The Effect of Apigenin on Gram Positives and Negative Bacteria

Dr.Entessar H.Ali
Applied Sciences Department, University of Technology /Baghdad
Email: mum bottol@yahoo.com

Received on: 4/ 9 /2011 & Accepted on: 3 /11/2011

ABSTACT

The antibacterial effect of Apigenin was evaluated by an in vitro study testing the growth of various Gram-Posative and Gram-Negative bacteria . The bactericidal activity of this extract was analyzed by serial dilution in tubes. This study,found that Gram-Negative and Gram-Positive bacteria susceptible to lower Apigenin concentrations. On the other hand, Gram-Negative bacteria were more susceptible than Gram-Positives bacteria, the minimal bactericidal concentration of Gram-Negative bacteria was 2 mg ml^{-1} but minimal bactericidal concentration of Gram-Positive bacteria was 4 mg ml^{-1} that mean doable inhibation concentration of Gram-negative bacteria . This study suggest that Apigenin have inhibation effect against Gram-Posative and Gram-Negative bacteria and Apigenin was natural material found in Iraq and world with little side effect

تاثير الابجنين كمضاد للبكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام

الخلاصة

تم تقييم الفعالية المضادة للابجنين على سلالات مختلفة من البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام . حيث استخدمت طريقة التخافيف المتسلسلة في الانابيب لقياس الفعالية المثبطة للنمو البكتيري .اظهرت هذه الدراسة تأثر البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام بالابجنين ولكن كانت البكتريا السالبة لصبغة كرام اكثر تحسس من البكتريا الموجبة لصبغة كرام تجاة المستخلص حيث كان التركيز المثبط الادنى للبكتريا السالبة لصبغة كرام 2 ملغم/مل اما البكتريا الموجبة لصبغة كرام فكان التركيز المثبط الادنى لها 4 ملغم/مل أي ضعف التركيز المثبط الادنى للبكتريا السالبة لصبغة كرام .

لذا يمكن اعتبار الابجنين ذا فعالية تضادية للبكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام مع الاخذ بنظر الاعتبار كونة مادة طبيعية وتأثيراتها الجانبية قليلة كما انها متوفرة في العراق والعالم.

المقدمة

يعد مركب الابجنين من الفلافونات (حلقة سداسية ترتبط بها واحد او اكثر من جذور (OH) الهيدروكسيل) [1] وتمثل الفلافونات رتبة كبيرة من متعدد الفينولات (Polyphenols) وتتميز بتركيبها الكيميائي المكون من حلقتين أروماتية (Aromatic rings) مرتبطة بثلاث جزيئات كاربون (C_6-C_3-C_6). تضم الفلافونات مجموعة كبيرة من المركبات الطبيعية الواسعة الأنتشار والمتميزة بفعالياتها الحيوية المهمة وهي ذات وزن جزيئي واطيء (250-1000 دالتون) ولها القابلية على كسح الجذور الحرة المؤكسدة والتي ينتجها النبات لحماية

https://doi.org/10.30684/etj.30.2.12
2412-0758/University of Technology-Iraq, Baghdad, Iraq
This is an open access article under the CC BY 4.0 license http://creativecommons.org/licenses/by/4.0

أسطحه من أضرار الإصابة بالبكتريا والفايروسات والفطريات وهي مبيدات حيوية طبيعية تنتج من قبل النباتات إستجابة لتعرضها للممرضات، وتضم الفلافونات ست مراتب رئيسية وهي حسب ما ورد في [2] وكالأتي:

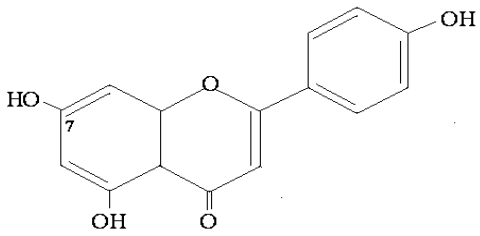
1- Flavones مثل Apigenin و Luteolin .
2- Flavonols مثل Quercetin و Myricetin .
3- Flavanones مثل Naringenin و Hesperidin .
4- Catechins مثل Epicatechin و Gallocatechin.
5- Anthocyanidins مثل Cyanidin و Pelargonidin .
6- Isoflavones مثل Genistein و Daidezin .

تعد النباتات الحاوية على الفلافونات مصدراً لمعالجة العديد من الامراض مثل امراض الاوعية الدموية والقلبية وبعض انواع السرطان من خلال عملها كمضادات للاكسدة [3].

تمتلك الفلافونات القدرة على حماية الأنظمة الحيوية من خلال قدرتها على نقل الكترونات الجذور الحرة والتفاعل مع المعادن وتنشيط الأنزيمات المضادة للأكسدة [4]. وفي مجال مضادات السرطان (Anti-cancer agents) أجريت دراسات لفلافونات مختلفة لتحديد قابليتها على منع حدوث السرطان المستحث او علاجه ولوحظ بأنها تمتلك فعالية في تثبيطه سواء كان في الجسم الحي او في الزجاج (*in vitro*)[5].

وهناك نباتات كثيرة تحتوي على الابجنين واهمها نبات الميرمية ***Salvia officinalis*** الذي يعد من النباتات الغنية بفلافونات متعددة ومنها أبجنين (Apigenin) والذي يعتبر مكوناً مهماً فيها [6] ويوجد في النبات بنسبة تصل الى 2.5 غرام لكل كيلو غرام وأما تركيبه الكيميائي فهو موضح في الشكل رقم (1).

شكل -1: التركيب الكيميائي لمركب الابجنين (Dordevic *et al*., 2001).



يعود هذا المركب الى مجموعة متعدد الفينولات وهو من مواد الأيض الثانوي في النبات وتتميز هذه المركبات بوجود حلقة الفلافون [7] ووزنة الجزيئي 270.24 دالتن، أما صفاته الكيميائية والفيزيائية فهو يكون بشكل بلورات أبرية صفراء اللون [8] ودرجة الانصهار (Melting point) هي 347°م [9]، ويذوب في الماء الحاروالكحول بصورة متوسطه وكلياً في هيدروكسيد البوتاسيوم [8].

يتميز هذا المركب بكونه مادة مضادة للأكسدة وذات فعالية عالية ضد البكتريا والفطريات مثل *Escherichia coli* و *Salmonella typhi* و *Candida albicans* [9]. كما وانه من المواد ذات الفعالية المضادة للتسرطن، حيث وجد بأنه يمتلك القابلية على تثبيط فعل مادة Dimethylbenzanthracene (DMBA) والتي لها القابلية على استحثاث سرطان الجلد في

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

الفئران [10 , 11]، وذلك لفعاليته المضادة للأكسدة حيث يعمل على سحب الجذور الحرة، كما وله أثر فعال في معالجة الألتهابات [12].

المواد وطرائق العمل :

- **الابجنين** :

تم الحصول على الابجنين كمادة قياسية من شركة Sigma العالمية وبنقاوة 98% وذلك لغرض اجراء الاختبارات الخاصة بفعاليته ضد البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام . ثم حضرت التراكيز (0.2 , 0.4 , 0.6 , 0.8) ملي غرام / مليلتر مستخلص الابجنين مع الماء المقطر الساخن.

- **العينات** :

تم تشخيص العزلات الجرثومية من عينات سريرية جمعت من مراكز طبية مختلفة من مرضى راقدين في بعض مستشفياتنا . تم عزلها وانماء المستعمرات وزرعها لحفظها وخزنها بدرجة حرارة تحت الصفر المئوي للاحتفاظ بها لمدة طويلة. تم تشخيص العزلات الجرثومية حيث اخضعت لفحوصات مظهرية بطرق عديدة كما اجري عدد من الاختبارات الكيماحيوية وفق ماورد في [13] والتي تتضمن الفحص المجهري لملاحظة شكل الخلايا اضافة الى شكلها في الاوساط الزرعية وشكل مستعمراتها.

- **تقدير الفعالية التضادية للابجنين تجاه البكتريا**

اخذت اربعة سلالات من البكتريا هي *Escherichia coli* ، *Pseudomonas fluoresenc* ، *Streptococcus faecalis* ، *Bacillus subtillis* والتي تم تشخيصها في الخطوة السابقة حيث اخذت المزارع البكتيرية الاربعة وزرعت في وسط السائل المغذي وحضنت بدرجة حرارة 37 º م لمدة 24 ساعة في الحاضنة لتنشيط العزلة ثم اخذت انابيب حاوية على 5مل من وسط السائل المغذي عقمت الانابيب ثم اضيف لكل منها 0.1 من العالق البكتيري بعد تحديد عدد الخلايا البكتيرية بشكل تقريبي حيث كان عدد البكتريا 1.5×10^{8} خلية / مل والذي يعطي طيف امتصاص مقداره (0.2) عند قياسة بجهاز المطياف الضوئي بطول موجي مقدارة (600) نانوميتر. تم اضافة 0.1 مليلتر من التخافيف (0.2 , 0.4 , 0.6 , 0.8) ملي غرام / مليلتر من المستخلص المخفف بالماء المقطر للانابيب الحاوية على وسط مغذي سائل مع ترك انبوبة واحدة دون اضافة المزروع البكتيري معاملة سيطرة لكل نوع من السلالات البكتيرية الاربعة التي سبق ذكرها ثم حضنت بدرجة حرارة 37 º م لمدة 24 ساعة وتم فحص العكورة الناتجة على طول موجي (600) نانوميتر ومقارنتها بانبوبة السيطرة لكل نوع من البكتريا .

- **التحليل الاحصائي**

حللت النتائج احصائيا" باستخدام (SPSS) Version 11.5 وبأستخدام التحليل التباين ANOVA وبصيغة المعدل ± الخطأ القياسي.

النتائج والمناقشة

اظهرت النتائج فعالية مستخلص الابجنين كمضاد بكتيري لانواع البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام حيث ثبطت نمو العزلات البكتيرية *Escherichia coli* ، *Pseudomonas fluoresens* ، *Streptococcus faecalis*، *Bacillus subtillis* وكما موضح في جدول رقم (1) .

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

E.coli : اشارت النتائج الى فعالية الابجنين كمضاد للبكتريا حيث نلاحظ ذلك في التركيز 0.2 ملي غرام / مليلتر وكانت النتيجة المعدل ± الخطأ القياسي (0.172 ± 0.005) مقارنة بالسيطرة التي كانت (**204**.0 ± 0.005) وكما موضح في جدول (1) . كما ان نقص اعداد البكتريا الحية في التركيز 0.4 ملي غرام / مليلتر حيث بلغ عدد الخلايا 1.5×10^{8} خلية / مل مقارنة بالسيطرة التي كانت 2.6×10^{8} (شكل 1) حيث كان التركيز المثبط الادنى 0.2 ملي غرام / مليلتر بالابجنين لبكتريا الـ *E.coli* .

P. fluoresens : لوحظ من النتائج تأثير الابجنين على هذه البكتريا حيث تأثرت بتركيز 0.2 ملي غرام / مل وكانت النتيجة (0.162± 0.01) بينما كانت السيطرة (0.246 ± 0.050) كما يلاحظ حدوث نقص في عدد الخلايا الحية حيث كانت السيطرة 1.65×10^{8} خلية / مل واصبحت بتركيز 0.2 ملي غرام / مليلتر 1.5×10^{8} خلية / مل وهو التركيز المثبط الادنى لهذه البكتريا وكما موضح في (شكل 1) .

St. faecalis : لوحظ من جدول (1) تأثرها بالابجنين بتركيز 0.4 ملي غرام / مليلتر حيث كانت (0.242 ± 0.003) مقارنة بالسيطرة (0.254 ± 0.004) أي تاثرها بتركيز اعلى من النوعين السابقين اما عدد الخلايا فتناقص بتركيز 0.4 ملي غرام / مليلتر واصبح 2.1×10^{8} خلية / مل مقارنة بالسيطرة 2.7×10^{8} خلية / مل وهو التركيز المثبط الادنى كما موضح في شكل (2) .

B. subtillis : فيلاحظ تأثرها بتركيز 0.4 ملي غرام / مليلتر حيث كانت (0.227 ± 0.005) مقارنة بالسيطرة التي كانت (0.239 ± 0.003) وانخفاض اعداد الخلايا الحية من 1.95×10^{8} خلية / مل في السيطرة الى 1.35×10^{8} خلية / مل بتركيز 0.4 ملي غرام / مليلتر من الابجنين وهو التركيز المثبط الادنى كما موضح في شكل (2) .

لوحظ من النتائج السابقة تأثر البكتريا السالبة لصبغة كرام *E.coli* ، *P.fluoresenc* حيث تأثرت بتركيز قليل من الابجنين وهو 0.2 ملي غرام / مليلتر بينما كانت البكتريا الموجبة لصبغة كرام اكثر مقاومة للابجنين حيث تأثرت بتركيز اعلى وهو 0.4 ملي غرام / مليلتر *St. faecalis*، *B. subtillis* لذا كان التركيز المثبط الادنى للبكتريا الموجبة لصبغة كرام اعلى من البكتريا السالبة لصبغة كرام ويعزى سبب فعالية الابجنين الى كونه مادة فلافونية حيث تعمل كمضاد للبكتريا , الفايروسات , الفطريات والابتدائيات اما ألية عملها فتتلخص بأيقاف تصنيع الاحماض النووية في الخلية البكتيرية وذلك من خلال تثبيط عمل انزيم CO-enzyme التي تنتجها الخلية البكتيرية [14].

إن لفلافونات النبات فعالية مضادة للفطريات والبكتريا، إذ وجدَ إن لهذه المركبات تأثيراً قاتلاً في الخلايا الفطرية من خلال تحطيم غشائها الخلوي وذلك لكونها مادة مضادة للاكسدة [15].

كما يمتاز الابجنين بكونة ذو تأثيرات جانبية قليلة ومضاد للبكتريا وقليل السمية اضافة الى سهولة الحصول علية وسهولة تحضيرة وثباتيته العالية [15]. اما الاختلاف في تأثير الابجنين على البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام فتعزى الى الاختلاف في تركيب غشائها الخلوي اضافة الى احتواء البكتريا الموجبة لصبغة كرام على الغشاء الخارجي outer membarian مما يؤدي الى قلة تأثرها اومقاومتها للابجنين[16] .

المصادر

[1]Zhang, Y.; Tang, L. and Gonzalez, V. (2005). Selected isothiocyanates rapidly induce growth inhibition of cancer cells. Mol. Cancer Ther., 2: 1045-1055.

[2]Ross, A .C. and Kasum, E .M. (2002). The function of vitamin A in cellular growth and differentiation, and its roles during pregnancy and lactation. Adv.

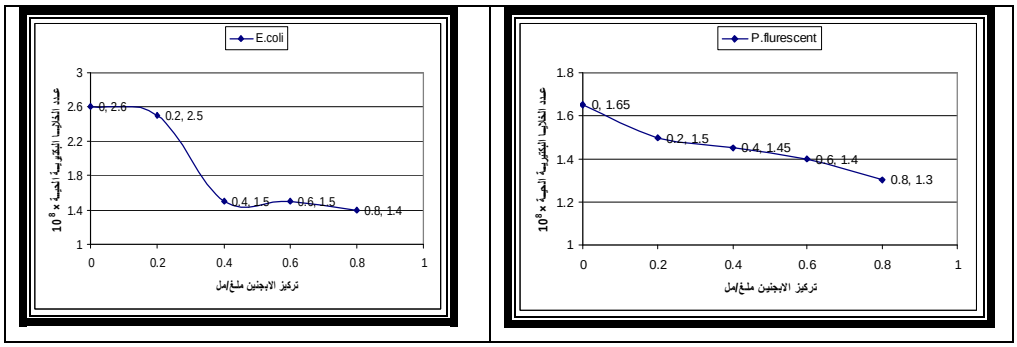
PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

Exp. Med. Biol., 352: 187-200.
[3]Ness, A.R. and Powles, J.W. (1997). Fruit and vegetables and cardiovascular disease: a review, Int. J. Epidemiol., 26: 1-13.
[4]Foyer, C. H.; Souriau, N. Perret, S.; Kunertk. J; Pruvost, C. and Jouanin, L. (1995). Over expression in antioxidant capacity and resistance to photoinhibition in poplar trees. Plant physiol., 109(3): 1047-1057.
[5]Miyagi, K.; Kikuzaki, H. and Nakatani, N. (2000). Antioxidant activity of chemical components from sage (*Salvia officinalis L.*) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) measured by the oil stability index method. J. Agric. Food .Chem., 50(7): 1845-1851.
[6]Dordevic, S.; Cakic, M. and Amr, S. (2001). The extraction of apigenin and Luteolin from the sage *Salvia officinalis* L. from Jordan.The Scientific J. FACTA, 1(5): 87– 93.
[7]Paladini, A.D.; Marder, M.;Viola, H. and Medina, J.H. (1999). Flavonoids and the centreal nervous system. J .Pharm. Pharmacol., 51(5): 519-526.
[8]Budavari, S. (1997). The Merck Index,13th ed. Whitehouse Station, NJ, Merck and Co. Inc.,:123-124.
[9]Lide, Y.C. (1997). Suppression of extracellular signals and cell proliferation through EGF receptor binding by (-)- epigallocatechin gallate in human A_{431} epidermoid carcinoma cells. J. cell Biochem., 67: 55–56.
[10]Chen, D. and Dou, Q. (2008). Tea polyphenols and their roles in cancer prevention and chemotherapy. Nath. Insit. of Health., 9 (7): 196-206.
[11]Berggren, M.; Sittadjody, S.; Song, Z. and Burd, R. (2009). Sodium selenite increases the activity of the tumer suppressor protein. Nutr. Cancer, 61: 322-331.
[12]Galati, G.; Chan, T.; Wu, B.O. and Brien, P.J. (1999). Glutathione dependent generation of reactive peroxidase redox cyclining of flavonoid.Chem. Res. Toxical,12: 521-524.
[13]Cowan, M.M. (1999) . Plant products as antimicrobial agents. Clin. Microbiol. Rev., 12(4) : 564-582.
[14]Tsao, C.S. (1997). An overview of ascorbic acid chemistry and biochemistry. In: Packer L, Fuchs J, eds. Vitamin C in health and disease. New York: Marcel Dekker Inc.,4: 25–58.
[15]Zhang, Y.; Tang, L. and Gonzalez, V. (2005). Selected isothiocyanates rapidly induce growth inhibition of cancer cells. Mol. Cancer Ther., 2: 1045-1055.
[16] Tsuji, P. and Walle, T. (2007). Cytotoxic effects of the dietary flavones chrysin and normal trout liver cell line. Chem. Biol. Interact., 171 (1): 37-44.

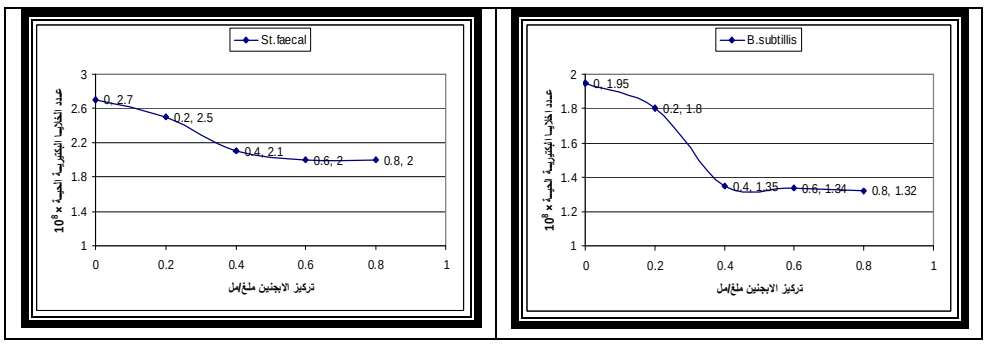
PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

جدول رقم (1) : تأثير الابجنين على نمو البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام .

سلالات البكتريا	الطيف الضوئي (600) نانوميتر (المعدل ± الخطأ القياسي)				
	تركيز مستخلص الابجنين ملي غرام / مليلتر				
	0.2	0.4	0.6	0.8	السيطرة
E. coli	0.005± 0.172	0.005 ± 0.158	0.005± 0.147	0.004± 0.132	0.204 0.005±
P. fluoresenc	0.01 ± 0.162	0.011 ± 0.153	0.005 ± 0.139	0.004± 0.138	0.246 0.050±
St. faecalis	0.004 ± 0.254	0.003 ± 0.242	0.011 ± 0.242	± 0.224 0.004	± 0.254 0.004
B. subtillis	0.004 ± 0.239	0.005 ± 0.227	0.004 ± 0.225	± 0.222 0.002	± 0.239 0.003



شكل (1) تأثير الابجنين على اعداد البكتيريا السالبة لصبغة كرام



شكل (2) تأثير الابجنين على اعداد البكتيريا الموجبة لصبغة كرام

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com