تأثير مستخلص اوراق نبات حلق السبع الشجيري <u>Adhatoda</u> <u>vasicia</u> ضد بعض انواع البكتريا الملوثة للجروح بواسطة استخدام اختبار الحساسية

علي صادق محمد*   انتصار حسين الموسوي **

تاريخ قبول النشر 2007/1/7

الخلاصة :

اجريت هذه الدراسة على نبات حلق السبع الشجيري –العائلة السنفية [<u>Adhatoda</u> <u>vasicia</u> , Acanthaceae family]،اذ تم جمعه من حدائق جامعة بغداد، تم استخلاص اوراق النبات باستخدام كحول الميثانول ، الذي اعطى نسبة استخلاص (30%).

جمعت (80)مسحة او عينة من جروح المرض من مستشفيات مدينة بغداد وزرعت على وسط اغار الدم و وسط اغار ماكونكي لغرض عزل وتشخيص البكتريا باجراء فحوصات المظهريةوالكيموحيوية عليها .اظهرت النتائج ايجابية (60)مسحة ملوثة بالبكتريه (75%)و (20)مسحة سالبة . (25%)شخصت البكتريا النامية على الاوساط الاختبارية فكانت <u>Pseudumonas</u> <u>aeruginosa</u>و <u>Staphylococcus</u> <u>aureus</u>و <u>Esherichia</u> <u>coli</u>و <u>Proteus</u> <u>spp</u> و <u>Klebsiella</u> <u>spp</u>اذ كانت نسبتها (32)عزلة (49.2٪) و (7)عــــزلات(10.7٪) و (5)عزلات(7.6٪) و (1)عزلة (1.5٪) و (20)عزلة(30.7٪)على التوالي .

اختبرت فعالية المستخلص الخام بواسطة اختبار الحساسية ضد البكتريا باستخدام تراكيــز (2 و 4و 6و 8و 10و 12ملغم/مل) للمستخلص الخام ، واظهرت النتائج بان قطر منطقة التثبيط تزداد بزيادة التراكيز المستخدمة وكان افضل تركيز استطاع تثبيط معظم البكتريــا المعزولة من الجروح كان (6)ملغم/مل من المستخلص الخام .

1-المقدمة :

يعود نبات حلق السبع الشجيري الى العائلة السنفية [1] Acanthaceae، وتعد الهند الموطن الطبيعي لهذه النبات .أدخل الى العراق في منتصف القرن الماضي اذ زرع بوصفه نبات زينة في الحدائق العامة والمنزلية .النبات يكون بشكل شجيرات دائمة الخضرةارتفاعه يتراوح من (1-3) م ، ذو ساق مستقيم يغطيه قلف ناعم بلون اخضر رمادي اوراقه متعاكسة الموقع ذات عنق قصير ، عريضة رمحية الشكل ، طويلة مدببة القمة ، يتراوح طولها (15-25)سم (وعرضها 5-10)سم ، وتكسوها طبقة شمعية ناعمة من الجانبين ، تكون الازهار حول قمةالنبات ذات لون ابيض ، تحتوي احيانا على خط مستقيم وسطي غير منتظم . [2] تحتوي اوراق النبات على مركبات ايض مثل القلويدات (قلويد الفازيسين Vasicine)والزيوت الاساسية وصبغات وكاروتينات [4,3]، بينما تحتوي الازهار على الكلايكوسيدات والكاروتينن والقلويداتبكمية قليلة جدا ، اما الجذور فانها تحتوي على قلويد الفازيسين وكلايكوسيدات . [1]كما تحتوي اجزاء النبات الكلي على مواد مثل السكريات وصمغ وشمع ودهون وراتنجات وكلورفيل وفيتامين Cبالاضافة الى احماض عضوية مثل Adhatodic acid [5]. تستخدم اوراق النبات الجافة في الطب الشعبي في علاج امراض الجهاز التنفسي مثل (الربو والسعال والالتهابات الشعبية المزمنة) [1]ويستعمل مسحوق الاوراق والجذور لعلاج التهابات المفاصل ولعلاج الجروح .كما تستخدم الازهار بوصفها مضاد للالم وعلاج المغص والتهابات العيون وارتفاع الحمى بانواعها فضلا عن علاج مرض السيلان ، بينما تستخدم قلف الجذور لعلاج التدرن الرئوي والامراض الجلدية مثل (الجرب والجذام والحكة الجلدية) . [6] وكان لمستخلص النبات فعالية في تثبيط نمو سلالات متعددة من الاحياء المجهرية نتيجة احتوائه على قلويدالفازيسين والزيوت الطيارة [3,2]ومستخلص الاوراق مادة مثبطة لنمو الفطريات [7]اما مستخلص الجذور استخدم كمضاد لبكتريا Bacillus و Mycoplasma[7].لذا اجريت هذه الدراسة لمعرفة تأثير مستخلص اوراق النبات على بعض الاحياء المجهرية لألتهاب الجروح بواسطة اختبار الحساسية .

2- طرائق العمل

2-1- جمع العينات النباتية وقياس الرطوبة النسبية والاس الهيدروجيني

جمعت اوراق نبات حلق السبع الشجيري من النباتات المزروعة بوصفها نبات زينة في حدائق كلية العلوم /جامعة بغداد ، خلال شهر اذار قبل

* قسم التقنية الاحيائية/كلية العلوم /جامعة بغداد
** قسم التقنية الاحيائية / الجامعة التكنولوجية

تزهير النبات ، وبعد جمع الاوراق تم تنظيفها ، وذلك بغسلها بالماء جيدا ، ثم جففت بفرشها في اماكن نظيفة في الظل ، وبدرجة حرارة الغرفة فيتهوية جيدة ، وفي جو غير رطب ، لمنع تلف النماذج ، وعند جفاف الاجزاء النباتية طحنت الى اجزاء خشنة بواسطة الطاحونة ، وحفظت الاوراق المطحونة في حافظات بلاستيكية نظيفة بعيدا عن الضوء ، والحرارة ، والرطوبة لحين الاستعمال ، وتم تدوين المعلومات الخاصة على علب الحفظ)تاريخ الجمع ، والجزء النباتي، وموقع الجمع ، والكمية . (تم تقدير الاس الهيدروجيني للنبات اذ تم خلط (10)غم من مسحوق اوراق النبات الجافة مع (50)مل ماء مقطر باستخدام خلاط كهربائي لمدة (10)دقائق، رشح وقيس الاس الهيدروجيني للراشح باستخدام pH-meter .

2-2- تحضير المستخلص الخام

حضر المستخلص الميثانولي الخام لاوراق النبات الجافة بحسب طريقة [8]وذلك باخذ (60)غم من الاوراق الجافة اذيبت في (500)مل من كحول ميثانولي . 80%وبعدها ركز المستخلص الميثانولي بواسطة التبخير باستخدام جهاز المبخر الدوار ، وبعد التخلص من كحول الميثانول، وزن المستخلص النباتي الخام و تم تقدير النسبة المئوية للمستخلص الميثانولي للاوراق بعمل نسبة مئوية بين الوزن الجاف الذي استخدم في الاستخلاص ووزن المستخلص بعد ازالة الكحول منه .حسب طريقة [9,2].

2-3-عزل وتشخيص البكتريه الملوثة للجروح

2-3-1-جمع العينات السريريه

تم جمع (80)عينة اومسحة من اصابات الجروح سطحية الملوثة الناتجة من العمليات الجراحية والانفجارات، باستخدام المسحات القطنية المعقمة من المصابين بمستشفى الكاظمية التعليمي ، ومستشفى الكندي التعليمي ، ومستشفى اليرموك التعليمي في مدينة بغداد خلال شهر اذار ونيسان . زرعت المسحات القطنية الملوثة باصابات الجروح مباشرة على وسط اغار الدم ، ووسط اغار ماكونكي ، وحضنت بدرجة حرارة 37م °لمدة 24ساعة . اخذت مستعمرة نقية واحدة بعد ظهور النمو على الاوساط الزراعية ، وشخصت مبدئيا على اساس الصفات المظهرية التي تضمنت حجم وشكل ، ولون المستعمرات ، ثم فحصت مجهريا لوصف شكل البكتريا من خلال تصبيغها بصبغة غرام [10] .حضرت صبغة غرام primary stainعلى وفق ماجاء في [11].

2-3-2-اختبارات الصفات المظهرية و الكيموحيوية لتشخيص العزلات البكتيرية

اجريت الاختبارات على وفق ما ورد في . [10]مثل (النمو على وسط اغار الدم و النمو على وسط اغار الماكونكي و النمو على وسط EMB واختبار انتاج الاوكسيديز والكاتاليز واليوريز والهيمولايسين و اختبار انزيم المخثر للبلازما و اختبار تخمر سكرالمانتول).

عزل بكترى P aeruginosa I

تم اجراء اختبارات خاصة لعزل وتشخيص هذه البكتريا بحسب الطريقة -:

1-النمو على وسط اغار King B للكشف عن صبغة Fluorescinالصفراء المخضره [12].

2- النمو على وسط اغار سترمايد Cetrimide agarحيث يعد وسطا متخصصا لهذه البكتريه حضر بحسب الطريقة الموصوفة من قبل [13].

3-النمو بدرجة حرارة 42م °و 5م °وهو اختبار خاص لهذه لبكتريا P. aeruginosaاذ تزرع انابيب بواسطة اغار المغذي بالنمو البكتيري ، وتحضن بدرجة حرارة 42م °، او بدرجة حرارة 5م °لمدة 24ساعة .وجود النمو يدل على ايجابية الاختبار ، اذ تملك هذه البكتريه قابلية النمو بدرجات حرارية متطرفة .

حفظ وادامة العزلات

حضر الوسط المستخدم لحفظ العزلات البكتيرية وفق ما جاء في [14]كما ولقحت قناني حاوية على وسط الاغار المغذي المائل ، وحفظت بدرجة حرارة (4)م . °

2-4-اختبار الحساسية باستخدام المستخلص الخام على نمو البكتريه المعزولة (In vitro)

حضرت التراكيز الاتية بناء على نتائج التي حصل عليها (البالاني ،2003) [2]اذ استخدمت التراكيز الاتية (2 , 4 , 6, 8, 10 , 12ملغم /مل) . باستخدام كحول الميثانول. (45%)لقح سطح الاغار (مولر –هنتون)باستخدام الناشر المعقم بالعالق البكتيري الذي يحوي على($1.5 X 10^8$) خلية /مل ، وعملت بعدها حفر بقطر (5)ملم على سطح الوسط المزروع باستخدام الثاقب الفليني المعقم . نقلت تراكيز المستخلص الخام وبمقدرة (50) مايكروليتر في كل حفرة مع بقاء واحدة بوصفها سيطرة (Control)حاوية على الميثانول 45 %) .(حددت فعالية التراكيز للمستخلص الخام بقياس منطقة التثبيط (Inhibition zone)المتكونة حول الحفرة مقدرة بالمليمتر بعد حضانة لمدة 24ساعة ، وبدرجة حرارة 37م° .

3- النتائج ولمناقشة

3-1- جمع العينات وتجفيفها وقياس الرطوبة النسبية والاس الهيدروجيني

بعد جمع اوراق النبات خلال شهر اذار تم قياس الرطوبة النسبية لها وكانت النتيجة (71%)وهذه النتيجة مقاربة للنتائج التي حصل عليها [2]، لذا نجد ان هذا النبات ينمو بصورة جيدة في البيئات العراقية اذ تتوفر فيها درجة الحرارة المناسبة و الرطوبة ومدة الاضاءة الكافية والرياح الموسمية ، والتربة الملائمة .اما عن قيمة الرقم الهيدروجيني (pH)للمستخلص الخام من الاوراق كان (7)

3-2- تقدير نسبة المستخلص النباتي الخام

تم اخذ (60)غم من الاوراق الجافة اذيبت في (500)مل من كحول الميثانول (80%)ومثلما موضح في الفقرة (2-2)، وتم الحصول على المستخلص الخام المركز بوزن (18)غم ، اي نسبة (30%)، وكانت هذه النسبة مطابقة للنسبة التي حصل عليها البالاني باستخدام كحول الميثانول [2] .فقد استخدم البالاني الماء الحار وكحول الايثانول وكحول الميثانول وكان افضل نسبة استخلاص حصل عليها هي باستخدام كحول الميثانول (80%) اذ حصل على النسب المئوية الاتية 20%, 30% (12%,على التوالي .لذا تم استخدام هذا المذيب لكونه ذات سعة بمدى الاستخلاص وعلى الرغم من تقارب قطبيته مع قطبية كحول الايثانول فانه يعد اقل قطبية من الماء [15]، ولكنه اعطى نسبة استخلاص اعلى من كليهما بفرق كبير ، فضلا عن كون كحول الميثانول يسهل استرجاعه بعد اجراء الاستخلاص للجزء النباتي المطلوب ، وهو كحول متوفر بالاسواق ، ورخيص الثمن واقل سمية من كحول الايثانول وقد استخدم المستخلص الخاملكشف عن المواد الفعالة الموجودة في الاوراق اذ يتوقع احتوائه على مركبات فعاله بايولوجيا مختلفة التي يتسنى لنا استخدامها في التجارب اللاحقة .

3-3-عزل وتشخيص الملوثات المرضية البكتيرية من الجروح

عزلت البكتريا مبدئيا بعد زرع المسحات على الاوساط الاغنائية كما في الفقرة (2-3-2)اذ تم تشخيصها اعتمادا على مواصفاتها المظهرية والاختبارات الكيموحيوية [10] .

3-3-1-نتائج الاختبارات الصفات المظهرية والكيموحيوية لتشخيص العزلات البكتيرية :-

أ –الصفات المظهرية

ان العزلات البكتيرية التي تظهر بشكل عصيات مستقيمة سالبة لصبغة غرام في الفحص المجهري فضلا عن ظهورها بهيئة مستعمرات شاحبة اللون على وسط اغار الماكونكي (غير مخمرة لسكر اللاكتوز) ، تكون مستعمراتها دائرية محدبة ذات حواف منتظمة ، قوامها بين مخاطي وجاف وتكون في وسط اغار الدم هالة شفافة حول المستعمرات اذ تحلل الدم من نوع بيتا ، مما يدل على انها عزلات لبكتريه P aeruginosa وتكون رائحه الوسط المزروع بهذه البكتريا ذو رائحه مميزه ،اما العزلات البكتيرية التي ظهرت بشكل عصيات مكورة فتكون بشكل مجاميع عنقودية موجبة لصبغة غرام في الفحص المجهري وتنمو على اغار الدم ، وتعطى تحللا كاملا للدم - B) (hemolysisوقد نمت على وسط اغار الملح وسكر المانتول ، اذ تخمر سكر المانتول)وهو وسط اختباري الذي يحتوي على تركيز (7.5%)من كلوريد الصوديوم وهذه النسبة مثبطة لنمو الانواع البكتيرية الاخرى ، اما سكر المانتول فهو يفرق بين بكتريا S . aureus المرضية عن غير المرضية حيث تكون الاخرى غير مخمرة لسكرالمانتول (مما يدل انه عزلات لبكتريه . S . aureusواماالعزلات البكتيرية التي تظهر بشكل عصيات مكورة سالبة لصبغة كرام في الفحص المجهري ، تنمو بشكل مستعمرات وردية اللون (مخمرة لسكر اللاكتوز)على وسط اغار الماكونكي ذات حواف منتظمة ، وكذلك تنمو بشكل مستعمرات صغيرة ذات بريق اخضر معدني على الوسط الزراعي .(EMB)مما يدل على انها عزلات لبكتريه . E coli بينما العزلات البكتيرية التي تكون بشكل عصيات سالبة لصبغة غرام في الفحص المجهري ، ومستعمراتها ذات لون شاحب على وسط اغار الماكونكي ،وتسبب ظاهرة الحركة الزاحفة (Swarming)على وسط اغار الدم ولها رائحة مميزة كرائحة السمك المتعفن ، فانها تكون عزلات لبكتريا . Proteus spp في حين كانت العزلات البكتيرية التي تظهر بشكل عصيات مستقيمة ، وبهيئة سلاسل مزدوجة ، او مفردة سالبة لصبغة غرام في الفحص المجهري ، وتظهر مستعمراتها وردية اللون ، غير منتظمة الحواف ، مخاطية لاحتوائها على الكبسولة [16]فتكون عزلات لبكتريا . Klebsiella spp تم اجراء اختبارات الصفات المظهرية لمعرفة انواع البكتريا وتشخيصها مبدئيا واكمل التشخيص بالاختبارات الكيموحيوية للتاكد من نوع البكتريا للعزلات وعلى وفق ما يأتي :-

ب – الاختبارات الكيموحيوية

ان اجراء الاختبارات الكيموحيوية للعزلات البكتيرية المذكوره اعلاه الموضحة في الفقرة -2)

(3-2، كانت نتائج هذه الاختبارات مبينة في الجدول (1) .اذ كان اختبار الاوكسيديز ،واختبار النمو بدرجة 42م °موجبا لبكتريا P. aeruginosa وسالبا ببقية الانواع الاخرى .اختبار الكاتاليز كان موجبا في جميع الانواع البكتيرية ، بينما اختبار اليوريز كان موجبا في : P aeruginosa ،Proteus spp ،Klebsiella spp، وسالبا في الانواع الاخرى .اماختبار الانزيم المخثر للبلازما والهيمولايسين فكان موجبا لبكتريا P aeruginosa وS. aureus وE. coli وسالبا في بكتريا Proteus spp وKlebsiella spp وكانت النتائج مطابقة لما ورد في (Holt et al , 1994).[10] من هذه النتائج يمكن تشخيص بكتريا P. aeruginosa التي اعطت نتيجة موجبة باختبار الاوكسيديز ونمت بدرجة حرارة 42م ° ودرجة حرارة 5م°

جدول (1)نتائج الاختبارات الكيموحيوية المشخصة للعزلات البكتيرية

الاختبارات / نوع البكتريا	Gram stain	Oxidase	Catalase	Urease	Coagulase	Hemolysin	Mannitol fermentation	Growth on 42C°	Growth on 5C°	Growth on king B	Growth on cetrimide
P.aeruginosa	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
S . aureus	+	-	+	-	+	+	+	N	N	N	N
E . coli	-	-	+	-	+	+	-	N	N	N	N
Proteus spp	-	-	+	+	-	-	-	N	N	N	N
Klebsiella spp	-	-	+	+	-	-	-	N	N	N	N

(+)نتيجة موجبة ، (-)نتيجة سالبة ، (N)لم يجرى الاختبار

كما ونمت على وسط King B ووسط السترمايد وهي اختبارات تشخيصية لهذه البكتريا .اما اليكتريا S . aureus فشخصت باختبار تخمر سكر المانتول فهي تنمو وتعطي نتيجة موجبة لهذا الاختبار .اما بكتريا E . coli فشخصت لكونها كانت سالبة في اختبار الاوكسيديز .

واختبار تخمر سكر المانتول ، موجبة باختبار الكاتاليز ، والهيمولايسين ، واختبار الانزيم المخثر .وقد اعتمد على الصفات المظهرية كونها تنمو عى وسط (EMB)بشكل مستعمرات صغيرة ذات بريق معدني .اما بكتريا Proteus spp وKlebsiella spp فكانت نتائجها متماثلة ، وقد اعتمد على الصفات المظهرية في التفريق بينهما.

2-3-3- تحديد النسب المئوية للعزلات البكتيرية

من مجموع (80)(لا حظ الفقرة 2-3-2)عينة لمسحات اصابات الجروح كانت (60) عينة موجبة لنمو الزرع البكتيري بنسبة (75%)، وتم الحصول منها على (65)عزلة بكتيرية .وكانت النتيجة مقاربة لما جاء في [17]اذ كانت نسبة العينات الموجبة (80%)والسالبة بنسبة . (20%) ان عدم ظهور النمو في بعض المسحات (العينات)، قد يعود الى تناول المرضى للعلاجات قبل اخذ العينات ، والى عدم اصابة المرضى بالملوثات البكتيرية .وتم تقدير النسبة المئوية للعزلات البكتيرية (خمسة وستون) بعد اجراء اختبارات الصفات المظهرية والكيموحيوية فكان عدد عزلات بكتريه P. Aeruginosa (32)عزلة (49.2%)اما بكتريا S aureus .فكانت عدد عزلاتها (7) (10.7%) وكانت عدد عزلاتها بكتريا E . coli (7.6%) (5)بينما حصلنا على عزلة واحدة من بكتريا Proteus spp وكانت نسبتها (1.5%)، في حين كانت عدد عزلات بكتريا Klebsiella spp (20) عزلة (30.7%)جدول (2) .وكانت هذه النتائج مقاربة لما ورد في [18, 19 , 20 , 21] .التي اظهرت ان بكتريا P. aeruginosa تمثل نسبة عالية من البكتريا الملوثة للجروح .من هذه النتائج تبين ان بكتريه P. aeruginosa هي الاكثر شيوعا في اصابات وتلوثات الجروح ، ويعزى ذلك لكونها بكتريه انتهازية تصيب البشرة وتوجد بشكل كبير في البيئة الاحيائية [22].نلاحظ من النتائج

جدول (2)النسب المئوية للبكتريا المعزولة من اصابات الجروح وبحسب نوع البكتريا على اساس الصفات المظهرية والاختيارات الكيموحيوية

نوع البكتريا	عدد العزلات	النسبة المئوية (%)
P aeruginosa	32	49.2
S . aureus	7	10.7
E . coli	5	7.6
Proteus spp	1	1.5
Klebsiella spp	20	30.7
المجموع	65	100

أن بكتريا P. aeruginosa هي المسبب الرئيس لتلوث الجروح اذ تفرز الانزيمات لتحطيم الانسجة [23].ويلاحظ ان بكتريه Klebsiella spp كانت نسبتها اعلى من بكتريه S . aureus وE . coli وProteus spp واقل من بكتريه P aeruginosa، وهذا يدل على حدوث تلوث الجروح من مصدر داخلي المنشأ (Endogenous)اذ ان بعض انواع البكتريا توجد بوصفها نباتا طبيعيا (Normal flora)في الجهاز الهضمي والتنفسي ، وقد يكون

التلوث خارجي المنشأ (Exogenous)اذ توجد هذه البكتريه في الشراشف ، وتلوث العاملين من الملاك الطبي [24].

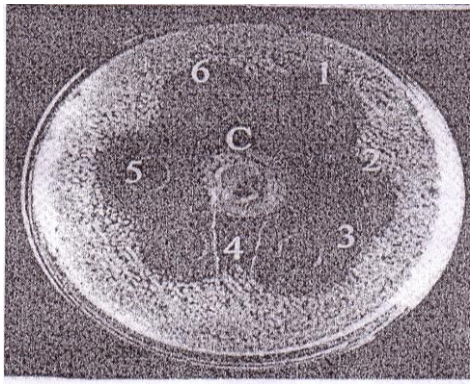
3-4-نتائج فحص الفعالية التضادية للمستخلص الخام على نمو العزلات البكتيرية

اجرى اختبار التضادية للبكتريا بالمستخلص الخام لاوراق نبات حلق السبع الشجيري ومثلما موضع في الفقرة (2-4).ويوضح الجدول (3). النتائج التي تم الحصول عليها .اذ يلاحظ من الجدول ان المعدل الكلي لتثبيط نمو البكتريه بتركيز(2ملغم/مل) من المستخلص الخام

جدول (3)نتائج تاثير تراكيز المستخلص الخام لاوراق حلق السبع الشجيري على العزلات البكتيريا باختبار الحساسية

التراكيز / العزلات	معدل اقطار تثبيط نمو العزلات البكتيرية بالملم						
	2ملغم/مل	4ملغم/مل	6ملغم/مل	8ملغم/مل	10ملغم/مل	12ملغم/مل	المعدل
P aeruginosa	20.0	24.5	30.0	30.0	31.0	31.5	27.8
S . aureus	18.0	19.0	20.3	24.8	25.0	25.3	22.0
E . coli	15.0	17.0	19.5	20.5	21.0	21.3	19.0
Proteus spp	19.0	20.0	25.0	25.5	25.8	26.0	23.5
Klebsiella spp	17.0	20.0	23.0	25.0	25.5	26.0	22.7
المعدل الكلي لتثبيط البكتريا	18.0	20.0	23.5	26.0	26.0	26.0	23.0

كانت (18)ملم ولهذا التركيز كان اعلى تأثيرعلى بكتريه P.aeruginosa(20ملم) ولكنه اقل تاثيرا على بكتريا E . coli(15)ملم . اما التراكيز (4ملغم /مل) فمعدل تثبيطه للبكتريه هو (20ملم) ، وأعلى تثبيط كان على بكتريا (24.5 P. aeruginosaملم) واقل تثبيط كان في بكتريا (17 E . coliملم) . كان لتركيز (6)ملغم/مل معدل تثبيط كلي (23.5)ملم ، وكان اعلى تاثير له في بكتريه P. aeruginosa (30ملم) ، واقل تأثير له في بكتريا E . coli (19.5ملم) ، اما التراكيز الاتية (8 ,10 , 12ملغم /مل) فقد تساوى معدل التثبيط فيها وهو (26ملم)، وكان اعلى تاثير لها على بكتريه P. aeruginosa (31.5,31,30ملم) على التوالي ، واقل تثبيط في بكتريا (20.5, 21, 21.3 coli . Eملم) على التوالي ، ومن الجدير بالذكر ان تاثير معاملة السيطرة (Control)كان غير ملحوظ اذ لم يعط منطقة تثبيط لنمو البكتريه .ومن جهة اخرى كان معدل تثبيط التراكيز المختلفة على كل بكتريا منفصلة حيث يلاحظ من الجدول ان معدل تثبيط بكتريه P. aeruginosaهو(27.8ملم)اذ يلاحظ ان معدل اقطار تثبيط بكتريا P. aeruginosaفي التراكيز 6 (4,2 ,ملغم /مل) كان هناك فرق ملحوظ بينها اذ كانت(20، 24.5، 30) اي ما يعادل حوالي (5 ملم) بين تركيز واخر وكان افضل تركيز هو (6 ملغم/مل) . اما التراكيز الاتية (8، 10، 12 ملغم/مل) فكانت الفروق في معدل اقطار مناطق التثبيط غير ملحوظ اذ كانت (30، 31، 31.5)ملم على التوالي ما يقارب حوالي (1)ملم وكما موضح في الصورة . (1)



صورة (1)مناطق تثبيط نمو بكتريا P. aeruginosa باستخدام تراكيز من المستخلص الخام
1- (تركيز 2 ملغم/مل) ، 2 – (تركيز 4 ملغم/مل) ، 3 – (تركيز 6 ملغم/مل) ،
4 – (تركيز 8ملغم/مل) ، 5- (تركيز 10 ملغم/مل) ، 6 – (تركيز 12ملغم/مل) ، C (سيطرة).

وان معدل اقطار التثبيط في بكتريا S . aureus بالنسبة للتراكيز المستخدمة هو (22.0)ملم ويلاحظ ان معدل اقطار تثبيط نموها في التراكيز (2 ، 4 ، 6 ، 8 ملغم/مل)على وفق الاتي (18 ، 19 ، 20.3 ، 24.8 ملم)على التوالي ، ويلاحظ ان اعلى تثبيط كان بتركيز (8 ملغم/مل) .اما التراكيز (10، 12 ملغم /مل) فكان معدل تثبيطها (25 ، 25,3ملم)اذ كان الفرق قليلا جدا وتبين هذه النتائج ان الفروقات التي ظهرت في استجابة البكتريه السالبة لصبغة غرام (Klebsiella spp , Proteus spp , E . coli , P aeruginosa)والموجبةلصبغة غرام S aureus .اذ ثبطت معظم البكتريه السالبة لصبغة غرام بتراكيز اقل من البكتريه الموجبة ، ويعود ذلك الى طبيعة البكتريه من ناحية بناء الجدار الخلوي ، اذ تحتوي البكتريه الموجبة على غشاء خارجي والى مقاومة البكتريه للمضادات الحيوية المستخدمة تجاهها ، ولكون هذه البكتريه مرضية ، فانها تتعرض للمؤثرات الخارجية ولجرع مختلفة من المضادات الحيوية التي يستخدمها المريض ، مما يؤدي الى زيادة مقاومتها اذ تمتلك هذه البكتريه

مورثات مقاومة توجد على البلازميدات والتي تسمى بلازميدات المقاومة (R-plasmid) [25]ان تأثير المستخلصات النباتية على الانواع البكتيرية يتم باليه مماثلة لعمل العقاقير المضادة للبكتريا ، اذ تعمل على تثبيط صنع الجدار الخلوي للبكتريا ، او تثبيط صنع البروتين ،
والاحماض النووية التي تحتاجها الخلايا البكتيرية بصورة اساسية ، او تثبيط صنع الغشاءالبلازمي [26] .ويعود السبب في تأثير المستخلص الخام على نمو البكتريا لاحتوائه على القلويدات مثل الفازيسين بنسبة
(95-98%)التي تعمل كمضادات للاحياء المجهرية [2], ولاحتوائها على التانينات التي تعد مواد مثبطة لنمو البكتريا لذا تستخدم لعلاج نزف الجروح [6]الانزيمات ، والبروتينات الناقلة الموجودة في غشاء الخلية [27] .يحتوي النبات على الراتنجات التي تكون موادا مطهرة قوية [28] .ولاحتواء نبات حلق السبع
الشجيري على التانينات فهو يمتلك خواص مطهرة ومعقمة [29] .وتعد التربينات مركبات مضادة للفايروسات والبكتريه .ويحتوي المستخلص الخام للنبات على والفينولات التي تعد موادا مؤكسدة سامة للاحياء المجهرية .لم يلاحظ اجراء اختبار الفعالية التضادية للمستخلص الخام حلق السبع الشجيري في المصادر ، ولكن اختبر باستخدام الـ (MIC)فقط . اجريت هذه التجربة للتاكد من تأثير المستخلص الخام للنبات على البكتريه المسببة لتلوث الجروح قبل الدخول في اجراء التجارب على الحيوانات المختبرية او . (In vivo)ان فعالية المستخلصات النباتية الخام المختلفة ، والمكوناته الفعالة ضد الاحياء المجهرية المختلفة يعتمد على تثبيط تكون الجدار الخلوي المايكروبي ، اذ تعمل على تثبيط التصنيع الحيوي للبروتينات الاساسية ، وايقاف العمليات الايضية للحامض النووي (DNA)وكذلك تعمل على تغير الوظائف الطبيعية للغشاء الخلوي . [30]

المصادر:

1 – Amrit,P,S(2004).Adhatoda vasicia – Therapeutic monograph .

2-البالاني ، ماجد رشيد . (2003)تأثير المستخلصات الخام وقلويد الفازيسين لنبات حلق السبع الشجيري في بعض الجراثيم المرضية .رسالة ماجستير /كلية العلوم .جامعة بغداد .

3- Bulk Herbs,Asthma Support(2004).Indian vasak leaves powder(A- dhatoda vasicia;Justicia adhatoda;Malabar).P: 3-5

4- Paliwa JK,Dwived AK,Singhs & Gutpa RC.(2000).Pharmacokinet- ics and in – situ absorption studies of a new antiallergic compoun- d in rats.Pubmed,vol.(20):197(1-2):213-20 .

5 – Kutub Fawzy Taha,(1983).Medicinal plant in Libya.Arab Encyclopedia house. Tarabols ,Libya P:158 – 160.

6 – Daster,J. F.(1970).Medicinal of India & Pakistan.1 ed. st Regional Research lab. ,Bombay,India.P:150-155 .

7 – Qureshi S.& Rai M.K.(1997).In vitro evaluation of inhibitory nature of extracts of 18 – plants species of chind wara against 3-keratinophilic fungi.J.Hindustan ntibio.vol.3a(1-4):56-60 .

8- Indian herbal pharmacopoeia, (vol.I),(1998).A joint Publication of regional research laboratory, Council of Scientific& Industrial Research . Jammutawi . P : 1-10 .

9-محمد،علي صادق و البالاني ،ماجد رشيد و النداوي ، منى جاسم :(2005)انتاج قلويد الفازيسين من نبات حلق السبع الشجيري Adhatoda Vasicia .
أ –المحتوى الكيمياوي وبعض المواد الفعالة بايولوجيا لمستخلصات اجزاء نباتية مختافة .مجلة ابحاث التقانة الحيوية .مجلد 7العدد 2ص – 47 62 .

10-Holt,H.G.;Krieg,N.R.;Sneath,P.A.; Staley,J.T.&Williams,S.J (1994). Bergeys manual of determinative bacteriology . 9 TH ed .will Ams and Wikins , Baltmore . U.S.A.

11-Atlas,R.M.;Brown,A.E.and Parks. L.c.(1995).Laboratory Manual experimental Microbiology.U.S.A.:121-123.

12- Stop,H.&Gadkari,D.(1981).Non pathogenic members of the genus P aeruginosa.In prokarytes.p.723 -729 .

13- Hawkey,P.M.&Lewis,A.D.(1989). Medical bacteriology.A practical approach.IRL press Oxford .

14-Ausubel,F.M.,Brent,R.;Kingston, R.E.;Moore,D.D,.Smith,J.A.,.Seidman,J. D.&Struhi ,K. (1987).Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley &

Sons,Inc.Newyork.p: 83-85.
15-الجبوري ، علي عواد . (1993)علم الادوية الطبيعية ، العراق –بغداد .
16- Joklik,W.K.;Wilett,H.P.;Amos,D.B. and Wilfert,C.M.(1992).Zinsser icrobiology.20 th ed.Appleton and Lange.U.S.A .
17- Ingraham,J.L.& Ingraham,C.A. (2000).Introduction to Microbiology.2nd ed .Brook .Cole .U.S.A .
18 – Levine,N.S.& Lindberg,R .(1976).The Quantitive Swab Culture & Smear J.Trauma .vol.16:89-94 .
19- Vandepitt,J.; Engbeak,K;pilot,P.& Heuck,C.C.(1991).Basic laboratory procedures in clinical bacteriology.Word Health Organization (WHO) library Geneva.P.68.
20- Vanbelden,C.& Iglewski;B.H. (1998).Cell to cell signaling & P. aeruginosa infection emerging infections Disease.vol.4(4).
21- Nair,D.;Gupta,N.; Kabra,S.;Ahuja ,R.B.& Prukash,S.K.(1999).Salmonella Senflenberg :a new pathogen in the burn wounds.vol.25: 723 – 727 .
22- Akasaka,T.; Tanaka.M.; Yamaguchi;A. and Sata,K.(2001)Type 11 Top isomerase mutations of fluoroquinolone resistant clinical strain of P. aeruginosa isolated in (1998)&(1999): role of target enzyme in mechanism of fluroro quinolone Antimicrobial Agents and Chemotherapy.45(8):2263-2268 .
23 – Bowler P.G.,Duerden B.I.and Armstrong D.G.(2001).clinical Microbiology Reviews ,vol.14(2): 244 – 269 .
24- Urano,T.;Naguchi,K.;Tiang,G& Tsukumi,K.(1995).Survay of P. aeruginosa contamination in human being in laboratory animals Exp Anim.vol.44(3):233 – 239.
25-Bertram,G.&Anthony,G.(1993). Pharmacology (examination & bord review).Appleton & lange.Los Altos – California –U.S.A.p:167- 269 .
26- Laurance,D.R.;Bennett,P.N.& Brown, M.J.(1997).Clinical Pharmacology.8 ed. Churchill livingstone.London . 250-260 .
27- Cowan,M.M.(1999).Plant Products as Antimicrobial Agents .Clincal Microbiology Reviews,vol 12(4):564-582.
28-رفعت ، محمد . (1988)قاموس التداوي بالاعشاب –دار البحار –بيروت .
29- Perry,Lily modal Auxiliaries.,(1980).Medicinal plant of East & South East Asia. ,with assistance of Judith Motazger Cambridge.,University of Cambridge., U.S.A.
30- Tyler,V.E.; Bradly,L.R.& Robbers , J.E.(1988).Pharmrcognosy, 19 ed.Lea& Febiger,P:4-5.

Effect of leaves extract of Adhatoda vasicia plant against some wounds contamining bacteria by using sensitive test

Ali . Sadiq Mohammed* **Entisar Hussein AL-Mosawe****

* Biotechnology Dept , science college , Baghdad Univ
** Biotechnology Dept, Technology Univ .

Abstract :

This study has been done on plant [Adhatoda vasicia , Acanthaceae family],which has been collected from gardens of university of Baghdad The leaves of plant were extracted by methanol alcohol obtain the crude extraction good ratio(30%).Eighty swabs

or samples were collected from several wounds patients of hospitals in Baghdad city.These swabs were cultured on blood and MacConkey ager to isolate bacteria and identified by appearance and bio chemical tests.The results showed that(60)somples were positive(75%)for tests bacteria white the other(20)swabs were negative(25%).The bacteria were identified as Pseudomonas aeruginosa ,Staphylococcus awreus , Esherichia coli,Proteus spp and Klebsiella spp; and their number percentage were(32)isolates(49.2 %),(7)isolates(10.7%),(5)isolates(7.6%),(1)isolate(1.5%)and(20)isolates(30.7%)respectiv ity.Crude extract teated by sensitivity test against the bacteria with concentration (2,4,6,8,10,12mg/ml).The results showed that the inhibition zone increased with increasing ils concentration The best concentration that inhited most of the bacteria is(6 mg/ml) of the crud extract that was isolated from wounds .