---- مجلة علوم الرافدين، المجلد 19، العدد 3، ص1-19، 2008 ----

التأثير التثبيطي لأوراق نبات الحناء *Lowsonia inermis* على أفراد النوع *Staphylococcus aureus* المعزولة من اخماج جلدية مختلفة

رواء محمود حموشي
كلية علوم البيئة وتقاناتها
جامعة الموصل

عبد الرزاق خضر محمود
قسم علوم الحياة
كلية التربية
جامعة الموصل

(تاريخ الاستلام 2007/5/7 ؛ تاريخ القبول 2008/4/7)

الملخص

تضمنت الدراسة عزل وتشخيص جراثيم المكورات العنقودية الذهبية *Staph. aureus* من اصابات جلدية مختلفة من ردهة الجراحة العامة وردهة الحروق ووحدة الطوارئ واستشارية الجلدية في مدينة طب الموصل. جمع (247) عينة شكلت جرثومة *Staph. aureus* (155) عزلة بنسبة (62.7%) واعطت اعلى نسبة (76.1%) من حالات داء القوباء المعدي في حين عزلت باقل نسبة من اصابات الجروح بنسبة (37.5%). حضرت المستخلصات المائي، الكحولي، الايثر البترولي، البنزين، الكلوروفورم والايستوني لاوراق نبات الحناء وتمت دراسة الفعالية التثبيطية لكل منها على العزلات المختلفة للجرثومة. حدد التركيز المثبط الادنى MIC والتركيز القاتل الادنى MBC لهذه المستخلصات وكان المستخلص الاسيتوني الافضل في التاثير وان الـMIC له مساويا لـ(0.5) ملغم/سم^3 والـMBC له مساويا لـ(1.0)ملغم/سم^3 ضد جميع العزلات الجرثومية المستخدمة في دراسة. وتباينت قيمة الـMIC والـMBC حسب نوع المستخلص ومنطقة العزل وتم اختيار المستخلص الاسيتوني لاختبار فعاليته داخل جسم الكائن الحي *in vivo* إذا اظهر تأثيرا جيدا في شفاء والتئام الجروح التجريبية والمخمجة بجرثومة *Staph.aureus* في الأرانب البيضاء نوع Albino وبفترة زمنية أقصاها عشرون يوماً.

Inhibitory Effect of *Lowsonia inermis* Leaves on *Staphylococcus Aureus* Isolated from Different Cutaneous Infections

Rwa'a M. Hamoshi
College of Environmental Science and Technology
Mosul University

A bdul Razak K. Mahmood
Department of Biology
College of Education
Mosul University

ABSTRACT

The study included the isolation and identification of *Staph. aureus* from different cutaneous infections in the emergency unit, and out patients of dermatology clinic both within the Mosul Medical City. (247) samples were collected, (155) of them were of *Staph. aureus* at a ratio of (62.7%). The highest rate Staphylococcal infection (76.1%) was isolated from impetigo while the lowest rate (37.5%) was isolated from infected wounds. The inhibitory effect alcoholic and aqueous, petroleum ether, benzene, chloroform, and acetone of Lowsonia Inermis leaves against the isolates of *Staph. aureus*. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the Minimum Bactericidal Concentration (MBC) determined for these extracts.

The results indicated that the acetone extract showed the best effect on bacteria and the MIC was (0.5 mg/cm^3) and the MBC equal to (1.0mg/ cm^3) against the tested bacteria. The MIC and MBC differs according to the type extract and the region of isolation .

The Acetone extract was chosen to test its effect *in vivo* , this extract showed good results in treating the experimental wounds which were artificially infected with *Staph. aureus* using the Albino rabbit as experimental model for maximum period of twenty days .

المقدمة

تشكل امراض المكورات العنقودية اكثر من 80% من الامراض القيحية المسجلة في المراكز الطبية، اذ تحدث معظم امراض المكورات العنقودية بين المرضى الراقدين في المستشفيات الذين يعانون ضعفا في ميكانيكيات دفاعات اجسامهم الطبيعية (Higaki *et al.*, 1999).

ازدادت في السنوات الأخيرة وبشكل مثير الاخماج المرتبطة بالمستشفيات والتي تسببها سلالات المكورات العنقودية المتعددة المقاومة للمضادات الحيوية، إذ تظهر بعض السلالات حاليا مقاومة لاكثر من 20 مركبا مضادا للجراثيم بضمنها المطهرات Antiseptics (Aries-de-sousa *et al.*, 2000).

أجريت العديد من الدراسات في استخدام النباتات بوصفها عوامل مضادة للجراثيم المسببة لاخماج الجروح وعوامل مساعدة في شفاء الجروح والتئامها عن طريق دراسات خارج الجسم الحي وداخله (Rasik *et al.*, 1999).

ويعد نبات الحناء *Lowsonia inermis* واحدا من هذه النباتـات الـذي ينتمـي للعائلـة الحنائيـة Lythraceae (الحسيني، 2003)، حيث استخدمت الاوراق التي تحتوي على مادة رئيسة معروفـة باسـم اللاوسون Lawsone (2-hydroxy-1, 4-naphthoquinone) وهـي المـادة المسـؤولة عـن التـاثير البايولوجي طبيا وعن الصبغة واللون البني المسود. وتحتوي ايضا على مركبات ومـواد اخـرى مثـل Glycosides وXanthones وCoumarins وFlavonoids وMucilage وResin وMannite وFat. وتحتوي ايضـا علـى تانينـات تعـرف باسـم Hennatannin وHenna tannic acid. كمـا تحتـوي ازهـار الحنـاء زيـت طيـار Volatile Oil لـه رائحـة زكيـة وقويـة واهـم مكوناتـه مادة α and B ionone (Hatton, 1999). استخدمت الحناء لعلاج الكثير من الأمراض الجلديـة حيـث استخدمت لعلاج الحروق والجروح وكذلك ساعدت على ايقاف الالتهابات. (Dahanukar *et al.*, 2000).

تهدف الدراسة الى اختبار الفعالية التثبيطية للمستخلصات المـائي والكحـولي والايثـر البترولـي والبنزين والكلوروفورمي والاسيتوني لأوراق النبات على جرثومة Staph. aureus المعزولة من اخمـاج جلدية مختلفة وإيجاد التركيز المثبط الأدنى MIC والقاتل الأدنى MBC وتأثير هذه المستخلصـات فـي الجروح التجريبية للأرانب المخمجة بالجراثيم المعزولة.

المواد وطرائق العمل

جمع العينات

استخدم في عملية جمع العينات مسحات قطنية معقمة للاصابات الجلدية المختلفة واسـتخدم وسـط نقيع الدماغ والقلب كوسط ناقل للعينات لحين وصولها للمختبر بفترة زمنية لا تتجاوز الثلاث ساعات ثـم حضنت المزارع في درجة حرارة 37م° لمدة 24 ساعة.

الزرع والتشخيص

تم زرع العينات على وسط Blood Agar وحضنت الاطبـاق فـي درجـة حـرارة 37م° لمـدة 18-24 ساعة وبعد ظهور النمو تم اخذ المستعمرات المنفردة المعزولة واعيد زرعها علـى وسـط ملـح المانتيول اذ حضنت الاطباق في درجة 37م° لمدة 18-24 ساعة. اخـذت المسـتعمرات المنفـردة التـي اتصفت بانها دائرية ذات قطر (2-3) ملم، ملساء، غير شفافة، محدبة قليلا صفراء او ذهبيـة. وزرعـت على وسط الاكار المغذي وحفظت في درجة حرارة 4م° لحين استخدامها في الاختبارات التشخيصية حيث شخصت العينات بالاعتماد على الصفات المزرعية والفحـص المجهـري والاختبـارات الكيموحيويـة (Todar, 2002; Johnson *et al.*, 2002).

اختبار الحساسية للمضادات الحيوية

استخدم في هذا الاختبار 5 انواع من المضادات الحيوية والمجهزة من شركة Oxoid ومعمل ادوية سامراء، اعتماداً على طريقة Bauer واخرون (1966)، حيث نقل 4-5 مستعمرات نقية من الجرثومة الى وسط المرق المغذي، حضنت لمدة 14-16 ساعة في درجة حرارة 37م° ثم خفف العالق الجرثومي بالمحلول الملحي الفسلجي مقارنة مع انبوب السيطرة القياسي الذي يعادل (10^8) خلية /سم^3، بالاعتماد على طريقة ماكفرلاند القياسي،بعدها تم اخذ 0.1 سم^3 من المعلق الجرثومي ونشر على سطح طبق يحتوي على وسط الاكار المغذي باستعمال مسحة قطنية معقمة، ثم تركت الاطباق في درجة حرارة الغرفة لمدة 30دقيقة، بعد ذلك ثبتت اقراص المضادات الحيوية المذكورة في الجدول (1) بواسطة ملقط معقم ثم حضنت في درجة 37م° لمدة 24 ساعة بعدها قيست منطقة التثبيط بوحدة الملم (Vandepitt *et al.*, 1991).

الجدول 1: انواع المضادات الحيوية المستخدمة في الدراسة وتراكيزها(مايكروغرام/ قرص)

نوع المضاد الحيوي	الرمز	التركيز مايكروغرام / قرص
Vancomycin	VA	30
Ampicillin	AM	10
Chloramphenicol	C	30
Tetracycline	TE	30
Gentamycin	GM	10

تحضير المستخلص المائي

حضر بالاعتماد على طريقة Riose وجماعته سنة (1987). ثم جفف المستخلص الناتج بالتجميد تحت ضغط مخلخل بوساطة جهاز التجفيد Lyophilizer المجهز من شركة Edwards ثم حفظت العينات بعد جفافها في قناني زجاجية ذات غطاء محكم وفي ظروف خالية من الرطوبة اذ حفظت المستخلصات النباتية بالتجميد لحين استخدامها في الدراسة.

تحضير المستخلص الكحولي الخام

اتبعت طريقة الباحث Grand واخرون (1988) في تحضير المستخلص الايثانولي والمحورة عن الطريقة الاساسية للباحث (Verporte *et al.*, 1982)، وبعد الحصول على المستخلص حفظت النماذج بالتجميد في قناني زجاجية ذات غطاء محكم لحين استخدامها في الدراسة.

فصل مكونات النبات باستخدام جهاز الاستخلاص المستمر (Soxhlet)

استخدم جهاز الاستخلاص المستمر لعملية الاستخلاص، اذ تم وضع 50 غم من النموذج النباتي المسحوق داخل الثمبل Thumble في جهاز الـ Soxhlet وباستخدام 500 سم^3 من كل مذيب مستخدم، وقد تم اختيار اربعة مذيبات متفاوتة القطبية في استخلاص مكونات كل نموذج نباتي على التوالي وهي الايثر البترولي 40-60م°، البنزين 80م°، الكلوروفورم 62م° والاسيتون 60م°. وبمعدل 10 ساعات استخلاص يوميا اذ تستمر عملية الاستخلاص الى ان يصبح المذيب المستخدم عديم اللون بعدها يركز المستخلص بجهاز المبخر الدوار Rotary Vaccume evaporator وفي درجة حرارة لا تزيد عن 40 م° وبعد تبخير جميع المذيب المستخدم في الاستخلاص يلاحظ تكون طبقة ثخينة من المستخلص تختبر فعاليتها المضادة على الجراثيم وتكرر العملية نفسها لكل مذيب مستخدم وعلى نفس النموذج النباتي (الرمضاني، 1999).

تعقيم المستخلصات النباتية

تم تعقيم المستخلص المائي باخذ غرام واحد من المستخلص الجاف واذيب في 5 سم^3 من الماء المقطر المعقم، وبذلك يكون لدينا مستخلص بنسبة 200 ملغم/سم^3 كتركيز قياسي، عقم هذا المستخلص باستخدام المرشحات الغشائية 0.22m لمنع مرور الجراثيم من خلاله وعد هذا المركز القياسي مصدرا لتحضير التخافيف اللاحقة المستخدمة في دراسة، في حين تم تعقيم المستخلص الكحولي، الايثر البترولي، الكلوروفورمي، مستخلص البنزين، الاسيتون، باذابة 1 غم من المستخلص في 5 سم^3 من مادة Dimethylsulfoxide (DMSO) ثم عقم المزيج بطريقة البسترة في درجة حرارة 62م° لمدة 15 دقيقة (النعمان, 1998).

اختبار الفعالية التثبيطية للمستخلصات النباتية

A. طريقة اختبار الحساسية (الانتشار بالاقراص)

اجري الاختبار بالاعتماد على طريقة Bauer وجماعته سنة 1966، ولدراسة الفعالية المضادة للمستخلصات النباتية على نمو الجراثيم فقد حضرت اقراص من ورق الترشيح (Whattman NO.1) بواسطة ثاقبة يدوية بقطر 6 ملم المشبعة بتراكيز مختلفة من المستخلصات النباتية المراد اختبارها وذلك باضافة 1 سم^3 من كل تركيز من المستخلص النباتي الى قنينة حاوية على 100 قرص معقم (Merius *et al.*, 1999).

تم تثبيت الاقراص بوساطة ملقط معقم وحضنت في درجة حرارة 37م° لمدة 18-24 ساعة بعدها تم قياس مناطق التثبيط ان وجدت ومقارنتها مع المضادات الحيوية القياسية.

B. طريقة اختبار العكارة

اجري الاختبار باضافة 0.1 سم^3 من كل تركيز من المستخلص النباتي الى انابيب حاوية على 9.8 سم^3 من المرق المغذي بعدها لقحت بـ 0.1 سم^3 من العالق الجرثومي وبتركيز 10^8 خلية/سم^3 باعتماد ماكفرلاند القياسي وبواقع ثلاثة مكررات من كل تركيز، حضنت الانابيب في درجة حرارة 37م$^\circ$ لمدة 18-24 ساعة، بعدها قيست العكارة بوساطة جهاز قياس الكثافة الضوئية Spectrophotometer وعند طول موجي 595 نانوميتر وحدد تاثير المستخلصات النباتية بالمقارنة مع عينة السيطرة التي تحوي 9.8سم^3 من وسط المرق المغذي و0.1 سم^3 من المعلق الجرثومي و0.1 سم^3 من المذيب المستخدم لاذابة المستخلص النباتي المراد دراسته.

تحديد قيم التراكيز المثبطة الدنيا للمستخلصات النباتية

Determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

حدد التركيز المثبط الادنى MIC باستخدام طريقة العكارة اذ حضرت التخافيف الاتية من كل مستخلص نباتي 200، 100، 50،25،12.5،6.25،3.125 ملغم/سم^3، ان اقل تركيز للمستخلص النباتي الذي يمنع نمو الجراثيم نهائيا بعد فترة تحضين24 ساعة في درجة37 م$^\circ$ اعتبر التركيز المثبط الادنى MIC وذلك مقارنةً مع عينة السيطرة (Levinson and Jawetz, 2000).

تحديد قيم التراكيز القاتلة الدنيا للمستخلصات النباتية

Determination of the Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

حدد التركيز القاتل الادنى MBC عن طريق اعادة زرع الانابيب التي لم تظهر نمواً والتي اظهرت نمواً قليلاً بطريقة العكارة وذلك بسحب 0.1 سم^3 من العالق الجرثومي لكل انبوب ونشره على سطح اطباق حاوية لوسط الاكار المغذي، ثم حضنت الاطباق في درجة 37م$^\circ$ لمدة 18-24 ساعة. قيم الـMBC اخذت من الاطباق التي لم تظهر نموا جرثوميا بعد انتهاء فترة التحضين (Grace, 1989).

تحضير المعلق الجرثومي

استخدمت عزلة لجرثومة *Staph aureus* والمعزولة من داء القوباء المعدي، اذ نميت الجرثومة في وسط المرق المغذي لمدة 18ساعة وفي درجة حرارة 37م$^\circ$، ثم اجريت للمزرعة عملية طرد مركزي وبسرعة 5000 دورة/دقيقة ولمدة 20 دقيقة بعدها غسل الراسب المكون من الخلايا الجرثومية بمحلول داري الفوسفات المتعادل، ثم حضر المعلق الجرثومي في الـ PBS بتركيز 10^{11} خلية /سم^3 بطريقة العد بالاطباق (Cruickshank *et al.*, 1975 ;Vandpitte *et al.*, 1991) واستخدم هذا التركيز للحصول على كثافة جرثومية عالية لغرض الحقن.

دراسة تأثير المستخلصات النباتية في جرثومة *Staph. aureus* المعزولة من داء القوباء المعدي داخل الجسم الحي *in vivo*.

اختبر المستخلص الايتوني لاوراق نبات الحناء لدراسة تأثيره على جرثومة *Staph. aureus* المعزولة من داء القوباء المعدي داخل الجسم الحي *In vivo* وذلك بالاعتماد على طريقة (Stepinska *et al.*, 1995)، اذ استخدمت مجاميع من ذكور الارانب البيض نوع Albino والتي يتراوح اوزانها ما بين 1.50-2.57 كغم قسمت مجاميع الارانب على4 مجاميع تضم كل مجموعة 3 ارانب وكما ياتي:

1. المجموعة الأولى: مجموعة السيطرة وتضم جروحا نظيفة لم تعامل باية مادة.
2. المجموعة الثانية: وتضم جروحا نظيفة غير مخمجة بجرثومة *Staph. aureus* ومعاملة بالمستخلص الاسيتوني.
3. المجموعة الثالثة: وتضم جروحا مخمجة بجرثومة *Staph. aureus*.
4. المجموعة الرابعة: وتضم جروحا مخمجة بجرثومة *Staph. aureus* ومعاملة بالمستخلص الاسيتوني.

تم تخدير المنطقة المراد إحداث الإصابة فيها بواسطة الايثر بعدها أزيل الشعر في منطقة جانبية من الجهة الظهرية ثم عقمت هذه المنطقة باستعمال الايثانول بتركيز 70%، بعدها تم عمل جروح على هذه المنطقة بواسطة مشرط طبي معقم ليشمل طبقة الجلد العليا، ثم حقنت هذه المنطقة بـ 0.05 سم^3 من المعلق الجرثومي الحاوي على 10^{11} خلية/سم^3 تحت الجلد ما عدا المجموعة الأولى والثانية التي حقنت بـ 0.05 سم^3 من المحلول الملحي الفسلجي، وقد عومات المجموعة الثانية والرابعة بالمرهم المحضر من المستخلص الاسيتوني والمكون من 1غم مستخلص نباتي مضافا إليه 1غم فازالين ولمدة 20 يوما وأجريت الفحوصات البكتريولوجية عند اليوم الأول والثالث والسابع والعاشر والرابع عشر واليوم العشرين من التجربة. اذ اخذت عينات من منطقة الإصابة بوساطة المسحات القطنية المعقمة وللفترات 1،3،7،10،14،20 من التجربة وزرعت على وسط الاكار المغذي وحضنت في درجة حرارة 37م° لمدة24 ساعة ثم لوحظ النمو.

النتائج والمناقشة

العزل والتشخيص

يوضح الجدول (2) العدد والنسب المئوية لجراثيم المكورات العنقودية وبحسب الحالة المرضية. حيث اعطت جرثومة *Staph. aureus* النسبة الاكبر ضمن المكورات العنقودية اذ بلغت نسبتها 62.7% من مجموع العينات قيد الدراسة ويرجع السبب في سيادة جرثومة *Staph. aureus* على الانواع الجرثومية الاخرى، كونها تشكل جزءاً كبيراً من النبيت الطبيعي للجسم ولاسيما على الجلد ومقدمة المنخرين اذ تحمل هذه الجرثومة بنسبة (20%-30%) في انوف الاصحاء والذين يشكلون اهم واخطر

عامل مسبب للاصابة فضلاً عن قابلية هذه الجرثومة لمقاومة الجفاف والانتشار عـن طريـق الهـواء. (Dowell and James, 2001).

كما ان عنقوديات الجلد (المكورات العنقودية) غالبا ما تكون صعبة الازالة باسـتعمال المضـادات الحياتية وهذا يرجع الى تكرار التلوث بهذه الجراثيم من المستودع الانفي ولهذا نجد ان مقاومـة البكتريـا للمضادات كانت ومازالت المعضلة الاساسية امام نجاح العلاج ومن الصـعوبة ان توجـد أي مجموعـة مضادات لم تظهر البكتريا اساليب لمقاومتها (Amyes, 2000).

كما عزلت باعلى نسبة 76.1% من داء القوباء المعدي مقارنة مع بقية الاصـابات الجلديـة قيـد الدراسة، وهذه النتيجة تتفق مع دراسة اخرى اجريت حول داء القوباء المعدي من قبل الباحـث (Mertz) واخرون (2002) اذ وجد ان جرثومة *Staph. aureus* هي السائدة والمسبب الرئيس لهذا المرض اذ تـم عزلها بنسبة 59% وعلى الرغم من اختلاف النسب في دراستنا مع دراسة هذا الباحث الا انهما تتفقان في ان المسبب الرئيسي لداء القوباء المعدي هو جرثومة *Staph. aureus* وربما يعود سبب اختلاف النسـب الى اختلاف البيئات المعزولة منها الجرثومة او نتيجة لتناول المصاب المضادات الحيوية.

اما نسبة هذه الجرثومة فقد عزلت من اصابات الجروح باقل نسـبة 37.5% مقارنـة مـع بقيـة الاصابات الجلدية لدراستنا الحالية ولكنها تعد نسبة جيدة ضمن اصابات الجروح اذ تشابه النتيجـة التـي حصل عليها الباحث Jones سنة 1996 عندما عزل هذه الجرثومة بنسبة 32% من اخماج الجروح، كمـا انها تعد نتيجة مقاربة بعض الشيء لنتيجة الباحثة عبد الباقي (2001) عندما عزلتها بنسبة 29%. ان تدني نسبة جرثومة *Staph. aureus* المعزولة من الجروح يمكن ان يوعز الى قابلية الجرح للتلـوث بـانواع اخرى مـن الجـراثيم وحـدوث التضـاد بـين السـلالات البكتيريـة المختلفـة (Antibiosis) مثـل Peseudomonas.

اما جراثيم المكورات العنقودية السالبة لانزيم مختر البلازما فقد عزلت باعلى نسـبة 43.3% مـن مرضى الحروق اذ تكون هذه الجراثيم موجودة طبيعيا على جلد الانسان ولكن عندما يتعـرض الانسـان لامراض اخرى او ضعف المناعة تصـبح جـراثيم انتهازيـة لهـا القابليـة علـى اصـابة الانسـان (Higaki *et al.*, 1999). كما عزلت المكورات العنقودية السالبة لانزيم مختر البلازما باقل نسـبة 5.9% من المرضى المصابون بداء القوباء المعدي وهذا يفسر سيادة جرثومة *Staph. aureus* في هذا المـرض كما ذكر سابقا.

الجدول 2: العدد والنسبة المئوية لجراثيم المكورات العنقودية المعزولة حسب الحالات المرضية

الحالات المرضية	عدد العينات الكلي	عدد عزلات الجراثيم على وسط ملح المانيتول	عدد عزلات التجلط الموجب	نسبتها المئوية %	عدد عزلات التجلط السالب	نسبتها المئوية %
الاصابات الثانوية a - الحروق b – الجروح	 30 48	 25 21	 12 18	 40 37.5	 13 3	 43.3 6.3
داء القوباء المعدي	67	55	51	76.1	4	5.9
الدمامل	46	41	34	73.9	7	15.2
التهاب جريبات الشعر	56	47	40	71.4	7	12.5
العدد الكلي	247	189	155	62.7	34	13.7

وكانت النتائج للاختبارات الشكلية والكيمياحياتية والفسلجية والتي اجريت على العزلات الجرثومية مطابقة لما ورد في أنظمة التشخيص المعتمدة (Atlase, 1995).

اختبار الحساسية للمضادات الحيوية

اظهرت جرثومة *Staph. aureus* المعزولة من اصابات جلدية مختلفة حساسيتها للمضادات الحيوية. الامبسلين، الكلورامفينكول، الفانكومايسين والجينتامايسين الجدول (3). اما بالنسبة للمضاد الحيوي تتراسايكلين فقد كانت عزلة *Staph. aureus* المعزولة من الاصابات الثانوية (الجروح، الحروق) مقاومة له بينما اظهرت بقية العزلات حساسية عالية تجاهه.

الفعالية التثبيطية للمستخلصات النباتية

اظهر اختبار تأثير المستخلصات النباتية المستخدمة قيد الدراسة على العزلات الجرثومية وباستخدام طريقة الانتشار بالاقراص تأثيراً متبايناً على العزلات الجرثومية واختلف هذا التأثير بحسب نوع المستخلص والتراكيز المستخدمة فضلاً عن المصدر الذي عزلت منه الجرثومة.

اذ أظهر المستخلص الاسيتوني والكلوروفورمي والكحولي والمائي أعلى تثبيط على الجرثومة المعزولة من داء القوباء المعدي في حين اعطى المستخلص الاسيتوني والكلوروفورمي والمائي أقل تثبيط للجرثومة المعزولة من الدمامل اما الكحولي اعطى اقل تثبيط للجرثومة المعزولة من التهاب جريبات الشعر مقارنة مع المضادات الحيوية اما مستخلص الايثر البترولي والبنزين فلم يظهران أي تأثير تثبيطي على جميع عزلات جرثومة *Staph. aureus* قيد الدراسة والجدول (3) يوضح ذلك.

الجدول 3: الفعالية التثبيطية للمستخلصات النباتية على جرثومة *Staph. aureus* مقارنة بالمضادات الحيوية القياسية (قطر دائرة التثبيط مقاس بالملم)

المستخلصات بتركيز 200 ملغم/سم ^{3}		الحالات المرضية			
		الاصابات الثانوية(جروح،حروق)	داء القوباء المعدي	الدمامل	التهاب جريبات الشعر
المستخلص المائي		12.3	18.7	11.3	11.7
المستخلص الكحولي		19	21	16.7	15
مستخلص الايثرالبترولي		-----	-----	-----	-----
مستخلص البنزين		-----	-----	-----	-----
المستخلص الكلوروفورمي		18.7	19.3	18	18.3
المستخلص الاسيتوني		20.3	23.3	18.7	22.3
المضادات الحيوية القياسية	Tetracycline 30µg/disk	11.3	24.7	26	26
	Ampicillin 10µg/disk	16.7	18.7	20.7	18.7
	Chloramphenicol 30µg/disk	24.7	17.7	23	21
	Vancomycin 30µg/disk	18.3	21.7	16.7	16.3
	Gentamycin 10µg/disk	20	22	18	18

❖ (----) تشير الى عدم وجود فعالية تثبيطية.

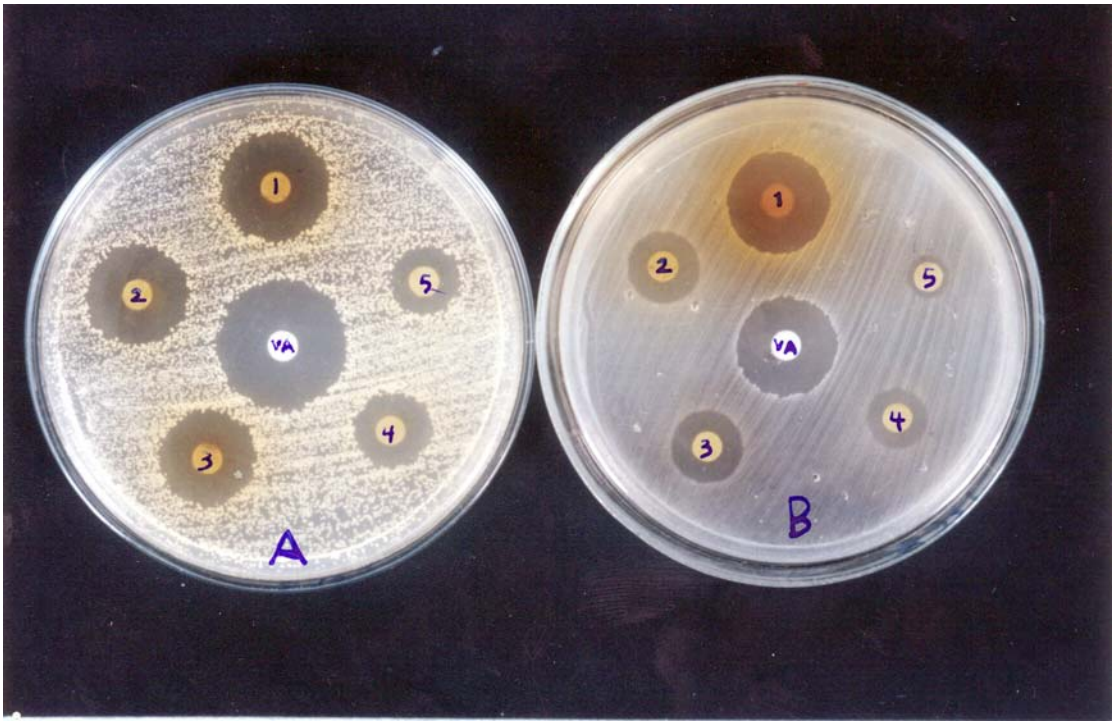
❖ قطر القرص 6 ملم.

كما توضح الجداول من (4-7) تأثير المستخلصات النباتية بتراكيز مختلفة على عزلات جرثومة *Staph. aureus* قيد الدراسة حيث اظهر المستخلص المائي تأثيراً متبايناً على العزلات الجرثومية اذ تناسب تأثير هذا المستخلص طردياً مع التراكيز، اذ كان مؤثراً لحد التركيز 25 ملغم/سم^3 للجرثومة المعزولة من داء القوباء المعدي اما الجرثومة المعزولة من التهاب جريبات الشعر فقد كان مؤثرا لحد التركيز 50 ملغم /سم^3 في حين الجرثومة المعزولة من الحروق والجروح والدمامل فقد كان مؤثرا فقط في التركيزين 200 ملغم/سم^3 و 100 ملغم / سم^3 الجدول (4).

كذلك اظهر المستخلص الكحولي تأثيراً متبايناً على العزلات الجرثومية وكان تأثيره إلى حد التركيز 12.5 ملغم/سم^3 لجميع العزلات ومن مصادرها المختلفة الجدول (5) الصورة (1) كما اثر المستخلص الكلوروفورمي على عزلات الجرثومة المعزولة من الجروح والحروق الى حد التركيز 12.5 ملغم/سم^3

في حين اثر على الجرثومة المعزولة من داء القوباء المعدي لحد التركيز25 ملغم/سـم^3 وكـان تـأثيره 6.25 ملغم/سم^{l3} للجرثومة المعزولة من التهاب جريبات الشعر الجدول (6).

أما المستخلص الاسيتوني فقد كان الأفضل في التأثير اذ كان مؤثراً لحد التركيز 25 ملغم/سم^3 على الجرثومة المعزولة من داء القوباء المعدي اما تلك المعزولة من الجروح والحروق والـدمامل والتهـاب جريبات الشعر فقد كان مؤثراً عليها لحد التركيز 50 ملغم/سم^3 الجدول (7).



الصورة (1)

A- تأثير المستخلص الكحولي

B- المستخلص الاسيتوني لاوراق نبات الحنـاء بتراكيـز مختلفـة علـى جرثومـة *Staph aureus* المعزولة من داء القوباء المعدي مقارنة مـع المضـاد الحيـوي Vancomycin

- 1 يمثل التركيز الاول 200 ملغم/سم^3
- 2 يمثل التركيز الثاني 100 ملغم/سم^3
- 3 يمثل التركيز الثالث 50 ملغم/سم^3
- 4 يمثل التركيز الرابع 25 ملغم/سم^3
- 5 يمثل التركيز الخامس 12.5 ملغم/سم^3

الجـدول 4: تـاثير المسـتخلص المـائي لاوراق نبـات الحنـاء بتراكيـز مختلفـة علـى جرثومـة *Staph. aureus* المعزولة من اصابات جلدية مختلفة (قطر دائرة التثبيط مقاس بالملم)

تراكيز المستخلص ملغم/سم^3	الحالات المرضية			
	الاصابات الثانوية (جروح،حروق)	داء القوباء المعدي	الدمامل	التهاب جريبات الشعر
200	12.3	18.7	11. 3	11.7
100	10.7	12.7	8.7	8.3
50	0.0	12	0.0	7.7
25	0.0	8.7	0.0	0.0
12.5	0.0	0.0	0.0	0.0
6.25	0.0	0.0	0.0	0.0
3.125	0.0	0.0	0.0	0.0

الجدول 5: تاثير المسـتخلص الكحـولي لاوراق نبـات الحنـاء بتراكيـز مختلفـة علـى جرثومـة *Staph. aureus* المعزولة من اصابات جلدية مختلفة (قطر دائرة التثبيط مقاس بالملم)

تراكيز المستخلص ملغم/سم^3	الحالات المرضية			
	الاصابات الثانوية (جروح،حروق)	داء القوباء المعدي	الدمامل	التهاب جريبات الشعر
200	19	21	16.7	15
100	14.7	19	12.7	13.7
50	14.7	18	11.7	12.7
25	11.7	14	11	10
12.5	8.3	13.7	10.7	9.3
6.25	0.0	0.0	0.0	0.0
3.125	0.0	0.0	0.0	0.0

الجدول 6: تاثير المستخلص الكلوروفورمي لاوراق نبات الحنـاء بتراكيـز مختلفـة علـى جرثومـة *Staph. aureus* المعزولة من اصابات جلدية مختلفة (قطر دائرة التثبيط مقاس بالملم)

تراكيز المستخلص ملغم/سم^3	الحالات المرضية			
	الاصابات الثانوية (جروح،حروق)	داء القوباء المعدي	الدمامل	التهاب جريبات الشعر
200	18.7	19.3	18	18.3
100	16.3	16.3	16	16.7
50	12.3	12.3	12.3	13.7
25	10.7	10.3	10.7	11.7
12.5	9.7	0.0	0.0	10.3
6.25	0.0	0.0	0.0	10
3.125	0.0	0.0	0.0	0.0

الجدول 7: تاثير المستخلص الاسيتوني لاوراق نبات الحناء بتراكيز مختلفة على جرثومة *Staph. aureus* المعزولة من اصابات جلدية مختلفة (قطر دائرة التثبيط مقاس بالملم)

تراكيز المستخلص ملغم/سم^3	الحالات المرضية			
	الاصابات الثانوية (جروح،حروق)	داء القوباء المعدي	الدمامل	التهاب جريبات الشعر
200	20.3	23.3	18.7	22.3
100	11.7	16.7	12.3	16.7
50	9.3	13.7	10.3	14.3
25	0.0	11	0.0	0.0
12.5	0.0	0.0	0.0	0.0
6.25	0.0	0.0	0.0	0.0
3.125	0.0	0.0	0.0	0.0

معدل قطر دائرة التثبيط حسب باستخدام ثلاث عزلات لكل منطقة عزل.

تحديد التركيز المثبط الادنى MIC والتركيز القاتل الادنى MBC

قدر التركيز المثبط الادنى MIC للمستخلصات النباتية التي اظهرت تأثيراً قوياً ضد الجراثيم، اذ حضرت التخافيف 200 و100 و50 و25 و12.5 و6.25 و3.125 ملغم/سم^3 للمستخلص الكحولي والكلوروفورمي والاسيتوني. اضيف 0.1 سم^{3}من كل تخفيف الى قناني حاوية على 9.8 سم^3 من وسط المرق المغذي الملقح بـ 0.1 سم^3 من العالق الجرثومي وبهذا يصبح تخفيف المستخلصات 0.0312,0.0625,0.125,0.25,0.5,1.0,2.0 ملغم/سم^3 على التوالي، اما التركيز القاتل الادنى MBC فقدر عن طريق اعادة زرع الانابيب التي لم تظهر نمواً والتي اظهرت نمواً ضعيفاً بجهاز قياس الكثافة الضوئية Sepctrophotometer عند تقدير التركيز المثبط الادنى، وبعد التحضين في درجة 37م$^{\circ}$ ولمدة 24 ساعة ظهرت النتائج كما في الجدول (8).

الجدول 8: التركيز المثبط الادنى (MIC) والتركيز القاتل الادنى (MBC) للمستخلصات النباتية على عزلات جرثومة *Staph. aureus* (ملغم /سم^3)

نوع المعاملة	الحالات المرضية							
	الاصابات الثانوية (جروح،حروق)		داء القوباء المعدي		الدمامل		التهاب جريبات الشعر	
	MIC	**MBC**	**MIC**	**MBC**	**MIC**	**MBC**	**MIC**	**MBC**
المستخلص الكحولي	0.25	0.5	0.125	0.5	0.5	0.125	0.25	0.5
المستخلص الكلوروفورمي	0.125	1.0	0.25	1.0	0.25	1.0	0.0625	0.25
المستخلص الاسيتوني	0.5	1.0	0.5	1.0	0.5	1.0	0.5	1.0

حيث ان الـ MIC للمستخلص الكحولي ضد جرثومة *Staph. aureus* والمعزولة من الاصـابات الثانوية (حروق وجروح) والمعزولة من مرض التهاب جريبات الشعر كان مساوياً لـ 0.25 ملغم/سـم^3 بينما كان الـ MIC للمستخلص الكحولي ضد الجرثومة المعزولة من داء القوباء المعدي والمعزولة مـن الدمامل كان مساوياً لـ 0.125 ملغم/سم^3. في حين كان التركيز القاتل الادنى MBC للمستخلص الكحولي مساوياً لـ 0.5 ملغم/سم^3 على جميع عزلات *Staph. aureus* قيد الدراسة.

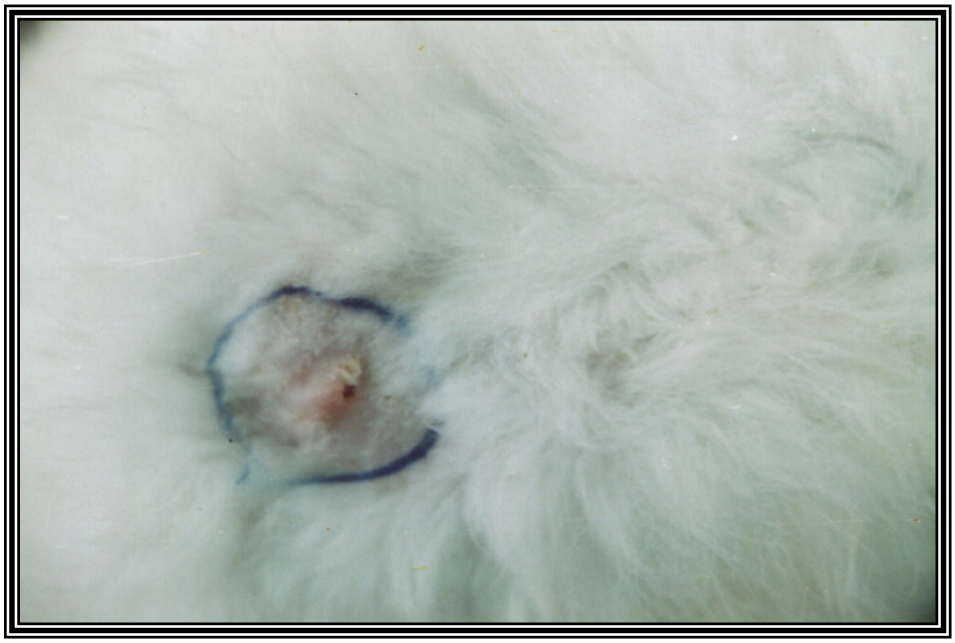
اما بالنسبة للمستخلص الكلوروفورمي للنبات فقد كان الـ MIC له مساوياً لـ 0.125 ملغـم/سـم^3 ضد الجرثومة المعزولة من الاصابات الثانوية (حروق وجروح)، اما الجرثومة المعزولة من داء القوبـاء المعدي والدمامل فقد كان مساوياً لـ 0.25 ملغم/سم^3 في حين كان الـ MIC للمستخلص ضد الجرثومـة المعزولة من التهاب جريبات الشعر مساوياً تقريباً لـ 0.0625 ملغم/سم^3.

وكان الـ MBC للمستخلص الكلورفورمي مساوياً لـ 1.0 ملغم/سم^3 ضـد الجرثومـة المعزولـة من الاصابات الثانوية وداء القوباء المعدي والدمامل في حين كان مساوٍ لـ 0.25 ملغم/سـم^3 للجرثومـة المعزولة من التهاب جريبات الشعر اما بالنسبة للمستخلص الاسيتوني فقد وجد ان الـ MIC له ضد جميع العزلات الجرثومية مساوياً لـ 0.5 ملغم/سم^3 والـ MBC مساوياً لـ 1.0 ملغم/سم^3 ضد جميع العـزلات الجرثومية قيد الدراسة.

تأثير المستخلص الاسيتوني لاوراق نبات الحناء داخل جسم الكائن الحي (*in vivo*)

توضح الصور (4,3,2) حدوث الاصابة بعد احداث الجـرح وتخميجـه بالجرثومـة. اذ اظهـرت التغيرات المرضية حدوث احمرار شديد بعد مرور يومين من احداث الاصابة ثم تبعـه تـورم للمنطقـة وازداد التورم والانتفاخ والاحمرار عند اليوم العاشر، بعد ذلك لوحظ تجمع القيح داخل المنطقة المصـابة بما يشبه تكون الخراج وازداد تكون وتجمع القيح يوماً بعد يوم حتى انفجرت هذه المنطقة مما ادى الـى خروج القيح ذي اللون الاصفر ولوحظت هذه الحالة في الايام التاسع عشـر والعشـرون مـن احـداث الاصابة.كما توضح الصور (6,5) تأثير المستخلص الاسيتوني في مجاميع الارانب المخمجة بالجرثومة.

الصورة 2: الخمج بافراد نوع جرثومة *Staph. aureus* المعزولة من داء القوباء المعدي غير المعاملة بالمستخلص الاسيتوني للنبـات عند اليوم العاشر من التجربة على الارنب



الصورة 3: الخمج بافراد نوع جرثومة *Staph. aureus* المعزولة مـن داء القوباء المعدي غير المعاملة بالمستخلص الاسيتوني عند اليـوم الرابع عشر من التجربة على الارنب

الصورة 4: الخمج بافراد نوع جرثومة *Staph. aureus* المعزولة مـن داء القوباء المعدي غير المعاملة بالمستخلص الاسيتوني عند اليـوم العشرون من التجربة على الارنب

الصورة 5: الخمج بافراد نوع جرثومة *Staph. aureus* المعزولة من داء القوباء المعدي المعاملة بالمستخلص الاسيتوني عند اليوم الثالث من التجربة على الارنب

الصورة 6: الخمج بافراد نوع جرثومة *Staph. aureus* المعزولـة مـن داء القوباء المعدي المعاملة بالمستخلص الاسيتوني عند اليوم السـابع من التجربة على الارنب

نتائج فحص العقم للجروح التجريبية Sterility Test

يوضح الجدول (9) نتائج زرع العينات المأخوذة من الجروح التجريبية، اذ كانـت نتـائج الـزرع موجبة بالنسبة لمجموعة الحيوانات المخمجة وغير المعاملـة بالمسـتخلص النبـاتي وكـذلك مجموعـة الحيوانات المخمجة والمعاملة بالمستخلص النباتي عند الايام (1,3) من التجربة. وعند اليوم السـابع مـن التجربة أعطت مجموعة الحيوانات المخمجة والمعاملة بالمستخلص النباتي نتيجة سالبة في حين أعطـت مجموعة الحيوانات المخمجة وغير المعاملة بالنبات نتيجة موجبة للزرع واستمرت النتيجة الموجبة حتـى اليوم العشرين من التجربة.وهذا يشير ان المستخلص الاسيتوني لاوراق نبات الحناء كان له تاثير مضـاد عالي لجرثومة *Staph. aureus* نتيجة احتوائه على مركبـات مضـادة للجـراثيم اهمهـا Coumarins وFlavonoids وMannite وTaning وLowsone وربما كان لواحدة من هذه المركبات او اكثر قابلية على اصلاح الخلايا المتضررة والاسراع من عملية التئام الجروح.

الجدول 9: نتائج فحص العقم للجروح التجريبية عند الأيام (20,14,10,7,3,1)

الايام	المجموعة الاولى	المجموعة الثانية	المجموعة الثالثة	المجموعة الرابعة
1	-	-	+	+
3	-	-	+	+
7	-	-	+	-
10	-	-	+	-
14	-	-	+	-
20	-	-	+	-

المصادر العربية

الحسيني، ايمن، 2003. تذكرة داؤد. مختصر التذكرة وراي العلم الحديث، مكتبة ابن سينا للنشر والتوزيع والتصدير، القاهرة، مصر.

الرمضاني، طلعت راجح، 1999. دراسة كيمياوية لبعض النباتات العراقية التي تنمو في المنطقة الشمالية، رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة الموصل.

النعمان، اديبة يونس شريف، 1998. التاثير الجزيئي لبعض المستخلصات النباتية على نمو وايض عدد من الجراثيم الموجبة والسالبة لصبغة كرام، رسالة دكتوراه، كلية العلوم، جامعة الموصل.

عبد الباقي، انعام عبد المنعم عبد الحميد، 2001. التاثير التثبيطي لعدد من النباتات الطبية في بعض انواع الجراثيم المعزولة من الجروح الخمجية، رسالة ماجستير، جامعة الموصل، كلية التربية.

المصادر الأجنبية

Amyes, S.G.B., 2000. The rise bacterial resistance. BMJ, 320 : pp.199-200.

Aries-de-sousa, M.; de-Lencastre, H.; Santos, S.I.; Kikuchi, K.; Totsuka, K., and Tomasz, A., 2000. Similarity of antibiotic resistance patterns and molecular typing properties of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated widely spread in hospitals in New York City and a hospital in Tokyo, Japan. Microb-Drug-Resist; 6: pp.253-258.

Atlase, R.M.; Brown, A.E., and Parks, L.C., 1995. Laboratory Manual Experimental Microbiology. Mosby-Comp.3: pp.98-103.

Bauer, A.W.; Kirbay, W.A.M.; Sherris, J.S., and Turk, M., 1966. Antibiotic susceptibility testing by a st and ardized single disc method. Amer. J. Clin. Pathol., 45: pp.493-496.

Cruickshnk, R.; Duguid, J.P.; Marmion, B.P., and Swain, R.H.A., 1975. Medical Microbiology, Vol.2. The Practice of Medical Microbiology. 12th.ed. Churchill Livingstone, London.

Dahanukar, S.A.; Kulkarni, R.A., and Reg, N.N., 2000. Pharmacology of Medicinal plants and natural products. Indian. J. Pharmacol. pp.22-26.

Dowell, E.B., and James, J.F., 2001. Speciation of Coagulase Negative staphylococci, Contagious comments Department of Epidemiology The children's Hospital Association. 15: pp.102-104.

Grace, O.O., 1989. Evaluation of the antimicrobial activity of citral. Letters in. Appli. Microbial. 9 : pp.105-108.

Grand, A.; Woudergem, P.A.; Verportes, R., and pousset, J.L., 1988. Anti-infection phytotherapies of tree-savannah sengl (West-Africa), II-Anti microbial activity of 33 species. J. Ethnopharmacol., 22: pp.25-31.

Hatton, C.K., 1999. Pharmacognosy Phytochemistry Medicinal Plants. 2nd ed. Inter cept, Ltd. Paris (Translated).7: pp.261-266.

Higaki, S.; Morohash, M.; Yamagishi, T., and Hasegawa, T., 1999. Comparative study of staphylococci from the skin of atopic dermatitis patients and from healthy subjects. Int. J. Dermatol, 38: pp. 9-265.

Johnson, A.G.; Ziegler, R.J.; Lukasewycz, O.A., and Hawley, L.B., 2002. Board Review Series Microbiology and Immunology. 4thed. Lippincott Williams and Wilkins Awolters Kluwer Company. 88p.

Jones, R.N., 1996. Impact of changing pathogenes and antimicrobial susceptibility pattern in the treatment of serious infections in hospitalized patients. Am.J. Med. 100 (suppl.): pp.3-12.

Levinson, W., and Jawetz, E., 2000. Medical Microbiology and Immunology. Examination and Board Review. 6th ed., McGraw-Hill, International Editions. Health Professions Series. 5: pp.117-119.

Mertz, P.; piovanetti, Y., and Eaglstein, W., 2002. Staphylococcus aureus is the primary pathogen in a treatment study of impetigo. in 20th world Congress of Dermatology, Paris.

Merius, D.J.; Veldman, K.T.; V and erpal, R.H.M., and Zijderveld, F.G., 1999. Sensitivity testing of Veterinary pathogenes with a semi-automatic image analysis system compared with tablet diffusion and agar dilution tests. Veterinary Quarterly. 21: pp.99-104.

Rasik, A.M.; Raghubir, R.; Gupta, A.; Shukia, A.; Dubey, M.P.; Jain, H.K., and Kulshrestha, D.K., 1999. Healing potential of calotropis procera on dermal wounds in Guinea pig. J. Ethnopharmacol, 968: pp.261-266.

Riose, J.L.; Recio, M.C., and Villar, A., 1987. Antimicrobial activity of selected plant employed in the Spanish Mediterranearea. J. Ethnopharmacol., 21: pp.139-152.

Stepinska, M.; Grzymbowski, J.; Struzyna, J.; Olszowska, M.; Jablonska, H.; Chomicka, M., and Chomiczewski, K., 1995. Mous Model of infected wound Acta. Microbiol. Pol., 44: pp.39-46.

Todar, K., 2002. Staphylococcus. J. Med. Microbiol, pp.1-9.

Vandepitte, J.; Engback, K.; Piote, P., and Heuk, C., 1991. Basic Laboratory procedures in clinical Bacteriology. World Health Organization, Geneva. pp.12-14.

Verporte, R.; Tginastoi, A.; Vandoorn, H., and Svendsen, A.B., 1982. Medical plant of Serinam, 1–Antimicrobial activity and some medicinal plants. J. Ethnopharmacol., 5: pp.221-226.