Bioactivity Study of Rosmarinus Officinalis and Thymus Vulgaris Extracts Against the Growth of Some Entrobacteriaceae Species

Mustafa M. Abd Al razak
Education College Ministry of Science& Technology/Baghdad.
Jameel M. Badi
Ministry of Science& Technology/Baghdad.
Hassan M. Resen
Ministry of Science& Technology/Baghdad.
Arkan M. Majeed
Ministry of Science& Technology/Baghdad.
Email:ahmedbio553@yahoo.com

Received on:21/12/2014 & Accepted on:9/7/2015

ABSTRACT

The aim of current research is statement efficiency of different solvents (ethyl alcohol 80%, cold and hot water) to the extract the highest contain of active compounds for Thymus vulgaris and Rosmarinus officinalis. The results showed that the alcoholic extract has the largest number of active groups in the vegetarian Thymus vulgaris and Rosmarinus officinalis compared with other extracts. The results biological activity of plant extracts the against pathogenic bacteria (P mirabilis., V. cholera (NAG) and S. typhi) showed the phenolic groups and weak acids of alcoholic extract for both plants ,where the greatest impact on the bacteria at a concentration of 100 mg / ml for all species bacteria studied . S.typhi was more sensitive towards phenolic groups with 16 mm diameter of the inhibition for both plants, while the V. cholera was most sensitive for the weak acids 8mm diameter and 14 mm inhibition of for both plants respectively. The results of the synergistic reaction of the part extract bicarbonate (phenolic groups) to extract alcohol for both plants when blended equal showed increase diameter of inhibition of bacteria to 25 mg / ml concentration, were the S. typhi was more sensitive toward the mix and the diameter of the inhibition was20 mm. Both cold and hot water extract Separately did not show any effect inhibitory toward studied bacteria.

Keywords:- Thymol , Rosmary, Bioactivity of Rosmarinus officinalis and Thymus vulgaris.

دراسة الفعالية الحيوية لمستخلصات نباتي الزعتر واكليل الجبل اتجاه نمو بعض انواع بكتريا العائلة المعوية

الخلاصة

تضمن البحث الحالي بيان كفاءة مذيبات مختلفة هي الكحول الاثيلي80 % ،الماء البارد والحار في استخلاص أعلى نسبة من المركبات الفعالة لنباتي الزعتر وإكليل الجبل حيث وجد بان المستخلص الكحولي قد اظهر اكبر عدد من المجاميع الفعالة في نباتي أكليل الجبل والزعتر مقارنة بالمستخلصات الأخرى اظهرت نتائج دراسة الفعالية الحيوية للمستخلصات النباتية اتجاه البكتريا المرضية (*P. mirabilis*, V. *cholera* (NAG) and *S. typhi* بأن أفضل كفاءة في تثبيط البكتريا كان

https://doi.org/10.30684/etj.2015.117206
2412-0758/University of Technology-Iraq, Baghdad, Iraq
This is an open access article under the CC BY 4.0 license http://creativecommons.org/licenses/by/4.0

باستعمال المجاميع الفينولية والأحماض الضعيفة من المستخلص الكحولي للنباتين حيث كانت اكبر تأثيرا على البكتريا عند تركيز 100 ملغ/مل لجميع أنواع البكتريا المدروسة وكانت بكتريا *s.typhi* أكثر حساسية تجاه هذه المجاميع و بقطر تثبيط بلغ 16 ملم للمجاميع الفينولية لكلا النباتين أما بالنسبة إلى مجموعة الأحماض الضعيفة فقد كانت بكتريا *V.cholera* ألاكثر حساسية و بقطر تثبيط بلغ 8و14 ملم لكلا النباتين على التوالي. وأظهرت نتائج الفعل التازري لمستخلص جزء البيكربونات (المجاميع الفينولية) للمستخلص الكحولي لنباتي الزعتر واكليل الجبل عند مزجهما بنسب متساوية ، زيادة في اقطار التثبيط لبكتريا ، وبدا بتركيز 25 ملغ/مل حيث كانت بكتريا *s. typhi* أكثر حساسية تجاه هذا المزيج وبقطر تثبيط بلغ 20 ملم . و أظهرت النتائج بان مستخلصي الماء البارد والحار كلا على حده ومزيجهما لم يظهرا أي تأثير تثبيطي اتجاه البكتريا المدروسة .

الكلمات الدالة :- ثايمول ، اكليل الجبل، الفعل التازري بين الزعتر واكليل الجبل

المقدمة:

رغم التطور الهائل في علم الأدوية الكيميائية ورواجها وظهور أعداد كبيرة منها للعلاج إلا أن السنوات العشر الماضية شهدت عودة إلى استخدام الإعشاب الطبية في علاج الإمراض كبدائل طبيعية لأنها تمتلك العديد من الخصائص العلاجية المعروفة (Philip,etal.,2009) لفعاليتها الحيوية الدوائية وتأثيرها الحيوي السريع وقلة الآثار الجانبية لها واحتوائها على الكثير من المواد الفعالة، ، ومنها استعمال مستخلصات النباتات الطبية كمضادات حيوية كنباتي الزعتر واكليل الجبل ,diamond) (1993 . يعد الزعتر (*T. vulgaris*) عشب مشهور يعود إلى العائلة الشفوية (Labiatea) والتي يطلق عليها العائلة النعناعية (mint family) (Spiewak,etal. 2001) يزهر الزعتر من حزيران الى تشرين الأول و تكون أزهاره صغيرة الحجم ذات لون وردي على شكل سنبلة ذات رائحة نفاذة (عقيل, 2003) وقد استطاع العالم الألماني كاسبر نيومان في سنة

1719 ولأول مرة من فصل المادة الفعالة في زيت الزعتر واسماها كافور الزعتر وفي سنة 1855 اسماها العالم الفرنسي م.لاليماند باسم الثايمول وهو الاسم المستعمل حاليا . وتوصلت الدراسات الحديثة الى احتواء هذا العشب على زيت طيار بنسبة 1-2% (عقيل ,2003) وقد شخصت مركبات كثيرة في زيت الزعتر تضمنت مواد مثل Thymol وCarvacrol وSabinen وLinalool وBLinaly-acetate والتي تميزت بخصائص عديدة تجعلها مواد مطهرة وقاتلة للبكتريا والفطريات والديدان وعوامل مضادة للأكسدة. قد أثبتت العديد من الدراسات المختبرية أن مادتي Thymol و Carvacrol في الزعتر تكون مضادة للعديد من أنواع البكتريا مثل *Salmonella.spp, Staphylococcus aureus, Escherichia coli*وغيرها.

(Katayama and Nagai, 1993) كما توصل (2005) , Penalver في دراسة أجريت لاختبار الفعالية المضادة لعدد من النباتات منها نبات الزعتر اتجاه عدة أنواع من سلالات البكتريا المعوية ، الى انه يتميز بكفاءة تثبيطية عالية وعند أدنى تركيز (20 ملغم/مل) وذلك لمحتواه الفينولي العالي وخصوصا من مادتي الثايمول والكارفاكرول. وأشار وهاب ،(2011) ايضا الى كفاءته التثبيطية في دراسة تاثير المستخلص الكحولي للزعتر والزيت الأساس له على نوعيين من البكتريا .S typhoid و S. typhimurium . اما نبات إكليل الجبل (*R. officinalis*) فهو نبات ينتمي الى العائلة الشفوية ايضا (Labiatea), (willis ljc,1973) وهو نبات عشبي معمر دائم الخضرة يصل ارتفاعه إلى حوالي مترين ويعرف أيضا باسم حصا ألبان و روزماري و ندى البحر، حيث يزهر منذ بداية شهر نيسان حتى نهاية شهر تشرين الاول

والإزهار خنثى ذات لون ازرق فاتح (Brickell , 1990) أن جميع الأجزاء الهوائية للنبات تستخدم في عملية الاستخلاص أما من الناحية الكيميائية فان نبات أكليل الجبل غني بالفلافونات والمواد الفينولية والتي تعطيه خواص المواد المضادة للالتهاب والمعقمة (Basaga,etal. ,1997) آذ يحوي على حمض Rosmarinic المفيد في حالات التسمم ومادة Rosmarol المضادة للأكسدة (Duke and A.Yensu,1985) وللنبات خاصية طاردة للحشرات وتعد الخلاصة المائية والكحولية للنبات مضادة للأكسدة وللبكتريا والفطريات(Tsai, etal., 2006) وأشارت ANESSINY, (1993) إلى فعالية المستخلص الايثانولي لنبات أكليل الجبل اتجاه بكتريا *Bacillus cereus* كما وجد (Santoyo. S.etal., 2005) و (Rezzoug ,SA.etal. 2005) أن للزيت العطري لنبات

أكليل الجبل تأثير مثبط لنمو البكتريا الموجبة لصبغة كرام *S.aureus* والبكتريا السالبة لصبغة كرام *E.coli* و*B.subtilis* وأشار (Ellof JN, 1998) في دراسة فعالية المستخلص الكحولي لنبات إكليل الجبل في تثبيط نمو البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام الى ان المستخلص الايثانولي له تأثير واسع النطاق ضد البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام *P.mirabilis, S. typhi* يهدف البحث لحالي للكشف عن الفعل التازري لمستخلصات أوراق نباتي الزعتر وإكليل الجبل على تثبيط أنواع من البكتريا المعوية في الوسط ألزرعي وأجراء الكشوفات الكيميائية للمستخلصات النباتية المنتجة وفعالية المركبات الفعالة المكونة للنباتين . **المواد وطرائق العمل**

جمع العينات النباتية:

تم الحصول على نباتي الزعتر Thymus vulgaris واكليل الجبل Rosmarinus officinalis من الأسواق المحلية وأخذت كمية كافية (1 كغم) من أوراق نباتي الزعتر واكليل الجبل ثم نظفت لإزالة الشوائب والأتربة والأجزاء التالفة منها تحت ماء الحنفية وتركت لتجف في الظل وبعدها سحقت بالمطحنة للحصول على مسحوق ناعم وحفظت بالثلاجة لحين الاستعمال .

العزلات البكتيرية:

تم الحصول على العزلات البكتيرية من مختبرات الصحة المركزية العامة / وزارة الصحة وهي :- *Vibrio cholera* (NAG) , *Salmonella typhi , Proteus mirabilis* وجميع هذه العزلات تنتمي الى عائلة Entrobacteriaceae

تحضير المستخلصات النباتية:

حضر المستخلص المائي البارد لأوراق نباتي الزعتر وإكليل الجبل كلا على حده حسب طريقة (2000 ,.Gruenewald,etal) التي تتضمن مزج كمية من المسحوق الجاف لكلا أجزاء النباتين مع كمية من الماء المقطر البارد بنسب متدرجة, نسبة وزن جاف بالغرامات إلى حجم بالمليلترات (150/5, 175/5, 125/5,100/5,75/5) وحضن المزيج في حاضنة هزازة بدرجة 37 م° لمدة 24 ساعة ورشح المزيج باستخدام ورق ترشيح Whatman (No.1) وتم تجفيفه في الفرن الكهربائي بدرجة حرارة تتراوح بين 35-40 م° وحفظ في الثلاجة لحين الاستعمال. كررت العملية السابقة نفسها في تحضير المستخلص المائي المغلي للاوراق نباتي الزعتر واكليل الجبل وذلك باستبدال الماء المقطر البارد بماء مقطر مغلي . وقد حضر المستخلص الكحولي للأوراق النباتين باستخدام طريقة (Ladd,etal., 1978) حيث استخدم الكحول الاثيلي (80%) في عملية الاستخلاص باستخدام جهاز الاستخلاص Soxholet اذ وضعت كمية من المسحوق الجاف لكلا النباتين (10 غم) كلا على حده وكمية من الكحول الاثيلي بنسب متدرجة (وزن/حجم) (350/10,300/10,250/10,200/10,150/10) في أوعية الاستخلاص (Thimbles) واستخلصت لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 40-45 °م ، وكررت العملية نفسها مرات عديدة للحصول على كمية كافية من المادة الفعالة لأجراء التجارب عليها ورشح باستخدام ورق ترشيح Whatman (No.1) ثم جفف المستخلص في الفرن الكهربائي بدرجة 40°م وحفظ في الثلاجة لحين الاستعمال.

الكشف عن المجاميع الفعالة لنباتي الزعتر واكليل الجبل في المستخلصات المائية والكحولية أجريت مجموعة من الكشوفات النوعية للتعرف على المكونات الفعالة في مستخلصات كلا النباتين وهي:-

الكشف عن الصابونيات (saponines) بطريقتين هما كاشف الرغوة وكاشف كلوريد الزئبقيك 1% (Harborne, 1984) الكشف عن الفينولات (Phenol's) بطريقة كاشف خلات الرصاص1% (المختار،1994) , (Jawad, 1997) وطريقة كاشف كلوريد الحديديك1% $FeCl_3$

الكشف عن القلويدات (Alkaloidreagent) (Harborne, 1984, Haddad 1965) باستعمال كاشف ماير Mayer reagent (Harborne ,1984) والكشف عن السكريات والكلايكوسيدات (Saccharides or Glycosides) وتم ذلك باستعمال كاشف فهلنك (Harborne ,.1984)

فصل بعض المجاميع الفعالة من المستخلص الكحولي لنباتي الزعتر واكليل الجبل فصلت بعض المركبات الفعالة من المستخلص الكحولي الجاف لنباتي الزعتر واكليل الجبل حسب طريقة جاكسون المذكورة في (Connors , 1981) وكما يلي :-

1 _ أذيب 10غم من المستخلص الكحولي لكلا النباتين كل على حده في 100 مل من الماء المقطر للحصول على محلول مائي .
2 _ تم إضافة تنكستنات الصوديوم 10% إلى المحلول المائي للمستخلص لأزاله البروتينات بشكل راسب والتي فصلت بجهاز الطرد المركزي بسرعة 3000 دورة/ دقيقة لمدة ربع ساعة .
3 – تم تحميض المحاول المائي للمستخلص بحامض كلوريد الهيدروجين(HCL) (0.5%) للحصول على محلول مائي محمض خالي من البروتينات .
4 – تم استعمال العديد من المذيبات العضوية لفصل بعض المجاميع الفعالة من المستخلص وهي :-
أ – **الايثر:-** تم إضافة كمية من الايثر إلى المحلول المائي للمستخلص المحمض والخالي من البروتينات ، ثم وضع في قمع الفصل ورج المزيج جيدا و ترك لحين انفصال الجزء الايثري العلوي عن الجزء المائي السفلي وكررت العملية مرة أخرى مع كمية جديدة من الايثر للحصول على كمية اكبر من المواد الذائبة في الايثر حيث جمعت الكميات في دورق زجاجي واحد ويحتوي الجزء الايثري على المركبات الحامضية المتعادلة وقد أعيد هذا الجزء إلى قمع الفصل وأضيف إليه بعض المحاليل لفصل المركبات الفعالة الثانوية الأخرى حيث تم إضافة له كمية مساوية من بيكربونات الصوديوم(5%، PH=8) ورج المزيج لفصل جزء البيكربونات اعيد الجزء الايثري المتبقي مرة أخرى إلى قمع الفصل ورج مع كميات مساوية من محلول هيدروكسيد الصوديوم(0.1 عياري PH=13) لفصل جزء الهيدروكسيد الذي يحتوي على الأحماض الضعيفة أما المركبات المتعادلة فقد بقيت في الجزء الايثري
ب – الكلوروفورم: تم إضافة كمية مساوية من الكلوروفورم الى الجزء المائي المفصول سابقا ووضع في قمع الفصل ، إذ فصل جزء الكلوروفروم الذي يشمل المركبات القاعدية غير المتأينة اما الجزء المائي المتبقي ويشمل على المركبات القاعدية المتأينة . وبعد أن تم الحصول على المحاليل (الجزء الايثري وجزء البيكربونات وجزء الهيدروكسيد وجزء الكلوروفروم والجزء المائي) رشحت باستخدام ورق ترشيح واتمان رقم 1 وتم توزيع الراشح في أطباق زجاجية ووضعت في الفرن الكهربائي بدرجة حرارة تتراوح بين 35-40 م^{o} لحين الحصول على المسحوق الجاف ثم جمعت المساحيق المجففة ووزنت وحفظت في الثلاجة لحين الاستعمال.

تحضير تراكيز المستخلصات النباتية :

تم تحضير المحلول الأساس(Stock solution) للمستخلص المائي (البارد، والحار) بأخذ 2غم من المادة المستخلصة وتم أذابتها في 20 مل من الماء المقطر ،(اي تركيز 10% وما يعادل 100ملغم/مل) حيث حظرت منه التراكيز ألأخرى(100,50,25 ملغم/مل) ، أما معاملة السيطرة فتضمنت الماء المقطر فقط .أما المستخلص الكحولي فقد اخذ 2غم من المسحوق الجاف وتم أذابتها في 3 مل من الكحول الاثيلي وأكمل الحجم إلى 20 مل ماء مقطر وبذلك يكون تركيز المحلول الأساس 10% وما يعادل 100ملغم/مل اذ حضرت منه التراكيز الأخرى (100,50,25 ملغم/مل) ، أما معاملة السيطرة فتضمنت 3 مل من الكحول الاثيلي وأكمل الحجم إلى 20 مل ماء مقطر .
وحضر المحلول الاساس للمجاميع الفعالة لكلا النباتين بإذابة 2غم من المسحوق الجاف في 20 مل من الماء المقطر وبذلك ليصبح تركيز المحلول الأساس 10% وما يعادل 100ملغم/مل ومنه حضرت التراكيز الأخرى (100,50,25 ملغم/مل) ، أما معاملة السيطرة فتمثلت بالماء المقطر فقط. اما مزيج المستخلصات لكلا النباتين فحضر بمزج 5 مل (500mg) من مستخلص جزء البيكربونات (المجاميع الفينولية) للمستخلص الكحولي لنبات الزعتر مع 5 مل(500mg) من مستخلص جزء البيكربونات (المجاميع الفينولية) للمستخلص الكحولي لنبات أكليل الجبل وبذلك يكون تركيز المحلول الاساس 10% وما يعادل 100ملغم/مل حضرت منه التراكيز الأخرى (100,50,25 ملغم/مل) وعوملت كافة المزيجات الأخرى بهذه الطريقة .

تأثير المستخلصات على نمو البكتريا:

استعملت طريقة الانتشار في الاكار بواسطة الحفر لدراسة تأثير مستخلصات أوراق نباتي الزعتر واكليل الجبل في تثبيط نمو البكتريا التي تم اختيارها في الدراسة حيث تضمنت هذه الطريقة عمل خمسة حفر بقطر 6 ملم بواسطة الثاقب الفليني وبأبعاد متساوية ثم نشر 0.1 مل من العالق البكتيري

لكل نوع كلا على حده بواسطة الناشر بصورة متجانسة على الوسط الاكار المغذي(بعد مقارنتها مع أنبوب ماكفرلاند القياسي رقم 0.5) ثم أضيفت التراكيز المحضرة لكل مستخلص بمقدار 0.1 مل لكل حفرة مع بقاء حفرة واحدة كمعامل سيطرة ، حيث حضنت الإطباق بدرجة 37°م لمدة 24 ساعة اذ يمكن معرفة فعالية المستخلص بقياس منطقة التثبيط حول الحفر بواسطة المسطرة . (Egorove, 1985) .

النتائج والمناقشة

النسب المئوية للمستخلصات النباتية :-

يبين الجدول (1) العلاقة بين حجم المذيب والنسبة المئوية لناتج الاستخلاص باستعمال وزن ثابت من نبات الزعتر حيث لوحظ أن أفضل نسبة وزن لنبات الزعتر إلى حجم الكحول الاثيلي هي نسبة 10 /150 ، اذ أمكن الحصول على أعلى نسبة مئوية للاستخلاص بلغت 8.45 % وكان وزن المستخلص 0.845غم ، وكلما زاد حجم المذيب قلة النسبة المئوية للاستخلاص ، أما عند استخدام الماء الحار والماء البارد كمذيب بنسب متدرجة لوحظ انه كلما زاد حجم الماء، زادت النسبة المئوية لناتج الاستخلاص وصولا إلى أعلى نسبة من ناتج الاستخلاص وهي 7.04% عند النسبة 10 /300 وكان وزن المستخلص 0.704 غم لكلا المذيبين(الماء الحار ، الماء البارد) مع بقاء هذه النسبة ثابتة عند استخدام حجوم أكثر من 150مل ، بينما يوضح الجدول (2) العلاقة بين حجم المذيب والنسبة المئوية لناتج الاستخلاص باستعمال وزن ثابت من نبات الزعتر حيث لوحظ أن أفضل نسبة وزن لنبات أكليل الجبل حيث لوحظ أن أفضل نسبة وزن لنبات اكليل الجبل إلى حجم الكحول الاثيلي عند استخدامه بنسب متدرجة مع بقاء وزن النبات ثابت في الاستخلاص هي نسبة 10 /150 ، حيث أمكن الحصول على أعلى نسبة مئوية للاستخلاص بلغت 22.57% وكان وزن المستخلص 2.2578غم وكلما زاد حجم المذيب قلة نسبة ناتج الاستخلاص أيضا أما عند استخدام الماء الحار والماء البارد كمذيب بنسب متدرجة لوحظ انه كلما زاد حجم الماء زادت النسبة المئوية لناتج الاستخلاص وصولا إلى أعلى نسبة مئوية لناتج الاستخلاص وهي 7.11% عند النسبة 1 /250 وكان وزن المستخلص 0.711غم للماء البارد أما الماء الحار كان أعلى نسبة مئويةلناتج الاستخلاص هي 7.7% عند النسبة 1 / 350 ووزن المستخلص 0.7728 غم . إن اغلب الدراسات السابقة استخدمت هذه النسب مع عدم الإشارة إلى النسبة المئوية لناتج الاستخلاص(Takeshi,etal.,2005) وبهذا تعتبر هذه النسب من النتائج الجيدة والجديدة.

جدول (1) العلاقة بين حجم المذيب والنسبة المئوية لناتج الاستخلاص باستعمال وزن ثابت من نبات الزعتر

المستخلص الكحولي			المستخلص المائي					
			الماء البارد			الماء الحار		
وزن النبات (غم)	حجم المذيب (مل)	وزن المستخلص (غم)	النسبة المئوية للمستخلص	وزن النبات (غم)	حجم المذيب (مل)	وزن المستخلص غم	النسبة المئوية للمستخلص	وزن المستخلص (غم)	النسبة المئوية للمستخلص
10	150	0.845	%8.45	5	75	0.485	%4.8	0.445	%4.4
10	200	0.809	%8.09	5	100	0.499	%4.9	0.474	%4.7
10	250	0.798	%7.98	5	125	0.599	%5.9	0.579	%5.7
10	300	0.763	%7.63	5	150	0.704	%7.04	0.704	%7.04
10	350	0.767	%7.67	5	175	0.680	%6.8	0.680	%6.8

جدول (2) العلاقة بين حجم المذيب والنسبة المئوية لناتج الاستخلاص باستعمال وزن ثابت من نبات أكليل الجبل

المستخلص الكحولي				المستخلص المائي					
				الماء البارد				الماء الحار	
وزن النبات (غم)	حجم المذيب (مل)	وزن المستخلص (غم)	النسبة المئوية للمستخلص	وزن النبات (غم)	حجم المذيب (مل)	وزن المستخلص (غم)	النسبة المئوية للمستخلص	وزن المستخلص (غم)	النسبة المئوية للمستخلص
10	150	2.2578	%22.57	5	75	0.5213	%5.21	0.555	%5.5
10	200	2.1574	%21.57	5	100	0.5969	%5.96	0.6404	%6.4
10	250	2.0875	%20.87	5	125	0.711	%7.11	0.6869	%6.8
10	300	2.0783	%20.78	5	150	0.7094	%7.09	0.724	%7.2
10	350	1.982	%19.82	5	175	0.7095	%7.09	0.7728	%7.7

الكشف الكيميائي التمهيدي الترسيبي للمركبات الفعالة لأوراق نباتي الزعتر واكليل الجبل

أظهرت نتائج الكشف الكيميائي عن وجود بعض المواد الفعالة في مستخلصات النباتات المستخدمة في الدراسة الحالية إذ يوضح الجدول (3) احتواء الزعتر على الفينولات والقلويدات والكلايكوسيدات والصابونيات واعطى دليل ظهور الرغوة للكشف عن الصابونيات نتيجة سالبة في المستخلص الكحولي للنبات ، كما يوضح الجدول (4) احتواء نبات أكليل الجبل على الفينولات والقلويدات والكلايكوسيدات والصابونيات ايظا واعطى دليل ظهور الرغوة للكشف عن الصابونيات نتيجة سالبة في المستخلص الماء البارد للنبات وهذا يتفق مع ما ذكره Spiewak,etal. (2001) و Calabrese, (2000) حول احتواء نباتي الزعتر واكليل الجبل على هذه المركبات اعلاه فضلا عن مركبات أخرى.

الجدول (3) الكشف الكيميائي النوعي لبعض المركبات الفعالة في مذيبات (الماء البارد، الماء الحار،الكحول الاثيلي) لنبات الزعتر

المركبات الفعالة	نوع الكاشف	ماء بارد	ماء الحار	المستخلص الكحولي	الدليل
الصابونينات	الرغوة كلوريد الزئبقيك	+ +	+ +	- +	ظهور رغوة راسب ابيض
الفينولات	خلات الرصاص كلوريد الحديديك	+ +	+ +	+ +	راسب ابيض هلامي لون اخضر مزرق
القلويدات	ماير	-	+	-	راسب ابيض اسمر
السكريات والكلايكوسيدات	فهلنك	+	+	+	راسب احمر

الجدول (4) الكشف الكيميائي النوعي لبعض المركبات الفعالة في مذيبات (الماء البارد ، الماء الحار ،الكحول الاثيلي) لنبات اكليل الجبل

المركبات الفعالة	نوع الكاشف	ماء بارد	ماء الحار	المستخلص الكحولي	الدليل
الصابونينات	الرغوة كلوريد الزئبقيك	- +	+ +	+ +	ظهور رغوة راسب ابيض
الفينولات	خلات الرصاص كلوريد الحديديك	+ +	+ +	+ +	راسب ابيض هلامي لون اخضر مزرق
القلويدات	ماير	-	+	+	راسب ابيض اسمر
السكريات والكلايكوسيدات	فهلنك	+	+	+	راسب احمر

اختبار الكفاءة التثبيطية لمستخلصات نباتي الزعتر وإكليل الجبل على نمو بكتيريا الاختبار

يوضح الجدول (5) تأثير المستخلصات لنبات الزعتر والمجاميع الفعالة المفصولة من المستخلص الكحولي على نمو البكتريا لقد بينت الاختبارات تأثير متباين لهذه المستخلصات على نمو البكتريا حيث كان مستخلص جزء البيكربونات (المجاميع الفينولية) هو الأشد تأثيرا على النمو إذ كان قطر التثبيط لبكتريا *S. typhi* 16 ملم ولبكتريا *P. mirabilis* 12 ملم وبكتريا *V.cholera* 12ملم عند التركيز100ملغم/مل تلاه مستخلص جزء الهيدروكسيد (الاحماض الضعيفة) فكان اقطار التثبيط لبكتريا *S. typhi* 10 ملم ولبكتريا *P. mirabilis* 8 ملم ولبكتريا *V. cholera* 14 ملم عند التركيز 100ملغم/مل . اما الجدول (6) يوضح تأثير مستخلصات نبات اكليل الجبل على نمو البكتريا قيد الدراسة حيث وجد هناك تباين في تأثير هذه المستخلصات وكان جزء البيكربونات (المجاميع الفينولية) هو الأشد تأثيرا على النمو اذ كان قطر التثبيط لبكتريا *S. typhi* 16 ملم وبكتريا *P,mirabilis* 14 ملم وبكتريا *V. cholera* 10 ملم عند التركيز100ملغم/مل تلاه مستخلص جزء الهيدروكسيد بقطر تثبيط 7 ملم لبكتريا *S. typhi* و7 ملم لبكتريا *P. mirabilis* و 8 ملم لبكتريا *V.cholera* عند التركيز 100ملغم/مل اما مستخلص الجزء المائي (القاعدية المتأينة) من المستخلص الكحولي ومستخلص الماء البارد ومستخلص الماء الحار لم يعطيا أي تأثير على نمو البكتريا حيث كانت مقاومة له لكلا النباتين. وهذه النتائج كانت مقاربة لما توصل أليه العديد من الباحثين الذين أكدوا فعالية الزعتر واكليل الجبل في تثبيط العديد من الكائنات المجهرية فقد ذكر كل من (1993) Katayama and Nagai, أن الثايمول والكارفكرول في المستخلص الكحولي للزعتر يعود لهما التأثير المضاد لأنواع عديدة من البكتريا وذكر كل من Perez-Fons,Aranda (2006) تفوق المستخلص الكحولي على المائي في تثبيط البكتريا ان التأثير الفعال لجزء البيكربونات (المجاميع الفينولية) وجزء الهيدروكسيد (الاحماض الضعيفة) من المستخلص الكحولي في نمو هذه البكتريا لكلا النباتين قد يعود لاحتواء هذه المستخلصات على كمية اكبر من الفينولات والحوامض مثل الثايمول والكارفكرول والسينيول والبورنيول والكامفين وحامض الروزمارينيك (Penalve,etal.,2005) أما التباين في فعالية المستخلصات وانعدام التأثير لبعض المستخلصات لكلا النباتين فقد تعود الى طبيعة المواد المستخلصة لكل طريقة استخلاص ونوعية المذيب المستعمل في عملية الاستخلاص وكذلك نوع البكتريا المنتقاة وهذا يتفق مع ما ذكره Mahasnesh,etal., (1996) ، كما اشار الباحث (1993) Panizzi,etal., الى ان المركبات الفعالة قد تكون ذائبة في الكحول لكلا النباتين وهذا يتفق مع ما ذكره (هميم، واخرون، 2002) الذي أوضح عدم امتلاك المستخلص المائي لنباتي الزعتر واكليل الجبل فعالية ضد بعض الانواع من البكتريا. لقد بينت الدراسة الحالية حساسية البكتريا لجميع تراكيز المستخلصات والمجاميع الفعالة للمستخلص الكحولي لكلا النباتين ماعدا التركيز 25 ملغم/مل الذي لم يؤثر على نمو بكتريا *S. typhi* و *V.cholera* عدا بكتريا *P. mirabilis* التي بدت حساسية تجاه هذا التركيز بقطر تثبيط بلغ 6 ملم لمستخلص جزء البيكربونات(المجاميع الفينولية) لنبات اكليل الجبل، ويلاحظ إن التأثير المثبط لنمو البكتريا يزداد بزيادة التراكيز وهذا يتفق مع كثير من الدراسات التي تؤكد أن فعالية معظم المركبات المثبطة للنمو الميكروبي تزداد بزيادة الجرعة المستعملة في الاختبار(رنا مجاهد عبدالله ، 2010) و (Suhad A,etal.,2013) و(حسين ،مصلح ، 1989) وذكر(Genena,etal., 2008) و Ellof JN, (1998) في دراسته على فعالية المستخلص الكحولي لنبات اكليل الجبل في تثبيط نمو البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام اظهرت بكتريا *V. cholera* اقل قطر تثبيط بلغ 10 ملم لمستخلص المجاميع الفينولية للمستخلص الكحولي لنبات اكليل الجبل عند التركيز 100 ملغم/مل و كذلك تفوق مستخلصات نبات الزعتر على مستخلصات نبات اكليل الجبل عند تركيز 50 ملغم/ مل جدول (6,5) وهذا يتفق مع ما أشار إليه الباحث (2003) Settiner and Krassner, من إن المجاميع المفصولة من النباتات وذات المحتوى الفينولي العالي والزيتي له تأثير تثبيطي عالي ضد البكتريا المرضية السالبة والموجبة لصبغة كرام . إن اقل نسبة تثبيط حصلت بعد إضافة تركيز 50 ملغم/مل من مستخلص جزء البيكربونات (المجاميع الفينولية) للمستخلص الكحولي لنبات اكليل الجبل لبكتريا *P. mirabilis* و *S. typhi* حيث بلغ قطر التثبيط لكلا البكتريا 4 ملم اما عند إضافة مستخلص جزء الهيدروكسيد (مجاميع الحوامض الضعيفة) لنبات الزعتر بتركيز 50 ملغم /مل فكانت اقل نسبة تثبيط هي لبكتريا *P. mirabilis* والذي بلغ 4 ملم وأظهرت بكتريا *S. typhi*

اعلى قطر تثبيط بلغ 16 ملم لمستخلص المجاميع الفينولية لكلا النباتين هذه النتائج تتفق مع ما ذكره (Thorria, 2013) و (Erturk 2010) و (El-Meleigy,etal. 2010) الذين لاحظوا ان العديد من مستخلصات بعض التوابل ومنها الزعتر واكليل الجبل لها تأثير مثبط لنمو العديد من الإحياء المجهرية ومنها بكتريا *s. typhi* و *P .mirabili* وتعود فعالية هذه المستخلصات اتجاه الاحياء المجهرية لاحتوائها على المركبات الفينولية مثل Carnosic acid وCarnosol وRosmanol و Rosmariquinone وRosmaridiphenol (Basaga,1997) فضلا عن زيت الكافور، والكامفين، والسينيول والبورنيول، كما يحتوي على فلافونيات مثل ديوسمينو الابيجنين (Daferera,etal.,2000)

جدول رقم (5): الفعالية التثبيطية لمستخلصات نبات الزعتر اتجاه انواع البكتريا المدروسة .

نوع المستخلص	اجزاء المستخلص الكحولي									المستخلص المائي					
	جزء البيكاربونات (المجاميع الفينولية)			جزء الهيدروكسيد(مجاميع الاحماض الضعيفة)			الجزء المائي			الماء الحار			الماء البارد		
انواع البكتريا	التركيز mg/ml			التركيز mg/ml			التركيز mg/ml			التركيز mg/ml			التركيز mg/ml		
	25	50	100	25	50	100	25	50	100	25	50	100	25	50	100
S. typhi	R*	9 ملم	16 ملم	R	6 ملم	10 ملم	R	R	R	R	R	R	R	R	R
P. mirabilis	R	12 ملم	12 ملم	R	4 ملم	8 ملم	R	R	R	R	R	R	R	R	R
V. cholera	R	6 ملم	12 ملم	R	8 ملم	14 ملم	R	R	R	R	R	R	R	R	R

*R= Resistant

جدول (6): الفعالية التثبيطية لمستخلصات نبات اكليل الجبل اتجاه أنواع البكتريا المدروسة

نوع المستخلص	اجزاء المستخلص الكحولي									المستخلص المائي					
	جزء البيكربونات (المجاميع الفينولية)			جزء الهيدروكسيد (مجاميع الاحماض الضعيفة)			الجزء المائي			الماء الحار			الماء البارد		
انواع البكتريا	التركيز mg/ml			التركيز mg/ml			التركيز mg/ml			التركيز mg/ml			التركيز mg/ml		
	25	50	100	25	50	100	25	50	100	25	50	100	25	50	100
S. typhi	R*	ملم 4	ملم 16	R	ملم 5	7 ملم	R	R	R	R	R	R	R	R	R
P. mirabilis	ملم 6	ملم 10	ملم 14	R	ملم 5	7 ملم	R	R	R	R	R	R	R	R	R
V. cholera	R	ملم 4	ملم 10	R	ملم 7	8 ملم	R	R	R	R	R	R	R	R	R

*R= Resistant

تاثير مزج تراكيز مختلفة من مستخلصات نباتي الزعتر واكليل الجبل على نمو البكتريا

يوضح الجدول (7) الفعل التازري لمستخلص جزء البيكربونات(المجاميع الفينولية) للمستخلص الكحولي لنباتي الزعتر واكليل الجبل عند مزجهما مع بعضهما بنسب متساوية وكذلك عند مزج مستخلص الماء البارد للزعتر مع مستخلص الماء البارد لاكليل الجبل ومزج مستخلص الماء الحار

لكلا النباتين مع بعضها وبتراكيز متسلسلة حيث اظهرت جميع البكتريا استجابات مختلفة فقد لوحظ ان مزيج المستخلص الماء الحار ومزيج المستخلص الماء البارد لكلا النباتين لم يؤثرا في نمو البكتريا لمقاومة البكتريا لهما منذ البداية. اما مزيج مستخلص جزء البيكاربونات (المجاميع الفينولية) للمستخلص الكحولي لنباتي الزعتر واكليل الجبل فكان اكثر كفاءة في تثبيط نمو البكتيريا بتراكيز متسلسلة حيث بدء تأثير هذا المزيج بتركيز 25ملغ/مل ولكن بصورة ضعيفة حيث كانت بكتريا *P. mirabilis* و *S. typhi* حساسة تجاه هذا التركيز بعد ان كانت مقاومة له قبل المزج (جدول 7) اما بكتريا *V. cholera* فمازالت مقاومة لهذا التركيز وفي تركيز 100,50ملغم/مل نلاحظ زيادة في اقطار التثبيط لكافة الأنواع البكتيرية حيث كانت بكتريا *P. mirabilis* الاكثر حساسية لهذا المزيج اذ بلغ قطر التثبيط 14 ملم عند التركيز 50 ملغم/مل تلتها بكتريا *S.typhi* بقطر تثبيط 8 ملم في حين كانت بكتريا *V. cholera* اقل تحسسا للمزيج بتركيز 50 ملغم/مل (قطر التثبيط = 6 ملم) اما عند التركيز 100ملغم/مل فكانت بكتريا *S .typhi* اكثر تحسسا بقطر تثبيط 20 ملم ويعزى سبب الكفاءة العالية لهذه المزيجات في تثبيط البكتريا الى احتوائها على العديد من المركبات الفعالة ومنها المركبات الفينولية التي تمتاز بقابليتها العالية للذوبان بالماء والتي ظهرت في مستخلص جزء البيكربونات للمستخلص الكحولي لكلا النبات .(El Kady,etal., 1993 - Inouye, 2001) وكذلك نجد ان التأثير المثبط للبكتريا يزداد بزيادة التركيز لهذه المزيجات نتيجة لتوفر المواد الفعالة فيها بكميات وتراكيز اكبر مع وجود حالة من التآزر بين هذه المواد اذ يصبح كلا منها مكملا للأخر ولذلك تبدي فعالية عالية في تثبيط البكتريا اكثر مما كانت عليه عند استعمال كل مستخلص بشكل منفرد وهذا يتفق مع Babayi,etal(2004). وبذلك تصبح البكتريا اكثر تحسسا ولا تستطيع مقاومة الفعل القاتل لهذه المواد ومن ثم ابادتها.

جدول (7) حساسية البكتريا للفعل التازري لمستخلصات نباتي الزعتر و اكليل الجبل.

نوع المستخلص	مزيج مستخلص جزء البيكربونات للزعتر+جزء البيكربونات لإكليل الجبل			مزيج مستخلص الماء البارد للزعتر +الماء البارد لإكليل الجبل			مزيج مزيج مستخلص الماء البارد للزعتر +الماء البارد لإكليل الجبل		
انواع البكتلريا	التركيز mg/ml			التركيز mg/ml			التركيز mg/ml		
	25	50	100	25	50	100	25	50	100
Salmonella typhi	2 ملم	8 ملم	20 ملم	R	R	R	R	R	R
Proteus mirabilis	6 ملم	14 ملم	16 ملم	R	R	R	R	R	R
Vibrio cholera	R*	6 ملم	14 ملم	R	R	R	R	R	R

R= Resistant*

المصادر :-

[1]. حسين ،مصلح ،(1989) الاحياء المجهرية في الغذية .مطابع التعليم العالي ،ص 560
[2].رنا مجاهد عبدالله ، (2010). دراسة التأثيرالمثبط لمستتلص نبات اكليل الجبل *Rosmarinus officinalis* السا لبة لصبغة كرام، مجلة كلية التربية الاساسية، العدد 65/ ص693-706
[3] عقيل ، محسن (1998) طب الامام الصادق . ط1 ،مؤسسة الإعلامي للمطبوعات ،بيروت ،ص333-336 .
[4] عقيل ، محسن (2003) . معجم الاعشاب المصور . ط1 ،مؤسسة الإعلامي للمطبوعات ،بيروت ،ص333-336 .

[5]وهاب امين جنان محمود طه ياسين زيد صلاح حسين (2011) .تأثير المستخلص الكحولي لنبات الزعتر في نمو بعض الجراثيم في الزجاج. مجلة القادسية لعلوم الطب الب طُري المجلد10 ، العدد2، ص 126-130

[6]هميم ، سعد سلمان (2002) . فعالية بعض المستخلصات النباتية ضد الممرضات الشائعة في اخماج الجلد الجرثومية .رسالة ماجستير / كلية التربية . جامعة البصرة ،العراق.

[7]. Anessiny G, Perez C. Screening of plants used a green line. Folk Medicine for Antimicrobial Activity. J Ethnopharmacol. 1993;39:119-128.

[8].Babayi , H . ; Kolo , I ; Okogun , J . I . and Ijah , U . J . J . (2004) The antimicrobial activities of methanolic extracts of Eucalyptus camaldulensis and Terminaliacatappa against some pathogenic microorganisms . Nigerian Society for Experimental Biology (NSEB) , 16 (2) :106 – 111 .

[9].Basaga, H., Tekkaya, C., &Acitel, F. (1997). Antioxidative and free radical scavenging properties of rosemary extract. Lebensmittel –Wissenschaft und Technologie, 30(1), 105–108

[10]. Brickell. C. (1990). The RHS Gardener's Encyclopedia of Plants and Flowers, Dorling Kindersley Publishers.

[11].Calabrese, V., Scapagnini, G., Catalano, C., Dinotta, F., Geraci, D and Morganti, P. (2000). Biochemical studies of a natural antioxidant isolated from rosemary and its applicationin cosmetic dermatology .International Journal of Tissue Reactions , 22 (8) :5 - 86 .

[12].Conner, D.E. (1981). Naturally Occuring compounds . In : Davison P.and Branan A.L (eds.). Antimicrobials in foods . New York : Marcel Dekker, Inc.: 441-468.

[13].Daferera, D. J, Ziogas, B and Polissiou M, (2000). GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *pencilliumdigitatum*. Journal of Agricultural and food chemistry, Athens, 48 (6): 2576-2581.

[14].Diamond, R.D.(1993). The growing proplem of mycosis in patients infected with human immunodeficiency virus J.Inf Dis. 13L: 480-486.

[15].Duke. J. A.and Yensu, E. S. (1985). Medicinal Plants of China, Reference Publications, Inc.45-71

[16].Egorove, N.S. (1985). Antibiotics. Ascientific approach. Mir publishers. Moscow.

[17].El-Kady I.A., Al-Maraghy S.S. and Mohammed E.M. (1993). Antibacterial and antidermatophyte activities of some essential oils from species. Qatar Univ. Sci. J., 13(1): 63-69.

[18].Ellof JN. (1998) Which extract should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? J. Ethnopharmacol,60:1-6.

[19].El-Meleigy, M.A.; M. Ahmed E; Arafa R.A.; Ebrahim N.A. and El-Kholany, E.E (2010). Cytotoxicity of four essential oils on some human and bacterial cells. J. Appl. Sci. Environm. Sanit. , 5(2): 143-159.

[20]. Erturk, O.(2010). Antibacterial and antifungal effects of alcoholic extracts of 41 medicinal plants growing in Turkey. Czech J. Food Sci. ,82: 53-60.

[21].Genena, A.K.; Hense, H.; Smania Junior, A. and Souza, S.M. (2008).Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) – a study of the composition, antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtained with supercritical carbon dioxide. Ciênc. Tecnol. Aliment, Campinas, 28(2): 463-469.

[22].Gruewald,J;Brendeler,T and Christof,J.(2000). PDR for Herbal medicines 2nd ed .p:409-410 .

[23]. Haddad , D. (1965) . The chemistry of vegetable drug . part 2 , CairoUniv. press , Cairo , Egypt . pp. 127

[24]. Harborne , G . B . (1984) Phytochemical Methods . Aguide to modern techniques of plants analysis . 2nd. Ed . Chapman and Hall ,London , New York .

[25]. Inouye , S . ; Takizawa , T . and Yamaguch , H . (2001). Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tractpathogens by gaseous contact . J.Antimicrobial Chemotherapy , 47(5) : 565–73 .

[26]. Jawad, A.I; Dhahir, A.B.J. and Hussain, A.M. (1985). Lactones extracted from Iraqi composite. Part:1. J.Basrah. Sci. Res, 16(1):5-18.

[27]. Katayama , T .and Nagai , I . (1993) . Chemical siginificance of the volatile compnents of spices from the food preservation standpoint , structure and
antimicrobial activity of some terpenes . Nippon suisanGakkaishi, Vol (1):26: 29.

[28]. Ladd , T . L. ; Jacobson , M , and Buriff , C . R . (1978) Jopanese beetles extracts from neem tree seeds as feeding deferents . J . Econ .Entorol . 71 : 810 – 813 .

[29]. Mahasneh , A . M . ; Abbas, . J . A . and E- Oqilah , A . A . (1996) Antimicrobial activity of extracts of herbal plants used in the traditional medicine of Bah rain . Phytotherapy Res ., 10 : 253 – 257.

[30]. Panizzi, L.; Flamini, G.; Cioni, P.L. and Morelli, I. (1993). Composition and antimicrobial properties essential oils of four Mediterranean Lamiaceae. J. Ethnipharmacol., 39(3): 167-170. .

[31]. Penalver , P . ; Huerta , B . ; Borge , C . ; Astorga , R . ; Romero , R . and
Perea,A.(2005) Antimicrobial activity of five essential oils against origin strains of Enterobacteriaceae family . Apmis , 113 (1) : 1 (Abst.) .

[32].Perez-Fons L; Aranda FJ; and Guillen, J. (2006) Rosemary (Rosmarinusofficinalis) diterpenes affect lipid polymorphism and fluidity in phospholipid membranes. Arch BiochemBiophys. 453(2):224-236

[33].Philip,K.; Abd Malek,S.N.; Sani,W.; Shin,S.K. ; Kumar,S. ; Lai,H.S.; Serm,L.G. and Rahman , N.S.A.(2009).Antimicrobial Activity of some medical plants from Malaysia. American Journal of Applied Sciences. 6(8).1613-1617.

[34]. Rezzoug SA, Boutekedjiret C, Allaf K. Optimization of operating conditions of Rosemary essential oil extraction by a fast controlled pressure drop process using response surface methodology. Journal of Food Engineering La Rochelle/Algiers, Vol. 71, 2005;pp:9-17.

[35]. Santoyo S; Cavero S; Jaime L; Ibaanez E; Senorans FJ; and Reglero G. (2005) .Chemical composition and antimicrobial activity of Rosemarinusofficinalis L.: Essential oil obtained via supercritical fluid extraction. J Food Prot,68:790-795.
[36]. Settiner, R.A. and Krassner, S.M. (2003). Antimicrobial effects of plant-derived essential oil formulations on pathogenic bacteria. J. Am. Nutraceutical Association, 6(3): 27-31.
[37]. Spiewak , R . ; Skorska , C . and Dutkiewicz , J . (2001). Occupational airborne contact dermatitis caused by thyme dust. Contact Dermatitis , Department of Occupational Biohazards , Institute of Agricultral Medicine, Lublin , Poland ; 44 (4): 235 – 239 .
[38].Suhad A. Ahmed , Nagham H. Abood and Dr.Abbas A. Al-Janabi (2013).Antimicrobial Effect of Pomegranate Peel Extracton Some Pathogenic Microorganisms, eng. And tech. journal.vol31 ,part(B) ,no.3: 316-324.
[39].Thorria RaddamMarzoog. (2013).Synergistic Effect of Rosmarinus Officinalis Extract with Antibiotics against Different Bacterial Isolates, eng. And tech. journal.vol31,part(B),no.5:678:686
[40].Takeshi Nagai, Takao Myoda, and Toshio Nagishima (2005): Antioxidative activities of water extract and ethanol extract from field *Equisetum arvense.* Food Chemistry, V.91(3)389-394.
[41]. Tsai, P. J. Tsai, T. H., Ho, S. H. (2006) In vitro inhibitory effects of rosemary extracts on growth and glucosyltransferase activity of Streptococcus sobrinus, Food Chemistry.45(2):23-36
[42]. Willis LJC. "A Dictionary of Flowering Plants and Ferns" 8th Ed. Cambridge, the University Press. 1973. :9-15