الفعالية الحيوية لمركب الأزادرختين والمستخلص الهكساني لثمار نبات السبحبح *Melia azedarach* ضد بعض العزلات البكتيرية

ثائر عبد القادر صالح   مثنى حامد حسن

قسم علوم الحياة– كلية العلوم – جامعة الانبار

معلومات البحث:

تاريخ التسليم: 2007/4/15
تاريخ القبول: 2007/9/7
تاريخ النشر: 06/14 / 2012
DOI: 10.37652/juaps.2007.15333

الكلمات المفتاحية:

فعالية حيوية ،
الأزادرختين ،
نبات السبحبح ،
العزلات البكتيرية.

الخلاصة:

تم دراسة فعالية مركب الأزادرختين بعد فصله من مسحوق ثمار السبحبح وتنقيته وتشخيصه بوساطة IR, CC,TLC ضد بعض العزلات البكتيريا المرضية وهي *Staphylococcus aureus* و *Proteus* و *Pseudomonas aeruginosa* و *Escherichia coli* وقد أثبت هذا المركب فاعليته العالية في التأثير ضد هذه العزلات البكتيريا وتثبيط نموها والتي كان قطر تثبيطها 23، 18، 17، 22 ملم في التركيز 50 ملغم/مل على التوالي، كما تم دراسة فاعلية المستخلص الهكساني لثمار السبحبح لغرض أثبات فاعليته الجيدة ضد نفس العزلات البكتيريا ولكن بنسب متفاوتة بينها وبين مستخلص مركب الأزادرختين حيث بلغت أقطار التثبيط 13، 19، 21، 12 ملم في التركيز 50 ملغم/مل على التوالي.

المقدمة

كانت المركبات الثانوية ذات أهمية خاصة للإنسان في مكافحة الآفات لزمن طويل حيث تم استخدام أجزاء نباتية مختلفة شملت الإزهار والأوراق والثمار والبذور لبعض النباتات الحاوية على مركبات سامة أو قاتلة أو طاردة (1). أ

عتمد الطب قديمه وحديثه على النباتات الطبية الطبيعية منها والمستزرعة والتي أستخدمت للعلاج قبل أكتشاف معظم العلاجات الحديثة كالمضادات الحيوية والهرمونات المستعملة حالياً في الطب الحديث (2)،

ولقد كانت الحاجة إلى تحضير الأدوية وأستعمالها لحالات مرضية في الواقع وراء البحث عن الأجزاء المختلفة للنبات وطرق تحضيرها ومعرفة خصائصها الطبية ومفعولها، لذلك نجد في الآثار البابلية والمصرية ما يدل بوضوح على معرفتهم الدقيقة بالأدوية حيث وردت على هيئة وصفات طبية لعلاج ما عرفوه من الأمراض،

ففي الألواح الطبية الخاصة بالتشخيص والعلاج نجد ثلاثة أعمدة، حيث تظهر في العمود الأول أسم النبات وفي العمود الثاني يذكر أسم المرض الذي يُعالج بذلك العشب وفي العمود الثالث تذكر الكميات والإرشادات (3). وقد أتجه البحث العلمي في الوقت الحاضر لعلاج الكثير من الأمراض المختلفة بأستعمال العقارات من أصل نباتي، لأن الكثير من المواد والمركبات المتكونة صناعياً والمُنتجة مختبرياً ذات

* Corresponding author at: Department of Life Sciences - College of Science - University of Anbar, Iraq;
E-mail address:

فاعلية عالية ضد الكثير من الأمراض مع رخص ثمنها وكثرة إنتاجها ألا أنها ذات أثار جانبية خطيرة مما جعلت الدول المتقدمة صناعياً اللجوء إلى النباتات الطبية والعطرية لأستخدامها في علاج الأمراض المختلفة (4). ومن المركبات الثانوية المهمة الموجودة في العائلة الزنزلختية Meliceae هو مركب الأزادرختين Azadirachtin الموجود في ثمار شجرة السبحبح وشجرة النيم والذي يعود إلى مجموعة Limonoids وهي مركبات تربينية والذي يكون ذا صيغة جزيئية Dihydroazadirachtin 22,23 ($C_{35}H_{46}O_{16}$)، أن الأزدارختين من أهم المكونات الفعالة الموجودة في هذه العائلة ، فقد تمكن الباحثون من عزله وتنقيته وتشخيصه ، إضافة إلى مكونات فعالة أخرى مثل السالانينات Salanins (5،6) .

جاءت هذه الدراسة لتجربة فعالية مركب الأزادرختين والمستخلص الهكساني لثمارالسبحبح ضد بعض العزلات البكتيرية المرضية ومعرفة تأثيرها ومن بين هذه العزلات هي:

Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Proteus

المواد وطرائق العمل

تم جمع النموذج النباتي لثمار السبحبح *Melia azedarach* من كلية الزراعة /جامعة بغداد خلال شهر تشرين الأول عام 2004 بعد تشخيصها من قبل قسم علوم الحياة / كلية العلوم/ جامعة بغداد وتجفيفها وطحنها وحفظها بدرجة 20 مْ ، وتم الحصول على العزلات البكتيرية المرضية من كلية العلوم / جامعة النهرين ولقد تم التأكد منها من خلال تشخيصها بواسطة الفحوصات المجهرية والكيموحيوية واعتمادا على المصادر العلمية المتبعة عالميا لتشخيص البكتيريا (7) . وقد شمل التشخيص الفحوصات الآتية: الفحص ألمجهري ، الصفات الزرعية ، فحص الحركة (8) . واختبار الكاتاليز ، اختبار الاوكسديز (7) . واختبار الاندول ، اختبار المثيل الأحمر ، اختبار فوكس بروسكاور ، اختبار استهلاك السترات ، اختبار اليوريا، اختبار اختزال النترات ، اختبارانزيم التجلط ، اختبار الجيلاتين ، اختبار تخمر السكريات(9) . أما بالنسبة لتحضير مستخلص مركب الأزادرختين من ثمار السبحبح فقد أتبعت طريقة العالم yamasakiوجماعته (10) في فصل مركب الأزادرختين ، ثم تم أخذ 1 غم من المستخلص الجاف وذوب في1مل من ألكحول الاثيلي(Ethanol) تركيز 99.5 وأكمل الحجم إلى 10مل ماء مقطر ومنه حضرت بقية التراكيز. ولغرض تحضير أطباق فحص الفعالية تم استخدام القاطع الفليني المعدني وبقطر 5 ملم لعمل حفر في الوسط الزرعي Muller Hinton agar وتم تلقيح الأطباق الحاوية على المولر هنتون بالبكتريا المعزولة وذلك بنشر عدد تقريبي من الخلايا 1.5×10^{-8} خلية / ملم وباستخدام ماكفرلاند لغرض المعايرة وبعد ذلك وضعت المستخلصات بالحفر بالتراكيز التالية(1.0ملغم\مل ،1ملغم\مل

، 10ملغم\مل ، 25 ملغم\مل ، 50 ملغم/مل) وحضنت بدرجة حرارة 37 مئوي لمدة 18 ساعة وتم قراءة النتائج بقياس قطر التثبيط بالمسطرة المدرجة (المنطقة الخالية من النمو الجرثومي)(11). ومن اجل الكشف عن مركب الأزادرختين الموجود في ثمارالسبحبح استخدمت تقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (Thin Layer Chromotography) (10).وذلك بقسمة المسافة التي يقطعها المركب على المسافة التي يقطعها المذيب لحساب قيمة R_f(12) ولغرض التأكد من تشخيص مركب الأزادرختين فقد تم أستخدام دراسة طيفية لهذا المركب بوساطة الأشعة تحت الحمراء Infra-Red Spectroscopy(IR)) .أما المستخلص الهكساني فقد تم تحضيره بوضع 200غم من مسحوق ثمار السبحبح في جهاز الأستخلاص Soxhlet Extractor ، وتم وضع لتر واحد من مذيب الهكسان وبنقاوة 99% والمجهز من قبل شركة Fluka ، بعدها تم تشغيل الجهاز لمدة ثماني ساعات وبدرجة حرارة 60مْ ، ثم ركز النموذج بواسطة جهاز المبخر الدوار التفريغي Rotary vacuum evaporator وبدرجة حرارة 45مْ ، ولغرض تحضير المحلول الأساس فقد تم وزن 1غم من المستخلص الزيتي الهكساني وأذابتها بـ1مل من الأيثانول تركيز 99% وإكمال الحجم إلى 10مل ماء مقطر ليكون التركيز 100ملغم/مل ومنه حضرت بقية التراكيز(13،10) .

النتائج والمناقشة

تشخيص البكتيريا

شخصت هذه العزلات بواسطة العديد من الاختبارات وباستخدام الأوساط الزرعية لملاحظة شكل النمو والصفات التمييزية وقد صنفت الى المجاميع التصنيفية حسب تصنيف Bergeys manual وتعود إلى ثلاثة مجاميع رئيسية حسب التصنيف العالمي للبكتيريا (14).

تشخيص مركب الأزادرختين

قد أظهر IR لنموذج المركب المفصول في ثمار السبحبح القمم الواضحة في المخطط البياني (1) حيث أن القمة العريضة عند 3460 cm^{-1} تعزى إلى أهتزاز أمتطاطي (Stretching Vibration) لمجاميع الـ O-H أما الحزمة القوية عند cm^{-1} 1740 فتنتج عن الأهتزاز الأمتطاطي لمجاميع الكاربونيل C=O وهناك حزم ضعيفة عند 1650 cm^{-1},1620 cm^{-1} والتي تمثل الأهتزازت المرنة لمجاميع C=C ، وهذه القمم تشابه كثيراً IR لمركب الأزادرختين القياسي (15). كما وأظهرت نتيجة TLC وجود بقعة واحدة مذنبة لونها أخضر مزرق ذات R_f = 0.568 وهذا يؤيد ما ذكره (10) بأن R_f لمركب الأزادرختين القياسي هو 0.56 كما في الصورة (1). R_f = المسافة التي تحركها المركب / المسافة التي تحركها نظام المذيب(12) .

إن مستخلص مركب الأزادرختين قد اظهر مجزئتين على صفيحة السليكا جل بعد فصلها بوساطة Column

chromatography واصطلح على تسميتهما بمجزئات A , B تبعاً لقيمة R_f حيث بلغت 0.568 ، 0.594 لهذه المكونات على التوالي ، وربما يعزى سبب تجزئة مركب الأزادرختين إلى أن المركب يتشكل من عدد من المركبات المتناظرة Isomeric compound ، وقد ذكر (16) أن مركب Azadirachtin يتكون من أربعة مجزئات سميت Azadirachtin A,B,C,D . أما(17) فقد وجد بأن هناك سبعة مركبات نظيرية للأزادرختين هي (A,B,C,D,E,F,G) عزلت من بذور نبات النيم .

الفعالية الحيوية لمركب الأزادرختين ضد البكتيريا

اظهر المركب فعالية حيوية جيدة ضد العزلات البكتيرية ، حيث لوحظ أن المركب له تأثير مثبط ولكل التراكيز ، ومن خلال الدراسة الحيوية لوحظ أن التركيز 0.1 ملغم/مل مثبط لجميع العزلات سواء كانت موجبة أم سالبة لصبغة كرام ، وبالمقارنة مع التأثير التثبيطي للمستخلص الهكساني لثمار السبحبح نلاحظ أن التركيز الأدنى غير مثبط لبعض العزلات البكتيرية ، ومن خلال النتائج لوحظ إن المركب أعطى أعلى تثبيط ضد *St. aureus* ففي التركيز الأعلى كان قطر التثبيط 23ملم و 22ملم للـ *E. coli* كما في جدول (2) والصورة (2) .

ومن هنا تأتي أهمية المركب في كونه يثبط نمو البكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام ، إن فعاليته تعود إلى كونها مركبات تربينية ذا صيغة جزيئية ($C_{35}H_{46}O_{16}$) والمعروفة بسميتها العالية(5،6) . أو ربما يعود إلى عدم قدرة غشاء البكتيريا لمنع دخول المستخلص إلى داخل البكتيريا وتثبيط فعاليتها بما يحويه المستخلص من مواد مثبطة ، في حين كان اقل تأثيرا في البكتيريا الموجبة لصبغة كرام حيث أن مقاومة العزلات البكتيرية للمركب الكيميائي ناتج عن وجود غلاف سميك يحيط بالخلية والتي تمنع المستخلص من الدخول للخلية أو حدوث طفرة في جين معين يؤدي لإنتاج أنزيم يسبب المقاومة(18)

الفعالية الحيوية للمستخلص الهكساني

تم حصول على المستخلص الهكساني لثمار السبحبح وقد حضر بتركيز 100ملغم/مل ومنه حضرت بقية التراكيز والتي تمثلت بـ 1.0ملغم /مل ، 1 ملغم /مل ، 10ملغم /مل ، 25 ملغم /مل ، 50 ملغم / مل وبصورة عامة فان الفعالية ضد البكتيرية للمستخلص اعتمدت على نوع الكائن المجهري ، نوع المستخلص ومقدار التركيز المستخدم. لوحظ من خلال النتائج إن المستخلص الهكساني أعطى تأثيرا تثبيطيا جيدا ضد البكتيريا المعزولة وخاصة السالبة لصبغة كرام منها حيث أعطى أعلى تثبيط ضد الزوائف الزنجارية ففي التركيز الأعلى كان قطر التثبيط 21 ملمتر ، 18ملمتر في التركيز 25ملغم /مل و 14ملمتر في التركيز 10ملغم /مل كما في جدول (3) ولقد ثبت من خلال الدراسة بان المستخلص الهكساني ذو فعالية جيدة وان قدرة المستخلص الهكساني على التأثير الحيوي تعود الفعالية التثبيطية للمستخلص الهكساني إلى

وجود المركبات الستيرويدية والتي تمتلك فعالية ضد الميكروبات (19) .

المصادر

[1] قريشي، م. سعيد. (1990). المكافحة الكيميوحيوية وتأثيراتها على الاقتصاد والبيئة والانتخاب الطبيعي. (ترجمة) هاني جهاد العطار. مطبعة جامعة الموصل. 363 صفحة.

[2] درويش، مصطفى. (1984). موجز علم العقاقير الطبية لطلاب معاهد المهن الصحية العالمية في العراق. المكتبة الوطنية. بغداد.

[3] خليل، ياسين. (1979). الطب والصيدلة عند العرب. مطبعة جامعة بغداد.

[4] الشحات، نصر أبو زيد. (2000). النباتات والأعشاب الطبية. الدار البحار للنشر والتوزيع. بيروت.

[5] Broughton, H.B.; Jones. P.S. Ley, S.V.; Morgan, E.D.; Slawin, A.M.Z. and Willimes, D.J. (1986). The chemical structure of azadirachtin. proc. 3rd .Int. Neem Conf., Nairobi. H.Schmutterer and K.R.S. Ascer, (eds).pp103-110.

[6] NIST, (1998). National Institute Of Standerds Technology, Mass Spectrometry Data Base Center 1A, USA.

[7] Baron, E.J; and Finegold, S.M. and Baily Scott. (1990). Diagnostic Microbiology; C.V mosby company Toronto.

[8]Cruickshank, R. Daguid, j,marmion and Swain ,R.(1975). Medical microbiology 12ed churrchill living stone London.

[9] جادالله. نزار فؤاد، العزام عقاب، الشاعر. عبد المجيد، المنسي عرسان (1994) الأحياء الدقيقة العملية. سلسلة الطرائق الأساسية، عمان.

[10] Yamasaki, R.B.; Kloke, J.A.; Lee, S.M.; Stone, G.A. and Darlington, M.V. (1986). Isolation and purification of azadirachtin from neem (*Azadirachta indica*) seeds using flash chromatography and high – performance liquid chromatograph.J.Chromatog. 356: 220-226.

[11] Egorov, N.S.(1985)Antibiotics scientific approach mir publisher ,Moscow.

[12] Harbone, J. B. (1984): Phytochemical methods A Guid to modern techniques of plant analysis. Chapman & Hall. New York.

[13] Valladares, G.M.T. Defago, S. Palacios, and M.C. Carpinella. (1997). Laboratory evaluation of *Melia azedarach* L. (Meliaceae) extracts against the elm leaf beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). J.Econ. Entomol. 90(3):747-750.

[14] Hoit, J.H., Krieg, N. R.sneath, P.H.A., staleg, J.T., and Williams, S.T. (1994). Bergeys manual of determinative bacteriology9th .ed U.S.A.

[15] Butterworth, J.H. and Morgan, E.D. (1971). Investigation of the locust feeding inhibition of the seed of the neem tree *Azadirachta indica*. J. Insect physiol. 17:969 -977.

[16] Chandler, L.D.(1988). Insect growth regulators and plant extracts for control of leafminer .Journal Rio Grande Valley Horticulture Society 39: 75-78.

[17] Rembold, H. (1989).Azadirachtins: their structure and mode of action. In: Insecticides of plant origin, ACS symp.ser.387 (eds.Arnason, J.T., philogene, B.J.R. and Morand,P.) pp.:150-163. American chemical society, Washington, DC.

[18] صالح .ضحى سعد (لجنه من تدريسي قسم علوم الحياة) (1991) علم الأحياء المجهرية .دار الحكمة. جامعه بغداد العراق ص391.

[19] Wolters, B. (1976). Serial experiments on transformation and degradation of secondary plant substances by microorganisms. Plant Medica, 29:41-53.

جدول (1) نتائج الاختبارات الكيمو حيوية للعزلات البكتيرية المرضية

Isolates bacteria	*Staphylococcus aureus*
Gram stain	+
catalase	+
Oxidase	-
I	-
M	-
V	-
C	+
Urease	+
Gelatin	+
Nitrate reduction	+

جدول (2) التأثير التثبيطي لمركب الازاردختين ضد العزلات البكتيرية

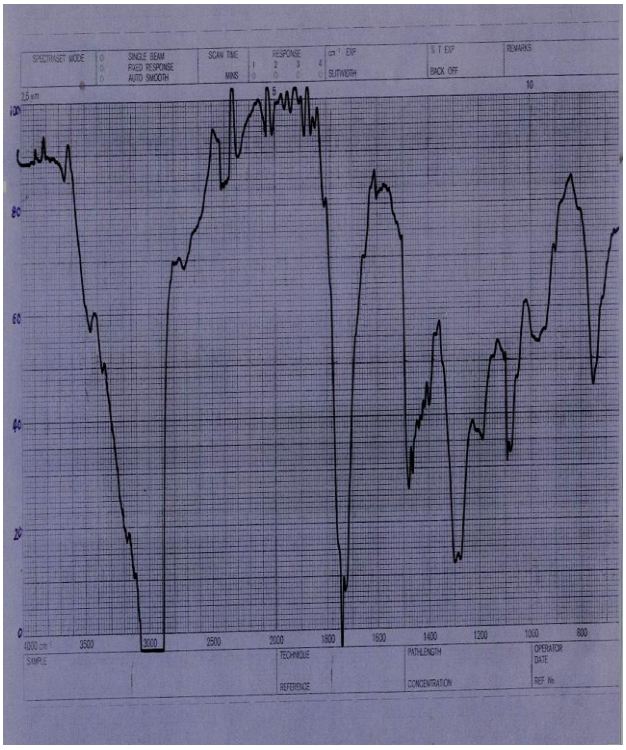
تركيز المستخلص	*Staphylococcus*	*Pseudomonas*	*Proteus*	*E coli*
50 mg/ml	23	17	18	22
25 mg/ml	19	15	16	17
10 mg/ml	15	13	14	14
1 mg/m	13	10	11	12
0.1 mg/ml	11	7	7	10

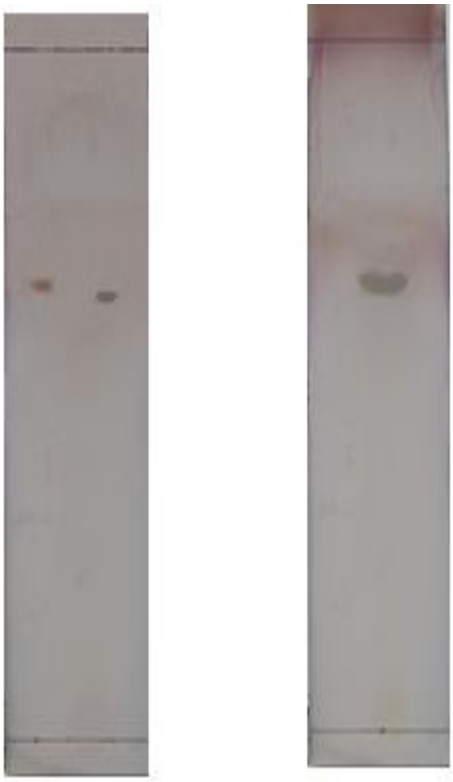
جدول (3) التأثير التثبيطي للمستخلص الهكساني لثمار لنبات السبحبح ضد نمو العزلات البكتيرية

Pseudomonas aeruginosa	*E. coli*	*Proteus ssp*
-	-	-
+	+	+
+	-	-
-	+	+
-	+	+
-	-	+
+	-	-
+	-	+
+	-	+
+	+	+

تركيز المستخلص	*Staphylococcus*	*Pseudomonas*	*Proteus*	*E coli*
50mg/ml	13	21	19	12
25mg/ml	11	18	15	10
10mg/ml	9	14	12	9
1mg/ml	-	12	10	-
0.1mg/ml	-	7	7	-

مخطط بياني (1) يوضح مركب الأزادرختين المشخص بوساطة الأشعة تحت الحمراء IR

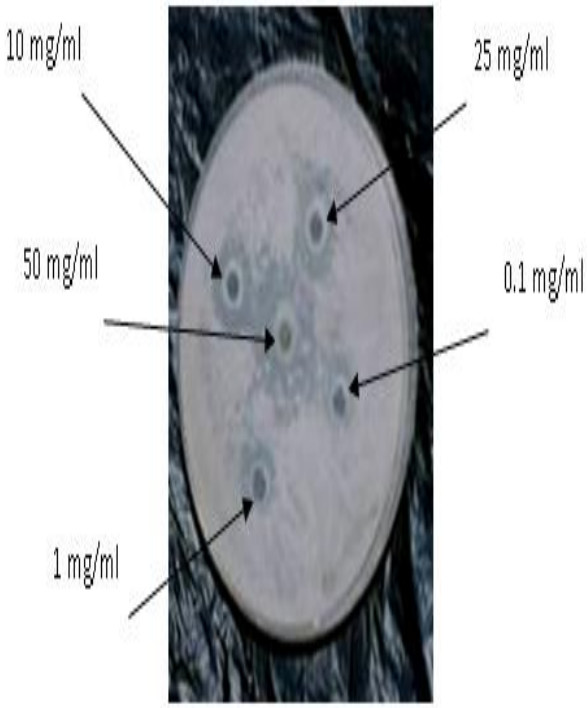




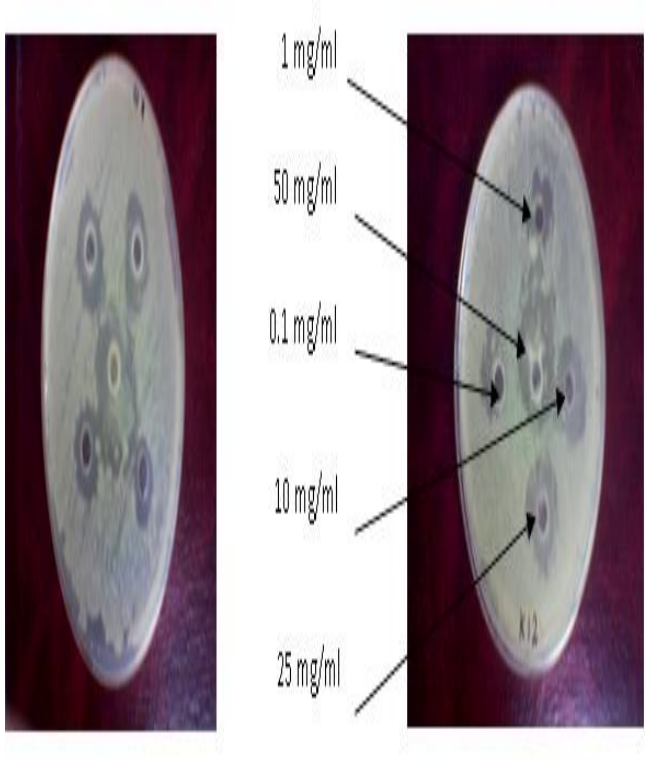
(ب) (ا)

صورة (1) يوضح فصل مركب الأزادرختين بوساطة TLC

(أ) مركب الأزادرختين (ب) مجزئات مركب الأزادرختين



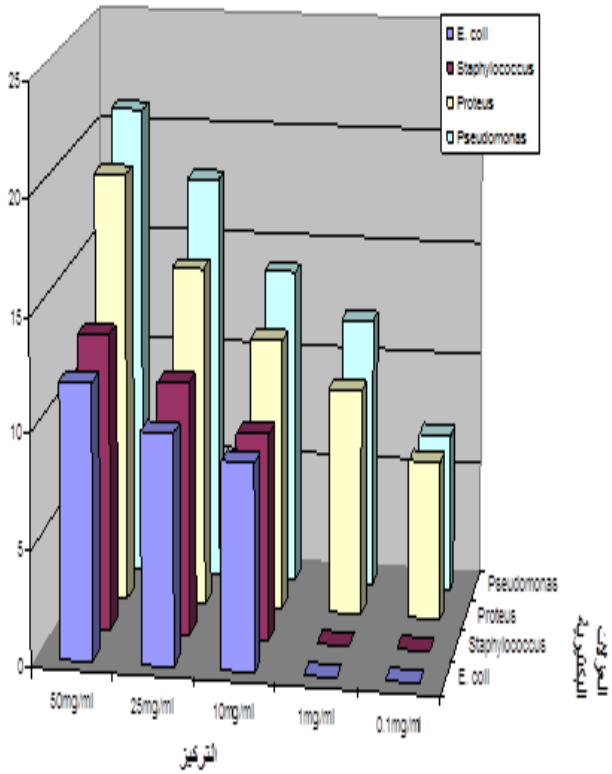
صورة (2)التأثير التثبيطي لمستخلص مركب الأزادرختين لثمار السبحبح ضد بكتيريا *St. aureus*

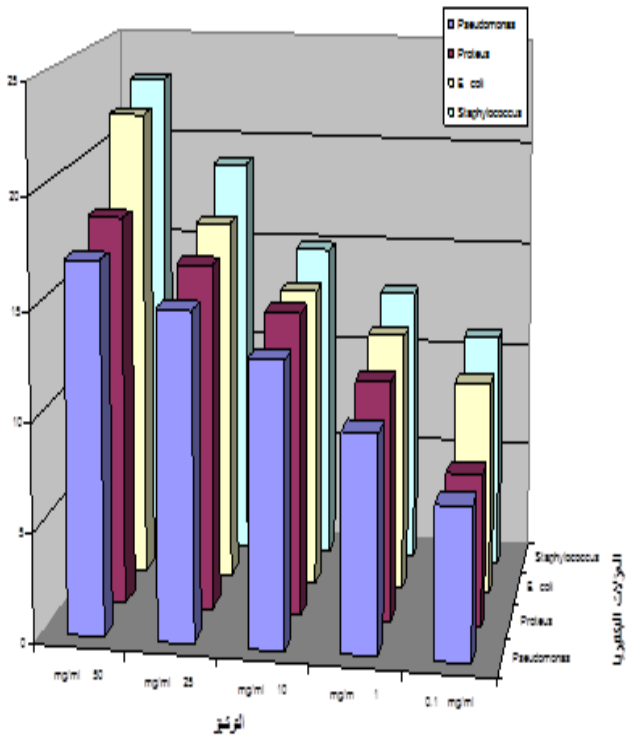


صورة (3) التأثير التثبيطي للمستخلص الهكساني لثمار السبجبح ضد بكتيريا(1)***Proteus***،(2) ***Pseudomonas***

شكل(١) يوضح التأثير التثبيطي لمستخلص مركب الأزاركتين ضد العزلة البكتيريا St. arues

شكل(٢) يوضح التأثير التثبيطي للمستخلص الهكساني لثمار السبجبح ضد انواع من بعض العزلات البكتيرية





BIOLOGICAL ACTIVITY OF AZADIRACHTIN COMPOUND AND HEXANE EXTRACT OF MELIA AZEDARACH FRUITS AGAINST SOME BACTERIAL ISOLATIONS

THAER ABDUL KADER AND MUTHNA HAMID

ABSTRACT:

An activity of azadirachtin compound after separating it from *Melia azedarach* fruits powder and purification as well as diagnosing it by IR,CC,TLC, against some pathogenic bacterial isolations which are *Staphylococcus aureus , Proteus , Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli ,* has been studied .This compound has proved its high activity to influence against these bacterial isolations and inhibated the diameter of inhibation it was 23,18,17,22mm with concentration 50mg/ml respectively . An activity of hexane extract of *Melia azedarach* fruits powder also has been studied to prove its good activity against same bacterial isolations but in diverse rates between it and azadirachtin compound extract since diameters of inhibition zone have reached 13,19,21,12 mm with concentration 50 mg/ml respectively .