دراسة تأثير المستخلص الكحولي والمائي البارد لثمار واوراق نبات السدر *Ziziphus spina Christi* ضد البكتريا المعزولة من اصابات العيون (التهاب الملتحمة) خارج وداخل الجسم الحي

هالة عماد عبد الوهاب ***طالب عبد الله حسين****

استلام البحث 25، شباط، 2014
قبول النشر 4، ايار، 2014

الخلاصة :

نفذت الدراسة الحالية لمعرفة فعالية مستخلص ثمار واوراق السدر *Ziziphus spina Christi* في نمو وفعالية الانواع الآتية من البكتريا المرضية *(Pseudomonas aeruginosa, Streptococcus pyogenes, Staphylococcus aureus , Escherichia coli)* وأظهرت النتائج تفوق المستخلص الكحولي الايثانولي لثمارواوراق السدر المحضرة باستعمال جهاز السكسوليت وباضافة كحول الايثانول 95% تفوقا معنويا مقارنة بالمستخلص المائي المحضّر باستعمال الماء المقطر اذ كان تاثيره مثبطًا تجاه نمو وفعالية هذه الانواع . وبالنسبة للمعاملة داخل الجسم الحي باحداث اصابة بهذه الانواع المشخصة من البكتريا للفئران المختبرية وعلاجها باستعمال المستخلص الكحولي لاوراق السدر باعلى تركيز مثبط فأظهرت استجابة ايجابية للعلاج .

الكلمات المفتاحية : *Ziziphus spina christi* ، إلتهاب الملتحمة ، المستخلص الكحولي لأوراق نبات السدر

المقدمة :

يعود نبات السدر الشوكي *Ziziphus spina christi* الى *العائلة Rhamnaceae* وهو من النباتات التي توجد في المناطق الاستوائية وشبه الاستوائية ،موطنه الاصلي في شبه الجزيرة العربية وبلاد الشام ، وهو نبات شائك قديم يصل عمره الى 100 عام ويصل ارتفاعه من 2 الى 5 امتار او اكثر ، يتمايز هذا النبات بثماره الصغيرة ذات النوى وبلونه الاصفر او الاحمر حلو المذاق ، وتتمايز الثمار بكونها ذات قيمة غذائية ودوائية عالية وذلك لمحتواها العالي من فيتامين C ، سكريات وبروتينات .

يحتوي السدر على القلويدات وهي اهم مافي النبات من مواد دوائية تتكون نتيجة الفعاليات الايضية وتؤثر القلويدات في الانسان تاثيرات دوائية عظيمة فمنها المسكنات ، قاتلة او مثبطة لنمو الاحياء المجهرية ومضادات الطفيليات [1]. أما الصابونينات فتوجد بشكل كبير في هذا النبات واهم خواصها إنها مضادة للبكتريا [2] .

اما فائدة الثمار فلها دور بوصفها مضادة للأكسدة ولها تاثير فعال لمنع تلف الكبد بفعل البلهارزيا المعوية ، وعلاج مرض السكري وعلاج امراض الكبد والقلب ، اما اوراق النبات فلها فوائد كثيرة لعلاج قشرة الرأس وحالات التهاب الربو ومنع الامراض الرئوية والزحار وعلاج القروح وبوصفها مهدئاً للجهاز العصبي المركزي ، اما الدول الأفريقية فتستعمله علاجاً طبياً إذ استعمل لمعالجة التقرحات الهضمية التي تحدث في المعدة [3] كما استعملت الاوراق مبيداً طبيعياً ضد الفطريات التي تعيش في نبات الطماطم [4] .

والهدف من الدراسة هو:

1- عزل وتشخيص البكتريا المسببة لاصابات العيون والجروح .

2- اجراء فحص الحساسية للمستخلص الكحولي لاوراق السدر وتحديد (Minimum Inhibitory Concentration) (MIC) .

3- تحضير المستخلصين المائي البارد والكحولي لثمار واوراق نبات السدر ودراسة تأثيرها في انواع البكتريا المعزولة من اصابات العيون والجروح خارج الجسم الحي عن طريق إضافته بتراكيز معينة للأوساط الزرعية ، وداخل الجسم الحي عن طريق احداث الاصابة بالحيوانات وعلاجها باستعمال مرهم يحضر من المستخلص الكحولي .

المواد وطرائق العمل :

1- الأوساط الزرعية : تم تحضير الاوساط الزرعية المدرجة في الآتي بحسب تعليمات الشركة المجهزة ، وتم ضبط الاس الهيدروجيني لها على الرقم (7) وجرى تعقيمها وهذه الاوساط :-

- وسط اكار الدم Blood Agar (BA)
- وسط اكار المانيتول الملحي (MSA) Manittol Salt Agar
- وسط الماكونكي MaCconkey Agar (MA)

*جامعة بغداد ، كلية العلوم للبنات ، قسم علوم الحياة

2- **جمع العينات :**
تم الحصول على البكتريا من خلال جمع 50 عينة من مرضى مصابين بالتهاب الملتحمة البكتيري في مستشفى ابن الهيثم للعيون وتم تشخيص البكتريا باجراء مجموعة من الفحوصات الكيموحيوية [(اختبار انتاج الانزيم الحال (Hemolysin) و اختبار الكاتليز (Catalase Test) [5] , اختبار انتاج انزيم الاوكسيديز (Oxidase Test)
اختبار اليوريا (Urease Test) , النمو على وسط الماكونكي (MaCconkey agar) واختبار الاندول] [6].

3- تهيئة عينات ثمار واوراق نبات السدر :
تم الحصول على ثمار واوراق نبات السدر *Ziziphus spina christi* في شهر اذار 2013 من منطقة الجادرية في بغداد ، نظفت الاوراق والثمار من الاتربة العالقة بها ، ثم جففت بنشرها فوق قماش بدرجة حرارة الغرفة ، وبعد تجفيفه تم طحنه بهاون يدوي الى حين استخلاصه.

4- استخلاص اوراق وثمار نبات السدر :
A- **المستخلص الكحولي** : تم وزن 100 غرام من مسحوق الثمار والاوراق ووضعت في جهاز السكسوليت مع 750 مليلتر من الايثانول (95%) في درجة حرارة 60 م^0 لمدة 8 ساعات ثم رشّح وجفف المستخلص ووزن وحفظ في الثلاجة بدرجة 4 م الى حين الاستعمال اتبعت هذه الطريقة على وفق ما جاء في [7] .
B- **المستخلص المائي** : تم وزن 100 غرام من مسحوق الثمار والاوراق واذيب في 1 لتر من الماء المقطر وترك لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة الغرفة ، بعد ذلك رشح المستخلص باستعمال ورق ترشيح ثم نبذ الراشح بقوة 2500 دورة\ دقيقه لمدة 10دقائق بجهاز الطرد المركزي اخذ الرائق واهمل الراسب ثم جفف المستخلص ثم وزن ووضع في الثلاجة بدرجة 4 م ، اتبعت هذه الطريقة على وفق ماجاء في [7]. وتمت إذابة المستخلصين في مادة Dimethyle solfoxide (DMSO) عند دراسة فعاليته ضد البكتريا المستعملة .

5- الكشف عن المركبات الفعالة في مستخلص اوراق وثمار نبات السدر :
A - الكشف عن القلويدات وتم باستعمال كاشف دراكندروف حيث يتكون لون برتقالي عند معاملة المستخلص بالكاشف دلالة على وجود القلويدات .
B- الكشف عن الصابونينات وذلك باضافة 3مل من المستخلص الى 2 مليلتر من كلوريد الزئبقيك 1% وظهور راسب ابيض دلالة على وجود الصابونينات.

6- دراسة تاثير مستخلص اوراق وثمار السدر في نمو وفعالية الانواع البكتيرية :
اتبعت في ذلك طريقة نشر الاكار بواسطة الحفر [8] وتمت كالاتي :
A- استعمل وسط مولر هنتون اكار (وسط مغذي) لغرض تنشيط العزلات البكتيرية وحضنت بدرجة 37 م لمدة 24 ساعه.
B- اخذ بوساطة ناقل من عالق بكتيري وخطط على الوسط نفسه ثم تركت الاطباق لمدة ساعه واحدة ليجف العالق .
C- تم عمل اربع حفر بقطر 6 ملم بكل طبق باستعمال ثاقب معقم.
D- تمت إضافة 100 مايكرولتر من كل تركيز من المستخلصين في الحفرة باستعمال ماصة دقيقة بحذر شديد لتلافي تناثر المستخلص فوق سطح الوسط الزرعي.
E- حضنت الاطباق (بخمسة مكررات) بدرجة 37م لمدة 24 ساعة لملاحظة تكون هالة شفافة حول الحفرة التي تمثل قطر منطقة تثبيط النمو مقاسة بالملم .

7- اختبار حساسية المضادات الحيوية Tetracyclin، Neomycin، Cloramphinicol، Azithromycin تجاه عزلات البكتريا المدروسة [9]
استعملت المضادات الحيوية المجهزة من شركة bio-analyse ، اذ اختبرت حساسية البكتريا تجاه المضادات الحيوية وذلك باستعمال طريقة الانتشار بالحفر ، وتم وضع 200 مايكروليتر من المضاد في كل حفرة ، وضعت الاطباق في الحاضنة لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37 م وقيست مناطق التثبيط للمضادات الحيوية وتمت مقارنتها بمناطق التثبيط للتراكيز النباتية المستعملة مقاسة بالمليمتر.

8- الحيوانات المختبرية :
وزنت الفئران المختبرية من نوع Balb/c من جنس الذكور وكان وزنها (20 - 30) غرام وبعمر (6-8) اسابيع، حيث وضعت الفئران في بيت الحيوان الخاص بكلية العلوم للبنات في جامعة بغداد ، و استعمل في التجربة 20 فأرا من ذكور الفئران البيض قسمت الحيوانات الى خمس مجاميع لكل مجموعة اربعة فئران (معاملة السيطرة ، معاملة سالبة اصابه دون علاج ، معاملة موجبة اصابة وعلاج ،علاج بالمضاد الحيوي).
و تمت اصابة ملتحمة العين للفئران البيض بأربعة انواع من البكتريا (*S.aureus, E.coli , p.aeruginosa, S.pyogenes*) وتمت الاصابة باستعمال مسحة معقمة لكل نوع من هذه البكتريا [8] اما العلاج فتم تحضيره من خلال تعيين نسبة اربع مجاميع (n= 4) لعلاج العيون وثلاث مجاميع (n= 4) لعلاج الجروح حيث حضر مرهم

موضعي يتكون من شمع البرافين الابيض الناعم والمستخلص الايثانولي لاوراق السدر بنسبة (50%w\w) [10] ، وتم تحضير برافين ابيض (8 g) ووضعه في حمام مائي و(8 g) من المستخلص المذاب في محلول DMSO يخلط لعدة دقائق ويوضع المخلوط في انابيب معقمة وتم وضع العلاج بوساطة مسحة معقمة للعيون المصابة بالبكتريا وكذلك بالنسبة للجروح المصابة. وبعدها تمت مراقبة الاصابات بالعيون والجروح ومدى تحسنها بالعلاج وتشريحها وتم وضع ملتحمة العين والجلد مع العضلات في محلول الفورمالين المخفف 10% .

9- لأغراض الدراسة النسيجية :

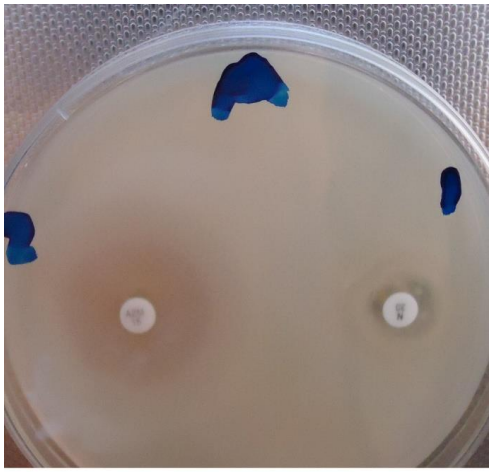
تمت الدراسة النسيجية لملتحمة العين وذلك من خلال عمل المقاطع النسيجية باستعمال صبغة الهيماتوكسلين والايوسين حيث كان سمك المقاطع النسيجية (5-7) مايكروميتر وذلك في كلية العلوم للبنات \قسم علوم حياة\ جامعة بغداد.

10- التحليل الاحصائي :

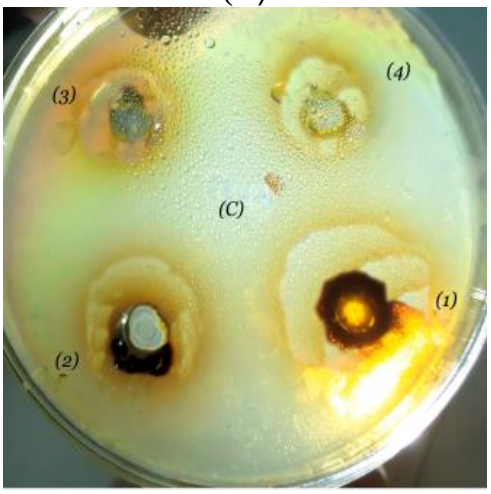
حللت النتائج احصائيا باستعمال اختبار LSD لمعرفة اقل فرق معنوي ولمعرفة تأثير التراكيز وتحت مستوى 0.05 من مستويات الاحتمالية. [11]

النتائج والمناقشة :

أظهرت النتائج ان للمستخلص الميثانولي لاوراق وثمار السدر فعالية عالية ضد البكتريا المستعملة في الدراسة ، مقارنة بالمضادات الحيوية المستعملة ، أما المستخلص المائي البارد فكان له تأثير مثبط قليل في البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام كما موضح بالشكل (1):



(A)



(B)

شكل (1) A - تمثل انواع من المضادات الحيوية المستعملة ضد البكتريا.

B- يمثل تأثير المستخلص النباتي لاوراق السدر في بكتريا (*E. coli*) بالتراكيز (1)600 ملغرام/مل (2) 300ملغرام /مل (3) 150ملغرام /مل (4) 75 ملغرام/مل

إذ استعمل المضاد الحيوي Tetracyclin (30mcg) ومضاد Azithromycin (30mcg) ضد بكتريا *P.aeruginosa* حيث ظهرت اقطار التثبيط (23 ، 18) ملم على التوالي . (شكل 1 (A)). وفي شكل 1(B) يظهر استعمال وسط (MSA)واختبار المستخلص الكحولي للثمار ضد بكتريا *P.aeruginosa* .

جدول (1) معدلات اقطار التثبيط (مقاسة بالملم) للمستخلص الكحولي لثمار السدر تجاه العزلات الجرثومية

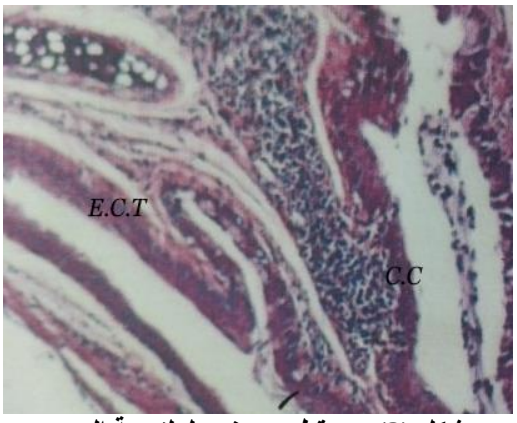
ت	البكتريا	التركيز(ملغرام\مل)				قيمة LSD
		75	150	300	600	
1	*S. aureus*	12 A Ba	15 B	16 BC	20 C a	*3.66
2	*P. aeruginosa*	14 B a	15 B	17 AB	21 A a	*4.09
3	*S. pyogenes*	12 A a	15 A	16 AB	20 B a	*4.52
4	*E. coli*	0 B b	17 A	19 A	20 A a	*6.38
	* (P<0.05) ، NS: غير معنوي.					

*(المتوسطات التي تحمل حروفاً كبيرة مختلفة ضمن الصف الواحدة (بين التراكيز) وحروفاً صغيرة مختلفة ضمن العمود الواحد (بين العزلات) تختلف معنويا فيما بينها) ملاحظة : كل قيمة هي معدل لاربعة مكررات

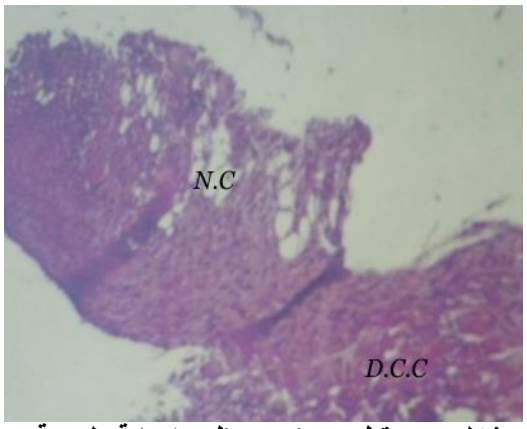
أما من الناحية الاحصائية فقد تمت معاملة الانواع البكتيرية بالتراكيز المذكورة سابقا من المستخلص الايثانولي، واشارت نتيجة التحليل الاحصائي الى ان تأثير المستخلص النباتي للاوراق والثمار في الخلايا البكتيرية ذو فروق معنوية ($p \leq 0.05$) ابتداء من التركيز 75ملغم\مليلتر في بعض الانواع كما في الجدول (1) ، في حين لم يكن هذا التركيز ذا تاثير معنوي في المستخلص المائي للثمار والاوراق. اذ لوحظ ان التراكيز (300,150,75) ملغم\مليلتر لم يكن لها اي تأثير فعال تجاه بكتريا (*S.pyogenes, P.aeruginosa, E.coli*) في حين كان لتركيز600 ملغم\مليلتر بالنسبة لبكتريا *S.aureus* فرقاً معنوياً واضح.

وأشار[12] الى ان تاثير المستخلص الميثانولي لنبات السدر ضد انواع من البكتريا الموجبة لصبغة كرام والبكتريا السالبة للصبغة حيث ظهر تاثير المستخلص ضدالبكتريا السالبة اكثر فعالية من البكتريا الموجبة وكان له تاثيراً قاتلاً للتراكيز العالية ضدهذه البكتريا وتاثيراً مثبطاً للتراكيز الواطئة. وهذه النتائج مطابقة لنتائج دراستنا كونه مضاداً فعالاً للانواع البكتيرية السالبة اكثر من الموجبة .

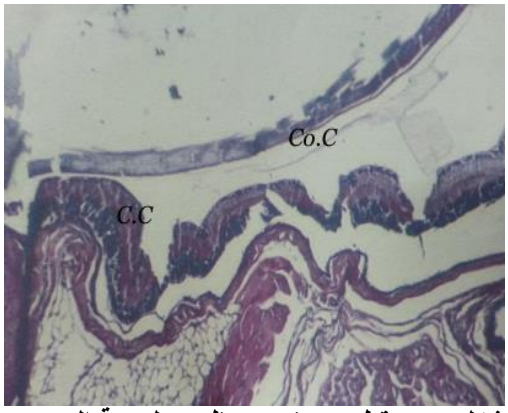
اما التغيرات النسيجية فأن الأنسجة الطلائية لملتحمة العين الطبيعية تكون عمودية مطبقة ومكونة من عدة صفوف من خلايا اسطوانية ، وتكون خلايا الطبقة السطحية عمودية الشكل اما الطبقات التي تحتها فتكون من نوع مضلع وتكون خلايا الطبقة القاعدية مكعبة ، وعندما حدثت الاصابة لهذه الخلايا غيرت من شكلها نتيجة حدوث تنخر وظهورخلايا التهابية وتشكل فجوات سايتوبلازمية. وكذلك عند علاج الاصابات في ملتحمة العين وذلك باستعمال المرهم المحضر من المستخلص وقورنت بمعاملة السيطرة الموجبة والسالبة حيث ظهر تحسن الخلايا المتنخرة لشكل اشبه للشكل الطبيعي وكما موضح بالشكل (6،5،4،3،2)



شكل (2) : مقطع عرضي لملتحمة العين
Epithelial columnar tissue : E.C.T ،
Cuboidal cells : C.C
(H&E 10X)

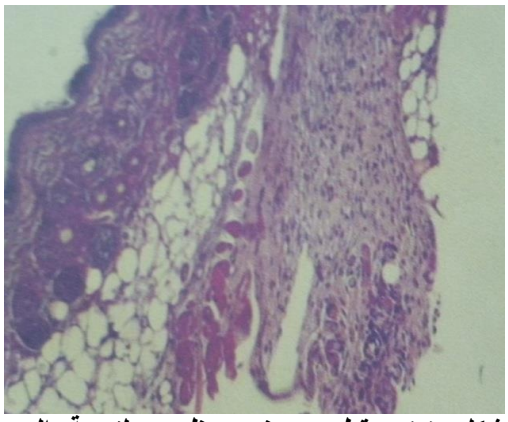


شكل (3) مقطع عرضي ، يظهر اصابة ملتحمة العين ببكتريا *S. Aureus*
Necrotic cells (N.C)
Damaged columnar cells (D.C.C)
(H&E 10X)



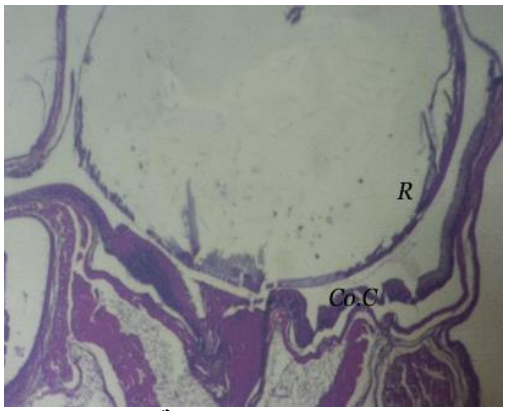
شكل(4)مقطع عرضي ، يظهر ملتحمة العين بعد علاجها بالعلاج المحضر من المستخلص الكحولي لاوراق السدر

(H&E 10X)



شكل (5) مقطع عرضي يظهر ملتحمة العين مصابة ببكتريا *Str.pyogenes*

(H&E 10X)



شكل (6) علاج الملتحمة بالمستخلص الكحولي Co.C: Columnar cells
R: Retina

(H&E 10X)

المصادر :

1- Nawash, S. O. and Al-Horani, S. A. 2011. The most important medicinal plants in Wadi Araba desert in South West Jordan: A review article. Advances in Environmental Biology, 5(2): 418-425.

2- Dahiru D, Sini JM, and John-Africa L. Antidiarrhoeal activity of *Ziziphus mauritiana* root extract in rodents. Afr J Biotechnol. 2006;5 (10):941–945.

3- Abalaka ME, Daniyan SY, Mann A .2010. Evaluation of the antimicrobial activities of two *Ziziphus* species (*Ziziphus mauritiana L. and Ziziphus spina-christi L.)* on some microbial pathogens. Afr. J. Pharm. Pharmacol. 4(4):135-139.

4- Mustafa, B., Hajdari A. , Pajazita Q., Syla B., Quave C.L. and Pieroni A., 2012. An ethnobotanical survey of the Gollak region, Kosovo. Gen. Resour. Crop Evol., 59: 739-754.

5- Forbes LB, Nielsen O , Measures L and Ewalt DR 2000 .*Brucelosis* in ringed seals and harp seals from Canada. J. willd/Dis 36:595-598.

6- Atlas, R.M.,1995. Bioremediation. Chem.Eng.news,73:32-42.

7- Adzu B, Amos S, ballen C, Gamaniel K . 2001.Antinociceptive activity of *Z.spina christi* root barck extract.fitoterapia 72:334-350.

8-Harley, J. P. and Prescott, L. M. 2002. Laboratory Exercises in Microbiology. 5 th ed. The Mc Grow- Hill Companies. USA .

9-Hammer A., Detlev H.,Carsten H. , Rolf K., Elke L. , Richard M., Hans G.B. 2003. Solar energy assessment using remote sensing technologies. Remote Sensing of Environment 86 .pp: 423 – 432.

10-Chah, K.F., Eze C.A., Emuelosi C.E. and Esimone C.O., 2006. Antibacterial and wound healing properties of methanolic extracts of some Nigerian medicinal plants. J. Ethnopharmacol., 104: 164-16.

plants used in the treatment of gastrointestinal disorders in the Eastern Cape Province, South Africa.*J.of Medicinal Plants Research.* ;6(18): 3415–3424.

11- Sas/STAT .2010.users Guide for personal computers release q.1 SAS institute Inc.Cary and N.C, US.

12- Olajuyigbe OO, Afolayan AJ.2012. Ethnobotanical survey of medicinal

Study the effect of Aqueous cold water and Alcoholic extracts of *Ziziphus spina christi* against bacteria isolated from Conjunctivitis In vitro and In vivo

Hala I. Abd Al-Wahab *** ***Talib A. Hussien *

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

Abstract:

This study aimed to study the effect of *Ziziphus spina christi* Aqueous cold and Alcoholic leaves and fruits extracts on the growth and activities of the following types of bacteria :(*Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes).* The results appeared outweigh the alcoholic extract of leaves and fruits of Sidr that prepared by saxholate extractor by addition of ethanol 95% significant superiority as compared with aqueous extract that prepared by using distilled water as was its influence inhibitor to the growth and effectiveness of bacteria , about the treatment of *in-vivo* to cause injury to these types of bacteria diagnosed laboratory mice and treated with alcoholic extract of the leaves of Sidr highest concentration of inhibitor Tests showed a positive response to treatment**.**