

وزارة التربية والتعليم العالي
البحرین
جامعة سبها - كلية العلوم

جامعة سبها - كلية العلوم

قسم : علم النبات - شعبة : أحياء دقيقة

بحث مقدم للاستكمال متطلبات الحصول على درجة البكالوريوس في علم النبات

بعنوان :-

دراسة نباتات الاكليل، المرمية و النعناع و نشاط مضادات
الميكروبات للزيوت العطرية
المستخرجة منها

Study of antimicrobial activity of essential oil
extracted from plants of Rosmarinus officianalis, Salvia officianalis and Mentha pirpireta

إعداد الطالبات :-

أمنة يوسف على عثمان

هرضي حسين الطاهر بشير

أسماء المهدي ودي

سعدة محمد مسعود

تحت إشراف:

د. يونس الخيالي

العام الجامعي
2016-2017 ف

ملخص

الزيوت الطيارة ومركباتها لديها تاريخ طويل كعوامل المضادة للجراثيم، ولكن استخدامها كإضافات المضادة للميكروبات في صناعة المواد الغذائية نادرة . ويهدف هذا العمل إلى المساهمة في تحديد النشاط المضادة للميكروبات عن طريق الزيوت الطيارة. في البداية، تركز هذه الدراسة على استخراج هذه المركبات من بعض النباتات الطبية وهي الإكليل الجبل (*Rosmarinus officinalis L*) ، المرمية (*Salvia officinalis L*) و النعناع (*Mentha piperita L*) بالطريقة التي يتم فيها استعمال تغنية hydrodistillation (نوع hydrodistillateur).

تم توجيه العمل نحو اكتشاف النشاط المضاد ضد البكتيريا باستعمال الزيوت المتحصل عليها باختيار السلالات البكتيرية المتسببة ، في التسمم الغذائي والأمراض التي تصيب الإنسان. وأدى ذلك باستخدام طرق الحفر. وأظهرت الزيوت التي شملتها الدراسة النشاط المضاد للبكتيريا علي جميع السلالات المختبرة، بما في ذلك المذهبة الأكثر حساسية في حين الزنجارية الأكثر مقاومة.

تم تحديد تركيزات المثبطة الحد الأدنى (MIC) عن طريقة التخفيف علي الأوساط الصلبة. تبين في هذه الدراسة إن النتائج تختلف حسب نوع السلالة البكتيريا و مصدر الزيت. كان قطر منطقة التثبيط لزيت الإكليل 7 ملم (*E. coli*) و 12 ملم علي *Shigella* ، و زيت المرمية اعطا 9.30 ملم (*Shigella*) و 13 ملم (*E. coli*) وبنسبة لنبات النعناع النتيجة كانت 7.30 ملم علي *Shigella* و 13.30 ملم علي *Proteus*.

تبين هذه النتائج إن البكتيريا *E. coli* لها اكثر حساسية لمرمية و مقاومة نسبيا للإكليل و بالعكس *Shigella* حساسة للإكليل ومقاومة للمرمية والنعناع و *Proteus* بينة اكبر حساسية للنعناع بالرغم من لها حساسية متوسطة للإكليل والمرمية.

وتشير هذه النتائج نتيجة إيجابية للاستعمال كإضافات في مجال صناعة المواد الغذائية لسلامة المستهلك. وسوف يمكن للباحثين مناقشة تطبيق هذه الخصائص في الحفاظ على سلامة اللحوم المفرومة وتخزينها في درجة حرارة التبريد.

الفصل الأول

المقدمة

هنا مقدمة ص 8 أيضا مقدمة ماهو الفرق بينهما ولماذا الإثنان في البحث؟

1- منذ آلاف السنين، قد استخدم البشر مختلف الموارد الموجودة في البيئة للعلاج ولمعالجة جميع أنواع الأمراض. حاليا، منظمة الصحة العالمية (FAO) تقدر، أن حوالي 80% من سكان الأرض قد يستخدمون المستحضرات العشبية التقليدية، كعلاج الأولي (Lhuillier،2007).

2- في جميع أنحاء العالم، هذه الأنواع تمتلك قيمة عالية وتحتل مكانة اقتصادية متميزة جدا بالإضافة إن الزيوت العطرية المستخرجة من هذه الأنواع لديها مجموعة واسعة من الاستخدام. وهي تستخدم في الأدوية العشبية والعطرية لعلاج القلق، والعصبية، والأرق، ولكن أيضا لتخفيف الروماتيزم وعلاج التهابات الجهاز التنفسي بالإضافة إلى تطبيقها في مجال طب الأعشاب والروائح، أيضا تستخدم هذه الزيوت في مناطق أخرى في الحلويات ومستحضرات التجميل والعطور.

3- عرفت النباتات الطبية والعطرية للإنسان منذ أمد بعيد ودونت كثير من الدراسات و المعلومات عنها في الحضارات القديمة مثل حضارة المصريين والهند والصين واليابان ولا زالت الكثير من الشعوب الآن تستعمل هذه النباتات كما كانت تستعملها منذ الاف السنين.

4- حيث أن لبعض النباتات الطبية والعطرية التي تحتوي على مواد كيميائية فعالة متمثلة في الزيوت العطرية أو الزيوت الطيارة، والتي تعتبر مواد هيدروكربونية لها خاصية التطاير على درجة الحرارة العادية دون أن تترك أثر على ورقة الترشيح وغيرها من المواد الفعالة مثل القلويدات والجلايكوسيدات لها القدرة الفسيولوجية على معالجة مرض معين.

الهدف من الدراسة

هذه الدراسة تهدف إلى التعرف على هذه الانواع، على طريقة الاستخلاص وفعالية الانواع الثلاثة ضد الجراثيم.

غير واضحة الفكر والهدف؟

تهدف هذه الدراسة إلى التعرف على نباتات الثلاثة ضد الجراثيم عن طريق الاستخلاص؟

توضيح:

تهدف هذه الدراسة إلى التعرف على فاعلية النباتات الثلاث ضد الجراثيم عن طريق الاستخلاص.

الفصل الثاني

الدراسات السابقة

المقدمة الأساسية:

2.1- مقدمة

منذ آلاف السنين، قد استخدم البشر مختلف الموارد الموجودة في البيئة للعلاج ولمعالجة جميع أنواع الأمراض. حالياً، منظمة الصحة العالمية (FAO) تقدر، أن حوالي 80% من سكان الأرض قد يستخدمون المستحضرات العشبية التقليدية، كعلاج الأولي (Lhuillier, 2007).

عُرفت النباتات الطبية والعطرية للإنسان منذ أمد بعيد ودونت كثير من الدراسات و المعلومات عنها في الحضارات القديمة مثل حضارة المصريين والهند والصين واليابان ولا زالت الكثير من الشعوب الآن تستعمل هذه النباتات كما كانت تستعملها منذ آلاف السنين. تشمل النباتات الطبية والعطرية مجموعة من النباتات التي تستعمل لعلاج الإنسان أو الحيوانات وأيضاً يحضر منها مستحضرات التجميل المختلفة ، لذلك فهي لها أهمية كبيرة للإنسان مع العدد الكبير من صناعات التي تقوم عليها ، وقد عرف العالم Dragendoroff النبات الطبي علي انه "كل شيء من أصل نباتي ويستعمل طبياً فهو نبات طبي ". وطبقاً لهذا التعريف أو المفهوم فنجد انه يضم المملكة النباتية بأسرها ولايستثنى من ذلك اكثر النباتات رقياً إلي أدناها وأبسطها تركيباً وتطوراً ولما كانت الكميات التي تجمع منها برياً لاتفي بالاحتياجات المتزايدة منها عالمياً فان زراعتها أصبحت ضرورة حتمية (خلف الله. 1980).

حيث أن لبعض النباتات الطبية و العطرية التي تحتوي علي مواد كيميائية فعالة متمثلة في الزيوت العطرية أو الزيوت الطيارة ، والتي تعتبر مواد هيدروكربونية لها خاصية التطاير على درجة الحرارة العادية دون أن تترك أثر على ورقة الترشيح وغيرها من المواد الفعالة مثل القلويدات والجلايكوسيدات لها القدرة الفسيولوجية علي معالجة مرض معين ، أو علي الأقل تقلل أعراض الإصابة بهذا المرض إذا ما أعطيت للمريض بصورتها النقية بعد استخلاصها من المادة النباتية ، أو إذا ما تم استخدامها وهي مازالت علي صورتها الأولى في صورة عشب نباتي طازج أو مجفف أو مستخلص جزئيا (الزبيدي ,ليبب احمد كاظم . 2005).

ويعتبر مجال دراسة الزيوت الطيارة العطرية و النباتات الحاملة لها من المجالات الهامة ، حيث أن القدر الأكبر من هذه النباتات الحاملة للزيوت تستخدم في مجال تصنيع العفاقير و كذلك في صناعة مستحضرات التجميل ومواد الزينة ، هذا فضلا عن تنوع التركيب الكيميائي لهذه الزيوت وكذلك صعوبة التخليق المعملّي لبعضها . كذلك تستخدم اغلب الزيوت العطرية والطيارة والنباتات العطرية الحاملة لها كمحسنات للطعم و النكهة و الرائحة لأغلب المستحضرات الصيدلانية والأطعمة . أيضا من مجالات استخدام النباتات الطبية و العطرية هو استخدامها كبهارات أو توابل أو مشروبات . كذلك فإن عدد من هذه الزيوت ذات تأثيرات طبية وعلاجية كالزيوت المحتوية على المركبات الفينولية والتي تستخدم كمطهرات ، وتنتج الزيوت العطرية الطيارة كمواد حيوية ثانوية أثناء عملية التمثيل الغذائي للنباتات وهي غالبا تعتبر ميزة للنباتات المنتجة لها (السيد ,محمد درويش . 2004).

2.2 - كيمياء الزيوت Chemistry of essential oils

تتكون معظم الزيوت الطيارة من مزيج من الهيدروكربونات والمركبات الاكسيجينية المشتقة من هذه الهيدروكربونات ، وبعض الزيوت الطيارة تتكون فقط من الهيدروكربونات ولا تحتوي إلا على كمية محدودة من المركبات الاكسيجينية مثل زيت التربنتينا ، والبعض الآخر يتكون من المركبات الاكسيجينية فقط مثل زيت القرنفل ، وتعتمد رائحة أي زيت عطري طيار أو طعمه بصفة أساسية على مثل هذه المركبات الاكسيجينية التي تذوب في الماء بنسب متفاوتة كما في ماء الزهر وماء الورد ، كذلك فإن هذه المركبات الاكسيجينية تذوب في الكحول بنسب أعلى من نسب ذوبان الهيدروكربونات .

ومن المركبات الاكسيجينية التي تتواجد بالزيوت الطيارة ما يلي :

(الكحولات – الأثيرات – الأكسيدات – الكيتونات – الفينولات – البيروكسيدات).

هذا بالإضافة إلي كل من المركبات الكبريتية والنيتروجينية والهيدروكربونية .

وينتمي معظم هذه المركبات إلي مجموعة التربينات والتي تبني حيويًا بالنبات من خلال دورة الخلات " Acetate Pathway " والوحدة البنائية هي مركب الأيزوبنتينيل بيروفوسفات Iso-pentenyl (pyrophosphate) والذي يحتوي علي خمس ذرات من الكربون (الصالح, ضحى سعد. 1990).

3.2 الهيدروكربونات التربينية Terpenoid Hydrocarbons :

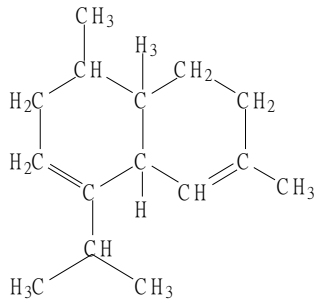
1 – هذه التربينات قد تكون أليفاتية على شكل سلسلة مفتوحة كما في حالة الميراسين Myrecene الذي يتواجد في زيت حشيشة الدينار والاوسمين Ocimene الذي يوجد في زيت الريحان العطري الطيار .

2- قد تكون هذه التربينات حلقية تحتوي على حلقة واحدة فقط مثل الزنجبرين

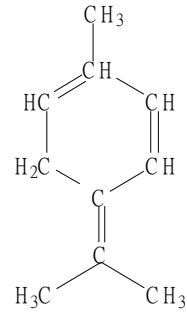
Zingiberene الموجود بزيت الزنجبيل Zingiber officinale .

3- أو قد تكون هذه التربينات ثنائية الحلقة مثل الكادينين Cadinene الذي يتواجد في زيت

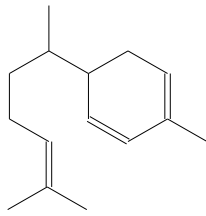
حشيشة الليمون وزيت الكاد (الصالح, ضحى سعد. 1990) .



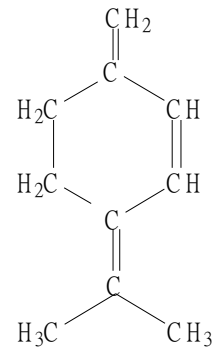
Cadinene



Cis - B - O cim enne



Zingiberene



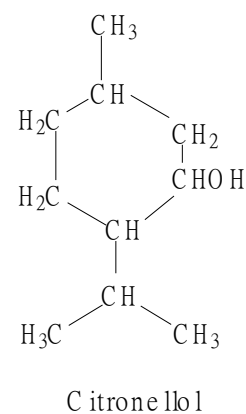
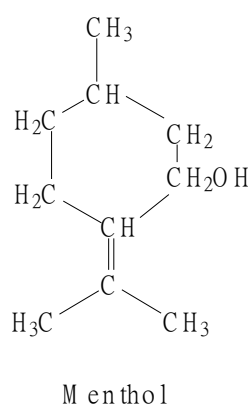
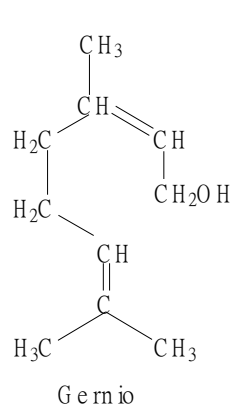
Myrcene

4.2 - المشتقات الاكسيجينية للتربينات Oxygenated drevatives

1 - الكحولات Alcohols وهذه يمكن أن تقسم إلي مجموعتين هما :

- كحولات أليفاتية (ذات سلسلة مفتوحة غير حلقية) ومنها الجيرانيلول الموجود في زيت العتر البلدي (العطرشان) والورد البلدي وكذلك السترونيلول Citronello1 الموجود في زيت العتر البلدي واللينالول Linallo1 الموجود في زيت الكسبرة .

- كحولات حلقية (أحادية الحلقة) مثل المنترول Menthol الموجود في زيت النعناع .

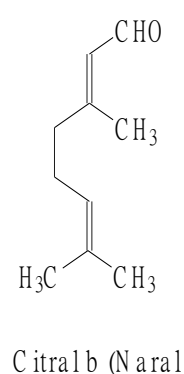
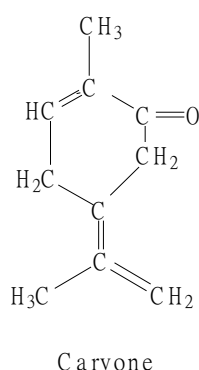
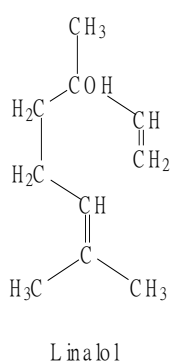


2 – الأسترات Esters مثل خلات المنثايل Menthyl acetate التي توجد في زيت النعناع

الفلجلي أو خلات اللينالول linalool acetate وتوجد في زيت اللافندر والبرجموت .

3 – الألدهيدات Aldehyds مثل السترونيالات Ctronellal الذي يوجد في زيت الكافور

الليموني و السترال Citral الذي يوجد في زيت حشيشة الليمون وزيت الليمون والدهيدالسناميك Cinnamic aldehyde الموجود في زيت القرفة .



4 – الكيتونات Ketones مثل الكارفون Carvone الموجود في زيت الكراوية والشبث والنعناع

البلدي والكافور Camphor الموجود بزيت الريحان .

5 – مركبات تحتوي علي النيتروجين كالأندول المتواجد في العديد من الزيوت المستخلصة من

الأزهار كالياسمين وأزهار الليمون .

6 – مركبات فينولية مثل الثيمول Thymol الموجود في زيت الزعتر والأيوجينول Euginol

الموجود في زيت القرنفل الكريزولات الموجودة في زيت قطران الخشب ، هذا وتستعمل الزيوت المحتوية علي الفينولات كمواد مطهرة لإبادة الجراثيم .

7 – مركبات الأثيرات الفينولية Phenolic ethers مثل مركب الأنيثول Anethol الموجود في زيت الينسون (الأنيسون) وزيت الشمر .

8 – مركبات كبريتيه الموجوده في كل من زيت البصل والثوم والخردل .
مركبات أخرى مثل مادة الأسكاريدول Ascaridol الموجود في زيت الكينوبوديم (المنته الطبية)
المستخدم كطارد للديدان الاسطوانية ، ومادة الأيوكاليبتول Eucalyptol (السينيول) والموجود في زيت الكافور(العكيلي ,عدنان خيون . 2002) .

4.2 نبذة عن الأعشاب التي تمت دراستها في البحث

تم اختيار ثلاث نباتات عطرية ليتم استخلاص ودراسة المواد الفعالة لها وهي :
(الإكليل – المرمية – النعناع الفلفلي).

الإكليل

Family LAMIACEAE

Rosmarinus officinalis L

الإكليل

الفصيلة الشفوية

الاسم العلمي

الاسم الشعبي

نبات شجيري معمر، دائم الخضرة ، يبلغ ارتفاعه حوالي 2متر ، أوراقه صغيرة إبرية الشكل تشبه الأشواك ، تخرج منها رائحة مميزة عند حرقها ، سطحها الأعلى أخضر غامق والسطح السفلي مكسو بشعيرات بيضاء دقيقة . وتخرج الأوراق من الساق في مجموعات ، كل مجموعة



شكل (1) يوضح نبات الإكليل

من ثلاث وريقات ، وهذه المجاميع تكون متقابلة على الساق . الأزهار لونها بنفسجي يميل إلى الأزرق أو البنفسجي الخفيف .

الجزء المستعمل :

الأزهار والأوراق .

المكونات الفعالة :

وجدا أن نبات الأكليل يحتوي على زيت طيار يتרכب من المواد الآتية :

Terpenes	_ ترينينات
Borneol	_ بورنيول
Cineol	_ السينيول
Rosmarinc acid	_ حمض الروزمارينك
	_ مواد صابونية

الفوائد و الاستعمالات:

لزيت الإكليل المستخلص فوائد عديدة نسردها: له أثر فعال في علاج ضغط الدم المرتفع كما أشار إليه سيدنا محمد (صلى الله عليه وسلم)، وأيضاً يستخدم الإكليل في علاج اضطرابات المعدة ومساعد على الهضم، ومدر للطمث، ويستعمل في علاج اضطرابات الحيض، ومسكن للتشنجات ومنبه للأعصاب، ومن ناحية أخرى فإنه يستخدم بنجاح في علاج حالات العيون المصابة بالرمد الربيعي، ويستعمل هذا النبات في علاج مرض الصفيير (الشماع , علي عبد الحسين . 1989) .

المرامية

Fam. Labiatae(lamiaceae) الفصيلة الشفوية

Salvia officinalis L الاسم العلمي

المرامية الاسم الشعبي

المرامية نبات عشبي معمر قوي النمو يبلغ ارتفاعه 50 – 60 سم ، الأوراق رمحية الشكل طوله 3-5 سم وعرضها 1-2.5 سم ، لونها رمادي فاتح لغزارة الأوبار على سطحي الورقة ، الأزهار لونها أرجواني أزرق في نورات عنقودية .



شكل (2) يوضح نبات المرامية

المكونات الفعالة:

الجزء المستخدم من نبات المرامية هو الأوراق التي يتم جمعها عند بدء النبات في الأزهار حيث تحتوي هذه الأوراق على زيوت تصل نسبتها إلى 2.5% أو أكثر ، و الزيت أصفر مخضر يحتوي على :

لينالول linalool ، بالإضافة إلى احتواء الأوراق على المواد المرة و التانينات والراتنجات (الزبيدي ,ليبب احمد كاظم 2005) .

الفوائد والاستعمالات :

يستخدم المستخلص أو المنقوع المائي لأوراق نبات المرامية في تخفيف ألم الحجرة و اللثة عند إستعمالها في صورة مضمضة ويستعمل كشراب لإزالة الكحة وتقوية وتنشيط الدورة الدموية وتقليل حالات الهياج العصبي ، و تهدئة الأعصاب ووقف الإسهال وزيادة إفراز الصفراء وقد يستعمل العشب أيضا في علاج اضطرابات المعدة وتنظيم عمليات الهضم أو تسكين آلام الكليتين واحتباس البول ويستخدم الزيت الطيار كمطهر أو كعلاج لبعض الأمراض الجلدية ، والزيوت الطيار ككل يفرج التشنجات العضلية وهو مضاد للجراثيم (السيد ,محمد درويش (2004) .

النعناع الفلفلي

Fam. LAMIACEAE

الفصيلة الشفوية

Menthe piperita

الاسم العلمي

النعناع أو النعنع

الاسم الشعبي

نبات عشبي معمر، يصل ارتفاعه الى حوالي 80 سم، رائحته مميزة ، ساقه خضراء مضلعة ، الأوراق جالسه غير معنفة ،زرقاء متجمعة في عناقيد طرفية ، وأخرى جانبية في منطقة التصاق الورقة بالساق ، الأزهار نادرا ما تعطي بدورا، ولكن هذا النبات يتكاثر خضريا بواسطة السوق الجارية تحت سطح التربة .



شكل (3) يوضح نبات النعناع الفلفلي

الجزء المستعمل طبيا

الاوراق قبل ظهور الازهار في فصل الربيع واجزاء من السوق الغضة

المواد الفعالة :

1. زيت طيار من المنتول *menthol+volatile*
2. مواد دابغة ومسكنة للتشنجات ومدرة للصفراء
3. مادة الكارفون *carvone*
4. مواد تربينية أهمها :

أ- الليمونين *limonene*

ب- فيلاندرين *phellenderene*

ج - بنين *pinen*

الفوائد والاستعمالات

الاستعمال الخارجي يستعمل النعناع لعلاج الالتهاب الجلدي، وذلك بوضع مزيج من النعناع المفروم مع الخل فوق مكان الإصابة ، كما يستعمل مغلي الأوراق للغرغرة ولتنظيف الحلق والفم والتخلص من الروائح الكريهة ، أما بالنسبة للاستعمال الداخلي يعتبر مغلي أوراق النعناع من انجح الأدوية لمعالجة ولتسكين المغص المعوي ومغص الرحم وطرده الغازات المعوية ، ومغلي النعناع يكسب الجسم المنهك نشاط وحيوية ، والمغلي يحضر بالطرق المعروفة وهي ملعقة كبيرة من مسحوق

الأوراق لكل كوب من الماء الساخن لدرجة الغليان ويؤخذ منه بعد أن يبرد من كوب إلى ثلاثة أكواب في اليوم ويمكن مزج المغلي مع الشاي الخفيف واللبن ، ويلاحظ عدم شرب المغلي عند الشعور بالقئ لأنه يثير القئ ويزيد من جفاف الحلق، والشعور بالعطش كما أن أكثر الحالات استخداما لهذا النبات في العلاج المغص المعوي والرحم والالتهاب الجلدية (الصالح, ضحى سعد. 1990).

الفصل الثالث

المواد وطرق العمل

3- المواد و طرق العمل

1.3 – الأجهزة و الأدوات المستخدمة:

- الرجاج .
- جهاز المبخر الدوار .
- الحاضنة .
- الأوتوكليف .
- أطباق بتري .
- مخبار مدرج .
- سواب قطني .
- لوب معدني + بلاستيكي .
- أوراق ترشيح .
- إبر معقمة .
- أنابيب زجاجية ذات أحجام معينة .

2.3 - الأوساط الزراعية

- وسط صلب (Nutrient Agar، Mueller Hinton Agar).

3.3- مذيبيات المستخدمة

- الهكسان العضوي .
- كحول مطلق .
- ماء مقطر .

4.3- البكتيرية المختبرة

تم اختبار أربعة اجناس بكتيريا ممرضة والتي تسبب العديد من المشاكل الطبية للمستشفيات والمختبرات المختلفة في مدينة سبها وهي : *Shigella* ، *E. coli* ، *Pseudomonas* و *Proteus*.

5.3-النباتات المستخدمة

تم استخدم ثلاثة نباتا في هذا العمل و هي :

- المرمية (*Rosmarinus officinalis L*)

- (الاكليل (*Salvia officinalis L.*)

- (النعناع الفلفلي (*Mentha piperita L.*)

6.3 - طريقة الاستخلاص.



الإكليل



المرمية



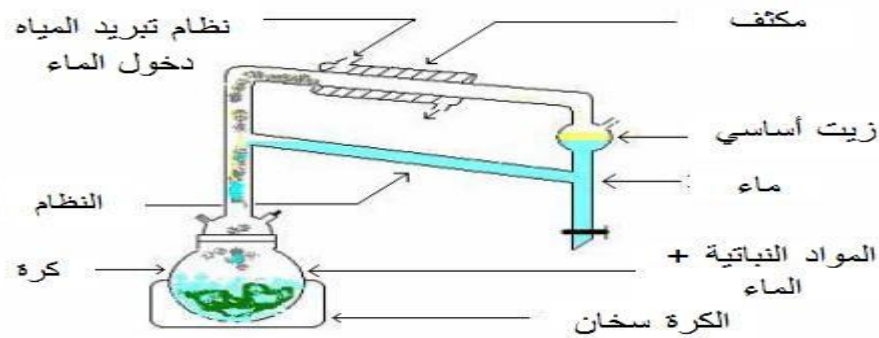
النعناع الفلفلي

الشكل رقم 4 : يبين الثلاثة النباتات المختبرة

6.3- طريقة الاستخلاص :-

أ - التقطير بالماء : Hydro distillation

تم اختيار في هذا العمل طريقة التقطير بالماء وهي عبارة عن استخلاص أو فصل الزيت الطيار التي يحتوي عليه أجزاء النبات، وتم ذلك بتبخير الزيوت المتطايرة عن باقي المكونات الغير متطايرة وذلك باستخدام الحرارة، ثم تكثيفه بخفض درجة حرارته للحصول علي الزيت في الصورة السائلة والتي يجب فصلها عن الماء للحصول عليها في الصورة النهائية وفي هذه الحالة يلعب الماء دوراً أساسياً في عملية التقطير حيث يقوم بنقل الزيوت الطيارة من داخل النسيج النباتي إلي سطحه الخارجي و شكل رقم 1 يبين جميع المراحل التي تمر بها هذه العملية .



الجهاز المستخدم في التقطير بالبخار للزيوت (Hernandez Ochoa, 2005)

شكل رقم 1: يبين كيفية استخلاص الزيوت الطيارة عن طريق ال Hydrodistillation

أ- جمع العينات وتحضيرها Collection and preparation of samples

تم جمع عينات أوراق الإكليل والمرمية والنعناع الفلفلي من المشتل في أكياس بلاستيكية ، وتم استعمالها في استخراج الزيوت الأساسية . لإتمام هذا العمل تم تنظيف الأراك من التربة والاجسام الخارجية ، ثم تجفيفها في الظل في مختبر جيد التهوية لمدة 5 إلى 7 أيام. بعد ذلك تم طحن الأوراق الجافة للحصول علي مسحوق ناعم جيداً (باستخدام الهاون) و جاهز للاستعمال. تم الحفاظ علي عينات المسحوق (بمقدار 100 غم لكل نبات) في دوارق مخروطية نظيفة في الثلاجة حين استعمالها .

ب. استخلص الزيت الطيار من الجزء النباتي

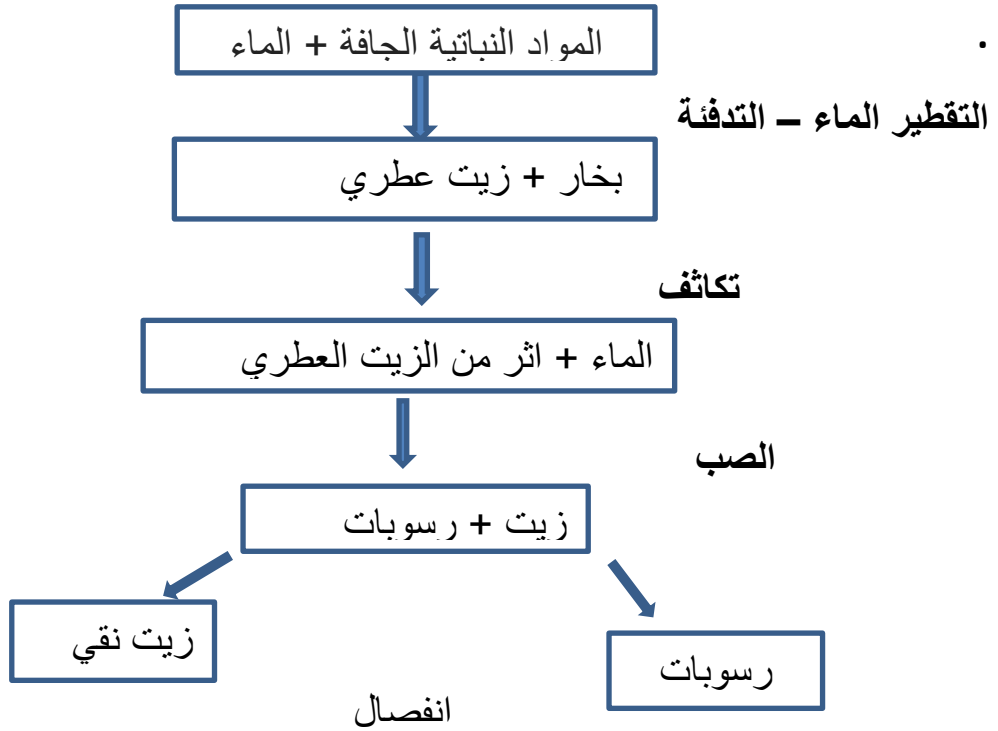
أجريت عملية استخلاص الزيت من المسحوق حسب طريقة Clevenger (1928). و هذا تم استخلص الزيت الطيار من المسحوق الجاف لأوراق النباتات الثلاثة باستعمال جهاز Clevenger موصول بدورق حجم 1 لتر. ثم وضعت في هذا دورق الخاص بالجهاز وأضيف لها 500 مليلتر من الماء المقطر وزن 100 غم من مسحوق الاوراق المجففة. و جرت عملية التقطير بتسخين الدورق بشكل مستمر لمدة ساعتين ونصف لكل عينة من العينات لحين استخلاص كمية الزيت الطيار من العينة، وهذا عند يتكون الفاصل بين طبقتان المائية و الزيتية. هاتان الطبقتان تتكون من خلال حمام الفصل في أنبوبة جمع الزيت: فالماء يكون في الأسفل والزيت الى الأعلى، لأنه أخف من الماء. وبعد فصل الطبقة الزيتية، تم وضع كل عينة زيت في قنينة معقمة و محكمة الغلق. تم وزن كمية الزيت لكل معاملة بواسطة ميزان حساس (1260 MP-Sartorius) ، ثم حفظت القناني على درجة حرارة 4⁰م لحين قياس نسبة الزيت وتقدير بعض الصفات الفيزيائية للزيت و هذا لكل معاملة و لكل نبات (جدول 1).

جدول (1): يبين تركيز الزيوت (3) المستخلصة

المذيب	الميرمية	النعناع	الإكليل
الهكسان	ذات لون أخضر زاهي	ذات لون غامق	ذات لون أخضر مائل للأصفر
	9g	9.69 g	9.64g

ج - طريقة استخلاص الزيوت الطيارة Extraction of volatile oil

لاستخلاص هذه الزيوت من الثالثة النباتات المختبرة تم وضع بورتوكول



شكل رقم 2 : بروتوكول العمل في استخراج الزيوت الطيارة من النباتات الثالثة

ماهو الفرق بين شكل (1) وشكل (2).

7-3- البكتيريا المستخدمة في هذه الدراسة :-

تم الحصول علي السلالات البكتيريا من مركز سبها الطبي. الاربعة السلالات تم عزلها من مرضي يترددون علي المركز و تم تنقيتها وتعريفها قبل استعمالها في تجربة.

1 – *Pseudomonas*

2- *E.Coli*

3- *Shigilla*

4- *Proteus*

ثم تحديث مزارع البكتيريا المذكورة على الأوسط (nutrient agar) وحفظها في الثلاجة حين استعمالها

- خطوات العمل :-

بعد أن تم تحضير بيئة أجار (Mueller Hinton agar) تم توزيعها علي أطباق بتري وعمل بالآتي :-

1 - زرعت بيئة الأجار على 12 طبق بالتساوي حتى تجمد .

2 - تحضير معلق بكتيري وذلك كالآتي :-

المعلق البكتيري :- المحلول الملحي (Normal saline) ثم سكبهُ إلي حد معين في أنبوبة اختبار صغيرة الحجم ، ثم أخذ بواسطة ممسحة معقمة مسحة من البكتيريا التي تم تجديدها كل علي حدة ، وخلطها مع المحلول الملحي ثم رجها جيداً وتحضير أنبوبة اختبار أخرى وتكون صغيرة أيضاً وسكب فيها كلوريد الباريوم الغرض من عمل أنبويتين للمقارنة بين درجة التعكير (للمحلول الملح والبكتيريا) مع (كلوريد الباريوم) ، بعد أن تم خلط المحلول الملحي مع البكتيريا جيداً أخذت مسحة من كل أنبوبة (مع العلم إنه تم تحضير 4 أنابيب كل أنبوبة بها جنس معين من البكتيريا الجديدة مع المحلول الملحي) ، وتوزيع هذه المسحة علي أطباق بتري كل بكتيريا يخطط بها ثلاث أطباق .

3- بعد تخطيط الأطباق بالبكتيريا تم ثقب الأطباق بواسطة أداة الثقب عمل 3 ثقوب في الطبق وفي كل ثقب وضعت عينة من الزيت الذي تم استخلاصه ، مع وضع عينة بها المذيب Control .

4 - لكل بكتيريا عدد 3 أطباق وفي كل طبق 4 ثقوب ، فكل ثقب تم وضع عينات من زيت الإكليل ، زيت النعناع ، زيت المرمية والثقب الرابع وضع فيه الهكسان ، وبعد ذلك تم أخذ العينات بواسطة ماصة يدوية (Pipetman) سعتها 25 مم.

الفصل الرابع

النتائج والمناقشة و الخلاصة

1.4- النتائج

1- نتائج

1-1- الخصائص الحسية للزيت المستخرج

تم التعرف على الزيوت المستخرجة من نباتات *Rosmarinus officinalis* L. (المرمية) ، *Salvia officinalis* L. (الأكليل) و *Mentha piperita* (النعناع الفلفلي) إن لها مظهر سائل شفاف واضحة اللون : الأخضر الزاهي (المرمية) ، الأخضر الغامق (النعناع) والأخضر مائل للأصفر (الإكليل) وهذه النتائج تطابق مع ما حصل عليه في دراساتهم.

2-1- النشاط المضاد للجراثيم

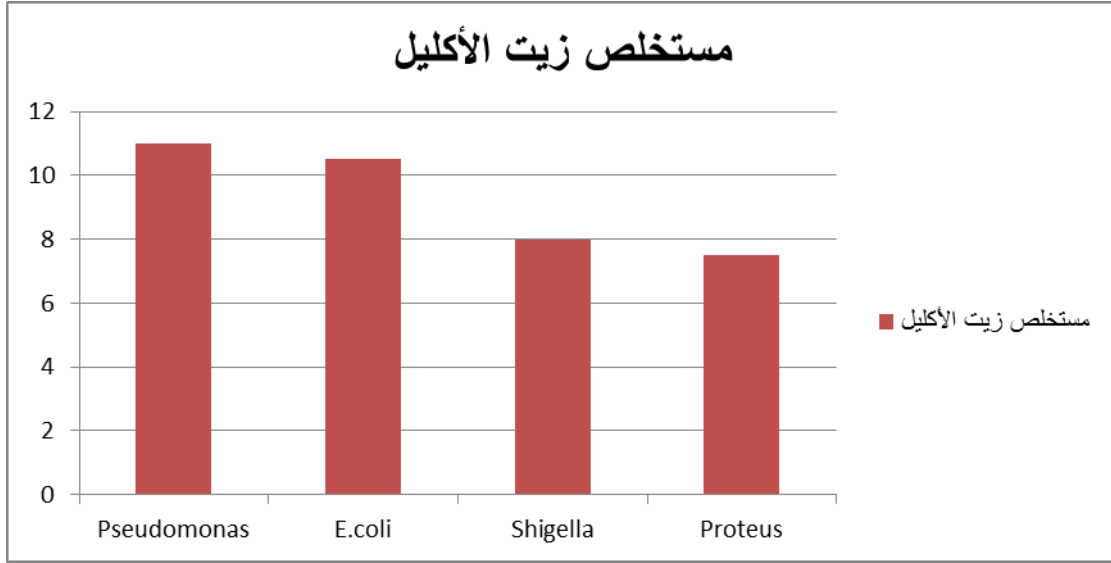
عن طريقة النشر في الحفر تم تسليط الضوء على الزيوت الأساسية للنباتات الثلاثة المختبرة و المضادة للبكتيريا علي الأربعة سلالات البكتيرية الممرضة. وتم التأكد من النتائج بعد التحليل الإحصائي ($p \leq 0.05$) الجدول 2 ، 3 و 4) التي تبين لنا الاختلاف بين أقطار مناطق التثبيط و بين سلالة الاختبار.

وتتلخص نتائج المتحصل عليها بعد اختبار الزيت العطري في الجدول رقم 2,3 و 4. القيم هي متوسط ثلاثة القياسات أو تكرارات.

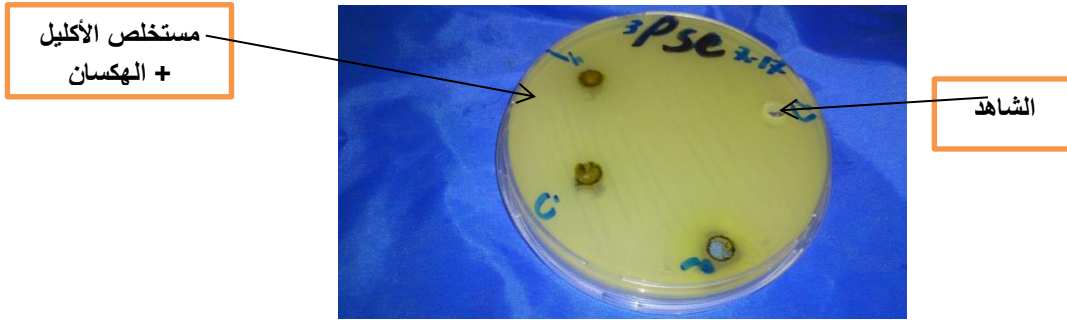
الجدول رقم 2 :يبين القطر (ملم) مناطق تثبيط لنبات الإكليل

السلالات المختبرة	قطر منطقة التثبيط (ملم)	الحساسية الي زيت نبات الإكليل
Proteus	9±1.1	+
E. coli	7±1.1	+
Shigella	12± 0.4	-
Pseudomonas	9.6±0.2	-

(+) حساسة (-) مقاومة



شكل (2) يوضح تأثير مستخلص الأكليل على الأربعة (4) البكتيريا المختبرة
قطر منطقة التثبيط (ملم)



شكل (3) يوضح تأثير مستخلص الأكليل على البكتيريا Pseudomonas
جدول 2: يبين قطر منطقة التثبيط لزيت نبات المرمية

السلالات المختبرة	قطر منطقة التثبيط (ملم)	الحساسية الي زيت نبات المرمية
Proteus	11.3 ±10	+
E. coli	13±1.3	+
Shigella	9.3± 0.2	-
Pseudomonas	10±0.2	-

(+) حساسة (-) مقاومة

جدول 4 : يبين قطر منطقة التثبيط لزيت نبات النعناع

السلاطات المختبرة	قطر منطقة التثبيط (مم)	الحساسية الي زيت نبات النعناع
Proteus	13.3± 02	+
E. coli	11.6±0.3	+
Shigella	7.3± 0.1	-
Pseudomonas	10.3 ±10	-

(+) حساسة (-) مقاومة

2.4- المناقشة

تبين لنا في الجداول 2 و 3 و 4 تأثير الزيوت النباتية الطبية الثلاثة على الأربعة سلالات البكتيريا المختبرة، ووفقا للشكل رقم 2 نرى بسهولة أن الزيت العطري للإكليل الجبل أظهرت النشاط منطقة تثبيط بقطر تجاوزت 10 ملم. لوحظ أن مختلف السلالات البكتيرية المدروسة تتفاعل بشكل مختلف مع الزيوت الأساسية المختبرة، حتى لو كانت نفس السلالة مثل *Proteus* (9، 11 و 13ملم).

نتيجة حساسية البكتيريا *Escherichia coli* اعطت اختلاف كبير اتجاه الزيوت العطرية المختبرة تق بقطر 7، 11 و 13ملم نتيجة تغرب لعمل *HADDOUCHI et al.* (2008) التي يبلغ من 8 الي 9مم و وجدت أن هذا الزيت تطابق مع نتيجة اختبار MOHAMMEDI (2006) وجد إن الزيوت المختبرة اعطت متوسطة ادناء على البكتيريا *Klebseilla* (7.3 ملم) ولكن توجد في دراسات سابقة على نفس البكتيريا نتائج تساوي 33 ملم و 88 ملم.

من هذه المقارنة يمكننا القول أن الزيت الطائر لنباتات المختبرة لها نشاط مضاد محدود لسلالات البكتيريا المختبرة ، والقل أن النشاط المضاد للبكتيريا يعتمد على نوعية الزيت العطري من جانب و على السلالة البكتيرية نفسها من جانب آخر. العديد من الدراسات عن اختبار النشاط المثبط للزيت العطري تؤكد هذه النتيجة كما اكدها *KALEMBA and KUNICKA* (2003) في اختباراتهم السابقة، جدوا أن حساسية الكائنات الحية الدقيقة للزيوت الطيارة تعتمد على الخصائص الاساسية للزيت و الكائنات الحية الدقيقة نفسها.

ومن المعروف أن البكتيريا ايجابية الجرام أكثر الحساسية وهذا حسب دراسات واختبارات *CELIKEL et KAVAS* (2008)، التي تؤكد أن عمل نشاط الزيوت الطيارة له تأثير بسيط على نمو البكتيريا سالبة الجرام مقارنة للبكتيريا ايجابية الجرام وهذا يرجع الي تركيبة بعض الزيوت الأساسية حسب تكوين تركيباتها و ايضا (*Pool* 2001) اكدا هذا الاختلاف.

من هاتين النقطتين يمكن للمقارنة مع سلالة *Enterococcus feacalis* موجبة الجرام (10.2 ملم) مع سلالات أخرى سلبية الغرام *Escherichia coli* (7 ملم) ، *Proteus* (9 ملم) *Shigella* (7.3 ملم).

وفقا للدراسات التي قام بها *BURT.* (2004) ، في مقاومة البكتيريا سالبة الجرام المرتبطة بتركيب المعقد للقلاف الخلوي لهذه الكائنات الدقيقة التي تحتوي على غشاء مزدوج ،عكس بساطة هيكل غشاء بكتيريا ايجابية الغرام

وفقا لدراسة (OUSSALAH *et al.*, 2006) ، النشاط البيولوجي للزيت الأساسي يتعلق بتركيبته الكيميائية، للمجموعات الفاعلة من المركبات الرئيسية (الكحول، الفينولات، والألدهيدات) من جانب الاول، وأثار التآزر (synergic) بين خصائص مكونات المضادة للجراثيم و الجزء المتعلقة بالانجذاب مما يؤدي إلى تراكم في الجدران البكتيرية، والتي يسبب عملية نفاذية لغشاء الخلية، وتم تدهور الجدار بالكامل (HELANDER *et al.*, 1998) وبعد ذلك الضرر للغشاء السيتوبلازمي، والضرر للبروتينات الغشائية بتسرب محتواها الخلوي (HELLAL, 2011) وهذا تم عليه من (Derwich *et al.*, 2009) و (Sivropoulou *et al.*, 1997) في ال العديد من دراساتهم.

الرئيسية تتكون من 178- سينول كان معروفا أن يكون النشاط البكتيري ضد سلالات بكتيرية (*E. coli*، *Pseudomonas*،

ليست هناك دراسة في القسم قريبة منها ومقارنتها بها. والفرق بينهما.

3.4- الخلاصة

استنتاج

وهناك عدد كبير من النباتات العطرية تحتوي على مركبات كيميائية لها خصائص مضادة للميكروبات. وقد ركزت العديد من الدراسات البحثية على الزيوت الطيارة المستخلصة من هذه الأعشاب.

استخدام الصيغ للحصول على زيوت طيارة من النباتات العطرية والطبية يمكن أن يكون لها مزايا عديدة أكثر من المنتجات الصناعية الحالية.

استخراج الزيوت الطيارة من الإكليل (*Rosmarinus officinalis L.*)، المرامية (*Salvia officinalis L.*) و لنعناع ا (*Mentha piperita L.*) من قبل العديد من الطرق. ولكن في هذا العمل ينصح أسلوب واحد: التقطير بالبخار.

استعمال طريقة الحفرمكنت من تسليط الضوء على الزيوت الطيارة المضادة للبكتيريا لهذه الثلاثة النباتات اتجه أربعة البكتيريا المراضية و التي لها اهمية طبية كبيرة في العديد من المستشفيات مع مناطق تثبيط تتراوح بين 7.0 و 13.30 ملم

نقط النشاط المضاد للبكتيريا أساسيا من هذه النباتات الطبية الثلاثة، تقييمها من قبل طريقة نشرها، قد كشفت عن نشاط كبير على نمو البكتيريا المختبرة مع مناطق تثبيط 7-12ملم لنبات المرسمية، نبات الإكليل 9.3-13ملم و النعناع 7.3-13.3ملم.

طريقة الاتصال المباشر مكنت أيضا من تسليط الضوء على فعالية الزيوت المضادة للبكتيريا الناتجة من هذه النباتات اتجاه السلالة البكتيرية الممرضة للغاية و التي لها نوع من المقاومة للمضادات الحيوية وهذا مؤشر جيد لاستخدامها في المستقبل.

النتائج المتحصل عليها تشير الى ان الزيوت العطرية التي تم الحصول عليها من هذه النباتات الطبية لديه نشاط مضاد جيد للجراثيم ومثيرة للاهتمام و أيضا تملك نشاط كبير ضد البكتيريا إيجابية الغرام و بكتيريا سلبية الغرام.

النشاط المضاد للميكروبات من هذه الزيوت الطيارة يرجع إلى طبيعة تركيباتها الكيميائي، على سبيل المثال مركب السينول (cineole) باعتباره مكون اساسي لهذه الزيوت الطيارة.

ويبدو أن هذه النباتات يمكن أن تقوية قيمتها وميزاتها الخاصة في مكافحة العديد من الأنواع الميكروبية المسؤولة و المسببة العديد من الأمراض المختلفة. ويمكن تفسير

فعاليتها في المختبر ترجع الي اكتساب هذه النباتات العديد من المركبات العطرية المتنوعة .

هذه الدراسة تمكن مرة أخرى من تطوير و استغلال الزيوت الطيارة في المجالات الصناعات الدوائية ومستحضرات التجميل. وفي الوقت نفسه، فإنه تؤكد على ان يمكن استخدامها كمادة حافظة في مجال الصناعات الغذائية.

كل هذه النتائج التي تم الحصول عليها تحت ظروف المختبر ليست سوى إلا الخطوة الأولى في البحث عن مصدر للمواد الطبيعية التي لها نشاط بيولوجي النشط للجراثيم.

التوصيات:-

1- توفير الأدوات المعملية والمواد الكيميائية والأدوات البحثية لجميع الطلبة.

2- توفير مولدات للمحافظة على العينات أثناء انقطاع الكهرباء.

3- توفير جهاز تقطير في المعمل.

4- هذه النتائج أولية يمكن أن تستكمل عليها دراسات أخرى أكثر تفصيلاً: مثل الإختبارات المضادة للأكسدة و تحسين الأداء تحديد الحد الأدنى للتركيز المثبطة للسلاطات البكتيرية و طريقة التطبيق وإختبار سلاطات ميكروبية أخرىإلخ.

المصادر العربية

الراوي، خاشع محمود وعبد العزيز خلف الله (1980). تصميم وتحليل التجارب الزراعية. دار الكتب للطباعة

والنشر 488:ص.

الزبيدي، إبيب احمد كاظم (2005).الفعالية التثبيطية لمستخلصات قلف نبات القرفة (الدارسين (ضد بعض

الإحياء الدقيقة لاستخدامها في حفظ اللحم المثلوم .رسالة ماجستير .معهد الهندسة الوراثية والتقنيات

الإحيائية للدراسات العليا، جامعة بغداد، العراق.

السيد، محمد درويش (2004) .العلاج بالأعشاب الطبية، موسوعة علماء المسلمين المنظمة، علوم بيئة،

تقنية.جمهورية مصر العربية.

الصالح، ضحى سعد (1990) .علم الأحياء المجهرية .لجنة من تدريسيي قسم علوم الحياة.دار الحكمة .جامعة

بغداد .العراق.

العكيلي، عدنان خيون (2002) .دراسة تأثير حامض ألكليك وبعض المستخلصات النباتية في نمو بكتريا إصابات

الشماع، علي عبد الحسين . (1989) العقاقير وكيمياء النباتات الطبية . مطبعة دار الكتب للطباعة،

الموصل 400 : صفحة

الزبيدي، إبيب احمد كاظم (2005) . الفعالية التثبيطية لمستخلصات قلف نبات القرفة (الدارسين (ضد بعض

الإحياء الدقيقة لاستخدامها في حفظ اللحم المثلوم .رسالة ماجستير .معهد الهندسة الوراثية والتقنيات

الإحيائية للدراسات العليا، جامعة بغداد، العراق.

السيد, محمد درويش (2004) .العلاج بالأعشاب الطبية ,موسوعة علماء المسلمين
المنظمة ,علوم بيئة ,

تقنية.جمهورية مصر العربية.

الصالح ,ضحى سعد (1990) . علم الأحياء المجهرية .لجنة من تدريسيي قسم علوم
الحياة.دار الحكمة .جامعة

بغداد .العراق.

العكيلي ,عدنان خيون (2002) .دراسة تأثير حامض ألكليك وبعض المستخلصات
النباتية في نمو بكتريا إصابات

الحروق .رسالة ماجستير ,كلية العلوم .الجامعة المستنصرية.

Refferences

Bahorun, T. (1997) Substances naturelles actives : la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. *Food and agricultural resarch council, Réduit, Mauritus*. 83-94.

Bérubé-Gagnon, J. (2006) Isolation et identification de composés antibiotiques des écorces de *Picea mariana*. Mémoire comme exigence partielle de la maîtrise en ressources renouvelables. Quebec.

Ferrari, J. (2002) Contribution à la connaissance du métabolisme secondaire des Thymelaeaceae et investigation phytochimique de l'une d'elles: *Gnidia involucrata* Steud. ex A. Rich. Thèse de doctorat. Lausanne.

Lhuillier, A. (2007) Contribution a l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches : *Agauria salicifolia* Hook.f ex Oliver, *Agauria polyphylla* Baker (*Ericaceae*), *Tambourissa trichophylla* Baker (*Monimiaceae*) et *Embelia concinna* Baker(*Myrsinaceae*). Thèse de doctorat. Toulouse.

Marfak, A. (2003) Radiolyse gamma des flavonoïdes. Etude de Leur reactivite avec les radicaux issus des Alcools: formation de depsides. Thèse de doctorat. Limoges.

BURT S. A. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potentiel applications in foods-a rewiew International. *J. Food Microbiol*, 94 :pp223-253.

CELIKEL N., and KAVAS G. 2008. Antimicrobial pooperies of some essential oils against some pathogenic microorganisms. *Czech Journal of Food science* , pp26-174-181.

DERWICH E., BENZIANE Z. ET BOUKIR A., 2009. Chemical composition and antibacterial activity of leaves essential oil of *Laurus nobilis* from Morocco. *Aust. J. Basic et Appl. Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, pp: 3818-3824.

HADDOUCHI F., BENMANSOUR A., 2008. Huiles essentielles, utilisations et activités biologiques Application à deux plantes aromatique. Université Tlemcen.les technologies de laboraoire-No8 janvier-forier 88.

HELANDER, I. M., H. L. ALAKOMI, ET AL. 1998. "Characterisation of the action of selected essential oil components on Gram- bacteria" *Journal of Agriculture Food chemistry* , pp3590-3595.

HELLAL Z., 2011. Des propriétés antibactériennes et antioxydants de certaines huiles essentielles extraites des Citrus Application sur la sardine (*Sardina Pilchardus*). Magistère, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou. pp1-8-45-78.

KALEMBA ET KUNHCK., 2003. Antibacterial and antifungal proerties of essential oil.current *Medicinal chemistry*, 10: pp813-892.

MOHAMMEDI Z., 2006. Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoide de quelques plantes de la région de Tlemcen, magistère Université Abou Bakar Bel Kaid Tlemcen, p105.

POOL E, K. 2001. Multidrug resistance in Gram-negative bacteria-currend opinion in *Microbiology*, 4:pp500-508.

SIVROPOULOU, A., C. NIKOLAOU, E. PAPANIKOLAOU, S. KOKKINI, T. LANARAS and M, ARSENAKIS, 1997. Antimicrobial, Cytotoxic and Antiviral Activities of *Salvia fruticosa* Essential Oil. *J. Agric. Food Chem*, 45: pp3197-201.