تاثير المستخلص ألأثيلي لأوراق نبات
فرشاة البُطل *Callistemon viminalis* على الخميرة البيضية *Candida spp.*

اسامة باسم عبد الخالق صباح سعد عبد الصاحب
كلية مدينة العلم الجامعة – قسم علوم الحياة – الكاظمية
بغداد – العراق

الخلاصة

أجريت الدراسة على نبات فرشاة البُطل *Callistemon viminalis* لمعرفة فعالية مستخلص الاوراق في نمو الخمائر باستعمال مذيب عضوي هو الكحول الأثيلي. وللكشف عن المجاميع الفعالة الرئيسة في النبات.

أظهر المستخلص فعالية عالية ضد خميرة *Candida* حيث سجلت اعلى تثبيط عند تركيز 10 ملغم/مل بلغ 28.6 و24.6 ملم والذي لي يفرق معنوياً عن قطر التثبيت عند تركيز 20 ملغم/مل للخميرتين *C. albicans* و *C. Kefyr* وعلى التوالي.

وهذه النتائج قد تم تقويمها بأستعمال طريقة الأنتشار في الحفر (Agar well diffusion method) ، وقورنت النتائج مع نتائج تأثير بعض المضادات الحيوية المعروفة مثل : Fluconazol ، Clotrimozole و Nystatin. واعطت اقطار تثبيط بلغت 21,18,13 و 16,13,17 للخميرتين *C. albicans* و *C. Kefyr* وعلى التوالي. بينت نتائج الدراسة الكيميائية التي أجريت على اوراق النبات أنها تحتوي على المكونات الكيميائية التالية : الفلافونويدات ، والكلايكوسيدات ، والتانينات ، والزيوت الطيارة ، والتربينات ، والراتنجات ، والصابونينات ، والفينولات ، وعدم أحتوائها على القلويدات والكومارينات والستيرويدات.

الكلمات المفتاحية: نبات فرشاة البطل ، الخميرة البيضية ، الادرات ، مستخلص نباتي و اثيل الكحول

Effect of Ethyl Alcohol Leaves Extract of Bottle-brush *Callistemon viminalis* against *Candida spp*.

Osama Bassim abdul Khaliq Sabah Saad Abdul-Saheb
Madenat Al-elem Univ. College, Biology Dept. , Al-Kadhmiya, Baghdad, Iraq

Abstract

This study was conducted on bottle-brush plant *Callistemon viminalis* to determine the inhibition activity of leaves extract against yeast using ethyl alchole as organic solvent, and to detect the main active chemical groups in the plants. The extract showed high inhibitory activity against *Candida albicans* and *C.kefyr* which recorded 28.6 and 24.6 mm at 10 mg/ml respectively with no significant differences with that of 20 mg/ml. The results compared to that of Fluconazol, Clotrimozole, and Nystatin antibiotics using agar well diffusion technique which recorded inhibition zone 13,18,21 and 17,13,16 mm for *C.albicans* and *C.kefyr* represented. Chemical analysis of plant leaves showed the major chemical groups detected were flavonoids , glycosides ,tannins , volatile oils , terpenes , resins , saponins and phenols while alkaloids, coumarins and steroids were not detected.

Key words: *Callistemon viminalis* , Candida , Leaves , Plant extracts and Ethanol

المقدمة

يعد نبات فرشاة البُطل *Callistemon viminalis* من النباتات المستزرعة بشكل واسع بوصفها أشجار زينة (Ornamental) في الحدائق العراقية ، وتعد أستراليا الموطن الأصلي للنبات (Chakarvarty,1976) . أستخدمت أوراق النبات بديلاً للشاي فضلاً عن أمتلاكها نكهة منعشة (Cribb,1976) . تحتوي الأزهار على صبغة تستعمل لدباغة الجلود ولاتحتاج إلى مثبت (Grae,1974) . أستخدم النوع *C.viminalis* لعلاج الآلام، والأضطرابات المعوية، والأمراض المُعدية Sudhakar *et al.*, (2004) يعود النبات للعائلة الآسية (Myrtaceae)، ويوجد حالياً (34) نوعاً يعود للجنس *Callistemon* (Harvey, 2007 ; Wilson, 2007) . الأسم العام للنبات هو الشلال الأحمر (Red cascade) أو فرشاة البطل متدلية الأغصان (Weeping bottle-brush) (Gilman and Watson, 2007). يبلغ أرتفاع النبات (15–20) قدم ، دائم الخضرة ، ومعدل النمو متوسط ، والساق متفرع ، والفروع تكون متدلية ، والأوراق خضراء من النوع البسيط (simple type) ومتبادلة الترتيب (alternative arrangement) وذات حواف ملساء (entire margin)، وشكل رمحي أو ضيق وطويل (lanceolate, linear shape) وتعرق متوازٍ (parallel venation) ، نصل الورقة يبلغ طوله (2–4) أنج ، الثمرة بنية ذات شكل دائري وغطاء صلب وطولها أقل من (5) أنج (Gilman and Watson, 2006).

المكونات الكيميائية Chemical constituents

يكون النبات ذا طبيعة عطرية حيث يحتوي على كميات عالية من

Cineole ،α - pinene ،limonene ،α-terpineol (Grayson, 2000)

و terpenoids (Chitwood, 2002) .

وتحتوي الأوراق والأزهار والثمار على زيوت طيارة يكون المكون الأساسي لها هو المركب 1,8-cineole (Sawi,2007) حيث اثبت Srivastava et al., (2003) أن الزيت يشكل (0.45%) من الوزن الطري للأوراق ، ويحتوي الزيت على (42) مركباً أهمها 1,8-cineole بنسبة (61.7%) و α - pinene بنسبة (24.2%) ، و menthyl acetate بنسبة (5.3%) .

وهناك مركبات كيميائية أخرى مختلفة عزلت من النبات مثل :

triterpenoids ،

Flavonoids ،

Saponins ،

polyphenolic compounds

(Jawad and Jaffer , 2008).

الأستخدامات الطبية Medicinal uses

أظهرت الدراسات التي أجريت على مستخلصات أوراق النبات بإستعمال الكحول الأثيلي أن لها فعالية ضد بعض الأحياء المجهرية الممرضة خارج الجسم الحي (*In vitro*)

(Frame *et al.*,1998 ; Jawad and Jaffer,2008) .

أبدت المركبات المعزولة من النبات فعالية مضادة للأحياء المجهرية *Staphylococcus aureus* ، *Escherichia coli* ، *Bacillus subtilis* ،*C.albicans* (Jawad and Jaffer,2008).

كذلك يمكن أستعمال زيت النبات مسكناً للآلام (analgesic) ، ومضاداً للألتهابات (Anti-inflammatory) (Sudhakar 2004).

كما أن لزيت النبات فعالية تثبيطية ضد بعض الفايروسات (Singh *et al.*,2007) . وأكد Pandey (1995) ان الزيت المستخلص من النبات يملك فعالية مثبطة لنمو الفطريات (Fungistatic) والديدان الطفيلية.

الهدف من الدراسة :-

1- أستخلاص المكونات الكيميائية لأوراق النبات.
2- الكشف عن المكونات الرئيسة لأوراق النبات.
3- دراسة التأثير المضاد لهذه المركبات على خميرة *Candida* .
4- إجراء اختبار حساسية للخميرة للمضادات الحيوية لمعرفة مقاومتها للمضادات المستعملة ومقارنتها بالمستخلص النباتي.

المواد وطرائق العمل

جمع عينات نبات فرشاة البُطل *Callistemon viminalis* وتشخيصه

جمعت العينات النباتية من منطقة الجادرية في بغداد. جمعت الأوراق بعد الظهر، حيث تكون قد تشبعت من شعاع الشمس وزادت محتوياتها من المواد الفعالة (رويحة 1983). ونقلت إلى المختبر وجففت وطحنت (الأوراق) وحفظت في عبوات زجاجية محكمة الغلق. تم تشخيص النبات في معشب كلية العلوم – جامعة بغداد.

عزلات الخميرة

أجريت هذه الدراسة على عزلات للخميرة البيضية *Candida spp.* التي تم الحصول عليها من مركز بحوث التقنيات الأحيائية – جامعة النهرين، وهي مشخصة من قبل المركز البحثي اعلاه (جدول 1).

حساب العدد التقريبي للخميرة

تم حساب العدد التقريبي للعزلة قيد الأختبار، بنقل كمية مناسبة من المستعمرات من المزارع النقية المنشطة للكائن المجهري إلى أنابيب حاوية على محلول الملح الفسيولوجي بحيث تصبح العكورة مساوية لعكورة محلول ثابت العكورة (Macfaddin, 2000). وللدقة تقاس الكثافة الضوئية لكل من العالق ومحلول ثابت العكورة عند طول موجي (650 nm) وتقارن وذلك للحصول على عدد تقريبي للكائن المجهري وبتركيز ($101.5x10^8$) خلية/مل .

حفظ وإدامة العزلات

Maintenance of isolates

تم أستعمال وسط Sabouraud Dextrose Agar (SDA) المائل لحفظ العزلات في درجة حرارة (4)°م ، ويتم تجديد المزارع كل (3-4) أسابيع.

المضادات الحيوية المستعملة في الدراسة

وتم تحضير التراكيز المطلوبة بإذابة المضادات الحيوية في المذيب الخاص لكل مضاد، ثم عقمت بالترشيح بإستخدام المرشحات الغشائية (Millipore membrane filter) قطر فتحاتها (0.22) مايكروميتر، والمبينة أنواعها وتراكيزها بالمايكروغرام ورمزها في الجدول (2) (NCCLS,2002).

تحضير المستخلص النباتي

تم تحضير المستخلص الكحولي بأستخدام الكحول الأثيلي بتركيز (80%) وحسب طريقة Harborne *et al.* (1975) بأستخدام جهاز السوكسليت (Soxhlet apparatus) .

التراكيز المستعملة في التجربة

تم تحضير محلول خزين (Stock solution) من المستخلص النباتي وذلك بإذابة (1) غم من المستخلص المجفف في (10) مل من الكحول الأثيلي (80%) ، وعقم خلال ورقة الترشيح (0.22) مايكروميتر ، وحضرت التراكيز (0.1 ، 0.5 ، 1 ، 5 ، 10 ، 20) ملغم/مل وذلك بمزج حجم معين من محلول الخزين مع الكحول الأثيلي (80%) للحصول على التراكيز المطلوبة .

تأثير التراكيز المختلفة لمستخلص النبات في نمو الخميرة

طريقة الأنتشار في الحفر The agar-well diffusion method

أتبعت طريقة Perez *et al.* (1990) للكشف عن فعالية التراكيز المختلفة للمستخلص والمضادات الحياتية وكما يلي:

1- صب (25) مل من الأكار المغذي لكل طبق .

2- لقح الأكار المغذي بنشر (0.1) مل بوساطة ناشرمعقم (Sterile spreader) من مزروع الخميرة الحاوي على ($101.5x10^8$) خلية/مل ، بمقارنته مع محلول ثابت العكورة القياسي، ثم تركت الأطباق لتجف في حرارة الغرفة .

3- عملت حفر بقطر (10) ملم في الوسط المزروع بوساطة ثاقب فليني معقم (Sterile cork borer)

4- أضيف مقدار (0.2) مل من التراكيز المتدرجة المحضرة للمستخلص النباتية بإستعمال ماصة دقيقة معقمة ، وعملت حفرة السيطرة المتمثلة بأضافة كحول أثيلي (80%) .

5- عملت ثلاث مكررات لكل طبق ، بعدها حضنت الأطباق بدرجة حرارة (37)°م لمدة (24) ساعة في الحاضنة .

6- حددت فعالية كل تركيز من المستخلص النباتي بقياس قطر منطقة التثبيط Inhibition (zone)، علماً أن منطقة التثبيط هي المنطقة الخالية من النمو الخميري.

أستخدم لذلك البرنامج الأحصائي الجاهز : نظام الرزمة الأحصائية الأجتماعي Social Package Statistical System (SPSS) لتحليل النتائج احصائياً.

النتائج والمناقشة

إختبار فحص الحساسية للمضادات الحيوية

أختبرت (3) انواع من المضادات الحيوية المستخدمة صيدلانياً لمعرفة حساسية الخمائر اتجاهها، ولقد أشارت النتائج الى مقاومة نسبية لمعظم عزلات الخميرة قيد الدراسة لأغلب المضادات الحيوية المستعملة حيث اعطت خميرة *C.albicans* اقطار تثبيط كانت 13 و18 و21 وخميرة *C.kefyr* كانت 17 و13 و16 لكل Nystatin و Clotrimozole و Fluconazol وهذه النتيجة قد تكون بسبب كثرة الأستخدام للمضادات الحيوية، فضلاً عن تطور نوع المقاومة التي تمتلكها هذه العزلات ضد أغلب المضادات المستعملة (Sibanda and Okoh , 2007) .

لقد اظهرت المضادات (Nystatin) , (Fluconazol) (Clotrimozole), فعالية ضعيفة نسبيا اتجاه الخميرة (جدول 3).

تأثير المستخلصات الخام لنبات فرشاة البُطل في نمو الخميرة

أجريت دراسة تأثير مستخلص اوراق النبات على الخميرة بأستخدام طريقة الأنتشارفي الحفر لجودتها وسهولة أجرائها ووضوح نتائجها ، وحددت مدة القراءة للنتائج بعد (24) ساعة بوساطة قياس أقطار مناطق التثبيط (Inhibition Zones). ان الفعالية التي أظهرتها مستخلص الكحول الأثيلي للنبات تجاه الخمائر قد تعزى لأحتواء هذا المستخلص على أغلب المركبات الفعالة المضادة للأحياء المجهرية مثل الزيوت الطيارة والتربينات والفينولات والفلافونويدات والصابونينات (Ellof, 1998 ; Ekwenye and Elegalam, 2005) .

اظهرت خميرة *C. albicans* أكثر حساسية من خميرة *C.kefyr* حيث كانت مناطق التثبيط (28.67 , 24.67) ملم على التوالي عند التركيز (10) ملغم / مل (جدول 4).

الكشوفات الكيميائية للمجاميع الفعالة في نبات فرشاة البُطل

أظهرت نتائج الكشوفات للمركبات الفعالة الموضحة في الجدول(5) لمستخلص الاوراق النبات بمذيب الكحول الأثيلي أحتوائها على

المركبات الاتية :- فلافونويدات ، وكلايكوسيدات ، وتانينات ، وزيوت طيارة ، وتربينات ، وراتنجات ، وصابونينات ، وفينولات وان المستخلصات المستخلصة بالمذيب خلت من القلويدات والكومارينات والستيرويدات.

قد يعزى التأثير العالي للمستخلص الى وجود الزيوت الطيارة والتي هي عبارة عن مركبات تربينية أحادية كبيرة (Cowan,1999) . ولهذه الزيوت القدرة على تثبيط نمو الأنواع الخميرية ، وهذا يعود لقدرة الزيت على تحليل جدار الخلية كما يؤدي الى أضعاف الفعاليات الحيوية داخل الخلية وذلك عن طريق التداخل مع وظيفة الغشاء السايتوبلازمي متمثلة بعملية بناء البروتين ومن ثم تثبيط وأيقاف هذه العملية ، وكذلك إعاقة عملية النقل الفعال للأيونات والأملاح عبر هذا الغشاء (القيسي ، 2008) .

الاستنتاجات

احتواء النبات على المجاميع الفعالة وهي : الفلافونويدات، والكلايكوسيدات ، والتانينات ، والزيوت الطيارة، والتربينات ، والراتنجات، والصابونينات، والفينولات.

وخلو النبات من القلويدات، والكومارينات ، والستيرويدات حسب ماأظهرت الطرق المستعملة في الكشف.

و كانت خميرة *C.albicans* الأكثر تأثراً من الخميرة *C. kefyr* بالمستخلص النباتي.

جدول (1) عزلات الخميرة ومصدره

أسم العزلة	مصدر الأصابة	مكان جمعها
Candida albicans	إلتهاب القدم ، تقرحات الجلد	مركز بحوث التقنيات الأحيائية
Candida kefyr	تقرحات الجلد	مركز بحوث التقنيات الأحيائية

جدول (2) المضادات الحيوية وتراكيزها والمذيب الخاص لها

المضاد الحيوي	الرمز	التركيز	المذيب	المادة المخففة
Nystatin	NY	30µg	داي ميثل فورمامايد	داي ميثل فورمامايد
Clotrimozole	CZ	30µg	هيدروكسيدالصوديوم (1M)	داي ميثل فورمامايد
Fluconazol	FZ	30µg	هيدروكسيدالصوديوم (1M)	داي ميثل فورمامايد

جدول (3) تأثير المضادات الحيوية بوساطة قياس أقطار التثبيط (المعدل± الخطأ القياسي) في نوعين من الخميرة

المضاد	أقطار التثبيط (ملم) للخميرة	
	C albicans	*C. kefyr*
Nystatin	2.0±13.00	0.2±17.00
Clotrimozole	0.2±18.00	0.1±13.00
Fluconazol	0.2±21.00	0.1±16.00

جدول (4) تأثير مستخلصات أوراق نبات فرشاة البُطل بوساطة قياس أقطار التثبيط في الخميرة

التركيز (ملغم/مل)	*Candida albicans*	*Candida kefyr*
0.1	0.0±0.0 d B	0.0±0.0 d B
0.5	0.88±21.67c A	0.33±17.33c B
1	0.67±23.33b c A	0.57±20.0b B
5	0.57±25.0b A	0.88±21.67b B
10	0.67±28.67a A	0.88±24.67a B
20	0.88±30.33a A	0.88±25.33a B

– معاملة السيطرة في كلا الخميرتين كانت صفر

الحروف المتشابهة الصغيرة يعني عدم وجود فرق معنوي بين الأعمدة (التراكيز) عند مستوى معنوية $P<0.05$

الحروف المتشابهة الكبيرة يعني عدم وجود فرق معنوي بين الصفوف (الخميرة) عند مستوى معنوية $P<0.05$

جدول (5) نتائج كشوفات المواد الفعالة في مستخلصات نبات فرشاة البُطل

المادة الفعالة	الكحول الاثيلي
القلويدات	–
الفلافونويدات	+
الكلايكوسيدات	+
التانينات	+
الكومارينات	–
الزيوت الطيارة	+
التربينات	+
الستيرويدات	–
الراتنجات	+
الصابونينات	+
الفينولات	+

(+) وجود المركب (–) عدم وجود المركب

المصادر

القيسي ، صفاء الدين أحمد شنتر . (2008) . تأثير الزيت الطيار لنبات الآس *Myrtus communis* في نمو وفعالية بعض الأنواع البكتيرية المرضية وخميرة *Candida albicans* . مجلة أم سلمة للعلوم 5(1):8-12 .

رويحة ، أمين (1983) . التداوي بالإعشاب . الطبعة السابعة . دار القلم . بيروت – لبنان . ص 27-88 .

Chitwood,D.J.(2002).Phytochemicl Based Strategies for Nematode Control. Annu. Rev. Phytopathol. 40,221-249 .

Cowan,M.M.(1999). Plant Products as Antimicrobial agents. Clin. Microbiol. Rev. 12(4)564-582 .

Cribb,A.B.(1976). Wild Food in Australia , Fontana

Chakravarty, H.L.(1976). Plant Wealth of Iraq. Vol.1, Ministry of Agriculture and Agrarian Reform , Bagdad , Iraq. P.505 .

Eloff, J.N.(1998). Which Extractant Should be Used for Screening and Isolation of Antimicrobial Components from Plants. J. Ethnopharmacol. 60,1-8

Ekwenye,U.N. and Elegalam,N.N. (2005). Antibacterial Activity of Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and (*Allium sativum* L.) Extract on *Escherichia coli* and *Salmonella typhi* . Journal of Moleaular and Advanced Science. 1(4),411-416

Frame,A.D.,Rios olivares, E., Dejesus, L.,Ortiz,D., Pagan, J. and Mendez,S.(1998). Plants from Puerto Rico with Anti-*mycobacterium tuberculosis* Properties P.R. Health. Sci. J. 1(3),43-52 .

Gilman, E.F. and Watson,D.G.(2006) ENH271, One of a Series of the Environmental Horticulture Department, Florida Cooperative Extension service , Institute of Food and Agricultural Sciences , University of Florida .

Grae,I.(1974). Nature's Colors-Dyes from Plants. MacMillan Publishing Co. New York .

Grayson,D.H.(2000).Monoterpenoids. Nat. Prod. Rep. 17,385-419.

Harborn,B.,Mabary,T.J. and Mabry,H. (1975). Physiological and Functional of Flavonoids. New York, San Francisco.

Harvey,R.(2007). Australian National Botanic Gardens .

Jawad,A.M. and Jaffer,H.J.(2008). *In vitro* Antimicrobial Activity of Total Sesquiterpene Lactones and Phenols Isolated from some Iraqi Plants. Um Salama Science Journal. 5(1),80-83.

MacFaddin, F. J. (2000). Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. 3rd ed. Printed in United State of America .

NCCLS. (2002). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing. Twelfth Informational Supplement.

Sawi, S.A.(2007). Comparison Between the Chemical Composition and Radical Scavenging Activities of Essential Oils of Leaves , Flowers and Fruits of *callistemon lanceolatus* DC grown in Egypt. Planta Med. 73,892 .

Perez, L., Pauli, M. and Bazequre.P.(1990). Antibiotic Assay by the Agar-well Diffusion Method. Journal of Actabiology. 15,113-115 .

Pandey, A.K.(1995). Fungitoxicity of Essential Oil of *Callistemon lanceolatus* DC Against Some Sugarcane Pathogens. Proc. Nat. Acad. Sci. India. 65(1),73-80

Sibanda,T. and Okoh,A.I.(2007). The Challenges of Overcoming Antibiotic Resistance : Plant Extracts as Potential Sources of Antimicrobial and Resistance Modifying Agents. Afr. J. Biotechnol. 6(25),2886-2896 .

Singh,B.,Katoch,M.,Ram,R. and Zaidi ,A.(2007). A New Antiviral Agent from Indian Horse Chestnut *Aesculus indica*. European Patent EP1489910 .

Sudhakar,M.,Rao,C.V.,Rao,A.L. and Raju,D.B.(2004). Antinociceptive and Anti – inflammatory Effects of the Standardized Oil of Indian *Callistemom lanceolatus* Leaves in Experimental Animals. Acta Pharmaceutica Turcica. 46,131-139 .

Srivastava, S.K., Ahmad, A. , Syamsunder,K.V.,Aggarwal,K.K. and Khanuja, S.P.S.(2003). Essential Oil Composition of *Callistemon viminalis* Leaves from India. Flavour and Fragrance Journal. 18(5),361-363 .

Wilson,G.(2007). AGenus of Useful Landscaping Plants. AILA's landscape architecture online magazine. 30-32