وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
رئاسة جامعة القادسية
كلية الطب البيطري

الفعالية التثبيطية لمستخلصات نبات الشفلح *Capparis spinosa* تجاه جرثومه العصية القولونية *Escherichia coli*

بحث مقدم الى مجلس كلية الطب البيطري وهو جزء من متطلبات نيل شهادة البكالوريوس في الطب البيطري

من قبل الطالبان:-

يوسف محمد جاسم فالح مهدي كرهب

بأشراف الدكتور :-

أ. م. د. اسعد جاسم عبد

إقرار المشرف/

أشهد بأن هذا البحث الموسوم:

(الفعالية التثبيطية لمستخلصات نبات الشفلح ***Capparis spinosa***

تجاه جرثومه العصية القولونية ***Escherichia coli***)

قد تم بأشرافي في كلية الطب البيطرية (جامعة القادسية)، وهو جزء من متطلبات نيل درجة البكالوريوس في الطب البيطري والتشخيص البيطري.

التوقيع :

أسم المشرف :

الدرجة العلمية :

التاريخ :

أقرار رئاسة الفرع /

نؤيد بأن كل من الطالبان :

يوسف محمد جاسم فالح مهدي كرهب

قد اكملا متطلبات بحث التخرج الموسوم:

(الفعالية التثبيطية لمستخلصات نبات الشفلح ***Capparis spinosa***
تجاه جرثومه العصية القولونية ***Escherichia coli***).

كجزء من متطلبات نيل درجة البكالوريوس في الطب البيطري والتشخيص.

مقررة المادة:

ر. الفرع :

بسم الله الرحمن الرحيم

وَهُوَ الَّذِي أَنزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ نَبَاتَ كُلِّ شَيْءٍ فَأَخْرَجْنَا
مِنْهُ خَضِراً نُّخْرِجُ مِنْهُ حَباًّ مُّتَرَاكِباً وَمِنَ النَّخْلِ مِن طَلْعِهَا قِنْوَانٌ دَانِيَةٌ وَجَنَّاتٍ مِّنْ أ
ًعْنَابٍ وَالزَّيْتُونَ وَالرُّمَّانَ مُشْتَبِهاً وَغَيْرَ مُتَشَابِهٍ انظُرُوا إِلَى ثَمَرِهِ
إِذَا أَثْمَرَ وَيَنْعِهِ إِنَّ فِي ذَلِكُمْ لآيَاتٍ لِّقَوْمٍ يُؤْمِنُونَ)

(الأنعام:٩٩)

صدق الله العظيم

الأهداء

إلى من جرع الكأس فارغاً ليسقيني قطرة حب
إلى من كلّت أنامله ليقدم لنا لحظة سعادة
إلى من حصد الأشواك عن دربي ليمهد لي طريق العلم
إلى القلب الكبير (والدي العزيز).

إلى من أرضعتني الحب والحنان
إلى رمز الحب وبلسم الشفاء
إلى القلب الناصع بالبياض (والدتي الحبيبة).

إلى القلوب الطاهرة الرقيقة والنفوس البريئة إلى رياحين حياتي (إخوتي)

إلى الروح التي سكنت روحي فلان
الآن تفتح الأشرعة وترفع المرساة لتنطلق السفينة في عرض بحر واسع مظلم هو بحر الحياة وفي هذه الظلمة لا يضيء إلا قنديل الذكريات ذكريات الأخوة البعيدة إلى الذين أحببتهم وأحبوني (أصدقائي).

الفهرس

الموضوع	الصفحة
الخلاصة	٢
الفصل الأول : المقدمة	٣
الفصل الثاني : المواد وطرائق العمل	٤
أقراص المضادات الحيوية **Antibiotic discs**	٦
تحضير المستخلصات الكحولية	٦
اختبار الفعالية التثبيطية لمستخلص النبات والمضادات الحيوية	٨
النتائج والمناقشة	٩
الاستنتاج والتوصيات	١١
المصادر	١٢

ABSTRACT

This search was conducted to study the inhibitory activity of *Capparis spinosa* alcoholic extracts against *Escherichia coli*. Extracts prepared in different concentrations (100,200,400) mg/ml and agar diffusion method was used to studying this activity.

The 300mg concentration give highly significant effect on inhibition of E.coli compare with others concentration.

Also the E.coli isolate was resistances to antibiotic. Azteonam(ATM) ، Kanamycin(K) ، Cloxacillin(cx).

الخلاصة

أجرى هذا البحث لدراسة الفعالية التثبيطية للمستخلص الكحولية تجاه جرثومه العصيه القولونيه . حضر المستخلص بتراكيز مختلفة (400,200,100) ملغم/سم 3 وأستخدمت طريقة الأنتشار في الأكار لدراسة هذة الفعالية التثبيطية. كما قورنت النتائج مع نتائج حساسية الجرثومه المدروسة تجاه مجموعة من المضادات الحيوية.

أظهرت نتائج الدراسة الحالية لمستخلص الكحولي للأوراق وجذور نبات الشفلح تأثير تثبيطي على جرثومه العصية القولونية حيث أظهرت تركيز ٤٠٠ ملغم /سم٣ فارق معنوي مقارنهة مع التراكيز الأخرى. لوحظ مقاومة العزلة المستخدمة لبعض المظادات الحياتية Azteonam(ATM) ، Kanamycin(K) ، Cloxacillin(cx) ، بينما كان هناك تأثير تثبيطي للعملة المستخدمة من الأنواع الأخرى.

الفصل الأول:

المقدمة ...

عرف الإنسان منذ وجوده على سطح الأرض أسلوب العلاج بالأعشاب والنباتات الطبيعية بالفطرة والتجارب الذاتية، إذ كانت جميع الأمراض والآلام تعالج بالأعشاب وبالرغم من التقدم العلمي والتكنولوجي لصناعة الأدوية الطبية الكيميائية التي لها تأثيرات فعالة وسريعة في كثير من الأمراض، إلا أن الفوائد العلاجية للأدوية الطبية الكيميائية تشكل سلاحًا ذا حدين لما لها أضرار جانبية .إن الاستخدام الخاطئ والعشوائي لهذه الأدوية أدى إلى زيادة المقاومة الجرثومية لها إذ ظهرت سلالات ذات مقاومة عالية ولهذا السبب وغيره تزايد الاهتمام باستخدام النباتات الطبية كبديل ملائم لهذه العلاجات .(2,1) نبات الشفلح يعود إلى العائلة Capparidaceae وهو نبات معمر دائم الخضرة ذي لون أخضر مزرق، الأفرع زاحفة والأوراق سميكة ذات أذينات شوكية، الأزهار كبيرة والثمرة لبية تشبه في شكلها الكمثرة محمولة على عنق طويل، يتفاوت كبر الأوراق والأزهار من نوع إلى آخر حيث يوجد (250) نوعًا ويعرف الشفلح بعدة أسماء على مستوى الوطن العربي منها كبار، وقبار، *Capparis*ولصف، وقطن، وفلفل الجبل، وغيرها .أما من الناحية العلمية فيعرف باسم *Capparis cantilaginea*أو *spinosa* وتستعمل جميع أجزاء النبات بما في ذلك الجذور في الاستخدامات العلاجية وخصوصًا براعم الأزهار والثمار العنابية اللون التي تشبه الكمثرة ولكن أصغر بكثير من حجمها .(5,4,3)استخدم نبات الشفلح منذ القدم في علاج الكثير من الأمراض حيث استعملت الجذور مقوية وقابضة ومدررة للبول، وقشر الجذر فاتح للشهية وقشر الساق مدرر للبول ومقوي ولعلاج النقرس والرماتيزم ومسهل وطارد للبلغم ولأمراض الصدر، واستخدم منقوع قشر الساق والجذر لعلاج الإسهال والحمى، أم البراعم الزهرية والجذور لتطهير الكلى ومدرة للبول ولعلاج تصلب الشرايين وضد البرد والقشعريرة كما استخدمت الثمار الطازجة لعلاج الاسقربوط، ومنقوع الثمار لعلاج عرق النسا ومرض الاستسقاء، (7,6).

يحتوي نبات الشفّلح على مكونات فعالة عديدة مثل كلايكوسيدات Glycosides وانزيم المايروسينيز Myrosinase، وحامض الروتيك Rutic acid وحامض الكابرويك Caproic acid وحامض البكتيكPectic acid ومواد الصابونينSaponin ومواد قلويدية مثل الاستاكيدرين Stachydrine ومركبات فلافونيديةFlavonoides ولليربنس Lerpenes (7).

لقد أجريت دراسات حديثة وعديدة تبين فعالية نبات الشفلح بأنه مضاد للالتهابات وذو كفاءة عالية في مقاومة الحمى، كما أثبت علميًا أن براعم الأزهار ملينة وتخفف الآلام المعدة وأن لحاء الجذر مطهر

ويوقف النزيف الداخلي ويستخدم لعلاج الحالات الجلدية ويخفض نسبة سكر الدم وكغرغرة للاسنان والتهابات الحلق، وان مستخلص نبات الشفلح له قدرة كبيرة على قتل الكائنات الدقيقة (البكتريا والفطريات)(8).

ونظرا لتواجد هذا النبات بصوره واسعه في قطرنا وينمو بصوره طبيعيه من هنا فأن هدف هذه الدراسة تحضير المستخلص الكحولي لمختلف أجزاء نبات الشفلح وبيان فعاليتها ضد جرثومه العصيه القولونيه ومقارنة ببعض المضادات الحيوية.

الفصل الثاني

المواد وطرائق العمل: -

١ -المواد

جمع النبات وتصنيفه Classification and collection of the plant

جمع نبات الشفلح *Capparis spinosa* من أطراف مدينة الديوانيه، وصنفَّ النبات بالاعتماد على مصادر تصنيف (النباتات10,9) .

وتصنيفه العلمي كما يلي:-

Kingdom	Plantae-plants
Sub kingdom	Tracneobionta-vascular plants.
Super division	spermatophyta-seed plants.
Division	Magnoliophyta-flowering plants.
Class	Magnolio psida-Dicotyledons
Subclass	Dilleniidue
Order	capparales
Family	cappareae-caper family
Genus	capparis L.-caper
Species	*capparis spinosa* L.[Excluded-coper]

نظفت نبات الشفلح (جميع أجزاءه) مما علق بها من التراب والأوساخ، وحفظت في ظروف خالية من الرطوبة في مغلفات ورقية، وجففت في الظل في درجة حرارة الغرفة بوجود تيار هوائي مناسب وأجريت عليه عملية التقليب بصور مستمرة لمنع التعفن.

*العزلات البكتيرية:-

استخدمت في هذه الدراسة عزلتين من جرثومه E.coli المعزولة في فرع الاحياء المجهرية، كلية الطب البيطري، جامعة القادسية تم تأكيد تشخيصها استنادًا إلى الطرق المجهرية والزرعية .

والاختبارات البايوكيميائية الملائمة واستنادًا إلى، (13,12) .

***اقراص المضادات الحيوية Antibiotic discs:-**

الأقراص التي استخدمت في فحص الحساسية للمضادات الحيوية مجهزة من قبل شركة(.Cypress Daignostics) موضحة في الجدول(1).(14)

الجدول رقم :(1) أنواع وتراكيز المضادات الحيوية المستخدمة في فحص الحساسية

Sensitive S	Intermediate I	Resistant R	التركيز مايكروغرام/قر	المضاد الحيوي
≥ 23	18-22	≤ 17	30	Azteonam(ATM)
≥ 18	13-17	≤ 12	5	Cloxacillin(CX)
≥ 18	14-17	≤ 13	15	Clarithromycin(CLR)
≥ 19	15-18	≤ 14	10	Imipenem(IPM)
≥ 18	13-17	≤ 13	30	Kanamycin(K)
≥ 21	16-20	≤ 15	50	Sulfamethoxazole(SMZ

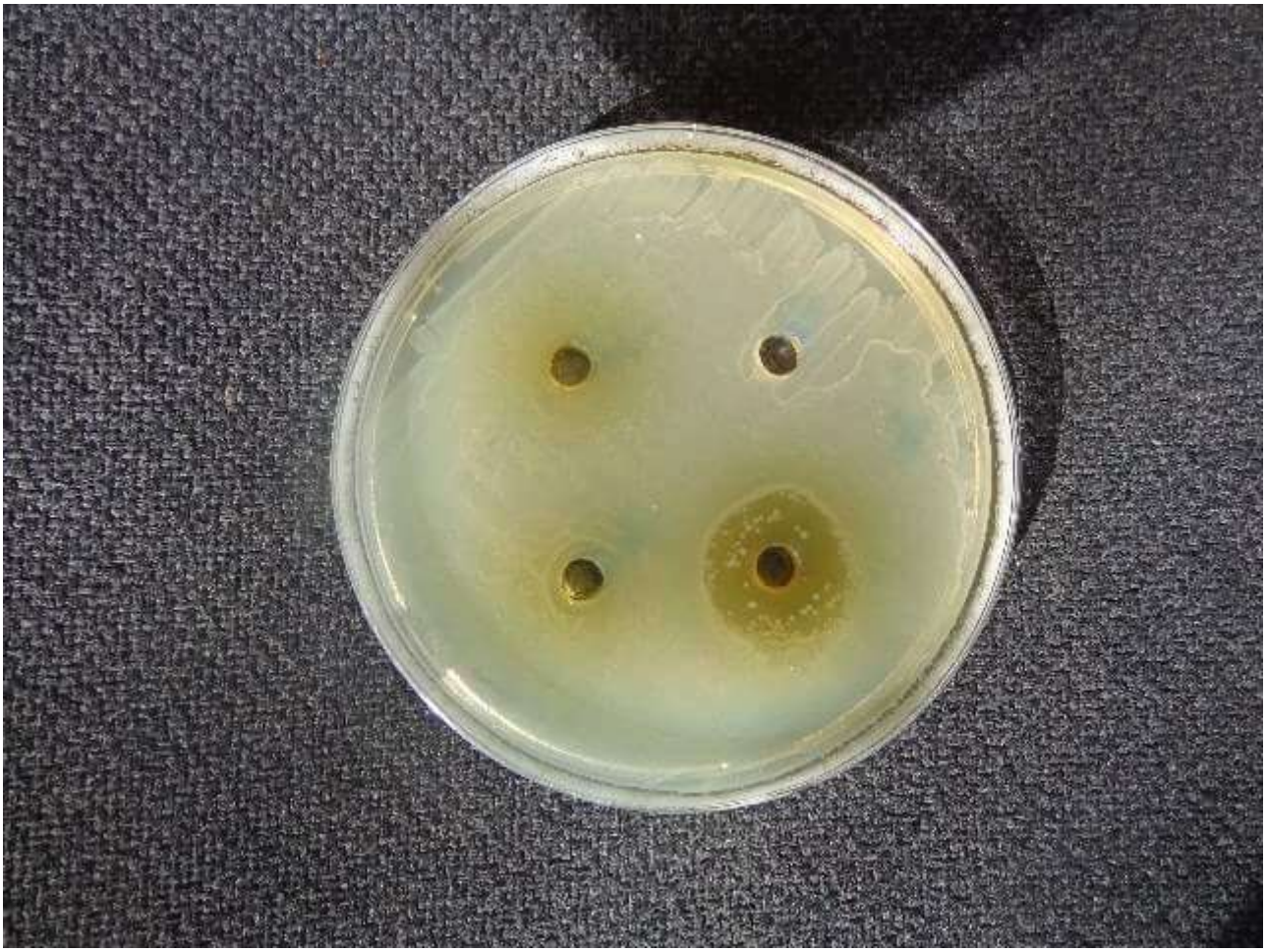
طرق العمل

***تحضير المستخلصات الكحولية**

حضر المستخلص الكحولي من أجزاء الشفلح(الأوراق، الجذور) حسب ما جاء في (16,15) وذلك بمزج 50 غرام من النموذج مع 250 سم ٣ من الكحول الايثانول 95 % ، وتم التخلص من المذيب باستخدام جهاز الدوار (Rotary Vaccune vaporation) المجهز من شركة Electrothermal الإنكليزية حيث أن الجهاز يعمل على أساس التبخير تحت ضغط مخلخل ودرجة حرارة لا تزيد عن وبعد تبخير جميع الإيثانول الموجود في المزيج لوحظ تكون طبقة سميكة من 40 ° م المستخلص الذي جفف بالتبريد تحت ضغط مخلخل بجهاز التجفيد وحفظت النماذج بالتجميد في قناني زجاجية ذات غطاء محكم لحين استخدامها.ثم تحضير المستخلص الكحولي للنبات وذلك بوزن 1 غرام واحد من المستخلص وإذابته في (1 سم٣) ، (2سم٣) ، (3 سم٣) من مادة Dimethyl Sulfoxide (DMSO) للحصول على التراكيز(300,200,100) ملغم/سم٣ على التوالي ثم عقم بطريقة البسترة بدرجة 62 لمدة 15 دقيقة (17). وكما في الجدول التالي.

نوع المستخلص	التركيز المستخدم	قطر تثبيط النمو بالملك + - الخطأ القياسي
المستخلص الكحولي للجذور	100 ملغم/سم٣	1.28 +_ 8.91 A
	200 ملغم/سم٣	1.12 +_ 9.3 A
	400 ملغم/سم٣	0.94 +_ 10.24 B
	100 ملغم/سم٣	0.22 +_ 9.14 A
	200 ملغم/سم٣	0.13 +_ 9.98 A
المستخلص الكحولي للأوراق	400 ملغم/سم٣	0.24 +_ 16.84 B

جدول (٢) تأثير مستخلص الجذور والأوراق لنبات الشفلح ضد نمو جرثومة العصية القولونية في الأطباق



صورة توضح الفعالية التثبيطية لمستخلص نبات الشفلح اتجاه البكتريا العصيه القولونية

صورة توضح الفعالية التثبيطيه لمستخلص جذور الشفلح ضد البكتريا العصية القولونية

***اختبار الفعالية التثبيطية لمستخلص النبات والمضادات الحيوية.**

اختبرت الفعالية التثبيطية للمستخلص الكحولي لنبات الشفلح على نمو البكتريا قيد الدراسة باستخدام طريقة اختبار الحساسية(طريقة الانتشار بالاقراص) وبالاعتماد على طريقة Bauer وجماعته سنة 1966حيث حضر المعلق البكتيري في وسط المرق المغذي وبتركيز 10^8 خلية /سم^3 وذلك بالمقارنة مع انبوب السيطرة القياسي رقم واحد، نقل 0.1 سم^3 من المعلق البكتيري ولقح باستخدام ماسحة قطنية معقمة على وسط أكار مولر هنتون (Muller – Hinton agar) ثم حضنت الأطباق بدرجة حرارة 37

°لمدة 30 دقيقة لكي يحصل التشرب .بعد ذلك وضعت أقراص من ورقة الترشيح (WhatmanNo- 1 (بقطر 6 ملم مشبعة بالتركيز(300,200,100) ملغم/سم٣ من المستخلص النباتي من خلال غمرها بالمستخلص وثبتت الأقراص بواسطة ملقط معقم على سطح الأطباق الملقحة وحضنت بدرجة حرارة 37 °لمدة 24 ساعة وبعد انتهاء مدة التحضين تم قياس اقطار التثبيط حول القرص المشبع بالمستخلصات النباتية .وأجرى أختبار الحساسية للمضادات الحيوية بأتباع نفس الطريقة أعلاه وبأستخدام أقراص المضادات الحيوية.

النتائج والمناقشة:

يبين الجدول رقم (2) الفعالية التثبيطية للمستخلصات النبات للأجزاء المختلفة من نبات الشفلح على الجرثومة

المدروسة ضمن التراكي(200,100 ,400) ملغم/سم3 ، وقد أظهرت النتائج تباين في تأثرها تبعًا للتراكيز المستخدمة والجزء المستخدم من نبات الشفلح (الأوراق والجذور) .

حيث لوحظ وجود فارق تثبيطي حسب التراكيز المستخدمة للمستخلص الكحولي للأوراق والجذور حيث اعطى التركيز (400) اعلى تأثير تثبيطي على جرثومة العصية القولونية وهذا يتفق مع (٢٣) حيث اشار الى أن المستخلص الكحولي كان الأكثر تأثيرًا مقارنة بالمستخلصات الأخرى، وقد يعود إلى فعالية المستخلص الكحولي في تثبيط البكتريا أو إلى أن المركبات الفعالة قد تكون لها قابلية على الذوبان في المذيبات العضوية.

وعند إجراء مقارنة لتأثير المستخلصات الكحولية لنبات الشفلح مع عدد من المضادات الحيوية المستخدمة تجاه البكتيرية المعزولة كما في الجدول (3) فقد وجد أن التأثير التثبيطي لمستخلص الثمرة الكحولي وبتركيز (٤٠٠) كان أفضل من مضادات GRS , ATM , K . حيث لم تعطي المظلات الحياتي تأثير تثبيطي على الجرثومة العصية القولونية ، في حين أن المستخلص الكحولي قد أعطى تأثيرًا واضحًا وأفضلية على مضادات وبقطر تثبيط (16.48) ملغم/سم٣ على جرثومه E.coli .

جدول (3) تأثير المضادات الحيويه على نمو جرثومة العصي القولونية في الاطباق.

نوع المزاد الحيوي	قطر تثبيط النمو بالملم	النتيجة
Azteonam(ATM)	7.5± 0.9	مقاومة
Cloxacillin(CX)	0 ±0	مقاومة
Clarithromycin(CLR)	30 ±0.2	حساسة
Imipenem(IPM)	12.2 ±1.8	مقاومة
Kanamycin(K)	27.5 ±1.4	حساسة
Sulfamethoxazole(SMZ)	34.2 ± 1.22	حساسة

صورة توضح الفعالية التثبيطيه للمزادات الحياتية نجاة البكتيرية العصية القولونية

ونلاحظ من نتائج جدول (٣) الذي يوضح التأثير التثبيطي في حالة زيادة تركيز المستخلص الكحولي بتركيز(400) ملغم/سم٣ إن زيادة التركيز أدى إلى زيادة في قطر التثبيط البكتيرية **E.coli** بأقطار تثبيط ، (16.24ملم) وقد يعود ذلك إلى زيادة المركبات الفعالة الموجودة في الثمرة وهي كلايكوسيدات البروتين Glycosides Rutin ، وانزيم المايروسينيز Myrosinase وحامض الروتيك Rutic acid وحامض الكابرويك Caproic acid وحامض البكتيك Pectic acid ومواد الصابونين Saponin وفلافونيدات Flavonoides التي لها فعالية تثبطية للبكتريا والفطريات، وهذا يتفق مع دراسة (8) لأنواع أخرى من الشفلح حيث لاحظ تأثيرها التثبيطي للبكتريا السالبة لصبغة كرام في حين لم يتفق مع نتائج دارستنا من حيث تأثيرها التثبيطي على البكتريا الموجبة التي لم تتأثر بمستخلصات أجزاء الشفلح المستعمل في هذه الدراسة.

الاستنتاج:

١- لوحظ وجود تأثير تثبيطي للأوراق نبات الشفلح اكثر من التأثير التثبيط الجذور عل الجرثومة العصية القولونية.

٢- وجود مقاومة العزلة المستخدمة التثبيط المضادات الحياتية وهذا يعطي أهمية للنبات المستخدم.

التوصيات:

١- استخدام أجزاء أخرى من النبات وكالثمار او خليط من أجزاء النبات.

٢- دراسة تأثير مستخلصات أخرى على أنواع عديدة من الجراثيم.

٣- استخدام المزادات الحياتية مع مستخلص النبات ودراسة تأثير التأزري .

المصادر

1- Adwan, G. M.; Abu-Shanab, B.A. and Adwan, K. M. (2008) In vitro activity of certain drugs in combination with plant extracts against *staphylococcus aureus* infections. Pak. J. Med. Sci., 24(4): 541-544.

٢- (سالم، مختار) ١٩٨٧ (أعشاب لكنها دواء، دار المريخ للنشر، الرياض.

٣- (مجيد، سامي هاشم ومحمود، مهند جميل) ١٩٨٨ .(النباتات والأعشاب العراقية بين الطب الشعبي والبحث العلمي .مطابع دار النورة، جامعة بغداد، العراق.

4- Inocencio, C.; Falcaraz, F. Calderon, C.; Obon, D. and Rivera.(2002). The use of floral characters in capparis Sect. capparis to determine the botanical and geographical origin of capers European food. Res. Techonol., 214(4): 335-339.

5- Fici, S. (2002). "Intraspeicfic Variation and evolutionary trends in capparis spinosa L.(Capparaceae)" plant systemat. Evol., 228(3-4): 123-141.

6- Ageel, A. M.; Parma, N.S.; Mossa, J.S.; Al-yahya, M.A.; Al-Said,M.S. and Tariq, M. (1986). Anti-inflammatory activity of some Saudi Arabian medicinal plants Agents-Actions, 17(3-4): 383- 384.S.

7) Hussein, F.T.K. (1985). "Medicinal plants in Libya", Arab ncyclopedia house.

7- Sama, W. and Ajaiyeoba, E. O. (2006). Phytochemical and Antimicrobial studies of capparis thonningii and capparis tomemtosa. Journal. 2 (6): 119-122.

8- Townsed, C.C.; Geuest, E., Omar, S. A. and Al-Khayat, A. H.(1980). Flora of Iraq, Vol. 8, Ministry of Agriculture and Agraian Reform, Baghdad.

9- Baily, L.H. (1977). Manual of cultivated plants. 16th ed., vol. 1,2 and 3 macmilian publishing Co., Inc.

10- Issa, A. (1981). "Diction are Des Noms Des Plant". Dar Al-Raed Al-Arabi. Beirut, Lebanon.

11- Benson, H.J. (2002). "Microbiological Application". 8th ed.McGraw-Hill companies, Inc., U.S.A.

12- Prescotte, L.M.; Harely, T.P. and Klein, D.A. (2002)."Microbiology" 4th ed. Mc Graw-Hill companies, Inc. U.S.A.

13- Vandepitte, J.; Engback, K.; Piot, P. and Heuk, C. (2003). "Basic Laboratory Procedures in clinical Bacteriology". World Health Organization, Geneva.

14- Adomi, P.O. (2006) Antibacterial activity of aqueous and ethanol extracts of the stem bark of alstonia boonei and Morineda Lucida. Sci., Res. Essays., 1(2): 50-53.

15- El-stal, A. Y.; Ashour, A. and Kerrit, A.A.M. (2005). Antimicrobial activity of some medical plant extracts in alestine Park. J. Med. Sci., 21(2): 187-193.
16- Shareef, A. Y. (1998). The molecular effect of some plant extract on the growth and metabolism of some gram positive and gram negative bacteria. Ph.D. Thesis, Coll. Sci.Univ. Mosul, Iraq.

17- Bauer, A.w.; Kirbay, W.A.M.; Sherris, J.S. and Turk, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standard single disc method.Am.J. Clin. Pathol., 45: 493-496.
18- Pyun, M. S. and Shin, S. (2006). Antifungal effects of the Volatile oils from Allium plants against, Trichophyton species and synergism of the oils with Keto conazole. Phyto medicine, 13: 394- 400.
19- Bonjar, S.(2004). Evaluation of antibacterial properties of some medicinal plant used in Iran. J.E.P.94:301-305.
20- Parekh, J. and Chanda, S.(2007). In vitro screening of antibacterial activity of aqueous and alcoholic extract of various Indian plant species againt selected pathogens from Enterbacteriaceae. Afr.J. Microbiol . Res., 1(6):92-99.
٢١- النعيمي، رشا جمال الدين مصطفى، (٢٠٠٩) تأثير المستخلص المائي لنبات الشفّلح Capparis spinosa في التغيرات المرضية لأكباد الجرذان البيض المستحدث تجريبيًا بعقار الباراسيتامول .رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة الموصل.