التأثير التثبيطي لمستخلصات نبات المريمية *Salvia officinalis* والتآزر بين مكوناتها الفعالة والمضادات الحيوية في جرثومي *Staphylococcus aureus* و *Salmonella typhimurium* المعزولتين من حالات التسمم الغذائي في مدينة الموصل♦

خضر داؤد سليمان فاطمة إبراهيم سلطان الدليمي

قسم علوم الحياة/كلية التربية/جامعة الموصل

ABSTRACT

In this study, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhimurium* were isolated and identified from patients suffering from food poisoning, (60) isolates (41.4%) showed *Staph. aureus* and (85) isolates (58.6%) showed *S. typhimurium*.

Aqueous and ethanol extracts from *Salvia officinalis* leaves showed high inhibitory activities against tested bacteria, while a good action was seen using the essential oils. The volatile oil compounds furfural and camphor isolated from ethanol extract showed good inhibitory action against *Staph. aureus* and high inhibitory action against *S. typhimurium* compared with the standard antibiotic (Gentamycin, Amoxicillin, Tetracycline), in addition the petroleum ether fraction containing the compounds β-pinene, α-pinene, Limonene) also showed good inhibitory action against tested bacteria, The minimum inhibitory concentration (MIC) values were detected for aqueous, ethanol, petroleum ether and chloroform extracts against *Staph. aureus* and *S. typhimurium* and was equal to (0.03) mg/cm^3, while the MIC value against *Staph. aureus* was (0.015) mg/cm^3 using the acetone extract. The isolated essential oils from sage leaves showed high MIC values (0.00033 and 0.0005 cm^3/cm^3) against *Staph. aureus* and *S. typhimurium* respectively, while furfural and camphor from the ethanol extract and β-pinene, α-pinene, Limonene from petroleum ether extract observed a MIC value equal to (0.06) mg/cm^3. In addition, the antibiotic sensitivity of both types of bacteria with the presence of the active components was also tested. The results showed that active components have synergistic effect against *Staph. aureus* but antagonistic effect against *S. typhimurium*.

♦ البحث ملقى في المؤتمر الأول لعلوم الحياة في كلية التربية جامعة الموصل للفترة 4-5 أيلول 2007

الخلاصة

تضمنت الدراسة عزل وتشخيص جرثومتي *Staphylococcus aureus* و *Salmonella typhimurium* من الاشخاص المصابين باعراض التسمم الغذائي Food poisoning ، إذ تم عزل (60) عزلة تمثل *Staph. aureus* و (85) عزلة تمثل جرثومة *S. typhimurium* وبنسبة (41.4%) و (58.6%) على التوالي. أظهرت النتائج تأثيرا تثبيطيا عاليا نسبيا للمستخلصات المائي والايثانولي وتأثيرا تثبيطيا جيدا للزيت الأساسي من أوراق المريمية في الجرثومتين قيد الدراسة. أما فيما يخص المركبات الزيتية المتطايرة المفصولة من المستخلص الكحولي لأوراق المريمية فقد اظهر الجزء الحاوي على (Camphor و Furfural) فعالية تثبيطية جيدة في جرثومة *Staph. aureus* وفعالية تثبيطية عالية في جرثومة *S. typhimurium* مقارنة بالمضادات الحيوية القياسية (Gentamycin ، Amoxicillin و Tetracyclin). أما الجزء المفصول بالايثر البترولي والحاوي على مركبات (β-pinene و α-pinene و Limonene) فقد اظهر فعالية تثبيطية جيدة في الجرثومتين قيد الدراسة. وتم تحديد التركيز المثبط الأدنى Minimum Inhibitory Concentration (MIC) لكل من المستخلص المائي والايثانولي والايثر البترولي والكلوروفورمي والاسيتوني لأوراق نبات المريمية حيث كان مساويا (0.03) ملغم/سم^3 في جرثومتي *Staph. aureus* و *S. typhimurium*، ماعدا المستخلص الاسيتوني في جرثومة *Staph. aureus* مساويا (0.015) ملغم/سم^3. وإما الزيت الأساسي المفصول من أوراق المريمية فقد كان ال MIC (0.00033) سم^3/ سم^3 في جرثومة *Staph. aureus* بينما كان (0.0005) سم^3/ سم^3 في جرثومة *S. typhimurium* أما الجزء المستخلص الايثانولي الحاوي على مادتي Furfural و Camphor والجزء المفصول بالايثر البترولي الحاوي على المواد Limonene و α-pinene وβ-pineneفقد كان ال MIC مساويا (0.06) ملغم/سم^3 في الجرثومتين قيد الدراسة. تم دراسة حساسية الجراثيم للمضادات الحيوية بوجود المواد الفعالة وتبين حدوث زيادة في حساسية *Staph. aureus* للمضادات الحيوية بوجود المواد الفعالة أي حصول حالة تآزر Synergism، في حين قلت حساسية جرثومة *S. typhimurium* للمضادات الحيوية بوجود المواد الفعالة أي حدوث تضادية Antagonism.

المقدمة

يعد مرض التسمم الغذائي Food poisoning من الامراض واسعة الانتشار ومن المسببات الرئيسية لحالات الوفيات في العالم، اذ ان حدوث التسمم الغذائي تسببه عوامل عديدة مشتركة، تشمل تلوث الغذاء بالجراثيم التي لها القابلية على احداث التسمم الغذائي للانسان

والحيوان (1). لقد تطورت الدراسات خلال السنوات القليلة الماضية في مجال العلاج بالنباتات الطبية وللنباتات الطبية قدرة غير محدودة على انتاج المركبات الاروماتية والتي تشكل نسبة عالية منها المركبات الفينولية او مشتقات الاوكسجين المعوضة (2). يعد نبات المريمية *Salvia officinalis* من النباتات الطبية المنتشرة في العالم الذي يعود الى عائلة *Lamiaceae* ، إما الاسم الانكليزي فهو Sage وهي عشبه معمرة مستديمة الخضرة تنتشر في المناطق الاستوائية والمعتدلة. ان نبات المريمية غني بالمواد الفعالة اذ يحتوي على زيت طيار Sage oil والذي يحتوي بدوره على مادة المرسين Myrcene والسيمين Cymene والكافور Camphor و Furfural و Limonene و α-Pinene و β-Pinene و 1,3- Cineole و α-Thujone وهي المواد المسؤولة عن التاثير البايولوجي (3،4). تحتوي الزيوت الطيارة في تركيبها الكيميائي على ذرة الاوكسجين O_2 وقد تتكون من الكحولات والالديهايدات والكيتونات والفينولات والاكاسيد والاسترات والايثرات والاحماض (5). اوضحت الدراسات ان الزيوت الاساسية اكثر فعالية ضد الجراثيم الموجبة لصبغة كرام من الجراثيم السالبة لصبغة كرام (6). وفي دراستنا الحالية تم استخدام اوراق نبات المريمية *Salvia officinalis* للحصول على بعض المركبات الزيتية المتطايرة والفعالة بايولوجيا بهدف معرفة الفعالية التثبيطية لهذه المركبات لوحدها او عند دمجها مع بعض المضادات الحيوية على نمو الجراثيم السالبة والموجبة لصبغة كرام.

المواد وطرائق العمل

جمع وتصنيف النباتات المستخدمة في الدراسة

تم جمع اوراق نبات المريمية *Saliva officinals* من الاسواق المحلية في مدينة الموصل. وتم التحقق من تصنيفها في معشب كلية العلوم / جامعة الموصل.

العزلات الجرثومية

جمعت (260) عينة (براز ، قئ) ماخوذة من الاشخاص الذين لديهم اعراض التسمم الغذائي والذين راجعوا العيادات الاستشارية في مستشفيات مدينة الموصل وعلى مدى (6) اشهر ابتداءا من شهر تموز (2005) ولغاية شهر كانون الاول (2005).

تم اخذ العينات باستعمال ماسحات قطنية معقمة Cotton swabs اذ تم نقل جزء من البراز او القئ الى قناني معقمة حاوية على (5) مل من وسط مرق نقيع المخ والقلب Brain heart infusion broth كوسط ناقل للعينات لحين جلبها الى المختبر وبفترة زمنية لا تتعدى الساعتين.

وقد اعتمد على الصفات الزرعية والفحص المجهري والاختبارات الكيموحيوية لتشخيص العزلات.

تحضير المستخلصات النباتية

تحضير المستخلصات المائية

اعتمدت طريقة Riose واخرين (8).

تحضير المستخلصات الكحولية الخام

اتبعت طريقة Grand واخرين (9) في تحضير المستخلص الايثانولي والمحورة عن الطريقة الأساسية للباحث Verporte واخرين (10).

تحضير بعض المستخلصات النباتية باستخدام جهاز الاستخلاص المستمر Soxhlet

اعتمدنا طريقة الباحث Al-Daody (11).

استخلاص المكونات الفعالة Active Constitutes Extraction

فصل وتنقية بعض المركبات الزيتية المتطايرة من المستخلص الكحولي من اوراق نبات المريمية باستخدام عمود الفصل الكروماتوغرافي (هلام السليكا)

يذاب (2) غم من المستخلص الكحولي الخام لاوراق نبات المريمية في (25) مل من الايثانول (96%) ويتم فصل مكونات المستخلص باستخدام عمود الفصل المعبأ بهلام السيليكا Silica gel من نوع (Mesh size 120-60) يشبع الهلام بمذيب الايثر البترولي ثم يوضع المستخلص الكحولي المذاب بالايثانول فوق الهلام وتبدأ عملية الفصل باستخدام المذيبات على التوالي: الايثر البترولي (40-60) °م، الايثر البترولي-البنزين (1:1 V/V)، البنزين-الكلوروفورم (1:1 V/V)، الكلوروفورم-تلوين (1:1 V/V) واخيرا تلوين-ايثانول (1:1 V/V) وبكمية نصف لتر لكل مذيب. وبذلك تم الحصول على (5) مستخلصات Fractions ويتم تركيزها بواسطة جهاز المبخر الدوار تحت الضغط المخلخل (12).

الكشف عن المركبات الزيتية المتطايرة لنبات المريمية باستخدام تقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة

الكشف عن مادتي (Furfural و Camphor)

استخدمت صفائح هلام السليكا Silica gel المجهز من شركة (Merek) وبسمك (0.25) ملم بالابعاد (20 × 20) سم، ونشطت الصفائح قبل الاستعمال في درجة حرارة (100) °م ولمدة نصف ساعة داخل الفرن Oven ثم تركت لتبرد بدرجة حرارة المختبر. تم تحميل العينات على احد طرفي اللوح والمتمثلة بعينة السيطرة القياسية لمادتي Camphor و Furfural للمقارنة مع عينة المستخلص المفصول من المستخلص الكحولي الخام بواسطة عمود الفصل وعلى هيئة بقع على امتداد خط البداية بواسطة الانبوبة الشعرية Capillary

tube ووضع اللوح في الحاوية Tank بشكل عمودي بحيث تكون النهاية المحملة بالعينات في الاسفل وملامسة لنظام المحلول Solvent system المتكون من (Ethyl acetate:chloroform) وبنسبة (V:V 3:27) وتم تغطية الحاوية بالغطاء الخاص بها وتركت في درجة حرارة المختبر إلى حين صعود محلول الفصل مسافة لا تقل عن (13) سم وبعدها رفع اللوح من الحاوية وترك افقيا لمدة (5) دقائق في ظروف المختبر ليجف، تم إظهار البقع عن طريق تعريضها للكاشف المتكون من بخار اليود وذلك بوضعها في (Tank) اخر حاو على بلورات اليود مبللة بالماء (13).

الكشف عن (β-Pinene و α-Pinene و Limonen)

تم الكشف عن مركبات (β -Pinene و α -Pinene و Limonen) من المستخلص الايثر البترولي لنبات المريمية بعد اجراء عملية الفصل بواسطة عمود الفصل بهلام السليكا باستخدام تقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (T.L.C) وباستخدام الالواح الزجاجية المغطاة بهلام السليكا وبالمواصفات المذكورة في الفقرة السابقة، اذ اتبعت الخطوات نفسها لهذه الفقرة ولكن نظام المحلول هنا متكون من الهكسان (30) مل (11).

التشخيص الوصفي لبعض المركبات الزيتية المتطايرة لنبات المريمية بقياس سرعة الجريان Rate of flow (Rf)

تم قياس سرعة جريان المادة Rate of flow على اللوح (TLC) اذ قيست المسافة التي قطعتها كل عينة من نقطة البداية الى النقطة التي توقفت عندها وتم قياس سرعة الجريان (Rf) باستخدام المعادلة (12):

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

تشخيص المجاميع الوظيفية لبعض المركبات الزيتية المتطايرة لنبات المريمية باستخدام تقنية طيف الاشعة تحت الحمراء IR

تم تشخيص المجاميع الوظيفية التي تعود لبعض المركبات الزيتية المتطايرة من المستخلص الكحولي والايثر البترولي لنبات المريمية بعد فصله من عمود الفصل باستخدام طيف الاشعة تحت الحمراء IR وباستخدام الجهاز Infrared Spectrophotometer Model Tensor 27 Bruker Co., Germany (14).

استخلاص الزيت الاساسي من اوراق نبات المريمية

تم الاعتماد على طريقة الباحث El-Kady واخرين (15) وذلك باستخدام جهاز التقطير البخاري Steam distillation apparatus .

اختبار الفعالية التثبيطية للمستخلصات النباتية والمكونات الفعالة

اعتمدت طريقة الباحث Bauer واخرين (7).

تحديد التركيز المثبط الادنى

Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

تم تحديد التركيز المثبط الادنى للمستخلصات النباتية والمواد الفعالة المفصولة وذلك باستخدام اختبار العكارة، باتباع طريقة الباحث Iwalokun واخرين (17).

اختبار حساسية الجراثيم للمضادات الحيوية بوجود المكونات الفعالة

تم اختبار حساسية الجراثيم للمضادات الحيوية بوجود المكونات الفعالة بالاعتماد على طريقة الباحثين Pyun و Shin (18)، اذ تم استخدام ثلاثة انواع من المضادات الحيوية Gentamycin (10 µg) و Teteracycline (30 µg) و Amoxicillin (25 µg) . تم نقل (0.1) سم^3 من العالق الجرثومي بتركيز (10^8 خلية / سم^3) الى وسط الاكار المغذي Nutrient agar ونشر على سطح الوسط بإتباع طريقة Bauer واخرين (7). بعد ذلك تم تثبيت قرص مشبع بالمكونات الفعالة لوحده بتركيز (200) ملغم/سم^3 وبجانبه قرص المضاد الحيوي لوحده والقرص الثالث عبارة عن احد اقراص المضادات الحيوية الثلاثة المختارة شبعت بالمكونات الفعالة المفصولة وبتركيز (200) ملغم/سم^3 ووضعت في طبق واحد بواسطة ملقط معقم على وسط الاكار المغذي وبمعدل ثلاثة مكررات وحضنت بدرجة (37) °م ولمدة (14-16) ساعة. تم قياس منطقة التثبيط او حزام التثبيط باستخدام مسطرة مدرجة وسجلت النتائج (19).

النتائج والمناقشة

جاءت نتائج الاختبارات الشكلية والكيموحيوية والفسلجية مطابقة لما ورد في انظمة التصنيف المعتمدة (20)، اذ اعطت (250) عينة نموا بكتيريا بنسبة (96.1%) ووجد ان (60) عزلة كانت تمثل جرثومة *Staph. aureus* و (85) عزلة تمثل جرثومة *S. typhimurium* أي بنسبة (41.4%) و (58.6%) لكل منها على التوالي. وقد اهملت العزلات التي لا تمثل الجرثومتين المذكورتين قيد الدراسة. لقد جاءت نتائج العزلات

الجرثومية مشابه لنتائج الدراستين (21 و 22) اذ كانت هذه الانماط الاكثر شيوعا من بين الأنماط الأخرى الموجودة في القي والبراز.

تم تحديد تاثير المستخلصات النباتية ومقارنتها مع المضادات الحيوية حسب ما ورد في توصيات منظمة الصحة العالمية (23)، اذ انتخبنا ثلاثة مضادات حيوية ابدت الجراثيم حساسية تجاهها وهي Tetracyclin و Amoxicillin و Gentamycin .

تبين من خلال النتائج التي تم التوصل اليها ان المستخلص المائي لاوراق المريمية اعطى تاثيرا تثبيطيا عاليا ضد الجرثومة *Staph. aureus* و *S. typhimurium* مقارنة بالمضادات الحيوية القياسية كما موضح في الجدول (1) والصورة (1). وهذا يتفق مع ما اشار اليه الباحث Amabeokn واخرين (24)، اذ اثبت ان للمستخلص المائي لاوراق المريمية تاثيرا تثبيطيا عاليا ضد جرثومة *Staph. aureus* . اما المستخلص الايثانولي لاوراق المريمية فقد كان تاثيره التثبيطي عاليا ضد الجرثومتين *Staph. aureus* و *S. typhimurium* مقارنة بالمضادات الحيوية القياسية الثلاث، كما موضح في الجدول (1) والصورة (2). وهذا يتفق مع دراسة Velickovic واخرين (25) ان المستخلص الايثانولي لاوراق المريمية يمتلك فعالية تثبيطية عالية ضد (5) انواع من البكتريا من ضمنها *Staph. aureus* و *S. enteritidis* و (4) انواع من الفطريات. كما اتفقت نتائج الدراسة الحلية مع ما توصل اليه الباحثان Dorman و Deans (26)، اذ بينا ان التراكيز الواطئة للزيوت الاساسية لنبات المريمية تاثيرا مضادا للعديد من الميكروبات. اما فيما يخص المركبات الزيتية المتطايرة المفصولة من جزء المستخلص الكحولي لاوراق المريمية فقد اظهر جزء المستخلص الكحولي الحاوي على Furfural و Camphor فعالية تثبيطية جيدة في جرثومة *Staph. aureus* وفعالية تثبيطية عالية في جرثومة *S. typhimurium* مقارنة بالمضادات الحيوية القياسية الثلاثة، كما موضح في الجدول (1) والصورة (3).

اما الجزء المفصول بالايثر البترولي الحاوي على مركبات و □-Pinene و Limonen و □-Pinene فقد اظهر فعالية تثبيطية جيدة في جرثومة *Staph. aureus* مقارنة بالمضاد الحيوي Amoxicillin وفعالية معتدلة مقارنة بالمضادين الحيويين Gentamycin و Tetracyclin كما موضح في الصورة (4)، وفعالية تثبيطية جيدة في جرثومة *S. typhimurium* مقارنة بالمضاد الحيوي Amoxicillin وفعالية عالية مقارنة بالمضادين الحيويين Gentamycin و Tetracyclin. كما اجرى الباحثان Miladinovic و Miladinovic (4) دراسة تم فيها تحليل الزيت الاساس لـ *Salvia officinalis* واثبت امتلاك زيت المريمية (18) مركب فعال ومن ضمنها α-thujone بنسبة (24.88%) و Camphor بنسبة (16.03%) التي ترجع اليها الفعالية البايولوجية.

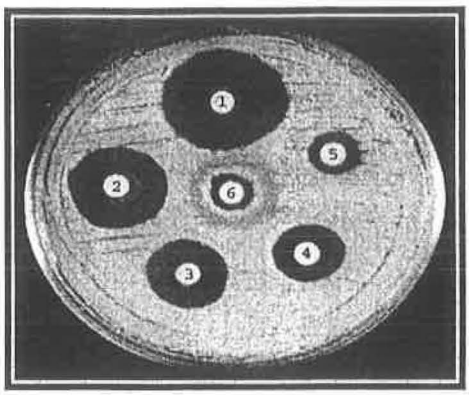
الجدول (1) الفعالية التثبيطية للمستخلصات النباتية وبعض مكوناتها الفعالة المفصولة في جرثومتي *Staph. aureus* و*S. typhimurium* مقارنة بالمضادات الحيوية القياسية (تركيز المستخلص 200 ملغم/سم^3)

نوع المعاملة		قطر دائرة التثبيط مقاسا بالملم	
		Staph. aureus	*S. typhimurium*
المستخلص المائي من اوراق المريمية		1.7±27	0.7±17.3
المستخلص الايثانولي من اوراق المريمية		3.4±25	1.3±20
المستخلص الايثرالبترولي من اوراق المريمية		1.5±20.3	1.5±17.6
المستخلص الكلوروفورمي من اوراق المريمية		1±17.5	0.7±16.3
المستخلص الاسيتوني من اوراق المريمية		1±19	1±16
الزيت الاساسي من اوراق المريمية		1.8±19	1.7±13
المستخلص الايثانولي من المريمية الحاوي على (Camphor, Furfural)		1±16	1±17
المستخلص الايثرالبترولي من المريمية الحاوي على (limonen, α-pinene, β-pinene)		1±15	1±15
المقارنة	Gentamycin	3.4±19	1±13
	Amoxicillin	1±16	0.0±15
	Tetracyclin	0.0±17	0.0±0

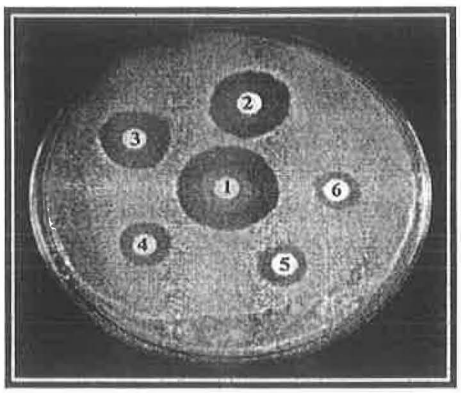
(-) تشير الى عدم وجود فعالية تثبيطية ، الارقام بعد الاشارة (±) تمثل الخطأ التجريبي ، قطر القرص (6) ملم ، معدل قطر التثبيط لثلاث عزلات لكل جرثومة

تحديد التركيز المثبط الادنى (MIC)

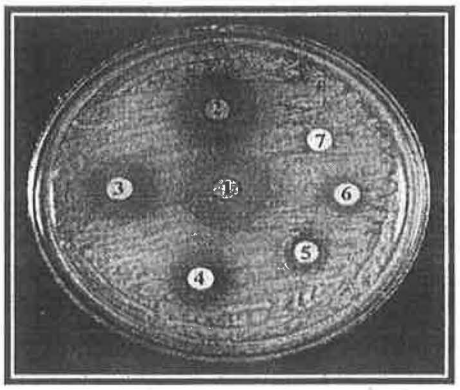
اظهرت النتائج التي تم التوصل اليها ان التركيز المثبط الادنى MIC لكل من مستخلص المائي والايثانولي والايثر البترولي والكلوروفورمي لاوراق نبات المريمية كان مساويا ل (0.03) ملغم/سم^3 في الجرثومتين *Staph. aureus* و *S. typhimurium* وكان ال MIC للمستخلص الاسيتوني في جرثومة *Staph. aureus* مساويا (0.015) ملغم/سم^3 و (0.03) ملغم/سم^3 في جرثومة *S. typhimurium*. واما في الزيت الاساسي المفصول من اوراق المريمية فقد تبين ان ال MIC كان مساويا ل (0.00033) سم^3/سم^3 في جرثومة *Staph. aureus* في حين كان مساويا (0.0005) سم^3/ سم^3 في جرثومة *S. typhimurium*. اما الجزء المستخلص الايثانولي الحاوي على مادتي Furfural و Camphor والجزء المفصول بالايثر البترولي الحاوي على المواد (β-Pinene و α-Pinene و Limonen) فقد كان ال MIC مساويا (0.06) ملغم / سم^3 في الجرثومتين قيد الدراسة.



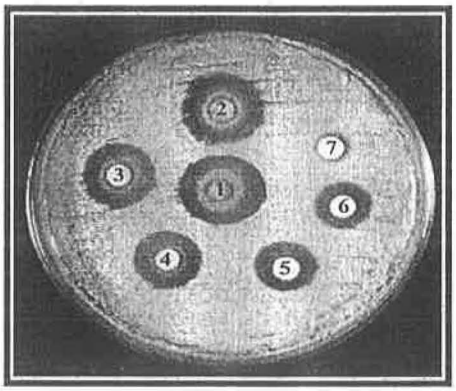
الصورة (1) تأثير المستخلص المائي من اوراق المريمية بتراكيز مختلفة في جرثومة *Staph. aureu* 1 (200 ملغم/سم^3) ، 2 (100 ملغم/سم^3) ، 3 (50 ملغم/سم^3)، 4 (25 ملغم/سم^3) ، 5 (12.5 ملغم/سم^3) ، 6 (6.25 ملغم/سم^3)



الصورة (2) تأثير المستخلص الايثانولي من اوراق المريمية بتراكيز مختلفة في جرثومة *S. typhimurium* 1 (200 ملغم/سم^3) ، 2 (100 ملغم/سم^3)، 3 (50 ملغم/سم^3)، 4 (25 ملغم/سم^3) ، 5 (12.5 ملغم/سم^3) ، 6 (6.25 ملغم/سم^3)



الصورة (3) تأثير الجزء المفصول بالايثانول الحاوي على مادتي (Camphor, Furfural) من المريمية بتراكيز مختلفة في جرثومة *Staph. Aureus* 1 (200 ملغم/سم^3)، 2 (100 ملغم/سم^3)، 3 (50 ملغم/سم^3)، 4(25 ملغم/سم^3)، 5 (12.5 ملغم/سم^3) ، 6 (6.25 ملغم/سم^3)



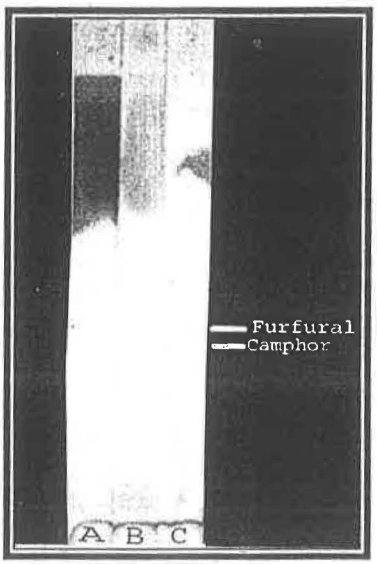
الصورة (4) تأثير الجزء المفصول بالايثرالبترولي الحاوي على (Limonen, α-pinen, β-pinene) من المريمية في جرثومة *Staph. aureus* 1 (200 ملغم/سم^3) ، 2 (100 ملغم/سم^3) ، 3 (50 ملغم/سم^3)، 4 (25 ملغم/سم^3) ، 5 (12.5 ملغم/سم^3)، 6 (6.25 ملغم/سم^3)

الكشف عن المركبات الفعالة المفصولة من نبات المريمية

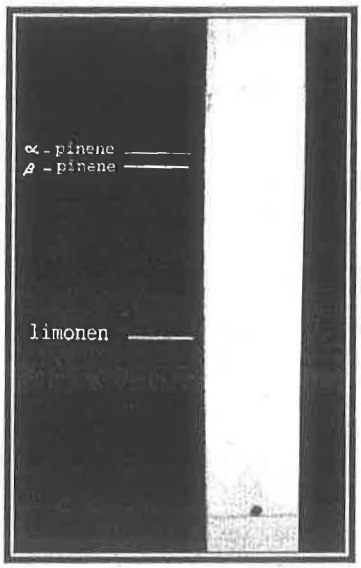
فصل وتشخيص المركبات الفعالة باستخدام تقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC)

اظهرت نتائج الكشف عن المركبات الفعالة للجزء المفصول بالايثانول من المستخلص الايثانولي من المريمية وباستخدام تقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) ظهور خمس بقع بلون اصفر-برتقالي باستخدام كاشف بخار اليود. اذ كان معدل سرعة الجريان (Rf) للبقعة الاولى مساويا تقريبا لـ (Rf = 0.38) وهي مقاربة لسرعة جريان المادة القياسية Camphor ، في حين كان معدل سرعة الجريان (Rf) للبقعة الثانية مساويا تقريبا (Rf = 0.42) وهي مقاربة لسرعة جريان (Rf) المادة القياسية Furfural . اما البقع الاخرى فكانت

بـ (Rf = 0.18) و (Rf = 0.26) و (Rf = 0.53) فلازالت مجهولة (كما موضح في الصورة 5). كما وتم التعرف على بعض المكونات الفعالة للجزء المفصول بالايثر البترولي وباستخدام تقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) بظهور اربع بقع بلون اصفر-برتقالي وباستخدام كاشف بخار اليود ايضا. اذ كان معدل سرعة الجريان (Rf) للبقعة الاولى (Rf = 0.42) وهي مقاربة لسرعة جريان المادة القياسية Limonen . اما البقعة الثانية فكانت بـ (Rf = 0.84) وهو مقاربة لـ (Rf) الـ α-Pinene . اما البقعة الثالثة فكانت بـ (Rf = 0.80) وهي مماثلة لـ (Rf) المادة القياسية β-Pinene . اما البقعة الرابعة كانت بمعدل سرعة جريان (Rf = 0.34) فلازالت مجهولة، وكما موضح في الصورة (6).



الصورة (5) البقع الظاهرة لمادتي (Camphor, Furfural) في الجزء المفصول بالايثانول من المريمية وعينة النموذج القياسية باستخدام تقنية (T.L.C) A عينة النموذج القياسية Furfural، B عينة النموذج



الصورة (6) البقع الظاهرة للمواد (Limonen, α-pinene, β-pinene) في الجزء المفصول الجزء المفصول بالايثرالبترولي من المريمية

تشخيص المجاميع الوظيفية لبعض المركبات الزيتية المتطايرة في نبات المريمية بواسطة IR

يتضح من خلال قياس طيف الاشعة تحت الحمراء (IR) للجزء المفصول من المستخلص الايثانولي الخام للمريمية باستخدام عمود هلام السليكا ظهور امتصاص عند (cm^{-1} 1732-1771) يعود الى المجموعة الايثرية (C-O-C) العائد الى مركب الـ Furfural. وعند قياس طيف الاشعة تحت الحمراء (IR) للجزء المفصول بالايثر البترولي ظهر امتصاص عند (cm^{-1} 1686) تعود الى الاصرة المزدوجة (C=O) للـ Limonen و α-Pinene و β-Pinene .

اختبار حساسية الجراثيم للمضادات الحيوية بوجود المواد الفعالة

لقد تبين ان جرثومة *Staph. aureus* اصبحت اكثر حساسية للمضادات الحيوية (TE و AX و GN) بوجود المستخلص الايثانولي الحاوي على مادتي (Camphor ، Furfural) لنبات المريمية، اذ كان تاثير المضاد الحيوي (GN) لوحده وبتركيز 10 □g/disc هو (19) ملم وتاثير المستخلص لوحده وبتركيز (200) ملغم/سم^3 (16) ملم، بينما عند دمج المضاد الحيوي المذكور مع المستخلص الايثانولي الحاوي على المواد الفعالة اصبح قطر دائرة التثبيط (23) ملم وكما موضح في الجدول (2) والصورة (7). كذلك كانت النتائج متقاربة عند استخدام المضادين (TE) و (AX) اذ ان التاثير كان اكبر عند دمج المواد الفعالة مع المضاد. كذلك الحال بالنسبة للمضاد الحيوي (TE) ، اذ اعطى قطر تثبيطي عند دمجه مع مستخلص المواد الفعالة للمريمية (20) ملم وهذا القطر اكبر مما لو استخدم المضاد الحيوي لوحده والمستخلص لوحده وكما موضح في الجدول (2) والصورة (7).

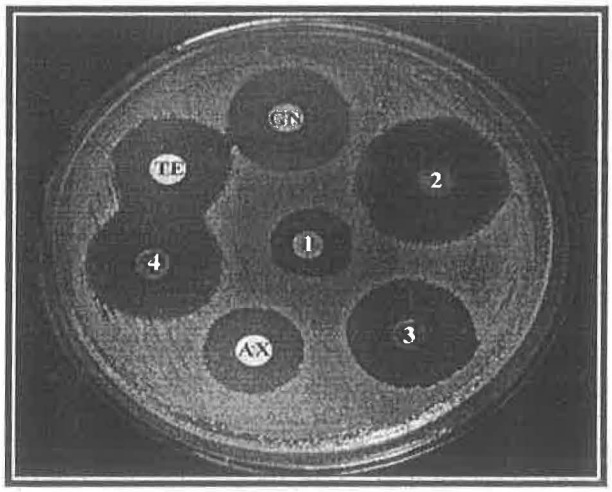
تبين مما تقدم ان هناك تآزر Synergism بين المضاد الحيوي المستخدم والمواد الفعالة لنبات المريمية، اذ ان الفعل التثبيطي ضد جرثومة *Staph. aureus* يزداد عند تواجد المواد الفعالة للمستخلص الايثانولي للمريمية والمضادات الحيوية المستخدمة جنبا الى جنب. اما تاثير المستخلص الايثانولي للمريمية الحاوي على مادتي(Camphor ، Furfural) مع مجاميع المضادات الحيوية المستخدمة في جرثومة *S. typhimurium* يلاحظ ان التاثير يكون اقل، أي حدوث حالة Antagonism وبهذا فان حساسية الجرثومة للمواد الفعالة قلت بوجود المضادات الحيوية كما موضح في الجدول (2).

لقد اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع ما توصل اليه الباحثان Pyun و Shin (18) اذ تضمنت الدراسة خلط العقار الطبي Ketoconazele (KE) مع زيت الثوم *Allium sativium* وكذلك زيت الالسين مع Ketoconazole وملاحظة التاثير البايولوجي على ثلاثة انواع من الفطريات، اذ تبين ان الفعالية البايولوجية زادت بشكل ملحوظ عند دمج العقار مع الزيت مما لو استخدم الزيت لوحده والعقار لوحده كلا على حدا.

الجدول (2) اختبار حساسية الجراثيم للمضادات الحيوية بوجود المواد الفعالة (قطر دائرة التثبيط مقاس بالملم)

مستخلصات المواد الفعالة والمضادات الحيوية			الجراثيم	
			Staph. aureus	*S. typhimurium*
1	Extract1		1±16 a	1±17 a
	Extract 1+GN		1±23 b	1±12 b
	Extract 1+AX		1±20 c	1±14 a
	Extract 1+TE		1±20 c	-
	المقارنة control	GN	3.4±19 a	1+13 b
		AX	1±16 a	0+15 a
		TE	0±17 a	-

- Extract1 : جزء المستخلص الايثانولي للمريمية بعد الفصل بالعمود الكروماتوغرافي الحاوي على (Camphor, Furfural) بتركيز (200) ملغم/سم^3
- Gentamycin (10) µg/disc : GN
- Amoxicillin (25) µg/disc : AX
- Tetracyclin (30) µg/disc : TE
- (-) : تشير الى عدم وجود فعالية تثبيطية



الصورة (9) تأثير المستخلص الايثانولي الحاوي على مادتي (Camphor, Furfural) في المريمية المتآزرة مع المضادات الحيوية الجنتامايسين (GN) ، اموكسيلين (AX) ، تتراسايكلين (TE) في جرثومة *Staph aureus*

1 المستخلص الايثانولي الحاوي على (Camphor, Furfural) (200 ملغم/سم^3)

2 المستخلص الايثانولي الحاوي على (Camphor, Furfural) (200 ملغم/سم^3) + GN

3 المستخلص الايثانولي الحاوي على (Camphor, Furfural) (200 ملغم/سم^3) + AX

4 المستخلص الايثانولي الحاوي على (Camphor, Furfural) (200 ملغم/سم^3) + TE

10µg/ disc ← GN

25µg/ disc ← AX

المصادر

1. Loir, Y.L., Baron, F. and Gautier, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. Genet. Mol. Res., 2(1): 63-76, 2003.
2. Carson C.E. and Riley T.V., Commun. Dis. Intell., 27: 143-146, 2003.
3. Delamare A.P.L., Moschen-Pistorello I.T., Srtico L., Atti-Serafinin L.A. and Echeverrigavay S., Antibacterial activity of the essential oils of Saliva officinalis L. and Salvia traloba L. cultivated in South Brazil. Food Chem., 100: 603-608 (The research will be published in 2007).
4. Miladinovie D. and Miladinovic L., Antimicrobial activity of essential oil of Sage from Serbia. Phys. Chem. Technol., 2(2): 97-100, 2000.
5. Keville K. and Green M., Aromatherapy materia medica. A complete guide to the healing art, Crossing Press, 1995.
6. Fyfe L., Armstrong F. and Stewart J., International J. Antimicrobial Agents, 9(3): 195-199, 1998.
7. Bauer W., Kirbay W.A.A., Sherris J.I. and Turk M., Am. J. Clin. Pathol., 45: 493-496, 1966.
8. Riose J.L., Recio M.C. and Villar A., J. Ethnopharmacology, 21: 139-152, 1987.
9. Grand A., Woundergen P.A., Verporte R. and Pousset J.L., J. Ethnopharmacology, 22: 25-31, 1983.
10. Verporte R., Tginastoi A., Vandoorn H. and Svendsen A.B., J. Ethnopharmacology, 5: 221-226, 1982.
11. Al-Daody A.Ch., Ph.D. Thesis, College of Science, University of Mosul, 112-113, 1998.
12. Harborne J.B., Phytochemical Methods. Chapman and Hall Ltd., New York, USA, 1973.
13. Kirchner, Thin Layer Chromatography. 2nd ed, 1978.
14. Silverstein R.M., Bassler G.C. and Morill T.C., Spectrometric identification of organic compound. 4th ed., John Wiley and Sons, USA, 1981.
15. El-Kady I.A., Al-Maraghy S.S. and Mohammed E.M., Qatar Univ. Sci. J., 13(1): 63-69, 1993.
16. Djipa C.D., Delmee M. and Quetinleclerca J., J. Ethnopharmacology, 71: 307-313, 2000.
17. Iwalokun B.A., Gbenle G.O., Adewole T.A. and Akinsinde K.A., J. Health Popul. Nutri., 19(4): 331-335, 2001.
18. Pyun M.S. and Shin S., Phytomedicine, 13: 394-400, 2006.

19. Rhee G.J. and Kim E.H., Yakhak Hoeji, 43: 716-728, 1999.
20. Koneman E.W., Allen S.D., Janda W.M., Schrechenberg P.C. and Winn W.C., Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th ed., J.B. Lippincott Com., Philadelphia, New York, 1997.
21. الحليم، صبا مؤيد سليمان. التأثير التثبيطي لعدد من النباتات الطبية وبعض مكوناتها الفعالة في بعض انماط السالمونيلا المعزولة من المرضى المصابين بالاسهال. رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة الموصل، العراق، 2001.
22. Bennett, R.W. Atypical toxigenic *staphylococcus* and non *staphylococcus aureus* species on the horizon, An update, J. Fd. Prot., 59: 1123-1126, 1996.
23. Vandepitte J., Engback K., Piot P. and Heuk C., Basic Laboratory Procedures in Clinical bacteriology. World Health Organization, Geneva, 1991.
24. Amabeoku G.J., Eagles P., Scott G., Springfield E.P. and Mayeng I., J. Ethnopharmacology, 75(213): 117-124, 2001.
25. Velickovic D.T., Randjelovic N.V., Ristic M.S., Velickovic A.S. and Smelcerovic A.A., J. Serb. Chem. Soc., 68(1): 17-24, 2003.
26. Dorman H.J.D. and Deans S.G., J. Appl. Microbiol., 88: 308-316, 2000.