

**دراسة الفعالية التضادية للمستخلص المائي الحار لأوراق نبات الدفلة**  
***Nerium oleander* في نمو بكتريا *Esehrichia coli* و *Klebsiella pneumonia***  
**خارج الجسم الحي**

م.م. سهير عبد الكريم

كلية التربية للبنات / جامعة الكوفة

م.سندس وفي غني

كلية التربية للبنات / جامعة الكوفة

م.م. عفيفة يوسف جعفر

كلية الرياضيات وعلوم الحاسبات / جامعة الكوفة

**الخلاصة :**

تمت دراسة التأثير التثبيطي للمستخلص المائي الحار لأوراق نبات الدفلة *Nerium oleander* على نمو بكتريا *Klebsiella pneumonia* و *Escherichia coli* حيث كانت بكتريا *E. coli* أكثر تأثر بالمستخلص المائي الحار وبلغ مقدار التثبيط 20 ملم عند التركيز 300 ملغم/مل و 13 ملم عند التركيز 150 ملغم / مل فيما بلغت نسبة التثبيط 18 ملم بالنسبة لبكتريا *K. pneumonia* عند التركيز 300 ملغم/مل و 5.14 ملم عند التركيز 150 ملغم / مل كما لوحظ ان معدل قطر التثبيط يزداد بزيادة التركيز للمستخلص . اظهرت الدراسة إمكانية الاستفادة من هذا المستخلص كعامل مساعد ضد الأمراض التي تسببها هذه البكتريا لما يحتويه هذا النبات من مركبات يمكن من خلالها القضاء على مسببات المرضية .

**المقدمة :**

تعد مقاومة البكتريا لفعل المضادات الحيوية إحدى أهم التحديات التي تواجه المختصين في المجال الطبي والصيدلاني، وقد لوحظ الانتشار الواسع لاستعمال المضادات بشكل عشوائي ودون اتمام مدة العلاج أدى الى تفاقم المشكلة (( Wise et al,1998 ، Aledort et al,2000 )

تعد بكتيريا *E. coli* من افضل الأمثلة المعروفة عن البكتريا المعوية كما انها على الأرجح من اكثر الكائنات الحية التي تمت دارستها بصورة شاملة. يسبب هذا الكائن التهابات القناة البولية والإسهال والتهاب السحايا. هناك المئات من السلالات المختلفة ضمن *E. coli* التي تتعاون بمستضداتها  $K_{H_2O}$  وقدراتها الايضية وحساسيتها للمضادات الحيوية واحتماليه توليدها للمرض. وفي السلالات التي تسبب الإسهال هناك على الأقل ثلاثة من العوامل التي تلعب دورا معينا في تلك الحالة : إنتاج التوكسين والقابلية على الافتعال بالامعاء والقره على غزو الخلايا المبطنه للأمعاء . وان قابليه بعض سلالات *E. coli* على تسبب التهاب السحايا ذات صلة بنمط معين من المستضد K.

تعيش *E. coli* في أمعاء البشر والحيوانات الاخرى وتكون سلالاتها المرضية للحيوانات غير ضارة للإنسان على العموم

تمثل *Klebsiella* من البكتريا المعوية ذات الأهمية الطبية حيث تسبب إصابات القناة البولية والدم والرئة. تكون أنواع *Klebsiella* مكبسلة وعديمة الحركة وجميع هذه الكائنات مسئولة عن الإصابات الخطيرة المكتسبة في المستشفيات من الماء الملوث والمحاليل المائية (الرجب والقزاز، 1986 )

**العلاج باستخدام النباتات الطبية**

بدأت الدراسة بهذا الموضوع منذ القدم وازدادت العناية باستعمال النباتات الطبية بعد ان تبين كفاءتها في القضاء على مسببات المرضية بجميع أنواعها حيث ان هذه النباتات تشكل مصدراً مهماً للمركبات التي تدخل في تحضير العقاقير الطبية المختلفة على أنها لا تحتوي في الغالب على مواد ذات تأثير جانبي ضار، لذا اتجه العلماء الباحثون في مختلف أنحاء العالم إلى دراسة النباتات الطبية ومعرفة تأثيراتها وفوائدها وذلك لأهميتها من الناحيتين العلمية والاقتصادية (الراوي ، 1973 ) . ومن النباتات المستخدمة هو نبات الدفلة *Nerium oleander* حيث يعتبر من النباتات المهمة كمحصول جني ألا انه يزرع في الدول كنبات زينة وعادة تزرع في الربيع والخريف عن طريق البذور وتحتوي الأوراق على عدة مواد مثل ( Nerine ، Oleandrine و Neriodorin ) كما يحتوي على زيوت أساس وحامض التانيك و Resin ، Wax ، Glycoside ( الراوي وفارتي ، 1964 ) كما يستخدم نبات الدفلة في علاج أمراض القلب فضلا عن استخدامها كمضاد بكتيري محصن وكمُنشط للقلب ومدرر وفي علاج الأورام الخبيثة وكذلك كمضاد للتشنج عند علاج الخناق الصدري كما تم استخدام النبات في علاج جميع أمراض الجلد كالطفح الجلدي والجرب والجدام والبثور من خلال تأثيرها على الطفيليات المسببة لتلك الأمراض كالقمل وخاصة في قتل اليرقات في الجروح ( Ballakgdar et al , 1991 ) ، كما استخدم نبات الدفلة في علاج القرحة والأمراض السرطانية ومسمار القدم ( Adome et al , 2003 ) ، ( Boulos , 2008 ) .

يعود نبات الدفلة الى عائلة Apocynaceae ويعرف محلياً بأسم Gandeera شجيري ، دائم الخضرة ، أملس ، يحتوي على عصير حليبي ، تترتب أوراقه بمجاميع ثلاثية (سوارية الترتيب) ذات سويقات قصيرة )

10-15 سم ) في الطول ، خطية إلى رمحية الشكل محتدة القمة ، ذات لون اخضر غامق ، لماع عند القمة ذات عرق وسطي قوي ، الأزهار وردية أو بيضاء اللون مخوص الكأس رمحية الشكل ( Hussain and Gorski 2004 ) يعتبر النبات من النباتات التي تتحمل الملوحة وتعرضه للشمس يؤدي الى تكشف الأزهار وهو ليس من نباتات الظل كما انه يتحمل مدى واسع من أنواع الترب وخاصة الرملية الجافة كما يمكنه النمو في الترب الفقيرة بالمغذيات المعدنية (المخصبات) ، كل أجزاء نبات الدفلة يحتوي على نوعين من السموم الأساسية Olendroside و Nerioside وقد شخّصت على انها مركبات كلايكوسيدية ويعد هذا النبات سام للماشية والإنسان في أي وقت بالسنة حيث سجلت وفيات للأطفال نتيجة تناول الاطفال لازهار الدفلة في الهند ( Popenoe, 2008) وفي دراسات عديدة استخدم دراسة التأثير التثبيطي لمستخلصات نبات الدفلة على نمو أنواع عديدة من البكتريا والفطريات وقد وجد تأثيرا واضحا على معدل نمو اقطارها كما اظهرت الدراسات إمكانية الاستفادة من هذه المستخلصات وخاصة الكحولية منها كعامل مساعد في أي برنامج مستقبلي للمكافحة البيولوجية او المكافحة المتكاملة من الامراض ( قاسم والبرهاوي، 2008 ؛ 2003 ، alkofahi and Abdelaziz ) ولأهمية هذا النبات من الناحية الطبية ولاستخدامه في علاج الطفيليات والمسببات الأخرى كالبكتريا والفطريات جاءت فكرة هذا البحث والتي تمحورت حول دراسة تأثير المستخلص المائي الحار لأوراق النبات الدفلة في معدل اقطار التثبيط لبكتريا *Klebsiella* و *Eschrechia coli* كونها مسببات مرضية خطيرة للإنسان والحيوان ومعرفة مدى مقاومتها لهذا النبات

**المواد وطرائق العمل**

## 1. جمع العينات النباتية Plants Collection

جمعت كمية كافية من أوراق نبات الدفلة ثم غسلت من الأتربة وفرشت في الظل بدرجة حرارة المختبر مع مراعاة التقليب المستمر بين الحين والآخر لمنع حدوث التعفن ، وعند جفافها سحقت بالمطحنة وحفظت في الثلاجة لحين الاستعمال .

## 2. تحضير المستخلص النباتي Plant Extract preparation

### المستخلص المائي Aqueous Extract

مستخلص الماء الحار

حضر المستخلص المائي الحار لأوراق نبات الدفلة بحسب طريقة ( Hernandez et al 1994 ) والتي تتضمن مزج كمية من المسحوق الجاف لكل أجزاء النبات المدروس مع كمية من الماء المقطر الحار بنسبة 1 غم : 2 مل ماء قطر وبأستعمال الخلاط الكهربائي Blender وبدرجة حرارة الغرفة ، ترك المحلول لمدة 24 ساعة ثم رشح الخليط الناتج بواسطة عدة طبقات من الشاش الطبي المعقم وزرع العالق الناتج من الترشيح في أنابيب اختبار الطرد المركزي بسرعة 3500 دورة/ دقيقة ثم أخذ الراشح لغرض التجفيف .

جفف المستخلص بالفرن الكهربائي بحرارة (40-45) مالمزود بمروحة هوائية لتجهيز تيار هوائي ساخن يساعد في التجفيف من ناحية ولتخفيف تأثير الحرارة على مكونات المستخلص من ناحية أخرى وبعد انتهاء التجفيف يتم وزن المسحوق الجاف وحفظه في قناني زجاجية محكمة الغلق في الثلاجة لحين الاستعمال .

**الكواشف التمهيدية الترسيبية (الأستدلالية) لمجاميع المركبات الكيميائية الثانوية لأوراق نبات الدفلة في المستخلص المائي**

**أولاً : كواشف التربينات Terpenoids Reagents**

### ● كاشف الرغوة Foam Reagent

يستعمل هذا الكشف للدلالة على وجود الصابونين Saponine برج قنينة محكمة الغلق تحوي على المستخلص المائي للنموذج وعند ظهور رغوة كثيفة فوق سطح المستخلص توصف النتيجة موجبة ( Harborne ، 1984 ) .

### ● كاشف كلوريد الزئبق Hgcl<sub>2</sub> Reagent

يستعمل هذا الكشف للدلالة على وجود الصابونين إذ يضاف 2:1 مل من كلوريد الزئبق الى 5 مل من المستخلص ، عند ذلك يظهر راسب أبيض دليلاً على وجود المواد التربينية (المختار، 1999) .

**ثانياً : كواشف الفينولات Phenoles Reagents**

### ● كاشف خلات الرصاص Lead acetate Reagent %1

يفيد في الكشف عن التانينات إذ تضاف كمية من الكاشف الى كمية مساوية من المستخلص المائي فيظهر راسب أبيض هلامي القوام (المختار ، 1999 ؛ السلامي، 1998)

### ● كاشف كلوريد الحديد FeCl<sub>3</sub> Reagent %1

يفيد في الكشف عن التانينات اليسيرة وذلك بإضافة كمية من الكاشف الى كمية مساوية من المستخلص المائي فيظهر راسب أخضر مزرق (Harborne, 1984)

- **كاشف هيدروكسيد البوتاسيوم 10% KOH Reagent**  
يفيد للكشف عن الفيورانوكومارين Furano Comarins (Harborne, 1984) والفلافونيدات Flaronoids (المختار ، 1994) إذ تضاف 10% من المحلول الكحولي لهيدروكسيد البوتاسيوم لكمية متساوية من المستخلص النباتي فيظهر لون أصفر أو أصفر مخضر (Harborne, 1984) .

#### ثالثاً : كواشف القلويدات Alkaloides Reagents

- **كاشف ماير Mayers Reagent**  
يفيد في الكشف عن عموم القلويدات ، يتم الكشف بأخذ (1-2) مل من الكاشف الى 5مل من المستخلص النباتي الذي تم الحصول عليه بالماء فيظهر راسب أبيض الى أسمر (Harborne ، 1984) .
- **كاشف دراكندروف Dragendroffs Reagent**  
يفيد في الكشف عن القلويدات البايروليديه ويتم الكشف بأخذ (1-2) مل من الكاشف وتضاف الى 5 مل من المستخلص المائي فيظهر لون برتقالي أو برتقالي محمر (Antherden ، 1969 ، السلامي ، 1998) .

#### تحضير تراكيز المستخلص النباتي

حضر المحلول الخزين Stock solution بأخذ 12.75 غم من المادة الخام الجافة وأذيب في 10مل من الماء المقطر المعقم وبذلك يكون تركيز المحلول الخزين 1275 ملغم / مل ومنه حضرت التراكيز المستعملة التي تتضمن (150 ، 300 ) ملغم / مل أما معاملة السيطرة فتمثلت بالماء المقطر فقط .

#### تشخيص بكتريا *Klebsiella* و *E. coli* ..

تم الحصول على عزلة من كلا النوعين من البكتريا المنمأة على وسط Nutrient agar والمشخصه في مختبر الأحياء المجهرية في مستشفى الحكيم من المصابين بالتهاب المجاري البولية بعدها تم تحضير العالق البكتيري بأخذ عدة مستعمرات بواسطة الناقل ونقلها الى انبوبة اختبار تحتوي على 5مل من المرق المغذي وحضنت لمدة 8 ساعات بدرجة 37م بعدها أضيف المحلول الفسيولوجي لكي تكون عكورته مقاربة للعكرة الموجودة في المحلول القياسي لأنبوبة ماكفرلاند رقم 0.5 الذي يقارب (1.5×10) خلية/مل.

#### دراسة تأثير المستخلص في نمو الجراثيم بطريقة الانتشار في الاكار Diffusion Method

**Agar**  
استعملت طريقة الانتشار في الاكار بواسطة الحفر (Egorove ، 1985) لدراسة تأثير مستخلص نبات الدفلة في تثبيط نمو بكتيريا الـ *Klebsiella* و *E. coli* وتضمنت هذه الطريقة عمل خمس حفر بقطر 6 ملم بواسطة الثاقب الفليني وبأبعاد متساوية ثم نشر 0.1 مل من العالق البكتيري ( المحضر في مختبر الأحياء المجهرية ) بواسطة الناشر بصورة متجانسة على وسط Nutrient agar (Oxoid U.K) ثم أضيفت التركيز المحضرة للمستخلص (150، 300) ملغم / مل بمقدار 0.1 مل لكل حفرة مع بقاء حفرة في الوسط تحتوي على ماء مقطر كسيطرة ، ثم حضنت الأطباق بدرجة 37 م لمدة 24 ساعة ويمكن معرفة فعالية فعالية المستخلص بقياس منطقة التثبيط بواسطة المسطرة حول كل حفرة .

#### النتائج والمناقشة

أظهرت نتائج الكشف الكيميائي التمهيدي إن نبات الدفلة يحتوي على الصابونين والتانينات وكذلك القلويدات وهذا ما أكده ( الراوي وفارتي ، 1964 ) من احتواء اوراق الدفلة على كلايكوسيدات وفينولات وتربينات ( جدول رقم 1) وبذلك فإن التأثير المثبط لهذا النبات على هذه الجراثيم المرضية يعود لوجود هذه المواد التي تمتلك خصائص علاجية للعديد من مسببات المرضية مما شجع على استخلاص المركبات الفعالة حياتياً من هذا النبات واختيار فعاليتها الدوائية وتسهيل الدراسات اللاحقة في مجال صناعة الأدوية لتصنيع علاجات ذات كفاءة عالية مع اختزال السمية.

#### جدول (1) يبين الكشف الكيميائي التمهيدي (الترسيبي) للمركبات الفعالة في المستخلص المائي لنبات الدفلة

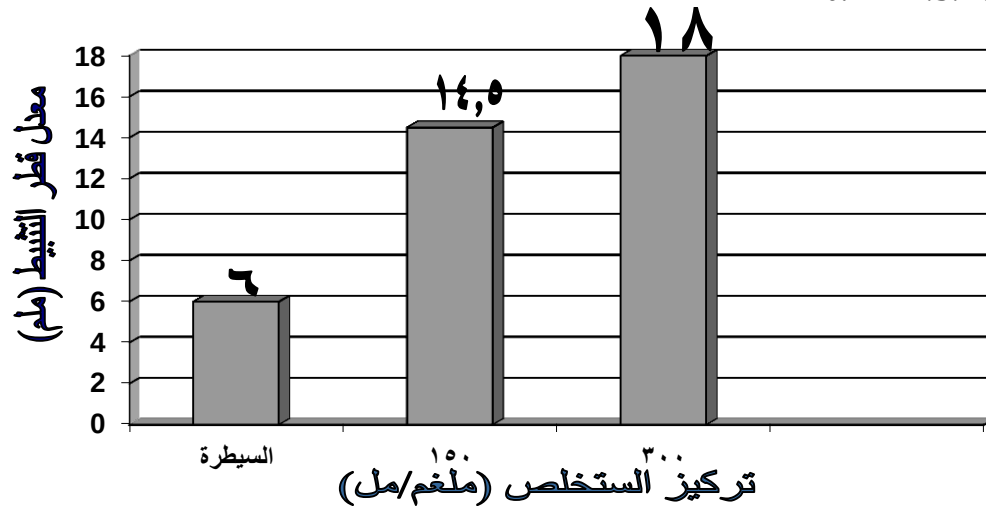
| المركب الكيميائي  | اسم الكاشف      | مستخلص اوراق الدفلة |
|-------------------|-----------------|---------------------|
| الصابونين         | الرغوة          | +                   |
| التانينات اليسيرة | كلوريد الحديدك  | +                   |
| القلويدات         | ماير- دراكندروف | +                   |

+ تعني ايجابية الكشف

#### تأثير تركيز مستخلص نبات الدفلة في نمو جرثومتي الاختبار

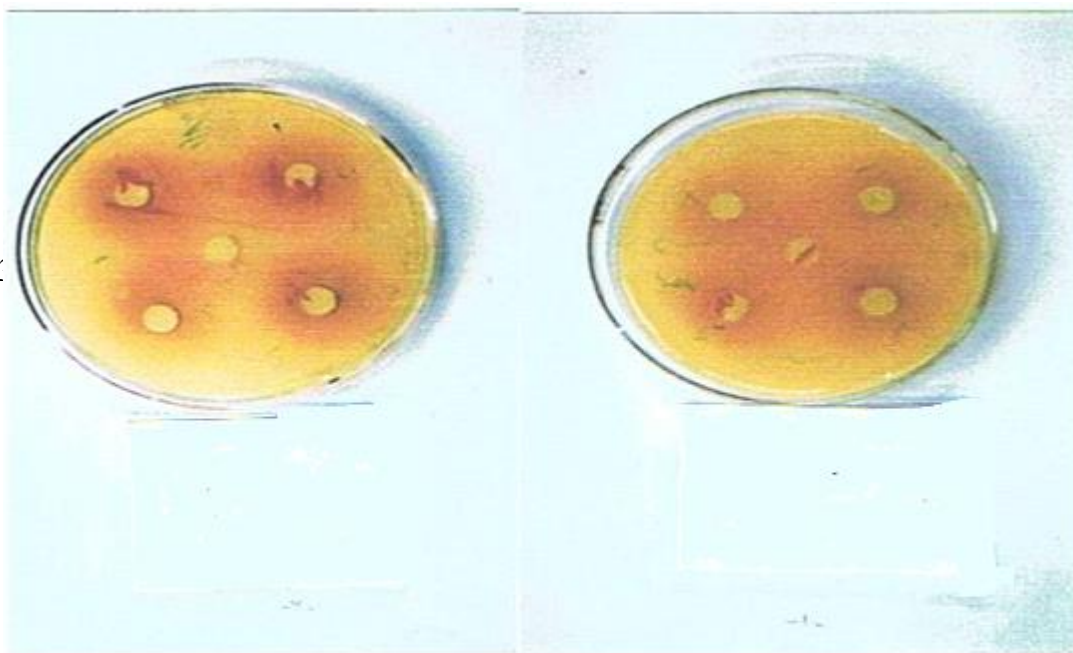
أثرت جميع تراكيز مستخلص نبات الدفلة في نمو بكتريا الاختبار وتناسب تأثيرها طردياً مع زيادة التركيز المختبرة (شكل 1 ، صورة 2) فالتركيز 300 ملغم / مل سبب تثبيطاً معنوياً في نمو البكتريا عن بقية التراكيز الأخرى إذ بلغ معدل قطر التثبيط بالنسبة للبكتريا *Klebsiella* ( 18 ملم ) تلاه التركيز 150ملغم / مل بقطر

تنشيط ( 5 . 14 ملم ) وهذه النتائج مماثلة لدراسات العديد من الباحثين الذين اكدوا فعالية مستخلص نبات الدفلة في تنشيط نمو العديد من الأحياء المجهرية ( قاسم والبرهاوي , 2008 ; Hussain and Gorsl ; 2004 ) .  
6.22 =L.S.D.



شكل (1) تأثير تراكيز مستخلص اوراق الدفلة في معدلات اقطار تنشيط نمو بكتريا *Klebsiella*

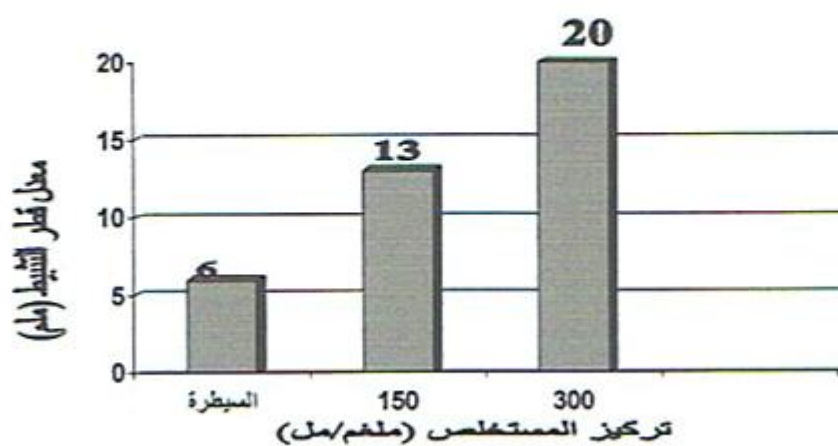
ملغم /مل



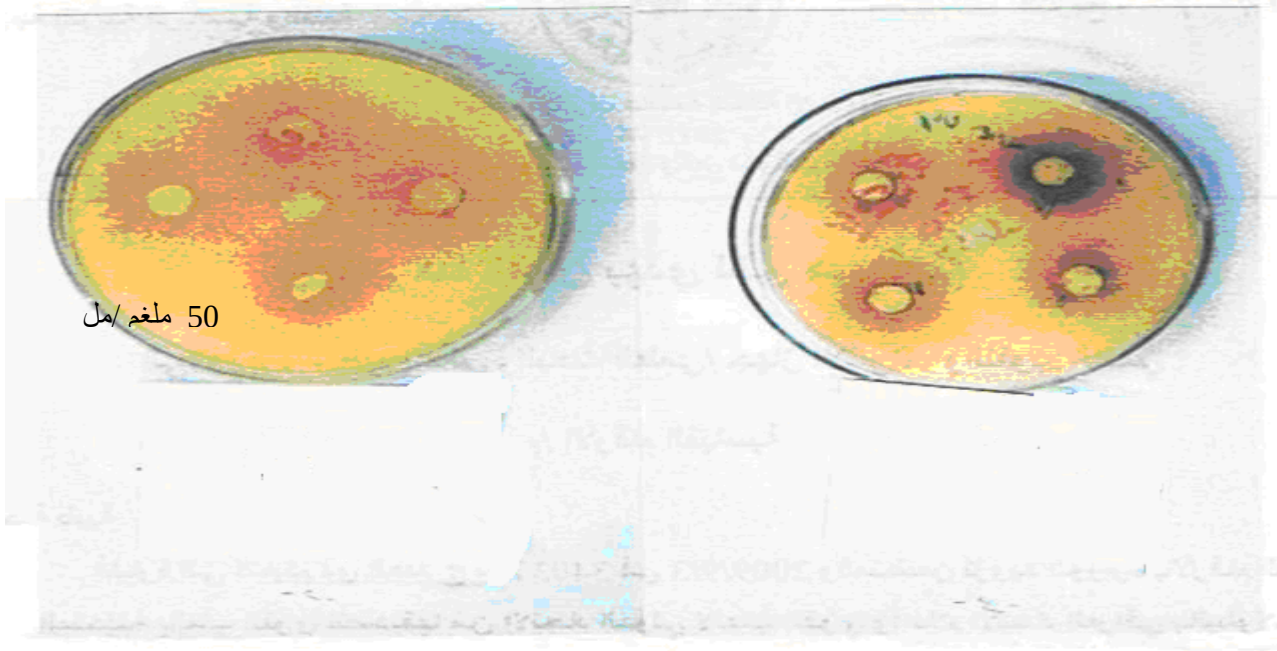
150 ملغم /مل

صورة رقم ١ تأثير مستخلص الماء الحار للنبات الدفلة في *Klebsiella*

أما بالنسبة لبكتريا *E.coli* فقد بلغ قطر التثبيط ( 20 ملم ) بتركيز ( 300 ملغم /مل ) وبلغ (13ملم) بتركيز ( 150 ملغم / مل ) ( شكل 2 ، صورة 2 )  
 $5.67 = L.S.D.$



شكل رقم ٣ تأثير تراكيز مستخلص اوراق الدفلة في معدلات انقطار تثبيط بكتريا *E. coli*



صورة رقم ٢ تأثير مستخلص الماء الحار للنبات الدفلة في *E.coli*

وقد يعزى السبب في تثبيط نمو البكتريا إلى وجود الفينولات التي تحتوي على مركب Coumarine التي تعد من مشتقات Phnylopropane التي لها فعالية تثبيطية ضد العديد من الكائنات خاصة الفطريات والبكتريا الموجبة والسالبة لصيغة كرام فضلا عن وجود مركبات 1.8-cineole : Alpha - pinene والتي تتمتع سمية عالية ( Taoubi et al 2002 ) إما التربينات وهي مركبات تتרכب من قواعد Isoprene فقد وجد إنها فعالية ضد البكتريا والفطريات والفيروسات والابتدائيات إذ إنها تساعد على تخريب غشاء الخلية لاحتوائها على مركبات Lipophilic وهذا يتفق مع ( Cowan ,1999 ) .

اما الزيوت الاساس فتحتوي على حلقة اروماتية حاوية على مجموعته ( OH ) القطبية والفعالة والتي تتمتع قابلية التفاعل والارتباط بواسطة الأواصر الهيدروجينية مع المجاميع الفعالة للانزيمات المساعدة وبالتالي تثبط نمو البكتريا وهذا يتفق مع ( Al-Ani et al , 1996 ) . وقد أشار Edmunds ( 1960 ) إلى إن زيادة الفعالية بزيادة تركيز المستخلص يعود لتأثير المستخلص على نفاذية غشاء الخلية وعمل الانزيمات الناقلة حيث يؤدي إلى تراكم المواد خارج غشاء الخلية وقابلية المستخلص على مسح البروتينات وإيقاف فعل الانزيمات المسؤولة عن سلسلة التفاعلات الايضية وهذا يؤدي إلى فقدان الكائن الحي القدرة على النمو والاستمرار .

#### المصادر العربية

الراوي ، علي (1973) . النباتات السامة الطبقة الثانية ، ص 93 – 94 من مطبوعات وزارة الزراعة العراقية

الراوي علي وجاكرة فارتي (1964) النباتات الطبية في العراق ، الهيئة العامة للبحوث الزراعية والموارد المائية ، المعشب الوطني العراقي

الرجب ، وفاء جاسم والقزاز حسن محمد علي (1986) علم الاحياء المجهرية الجزء الاول . 591-594 السلامي، وجيه مظهر (1998). تأثير مستخلصات نباتي المديد. *Convolvulus arvensis L.* والهاذل *Ipomoea cairica sweet* في الاداء الحيوي لحشرو من الحنطة *Homoptera: schizaphis graminum* Roud)Aphididae رسالة دكتوراه. كلية العلوم /جامعة بابل

المختار ، انتصار جواد عبد (1999) دراسة الخصائص الدوائية لبعض النباتات الطبية في بعض الديدان الطفيلية في الفئران المختبرية . رسالة ماجستير علوم - كلية الطب البيطري جامعة بغداد

قاسم ، ورقاء سعيد ورياض خليل البرهاوي ( 2008 ) التأثير التثبيطي لمستخلصات ازهار نبات الدفلة . *nerium olenderl* على نمو انواع مختلفة لجنس *altmaria* بحث جامعة الموصل ، كلية العلوم ، قسم

المصادر الاجنبية

**Adome ,R-O.; Gachihi, J-W. ; Onegi, B. ; Tamak, J. and Apio , S.O.(2003).** The cardiotoxic effect of crude ethanolic extract of *Nerium oleander* sciences , 3(2): 77-82

**Al-ani , A:B.; Nadi,M. and Al-khazraji, N,(1996).** The antimicrobial activity of volatile oils isolated from some Iraqi plants. Al-Anbar Univerity .J.,1(1):82-86.

**Aledort , J. ; Laxminarayan , R.; Howard , D.; Seiguer , E. and weldon , S. (2000).** International workshop on antibiotic Resistant : Global Policies and Options- Center for International Development . Harvard University , pp:1- 22.

**Alkofahi, A.S.; Abdelaziz , A.(2003).** Cytotoxicity, mutagenicity and antimicrobial activity of forty Jordanian medicinal plants . Pharmaceutical Biology, 28: 139-144

**Antherden , L . M . (1969). Bently and Drivers .** Text book of Pharmaceutical Chemistry 8 th ed . London . Oxford

**Ballakgdar, J; classe,r.; Fleurntin, J. and younos, C.(1991) .**Repertory of standard herbal drugs in moroan pharmacoepoea. J. Ethnopharmacol.35(2)123-143.

**Boulos, L; (2008). Medicinal plants of north Africa** reference publications , INC.

**Cowan ,M.,M.(1999). Plant** products as antimicrobial agents Clinical Microbiology Reviews ,12(4):564-582 .

**Edmunds, P.N.(1960).** .The growth requirement of *Haemophilus vaginalis*- path. Bact., 80: 325-335.

**Egorove, N.S.(1985).** Antibiotic scientific Approach. Mir Publishers . Moscow.

**Harborne ,G. B., (1984).** Phytochemical methods . Agued to modern techniques of plants analysis. second ed. chapman and hall .London. New York.

**Hernandez , M .; Lopez , R .; Abanas , R . M . ; Paris ,V .and Arias , A . (1994).** Antimicrobial activity of visnea mocanera leaf extracts . J . Ethano pharmacology , 41 :115- 119

**Hussain , M.A. and Gorski , M.S. (2004).** Antimicrobial activity of *Nerium oleander* linn. Asian Journal of plant Sciences 3(2): 177-180.

**Popenoe, J. (2008) Nerium oleander –** University Florida . Ifas Extension.

**Taoubi ; Traoulsi,A.F.; El-Haj,S.; Bessiere, J.M.and Rammal , S.(2002) .** Insecticidal properties of essential plant.oil against the Mosquito cultex pipiens molestus (Diptera : Culicidae) . Pest manag. Sci,58(5): 491-495.

Wise, R.,Hart,T.;Cars.O;Streulens,M.;Helmuth,R. and others. (1998).  
Antimicrobial resistance. B.M.J., 317 : 609-610

### **Abstract**

This study was concluded to test the inhibition effect of hot aqueous extract for leaves of *Nerium oleander L.* on the growth of the bacteria *Klebsiella pneumonia* and *Escherichia coli* which was the bacteria *E.coli* more effected by the hot aqueose extract with an inhibition diameter 20mm in the concentration of 300mg/ml and 13mm in 150mg/ml while the inhibition diameter was 18mm for the bacteria *Klebsiella pneumonia* in the concentration 300mg/ml and 14.5mm in concentration 150mg/ml and noted that the mean of inhibition diameter increased with increasing the concentration of the extract . The study was showed that the possibility usefulness of this extract like operative factor against the diseases that caused by this bacteria or any medical bacteria that because this plant contain compounds which could kill causes of diseases.