التأثير البايولوجي للمستخلص الاسيتوني لعفص البلوط والشاي الأحمر في بعض أنواع الجراثيم المرضية مقارنة لعدد من المضادات الحيوية

إبراهيم طلال داؤد عامرة علي احمد سرى إبراهيم خضر
قسم العلوم الطبية الأساسية / كلية التمريض
جامعة الموصل

الاستلام القبول
٢٠٠٧ / 07 / 05 ٢٠٠٧ / 11 / 05

Abstract

The antibacterial activates of *Quercus infectoria* and *Hibiscus sabdariffa* extract were screened against *Yersinia enterocolitica*, *Brucella melitensis*, *Listeria monocytogenes* .

Nutgalls of Quercus infectoria and calyces of Hibiscus sabdriffa were extracted in acetone using a Soxhlet apparatus. Extract of the plants showed high antibacterial activates on all types of bacteria tested using well diffusion method.

The study also detecte the antibacterial effect to of some antibiotics using the disc diffusion method, The two extracts showed agood effect on *Yersinia enterocolitica*, the inhibition zone of nutgalls extract aganist this bacteria was (28)mm using the concentration (200) mg/cm^3 which was greater than cephalexin, while the inhibition zone of Hibiscus sabdariffa extract was (20)mm using the same concentration which was greater than chloramphenicol.

الخلاصة

أجريت هذه الدراسة لغرض اختبار الفعالية البايولوجية لمستخلصي عفص ال بلوط *Quercus infectoria* والشاي الأحمر *Hibiscus sabdariffa* في ثلاثة أنواع من الجراثيم الممرضة *Yersinia enterocolitica*، *Brucella melitensis*، *Listeria*

monocytogenes . وقد تم استخدام الـ Soxhlet في عملية استخلاص المركبات الفعالة من نبات عفص البلوط و الكؤوس الزهر ية للشاي الأحمر باستخدام الأسيتون مذيب اً، أظهرت مستخلصات النباتين المذكورين فعالية تثبيطية جيدة في جميع الجراثيم المدروسة باستخدام طريقة الانتشار بالحفر كما تم اختبار حساسية هذه الجراثيم لعدد من المضادات الحيوية التجارية باستخدام طريقة الانتشار بالأقراص إذ كانت جراثيم الـ *Yersinia* الأكثر حساسية لكلا المستخلصين من بين أنواع الجراثيم إذ بلغ قطر التثبيط للمستخلص عفص البلوط عند التركيز 200 ملغم/سم^{3} (28 ملم) هو أعلى من قطر تثبيط مضاد الـ Cephalexin إذ بلغ قطر التثبيط لمستخلص الشاي الأحمر عند التركيز 200 ملغم/سم^{3} (20 ملم) وهو أعلى من قطر تثبيط مضاد chloramphenicol .

المقدمة

إن الاستخدام المفرط والمتكرر للمضادات الحيوية المستعملة في معالجة الإصابات الجرثومية سبب زيادة في المقاومة المتعددة لها مما دفع الباحثين للتحري والبحث عن مركبات مضادة للجراثيم من مصادر طبيعية إلا وهي النباتات (2،1). يعد نبات عفص البلوط Nutgalls of *Quercus infectoria* من النباتات المهمة إذ يحتوي على العديد من المواد ذات الفعالية البايولوجية أيضاً منها Tannic acid (50-70%)، gallic acid (2-3%)، ellagic acid (2%)، فضلاً عن الكلوكوز والنشا (3).

يستخدم عفص البلوط مع عدد من النباتات بوصفه دواءً لما بعد الولادة وذلك للحفاظ على مرونة جدار الرحم، كما يستخدم مضاداً لداء السكري ومضاد اً فايروسياً ومضاداً بكتيرياً ومضاداً للفطريات وطارداً للديدان ومضاداً للالتهابات anti-inflammatory (4) .

أما نبات الشاي الأحمر *Hibiscus sabdariffa* فهو من النباتات التي تحتل مكانة مهمة في المجال الطبي ، ينتمي هذا النبات إلى العائلة الخبازية Malvaceae وتكمن أهميته في كؤوسه الزهرية Galyces التي تحتوي على العديد من المركبات والمواد ذات الفعالية البايولوجية منها Protocatechuic acid و Gossypetin و Glucoside و Bibiscin و Anthocynin التي قد تمتلك تأثيرات مدررة وتقلل من لزوجة الدم، يمتلك هذا النبات فعالية في خفض ضغط الدم وله تأثيرات محفزة للأمعاء (5)، وتستخدم كؤوس هـ لمعالجة العديد من الأمراض إذ أظهرت فعالية في معالجة السفلس Syphilis مع منقوع جذور الحناء المغلي وكذلك أظهرت هذه الكؤوس فعالية في معالجة التهاب الكبد الفايروسي (6،7).

المواد وطرائق البحث

الأنواع الجرثومية المستخدمة في البحث:

Listeria monocytogenes ، ***Brucella melitensis*** ، ***Yersinia enterocolitica***

تم الحصول على هذه الأنواع من قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة الموصل وقد تم التأكد من نقاوة كل عزلة بإعادة زرعها على الأوساط الخاصة بكل نوع وإجراء الاختبارات الشكلية والكيموحيوية للتأكد من تبعية كل نوع (8) .

جمع وتصنيف النبات : تم جمع النباتات المستخدمة في هذه الدراسة من الأسواق المحلية وهي مجففة وتم التأكد من صنف النبات في قسم علوم الحياة إذ تم تنظيف وغسل الأجزاء المستخدمة من النبات بالماء المقطر وجففت في الظل وحفظت في ظروف خالية من الرطوبة لحين البدء بعملية الاستخلاص.

تحضير المستخلص الاسيتوني لنباتي عفص البلوط والشاي الأحمر : حضرت المستخلصات باستخدام جهاز الاستخلاص المستمر وذلك بوضع 40-50 غم من كل نموذج مسحوق (الكؤوس الزهرية لنبات الشاي الأحمر وعفص البلوط) في الجهاز وباستخدام 500 سم^3 من الأسيتون بوصفه مذيبلً وبمعدل (10) ساعات استخلاص يومياً إلى أن يصبح المذيب المستخدم رائقاً عديم اللون، بعدها تم ت إزالة المذيب باستخدام جهاز المبخر الدوار Rotary vaccume evaporator وبدرجة حرارة لا تزيد عن (50) م^o ثم تم تجفيد المستخلص الناتج بالتبريد باستخدام جهاز Lypholyzer وحفظه لحين البدء بالاختبار (9).

ولغرض إجراء اختبارات التثبيط اخذ (1) غم من المستخلص الاسيتوني لكلا النباتين وتم إذابته في 5 سم^3 من مادة Dimethyl sulfoxide (DMSO) وبذلك يكون لدينا مستخلص بتركيز 200 ملغم/سم^3 بوصفه تركيزاً قياسياً لتحضير التراكيز اللاحقة 100، 50، 25، 12.5، 6.25 ، 3.125 ملغم/سم^3 من كلا المستخلصين.

اختبار الفعالية البايولوجية :

اختبار الحساسية (الانتشار بالحفر) : تم اختبار فعالية المستخلصات النباتية على الجراثيم قيد الدراسة باستخدام طريقة الحفر ، إذ تم نشر (0.1) سم^3 من المعلق الجرثومي على سطح أطباق حاوية للاكار المغذي (Nutrient Agar) بعدها تم عمل حفر باستخدام ثاقب فليني بقطر (6) ملم بواقع (7) حفر لكل طبق وتم ترقيم الحفر حسب التراكيز المستخدمة، بعدها مباشرة تم إضافة (0.1) سم^3 من كل تركيز من المستخلص للحفر حسب تسلسل الحفر والتراكيز المستخدمة (200، 100، 50، 25 ، 12.5، 6.25، 3.125) ملغم/سم^3 ثم حضنت الأطباق

بالحاضنة لمدة (18-24) ساعة وتم قياس أقطار التثبيط بعد انتهاء فترة التحضين إن وجدت (10).

اختبار الحساسية للمضادات الحيوية : اجري اختبار الحساسية لسبعة أنواع من المضادات الحيوية الجاهزة من شركة (Oxoid)، استخدمت الطريقة القياسية وهي طريقة الانتشار بالأقراصDisc Diffusion (11). اجري الاختبار على وسط مولر هنتون (Muller-Hinton Agar) المجهز من شركة (Oxoid)، حيث حضر معلق من الجراثيم الفتية في المحلول الملحي الفسيولوجي ، وتم مقارنته مع الأنبوب الأول من أنابيب ماكفرلاند القياسية الذي يعادل (10^8) خلية /سم^3 ، بعد ذلك غمرت مسحة قطنية معقمة في المعلق، ونشرت على وسط اكار مولر هنتون، تركت الأطباق بدرجة حرارة الغرفة لمدة (3-5) دقائق لتجف ولكي يحصل التشرب ، بعدها تم تثبيت أقراص المضادات الحيوية على سطح اكار مولر هنتون بوساطة ملقط معقم، ثم حضنت بدرجة حرارة (37)م$^\circ$، لمدة (18) ساعة. بعدها تم قياس قطر منطقة التثبيط.

النتائج والمناقشة

أظهرت النتائج أن لمستخلص نباتي عفص البلوط والشاي الأحمر تأثيراً تثبيطياً واضحاً في جميع أنواع الجراثيم قيد الدراسة إذ أظهرت جميعها حساسيةً وبنسب متفاوتة .

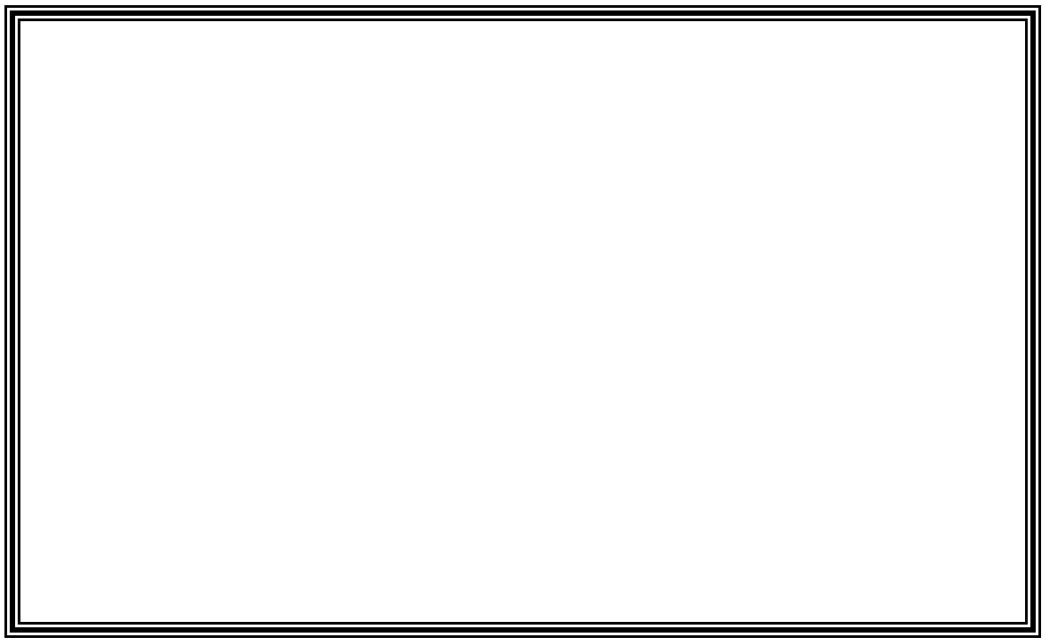
حيث يشير الجدول (1) إلى تأثير تراكيز مختلفة من المستخلص الاسيتوني لنبات عفص البلوط في الجراثيم ، إذ كانت جرثومة *Yersinia enterocolitica* الأكثر حساسية تجاه المستخلص (الصورة 1)، في حين كانت جرثومة *Listeria monocytogenes* الأقل حساسية وهذه النتائج تتفق مع ما توصل إليه (3) عند دراسته لعدد من مستخلصات عفص البلوط، كما اتفقت مع دراسة الباحثين Basri and Fan (4) حول تأثير المستخلص الاسيتوني لعفص البلوط في جرثومة *Salmonella typhimurium* السالبة لصبغة كرام، إذ تبين إن للمستخلص تأثيراً قاتلاً لهذه الجرثومة، كذلك اتفقت النتيجة مع الدراسة التي أجراها الباحث Voravuthikunchaiy في سنة 2006 (12) حول تأثير مستخلص عفص البلوط في نمو جرثومة *Helicobacter pylori* وهي من الجراثيم السالبة لصبغة كر ام، وتبين إن لها تأثيراً مضاداً على هذه الجرثومة وقد يعود سبب تأثير مستخلص عفص البلوط على هذه الجراثيم لاحتوائه على نسبة عالية من التانين Tannin والذي قد يكون هو المركب الفعال المسؤول عن الفعالية التثبيطية للجراثيم (4).

العزلات الجرثومية	تركيز المستخلص (ملغم/سم٣)	المضادات الحيوية

NA.	CF.	NT.	GM.	CL.	CP.	TE.	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200	
-	-	-	29	20	10	28	17	19	19	20	22	25	28	***Yer. enterocolitica***
25	20	21	16	25	-	18	-	12	14	15	20	25	27	***Br. melitensis***
19	15	-	20	21	-	-	-	10	13	16	19	21	25	***Lis. monocytogenes***

الجدول (1) : قطر دائرة التثبيط مقاساً بالملم لتراكيز مختلفة من المستخلص الاسيتوني لعفص البلوط على الجراثيم المدروسة مقارنة بالمضادات الحيوية.

- قطر القرص (6) ملم، – تشير إلى عدم وجود تأثير ، Tetracycline Te. 30µg/disk، Gentamicin GM. ،Cephalexin CL. 30µg/disk ،Chloramphenicol CP. 30µg/disk Nalidixic ، Cefizoxime CF. 30µg/disk ،Nitrofurantion NT. 300µg/disk ،10µg/disk acid NA. 30µg/disk



صورة رقم (1) : تأثير مستخلص الاسيتوني لعفص البلوط بتراكيز مختلفة في جرثومة *Yersinia enterocolitica* ، 1(200 ملغم / سم^3)،2 (100 ملغم / سم^3)،3 (50 ملغم / سم^3)، 4 (25 ملغم / سم^3) ،5 (12.5 ملغم/سم^3) ، 6(6.25 ملغم / سم^3) ،7(3.125 ملغم / سم^3).

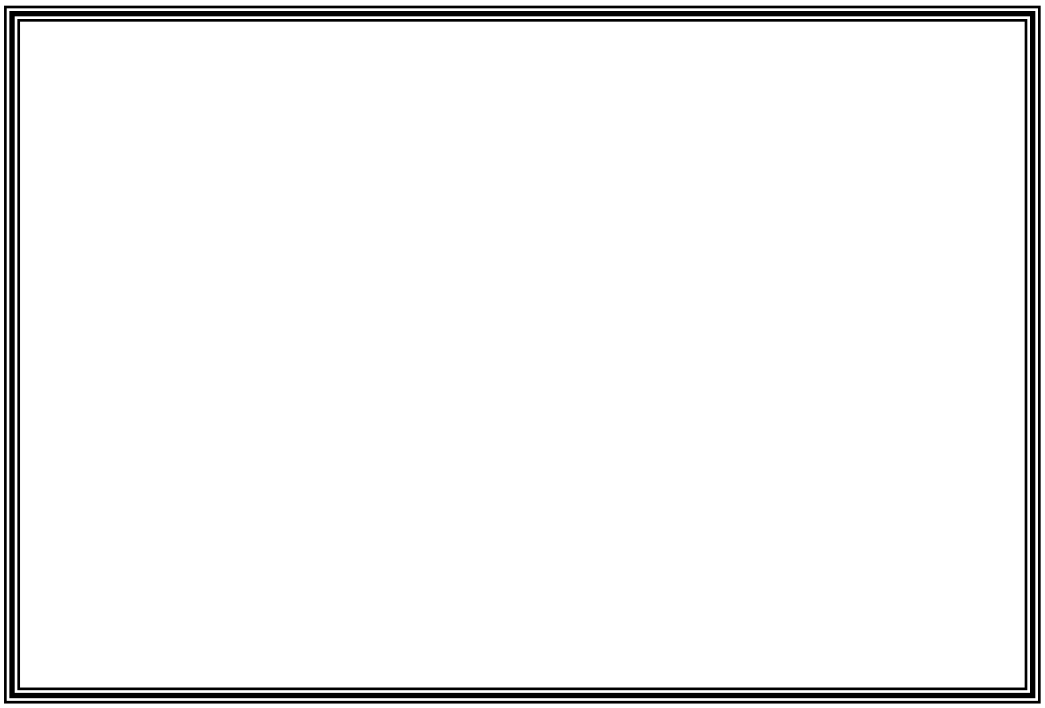
ويبين الجدول (2) تأثير تراكيز مختلفة من المستخلص الاسيتوني لنبات الشاي الأحمر في الجراثيم إذ يلاحظ إن جميعها كانت حساسة للمستخلص ولغاية التركيز 50 ملغم/سم^3 وأظهرت جرثومة *Yersinia enterocolitica* حساسية معتدلة تجاه المستخلص إذ بلغ قطر التثبيط 20 ملم عند التركيز 200 ملغم/سم^3 و (11) ملم عند التركيز 25 ملغم/سم^3 أعلى من قطر تثبيط مضاد Chloramphenicol (صورة -2-) وقد يعود سبب تأثير مستخلص الشاي الأحمر المضاد للجراثيم إلى احتواء كؤوسه الزهرية على الانثوسيانين Anthocyanins وهي

من الصبغات التابعة للفلافونيدات Flavonoides فضلاً عن احتوائه على عدد من الأحماض العضوية مثل حامض الماليك Malic acid وحامض الستريك Citric acid (13).

الجدول (2) : قطر دائرة التثبيط مقاساً بالملم لتراكيز مختلفة من المستخلص الاسيتوني لنبات الشاي الأحمر *Hibiscus sabdariffa* على الجراثيم المدروسة مقارنة بالمضادات الحيوية .

العزلات الجرثومية	تركيز المستخلص (ملغم/سم٣)							المضادات الحيوية						
	200	100	50	25	12.5	6.25	3.125	TE.	CP.	CL.	GM.	NT.	CF.	NA.
Yer. enterocolitica	20	16	14	11	-	-	-	28	10	20	29	-	-	-
Br. melitensis	18	15	13	-	-	-	-	18	-	25	16	21	20	25
Lis. monocytogenes	19	16	14	-	-	-	-	-	-	21	20	-	15	19

❖ قطر القرص (6) ملم، – تشير إلى عدم وجود تأثير ، Tetracycline Te. 30µg/disk، Gentamicin GM. ، Cephalexin CL. 30µg/disk ، Chloramphenicol CP. 30µg/disk 10µg/disk ، Nitrofurantion NT. 300µg/disk ، Cefizoxime CF. 30µg/disk، Nalidixic acid NA. 30µg/disk



صورة رقم (2) : تأثير مستخلص الاسيتوني للشاي الأحمر في جرثومة *Yersinia enterocolitica*.

يبين الجدول (1) أن جرثومة *Yersinia enterocolitica* أعطت حساسية للمضاد Cephalexin اقل من الحساسية التي أعطتها للمستخلص عفص البلوط إذ بلغ قطر التثبيط للمضاد (20) ملم في حين كانت للمستخلص (28) ملم عند التركيز (200) ملغم/سم^{3} في حين

بلغ قطر التثبيط للمضاد Tetracycline (28) ملم ولمستخلص عفص البلوط (17) ملم عند التركيز (3.125)، وأعطت مقاومة لمضادات Nitrofurantion, Cefizoxime, Nalidixic acid وهذه جاءت متفقة مع العديد من الدراسات (14).

إن تطور مقاومة المضادات الحيوية في الجراثيم عملية معقدة وفعالة جداً ومسؤولة عن العديد من المشاكل السريرية في معالجة الإصابات الجرثومية الموجودة اليوم ومن بين الآليات الوراثية المتعددة التي تسهم في مقاومة المضاد الحيوي هو التأثير في المورثات حيث إن الزيادة في عدد نسخ المورثات المقاومة للمضاد الحيوي يؤدي إلى زيادة في مستوى المقاومة وهذا ما أكدته الدراسة التي قام بها الباحث Edlund (15).

في حين أعطت جرثومة *Yersinia enterocolitica* حساسية للمضاد Chloramphenicol اقل من الحساسية التي أعطتها لمستخلص الشاي الأحمر حيث بلغ قطر التثبيط للمضاد (10) ملم في حين كانت للمستخلص (20) ملم عند التركيز (200) ملغم/سم^{3} جدول(2)، إن امتلاك الجراثيم آليات متعددة منها عدم نفاذية الغشاء الخارجي وحدوث تبدلات به فضلاً عن إنتاج أنزيمات محللة وحدوث طفرات يؤدي إلى زيادة مقاومة الجراثيم و من ثمة فمن الضروري استخدام مضادات محدودة التأثير للتقليل من انتشار السلالات المقاومة (16).

المصادر

1. Aliero, A. A. and A. J. Afolajan (2006). Antimicrobial activity of Solanum tomentosum. African. J. Biotech. 5(4): 369-372 .

2. Akinpelu, D. A. and T. M. Onakoya (2006). Antibacterial activities of medicinal plants used in folklore – remedies in South western. African. J. Biotech. 5(11) : 1078-1081.

3. Digrak, M.; I. Ahmet; M. H. Alma and S. Sen (1999). Antimicrobial activities of the extracts of various plant (Valex, Mimosa bark, gallnut powders, Salvia Sp. And phlomis sp.) Tr. J. Biology 23 : 241-248 .

4. Basri, D. F. and S. H. Fan (2005). The potential of aqueous and acetone extracts of galls of Quercus infectoria as antibacterial agents, Indian. J. pharmacol. 37(1): 26-29 .

5. Farombi, E. O. (2003). African in digenous plants with chemo therapeudtic potentials and biotechnological approach to the production of bioactive prophylactic agents. African. J. Biotech. 2(12): 662-671 .

6. Hussein, G.; H. Miyeshiro; N. Nakamura; M. Hattor, N. Kekiuchi and K. Shamotohono (2000). Inhibitary effects of Sudanese medicinal plant extracts of Hepatitis C Virus (HCV) protease. Phytother . Res. 14: 510-516 .

7. Nwinyi F. C., A. L. Binda, G. A. Ajoku, S. O. Aniacu, N. M. Enwerem, A. Orisadipe, D. Kubmarawa and K. S. Gamanid (2004). Evaluation of the aqueous extract of Boswellia dalzielli stembark for antimicrobial activities and gastro intestinal effects . African. J. Biotech. 3(5): 284-288 .

8. Prescott, L. M.; Harley, J. P. and Klein, D. A. (1999). Microbiology, 3rd ed., The Mcgraw-Hill comp. inc., USA .

9. Fabry, W.; P. O. Okemo and R. Ansong (1998). Antibacterial activity of East African medicinal plants. J. Ethnophamacol. 60: 79-84 .

10. Kudi, A. C.; Umoh, J. U.; Eduvie, L. O. and Gefu, J. (1999). Screening of some Nigerian medicinal plants for antibacterial activity . J. Ethnopharmacol. 67 : 225-228 .

11. Bauer, A.; W. A. M. Kirbay; J. S. Sherris and M. Turk (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single sisc method. Am. J. Clin. pathol. 45 : 493-496.

12. Voravuthikunchai, S. P.; L. Surasak and M. Hazel (2006). Effects of punica granatum pericarps and Quercus infectoria nutgalls of cell surface hydrophoticity and cell survival of *Helicobacter pylori*. J. Health. Sci. 52(2): 154-159 .

13. Omemu, A. M.; M. O. Edema; A. O. Atayese and A. O. Obaclina (2006). A survey of the microflora of Hibiscus subdariffa (Roselle) and the resulting "Zobo" juice, African. J. biotech, 5(3): 254-259 .

14. Ingo S., Peter H., and Berad W. (2000). Beta-Lactamase expression in yersinia enterocolitica biovars A, 1B and 3B.J.Med. Microbiol. 49:403-408 .

15. Edlund, T., Grund strom, T. and Normark S. (1979). Isolation and Characterization of DNA replications carrying the chromosomal B-Lactamase gene of *E.coli* mol. Gent. 173: 115-125 .

16. Lansing, P. M. John, H. P. and Donald K. A. (1996). Microbiology the Gran Hill comp. USA .