دراسة تأثير المستخلص الأسيتوني لأوراق نبات الاستيفيا المزروع في سورية في بعض الأنواع الجرثومية

الملخص

تضمّنت الدّراسة عزل الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* والإيشيريكية الكولونوية *Escherichia coli* والعنقوديات الذهبية *Staphylococcus aureus* من مشافي مدينة حمص، وتحديد هويّتها بالاعتماد على الصفّات الزرعية والمجهريّة والاختبارات البيوكيميائيّة ونظام API (Analytical Profile Index)، وذلك بهدف دراسة الفعاليّة البيولوجيّة للمستخلص الأسيتوني لأوراق نبات الاستيفيا *Stevia rebaudiana*.

أظهرت دراسة حساسيّة العزلات المدروسة للمضادات الحيوية إلى مقاومة أربع مضادّات حيويّة على الأقل وهي: Penicilline و Azitromycin و Tetracyclin و Cephaclore وبيّن المسح الكيميائي الكيفي لمستخلصات الأوراق احتواء المستخلص الأسيتونيّ على القلويدات والفلافونوئيدات والغلوكوزيدات.

أبدى المستخلص الأسيتوني فعالية تثبيطيّة تجاه العزلات المدروسة لجميع التراكيز، وبلغت قيمة متوسّط أقطار هالات تثبيط النموّ للزائفة الزنجارية بين 7-21mm وللإيشيريكيّة الكولونيّة 25-7 mm وللعنقوديّة الذهبية 27-15 mm. كما تمّ تحديد قيمة التركيز المثبّط الأدنى MIC وقيمة التركيز القاتل الأدنى MBC للمستخلص تجاه العزلات المدروسة وقد تباينت النتائج تبعاً لاختلاف نوع الجراثيم حيث سجّلت أقلّ قيمة MIC و MBC بـ 20 mg/ml و 30mg/ml، على التوالي للمكوّرات العنقودية الذهبية.

بيّنت الدراسة الإحصائيّة باستخدام برنامج SPSS واختبار ANOVA عدم وجود فروق معنوية بين كافة العزلات المدروسة، وكان التركيز 100mg/ml وهو التركيز الأكفأ بالنسبة للزائفة الزنجاريّة والإيشريكيّة الكولونية، أمّا التركيز 200mg/ml هو الأكفأ بالنسبة للمكورات العنقودية الذهبية.

الكلمات المفتاحيّة: الاستفيا– مستخلصات نباتية– فعالية بيولوجية–جراثيم –مقاومة

Studying the Effect of Some Extracts of Stevia Leaves Grown in Syria on Some Bacterial Species

Abstract

The study involved the isolation and identification of Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, and Staphylococcus aureus from hospitals in Homs city. The identification was based on cultural and microscopic characteristics, biochemical tests, and the Analytical Profile Index (API) system. The primary objective was to evaluate the biological efficacy of the acetone extract of Stevia plant leaves.

Antibiotic sensitivity testing revealed that the isolates exhibited resistance to at least four antibiotics: **Penicillin**, **Azithromycin**, **Tetracycline**, and **Cephalexin**. A qualitative chemical analysis of the leaf extracts indicated the presence of alkaloids, flavonoids, and glucosides in the acetone extract.

The acetone extract demonstrated inhibitory activity against all tested isolates at various concentrations. The average diameters of the growth inhibition zones were as follows: ***Pseudomonas aeruginosa*** (7-21 mm), ***Escherichia coli*** (7-25 mm), and ***Staphylococcus aureus*** (15-27 mm). The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) values of the extract were assessed against the studied bacterial isolates. The results demonstrated variability depending on the bacterial species, with the lowest MIC and MBC values recorded at 20 mg/ml and 30 mg/ml, respectively, for ***Staphylococcus aureus***.

Statistical analysis using SPSS and ANOVA indicated no significant differences among the isolates. The concentration of 100 mg/ml was found to be the most effective for ***Pseudomonas aeruginosa*** and ***Escherichia coli***, while a concentration of 200 mg/ml was most effective for ***Staphylococcus aureus***.

Keywords: *Stevia rebaudiana*- Plant extracts- Biological activity- Bacteria- Resistance

المقدّمة والدراسة المرجعية

تعدّ مقاومة الجراثيم لفعل المضادّات الحيويّة إحدى أهمّ التحدّيات التي تواجه المختصين في المجال الطبّي والصيدلاني، وقد لوحظ الانتشار الواسع لاستعمال المضادات الحيوية بشكلٍ عشوائيّ ودون إتمام مدّة العلاج، مما أدّى لتفاقم المشكلة (1). لهذا، لجأ الباحثون إلى الاهتمام بدراسة النباتات الطبيّة والانتفاع بها في معالجة الأمراض المختلفة، إذا تحتوي النباتات الطبيّة على عدد كبير من

المكونات الفعالة طبياً، والتي تعكس الإمكانات العلاجية الكبيرة لهذه النباتات (2). لوحظ أنّ لبعض المواد الفعالة المستخلصة من النباتات فعالية أكبر من نفس المادّة المصنّعة كيميائيّاً، كما أنّ النباتات الطبيّة تحتوي على أكثر من مادّة فعالة تعمل مع بعضها بشكلٍ متوازن لعلاج الحالة المرضية، وهذا ما لا نجده في المركبات الدوائيّة المصنّعة مخبرياً (3). يُمكن تصنيف تلك المكوّنات النباتيّة إلى الفينولات *Phenols* والفلويدات *Alkaloids* والصابونينيات *Saponins* والتربينات *Terpens* والغليكوزيدات *Glycosides* والزيوت الأساسيّة العطريّة *Essintial oils* وغيرها (4). تحتوي النباتات أيضاً على مواد غذائيّة وفيتامينات، كما أنّها تخلو من الآثار الجانبية الضارّة التي تصاحب استعمال الأدوية المصنّعة كيميائيّاً، وتمتاز بقوّة وسرعة تأثيرها العلاجي وقلة كلفتها وسهولة تحضيرها وسعة انتشارها (5).

من النباتات المستخدمة على نحوٍ شائع لفوائدها الطبيّة، نبات الاستيفيا *Stevia rebaudiana*، وهو نبات شبه استوائي، عشبي معمّر، صغير الحجم، يبلغ ارتفاعه *30-60 cm*، وتمتدّ أوراقه لتنمو على طول الجذوع، وتصطف مقابل بعضها. تعدّ أمريكا الجنوبيّة موطنها الأصلي، وتحديداً شمال البراغوي، ويُسمّى بورق العسل حيث تحتوي أوراقه على مجموعة من المواد ذات الطعم الحلو التي تفوق حلاوته حلاوة السكر العادي المستخرج من قصب السكر والشوندر السكري بـ 300 ضعف، كما أنّ تلك الحلاوة خالية من السعرات الحراريّة (6,7). يرتبط هذا الطعم الحلو بوجود الغليكوزيدات *Glycosides* والتي يكون الستيفيوزيد *Stevioside* والريبودوزايد *Rebaudioside A A* أكثرها أهميّة، لا يُمكن لهذين الغليكوزيدين أن يتحلمها أو يُمتصّا من قبل الجهاز الهضمي البشري، لذا فهما لا يؤثران على مستوى الغلوكوز في الدّم، وكذلك يحتوي نبات الاستيفيا أيضاً على التربينوئيدات الثنائيّة *Diterpenoides* (8).

ينتمي هذا النبات إلى شعبة مغلّفات البذور، مجموعة ثنائيّات الفلقة ورتبة النجميات عائلة *Eupatorieae*، جنس *Stevia* نوع *rebaudiana*، وهو واحد من *154* نوع لهذا الجنس (9). يحتاج نموّ هذا النبات إلى درجة حرارة معتدلة ورطوبة نسبيّة تصل إلى *80%*، كما أنّ بذوره منخفضة الإنبات، إذ لا تتعدّى نسبة الإنبات *9%*، حيث يُعطي الإكثار بالبذور نباتات غير متجانسة، وتختلف

في صفاتها الشكلية، لذا يتمّ زراعته باستخدام تقنية زراعة الأنسجة كطريقة بديلة للحصول على عدد كاف من النباتات، بحيث تكون مشابهة للأمهات خلال فترة قصيرة من الزمن (10).

يمتلك نبات الاستيفيا العديد من الاستعمالات العلاجية مثل التأثير المضاد للسرطانات والمضاد لتنخّر الأسنان والمثبط لتراكم الدهون والخافض لضغط الدّم والخافض للوزن عند الإنسان، كما أنّه مدرّ للبول وموسّع للأوعية ومقوّ عام للجسم (11,12). يُستخدم نبات الاستيفيا أيضاً في معالجة الجروح، ويحتوي على العديد من مضادات الأكسدة (13,14)، فهو يحتوي على الفينولات والفلافونوئيدات والتربينات والستيرولات والتانينات إضافةً بعض الفيتامينات والمعادن (15)، وتمثّل عديدات الفينول *polyphenols* ما نسبته *2-4%* من وزن الأوراق الجافّة (13,15)، ويمكن لجميع تلك المركبات أن تعمل كمضادات أكسدة ومضادات ميكروبية ومضادّات التهابات ومضادّة سرطان (16). وقد أكّدت دراسةٌ لتأثير مركب الستيفيول المستخلص من أوراق نبات الاستيفيا على الخلايا السرطانية البشريّة في الجهاز الهضمي أنّ تركيز *100-200 mcg/ml* من الستيفيول تقلّل من قابليّة نموّ خلايا سرطان القولون، وأنّ هذا التركيز يعمل بفعاليّة مماثلة لـ *5*–فلوروبوراسيل (وهو عقار كيميائيّ ضدّ السرطان). ووفقاً لما سبق، فقد يصبح الستيفيول عامل علاج كيميائي محتمل لعلاج السرطان (17). كما أنّ الغليكوزيد المسمّى ستيفيوزيد الموجود في نبات الاستيفيا أقلّ تسبّباً لموت الخلايا الطبيعيّة حتّى في الجرعات العالية (18)، وقد وجدت إحدى الدراسات أنّ الستيفيوزيد يُمكن أن يثبّط موت الخلايا المبرمج في الميتاكوندريا، فضلاً عن قدرته على خلق فعاليّة قويّة مضادّة للسرطان ضدّ خلايا سرطان الثدي *Mcf-7* المزروعة (19). وعن الأدوار الأخرى لنبات الاستيفيا، فقد أوضحت دراسةٌ أهميّة الخلاصة المائيّة لأوراق الاستيفيا في استخدامها كمضادّ للالتهابات وكمضاد وذمة من خلال قيام الجزء أسيتات الإيثيل للخلاصة بتثبيط البلاعم *RAW264* عن طريق عملها على *NF-B* الذي يؤدّي إلى انخفاض مستوى بروتين الانترليوكين *IL-6*، والذي بدوره يساعد على تنظيم ردّ الفعل المناعي (20).

كما ذُكرَ سابقاً، فقد درست فعالية أوراق الاستيفيا المضادّة للميكروبات. وقد شملت إحدى الدراسات العمل على خلاصاتٍ مائية وكلوروفورمية وخلاتيّة لأوراق نبات الاستيفيا وتحرّي تأثيرها المضاد للميكروبات ضدّ عزلات جرثوميّة مرضية ضمّت كل من الإيشيريكيّة الكولونية *Echerichia coli* والزوائف الزنجاريّة *Pseudomonas aeruginosa* والعنقوديات الذهبية *Staphylococcus aureus*

والعصيات الهشّة *Bacillus subtilis*، وقد لوحظَ تباين في الفعالية الحيويّة بتباين نوع المذيب المستخدم. كما لوحظ زيادة الفعالية بزيادة التركيز، حيث كانت أعلى استجابة عند التركيز *100 mg/ml* للخلاصة الكلوروفورمية، تلاها الخلاصة الخلاتية فالمائية. وتراوحت أقطار هالات منع النمو للمكورات العنقودية الذهبية ما بين *5-18 mm*. أمّا للزائفة الزنجارية، فقد كانت استجابتها أقل وبقطر هالة منع نموّ تراوحت ما بين *2-14 mm* (21). في دراسةٍ أخرى عملت على عدّة مستخلصات لأوراق الاستيفيا (إيثانولية وميثانولية وكلوروفورمية ومائية) إضافةً لاستخدام مستخلصات إيتانولية ومائيّة وخلاتية لأزهار النبات، دُرِس النشاط المضاد للميكروبات لتلك المستخلصات ضد عزلات جرثومية مرضية على الجسم الحيّ وفي الزجاج، ولوحظَ انّ تلك المستخلصات أبدت نشاطاً جيّداً كمضاد للجراثيم المختبرة كافّة، وقد تفوّق المستخلص الإيتانولي للأوراق على بقيّة المستخلصات من ناحية إعطائه لقطر هالة من نموّ للزائفة الزنجارية بلغ *22 mm*، في حين كانت مقاومتها لأغلب المضادات الحيوية عالية (22). تمّ تحديد التركيب الكيميائي لمستخلصات أوراق نبات الاستيفيا باستعمال خمس طرائق مختلفة للاستخلاص، وشملت الاستخلاص المائي والميتانولي وباستخدام الأمواج فوق الصوتية والأمواج الدقيقة (المايكروويف) والاستخلاص الإنزيمي وباستعمال جهاز *HPLC*. إذ تمّ تقدير المحتوى الكلي للفينولات والفلافونوئيدات والتانينيات والسكريات الكلية المختزلة وغير المختزلة في المستخلصات الخمس، وأبدت جميعها احتواءها على مركبي التحلية *Stevioside* و*Rebanioside*. كما أعطى المستخلص الإنزيمي والميثانولي أعلى محتوى من الفينولات والفلافونوئيدات، وأعلى فعالية مضادّة للأكسدة مقارنة بطرق الاستخلاص الأُخرى. وكان المستخلص الميتانولي هو الأفضل في تثبيط الجراثيم، وقد احتوت جميع المستخلصات على المركبات الفعالة (23,24). في دراسة أجريت في كلية الزراعة بجامعة دمشق، أظهرت أن الأوراق الجافّة لنبات الاستيفيا قد احتوت على نسبة *10.11%* من الرطوبة و*11.81%* من البروتين و*14.55%* رماد و*4.54%* شحوم. وقد شكلت الكربوهيدرات الكلية المحتوى الأعلى بين المكونات الأساسيّة لأوراق الاستيفيا الجافّة، إذ بلغت *52.61%* وكانت نسبة الكربوهيدرات الكلية الذائبة والسكريات المختزلة والسكريّات غير المختزلة والألياف *16.35%* و*5.44%* و*10.91%* و*16.5%*، على التوالي. وبلغت الطاقّة الكليّة للأوراق الجافّة *298.54* كيلوركالوري/*100* غرام. أمّا بالنسبة لمحتوى الأوراق من المكوّنات الفعالة، فقد كان محتواها من الغليكوزيد الاستيفيوزيد *6.08%*، ومن الفينولات الكليّة *3275*

مع مكافئ حمض الغاليك/*100* غرام، أمّا النشاط *DPPH* فقد كان *86.97%*. كما أعطى المستخلص المائي للأوراق رقم حموضة *pH 5.5*، ومحتوى من المواد الصلبة الذائبة *TSS* حوالي *3.7%* (25).

أهمية البحث:

تكمن أهمية البحث في دراسة فعالية مستخلص أوراق نبات الاستيفيا المضادّة لنموّ المكوّرات العنقودية الذهبية والإشيريكية الكولونية والزائفة الزنجارية المعزولات من حالات مرضية مختلفة بهدف الاستفادة من المواد الاستقلابية الطبيعيّة الثانوية لأوراق الاستيفيا في المستقبل، بوصفها مواد فعالة حيوياً وبديلاً للمضادّات الحيويّة في معالجة الأمراض الجرثوميّة المنشأ.

أهداف البحث:

بهدف البحث عن علاجٍ آمنٍ وفعّال ومتاح لبعض الجراثيم الممرضة، فقد تمحور البحث حول ما يأتي:

- الحصول على جراثيم المكورات العنقودية الذهبية والإشيريكية الكولونية والزائفة الزنجاريّة من عينات مرضية من مخابر في مدينة حمص، وتأكيد هويّتها.
- دراسة حساسيّتها لبعض المضادات الحيويّة شائعة الاستخدام.
- الحصول على مستخلص أسيتوني من أوراق الاستيفيا.
- الكشف الكيفي عن بعض المواد الفعالة في المستخلص، ودراسة الفعاليّة الحيويّة له ضدّ الجراثيم المدروسة وتحديد التركيز المثبّط الأدنى (*MIC*) والتركيز القاتل الأدنى (*MBC*) له.

المواد وطرائق البحث

جُمعَت 30 عيّنة مرضيّة شملت عينات بول، دم ومسحات جروح لمرضى مراجعين لمخابر الزرع الجرثومي في المشافي العامّة والخاصّة ومخابر التحليلات المرضيّة في مدينة حمص، بعد التأكّد من عدم استخدام المريض لأيّ نوعٍ من المضادّات الحيويّة قبل أخذ العيّنة.

زرع العيّنات: زُرعت العيّنات مباشرةً بعد نقلها للمخبر على أوساط الأغار المغذي والأغار الدّموي *Blood agar* ووسط ماكونكي *MacConkey*، وحضنت هوائيّاً بدرجة *37c* لمدّة *24* ساعة.

عزل الجراثيم وتنقيتها: عزلت الجراثيم اعتماداً على شكل المستعمرات ولونها والصبغات التي تفرزها، ونوع تحلل الدّم الذي أحدثته على أغار الدّم، ولغرض تنقيتها تمّ نقل مستعمرة منفردة من كل شكل من أشكال المستعمرات وتخطيطها على الأوساط المذكورة أعلاه (28–26).

تحديد هويّة الجراثيم المعزولة: شخصت الجراثيم اعتماداً على الصفات المظهريّة الاختبارات الكيميائيّة الحيويّة، وبالترتيب التالي اعتماداً على المرجع (29):

صبغة غرام، اختبار الاوكسيداز، اختبار الكاتلاز، اختبار الإندول واختبار أحمر الميثيل واختبار فوكس بروسكاور واختبار السترات (خاصّة بالإيشيريكيّة القولونيّة والزائفة الزنجاريّة)، اختبار المخثراز واختبار الدناز واختبار تخمر المانيتول (خاصّة بالمكوّرات العنقودية الذهبية)، كما تمّت الاستعانة بنظام*API (Analytical profile index)* لتأكيد تشخيص الجراثيم المدروسة. إذ تمّ اعتماد التعليمات المرفقة بعتيدة التشخيص وعند اختبار حساسيّة الجراثيم للمضادّات الحيويّة، تمّ اتباع طريقة الانتشار بالآغار باستخدام أقراص مشبعة بالمضادّات الحيويّة اعتماداً على المرجع (30).

تحضير الخلاصة النباتية:

تمّ الحصول على أوراق مجفّفة لنبات الاستيفيا، وطحنت باستخدام طاحونة كهربائيّة *woring blender* حتّى أصبحت بشكل مسحوق ناعم، وتمّ استخلاص أوراق النبات بطريقة الاستخلاص باستخدام الأسيتون وذلك حسب طريقة المرجع (31). وبعد الحصول على المستخلص الأسيتوني، تمّ الكشف الكيميائيّ عن بعض المكوّنات الفعّالة، والتي تضمّنت كل من: الصابونينيات والفلافونوئيدات والغلوكوزيدات والتربينات، وذلك حسب المرجع (32)، والفينولات حسب المرجع (33)، أمّا التانينيات فحسب المرجع (34)، والقلويدات والتربينوئيدات حسب المرجع (35).

دراسة تأثير الخلاصة الأسيتونية على نموّ الجراثيم:

حيث تمّ اتباع طريقة الانتشار في حفر الآغار *Agar well diffusion assay*، وذلك حسب المرجع (36). وتمّ تحديد التركيز المثبّط الأدنى*(MIC)* والتركيز القاتل الأدنى (*MBC)* للخلاصة الأسيتونية ضدّ الجراثيم المدروسة اعتماداً على المرجع (37) باستخدام طريقة العكارة.

النتائج والمناقشة:

تم الحصول على 10 عزلات جرثومية من كل من الزائفة الزنجارية والإيشركية القولونية والمكورات العنقودية الذهبية المشخصة مبدئياً من قبل مخابر الزرع الجرثومي لبعض المشافي في مدينة حمص، وتم تأكيد تشخيصها بإجراء الفحوصات المجهرية والزرعية والاختبارات الكيموحيوية ومقارنة النتائج باختبارات التعريف القياسية لأجناس وأنواع الجراثيم وفقاً لـ (29,38).

أظهرت نتائج الفحوصات التشخيصية الزرعية للعزلات النقية للأنواع الثلاثة المدروسة أن المستعمرات العائدة للزائفة الزنجارية دائرية الشكل ملساء وذات لون مخضر غير متألق منتشر على وسط الآغار المغذي، أما على وسط الآغار المدمى فظهرت مستعمراتها بلون غامق محاطة بهالة شفافة نتيجة لتحليلها للدم تحللاً كاملاً، أما على وسط ماكونكي فبدت مستعمراتها بلون شاحب كونها غير قادرة على تخمير سكر اللاكتوز في الوسط، بينما ظهرت مستعمراتها بلون نصف شفاف على وسط *EMB*. وبدت الخلايا الجرثومية عند الفحص المجهري بعد صبغها بصبغة غرام بشكل عصوي مفرد الترتيب سالبة لصبغة غرام، وبينت الفحوصات الكيموحيوية إيجابيتها لإختباري الأكسيداز والكاتالاز وذلك لقدرتها على إنتاج هذين الانزيمين واتصفت بسلبيتها لاختبار الإندول وأحمر الميتيل والفوكس بروسكاور وإيجابيتها لاختبار سترات السايمون حيث غيرت عزلات الزائفة الزنجارية لونه من الأخضر إلى اللون الأزرق.

أما مستعمرات الإيشركية القولونية فكانت دائرية ملساء ذات لون أبيض شفاف على وسط الآغار المغذي، أما على وسط الآغار المدمى فظهرت مستعمراتها غير محللة للدم، وعلى وسط ماكونكي بدت مستعمراتها بلون زهري أرجواني، في حين ظهرت مستعمراتها على وسط *EMB* صغيرة الحجم بلون بنفسجي غامق مع لمعة خضراء معدنية مميزة، وأظهرت نتائج الفحص المجهري للخلايا الجرثومية سلبيتها لصبغة غرام، وبينت الفحوصات الكيموحيوية سلبيتها لاختبار الأكسيداز وإيجابيتها لاختبار الكاتالاز، واتصفت بإيجابيتها لاختباري الإندول وأحمر الميتيل وسلبيتها لاختباري فوكس بروسكار وسترات السايمون.

أما بالنسبة للمكورات العنقودية الذهبية فكانت مستعمراتها على وسط الآغار المغذي دائرية محدبة لماعة ذات لون ذهبي، سطحها أملس وقوامها زبدي، أما على وسط الآغار المدمى فظهرت

مستعمراتها كبيرة الحجم صفراء اللون محللة للدم تحللاً كاملاً، وعلى وسط شابمان كانت مستعمراتها صفراء اللون وغيرت لون الوسط إلى الأصفر لقدرتها على تخمير سكر المانيتول، وأبدت إيجابيتها لاختباري المخثراز (المرتبط والحر) والدناز وهما الاختباران اللذان يميزان بين المكورات العنقودية الذهبية والمكورات العنقودية الأخرى، أما بالنسبة لاختبار الأكسيداز فكانت سالبة في حين أبدت إيجابيتها لاختبار سترات السايمون.

نتائج حساسية العزلات الجرثومية لبعض المضادّات الحيوية

تمّ اختبار حساسية ثلاث عزلات تابعة للأنواع الثلاث المدروسة (الزائفة الزنجارية والإيشركية القولونية والمكورات العنقودية الذهبية) تجاه عدد من المضادات الحيوية شائعة الاستخدام لتحديد المضاد الحيوي الذي سيتم استخدامه كشاهد إيجابي في دراسة الفعالية الحيوية لمستخلص أوراق نبات الاستيفيا الأسيتوني.

أظهرت النتائج تباين في مدى استجابة تلك العزلات للمضادات الحيوية المستخدمة فأبدت الزائفة الزنجارية أعلى استجابة للمضاد الحيوي *Amikacin* بقطر هالة تثبيط نمو *14 mm*، فيما كانت مقاومة إلى سبع مضادات حيوية هي: *Ciprofloxacin*، *Amox + Clavlan*، *Pencillin*، *Azitromycin*، *Tetracyclin*، *Cephaclore* و *Cloxacillin*. أما الإيشركية القولونية فأبدت أعلى استجابة للمضاد الحيوي *Ciprofloxacin* بقطر هالة تثبيط نمو *22 mm*، في حين كانت مقاومة إلى ست مضادات حيوية هي: *Amox + Clavlan*، *Pencillin*، *Azitromycin*، *Tetracyclin*، *Cephaclore* و *Cloxacillin*. أما المكورات العنقودية الذهبية فأبدت أعلى استجابة للمضاد الحيوي *Amox + Clavan* بقطر هالة تثبيط نمو *17 mm*، فيما كانت مقاومة إلى خمس مضادات حيوية هي:*Amikacin*، *Pencillin* ، *Azitromycin*، *Tetracyclin* و *Cephaclore*. والجدول (1) يوضح ذلك.

جدول 1 نتائج حساسية العزلات الثلاث المدروسة للمضادات الحيوية

اسم المضاد الحيوي	رمزه	تركيزه	الزائفة الزنجارية	الإيشركية القولونية	المكورات العنقودية الذهبية
Ciprofloxacin	*CIP*	*5*	*R*	*S*	*S*
Amox + Clavlan	*AMK*	*10*	*S*	*S*	*R*
Amikacin	*AX*	*25*	*R*	*R*	*S*
Gentamycin	*GM*	*30*	*I*	*S*	*S*
Pencillin	*P*	*10*	*R*	*R*	*R*
Vancomycin	*VA*	*30*	-	-	*S*
Azitromycin	*AZM*	*15*	*R*	*R*	*R*
Tetracyclin	*T*	*30*	*R*	*R*	*R*
Cephaclore	*CF*	*30*	*R*	*R*	*R*
Cloxacillin	*CL*	*5*	*R*	*R*	*S*
ملاحظة: تركيز المضادات الحيوية بوحدة (*µg*) ما عدا المضاد الحيوي *Pencillin* بقيمة وحدة عالمية (*IU*).					

اشتركت جميع العزلات بمقاومتها لأربع مضادات حيوية هي: *Pencillin*، *Azitromycin*، *Tetracyclin* و *Cephaclore*. وهذا يوافق ما ذكره (39) بوجود تغيير تدريجي ضمن أنواع الجراثيم الممرضة في حساسيتها للمضادات الحيوية، وذكر الأحمد وآخرون (2024) بأننا لا نتوقع وجود نمط ثابت لحساسية الجراثيم الممرضة للمضادات الحيوية وذلك بسبب الاستخدام الواسع والعشوائي للمضادات الحيوية (40).

نتائج الخلاصة الأسيتونية لأوراق الاستيفيا

تم الحصول على الخلاصة الأسيتونية لأوراق الاستيفيا، ويوضح الجدول (2) خواص الخلاصة ومردودها الذي تم تقديره باعتماد العلاقة الرياضية الواردة في المرجع (41).

جدول 2 نتائج خواص الخلاصة الأسيتونية لأوراق الاستيفيا

نوع الخلاصة	القوام	اللون	القابلية على الالتصاق	الوزن بالغرام	النسبة المئوية للمردود%
أسيتونية	شبه صلب	زيتي داكن	ملتصقة	1.375	2.75

بينت نتائج الكشف الكيميائي عن وجود عدد من مركبات الاستقلاب الثانوي باستخدام طرق الكشف الكيفي الأولي احتواء الخلاصة الأسيتونية على العديد من المواد الفعالة التي شملت القلويدات *Alkaloids* وفلافونوئيدات *Flavonoids* وغليوكوزيدات *Glycosides*، وهو ما يوضّحه الجدول (3).

جدول 3 نتائج الكشف الأولي عن المواد الفعالة للمستخلص الأسيتوني

نوع الكشف	الخلاصة الاسيتونية
صابونينات	–
تانينات	–
قلويدات	+
تربينوئيدات	–
فلافونوئيدات	+
غليكوزيدات	+
تربينات	–

إن احتواء أوراق الاستيفيا على هذه المجاميع الفعالة من المركبات يؤكد القيمة الدوائية لهذا النبات وتعدد استعمالاته كنبات طبي.

وافقت نتائج الدراسة الحالية دراسة كلارك (1996) حيث سجل وجود مركبات فعالة مختلفة في الخلاصة الأسيتونية لأوراق الاستيفيا والتي شملت الغلوكوزيدات والفلافونوئيدات والقلويدات (42)، إلا أنها خالفت دراسة *Elisha* وآخرون (2017) بغياب التانينات في أوراق نبات الاستيفيا و قد يعود سبب الاختلاف في التركيب الكيميائي لنبات الاستيفيا لاختلاف التربة والمناخ والموقع الجغرافي وطريقة الاستخلاص (43).

الفعالية الحيوية للخلاصة الأستونية لأوراق الاستيفيا

درس تأثير المستخلص الأسيتوني لأوراق نبات الاستيفيا على نمو الزائفة الزنجارية والإيشركية القولونية والمكورات العنقودية الذهبية قيد الدراسة، وقد استخدمت طريقة الحفر، وتم اعتماد شاهد سلبي للخلاصة الأسيتونية وهو *5% Dimethyl Sulfoxide (DMSO)* المعقم بالترشيح الغشائي الدقيق (كونه استخدم في حل الخلاصة الجافة) وذلك للتأكد من أن التأثير المثبط لنمو الجراثيم المدروسة يعود إلى المواد الكيميائية الفعالة الموجودة في المستخلص وليس للمذيب. كما استخدمت المضادات الحيوية *Amikacin*، *Ciprofloxacin* و *Amox + Clavlan* كشواهد إيجابية إلى كل من الزائفة الزنجارية والإيشركية القولونية والمكورات العنقودية الذهبية على التوالي.

أظهرت نتائج الخلاصة الأسيتونية أن أعلى متوسط قطر تثبيط نمو كان *27 mm* للمكورات العنقودية الذهبية عند التركيز *200 mg/ml*، وبلغ متوسط أقطار هالات تثبيط نمو استجابة الزائفة الزنجارية بين المدى (*12 – 21 mm*) عند التراكيز بين (*25 – 200 mg/ml*) والإيشركية القولونية بين المدى (*7 – 25 mm*) عند التراكيز بين (*25 – 100 mg/ml*)، وهو ما يوضّحه الجدول (4).

جدول 4 معدل أقطار تثبيط نمو الجراثيم العائدة إلى الإشريكية القولونية و الزائفة الزنجارية و المكورات العنقودية الذهبية بتأثير المستخلص الأسيتوني لأوراق الاستيفيا مقاسة بالمليمتر

العزلات الجرثومية	تراكيز الخلاصة الأسيتونية mg/ml			
	25	50	100	200
E.coli	7	19	25	20
Ps.aur.	12	20	21	21
Staph.au	19	21	25	27

وقد بلغت متوسطات أقطار هالات تثبيط نمو الأنواع الثلاث للجراثيم المدروسة بفعل الخلاصة الأسيتونية لأوراق الإستيفيا مقدار أكبر من قطر هالات تثبيط نمو الزائفة الزنجارية الإيشركية القولونية والمكورات العنقودية الذهبية بفعل المضادات الحيوية المستخدمة كشواهد إيجابية. وهذه النتائج توافق ما ورد في دراسة المصيلحي وآخرون (2016) من حيث فعالية الخلاصة الأسيتونية للنبات المدروس في تثبيط نمو الجراثيم الممرضة المختبرة (44).

يبين الجدول (5) قيم التركيز المثبط الأدنى *MIC* والتركيز القاتل الأدنى *MBC* لتأثير المستخلص الأسيتوني على العزلات قيد الدراسة حيث أعطت الخلاصة الأسيتونية أعلى القيم لكل من *MIC* و*MBC* تجاه الزائفة الزنجارية إذ بلغت *35 mg/ml* ، *40 mg/ml* و *30 mg/ml* على التوالي وهذا يتفق مع دراسة *Arámbula* وآخرون (2017) (45).

جدول 5 التراكيز المثبطة الدنيا *MIC* و التراكيز القاتلة الدنيا *MBC* للمستخلص الأسيتوني لأوراق نبات الإستيفيا المؤثرة في نمو العزلات المختبرة مقدرة ب *mg/ml*

العزلات الجرثومية	الخلاصة الأسيتونية	
	MIC	MBC
E.coli	25	30
Ps.aur.	30	35

Staph.au	*20*	*30*

وكانت أدنى قيمة لكل من *MIC* و*MBC* هي *20 mg/ml* و*30 mg/ml* على التوالي للخلاصة الأسيتونية تجاه المكورات العنقودية الذهبية، وهذا يوافق ما ذكرته سيخاني وآخرون (2014) بأن قيمة *MIC* و*MBC* تتفاوت اعتماداً على نوع الخلاصة ونوع الجراثيم (46).

التحليل الإحصائي:

تم إجراء الدراسة الإحصائية باستخدام برنامج *SPss* الجاهز – اختبار التباين الإحصائي *ANOVA* وذلك بهدف معرفة التباين الكلي بين تراكيز المستخلص الأسيتوني وإجراء اختبار التباين *Least significant difference (LSD)* لمعرفة التركيز الأكفأ.

تبين وجود فرق معنوي بين التركيزين *100mg/ml* و*200mg/ml* كون قيمة *Sig* لكليهما *0.05* >، وأن التركيز الأكفأ للخلاصة الأسيتونية على الزوائف الزنجارية *100mg/ml*. أما فيما يخص الاشريكية القولونية تبين أن التركيز الأكفأ هو *100mg/ml*. وبالنسبة للمكورات العنقودية الذهبية التركيز الأكفأ هو *200mg/ml*.

الاستنتاجات

- احتواء الخلاصة الأسيتونية لأوراق الإستيفيا على القلويدات الفلافونوئيدات والغلوكوزيدات.
- التركيز *100 mg/ml* هو التركيز الأكفأ للخلاصة الأسيتونية بالنسبة للزائفة الزنجارية والإيشيريكية الكولونية والتركيز *200 mg/ml* هو التركيز الأكفأ للخلاصة الأسيتونية بالنسبة للعنقوديات الذهبية.

التوصيات:

- متابعة الأبحاث لتحديد طبيعة المركبات الكيميائيّة ضمن المستخلصات المختلفة لأوراق الإستيفيا والتوصيف الكيميائي لها.
- دراسة إمكانية تطبيق هذا المستخلص تجاه أنواع جرثومية ممرضة أخرى

- إجراء دراسة تتضمّن اختبار القدرة الصادّة للجراثيم لهذا المستخلص في الكائنات الحيّة المصابة بالجراثيم

المراجع

1. Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, Zaidi AKM, Wertheim HFL, Sumpradit N, et al. Antibiotic resistance—the need for global solutions. Lancet Infect Dis. 2013 Dec 1;13(12):1057–98.

2. Salmerón-Manzano E, Garrido-Cardenas JA, Manzano-Agugliaro F. Worldwide Research Trends on Medicinal Plants. Int J Environ Res Public Health. 2020 May;17(10):3376.

3. Nasim N, Sandeep IS, Mohanty S. Plant-derived natural products for drug discovery: current approaches and prospects. The Nucleus. 2022;65(3):399–411.

4. Cowan MM. Plant Products as Antimicrobial Agents. Clin Microbiol Rev. 1999 Oct;12(4):564–82.

5. Sofowora A, Ogunbodede E, Onayade A. The Role and Place of Medicinal Plants in the Strategies for Disease Prevention. Afr J Tradit Complement Altern Med. 2013 Aug 12;10(5):210–29.

6. Mehta J, Dadhich LK. Micropropagation of Stevia rebaudiana Bertoni. in different kind of basal medium. In 2015 [cited 2024 Sep 10]. Available from: https://www.semanticscholar.org/paper/Micropropagation-of-Stevia-rebaudiana-Bertoni.-in-Mehta-Dadhich/30174a0758d2c8588f86779811b0888b824409d2

7. Bayraktar M. Micropropagation of Stevia rebaudiana Bertoni Using RITA® Bioreactor. HortScience. 2019 Apr 1;54:725–31.

8. Myint K zar, Wu K, Xia Y, Fan Y, Shen J, Zhang P, et al. Polyphenols from Stevia rebaudiana (Bertoni) leaves and their functional properties. J Food Sci. 2020;85(2):240–8.

9. Lemus-Mondaca R, Vega-Gálvez A, Zura-Bravo L, Ah-Hen K. *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. Food Chem. 2012 Jun 1;132(3):1121–32.

10. Sichanova M, Geneva M, Petrova M, Miladinova-Georgieva K, Kirova E, Nedev T, et al. Improvement of Stevia rebaudiana Bertoni In Vitro Propagation and Steviol Glycoside Content Using Aminoacid Silver Nanofibers. Plants. 2022 Sep 21;11(19):2468.

11. Carrera-Lanestosa A, Moguel-Ordóñez Y, Segura-Campos M. Stevia rebaudiana Bertoni: A Natural Alternative for Treating Diseases Associated with Metabolic Syndrome. J Med Food. 2017 Oct 1;20(10):933–43.

12. Peteliuk V, Rybchuk L, Bayliak M, Storey KB, Lushchak O. Natural sweetener Stevia rebaudiana: Functionalities, health benefits and potential risks. EXCLI J. 2021 Sep 22;20:1412–30.

13. Papaefthimiou M, Kontou PI, Bagos PG, Braliou GG. Antioxidant Activity of Leaf Extracts from Stevia rebaudiana Bertoni Exerts Attenuating Effect on Diseased Experimental Rats: A Systematic Review and Meta-Analysis. Nutrients. 2023 Jul 26;15(15):3325.

14. Bender C. Stevia Rebaudiana's Antioxidant Properties. In: Merillon JM, Ramawat KG, editors. Sweeteners: Pharmacology, Biotechnology, and Applications [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2017 [cited 2024 Sep 11]. p. 1–27. Available from: https://doi.org/10.1007/978-3-319-26478-3_6-1

15. Myint KZ, Zhou Z, Shi Q, Chen J, Dong X, Xia Y. Stevia Polyphenols, Their Antimicrobial and Anti-Inflammatory Properties, and Inhibitory Effect on Digestive Enzymes. Molecules. 2023 Nov 13;28(22):7572.

16. Tungmunnithum D, Thongboonyou A, Pholboon A, Yangsabai A. Flavonoids and Other Phenolic Compounds from Medicinal Plants for Pharmaceutical and Medical Aspects: An Overview. Medicines. 2018 Aug 25;5(3):93.

17. Chen J, Xia Y, Sui X, Peng Q, Zhang T, Li J, et al. Steviol, a natural product inhibits proliferation of the gastrointestinal cancer cells intensively. Oncotarget. 2018 May 29;9(41):26299–308.

18. Orellana-Paucar AM. Steviol Glycosides from Stevia rebaudiana: An Updated Overview of Their Sweetening Activity, Pharmacological Properties, and Safety Aspects. Molecules. 2023 Jan;28(3):1258.

19. Velesiotis C, Kanellakis M, Vynios DH. Steviol glycosides affect functional properties and macromolecular expression of breast cancer cells. IUBMB Life. 2022;74(10):1012–28.

20. Kim SY, Jo MJ, Hwangbo M, Back YD, Jeong TY, Cho IJ, et al. Anti-inflammatory Effect of Stevia Rebaudiana as a Results of NF-??B and MAPK Inhibition. J Korean Orient Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol. 2013 Aug 25;26:54–64.

21. Tadhani MB, Subhash R. In vitro antimicrobial activity of Stevia rebaudiana Bertoni leaves. Trop J Pharm Res. 2006 Jan 1;5:557–60.

22. D. Preethi1 TMS. Studies on Antibacterial Activity, Phytochemical Analysis of Stevia rebaudiana (Bert.) - An Important Calorie Free Biosweetner. J Ecobiotechnology [Internet]. 2011 Jul 4 [cited 2024 Sep 11]; Available from: https://updatepublishing.com/journal/index.php/jebt/article/view/183

23. Chakma A, Afrin F, Rasul MG, Maeda H, Yuan C, Shah AKMA. Effects of extraction techniques on antioxidant and antibacterial activity of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) leaf extracts. Food Chem Adv. 2023 Dec 1;3:100494.

24. Gamboa F, Chaves M. Antimicrobial potential of extracts from Stevia rebaudiana leaves against bacteria of importance in dental caries. Acta Odontol Latinoam AOL. 2012;25(2):171–5.

25. الخطيب ب, حبال دفاده. التركيب الكيميائي والخصائص الفعالة حيوياً لأوراق الستيفيا ريبوديانا المزروعة في سورية. مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية [Internet]. 2023 May 17 [cited 2024 Sep 11];39(2). Available from: https://journal.damascusuniversity.edu.sy/index.php/agrj/article/view/3115

26. Sandman K, Ecker C. Pseudomonas Isolation and Identification: An Introduction to the Challenges of Polyphasic Taxonomy. J Microbiol Biol Educ. 2014 Dec;15(2):287.

27. Ema FA, Shanta RN, Rahman MdZ, Islam MdA, Khatun MstM. Isolation, identification, and antibiogram studies of Escherichia coli from ready-to-eat foods in Mymensingh, Bangladesh. Vet World. 2022 Jun;15(6):1497–505.

28. Thomson P, García P, Miles J, Isla D, Yáñez C, Santibáñez R, et al. Isolation and Identification of Staphylococcus Species Obtained from Healthy Companion Animals and Humans. Vet Sci. 2022 Feb 13;9(2):79.

29. Quinn PJ, Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR. Clinical Veterinary Microbiology. Wolfe; 1994. 648 p.

30. ASM.org [Internet]. [cited 2024 Sep 18]. Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. Available from: https://asm.org:443/Protocols/Kirby-Bauer-Disk-Diffusion-Susceptibility-Test-Pro

31. Sumit G, Subudhi E, Nayak S. Antimicrobial assay of Stevia Rebaudiana Bertoni leaf extracts against 10 pathogens. Int J Integr Biol. 2008 Jan 1;2.

32. Edeoga H, Okwu DE, Oyedemi B. Phytochemical constituents of some Nigerian Medicinal Plants. Afr J Biotechnol. 2005 May 1;4.

33. Al-fekaiki D. استخلاص وتشخيص المركبات الفينولية من نبات الحناء (Lawsoniainermis) وتقدير فعاليتها كمضادات للأكسدة. 2019 Sep 1;

34. Fuleki T, Francis FJ. Lead acetate as chromogenic reagent for anthocyanins. Phytochemistry. 1967 Aug 1;6(8):1161–3.

35. Bello DAA. Phytochemical Detection of Active Ingredients in the Syrian Medicinal Plant Tribulus terrestris L. from the Family Zygophyllaceae. Syr J Agric Res SJAR [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2024 Sep 18]; Available from: https://www.academia.edu/113428573/Phytochemical_Detection_of_Active_Ingredients_in_the_Syrian_Medicinal_Plant_Tribulus_terrestris_L_from_the_Family_Zygophyllaceae

36. Das K, Tiwari R, Shrivastava D, Bilaspur BC. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. 2010 Jan 18;4:104–11.

37. Varghese N, Joy PP. Microbiology Laboratory Manual. 2014.

38. Koneman EW. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Lippincott Williams & Wilkins; 2006. 1764 p.

39. Zhao C, Yang S, Zhang F, Wang Z, Zhang Y, Wang X, et al. Antimicrobial Resistance Trends of the Most Common Causative Pathogens Associated with Community-acquired Respiratory Infections in China: 2009–2018. Infect Drug Resist. 2022 Aug 31;15:5069–83.

40. Ahmed SK, Hussein S, Qurbani K, Ibrahim RH, Fareeq A, Mahmood KA, et al. Antimicrobial resistance: Impacts, challenges, and future prospects. J Med Surg Public Health. 2024 Apr 1;2:100081.

41. Sumonrat C, Suphitchaya C, Tipparat H. Antimicrobial activities of essential oils and crude extracts from tropical Citrus spp. Against food-related microorganisms. Songklanakarin J Sci Technol. 2008 Apr 1;30.

42. Clark AM. Natural products as a resource for new drugs. Pharm Res. 1996 Aug;13(8):1133–44.

43. Elisha IL, Botha FS, McGaw LJ, Eloff JN. The antibacterial activity of extracts of nine plant species with good activity against Escherichia coli against five other bacteria and cytotoxicity of extracts. BMC Complement Altern Med. 2017 Feb 28;17(1):133.

44. Moselhy S, Ghoneim M, Khan J. In vitro and in vivo evaluation of antimicrobial and antioxidant potential of stevia extract. Afr J Tradit Complement Altern Med. 2016 Oct 29;13:18–21.

45. Miranda-Arámbula M, Maricruz OA, Marta LS, Ivonne PX, Ada M, Sandra L. Antibacterial activity of extracts of Stevia rebaudiana Bertoni against Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis and Pseudomonas aeruginosa. J Med Plants Res. 2017 Jul 3;11:414–8.

46. Mohammadi Sichani M, Hosseinabadi fatemeh, Karbasizade V, Mofid MR. Effect of different extracts of Stevia rebaudiana leaves on Streptococcus mutans growth. J Med Plant Res. 2014 Jun 1;6:4731–4.