تقييم الفعالية ضد الميكروبية لمستخلصات البابونج *Matricaria chamomilla* و الزعتر *Thymus vulgaris* على العزلات البكتيرية المرضية

وهران سمير شهاب ، عبد الكريم فتاح عمر

قسم علوم الحياة ، كلية التربية للبنات ، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق

الملخص

درس تأثير المستخلص النباتي لأزهار البابونج *Matricaria chamomilla* وأوراق الزعتر *Thymus vulgaris* في تثبيط نمو البكتريا المعزولة من اخماج اللوزتين والبلعوم بعد تحضير المستخلصات بطرق الاستخلاص المائي والكحولي والزيتي ، وتم الكشف النوعي الكيميائي عن المركبات الفعالة إذ احتوت أزهار البابونج على الراتنجات والتانينات والفينولات والفلافونات والتربينات والستيرويدات والقلويدات والكلايكوسيدات والزيوت الطيارة في المستخلصات المحضرة بينما أوراق الزعتر احتوت على الراتنجات والتانينات والفينولات والفلافونات والتربينات والستيرويدات و القلويدات والكلايكوسيدات والصابونينات والزيوت الطيارة في المستخلصات المحضرة ، كما اختبرت الفعالية ضد الميكروبية لهذه المستخلصات لثمانية أنواع من البكتريا المعزولة من اخماج اللوزتين والبلعوم، حضرت المستخلصات المائية والمستخلصات الكحولية والزيتية لكل من نباتي البابونج *M.chamomilla* و الزعتر *T.vulgaris* وبالتراكيز (60,45,30,15,5 120ملغم/مل)وتم دراسة التأثير التثبيطي لهذه المستخلصات في جميع العزلات البكتيرية والتي تباينت من حيث حساسيتها لهذه المستخلصات وقد كان المستخلص المائي والزيتي للبابونج أكثر تأثيرا في الجراثيم المعزولة من المستخلص الكحولي والذي كان ضعيف التأثير فيها كما أظهر مستخلص نبات الزعتر فعلا تثبيطيا وقد كان المستخلص الكحولي والزيتي أكثر تأثيرا في الجراثيم المعزولة من المستخلص المائي والذي كان ضعيف التأثير فيها، وحددتالتر اكيز الأدنى المثبطة (MIC) Minimum Inhibitory Concentration للمستخلص المائي والكحولي والزيتي وقد تباين تحديد هذا التركيز حسب نوع المستخلص ونوع الجرثومة.

المقدمة

يعد التهاب اللوزتين Tonsillitis والبلعوم Pharyngitis من أكثر الأمراض شيوعا في العالم إذ يصيب كل الفئات العمرية ولكن بشكل اكبر الأطفال ذو الأعمار (5-15) سنة [1] وتسببه أنواع كثيرة من البكتريا. إن انتشار المقاومة للمضادات الحيوية بين الجراثيم الموجبة والسالبة لصبغة كرام دفع الباحثين لإيجاد بدائل علاجية ومنها النباتات الطبية بكونها غنية بالمركبات الفعالة ضد الميكروبات [2]. منها البابونج *M.chamomilla* و الزعتر *T. vulgaris*.

يعد البابونج *M.Chamomilla* نبات عشبي ينتمي للعائلة المركبة *Compositae* ذا أوراق ريشية بسيطة خيطية خضراء داكنة، له ساق قائمة ويعطي أزهار مركبة ذات رائحة مميزة [3]. يستخدم مغلي الأزهار في معالجة التهاب المسالك التنفسية (الأنف، الحنجرة، القصبة الهوائية، وبحة الصوت والسعال ويستخدم للغرغرة في التهاب اللوزتين ومزيل للمغص ومطهر للجلد [4] .

أما الزعتر *T. vulgaris* فهو نبات عشبي ينتمي للعائلة الشفوية *Labiatae*عشبة ذات أوراق رمحية متقابلة صغيرة لونها اخضر إلى رمادي بساق قصير ملتوي أزهاره بيضاء، تؤخذ أوراق وأزهار الزعتر كمغلي العشبة كمطهر ولمعالجة أمراض المعدة والسعال والتهاب اللوزتين والبلعوم وأمراض الكلى [5]. يستعمل الزعتر لمعالجة الزكام وآلام الأسنان والتهاب الفم يستعمل زيت كغرغرة وغسول للفم لإزالة الروائح الكريهة له فعالية ضد ميكروبية ضد العديد من الأحياء المجهرية يدخل في صناعة معاجين الأسنان لكونه مطهر جيد للفم [6]

لهذا هدفت هذه الدراسة إلى تحضير المستخلص المائي والكحولي والزيتي لنباتي البابونج و الزعتر ودراسة الفعالية الضد ميكروبية ضد أنواع البكتريا المعزولة من أخماج اللوزتين والبلعوم .

طرق العمل

1- تشخيص العزلات البكتيرية Identification of Bacterial Isolates

1-1التشخيص البكتريولوجي الأولي

شخصت المستعمرات النامية على سطح الأوساط الزرعية الخاصة بالزرع الأولي مبدئيا بالاعتماد على الصفات الزرعية من حيث الشكل، الحجم، اللون، القوام، الرائحة، و تحلل الدم على وسط أكار الدم، تخميرها السكر اللاكتوز على وسط أكار الماكونكي، كما درست صفات الخلايا البكتيرية عن طريق الفحص المجهري و ذلك بعد تصبغها بصبغة كرام Gram Stain ثم فحصها تحت العدسة الزيتية للمجهر الضوئي لملاحظة حجم و شكل الخلايا البكتيرية وطريقة تجمعها وتفاعلها مع صبغة كرام[7] .

1-2 الاختبارات الكيموحياتية Biochemical tests

1-2-1 اختبار الكتاليز Catalase test

أجري هذا الاختبار للتحري عن قابلية العزلات على إنتاج إنزيم الكتاليز الذي يشطر بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) السام إلى غاز الأوكسجين والماءأجر ي الاختبار بنقل جزء من المستعمرة الجرثومية المأخوذة من مزرعة فتية باستعمال الناقل (Loop) ووضعها في شريحة زجاجية نظيفة ومن ثم أضيفت إليها بضع قطرات من محلول

بيروكسيد الهيدروجين(3%) ، يعد ظهور فقاعات هوائية خلال ثواني قليلة من إضافة الكاشف نتيجة موجبة للاختبار [8] .

2-1-2 اختبار الأوكسديز Oxidase test

نقل جزء من المستعمرة بوساطة عود خشبي معقم إلى ورقة ترشيح مرطبة ببضع قطرات من محلول (Tetramethyl -p- phenyldiamminedihydrochloride) بتركيز (1%) أن ظهور اللون البنفسجي دلالة على ايجابية الاختبار [8] .

2-1-3 اختبار قابلية الحركة Motility test

لقح وسط اختبار الحركة بمستعمرات فتية من العزلات الجرثومية بطريقة الطعن باستعمال الإبرة (Needle) وحضنت الأنابيب الملقحة بدرجة حرارة (37) درجة مئوية مدة (24) ساعة، يعد ظهور تضبب أو عكارة حول منطقة الطعن نتيجة موجبة للاختبار [8] .

2-1-4 اختبار الأندول Indol test

استخدم الاختبار للتحري عن قدرة البكتريا على تحليل الحامض الأميني التربتوفان إلى الاندول و CO_2 و NH_3 بفعل انزيم Tryptophynase، أجري الاختبار بتلقيح وسط ماء الببتون Peptone water بالبكتريا وحضن في درجة حرارة C°(37) لمدة (48) ساعة، ثم أضيف (0.5) سم^3 من الكاشف P-dimethyl amino benzyl dehyde ، تكون حلقة حمراء في طبقة الكحول يدل على إيجابية الاختبار نتيجة تفاعل الكاشف مع الأندول المتكون[8] .

2-1-5 اختبار المثيل الأحمر Methyl red test

لقحت الأنابيب الحاوية على وسط ماء الببتون والكلوكوز والفوسفيت بالعزلات النقية الوا اد اختبارها حضنت الأنابيب في درجة حرارة C° (37) لمدة (48–24) ساعة، ثم أضيف (5) قطرات من كاشف المثيل الأحمر. إن ظهور اللون الأحمر يعد دليلاً على النتيجة الموجبة ، أما بقاء اللون الأصفر يعني عدم قدرة البكتريا على إنتاج الأحماض بكمية كافية لخفض الدالة الحامضية إلى (4.5)[8] ..

2-1-6 اختبار الفوكس – بروسكاور Voges Proskaur test

أجري الاختبار بتلقيح وسط الـ MR-VP بمستعرة فتية من العزلات الجرثومية وتمت حضانة المستنبتات بدرجة حرارة (37) درجة مئوية مدة (24- 48) ساعة وبعد انتهاء مدة الحضانة أضيف لكل أنبوبة (1) ملليتر من (40%) هيدروكسيد البوتاسيوم و3 ملليتر من α-naphthol 0.05% مع الرج ، يعد ظهور لون وردي نتيجة موجبة للاختبار.[8] .

2-1-7 اختبار استهلاك السترات Citrate Utilization test

استعمل لهذا الغرض وسط غراء سترات سيمون إذ لقح الوسط بمستعمرة فتية بطريقة الطعن وحضنت المستنبتات بدرجة حرارة (37) درجة مئوية مدة (18 –24) ساعة. يعد تغير لون الوسط من الأخضر إلى الأزرق دليل على إيجابية الاختبار [8] .

2-1-8 اختبار تميع الجيلاتين Gelatin liquefaction test

تم تلقيح وسط الجيلاتين بمستعمرات فتية من العزلات الجرثومية بطريقة الطعن بالإبرة وتمت حضانة المستنبتات بدرجة حرارة (37)درجة مئوية مدة (24) ساعة إلى (7) أيام ، وبعد انتهاء مدة الحضانة وضعت الأنابيب في الثلاجة بدرجة حرارة (4) درجة مئوية مدة (30) دقيقة. إنَّ تحول الجيلاتين من القوام الصلب إلى السائل يعد دليلاً على إيجابية الاختبار [8] .

2-1-9 الكشف عن إنزيم اليوريز Urease test

لقحت الأنابيب الحاوية على وسط أكار اليوريا المائل بالمستعمرات النقية وذلك بالتخطيط على السطح المائل، حضنت الأنابيب بدرجة حرارة C°(37) ولمدة (48–24) ساعة، تغير لون الوسط من الأصفر إلى الوردي هي النتيجة الموجبة [8] .

2-1-10 اختبار تخمر السكريات Carbohydrate Fermentation test

إذ استخدم وسط أساس ماء الببتون والفينول الأحمر Phenol red water peptone وتم إضافة سكريات (الكلوكوز، اللاكتوز، السكروز، المانيتول، المالتوز) بتركيز (1%) ، لقحت الأنابيب بمستعمرات نقية من البكتريا، حضنت بدرجة حرارة C°(37) لمدة (24) ساعة، إنَّ تغير لون الوسط من الأحمر إلى الأصفر يدل على حدوث عملية التخمير [8] .

2-1-11 اختبار تخمير سكر المانيتول Mannitol Fermentation test

إذ لقح وسط المانيتول الملحي Mannitol Salt Agar بالمزروع البكتيري و حضنت بدرجةC°(37) لمدة (24) ساعة ، إنَّ تغير لون الوسط من الوردي إلى الأصفر الذهبي يدل على النتيجة الموجبة [9] .

2-1-12 اختبار انزيم التجلط Coagulase test

زرعت الجراثيم في وسط المرق المغذي و حضنت بدرجة C° (37) ثم نبذت مركزيا لمدة (30)ثانية للحصول على الراشح الجرثومي ، ثم مزج (0.5) مل من الراشح الجرثومي مع (0.5) مل من البلازما في أنبوبة اختبار معقمة و حضنت بدرجة حرارة C°(37) و لمدة (4) ساعات ، إنَّ تكون الخثرة يدل على النتيجة الموجبة و في حالة عدم ظهورها تحضن الأنبوبة ليلة كاملة[9] .

2-1-13 اختبار الحساسية لمضاد الباستراسين Bacitracin Sensitivity test

أجري الاختبار بتوزيع أقراص المضاد Bacitracin على وسط أكار الدم بعد زرعه بالبكتريا ثم حضن بدرجة C° (37) لمدة (24–48) ساعة ، استخدم هذا الاختبار للتفريق بين *Streptococcus pyogens* الحساسة للمضاد و بكتريا *Streptococcus pneumonia* المقاومة له.[9] .

2-1-14 اختبار الحساسية لمضاد الابتوكين Optochin Sensitivity test

أجري اختبار فحص الحساسية ضد الابتوكين Optochin بتلقيح وسط أكار الدم بأفراد النوع ثم وضعت أقراص الابتوكين وحضنت في

C° (37) لمدة (24–18) ساعة استخدم هذا الاختبار للتفريق بين *Streptococcus pneumonia* الحساسة للمضاد و بكتريا *Streptococcus pyogenes* [7] .

2- جمع العينات النباتية

تم الحصول على أزهار البابونج الزعتر من المعاشب الموجودة في الأسواق المحلية في صلاح الدين ،حيث أرسلت النباتات إلى المعشب الوطني في بغداد لغرض التشخيص ، طحنت النباتات وحفظت المساحيق بعلب زجاجية معتمة وبدرجة حرارة الغرفة لحين الاستعمال.

3- تحضير المستخلصات النباتية

a- تحضير المستخلص المائي والكحولي :

وذلك عن طريق إذابة 100غم من النموذج النباتي المسحوق في 500مل من الماء المقطر (المذيب) أو الكحول للمستخلص الكحولي ثم رشح المستخلص من خلال مروره بقمع بخنر Buchner funnel ثم رشح بأوراق ترشيح Whatman no.1. بعد عملية الترشيح وضع المزيج بجهاز المبخر الدوار Rotary Vaccume evaporator حيث أن هذا الجهاز يعمل على أساس التبخير تحت ضغط مخلخل ليجف بدرجة حرارة 45C°وبعد تبخير الماء المقطر الموجود في المزيج لوحظ تكون طبقة سميكة من المستخلص الذي جفف بالتجفيد ثم حفظت العينات بالتجميد بدرجة حرارة 4C° في قناني زجاجية معتمة ذات غطاء محكم لحين استخدامها في الدراسة[10].

b- تحضير المستخلص الزيتي:

اخذ 100غم من المسحوق النباتي ووضع في دورق زجاجي وأضيف إليها حجم معين من الماء المقطر مقداره (500)مل ثم جرت عملية التقطير البخاري لمدة (8) ساعات، جمع الزيت الناتج من عملية التقطير ثم فصل عن الماء باستخدام قمع فصل وتم تخليصه من الرطوبة بإضافة ملح كبريتات الصوديوم اللامائية(Anhydrous sodium sulphate) وترك لفترة حتى يمتص الماء تماماً ثم أجريت له عملية الطرد المركزي centrifugation وأخيرا جمع الزيت وحفظ في قناني جافة ومعتمة ويحفظ الزيت في الثلاجة تحت درجة C°(4) لحين الاستعمال[11] .

4- الكشف الكيميائي النوعي عن بعض المركبات الفعالة في النباتات الطبية

a_الكشف عن الكلايكوسيدات Glycosides

وضع (1) مل من المستخلص النباتي في أنبوبة اختبار وأضيف له (2)مل من كاشف بندكت المحضر ثم نقلت إلى حمام مائي بدرجة الغليان وترك لمدة (5) دقائق واستدل على ايجابية الفحص من خلال ظهور اللون الأحمر[12] .

b-الكشف عن الراتنجات Resins

أضيف (50) مل من الكحول الاثيلي بتركيز(95%)إلى (10)غم من مسحوق النبات الجاف أو المستخلص النباتي ووضع في حمام مغلي لمدة دقيقتين ورشح بعد ذلك ويضاف له (100) مل من الماء المقطر المحمض بحامض الهيدروكلوريك (4%) حيث استدل على وجود المواد الراتنجية بظهور العكورة في المحلول [13].

c-الكشف عن التانينات Tannins

أذيب (10)غم من المسحوق النباتي الجاف في (50)مل من الماء المقطر وغلي المزيج ثم رشح وقسم الراشح بعد أن برد إلى قسمين :- أضيف للقسم الأول محلول خلات الرصاص تركيز (1%) إن ظهور راسب ابيض هلامي القوام يدل على وجود التانينات[14] .

d-الكشف عن الصابونينات Saponins

أمكن الاستدلال عن وجود الصابونينات بإتباع الطريقتين التاليتين:-

1-كاشف الرغوة: وضع كمية من المستخلص النباتي المائي في أنبوبة مغلقة ورجت بشدة، إن ظهور رغوة كثيفة تبقى لمدة طويلة على السطح دليلا على وجود الصابونينات [12].

2- كاشف كلوريد الزئبقيك $HgCL_2$: أضيف (1مل) من كاشف كلوريد الزئبقيك $HgCL_2$ تركيزه إلى (1مل) من المستخلص النباتي الجاف حيث يدل وجود الراسب الأبيض على ايجابية الفحص [12].

e-الكشف عن القلويدات Alkaloids

باستخدام كاشف ماير Mayer reagent ،حيث وضعت كميات متساوية من كاشف ماير مع المحلول النباتي ومزجت جيدا ، أن ظهور جزيئات الراسب الأبيض دلالة على ايجابية الفحص[15] .

f-الكشف عن الستيرويدات Steroids

أضيف (2) مل من حامض الخليك اللامائيAcetic anhydride إلى (0.5) مل من المستخلص النباتي مع (2) مل من حامض الكبريتيك H2SO4 ، إن ظهور لون ازرق داكن مخضر دلالة على ايجابية الفحص[16] .

g-الكشف عن الفلافونات Flavonoids

أذيب 5 غم من مسحوق الجزء النباتي في 10مل من الكحول الاثيلي (95%) ثم رشح المحلول ثم أضيف 1 مل من الكحول الاثيلي (50%) إلى 10مل من محلول هيدروكسيد الصوديوم KOH بتركيز (50%) مزجت كميات متساوية من كلا المحلولين1،2 يدل ظهور اللون الأصفر على وجود الفلافونات [17] .

h-الكشف عن الفينولات Phenols

أذيب (0.1)غم من المستخلص في 1مل من الماء المقطر وأضيف إليه (1-2) قطرة من محلول كلوريد الحديديك FeCl3 (1%) ، سجلت النتيجة موجبة بظهور اللون الأزرق والأخضر[18].

i-الكشف عن التربينات Terpens

أذيب (1)غم من المستخلص النباتي في (1-2) مل من الكلوروفورم وأضيفت إليه قطرة من حامض الخليك اللامائي وقطرة من حامض الكبريتيك المركز ، سجلت النتيجة موجبة بظهور اللون البني دلالة على وجود التربينات[16] .

j-الكشف عن الزيوت الطيارة Volatile oils

اخذ (10)مل من المستخلصات النباتية المحضرة ورشحت ثم شبعت بها أوراق الترشيح وعرضت للأشعة فوق البنفسجية إذ يدل اللون الوردي البراق على وجود الزيوت الطيارة.[16]

k-تقدير الأس الهيدروجيني pH

قدرت قيمة الدالة الحامضية للمحلول النباتي (pH) باستخدام جهاز pH meter عند درجة حرارة المختبر[12].

5-تحضير التراكيز القياسية للمستخلص المائي والكحولي والزيتي للنباتات

حضرت التراكيز النهائية للمستخلص المائي والكحولي والزيتي لكل من نبات البابونج ونبات الزعتر باستخدام الماء المقطر والكحول 80% وكانت بمقدار (120,60,45.30.15,5) ملغم /مل.

6- دراسة تأثير المستخلصات النباتية في نمو البكتريا

استخدمت طريقة الانتشار بالحفر (The agar well diffusion method) لملاحظة تأثير المستخلصات النباتية في نمو البكتريا المعزولة، لقح وسط مولر هنتون الصلب بالعالق البكتيري القياسي (أنابيب ماكفرلاند 0.5) والذي يساوي تقريبا ($1.5*10^8$) خلية / مل باستعمال ماسحة قطنية معقمة وتركت الأطباق (15) دقيقة ،عملت حفر على وسط الزرعي المزروع بواسطة الثاقب الفليني (Cork borer) أضيفت التراكيز المحضرة لكل مستخلص بمقدار (0.1) مل/حفرة وتركت الأطباق في درجة حرارة الغرفة لمدة (20) دقيقة ثم حضنت الأطباق في الحاضنة بدرجة حرارة 37 لمدة 24 ساعة حددت الفعالية للمستخلصات بقياس قطر منطقة التثبيط حول كل حفرة بالمليمتر [19].

7- تحديد التركيز المثبط الأدنى (MIC) للمستخلصات النباتية ضد البكتريا المعزولة

حدد التركيز المثبط الأدنى باستخدام طريقة العكارة (Turbidity Method) حيث أضيف 0.8 مل من مرق نقيع القلب الدماغ إلى أنابيب اختبار صغيرة ،عقمت بالمؤصدة بعدها أضيف 0.1مل من التراكيز المحضرة للمستخلصات النباتية باستثناء أنبوب السيطرة أضيف له نفس الحجم من المحلول الملحي الفسيولوجي ثم أضيف 0.1ملليتر من العالق البكتيري المقارن بأنبوبة 0.5 ماكفرلاند رجت الأنابيب جيدا وحضنت بدرجة حرارة 37 لمدة (18-24) ساعة بعدها سجلت النتائج على أساس ملاحظة العكارة دلالة على وجود نمو (+) وعدم وجود نمو (–) .[20] .

8-التحليل الإحصائي Statistical Analysis

حللت البيانات إحصائيا باستخدام اختبار تحليل التباين (ANOVA) (F test)، وقورنت المتوسطات الحسابية للمعاملات باستخدام اختبار دانكن متعدد الحدود Duncun Multiple Range بمستوى معنوية ($P<0.05$) بتطبيق البرنامج الإحصائي Minitab

النتائج والمناقشة

درست الفعالية ضد الميكروبية للمستخلصات الثلاث المحضرة من البابونج و الزعتر (المستخلص المائي ، الكحولي و الزيتي) إذ استخدم ثمانية أنواع من البكتريا المرضية المعزولة من اخماج اللوزتين والبلعوم والجدولان (2)،(1) يوضحان تشخيص البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام المعزولة على التوالي.

جدول (1): الاختبارات الكيموحيوية للمكورات العنقودية والمسبحية المعزولة من عينات المرضى .

العزلات الجرثومية	Oxidase	Haemolycin	Catalase	Bacitracin	Coagulase	Optochin	Mannitolsalt.a	Motility	Sucrose	Mannitol
Staph.aureus	–	β	+	–	+	–	+	–	+	+
Staph.epidermidis	–	γ	+	–	–	–	+	–	+	–
Strep.pyogenes	–	β	–	+	–	–	–	–	–	–
Strep.pneumoniae	–	α	–	–	–	+	–	–	+	–

α : تحلل الدم من نوع ألفا β: تحلل الدم من نوع بيتا γ: لاتحلل الدم

+ : النتيجة الموجبة – : النتيجة السالبة

الجدول (2) : الاختبارات الكيموحيوية للجراثيم السالبة لصبغة كرام المعزولة من عينات المرضى

العزلات الجرثومية	الاختبارات الكيموحيوية										
	Catalase	Oxidase	Lactose fermentation	Indole	Methyl .Red	V.p	Simmons citrate	Gas	H_2S	Motility	Urease
E.coli	+	−	+	+	+	−	−	+	−	+	−
K.pneumoniae	+	−	+	−	−	+	+	+	−	−	+
C. freundii	+	−	+	−	+	−	+	+	+	+	+
P.aeruginosa	+	+	−	−	−	−	+	−	−	+	+

+ : موجبة للاختبار ، − : سالبة للاختبار

أجريت للمستخلصات الثلاث المحضرة للنباتات قيد الدراسة كشوفات كيمياوية لمعرفة محتواها من المواد الفعالة ،حيث أشارت نتائج هذه الكشوفات إلى احتواء كل من المستخلصات المائية والكحولية والزيتية للبابونج على (التانينات، الفلافونات، القلويدات، الراتنجات، الكلايكوسيدات، التربينات، الستيرويدات، الفينولات والزيت الطيار) إذ تعد جميع هذه المركبات فعالة جدا ولها استخدامات طبية وهذه النتيجة تتفق مع دراسة [21].

ذكرت الدراسات إن الفعالية التثبيطية لأزهار البابونج المضادة للبكتريا والالتهابات قد تعزى لاحتوائه على الفلافونات فضلا عن الفينولات إذ وجد أن للفلافونات القدرة في تمزيق الأغشية الخلوية عن طريق تكوين معقد مع البروتين الخارجي الموجود فيها ،وعلى الفينولات التي تعمل على تثبيط الأنزيمات المسئولة عن التفاعلات الايضية الأساسية بتداخلها غير المتخصص مع البروتينات مما يؤدي إلى مسخ البروتين denaturation protein ومن ثم عدم قدرة البكتريا على الانقسام الخلوي والنمو [22]. أما بالنسبة لقياس الأس الهيدروجيني PH للمستخلصات المائية والكحولية والزيتية فقد كانت (5.00)، (4.84)، (5.32) على التوالي.

أما مستخلصات الزعتر احتوت على (التانينات ،الفلافونات، القلويدات، التربينات ،الصابونينات ،الستيرويدات، الكلايكوسيدات، الراتنجات والزيت الطيار) إذ تعد جميع هذه المركبات فعالة جدا ولها استخدامات طبية وهذه النتيجة تتفق مع دراسة[23]. كما أن الأس الهيدروجيني PH للمستخلصات كانت (5.42)، (5.02)، (5.18) للمستخلص المائي والكحولي والزيتي على التوالي .يتبين من النتائج انه كانت جميع المستخلصات حامضية وهذه صفة مهمة جدا لتثبيط نمو البكتريا الممرضة التي يثبط نموها الوسط الحامضي لانخفاض الفعالية الحيوية لأنزيمات الأيض الحيوي والجدول (3) يوضح النتائج.

الجدول (3)الكشف الكيمياوي التمهيدي الاستدلالي لبعض المركبات الفعالة لمستخلصات النباتات

المركبات الكيميائية	مستخلص نبات البابونج			مستخلص نبات الزعتر		
	المائي	الكحولي	الزيتي	المائي	الكحولي	الزيتي
الكلايكوسيدات	+	+	+	+	_	+
الصابونينات	_	_	_	+	+	+
القلويدات	_	+	_	+	+	_
الفلافونات	+	+	+	+	+	+
التانينات	+	+	+	+	+	_
الستيرويدات	+	_	+	_	_	+
الفينولات	+	+	+	_	+	+
الراتنجات	_	+	+	_	+	_
التربينات	+	+	+	_	+	+
الزيوت الطيارة	+	+	+	+	+	+
pH	5.00	4.84	5.32	5.42	5.02	5.18

+ : وجود المادة الفعالة ، − : عدم وجود المادة الفعالة

أما فيما يتعلق بدراسة تأثير التراكيز القياسية المحضرة من المستخلصات الثلاث للبابونج و الزعتر على البكتريا الممرضة والمعزولة من أخماج اللوزتين والبلعوم فقد أوضحت نتائج التحليل الإحصائي عند مستوى معنوية $P<0.05$ كما يلي :

1- تأثير المستخلصات المائية للنباتات في العزلات البكتيرية :

أبدى المستخلص المائي للبابونج تأثير تثبيطي على *S.pyogenes, S. aureus* وكان التركيز القاتل لهما 30 ملغم/مل أما التركيز المثبط الأدنى (15) ملغم/مل أما بكتريا *S.epidermidis, C.freundii, S.pneumoniae*h` وجد أن التركيز القاتل(MBC) هو (60) ملغم/مل في حين كان التركيز القاتل(30) ملغم/مل أما بالنسبة للعزلات *E.coli ,K.pneumoniae, P.aeruginosa* التركيز القاتل لها (60) ملغم/مل وكان المثبط الأدنى(MIC) للعزلات (45) ملغم/مل. أما بالنسبة للمستخلص المائي للزعتر وجد أن التركيز القاتل(MBC) للعزلات البكتيرية الموجبة والسالبة لصبغة كرام فقد كان (120)ملغم/مل في حين كان التركيز المثبط الأدنى(MIC) للعزلات *S.epidermidis, S.pyogenes, S.aureus* هو (60) ملغم/مل ، كما تبين أن المستخلص لم يظهر أي فعالية تذكر تجاه العزلات الباقية. وقد أظهرت نتائج الدراسة الحالية بالنسبة لمستخلصات نبات البابونج *M. chamomilla* .

إن المستخلص المائي للنبات قد اظهر تأثيرا تثبيطيا في جميع الأنواع الجرثومية الموجبة والسالبة لصبغة كرام وبتراكيز مختلفة بينما المستخلص المائي للزعتر لم يكن فعالا في تثبيط العزلات البكتيرية ، الأنواع البكتيرية الموجبة لصبغة كرام كانت أكثر تحسسا للمستخلص بالمقارنة مع الأنواع السالبة لصبغة كرام قد يعزى ذلك لكون البكتريا الموجبة لصبغة كرام تمتلك جدار يتميز بكونه ذو نفاذية أكثر من جدار البكتريا السالبة لصبغة كرام بالإضافة لكون المادة الفعالة المذابة في الماء ذات قدرة عالية على اختراق الجدار الخلوي للبكتيريا وهذا يتفق مع دراسة [**24**] .

2-تأثير المستخلصات الكحولية للنباتات في العزلات البكتيرية:

لم يكن للمستخلص الكحولي للبابونج تأثير تثبيطي على البكتريا حيث وجد أن التركيز القاتل لها هو(120) ملغم/مل للبكتريا الموجبة و البكتريا السالبة لصبغة كرام المعزولة في حين كان التركيز المثبط الأدنى(MIC) للعزلات الموجبة لصبغة كرام(60) ملغم/مل ، فيما يخص عزلات البكتريا السالبة لصبغة كرام لم تظهر حساسية تجاه المستخلص الكحولي .

أما بالنسبة للمستخلص الكحولي للزعتر وجد أن التركيز القاتل للعزلات البكتيرية الموجبة لصبغة كرام هو (30) ملغم/مل عدا جرثومة *S.aureus* فقد كان التركيز القاتل (60)ملغم/مل،في حين كان التركيز القاتل للعزلات السالبة لصبغة كرام (60) ملغم/مل عدا عزلة *P.aeruginosa* كان (120) ملغم /مل كما تبين أن التركيز المثبط الأدنى المثبط لنمو العزلات , *S.pneumoniae, S.pyogenes S.epidermidis* كان (15)ملغم/مل ، أما فيما يخص عزلات *S.aureus* فقد كان التركيز المثبط الأدنى للنمو(30)ملغم/مل أما فيما يخص العزلات *K.pneumoniae,C.freundii, E.coli* فقد كان التركيز المثبط الأدنى (45) ملغم/مل و لبكتريا *P.aeruginosa* كان (60) ملغم/مل. لوحظ أن فعالية المستخلص الكحولي للزعتر كانت عالية في حين أن المستخلص الكحولي للبابونج لم يكن مؤثرا في العزلات وهذه النتائج تتفق مع دراسات حديثة عديدة منها دراسة **[25]** الذي وجد أن المستخلص الكحولي لنبات الزعتر *Thymus vulgaris* قد اظهر تأثيرا تثبيطيا في أنواع جرثومية سالبة وموجبة لصبغة كرام وتتفق مع نتائج **[26]** الذي وجد أن للمستخلص الكحولي فعالية ضد *S.aureus ,E.coli, K.pneumoniae* وكانت اقطار مناطق التثبيط (2.9, 3.9, 4.2) ملم ، قد يعزى السبب لوجود مجموعة الهيدروكسيل OH التي لها القدرة على تكوين أواصر هيدروجينية بين مجاميع الهيدروكسيل في هذه المركبات وجزيئات الماء الموجود في الخلية البكتيرية حيث يشكل الماء نسبة (90%) من وزن الخلية و هذه المركبات الفينولية لها القدرة على تخثير بروتينات الخلية البكتيرية وتدمير الانزيمات المسؤولة على إنتاج الأحماض الامينية الضرورية في الانقسام الخلوي [**27**] .

3- تأثير المستخلصات الزيتية للنباتات في العزلات البكتيرية :

اظهر المستخلص الزيتي للبابونج تأثير تثبيطي متباين في العزلات البكتيرية فقد كان التركيز القاتل لأنواع البكتريا *S.pyogenes, S.aureus, S.epidermidis* كان60 ملغم/مل أما لبكتريا *S.pneumoniae* كان (120) أما التركيز القاتل لأنواع البكتريا *K.pneumoniae ,C.freundii* كان (120,60) ملغم/مل على التوالي أما بكتريا *E.coli, P.aeruginosa* كان (120)ملغم/مل فيما كان التركيز المثبط الأدنى للبكتريا*S.pyogenes, S.aureus* هو (30)ملغم/مل ، أما التركيز المثبط الأدنى للعزلات *S.epidermidis, C.freundii* كان (45)ملغم/مل كما تبين أن التركيز المثبط الأدنى المثبط لنمو العزلات *K.pneumoniae, S.pneumoniae* كان (60) ملغم/مل. فيما يخص عزلات البكتريا *E.coli, P.aeruginosa* لم يكن للمستخلص أي تأثير تثبيطي يذكر. أما بالنسبة للمستخلص الزيتي للزعتر فقد اظهر تأثيرا تثبيطيا في كل العزلات حيث وجد أن التركيز القاتل للعزلات البكتيرية الموجبة لكرام هو (30) ملغم/مل أما البكتريا السالبة لكرام فقد كان التركيز القاتل لها (60) ملغم/مل، كما تبين أن التركيز المثبط الأدنى المثبط لنمو العزلات *S.pyogenes ,S.pneumoniae ,S.aureus S.epidermidis*, فقد كان (15) ملغم/مل ، أما فيما يخص عزلات السالبة لصبغة كرام كان التركيز المثبط الأدنى (45) ملغم/مل.

اظهر زيت الزعتر فعالية تثبيطية بكل العزلات البكتيرية المختبرة أعلى من الفعالية التثبيطية لزيت البابونج وكان أكثر تأثيرا في البكتريا الموجبة لصبغة كرام من البكتريا السالبة لصبغة كرام ، بعض الباحثين أعزى سبب عدم تحسس البكتريا السالبة لصبغة كرام للزيوت الأساسية ومركباتها إلى أن تركيب جدار الخلية يلعب دور في المقاومة لوجود

Polysaccharide يمنع دخول العوامل السمية Toxic agents [28]. ويعزى سبب الفعالية الضد ميكروبية للمستخلصات الزيتية لوجود المجاميع الوظيفية والتركيب الكيمياوي ومكونات الزيوت الأساسية تلعب دور في تثبيط نمو الجراثيم إضافة إلى أن الزيوت الأساسية تسبب في زيادة النفاذية لغشاء الخلية Cell membrane مما يؤدي إلى إتلاف نظام الأنزيم لتنفس الخلية البكتيرية[29].

جدول (4) نتائج اختبار (MIC)،(MBC) للمستخلصات الثلاث للبابونج على العزلات البكتيرية*

البكتريا	المستخلص المائي		المستخلص الكحولي		المستخلص الزيتي	
	MIC mg/ml	MBC mg/ml	MIC mg/ml	MBC mg/ml	MIC mg/ml	MBC mg/ml
S.aureus	**15115**	**30**	**60**	**120**	**30**	**60**
S.epidermidis	**30**	**60**	**60**	**120**	**45**	**60**
S.pyogenes	**15**	**30**	**60**	**120**	**30**	**60**
S.pneumoniae	**30**	**60**	**60**	**120**	**60**	**120**
C.freundii	**30**	**60**	_	**120**	**45**	**60**
K.pneumoniae	**45**	**60**	_	**120**	**60**	**120**
E.coli	**45**	**60**	_	**120**	_	**120**
P.aeruginosa	**45**	**60**	_	**120**	_	**120**

_:لا يوجد تأثير ، MIC: التركيز المثبط الأدنى ، MBC : التركيز القاتل الأدنى

جدول (5) نتائج اختبار (MIC)، (MBC) للمستخلصات الثلاث للزعتر على العزلات البكتيرية

البكتريا	المستخلص المائي		المستخلص الكحولي		المستخلص الزيتي	
	MIC mg/ml	MBC mg/ml	MIC mg/ml	MBC mg/ml	MIC mg/ml	MBC mg/ml
S.aureus	60	120	30	60	15	30
S.epidermidis	60	120	15	30	15	30
S.pyogenes	60	120	15	30	15	30
S.pneumoniae	_	120	15	30	15	30
C.freundii	_	120	45	60	45	60
K.pneumoniae	_	120	45	60	45	60
E.coli	_	120	45	60	45	60
P.aeruginosa	_	120	60	120	45	60

_:لا يوجد تأثير ، MIC: التركيز المثبط الأدنى ، MBC : التركيز القاتل الأدنى

المصادر

1- Cunnigham, Madeleine W. (2000). Pathogenesis of group streptococcal infections. J. Clin. Microbial. Rev., 13 (3): 470-511.

2- Cowan, M.(1999) .plant products as antimicrobial agents Clinical Microbiology. Rev. 12(4):564-582.

3- Van Wyk, B E & Wink ,M.(2004).Medicinal plants of the world, 1st ed.Briza Publication, South Africa. P. 323.

4 -Ross, S.M. (2008). *Chamomilla* a spoon full of Medicine .Holistic Nursing Practice. 22(1):56-57 .

5- Rota, C.; Herrera, H.; Martinez, R.;Sotomayor ,J.; Jordan, M. (2008). Anti microbial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris* , *Thymus Zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. Food control. 19:681-687.

6- Gonclaves, Gial .M.S; bottaro, .M.; Nilson, A.C. (2011). Effect of the *Thymus vulgaris* essential oil on the growth of *Streptococcus mutans* .J. Basic an App. pharmaceutical Sci. 32(3):375-380

7- Cruickshank, R.; Dugid, J. P.; Marmion, B. P. and Swain R. H. A (1975). Medical Microbiology .Vol .2.The practice of Medical microbiology.12th ed .Churchill Livingstone. England.

8- Mahon, C.R.; Lehman, D.C.; Manuselis, G. (2011). Textbook of Diagnostic Microbiology. 4th ed., W.B Saunders Company, China .

9- Macfaddin, J. F.(2000). Biochemical test for Identification of Medical bacteria .2nd ed. Waverly press: Inc.; Baltimore.

10- Coelho, D.s.g; Haas, A.P.S; Von, P.G.L.; Schapoval E.E.S and Elisabetsky E.(2004). Ethno pharmacological studies of antimicrobial remedies in the South of Brazil. J. Ethnopharmacology. 90:135-143.

11- Farag, R.S.; Daw, Z.Y.; Hewedi, F.M. and El-Bairoty, G.S.A.(1989). Antimicrobiaactivity of some Egyptian Spice essential oils J.Food port.52:665 –669

12- Evans W.C. (1999). Trease and Evan's Pharmacognosy. 14th ed. W.BSaunders Company Ltd. UK.

13- Shihata, I.M. (1951).A pharmacological study of *Anagallis arvensis*. M. D. vet. Ph.d. Thesis Cairo Univ.

14- Molan , A.L.; Mcnebb W.C.; Attowd, G.T.; Min, B.R; Peters, B.R and Barry, T.N.(1997).The effect of condensed tannin from two Lotus species on protein degradation and bacterial growth in the Rumen.

15- Harborne, J.B. (1985). Phytochemical Methods, 2nd ed. Chapman and Hall, New York. USA.

16- Indian Herbal Pharmacopeia. (1998). A joint Publication of Regional Research Laboratory. Counce of Scientific and Industrial Research .Jammataw. 1:1-10.

17 - Al-Assadi, I.J. (2001) .Study of hypoglycemic and anti-hyperglycemic action of *Olea europae* in animals and humans Ph.D. thesis, College of Science, Basrah Univ., Iraq.

18- Al-Khazraji S.M., (1991). Biopharmacological study of the Artemisia herbal MSc. Thesis, College of Pharmacy, Baghdad Univ, Iraq.

19- Schelz, A.; Molnar, J and Hohmann, J. (2006). Antimicrobial and ant plasmid activities of essential oils. Fitoterapia .77(4):279-285.

20 - Ghosh , S.;E. Subudhi and S. Nayak.(2008). Antimicrobial assay of *Stevia rebaudiana* Betroni leaf extracts against 10 pathogens Int. J. Integrat. Biol., 2: 27-31 .

21- Al. Thawani, Amina N.; Al. Naymi, Hanan A. and Al. Tahan, Farid. (2007). Evaluation of antimicrobial activity of watery and alcoholic extracts for *M atricaria chamomilla* on inhibition of growth of gram positive Pathogenic bacteria isolated from Pharyngitis and Tonsillitis cases .Iraqi J. Biotech., 6 (1): 52- .

22- Tsuchiya, H.; Sato, M.; Linum M.; Yokoyama, J.; Ohyama, M.; Tanaka, T.; Takasa, I and Naimkaw, I. (1994). Inhibition of the growth of Cariogenic bacteria in vitro by plant flavones Expermetia .50: 846- 849.

23- Ocana ,A. & Reglero, G. (2012) .Effects of Thyme extract oils (from *Thymus vulgaris* , *Thymus Zygis* and *Thymus hyemaltis* on Cytokine production and Gene expression of ox LDL. stimlated THP-1-Macrophage .J. of Obesity ID 10416,11pages.

24-Hadarouga, N. G.; Hadarouga, D.I.; Tatu, C.; Gruia, A.; Costscu, C.; Luepea, A. X. (2009). Multivariate analysis (PCA) in compositae bio compounds class. J. of Agroalimetary processes and Tech.15:201-210.

25- Rahim, Babadaiesamani; Zahra, Babadaie; Hadistrahiminam. (2013). Impact of Medical plants as Feed Additives Australian J. of Basic & App. Sci., 7(6): 420-426

26- Samiayah, Chitra; Louis, Degon; Zogue, Sehareze. (2011). Antibacterial activity of *Thymus vulgaris* L.(Thyme) from leaf extract –A medicinal plant .Int.J. Ecology & Dev., 20(11) .

27- Xu, Zhou F.; JiBP.; Pei, R.S. and Xu N.(2008). The antibacterial mechanism of Carvacrol and Thymol against *E. coli* Lett. App. Microbial .47:174-179 .

28- Guante, L. F., Higgins, S.C. and Hughes, J.F. (2005). In traction of air ions and bactericidal vapours to control microorganisms .J. Appl. Microbiol. ,99: 1324 -1329.

29-Yesil Celiktas, O.; Hames Kocabas EE, Bedir E., Vardar Sukan F.; Ozek T. and Baser KHC. (2007). Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis* ,depending on location and seasonal variations Food Chem., 100: 553-559.

Antimicrobial activity assay for extracts of *Matricaria chamomilla* & *Thymus vulgaris* on Pathogenic bacterial isolates.

Wahran Samir Shehab , Abdul –Kareem Fatah Omar

Biology Dept. , Education College for women , Tikrit University , Tikrit , Iraq

Abstract

The effects of *Matricaria chamomilla* and *Thymus vulgaris* plant extracts were studied on Growth inhibition of the pathogenic bacteria of pharyngitis and tonsillitis Infections .The chemical tests were made for preparing the extracts, the watery, alcoholic and oily extracts of *M.chamomilla* contained resins, tannins ,phenols, flavonoids ,tenpins ,steroids ,alkaloids ,glycosides and volatile oils when prepared extracts as well as *T.vulgaris* contained resins ,tannins, phenols, flavonoids ,terpens, steroids ,alkaloids ,glycosides ,saponins and volatile oils in prepared extracts. The anti-microbial activity of these extracts was tested on eight types of pathogenic bacteria which were isolated from tonsillitis and pharyngitis infections, since the water extract, alcoholic extract and oily extract for *M.chamomilla, T.vulgaris* were prepared in concentrations of (5,15,30,45,60,120 mg/ml) .The inhibitory effect of these extracts were studied for all the isolated bacteria which showed variable sensitivity for these extracts .Watery and oily extracts for *M. chamomilla* were more effective on isolated bacteria .

in comparison with alcoholic extract which was with variable effect. Extracts of *T. vulgaris* of alcoholic and oily were more effective on isolated bacteria in comparison with watery extracts which were with variable effect ,the Minimum inhibition concentration(MIC) of alcoholic and watery and oily extracts were also determined and the results showed variable concentrations according to type of extract and bacterial species.