جمهوريَّة العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جـامعة ديـالى
كلية التـربية للعلوم الصرفة
قسم عـلوم الحيـاة

التصنيف الجزيئي لثلاث أجناس من العائلة الآسية واختبار تأثير مستخلصاتها الكحولية على عزلات بكتيرية ممرضة

أطروحة مقدمة إلى مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة ديالى وهي جزء من متطلبات نيل درجة الدكتوراه فلسفة في علوم الحياة

مقدمة
من قبل الطالبة
علا رباح محمود
بكالوريوس علوم حياة 2013-2014 جامعة ديالى
ماجستير علوم حياة 2017-2018 جامعة ديالى

بإشراف

أ.م. د.اسيل كاظم الانباري

محرم 1444هـ

آب 2021م

الفصل الأوَّل

المقدمة Introduction

من فضل الله على الإنسان أن أوجد له النبات ليكون غذاء له ويستخرج منه العلاج لكثير من الأمراض المعدية وبذلك أتجه الإنسان بتفكيره إلى استغلال ما وهبه الله له من ثروات فعرف العلاج بالأعشاب منذ القدم وعمل من الطبيعة المحيطة به أول صيدلية يلوذ بها ليجد الدواء الشافي ، إذ أن ألأعشاب الطبية اكتسبت في العقود الأخيرة شعبية كبيرة بسبب فكرة أنها، كمنتجات طبيعية، لها آثار ضارة أقل وفعالية أفضل من نظائرها الاصطناعية (Abushouk وآخرون، 2017). ووفقا" لاعلان منظمة الصحة العالمية بضرورة العودة إلى العلاج بالأعشاب الطبيعية والحد من تناول الادوية المصنعة وذلك لما تشكله من تأثيرات جانبية سلبية، يستخدم 80٪ من سكان العالم حاليًا الأدوية التقليدية كمصدر أساسي للعلاج الصحي (World Health Organization،2003).

تضم الفصيلة الآسيَّة Myrtaceae حوالي 3500 نوع، موزعة على 100 جنس، تنمو في المناطق الحارة من العالم ، تحتوي نباتات هذه العائلة على مركبات كيميائية فعالة لتثبيط نمو عدد من أنواع البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام ومن هذه النباتات فرشاة البطل شجرة فرشاة القنينة أو (البطل) *Calistemon viminalis* ،اذ تحتوي على مركبات كيمائية فينولية تستخدم لأغراض طبية مثل آلام المعدة والتهابات الجلد وحالة الجهاز التنفسي (Christenhusz وآخرون،2016) ، ولايخفى على احد ان الاوكالبتوس *Eucalyptus spp* شجرة خشبية معمرة حيث يحتوي على مركبات كيميائية تدخل في علاج الكثير من الأمراض المعدية ومن هذه المركبات هي فلافونويدات وتربينات وزيوت طيارة(حسوني وآخرون، 2013)، وعطر الياس يسبق اهميته، إذ يحتوي أحماض فينولية ودباغية وراتنجات. أكد الكثير من العلماء ومنهم(Benzie و Wachtel– Galor،2011)، على العودة للطبيعة وتقييم كفاءة المستخلصات النباتية بطيئة الشفاء لكن عديمة الآثار الجانبية ضد أنواع الميكروبات الممرضة لتأكيد فعاليتها الوظيفية وإجراء دراسات دوائية لتصنيع دواء بديل أكثر فعالية وبضمنهابكتريا *Acinetobac*ter *baumannii* و *Pseudomonas aeruginosa*و*Staphylococcus aureus*. ونظرا لتواجد مراتب هذه العائلة في العراق ولتوفير قاعدة بيانات تصنيفية وراثية وكيمياوية واستجابة للتوصيات والمقالات الصادرة عن منظمة الصحة العالمية والتي تدعو الى تكثيف الجهود من اجل زيادة مجالات استخدام وتطبيق النبانات الطبية كمصادر للطب البديل عن طريق اهميتها الصيدلانية لذا اقترح موضوع الدراسة ليشمل الجوانب الأتية :

1. التصنيف الجزيئي لبعض اجناس العائلة الآسيَّة ذات الاهمية الطبية وهي كل من

C. viminalis و *E. spp.* و *M. communis* بإستخدام مؤشرات جزيئية متخصصة وعشوائية ورسم شجرة النشوء والتطور phylogenetic tree لهذه الاجناس الثلاثة لتحديد مدى التقارب الوراثي بين هذه الاجناس.

2. دراسة كيموحيوية لتشخيص وتوظيف المركبات الفينولية المتواجدة في الاجناس قيد الدراسة باستعمال تقنية HPLC واستخدام التصنيف الكيميائي لعزل المراتب ؛ يعد دلالة صيدلانية لمحتوى الاجناس العراقية التابعة للعائلة المدروسة من الفينولات .

3. إختبار فعالية المستخلصات الكحولية النباتية للأجناس الثلاثة على القدرة التثبيطية لبعض العزلات البكتيرية المرضية كل من *A. baumannii* و*P. aeruginosa* و *S. aureus* .

4. استخدام مضاد بكتيري مع مستخلصات الدراسة الحالية لدراسة التأثير التأزري له ضد العزلات البكتيرية *A .baumannii* و *P. aeruginosa* و *S. aureus*

الخلاصة Abstract

أجريت هذه الدراسة في مختبرات كلية التربية للعلوم الصرفة \جامعة ديالى من كانون الاول 2019 الى شهر تشرين الثاني2021 بهدف ايجاد التقارب الوراثي بين الاصناف النباتية التابعة للعائلة الآسية *Callistemon viminalis* (Sol ex Gaertn.) G.Don ex loudon ، *Eucalyptus spp*، *Myrtus communis* L. بأستخدام تقنية (RAPD) وتقنية (ITS) ،ومعرفة ما تحتويه النباتات المدروسة من مركبات فعالة طبيا باستخدام تقنية الفصل كروموتوغرافيا السائل عالي الدقة (HPLC) وايجاد القدرة التثبيطيه للمركبات الفعالة على ثلاثة انواع من العزلات البكتيرية(*A.baumannii*, *P.aeruginosa*, S. *aureus*) حيث استعمل 25 بادئ عشوائي تميَّز البادئ OPA-15 في*Callistemon viminalis* نبات فرشاة البطل بظهور حزمتين فريدة تراوحت الأوزان الجزيئيَّة لها 700 و800 زوج قاعدي ولم تظهر هذه الحزم في الأصناف الباقية أمَّا البادئ OPC-20 ؛ فقد تميَّز بظهور حزمة فريدة ذات وزن جزيئي 800 زوج قاعدي و أظهر البادئ (OP-C7) لنبات اليوكالبتوس حزمة واحدة ذات وزن جزيئي 600 زوج قاعدي ومع هذه الحزمة يصبح العدد الكلي للحزم المتضاعفة أربع حزم فقط، إذ لم تظهر أي حزم أخرى لبقية البوادئ ولجميع الأصناف المدروسة ؛هذه النتيجة كانت غير كافية لإيجاد التقارب الوراثي ورسم الشجرة الوراثية للأصناف لذا تم الاستعانة بتقنية التسلسل المتكرر للجينوم ITS باستخدام البوادئ المتخصصة ITS1 و ITS4 تم تحديد الشجرة للنباتات قيد الدراسة باستعمال برنامج Chromas، لغرض معرفة التشابه بين النباتات قيد الدراسة والنباتات المسجلة عالميا، إذ تم تحديد الشجرة الوراثِيَّة للنباتات بتتابع القواعد النايتروجينية (Nucleotide sequence) لحزم الحامض النووي المضاعفة بالاستعانة ببرنامج(BLAST) Basic Local Alignment Search Tool التابع لموقع المركز الوطني لمعلومات التقانة الحيوية NCBI)National Center for

Biotechnology Information في الولايات المتحدة) والعائدة لنفس النباتات المشخصة عالميًا، إذ بينت نتائج التقنية وجود تقارب وراثي بين الأصناف النباتية، إذ ظهرت الابعاد الوراثِيَّة وإنعزلت الأنواع بشكل مجموعتين رئيسيتين بلغت نسبة التشابه بينهما 0.0561% ؛ إذ كان نبات الاس (M.communis) اقرب وراثيا إلى نبات فرشاة البطل (C.viminalis)،أما نبات الاوكالبتوس(Eu.SPP) كان الأبعد وراثيًا، أُجريت سلسلة من التجارب لغرض تشخيص المركبات الفينولية الموجودة داخل النباتات قيد الدراسة وبينت فعالية وكفاءة تقنية الفصل الكروموتوغرافي HPLC في معرفة المواد الفعالة داخل كل نبات من النباتات قيد الدراسة ،أذ بينت النتائج ان الانواع المدروسة اشتركت في العديد من المركبات وعلى هذا الاساس يمكن تقسيمها الى مجاميع حسب درجة التقارب ووجود المركبات الفعالة حيث سجل ال Gallic acidوجوده في جميع الانواع وسجل أعلى تركيز في *Eucalyptus.spp* كان 662.929 ميكروغرام / مل، بينما كانت أقل نسبة في *M. Communis* بمتوسط 60.525 ميكروغرام / مل.بينما سجل وجود Ferulic acid في النوعين (فرشاة البطل واليوكالبتوس)بتركيز 359.149 لفرشاة البطل و 104.835ميكروغرام\مل لنبات اليوكالبتوس،مما يدل على وجود تقارب وراثي بين كل من فرشاة البطل واليوكالبتوس حيث تشابه الاثنان في بعض نواتج الايض، وقد انفرد كل نوع من الانواع بمجموعة من المركبات الفعالة تختلف فيما بينها حسب النوع بالمدروس ومما يجب ان يشار له ان النوع (*M. Communis*) سجل اكبر عدد للمواد الفينولية وبلغ (11)مركبا ،اما اقل عدد فقد سجل في نبات (*Eucalyptus.spp*) وبلغ (8) مركبا فينوليا و تميز باحتوائه على مركب Eucalptone الَّذي يحتوي على أعلى تركيز كان 1020.201 ميكروغرام / مل ، بينما حقق حمض الفيروليك أقل تركيز بلغ 104.835 ميكروغرام/ مل،.بينما سجل فرشاة البطل (9) مركبات فينولية وكان أكثرها مركب هو حمض الساليسيليك بتركيز 862.309 ميكروغرام / مل واقلها

مركب كاتيكول بتركيز 156.579 ميكروغرام / مل، وفصل *C. viminalis* سبعة مركبات فريدة .بينت الدراسة ان للمركبات الفينولية المدروسة نشاطا" مضاداً للأكسدة ومقدرتها على إزاحة الجذور الحرة وقد اختلف محتوى النبات من الفينولات الكلية ومضادات الاكسدة بين النباتات قيد الدراسة ؛ قد حقق المستخلص الكحولي للآس اعلى محتوى من الفينولات ، إنَّ نشاط الكسح للمستخلص الكحولي *E. spp* ومستخلص *M. communis* عند 200 ميكروغرام/ مل اعلى مقارنة بحامض الأسكوربيك. كانت 95.95 و 96.36 ميكروغرام/ مل على التوالي ، أمَّا *C. viminalis* فقد كانت حتى عند 300 أقل من حمض الإسكوربيك .

أجري اختبار حساسيَّة العزلات البكتريه ولأربعة عشر مضادًّا حيويًّا ، قُرئت النتائج بقياس مناطق التثبيط المتكونة حول أقراص المضادات الحيوية وفسرت النتائج على أنَّ العزلة حساسة أو مقاومة ، إذ بينت النتائج أنَّ بكتريا *A.baumannii* كانت حساسة لخمسة أنواع من المضادات الحيوية ومقاومة لتسعة أنواع من المضادات الحيوية ، أمَّا بكتريا *P.aeruginosa* ؛ فقد كانت حساسة لخمسة أنواع من المضادات الحيوية ومقاومة لتسعة أنواع من المضادات الحيوية وتميزت بكتريا *S.aureus* بكونها حساسة لستة أنواع من المضادات الحيوية ومقاومة لثمان أنواع من المضادات الحيوية وايضا بينت نتائج الدراسة فعالية المستخلصات النباتية الكحولية ، إذ بينت نتائج الدراسة فعالية المستخلص الكحولي للنباتات المدروسة وبتراكيز (0.1، 0.6، 0.3،0.01 ، 0.03، 0.06%)ملغم /مل في تثبيط العزلات البكتيرية المذكورة آنفا" ، إذ سجل مستخلص الآس أعلى متوسط قيمة لهالة التثبيط ضد بكتريا*S. aureus* بتركيز 0.06 وبلغ 31 مليمتر، في حين بلغ معدل قطر هالة التثبيط لنفس المستخلص 15 مليمتر ضد بكتريا *P. aeruginosa* بتركيز 0.01 وعدت أقل هالة تثبيط ضد البكتريا الاختباريا وأظهرت النتائج أنَّ المستخلص الكحولي لليوكالبتوس أعطى أعلى أكبر قطر تثبيطي وعند تركيز 0.6% وكان 31مليمتر لبكتريا

S.aureus ؛ وأقل قطر تثبيطي عند تركيز 0.06 بقطر 11مليمتر لبكتريا *P.aeruginos* بينما تفوق المستخلص الكحولي لنبات فرشاة البطل عند تركيز 0.3% بتكوينه أكبر قطر تثبيط لبكتريا *S.auareus*وهو30مليمتر، نلاحظ من النتائج تفوق المستخلصات النباتية الثلاثة عند التركيز 0.06 و0.6 و0.3% في تثبيط بكتريا *S.auareus* وأيضًا وضحت نتائج التجربة التأثير التآزري للمستخلصات النباتية مع مضاد الكلورامفينكول، إذ أظهرت المستخلصات النباتية ومضاد الكلورامفينكول تأثيرًا تآزريًّا ضد البكتريا التي كانت مقاومة لعدد أكبر من المضادات الحيويَّة، أمَّا العزلات التي كانت حساسة لعدد أكبر من المضادات الحيويَّة فقد أظهرت تأثيرًا تآزريًّا أعلى، إذ أظهرت النتائج تأثيرًا تآزريًّا واضحًا على بكتريا *A.baumannii*، إذ كان معدل أقطار التثبيط 33 مليمتر لخليط مستخلص الآس مع الكلورامفينكول و31 مليمتر لمستخلص فرشاة البطل واليوكالبتوس، أيضًا أعطى خليط المستخلصات النباتية مع مضاد الكلورامفينكول تأثيرًا تآزريًّا على بكتريا *P.aeruginosa* ؛ إذ كان معدل أقطار التثبيط لخليط مستخلص الآس 31 مليمتر و30 مليمتر لخليط مستخلص فراشة البطل واليوكالبتوس وحدوث أقل تأثير تأزري لبكتريا *S.aureus* لخليط المستخلصات النباتية الثلاثة مع مضاد الكلورامفنيكول نتيجة لنقصان معدلات أقطار التثبيط ووصولها إلى 22 مليمتر .