{5}$/ملليليتر) اذ لقح 0.1 مل منه في تخافيف المستخلصات وحضنت الانابيب بدرجة 37مº لمدة 24 ساعة.
8) نقل 0.1 مل من كل تخفيف للمستخلص المزروع وزرع على وسط (Nutrient agar) وحضن بدرجة 37مº لمدة 24 ساعة وتم تحديد التركيز المثبط الادنى (MIC)اذ عد اقل تركيز للمستخلص اظهر مستعمرات منفردة بينما التراكيز الاقل اظهرت نموا كثيفا والتراكيز الاعلى تكون قاتلة أي لا يظهر أي نمو على الطبق (MBC).
9) تم التحري عن انتاج الانواع البكتيرية الاربعة لانزيم الهيمولايسين بنقل مستعمرة منفردة وتخطيطها على وسط اكار الدم ثم حضنت بدرجة 37مº لمدة 24-48 ساعة مع ملاحظة تحلل الدم حول منطقة النمو [17].
10) بعد تحديد التركيز المثبط الادنى (MIC) لكل مستخلص نباتي ,درس تأثير المستخلصات في انتاج انزيم الهيمولايسين وكالاتي :اخذ 100 مايكروليتر من التركيز تحت التركيز المثبط الادنى (subMIC) وزرع على وسط10% اكار الدم ,حضنت الاطباق بدرجة 37مº لمدة 24 ساعة ,وفحصت النتائج بملاحظة التغيرات الحاصلة في وسط النمو حول المستعمرات .

النتائج والمناقشة:

1.تحديد MIC للمستخلصات المائية والكحولية لقشور الرمان :

تم تحديد التركيز المثبط الادنى للمستخلصات المائية والكحولية لقشور الرمان تجاه العزلات البكتيرية الاربعة *E.coli* *B.cereus,S.aureus,P.aeruginosa*, بأستخدام طريقة الانابيب (tube test) وكان التركيز المثبط الادنى لمستخلص قشور الرمان المائي (200mg\ml) تجاه كل من بكتيريا الـ *E.coli* و *P.aeruginosa* و(2mg/ml) تجاه بكتيريا الـ *S. aureus* و(5 mg/ml) تجاه *B. cereus*, اما التركيز المثبط الادنى للمستخلص الكحولي لقشور الرمان كان (0.5,1 , 20, 50 mg/ml) لعزلات الـ *E.coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* , *B. cereus* على التوالي , اذ أعطت التراكيز الاقل نموًا كثيفاً والتراكيز الاقل كانت قاتلة شكل (1-a,b), (1-c,d), (1-e,f),(1-g,h) .

يلاحظ من النتائج الفعالية ضد المكروبية للمستخلص المائي والكحولي لقشور الرمان تجاه العزلات البكتيرية الاربعة وهذا يتوافق مع ما توصل اليه [18] بأن المستخلصات المائية والكحولية لقشور الرمان كانا الاكفأ بين 38 مستخلص نباتي ضد عزلة *E.coli* اذ بلغ الـ MIC (0.78 mg/ml) للمستخلص المائي و(0.09 mg/ ml) للمستخلص الكحولي . يلاحظ من النتائج ان المستخلص الكحولي لقشور الرمان كان أكفأ من المستخلص المائي في الفعالية ضد المكروبية وهذا يتوافق مع ماذكره[8] بأن المستخلص الكحولي كان اكثر كفاءة من المستخلص الخام للثمار الناضجة وغير الناضجة والمستخلص الاسيتوني تجاه عدد من البكتيريا ومنها *S.aureus* و *E.coli* و *P.aeruginosa* ,كما توصل [19] الى كفاءة المستخلص الكحولي للرمان ضد عدد من البكتيريا ومنها *B.cereus* , *P.aeruginosa* وكانت بكتيريا الـ *E.coli*الاكثر مقاومة للمستخلص اذ كان الـ MIC يتراوح بين (32-4mg/ml) وكان مستخلص قشور الرمان من بين اكثر المستخلصات النباتية (15 مستخلص نباتي) فعالية ضد ميكروبية في الدراسة التي اجريت في الاردن .

ومن بين 45 مستخلص نباتي كان مستخلص قشور الرمان من اكفأ المستخلصات النباتية فعالية ضد عدد من الممرضات وكان المستخلص الكحولي اكفأ من المستخلص المائي والمستخلص الهكساني اذ كانت اقطار مناطق التثبيط تتراوح بين (31-40mm) لبكتيريا *S. aureus* و(21-30 mm) لبكتيريا *B. cereus* و(10-20 mm) لبكتيريا

E.coli [20] ,وهذا يقارب النتائج التي حصلنا عليها بأن بكتيريا *E.coli* اكثر مقاومة وتليها *S. aureus* ومن ثم *B.cereus* .

ذكر كل من [22,21]ان المستخلص الكحولي اكثر فعالية ضد ميكروبية من مستخلص الكلوروفورم وبتروليوم ايثر , وان المستخلص الكحولي كان الاكفأ من بين 12 مستخلص نباتي استخدم في الدراسة تجاه *S.aureus* و*E.coli* و*P.aeruginosa* , هذا يقارب ما توصل اليه [23] بكفاءة المستخلص الكحولي اكثر من المستخلص المائي تجاه بعض Gve^+ وGve^- , اما [24]فذكر كفاءة المستخلص الكحولي ضد سلالات *Salmonella typhi* متعددة المقاومة لمضادات الحياة .

كما ذكر [25] ان المستخلص الميثانولي للرمان كان الاكثر فعالية ضد عدد من البكتيريا المسببة للاسهال ومنها بكتيريا *E. coli* و *S .aureus* اذ كان الMIC يتراوح بين (0.039-0.6 mg/ml) للمستخلص الكحولي , كما ان المستخلص الكحولي للرمان كان من بين اكفأ المستخلصات المستخدمة ضد عدد من الممرضات منها بكتيريا *E. coil* بتركيز (8 mg/ml) [26]وذكرت [27]فعالية عصير الرمان مع الماء ومع العسل في تثبيط فعالية عدد من البكتيريا ومنها *P.aeruginosa* عند التركيز 10% .

تعود الفعالية ضد المكروبية لقشور الرمان الى احتواءه على عدد من المركبات ذات الفعالية ضد المكروبية مثل مركبات الـ flavonoid , alkaloid tannin , polyphenol , , glycosides [28,27,20,10] مركبات الـ tannin التي تبلغ نسبتها في القشور حوالي 25% [5] لها فعالية ضد مكروبية عالية من خلال ارتباطها بالبروتينات وتكوين معقد مع جدار الخلية (cell wall) مسببة تحطم الخلايا البكتيرية[29], كما ذكر [9] فعالية الـ tannin المستخلص من قشور الرمان في قتل فيروس (herps) من خلال تثبيط تضاعف الخلايا واغلاق عملية امتصاص الفيروس من قبل الخلية . كما يحوي النبات على عدد من المركبات الفينولية مثل (caffic acid) [28] الذي أثبت ان له فعالية ضد بكتيرية وضد فطرية [29].

يلاحظ من النتائج ان فعالية المستخلص الكحولي ضد المكروبية تجاه العزلات الاربعة كانت اكثر من المستخلص المائي وهذا يعود الى قابلية الكحول على اذابة الكثير من المركبات الفعالة في القشور مثل tannin ,polyphenoles, alkaloid flavonoid, بينما المستخلص المائي تذوب فيه مركبات tannin ضمن المركبات الفعالة في قشور الرمان [29] .ويلاحظ وجود اختلاف في الاستجابة ضد المكروبية لبكتيريا Gve^- و Gve^+ وهذا يعود الى طبيعة جدار بكتيريا Gve^- التي تجعلها اكثر مقاومة من بكتيريا Gve^+ [1]ويلاحظ اختلاف في شدة الفعالية ضد المكروبية وذلك لوجود اختلاف في مراحل جمع النبات واختلاف في ضراوة العزلات والاختلاف في طرق الاستخلاص [20] .

2. تأثير المستخلصات المائية والكحولية لقشور الرمان تجاه انزيم الهيمولايسين :

يعد انزيم الهيمولايسين واحد من عوامل الضراوة المهمة اذ يلعب دوراًمهماً في امراضية البكتيريا , لذا حاولنا في هذا البحث معرفة تأثير التراكيز تحت المثبطة للمستخلصات المائية والكحولية لقشور الرمان تجاه انزيم الهيمولايسين المنتج من قبل *B. cereus* ,*S. aureus* ,*P. aeruginosa* , *E. coli* .

يلاحظ من الجدول (1) ان المستخلصات المائية والكحولية لقشور الرمان كانت مضعفة لانتاج انزيم الهيمولايسين في بكتيريا *E.coli* عند التراكيز (175,150,125mg/ml) للمستخلص المائي و(40,30.,20mg/ml) للمستخلص الكحولي ,كما كانت المستخلصات مضعفة لانتاج الانزيم من بكتيريا *P. aeruginosa* في التراكيز (175,150,125mg/ml) للمستخلص المائي والتراكيز (10,15mg/ml) للمستخلص الكحولي ,بينما كانت المستخلصات مثبطة لانتاج الانزيم من *S. aureus* في التراكيز (0.5,1 mg/ml) للمستخلص المائي و(0.2,0.3 mg/ml) للمستخلص الكحولي ومثبطة ايضاً لانتاج الانزيم من قبل بكتيريا *B. cereus* في التراكيز (2,3 mg/ml) للمستخلص المائي و(0.2,0.5 mg/ml) للمستخلص الكحولي وينخفض تأثير المستخلصات بأنخفاض التراكيز (يتناسب المثبط طردياً بزيادة التراكيز)شكل 2 (d,c,b,a) .

وقد ذكرت بعض المصادر قدرة مستخلصات قشور الرمان في تثبيط بعض الانزيمات ,إذ ذكر [30]فعالية الزيت الخام للبذور والمستخلص المائي للقشرة في تثبيط عمل انزيم (aromatase) بنسبة (60-80%) من خلال دراسة دور هذه المستخلصات في علاج سرطان الثدي .كما ذكر[31] ان المستخلص الكحولي للرمان كان من بين اكثر المستخلصات النباتية فعالية في تثبيط كفاءة انزيم (α-amylase) ,كما أن مركبات الـ (flavonoid) المستخلصة من زيت بذور النبات لها فعالية تثبيطية بنسبة (31-44 %) لانزيم (sheep cyclooxygenase) وتثبيط لـ (soya bean lipoxygenase) بنسبة (8-69 %) اما مركبات الـ (flavonoid) المستخلصة من عصير الرمان المتخمر فقد أظهرت نسبة تثبيط بلغت (21-30 %) لانزيم (soya bean lipoxygenase) ولم يكن لها دور في تثبيط (sheep cyclooxygenase) [32] . كما وجد ان مستخلص قشور الرمان له فعالية تثبيطية لأنزيم

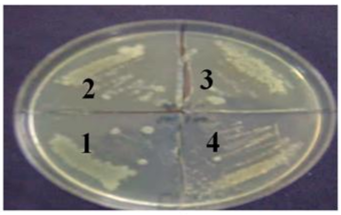
(matrix metalloproteinase-1) المنتج من قبل الارومة الليفية الجلدية (dermal fibroblast) [33] .كما وجد ان المستخلص الكحولي للأزهار يثبط انزيم (α-glucosidase) في الامعاء وهذا يساعد في علاج مرضى السكري [34] .

ان المستخلص المائي والكحولي لقشور الرمان يحوي العديد من المركبات التي لها فعل تثبيطي للانزيمات ,فمركبات الـ (tannin) ذات فعالية تثبيطية للانزيمات كما ان النبات غني بالاحماض الفينولية التي لها فعالية تثبيطية للانزيمات من خلال تداخلها مع البروتينات وبالتالي توقف عمل الانزيم [29]

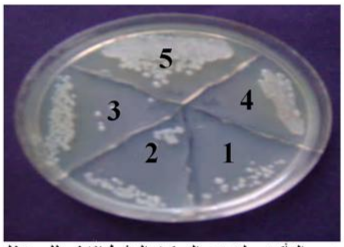
جدول(1) تأثير المستخلص المائي والكحولي لقشور الرمان وبتراكيز تحت التركيز المثبط الادنى في انتاج انزيم الهيمولايسين

المستخلص	العزلة البكتيرية	التراكيز(mg/ml)	انتاج الهيمولايسين
المائي	*E.coli*	175 150 125	+* +* +*
الكحولي	*E.coli*	40 30 20	+* +* +*
المائي	*P.aeruginosa*	175 150 125	+* +* +*
الكحولي	*P.aeruginosa*	15 10	+* +*
المائي	*S.aureus*	1 0.5	- -
الكحولي	*S.aureus*	0.3 0.2	- -
المائي	*B.cereus*	3 2	- - -
الكحولي	*B.cereus*	0.5 0.2	- -

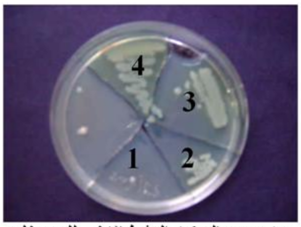
(*+ انتاج ضعيف للانزيم ,- عدم انتاج انزيم)



شكل (b-1) الفحص التأكيدي لتحديد التركيز المثبط الادنى للمستخلص الكحولي تجاه بكتيريا *E.coli*:
1. 50 ملغ/مل.
2. 40 ملغ/مل.
3. 30 ملغ/مل.
4. 20 ملغ/مل.



الفحص التأكيدي لتحديد التركيز المثبط الادنى للمستخلص المائي تجاه بكتيريا *E.coli* :
1. 200 ملغ/مل.
2. 175 ملغ/مل.
3. 150ملغ/مل.
4. 125ملغ/مل.
5. 100ملغ/مل



شكل (c -1) تحديد التركيز المثبط الادنى للمستخلص المائي تجاه بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa*

1. 200 ملغ/مل.
2. 175 ملغ/مل.
3. 150ملغ/مل.
4. 125ملغ/مل.

شكل (f-1) الفحص التأكيدي لتحديد التركيز المثبط الادنى للمستخلص الكحولي تجاه بكتيريا *Staphylococcus aureus* :

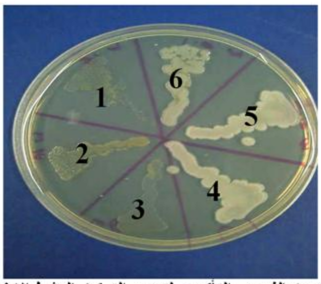
1) 0.5 ملغ/مل .
2) 0.3 ملغ/مل .
3) 0.2 ملغ/مل .
4) 0.1 ملغ/ مل
5) 0.05 ملغ/مل .
6) 0.01 ملغ/ مل

شكل (d-1) الفحص التأكيدي لتحديد التركيز المثبط الادنى للمستخلص الكحولي تجاه بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa*

1. 20 ملغ/مل.
2. 15ملغ/مل.
3. 10ملغ/مل.
4. 5 ملغ/مل.
5. 1ملغ/مل

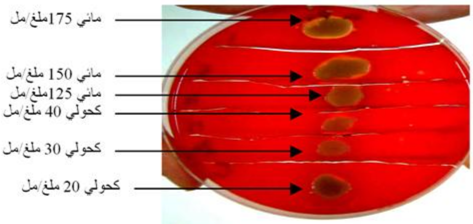
شكل (g-1) الفحص التأكيدي لتحديد التركيز المثبط الادنى للمستخلص المائي تجاه بكتيريا *Bacillus cereus*

1. 5ملغ/مل.
2. 3 ملغ/مل.
3. 2 ملغ/مل.
4. 1 ملغ/مل.
5. 0.5 ملغم/مل

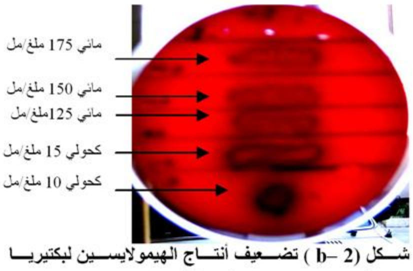


شكل (e-1) الفحص التأكيدي لتحديد التركيز المثبط الادنى للمستخلص المائي تجاه بكتيريا *Staphylococcus aureus* :

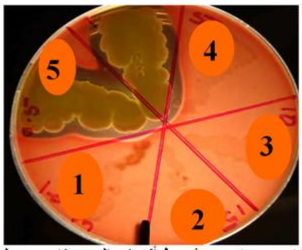
1) 2 ملغ/مل .
2) 1ملغ/مل .
3) 0.5 ملغ/مل.
4) 0.1 ملغ/ مل
5) 0.05 ملغ /مل.
6) 0.01 ملغ/ مل



شكل (a - 2) تضعيف أنتاج الهيمولايسين لبكتيريا *E.coli*

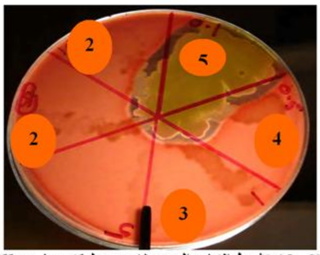


شكل (2 –b) تضعيف أنتاج الهيمولايسين لبكتيريا *Pseudomonas aeruginosa*



شكل (2- c) تثبيط أنتاج الهيمولايسين لبكتيريا *Staphylococcus aureus* :

1. 1ملغ/مل مائي .
2. 0.5 ملغ/مل مائي .
3. 0.3 ملغ/مل كحولي .
4. 0.2 ملغ/مل كحولي .
5. السيطرة .



شكل (2- d) تثبيط انتاج الهيموليسين لبكتيريا *Bacillus cereus*

1. 3 ملغ/مل مائي .
2. 2 ملغ/مل مائي .
3. 0.5 ملغ/مل كحولي .
4. 0.2 ملغ/مل كحولي .
5. السيطرة .

المصادر :

1. Brooks, G.F ;Butel,J.S and Morse,S.A.1998.Medical Microbiology 21 st ed. Appleton and Lang .Stamford United states of America .p. 222-223.
2. Qarah ,S. 2004. *Pseudomonas aeruginosa* Infections .Internet explorer. eMedicine.com.
3. Forbes ,B.A; Sahm ,D.F. and Weissfeld ,A.S. 2007 .Diagnostic Microbiology .12th ed. Mosby Inc.p.255,282,323.
4. Van Delden ,C.H. and Iglewski ,B.H.1998. Cell to cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections . Emer .Infect. Dis. 4(4).
5. Nadkarni ,A.K. 2000 .Dr. K.M. Nadkarni's Indian Materia Media .3 rd ed. Popular Prakashan Private Limited .vol.1.
6. Ajaikmar ,K.B. ;Asheef, M. ;Babu ,B.H. and Padikkala ,J. 2005.The inhibition of gastric mucosal injury by *Punica granatum* L.(pomegranate) methanolic extract .J.Ethnopharmacology .96(1-2) :171-176 .
7. Das ,A.K. ;Mandal ,S.C. ; Benerjee, S.K. ;Sinha,S. ;Das ,J. ;Saha ,B.P.and Pal,M.1999. Studies on antidiarrhoeal activity of *Punica granatum* seed exrract in rats . J. ethnopharmacology .68(1-3):205-208 .
8. Pradeep ,B.V. ;Manojbabu ,M.K. and Palaniswamy ,M. 2008 .Antibacterial activity of Punica granatum L. against gastrointestinal tract infection causing organisms . Ethonbotanical Leaflets .12:1085-1089.
9. Zhang ,J.;Zhan ,B. ;Yao ,Y. ;Gao ,Y. and Shoug ,J. 1995 .Antiviral activity of tannin from pericarp of *Punica granatum* L. against genital herps virus .Pub .Med .20(9):556-558 .
10. Adyary ,A.V. ;Peña ,F.B.R. ;Medina ,M.E. ;Gra ,B. ;Rivera ,F. ;Gutierraz ,Y. and Vuorela ,P.M. 2003 .Studies on the toxicity *Punica granatum* L. (punicaceae) whole fruit extract .J.Ethnopharmacology .89(2-3):295 -300

Escherichia coli O157:H7 .J. Ethnopharmacol.94(1):49-54 .

19. Nimri ,L.F. ;Neqdam ,M.M.;and AL Kofali A. 1999 .Antibacterial activity of Jordanian medicinal plants .Pharmaceutical Biology .37(3):196-201.

20. Ahmad ,I. and Beg ,A.2001 .Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi drug resistance human pathogens. J.Ethnopharmacol. 74:113-123.

21. Asha ,M.K. and Amit ,A. 2001 .Antibacterial activity of *Punica granatum* .Fitoterrapia .72(2):171-175 .

22. Nararo ,V.;Villawed ,M.L. Rojas ,G. and Lozoya ,X. 1996. Antibacterial evaluation of some plant used in Mexican traditional medicine for treatment of infectious disease .J.Ethnopharmacol.53(3):143-147 .

23. Neg ,P.S. and Jayaprakasha ,G.K.2006 .Antioxidant and antibacterial activities of *Punica granatum* peel extracts .J. Food Science.68(4):1473-1477 .

24. Khullar ,N. and Rani ,P. 2004 .Antimicrobial evaluation of some medicinal plants for their anti-enteric potential against multi drug resistant *Salmonella typhi* .Phytotherapy Res.18(8):670-673 .

25. Mathabe ,M.C. ;Nikolova ,R.V.;Lam ,N. and Nyazema ,N.Z. 2006.Antibacterial activities of medicinal plants used for treatment of diarrhoea in Limpopo Province ,South Africa .J.Ethnopharmacol. 105(1-2):286-293 .

26. Alanis ,A.D.;Celzada ,F. ;Cervantes ,J.A.Terres ,J. and Ceballos ,G,M. 2005 Antibacterial properties of some plants used in Mexican traditional medicin for treatment of gastrointestinal disorders J.Ethnopharmacol. 100(1-2):153-157 .

11. Murthy ,K.N.CH. ;Jayaprakasha ,G.K. and Singh ,R.P. 2002 .Studies on antioxidant of pomegranate(*Punica granatum)* peel extract using in vivo models .J.Agriculure Food Chemsitry .50(17):4791-4795 .

12. Seeram ,N . ;Adams ,L. ;Henning ,S. ;Nin ,Y. ;Zhang ,Y. ;Nair ,M. and Heber ,D. 2009 .IN vitro antipoliferation ,apoptotic and antioxidant activities of punicalagin , ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenoles as found in pomegranate juice . J.Nut. Bioch .16(6):360-367 .

13. العبيدي, لمياءعبد الرزاق احمد طه2000.تأثير متستخلص نبات القريص في نمو بعض الاحياء المجهرية الممرضة.رسالة ماجستير .كلية العلوم-جامعة بغداد.

14. Harborne ,J.B. 1984 .Phytochemical methods .2 nd Ed. Chapman and Hull .

15. Anessing ,C. and Peroz ,C.1993 .Screening of plants used inArgentina folk medicine for antimicrobial activity .J.Ethnophrmacol. 39(2):119-128 .

16. Miles ,R.S. and Amyes ,S.G.B. 1996 .Laboratory control of antimicrobial therapy ,In:Practical Medical Microbiology 14th Ed.By: J.Gerald Collee;Barrie ,P.Marmion ;Andrew ,G. Fraser and Anthony ,Simmon .Churchill Livingston .New York .P:159-161 .

17. Cruichshank ,R. ;Duguid ,J.P. Marmion ,B.D. and Swain ,R.H.A. 1975 .The practice of medical microbiology .In: Medical microbiology .Vol.2.12 th Ed. Churchill Livigston .London .P:141-181,443-447.

18. Voravuthikunchai ;Lortheeranuwat ,A.;Jeeju ,W.;Sririrak ,T. ;Phongpaichit ,S. and Supawita ,T. 2004 .Effective medicinal plants against enteroheamorrhagic

for human brest cancer . Breast Cancer Research and treatment .71(3):203-217 .

31. Prashanth ,D. ;Padmaja ,R. and Samiulla ,D.S. 2001 .Effect of certain plant extracts on α –amylase activity .Fitoterapia .72(2):179-181 .

32. Schubert ,S. Y. ;Lansky, E.P. and Neeman ,I. 1999 .Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids .J. Ethnpharmacol .66(1):11-17 .

33. Aslam ,M.N.;Lansky ,E.P. and Varani ,J. 2006 .Pomegranate as a cosmeceutical source :pomegranate fractions promote proliferation and procollagen synthesis and inhibit matrix metaloprotinase -1 production .J. Ethnopharmacol. 103(3):311-318 .

27. Al- Brahim ,J.S.R 2008 . Effect of pomegranate (*Punica granattum*) juice on the inhibition of wound bacterial infection .Ass.Univ. Bull.Environ.Res. 11(2).

28. Lu ,E.P. ;Gökmen ,V. and Artik ,N.2002 .Organic acides and phenolic compound in pomegranate (*Punica granatum* L.) grown in Turkey .J.Food composition and analysis .15(5):567-575 .

29. Cowan ,M.M.1999 .Plant products as antimicrobial agents .Clinical Microbiology Reviews .12(4) :564-582 .

30. Kim ,N.D.;Mehta ,R. ;Yu ,W .;Neeman ,I. ;Liveny ,T. ; Amchoy ,A. ;Poirier ,D. ;Nicholls ,P. ;Kirby ,A. ;Jiang ,W. ;Mansel ,R. ;Ramachandram ,C.; Rabi ,T. ;Keplan ,B. and Lansky ,E. 2002 .Chemopreventive and adjuvant therapeutic potential of pomegranate (*Punica granatum*)

The Effect of Aqueous and Alcoholic Extracts of *Punica granatum* L. Pericarp on Hemolysin Production of several Bacterial species

M. M.Al-humndu* ***D. N. Farj****

*Department of Biology, College of Science, University of Baghdad

Abstract:

Four local hemolysin producer bacterial isolates were selected, tow of them gram negative bacteria (*Escherichia coli ,Pseudomonas aeruginosa*) and the other two were gram positive bacteria (*Staphylococcus aureus* , *Bacillus cereus*). Minimum inhibitory concentration of the aqueous and alcoholic extracts of *Punica granatum* L. pericarp were determined towards the four bacterial isolates ,results obtaind showed that MICs of the aqueous extract were 200 mg/ml for *E .coli* and *P. aeruginosa* isolates while were 5 mg/ml and 2 mg/ml for *B. cereus*, *S. aureus* , respectively The MICs for the ethanolic extract were 50 mg/ml , 20 mg/ml ,1 mg/ml ,0.5 mg/ml for *E. coli ,P. aeruginosa ,B. cereus ,S. aureus* , respectively. The effect of Sub-MICs of the aqueous and alcoholic extracts on hemolysin production was investigated , both extracts had a suppressing effect on hemolysin production by *E. coli ,P. aeruginosa* ,while both extract had an inhibitory effect on hemolysin production by *S. aureus* and *B . cereus* isolates