الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
جامعة جيجل

جامعة محمد الصديق بن يحيى
كلية علوم الطبيعة و الحياة
رقم الجرد : 649

كلية العلوم

قسم الكيمياء الحيوية و الميكروبيولوجيا

MB.24/05

مذكرة التخرج لنيل شهادة

المكتبة

الدراسات العليا "D.E.S"
تخصص ميكروبيولوجيا

الموضوع

دراسة النشاط المضاد للبكتيريا للزيت الأساسي لنبتة طبية

إعداد الطالبات
مخالفة حنان
متناني فتيحة
برميتة الهام

لجنة المداولات
الرئيس: رولة ساجية
الممتحن: ايدوي الطيب
المؤطر: بوالطغان نعيمة

جامعة محمد الصديق بن يحيى
مكتبة الكلية
كلية علوم الطبيعة و الحياة

جوان: 2005

كلمـــة تشكـــــر

بسم الله الرحمن الرحيم

« ربي أوزعني أن أشكر نعمتك التي أنعمت علي و على والدي و أن أعمل صالحا ترضاه و أدخلني في عبادك الصالحين ».

نشكر الله و نحمده على نعمه التي أنعم علينا و الذي ألهمنا الصبر و المثابرة لتحقيق هذا الإنجاز.

و لا يفوتنا أن نتقدم بكل احتراماتنا و تشكراتنا الخالصة إلى كل من ساعدنا من قريب أو من بعيد في إنجاز هذه المذكرة و نخص بالذكر:

الأستاذة المؤطرة "بوطغان نعيمة" و الأستاذة "العقون سهيلة" و الأستاذة "كعبوش زهية".

إلى أساتذة لجنة التقييـــم:رولة ساجية ، إيدوي الطيب.

إلى من تفانوا في إنجاز هذا العمل : فطيمـــــة، فريـــح، بـا سبـن ..

ولا ننسى أن نتقدم بالشكر الجزيل لكافة أساتذة معهد البيولوجيا.

إلى كل طلبـــة البيولوجيا خاصـــة قسم الميكروبيولوجيا.

حنان، فتيحة، إلهام

*** الفهـــــرس ***

العنـــوان	الصفحـــة
مقدمـــــة.....	02

الفصـــل الأول: " الزيوت الأساسيـــــة "

لمحة تاريخية عن الزيوت الأساسية.....	05
I تعريف الزيوت الأساسية	06
II توزيع الزيوت الأساسية	06
III أماكن تواجد الزيوت الأساسية	06
IV خصائص الزيوت الأساسية	07
V الدور و الأهمية العلاجية للزيوت الأساسية.....	10
VI طرق إستخلاص الزيوت الأساسية.....	12

الفصـــل الثانى: "السلالات البكتيرية المدروسة "

I مقدمـــــة	15
II الخصائص المورفولوجية ومميزات السلالات البكتيرية	15
1-II *Escherichia coli*	15
2-II *Pseudomonas aeruginosa*	17
3-II *Staphylococcus aureus*	18
4-II *Salmonella typhimurium*	19
5-II *Klebsiella pneumonia*.....	20
6-II *Enterobacter cloacae*	20

الفصـــل الثـــالث: " دراسة النشاط المضاد للبكتيريا لمستخلص نبتة الخزامة"

I دراســـة النبتة 23
I-1 المادة النباتية 23
I-2 الوصف النباتي 23
I-3 الخصائص العلاجية لـــ *Lavandula stoechas* 24
I-4 الوضع ضمن التصنيف النباتي 24
I-5 الإستـــــخلاص 24
I-6 التركيب الكيميائي للزيت الأساسي لـــ L.S 25
II تقدير الفعالية المضادة للبكتيريا للزيت الأساسي لأزهار L.S 25
II-1 مصدر السلالات البكتيرية 25
II-2 تحضير السلالات البكتيرية 26
II-3 طريقة الإنتشار على وسط جيلوزي صلب(الأنتيبيوغرام) 26
II-3-1 الوسائل المستعملة 26
II-3-2 طريقـــــة العمل 26
II-4 الطريقة العملية لتحديد الـــ CMI 27
II-4-1 الوسائـــل المستعملـــة 27
II-4-2 تحضير سلسلة التخفيفات 28
II-3 طريقـــــة العمل 29
III النتائج 29
III-1 نتائج الأنتيبيوغرام 29
III-2 نتائج الـــ CMI 34
III-3 المناقشـــــة 35

الخاتمـــــة 36
المراجـــع 37
الملخـــص 41

"المقدمة"

مقدمـــــــــة:

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

وقد 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 و العلاجية و غير العلاجية ذات الأصل النباتي مثل : المضادات الحيوية و المبيدات الحشرية أو الحشائشية.

أما النبات العطري فيمكن أن يعرف على أنه النبات الذي يحتوي في عضو أو أكثر من أعضائه النباتية على زيوت عطرية طيارة، سوءا كانت في ذات صورتها الحرة أو في صورة أخرى تتحول أو تتحلل مائيا إلى زيوت عطرية طيارة ذات عبير مقبول و يمكن استخلاصها بالطرق المتعارف عليها[1]

وقد وقع اختيارنا على العائلة الشفوية لدراستها، إذ تعتبر من أرقى العائلات النباتية حيث تضم هذه العائلة 300 جنس تشمل تحتها ما يقارب 4000 نوع نباتي، معظم هذه الأنواع عطرية الرائحة بالرغم من أن نباتات هذه العائلة موزعة في أنحاء العالم إلا أنها تميل إلى التمركز حول منطقة البحر الأبيض المتوسط.

تتميـــز النباتات العطرية بأنها ذات سيقان مضلعة أو مربعة و الأوراق بسيطة متقابلة و متصالبة، الأزهار في مجموعات أو نورات عنقودية صغيرة أو سنبلية و الأزهار خنثى.

تحتوي العائلة على العديد من الأجناس ذات القيمة الإقتصادية العالية في إنتاج الزيوت الطيارة مثل : الزعترThymus, الخزامةLavande , النعناع Menthe وغيرها [1].

يعتبر جنس الخزامة من أهم أجناس هذه العائلة، وقد تم إختيار هذه المادة النباتية على أساس معايير كيميائية و بيولوجية، فمن الناحية الكيميائية يتميز هذا الجنس باحتوائه على المركبات الفلافونودية كما يتميز كذلك بتنوع كبير للتربينات، أما من الناحية البيولوجية فيشتهر بخصائصه الطبية حيث أثبتت الأبحاث العلمية أن زيت الخزامة يملك قدرة كبيرة على قتل البكتيريا ويستعمل أيضا كمادة مطهرة و مخفظة للألم و مهدئة للأعصاب كما يخفف نبات هذا الجنس من تشنج العضلات و يزيل المغص و يطرد الغازات من المعدة [site 2].

الاستخدام الرئيسي لزيت الخزامة هو صناعة أفخر أنواع العطور و الروائح، هذا بالإضافة لاستخدام الزيت و ماء التقطير في صناعة مستحضرات التجميل كالمساحيق ،الكريمات و الصابون وغيرها [1] .

أما من الناحية الطبية يستخدم الزيت ضد الصداع، خفقان القلب، الكبد، الطحال و حالات حروق الشمس الشديدة كما يستعمل لعلاج الاضطرابات على مستوى الجهاز التناسلي الأنثوي [2] .

وقد قسمنا بحثنا هذا إلى مقدمة و ثلاثة فصول و خاتمة:

الفصل الأول:

خاص بالزيوت الأساسية و أهم ما تضمنه تعريفها، خصائصها الفيزيائية، الكيميائية و العلاجية، طرق استخلاصها.

الفصل الثاني:

خصصناه لدراسة الخصائص المورفولوجية و مميزات السلالات البكتيرية المدروسة .

الفصل الثالث:

تضمن تقدير الفعالية المضادة للبكتيريا للزيت الأساسي لـــ *Lavandula stoechas* و مناقشة النتائج المتحصل عليها من خلال هذا العمل.

الفصل الأول
"الزيوت الأساسية"

لمحـــة تاريخية عن الزيوت الأساسية:

يعود تاريخ استخدام الروائح النباتية للعلاج الطبي من 2000 سنة تقريبا، ففي الصين يعتبر العلاج بالأعشاب أسلوب حياة و من العادات والتقاليد الصينية.

أما في مصر فقد وجد أن الزيوت العطرية النباتية هي مطّهرات و مواد حافظة ممتازة، وكانت تستخدم كمواد حافظة للذبائح، حيث كانت المفتاح لحفظ المومياوات المصرية، التي عرفت أنها تستطيع الحفاظ على مكونات الجسم بصورة مدهشة تصل إلى 5000 سنة.

أما في حوالي 3000 عام قبل الميلاد، استعمل القساوسة الزيوت النباتية العطرية في الطقوس الدينية، ولقد أدركوا أن آثار هذه الزيوت يمكن أن تفيد الناس في المعيشة الصحية.

وفي القرن الثاني عشر إستخدم الأوروبيون الزيوت العطرية النباتية لمقاومة الأمراض المعدية أما في القرن 15 استخدموها في إزالة العرق ومنع الأمراض، بينما تم تطوير استخدامها في القرن 17 على نطاق واسع على شكل عطورات.

ولقد تم استخدام الروائح العطرية في بداية عام 1928 من قبل "رينيه موريس جاتيفون"، وهو صيدلي فرنسي احترق يده بصورة غير متعمدة في تجربة ومن شدة ذعره نقع يده في زيت الخزامة النقي بعد ساعات قليلة و بمداولة الاستخدام إلتأم الحرق تماما بدون ندوب، وبذلك كان المحترف الأول لاكتشاف نظرية الشفاء باستخدام الزيوت النباتية العطرية وقد اعتمد عليها الدكتور"جان فالنيت" في أبحاثه إذ وجد أن الزيوت النباتية يمكن أن ترقى وتطور أسلوب الدفاع عند الخلية و تحرسها من العدوى البكتيرية.

وفيما بعد و مع التقدم العلمي تم استخراج مستحضرات التجميل و العطور من الزيوت النباتية العطرية و أصبحت أكثر شيوعا بين الناس و الآن يساهم الخبراء في العديد من دول العالم في البحوث العلمية للمحافظة على هذا التراث الطبي و الموروث القديم من أجل تطويره لنشره على نطاق واسع [site 1].

I تعريف الزيوت الأساسية :

الزيوت الأساسية الموجودة في النباتات العطرية هي نواتج تكون عموما معقدة تتشكل من مركبات طيارة، ذات روائح مميزة و هي المسؤولة عن مختلف الروائح التي تطرحها النباتات[7].

تستخلص من أجزاء النباتات المختلفة كالبراعم، الأزهار، الثمار، السيقان، الأوراق، الجذور و غيرها و سميت بالزيوت لأنها تشبه الزيوت والشحوم الأخرى في الأثر الذي تتركه، إذا وضعت نقطة منها على الورق تركت بقعة شفافة لاتلبث أن تتطاير لدى يطلق عليها الزيوت الطيارة [site 2].

II تـــوزيع الزيوت الأساسيـــــة:

يضم قسم النباتات الراقية مايقرب من 60 عائلة نباتية تضم تحتها نحو 3000 نوع نباتي تحتوي على الزيوت الطيارة .

ومن أهم العائلات التي تعد منتجة للزيوت الطيارة هي:

- العائلـــة المركبـــة Compositae
- العائلـــة الشفوية Lamiaceae
- العائـــة الصنوبرية Pinaceae
- العائلـــة الآسية Myrtaceae
- العائلـــة القرفيـــة Lawraceae [1]

III أماكن تواجد الزيوت الأساسية

تتواجد الزيوت الأساسية داخل غدد صغيرة جدا تقع في أجزاء مختلفة من النبتة العطرية فهي قد توجد في: [7]

- الأوراق العطرية كما في الحبق Basilic
- الأزهار كما في الورد La rose
- الفواكه كما في الليمون Citron
- الحبوب كما في الكزبرة Coriandre
- القشرة كما في القرفة La cannelle
- الجذور عند بعض النباتات

تتوضع الزيوت العطرية غالبا على أو قرب سطح النبات و تسمى هده الأماكن بـــ خلايا الزيوت الأساسية "cellules à huiles essentielles".

الجــدول1:محتوى الزيوت الأساسية في مختلف التوابل و الأعشاب العطرية [30] .

التوابـــــل	الزيـــوت العطريـــة أقــل – أكبـــر%
▪ التوم .... Ail	0.25 – 0.1
▪ الينسون .... Anis	4 – 1
▪ الحبق .... Basilic	0.1
▪ الجزر .... Carotte	0.8 – 0.5
▪ الكروية .... Carvi	6 – 3
▪ القرفة .... Cannelle	3.5 – 1.6
▪ الكرفس .... Céleri	2.5 – 1.5
▪ الكزبرة .... Coriandre	1 – 0.1
▪ الكمون .... Cumin	5– 2.5
▪ الفلفل الأسود .... Poivre	3.5 – 1
▪ الزعفران .... Safran	1 – 0.1
▪ الزعتر .... Thym	1.2 – 0.5

IV خصائــــص الزيـــوت الأساسيـــة:

1 الخصائص الفيزيائية والكيميائية:

تتميز الزيوت الأساسية برائحتها العطرة سريعة التطاير على درجة الحرارة العادية و تتبخر تماما بالتسخين، وهذا مايميزها عن الزيوت الذهنية الثابتة، نادرا ماتكون ملونة غير أنها قد تأخذ لونا أحمر، أخضر، أصفر أو أزرق بتأثير المواد الغريبة التي قد توجد بها و يدكن اللون عادة بطول مدة التخزين، لها كثافة نوعية أقل من كثافة الماء (0.18–0.84) ولها معامل تجزئة مرتفع (indice de refraction) تذوب في المذّيبات العضوية المستعملة كالكحول و الإيثير و تذوب أيضا في الدّهون وقليلة الذوبان في الماء [7].

يتغير لونها و تسوء رائحتها و تزداد لزوجتها و تصبح مادة راتنجية عديمة الرائحة إذا تعرضت للهواء، ويساعد الضوء على سرعة هذا التفاعل، الزيوت الأساسية سريعة الإحتراق والإلتهاب

أما من الناحية الكيميائية فالزيوت الأساسية عبارة عن مخاليط معقدة لعدة مركبات تتكون أساسا من قسمين أحدهما هو الهيدروكربوني الذي يكون الجزء الأساسي من الزيت العطري والاخر عبارة عن مركبات أكسجينية و هذه الأخيرة تنتمي لأحد هذه المجموعة العضوية من الأحماض، الكحولات، الأسترات، الألدهيدات، الكيتونات أو الإيثيرات و قد تتضمن هذه المكونات مركبات كبريتية أو نتروجينية بنسب ضئيلة، لكن لها تأثير على رائحة و نكهة الزيت العطري و الجزء الهيدروكربوني في الزيت أساسه، Polyterpénes Terpénes, Sesquiterpénes و قد تكون نسبته مرتفعة إذ تصل إلى 90% أو 98% [19].

الجدول2:الخصائص العلاجية للعائلات البيوكيميائية للزيوت الأساسية [8] .

العائلة البيوكميائية	الخصائص البيولوجية و العلاجية
Monoterpénes	– تعتبر محفزات للجهاز المناعي. – تستعمل في حالات الآلام الموضعية فهي إذن عبارة عن مسكنات للألم Antalgique . – يجب أن يكون استعمالها محدود لأنه مع الوقت قد تصبح مهيجة للبشرة و مخاطية الجسم.
Monoterpénoles	– تعتبرمركبات مضادة للتعفنات anti-infectieux فهي قاتلة لكل من البكتيريا bactericides و الفيروسات virucides كما يمكن اعتبارها محفزات جيدة للجهاز المناعي ومهدآت جيدة للأعصاب و خافضة لضغط الدم .
Sesquiterpènes	– تعطي مركبات azulénes اللون الأزرق الداكن للزيوت الأساسية مما يكسبها فعالية مضادة للإلتهاب جيدة Excellents anti-inflammatoires .
Diterpénoles	– نظرا للتشابه الكبير بين بنيتها و بنية الستروئيدات و الهرمونات الجنسية لدى الإنسان تعتبر Diterpénoles منظمات هرمونية جيدة حتى عند أخذها بجرعات صغيرة.

Phénols	- يملك هذا النوع من المركبات فعالية مضادة للتعفنات anti-infectieuse جد كبيرة وأخرى محفزة للجهاز المناعي. - يمكن اعتبارها كمنشطات عند تناولها بجرعات صغيرة. - يجب استعمالها بحذر شديد لأنها تعتبر كمهيجات للمخاطية كما تمتلك القدرة على إحداث تسمم للكبد hépatotoxique عند أخذها بجرعات متتالية أما فيما يخص استعمالها على البشرة فيجب تخفيفها دائما بواسطة زيت نباتي.
الألـــدهيدات **Aldéhydes**	- تعتبر هذه الألدهيدات مضادات جيدة، مهدئة للجهاز العصبي خافظة لضغط الدم، منشطات ومضادات للتعفنات anti-infectieuse لكن يمكنها أن تهيج كل من البشرة والمخاطية.
الأحمـــاض **Acides**	- تعتبر أكثر ممتلكات المملكة مقاومة للالتهاب، خافضة لضغط الدم. - توجد أساسا على شكل أسترات.
السيتونـــات **Cétones**	- مركبات جد نشطة على المستوى الفيزيولوجي لكن يجب توخي الحذر عند استعمالها. - تعتبر مهدآت جيدة ومسكنات للألم عند أخذها بجرعات صغيرة، أما عند رفع الجرعة وتكرارها فتبدي تأثيرها السمي على مستوى الجهاز العصبي meurotoxicité كما يمكن أن يصاب الشخص بنوبات من الصرع. - كما يمكن اعتبارها مواد مانعة لتجلط الدم Anti-coagulante ومنشطة للدورة الدموية. - تمتلك قدرة محدودة في القضاء على البكتيريا. - تعتبر محفزات جيدة للجهاز المناعي. - تحذيرات الاستعمال يجب عدم: 1/ استعمال هذا النوع من المركبات وحده. 2/ إستعمال جرعات كبيرة. 3/ استعمالها لوقت طويل .

الأستـــــرات Ester	- تجمع الأسترات بين الخاصية المهدئة للسيتونات و الخاصية المنشطة للكحولات ومن ثمة كانت خاصيتها المهدئة للأعصاب المضادة للتشنجات Anti-spasmodique . - مضادة للإنهيار العصبي Anti-dépresseures. - لاتهيج البشرة. - كثيرة الاستعمال نظرا لتأثيراتها الجانبية النادرة.
Diones	- مركبات مضادة للتشنجات و تجلط الدم تمتلك سمية صغيرة مقارنة مع السيتونات.

V الدور و الأهمية العلاجية للزيوت الأساسية:

V-1 الدور البيــــولوجي:

تمتلك الزيوت الأساسية دورا في التخلص من بعض نواتج التمثيل الغذائي غير العادي للنبات، لدى تكون مزيلة لنواتج التسمم النباتي وفي العديد من النظريات تسند إليها وظيفة جذب الحشرات إلى النباتات مما يساعد على إتمام عملية التلقيح الخلطي بها و زيادة المحصول أو الحفاظ على النوع النباتي، أو أنها قد تعمل كمواد طاردة للحشرات و الحيوانات [1].

كما تستخدم أيضا كمادة لاحمة للأنسجة المجروحة في النباتات نتيجة العوامل الطبيعية و الميكانيكية، فتعمل بدورها على سرعة إلتام الجروح، و تمنع سيولة السائل الخلوي خارجيا [1].

V-2 الدور الفيــزيولوجيي:[9]،[23]،[24]،[25]

- خاصيــــة التطهيـــر: و تعني مبيد الميكروبات Microbicide أي قتل الميكروبات والفيروسات الممرضة، ويؤكد هذا الدور بواسطة المضادات الحيوية الكلاسيكية لأن لها تأثير محلل للبكتيريا Bacteriolytique .
- تؤثر على الخلية إذ تساعدها على التنفس و التفاعل الجيد .
- تسهل إنتاج المضادات و تحفز الكريات البيضاء.
- تساعد الجسم على معالجة الملوثات .
- لها عمل مخرب للسموم.
- مجدد للحيوية والنشاط.

- تنفذ بسرعة داخل الدم و الغدد، وتؤثر على الجهاز العصبي فتريحه و تنعشه.
- تنشط الدورة الدموية و تزيد من دوران الدم داخل الشعيرات الدموية الدقيقة.
- تسبب احمرار الجلد الناتج عن الحساسية للحرارة ولها عمل مخذر موضعي.
-

V-3 الدور العلاجي و الصيدلاني :[26]،[27]،[28]

- قدرة التطهير التي تمارس ضد مختلف البكتيريا الممرضة .
- عملها كمضاد فطري و تأثيرها على الفطريات المسؤولة على السموم الفطرية و على الخمائر Candida .
- تنقص أو تقضي على تشنج الأمعاء .
- تعتبر كمسكنات إذ تحسن من الإضطرابات النفسية و الجسدية المختلفة، كما تنقص من النرفزة.
- تأثيرها كمضاد حيوي كلاسيكي و هذا دون الرجوع إلى السلبيات (لا توجد مقاومة دائمة أو مستمرة).
- تساعد الجسم على معالجة الفضلات.
- عملها كمخرب للسموم.
- تسهل التنفس .
- توجد كمرهم للدهن، كريمة مخصصة لتخفيف إلتواء المفاصل، الإنقباضات، إنفصام العروق وآلام أخرى للمفاصل و العضلات.
- الزيوت تسبب ظواهر التهيج و الإثارة لمختلف المستويات.
- لها نشاطات أخرى كمسكن عصبي ،لآلام الجروح و مسؤول عن إفرازات الصفراء.

بالإضافة إلى ذلك فإن الدور الأساسي لمجال استخدام الزيوت الطيارة هو تصنيع الروائح و العطور و مستحضرات التجميل و مركبات الزينة المتنوعة الأغراض [29].

نجد أيضا أنها قد تستخدم في المجالات الغذائية كتوابل أو بهارات أو مكسبات للطعم أو النكهة أو الرائحة في بعض الأغذية أو المشروبات [1] .

VI استخلاص الزيوت الأساسيـــــــة:

إن أشهر طرق إستخلاص الزيوت الأساسية هي طريقة التقطير ثم طريقة الإستخلاص بالمذيبات العضوية من بينها:

- ❖ **الاستخلاص بالأجسام الذهنية:** [10]

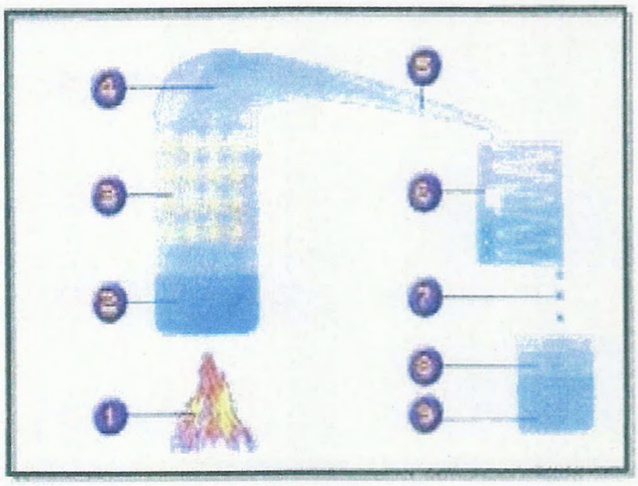
هي طريقة مكلفة تستعمل عموما في تحضير العطور الثمينة مثل :عطور الورد والياسمين و البنفسج.

- ❖ **الاستخلاص بالمذيبات العضوية:**[10]

تستخلص الزيوت الطيارة بواسطة بعض المذيبات العضوية إذا كانت متواجدة في الزهور، فتخلط مع مذيب مناسب مثل:الكحول الإيثيلي حتى يتم ذوبان الزيت الطيار بأكمله في المذيب، ثم يفصل عن طريق تقطيره تحت درجة حرارة معينة حيث يتكثف الزيت فقط بعيدا عن المذيب.

- ❖ **التقطيـــر بالبخـــار:**[site 2]

تعتبر من أشهر طرق استخلاص الزيوت العطرية و تعتمد على تحويل السائل إلى بخار بالتسخين ثم تكثيف هذا البخار وتحويله إلى سائل بالتبريد .



البيـــــانات:

1 ⟵ ولاعة التسخين

2 ⟵ الماء

3 ⟵ خزان النباتات

4-5 ⟵ مواسير توصيل

6 ⟵ مكثف بارد لتكثيف كل من الزيت والماء

7 ⟵ قابلة لاستقبال الزيت والماء المسال

8 ⟵ الزيت الأساسي

9 ⟵ الماء، هذا الماء يسمى hydrolat أو ماء الورد (eau florale) يحتوي على أقل من 5% من الزيت الأساسي [site 2].

رسـم يوضح جهـاز التقطير بالبخـار لأزهار نبتة Lavandula stoechas

الفصل الثانـــي

" السلالات البكتيرية المدروسة "

I مقــدمـــــة

البكتيريا هي كائنات دقيقة (Microorganisme) لوحظت لأول مرة من قبل " Leewven Hook" سنة 1675 ، وهي كائنات وحيدة الخلية تنتمي إلى بدائيات النواة لأنها لا تملك غشاء نووي (Membrane nucléaire) و تتميز الخلايا البكتيرية عن الخلايا الحيوانية بحجمهاالصغير ووجود جدار صلب يتكون أساسا من Piptidoglucane .

واعتمادا على تلوين الغرام (Coloration de Gram) يمكن تقسيم البكتيريا إلى مجموعتيـــن: سالبة الغرام (-Gram) و موجبة الغرام (+Gram) و هي شديدة الإنتشار و التنوع، البعض منها متعايشا commensale و البعض الأخر ممرضا Pathogène [17] و لأجل هذه الأخيرة بدلت العديد من المحاولات لإنتاج مركبات كيميائية قادرة على قتل هذه البكتيريا أو على الأقل الحد من نموها [6].

وقد تم اكتشاف مقدرة البكتيريا على إنتاج مواد مضادة للنمو أطلق عليها إسم المضادات الحيوية، وكان العالم "ألكسندر فليمينغ" هو أول من قام بوصف إحدى هذه المواد عام 1929 و التي يقوم بإنتاجها فطر *Penicillium notatum* حيث أسماها بمادة البنيسلين [6] .

وعند بداية إستعمال هذه المضادات الحيوية ظهرت قدرة البكتيريا على التحول و بالتالي قدرتها على مقاومة هذه المواد، لذلك كثفت الأبحاث في هذا المجال للحصول على مركبات جديدة و هو الهدف نفسه من وراء بحثنا هذا من خلال دراسة هذا النشاط على أزهار نبتة *Lavandula stoechas*.

II الخصائص المورفولوجية ومميزات السلالات البكتيرية المدروسة:

1-II *Escherichia coli*:

عزلت لأول مرة من طرف العالم" Escherich " عام 1885م، تعتبر البكتيريا المنتمية لهذا النوع من أكثر الأنواع دراسة من قبل مؤسسي الأعمال الفيزيولوجية و الوراثية، إذ تمثل أكبر قسم من الكائنات الدقيقة التي تعيش في الأنبوب الهضمي و تكون ممرضة في الجهاز البولي [13].

1-II -أ الخصائــص البكتيريــــة:

بكتيريا هذا النوع صغيرة الحجم (0.7µm .2µm) تتواجد في الصورة المنعزلة أومجتمعة مثنى و نادرا ما تكون على شكل كومة، تتميز بأنها عبارة عن عصويات سالبة الغرام (-Gram) ، عادة ماتكون متحركة بواسطة الأهداب المحيطية، أحيانا تكون محاطة بمحفظة (antigène A).

زراعتها سهلة وشديدة التحمل لتغيرات كل من الــ pH و درجة الحرارة حيث يصل الــ pH الأعظمي إلى 7.5 ، أما درجة الحرارة القصوى 37^0م، لكنها تنمو في درجات حرارة تتراوح مابين 15-45^0م تعطي مستعمرات ملساء(smooth) ذات قطر بين (2-3ملم).

Escherichia coli تخمر الــ Glucose, Mannitol, Lactose منتجة لأحماض وغازات (الهيدروجين و ثاني أكسيد الكربون) بكميات متساوية، وتهدم الــ Trypthophane إلى Indol ، معظمها تملك إنزيم Lysine decarboxylase [13].

II-1 – ب الإمراضيـــــة :

❖ **الإلتهاب البولـــي:**

غالبا تكون *E.coli* هي المسببة للالتهابات البولية.

❖ **الإلتهاب المعوي:**

أفراد هذا الجنس تعد معوية حيث تتواجد طبيعيا داخل أمعاء الإنسان و الحيوان، تمثل 80% لبكتيريا الأمعاء الهوائية، أما بكتيريا النوع *E.coli* فتعتبر مسؤولة عن التقرحات المعوية و أعراض مختلفة أخرى كالإسهال الدموي، البواسير...إلخ

بما أن *E.coli* مسؤولة عن الإسهال الحاد يمكن أن نقسمها إلى أربعة أنواع ممرضة (phathotypes): entérotoxinogènes , entérohemorragiques, entéroinvasifes, entéropathogénes [11].

تتميز بكتيريا هذه العائلة بقدرتها على إنتاج سم داخلي Entérotoxine حيث يقوم هذا الأخير بتخريب وظائف الإمتصاص [11].

الإسهال الناتج عن *E.coli* يكون أكثر إنتشارا عند المسافرين [13].

II-1-ج الخصائـــــص الأنتجينية:

يوجد أكثر من 170 antigènes somatiques و 52 antigènes flagellaires و 70 antigènes capsulaires ، تسمح بتقسيمها إلى عدة أنواع(sérotypes) .

II-1-د الحساسيـــــة إتجاه المضادات الحيوية:

حساسة طبيعيا لكل المضادات الحيوية النشطة على العصويات السالبة الغرام (- Gram) مثل : Colistine ,Tétracycline, Les aminosides, Céphalosporine , Ampicilline, Triméthoprime. Sulfaméthoxazole. لكن يجب مراقبة هذه الحساسية دائما بواسطة الــ antibiogramme لأن بعض سلالات *E.coli* يمكن أن تكتسب مقاومة لهذه المضادات بسهولة [10]، [14] .

II -2 *Pseudomonas aeruginosa*

عزلت لأول مرة من قبل Garle Gessard عام 1882 [10]،[14]، مشتقة من الإسم اللاتيني aeruginosus كما تسمى كذلك بالعصويات Pyocyanique (بيوسيانيك) مسؤولة عن التعفنات الخطيرة الملاحظة بعد العملية الجراحية.

Pseudomonas aeruginosa عبارة عن عصويات متحركة، هوائية إجباريا، تنمو بسهولة على أوساط عادية، تتميز بإنتاج أصبغة زرقاء مخضرة لمستعمراتها، حسب طبيعة الأنتجين Antigene O (محمول بواسطة لبيدات متعددة السكاكر Lipopolysacharidique) نميز عدة أنواع [14]،[15].

II-2-أ الخصائـــــص البكتيرية:

Pseudomonas aeruginosa هي عصويات سالبة الغرام يتراوح طولها من 1,5 − 3 µm، 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).

يمكن تقسيم مستعمرات هذا النوع حسب الشكل إلى 3 أقسام:

- مستعمرات كبيرة تكون محذبة المركز ذات محيط غير منتظم.
- مستعمرات صغيرة قليلة التحذب و ذات محيط منتظم.
- مستعمرات هلامية لزجة معتمة محذبة [14]،[17].

كثيرا من أنواعها تحلل البروتين، و تختزل النترات إلى نتريت ثم إلى أمونياك و البعض الأخر يختزلها مباشرة إلى نيتروجين، عند تنميتها يشاهد تلون الوسط تبعا لنوع الصبغة المتكونة [4].

II-2-ب الأصبغـــــة المنتجـــة من طرف *P. aeruginosa* :

تنتج بكتيريا ***P. aeruginosa*** نوعين من الأصبغة:

- **صبغة الـــــ Pyocianine:** صبغة زرقاء اللون تذوب في الماء و الكلوفورم [17]،[16] .
- **صبغة الـــ Pyoverdine:** صبغة صفراء مخضرة تذوب في الماء ولا تذوب في الكلوفورم.

II-2-ج الإمراضيــــــــــــــة:

بكتيريا هذا النوع مسؤولة عن العديد من الأمراض التي تصيب الإنسان مثل الأمراض البولية، التهاب القصبات الهوائية، الالتهابات الرئوية، أمراض العيون و التهاب المفاصل [13] كما أنها تؤدي عند إصابة الإنسان إلى تلوث الجروح و الحروق [4].

II-2-د الحساسيـــــة اتجاه المضادات الحيوية :

تعتبر بكتيريا هذا النوع من أكثر الانواع مقاومة للمضادات الحيوية فهي مقومة طبيعيا لـــ Chloramphénicol, Céphalosporine 1er et 2éme G ، Triméthoprime,Tetracycline, . penicillineA

إضافة إلى المقاومة الطبيعية، فقد أدى استعمال المضادات الحيوية ذات نطاق واسع إلى ظهور سلالات جديدة من ***P. aeruginosa*** مسؤولة و بصفة خاصة عن العدوى الملاحظة في المستشفيات، لكن مع هذا تبقى حساسة لبعض المضادات الحيوية مثل Colistine, Tobramycine, Gentamicine, . Ticarcilline, Carbénicilline

II-3 *Staphylococcus aureus* :

شوهد هذا الجنس *S.aureus* لأول مرة من قبل "Pasteur " سنة 1879 [17]. سنة 1884 قسم "Rosenbach " الجنس *Staphylococcus* حسب لون المستعمرة إلى قسمين بيضاء وصفراء [10].

II -3-أ الخصائـــــص البكتيريـــــة :

تظهر بكتيريا *S.aureus* تحت المجهر على شكل مكورات موجبة الغرام يتراوح قطرها من 0.8 إلى 1ميكرومتر، تجتمع في ثنائيات(diplocoque) أو على شكل عنقود عنب صغير (grappes de raisin) غير متجرثمة(asporulée).

عادة ما تكون بدون محفظة [10]،[16]،[17]، غير متحركة، تختزل النترات، لها القدرة على تحليل الدم (hymolyse)، تعتبر فلورا طبيعية لجلد الإنسان، قد تفرز السموم داخل جسم الإنسان فتعتبر ممرضة.

تتواجد على جلد الإنسان و الغدد اللمفاوية و الأغشية المخاطية للحيوانات ذات الدم الحار[4].

تعتبر بكتيريا نوع *S.aureus* هوائية – لاهوائية (aero-anaerobie) تنمو بسهولة خلال 24 ساعة في وسط عادي كما يمكن عزلها على وسط خاص زائد الملوحة يسمى chapman، كما أنها غير حساسة للتغيرات الحرارية، تنمو في درجات حراراة تتراوح بين 12-46 °م [18].

مستعمرات هذا النوع محذبة، ملساء، ذات قطر يتراوح من 1-4 ملم عادة ماتكون صفراء اللون وذلك راجع إلى صبغة تنتجها البكتيريا ذات طبيعة بروتينية، عادة ما تربط هذه الصبغة بخصائص ممرضة أخرى.

II-3-ب الحساسيــــــة إتجاه المضادات الحيويــــة:

تبدي حوالي 90% من سلالات *S.aureus* مقاومة إتجاه البنيسلين A و G و حوالي 60 إلى 80% من هذه السلالات مقاومة كذلك للعديد من المضادات الحيوية الأخرى مثل: Erythromycine, lincomycine و بعض الأمينوزيدات (Aminosides)، و تعود هذه المقاومة إلى إفرازها إنزيمات تثبط المضاد الحيوي مثل : Pénécillinase كما تبدي نوعا أخر من المقاومة و هذا بتغير الشكل الفراغي للمركز الفعال للمضاد الحيوي

تتحسس *S.aureus* لمجموعة من المضادات الحيوية منها Céphalosporine , Pristinamycine, Vancomycine ,PinicillineM , Rifampicine حساسة أيضا لعائلة Synergistines, Macrolides Fluaroquinalones [19] . و نظرا لسهولة إكتساب *S.eureus* مقاومة اتجاه المضادات الحيوية، يتحتم إجراء إختبار مقاومتها و حساسيتها للمضادات الحيوية Antibiogramme قبل وصف أي علاج.

II- 4 *Salmonella typhimurium* :

لقد تم إكتشاف 1900 نوعا من *Salmonella* إلى يومنا هذا، نستطيع التمييز بينها من خلال الخصائص الأنتجينية.

II- 4 - أ الخصائـــــص البكتيريــــة:

أنواع هذا الجنس عبارة عن طفيليات للجهاز الهضمي لكل من الإنسان و الحيوان[20] تكون ذات شكل عصوي لاهوائية إختياريا، سالبة الغرام، تتحرك بواسطة أسواط محيطة، تنمو بسهولة في أوساط عادية في درجة حرارة 37^0م و pH= 7.6، تعكر الوسط السائل كما تعطي على وسطها المغدي مستعمرات صغيرة الحجم دائرية واضحة ذات سطح أبيض لامع [18]، تكون غاز كبريتو الهيدروجين (H_2S_2)، لا تنتج أندول لكنها موجبة لاختبار أحمر الميثيل، لا تحلل اليوريا تختزل النترات (NO_3) إلى نتريت (NO_2) تستعمل السترات (Citrate) كمصدر للكربون [4].

II- 4 –ب الحساسيــــة اتجاه المضادات الحيويــــة:

أفراد هذا الجنس حساسة طبيعيا لكل المضادات الحيوية التي توصف في حالة الإصابة بالعصويات السالبة إلا أن هناك نسبة منها تكون مقاومة لبعض المضادات الحيوية مثل Chloramphénicol ,Ampicilline ، كما تم عزل بعض الأنواع من هذا الجنس في افريقيا الشمالية تتميز بقدرتها على إنتاج ß-lactamase [12].

II- 5 *Klebsiella pneumoniae* :

اكتشف هذا الجنس من طرف klebs سنة 1880 و قام بوصفها Friedhand سنة 1882 [19].

تضم عدة أنواع، اعتبرت ولفترة طويلة بأنها متعايشة لكن حاليا تعتبر مسؤولة عن عدد كبير من الأمراض و العدوى الملاحظة في المستشفيات. تعتبر بكتيريا انتهازية تظهر كفاءة عالية في مقاومة العديد من المضادات الحيوية [14].

II- 5- أ الخصائــــص البكتيريـــــة:

عبارة عن عصويات قصيرة ذات نهايات مستديرة، توجد بصفة مفردة، سالبة الغرام، غير متحركة، هوائية، عادة ماتحتوي على المحفظة التي تعطي المظهر اللزج المميز للمستعمرات، كما تتواجد هذه الأخيرة على شكل دائرة محدبة قطرها3-4 ملم .

قد تنتج الاندول (Indol) و اليوريا (Urée)، لا تنتج كبريتات الهيدروجين(SH_2) تختزل النترات إلى نتريت، لها القدرة على تخمير العديد من السكريات مثل : الجليكوز، اللاكتوز، و تنتج كميات من غاز ثاني أكسيد الكربون (CO_2) أكثر من الهيدروجين، تستخدم السترات (Citrate) كمصدر للكربون، درجة الحرارة 35^0م [4].

II- 5- ب الحساسيـــــة إتجاه المضادات الحيويـــــة:

تقاومالــPenicilline ولكنها حساسة للتركيزات المرتفعة منها، تقاوم طبيعيا Ticarcilline Ampicilline, [14].

حساسة أيضا لعدد كبير من المضادات الحيوية منها Céphalosporine, sulfaméthoxazole, aminosides, colistine, triméthoprime[5]، [17].

II - 6 *Enterobacter cloacae* :

II- 6- أ الخصائـــــص البكتيرية:

عبارة عن عصويات سالبة الغرام، متحركة بالأسواط المحيطية، عادة ما تفتقر إلى المحفظة، إلا في عدد من سلالات *E.aerogensa*، تنتج بعض سلالات *E.cloacae* اللون الأصفر، تستخدم السيتونات كمصدر للكربونات، تخمر الــ جليكوزو تنتج غاز ثاني أكسيد الكربون و الهيدروجين بنسبة2 إلى 1 في درجة حرارة 37^0م.

عزل النوع *E.cloacae* من التربة و الماء و المجاري و براز الانسان و حيوانات أخرى و كذلك من البول و بعض الأماكن المصابة للحيوانات و له نفس خصائص الجنس.

II- 6- ب الحساسيـــــة إتجاه المضادات الحيوية :

باستثناء النوع *E.cloacae* الذي يبدي مقاومة لكل من Ampicilline و Ticarcilline [14] تتحسس بعض الأنواع الأخرى لعدد كبير من المضادات الحيوية.

الفصل الثالث

"دراسة النشاط المضاد للبكتيريا لمستخلص نبتة الخزامة"

I دراســـــة النبتـــــة:

I-1 المادة النباتيـــــة:

تم جمع النبتة *Lavandula stoechas* من منطقة جبل الوحش بقسنطينة في أواخر شهر ماي 2004 و هي نبتة فتية أخضعت لعملية التجفيف بمخبر L.O.S.T بمعهد الكيمياء بجامعة منتوري-قسنطينة بوضعها في أماكن بعيدة عن الرطوبة و تحت الظل، تم عزل الأزهار عن الأوراق فكانت كتلة الأزهار المستعملة 100غ حفظت عينة منها تحت اسم (LOSTZKBNLs05/04).

I-2 الوصف النباتي لـــ *Lavandula stoechas* :

يعرف أيضا بالخزامة البحرية و هو نبات عشبي معمر يصل ارتفاعه الى حوالى 1 متر له أوراق متطاولة خشنة و أزهار سنبلية بنفسجية اللون، الكأس له 5 أسنان، التويج له 5 فصوص لكل منها شقين، فيها 4 أسدية، له بذرة واحدة سوداء، يبدأ نموها في أوائل فصل الربيع و تبدأ في الذبول في أواخر فصل الصيف [5].

Lavandula stoechas . [site 2]

I-3 الخصائص العلاجية لـ *Lavandula stoechas* :

يستعمل نبات جنس ***Lavandula stoechas*** على نطاق واسع، فهي تستخدم في تحضير العديد من العطور و مستحضرات التجميل، يستعمل كمضاد للربو، كمطهر، مضاد للتشنجات على مستوى الجهاز الهظمي، مسهل للهضم ، يمنع القيء، كما يستعمل في عمليات التدليك[31]،[32]. مسكن للألم [33]، كمضاد لتكسر الصفائح الدموية، مقوية للجهاز العصبي، و تستعمل لمعالجة حروق الشمس [34].

I-4 الوضع ضمن التصنيف النباتي:

Rauyaume	Plantes	المملكة .....
Sous royaume.....	Tracheobiontes	تحت المملكة .....
Embranchement.....	Spermatophytes	الفرع .....
Division	Magnoliophytes	القسم .....
Classe	Magnoliopsides	الصنف .....
Sous classe	Asteridae	تحت الصنف .....
Ordre	Lamiales	الرتبة .....
Famille.....	Lamiaceae	العائلة .....
Genre	*Lavandula*	الجنس .....
Espéce	*Lavandula stoechas*	النوع .....

I-5 الإستخلاص

أجريت عملية الإستخلاص لـ 100غ من *Lavandula stoechas* بواسطة تقنية التقطير بالماء Hydrodistilation في جهاز Clevenger لمدة 3 ساعات، لنتحصل في الأخير على مستخلص الزيت الأساسي بوزن 2.1 غ ذو لون أصفر و رائحته عطرة.

I-6 التركيب الكيميائي للزيت الأساسي لأزهار *Lavandula stoechas*: [35]،[36]

تم التحليل الكيميائي بواسطة الكروماتوغرافية GC/MS حيث تم تحديد 38 مركب منها

المركبـــــات	النسبة المئوية (%)
Menthol	18.1
Menthone	12.6
Pulegon	40.4
Comphor	39-18
Feuchone	30-9
α-Pinene	0.42
β-Pinene	0.45
α-Thujone	0.33
Linalool	0.61
Iso-borneol	traces
Borneol	5.37
Linalyl acetate	2.98
Caryophyllene	2.37

II تقديـــر الفعالية المضادة للبكتيريا لمستخلص أزهار *Lavandula stoechas* :

II-1 مصدر السلالات البكتيـــــرية:

تم الحصول على السلالات:

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853
- *Escherichia coli* ATCC 259213
- *Staphylococcus aureus* ATCC 29213
- *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603

وهي سلالات مرجعية من معهد باستور بالجزائر العاصمة، أما باقي السلالات الاخرى:

- *Enterobacter cloacae*
- *Salmonella typhimurium*

فقد تم عزلها من خلال أخذ عينات مختلفة من المرضى بالمستشفى الجامعي ابن باديس "قسنطينة".

II-2 تحضير السلالات البكتيرية:

من أجل الإحتفاظ بهذه السلالات المذكورة طيلة البحث، كنا نجدد عملية الزرع بداية كل أسبوع، إذ يتم زرع كل نوع بكتيري على الوسط الملائم له فتزرع *Staphylococcus aureus* على وسط خاص (chapman)، أما باقي الأنواع الأخرى فتزرع فوق الوسط(hécktoen).

II-3 طريقة الإنتشـــار على وسط صلب:

❖ **Antibiogramme:** من أجل تقدير الفعالية أو النشاط المضاد للبكتيريا أنجز الـــ Antibiogramme بواسطة طريقة الإنتشار على وسط صلب [15]،[22].

تعتبر هذه الطريقة غير مكلفة مقارنة بالطرق الاخرى،إضافة الى أنها تسمح بتحديد حساسية البكتيريا للمركبات المضادة لها.

II-3-1 الوسائـــل المستعملـــة:

- ممصات باستور Pipettes pasteur
- ملقط معقم Pince stérile
- إبرة تلقيح بلاتينية Anse de platine
- ممسحة معقمة Econvillon strille
- Bec benzen
- مسطرة
- ماء مقطر، الإيثانول الوسط Mueller_Hinton

II-3-2 طريقـــة العمل:

أ - تحضير الأقراص:

توضع الأقراص المصنوعة بواسطة ورق واثمان رقم 3 و التي تكون بقطر 6 ملم في أنبوب اختبار زجاجي يحوي 10 ملم من الماء المقطر في جهاز autoclave لمدة 20 دقيقة على درجة حرارة 120°م، بعدها يتم التخلص من الماء ثم توضع الأقراص في الحاضنة حتى تجف.

ب- الوســـــط:

يسكب Mueller_Hinton في علب بيتري بحيث يكون ارتفاعه4 ملم، ثم يترك ليجف قبل الإستعمال.

ج- اللقـــاح البكتيري L'inoculum:

يتم كشط 5 مستعمرات متباعدة عن بعضها البعض و متشابهة من مزرعة بكتيرية عمرها 18 ساعة بواسطة إبرة تلقيح بلاتينية، تغمر إبرة التلقيح في انبوب به 10ملل من الماء المقطر و يرج الأنبوب جيدا للحصول على معلق بكتيري متجانس.

د- الزرع L'ensemencement:

بعد مرور 15 دقيقة على تحضير اللقاح البكتيري تغمر ممسحة (Econvillon) في الأنبوب الحاوي على المعلق البكتيري.

يمسح كامل سطح علبة بتري المحضرة سابقا في إتجاه واحد من الأعلى إلى الأسفل، تكرر العملية مرتين بحيث تدار العلبة بزاوية 60^{0}م في كل مرة. توضع في نفس العلبة و لنفس السلالة البكتيرية 4 أقراص تحوي تراكيز متزايدة من المستخلص(10 ميكرولتر) .

بعد غلق العلب تترك لمدة 15 دقيقة في درجة حرارة عادية، ثم توضع بعدها في حاضنة لمدة 18 ساعة على درجة حرارة 37^{0}م.

هـ - القـــــراءة:

بعد مرور 24 ساعة تتم القراءة بقياس مناطق التثبيط (Zones d'inhibition) بواسطة مسطرة.

4-II الطريقـــة العملية لتحديد CMI:

تعرف الـــ CMI بأنها أصغر تركيز ممكن من المضاد الحيوي، يؤدي و في خلال 18إلى 24 ساعة من الحضن على درجة حرارة 37^{0}م إلى تثبيط النمو أو التضاعف البكتيري [21] و يمكن تحقيقها بطريقتين:

- **طريقة التخفيف**(Méthode par dilution) و نستطيع تحقيقها سواءا على وسط صلب أو سائل.
- **طريقة الإنتشار**(Méthode par diffusion).

1-4-II الوسائـــــل المستعملـــة :

- سلسلة تخفيفات الزيت الأساسي
- علب بتري Boites de petri
- محلول الزرع(Bouillon nutritif) يحتوي على بكتيريا عمرها 18سا
- Bec benzen
- ملقط معقم pince stérile
- الوسط Mueller-hinton

II-4-2 تحضير سلسلة التخفيفات:

نحضر المحلول الام (أ) بتركيز 2000 مغ/ملل، بحيث نضيف إلى10ملل من الإيثانول المخفف 20ملغ من مستخلص الزيت الأساسي لأزهار *Lavandula stoechas*.

من خلال هذا المحلول الام (أ)نحضر مختلف التخفيفات حسب الجدول -3-:

الجدول3: مختلف تركيـــزات المحلول الأم [37]،[38]

التركيز البدائي بـــ ملغ/ملل	الحجم بـــ ملل	حجم الكحول بـــ ملل	التركيز النهائي بـــ ملغ/ملل
2000	6.4	3.6	128
1280	2	2	64
	1	3	32
	0.5	3.5	16
	0.5	7.5	8
80	2	2	4
	1	3	2
	0.5	3.5	1
	0.5	7.5	0.5
5	2	2	0.25
	1	3	0.125
	0.5	3.5	0.063
	0.5	7.5	0.032

II-4-3 طريقـــــة العمل:

❖ **اليوم الأول :**

1- تحضير المزرعة البكتيرية:

نقوم بإعادة زرع كل سلالة بكتيرية بواسطة المقبض البلاتيني(L'anse de platine) إنطلاقا من مزرعة عمرها 18 ساعة (بعض المستعمرات) في 10 ملل من المحلول المغذي (Bouillon nutritif)

- توضع في الحاضنة في 37 ^{0}م من 3 إلى 5 ساعات حتى ظهور جيد للمستعمرات (حوالي 5 . 10^7 بكتيريا/ملل).
- نضع 18 ملل من الجيلوز Mueller_Hinton درجة حرارته 45^{0}م في كل علبة من علب بيتري.
- نضيف 2ملل لكل تخفيف من سلسلة الزيت الأساسي المحضر سابقا بحيث نبدأ من أعلى إلى أقل تركيز، ثم نقوم بتحريك علبة بتري من أجل الخلط الجيد.
- نقوم بتحضير علبة بتري تحتوي على 18ملل من الجيلوز M.H كشاهد زائد 2ملل من الكحول.
- نترك علب بتري في درجة الحرارة العادية لبعض الدقائق حتى يتجمد الجيلوز، ثم نزرع بواسطة المقبض البلاتيني العلب على شكل خطوط.
- نقوم بحضن العلب 18 ساعة في درجة حرارة 37^{0}م.

❖ **اليوم الثاني:**

- قراءة CMI.

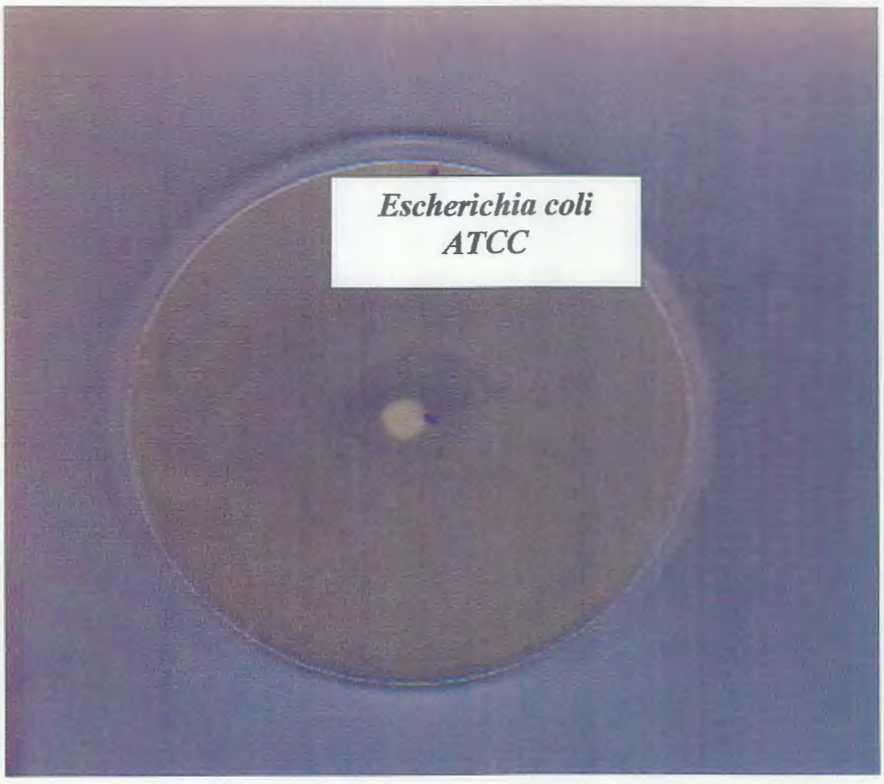
III النتـــائج :

1 – نتائـــج Antibiogramme:

قيست أقطار مناطق التثبيط الخاصة بمستخلص نبتة الخزامة بعد 24 ساعة من التحضين فكانت النتائج الممثلة في الجدول -4- بـــ ملم

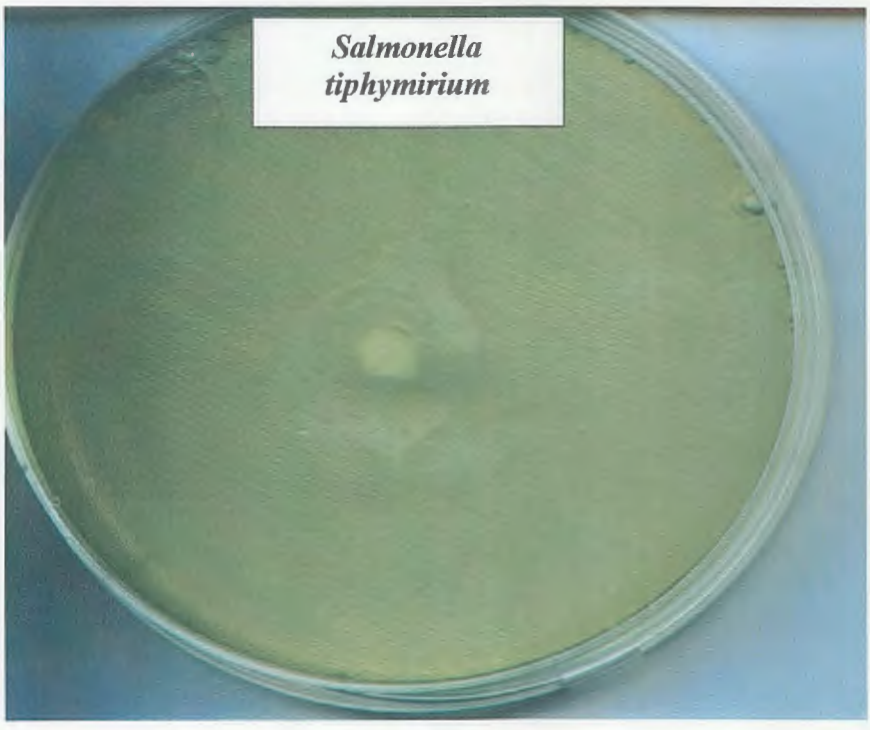
الجـــدول4:مناطق التثبيط بـــ ملم

القطـــــر بـــ ملم				
التركيز/8 (8 ملغ/ملل)	التركيز/4 (16 ملغ/ملل)	التركيز/2 (32 ملغ/ملل)	التركيز (64 ملغ/ملل)	السلالة البكتيرية
12	14	16	18	*Escherichia coli* ATCC 259213
26	28	32	36	*Staphylococcus aureus* ATCC 29213
20	22	22	24	*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
12	14	20	24	*Salmonella typhimurium*
10	16	18	22	*Enterobacter cloacae*
18	22	22	24	*Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603



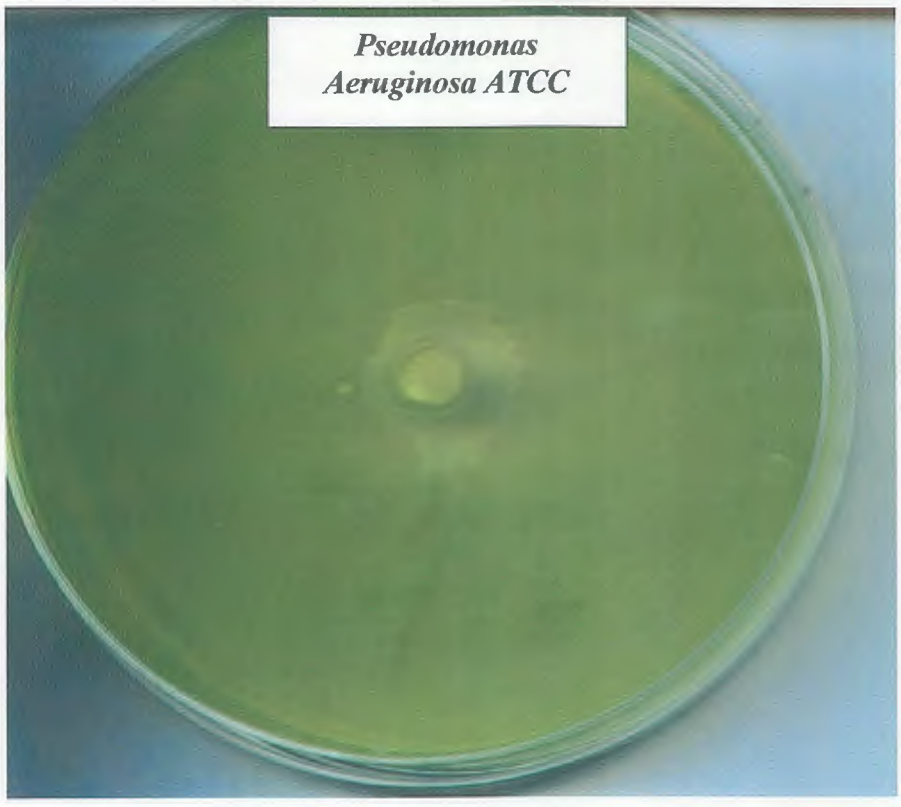
الصورة I-1: التأثير المضاد للبكتيريا للزيت الأساسي لـــ *Lavandula stoechas* على *Escherichia coli ATCC*

الصورة I-2: التأثير المضاد للبكتيريا للزيت الأساسي لـــ *Lavandula stoechas* على *Staphylococcus aureus ATCC*

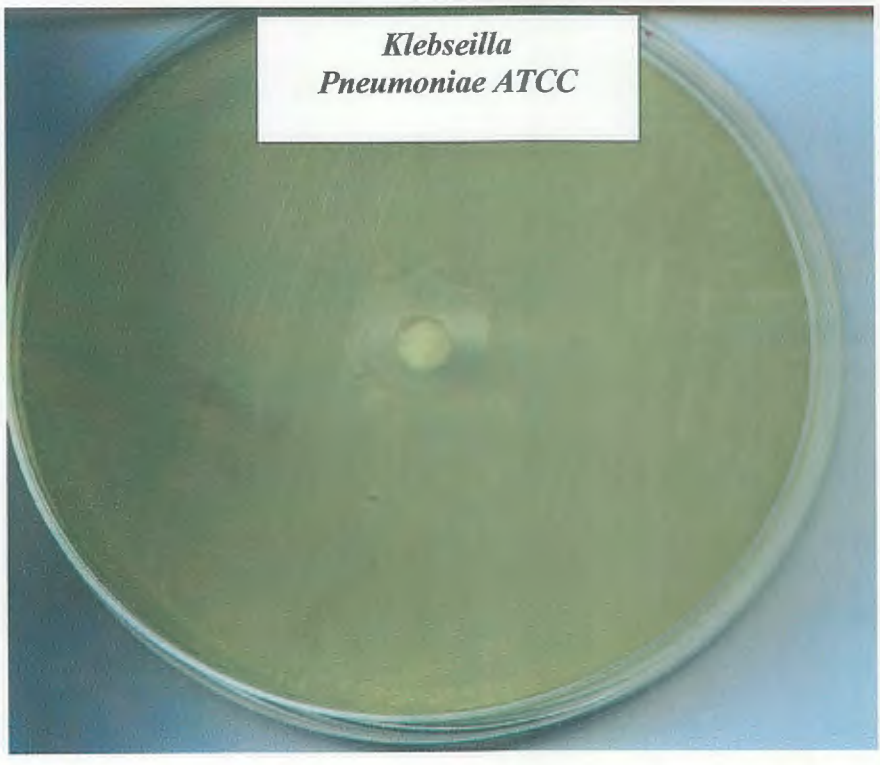


الصورة I-3: التأثير المضاد للبكتيريا للزيت الأساسي لـ *Lavandula stoechas* على *Salmonella tiphymirium*

الصورة I-4: التأثير المضاد للبكتيريا للزيت الأساسي لـ *Lavandula stoechas* على *Enterobacter cloacae*



الصورة I-5: التأثير المضاد للبكتيريا للزيت الأساسي لـــ *Lavandula stoechas* على *Pseudomonas aeruginosa ATCC*



الصورة I-6: التأثير المضاد للبكتيريا للزيت الأساسي لـــ *Lavandula stoechas* على *Klebseilla pnemeumoniae ATCC*

2- نتائـــــج الـــ CMI:

نتائج التركيز الأدنى للتثبيط (CMI) لمستخلص نبتة الخزامى ممثل في :

الجدول5: قيم CMI لمتستخلص النبتة (µg/ml) (ميكروغرام/مل)

السلالـــة البكتيريـــة	CMI بـــ ميكروغرام/ملل
Escherichia coli ATCC 259213	64
Staphylococcus aureus ATCC 29213	أقـــل من 0.001
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	0.32
Salmonella typhimurium	0.62
Enterobacter cloacae	0.32
Klebsiella pneumoniae ATCC 700603	0.32

IV مناقشـــــة النتـــائج:

أظهرت نتائج الـــ Antibiogramme المدونة في الجدول-4- تحسس كل السلالات البكتيرية المدروسة لمستخلص أزهار نبتة *Lavandula stoechas*، فقد استجابت*Staphylococcus aureus* ATCC 29213 مثلا استجابة جيدة حيث وصل قطر المنطقة المثبطة إلى36 ملم بينما لم يتعدى هنا القطر 18ملم مع *Escherichia coli* ATCC 259213، أما مع باقي السلالات الأخرى فقد تأرجح بين 22 و 24 ملم.

ومن خلال نتائج Antibiogramme كذلك نلاحظ أن هناك علاقة تناسب بين قطر المنطقة المثبطة و تركيز المستخلص فكلما زاد هذا الأخير زاد قطر المنطقة المثبطة.

جاءت نتائج هذا الاختبار (CMI) لتؤكد نتائج Antibiogramme فمثلا كان تركيز0.32 ميكروغرام/ملل كافيا لتثبيط كل من *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27852 , *Enterobacter cloacae* . *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 . وعلى عكس *Escherichia coli* ATCC 259213 فقد كان رفع التركيز إلى غاية 64 ميكروغرام/ملل أمرا ضروريا لتثبيط نموها.

أما بالنسبة للكرويات الموجبة الغرام *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ، كان تأثير المستخلص كبيرا جدا فلم نلاحظ نمو بكتيري حتى عند 0.001 ميكروغرام/ملل .

ونظرا لنفاد كمية الوسط M.H توقفنا عن إجراء تخفيفات أخرى لتحديد أصغر تركيز مثبط لنموها بدقة.

من خلال نتائج Antibiogramme و من خلال نتائج CMI، نستنتج أنه يمتلك مستخلص أزهار نبتة *Lavandula stoechas* فعالية أو نشاطا كبيرا مضاد للبكتيريا خاصة مع الكرويات الموجبة الغرام (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213)، حيث يقل CMI عن 0.001 ميكروغرام/ملل، و تتقارب درجة هذه الفعالية مع باقي السلالات السالبة الغرام من سلالة لأخرى.

"الخاتمة"

الخاتمـــــة:

إن الهدف الرئيسي من بحثنا هذا هو دراسة فعالية زيت أزهار نبتة *Lavandula stoechas* على مجموعة متنوعة من السلالات البكتيرية:

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27852, *Escherichia coli* ATCC 259213,
Salmonella typhimurium, *Enterobacter cloacae* ATCC 29213,
Staphylococcus aureus , *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603

إذ قمنا كخطوة أولى باستخلاص الزيت الأساسي بواسطة التقطير بالماء باستعمال جهاز clevenger.

النتائج المتحصل عليها بطريقةالـــ Antibiogramme بينت ان هذا الزيت له فعالية مضادة للبكتيريا خاصة على *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ، حيث وصل قطر المنطقة المثبطة إلى 36 ملم، *Salmonella typhimurium* ، *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 قطر المنطقة المثبطة 24 ملم.

بعد إختبار النشاط المضاد للبكتيريا قمنا بتحديد أصغر تركيز مثبط للنمو البكتيري (CMI) ، وقد جاءت نتائجه مؤكدة لنتائج الـــ Antibiogramme .

بينت النتائج المتحصل عليها بأن هذا الزيت يحتوي على مواد بيوفعالة "Bio-actives"، ووجود مثل هذه المركبات هي اللتى تجعل النباتات ذات نفع علاجي و قيمة دوائية معروفة.

المراجـــع باللغـــة العربيـــة:

[1] محمد السيد هيكل. عبد الله عبد الرزاق محمد. النباتات الطبية و العطرية: كيمياؤها، إنتاجها، فوائدها، منشأة المعارف (الطبعة الثانية)، مصر.(1993). ص. 13-186-187-274.

[2] مختار سالم. أعشاب لكنها دواء، دار المريخ للنشر. (1987). ص.209.

[3] الشحات نصر أبو زيد. النباتات العطرية و منتجاتها الزراعية و الدوائية، الدار العربية للنشر والتوزيع. (1992). ص. 24-48.

[4] محمد حلمي عبد العزيز. أساسيات علم البكتيريا، دار المعارف (الطبعة الأولى)، مصر. (1994). ص.226-244-245-246-280.

[5] حسان قبيسي. معجم الأعشاب و النباتات الطبية، دار الكتب العلمية (الطبعة الخامسة)، لبنان. (2002). ص.159.

[6] ولكسون. ج. ف. ترجمة :نبيل إبراهيم حجازي. مقدمة في علم الميكروبيولوجيا، دار المريخ للنشر، الرباط. (1989). ص. 159.

المراجـــع باللغـــة الفرنسيـــة :

[7] Bruneton. J. Pharmacognosies, phytochimie, plantes médicinales, techniques et documentation, 2éme édition . lavoisier(France). (1993). P.422-266.

[8] Houchit. J. pharmacie naturelle, édition aubanel.(1992).

[9] Bezager. L et coll. Les plantes dans la thérapeutique moderne, 6éme édition. édition Maloire. (1992). P. 420.

[10] Bernadet. M. Phyto- Aromathérapie pratique. Edition dangles. France. (1983). P.78-79-80-81.

[11] Feiffer. B. Gastro- enterites dues à Escherichia coli.

[12] Avril. J.L, Dabernat. H, Denis. F, Montiel. H. Bacteriologie clinique. Edition Marketing (1ere édition) ,Paris. (1995) .P.14 -15 -125 -167 -266.

[13] Nauciel.C. Bactériologie médicale. Edition Masson (2éme édition) . 2000. P. 389.

[14] Berche. P, Gaillaard. J. L, Simont. M. Bacteriologie :les Bacteries des infection humaines.édition Flammarion (1ere edtition), Paris. (1989).

[15] Barry. A. procedure for testing antimicrobial agents in agar media. 2nd edition. (1986).

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

[17] Ferron. A. Bactériologie (à l'usage des étudiants en médicine) . Edition Gouan et Roque (8éme édition). (1976).

[18] Boulahbal. F. Microbiologie S1clinique. Office des publications ministraires universitaires, Alger. (1994).

[19] Fasquelle.R. Elements de Bactériologie médicale. Edition Flammarion médécine (9éme édition) , Paris.(1974) . P.108-111-139.

[20] Andrejak et Hary. Cour de phrmacologie. Edition Ellipes(3 = édition). 1993, P. 291-292.

[21] Minor. L, Véron, V. Bactériologie médicale. Edition Flammarion, Paris. (1989).

[22] Bhaskara Redym. V. et coll. Characterization and use of essential l oil from *Thymus vulgaris against* , *Botrytis cinerea* and *Rizopus stolonifer* in straw berry fruits phytochemistry (4) . (1998). P. 1515- 1520.

[23] Bezager. L et coll. Les plantes dans la thérapeutique moderne, 6éme édition, édition Maloire. (1992). P. 423.

[25] Paris. M. Hurabielle. M. Abrégé de matière médicale (pharmacognosie), Tome I, édition Masson. Paris, New york . (1981). P.32.

[26] Bernadet. M. Phyto-aromathérapie pratique, édition masson . P. 89-78.

[27] Cretti. L. les plantes aromatiques médicinales, édition Atlas. (1981). P. 68-15.

[28] Orange. R. Passet. G. Plantes médicales à essence et chimiotaxonomie. 17 journée de l' aromate lourd, Martin 12 mai (1973).

[29] Richard. H . Epices et aromates, édition Apria (Paris). (1992). P. 4 -20.

[30] Saez. F. Essential oil variability of *thymus zygis* gronring wild in southeastern , Spain , Phytochemistry (40), (1995). P.825 -819.

[31] Chevallier. A. The Encyclopedia of Medicinal plants Dorling Kindersley. London. (1996). ISBN (9). P. 51- 48.

[32] Bown. D. Encyclopaedia of Herbs and their Uses. Dorling Kindersley. Landon. (1995). INSB 0-7513. P. 20 – 31.

[33] Gilani . A. H, Aziz. N, Khan. M. A. Ethnopharmacological evaluation of the anticonvulsant. (2000). Journal of ethnopharmacology,(71). P. 161- 167.

[34] Ballabeni. V, Tognolini.M, Chiavarini. M. Novel antiplatelet and antithrombotic activities of essential oil from *Lavandula hybrida* Reverchon "grosso". Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology. (2004). (11). P. 596- 601.

[35] Goren. A, Topcu. G , Bilsel. G. The chemical constituents and biological activity of essential oil of Lavandula stoechas SSP. Stocchas. Zeitschrift fuer natue florschung. (2002), 57, P. 797-800.

[36] Zrira. S, Benjilali. B. the constituents of the oils of Lavandula stoechas. L. SSP. Stoechas from Morocco. Journal of Essential oil Research.(2003). (15).P.68.69

[37] Courvalin. P, Fandrois. J. P, Goldstien. F. Philippon. A, Sirot. J.L' antibiogramme automatisé mpc-vigot. Paris. (1988).

[38] Carbonelle. B, Denis. E . Mamonier. A, Pinon. G. Vargnas. R. Bactériologie médicales. Ed. SIMEP (2éme tirage). (1987).

مراجـــــع الـــ WEB

[site1] www.dermaoum. Com /medicaloil.htm.

[site 2] http:// www. khayma. Com/ hawai.

الملخـــــــص

تضم العائلة الشفوية (Lamiaceae) ما يقارب 300 جنس و حوالي 4000 نوع، غالبا ماتنتشر في منطقة البحر الأبيض المتوسط.

بينت دراسة الفعالية المضادة للبكتيريا للزيت الأساسي لـــ *Lavandula stoechas* نشاط كبير مضاد للسلالات البكتيرية المدروسة.

حيث ادى مستخلص الزيت الأساسي لـــ *Lavandula stoechas* إلى تثبيط كبير لنمو *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (36 ملم)، (0.001 ميكروغرام/ملل)، *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27852 (24 ملم)، (0.32 ميكروغرام/ملل).

الكلمـــات المفتاحيـــة:

Lavandula stoechas، العائلة الشفوية، الفعالية المضادة للبكتيريا، الزيت الأساسي.

من إعداد:
- مخالفة حنان
- متناني فتيحة
- برميتة إلهام

الموضوع:
دراسة النشاط المضاد للبكتيريا
للزيت الأساسي لنبتة طبية

تاريخ العرض:
2005/07/03

الملخص

تضم العائلة الشفوية (Lamiaceae) ما يقارب 300 جنس و حوالي 4000 نوع، غالبا ماتنتشر في منطقة البحر الأبيض المتوسط.

بينت دراسة الفعالية المضادة للبكتيريا للزيت الأساسي لـــ *Lavandula stoechas* نشاط كبير مضاد للسلالات البكتيرية المدروسة.

حيث ادى مستخلص الزيت الأساسي لـــ *Lavandula stoechas* إلى تثبيط كبير لنمو *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (36 ملم)، (0.001 ميكروغرام/ملل)، *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27852 (24 ملم)، (0.32 ميكروغرام/ملل).

الكلمـــات المفتاحيـــة:

Lavandula stoechas، العائلة الشفوية، الفعالية المضادة للبكتيريا، الزيت الأساسي .

Résumé

La famille des labiées (lamiaceae) comprenant plus de 300 genres et 4000 espèces, dont la plupart sont réparties dans la région méditerranéenne.

L'étude de l'activité anti-bactérienne de l'huile essentielle de *Lavandula stoechas* a montré une bonne activité vis-à-vis des souches testées.

L'huile essentielle de *Lavandula stoechas* a fortement inhibé les souches *Staphyloccus aureus* ATCC 29213, (36mm) , (0.001µg/ml), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27852 (24mm), (0.32µg/ml).

Mot clés :

Lavandula stoechas, lamiaceae, activité anti-bactérienne, l'huile essentielle.

Abstract

The Labiatae familly includes over 300 genus and 4000 species, are more abundant in mediterranean area.

The study of the anti-bacterial activity of the essential oils of *Lavandula stoechas* Showed a good activity against the tested strains.

The essential oil of *Lavandula stoechas* inibited strongly the growth of the *Staphyloccus aureus* ATCC 29213, (36mm) , (0.001µg/ml), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27852(24mm), (0.32µg/ml).

Key words :

Lavandula stoechas, lamiaceae, anti-bactérial activity, essential oil.