الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة جيجل

MB.19/06

01/01

كلية العلوم — قسم البيوكيمياء والميكروبيولوجيا

مذكرة التخرج

لنيل شهادة الدراسات العليا (D.E.S) في البيولوجيا

فرع: الميكروبيولوجيا

الموضوع

الدراسة الفيتو كيميائية و التأثير المضاد للبكتيريا للنبتة الطبية *Stachys circinnata*

تقديم الطلبة:

معروكة علي.

جعبوب حنان.

سلطان فراح.

جامعة جيجل - كلية العلوم - المكتبة

مكتبة الكلية

لجنة المناقشة:

الرئيس: الأستاذ سبتي محمد

الممتحن: الأستاذ إيدوي الطيب

المؤطرة: الأستاذة العقون سهيلة.

دفعة جوان 2006

دعاء

الحمد لله رب العالمين

حسبي الله و نعم الوكيل و لا حول و لا قوة إلا بالله

العلي العظيم، اللهم إني أبرا من حولي و من قوتي

على حولك و قوتك،

اللهم إني أتقرب إليك بالصلاة

على سيدنا محمد عبدك ونبيك و رسولك سيد

المرسلين صلى الله و تعالى عليه و عليهم

أجمعين امتثالا لأمرك و تصديقا له

و محبة فيه و شوقا إليه.

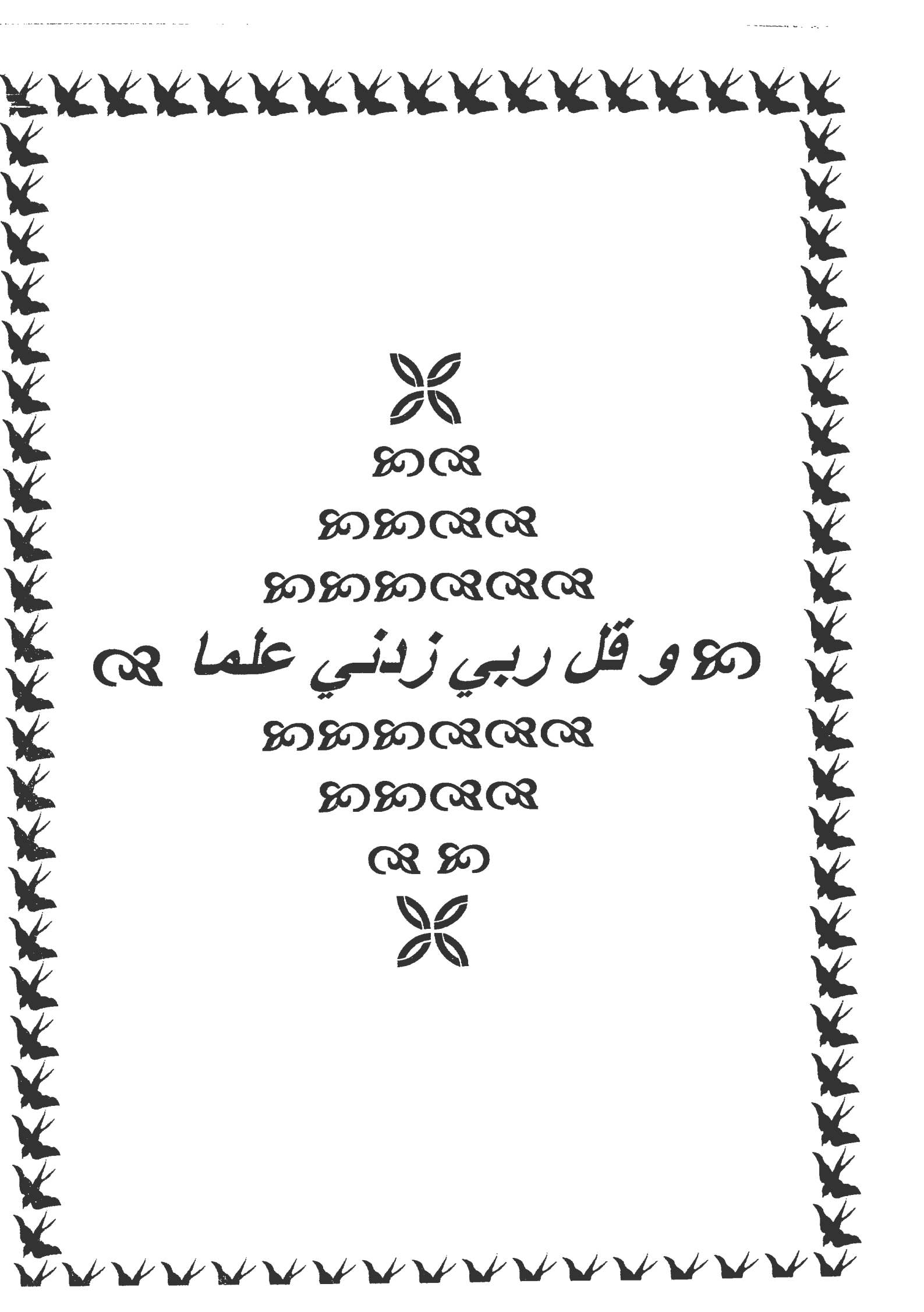
تشكرات

الحمد لله الذي علم بالقلم علم الإنسان ما لم يعلم و الصلاة و السلام على معلم البشر و على آله و صحبه أجمعين إلى يوم الدين.

أولا و قبل كل شيء نتقدم بأسمى عبارات الشكر و الامتنان و التقدير إلى من تعجز الألسنة عن إيجاد العبارات المناسبة لشكره، إلى من سدد خطانا أنار دربنا إلى ربه العزة جل جلاله. نتقدم بجزيل الشكر إلى الأستاذة الموجهة و الناصحة لنا طوال مراحل إنجازنا لهذا العمل الأستاذة العقون سهيلة.

كما نتقدم بتشكراتنا الخالصة إلى الأستاذ إيدوي الطيب و الأستاذ السبتي على قبولهما مناقشة هذا البحث.

نتقدم بأسمى معاني التقدير و الاحترام إلى الأستاذة بوطغان نعيمة و الأخوات يسمينة، سهام و وردة، إلى كل من شاركونا في هذا العمل من أساتذة و عمال المخبر و كل طلبة السنة الرابعة ميكروبيولوجيا و بيوكيمياء للسنة الجامعية 2005 – 2006.


و قل ربي زدني علما

قائمة الكلمات المختصرة

AcOH	Acide Acétique
ADH :	Arginine déhydrolase
ATB	Anti-biotique (l'extrait)
ATCC	American Type Culture Collection
BuOH	Butanol
BAW	Butanol acetic Acide water
CC	Chromatographie sur colonne
$Cdcl_4$	Chloroforme
Cit	Citrate
CCM:	Chromatographie sur couche mince
CP :	Chromatographie sur papier
HPLC:	Haute Performance Liquide Chromatographie
Ind	Indol
Glu	Glucose
g (غ)	Gramme
Lac	Lactose
LDC	Lysine décarboxylase
Mann	Mannitol
MeEtCO	Méthyl Ethyle Cétone
MeOH	Méthanol
ml:	Milli litre
mm:	Milli mètre
Mob:	Mobilité
M-H	Muller-Hinton
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
NR_I	Réactif Nitrate I
NR_{II}	Réactif Nitrate II
ODC	Ornithine décarboxylase
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ONPG	Orthonitrophénol-béta-galactopyranoside
pH:	Potentiel hydrogène
R_F:	Facteur de retentions
RM	Rouge de Méthyle
Sacc	Saccharose
UV	Ultra Violet
µl	Microlitre
µg/ml	Microgramme par millilitre
VP	Voges-Proskauer.

قائمة الجداول:

الجدول (I) يمثل الهياكل الأساسية للفلافونويدات .....ص 6
الجدول (II) قائمة الإنزيمات المستخدمة في الاصطناع الحيوي للفلافونويدات .....ص 10
الجدول (III) يبين نتائج الاختبارات البيوكيميائية la galerie biochimique .....ص 40
الجدول (IV) يبين مختلف التخفيفات للمحلول الأم .....ص 34
الجدول (V) مناطق التثبيط الـ ملم لمختلف تراكيز المستخلص خلات الإيثيل .....ص 41
الجدول(VI) يبين مناطق التثبيط بالـــ ملـم لمختلف تراكيز المستخلص البوتانولي ...ص 42

قائمة المخططات:

مخطط (1)- مخطط الاصطناع الحيوي لمختلف الأقسام الفلافونويدية .....ص 9
مخطط (2)-مخطط عام لاستخلاص الفلافونويدات .....ص 23

قائمة الأشكال:

الشكل (1) الهيكل الفلافونويدي .....ص 7
الشكل (2) الخريطة الكروماتوغرافية أحادية البعد لمستخلصات النبتة الأربعة (CP) ..ص 36
الشكل (3) الخريطة الكروماتوغرافية ثنائية البعد لمستخلص خلات الأيثيل (CP) .....ص 36
الشكل (4) الخريطة الكروماتوغرافية ثنائية البعد للمستخلص البوتانولي (CP) .....ص 37
الشكل (5) الخريطة الكروماتوغرافية أحادية البعد للمستخلصات الأربعة (CCM) .....ص 37
الشكل (6) خريطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة على متعدد الأميد DC6 ثنائية البعد للمستخلص البوتانولي .....ص 38
الشكل (7) خريطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة على متعدد الأميد DC6 ثنائية البعد لمستخلص خلات الإيثيل .....ص 38

الفهرس

الفهرس

المقدمة..... ص 1

القسم الأول:

I. دراسة النبتة: *Stachys circinnata*..... ص 3

I.1. الوصف النباتي للجنس *Stachys*..... ص 3

I.2. الوصف النباتي للنوع *Stachys circinnata*..... ص 3

I.3. الوضع ضمن التصنيف النباتي..... ص 3

II.المركبات الفلافونويدية

II .1. مدخل..... ص 4

II.2. خصائص الفلافونويدات..... ص 4

II.2.1. التوزيع..... ص 4

II.2.2. التصنيف..... ص 4

II.2.3. الذوبانية..... ص 7

II.2.4. البنية..... ص 7

II.2.5. الاصطناع الحيوي للفلافونويدات..... ص 7

II.3. أهمية الفلافونويدات..... ص 11

II.3.1. الدور البيولوجي..... ص 11

II.3.2. الدور الفيزيولوجي..... ص 11

II.3.3. الدور العلاجي الاستشفائي..... ص 12

II.4. طريقة الاستخلاص، الفصل..... ص 12

II.4.1. طريقة الاستخلاص..... ص 12

II.4.2. طرق الفصل..... ص 12

III. عموميات حول البكتيريا المختبرة

III. 1. مقدمة..... ص 14

2.III. الخصائص العامة للبكتيريا المختبرة..... ص 14

3.III. الخصائص المرفولوجية و مميزات السلالات البكتيرية المدروسة

1.3.III. *Escherichia coli*..... ص 15

2.3.III. *Klebsiella pneumoniae*..... ص 16

3.3.III. *Pseudomonas aerugenosa*..... ص 16

4.3.III. *Staphylococcus aureus*..... ص 18

القسم الثاني

أولا: الدراسة الكيميائية النباتية للنبتة *Stachys circinnata*:

I. الوسائل المستعملة Matériel..... ص 20

II. الطرق ..... ص 22

1. قطف النبتة..... ص 22

2. استخلاص النبتة..... ص 22

3. الاختبارات الكروماتوغرافية..... ص 24

1.3. كروماتوغرافيا الورق CP..... ص 24

2.3. كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة CCM..... ص 25

ثانيا: دراسة الفعالية المضادة للبكتيريا للنبتة *Stachys circinnata*..... ص 27

I. الهدف من هذه الدراسة..... ص 27

II. تحضير السلالات البكتيرية..... ص 27

III. Antibiogramme عن طريق الانتشار على وسط صلب (طريقة الأقراص)..... ص 32

• طريقة العمل..... ص 33

أ). تحضير الوسط..... ص 33

ب). تحضير الأقراص..... ص 33

ج). اللقاح البكتيري L'inoculum..... ص 33

د). تحضير سلسلة التخفيفات..... ص 33

ه). الزرع..... ص 34

و). القراءة..... ص 34

القسم الثالث

النتائج والمناقشة ..... ص 36

الخاتمة..... ص 44

المراجع..... ص 45

الملحقات ..... ص 49

المقدمة

المقدمة:

إن التداوي بالأعشاب عرفته أقدم الحضارات على الأرض، إذ استطاعت أن تعرف كيف تستفيد من الخصائص العلاجية لبعض النباتات، و انتشرت هذه المعرفة بعدها و انتقلت عبر العصور و قد تكون هذه المعرفة من أولى الجهود التي بدلها الإنسان لكي يفهم الطبيعة و يستغلها في تهدئة واحد من أقدم اضطراباته نتيجة تعرضه للمرض و الألم **[1]**.

يعرف النبات الطبي على أنه النبات الذي يحتوي في عضو أو أكثر من أعضائه المختلفة على مادة كيميائية واحدة أو أكثر، لها القدرة الفيزولوجية على معالجة مرض معين أو على الأقل تقلل من أعراض الإصابة بهذا المرض**[1]**.

و قد عرف العالم «Dragendroff» النبات الطبي على أنه " كل شيء من أصل نباتي و يستعمل طبيا فهو نبات طبي"، و طبقا لهذا التعريف أو المفهوم نجد أنه يضم المملكة النباتية بأسرها.

إن هذا المفهوم الشامل للنبات يهيئ فرصا عديدة لاكتشاف المزيد و الجديد من المواد الكيميائية والعلاجية و غير العلاجية ذات الأصل النباتي مثل المضادات الحيوية و المبيدات الحشرية أو الحشائشية **[1]**.

وقد كان مجال دراستنا هذه على العائلة الشفوية و هي عائلة كبيرة تضم نباتات طبيعية مفيدة، تضم هذه العائلة 350 جنس تقريبا تشتمل تحتها على ما يقارب 4000 نوع نباتي معظم هذه الأنواع عطرية **[2]**.

بالرغم من أن نباتات هذه العائلة موزعة في كل أنحاء العالم إلا أنها تميل إلى التمركز حول منطقة البحر الأبيض المتوسط.

و بشكل عام فإن نباتات العائلة الشفوية ذات توزيع مفتوح، و توجد أجناس قليلة منها في الغابات المطرية الأفريقية. أغلب أنواعها شجيرية و عشبية و الأشجار فيها نادرة جدا لكنها توجد في جنوب أمريكا متمثلة بالجنس *Hyptis* حيث تصل الأنواع فيه إلى 12 متر **[2]**. غالبا السيقان مضلعة رباعية، الأوراق بسيطة متقابلة و بدون أذينان، النباتات مغطاة بالشعيرات و الغدد الفارزة للروائح العطرية **[3،2]**. أزهار نباتات هذه العائلة ثنائية الجنس بشكل رئيسي لكنها في أنواع كثيرة من الأجناس *Mentha*، *Nepeta*، *Zizphora* على سبيل المثال فإن 50% من النباتات قد تمتلك أزهارا أعضائها الذكرية تختزل و تكون عقيمة و تصبح الزهرة أنثوية وظيفيا، و في هذه الأزهار فإن الأوراق التويجية غالبا ما تكون صغيرة و شاحبة اللون **[3.2]**.

و الجنس *Stachys* هو أحد أهم أجناس هذه العائلة و قد تم اختيار هذه المادة النباتية على أساس معايير كيميائية و بيولوجية، فمن الناحية الكيميائية يتميز هذا الجنس باحتوائه على المركبات الفلافونويدية، أما من الناحية البيولوجية فيشتهر بخصائصه الطبية حيث أثبتت الأبحاث العلمية أن مستخلصاته الفلافونويدية لها فعالية مضادة للإلتهاب، مضادة للتسمم الكبدي و هي أيضا معدلة للسموم، مضادة لالتهاب النيفرون، مضادة للتوتر anti-anoxique كذلك مضادة للبكتيريا **[4]**، و في بحثنا هذا وقع اختيارنا على النوع *Stachys circinnata* حيث كان الهدف من هذه الدراسة هو تقدير الفعالية المضادة للبكتيريا للمستخلصات الفلافونويدية لهذه النبتة.

و قد قسمنا بحثنا هذا إلى ثلاث أقسام:

القسم الأول يتناول الدراسة النظرية، و فيها دراسة المركبات الفلافونويدية و دراسة الخصائص المرفولوجية و مميزات السلالات البكتيرية المدروسة من جهة، و دراسة المادة النباتية و صفها و تصنيفها من جهة أخرى.

القسم الثاني يتضمن الدراسة التطبيقية و يتناول فيها كيفية استخلاص المركبات الفلافونويدية وطرق فصلها، و دراسة الفعالية المضادة للبكتيريا.

القسم الثالث يضم النتائج المتحصل عليها من خلال هذا العمل و مناقشتها.

القسم الأول

I.دراسة النبتة.

I. دراسة النبتة:

1.I. الوصف النباتي للجنس *Stachys*:

الجنس *Stachys* هو أحد أجناس العائلة الشفوية يحتوي أكثر من 270 نوع، معظم أنواع هذا الجنس نباتات عطرية و هي إما حقلية أو شجرية، تتميز النباتات العشبية منها بأنها ذات سيقان مضلعة أو مربعة و أوراق بسيطة متقابلة و متصالبة، المجموع الخضري يغلب عليه وجود الزغب، الأزهار في مجموعات أو نورات عنقودية صغيرة أو سنبلية و الأزهار خنثى [2].

2.I. الوصف النباتي للنوع *Stachys circinnata*:

هو نبات عشبي ذو أوراق ضيقة مغضنة في بعض الأحيان، مغطاة بواسطة طبقة كثيفة من الشعيرات تكون قصيرة. و هي سنابل مزهرة مفصولة إلى الأسفل (متفرقة) جد كثيفة في الأعلى لها تويج مبلل ذو حلقة من شعيرات مائلة و حصيات غير كاملة، تتمركز في الجزائر وبالخصوص في الجبال [5].

3.I. الوضع ضمن التصنيف النباتي [5]:

Royaume	**Plantes**	**المملكة**
Sous royaume	**Tracheobiontes**	**تحت المملكة**
Embranchement	**Spermatophytes**	**فوق القسم**
Division	**Magnoliophytess**	**القسم**
Classe	**Magnoliopsides**	**الصنف**
Sous classe	**Asteridae**	**تحت الصنف**
Ordre	**Lamiales**	**الرتبة**
Famille	**Lamiaceae**	**العائلة**
Genre	***Stachys***	**الجنس**
Espèce	***Stachys circinnata***	**النوع**

II. المركبات الفلافونويدية.

II. المركبات الفلافونويدية:

1.II. مدخل:

تعتبر المركبات الفلافونويدية من أهم المجموعات الفينولية و تمثل قسم بالغ الأهمية من الميثابوليزمات الثانوية، التي تحدث في جميع خلايا و أنسجة النباتات **[6]**. و قد تم التعرف لحد الآن على أكثر من 4647 صيغة فلافونويدية **[7]**.

أما كلمة «فلافونويد» فقد أدخلت عام 1952م من طرف «Geissman» و «Hinreiner». إشارة إلى جميع الصيغ التي تملك الهيكل (C_6-C_3-C_6) المماثل للفلافون إضافة إلى الأنتوسيانات **[8]**. والمصطلح «فلافونويد» في اللغة الأجنبية مشتق من الكلمة اللاتينية « flavus» و تعني أصفر **[9]**.

2.II. خصائص الفلافونويدات:

1.2.II. التوزيع:

الفلافونويدات هي مركبات موجودة في كل أجزاء النباتات الراقية (الجذور، السيقان، الأوراق، الأزهار، حبوب الطلع، الثمار، الحبوب و الخشب) **[9]**، فهي واسعة الانتشار عند كاسيات البذور قليلة عند عاريات البذور **[10]**.

كثيرة التواجد في الجزء الهوائي للنبات **[9]**، و عند الحزازيات **[11]**، عند النباتات أحادية الفلقة و تعتبر أذات تشخيصية لذوات الفلقتين **[10]**.

أغلبية الفلافونويدات توجد تحت أشكال أجليكون Aglycone و جلوكوزيدات ذائبة في الماء، تتمركز عموما في فجوات الخلايا السطحية للأنسجة النباتية و نادرة جدا في السيتوبلازم **[12]**.

2.2.II. التصنيف:

تتقسم الفلافونويدات إلى عدة أقسام:

- **الفلافون و الفلافونول:**

و هي تمثل أغلبية الفلافونويدات حيث تتواجد بنسبة 80% من مجموعها. تكون الحلقة (A) مستبدلة بصفة تزيد عن 90% في الموقعين 5 و 7 بواسطة مجموعات هيدروكسيل حرة أو على شكل إيتيروزيد أي مرتبطة بالسكر **[13]**.

- **الفلافانون و ثنائي الهيدرو فلافونول:**

هذا الصنف من الفلافونويدات نادر الوجود مقارنة بنظائرها في الحالة غير المشبعة و يتميز بغياب الرابطة الثنائية في الموقع (C_3-C_2) وجود موقع لا تناظر **[13]**.

- **الفلافونويدات الثنائية:**

أغلبيتها عبارة عن مركبات ثنائية بين الفلافون و الفلافانون عادة تكون ثلاثية الاستبدال 5، 6، ´4

- **الشالكونات و الأرونات:**

تتميز الشالكونات بغياب الحلقة الغير متجانسة و وجود سلسلة ثلاثية الكربون، سيتونية، α، β، غير مشبعة. وتكون الحلقة(B) فيها غير مستبدلة غالبا،بينما الحلقة (A) فمستبدلاتها تماثل تلك في الفلافونويدات الأخرى، أما الأورونات فتتميز بالصيغة 2-benzylidéne coumaranone **[13]**.

- **الفلافونويدات الإيثيروزيدية:**

أ). من النوع (O-sucre):

أغلبية الفلافونويدات تتواجد على شكل أجليكونات مرتبطة مع جزيئ سكري هذا الأخير قد يكون أحادي أو ثنائي أو ثلاثي السكر **[14]**.

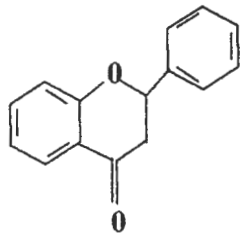
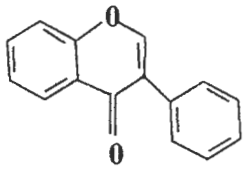
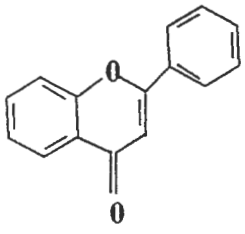
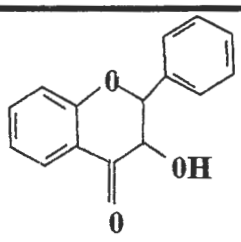
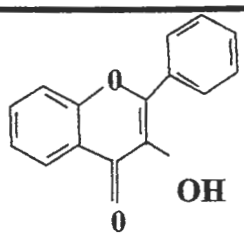
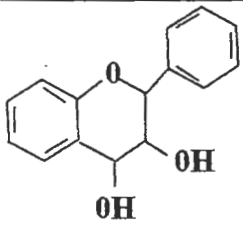
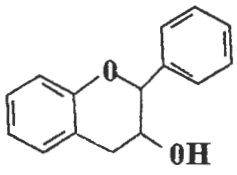
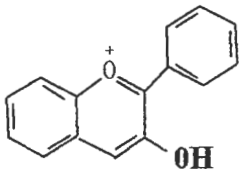
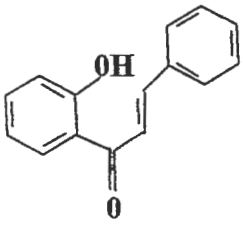
ب). من النوع (C-sucre):

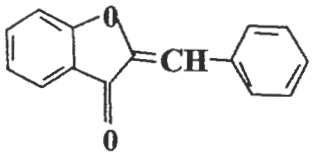
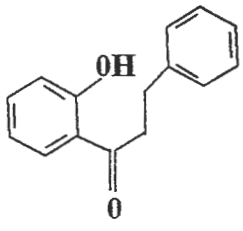
تم التعرف على أكثر من 350 مركب كربون –إيثيروزيد **[13]**، ولهذا النوع من الجليكوزيدات مقاومة للتميه الحمضي **[15]**.

- **الإيثيروزيدات:**

تم عزل و تحديد حوالي 700 إيزوفلافونويد، و تتميز هذه المركبات بتموضع الحلقة (B) في الموقع 3 للحلقة البيرانية بدلا من الموقع 2 **[16]**، وتبعا لمستوى الأكسدة للحلقة الغير متجانسة نتفرغ إلى الأقسام الممثلة في الجدول(I)

الجدول (I) يمثل الهياكل الأساسية للفلافونويدات [13]

Flavanone	isoflavone	Flavone
		
Dihydroflavonol	**Flavonol**	**Flavan-3,4-diol**
		
Flavan-3-ol	**Anthocyanidine**	**chalcone**
		

Aurone	Dihydrochalcone
	

II.3.2. الذوبانية:

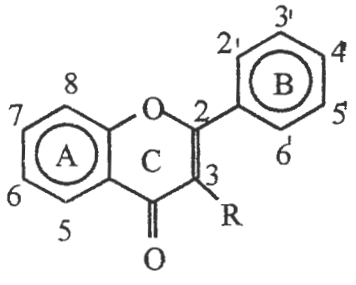
تذوب الفلافونويدات في القواعد القوية لأنها مركبات فينولية تمتاز بصفة حمضية ضعيفة، و تزيد قطبيتها إذا كانت تحتوي على عدد أكبر من مجموعات الهيدروكسيل الحرة (-OH) أو جزيئة سكر أو أكثر و بالتالي تكون ذوّابة في المذيبات القطبية، و تذوب في المذيبات الأقل قطبية كالكلوروفورم إذا كانت تحمل عددا من مجموعات الميتوكسيل **[17]**.

II.4.2. البنية:

من الناحية البنائية للفلافونويدات فهي تحتوي على 15 ذرة كربون موزعة على ثلاث حلقات (C_6-C_3-C_6)، نواتين عطريتين (A) و (B) تجمعها حلقة (C) غير متجانسة تحتوي على عنصر الأكسجين **[13]**، و لدرات كربون الهياكل الفلافونويدية مصدرين:

- الحلقة (B) مع ذرات الكربون 3، 2 و 4 كما هو موضح في الشكل (I) ناتجة من مشتق حمض السيناميك.

- أما الحلقة (A) فهي ناتجة من تكاثف وحدات الخلات.



(R = H : Flavone)
(R=OH: Flavanol)

الشكل (1) الهيكل الفلافونويدي [13]

II.5.2. الاصطناع الحيوي للفلافونويدات:

تصنع الفلافونويدات في البلاستيدة انطلاقا من 4–Cynamoyl – CoA الناتجة من الشبكة الأندوبلازمية المحببة، مركبة في شكل إيثيروزيدات، حيث أن البعض منها يغادر البلاستيدة و يتراكم في الفجوة (مثل الأونتوسيانات).

فالإنزيم المفتاح لتشكيل الهيكل الفلافونويدي هو (Chalcone synthase) (CHS) **[18]**، الذي يحفز تدريجيا تكاثف ثلاث وحدات الخلات من Coumaroyl – 4 و Malonyl–CoA إلى 6-tétra hydroxychalcone، 4′، 2′، 4، هذا الأخير يعتبر نقطة انطلاق لاصطناع العديد من الفلافونويدات الموضحة في المخطط (1)، و هذا بوجود محفزات إنزيمية تخص كل مرحلة من المراحل المختلفة.

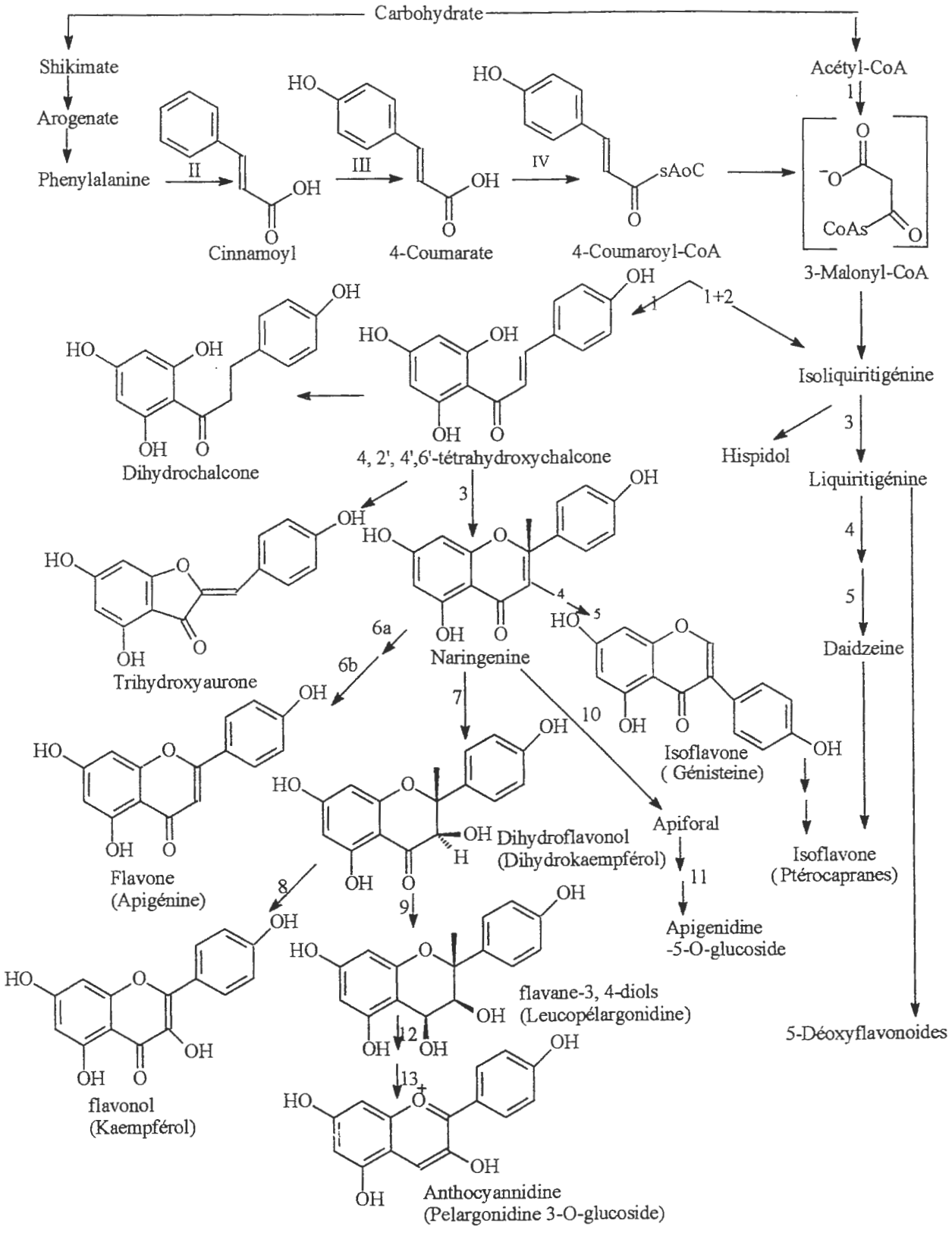
يمثل الفلافانون أهم الفروع الفلافونويدية حيث ينتج من عملية تحوير فراغية نوعية انطلاقا من نواة الشالكون **[19]**.

كما أن إعادة الترتيب للفلافانون بفعل الإنزيم إيزوفلافون «Isoflavon Synthase» و الذي يقود إلى الإيزوفلافون يعتبر أول تفاعل نوعي للإصطناع الحيوي للإيزوفلافونويدات **[20]**، حيث أن 2-hydroxyisoflavone هو المركب الوسيطي في هذا التفاعل **[21]**، و يعتقد أن العملية تتم في خطوتين، الأولى هجرة aryl 2 ،1 مصحوبة بأكسدة و الثانية نزع الماء لتشكيل الإيزوفلافون.

أما الإنزيم Flavone hydroxylase يحفز تفاعل hydroxylation للفلافانوون إلى dihydroflavonol و هذا ما أظهرته أبحاث Forkmann **[22]**.

إن تشكيل الأونتوسيانات مفضلة بوجود الضوء و توفر درجات الحرارة المنخفضة (و هذا ما يفسر الألوان المشرقة للنباتات الجبلية) حيث يكون متعلقا بظاهرة الفيتوكروم.

Proanthocyanidine: مركبات (كانت تسمى قديما بـــ leucoanthocyanes أو flavanediols) غير ملونة، توجد غالبا في السيقان و الأوراق، أما الأورونات و الفلافونات بالإضافة إلى الشالكونات تلون بعض الأزهار بالأصفر، رغم أن هذا اللون لمعظم الأزهار راجع إلى الكاروتينات **[23]**.



مخطط (1)- مخطط الاصطناع الحيوي لمختلف الأقسام الفلافونويدية [10].

الجدول (II) قائمة الإنزيمات المستخدمة في الاصطناع الحيوي للفلافونويدات [10].

CO-FACTEUR العامل المساعد	(ACRONYME) الإنزيم	
—	Acetyl-CoA	I
—	Phénylalanine ammonia-lyase (PAL)	II
NADPH	Cinnamate 4-hydroxylase (C4H	III
CO-Sh ATP	4-Coumarate:CoA ligase (4CL)	IV
—	Chalcone synthétase (CHS)	1
NADPH	Polyketide réductase (PKR)	2
—	Chalcone isomérase	3
NADPH	2-Hydroxyisoflavone synthétase (IFS)	4
—	2-Hydroxyisoflavone déhydratase	5
NADPH	6-a Flavone synthase I (FNSI)	6
NADPH	6-b Flavone synthase II (FNSI)	6
2-Oxoglutarate	Flavanone 3-hydroxylase (FHT)	7
2-Oxoglutarate	Flavonol synthétase (FLS)	8
NADPH	Dihydroflavonol 4-réductase (DFR)	9
NADPH	Flavanone 4-réductase (FNR)	10
NADPH	Leucoathocyanidine 4-réductase	11
inconnu	Anthocyanin synthase (ANS)	12
Inconnu	Flavine 3-0-glucosyltransférase (FGT)	13

II.3. أهمية الفلافونويدات:

الفلافونويدات هي أكثر المركبات الفينولية انتشارا في المملكة النباتية و نظرا لأهميتها فقد حضيت بدراسات كثيرة لمعرفة أدوارها البيولوجية و الفيزيولوجية و العلاجية الاستشفائية.

II.3.1. الدور البيولوجي:

هي عبارة عن صبغات ذائبة ذات ألوان متغيرة من أبيض عاجي إلى أصفر، تكون مع الكلوروفيل les chlorophylles و الكاروتينات les caroténoïdes صباغات قابلة للذوبان في الدهون.

و تتدخل الطبيعة الكيميائية والعوامل الفيزيوكيميائية للفلافونويدات في تغيير اللون الذاتي للنبات، ومن أهم هذه العوامل المتغيرة في لون الصباغ:

- ❖ تركيز الفلافونويدات في الخلية النباتية.
- ❖ وجود صباغ غير فلافونويدية.
- ❖ ارتباط الصباغ مع بعضها Co-pigmentation.
- ❖ ارتباط الفلافونويدات بمعادن Mg, Fe, Al لتكوين معقدات معدنية **[8]**.

و لهذه الصباغ دورا مهما في عمليات إستقطاب مختلف الحشرات أو تنفيرها، فمثلا اللون المفضل عند الفراش هو الوردي و لدى الطيور الأحمر بينما يفضل النحل الألوان الزرقاء و الصفراء **[15]**. كذلك أشجار التوت تفرز الفلافونول 3 – Glucosyl Quercetine لجدب دودة الحرير نحو أوراقها و هذا بالنسبة للفلافونويدات المتواجدة في قلب الخشب «cœur du bois » زيادة على ذلك النباتات التي تفرز مركبات طاردة للحشرات من أعلى أوراقها **[23]**. لها كذلك دور في مختلف تفاعلات الأكسدة و الإرجاع **[24]**.

II.3.2. الدور الفيزيولوجي:

تلعب الفلافونويدات دورا مهما في فيزيولوجيا النبات، و لها تأثير في بعض وظائف خلايا الثدييات، ويعتقد أن لها علاقة بعمليات التنفس، النمو و الأكسدة الإرجاعية، و كذلك تغيير التوازنات الإنزيمية الداخلة في مراحل النمو أو تحفيز البعض منها **[24]**، و تعتبر عموما غير سامة بالنسبة للإنسان غير أن تأثيرها بطيء، و هي غالبا ما تكون حاضرة في أغدية الإنسان (1غ/يوميا) **[25]**.

II.3.3. الدور العلاجي الاستشفائي:

بدأ البحث عن الفعاليات الأساسية في بداية القرن التاسع عشر(19) مع فصل المركبات القلوية التالية: المورفين، السيتريكنين، و الكنين مسجلا بذلك أول تطور في مجال النباتات الطبية **[26]**. و في القرن العشرين مع التطور في تقنيات البحث و التحليل، ظهرت لنا نتائج مذهلة في الميدان العلاجي ضد عدة أمراض منها:

مضادة للسرطان، مضادة للالتهاب، مضادة للورم **[27]**، و مخفضة لنسبة الكولسترول في الدم **[28]**، و مضادة للتسمم الكبدي **[29]**. و للفلافونويدات تأثيرات أخرى مثل: تأثيرها على نفاذية الأوعية الدموية،بالإضافة إلى الفعالية المضادة للميكروبات **[30]**، و مضادة للفيروسات **[31، 32]**، و تستعمل أيضا كمسكنات و مدرات للبول **[28]**، و هي كذلك مضادة للتشنج **[29]**.

II.4. طريقة الاستخلاص، الفصل:

II.1.4. طريقة الاستخلاص [33]:

تعامل الأجزاء النباتية المراد استخلاص الفلافونويدات منها بمذيب مناسب و أكثر المذيبات استعمالا (كحول – ماء) بنسب معينة (3/7) أو (2/8) في حالة المادة النباتية الجافة، و يفضل الكحول لوحده في حالة المادة النباتية الغضة (الخضراء)، و أغلب الكحولات المستعملة هي الميثانول و الإيثانول، إذ يتفادى استعمال الماء المقطر لوحده لأنه يؤدي إلى استخلاص مواد أخرى غير فلافونويدية إضافة إلى الصعوبات التي نصادفها أثناء التركيز.

تتم عملية الإستخلاص للراشح بدءا بالهكسان كي يتم التخلص من المركبات الطبيعية ذات القطبية الضعيفة مثل الدهون و التربينات و الكلوروفيل.

II.2.4. طرق الفصل:

الطريقة الأساسية لذلك هي الكروماتوغرافيا بمختلف أنواعها، حيث تستخدم كلمة كروماتوغرافيا للإشارة إلى تقنيات مختلفة، تعتمد جميعها على توزيع المادة تحت الدراسة بين طورين أحدهما ثابت والآخر متحرك، و الطور الثابت قد يكون جامدا أو سائلا عضويا **[34]**.

و الهدف من هذه الطريقة هو التحصل على مركبات نقية لأجل ذلك يستعمل طرق فصل متتالية أهمها:

- **كروماتوغرافيا العمود(CC):** تستعمل هذه التقنية من أجل فصل خليط معقد يحتوي على عدد كبير من المركبات. الهدف الأساسي منها هو الحصول على كسور أقل تعقيد يمكن فصلها بالطرق الكروماتوغرافية الأخرى.
- **كروماتوغرافيا الورقة (CP):** ومن الأنواع الموجودة هي ورق (whattman) و(Sleider) و(Shull) و(Direux) و(Arches)، و الأكثر استعمالا هو ورق (واطمان)، توجد ثمانية أنواع من ورق واطمان مرتبة حسب سمكها، و حسب نسيج مساحتها و كذا سرعة انتشار الماء بها **[35]**. عمليا و لفصل المركبات الفلافونويدية خاصة نستعمل ورق واطمان رقم II أو III **[36]**.

- **كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (CCM):** يعتمد الفصل الكروماتوغرافي بتقنية الطبقة الرقيقة على نفس أسس كروماتوغرافيا العمود ولذلك تعد هذه التقنية احد أمثلة كروماتوغرافيا الامتزاز، تختلف طبيعة الدعامة الثابتة المستخدمة هنا قليلا عن تلك التي تستعمل في كروماتوغرافيا العمود، أين تضاف مادة تساعد على تماسك حبيبات الدعامة الثابتة [35].
- **كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء (HPLC).**

III. عموميات حول البكتيريا المختبرة.

III. عموميات حول البكتيريا المختبرة:

III. 1. مقدمة:

لم يتم التعرف إلى عالم البكتيريا إلا بعد اكتشاف المجهر في بداية القرن السابع عشر من طرف العالم الهولندي (Antony Van leevenhoek) (1632م-1723م) حيث لاحظ عدد كبير من الجزيئات التي لا ترى بالعين المجردة لها أشكال كروية و عصوية تمثل الشكل الظاهري للبكتيريا، لكن الدراسة البكتيرية لم تبدأ إلا في الجزء الثاني من القرن التاسع عشر، توصلت إلى أن هذه العضيات الصغيرة التي لا يتجاوز قطرها (1 ميكرومتر) تنتمي إلى بدائيات النواة بدلا من المملكة النباتية، و المقصود ببدائية النواة أنها عديمة الغشاء النووي و لاتملك إلا كروموزوم واحد **[37]**.

و تتميز الخلايا البكتيرية عن الخلايا الحيوانية بصغر حجمها و وجود جدار صلب يتكون أساسا من (Piptidoglycane)، و اعتمادا على تلوين الغرام (Coloration de Gram) يمكن تقسيم البكتيريا إلى مجموعتين: سالبة الغرام (- Gram) و موجبة الغرام (+ Gram)، و هي شديدة الانتشار و التنوع، فالبعض منها متعايش و البعض الآخر ممرض **[38]**.

و لأجل هذه الأخيرة بذلت العديد من المحاولات لإنتاج مركبات كيميائية قادرة على قتل هذه البكتيريا. أو على الأقل الحد من نموها **[39]**، و هو الهدف نفسه من وراء دراستنا للمستخلصات الفلافونويدية للنبتة (*Stachys circinnata*).

III.2. الخصائص العامة للبكتيريا المختبرة:

عائلة Les entérobactéries: هي مجموعة بكتيرية معظم عناصرها تكون متطفلة على الأنبوب الهضمي للإنسان و الحيوان، حسب نوعها الميكروبيولوجي، بعضها يكون سبب إصابة الإنسان بأمراض قد تكون حادة مثل حمى التفويد و مرض الطاعون، و البعض الآخر يتواجد في المحيط (التربة و الماء)، حيث تدخل في الحلقات الكبيرة لهدم المواد العضوية. و قليلا ما تكون متعايشة مع النباتات و قد تكون سبب في إتلاف معظم الأغذية الصناعية **[37]**، و من أهم مميزاتها ما يلي:

- ✓ سالبة الغرام (- Gram)
- ✓ طولها 6 ميكرومتر و قطرها من 0,3 إلى 1 ميكرومتر.
- ✓ غير متحركة أو متحركة بواسطة أسواط جسمية.

- ✓ تنمو على أوساط هوائية أو غير هوائية اختيارية.
- ✓ تختزل النترات إلى نتريت.
- ✓ تخمر الجلوكوز مع إنتاج الغاز (+gaz) و(- oxydase).
- ✓ تنمو على الأوساط السائلة و الصلبة و العادية مدة 18 ساعة من الحضانة في درجة حرارة 37°م **[40]**.

III.3. الخصائص المرفولوجية و مميزات السلالات البكتيرية المدروسة:

III.3.1. *Escherichia coli*:

(Les colibacilles) اكتشفت لأول مرة من طرف العالم (Eschiriche) عام 1885 تمثل 80% تقريبا من مجموع بكتيريا الأنبوب الهضمي لذا فهي أكثر الأنواع دراسة من قبل مؤسسي الأعمال الفيزيولوجية والوراثية **[41]**، و نستطيع إيجادها كذلك بالتوازي على مستوى مختلف السوائل المخاطية عند الإنسان والحيوان، و وجودها في المحيط أو في الأغذية دلالة على التلوث **[37]**.

III.3.1.1. الخصائص البكتيرية:

تنتمي إلي عائلة Enterobacteriaceae، و هي عبارة عن عصويات سالبة الغرام (-Gram) صغيرة الحجم طولها 6 ميكرومتر و قطرها من 0,3 إلى 1 ميكرومتر تتواجد بأشكال منعزلة أو متجمعة مثنى مثنى و نادرا ما تكون على شكل كومة، عموما تكون متحركة بواسطة أهداب محيطية، أحيانا تكون محاطة بمحفظة أنتيجينية (Antigène A)، زراعتها سهلة وشديدة التحمل لتغيرات كل من الـ pH الأعضمي لها يتراوح ما بين 5 و7 و تنمو في أوساط ذات درجات حرارة تتراوح ما بين (15-45°م).

III. 3.1.2. الإمراضية:

أ). **الالتهاب البولي:** غالبا تكون *E.coli* هي المسببة للإلتهابات البولية عند تواجدها بأعداد كبيرة **[42]**.

ب). **الالتهاب المعوي:** أفراد هذا الجنس تعد معوية تتواجد طبيعيا داخل أمعاء الإنسان و الحيوان، تمثل 80% من البكتيريا الهوائية للأمعاء.كذلك هذا النوع يعتبر المسؤول عن التقرحات المعوية وأعراض مختلفة أخرى كالإسهال و البواسير ...الخ **[42]**.

تتميز بكتيريا هذه العائلة بقدرتها على إنتاج سم داخلي (Enterotoxine) حيث يقوم هذا الأخير بتخريب وظائف الامتصاص **[42]**، الإسهال الناتج عن *E.coli* يكون أكثر انتشارا عند المسافرين **[41]**.

يوجد أكثر من 170 Antigènes somatiques و 52 Antigènes flagellaires و 70 Antigènes capsulaires (محفظية) تسمح بتقسيمها إلى عدة أنواع (Sérotypes).

III.2.3: *Klebsiella pneumoniae*:

أكتشف جنس (*Klebsiella*) من طرف العالم (Klebs) سنة 1880 و قام بوصفها (Fiedlander) سنة 1882 **[43]**. تضم عدة أنواع اعتبرت و لفترة طويلة بأنها متعايشة و لكن حاليا تعتبر مسئولة عن عدد كبير من الأمراض و العدوى الملاحظة في المستشفيات. و تعتبر بكتيريا انتهازية تظهر كفاءة عالية في مقاومة العديد من المضادات الحيوية **[42]**.

❖ **الخصائص البكتيرية:**

تنتمي إلي عائلة Enterobacteriaceae، و هي عبارة عن عصويات قصيرة ذات نهايات مستديرة، توجد بصفة مفردة، و سالبة الغرام، غير متحركة، هوائية عادة ما تحتوي على المحفظة التي تعطي المظهر اللزج المميز للمستعمرات، كما تتواجد هذه الأخيرة على شكل دائرة محدبة قطرها ما بين 3-4 ملم **[42]**.

III.3.3. *Pseudomonas aerugenosa*:

عزلت لأول مرة من قبل العالم Garl Gessard عام 1882م **[42، 44]**. مشتقة من الإسم اللاتيني «aeruginosus» كما تسمى أيضا بالعصويات «pyocyanique» مسؤولة عن التعفنات الخطيرة الملاحظة بعد العملية الجراحية. و هي عبارة عن عصويات متحركة، هوائية إجباريا، تنمو بسهولة على أوساط عادية، تتميز بإنتاج أصبغة زرقاء مخضرة لمستعمراتها، حسب طبيعة الأنتيجين O Antigène محمول بواسطة ليبدات متعددة السكاكر Lypopolysacharides نميز منها عدة أنواع **[45،42]**.

III.3.3.1. الخصائص البكتيرية:

Pseudomonas aerugenosae تنتمي إلى عائلة Pseudomonadaceae و هي عصويات سالبة الغرام يتراوح طولها ما بين 1,5–3 ميكرومتر، شديدة الحركة بواسطة أسواط قطبية، توجد في الأماكن الرطبة، الماء، التربة و النباتات كما يمكن أن توجد عند الإنسان في الجلد و السوائل (خاصة الهضمية منها) توجد مستعمرات هذا النوع على الأشكال التالية:

- ✓ مستعمرات صغيرة قليلة التحدب و ذات محيط منتظم.
- ✓ مستعمرات كبيرة تكون محدبة المركز ذات محيط غير منتظم.
- ✓ مستعمرات هلامية لزجة معتمة محدبة **[38، 42]**.
- ✓ الكثير من أنواعها تحلل البروتين و تختزل النترات إلى نتريت ثم إلى أمونياك و البعض الآخر يختزلها مباشرة إلى نتروجين.
- ✓ عند تنميتها يشاهد تلو ن الوسط تبعا لنوع الصبغة المتكونة **[46]**.

III.3.3.2. الأصبغة المنتجة من طرف *P.aerugenosa*:

تنتج نوعين من الأصبغة:

- صبغة الـــ **pyoverdine**: صبغة صفراء مخضرة لا تذوب في الماء و لا تذوب في الكلوروفورم.
- صبغة الـــ **pyocyanine**: صبغة زرقاء اللون تذوب في الماء و الكلوروفورم **[38، 47]**.

III.3.3.3. الإمراضية:

بكتيريا هذا النوع مسؤولة عن العديد من الأمراض التي تصيب الإنسان مثل الأمراض البولية، التهاب القصبات الهوائية، الالتهابات الرئوية، أمراض العيون و التهاب المفاصل **[41]**، كما أنها تؤدي عند إصابة الإنسان إلى تلوث الجروح و الحروق **[46]**.

III .4 .3 *Staphylococcus aureus*:

شوهد هذا النوع لأول مرة من قبل العالم «لويس باستور» سنة 1879م **[38]**، و في سنة 1883م أطلق العالم Ogston اسم *Staphylocoques* الذي ينقسم إلى شطرين و الذي يتناسب مع تعريف لويس باستور:

Kokkos: و تعرف على أنها حبوب متجمعة على شكل كومة غير منتظمة.

Staphylos: و تعني عنقود عنب **[48]**.

في سنة 1884م قسم العالم Rosenbach الجنس *Staphylococcus* حسب لون المستعمرة إلى قسمين بيضاء و صفراء انطلاقا من مزارع نقية لهذه البكتيريا **[44]**.

III.1.4.3. الخصائص البكتيرية:

تظهر بكتريا *S.aureus* تحت المجهر على شكل مكورات موجبة الغرام يتراوح قطرها ما بين 0,8 -1 ميكرومتر، تجتمع في ثنائيات (diplocoques) أو على شكل عنقود عنب صغير (grappes de raisin) غير متجرثمة (asporulée)، عادة ما تكون بدون محفظة (sans capsule) **[38، 44، 47]**، و غير متحركة، تعتبر هذه البكتيريا هوائية لا هوائية (aero-anaerobie) تنمو بسهولة خلال 24 ساعة في وسط عادي كما يمكن عزلها على وسط خاص زائد الملوحة يسمى Chapman حيث Na Cl =7,5، كما أنها غير حساسة للتغيرات الحرارية، تنمو في درجات حرارة تتراوح ما بين 12 و 46 °م، و تقاوم الجفاف لعدة أشهر **[49]**، لها pH مناسب في حدود 5-7 **[38،48]**، قادرة على إفراز صبغات حامضية ذات طبيعة بروتينية «Caroténoïdes» المسؤولة عن لون المستعمرات (بيضاء أو مصفرة، ذهبية = aureus) ، عادة ما ترتبط هذه الصبغة بخصائص ممرضة أخرى **[37،50،51]**.

III.2.4.3 الإمراضية:

تعتبر هذه البكتيريا كثيرة التواجد في الطبيعة **[38،48،50]**. تتواجد بشكل شبه دائم في الأنف (سدادة الأنف الداخلية) بالنسب التالية (من 30 إلى 100% *S.epidermidis*)، (من 30 إلى 40 % *S.aureus*) و غالبا على الجلد تتواجد بنسبة (من 85 على 100% *S.epdermidis*)، و عموما يمكن عزل *S.aureus* من الفضلات (البراز) **[48]**.

تتواجد هذه البكتيريا على مستوى الأغشية المخاطية للحيوانات ذات الدم الحار، و على الكثير من المواد الغذائية **[46]**، لها القدرة على تحليل كريات الدم الحمراء (Hymolyse)، قد تفرز سموم داخل جسم العائل أو في بيئة النمو فتعتبر ممرضة **[51]**.

يعتبر النوع *S.aureus* جد ممرض و هذا راجع لإفراز العديد من السموم و الإنزيمات، من بين هذه السموم Toxine α ، β ، δ ، γ و Staphylolysines المضادة للبالعات و المتسببة للموت الخلوي لخلايا البشرة كذلك leucocidines الذي يدمر و يتلف الخلايا متعددة الأنوية (Polynucléaires)، كذلك تمتاز بإفرازها لإنزيمات خلوية خارجية (Enzymes extracellulaires) مثل Staphylocoagulase, DNase المسؤول عن تكون مسمار داخل الأوعية الدموية **[38]**.

جميع سلالات (*S.aureus*) تملك عوامل أنتيجينية على السطح تستعمل في التصنيف (حوالي 30 عامل أنتيجيني).

القسم الثاني

الوسائل و الطرق

I. الوسائل المستعملة Matériel:

1). الوسائل البيولوجية:

أ). السلالات المختبرة:

★ **البكتيريا سالبة الغرام (-) Gram**

- ✓ *Escherichia coli ATCC 25922*.
- ✓ *Pseudomonas aerugenosa* ATCC.
- ✓ *Escherichia coli*.
- ✓ *Pseudomonas aerugenosa*.
- ✓ *Klebsiella pneumoniae*.

★ **البكتيريا موجبة الغرام (+) Gram**

- ✓ *Staphylococcus aureus*.

ب). أوساط الزرع:

- ✓ (Gélose Chapman) (من أجل زرع *Staphylococcus aureus*).
- ✓ (Gélose HéKtoen) (من أجل زرع les entérobactéries).
- ✓ (Gélose Mulleur-Hinton) (لتحقيق Antibiogramme).
- ✓ (Bouillon Nutritif) (من أجل الإغناء).
- ✓ Milieu moeller: ODC، LDC و ADH.
- ✓ الأوساط TSI، Mannitol Mobilité، eau peptonée، Citrate de Simmons، Clark et Lubs.

2). الكواشف:

- ✓ VPI، VPII، KOVACS.
- ✓ Le rouge de méthyle.
- ✓ L'huile de vaseline et à immersion.
- ✓ NR^{I}, NR^{II}.
- ✓ السكريات: Glucose، Lactose، Maltose.
- ✓ Disque ONPG.
- ✓ Papier Whatman N° 3.

- ✓ Papier Filtre.
- ✓ plaque CCM.

3). المذيبات العضوية:

- ✓ Méthanol.
- ✓ Ether de Pétrol.
- ✓ Chloroforme.
- ✓ Acétate d'éthyle.
- ✓ N- Butanol.
- ✓ Acide acétique.
- ✓ Méthyl Ethyl Cétone.
- ✓ Toluéne.

★ المواد المستعملة لتحقيق تلوين الغرام:

- ✓ Violet de Gentiane.
- ✓ Lugol.
- ✓ Alcool.
- ✓ Fuschine.

4). الأجهزة المستعملة:

- ✓ Etuve.
- ✓ Broyeur.
- ✓ Rotavapor.
- ✓ Lampe UV.
- ✓ Autoclave.

II. الطرق:

أولا: الدراسة الكيميائية النباتية للنبتة *Stachys circinnata*:

1. قطف النبتة:

تم جمع المادة النباتية *Stachys circinnata* من ولاية قسنطينة و ذلك في أواخر شهر ماي 2005م حيث تم قطفها و هي نبتة فتية في طور الإزهار، تم تجفيفها تحت الظل و بعيدا عن الرطوبة لنحصل بعد ذلك على 100غ من الوزن الجاف للنبتة.

تجدر الإشارة إلى أنه تم التعرف على النبتة من طرف خبير دولي في علم تصنيف النبات.

2. استخلاص النبتة [52]:

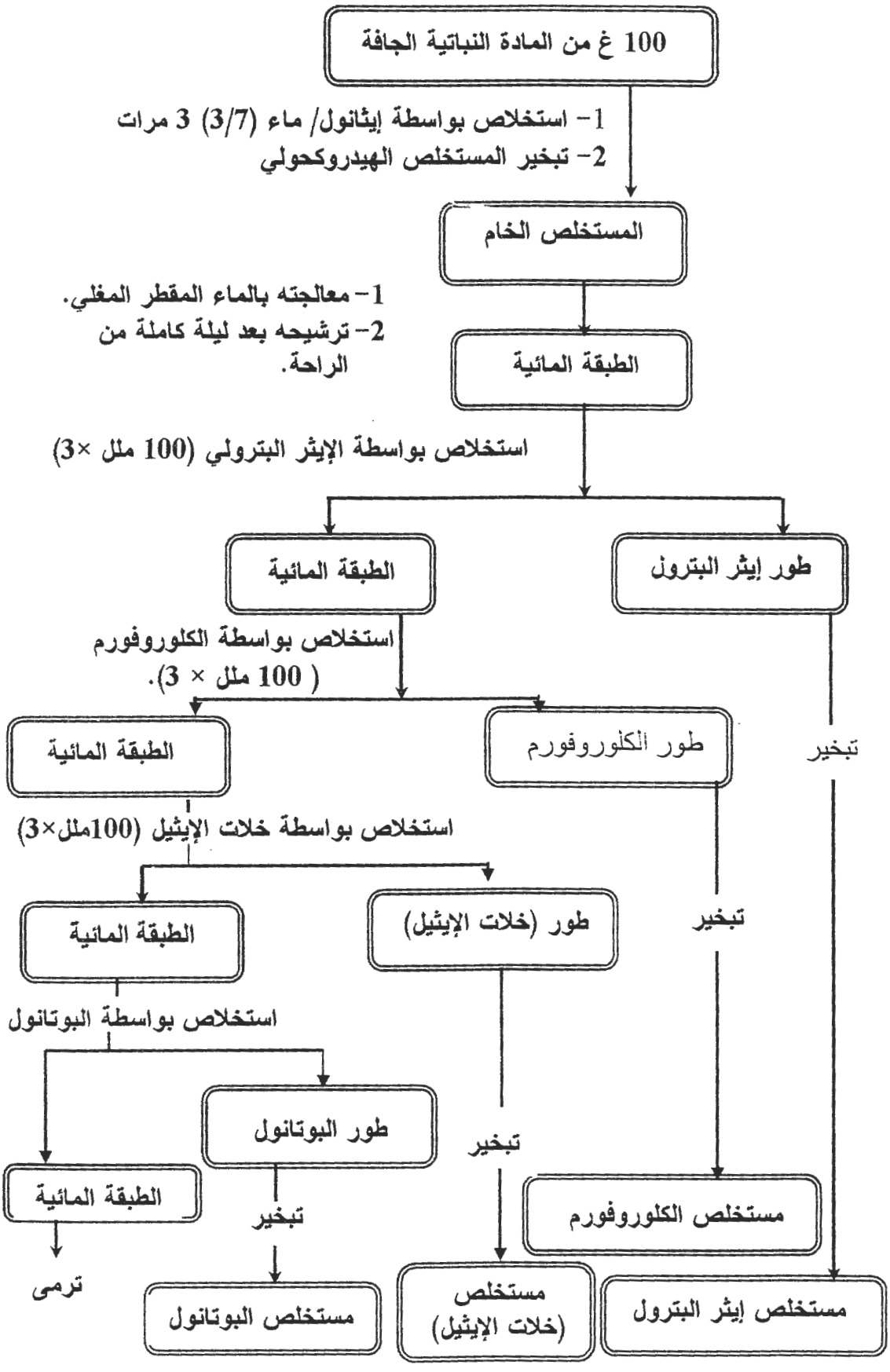
بعد قطف و طحن الأجزاء الهوائية للنبتة الجافة (100غ) تم نقعها في خليط من الإيثانول والماء بنسبة (3/7) تم تركت لمدة 24 ساعة.

رشح بعدها المحلول الهيدروكحولي و استقبل الراشح في دورق، وبغية الحصول على مستخلص خام كاف و معتبر أعيدت العملية ثلاث مرات و في كل مرة يعاد فيها تجديد المذيب (كل 24 ساعة). ركز المحلول الهيدروكحولي في درجة لا تفوت 45°م. بعدها أضيف الماء المقطر المغلي و ترك ليلة كاملة، بعدها رشح المحلول.

لننتقل بعد ذلك إلى الاستخلاص من نوع " سائل – سائل" في قمع فصل مستخدمين لهذا الغرض أربع مذيبات عضوية عديمة الامتزاج مع الماء و هي على التوالي:

- إيتر البترول Ether de pétrol.
- الكلوروفورم Chloroforme.
- خلات الإيثيل Acétate d'éthyle.
- البوتانول n - Butanol.

و يمكن تلخيص خطوات هذه العملية في المخطط التالي:



مخطط -2-مخطط عام لاستخلاص الفلافونويدات [52]

3. الاختبارات الكروماتوغرافية:

لغرض إتمام الدراسة الكيميائية للنبتة *Stachys circinnata* استخدمنا أساليب كروماتوغرافية للتأكد من وجود المركبات الفلافونويدية في مختلف الأطوار الأربعة للمستخلص النباتي و أي من الأطوار يحتوي على أكبر نسبة من الفلافونويدات. استعملنا في هذه الدراسة نوعين من الكروماتوغرافيا:

- ❖ كروماتوغرافيا الورق CP.
- ❖ كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة CCM.

1.3. كروماتوغرافيا الورق [53]:

يعتمد الفصل في هذه الطريقة على اختلاف معاملات التوزيع للمواد المراد فصلها بين طور ثابت (و هو عبارة عن طبقة رقيقة من الماء ممتزجة على ورق الترشيح) و الطور المتحرك (الذي عادة ما يكون مملصا عضويا).

تعتبر هذه التقنية جد ملائمة لفصل الكميات الصغيرة من المركب الطبيعي و كذلك لفصل الخلائط المعقدة لجميع الفلافونويدات و جليكوزيداتها.

يعرف الورق المستعمل تجاريا باسم ورق واطمان Whattman، و قد استعملنا ورق واطمان رقم(III) للتأكد من وجود المركبات الفلافونويدية.

أ). كيفية تحضير كروماتوغرافيا الورق أحادي البعد:

لتحضير كروماتوغرافيا الورق أحادي البعد نحضر ورق واطمان، و بواسطة ماصة شعرية توضع عدة قطرات من الخليط المراد فصله ثم يترك ليجف، بعدها تغمس حافة الورق السفلية في الوعاء «la cuve» يحوي الصنف السائل المتحرك، هذا الأخير الذي يتكون من حمض الخل بنسبة 15% و بسريان المملص خلال الورق و بفعل الخاصية الشعرية تتحرك مركبات المستخلص بمعدلات مختلفة تتوقف على معدلات التوزيع و على نوعية المملص المستخدم، ثم نخرج الكروماتوغرام ليجف و يتم رسم البقع المفصولة بالاستعانة بمصباح UV **[54،36]**.

ب). كيفية تحضير كروماتوغرافيا الورق ثنائية البعد:

لقد وجد أن أسلوب التحليل الكروماتوغرافي السابق شرحه باستخدام بعد واحد من أبعاد الورق يكون في بعض الأحيان غير كافي لتجزئة الخليط تجزئة كاملة، و قد تطور هذا الأسلوب إلى استخدام بعدين يكون احدهما عمودي على الآخر، بحيث تتم العملية أولا على البعد الأول مع المذيب الأول، بعدها تخرج الورقة لتجف، ثم تدار بمقدار 90°، و تغمس في مذيب ثاني على بعد ثاني و المذيبات العضوية المستعملة كالتالي:

البعد الأول	الطور العضوي: **BAW** **Bu OH : AcOH : H_2O** **4 : 1 : 5**
البعد الثاني	الطور المائي: **AcOH (% 15)**

يتم رسم البقع المفصولة باستخدام مصباح UV.

2.3. كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة CCM:

تعتبر هذه التقنية أحد أمثلة كروماتوغرافيا الإمتزاز، تعتمد على قوة امتزاز المواد على السطح الجامد حيث تبدأ المركبات الأقل امتزاز بالتحرك، و تفصل أولا تم يتم فصل المركبات الأكثر إمتزاز **[52]**.

و تستعمل هذه التقنية بين طورين، طور ثابت (المحدد للأنواع المختلفة من كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة). (يكون عبارة عن صفائح من البلاستيك أو الألمنيوم أو الزجاج مغطاة بطبقة من السيليكاجال G– أو السليكاجال G-F– أو سيليلوز أو متعدد الأميد DC_6) و طور متحرك (الذي يكون عادة مملصا عضويا) **[53]**.

أ). كيفية تحضير صفيحة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة أحادية البعد على السيليكاجال:

بالاستعانة بأنبوبة شعرية يتم وضع قطرات (نقاط) من الأطوار المراد فصلها على الصفيحة: بعدها يتم وضع الصفيحة في وعاء مغطى «la cuve» يحتوي على حجم المملص المكون من:

خلات الإيثيل: ميثانول: حمض الخل بنسبة 1:1:8 مع مراعاة عدم انغماس مواقع المستخلص داخل الملص، بعدها يبدأ الملص بتحرير مكونات كل طور حسب قوة امتزازه على الدعامة الثابتة.

و نتيجة لذلك تفصل الخلائط إلى عدة بقع أو حزم يتم تحديدها بالاستعانة بمصباحUV، مع العلم أن معامل الإعاقة أو ثابت الانحباس R_f يمثل النسبة بين المسافة التي قطعتها الحزمة إلى المسافة التي قطعها المذيب أي:

R_f = المسافة التي قطعتها الحزمة /المسافة التي قطعها المذيب.

ب). كيفية تحضير صفيحة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة ثنائية البعد على متعدد الأميد:

تعتبر صفيحة متعدد الأميد من أحسن الدعامات الصلبة لأنها مناسبة للدلالة على وجود مركبات فلافونويدية، يكون سمك الصفيحة 0,1 ملم.

يتم استعمال في هذه التقنية بعدين يكون أحدهما عمودي على الآخر و لكل بعد ملص خاص به.

البعد الأول	الملص الأول: Tol :MEC :MeOH 4 : 3 : 3
البعد الثاني	الملص الثاني: H_2O :MeOH : MEC : AcOH 13 : 3 : 3 : 1

يتم رسم البقع المفصولة عن طريق أشعة UV.

ثانيا: دراسة الفعالية المضادة للبكتيريا للنبتة *Stachys circinnata*:

I. الهدف من هذه الدراسة:

لتقدير تأثير المستخلصات الفلافونويدية للنبتة *Stachys circinnata* على نشاط سلالات بكتيرية مختلفة سالبة أو موجبة الغرام تمت دراسة الفعالية المضادة للبكتيريا المختبرة بمخابر الميكروبيولوجيا بكلية العلوم - جامعة جيجل.

II. تحضير السلالات البكتيرية:

لتحقيق هدفنا من الدراسة تم استعمال السلالات البكتيرية التالية:

- *Escherichia-coli ATCC 25922*.
- *Pseudomonas aerugenosa ATCC 27853*.
- *Staphylococcus aureus*.
- جنس *Klebsiella* spp.
- جنس *Pseudomonas* spp.
- جنس *Escherichia* spp.

وهي سلالات مرجعية تم الحصول عليها من معهد باستور بالجزائر العاصمة، أما السلالات الأخرى فتم عزلها من خلال عينات مختلفة من مرضى بالمستشفى الجامعي بقسنطينة، لذلك أجرينا الاختبارات البيوكيميائية للتعرف عليها.

1.II. تلوين الغرام La coloration de GRAM [49]:

تلوين الغرام جد مستعملة في ميدان علم البكتيريا، فهي تساعد على تحديد قسمين كبيرين من البكتيريا، البكتيريا موجبة الغرام التي تتلون باللون البنفسجي و البكتيريا السالبة الغرام التي تتلون باللون الوردي حسب الخطوات التالية:

- ✓ تحضر المسحة البكتيرية عن طريق اقتطاع جزء من المستعمرة و إذابتها في قطرة ماء معقم مع التحريك حركات دائرية ثم تجفف و تثبت بالحرارة.

- ✓ نغطي المسحة البكتيرية بالملون Violet de Gentiane لمدة دقيقة و هذا من أجل إعطاء الخلايا البكتيرية اللون البنفسجي.
- ✓ نغطي المسحة من جديد بواسطة Lugol و هذا من أجل تثبيت و ترسيخ الملون السابق.
- ✓ نسكب على المسحة البكتيرية الكحول حتى يزول اللون البنفسجي.
- ✓ نغطي الصفيحة الزجاجية بواسطة الملون Fuschine لمدة دقيقة.
- ✓ نجفف الصفيحة الزجاجية بواسطة الورق الماص و نفحص بالمجهر الضوئي بتكبير 100.

مع العلم بأنه يسكب الماء على الصفيحة الزجاجية بعد كل مرحلة من التلوين.

II.2. الاختبارات البيوكيميائية [49]:

- **Recherche de la Nitrate réductase:**

بعض البكتيريا تستطيع أن ترجع les nitrates (NO_3) إلى les nitrites (NO_2) بفضل إنزيمات.
و خطوات الاختبار تكون كالتالي:

- ✓ نضع من 2 إلى 3 قطرات من المعلق البكتيري إلى Bouillon Nitrate.
- ✓ نحضن في درجة حرارة 37°م لمدة 24 ساعة.
- ✓ بعد مدة الحضن نضيف قطرة من كاشف Réactif Nitrate I(NR_I)
- ✓ (محلول Naphtol 6% في كحول 60%) و قطرة من كاشف Réactif Nitrate II(NR_{II}) (محلول Naphtol 16% في الماء المقطر المعقم).

عندما يكون التفاعل سلبي لنا احتمالان:

- إما الـــ Nitrate يرجع إلى الـــ Nitrite وصولا إلى النشادر NH_3 أو الأزوت N_2.
- إما الـــ Nitrate لم يرجع بعد.

في هذه الحالة يتم ارجاع النترات كيميائيا بواسطة مسحوق الزنك (poudre de zinc) فتعطي نتيجة إيجابية (ظهور النتريت في الوسط).

عندما يكون التفاعل إيجابي + Nitrate Réductase

ظهور اللون الوردي أو الأحمر.

- **اختبار السترات Test de Citrate de Simmons:**

وجود إنزيم الـــ Citrate Perméase عند البكتيريا يسمح باستعمال الـــ Citrate الموجود في وسط الزرع (Citrate de Simmons)، و هذا ما يجعل لون الوسط يتغير من اللون الأخضر (pH حامضي) إلى اللون الأزرق (pH قاعدي).و خطوات الاختبار كالتالي:

- ✓ نزرع البكتيريا على سطح الوسط Citrate de Simmons بخطوط متقاربة.
- ✓ تحضن الأنابيب في درجة حرارة 37°م مدة 24 ساعة.

تهديم الـــ Citrate حتى مرحلة CO_2، يؤدي إلى نمو البكتيريا و جعل الوسط قاعدي (أصبغة زرقاء).

- **اختبار استقلاب البروتينات و الأحماض الأمينية:**

أ). اختبار الأندول Test de l'Indole:

بعض أنواع البكتيريا تقوم بإماهة الحمض الأميني Tryptophane (الموجود في أغلبية البروتينات)، مع نزع وظيفته الأمينية حتى مرحلة الـــ Indole. هذا الأخير بإضافة كاشف KOVACS يعطي مركبا أحمر اللون هو nitroso-indole.

- ✓ نزرع البكتيريا في الوسط eau peptonée.
- ✓ نحضن الأنبوب لمدة 24 ساعة في درجة حرارة 37°م.
- ✓ نضيف من 4 إلى 5 قطرات من الكاشف KOVACS مع التحريك ثم نتركه مدة من الزمن.

تشكل الحلقة الحمراء على السطح دلالة على تفاعل الـــ indole (+ indole).

ب). اختبار Argenine dihydrolase(ADH):

يتم في هذا التفاعل نزع مجموعة الكربون من الـــ Argenine ثم تتبعه الإماهة (hydrolysée) لنحصل على peutriscine.

- ✓ نزرع في الوسط MOELLER الغني بـــ Argenine، بعدها يتم الحضن في درجة حرارة 37°م لمدة 24 ساعة.

ظهور اللون البنفسجي دلالة على وجود ADH.

ج). اختبار Ornithine décarboxylase (ODC):

نزع الكربون من الحمض الأميني l'ornithine يؤدي إلى انتشار الـــ putriscine و الـــ CO_2.

✓ يتم الزرع في وسط MOELLER الغني بالـــ Ornithine، ثم الحضن في درجة حرارة 37° م لمدة 24 ساعة.

ظهور اللون البنفسجي دلالة على وجود الـــ ODC.

د). اختبار Lysine décarboxylase(LDC):

بعض البكتيريا تملك إنزيم Décarboxylase الذي يعمل يعمل على نزع الوظيفة الكربوكسيلية من الحمض الأميني Lysine و ينتج عن هذا التفاعل الإنزيمي الـــ Cadavrine الذي يرتبط مع الـــ Ninhydrine هذا الأخير الذي يعطي اللون البنفسجي للوسط.

- **اختبار الأيض السكري:**

أ). تهديم السكريات في الوسط TSI:

استعمال البكتيريا للسكريات الموجودة في وسط الزرع TSI تجعل منه وسط حامضي، و يعتبر TSI وسط زرع معقد يسمح بالكشف عن العديد من الإنزيمات المسؤولة عن تهديم الجلوكوز و اللاكتوز والسكروز و كذلك الأحماض الأمينية.

يكون الاختبار بالوخز المركزي في الراسب le culot متبوع بخطوط طولية متقاربة على السطح المائل le pente، بعد الحضن في 37° م لمدة 24 ساعة نستطيع الكشف عن 5 خصائص:

- جلوكوز مهدم: الراسب يميل إلى الأصفر.
- لاكتوز مهدم:السطح المائل يميل إلى الأصفر.
- سكروز مهدم: السطح المائل يميل إلى الأصفر.
- إنتاج الغاز يعبر عنه بتشكيل فقاعات غازية ترفع الوسط عن جدار الأنبوب.
- إنتاج الـــ H_2S (Sulfure d'hydrogéne): le pente و le culot يميل إلى الأسود.

ب). تهديم المانيتول Mannitol–Mobilité:

المانيتول هو عبارة عن ناتج مصدره D-mannose، و هدمه يؤدي إلى تشكيل الحمض في سلسلة قصيرة من التفاعل تترجم بظهور اللون الأصفر في الوسط.

الوسط Mannitol – Mobilité نصف صلب، يحتوي على سكريات و يسمح بدراسة خاصيتان:

- إستعمال المانيتول.
- دراسة حركية الجراثيم.

طريقة العمل:

- يتم بواسطة الحقن المركزي Piqûre centrale .
- بعدها يتم الحضن لمدة 18 ساعة في درجة حرارة 37° م.

القراءة:

- الجراثيم المتحركة تنتشر ابتداءا من خط الزرع، و تخلق تعكر في الوسط.
- أما البكتيريا الغير متحركة فتنمو فقط على طول خط الزرع.

ج). اختبار β-galactosidase:

بعض البكتيريا تملك إنزيم β-galactosidase الذي يحلل اللاكتوز إلى جلوكوز و جلاكتوز، و هذا ما يؤدي إلى جعل الوسط اللاكتوزي حامضي.

- ✓ نحضر معلق بكتيري كثيف يتكون من مستعمرات بكتيرية محللة في الماء الفيزيولوجي.
- ✓ تغمس أقراص ONPG في المعلق.
- ✓ يوضع المعلق البكتيري في الحاضنة في درجة حرارة 37° م لمدة 18 ساعة.

ظهور اللون الأصفر دلالة على امتلاك البكتيريا للإنزيم β-galactosidase.

- **اختبار حمض البيروفيك في وسط Clark et Lubs:**

يستعمل في اختبار أحمر الميثيل و اختبار Voges Proskauer بيئة Clark et Lubs، و هما اختباران ضروريان للكشف عن العصويات السالبة الغرام الغير متجرثمة.

بعض البكتيريا تحول ناتج تمثيل الجلوكوز الوسيط و هو حامض البيروفيك إلى مركبات متعادلة و CO_2 والبعض الآخر لا تقوم بذلك مما يجعل الوسط حامضي.

أ). إختبار Voges Proskauer (VP):

يتم من خلاله الكشف عن Acethyl Methyl–Carbinol ($CH_3 - CHOH - CO - CH_3$) و الناتج عن نزع مجموعة الكربوكسيل من حمض البيروفيك، هذا الاختبار يسمى كذلك Acetoïne و هو مركب وسيط في تكوين Butylene - glycol.

الـ Acetoine في وجود مركب هيدروكربوكسيلي مثل الصودا أو البوتاس يتأكسد و الناتج هو Diacethyl و الذي يتفاعل مع مشتق البيبتون و يعطي اللون الأحمر للتفاعل و الإختبار يعتمد على أخذ 1 ملل من مزرعة Clark et lubs عمرها 24 ساعة. يضاف إليه 0,5 ملل من محلول الصودا أو البوتاس (15–16%) في ماء مقطر و 0,5 ملل من α–naphtol، يرج جيدا و إذا ظهر اللون الأحمر دل ذلك على وجود Acethyl - Methyl – Carbinol.

ب). اختبار أحمر الميثيل Rouge de Méthyle(RM):

يعتمد على وجود أحماض عضوية قصيرة السلسة، الناتجة عن هدم حمض البيروفيك سواءا هوائيا أو لا هوائيا و التي تجعل الـ pH حامضيا أقل من 4,5، فيحتفظ أحمر الميثيل بلونه، و في حالة غياب الأحماض فإن pH البيئة يرتفع قليلا و يصل إلى نقطة الانعطاف (pH أكبر من 6,1) فيتحول اللون إلى الأصفر.

- ✓ يتم الاختبار بأخذ 1,5 ملل من مزرعة Clark et lubs عمرها 24 ساعة و يضاف إليها قطرة من أحمر الميثيل.

III. Antibiogramme عن طريق الانتشار على وسط صلب (طريقة الأقراص):

L'Antibiogramme: هي تقنية تستعمل من أجل تقدير مدى مقاومة البكتيريا أو حساسيتها تجاه العوامل الكيميائية المضادة و تقدير تركيز أو جرعة هذه الأخيرة عن طريق النمو و الانتشار على بيئة غذائية صلبة [55]. تعتبر هذه العملية غير مكلفة و سهلة التحقيق مقارنة بالتقنيات الأخرى [56، 57].

و بالتحديد قمنا بتطبيق طريقة:NCCLS

- **طريقة العمل:**

تختلف هذه الطريقة حسب نوع البكتيريا إذا كانت متطلبة لشروط خاصة (Bactéries exigeantes) أو غير متطلبة (Bactéries non exigeantes)، و أهم الخطوات المستعملة لتحقيق l'antibiogramme حسب طريقة **NCCLS** مع البكتيريا الغير متطلبة للشروط الخاصة هي:

أ). الوسط [57]:

الوسط الملائم لتحقيق L'antibiogramme هو وسط Mueller-Hinton حيث يعتبر الوسط المثالي حسب قوانين O.M.S

- قوام الوسط يكون 4 ميليمتر تماما موزعة بالتكافؤ على كامل الطبق البتري.
- تجفف الأطباق في درجة حرارة 37° م لمدة 30 دقيقة قبل الاستعمال.

ب). تحضير الأقراص [58]:

توضع الأقراص المصنوعة من ورق واطمان رقم (III) والتي تكون بقطر 6 ملم، دائرية الشكل لتسهيل قياس درجة التثبيط، في أنبوب اختبار يحتوي على 10 ملل من الماء المقطر و توضع في جهاز Autoclave لمدة 20 دقيقة في درجة حرارة 120 °م.

ج). اللقاح البكتيري L'inoculum:

يتم كشط بعض المستعمرات البكتيرية المتباعدة عن بعضها البعض و متشابهة من مزرعة بكتيرية فتية عمرها 18 ساعة بواسطة لإبرة تلقيح بلاتينية، تغمر إبرة التلقيح في أنبوب به 10 ملل من الماء المقطر المعقم مع رج الأنبوب للحصول على معلق بكتيري متجانس ذو كثافة ضوئية مابين [0,08-0,1] =DO عند طول موجة 625 نانومتر. يمكن تعديل اللقاح البكتيري بإضافة عدة مستعمرات إلى اللقاح البكتيري و هذا في حالة عدم كثافته (مخفف) أو إضافة الماء المقطر المعقم في حالة كون اللقاح كثيف[58].

د). تحضير سلسلة التخفيفات:

نحضر المحلول الأم Solution mer حيث قمنا بإذابة 1 غ من المستخلص في 10 ملل من الماء المقطر المعقم من خلال هذا المحلول الأم S M نحضر سلسلة من التخفيفات حسب الجدول التالي:

الجدول-(IV) يبين مختلف التخفيفات للمحلول الأم [59، 60].

التركيز الابتدائي المادة الفعالة بـــ mg/ml	الحجم بالـــ ml	حجم الماء المقطر بالـــ ml	التركيز النهائي mg/ml
10000	6،4 ملل	3,6 ملل	6400
6400	2	2	3,200
	1	3	1,600
	0,5	3,5	0,800
	0,5	7,5	0,400

ه). الزرع:

بعد مرور 15 دقيقة من تحضير اللقاح البكتيري تغمر ممسحة écouvillon في الأنبوب الحاوي على المعلق البكتيري و إمرارها على الجدار الداخلي للأنبوب، نمسح كامل سطح البيئة الغذائية الصلبة في اتجاه واحد من الأعلى إلى الأسفل، تكرر العملية 3 مرات حيث تدار العلبة في كل مرة بزاوية 90.

بواسطة ملقط معقم توضع الأقراص المشبعة بالمستخلصات الطبيعية على السطح الصلب [الأقراص تشبع بـــ 15 ميكرولتر من التراكيز المتزايدة للمستخلص]، تترك لمدة 15 دقيقة ثم توضع في الحاضنة لمدة 18 ساعة تحت درجة حرارة 37 °م.

و). القراءة:

بعد مرور زمن الحضن تتم القراءة بقياس مناطق التثبيط **zones d'inhibitions** بواسطة مسطرة، تتم مقارنة النتائج بالقيم المرجعية [63](أي بعد قياس قطر منطقة التثبيط يتم مقارنتها مع القطر المرجعي) ، و هذا من أجل تصنيف البكتيريا (حساسة، متوسطة الحساسية أو مقاومة).

❖ عندما يكون قطر منطقة التثبيط بالنسبة للسلالة المختبرة صغير جدا مقارنة بالقطر المرجعي يقال عن السلالة أنها مقاومة Résistante.

❖ عندما يكون قطر منطقة التثبيط بالنسبة للسلالة المختبرة يساوي القطر المرجعي يقال عن السلالة أنها متوسطة Intermédiaire.

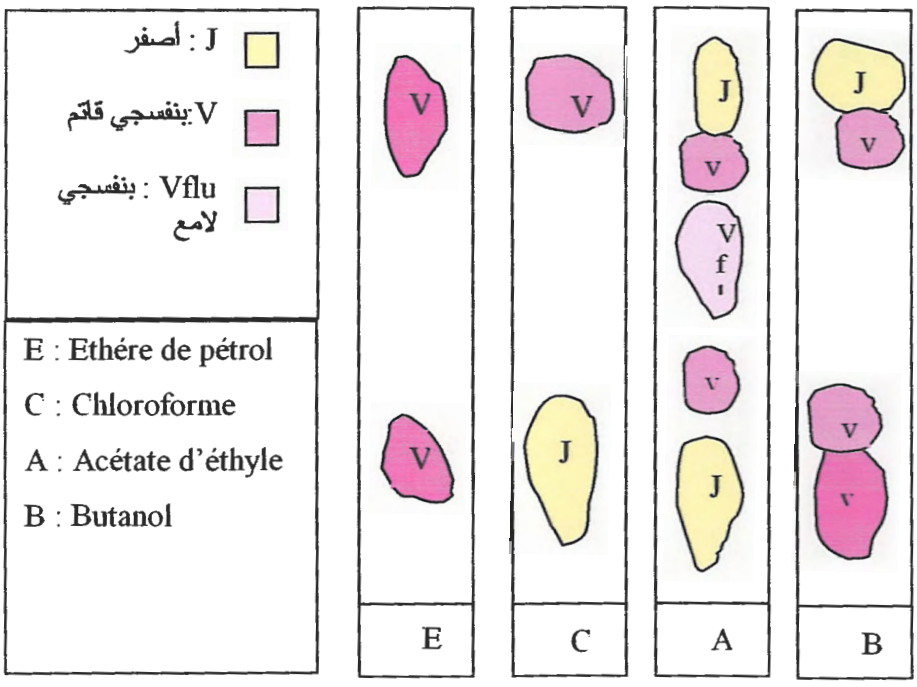
❖ عندما يكون قطر منطقة التثبيط بالنسبة للسلالة المختبرة أكبر من القطر المرجعي، يقال أن السلالة حساسة Sensible.

القسم الثالث

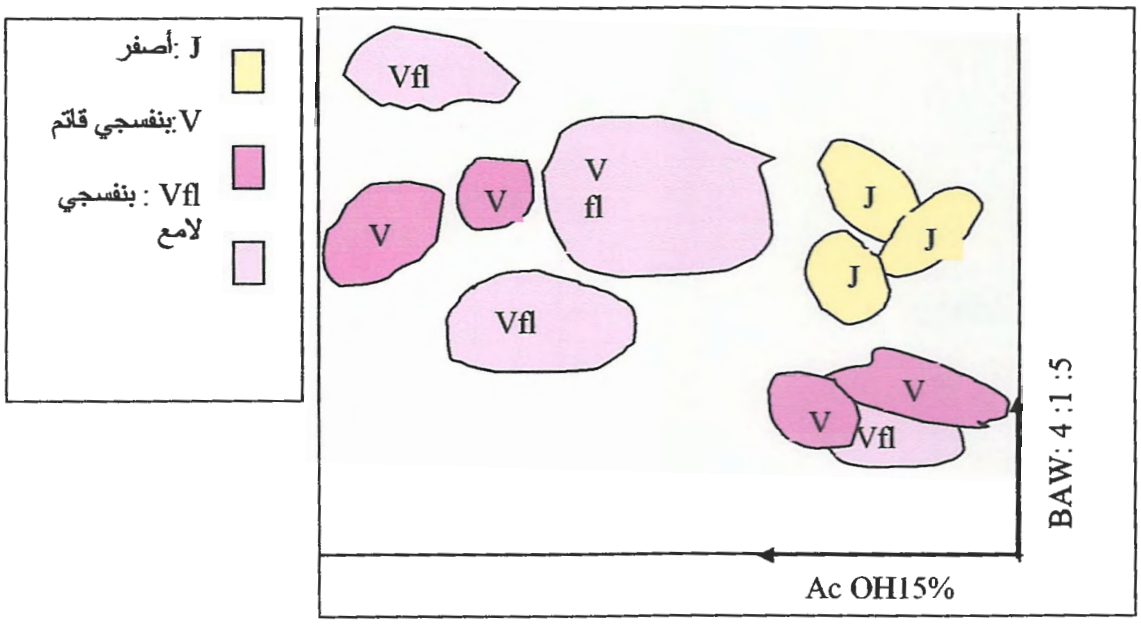
النتائج والمناقشة

النتائج و المناقشة:

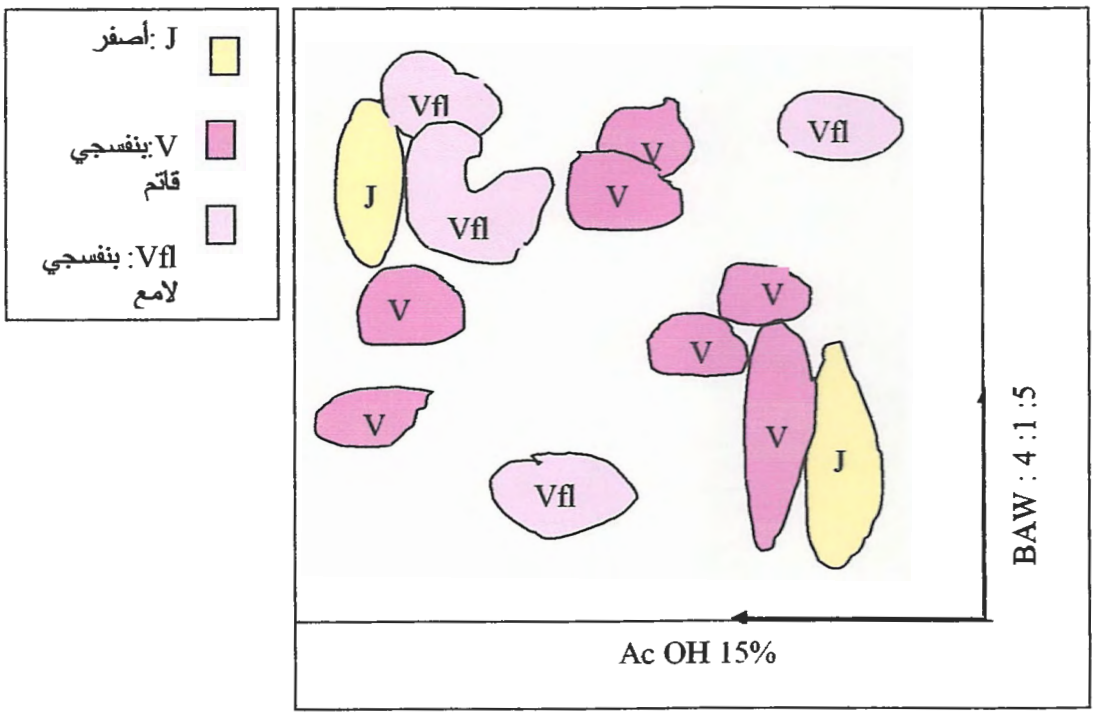
1. نتائج الاختبارات الكروماتوغرافية:



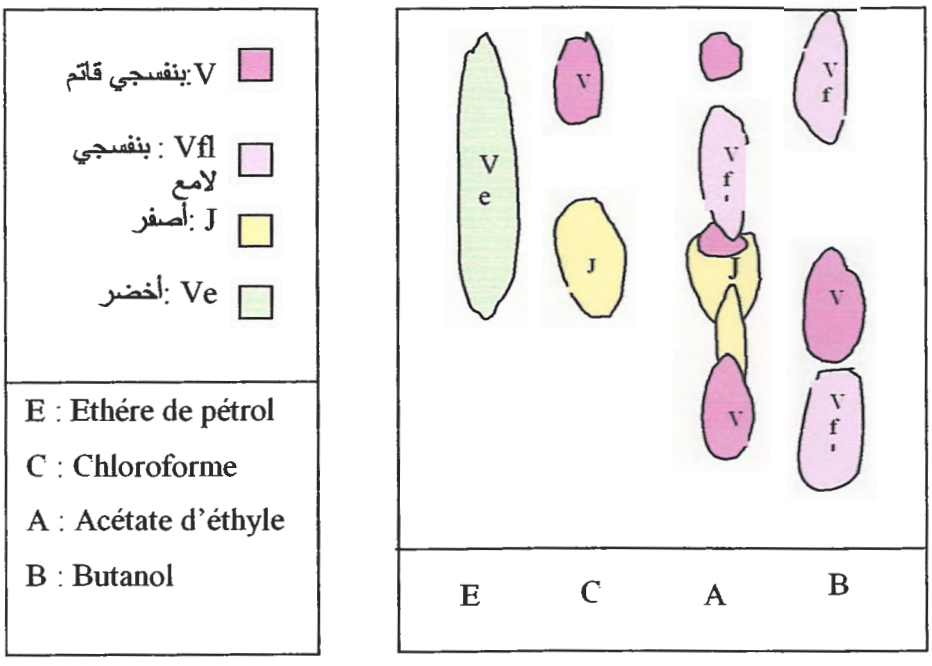
الشكل (2) الخريطة الكروماتوغرافية أحادية البعد
لمستخلصات النبتة الأربعة (CP)



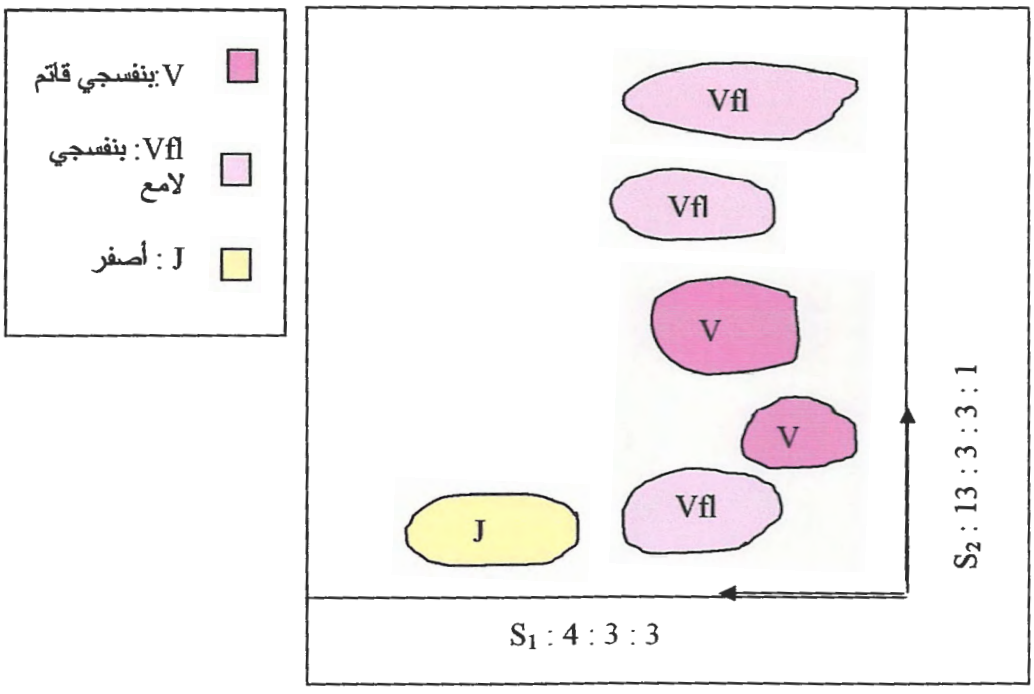
الشكل (3) الخريطة الكروماتوغرافية ثنائية البعد لمستخلص
خلات الأيثيل (CP)



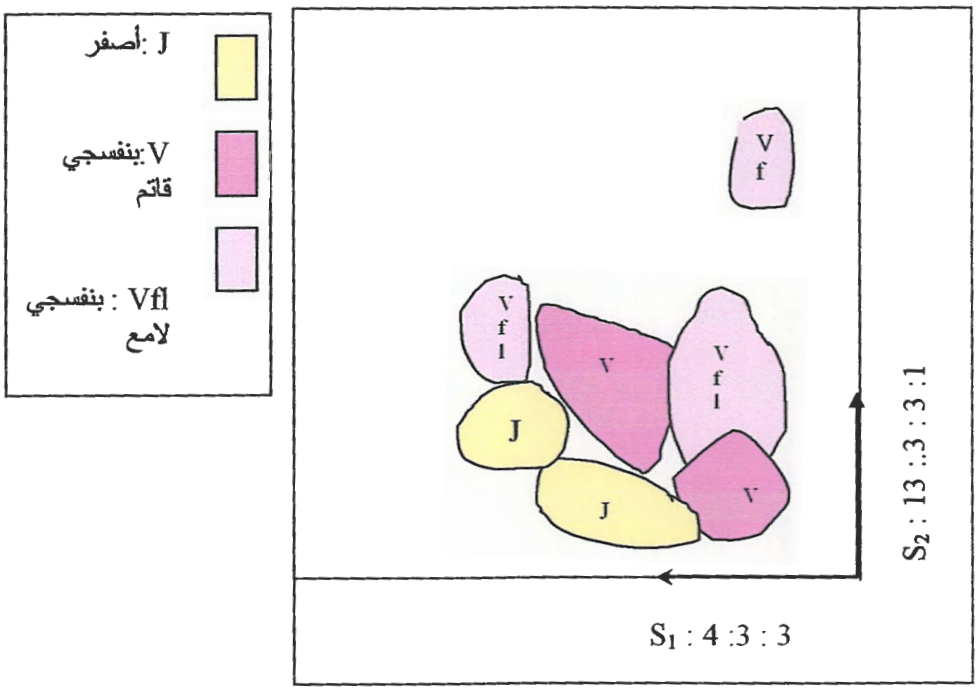
الشكل (4) الخريطة الكروماتوغرافية ثنائية البعد
للمستخلص البوتانولي (CP)



الشكل (5) الخريطة الكروماتوغرافية أحادية البعد
للمستخلصات الأربعة (CCM)



الشكل (6) خريطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة على متعدد الأميد DC_6 ثنائية البعد للمستخلص البوتانولي



الشكل (7) خريطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة على متعدد الأميد DC_6 ثنائية البعد لمستخلص خلات الإيثيل

* مناقشة نتائج الاختبارات الكروماتوغرافية:

أظهرت نتائج كروماتوغرافيا الورقة أحادية البعد (الشكل-2-) و نتائج كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة على السيليكاجال (الشكل-5-) أن مستخلص خلات الإيثيل و المستخلص البوتانولي يحتويان على أكبر عدد من الفلافونويدات، (عدد البقع المختلفة الألوان تدل على عدد الفلافونويدات المختلفة)، حيث لوحظ وجودها بكثرة في المستخلص البوتانولي و مستخلص خلات الإيثيل، و قلتها في مستخلص إيثر البترول و مستخلص الكلوروفورم.

إن نتائج كروماتوغرافيا الورق ثنائية البعد (الشكل 3 و 4) و نتائج كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة ثنائية البعد على متعدد الأميد (الشكل 6 و 7) موافقة لهدف استعمال هذه الطريقة و هي الفصل الجيد للمركبات الفلافونويدية ذات معامل انحباس متقارب.

كذلك من خلال مقارنة الخرائط الكروماتوغرافية للمستخلصين (طور خلات الإيثيل و الطور البوتانولي)، نلاحظ التنوع الكبير للفلافونويدات (فلافون فلافونول فلافانول...الخ)، و هذا عند ربط العلاقة الموجودة بين اللون الاستشعاعي للمركبات و طبيعتها و كدا طبيعة مستبدلاتها [61]:

- بنفسجي - قاتم: - يشير إلى وجود الفلافون.
  - فلافون مستبدل في الموضع 3.
  - 5، 6، 7، أو 5، 7، 8 ثلاثي هيدروكسيل فلافون.
  - بعض الشالكونات.

- بنفسجي - نيلي:- فلافونول أو فلافانول يملك هيدروكسيل في الوضع 3.
  - فلافون أو فلافانون بدون OH في الوضع 5.

- أصفر: - فلافانول مع OH حر في الموضع 3 و مع أو بدون OH في الموضع 5.
- أخضر:- بعض الشالكونات.

كذلك الهجرة الكبيرة للمركبات الفلافونويدية في الأنظمة المائية (AcOH 15% والنظام 1:3 :3 :13) بنسبة كبيرة تشير إلى أنها إيثيروزيدات، والهجرة في الأنظمة العضوية:(النظام 1: 1: 8 الذي يستعمل عادة في فصل الأجليكونات القطبية Polyhydroxylés)، و النظامين (3 :3 :4) و BAW (5 :1: 4) الذين يستعملان في فصل الأجليكونات الغير قطبية [62]. كل هذه الأنضمة تشير إلى التنوع الكبير في

محتوى المستخلصين و من خلال هذه النتائج وقع اختيارنا على مستخلص خلات الإيثيل و مستخلص البوتانول لدراسة فعالية المركبات الفلافونويدية على نشاط البكتيريا.

2. نتائج الاختبارات البيوكيميائية Résultats de la galerie biochimique:

الجدول (III) يبين نتائج الاختبارات البيوكيميائية la galerie biochimique

الخصائص الكيميائية	Nitrate	Citrate	Indole	Mobilité	Mannitol	H_2S	Glucose	Lactose	Saccharose	Gaz	β galactosidase	O D C	L D C	A D H	R M	Gram	VP
جنس *Escherichia*	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
جنس *Pseudomonas*	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+
جنس *Klebsiella*	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+

Staphylococcus:- المستعمرات ذهبية على وسط الزرع Chapman.

- موجبة الغرام (+ Gram).

*** مناقشة نتائج الاختبارات البيوكيميائية:**

انطلاقا من نتائج الاختبارات الكيميائية (La galerie biochimique) تم معرفة الأنواع البكتيرية المختبرة *Escerichia coli*، *Klebsiella pneumoniae* و *Pseudomonas aerugenosa*. حيث تم الاحتفاظ بهذه السلالات المذكورة فتية طيلة مدة هذه الدراسة.

و من أجل ذلك نقوم بتجديد عملية الزرع كل بداية أسبوع، إذ يتم زرع كل نوع بكتيري على الوسط الملائم له، فتزرع *Staphylococcus* على وسط خاص«Chapman»، أما باقي الأنواع الأخرى فتزرع على وسط «Hektoen»

3. نتائج الـ Antibiogramme:

الجدول (V) مناطق التثبيط الـ ملم لمختلف تراكيز المستخلص خلات الإيثيل.

القطر بالـ (ملـم)				
التركيز A mg/ml	التركيز B mg/ml	التركيزC mg/ml	التركيز D mg/ml	
10	10	08	08	*Klebsiella pneumoniae*
10	10	10	10	*Pseudomonas aerugenosa*
10	10	08	08	*Pseudomonas aerugenosa ATCC 27853*
10	10	10	10	*Escherichia coli*
12	10	10	08	*Escherichia coli ATCC 25922*
20	12	10	10	*Staphylococcus aureus*

الجدول(VI) يبين مناطق التثبيط بالـــ ملـــم لمختلف تراكيز المستخلص البوتانولي.

القـــطر بالـــ (ملم)				
التركيز D mg/ml	التركيز C mg/ml	التركيز B mg/ml	التركيز A mg/ml	
08	08	10	10	*Klebsiella pneumoniae*
08	10	12	12	*pseudomonas aerugenosa*
10	10	10	10	*pseudomonas aerugenosa ATCC 27853*
10	10	10	12	*Escherichia coli*
08	08	08	10	*Escherichia coli ATCC 25922*
12	14	14	18	*Staphylococcus aureus*

و التراكيز المستعملة موضحة كما يلي:

التركيز D	التركيز C	التركيز B	التركيز A
mg/ml 0,4	mg/ml 0,8	mg/ml 1,6	mg/ml 3,2

* **مناقشة نتائج L'antigiogramme:**

انطلاقا من نتائج الـــ Antibiogramme سجلنا تحسس السلالة البكتيرية الموجبة الغرام *Staphylococcus aureus* للمستخلصات الفلافونيدية ذات التراكيز العالية (mg/ml)، حيث بلغ قطر منطقة التثبيط بالنسبة لمستخلص خلات الإيثيل 20 ملم، و عدم تحسس السلالات البكتيرية السالبة الغرام المختبرة حيث بلغ قطر منطقة التثبيط 12 ملم بالنسبة للسلالة *Escherichia coli ATCC 25922* و 10 ملم بالنسبة

للـــــسلالات التاليـــــة *Pseudomonas aerugenosa*، *Pseudsomonas aerugenosa ATCC 27853*، *Klebsiella pneumoniae*، *Escherichia coli*.

أما بالنسبة لنتائج L'antibiogramme للمستخلص البوتانولي ذو التركيز العالي فقد سجلنا حساسية بالنسبة للسلالة البكتيرية *Staphylococcus aureus* بقطر 18 ملم، و عدم تحسس السلالات البكتيرية السالبة الغرام *Escherichia coli* (12 ملم)، *Pseudomonas aerugenosa* (12 ملم)، *Escherichia coli ATCC25922* (10 ملم)، *Klebsiella pneumoniae* (10 ملم).

من خلال هذه النتائج نستنتج أن المستخلصين لهما فعالية على الكرويات موجبة الغرام و ليست لها فعالية على العصويات السالبة الغرام، وأن مستخلص خلات الإيثيل له فعالية أكثر من المستخلص البوتانولي.

لقد تم تحديد قطر منطقة التثبيط المرجعية بـــ 15 ملم بالنسبة للمستخلصات الطبيعية [63]، وهذا عندما يكون تركيز هذه الأخيرة من رتبة بعض الميكروغرامات.

وفي دراستنا هذه استعملنا تراكيز كبيرة وكانت أقطار مناطق التثبيط صغيرة نسبيا على هذا الأساس تعد المركبات الفلافونويدية للنبتة *Stachys circinnata* ليست لها فعالية مضادة للبكتيريا، على خلاف الأنواع الأخرى من الجنس *Stachys* التي أثبتت علميا بأن لها فعالية مضادة للبكتيريا (سواء الموجبة الغرام أو السالبة الغرام، سلالات مرجعية أو سلالات أخذت من عينات للمرضى) و ليس لها فعالية على الفطريات [64،4].

الخاتمة

الخاتمـــــة:

تركز اهتمامنا خلال هذا البحث على التعرف على فعالية المستخلصات الفلافونويدية للنبتة *Stachys circinnata* (وهي نبتة تتواجد خصوصا في مناطق البحر البيض المتوسط) على سلالات بكتيرية موجبة و سالبة الغرام وهي كالتالي:

(*Klebsiella pneumoniae* ,*pseudomonas aerugenosa* ,*pseudomonas aerugenosa ATCC 27853* ,*Escherichia coli ATCC 25922* ,*Escherichia coli* ,*Staphylococcus aureus*).

كخطوة أولى، قمنا باستخلاص الفلافونويدات، و استدلينا على وجود المركبات الفلافونويدية بواسطة تقنيات الفصل بالكروماتوغرافيا المختلفة (كروماتوغرافيا الورق CP و كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة CCM) التي أثبتت غنى الطورين خلات الإيثيل و البوتانول بهذه المركبات، و كخطوة ثانية قمنا بدراسة الفعالية المضادة للبكتيريا بطريقة L'antibiogramme على وسط صلب التي أظهرت نتائجها أن السلالات البكتيرية المختبرة لم تتحسس لأي مستخلص مدروس و لذلك نستنتج أن المركبات الفلافونويدية للنبتة المدروسة ليست لها فعالية مضادة للبكتيريا.

المراجع

المراجع:

[1]- حسان قبيسي. معجم الأعشاب و النباتات الطبية. دار الكتب العلمية (الطبعة الخامسة). لبنان(2002) .14

[2]- الدكتور شكري إبراهيم سعد. النباتات الزهرية: نشأتها – تطورها- تصنيفها. دار الفكر العربي، (1414 هـ -1994 م).

[3]- الشحات نصر أبو زيد. النباتات العطرية ومنتجاتها الزراعية والدوائية. رقم الإيداع 92/8982. الطبعة الثانية(1992).

[4] - N. Maliki, A. Garjani, H. Nazemiyeh, N. Nilfourouchan, A. T. Eftekhar sadat, Z. Allemah, N. Hasania. Potent anti-inflammatory activities of hydro alcoholic extracts from aerial parts in *Stachys influta* on rats. journal of Ethno pharmacology. (2001). 23-28.

[5] - P. Quezel, S. Santa. Nouvelle flore de l'Algerie et des régions Désertiques Méridionales. Tome II. Edition C.N.R.S. Paris (1963). 982 - 988.

[6]- J. B. Harborne. The flavonoids. Published in since (1988) by Chapman and Hall.

[7]- J. B. Harborne, H. Baxte, The hand book of natural flavonoids. V. 2. eds Wely. chicheir (1999).

[8]- P. R. Gayon, Les composée phénoliques des végétaux. eds. Dunod. paris (1998).

[9]- J. Burnton. Pharmacognosie, Phytochimie et plantes médicinales, Techniques et documentation, 2 éme édition Lavoisier (1993).

[10]- J. B, Harborne. The flavonoids. advances in research since (1980). Chapman and Hall. New York (1998).

[11]- J. B. Harborne. Progress in phytochimistry. V.5. eds. Swin. T perganon press. Oxfords (1978).

[12]- R. Melcent. chimie organique hétérocyclique. eds .EDP sciences (2003).

[13]- J. B. Riberau-gayou. Les composées phénoliques des végétaux Dunod. paris. (1998).

[14]- G. Richert Métabolisme des végétaux (physiologie et biochimie). Presses poli techniques et universitaire romandes. Lausanne (1993)

[15]- J. B. Harborne. The flavonoids. Acadimic press. Part. 2. (1975).

[16]- J. B. Bruneton. Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales. 5 éme édition. Maison TEC et DOC. (1999).

[17]- H. Elhazimi. les produits naturelles. université du Roi Saoud. Djedda (eds en arabe). (1995).

[18]- W. Heller, G. Forkmann In flavonoids Advances in Research since 1980. Editor J. B Harborne. Chapman and Hall. London. 1988. 400.

[19]- M. J. Bland, E. Wong. Aur. J. biochem. 1975. 50. 383. bioorg, chem. 1979. 8.1.

[20]- G. Kochm, H. Grisbach. Eur. J. biochem. Les Composées phénoliques des végétaux . 1986. 155, 311.

[21]- M. F .Hashim, T. Hokmatsuka, y. Ezukam, U. sankawa. FEBS Lett. 1990. 271. 219.

[22]- G. stotz, R. Sprbille, G. Forkmann. plant physiol. 1984. 116. 171.

[23]- J. B. Harborne. Flavonoids–in phytochimistry. (1) eds. Litton educational publishing Inc (1973).

[24]- J. Brunet. Eliment de phytochimie et de pharmacognosie. eds technique et documentation. Lavoisier (1987).

[25]- E. H. Kelly, R.T. Anthony, T. Dennis. The journal of nutritional biochemistry. v. 12. N° 10. (2002). 572 .573.

[26] -M. Hamburger, K. Hostman. Bioactivity in plants. the think between phytochimistry. (1991). 30. 38. 64.

[27]- J. V. Arnold, A. Royer. Advance in medicinal plants research eds. wessenchaft liche verlags Giselle chaft mbh Stuttgart. (1985).

[28]- J. Bruneton. Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales. eds technique et documentation. Paris. 3^{éme} édition. Lavoisier (1997).

[29]- G. E. Ferraro, Acta farm. Bonaerense, v. 2. N° 2. (1983). 97 .103.

[30]- L. Biyiti, , D. S. pesendo. Plantamedica v. 2. (1988). 95. 190.

[31]- J. W. Melure. Physiology and function of flavonoids. eds Chapman and hall. L London (1975).

[32]- D. Jiang, D. H. zien, W. J Ren. Phytochimistry. v. 62. N° 8. (2003). 1235-1238.

[33]- K. R. Markham. Techniques of flavonoids identification. Academic press .London. (1982).

[34]- D. Dungerdorzh, V. petrenko, L. Dergyugina. Aglyconic composition flavonol glycosides of *Astra galus monogolius* .khim .prir .soedin. (1974) 1. 88.

[35]- H. Grisebach, Z. nature forch.Chimie organique moderne et pratique. 12b. (1957). 277.

[36]- J. B. Harborne. The flavonoids. v. 1. eds Chapman and hall (1975).

[37]- A. Ferron. Bactériologie (à l'analyse des étudiantes en médicine). Edition Goum et Roque (10 éme édition). (1979).

[38]- A. Ferron. Bactériologie (à l'analyse des étudiantes en médicine). Edition Goum et Roque (8 éme édition). (1976).

[39]- ولكسون. ج. ف. ترجمة نبيل إبراهيم حجازي. مقدمة في علم الميكروبيولوجيا. دار المريخ للنشر. الرباط (1989) 159.

[40]- L. Leminor, M. Veron. Bactériologie médicale. Edition Flammarion (2éme édition). paris. (1989)

[41] - C. Nauciel. Bactériologie médicale. Édition Masson (2éme édition) 2000. 389.

[42]- P. Berche, J. L. Gaillard. M. Simonet. Bactériologie: les Bactéries des infections humaines. Édition. flammarion (1ére édition). Paris. (1986).

[43]- R. Fasquelle. Eléments de Bactériologie médicale. Edition flammarion médicine (9éme edition) Paris. (1974). 108 .11 .139.

[44]- M. Bernadet. Phyto-armathirapie pratique. Edition danyls France (1983). 78. 79. 80. 81.

[45]- A. Barry. Procedure for testing antimicrobial agents in agar media .2nd edition. (1986).

[46]- محمد حلمي عبد العزيز. أساسيات علم البكتيريا. دار المعارف (الطبعة الأولى). مصر.(1994) 226. 245. 246. 280.

[47]- H. Hecterc. Microbiologie générale. Edition Doin (1975).

[48]- F .Boulahhal. microbiologie S1 clinique. Office des publications ministraires. Universitaires. Alger. (1994).

[49] - J. Guirand, p. Galzy. L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires end. De l'usine. France. (1980).

[50] - J. L. Avril, H. Dahernat. F. Denis, H. Monteil. Bactériologie clinique. Edition marketing. (1ére edition).Paris. (1992).

[51]- H. Leclerc. Microbiologie genirale. edition. DO, N. 1975.

[52]- K. R .Markham. Techniques of flavonoids identification. eds acadimic press London. (1982).

[53]- P. Lebreton. Sur l'analyse qualitative et quantitative des flavonoides. chim. Anal. France, 49 (7) (1967). 375.383.

[54]- A. S. Abd Elchacour. Chimie organique moderne et pratique université de Roi Abdelaziz. Djedda. (Ed en arabe) (1987).

[55]- A. Barry. Procedure for testing antimicrobial agents in agar media .2nd editon. (1986).

[56]- V. Bhaskar Redym. Characterization and use of essential oil from *Thymus vulgaris* against Botryti cineria and Rizopus stolonifer in straw berry fruits phytochimistry (4). (1998). 1515. 1520.

[57]- A. Barry. Lorain. procedure for testing antimicrobial agents in agar media: Theorical considerations. Antibiotics in laboratory medicine. Williams. walking. Baltimore. 2nd edition. (1986).

[58]- H. M, Sheris, J. c .Antimicrobial susceptibility testing. Ericsson. Report of international collaborative study. Actapathol-Microbial. Scand .sect. B. supply. (1971). 217.

[59] - P. Courvalin, J. P. Fandrois, F. Goldstien, A. Phlippon, J. sirot. L'antibiogramme automatise mpc – vigot. paris. (1988).

[60]- B. Carbonelle, E. Denis, A. Mamonier, C. Pinon. R. Cvargnes. Bactériologie médicale. Ed. SIMEP (2éme tirage). 1987.

[61]- K. R. Marakham. Flavones, flavonols and their glycosides in «Méthods in plant biochemistry » Acadimic press.v 1 (chapitre 6). 1989. 197. 232.

[62]- H. Combier, M. Jay, B. Virion, P. Lebreton. Influence des- 6 (et/ou) des 8-Substitution Sur le comportement spectrometrique des flavonoids.Assemblée du Groupe «poly - phénols». Lyon. France.(1974).

[63]- Z. Kabouche, N. Boutaghane, S. Laggoune, A .Kabouche, Z. Ait –Kaki, K. Benlabed. Comparative antibacterial activity of five Lamiaceae essential oils from Algeria.The international journal of Aromatirapy (2005). 131.

[64]- D. Basarna, G. Ahmet. Antimicrobial Activity of Some Endemic Verbascum. *Salvia* and *Stachys* species. Pharmaceutical biology (formerly international journal of pharmacognosy) (4), (2004). 301-304.

Annexe 1

Réactifs :

1. Violet de gentiane.

Violet de gentiane	1g.
Ethanol à 90%	10 ml.
Phénol	2g.
Eau distillée	100 ml.

2. Fuschine.

Fuschine basique	1g.
Alcool éthylique à 90%	100 ml.
Phénol	5g.
Eau distillée	100 ml.

3. Lugol.

Iode	1g.
Iodure de potassium	2g.
Eau distillée	300 ml.

4. Kovacs.

Alcool amylique ou isoamylique	150 ml.
P.étiméthylaminobenzaldéhyde	10g.
Acide chlorhydrique concentré	50 ml.

Avec l'ajout de l'acide en dernier et lentement. Conserver à +4C°.

Annexe 2

Les milieux de culture.

1. Gélose HEKTOEN.

Protéose –peptone	12g.
Extrait de levure	3g.
Chlorure de sodium	5g
Thiosulfate de sodium	5g.
Sels biliaires	9g.
Citrate de fer ammoniacal	1.5g.
Salicine	2g.
Lactose	12g.
Saccharose	12g.
Fuschine acide	0.1g.
Bleu de bromothymol	65mg.
Gélose	13mg.

pH = 7.6 stereliser par 5 mn d'ébullition.

2. Gélose Chapman.

Extrait de viande	1g/l.
Chlorure de Sodium	5g/l.
Peptone	10g/l.
Gélose	15g/l.
Rouge de Phénol	0,025g/l.
Mannitol	10g/l.

pH= 7.4 Autoclaver 15 mn à 120 C°.

3. Mueller Hinton.

Extrait de viande	2g/l.
Hydrolyse acide de Caséine	75,5g/l.
Amidon	1,5g/l.
Gélose	10g/l.

pH = 7.5. Autoclaver 15 mn à 115 C°.

4. Mannitol mobilité.

Peptone	20g.
Nitrate de potassium	1g.
Mannitol	2g.
Rouge de phénol	4g.
Gélose	4g.

5. TSI.

Peptone	20g.
Extrait de viande	3g.
Extrait de levure	3g.
Chlorure de Sodium	5g.
Glucose	1g.
Lactose	10g.
Saccharose	10g.
Citrate de fer	0.5g.
Hyposulfite de Sodium	0.5g.
Rouge de phénol	25g.
Gélose	12g.

pH= 7.4 Autoclaver 15 mn à 115 C°.

6. Citrate de Simmons.

Sulfate de Magnésium	0,2g.
Citrate de Sodium	2g.
Chlorure de Sodium	5g.

Phosphate monoammonique	1g.
Phosphate dipotassique	1 g.
Bleu de bromothymol	80g.
Gélose	12g.

pH = 6.8 Autoclaver à 20 mn à 120 C°.

7. LDC.

Lysine	5g.
Extrait de levure	3g.
Chlorure de Sodium	5g.
Glucose	1g.
Pourpre de bromocrésol	16mg.

8. Clark et Lubs.

Peptone	10g.
Glucose	5g.
Phosphate Dipotassique	2g.

pH 7 Autoclaver à 20 mn à 120 C°.

9. ODC.

Ornithine	5g.
Extrait de levure	3g.
Chlorure de Sodium	5g.
Glucose	1g.
Pourpre de bromocrésol	16mg.

10. ADH.

L'argenine	5g.
Extrait de levure	3g.
Chlorure de Sodium	5g.
Glucose	1g.
Pourpre de bromocrésol	16mg.

إعداد الطلبة:
معروكة علي
جعبوب حنان
سلطان فراح

الموضوع:
الدراسة الفيتو كيميائية والتأثير المضاد للبكتيريا للنبتة
Stachys circinnata

لجنة المناقشة:
الرئيس: الأستاذ سبتي محمد
الممتحن: الأستاذ إيدوي الطيب
المؤطرة: الأستاذة العقون سهيلة

الملخص:

يكمن هدفنا في دراسة الفعالية المضادة للبكتيريا للمستخلصات الفلافونويدية للنبتة الطبية *Stachys circinnata* من العائلة الشفوية التي تضم ما يقارب 350 جنس و حوالي 4000 نوع تنتشر في جميع أنحاء العالم و بالخصوص في منطقة البحر الأبيض المتوسط.

استعمال التقنيات الكروماتوغرافية (CP و CCM) التي بينت أن النبتة *Stachys circinnata* تحتوي على مركبات فلافونويدية.

بينت الدراسة عدم وجود أي تأثير مضاد للبكتيريا على السلالات المختبرة.

الكلمات المفتاحية:

العائلة الشفوية – *Stachys circinnata* –الكروماتوغرافيا –الفلافونويدات – الفعالية المضادة للبكتيريا.

Résumé

Notre travail consiste à diterminer l'activité antibactérienne des extraits flavonoidiques de la plante *Stachys circinnata,* appartenant à la famille des Labiées (Lamiaceae). Qui comporte prés de 350 genres et 4000 espèces distribuées à travers le monde et plus particulièrement dans la région méditerranéenne.

L'utilisation des techniques chromatographiques (CP et CCM), a montré que la plante *Stachys circinnata* contient des composées flavonoidiques.

Notre étude a montré que ces extraits n'ont aucun effet antibactérien sur les souches étudiées.

.Mots clés : Labiées - *Stachys circinnata* - flavonoides - effet antibactérien.

Abstract:

Our work consists to determine the antibacterial activity of the flavonoidics extracts of the plant *Stachys circinnata,* pertaining to the family of Labiatae (Lamiaceae). This comprises meadows of 350 genus and 4000 species distributed throughout the world and more particularly in the Mediterranean area.

The use of the chromatographic techniques (paper and thin layer) showed that the plant *Stachys circinnata* contains the made up flavonoidics ones.

Our study showed that these extracts do not have any antibacterial effect on the studied stocks.

Key words:

Labiatae- *Stachys circinnata* - falvonoid- antibacterial activity.