# التاثير البايولوجي لمستخلصات نبات الزعتر *Thymus vulgaris* ومكوناتها الفعالة لبعض انواع الجراثيم والتأزر بين المكونات الفعالة والمضادات الحيوية

**خضر داؤد سليمان**

*قسم علوم الحياة، كلية التربية، جامعة الموصل، الموصل، جمهورية العراق*

**الكلمات المفتاحية:** مستخلصات نبات الزعتر، الثايمول

**الملخص:**

تضمنت الدراسة اختبار الفعالية المضادة لمستخلصات نبات الزعتر *Thymus vulgaris* ومكوناتها الفعالة وزيت الزعتر لستة انواع من الجراثيم *Staphylococcus aureus* ، *Streptococcus pyogenes* ، *Bacillus subtilis* ، *Shigella flexneri* ، *Proteus mirabilis* ، *Pseudomonas aeruginosa* . اظهر المستخلص الكحولي تاثيرا تثبيطيا جيدا ضد الجراثيم قيد الدراسة عدا جرثومة *P. aeruginosa* . اما المستخلص الاسيتوني فكان تاثيره يشابه تاثير المستخلص الكحولي، بينما الزيت الاساسي المفصول من نبات الزعتر فقد اظهر تاثيرا تثبيطيا متميزا في جميع انواع الجراثيم قيد الدراسة، فقد اظهر الزيت الاساسي اعلى تاثير في التركيز (٠,١) مكغم$^{٣}$/سم$^{٣}$ (٣١) ملم في الجرثومة *S. pyogenes* .

اما المادة الفعالة المفصولة من زيت الزعتر الـ (Thymol) فقد اظهرت فعالية في جميع انواع الجراثيم المستخدمة، وقد كان لها فعالية تثبيطية عالية جدا في نوعين من الجراثيم *S. pyogenes* و *S. aureus* حيث كان قطر دائرة التثبيط في الجرثومة *S. pyogenes* عند التركيز ٢٠٠ ملغم/سم$^{٣}$ (٣٤) ملم، بينما في الجرثومة *P. aeruginosa* في نفس التركيز (١٩) ملم. تم اختبار حساسية الجراثيم للمضادات الحيوية بوجود المادة الفعالة والتي كانت مقاومة قبل استعمال المكونات الفعالة المفصولة من زيت الزعتر.

استخدمت اربعة انواع من المضادات الحيوية (Ampicillin ، Cephalosporin ، Trimethoprim ، Chloramphenicol) فقد تبين ان الجرثومة *S. aureus* اصبحت حساسة للمضادات الحيوية Ampicillin ، Cephalosporin ، Chloramphenicol ، Trimethoprim بوجود المادة الفعالة (Thymol) . اما الجرثومة *P. aeruginosa* فقد بقيت مقاومة للمضادات الحيوية Ampicillin ، Cephalosporin ، Chloramphenicol بوجود المادة الفعالة (Thymol) ، بينما اصبحت حساسة للمضاد الحيوي Trimethoprim بوجود المادة الفعالة.

**المقدمة:**

لقد شاع استخدام النباتات الطبية منذ القدم لعلاج مختلف الامراض حيث استخدمت لعلاج العديد من الحالات ومنها امراض البرد والسعال (cough) والمغص (colic) وكمواد مضادة للحمى (Antifever) والتهاب القصبات وذات الرئة (٦). فالجراثيم كانت ولاتزال من اهم اسباب الامراض البشرية والحيوانية والنباتية، وان العديد من هذه الامراض قد عولجت باستخدام الاعشاب الطبية منذ ولادة البشرية (٢٨).

في اواخر القرن العشرين اتجهت انظار الدول المتقدمة والجهات العلمية بملاحظة تناقص مستمر في فعالية المضادات الحيوية وزيادة قدرة الجراثيم على تطوير وسائل الدفاع عن نفسها ومقاومة عمل المضادات الحيوية (٢٢،١٧).

هناك العديد من المركبات الكيمياوية المضادة للاحياء المجهرية ولكن الكثير من هذه المركبات لها اثار جانبية فضلا عن استخدامها المستمر لها حيث يفقد فعاليتها ويكسب الجراثيم المقاومة لعمل هذه المركبات، ولهذا اولت العديد من الدول الى الاهتمام بالنباتات الطبية واستخدامها كبديل عن الادوية (٢٦).

وفي السنوات الاخيرة اهتم الباحثون في التحري عن النباتات التي لها فعالية مضادة للجراثيم في العديد من الدراسات نظرا لاهمية استخدامها في الطب الشعبي في علاج العديد من الامراض (٢٩).

وبما ان المملكة النباتية غنية بمنتجاتها الثانوية والتي تمتلك فعالية مضادة للاحياء المجهرية مثل التانينات (Tannins) والقلويدات (Alkaloids) وغيرها من المركبات مما دفع الباحثين الى عزل هذه المركبات الحيوية واصبحت هذه المركبات تدخل في صناعة الادوية والتي توجد في اجزاء مختلفة من النبات كالسيقان والجذور والاوراق والازهار والثمار (٩).

ونظرا لكون ارض العراق الخصبة غنية بانتاج العديد من النباتات الطبية والاعشاب المتنوعة لذا ينبغي على الباحثين العراقيين ان يبذلوا جهودهم من اجل اكتشاف مثل هذه الثروة الطبيعية، وقد اجرينا الدراسة الحالية على الاجزاء الهوائية لنبات الزعتر *Thymus vulgaris* وزيت الزعتر شائع الاستخدام في الطب الشعبي لتسليط الضوء على فعالية مستخلصات هذا النبات والمكونات الفعالة المفصولة منها وكذلك تأزر المكونات الفعالة لهذا النبات مع بعض المضادات الحيوية ودراسة تاثيرها التثبيطي في الانواع الجرثومية المنتخبة.

**المواد وطرائق العمل:**

**انواع الجراثيم المستخدمة في الدراسة:**

*S. aureus*
*S. pyogenes*
*B. subtilis*
*Sh. flexneri*
*P. mirabilis*
*P. aeruginos*a

تم الحصول على هذه الانواع من الجراثيم من فرع الاحياء المجهرية/قسم علوم الحياة/ كلية العلوم/جامعة الموصل.

وتم الحصول على نبات الزعتر من الاسواق المحلية لمدينة الموصل.

**تحضير المستخلص الكحولي لنبات الزعتر:**

حضر المستخلص الكحولي لنبات الزعتر باتباع طريقة الباحث Grand واخرون (١٩٨٨) المحورة عن الطريقة الاساسية للباحث (٢٨) في تحضير المستخلصات الكحولية وذلك عن طريق اذابة (٢٠) غم من نبات الزعتر في (٢٠٠) سم$^{٣}$ من الكحول الاثيلي بتركيز (٩٥%) داخل حمام ثلجي، وبعد رج المزيج جيدا وتركه في الثلاجة لمدة (٢٤) ساعة رشح خلال عدة طبقات من الشاش، ثم مرر خلال قمع بخنر، بعدها وضع في جهاز المبخر الدوار (Rotary vacuum evaporator) بدرجة حرارة لا تزيد عن (٤٠) °م وبعد تبخير جميع الايثانول الموجود في المزيج، لوحظ تكون طبقة ثخينة من المستخلص الذي جفف بالتجفيد. حفظت النماذج في قناني زجاجية ذات اغطية محكمة لحين استخدامها.

**استخلاص المكونات الفعالة الاخرى من نبات الزعتر:**

اتبعت الطريقة التي استخدمها الباحث (٥)، حيث تم الاستخلاص باستعمال جهاز الاستخلاص المستمر Soxhlet حيث وضع (١٠٠) غم من مسحوق نبات الزعتر في الـ Thumble وباستعمال عدة مذيبات Petroleum ether و Benzene و Chloroform و Acetone ، اذ تعتمد هذه الطريقة في مضمونها على طبيعة المكونات الفعالة للنبات، وقطبية المذيب المستعمل في عملية الفصل، لذلك فقد تم اختيار اربعة مذيبات متفاوتة القطبية، اجريت عملية الفصل بدرجات حرارية مختلفة من ٤٠-٨٠ °م حسب درجات غليان كل مذيب على ان لا تزيد من ٨٠ °م وبمعدل (٨) ساعات لكل مذيب الى ان يصبح المذيب المستخدم عديم اللون بعدها تم تركيز كل مستخلص بواسطة جهاز التبخير تحت ضغط مخلخل والتي استخدمت لاحقا لمعرفة فاعليتها التثبيطية ضد الجراثيم.

**تحضير الزيت من الزعتر:**

تم تحضير زيت الزعتر حسب طريقة (El-Kady et al., 1993) وذلك بمزج (١٠٠) غم من الزعتر مع (١,٥) لتر من الماء المقطر في دورق سعته (٢) لتر، حيث تم تحضير الزيت بطريقة التقطير المائي. وبعد جمع الزيت تم تجفيفه باستخدام كبريتات الصوديوم اللامائية.

**فصل الثايمول من زيت الزعتر:**

اتبعت طريقة Khodair وجماعته (١٩٩٣) حيث اذيب (٢) سم$^{٣}$ من الزيت في (١٠) سم$^{٣}$ من الكلوروفورم بعدها وضع المزيج في قمع الفصل واضيف له هيدروكسيد البوتاسيوم (KOH) وبتركيز (٥%) (٥ سم$^{٣}$ × ٣) مع الرج باليد جيدا ثم اضيف له حامض الهيدروكلوريك المخفف بعدها اضيف الكلوروفورم (١٠ سم$^{٣}$ × ٣) وترك لفترة ثم عزلت الطبقة العضوية (طبقة الكلوروفورم التي جمعت وجففت باستخدام جهاز المبخر الدوار)، اعيدت بلورة الثايمول باستخدام الميثانول.

**الكشف عن الثايمول باستخدام تقنية كروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) :**

استخدمت الالواح الزجاجية المغطاة بمادة هلام السليكا (Silica gel) الصفائح الرقيقة المجهزة من شركة Merck وبسمك (٠,٢٥) ملم بابعاد (٢٠ ×٢٠) سم ونشطت الصفائح قبل استعمالها وذلك بتسخينها لمدة ساعة واحدة في فرن بدرجة حرارة (١٠٠) °م ثم تركت لتبرد الى درجة حرارة المختبر ثم حملت العينة على احد طرفي اللوح بهيئة بقعة على امتداد خط البداية بواسطة الانبوب الشعري (Capillary tube) ووضع اللوح في الحاوية (Tank) بشكل عمودي وحسب الطريقة التصاعدية وملامسة لنظام المحلول المكون من (Toluene-ethyl acetate) بنسبة (٩٣:٧ V/V) (٣٠). ويجري القياس الى حين اكتمال صعود محلول الفصل الى مسافة لاتقل عن ١٥ سم وبعدها رفع اللوح من الحاوية وجفف لمدة خمس دقائق في درجة حرارة الغرفة ليجف بعدها تم اظهار البقع بواسطة تعريضها للكاشف Vanilin-$H_2SO_4$ (٣٠).

**التشخيص الوصفي للثايمول بقياس سرعة الجريان Rate of flow (Rf) :**

تم قياس سرعة جريان المادة Rf على اللوح (TLC) بحيث ان المسافة التي قطعتها العينة مقسومة على المسافة التي قطعها محلول الفصل تساوي سرعة جريان المادة وكما في المعادلة الاتية(١٣):

$$\text{معدل سرعة جريان المادة (Rf)} = \frac{\text{المسافة التي تقطعها العينة من نقطة البداية}}{\text{المسافة التي يقطعها المذيب من نقطة البداية}}$$

**الكشف عن المركبات الفعالة المفصولة من نبات الزعتر:**

تم استخدام تقنية كروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة (Thin layer chromatography) (TLC) للكشف عن مركب الثايمول المفصول من زيت الزعتر. اذ تم التعرف على مركب الثايمول باستعمال الكاشف Vanilin-sulfuric acid فظهرت بقعة بلون احمر بنفسجي دلالة على وجود المركبات الفينولية وكانت قيمة الـ Rf لها تساوي (٠,٧٤) وهي مماثلة لبقعة النموذج القياسية (Thymol) كما موضح في الصورة (١).

**طريقة اختبار الحساسية لمستخلصات نبات الزعتر والمكونات الفعالة بطريقة الانتشار بالاقراص:**

اتبعت طريقة Bauer واخرون (١٩٦٦) في اختبار الحساسية وذلك بنقل (٣-٥) مستعمرات نقية للجراثيم الى وسط المرق المغذي وتحضينها بدرجة حرارة (٣٧) °م لمدة (١٨-٢٤) ساعة، ثم خفف العالق الجرثومي بعد ذلك بالمحلول الملحي الفسيولوجي Normal saline بالمقارنة مع انبوبة السيطرة لمحلول ماكفرلاند الذي يعادل ١٠$^{٨}$ خلية/سم$^{٣}$ ثم ينقل (٠,١) سم$^{٣}$ من العالق الجرثومي المخفف الى وسط الاكار المغذي ونشر على سطح الوسط بشكل متجانس باستخدام مسحة قطنية معقمة وتحضن لمدة (٣٠) دقيقة وبدرجة حرارة (٣٧) °م لغرض التشرب. ولغرض دراسة تاثير المستخلصات النباتية والمكونات الفعالة في نمو الجراثيم فقد حضرت اقراص من ورق الترشيح (Whatman No.1) بقطر (٦) ملم المعقمة والمشبعة بالتراكيز (3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200) ملغم/سم$^{٣}$ من المستخلصات والمكونات الفعالة الى قنينة حاوية على (١٠) اقراص معقمة (١٧)، ثم ثبتت الاقراص المشبعة بالتراكيز المختلفة بواسطة ملقط معقم وحضنت بدرجة (٣٧) °م مدة (١٤-١٦) ساعة. استخدمت طريقة (١٨) لبيان الحساسية للمستخلصات المستخدمة التي تعتمد على حزم التثبيط واستخدمت المضادات الحيوية من نوع (Tetracycline و Gentamycin و Ciprofloxacin) والتي اظهرت الانواع الجرثومية حساسيتها لها كعينة سيطرة موجبة للجراثيم وذلك بالاعتماد على ما يستخدم في مختبر الصحة العامة والمعتمدة على فحوصات منظمة الصحة العالمية (٢٧).

**تحديد التركيز الادنى المثبط:**

تم تحديد التركيز الادنى المثبط (MIC) للمستخلصات النباتية للزعتر والاجزاء المفصولة باستخدام طريقة العكارة، حيث حضرت التخافيف التالية من كل مستخلص (3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200) ملغم/سم$^3$ و (١٠:١، ١٥:١، ٢٠:١، ٢٥:١، ٣٠:١، ٣٥:١، ٤٠:١) سم$^3$/سم$^3$ بالنسبة للزيت الاساسي حيث اضيف (٠,١) سم$^3$ من كل تركيز الى انبوبة حاوية على (٩,٨) سم$^3$ من المرق المغذي المعقم ولقح بـ (٠,١) سم$^3$ من العالق الجرثومي بتركيز ($10^8$) خلية/سم$^3$ وحضنت الانابيب بدرجة حرارة (٣٧) °م ولمدة (١٤-١٦) ساعة ثم قيست العكارة باستخدام جهاز المطياف الضوئي وعلى طول موجي (٥٩٥) نانوميتر وبالمقارنة مع عينة السيطرة المكونة من (٩,٨) سم$^3$ من المرق المغذي و (٠,١) سم$^3$ من المذيب المستخدم لاذابة المستخلص او المكونات الفعالة و (٠,١) سم$^3$ من العالق الجرثومي بتركيز ($10^8$) خلية/سم$^3$ (١٤).

**اختبار الحساسية الدوائية للمضادات الحيوية ضد انواع الجراثيم المنتخبة الموجبة والسالبة لصبغة كرام:**

اجري اختبار الحساسية لـ (١٠) انواع من المضادات الحيوية والمجهزة من معمل ادوية سامراء وشركة (Oxoid) ، اذ اتبعت طريقة Bauer واخرون (١٩٦٦) وذلك بنقل المستعمرات النقية للجراثيم الى وسط المرق المغذي وحضنت بدرجة حرارة (٣٧) °م لمدة (١٤-١٨) ساعة، ثم خفف المعلق الجرثومي بالمحلول الملحي الفسيولوجي المعقم وبالمقارنة مع انبوبة السيطرة لمحلول القياسية الذي يعادل ($10^8$) خلية/سم$^3$، ثم نشر (٠,١) سم$^3$ من العالق الجرثومي المخفف على اطباق الاكار المغذي باستخدام مسحة قطنية معقمة، ثم تركت الاطباق في درجة حرارة الغرفة لغرض التشرب، وثبتت بعد ذلك الاقراص المشبعة بالمضادات الحيوية تبعا لما جاء في توصيات منظمة الصحة العالمية وكما موضح في الجدول (١)، ثم حضنت الاطباق في درجة حرارة (٣٧) °م ولمدة (١٨-٢٤) ساعة وقيست بعد ذلك منطقة التثبيط (Inhibition zone) وسجلت النتائج (٢٧).

**جدول (١):** اختبار حساسية انواع الجراثيم للمضادات الحيوية (قطر دائرة التثبيط مقاسا بالملم)

| المضادات الحيوية | المختصر | التركيز (µg/disc) | *S. aureus* | *S. pyogenes* | *B. subtilis* | *Sh. flexneri* | *P. mirabilis* | *P. aeruginosa* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ampicillin | Ap | ١٠ | R | 21 | R | R | R | R |
| Cephalosporin | Cp | ٥ | R | 20 | R | R | R | R |
| Gentamycin | GN | ١٠ | 22 | 20 | R | 22 | 17 | 10 |
| Chloramphenicol | Cm | ٣٠ | R | R | R | 17 | R | R |
| Streptomycin | Sm | ١٠ | 18 | 17 | 12 | 17 | 51 | 14 |
| Carbincillin | Car | ١٠٠ | 17 | 18 | R | 16 | 11 | 9 |
| Erythromycin | Er | ١٥ | 14 | 15 | R | R | R | R |
| Trimethoprim | Tm | ٥ | R | R | R | 20 | 13 | R |
| Ciprofloxacin | CIP | ٥ | 31 | 35 | 24 | 26 | 20 | 15 |
| Tetracycline | Te | ٣٠ | 16 | 18 | R | 15 | R | R |

**اختبار حساسية الجراثيم للمضادات الحيوية بوجود المكونات الفعالة المفصولة من نبات الزعتر:**

اعتمدت طريقة الباحثين Muroi و Kubo (١٩٩٦) في قياس حساسية الجراثيم للمضادات الحيوية بوجود المكونات الفعالة، اذ تم اضافة اربعة انواع من المضادات الحيوية التي قاومتها الجراثيم كلا على حدى (Chloramphenicol، Ampicillin ، Trimethoprim، Cephalosporin) وبالتراكيز النهائية (0.025ml/25ml ، 0.050ml/25ml ، 0.025ml/50ml ، 0.075ml/20ml) على التوالي والمعتمدة من قبل الباحث Ahmed (١٩٨٩) الى وسط المرق المغذي الحاوي على (١٠٠) مايكروليتر وبتركيز (٢٠٠) ملغم/سم$^3$ من لمكونات الفعالة ولقحت الانابيب بالعالق الجرثومي بتركيز ($10^8$) خلية/سم$^3$ وحضنت بدرجة حرارة (٣٧) °م ولمدة (٢٤-٤٨) ساعة، وقيست كثافة النمو للجراثيم النامية بجهاز المطياف الضوئي وبالمقارنة مع عينة السيطرة المكونة من وسط المرق المغذي مضافا اليه المضاد الحيوي والمذيب المستخدم لاذابة المكونات الفعالة والعالق الجرثومي (٢٠).

## النتائج والمناقشة:

لقد اظهرت اختبارات تاثير المستخلصات لنبات الزعتر ومكوناتها الفعالة وزيت الزعتر المستخدمة ضد الجراثيم المنتخبة تاثيرا متباينا اعتمادا على نوع المستخلص والمكونات الفعالة المفصولة والتدرج بالتراكيز المستخدمة. يوضح الجدول (٢) تاثير المستخلصات لنبات الزعتر ومكوناتها الفعالة المفصولة من زيت الزعتر وكذلك زيت الزعتر في الجراثيم قيد الدراسة ومقارنتها بالمضادات الحيوية القياسية ان المستخلص المائي والايثر البترولي والبنزين والكلوروفورم لنبات الزعتر لم تظهر تاثيرا ضد انواع الجراثيم قيد الدراسة. اما المستخلص الكحولي فقد اظهر تاثيرا تثبيطيا جيدا ضد الجراثيم المنتخبة عدا جرثومة *P. aeruginosa* مقارنة بالمضادين الحيويين Tetracycline و Gentamycin وتاثيرا ضعيفا مقارنة بالمضاد الحيوي Ciprofloxacin كما في الجدول (٣)، وربما يعود هذا

الى المركبات الفعالة في نبات الزعتر قد تكون ذائبة في الكحول وهذا يتفق مع ما اشار اليه الباحث (٢١).

**جدول (٢):** الفعالية التثبيطية لمستخلصات نبات الزعتر في انواع الجراثيم المنتخبة مقارنة بالمضادات الحيوية القياسية (قطر دائرة التثبيط مقاسا بالملم)

| نوع المعاملة | *S. aureus* | *S. pyogenes* | *B. subtilis* | *Sh. flexneri* | *P. mirabilis* | *P. aeruginosa* |
|---|---|---|---|---|---|---|
| المستخلص المائي للزعتر | – | – | – | – | – | – |
| المستخلص الكحولي للزعتر | ١٨ | ٢١ | ١٣ | ٢٠ | ١٤ | – |
| مستخلص الايثر البترولي للزعتر | – | – | – | – | – | – |
| مستخلص البنزين للزعتر | – | – | – | – | – | – |
| مستخلص الكلوروفورم للزعتر | – | – | – | – | – | – |
| مستخلص الاسيتون للزعتر | ١٧ | ١٨ | ١٦ | ١٥ | ١٢ | – |
| زيت الزعتر | ٢٨ | ٣١ | ٢٥ | ٢٤ | ١٩ | ١٧ |
| الثايمول | ٣٠ | ٣٤ | ٢٦ | ٢٥ | ٢٢ | ١٩ |
| Tetracycline | ١٦ | ١٨ | – | ١٥ | – | – |
| Gentamycin | ٢٢ | ٢٠ | – | ٢٢ | ١٧ | ١٠ |
| Ciprofloxacin | ٣١ | ٣٥ | ٢٤ | ٢٦ | ٢٠ | ١٥ |

**جدول (٣):** تاثير المستخلص الكحولي لنبات الزعتر بتراكيز مختلفة في الانواع الجرثومية(قطر دائرة التثبيط مقاسا بالملم)

| تراكيز المستخلص النباتي (ملغم/سم$^٣$) | *S. aureus* | *S. pyogenes* | *B. subtilis* | *Sh. flexneri* | *P. mirabilis* | *P. aeruginosa* |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ٢٠٠ | ١٨ | ٢١ | ١٣ | ٢٠ | ١٤ | – |
| ١٠٠ | ١٤ | ١٥ | ٨ | ١٨ | ٩ | – |
| ٥٠ | ٩ | ١٢ | – | ١٥ | – | – |
| ٢٥ | – | ٨ | – | ١٠ | – | – |
| ١٢,٥ | – | – | – | – | – | – |
| ٦,٢٥ | – | – | – | – | – | – |
| ٣,١٢٥ | – | – | – | – | – | – |

لقد ابدى المستخلص الاسيتوني لنبات الزعتر فعالية تثبيطية جيدة ضد الجراثيم المنتخبة عدا جرثومة *P. aeruginosa* مقارنة بالمضادين الحيويين Tetracyline و Gentamycin وتاثيرا ضعيفا مقارنة بالمضاد الحيوي Ciprofloxacin كما في الجدول (٤). ولم يظهر المضاد الحيوي Tetracyclin تاثيرا في نمو الجراثيم *B. subtilis* و *Pr. mirabilis* بينما كان تاثير المستخلص الاسيتوني في تركيز (٢٠٠) ملغم/سم$^٣$ في الجرثومة *B. subtilis* (١٥) ملم وفي الجرثومة *Pr. mirabilis* في نفس التركيز (١٢) ملم. وربما يعود سبب ذلك الى المادة الفعالة المؤثرة في الجرثومة قد تكون ذائبة في الاسيتون اعلى مما هو عليه من بقية المذيبات.

**جدول (٤):** تاثير المستخلص الاسيتوني لنبات الزعتر بتراكيز مختلفة في الانواع الجرثومية (قطر دائرة التثبيط مقاسا بالملم)

| تراكيز المستخلص النباتي (ملغم/سم$^٣$) | *S. aureus* | *S. pyogenes* | *B. subtilis* | *Sh. flexneri* | *P. mirabilis* | *P. aeruginosa* |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ٢٠٠ | ١٧ | ١٨ | ١٦ | ١٥ | ١٢ | – |
| ١٠٠ | ١٤ | ١٦ | ١٣ | ١٣ | ٩ | – |
| ٥٠ | ١٠ | ١٤ | ٨ | ٩ | – | – |
| ٢٥ | ٨ | ٩ | – | – | – | – |
| ١٢,٥ | – | – | – | – | – | – |
| ٦,٢٥ | – | – | – | – | – | – |

اما فيما يخص الزيت الاساسي المفصول من نبات الزعتر فقد اظهر تاثيرا تثبيطيا متميزا نظرا للمستخلصات الاخرى الكحولي والاسيتوني في جميع انواع الجراثيم قيد الدراسة مقارنة بالمضادين الحيويين Gentamycin و Tetracyline ومتساويا تقريبا بالمضاد الحيوي Ciprofloxacin وكان تاثير الزيت الاساسي لنبات الزعتر في الجرثومة *P. aeruginosa* افضل من تاثير المضادين الحيويين Gentamycin و Ciprofloxacin القياسية كما في الجدول (٥). وهذه النتائج متطابقة مع ما توصل اليه الباحث (٢٤). وقد يرجع السبب الى احتواء الزيت على الثايمول وهذا ما تبين من خلال فصل الثايمول من زيت الزعتر في هذه الدراسة والذي اظهر فعالية تثبيطية عالية في انواع الجراثيم قيد الدراسة، حيث اشارت اليه العديد من الدراسات (١٠،٢٥)، فقد اظهر الزيت الاساسي اعلى تاثير تثبيطي ضد الجرثومة *S. pyogenes* حيث كان قطر دائرة التثبيط في التركيز (٠,١) سم$^٣$/سم$^٣$ (٣١) ملم وفي الجرثومة *P. aeruginosa* وفي نفس التركيز (١٧) ملم. وقد اشار الباحث (٢٤) الى ان للزيوت الاساسية المفصولة من النباتات ذات المحتوى الزيتي العالي له تاثير ضد الجراثيم المرضية الموجبة والسالبة لصبغة كرام.

**جدول (٥):** تاثير زيت الزعتر بتراكيز مختلفة في الانواع الجرثومية المنتخبة (قطر دائرة التثبيط مقاسا بالملم)

| التراكيز (سم$^٣$/سم$^٣$) | *S. aureus* | *S. pyogenes* | *B. subtilis* | *Sh. flexneri* | *P. mirabilis* | *P. aeruginosa* |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ٠,١ | ٢٨ | ٣١ | ٢٥ | ٢٤ | ١٩ | ١٧ |
| ٠,٠٦ | ٢٤ | ٢٥ | ٢١ | ٢٠ | ١٥ | ١٤ |
| ٠,٠٥ | ١٩ | ١٨ | ١٧ | ١٤ | ١١ | ٩ |
| ٠,٠٤ | ١٣ | ١٤ | ١٠ | ١٠ | ٨ | – |
| ٠,٠٣٣ | ٨ | ٩ | – | – | – | – |
| ٠,٠٢٨ | – | – | – | – | – | – |
| ٠,٠٢٥ | – | – | – | – | – | – |

اما بالنسبة للثايمول المفصول من زيت الزعتر فقد اظهر فعالية في جميع انواع الجراثيم قيد الدراسة وقد كان له فعالية تثبيطية عالية جدا في نوعين من الجراثيم *S. pyogenes* و *S. aureus* مقارنة مع عينات السيطرة Gentamycin و Tetracycline وتاثيرا معتدلا مقارنة مع المضاد

الحيوي Ciprofloxacin كما موضح في الجدول (٦) والصورة (١)، فقد اظهر فعالية تثبيطية عالية في الجرثومة *S. pyogenes* وكان قطر دائرة التثبيط عند التركيز (٢٠٠) ملغم/سم$^{٣}$ (٣٤) ملم كما في الصورة (٢)، بينما معدل قطر التثبيط في الجرثومة *P. aeruginosa* في نفس التركيز (١٩) ملم وفي الجرثومة *P. mirabilis* (٢٢) ملم وهذا اعلى من تاثير المضادات الحيوية القياسية المستخدمة في هذين الجرثومتين.

**جدول (٦):** تاثير الثايمول المفصول من زيت الزعتر بتراكيز مختلفة في الانواع الجرثومية (قطر دائرة التثبيط مقاسا بالملم)

| التراكيز (ملغم/سم$^{٣}$) | *S. aureus* | *S. pyogenes* | *B. subtilis* | *Sh. flexneri* | *P. mirabilis* | *P. aeruginosa* |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ٢٠٠ | ٣٠ | ٣٤ | ٢٦ | ٢٥ | ٢٢ | ١٩ |
| ١٠٠ | ٢٣ | ٢٧ | ١٨ | ٢٠ | ١٦ | ١٣ |
| ٥٠ | ٢٠ | ٢٢ | ١٤ | ١٤ | ١٠ | ٩ |
| ٢٥ | ١٥ | ١٥ | ١٠ | ١٣ | ٩ | – |
| ١٢,٥ | ١٣ | ١٢ | – | ١١ | – | – |
| ٦,٢٥ | ١١ | ١٠ | – | – | – | – |
| ٣,١٢٥ | – | – | – | – | – | – |
| ١,٥٦٣ | – | – | – | – | – | – |
| ٠,٧٨٢ | – | – | – | – | – | – |

**الصورة (١):** البقع الظاهرة للثايمول المفصول من زيت الزعتر وعينة النموذج القياسية بواسطة تقنية TLC

T = الثايمول المفصول من زيت الزعتر

S = عينة النموذج القياسية

**الصورة (٢):** تاثير الثايمول المفصول من زيت الزعتر بتراكيز مختلفة في الجرثومة*S. pyogenes* مقارنة مع المضاد الحيوي القياسي Gentamycin ١ (٢٠٠ ملغم/سم$^{٣}$)، ٢ (١٠٠ ملغم/سم$^{٣}$)، ٣ (٥٠ ملغم/سم$^{٣}$)، ٤ (٢٥ ملغم/سم$^{٣}$)، ٥ (١٢,٥ ملغم/سم$^{٣}$)، ٦ (٦,٢٥ ملغم/سم$^{٣}$).

اظهر الثايمول فعالية تثبيطية عالية في الجراثيم *Sh. flexner* و *P. mirabilis* و *P. aeruginosa* مقارنة بالمضادين الحيويين Gentamycine و Tetracyline وتاثيرا متساويا تقريبا مقارنة بالمضاد الحيوي Ciprofloxacin ، فقد كان تاثير الثايمول في الجرثومة *B. substilis* في التركيز (٢٠٠) ملغم/سم$^{٣}$ (٢٦) ملم بينما لم يظهر المضادين الحيويين Gentamycin و Tetracycline تاثيرا لنفس الجرثومة وبالتركيز المذكور.

ويتبين من خلال النتائج ان مادة الـ (Thymol) المفصولة من زيت الزعتر لها فعالية اعلى من المستخلص الكحولي والاسيتوني وزيت الزعتر في جميع انواع الجراثيم قيد الدراسة وان لكل من هذه المركبات الفعالة طبيعة تاثير مختلفة وهذا ما اشارت اليه العديد من الدراسات حيث اوضحت دراسة كل من Marino وجماعته (٢٠٠١) ودراسة Juven (١٩٩٤) بان المركبات الفينولية كالثايمول لها القابلية على اذابة الغشاء الداخلي للجرثومة ثم النفاذ الى داخل الخلية والتاثير على مكوناتها الاساسية، وقد يرجع السبب الى ان الفعالية المضادة لمادة الـ (Thymol) تقل عند تواجدها مع مركبات فعالة اخرى ومن ثم يؤدي ذلك الى تقليل الفعالية التثبيطية لهذه المادة وهذا ما يسمى Antagonism .

حدد التركيز المثبط الادنى (MIC) لمستخلصات نبات الزعتر ومكوناته الفعالة التي اظهرت تاثيرا متميزا ضد الجراثيم قيد الدراسة وكما موضح في الجدول (٧)، اذ تبين ان التركيز المثبط الادنى (MIC) للمستخلص الكحولي في جرثومة *S. pyogenes* كان مساويا تقريبا لـ (٠,٢٥) ملغم/سم$^{٣}$ كما انها كانت مساوية لـ (٠,٢٥) ملغم/سم$^{٣}$ في جرثومة *Sh.*

*flexneri* ، اما المستخلص الاسيتوني فقد كان تركيزه المثبط الادنى (MIC) مساويا تقريبا لـ (١,٠) ملغم/سم$^{٣}$ في الجرثومة *P. mirabilis* وكانت مساوية لـ(٠,٢٥) ملغم/سم$^{٣}$ في الجرثومتين *S. aureus* و *S. pyogenes* .

**جدول (٧):** التركيز الادنى المثبط (MIC) للانواع المختلفة من المستخلصات لنبات الزعتر ومكوناتها الفعالة في الانواع الجرثومية

| نوع المستخلص | *S. aureus* | *S. pyogenes* | *B. subtilis* | *Sh. flexneri* | *P. mirabilis* | *P. aeruginosa* |
|---|---|---|---|---|---|---|
| المستخلص الكحولي | ٠,٥ | ٠,٢٥ | ١,٠ | ٠,٢٥ | ١,٠ | – |
| المستخلص الاسيتوني | ٠,٢٥ | ٠,٢٥ | ٠,٥ | ٠,٥ | ١,٠ | – |
| زيت الزعتر | ٠,٠٠٠٣ | ٠,٠٠٠٣ | ٠,٠٠٠٤ | ٠,٠٠٠٤ | ٠,٠٠٠٤ | ٠,٠٠٠٥ |
| الثايمول | ٠,٠٦٢٥ | ٠,٠٦٢٥ | ٠,٢٥ | ٠,١٢٥ | ٠,٢٥ | ٠,٥ |

اما بالنسبة للزيت الاساسي المفصول من نبات الزعتر فقد تبين ان التركيز المثبط الادنى مساويا تقريبا لـ (٠,٠٠٠٣) سم$^{٣}$/سم$^{٣}$ في الجرثومتين *S. aureus* و *S. pyogenes* فيحين كانت مساوية لـ(٠,٠٠٠٥) سم$^{٣}$/سم$^{٣}$ في الجرثومة *P. aeruginosa* اما بالنسبة للمادة الفعالة (Thymol) المفصول من زيت الزعتر فقد كان التركيز المثبط الادنى مساوي لـ (٠,٠٣١٢) ملغم/سم$^{٣}$ في الجرثومة *S. aureus* بينما كان مساويا لـ (٠,٥) ملغم/سم$^{٣}$ في الجرثومة *P. aeruginosa* .

وعلى صعيد القطر اجريت عدد من الدراسات حول تاثير مستخلصات نبات الزعتر على الاحياء المجهرية، فقد اشار الباحث (١) في دراسته تاثير المستخلص الكحولي والزيت الاساسي على نوعين من بكتريا السالمونيلا *S. typhi* و *S. typhimurium* وتشير الدراسة ان النتائج كانت ذات تاثير متباين لانواع السالمونيلا المنتخبة.

اما الباحث (٢) فقد بين تاثير المستخلص الكحولي والزيوت الاساسية المفصولة من نبات الزعتر ضد الجراثيم المرضية السالبة والموجبة لصبغة كرام، فقد اشار الباحث ان الزيت الاساسي اظهر تاثيرا جيدا ضد جرثومة *S. pyogenes* مقارنة بالانواع الجرثومية الاخرى، وهذه النتائج مقاربة للنتائج التي تم التوصل اليها.

تم اختبار حساسية الجراثيم للمضادات الحيوية بوجود المادة الفعالة والتي كانت مقاومة للمضادات الحيوية قبل استعمال المكونات الفعالة المفصولة من زيت الزعتر قيد الدراسة كما في الجدول (٨) وتم اختبار اربعة انواع من المضادات الحيوية (Ampicillin ، Trimethoprim ، Chloramphenicol ، Cephalosporin) فقد تبين ان جرثومة *S. aureus* اصبحت حساسة للمضادات الحيوية المستخدمة بوجود الثايمول، وفي الجرثومة *S. pyogenes* تبين ان الجرثومة اصبحت حساسة للمضادات الحيوية Chloramphenicol و Trimethoprim بوجود المادة الفعالة. في حين اصبحت الجرثومة *Sh. flexneri* حساسة للمضادات الحيوية Ampicillin و Cephalosporin بوجود المادة الفعالة. اما بالنسبة لجرثومة *P. mirabilis* فقد اصبحت حساسة للمضادات الحيوية Cephalosporin و Chloramphenicol ، في حين بقيت الجرثومة مقاومة للمضاد الحيوي Ampicillin بوجود الثايمول. اما الجرثومة *P. aeruginosa* فقد بقيت مقاومة للمضادات الحيوية Ampicillin و Cephalosporin و Chloramphenicol، بينما اصبحت حساسة للمضاد الحيوي Trimethoprim بوجود مادة الثايمول كما في الجدول (٨). اما جرثومة *B. subtilis* فقد بقيت مقاومة للمضادات الحيوية الاربعة بوجود المادة الفعالة (Thymol) .

**جدول (٨):** اختبار حساسية الجراثيم للمضادات الحيوية بوجود المادة الفعالة

| المضادات الحيوية + المادة الفعالة | *S. aureus* | *S. pyogenes* | *B. subtilis* | *Sh. flexneri* | *P. mirabilis* | *P. aeruginosa* |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Thymol + Am | S | | R | S | R | R |
| Thymol + Tm | S | S | R | | | S |
| Thymol + Cm | S | S | R | | S | R |
| Thymol + Cp | S | | R | S | S | R |

Am: Ampicillin
Tm: Trimethoprim
Cm: Chloramphenicol
Cp: Cephalosporin
S: Sensitive
R: Resistant

لقد اجريت هذه الدراسة للتاكد من ظاهرة وجود التآزر (Synergism) بين المكونات الفعالة للنباتات الطبية والمضادات الحيوية وبالذات نبات الزعتر ومن خلال النتائج التي تم الحصول عليها تبين ان هناك تآزر بين النباتات الطبية والمضادات الحيوية وهذا ما اكده بعض الباحثين في هذا المجال Agil واخرون (٢٠٠٥) و Nascimento واخرون (٢٠٠٠).

**المصادر:**


١. الحليم، صبا مؤيد سليمان محمد (٢٠٠١). التاثير التثبيطي لعدد من النباتات الطبية وبعض مكوناتها الفعالة في بعض انماط السالمونيلا المعزولة عن المرضى المصابين بالاسهال. رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة الموصل، العراق.

٢. النعمان، اديبة يونس شريف (١٩٩٨). التاثير الجزئي لبعض المستخلصات النباتية على نمو وايض عدد من الجراثيم الموجبة والسالبة لصبغة كرام. اطروحة دكتوراه، كلية العلوم، جامعة الموصل، العراق.

3. Ahmed K.D. (1989). The positive control of iLvC expression in E. coli K-12. Ph.D. Thesis, University of Durham, England.
4. Al-Ani A.J., Nadir M.T. and Al-Khazraji N.K. (1996). The antimicrobial activity of volatile oils isolated from some Iraqi plants. Journal of Al-Anbar University, 1(1): 82-86.
5. Al-Daody A.Ch. (1998). Chemical study on some Iraqi plans. Ph.D. Thesis, University of Mosul, Iraq.
6. Anesini C. and Perez C. (1993). Screening of plants used in Argentine folk medicine for antimicrobial activity. J. of Ethnopharmacol., 39: 119-128.
7. Aqil F., Khan M.S., Owais M. and Ahmad I. (2005). Effect of certain bioactive plant extracts on clinical isolates of beta lactamase producing methicilin resistant Staphylococcus aureus. J. Basic Microbiol., 45(2): 106-114.

combination with methicillin against methicillin-ressitant Staphylococcus aureus. J. Appl. Bacteriol., 80: 387-394.
20. Nascimento G.F., Locatelli J., Freitas P.C. and Silva G.L. (2000). Antibacterial activity of plant extracts and phytochemical on antibiotic resistant bacteria. Brazil J. Microbiol., 31: 247-256.
21. 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.
22. Prescott L.M., Harley and Klein D.A. (1996). Microbiology. 3rd ed., W.M.C. Brown Publishers, London, Chicago.
23. Rahman M. and Gul S. (2002). Antibacterial activity of hydrodistilled essential oils of Psammageton canescens N.O. Umbelliferae. J. Biotechnology, 1(1): 55-60.
24. 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.
25. Smith-Plamer A., Stewart J. and Fyfe L. (1998). Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food borne pathogens. Letters in Applied Microbiology, 26: 118-122.
26. Sokmen A., Jones B. and Erturk M. (1999). The in vitro antibacterial activity of Turkish medicinal plants. J. Ethnopharmacol., 67: 79-86.
27. Vandepitte J., Engback K., Piot P. and Heuk C. (1991). Basic Laboratory Procedures in Clinical Bacteriology. World Health Organization, Geneva.
28. Verpoorte R., Tginastoi A., Vandoorn H. and Svendsen A.B. (1982). Medicinal plant of Serinam, 1-Antimicrobial activity of some medicinal plants. J. Ethnopharmacol., 5: 221-226.
29. Vuotto M.L., Basile A., Moscatiellow V., Sole P.D., Castaldo Cobianchi R., Laghi E. and Lelpo M.T.L. (2000). Antimicrobial and antioxidant activities of Feijoa sellowiana fruit. International Journal of Antimicrobial Agents, 13: 197-201.
30. Wagner H., Bladt S. and Zgainski E.M. (1984). Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas. Springer Verlage, Berlin.
8. Bauer A.W., Kirbay W.A.M., Sherris J.S. and Turk M. (1966). Antibiotics susceptibility testing by a standardized single disc method. Am. J. Clin. Pathol., 45: 493-496.
9. Cowan M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews, 12(4): 564-582.
10. 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.
11. Grand A., Woudergem P.A., Verpoorte R. and Pousset J.L. (1988). Anti-infections phytotherapies of tree-Savannah sengal (West Africa), II-Antimicrobial activity of 33 species. J. Ethnopharmacol., 22: 25-31.
12. Hammer K.A., Carson C.F. and Reily T.V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. Journal of Applied Microbiology, 86(6): 985-990.
13. Harbone J.B. (1973). Phytochemical Methods. A Guide to Modern Technique of Plant Analysis. 1st ed., Printed in Great Britain Cox and Wyman Ltd., London.
14. Iwalokun B.A., Gbenle G.O., Adewole T.A. and Akinsinde K.A. (2001). Shigellocidal properties of three Nigerian medicinal planys: Ocimum gratissimum, Terminalia avicennoides and Momordia balsamina. J. Health Popul. Nutri., 19(4): 331-335.
15. Juven B.J., Kanner J., Schved F. and Weisslowiez H. (1994). Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. J. Appl. Bacterial., 76: 626-631.
16. Khodair A.I., Hammouda F.A. and Abdel-Azim H. (1993). Phytochemical investigation of Thymus decassatus L. Qatar Univ. Sci. J., 13(2): 211-213.
17. Laurence D.R. and Benett P.N. (1990). Clinical Pharmacology. 6th ed., English Language Book Society, pp. 193-197.
18. Marino M., Bersani C. and Comi G. (2001). Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and compositate. Int. J. Food Microbiol., 2140:1-9.
19. Muroi H. and Kubo I. (1996). Antibacterial activity of anacardic acid and totarolalone and in

# The Biological Effects of *Thymus vulgaris* Extracts and its Ingradient Against Some Bacteria and its Synergism Between the Active Material with Antibiotics

**Khider Dawood Sulayman**

***Department of Biology,College of Education, University of Mosul, Mosul, Iraq***

## Abstract:

This study was indicated the biological activity of Thymus vulgaris extract involving its oil active ingredient against six bacterial species: *Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes, Bacillus subtilis, Shigella flexneri, Proteus inirabilis, Pseudomonas aeruginosa*. The ethanolic extract was showed more bacterial inhibition against the bacterial species except *Pseudomonas aeruginosa*.

The acetonic extract was showed similar alcoholic extract effects. The Thymus vulgaris oil extract showed comparable inhibition effect against the all bacterial studied. It showed maximum inhibition effect at 0.1 $cm^3/cm^3$ of about 31 mm against *S. pyogenes*. The active material (Thymol) showed maximum inhibition activities toward *S. Pyogenes*, *S. aureus* compared to the control and medium activity to the antibiotic Ciprofloxacin. The radius of the inhibition zone against *S. pyogenes* of 200 mg/ml is about 34 mm. While against *P. aeruginosa* of the same concentration is about 19 mm.

The sensitivity measurements of the antibiotic in the presence of the active material in which the bacterial resistance was measured before using the Thymol oil extract. Four antibiotics were used namly Ampicillin, Chloramphenicol, Cephalosporin and Trimethoprim. It was found that *S. aureus* became more sensitive toward Ampicillin, Trimethoprim and Cephalosporin in the presence of the active material (Thymol) while *P. aeruginosa* was still in resistance to Chloramphenicol, Cephalosporin and Ampicillin in the present of (Thymol), while it became more sensitive to the antibiotic Trimethoprim in the presence of the active compound.