التاثيرات البايولوجية لمستخلصات اوراق نبات الآس *Myrtus communis* والزيت الاساس Essential oils في بعض انواع الجراثيم المعزولة من جسم الانسان

شيماء غازي يونس   عبد الرزاق خضر محمود

قسم علوم الحياة – كلية التربية –جامعة الموصل- العراق

الخلاصة

تم اختبار الفعالية التثبيطية لمستخلصات اوراق نبات الاس *Myrtus communis* التي تضمنت المستخلص (المائي، الايثانولي، الاستوني، الايثر البترولي، والكلوروفومي) بالاضافة الى الزيت الاساس Essentia oils لاوراق النبات الذي تم فصلة باستخدام التقطير البخاري Steam Distillation Apparatus في تثبيط نمو بعض البكتريا الممرضة وباستخدام اختبار الحساسية Sensitivity tesst وتضمنت كل من بكتريا *Escherichia coli* و*Pseudomonas aeruginosa* و*Staphylococcus aureus* والتي عزلت من مستشفى ابن سينا التعليمي وابن الاثير للاطفال باستخدام اوساط انتخابية وتم تشخيصها باستخدام الفحص المجهري والاختبارات الكيموحيوية. أظهرت النتائج امتلاك جميع المستخلصات فعالية تثبيطية تجاه الجراثيم الموجبة والسالبة وباقطار تثبيط متباينة تبعاً لنوع المستخلص وطبيعة المكونات الفعالة والتدرج بالتركيز. وامتلك المستخلص الكحولي اعلى فعل تثبيطي على الجراثيم مقارنة بالمستخلصات الاخرى اما الزيت الاساس فاظهر فعالية تثبيطية لكل من البكتريا الموجبة والسالبة الان تاثيره كان اعلى في الجراثيم الموجبة وبجميع التراكيز المستخدمة.

الكلمات المفتاحية: التأثير البايولوجي لـ *Myrtus communis L*، الزيوت الاساسية لنبات الآس.

Bioeffect of *Myrtus commmunis* leaves Extracts and the Essential Oil on Some Microrganis Isolated from human

Shaimaa Ghazi Younis Al-Ma'adydi   Dr.Abdul-Razzak Khidher Mahmood

Biology department / college of education of pure science / University of Mosul

Received 8 April 2015   ; Accepted 16 August 2015

التاثيرات البايولوجية لمستخلصات اوراق نبات الآس *Myrtus communis* والزيت الاساس

Essential oils في بعض انواع الجراثيم المعزولة من جسم الانسان

شيماء غازي يونس   عبد الرزاق خضر محمود

Abstract

The inhibition activity was tested for the extracts of *Myrtus communis* leaves which included the extract(aqueous, ethanol, acetonic, petroleum ether, chloroformic)as well as the essential oils for the leaves isolated by distillation apparatus steam in the growth some pathogenic kinds of bacteria and by using Sensitivity tests including *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus aureus* which were Isolated from patient attendance to the Ibn-Sina Teaching hospital, Ibn-Al-Ather hospital for children. The micro-organis were isolated by using selective media and were diagnosed by microbiologcal method and the biochemical tests.The results indicated that all the extracts possessed prohibition activity towards the positive and negative germs with various prohibition diameters according to the kind of extract,and the nature of the effective components, and focus gradation. The alcoholic extract showed higher prohibition activity on the germs compared to the other extracts. The essential oil showed prohibition activity for both positive and negative bacteria, but its effect was higher on the positive micro-organis - in all used concentrations.

Key words: Biological effect of *Myrtus communis L*, Essential oils for *Myrtus communis*.

المقدمة

ان اكتساب صفة المقاومة للجراثيم الموجبة والسالبة لصبغة كرام للعديد من المضادات الحيوية تعد من المشاكل الرئيسة للعلاج ضد الاصابات البكتيرية، وهذا شجع العديد من الباحثين الى اكتشاف طرق اخرى للعلاج غير المضادات.

ومن هذه البدائل هي النباتات الطبية وما تحوية من مكونات فعالة مضادة للجراثيم مثل الفينولات phenols والقلويدات Alkaloids والفلافونيدات Flavonids والزيوت الاساسية Essential oil والكلايكوسيدات Glycosides والعفصيات Tannins وغيرها من المواد الطبيعية التي امتازت بقلة التاثيرات الجانبة والنقاوة العالية والتي تم التاكد من جدارتها في علاج الاخماج الجرثومية فضلا عن انه لا توجد بحوث تؤكد امكانية الجراثيم على اكتساب صفة المقاومة لمثل هذه المكونات الفعالة [4]. لذا فان اغلب دول العالم اخذت في الاونة الاخيرة تلجا الى النباتات الطبية وجعلها مصدرا رئيسياً للحصول على المستحضرات لما تحتوية من مكونات فعالة مضادة لعمل الجراثيم. ومن هذه النباتات الطبية هو نبات

التاثيرات البايولوجية لمستخلصات اوراق نبات الآس *Myrtus communis* والزيت الاساس

Essential oils في بعض انواع الجراثيم المعزولة من جسم الانسان

شيماء غازي يونس عبد الرزاق خضر محمود

الاس *Myrtus communis* الذي يعد من النباتات الواسعة الانتشار في العالم فقد استخدمت مستخلصات النبات المختلفة في علاج العديد من الامراض الجرثومية لما تمتلكه من مكونات فعالة جعلتها ذات قيمة غذائية صيدلانية من قبل المستهلك [5] فقد استخدم مستخلصات الاوراق في علاج قرحة المعدة Ulcer والسعال Cough وكمادة معقمة للعمليات بشكل مطهر Disinfectant كما استخدم النبات لعلاج حالات التهاب اللثة والاسنان وكغسول للفم واشارت دراسة الباحث [6] بان مستخلصات اوراق الاس مفيدة في علاج امراض الدماغ وبشكل خاص الصرع epilepsy وامراض المعدة diseases stomach وامراض الكبد liver diseases وامراض الروماتزم Rheumatism وعلاج الاكزما eczema واضطراب الرئة pulmonary disorders والتهاب الجيوب الانفية sinusitis وعلاج تساقط الشعر hair full والتهاب القصبات التنفسية الحاد chronic bronchitis وعلاج الخراجات abscess وفرط سكر الدم hyperglycemic وان مستخلصات اوراق نبات الاس ماتزال تستخدم كغسول للقناة التناسلية كمادة مطهرة Disinfectant من الجراثيم [7]. وتعود فعالية مستخلصات اوراق النبات على لجراثيم الى وجود العديد من المكونات الفعالة مثل التانينات (Tannins والفلافونيدات Flavonoids ومادة myrtucommulone A & B وGalloyl-glucosides وEllagitannins وCaffeic و gallic acid and ellagic acid) وتعتبر الزيوت الاساسية Essential Oils التي تم استخلاصها من الاوراق من اهم المكونات الفعالة والتي استخدمت بشكل رئيسي لعلاج الجهاز التنفسي واضطراب الرئة Lung Disorders [8]

اهمية البحث واهدافه:

تكمن اهمية البحث في اختبار الفعالية التثبيطية لمستخلصات اوراق نبات الاس *Myrtus communis* والزيت الاساس Essential oil في كل من بكتريا *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa* و*Staph aureus* بهدف التعرف على اهمية مستخلصات الاوراق وزيتها الاساس بوصفها مواد فعالة بايلوجية وبديلة للمضادات الحيوية في معالجة الامراض الجرثومية لذا في السنوات القادمة سوف يتم التركيز على العمليات الايضية للنبات وغيرها من الاشكال المتطايرة والتي ستصبح جزء من الادوية المعتمدة للطبيب المعالج لغرض العلاج

المواد وطرق العمل

1 جمع العينات Collection of Samples:-

تم جمع 200 عينة من مناطق عزل مختلفة لجسم الانسان من مستشفى ابن الاثير ومستشفي ابن سيناء التعليمي ابتداء من الفترة الزمنية 15-8-2013 من شهر اب ولغاية

20-11-2013 من تشرين الثاني. تضمنت عينات لمناطق مختلفة من جسم الانسان ومن كلا الجنسين وبمختلف الاعمار وتم ملئ استمارة استبيان المريض. واستخدم وسط نقيع المخ والقلب

Brain heart infusion broth كوسط ناقل للعينات لحين وصولها للمختبر وبفترة زمنية لا تتجاوز ثلاث ساعات ثم حضنت المزارع في درجة حرارة 37م° ولمدة 24 ساعة.

2. زرع وعزل الجراثيم isolation and identification of micro-organis

تم زرع عينات (الدم ،الادرار،مسحات الجروح، والخروج) على اطباق حاوية على وسط اكار الدم (Blood Agar) ووسط اكار الماكونكي (Mac Conkey-Agar) وحضنت بالحاضنة بدرجة 37°م ولمدة 24 ساعة وبعد ظهور النمو تم اختيار المستعمرات المفردة ذات الموصفات المطلوبة واعيد زراعة كل عينة على وسط (Eiosin-Methylene-Blue) لعزل بكتريا (*E.coli*) والتى تعطي بريق معدني بالون اخضر عند زراعتها على هذا الوسط وكذلك زرع العينات على وسط المانيول الملحي لعزل البكتريا (*Staphylococcus aureus*) التى تظهر بشكل مستعمرات ذهبية على هذا الوسط، كما تم زرع العينات على وسط (Pyocyanosel Agar) لعزل بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* ووزعت العينات لاكثر من مرة لغرض الحصول على مزارع نقية بعد ذلك تم نقلها الى موائل وسط اكار المغذي وبعد التحضين حفظت العينات في الثلاجة بدرجة 4°م لحين استخدامها في الدراسة لاجراء الاختبارات الكيموحيوية التشخصية.

3. التشخيص Identification:-

تم الاعتماد على الصفات المزرعية والفحص المجهري والاختبارات الكيموحيوية لتشخيص العزلات الجرثومية .حيث تم تشخيص العينات اولاً بملاحظة الصفات العامة للمستعمرات النامية من حجم المستعمرات وارتفاعها وحافاتها ولونها، وتم بعد ذلك تحضير مسحات (اغشية) صبغت بصبغة كرام لملاحظة شكل الخلايا وترتيبها وقابلية اصطباغها بصبغة كرام .

4. جمع وتصنيف النبات المستخدمة في الدراسة:-

تم جمع اوراق نبات الاس *Myrtus Communis* من الحدائق المنزلية بعد ذلك تم غسل الاورق وتجفيفها في الظل بوضعها على اوراق ترشيح كبيرة ومعقمة وفي مكان مناسب وتيار هوائي وبدرجة حرارة الغرفة واجريت عليها عملية التقليب بصورة مستمرة لعدم تعفها او اصابتها بامراض فايروسية اوبكتيرية ثم جمعت في اكياس ورقية جافة وخزنت في ظروف خالية من الرطوبة لحين استخدامها وتم التحقق من تصنيفها في كلية العلوم/ جامعة الموصل.

5. تحضير المستخلفات المائية Preparation of Aqueous Extracts:-

اعتمد طريقة [9] في تحضير المستخلص المائي، اذ تم سحق العينة النباتية بواسطة جهاز طاحونة كهربائية ووزن (40) غم من المسحوق النباتي Plant Power ومزج في

(160) سم^3 من الماء المقطر المعقم بنسبة (4.1) وزن:حجم، ثم مزج النموذج باستخدام جهاز سحق Blender داخل حمام ثلجي ولمدة ساعة واحدة، ثم وضع في الثلاجة لغرض النقع ولمدة(24)ساعة، رشح المزيج بواسطة قمع الترشيح

وباستخدام ورق الترشيح (Whatmann No:1)، ثم ناخذ بعد ذلك الراشح Filterate وتجفف بالتجميد تحت ضغط مخلخل باستخدام جهاز التجفيد Lyophilizer المجهز من شركة (Edwards) ثم حفظت العينات المجففة بالتجميد لحين استخدامها.

6. تحضير المستخلصات الكحولية الخام

Preparation of crude ethanolic extracts

اتبعت طريقة [10] في تحضير المستخلص الايثانولي وذلك بإذابة (40) غم من المسحوق النباتي في (400)سم^{3}من كحول الايثانول بتركيز (95%) داخل حمام ثلجي وباستخدام جهاز Sterrier ولمدة (5-6) ساعات ثم ترك المزيج في الثلاجة لمدة (24) ساعة للنقع، ثم رشح خلال قمع لترشيح، واخذ الراشح وثم تبخير الايثانول باستخدام جهاز المبخر الدوار Rotary Vaccume Evaporator اذ يتم تبخير المذيب تحت ضغط مخلخل ودرجة حرارة لاتزيد عن (40)°م تؤخذ الطبقة المتكونة من المستخلص الخام بعد التبخير وتحفظ بالتجميد في قناني زجاجية معقمة ذات غطاء محكم لحين استخدامها في الدراسة.

7. تحضير المستخلصات النباتية باستخدام جهاز الاستخلاص المستمر

Perparation of Some Plant Extracts Using Soxhlet

تم وضع (50) غم من المسحوق النباتي داخل الثميل Thumble في الجهاز الاستخلاص المستمر Soxhet وباستخدام (500)سم^3 من كل مذيب عضوي مستخدم.

تم اختيار ثلاثة مذيبات عضوية متفاوتة بالقطبية في استخلاص مكونات النبات وهي على التوالى الاثير البترولي (40-60)°م، الكلورفوم (62)°م والاسيتون (60)°م تم الاستخلاص بمعدل (10)ساعات يوميا، اذ تستمر عملية الاستخلاص الى ان يصبح المذيب المستخدم والذي يخرج من الثمبل Thumble عديم اللون، ثم يوضع المذيب الثاني ويبدأ الاستخلاص بنفس العملية وتكرر على جميع المذيبات المستخدمة وعلى نفس النموذج النباتي ويتم التخلص من المذيب باستخدام جهاز المبخر الدوار وبدرجة حرارة (40)°م.ثم تؤخذ الطبقة المتكونة وتحفظ في قناني محكمة الاغلاق وتحفظ في الثلاجة لحين استخدامها [1].

8. استخلاص الزيت الاساس من نبات الاس:- Extraction of Essential oils from Myrtle

تم اعتماد طريقة الباحث [11] وذلك باستخدام جهاز التقطير البخاري Steam Distillation Apparatus أذ تم مزج (100) غم من المسحوق النباتي المطحون جيدا لاوراق نبات الاس مع (2) لتر من الماء المقطر في دورق سعته (2.5) لتر والبدء بالفصل بالتقطير البخاري وبعد جمع الزيت الذي كان مذاباً بالماء المقطر تم فصلة عن الماء بواسطة الايثر في قمع الفصل وتم الحصول على الزيت بعد تبخير الايثر.

9. تحضير وتعقيم المستخلصات المائية:-

تم تعقيم المستخلص المائي لنبات الاس بعد تحضير التركيز (200)ملغم/سم^3 وذلك بوزن (1) غم من المستخلص المائي الجاف واذابتة في (5) سم^3 من الماء المقطر، اذ عقم المستخلص بتمريرة خلال المرشحات الغشائية Membrane Filter من نوع (0.22) مايكرون واعتبر هذا التركيز هوالاساسي والذي حضرت منة التركيز المتسلسلة للمستخلص [2].

10 . تحضير وتعقيم المستخلصات الايثانولية والعضوية والزيت الاساس لنبات الاس:-

تم تحضير التركيز (200) ملغم/سم^3 من المستخلص الايثانولي، الايثر البترولي الكلوروفومي، الاسيتوني وذلك باذابة (1) غم من كل مستخلص في (5) سم^3 من مادة Dimethyl Sufoxide (DMSO) ثم عقم المزيج بطريقة البسترة بدرجة (62)°م ولمدة (10-15) دقيقة وبهذا تم الحصول على التركيز القياسي والمعتمد في تحضير التخافيف المتسلسلة للمستخلصات [2-12]

اما الزيت الاساسي المفصول من اوراق نبات الاس تم تعقيمة باستخدام المرشحات الغشائية (0.22) مايكرون بعد اذابة (1) سم^3 من الزيت في (5)سم^{3}من مادة Ethylene glycol وبهذا تم الحصول على الزيت المعقم والمعتمد في تحضير التخافيف المتسلسلة [13].

11. اختبار الفعالية التثبيطية للمستخلصات النباتية والزيت الاساس لنبات الاس:-

تم استخدام طريقتين لاختبار حساسية الجراثيم للمستخلصات النباتية وهي:-

- طريقة اختبار الحساسية (الانتشار بالاقراص) Sensitivity test method
- طريقة اختبار قياس العكارة Turbidity test method

1.11. طريقة اختبار الحساسية (الانتشار بالاقراص) Sensitivity test method

اعتمدت طريقة الباحث [14] في اختبار الحساسية وذلك بنقل (3-5) مستعمرات فتية للجراثيم المدروسة الى وسط المرق المغذي وتحضينها بدرجة حرارة (37)°م ولمدة (18-24) ساعة وبعد ذلك يعمل تخفيف للعالق الجرثومي النامي

باستخدام المحلول الملحي الفسلجي Normal Saline وبالمقارنة مع انبوب السيطرة القياسي لمحلول ماكفرلاند الذي يعادل (10^8) خلية /سم^3 ثم ينقل (0.1)سم^3 من العالق الجرثومي المخفف الى وسط الاكار المغذي Nutrient Agar ونشرها على سطح الوسط بشكل متجانس باستخدام مسحة قطنية معقمة Cotton Swab وتحضن لمدة (30) دقيقة وبدرجة حرارة (37)°م لغرض التشرب في هذه الاثناء يتم اعداد الاقراص المشبعة بالمستخلصات النباتية الخام اذا يتم تحضير اقراص من ورق ترشيح نوع (Watmann No.1) وبقطر (6) ملم واضافة (0.1)سم^3 من كل تركيز (200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125)ملغم /سم^3 من المستخلصات النباتية و(0.2،0.1 ، 0.066، 0.05، 0.04، 0.033، 0.028) سم^3/سم^3 من الزيت الاساس الى قنينة حاوية على (10)اقراص معقمة ثم يتم تثبيت الاقراص المشبعة بالتراكيز المختلفة بواسطة ملقط معقم على وسط الاكار المغذي وتحضينها في درجة حرارة (37)°م ولمدة (14-16) ساعة يتم قياس منطقة التثبيط اوحزام التثبيط باستخدام مسطرة مدرجة وتسجيل النتائج .

2.11. طريقة اختبار العكارة:- Turbidity test method

اختبرت حساسية الجراثيم للمستخلصات النباتية والمكونات الفعالة عن طريق قياس العكارة اذ تم اضافة (0.1)سم^3 من المستخلص النباتي اوالمكونات الفعالة وبتراكيز مختلفة الى انابيب حاوية على (9.8) سم^3 من وسط المرق المغذي المعقم ثم يتم تلقيح الوسط بـ (0.1)سم^3 من العالق الجرثومي وبتركيز (10^8) خلية/سم^3 وبمعدل ثلاثة مكررات لكل تركيز، وحضنت بدرجة حرارة (37)°م ولمدة (14-16)ساعة بعد ذلك يتم قياس العكارة باستخدام جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer من نوع (SERIESCECTL CE 1021, 1000) وعند طول موجي (595) نانوميتر، وحدد مدى تاثير المستخلصات النباتية والمكونات الفعالة على نمو الجراثيم بالمقارنة مع عينة السيطرة المكونة من (9.8) سم^3 من المرق المغذي و(0.1) سم^3 من المذيب المستخدم لاذابة المستخلص او المكونات الفعالة و(0.1)سم^{3}من العالق لجرثومي وبتركيز(10^8)خلية/سم^3. [15]

12. تحديد التركيز المثبط الادني Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

تم تحديد التركيز المثبط الادنى للمستخلصات اوراق نبات الاس والزيت الاساس والتى تمثل اعلى تخفيف للمستخلص يمنع نمو الجراثيم وذلك باستخدام اختبار العكارة اذ حضرت التراكيز (3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 ملغم /سم^3 من كل مستخلص اما الزيت الاساس فكانت تراكيزه (5: 1, 10: 1, 15:1, 20 1, 25: 1, 30: 1, 35: 1 سم^3/سم^3، حيث اضيف (0.1)سم^3 من كل تركيز الى انبوبة حاوية على (9.8) سم^3 من المرق المغذي المعقم ولقح بـ (0.1)سم^3 من العالق الجرثومي بتركيز (10^8) خلية /سم^3 وحضنت الانابيب بدرجة حرارة (37)°م ولمدة (14-18) ساعة ثم قيست العكارة باستخدام جهاز المطياف الضوئي وبالمقارنة مع عينة السيطرة المكونة من (9.8) سم^3 من المرق المغذي و(0.1) سم^3 من المذيب المستخدم لاذابة المستخلص اوالمكونات الفعالة و(0.1) سم^3 من العالق الجرثومي بتركيز (10^8) خلية /سم^3 [16].

النتائج والمناقشة

1. جمع وعزل العينات Collection and isolation of Samples

اظهرت النتائج وجود 150 عزلة اظهرت النمو البكتيري على الاوساط الانتخابية Slective Media وبنسبة 75% واهملت العينات التي لم تظهر نموا على هذه الاوساط. وبلغ العدد الاجمالي للعزلات الجرثومية الخاصة بجرثومة (*E.coli*) 70 عزلة وبنسبة 46.6% والتي تم زراعتها على وسط Eiosin methylene Blue (EMB) بعد نقلها من وسط الـ Macconkey Agar وتضمنت(27) عزلة من Diarrhea وبنسبة (38.5%) و(25) عزلة من الادرار Urine وبنسبة (35.7%) و(18) من الدم Blood وبنسبة (25.7%). اما جرثومة *Staph.aureus* فبلغ عددها (50) عزلة وبنسبة (33.3%) وتضمنت (19)عزلة من الجروح Wound و(18) عزلة من الادرار Urine و(13)عزلة من الدم Blood وبنسبة (38%) و(36%) و(26%) على التوالي. والتي تم زراعتها على على وسط Mannitol -Salt -Agar بعد نقلها من وسط Blood Agar واعطت النتيجة الموجبة لاختبار التجلط Coagulase.

اما بالنسبة لجرثومة *Pseudomonas aeruginosa* فبلغ العدد الاجمالي لها (30)عزلة وبنسبة (20%) والتي اظهرت انتاج الصبغة على وسط Pyocyanosel Agar بعد زراعتها على وسط Nutrient Agar وتضمنت (18) عزلة من الجروح Wound بنسبة 60% و(8)عزلات من الادرار Urine بنسبة (26.6%) و(4) عينات من الدم Blood بنسبة (13.3%) ويشير الجدول (1) الى الانواع الجرثومية ومناطق عزلها ونسبتها المئوية حيث لوحظ بان جرثومة *E.coli* تشكل النسبة الاكبر من بين العزلات وتليها جرثومة *Staph.aureus* ثم *Pseudomonas aeruginosa* واتفقت هذه النتائج مع دراسة [3] في مدينة الموصل لاصابات القناة البولية بكون جرثومة *E.coli* هي المسبب الاكثر شيوعاً من بين العزلات التي تم عزلها لمناطق مختلفة من الجسم.ويعود ذلك الى عوامل الفوعة الخاصة بهذه الجرثومة أو وبائية النمط وطبيعة حاملي المرض وطبيعة العلاج.واشارت الدراسة الحالية بان اعلى نسبة لجرثومة *E.coli* تم عزلها من حالات اسهال الاطفال Diarrhea دون الثالثة من العمر ووصلت نسبنها 38.5% وقد يعود السبب في ذلك الى عدم تكامل الجهاز المناعي لدى الاطفال الذي سبب الاصابة بجرثومة الايشريكية القولونية الممرضة للامعاء Enteropathogenic *coli* *Escherichia* (EPEC) اوقد يعود السبب الى تزايد الاعتماد على الرضاعة الصناعية.

الجدول (1) الاعداد والنسب المئوية للجراثيم قيد الدراسة ومناطق عزلها المختلفة من جسم الانسان

PS.AERUGINOSA		*S.AUREUS*		*E.COLI*		الانواع الجرثومية
النسبة المئوية	العدد	النسبة المئوية	العدد	النسبة المئوية	العدد	منطقة العزل
---	---	---	---	38.5%	27	**Diarrhea**
60%	18	38%	19	---	---	**Wound**
26.6%	8	36%	18	35.7%	25	**Urine**
13.3%	4	26%	13	25.7%	18	**Blood**
20%	30عينة	33.3%	50عينة	%46.6	70عينة	المجموع
150						

--- (تشير الى عدم عزل الجرثومة من تلك المنطقة)

2. التشخيص Identification

كانت نتائج الاختبارات الشكلية والكيموحيوية مطابقة لما ورد في انظمة التشخيص المعتمدة [17-18] وكما موضح في الجدول (2).

الجدول (2) نتائج الإختبارات الكيمياحياتية والفسلجية المستخدمة في تشخيص الجراثيم قيد الدراسة

الإختبارات / الجراثيم	صبغة كرام	IMVC				Oxidase	Catalase	Coagulase	Urease	Mannitol salt agar	Gelatinase	DNAase	تحلل الدم التام	أختزال الامين من الحامض الاميني الفنيلال الانين	TSIS/B/H_2S	اختبا ر الحركة	أنتاج الصبغة	إختبار تخمر السكريات					
		I	M R	V P	C													كلوكوز	لاكتوز	ما نتول	سكروز	رايبوز	ما لتوز
E.coli	–	+	+	–	–	–	+	– –	–	– –	–	– –	–	–	A/ A-	+	+	+	+	+	+	+	+
Staph.aureus	+	–	+	+	D	_	+	+	D	+	+	+	+	––	A/ A-	–	– –	+	+	+	+	d	+
PS.aeruginosa	–	–	–	–	+	+	+	– –	–	– –	+	– –	+	––	AI K/A IK-	+	+	+	–	–	–	–	–

(+) موجبة للإختبار   (A) تشير الى الوسط الحامضي

(–) سالبة للإختبار   (AIK) تشير إلى الوسط القاعدي

(d) متغايرة للإختبار   -- لم يجرى الإختبار

3. تاثير المستخلصات النباتية والزيت الاساس oil Essential لنبات الاس في جرثومة *E.coli* و*Staph.aureus*و*Ps.aeruginosa* مقارنة بالمضادات الحيوية القياسية:

يوضح الجدول (3) الفعالية التثبيطية لمستخلصات النبات وزيتة الاساس ضد الجراثيم المدروسة مقارنة بالمضادات القياسية. أظهر نتائج الدراسة الحالية بان المستخلص المائي لاوراق نبات الاس حساسية عالية على الجرثومتين *E.coli* و*Staph.aureus* مقارنة بالمضادات الحيوية القياسية NV وNOR وCN TE وحساسية جيدة مقارنة مع مضاد السيطرة القياسي CIP اما جرثومة *Ps.aeruginosa* فقد اعطى المستخلص المائي حساسية عالية على الجرثومة مقارنة مع جميع المضادات الحيوية القياسية ويعزى سبب تاثير المستخلص المائي لنبات الاس على الجراثيم الى احتواءة على عدد من المواد الفعالة الذائبة في الماء والتي الها قابلية الانتشار وقابلية النفاذ خلال الجدار الخلوي للجراثيم. اما المستخلص الايثانولي فقد أظهر تفوقاً في تاثيره على الجراثيم المدروسة مقارنة مع المستخلصات الاخرى للنبات فقد أظهر حساسية عالية على جميع الجراثيم قيد الدراسة مقارنة بالمضادات الحيوية القياسية NV وNOR وCN TE وحساسية جيدة مقارنة بالمضاد الحيوي CIP وقد اظهرت الدراسة التي قام بها [12] بان المستخلص الايثانولي لاوراق النبات فعالية تثبيطية ضد الجراثيم *Strepto.pyosgene Staph.aureus ,Ecoli* واشار بان الفعالية المضادة للجراثيم التي يمتلكها نبات الاس تعود الى وجود الفينولات والفينولات المتعددة والتي تعمل على مسخ البروتينات وايقاف فعل الانزيمات المسؤولة عن سلسلة من التفاعلات الايضية وبذلك يفقد الكائن المجهري حيويته. اما بالنسبة لتاثير للمستخلص الاستوني والكلوروفومي على الجرثومتين *E.coli* و*Staph.aureus* فقد تبين ان كلا المستخلصين فعالية تثبيطية عالية على الجراثيم مقارنة بالمضادات الحيوية NV وNOR وCN TE وحساسية جيدة مقارنة مع المضاد الحيوي CIP اما جرثومة *Ps.aeruginosa* فقد اعطى المستخلص فعالية تثبيطية عالية مقارنة مع جميع المضادات الحيوية القياسية وقد اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع دراسة [19] ان المستخلصات الكلوروفومية والاستونية والايثانولية لنباتات العائلة الاسية Myrtaceae من ضمنها نبات الاس واليوكالبتوس فعالية تثبيطية تجاه الجراثيم الموجبة والسالبة لصبغة كرام من ضمنها بكتريا *Staph.aureus*. أما المستخلص الايثربترولي فاظهر حساسية عالية في جرثومة *E.coli* مقارنة مع المضادات الحيوية القياسية NV وNOR وTE وحساسية جيدة على الجرثومة مقارنة بالمضاد CN وحساسية معتدلة مقارنة بمضاد السيطرة القياسية CIP اما بالنسبة لجرثومة *Staph.aureus* فاظهر المستخلص فعالية تثبيطية عالية مقارنة مع المضادات الحيوية القياسية NV وNOR وCN TE وحساسية جيدة مقارنة بالمضاد CIP اما في جرثومة *Ps.aeruginosa* فقد اظهر المستخلص فعالية تثبيطية عالية على الجرثومة مقارنة بجميع المضادات الحيوية القياسية ويعزى الفعل التثبيطي الى قدرة المستخلص البترولي على اذابة العديد من المواد الفعالة الموجودة في النبات.

اما بالنسبة للزيت الاساس لاوراق نبات الاس فاظهر حساسية عالية في الجرثومتين *E.coli* و*Ps.aeruginosa* مقارنة بالمضادات الحيوية NV وNOR وCN TE وحساسية جيدة مقارنة بالمضاد الحيوي CIP اما بالنسبة لجرثومة *Staph.aureus* فقد اظهر الزيت الاساس فعالية تثبيطية عالية مقارنة مع جميع المضادات الحيوية القياسية.اذ ان الزيت الاساس كان اكثر تاثيراً على جرثومة *Staph.aureus* مقارنة مع الجراثيم السالبة المستخدمة. واتفقت هذه النتائج مع دراسة [20] اذ بين ان الزيت الاساس كان لة تاثيراً تثبيطياً عاليا ًضد جرثومة *Staph.aureus* مقارنة مع جرثومة *Ps.aeruginosa* وبشكل عام اثبتت العديد من الدراسات ان البكتريا السالبة لصبغة كرم اكثر مقاومة لتأثير مستخلصات النباتات الحاوية على الزيوت الاساسية ويعزى ذلك التركيب الخارجي للغشاء الخلوي المتكون من الدهون الفوسفاتية غير النفاذة للتراكيب المحبة للدهون [8].

واشارت الدراسات [21- 22] بان الزيوت الاساسية Essential oils لنبات الاس التي تم الحصول عليها بطريقة التقطير المائي hydrodistillation method والتي تم تحليلها بطريقة الكروماتوكرافيا أظهرت بان المكونات الكيميائية الرئيسية للزيوت هي:

α –pinene 11%, 1, 8-cineole 16%, linalool 12%, α-terpineol 7% and, limonenes 5% والتي يعزى اليها الفعل التثبيطي.

اما دراسة الباحث [23] التي اجرها عن تاثير الزيوت الاساسية للنبات على الديدان الخيطية Nematode في عقد جذور النباتات واشار بان المكونات الفعالة لهذه الزيوت أظهرت تاثير قاتل لهذه الديدان اذ ان السيطرة على هذه الديدان تعتمد على المبيدات والمواد الكيميائية الا ان القلق على صحة الانسان والنظام البيئي يحول دون استخدامها لذا فمثل هذه البدائل الطبيعية للمكافحة ضرورية للتقليل من الاضرار الناتجة من استخدام مبيدات كيميائية.

الجدول(3) الفعالية التثبيطية لمستخلصات اوراق نبات الاس والزيت الاساس في جرثومة *Escherichia. coli* و*Staph.aureus* و*Pseudomonas.aeruginosa* مقارنة بالمضادات الحيوية القياسية (تركيز المستخلص 200 ملغم/سم^3)

نوع المعاملة		النوع الجرثومي		
		E.coli	*S.aureus*	*Ps.aeruginosa*
المستخلص المائي للاس		0±20.0	1.0±21.0	0±20.0
المستخلص الايثانولي للاس		0±24.0	0±25.0	2.8±23.33
المستخلص الاستوني للاس		0.5±20.33	0.5±20.33	2.3±21.33
المستخلص الايثربترولي للاس		0±15.0	1.5±21.58	0±20.0
المستخلص الكلوروفومي للاس		1.1±21.33	2.6±22.0	0±22.0
الزيت الاساس		2.5±22.6	3.5± 25.0	1.1± 19.0
المقارنة	Novobiocin-NV	0.58±9.67	0.0±0.0	0.58±15.33
	Norfloxacin-NOR	1.53±11.67	0.58±15.67	2.30±1.33
	Tetracycline-TE	0.58±12.33	2.52±17.67	1.73±1.0
	Gentamicin-GN	0.0±15.0	1.15±18.6	1.53±13.66
	Ciprofloxacin-CIP	0.5±24.33	2.0±22.0	0.0±15.0

وتم حساب الحجم والابعاد حسب المصدر (24)

4. تحديد التركيز المثبط الادنى

Minimum Inhibitory Concentration Detection (MIC)

تم تحديد التركيز المثبط الادنى (MIC) للمستخلصات النباتية والزيت الاساس لنبات الاس أظهرت تاثيراً قوياً ضد الجراثيم قيد الدراسة وكما موضح في الجدول (4) أذ حُضرت التخافيف كما ذكر في الفقرة (12.4) من المواد وطرق العمل. حيث اضيف (0.1) سم^3 من كل تخفيف الى قناني حاوية على (9.8) سم^{3}من المرق المغذي ولقحت بـــــ (0.1) سم^3 من العالق الجرثومي ليصبح لدينا في كل قنينة (10سم^3) وبهذا اصبح تركيز المستخلصات النباتية (2.0, 1.0, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.312) ملغم/سم^3 والمستخلصات الحاوية على بعض المكونات الفعالة من المركبات الزيتية الاساسية لنبات لاس كما يلي (0.002, 0.001, 0.006, 0.005, 0.004, 0.00033, 0.00028) سم^3/ سم3 وبعد التحضين بدرجة (37) م° أظهرت النتائج التي تم التوصل اليها بان التركيز المثبط الادنى (MIC) لكل من المستخلص المائي والايثانولي لاوراق نبات الاس في جرثومة *E.coli* كان مساوياً 0.06 ملغم/سم^3 اما المستخلص الاستوني والكلوروفومي فكان مساوياً 0.03 ملغم/سم^3 اما

المستخلص الايثربترولي فقد كان مساويا0.125 ملغم/سم^3 اما بالنسبة للزيت الاساس فـــــ الـــ (MIC) كان مساوياً 0.004 سم^3/سم^3.اما جرثومة *S.aureus* فقد تبين ان التركيز المثبط الادنى للمستخلص المائي والايثانولي والاستوني كان مساوياً 0.03 ملغم/سم^3 اما المستخلص الايثربترولي فقد كان مساوياً 0.06 ملغم/سم^3 في حين اعطى الـ (MIC) للمستخلص الكلوروفومي 0.015 ملغم/سم^3 اما بالنسبة للتركيز المثبط الادنى للزيت الاساس Essential oils فكان مساوياً 0.00028 سم^3/سم3. اما جرثومة *Ps.aeruginosa* فقد أظهر المستخلص المائي تركيزاً مثبطاً ادنى بحدود 0.125 ملغم/سم^3 بينما الـــتركيز المثبط الادنى (MIC) للمستخلص الايثانولي والايثربترولي كان مساوياً 0.06 ملغم/سم^3 .اما المستخلص الاستوني فاعطى تركيز مثبط الـ (MIC) بحدود 0.03 ملغم/سم^3 والمستخلص الكلوروفومي فالـ (MIC) مساو0.015 ملغم/سم^3 امابالنسبة للزيت الاساس فالـ (MIC) كان مساوياً 0.004 سم^3/سم^3.

الجدول (4) تحديد التركيز المثبط الادنى (MIC) للانواع المختلفة من مستخلصات اوراق نبات الاس وزيته الاساس في جرثومة *E.coli* و *S.aureus* و *Ps.aeruginosa*:-

نوع المستخلص	الجراثيم		
	E.coli	***S.aureus***	***Ps.aeruginosa***
المستخلص المائي للاس	**0.06**	**0.03**	**0.125**
المستخلص الايثانولي للاس	**0.06**	**0.03**	**0.06**
المستخلص الاستوني للاس	**0.03**	**0.03**	**0.03**
المستخلص الايثربترولي للاس	**0.125**	**0.06**	**0.06**
المستخلص الكلوروفومي للاس	**0.03**	**0.015**	**0.015**
الزيت الاساس	**0.004**	**0.00028**	**0.004**

المصادر

1. الرمضاني، طلعت راجح (1999).دراسة كيمياوية لبعض النباتات العراقية التي تنموفي المنطقة الشمالية. رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة الموصل.
2. النعمان، اديبة يونس شريف حمو(1998).التاثير الجزيئي لبعض المستخلصات النباتية على نمو وايض عدد من الجراثيم الموجبة والسالبة لصبغة كرام. اطروحة دكتوراة، كلية العلوم، جامعة الموصل، العراق.
3. الرسام، زياد ذنون داوؤد (2004). التهاب المجاري البولية المتسببة عن *Alcaligenes* spp. وعلاقتها بالتثبيط المناعي لدى مرض السكر. رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة الموصل.
4. Essawi, T. and Srour, M. (2000).Screening of some Palestinian med icinal plants for antibacterial activity, J. Ethnopharmacol.70: 343-349.
5. Yadegarinia D.Gachkar L, Rezaei MB, Taghizadeh M, Astaneh SA, et al.(2006) Biochemical activities of Iranian *Mentha pipenta* L. and *Myrtus communis* L.essential oils.phytochemistry 67:1249-1255.
6. Amensour M, Sendra E, Abrini J, Perez-Al varez JA and Fernandez Lopez J, (2010) . Antioxidant activity and total phenolic compounds of myrtle extracts, J Food, 8(2):95-101.
7. Maccioni S, Tomei PE, Rizzo A (1995) the medicinal use dele wild and cuitvated plant species in the folk tradition of the val di Magra. Memoirs of the Academy of Sciences Lunigianese 389-435.
8. Zanetti S, Cannas S, Molicotti P, Bua A, Cubeddu M, et al (2010).Evaluation of the antimicrobial Properties of the essential oil *Myrtus communis* L. against Clinical Strains of Mycobacterium spp.interdiscip perpect infect Dis 2010.
9. Riose, J.L.; Recio, M.C. and Villar, A. (1987). Antimicrobial activity of selected plants employed in the Spanish Mediterranean area. J. Ethnopharmacology, 21:139-152.

10. Grand, A.; Woundergen, P.A.; Verport, R. and Pousset, J.L. (1988). Anti-infections phytotherapies of tree-svannah Senegal (west Africa). II-antimicrobial activity of 33 species. J. Ethnopharmacology, 22:25-31.

11. El-Kady, L.A.; Al-Maraghy, S.S. and Mohammed, E.M.(1993). Antibacterial and Antidermatophyte activities of some essential oils from spices. Qutar Univ. Sci. J., 13(1):63-69.

12. Shareef A.Y. (1998). The molecular effect of some plant extract on the growth and metabolism of some gram positive and gram negative bacteria.Ph.D thesis College of Science, University of Mosul, Iraq.

13. Miladinovic, D. and Miladinovic, L. (2000). Antimicrobial activity of essential oil of sage from Serbia. Phys. Chem. And Technol., 2(2): 97-100.

14. Bauer, W.; Kirbay, W.A.A.; Sherris, J.I. and Turk, M. (1966).Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. Am.J. Clin. Pathol., 45:493-496.

15. Pessini, G.L.; Dias Filho, B.P.; Nakamura, C.V. and Cortez, D.A.G. (2003). Antibacterial activity of extracts and neolignans from *Piper regnelli* var. *Pallescens yunck*. Mem. Inst. Oswaldocruzz, Riode Janeire, 98(8): 1115-1120.

16. Iwalokun, B.A.; Gbenle, G.O.; Adewole, T.A. and Akinsinde, K.A. (2001). Shigellocidal properties of three Nigerian medicinal plants: *Ocimum gratissimum, Terminalia avicennoidcs* and *Morordia. Balsamina.* J. Health Popul. Nutri., 19(4):331-335.

17. Collee, J.G.; Fraser, A.G.; Marmion, B.P. and Simmons, A. (1996). Mackin & MacCareny "Practical Medical Microbiology". 14th.ed., Churchill Livingston Inc., New York.

18. Koneman, E.W.; Allen, S.D.; Janda, W.M.; Schreckengerg, P.C. and Winn, W.C. (1997). Color Atlas & Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th. Ed., J.B. Lippincott Com. Philadelphia, New York.

.

19. Brada M, Tabti N, Boutoumi H, Wathelet JP, Lognay G (2012) Compositiion of the different extracts and essential oil of Leaves and berries of Algerian myrtle *Myrtus communis* Journal of. essential oil Research 24:1-3.

20. Akin M. Aktumsek A, Nostro A(2010).Antibacterial activity and composition of the essential oil. of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn and *Myrtus communis L.* growing in Northem Cyprus. African Journal of Biotechnology 9:531-535

21. Messaoud C, Bejaoui A, Boussaid. M, (2011) Fruit color, chemical and genetic diversity and structure of *Myrtus communis* L. var italic Mill. morph populations Biochemical Systematics and Ecology 39:570-580.

22. Ghnaya AB, Chograni H, Messoud C, Boussaid M (2013). Comparative Chemical Composition and Antibacterial Activities of *Myrtus communis* L essential oil isolated from Tunisian and Algerian population. J plant pathol Microb 4: 186-192 .

23. Oka Y, Nacer S, Putievsky E, Ravid U, Yaniv Z, Spiegel Y.(2012). Nematicidal activity of essential oil and their components against the root –knot nematode. Phytopathology, 90, 710-715

24. Vandepitte, J.; Engback, K.; Piot, P. and Heuk, C. (1991). Basic laboratory procedures in Clinical Bacteriology. World Health Organization, Geneva.