المجلة العراقية للعلوم البيطرية، المجلد 23، عدد إضافي 2، 2009 (551-554)
وقائع المؤتمر العلمي الخامس، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل

دراسة مقارنة للدور التثبيطي للمستخلص الكحولي لنبات إكليل الجبل والمضادات الحيوية ضد بعض انواع البكتريا

وفاء عبد الاله أحمد، ميسون صباح عباس و ميثاق غالب

وحدة الأمراض المشتركة، كلية الطب البيطري، جامعة بغداد، بغداد، العراق

الخلاصة

استهدفت هذه الدراسة معرفة الدور التثبيطي للمستخلص الكحولي لنبات اكليل الجبل Rosemarinus لبعض انواع الجراثيم حيث حضر المستخلص الكحولي بتركيز 200 ملغم/مل وتمت دراسة قابليته في تثبيط نمو تسع انواع من البكتريا وهي: *Listeria Bacillus anthracis* (Sterne strain) *Pseudomonas aeruginosa Escherichia coli, Br. Melitensis, Brucella aborus monocytogenes Klebsiella pneumoniae Salmonella typhimurium,* و *Staphylococcus aureus* باستخدام طريقة الانتشار حول الاقراص اذ جرى زرع كل نوع من البكتريا قيد الدراسة على طبق من الوسط الزرعي الصلب Mueller Henton ثم اضيفت اقراص من ورق الترشيح المشبعة بالمستخلص الكحولي لاكليل الجبل. تمت دراسة القابلية التثبيطية من خلال قياس قطر الهالة الشفافة الناتجة عن تثبيط النمو البكتيري، وقد اظهرت النتائج ان المستخلص الكحولي لاكليل الجبل كان اكثر تاثيراً على جرثومة *L. monocytogenes* تليها *Br.melitensis* و *S.aureus* وتليها *S.typhimurium* و *B.anthracis* (Sterne strain) تليها *Br.abortus* و *E.coli* و *P.aeruginosa* و *K.pneumoniae* كما اجري فحص الحساسية لانواع الجراثيم المذكورة للمضادات الحيوية الآتية: Ampicillin (AM10mg), Vancomycin (VA30mg), Cephalothin (KF30mg), Ceftazidime (CAZ30mg), Tobramycin (TOB5mg), Ofloxacin (OFX5mg), Cloxacillin (CX1mg), Cefaclor (CEC30mg) وتمت مقارنة نتائج حساسية العزلات المستعملة للمستخلص الكحولي لاكليل الجبل مع نتائج حساسيتها للمضادات الحيوية المذكورة وقد بينت النتائج ان المضاد الحيوي Ofloxacin كان الاكثر تثبيطاً لجميع العزلات المستعملة حيث اظهرت الجراثيم حساسية عالية له مقارنة ببقية المضادات الحيوية المستعملة في الدراسة، بينما كان المضاد الحيوي Cloxacillin اقل تاثيراً على العزلات قيد الدراسة.

Comparative study for the inhibitory effect of alcoholic extract of rosemarinus and antibiotics on some bacteria

W. A. Ahmed, M. S. Abbas and M. G. Abid

Zoonotic Disease Unit, College of Veterinary Medicine, University of Baghdad, Baghdad, Iraq

Abstract

This study was conducted to investigate the inhibitory role of alcoholic extract of Rosemarinus on some bacterial species: *Listeria monocytogenes*, *Brucella aborus*, *Brucella melitensis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus anthracis* (Sterne strain), *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*. These strains were cultured on Mueller Henton agar then filter paper was saturated with alcoholic extract of Rosemarinus at concentration 200 mg/ml were added, the inhibitory zone were measured. The results revealed that the inhibitory effect of alcoholic extract was more effective on *L. monocytogenes* then *Br. melitensis*, *S. aureus, S. typhimurium, B. anthracis* (Sterne strain), *Br. abortus*, *E.coli*, *P. aeruginosa*, and *K. pneumoniae* respectively. Also susceptibility test of these strains for some antibiotics, which were Ampicillin (AM10mg), Vancomycin (VA30mg), Cephalothin (KF30mg), Ceftazidime (CAZ30mg), Tobramycin (TOB5mg), Ofloxacin (OFX5mg), Cloxacillin (CX1mg), and Cefaclor (CEC30mg) were compared with the susceptibility of these isolates for alcoholic extract of Rosemarinus. The results revealed that ofloxacin was more effective against all bacteria used in the current study, while cloxacillin had less effect on these bacteria.

Available online at http://www.vetmedmosul.org/ijvs

المقدمة

ينتمي نبات اكليل الجبل *Rosemarium* للعائلة الشفوية Labiatae التي غالباً ما تسمى بعائلة النعناع Mint Family (1). ويعد نبات اكليل الجبل غنياً بالزيوت الطيارة التي تكسبه طعماً ورائحة مميزين ويمتلك العديد من الاستعمالات الطبية وغير الطبية (2). وتستعمل الزيوت الموجودة في هذا النبات في تثبيط الاحياء المجهرية الممرضة (3،4).

يحتوي نبات اكليل الجبل على زيت طيار ومادة الكامفين والباينين والسينيول ونوع من الكامفور مع تربنتين ومواد أخرى منشطة للاعصاب، كما ويحتوي على مواد مقوية ومرممة ومعيدة للنشاط في اجهزة الجسم جميعها Restorative وفيه فلافونويد Diosmin معروف بفعاليته المضادة لهشاشة الاوعية الدموية الشعرية (5). واشارت (6) الى فعالية المستخلص الايثانولي لنبات اكليل الجبل تجاه البكتريا *B.cereus* كما وجد (7) و (8) ان للزيت العطري لإكليل الجبل تاثيراً مثبطاً لنمو البكتريا الموجبة لصبغة كرام مثل *S.aureus* و *B.subtilis* والبكتريا السالبة لصبغة كرام مثل *E.coli* و *P.aeruginosa*.

كما ان العلاج بالمضادات الحيوية قد يكون عامل الخطر الرئيسي للاصابة بالجراثيم المقاومة للمضادات وقد يؤدي هذا الى تفشي الاصابة وزيادة شدتها، فقد سجلت اندلاعات مرضية خطيرة في بلدان العالم سببها الانماط المقاومة للمضادات الحيوية اذ ان صفة المقاومة للمضادات الحيوية هذه ادت الى زيادة ضراوة السالمونيلا (9).

ان صفة المقاومة للمضادات الحيوية يشفر لها بواسطة جينات محمولة على البلازميدات يتم اكتسابها نتيجة لكثرة استعمال المضادات الحيوية سواء في الطب البيطري او الطب البشري (10). لذا استهدفت دراستنا معرفة الدور التثبيطي للمستخلص الكحولي لنبات اكليل الجبل لبعض انواع البكتريا لأهمية المستخلصات الطبيعية للسيطرة على الجراثيم المقاومة للمضادات الحيوية والتي اصبح تشكل خطراً كبيراً على الصحة العامة.

المواد وطرائق العمل

أجري البحث في مختبر وحدة الامراض المشتركة / كلية الطب البيطري / جامعة بغداد.

اكليل الجبل

تم الحصول على نبات اكليل الجبل من الاسواق الشعبية السورية وطحن بصورة ناعمة ووضع في قناني زجاجية نظيفة وبعد ذلك تم تحضير المستخلص الكحولي حيث أخذ 100 غم من المسحوق النباتي الجاف وتم وضعه في دورق مخروطي سعة 1000 مل واضيف له 500 مل كحول اثيلي بتركيز 70% وترك منقوعاً لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة الغرفة وبعد ذلك رسب المزيج باستخدام جهاز الطرد المركزي 3000 دورة/دقيقة لمدة 15 دقيقة وجمع المحلول ثم رشح باستخدام ورق الترشيح Whatman No.1 وبخر المحلول بجهاز المبخر الدوار Rotary Vacuum Evaporator بدرجة حرارة 40 م° لحين الحصول على سائل كثيف حيث تم تجفيفه في الحاضنة بدرجة 37 م° خلال 3-4 ايام ثم حفظ المسحوق في الثلاجة لحين الاستعمال (6).

حضر محلول خزين Stock solution من المستخلص النباتي باذابة (1 غم في 5 مل ماء مقطر معقم)، رشح المحلول باستعمال ورقة ترشيح Whatman membrane filter 0.45µm وبتركيز 200 ملغم/مل وتم قياس الاس الهيدروجيني له وتم تشبيع اقراص ورق الترشيح بالمستخلص الكحولي لاكليل الجبل.

المضادات الحيوية

استعملت المضادات الحيوية ودرست حساسيتها على البكتريا المستخدمة في الدراسة وشملت المضادات الاتية Ampicillin, Vancomycin, Cephalothin, Ceftazidime, Tobramycin, Ofloxacin, Cloxacillin, Cefaclor.

البكتريا المستعملة

تم استعمال تسع عزلات مشخصة ومفحوصة في مختبر الاحياء المجهرية / وحدة الامراض المشتركة / كلية الطب البيطري / جامعة بغداد. وشملت *Listeria monocytogenes*، *Brucella aborus*، *Brucella melitensis*، *Escherichia coli*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Bacillus anthracis* (Sterne strain)، *Salmonella typhimurium*، *Klebsiella pneumoniae* و *Staphylococcus aureus*.

الفعالية التثبيطية

استعملت اطباق معقمة تحتوي على الوسط الزرعي الصلب Muller Henton agar وجرى الزرع بصورة كثيفة باستعمال مسحات قطنية وزرع كل طبق بنوع من البكتريا المستعملة في الدراسة وبعدها أضيفت اقراص ورق الترشيح المشبعة بالمستخلص الكحولي لاكليل الجبل وبتركيز 200 ملغم/مل ثم حضنت الاطباق بدرجة 37 م° لمدة 24 ساعة وبعدها تم ملاحظة قطر التثبيط وقياس الهالة الشفافة الناتجة عن تثبيط النمو البكتيري.

النتائج والمناقشة

اظهرت النتائج بان للمستخلص الكحولي لاكليل الجبل الاثر التثبيطي على معظم انواع البكتريا حيث اوضح الشكل 1 بان جرثومة *L.monocytogenes* كانت هي الاكثر تثبيطاً من قبل المستخلص الكحولي لاكليل الجبل تليها *Br.melitensis* و *S.aureus* وتليها *S.typhimurium* و *B.anthracis* (Sterne strain) تليها *Br.abortus* و *E.coli* و *P.aeruginosa* و *K.pneumoniae*.

واوضح الجدول 1 بأن المضاد الحيوي Ofloxacin كان الاكثر تثبيطاً على جميع البكتريا المستعملة حيث اظهرت البكتريا حساسية عالية له مقارنة ببقية المضادات الحيوية المستعملة في الدراسة، بينما كان للمضاد الحيوي Cloxacillin تاثيراً اقل على البكتريا المستعملة.

بينت نتائج الدراسة بان المستخلص الكحولي لاكليل الجبل له الاثر التثبيطي الواضح على معظم انواع البكتريا المستعملة. وقد كانت جرثومة *L. monocytogenes* الاكثر تاثراً بالمستخلص الكحولي مقارنةً بالانواع الاخرى المستعملة قيد الدراسة وقد يعزى سبب عدم تاثير المستخلص الكحولي في نمو البكتريا السالبة لصبغة كرام الى امتلاكها طبقة من الغشاء الخارجي Outer membrane المكونة من Lipopolysaccharide التي تجعل نفاذية المواد اقل قياساً بالبكتريا الموجبة لصبغة كرام (11).

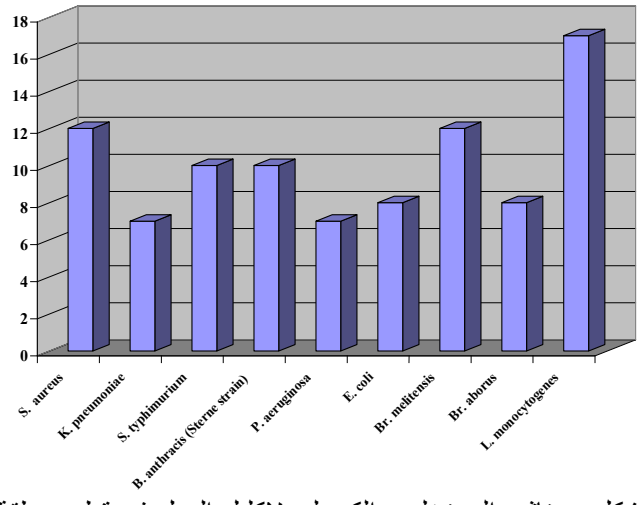
وجد (12) بان المستخلص الكحولي لنبات اكليل الجبل تاثير مثبط لجرثومة *S.aureus* والتي تسبب تلف الاغذية وهذا يتفق مع ما توصلنا اليه في دراستنا. وقد اشار (13) الى تاثير المستخلص الكحولي لنبات اكليل الجبل في الجراثيم الموجبة والسالبة لصبغة كرام، وهذا يتفق مع نتائج دراستنا.

قد تعود فعالية المستخلص الكحولي لنبات اكليل الجبل في تثبيط الاحياء المجهرية الى احتوائه على مركبات: الدباغيات والفلافونويدات والصابونينات وان لهذه المركبات فعالية تثبيطية لمجموعة كبيرة من الاحياء المجهرية ومنها البكتريا والفطريات (14).

جدول (1) يوضح تاثير المضادات الحيوية على العزلات المستخدمة في الدراسة.

Bacteria	AM 10 mg	VA 30 mg	KF 30 mg	CAZ 30 mg	TOB 5 mg	OFX 5 mg	CX 1 mg	CEC 30 mg
L.monocytogenes	9	17	-	-	20	23	6	9
Br. aborus	10	22	-	17	-	29	-	-
Br. melitensis	17	19	20	10	9	26	11	16
E. coli	13	28	20	20	17	28	21	15
P. aeruginosa	15	17	19	26	20	25	-	16
B. anthracis (Sterne strain)	28	11	23	-	19	28	15	17
S. typhimurium	22	7	13	26	17	29	6	19
K. pneumoniae	-	-	-	-	-	30	-	-
S. aureus	22	17	18	12	21	26	-	18

AM= Apicillin, VA=Vancomycin, KF=Cephalothin, CAZ= Ceftazidime, TOB= Tobramycin, OXF= Ofloxacin, CX= Cloxacillin, CEC= Cefaclor.



شكل 1: تاثير المستخلص الكحولي لاكليل الجبل في قطر منطقة التثبيط (ملم) للانواع البكتيرية المستخدمة في البحث.

اظهرت النتائج بان للمستخلص المستخدم تاثيراً مثبطاً لجرثومة *S.aureus* اذ كان ترتيبها الثالث قبل *S.typhimurium* وهذا يتفق مع ما ذكره (12) بأن للمستخلص الكحولي لنبات اكليل الجبل تاثيراً مثبطاً لجرثومة *S.aureus* والتي تسبب تلف الاغذية.

بينما اشار (13) الى تاثير المستخلص الكحولي لنبات اكليل الجبل على الجراثيم الموجبة والسالبة لصبغة كرام وهذا يتفق مع نتائج دراستنا. كما اشار (15) الى تاثير مستخلص اكليل الجبل على الجراثيم الموجبة لصبغة كرام *S.aureus* و *B.cereus* وكذلك على الجراثيم السالبة لصبغة كرام *E.coli* و *P.aeruginosa* ولكن تاثيره على الجراثيم السالبة اكثر منه على الجراثيم الموجبة لصبغة كرام؛ بينما ذكر (17) ان تاثير المستخلص الكحولي لاكليل الجبل تاثيراً تثبيطياً على الجراثيم الموجبة لصبغة كرام *S.aureus* و *B.cereus* اكثر منه على السالبة لصبغة كرام *E.coli* و *P.aeruginosa*.

فيما اشار (16) و (18) الى ان المستخلص اكليل الجبل يصبح اكثر فعالية مع زيادة وقت الاستخلاص وخاصة على *S.aureus* وعلى النقيض من ذلك يصبح اقل فعالية على جرثومة *B.cereus* مع زيادة وقت الاستخلاص.

وقد تعود فعالية المستخلص الكحولي لنبات اكليل الجبل في تثبيط الاحياء المجهرية الى احتوائه على مركبات الدباغيات والفلافونويدات والصابونينات ولهذه المركبات فعالية تثبيطية لمجموعة كبيرة من الاحياء المجهرية ومنها البكتريا والفطريات (14).

نستنتج من خلال نتائج دراستنا ان الاعشاب الطبيعية ممكن ان تكون مصدراً لمنتجات قادرة على السيطرة على الجراثيم المقاومة للمضادات ولها اهمية كبيرة لتطوير ادوية مؤثرة وآمنة وزهيدة الثمن.

المصادر

1. Willis LJC. "A Dictionary of Flowering Plants and Ferns" 8th Ed. Cambridge, the University Press. 1973.
2. Fadel HH, El-Massry KF. *Rosemarinus officinalis* L.: effect of drying on the volatile oil of fresh leaves and antioxidant activity of their extracts. J. Essential Oil Bearing Plants. 2000;3:5-19.
3. Youn J, Lee KH, Won J. Beneficial effects of rosemarinic acid on suppression of collagen induced arthritis. J Reumatol. 2003;7:30-45.
4. Pyevich D, Bongenschutz MP. Herbal diuretic and lithium toxicity. J Psychiatry. 2001;158:200.
5. يحيى، توفيق الحاج. النبات والطب البديل. الدار العربية للعلوم. مطبعة المتوسط، بيروت-لبنان، 2003:ص 156.
6. Anessiny G, Perez C. Screening of plants used a green line. Folk Medicine for Antimicrobial Activity. J Ethnopharmacol. 1993;39:119-128.
7. Santoyo S, Cavero S, Jaime L, Ibaanez E, Senorans FJ, Reglero G. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosemarinus officinalis* L.: Essential oil obtained via supercritical fluid extraction. J Food Prot. 2005;68:790-795.
8. Rezzoug SA, Boutekedjiret C, Allaf K. Optimization of operating conditions of Rosemary essential oil extraction by a fast controlled pressure drop process using response surface methodology. Journal of Food Engineering La Rochelle/Algiers, Vol. 71, 2005;pp:9-17.
9. Anderson WH, Wilson CR, Remero GP. Relative productivity from selected food types. J Assoc Office Annual Chain. 1979;62:320-326.
10. Richmond MH, Linton KB. The use of tetracyclinin the community and its possible relation to the excretion of tetracycline-resistant bacteria. J NT. Microb Chemother. 1980;6:33-41.
11. هادي سالي محفوظ. الفعالية التثبيطية للزيوت الطيارة لنبات اكليل الجبل *Rosemarinus officinalis* في بعض الاحياء المجهرية الممرضة. رسالة ماجستير- كلية العلوم– جامعة بغداد 2007.
12. Muroi H, Kuba I. Antimicrobial activity anacardiac acid and totarol, alone and in combination with methicillin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Appl Bacteriol. 1996;80:387-394.
13. Abu-Shanab H, Adwan G, Abu-Safiya D, Adwan K. Antibacterial activities of some plants extracts utilized in popular medicine in Palestine. Turk J Biol. 2004;28:99-102.
14. Ellof JN. Which extract should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? J. Ethnopharmacol. 1998;60:1-6.
15. Weckesser S. Screening of plant extracts for antimicrobial yeasts with dermatological relevance. Phytomed. 2007;pp:508-516.
16. Genena AK, Hense H, Junior AS, Souza SM. Rosemary (*Rosemarinus officinalis*) – a study of the composition, antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtained with supercritical carbon dioxide. Cienc Tecnol Aliment. 2008;28:463-469.
17. Celiktas OY. Antimicrobial activities of methanol extracts of essential oils of *Rosemarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. Food Chem. Bornova – Izmir / Eskisehir, Vol. 100, 2007, pp:553-559.
18. Gachkar, L. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosemarinus officinalis* essential oils. Food Chem. Tehran, Vol. 102, 2007,pp:898-904.