مجلة الأزهر للبحوث الزراعية
العدد رقم (13) **ديسمبر سنة** 2012
من ص 85-103

تأثير مستخلصات القهوة العربية والمواد المضافة إليها (الهيل والقرنفل) كمضاد لبعض أنواع البكتيريا الممرضة المنقولة عبر الغذاء

مطلق محمد العتيبي ، فرج علي صالح
قسم علوم الغذاء والتغذية، كلية العلوم الزراعية والأغذية ،
جامعة الملك فيصل ، المملكة العربية السعودية

الملخص

تم دراسة نشاط المستخلص المائي والكحولي والايثيري للقهوة والهيل والقرنفل ضد البكتيريا الممرضة المنقولة عبر الغذاء مثل *Staphylococcus aureus, Salmonella enteric* and *Listeria monocytogenes*. أعطي المستخلص الكحولي والايثيري للقرنفل أكبر تأثير مثبط لبكتيريا *L. monocytogenes* and *S. enteric* .. في حين أظهر المستخلص المائي للقرنفل تأثير قوي ضد بكتيريا *Staph. aureus*. كذلك المستخلص الكحولي للحبهان أبدي تأثير قوي أيضا ضد بكتيريا *L. monocytogenes*. . أما القهوة فكان للمستخلص المائي فقط تأثير مثبط ضد البكتيريا الممرضة وخصوصا بكتيريا *S. enteric*. وعند دراسة أقل تركيز قادر على إحداث تثبيط للبكتيريا (MIC)، فقد أبدت بكتيريا *L. monocytogenes* حساسية عالية للتركيزات القليلة (0.5 ملليجرام/مل) لكلا من المستخلص الايثيري للهيل والمستخلص الكحولي للقرنفل. بينما أظهرت بكتيريا *Staph. aureus* نفس الحساسية ولكن للمستخلص الايثيري لكلا من الهيل والقرنفل. تبين أن البكتيريا السالبة لصبغة جرام حساسة بمقدار الضعف عن البكتيريا الموجبة لجرام تجاه المستخلص المائي للقهوة. وعند دراسة تأثير 10 تركيبات من القهوة العربية ضد بكتيريا *Staph. aureus* تبين أن التركيبة المحتوية علي 29.4 قهوة و 3.4 هيل و 0.8 قرنفل وكذلك التركيبة المحتوية على 18.5 قهوة و 2 هيل و 0.9 قرنفل (جرام/لتر ماء) أظهرتا أكبر نشاط مضاد لهذه البكتيريا عن باقي التركيبات قيد الدراسة. ومن هذه النتائج ننصح باستخدام هذه التركيبات عند إعداد القهوة العربية للحصول على أفضل نشاط مضاد للبكتيريا الممرضة.

1- المقدمة

القهوة العربية واحدة من أفضل المشروبات الساخنة الشعبية في العالم العربي وخصوصا في شبة الجزيرة العربية وذلك لنكهتها وطعمها المستساغ. أعتاد سكان شبه الجزيرة العربية تقديم القهوة العربية في جميع المناسبات كنوع من أنواع كرم الضيافة والحفاوة. ويتم تناولها بصفة مستمرة على مدار العام صيفاً كان أو شتاءً.

يتم إعداد القهوة العربية بعد تحميص البن إلى اللون الأشقر وطحنها ثم غليها لفترة من الزمن. بعد ذلك تضاف إلى مخلوط الهيل (الحبهان) و القرنفل أو ما يسمى المسمار لإعطاء طعم ونكهة مميزة للقهوة العربية وقد يضاف إليها الزعفران. وبالتالي وبتناول هذه القهوة فأنة يمكن الحصول على مستخلص مائي لكل هذه الإضافات حيث تحتوي على الزيوت الطيارة المفيدة لمكونات تلك القهوة وكذلك المركبات الذائبة في الماء. ومن الجدير بالذكر أن هذه القهوة لا يضاف إليها السكر.

ان التركيب الكيميائي للقهوة معقد جدا إذ تحتوي على مئات من المركبات الكيمائية والتي تكون موجودة أصلا في القهوة أو التي تكونت بتأثير عملية التحميص (Daglia *et al.*, 2007)، علاو على مساهمة المواد المضافه ببعض المركبات الكيميائية المنكهة. وعزى كثير من العلماء التأثيرات الصحية للقهوة لتلك المركبات مثل التأثير المضاد للحساسية والتأثير المضاد للفطريات والتأثير الخافض للسكر (Johnston, *et al.*, 2003; Kendrick and Day, 2007; Ohshima *et al.*, 2003; Rosengren *et al.*, 2004).

ومن أهم التأثيرات الصحية للقهوة هو التأثير المضاد للبكتيريا الممرضة للإنسان والمنقولة عبر الغذاء ويشمل هذا التأثير بعض أنواع البكتيريا السالبة والموجبة لصبغة جرام (Almeida *et al.*, 2006; Almeida *et al.*, 2004; Daglia *et al.*, 1994; Daglia *et a.*, 1998; Daglia *et al.* 2007). ويختلف هذا التأثير المضاد للبكتيريا حسب التركيب الكيميائي للقهوة (Daglia *et al.* 1998) والذي يتأثر بأنواع المواد المضافة والعمليات التصنيعية التي تجري على القهوة مثل التحميص والتخلص من مادة الكافيين (Farah *et al.*, 2006a; Farah *et al.*, 2005). فقد ذكر Daglia *et al.*, (1998) أن المركبات الصغيرة في الوزن الجزيئي (أقل من 20 دالتون) الموجودة في القهوة هي التي لها أعظم تأثير مضاذ لبكتيريا *Staphylococcus aureus* and

Streptococcus mutans . في حين أنـــه أوضـــح Daglia *et al.*, (2007) أن التـــأثير المضاد لبكتيريا Streptococci الموجودة في الفم يرجع إلي المركبات الموجـــودة فـــي القهوة بنسبة قليلة جدا مثل مركب الجلوكوزال والميثيل جلوكوزال والداي اسيتيل، كمـــا أشار أيضا إلى أن هذا التأثير المضاد للبكتيريا يتزايد في وجود مـــادة الكافـــايين. وفـــي الدراستان السابقتان يعتقد الباحثون أن المركبات الطبيعية الموجودة في القهوة الخـــضراء ليس لها أي تأثير مضاد لمثل هذه البكتيريا. كذلك فإن القهوة الخضراء تحتوي على كمية كبيرة من السكروز (6–10% من تركيب القهوة) أما القهوة المحمصة فلا يوجد فيهـــا إلا 0.01% سكروز فقط من تركيب القهوة (Farah *et al.*, 2006b). علاوة على ذلـــك فقـــد أوضح الباحثين أن بعض المركبات الطبيعية في القهوة ذات الوزن الجزيئي الصغير مثل Trigonelline, caffeic acid and 5-caffeoylquinic acid (139 و 180 و 354 دالتون على الترتيب) لها تأثير مضاد لبكتيريا *Legionella pneumophile* (Furuhata *et al.*, 2002 وأيضا على الأصـــناف البكتيريـــة التابعـــة لمجموعـــة Enterobacteria (Almeida *et al.*, 2006) وكذلك على بكتيريا *Streptococcus mutans* المسببة لتسوس الأسنان (Almeida *et al.*, 2004).

ومن ناحية أخري فإن للمواد المضافة للقهوة تأثير مضاد للبكتيريا كذلك، ويعتبر الهيل أو الحبهّان (*Elettaria cardamomum*) Cardamom احد تلـــك الأعـــشاب أو التوابـــل المضافة للقهوة، وهو يتبع عائلة الزنجبيليات Zigiberaceae ويطلق عليها ملكة التوابـــل (Ravindran,2002). ويستخدم الهيل في الهند والصين كعشب علاجي للمـــساعدة علـــى الهضم والتخلص من غازات الأمعاء (Ravindran, 2002). ولحبوب الهيل نشاط مضاد للميكروبات ضد البكتيريا السالبة لصبغة جرام وعلى البكتيريا المسببة لقرحـــة المعـــدة *Helicobacter pylori* (Mahady *et al.*, 2005). وكما أوضح Kubo *et. al.*, (1991) أن الهيل له نشاط مضاد للميكروبات المسببة لتسوس الأسنان وسقوط الـــشعر وأمـــراض الجلـــد مثـــل بكتيريـــا *Bacillus subtilis, Brevibacterium ammoniagenes, Streptococcus mutans, Escherichia coli, Psudomonas aeruginosa, Enterococcus aerogenes, Proteus vulgaris, Staphylococcus aureus* ، وخميرة *Candida utilis* وفطر *Penicillium chrysogenum* . وقد ذكـــر Arora and Kaur (2007) أن المستخلص المائي لحبوب الهيل لها نشاط قوي ضـــد أنـــواع كثيـــرة مـــن البكتيريا الممرضة.

ومن الأعشاب التي تضاف أيضا للقهوة هي القرنفل أو باللغة الدارجة المسمار Cloves (*Syzygium aromaticum*) وهي من الأعشاب التي لها فوائد متعددة، فقد ذكر Broadhurst *et al* (2000), Suganthi, *et al.*, (2007), Dearlove *et al.*, (2008) and Shukri *et al.*, (2010) أن للمستخلص المائي ولزيت القرنفل نشاط لخفض الجلوكوز في الدم لما له من نشاط بيولوجي مشابه للأنسولين Insulin-like biological activity. وعلاوة على ذلك فقد ذكر العلماء أن للقرنفل نشاط مضاد للميكروبات مثل *Aspergillus xavus* المعروف بإفرازه للسموم الفطرية في الغذاء (Omidbeygi *et al.*, 2007) . كما أن لمستخلص القرنفل تأثير مثبط لبكتيريا *Bacillus cereas* المتحملة للحرارة (Sofia *et al.*, 2007). وكذلك للقرنفل تأثير مثبط للعديد من الميكروبات الممرضة والمسببة للفساد الأغذية مثل *Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumonia, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Enterococcus faecalis, Mycobacterium smegmatis, Micrococcus luteus, and Candida albicans* . وأيضا فقد أوضح العالمان Cai and Wu (1996) أن للقرنفل تأثير مثبط ضد البكتيريا المسببة لأمراض الأسنان لذلك فإن زيت القرنفل يستخدم كمخدر موضعي لألام الأسنان.

والأبحاث التي أجريت على القهوة العربية والنشاط المضاد للبكتيريا لهذه القهوة يعد قليل جداً ، لهذا السبب كان الهدف من هذه الدراسة هو التعرف على القيمة الحيوية للقهوة العربية ومصافاتها مثل الهيل والقرنفل عن طريق معرفة نشاطها المضاد للبكتيريا الممرضة مثل *Staphylococcus aureus, Salmonella enteric* and *Listeria monocytogenes*. كذلك تحديد أفضل نسب خلط لهذه المكونات للحصول على أفضل تأثير مضاد لتلك البكتيريا.

1. الطرق والخامات

1.2. القهوة والهيل والقرنفل

تم الحصول على القهوة نوع هراري بعد تحميصها في المتجر لدرجة الاشقرار وكذلك والهيل والقرنفل من الأسواق المحلية بمدينة الأحساء.

2.2. والبكتيريا الممرضة

تم شراء سلالات البكتيريا الممرضة من المركز الأمريكي لتجميع المزارع America Type Culture Collection (ATCC) وهي *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Salmonella enteric* ATCC 13076 and *Listeria monocytogenes* ATCC 7644، وتم حفظها بالتجميد لحين استخدامها.

3.2. تحضير المستخلصات

طُحن الهيل والقرنفل والقهوة طحناً دقيقاً كلاً على حدى، ثم خلط كل واحد مع مذيبات متدرجة القطبية وهي أثير ثنائي الإثيل والميثانول والماء وذلك باستخدام المجنس العمودي (IKA, T 18 basic ULTRA-TURRAX, China). تم ترشيح الناتج باستخدام ورق ترشيح (Whatman No. 1) ثم ترشح مرة أخري باستخدام مرشح الحقنة ذو سعة الثقوب 0.45 ميكروميتر. تم التخلص من المذيب في الراشح الناتج باستخدام الفرن تحت تفريغ على درجة حرارة 45°م للحصول على مسحوق جاف للمستخلص الإيثيري والكحولي والمائي. تم إذابة كلا من هذه المستخلصات الجاف في كحول 80% لاستخدام لمعرفة التأثير المضاد للبكتيريا.

4.2. اختبار النشاط المضاد للبكتيريا للمستخلصات

أُستخدمت طريقة الانتشار من خلال الثقب في الأجار Agar well diffusion method كما هي موضحة في طريقة Schillinger and Lucke, (1989) لتقدير النشاط المضاد للبكتيريا للمستخلصات ضد البكتيريا الممرضة السابق ذكرها. تم تنشيط البكتيريا الممرضة في بيئة المرق المغذي Nutrient broth (CM0501, Oxoid) على درجة 37°م لمدة 18 ساعة، ثم عمل تخفيفات متتالية من هذه البكتيريا، 1 مل من هذه التخفيفات (يحتوي على 610 وحدة مكونة للمستعمرة) يضاف إلي 100 مل من بيئة الأجار المغذي المعقمة Nutrient agar (CM856, Oxoid) على درجة 50°م في حمام مائي، ثم يقلب جيداً وتصب في أطباق بيتري، وتترك لتتصلب. تم ثقب الأجار قطر باستخدام ثاقب الأجار المعقم بقطر 6 ملليميتر. عقمت المستخلصات المذابة في الكحول باستخدام مرشح الحقنة ذو سعة ثقوب 0.45 ميكروميتر ثم تم تعبئة كل ثقب بالمستخلصات (100 ميكروليتر). تركت الأطباق لمدة نصف ساعة للسماح بحدوث تخلل للمستخلصات في الأجار. ولضبط الاختبار تم تعبئة ثقب بمحلول الكلوروميفينيكول (30

مليجرام/100 ميكروليتر محلول منظم) واعتبرت عينة ضابطة موجبة، وكذلك تعبئة ثقب بالميثانول وأخر بالمحلول المنظم كعينة ضابطة سالبة. حضنت الأطباق على درجة حرارة 37°م/24-48 ساعة حتى تظهر نموات البكتيريا في الأطباق الضابطة بوضوح. تم قياس أقطار المنطقة الخالية من النموات حول ثقب الأجار (متضمنة قطر الثقب 6 ملليميتر) باستخدام الأدمة الرقمية. ويعتبر هذا القطر مقياس لمدي التأثير المضاد للمستخلصات ضد البكتيريا الممرضة. تم إعادة هذه التجربة ثلاث مرات.

5.2. أقل تركيز قادر على إحداث تثبيط (Minimal Inhibitory Concentration, MIC)

تم انجازه بطريقة التخفيف بالاجار باستخدام بيئة ميلر هيلتون أجار (Mueller-Hinton Agar, MHA, CM0337, Oxoid) تبعاً لطريقة معهد المعايير المعملية والطبية (Clinical and Laboratory Standard Institute, CLSL, 2006) ضد البكتيريا الممرضة. تم تحضير تركيزات متدرجة من المستخلصات التي أظهرت تأثيرات مضادة للبكتيريا الممرضة من صفر إلي 20 ملليجرام/مل. تم إضافة هذه التركيزات إلي أنابيب تحتوي على 20مل من البيئة (MHA) مسالة في حمام مائي على درجة حرارة 50°م وإجراء مزج جيدا ثم تم صبها في طبق بتري وبعد التصليب وضع على سطح الطبق 5 ميكروليتر من مزرعة البكتيريا الممرضة المخففة (410 وحدة مكونة للمستعمرة/مل) (تم استخدام طبق لكل نوع من البكتيريا بدون مستخلص كعينة ضابطة) تركت الأطباق نصف ساعة قبل التحضين ليحدث لإتاحة الوقت لحدوث تشرب للبكتيريا في الاجار . حضنت الأطباق على درجة حرارة 37°م لحين ظهور البكتيريا في العينة الضابطة (من 12-48 ساعة). تم استخدام تركيزات متدرجة من الكلوروميفينيكول من 0.001 إلي 0.005 ملليجرام/مل كمضاد حيوي مرجعي واختباره بنفس الطريقة السابقة. تم أخذ أقل تركيز أحدث عدم ظهور نموات مرئية من البكتيريا على سطح الطبق.

6.2. إعداد القهوة العربية

أوزان القهوة والمواد المضافة لها تختلف من تركيبة لأخرى حسب ذوق المستهلكين، لذلك تم استدعاء 10 أشخاص من معدي القهوة للاستعانة بهم في إعداد 10 تركيبات من القهوة تبعاً لرغبتهم (تركيبة الخلطات موضحة فى جدول رقم 1). كانت طريقة الإعداد متشابهة، وهى طريقة تقليدية متبعة في إعداد القهوة العربية ويتم فيها

تسخين الماء لدرجة حرارة قبل الغليان ثم تضاف القهوة المطحونة ويترك ليغلى ثم ترفع بعد الغليان مباشراً. تصب هذه القهوة على مطحون الهيل والقرنفل في العبوة الخاصة (الدلة) للحفاظ على حرارتها، وتغلق العبوة بإحكام، وبهذا تكون جاهزة للشرب.

جدول 1: تركيبة خلطات القهوة المستخدمة في الدراسة

رقم الخلطة	الوزن بالجرام/لتر ماء		
	قهوة	هيل	قرنفل
1	29.4	3.4	0.8
2	19	2.9	2.7
3	23.3	3	1.5
4	25.7	4.4	1
5	20	3.2	1.4
6	27.2	2.5	2.6
7	18.5	2	0.9
8	22	3.8	1.9
9	22.4	3.5	2.3
10	30	2.8	2.4

7.2. تأثير القهوة على أعداد البكتيريا الممرضة

بعد إعداد القهوة بالطريقة السابقة. تم تنشيط البكتيريا الممرضة قيد الاختبار في بيئة المرق المغذي على درجة حرارة 37°م/18-24 ساعة (لحين ظهور عكارة). أضيف إلي كل خلطة نوع من أنواع البكتيريا كلا على حدي بمعدل 610 وحدة مكونة للمستعمرة لكل مل قهوة. وتم تتبع الأعداد الحية للبكتيريا في زمن الصفر وبعد 1،2،3،4 ساعة على درجة 37°م.

8.2. عد البكتيريا الممرضة

لعد بكتيريا ATCC 29213 *Staphylococcus aureus* استخدمت بيئة الاستافيلوكوكس *Staphylococcus* medium no. 110 (CM0145, Oxoid. كما استخدمت بيئة أجار أملاح الصفراء البنفسجية الحمراء Vilot Red Bile agar (VRBA, CM0107, Oxoid) لعد بكتيريا ATCC 13076 *Salmonella enteric*. كذلك استخدمت بيئة أجار لليستيريا المنتقاة Listeria- selective agar (LSA, CM

856, Oxoid) لعد بكتيريا *Listeria monocytogenes* ATCC 7644. تم تحضين كل الأطباق على درجة حرارة 37°م/24-48 ساعة.

2. النتائج والمناقشة

1.3. مسح شامل لنشاط مستخلصات القهوة والهيل والقرنفل ضد البكتيريا الممرضة

تم اختبار نشاط المستخلص المائي والكحولي والاثيري للقهوة والهيل والقرنفل ضد ثلاث أنواع من البكتيريا الممرضة بطريقة الانتشار من خلال الثقب في الأجار (جدول 2). يعرض الجدول متوسط قطر منطقة التثبيط الناتجة من نشاط المستخلصات ضد البكتيريا الممرضة السالبة لصبغة جرام (*Salmonella enteric* ATCC 13076) وأيضا الموجبة لصبغة جرام (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and *Listeria monocytogenes* ATCC 7644). أتضح من التجربة أن المستخلص الكحولي والايثيري للقرنفل أعطي أكبر تأثير مثبط لبكتيريا *L. onocytogenes* and *S. enteric*. وكان للمستخلص الكحولي للحبهان تأثير قوي أيضا ضد بكتيريا *L. monocytogenes*. (قطر التثبيط 18.8مم) يليها بكتيريا *Staph. aureus* (قطر تثبيط 14.1مم). وجد Nanasombat and Lohasupthawee (2005) المستخلص الكحولي للهيل له نشاط مضاد لأنواع وسلالات بكتيريا Salmonella spp وتراوح قطر التثبيط بين 7-12مم.

المستخلص المائي للهيل لم يظهر أي تأثير يذكر على البكتيريا الممرضة. وهذا النتيجة تتفق مع Arora and Kaur, (2007) الذي وجد أن تأثير المستخلص المائي للهيل على درجة حرارة الغرفة كمضاد للبكتيريا الممرضة السالبة والموجبة لصبغة جرام كان ضعيفا بالمقارنة بالمستخلص المائي على الساخن. ويعزي ذلك إلي أن الماء الساخن له قدرة على استخلاص المركبات المضادة للبكتيريا أفضل من الماء البارد. وفي حين أن دراستنا لم تثبت تأثير مضاد للبكتيريا للمستخلص المائي للهيل إلا أن Arora and Kaur, (2007) ذكر أن تركيز 3% (3 جرام هيل لكل 100مل ماء) هو أقل تركيز قادر على إحداث تثبيط للبكتيريا الممرضة السالبة لصبغة جرام *Salmonella typhi* وكذلك الموجبة لصبغة جرام مثل *Staph. aureus*.

أما التأثير الأكبر وبفروق معنوية (P>0.5) ضد بكتيريا *Staph. aureus* فكان للمستخلص الايثيري للقرنفل والذي سجل قطر لمنطقة التثبيط مقداره 22.4مم. ويعزي نشاط المستخلص الكحولي والاثيري للقرنفل المضاد للبكتيريا الممرضة للزيوت الطيارة التي تستخلص في الكحول والايثر Knight and McKellar, (2007), Cava *et al.*, (2007) and Goni *et al.*, (2009). ومن أهم المركبات الرئيسية التي توجد في هذه الزيوت الطيارة والتي لها تأثير شديد ضد هذه البكتيريا مركب الإجينول (Eugenol, 4-allyi-2-methoxyphenol) (Miyazawa and Hisama 2001) والذي تبين أن له تأثير مضاد لأنواع عديدة من البكتيريا الممرضة مثل *E. coli, L. monocytogenes, C. jejuni, S. enterica, S. aureus, L. sakei, Helicobacter pylori* (Friedman *et al.*, 2002; Walsh *et al.*, 2003; Ali et al., 2005 and Gill and Holley, 2006). كما وجد Hoque *et al.*, (2008) أن المستخلص المائي والكحولي وكذلك الزيوت الطيارة للقرنفل نشاط مضاد على 21سلالة من البكتيريا الممرضة المنقولة عن طريق الغذاء. وأوضح Pandey and Singh, (2011) أن مستخلص القرنفل الكحولي بالميثانول له نشاط تثبيطي أقوي من المستخلص بالايثانول، وأن وجود عناصر مثل الزنك والنحاس والكالسيوم والماغنيسيوم والحديد تزيد من تأثير المستخلص الميثانولي المضاد للبكتيريا.

وكذلك أظهر المستخلص المائي للقرنفل تأثير قوي ضد البكتيريا الممرضة قيد الدراسة وخصوصاً بكتيريا *Staph. aureus* (قطر التثبيط مقداره 18مم). وهذه النتيجة متفقة مع ما توصلا إليه Arora and Kaur, (2007) ولكن قطر التثبيط الذي توصلا إليه هو 14مم. وكذلك وجد Hoque *et al.*, (2008) أن المستخلص المائي للقرنفل له تأثير مثبط على بكتيريا *Staph. Aureus* بمتوسط قطر تثبيط مقداره 15.6مم، في حين لم يظهر هذا المستخلص أي نشاط يذكر ضد بكتيريا *L. monocytogenes.* وأيضا *Salmonella enteritidis*.

أما القهوة فكان للمستخلص المائي فقط تأثير مثبط ضد البكتيريا الممرضة وخصوصا ضد بكتيريا *S. enteric* بصورة معنوية عن باقي البكتيريا (P>0.5). أما المستخلص الاثيري والكحولي للقهوة فلم يُظهرا أي نشاط مضاد لأي من أنواع البكتريا قيد الدراسة. ويرجع السبب في ذلك إلي أن القهوة العربية لا يتم تحميصها كاملاً، ولكن تحمص لدرجة

الاشقرار والتي معها لا تتكون المركبات المسئولة عن النشاط المضاد للبكتيريا بـصورة كاملة (تأثيرها يكون ضعيف). وجد Antonio *et al.*, (2010) أن هناك علاقة عكسية بين درجة تحميص القهوة وأعداد بكتيريا *Streptococcus mutans* ، وهذا قد يرجع إلي أن المركبات المسئولة عن النشاط المضاد للبكتيريا تتكون نتيجة التحميص من خلال تفاعل ميلارد كما ذكر Daglia *et al.*, (2007).

جدول 2: النشاط المضاد للبكتيريا الممرضة لمستخلصات القهوة والهيل والقرنفل

المستخلصات	قطر منطقة التثبيط (مم)$^{\Psi}$ (المتوسط±الانحراف المعياري)		
	Listeria monocytogenes ATCC 7644	*Salmonella enteric* ATCC 13076	*Staphylococcus aureus* ATCC 29213
المائي للقهوة	0.5 ± 14.3^{Cb}	1.1 ± 18.1^{Ca}	0.9 ± 13.0^{Eb}
الكحولي للقهوة	ل ت	ل ت	ل ت
الايثيري للقهوة	ل ت	ل ت	ل ت
المائي للهيل	ل ت	ل ت	ل ت
الكحولي للهيل	1.4 ± 18.8^{ABa}	0.4 ± 12.3^{Dc}	0.9 ± 14.1^{Db}
الايثيري للهيل	0.5 ± 14.0^{Cb}	0.7 ± 13.5^{Db}	1.0 ± 15.9^{Da}
المائي القرنفل	0.7 ± 16.9^{Bb}	0.5 ± 11.7^{Ec}	0.6 ± 18.0^{Ca}
الكحولي القرنفل	0.7 ± 19.0^{Aa}	0.5 ± 20.4^{Ba}	1.4 ± 17.7^{Cb}
الايثيري القرنفل	1.6 ± 18.8^{ABb}	0.9 ± 20.4^{Bb}	0.5 ± 22.4^{Aa}
الكلوروميفينيكول Ω	0.3 ± 20.3^{Ab}	0.5 ± 24.2^{Aa}	0.4 ± 20.6^{Bb}

ABCD : الأحرف الاستهلاكية الكبيرة في نفس العمود تشير إلي عدم وجود فروق معنوية بين المعاملات (ن =3)
abc : الأحرف الاستهلاكية الصغيرة في نفس الصف تشيرإلي عدم وجود فروق معنوية بين المعاملات (ن =3)
Ψ : قطر التثبيط متضمن قطر ثقب الأجار (6مم)
Ω : بتركيز 30ملليجرام/ثقب
ل ت : لم تكتشف

2.3. أقل تركيز قادر على إحداث تثبيط

Minimal Inhibitory Concentration, (MIC)

تم إجراء هذه التجربة على المستخلصات التي ثبت أن لها تأثير مضاد للبكتيريا الممرضة. ويظهر جدول 3 أقل تركيزات من المستخلصات التي أبدت نشاط مضاد

للبكتيريا الممرضة قيد الدراسة. بكتيريا *Staph. aureus* وكذلك *L. monocytogenes* الموجبة لصبغة جرام أظهرا حساسية كبيرة لمعظم المستخلصات بالمقارنة ببكتيريا *S. enteric* السالبة لصبغة جرام. ومن المعلوم أن البكتيريا السالبة لصبغة جرام مقاومة لتأثير المضادات الحيوية عن البكتيريا الموجبة، وذلك لأن الأخيرة تحتوي على طبقة من الدهون والسكريات العديدة (Lipopolysaccharide) على السطح الخارجي لجدار الخلية مما يجعلها مقاومة لتأثير المضادات البكتيرية (Nikaido and Vaara, 1985 & (Plesiat and Nikaido, 1992

أبدت بكتيريا *L. monocytogenes* حساسية عالية للتركيزات القليلة (0.5 ملليجرام/مل) لكلا من المستخلص الايثيري للهيل والمستخلص الكحولي للقرنفل. بينما أظهرت بكتيريا *Staph. aureus* نفس الحساسية ولكن للمستخلص الايثيري لكلا من الهيل والقرنفل. ومن جهة أخري أظهرت بكتيريا *S. enteric* حساسية للمستخلص الايثيري لكلا من الهيل والقرنفل وكذلك المستخلص الكحولي للقرنفل (أقل تركيز أحدث تثبيط 1 ملليجرام/مل).

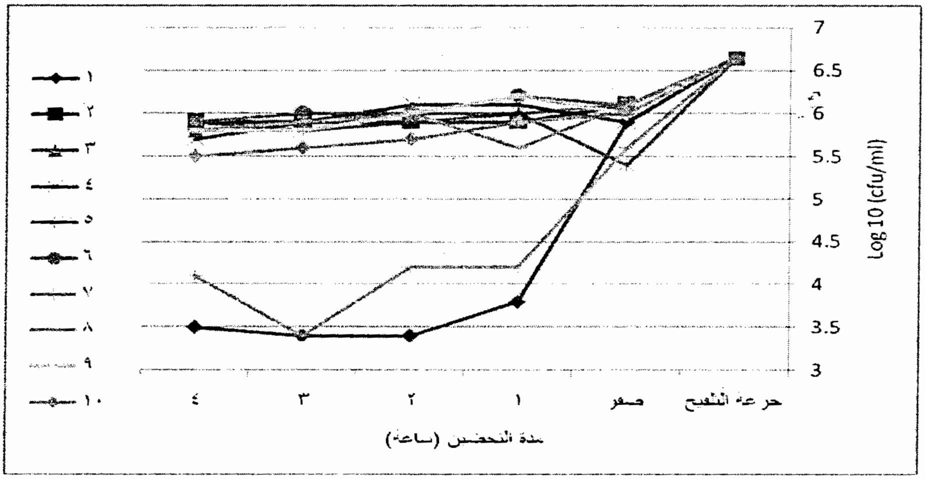
وهذه النتائج تتفق مع ما جاء به Pandey and Singh (2011) الذي وجد أن أقل تركيز للمستخلص الكحولي للقرنفل قدر على إحداث تثبيط ضد بكتيريا *Staph. aureus* هو 0.385 ملليجرام/مل. كذلك بين Hoque *et al*., (2008) أن أقل متوسط تركيز للمستخلص الكحولي والمائي للقرنفل قدر على إحداث تثبيط ضد بكتيريا *S. aureus* هو 2.1 و 2.3 على الترتيب.

ومن الجدير الذكر أنه على الرغم من أن أنواع البكتيريا الممرضة أبدت حساسية أقل تجاه المستخلص المائي للقهوة، إلا أن البكتيريا السالبة لصبغة جرام كانت حساسة بقدر الضعف من البكتيريا الموجبة لجرام. فقد سجل أقل تركيز مثبط لبكتيريا *Staph. aureus* وكذلك *L. monocytogenes* للمستخلص المائي للقهوة 20 ملليجرام/مل. بينما كان 10 ملليجرام/مل لبكتيريا *S. enteric*. ذكر Antonio *et al*., (2010) أن أقل تركيز من القهوة المحمصة لمدة 6-7 دقائق كان 5 مليجرام/مل ضد بكتيريا *Streptococcus mutans* الموجبة لصبغة جرام.

جدول 3: أقل تركيز قادر على إحداث التثبيط (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) لمستخلصات القهوة والهيل والقرنفل.

المستخلصات	أقل تركيز مثبط (ملجرام/ مل)		
	Listeria monocytogenes ATCC 7644	*Salmonella enteric* ATCC 13076	*Staphylococcus aureus* ATCC 29213
المائي للقهوة	20	10	20
الكحولي للهيل	2	2	1
الايثيري للهيل	0.5	1	0.5
المائي القرنفل	5	20	10
الكحولي القرنفل	0.5	1	1
الايثيري القرنفل	1	1	0.5
الكلوروميفينيكول Ω	0.003	0.003	0.003

3.3. نشاط القهوة المضاد لبكتيريا *Staph. aureus*



شكل 1: نشاط القهوة المضاد لبكتيريا ATCC 29213 *Staphylococcus aureus* أثناء فترات التحضين

تأثير 10 تركيبات من القهوة المحضر على بكتيريا *Staph. aureus* موضح بالشكل رقم 1. والنتائج المتحصل عليها تفيد بأن جميع الخلطات أبدت نشاط مضاد لبكتيريا *Staph. aureus* بعد الإضافة مباشراً. بعد التحضين تبين أن التركيبة رقم 1

وكذلك رقم 7 (أنظر مكونات هاتان التركيبتان في جدول رقم 1) كانا لهما أكبر تأثير على البكتيريا قيد الدراسة حيث انخفضت أعداد البكتيريا بمقدار من 2–3 دورة لوغاريتمية أثناء مدة التحضين. وقد يرجع هذا التأثير المضاد للبكتيريا إلي حدوث ما يعرف بالتأثير التعاوني (Synergistic effect) بين مكونات التركيبة الواحدة والذي أفضي إلي حدوث هذا التأثير المتميز عن باقي التركيبات. Ghanwate and Thakare (2012) وجد خلط نبات الزيزفون مع نبات متسلق يعرف باسم betel مع نبات يسمي Kattha كان له نشاط مضاد للبكتيريا الممرضة أكبر من تأثير كل نبات على حدي، وعزى الباحث هذا التأثير لوجود التأثير التعاوني بين مركبات هذه التركيبة. ولا يوجد في المراجع تأثير تركيبة القهوة على أنواع من البكتيريا، لذلك لا يمكننا عمل مقارنة بين هذا النتائج ونتائج أخري.

شكر وتقدير

يتقدم الباحثون بجزيل الشكر لعمادة البحث العلمي بجامعة الملك فيصل على دعمها لهذا البحث وكذلك لتعاونها الايجابي لتقدم مسيرة البحث العلمي.

REFERENCES

1. **Agaoglu, S., Dostbil, N. and Alemdar, S. (2007).** Antimicrobial activity of some spices used in the meat industry. Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy. **51**, 53–57.

2. **Ali, S. M., Khan, A. A., Ahmed, I., Musaddiq, M., Ahmed, K. S., Polasa, H., Rao, V. L., Habibullah, C. M., Sechi, L. A., Ahmed, N. (2005).** Antimicrobial activities of Eugenol and Cinnamaldehyde against the human gastric pathogen *Helicobacter pylori. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials,* 4, 20.

3. **Almeida, A. A. P., Farah, A., Silva, D. A. M., Nunan, E. A., and Glria, M. B. (2006).** Antibacterial activity of coffee extracts and selected coffee chemical compounds against Enterobacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **54**, 8738–8743.

4. **Almeida, A.A.P., Naghetini, C.C., Santos, V.R., and Glria, M.B. (2004).** In vitro antibacterial activity of coffee extracts on Streptococcus mutans.

In Proceedings of the 20th international conference on coffee science (pp. 242–248). Bangalore, India: ASIC.

5. **Antonio, A. G., Moraes, R. S., Perrone, D., Lucianne C. Maia, L. C., Santos, K. R., Lorio, N. I. and Farah, A. (2010).** Species, roasting degree and decaffeination influence the antibacterial activity of coffee against *Streptococcus mutans*. Food Chemistry. **118**, 782-788.

6. **Arora, D.S. and Kaur, G.J. (2007).** Antibacterial activity of some Indian medicinal plants. *Journal of Nat Med.* **61**, 313–317.

7. **Broadhurst, C.L., Polansky, M.M., and Anderson, R.A. (2000).** Insulin-like biological activity of culinary and medicinal plant aqueous extracts in-vitro. *Journal Agriculture Food Chemistry.* **48**, 849–852.

8. **Cai L. and Wu, C.D. (1996).** Compounds from Syzygium aromaticum possessing growth inhibitory activity against oral pathogens. *Journal of Nat Prod.* **59**:987–990.

9. **Cava, R., Nowak, E., Taboada, A., and Marin-Iniesta, F. (2007).** Antimicrobial activity of clove and cinnamon essential oils against *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk. *Journal of Food Protection*, **70**(12), 2757–2763.

10. **Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI. (2006).** M2-A9. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard, 9th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

11. **Daglia, M., Cuzzoni, M.T. and Dacarro, C. (1994).** Antibacterial activity of coffee: Relationship between biological activity and chemical markers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **42**, 2273–2277.

12. **Daglia, M., Papetti, A., Dacarro, C. and Gazzani, G. (1998).** Isolation of an antibacterial component from roasted coffee. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* **18**, 219–225.

13. **Daglia, M., Papetti, A., Grisoli, P., Aceti, C., Spini, V., Dacarro, C. and Gazzani, G. (2007).** Isolation, identification, and quantification of roasted coffee antibacterial compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **55**, 10208–10213.

14. **Dearlove, R.P., Greenspan, P., Hartle, D.K., Swanson, R.B. and Hargrove, J.L. (2008).** Inhibition of protein glycation by extracts of culinary herbs and spices. *Journal Medicinal Food.* **11**, 275–281.

15. **Farah, A., de Paulis, T., Moreira, D. P., Trugo, L. C., and Martin, P. R. (2006a).** Chlorogenic acids and lactones in regular and water-

decaffeinated arabica coffees. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **54**, 374–381.

16. **Farah, A., de Paulis, T., Trugo, L. C., and Martin, P. R. (2005).** Effect of roasting on the formation of chlorogenic acid lactones in coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **53**, 1505–1513.

17. **Farah, A., Monteiro, M.C., Calado, V., Franca, A.S., and Trugo, L.C. (2006b).** Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee. *Food Chemistry*. **98**, 373–380.

18. **Friedman, M., Henika, P. R. and Mandrell, R. E. (2002).** Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni, Escherichia coli, Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *Journal of Food Protection* **65**, 1545–1560.

19. **Furuhata, K., Dogasaki, C., Hara, M. and Fukuyama, M. (2002).** Inactivation of Legionella pneumophila by phenol compounds contained in coffee. *Journal of Antibacterial and Antifungical Agents*. **30**, 291–297.

20. **Ghanwate, N. A. and Thakare, P. (2012).** Antimicrobial and synergistic activity of ingredients of belet quid on oral and enteric pathogens. Bioscience Discovery, 3(1):47-51, Jan. 2012

21. **Gill, A. O. and Holley, R. A. (2006).** Disruption of *Escherichia coli, Listeria monocytogenes and Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. *International Journal of Food Microbiology* **108**, 1–9.

22. **Goni, P., Lopez, P., Sanchez, C., Gomez-Lus, R., Becerril, R., and Nerin, C. (2009).** Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. *Food Chemistry*, **116**, 982–989.

23. **Hoque, M. M., Bari, M. L., Juneja, V. K. and Kawamoto, S. (2008).** Antimicrobial activity of cloves and cinnamon extracts against food borne pathogens and spoilage bacteria, and inactivation of *Listeria monocytogenes* in ground meat with their essential oils. Rep. Natl. Food Research Institute, **72**: 9-21.

24. **Johnston, K.L., Clifford, M.N. and Morgan, L.M. (2003).** Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: Glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine. *American Journal of Clinical Nutrition*. **78**, 728–733.

25. **Kendrick, S.F.W. and Day, C.P. (2007).** A coffee with your brandy, Sir. *Journal of Hepatology*. **46**, 980–982.

26. **Knight, K. P., and McKellar, R. C. (2007).** Influence of cinnamon and clove essential oils on the D- and Z-values of Escherichia coli O157:H7 in apple cider. *Journal of Food Protection*. 70(9), 2089–2094.

27. **Kubo, I., Himejima, M. and Muroi, H. (1991).** Antimicrobial activity of flavor components of cardamom *Elettaria cardamomum* (Zingiberaceae) seed. *Journal of Agriculure Food Chemestry*. **39** , 1984–1986.

28. **Mahady, P.S., Stoia, H.F., Fabricant, D.B. and Chadwick, L.R. (2005).** In vitro susceptibility of *Helicobacter pylori* to botanical extracts used traditionally for the treatment of gastrointestinal disorders. *Phytotherapy Research.* **19**, 988–991.

29. **Miyazawa, M. and Hisama, M., (2001).** Suppression of chemical mutageninduced SOS response by alkylphenols from clove (Syzygium aromaticum) in the *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 umu test. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 4019–4025.

30. **Nanasombat, S. and Lohasupthawee, P. (2005).** Antibacterial activity of crude ethanol extracts and essential oils of spices against salmonellae and other enterobactrria. KMITL Science technology Journal. **5** (3): 527-537.

31. **Nikaido H, Vaara M. (1985).** Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. Microbiology Review, 49:1–32.

32. **Ohshima, T., Miyakawa, Y., Watanabe, T. and Ohyama, K. (2003).** Effect of amphotericin B dilution with various beverages on the survival of Candida albicans cells. *Kansenshogaku Zasshi.* 77, 29–33.

33. **Omidbeygi, M., Barzegar, M., Hamidi, Z. and Naghdibadi, H. (2007).** Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus xavus* in liquid medium and tomato paste. *Food Control.* **18,** 1518–1523.

34. **Pandey, A. and Singh, P. (2011).** Antibacterial activity of *Syzygium aromaticum* (clove) with metal ion effect against food borne pathogens. Asian Journal of Plant Science and Research, **1** (2):69-80

35. **Plesiat P, Nikaido H. (1992).** Outer membranes of gram-negative bacteria are Permeable to steroid probes. Molecular Microbiology, 6:1323–33.

36. **Ravindran, M.K. (Ed.). (2002).** Cardamom: the genus Elettaria. New York: Taylor and Francis.

37. **Rosengren, A., Dotevall, A., Wilhelmsen, L., Thelle, D. and Johansson, S. (2004).** Coffee and incidence of diabetes in Swedish women: A

prospective 18-year follow-up study. *Journal of Internal Medicine.* **255**, 89–95.

38. **Schillinger, U. and Lucke, F.K. (1989).** Antibacterial activity of *Lactobacillus* sake isolated from meat. *Applied. Environmental. Microbiology.* **55**, 1901-1906.

39. Shukri, R., Mohamed, S. and Mustapha, N.M. (2010) Cloves protect the heart, liver and lens of diabetic rats. *Food Chemistry.* **122**, 1116–1121.

40. **Sofia, P.K., Prasad, R., Vijay, V.K., and Srivastava, A.K. (2007).** Evaluation of antibacterial activity of Indian spices against common food borne pathogens. *International Journal of Food Science and Technology.* **42**, 910–915.

41. **Suganthi, R., Rajamani, S., Ravichandran, M. K, and Anuradha, C.V. (2007).** Effect of food seasoning spices mixture on biomarkers of oxidative stress in tissues of fructose-fed insulin-resistant rats. *Journal Medicinal Food.* **10**, 149–153.

42. **Walsh, S. E., Maillard, J. Y., Russell, A. D., Catrenich, C. E., Charbonneau, D. L. and Bartolo, R.G. (2003).** Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and negative bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 94, 240–247.

EFFECT OF ARABIC COFFEE AND ITS ADDITIVES (*ELETTARIA AND DIANTHUS*) EXTRACTS AS ANTIBACTERIAL AGENTS ON SOME FOOD PATHOGENIC MICROORGANISMS

Al- Otaibi, M. M. and Saleh, F. A.

Food and Nutrition Sciences Dep. College of Agricultural and Food Science, King Faisal University, Saudi Arabia.

E. mail: Mutlag@kfu.edu.sa

ABSTRACT

In this study, the water soluble, alcoholic and ether extracts of the Arabic coffee and its constituents (*Elettaria and Dianthus*) as antibacterial agents on some pathogenic bacteria (*Staphylococcus aureus, Salmonella enteric and Listeria monocytogenes*) had been studied. It was found that the alcoholic and ether extracts of *Dianthus* exhibited a higher effect as growth inhibitors on *Salmonella enteric and Listeria monocytogenes*. While, the water soluble extract of *Dianthus* exhibited a higher effect as inhibitor on the growth of *Staphylococcus aureus*. Also, it was found that the alcoholic extract of the *Elettaria* had a strong effect against *Listeria monocytogenes* growth. On the other hand, it was found that only the water soluble coffee extract had a significant effect against *Salmonella enteric* growth. In another section of the study, effect of the smallest concentrations of these constituents that may inhibit the growth of pathogenic microorganisms had been studied. It was found that *Listeria monocytogenes* had very high sensitivity to very low concentrations (0.5mg/ml) for both the ether extract of *Elettaria* and the alcoholic extract of *Dianthus*. While, it was found that *Staphylococcus aureus* had the same sensitivity for both the ether extracts of *Elettaria and Dianthus*. However, it was found that Gram (-) bacteria was twice more sensitive than the Gram (+) bacteria from the coffee water soluble extract. In the last section of the study, 10 different combinations from the Arabic coffee and its constituents and their effect on the *Staphylococcus aureus*

growth were studied. It was found that the combinations which were formed from 29.4 coffee, 3.4 *Elettaria and 0.8 Dianthus* (g/L) and from 18.5 coffee, 2 Elettaria and 0.9 Dianthus (g/L) had the highest effect on the *Staphylococcus aureus* growth compared to all other combinations as good inhibitors. Therefore, use these combinations during the Arabic coffee preparation to have the highest effect against the pathogenic microorganism's growth is recommended.