الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

جامعة جيجل

جامعة محمد الصديق بن يحيى
كلية علوم الطبيعة و الحياة
المكتبة
رقم الجرد : 650

كلية العلوم

مذكرة التخرج

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

فرع: الميكروبيولوجيا

الموضوع

دراسة النشاط المضاد البكتيريا للنبتة
Salvia officinalis (L)

إعداد الطلبة:

بخوش خالد

بلقاسم فاتح

زقار فارس

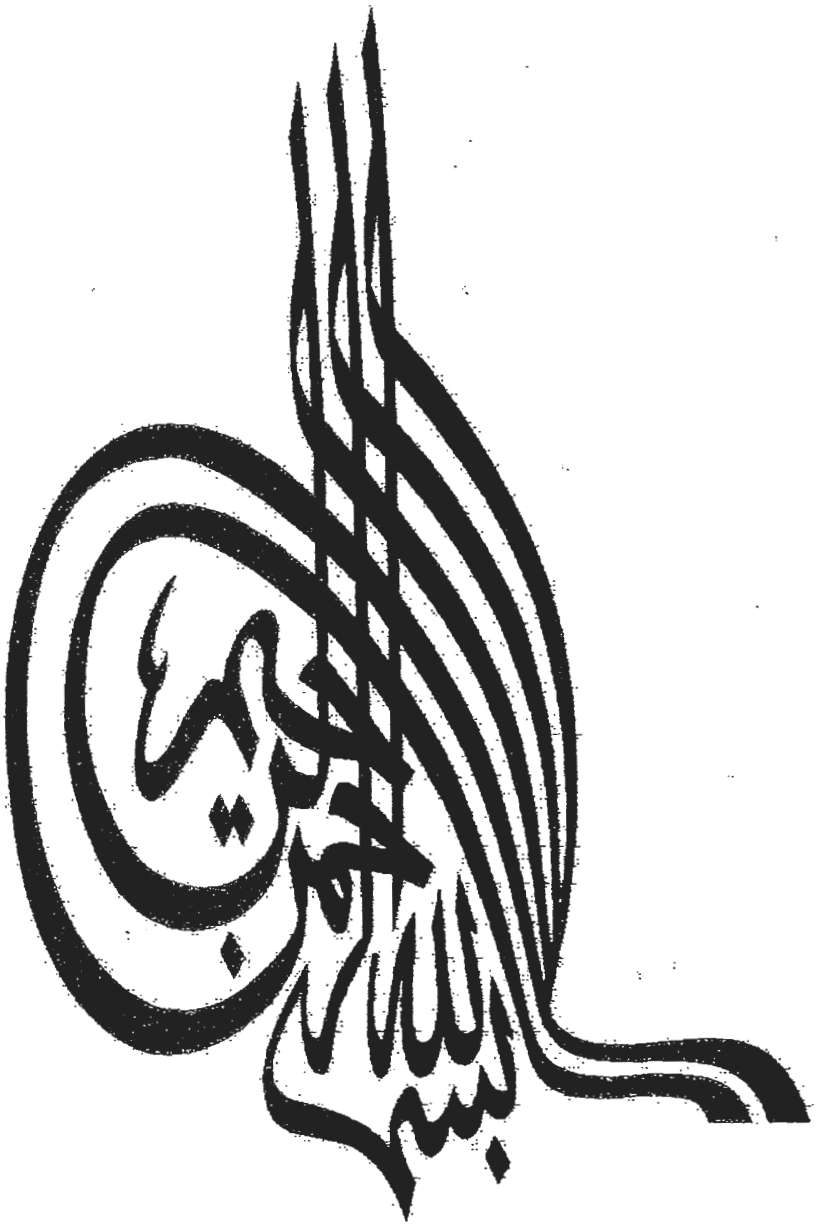
لجنة المناقشة:

الرئيس: إيدوي الطيب

المقررة: رولة سجية

المؤطرة: العقون سهيلة

دفعة جوان 2005.


بسم الله الرحمن الرحيم

كلمة شكر

قال الله تعالى: ﴿يرفع الله الذين آمنوا منكم و الذين أوتوا العلم درجات و الله بما تعملون خبير﴾ صدق الله العظيم

نشكر الله العلي القدير الذي بفضله تم هذا الإنجاز

نتقدم بتشكراتنا الخالصة إلى كل من قدم لنا يد المساعدة في هذا الإنجاز: الأستاذة المشرفة العقون سهيلة.

الأستاذة بوطغان نعيمة.

الأستاذة كحبوش زهية مديرة مخبر .L.O.S.T (قسنطينة) على المساعدات التي قدمتها لنا.

إلى أعضاء لجنة التقييم :

الأستاذ المحترم إيدوبي الطيب رئيس اللجنة

و الأستاذة المحترمة رولة سجية الممتحنة

و إلى جميع طلبة وطالبات البيولوجيا دفعة 2005 م

إهداء

أهدي هذا الإنجاز إلى الوالدين الكريمين

إلى أخي طارق

إلى الجدين من الأم و من الأب

إلى الأخوات دنيا، أسماء، وداد، إكرام

إلى جميع الأخوال و الخالات، الأعمام و العمات

إلى جميع من يعرفني و صاحبني خاصة فرقاني سمير،

بلعطار نذير، بن التونسي مهدي، سراوي شعبان، غيشي طارق،

خالد بوخليلبة، جيملي فرحات، سفيان، ياسين بوراس،

يزيد بوراس، سماتي ياسين، بالمبارك فاتح،

و إلى كل الطلبة و الطالبات الذين

درسوا معي

إلى كل من يعرف **بخوش خالد**

إهداء

أهدي إنجازي هذا إلى من كانا سببا في وجودي

إلى من رباني صغيرا و سهرا على تعليمي

إلى من هما أغلى شيء في الوجود : أمي و أبي

إلى إخوتي : سعاد ، سفيان ، بلال ، إسلام

إلى جدتي ، و جميع أعمامي و أخوالي

إلى جميع الأهل و الأقارب

إلى الذي أحترمه كثيرا * نسيم *

إلى جميع الأصدقاء

إلى الإتحاد العام الطلابي الحر

و إلى كل من يعرف Belkacem Fatih

و أخيرا أسأل الله أن ينفعنا بما علمنا و أن يوفقنا إلى ما فيه رشاد

إهداء

أهدي هذا الإنجاز إلى أمي العزيزة وكذلك إلى أبي العزيز

وإلى كل أخوتي و أخواتي وإلى ابن العم العزيز جمال و إلى كل الأهل

إلى الأساتذة الكرام إختصاص

Santé et production animale

1. باقة صالح
2. بن عبد القادر مراد
3. لحلو رشيد

إلى كل الأصدقاء الطيبين و خاصة أحمد، عز الدين، صالح، عدلان، طارق، هشام، موسى، نوفل و سامي.

مقدمة.....1

الجزء النظري

الفصل الأول:

الدراسة الكيميائية النباتية لـــ:(L) *Salvia officinalis* .

I- مقدمة.....5

II- الوضع ضمن التصنيف النباتي.....5

III- الموطن الأصلي.....5

IV- الوصف النباتي لجنس *Salvia*.....6

1- الصفات المورفولوجية للنوع (L) *Salvia officinalis*.....6

2- الصفات الكيميائية.....6

أ- الثوابت الطبيعية.....6

ب- المركبات التربينية.....7

V- الفوائد والاستعمالات.....8

الفصل الثاني:

الزيوت الطيارة.

I- لمحة تاريخية عن الزيوت الطيارة.....11

II- تعريف الزيوت الطيارة.....13

III- توزيع الزيوت الطيارة.....13

IV- أماكن التواجد.....14

V- مكوناتها الجزيئية الهامة.....14

VI- خصائص الزيوت الطيارة.....15

1- الخصائص الفيزيائية.....15

2- الخصائص الكيميائية.....15

VII- دور و أهمية الزيوت الطيارة.....16

1-الدور البيولوجي.....16

2- الدور الفيزيولوجي.....16

3- الدور العلاجي و الصيدلاني.....17

4- الدور الإقتصادي.....17
VIII- طرق إستخلاص الزيوت الطيارة.....18
1- طرق الاستخلاص بالتقطير.....18
2- طرق الاستخلاص بالمذيبات العضوية.....18
3- طرق الاستخلاص بالعصر الهيدروليكي.....19
4- طريقة الاستخلاص بالتحليل الإنزيمي.....19
IX- الاحتياطات اللازمة قبل عملية التقطير البخاري.....19

الفصل الثالث:

عموميات حول البكتيريا المختبرة.

I- مقدمة.....22
II- الخصائص العامة للبكتيريا المختبرة.....22
1- عموميات حول عائلة L'Enterobacteriaceae.....23
2- خصائص الزرع.....24
3- القدرة الإمراضية.....24
III- البكتيريا المختبرة.....24
1- البكتيريا العصوية السالبة الغرام.....24
• *Salmonella typhimurium*.....24
• *Escherichia coli*.....25
• *Enterobacter cloacae*.....26
• *Klebsiella pneumoniae*.....26
• *Pseudomonas aerugenosa*.....27
2- البكتيريا الكروية الموجبة الغرام.....28
• *Staphylococcus aureus*.....28
IV- حساسية البكتيريا للمضادات الحيوية.....30
1- العوامل الفيزيائية.....30
2- العوامل الكيميائية.....30

V- تقنية القياس (Aromatogramme)..... 31
VI- التركيز الأدنى المثبط CMI.....32

الجزء العملي:

دراسة النشاط المضاد للبكتيريا للزيت الطيار لـــ:(L) *Salvia officinalis*

I- الهدف من هذا البحث.....33
II- الوسائل.....33
III- طريقة العمل.....34
1- إستخلاص الزيت العطري لنبتة (L) *Salvia officinalis* 34
أ- المادة النباتية.....34
ب- الإستخلاص.....34
2- دراسة النشاط المضاد للبكتيريا للزيت الطيار لـــ:(L) *Salvia officinalis* 36
2-1- Aromatogramme عن طريق الانتشار على وسط صلب.....36
2-2- تحقيق Aromatogramme 37
أ- تحضير اللقاح البكتيري.....37
ب-الزرع.....38
ت-قبل التحضين.....38
ث-القراءة.....38
ج- التعليق.....39
2-3- التركيز الأدنى المثبط CMI.....42
أ- تحضير النسق من التراكيزالمختلفة للمستخلص.....42
ب- المبدأ.....43
3- النتائج.....45
أ- نتائج الـــ Aromatogramme.....45
ب- نتائج CMI 46
البيان-1-: قطر منطقة تثبيط الزيت الأساسي لكل نوع من البكتيريا المختبرة.....47
البيان-2-: قيم الـــCMI لمختلف السلالات المختبرة.....47

صور توضح الفعل المضاد للبكتيريا للزّيت الأساسي لـــ:(L) *Salvia officinalis* 48
مناقشة النتائج..... 51
الخاتمة..... 53
المراجع..... 55
الملحق..... 60
قائمة الكلمات المختصرة..... 61

الجداول

الجدول-1-: الصفات الطبيعية للزيت العطري الناتج من أوراق الأنواع المختلفة لنبات المريمية..... 7
الجدول-2-: نسب المركبات الأساسية للزيت الطيار للمريمية *S. officinalis* ، *S. sclarea* *S. lavandulifolia*..... 8
الجدول-3-: السلالات المختبرة..... 22
الجدول-4-: حساسية السلالات البكتيريا للمضادات الحيوية..... 30
الجدول-5-: نتائج الإختبارات البيوكيميائية للـــEnterobacter 41
الجدول-6-: تحضير مجموعة التراكيز..... 42
الجدول-7-: قطر منطقة تثبيط الزيت الأساسي لكل نوع من البكتيريا المختبرة..... 44
الجدول-8-: قيم CMI للسلالات الموجبة الغرام..... 45
الجدول-9-: قيم CMI للسلالات السالبة الغرام..... 46

الصور

الصورة-1-: (L) *Salvia officinalis* 5
الصورة-2-: (L) *Salvia officinalis* 34
الصورة-3-: رسم تخطيطي للجهاز المستخدم في عملية التقطير المائي البخاري CLEVENGER..35

I- مقدمة:

تكون الشفويات عائلة ضخمة من النباتات الراقية مغطاة البذور ذوات الفلقتين (Angiospermes dicotylédones) إذ تحتوي عل عدد كبير من الأنواع المشتركة و المستعملة من طرف الإنسان.

أطلق الاسم (Lamiaceae= labiées) من طرف علماء النبات على هذه العائلة و هو المشتق من الاسم اللاتيني (Labium) أي (Lèvre).

تحتوي هذه العائلة حوالي 350 جنس و 4000 نوع من النباتات العشبية، تتوزع في جميع أنحاء العالم و بصفة خاصة في منطقة البحر الأبيض المتوسط، هناك عدد كبير من الأنواع تظهر في حياتنا اليومية وهي تستعمل لعدة أغراض منها:

النعناع (La menthe)، الإكليل(Le romarin)، وهي أصلا نباتات عطرية، الريحان(Le basilic)، الخزامة(La lavande) و الجعدة(La germandrée) هاته الأخيرة نظرا لخصائصها الاروماتية فهي تستعمل في صناعة مواد التجميل و في مجالات أخرى كالصناعات الصيدلانية.

تشتهر هذه العائلة بغناها بالمركبات التربينية (زيوت أساسية طيارة، تربينات ثنائية و تربينات ثلاثية) و الفلافونيدات.

و قد وقع اختيارنا على الجنس *Salvia* الذي يعتبر من أهم أجناس هذه العائلة إذ يحتوي على 900 نوع [1]، لذلك كان هدفا للعديد من الدراسات الفيتوكيميائية التي أدت إلى فصل العديد من المركبات منها: التربينات الثنائية [2]، الثلاثية [3]، الفلافونيدات [4]، الأحماض الفينولية [5] و الستيرولات[6].

و قد تم اختيار المادة النباتية على أساس معايير كيميائية و بيولوجية، فمن الناحية الكيميائية يتميز الجنس *Salvia* باحتوائه على المركبات الفلافونيدية كما يتميز كذلك بتنوع كبير للتربينات، أما من الناحية البيولوجية فيشتهر بخصائصه الطبية حيث استعمل منذ القدم في الطب الشعبي فمثلا استخدم الصينيون جذور النوع *S. miltiorrhiza* لعلاج بعض أمراض القلب، التهاب الكبد، تشحم الكبد و أمراض الكلى [7]، و عموما يستعمل نبات الجنس *Salvia*:

- كمضاد للسرطان [8]، كخافض للحمى، كمخفض لنسبة السكر في الدم [9]، مضاد للتشنجات على مستوى الجهاز الهضمي و هذا بتحفيز إفرازات الصفراء كما يستعمل لعلاج القرحة المعدية، و يعمل أيضا على الجهاز العصبي [10]، إذ يعتبر نبات النوع *S. Paratensis* محفز جيد للغدة الكضرية، مخفض لضغط الدم.

- يستعمل كذلك نبات الجنس *Salvia* ضد لسعات الحشرات، ضد الغثيان، مزيلة للندابات (Cicatrisantes) كما يستعمل لعلاج بعض حالات العقم و هذا بتحفيزه الجيد لعملية الإخصاب [11].
- مضاد للتشنجات [12]، مضاد للميكروبات [13]، [14]، مضادة للكوليرا [15]، مضاد للفيروسات [9]، مضاد لالتهاب [9]، مضاد للأكسدة [16]، الفعالية المضادة للفطريات [17].

و قد قسم بحثنا هذا إلى مقدمة، الجزء النظري، الجزء العملي و الخاتمة:

- الجزء النظري:

1. الفصل الأول: الدراسة الكيميائية النباتية لـ *Salvia officinalis* (L).
2. الفصل الثاني: الزيوت الطيارة.
3. الفصل الثالث: عموميات حول البكتيريا المختبرة.

- الجزء العملي: دراسة النشاط المضاد للبكتيريا للزيت الطيار للنبتة *Salvia officinalis* (L)
- الخاتمة

الجزء النظري

الفصل الأول:

الدراسة الكيميائية النباتية

لـ: *Salvia officinalis (L)*

I- مقدمة:

الصورة-1-: *Salvia officinalis* (L) [19]

كلمة المريمية اخذ من أسطورة يرويها النصارى عن مريم عليها السلام، نص الأسطورة (يحكى آن صبيا أصيب بالحمى وعجز الطب عن شفائه. تضرعت والدته إلى العذراء مريم طالبة منها الشفاء لولدها، فاستجابت لطلب الوالدة فظهرت لها في المنام وآمرتها أن تسقي ابنها شاي القصعين، نفذت آلام ما أمرت به فاشفي الصبي. ومن ذلك الوقت سميت (حشيشة مريم) ثم مريمية. و الاسم العلمي لها (*Salvia officinalis*) اخذ من اللاتينية وتعني:

المنقذ- Sauveur- Salvatrice- Salvia.

II- الوضع ضمن التصنيف النباتي Place dans la systématique [18-19] :

Royaume	Plantes	المملكة
Sous royaume	Tracheobiontes	تحت المملكة
Embranchement	Spermatophytes	فوق القسم
Division	Magnoliophytes	القسم
Classe	Magnoliopsides	الصنف
Sous classe	Asteridae	تحت الصنف
Ordre	Lamiales	الرتبة
Famille	Lamiaceae	العائلة
Genre	*Salvia*	الجنس
Espèce	*Salvia officinalis* (L)	النوع

III- الموطن الأصلي:

يعتبر حوض البحر الأبيض المتوسط الموطن الطبيعي لنباتات هذا الجنس، لاسيما منطقة جنوب أوروبا، بالرغم من وجوده بريا في بعض الأماكن الأخرى في كل من وسط روسيا، و أمريكا الشمالية و إيران، و مع ذلك انتشرت زراعته في معظم المناطق الباردة و المعتدلة و الدافئة المرتفعة الرطوبة.

واهم البلدان إنتاجا للزيت العطري هي: ألبانيا، تركيا، اليونان ،يوغسلافيا، اسبانيا، الأرجنتين، والمغرب.

و بحكم الموقع الجغرافي للجزائر، فان المريمية تنمو في الجزائر إضافة إلى أنواع أخرى من عائلة الشفويات، هناك 26 نوع تنمو في الجزائر، وتستعمل في الغالب في التداوي بالطرق التقليدية الشعبية[20-21].

IV- الوصف النباتي للجنس *Salvia* [22]:

أنواع هذا الجنس نباتات عشبية، و دائمة الاخضرار، ومعمرة طويلا، و نموها غزير و سريع لكبر حجم افتراشها، و زيادة تفريعها الأفقي، و المغطاة بالأوبار. والأوراق بسيطة، متقابلة الوضع، و معنقة ونصلها مغطى بالأوبار على سطحيها العلوي و السفلي، و لونها أخضر رمادي، أو رمادي مخضر. و الأزهار صغيرة الحجم ألوانها مختلفة من الأبيض إلى الأحمر الأرجواني، والمحمولة على حوامل زهرية قصيرة منفردة أو متفرعة. و النورات العنقودية طرفية الموضع و الثمار صغيرة الحجم، شكلها كروي، بدخلها أربعة بذور سمراء اللون، مستديرة الشكل، قطرها لا يزيد عن 2 ملليمتر.

وأهم أنواع هذا الجنس يمكن التفرقة بينها من حيث الشكل الخارجي نباتيا، والتركيب الداخلي كيميائيا، تبعا لصفاتها المختلفة و المتميزة:

1- الصفات المورفولوجية للنوع *Salvia officinalis*:

نباتاتها قوية النمو كبيرة الحجم، يبلغ ارتفاعها 100سم أو أكثر. والأوراق صغيرة الحجم، مستطيلة رمحيه الشكل نوعا ما، إلا أنها ضيقة عند قاعدة نصلها، و تصل أطوالها بين 3-5 سم، و عرضها من 1-2.5 سم، و لونها رمادي فاتح لغزارة الأوبار على سطحها. و الأزهار لونها أرجواني مزرق، توجد في نويرات متزاحمة عنقودية[19-21].

2- الصفات الكيميائية:

أ- الثوابت الطبيعية:

تحتوي نباتات المريمية على كمية من الزيوت الطيارة تختلف نسبتها باختلاف أنواعها. و على سبيل المثال، ذكر كل من:Sakolov و Bodrug [23]، أن الأنواع:

S. glutinosa, S. aethiopis, S .moldavensis, S. nutans, S. austriaca, S. verticellata تحتوي أوراقها على نسبة من الزيت العطري هي 0.014 و 0.082 و 0.18 و 0.04 و 0.013 و 0.02 % على التوالي كما تختلف الثوابت الأخرى للزيوت العطرية الناتجة من أنواع المريمية تبعا لدراسة كل من: Ivanic و Savin **[24]** ، Morani **[25]**، Luisi **[26]**، مبينا ذلك الاختلاف في صفاته الطبيعية المدونة في الجدول-1-.

الجدول-1-: الصفات الطبيعية للزيت العطري الناتج من أوراق الأنواع المختلفة لنباتات المريمية.

النوع / الصفات الطبيعية	*S .trilobo*	*S. afficinalis*	*S. sclarea*
الكثافة النوعية	0,9123	0,9195	0,8960
الدوران الضوئي	°12-	°11-	°22-
معامل الانكسار	1,4735	1,4758	1,4693
كمية الإستر%	3,155	2,51	40,96
كمية الكحولات	15,65	13,04	64,5

ب- المركبات التربينية:

مكونات الزيت العطري من المواد التربينية لأنواع المريمية مختلفة النوعية و الكمية. بالنسبة لنوعية المركبات التربينية، أعلن كل من : Soklov, Bodrug **[23]** أن النوعين *S. moldavica* , *S. aethiopis* يشترك زيتهما العطري في المكونات:

α-Pinène, Limonène, Pinène و Borneol، إلا أن النوع الأول يحتوي زيته أيضا على Linalool و Caryophyllene غير الموجودة في زيت النوع الثاني الذي يحتوي على Thujone, Terpinène , Myrcéne, Terpinolène, P.Thymol, Ocimène-2, Ocimène-1 غير الموجودة بالمرة في الزيت العطري للنوع الأول. و بالنسبة للمركبات التربينية لزيت المريمية، ذكر Ivanic, Savin **[24]** أن النسبة المئوية للمركبات التربينية الرئيسية هي: Thujone، Cineole، Borneol، Linalool، Bornyl acetate، Linalyl acetate، α-Pinène، β-Pinène قد تصل كميتها إلى 83.8-59.6-30.9-20.8- 31.3% لزيت الأنواع *S. officinalis*، *S. nemorosa*، *S. verticullata*، *S. glutinosa*، *S. aethiopis*

على الترتيب حتى الأنواع الأخرى تختلف في كمية و نوعية مركبات زيوتها الطيارة الفريدة في النوع *S. nemorosa* لدراسة Lawrence و آخرين [27]، و النوع *S. stenophylla* لتحليل Jequier و آخرين 1980م [28]. و الجدول التالي يوضح نسب المركبات الأساسية للزيت العطري لثلاث أنواع من المريمية.

جدول-2-: نسب المركبات الأساسية للزيت الطيار للمريمية *S. officinalis* ، *S. sclarea* و *S. lavandulifolia* [29].

المركبات	نسب المركبات الأساسية للزيت الطيار *S. officinalis*
1,8-cineole	11.7%
α-thujone	65.5%
β-thujone	15.4%
المركبات	**نسب المركبات الأساسية للزيت الطيار *S. sclarea***
linalool	10.7%
linalyl acetate	81.1%
المركبات	**نسب المركبات الأساسية للزيت الطيار *S. lavandulifolia***
1,8-cineole	25.5%
Camphor	39.0%
linalyl acetate	10.2%

V- الفوائد والاستعمالات:

تستعمل المريمية كمادة مقبضه ومطهرة ومعطرة وطاردة للغازات مخفضة للعرق ومقوية مولدة للإستروجين الخافض لإنتاج حليب الثديين. كما تستخدم ضد الالتهابات وضد تقلصات العضلات ومضادة لعدة أنواع من البكتيريا [30]. كما تستخدم كمقوية للأعصاب. كذلك ثبت أهمية نبتة المريمية العشبية في معالجة بعض الأمراض المستعصية وفي مقدمتها مرض السرطان، وذلك عن طريق كبح وتعطيل الخلايا السرطانية لدى الإنسان [29-31-32]. وقف انتشار خلايا مرض السرطان التي تصيب بعض أجزاء الجسم وخاصة القولون والرئة والثدي كما أن تناول مستخلص المريمية يسهم إلى حد كبير في معالجة أمراض اللثة واللوزتين والحلق وعسر الهضم والسكري كون عشبه المريمية تعمل على وقف العفونة في الجسم.

و تستخدم المريمية اليوم في علاج الكثير من الاضطرابات الصحية أبرزها:

- الاضطرابات الهضمية، وفقدان الشهية وزيادة الإفرازات في المعدة.
- اضطرابات الدورة الشهرية وأعراض انقطاع الطمث وتساعد المريمية على انسياب أفضل للدم خلال العادة الشهرية، بفضل ما تتمتع به من مزايا هرمونية. كذلك فإنها تخفف من التعرق ومن الهبات الساخنة التي تعاني منها النساء في سن اليأس.
- منشطة للدورة الدموية، ينصح بها أيام الامتحانات وللمصابين بفقر الدم وضعف الذاكرة، ورجفة اليدين.
- مقوية لعمل المعدة والأمعاء، وتفيد ضد الإستفراغ والإسهال والنزف النسوي، والسيلان.
- تنفع من ضعف الرئتين والإصابات المتكررة بالرشح والنزلات الصدرية والحساسية.
- مفيدة لعلاج الربو. ولا تزال أوراقها الجافة تضاف إلى الأعشاب الأخرى المستخدمة لعلاج الربو.
- مفيدة لالتهاب اللثة والحلق والحنجرة.
- تحتوي المريمية على حامض الروزمارينيك، وهو مضاد قوي للالتهابات ويخفف الروماتيزم وتشنجات العضلات[9-12].
- تخفف مستوى السكر في الدم [9].
- تنفع لعلاج الاكتئاب والإرهاق العصبي[10].
- شربه قبيل النوم يخفف الأرق والقلق والإرهاق خصوصا لدى المسنين.

الفصل الثاني:
الزيوت الطيارة

I- لمحة تاريخية عن الزيوت الطيارة [22]:

تعرف الإنسان منذ القدم على الكثير من النباتات و الأعشاب الطبيعية التي تنمو بريا في بيئته المترامية الأطراف، حيث و جد أن الكثير منها قد يفيد في الغذاء، و القليل منها يصلح كدواء. بجانب ذلك، عثر الإنسان الأول على الكثير من الأعشاب العطرية ذات الرائحة الذكية، كما توصل إلى معرفة خصائصها، و تحديد فوائدها باستخدامها في عملية التطيب لتعطير الجسم، وإنعاش البدن بالرائحة الذكية المنبعثة من الأعضاء المختلفة للنباتات العطرية، كما أمكن استغلال هذه الأعشاب في الطب الشعبي لعلاج الأمراض، و إزالة العلل، و طرد الروح الشريرة.

و قد تاجر بها الإنسان في القدم و اتسع تداولها بين الشعوب في الشرق و الغرب وأصبحت من أهم المكونات الرئيسية في التجارة الدولية للعالم القديم، كما في بلاد الصين و الصين الهندية و الفرس في أسيا، مصر في أفريقيا، اليونان و الرومان في أوروبا.

ففي عهد المصريين، اهتدى الفراعنة إلى فصل الزيوت الطيارة من النباتات العطرية في صورة المستخلص المائي، و يعبأ في أوعية زجاجية، ويحكم قفلها لحين استغلالها، كما في حالة إزهار الورد، و مستخلصها المائي يعرف باسم ماء الورد، و أيضا كما في عشب النعناع؛ و تستخدم المستخلصات المائية للأعشاب والبذور العطرية كمصدر للرائحة الذكية أثناء عملية الاستحمام، أو عند استعمالها رشا داخل حجرات المنازل لتعطير هوائها الجوي، وطرد الروح الشريرة والشياطين خارجها. كما تضاف هذه المستخلصات إلى الغذاء أو الماء لغرض تقوية الصحة و إنعاش الجسم؛ أو عند استعمالها تدليكا على مواضع الألم. وقد تفيد في علاج بعض الأمراض، و إزالة الآلام و الأوجاع، و العمل على سرعة الشفاء. على سبيل المثال، المستخلص المائي لأزهار النارنج يفيد في تسكين الصداع و سرعة زوال نزلات البرد؛ و المستخلص المائي لبذور حبة البركة يزيل الزكام، و يفيد في تحسين و إزالة الأزمات الصدرية و التنفسية و التشنجات المعوية و المعدية. و المستخلص المائي للبراعم الزهرية للقرنفل يستخدم في إزالة الآم الأسنان واللثة عند استعماله كغسول للفم. والمستخلص المائي لأوراق و عشب النعناع يزيل المغص المعوي و يطرد الغازات...

و من مصر الفرعونية انبثقت فكرة تطوير وحدات التقطير المائية لتقطير الزيت الطيار من الأعشاب و الأعضاء النباتية الحاملة للزيت العطري، بهدف تقليل الوزن، و تصغير الحجم، و خفض تكاليف الشحن و تسهيل عملية النقل عبر الطرق التجارية.

و منذ بداية العصور الوسطى، تقدمت و تطورت أجهزة التقطير و الاستخلاص للزيوت الطيارة بواسطة بخار الماء، خلال الحضارات اليونانية و الرومانية و العربية.

و على العموم، بعد الفتوحات الإسلامية لبلاد الصين و الهند و الفرس شرقا، و حتى السواحل الشمالية لقارة أفريقيا غربا، و السواحل الجنوبية لقارة أوروبا جنوبا، أصبحت الدولة الإسلامية هي المسيطرة تماما على تجارة و توزيع الأعشاب العطرية و منتجاتها الزيتية.

و منذ بداية القرن السابع عشر الميلادي، و ظهور النهضة الأوروبية، و تقدم علوم الكيمياء، اهتم علماء الغرب و رهبانه اهتماما عظيما بالنباتات العطرية و زيوتها الطيارة، و ذلك لفوائدها الجليلة في علاج الأمراض المستعصية، و المنتشرة في مجتمعاتهم، مما شجع كثيرا من المتخصصين في الكيمياء و الصناعة و الطب على التركيز لفصل مكونات الزيت الطيار، وعزل مركباته الرئيسية، و معرفة المواد المسؤولة عن الرائحة والطعم، و المواد الهامة دوائيا و ذات الفعالية بيولوجيا، وكان على رأسهم العالم لافوا زيه Lavoisier 1793م، و العالم برث لوت Berthelot 1826م، و العالم تلدين Tilden 1842م. ونتيجة لمجهودات و اكتشافات هؤلاء العلماء، تقدمت و تطورت طرق الفصل الكيماوي خلال القرن العشرين، مع استعمال طرق التقطير بالماء و البخار، أو بالبخار المباشر، وطرق الفصل الميكانيكي و الهيدروليكي، و طرق الفصل بالمذيبات العضوية، أو بالتحلل الإنزيمي. وتبعا لذلك، أمكن التمييز بين طرق الفصل المختلفة لمعرفة الصفات الطبيعية و الكيميائية للزيوت الطيارة المفصولة من النباتات العطرية، وتحديد مركباتها الرئيسية، ومكوناتها التربينية الداخلة في تركيب الزيت الطيار، تبعا لنوع المصدر النباتي، و أعضائه المختلفة، ومناطق بيئته و زراعته.

وخلال الربع الأول من هذا القرن تقدمت الكيمياء بفروعها المختلفة في اكتشاف العناصر و مركباتها، و كثرة الشركات الصناعية المختلفة الأدوات، و المتعددة الأغراض، مما ساعد على ظهور الأجهزة العلمية التي تعمل على تحديد و معرفة الثوابت الطبيعية للزيوت الطيارة، و فصل مكوناتها التربينية، و تحقيق هيكلها البنائي، و أوزانها الجزيئية، لذلك تعددت المنتجات الأولية و الإفرازات الطبيعية للزيوت الطيارة و المنفصلة بصورة نقية، و التي استغلت في ظهور و استحداث صناعات كيميائية متعددة، مثل مستحضرات التجميل في صور مختلفة القوام، وفي صناعة العطور و الخمور، والصناعات الغذائية، و الصناعات الدوائية.

II- تعريف الزيوت الطيارة [33] :

تعتبر الزيوت الطيارة إحدى منتجات الأيض العضوي الغذائي، و هي أهم المنتجات الثانوية، و ذلك بسبب الإفرازات الأولية التي تفرزها أو تنتجها طبيعيا بعض النباتات الخاصة، و المعروفة باسم النباتات العطرية Les Plantes aromatiques، والتابعة لأهم العائلات و الفصائل النباتية، و تمثل الزيوت الطيارة المواد الرئيسية المسؤولة عن الرائحة المتميزة للنباتات و أعضائها المختلفة، كما أن هذه المكونات الطيارة لها القدرة على التطاير و التبخر في الظروف العادية، و تتميز الزيوت الطيار بسهولة فصلها عن الأعضاء النباتية الحاملة لها بواسطة طرق التقطير و الاستخلاص المختلفة، مما أطلق عليها اسم الزيوت الطيارة Les huile volatiles، أو الزيوت الأساسية Les huiles essentielles، لان مكوناتها المختلفة لا تحمل في جزيئاتها مواد جليسيرينية أو دهنية.

و معظم الزيوت الطيارة عبارة عن مواد سائلة بعد تقطيرها أو استخلاصها بطرق الفصل المختلفة، ونادرا ما تكون في صورة صلبة. و الزيوت الطيارة قابلة للذوبان بشدة مع الايثانول و الكلوروفورم و الايثير، ولا تذوب في الماء.

و الزيوت الطيارة ما هي إلا مركبات عضوية التمثيل، تربينية التكوين داخل سيتوبلازم الخلايا الحية للأنسجة النباتية المختلفة، و معظمها يوجد في صورة حرة سائلة، القليل منها غير حر و صلب و ذلك لارتباطه مع مركبات جليكوسيدية أو راتنجية، إلا انه ينطلق في صورة حرة سائلة بفعل النشاط الإنزيمي الخاص.

III- توزيع الزيوت الطيارة [33]:

إن إنتاج الزيوت الطيارة محصور على النباتات الراقية دون الدنيا. و الأجناس القادرة على تكوين المركبات المكونة للزيوت الطيارة، تنتمي إلى حوالي 50 عائلة و أهمها:

1. العائلة المركبة Famille Compositeae.
2. الشفوية Labiateae.
3. الميرتاسية Myrtaceae.
4. الصنوبرية Pinaceae.
5. الوردية Rosaceae.

6. الخيمية Umbelliferceae.

يمكن للزيوت الأساسية أن تخزن في جميع أجزاء النبتة، الأزهار، اللحاء، الخشب، الجذور، الريزومات و الثمار.

IV- أماكن التواجد[33]:

1. الزيوت الطيارة تتجمع داخل أنسجة النبات في أماكن تخزين تعرف بالتراكيب الإفرازية، و هذه الأخيرة قد توجد على البشرة الخارجية للأعضاء النباتية التي تعرف بالتراكيب الخارجية، منها الشعيرات الغددية لتواجدها على بشرة كل من الأوراق و السيقان لنباتات العطرية.
2. كما توجد داخل الأنسجة المختلفة لبعض النباتات، لذلك يطلق عليها التراكيب الداخلية، مثل الغدد الزيتية داخل قشور ثمار الموالح، و الجيوب الزيتية داخل فصوص ثمار الموالح، و القنوات أو الأنابيب الزيتية داخل بذور الينسون و الكروية و الشمر و الشبت و الكمون...
3. تتركز الزيوت الطيارة في المجموع الخضري دون الجذري، كما في النعناع؛ وفي الأوراق، كما في الكافور؛ وفي الأزهار، كما في النرجس و الياسمين؛ وفي النورات الزهرية، كما في الأقحوان. مكونات الزيت الطيار لا تختلف أنواعها باختلاف العضو النباتي لمعظم النباتات العطرية.

V- مكوناتها الجزيئية الهامة:

جميع النباتات العطرية قد تحتوي على الزيت الطيار الذي يتكون في المجموع الخضري، أو أحد أعضائه الهوائية، و نادرا إنتاجه في الجذور. و الزيت الطيار المفرز في النبات طبيعيا قد يتركب من أحد أو بعض مكونات الزيوت التربينية، و المسؤولة عن الرائحة و الطعم المميزين لكل نبات. و ترجع هذه الصفات إلى كل من المواد الهيدروكربونية و الأكسوجينية.

تتكون الزيوت الطيارة من عدة مركبات:

Terpènes, Sesquiterpènes, Aldéhydes, Esters, Cétones, Lactones, Phénols إضافة إلى بعض المركبات الغير المعروفة، كلها بنسب متفاوتة لكل عطر. و هذه الزيوت لا تحتوي على الأحماض الدهنية (acides gras) ولا على الفيتامينات و لا على الأملاح المعدنية. و في بعض الحالات هناك اثر زيتي و هي

ليست بالأجسام الدهنية. هذه الأخيرة تعتبر من الزيوت الثابتة (مثل: زيت الزيتون، فول الصويا، زيت عباد الشمس ...) و التي تترك اثر شفاف على الورق[22].

VI- خصائص الزيوت الطيارة [34] :

1- الخصائص الفيزيائية:

1. تتميز الزيوت الأساسية برائحتها العطرة سريعة التطاير على درجة الحرارة العادية و تتبخر تماما بالتسخين.
2. نادرا ما تكون 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.
3. لها كثافة نوعية أقل من كثافة الماء (0.18-0.84).
4. لها معامل تجزئة مرتفع (Indice de réfraction)، تذوب في المذيبات العضوية المستعملة كالكحول و الإيثير و تذوب أيضا في الدهون وقليلة الذوبان في الماء.
5. يتغير لونها و تسوء رائحتها و تزداد لزوجتها و تصبح مادة راتنجية عديمة الرائحة إذا تعرضت للهواء، ويساعد الضوء على سرعة هذا التفاعل، والزيوت الأساسية سريعة الاحتراق والالتهاب.
6. التعرف على الخصائص الفيزيائية {اللزوجة، الامتزاج مع الكحول، القدرة الدورانية...} يتم عن طريق إجراء تحليل CPG (Chromatographie en Phase Gazeuse).

2- الخصائص الكيميائية:

أما من الناحية الكيميائية فالزيوت الأساسية عبارة عن مزيج معقد متكون من عدة مركبات تتكون أساسا من قسمين أحدهما هو الأيدروكربون (Hydrocarbone) الذي يكون الجزء الأساسي من الزيت الطيار والأخر عبارة عن مركبات أكسوجينية و هذه الأخيرة تتبع أي مجموعة عضوية من الأحماض، الكحولات، الأسترات، الألدهيدات، السيتونات لها تأثير في رائحة و نكهة الزيت الطيار و الجزء الأيدروكربوني في الزيت أساسه Terpènes، Sesquiterpènes، Polyterpènes و قد تكون نسبته مرتفعة قد تصل إلى 90% أو 98%.

مع الإشارة إلى أن نوعية الزيت الطيار متعلقة بعدة عوامل منها: نوعية التربة، المناخ، وقت القطف.

VII- دور و أهمية الزيوت الطيارة:

1- الدور البيولوجي:

الفائدة الحقيقية للزيوت الطيارة للنباتات المفرزة لها لم تعرف حتى الآن، إلا أن النباتات تستفيد منها بيولوجيا من حيث المساعدة على جذب الحشرات الحقلية إلى أزهارها لزيادة عملية التلقيح الخلطي بها، مؤدية إلى رفع نسبة الإخصاب و العقد لزيادة الإنتاج الثمري أو البذري، كما أن الزيوت الطيارة تعمل كمواد طبيعية طاردة أو قاتلة للآفات الفطرية و البكتيرية المسببة للأمراض النباتية، كما تستخدم أيضا كمادة لاحمة للأنسجة المجروحة في النباتات، نتيجة العوامل الطبيعية و الميكانيكية، فتعمل بدورها على سرعة التآم الجروح، و تمنع سيولة العصير الخلوي منها خارجيا [33-34].

2- الدور الفيزيولوجي [35-36-37]:

1. تنشط الجسم.
2. تؤثر على الخلية، وبالتالي يسمح لها بالتنفس أحسن و التفاعل أكثر.
3. تساعد في إنتاج الأجسام المضادة، وتحفز الكريات البيضاء.
4. تساعد الجسم على معالجة الملوثات.
5. لها عمل مزيل للسموم Désintoxication.
6. تنفذ بسرعة داخل الدم و الغدد، وتؤثر على الجهاز العصبي فتريحه و تنعشه.
7. تنشط الدورة الدموية و تزيد من دوران الدم داخل الشعيرات الدموية الدقيقة Microcirculation .
8. مضاد للتشنج.

3- الدور العلاجي و الصيدلاني [35-36-37-38]:

1. عمله كمضاد للفطريات خاصة المسؤولة على إفراز السموم و على الخمائر Candida.
2. خاصية التطهير، مما يسمح لها بالقضاء على مختلف الميكروبات الممرضة.
3. مضاد للتشنجات، بحيث يعمل على القضاء أو إنقاص تشنج المعدة والأمعاء.
4. تعتبر كمسكنات إذ تحسن من الاضطرابات النفسية و الجسدية المختلفة.
5. تعمل كمضاد حيوي كلاسيكي.
6. عمله كمخرب للسموم.
7. يسهل التنفس في حالة التبخر.
8. عدد كبير من المراهم، الدهن، الكريمات متكونة أساسا من الزيوت العطرية و المخصصة لتخفيف التواء المفاصل، الانقباضات، و الآلام الأخرى للمفاصل و العضلات.
9. الزيوت تسبب ظواهر التهيج و الإثارة لمختلف المستويات.
10. لها نشاطات أخرى كمسكن عصبي، التأم الجروح.
11. لها نشاط مضاد للميكروبات.
12. مجدد للحيوية والنشاط.
13. تسبب احمرار الجلد الناتج عن الحساسية للحرارة ولها عمل مخدر موضعي.
14. مضاد للكوليرا.

4- الدور الاقتصادي [36] :

أهمية الزيوت الطيارة المستخلصة بواسطة طرق التقطير أو الاستخلاص المختلفة تكمن في صناعة الروائح العطرية والعطور و مستحضرات التجميل، نجد أيضا أنها قد تستخدم في المجالات الغذائية كتوابل أو بهارات أو مكسبات للطعم أو النكهة، وفي صناعة المنتجات الزراعية و الحيوانية، و صناعة الحلويات و المربى، وصناعة الصابون و المنظفات كمواد طبيعية مكسبه للرائحة و الطعم. و الزيوت الطيارة تدخل في تركيب الأدوية و الصناعات الدوائية و مستحضراتها المختلفة، و المستخدمة في علاج الكثير من الأمراض البشرية و الحيوانية. و ثبت حديثا أن الزيت الطيار المستخلص من المجموع الخضري لحشيش الستر ونيلا و الشيح الخراساني و من أزهار القطيفة، قد يستعمل كمادة طبيعية طاردة للحشرات المنزلية المختلفة، و قاتلة لها كمبيد حشري خام.

VIII - طرق استخلاص الزيوت الطيارة:[22]

من المعروف أن الزيوت الطيارة المستخلصة عبارة عن سوائل ذكية الرائحة، عضوية التكوين، و معقدة التركيب، لأنها تحتوي على خليط من المواد الهيدروكربونية و التربينية، مختلفة فيما بينها كيميائيا، مثل زيت الزعتر و النعناع و القرفة و الموالح، و القليل من الزيوت الطيارة يحتوي سائلها العطري على مركب واحد فقط، مثل مركب البنزالدهيد لزيت ثمار اللوز المر، علاوة على ذلك، بعض الزيوت العطرية تحتوي على مركب رئيسي تصل نسبته إلى أكثر من 90 %، مثل مركب الايجانول Eugénol لزيت البراعم الزهرية للقرنفل.

يتوقف استخلاص الزيت الطيار أساسا على الصفات الطبيعية للزيت و مكوناته التربينية، و على النوع النباتي و أعضائه المختلفة. وعلى سبيل المثال، العشب الطازج أو الجاف لنبات النعناع و الريحان، أو أزهار الأقحوان و الموالح، و البذور المجروشة للكروية يمكن فصل زيوتها الطيارة في صورة سائلة بإحدى طرق التقطير، بينما أزهار الياسمين لا يمكن فصل زيتها الطيار تقطيرا، بل يمكن استخلاصه في صورة عجينة بواسطة المذيبات العضوية، بينما ثمار الموالح لا يمكن فصل زيتها إلا باستعمال طرق العصر الهيدروليكية، حتى ثمار اللوز المر لا يمكن فصل زيتها الطيار بالطرق السابقة و ذلك لارتباطه بمواد أخرى تجعله في صورة غير حرة، إلا بعد التعرض للنشاط الإنزيمي المحلل، و تحويل الزيت الطيار في حالة طليقة، ثم استخلاصه بطرق التقطير المعروفة.

لذلك يوجد العديد من طرق الاستخلاص للزيوت الطيارة. و أهم هذه الطرق لسرعة تحضيرها و استخلاص الزيت منها بصورة اقتصادية هي:

1. **طرق الاستخلاص بالتقطير :**
   - أ- التقطير المائي.
   - ب- التقطير المائي البخاري.
   - ج- التقطير البخاري.

2. **طرق الاستخلاص بالمذيبات العضوية :**
   - أ- المذيبات الطيارة.
   - ب- المذيبات الثابتة.

3. طرق الاستخلاص بالعصر الهيدروليكي :

أ- العصر اليدوي.

ب- العصر الميكانيكي.

4. طريقة الاستخلاص بالتحليل الإنزيمي.

IX- الاحتياطات اللازمة قبل عملية التقطير:[22]

1- يجب الانتهاء من قطع النباتات العطرية قبل الظهيرة و ارتفاع درجة الحرارة، و نقل عشبها مباشرة إلى أجهزة التقطير، كما في النعناع و المريمية و الريحان، بينما يبقى عشب الزعتر بعد حشه و قطعه لمدة حوالي 15-20 ساعة للمساعدة على رفع إنتاجه من الزيت، مع زيادة محتوياته الرئيسة بفعل النشاط الإنزيمي الداخلي لتحلل بعض المواد الجليكوسيدية، و تحويلها إلى مواد أخرى، منها الزيت العطري.

2- منع حش النباتات العطرية خلال هطول الأمطار، أو الغيوم، أو عندما تكون السماء ملبدة بسحب كثيفة، لان العشب المقطوع و المبلل بالأمطار الطبيعية يؤدى إلى خفض إنتاج الزيت نتيجة عملية التخمر الطبيعية، بينما كثرة السحب و حجزها للأشعة الشمسية تعمل بدورها على قلة تكوين الزيت العطري والمركبات التربينية لنقص عملية التمثيل الغذائي لخفض الأشعة الضوئية طبيعيا.

3- تقطيع العشب الطازج أو الجاف إلى أجزاء صغيرة، كما في الزعتر، الريحان والمريمية، حتى في السيقان السميكة و الغليظة، كما في القرفة بغرض زيادة إنتاج الزيت الناتج بواسطة عملية التقطير، نتيجة تجزئتها إلى أجزاء صغيرة.

4- التخلص من الحشائش الغريبة، و النامية بريا مع النباتات العطرية قبل استخلاص و تقطير زيتها العطري لتجنب خفض الصفات الطبيعية و الكيميائية، لأن بعض الحشائش تحمل زيوت طيّارة غير مرغوبة.

5- التخلص من الأتربة و الحصى العالق بعشب النباتات العطرية، أو المختلطة مع البذور العطرية لتجنب رداءة الزيت الناتج، و ضعف رائحته، و تغيير لونه الطبيعي.

6- جرش البذور العطرية مثل بذور الكروية لزيادة إنتاج الزيت، والمحافظة على مكوناته التربينية، بمقارنته بالبذور الكاملة، وبجانب ذلك، فالطحن الناعم للمواد النباتية قد يعوّق من تقطير محتوياتها الزيتية لعدم قدرة انتشار البخار إلى الأنسجة النباتية بتحويلها إلى كتلة أو كتل عجينية القوام، فيقل الزيت و مركباته المختلفة، كما في حالة فقد مركب الليمونيين في زيت الكروية العطري المنخفض الإنتاج على أن يكون الجرش قبل التقطير.

7- بذور و ثمار بعض النباتات تحتوي على زيوت طيّارة غير حرة، وذلك لارتباطها بمواد أخرى من الجليكوسيدات، مثل اللوز المرّ، كذلك يجب جرش أعضائها السابقة، و فصل زيوتها الثابتة بطرق الاستخلاص بالعصر الهيدروليكي، و المتبقي من البذور لابد من نقعه في الماء العادي لعدة ساعات لتنشيط التحليل الإنزيمي لتحرير الزيت الطيّار من المركبات السابقة، ثم تقطيره أو استخلاصه بالطرق السابقة.

8- وحدات التقطير و أنابيب التكثيف يجب أن تصنع من مواد تمنع أي تفاعل كيميائي يحدث بين الزيت الناتج و الجهاز أثناء تقطير الزيت الطيّار.

9- أنابيب التكثيف و حوض التبريد يجب أن تكون سليمة و خالية من العيوب، مثل الثقوب، لمنع خروج بخار الماء و الزيت من أنابيب التكثيف، أو تسرب المياه من أحواض التبريد؛ فيعيق عملية التكثيف.

10- درجة حرارة بخار الماء اللازمة لعملية التقطير بالبخار يجب ألا تزيد عن 100 °م، و تكون عملية التقطير تحت تفريغ أو ضغط منخفض لتقليل حدوث الفقد في الزيت العطري، و منع أي تلف لبعض مكوناته، و أي ارتفاع في درجة الحرارة يؤدي إلى ظهور بعض المركبات الجديدة لمواد غير موجودة في مكونات الزيت.

الفصل الثالث:

عموميات حول البكتيريا المختبرة

I - مقدمة:

يمكن ربط علم الميكروبيولوجيا بالعالم Antony van leevenhoek (1632-1723م)، هذا العلم الذي يهتم بدراسة الكائنات متناهية الصغر كالبكتيريا التي تنتمي إلى قسم Procaryote (قسم بسيط أولي من بدائيات النواة). إذ أن هذا العالم قام بصنع عدسات زجاجية مكبرة (160 مرة) مكنته من رؤية كريات الدم الحمراء، الحيوانات المنوية و نسج حيوانية و أعطى وصف كامل وشامل و دقيق بالنسبة للأحياء الدقيقة كالفطريات و البكتيريا سنة 1675م.

ومع اكتشاف المجهر الضوئي (3000 مرة) و المجهر الإلكتروني الذي تتجاوز قوة تكبيره (750 ألف مرة) أصبح لدينا معلومات عن دور هذه الكائنات في عمليات التخمر و في تنقل الأمراض و التعرف على خصائص و مرفولوجية هذه الكائنات [39].

علم البكتيريا يحوى عدد كبير من الأجناس البكتيرية، بعضها ممرض و البعض الآخر يعيش متعايشا مع كائنات أخرى، ويمكن أن تسبب أمراض لدى الإنسان (عدوى) وهذا عند تلائم الظروف.

الهدف من دراستنا هو تقدير الفعالية المضادة للبكتيريا لزيت عطري لنبتة طبية *Salvia officinalis* على سلالات بكتيرية متنوعة (موجبة الغرام gram(+) و سالبة الغرام gram(-)) مسؤولة عن العدوى في المستشفيات (Les infections nosocomiales) الجدول-3-.

الجدول-3-: السلالات المختبرة.

البكتيريا السالبة الغرام	البكتيريا الموجبة الغرام
Escherichia coli ATCC 25922	***Staphylococcus aureus*** ATCC 29213
Klebsiella pneumoiniae ATCC 700603	
Pseudomonas aerogenosa ATCC 27853	
Salmonella typhimurium	
Enterobacter cloacae	

II- الخصائص العامة للبكتيريا المختبرة:

1- عموميات حول عائلة L'Entérobactériaceae:

الـــEntérobactériaceae تحتوي على مجموعة من البكتيريا المهمة بحيث العديد من الأجناس تنقسم إلى أنواع لنفس النوع. أطلق اسم Entérobactéries على هذه العائلة لان كثيور من العناصر المكونة لها متطفلة على الأنبوب الهضمي للإنسان و الحيوان. كذلك يمكن عزلها انطلاقا من التربة و

النباتات و التي تعتبر هذه الأخيرة عادية لبعض الأنواع مثل:*Entérobacter agylomerans* و *Erwinia* .[41]

- بكتيريا سالبة الغرام ذات أبعاد مختلفة يتراوح طولها 6 ميكرومتر و عرضها ما بين 0.3-1 ميكرومتر.
- متحركة (*Entérobacter, Serratia, E. coli, P. mirabilis*) بواسطة أسواط جسمية (Ciliature péritriche) أو غير متحركة (*K. pneumonia*) .
- تنمو في أوساط هوائية لا هوائية اختياريا.
- تخمر الجلوكوز مع إنتاج غاز.
- Oxydase (-) .
- تختزل نترات إلى نتريت.
- Lactose +.

أكثر الأنواع الممرضة للإنسان هي:

Escherichia coli و بكتيريا من جنس *Salmonella*، *Shigella* و *Yersinia*. البكتيريا الأخرى من هذه العائلة لها سلوك انتهازي أحيانا مسببة للعدوى داخل المستشفيات خاصة التي تصيب الجهاز البولي، أهم أنواعها *Proteus*، *Morganella*، *Citrobacter*. أغلبية هذه البكتيريا منتجة لـــβ- Lactamases و مقاومة للعديد من المضادات الحيوية [40].

2- خصائص الزرع:

Entérobactériaceae تنمو على الأوساط السائلة و الصلبة العادية مدة 18 ساعة من الحضانة في درجة حرارة 37°م. وهذه البكتيريا يمكن أن تعطي الأشكال التالية:

1. الأشكال S (Smooth): مستعمراتها ملساء، منتفخة، لامعة و رطبة، يتراوح قطرها بين 2-4 ملم. وفي الأوساط السائلة هناك تكون معلق بكتيري بصفة متجانسة.
2. الأشكال R (Rough): مستعمراتها خشنة، جافة، ذات حواف غير منتظمة. وتلاحظ بالخصوص مع البكتيريا التي تخضع إلى مرات عديدة من العزل، والأشكال R تعطي الهيئة المحببة.

3. المستعمرات الهلامية مألوفة مع *Klebsiella*، قطرها يتجاوز 10 ملم؛ و هي تميل إلى التمدد.

المستعمرات الصغيرة أو القزمية(naines) تلاحظ مع بكتيريا مختلفة[41-42].

3- القدرة الإمراضية:

إن لـــL'Entérobactériaceae القدرة على إحداث الأمراض و التي تؤدي إلى اضطرابات في الجهاز الهضمي، إصابات في الأنابيب البولية و الأمراض خاصة بالطاعون. يمكن أن تتواجد في أماكن أخرى. و لا يجب أن ننسى بان L'Entérobactériaceae تصيب أيضا النباتات (Phytopatogénes) مثل: *Pantoea* (*Entérobacter agglomerans*) [42].

III- البكتيريا المختبرة:

I- البكتيريا العصوية السالبة الغرام:

- *Salmonella typhimurium*:

حتى وقتنا هذا تم التعرف على 1900 نوع من الـــ *Salmonella* و تتم التفرقة بينهم عن طريق الصفات الانتيجينية. وهي المتسببة في عدد من الأمراض (Salmonellose). و هو متطفل إجباري و مسبب للحمى التيفوئيدية Fiéver typhoïde.

و تعيش هذه البكتيريا متطفلة على الجهاز الهضمي للإنسان و الحيوان. و ملوثة للمحيط الخارجي (تربة، مياه،....) بسبب الفضلات المنزلية و الحيوانية (البراز) لكن نموها يبقى ضعيف أو متوازن طبيعيا وهذا راجع لعدة عوامل كالحرارة، و المنافسة بين البكتيريا المختلفة فيما بينها.

وتنتقل العدوى للإنسان، عن طريق وسيط حيوي قد يكون الماءأو المواد الغذائية.

و هذه البكتيريا تأخذ شكل عصيات ذات الابعاد التالية: من 2-3 طولا و 0.6-0.8 عرضا، متحركة بواسطة أسواط جسمية (Ciliature périt riches) ، لا تملك كبسولة، سالبة الغرام.

تمتلك هذه البكتيريا خصائص أنتيجينية: هناك 4 أنواع من الأنتيجينات

- Antigène O (l'Antigène somatique) ثابت حراريا، ثابت في الكحول لكن بنسبة5%
- Antigène K
- Antigène H (Flagellaire)

كما تتميز هذه البكتيريا بإفرازها لـــ Neurotoxine thermolabile و هي ممرضة للجهاز الهضمي للإنسان و الحيوان و هي المتسببة في التسممات الغذائية Toxi-infections alimentaires. و الـــ *Salmonella* لها القدرة على التضاعف في سيتوبلازم البالعات الكبير (Macrophages), ولكشف أعراض الإصابة بالـــ *Salmonella* يجب عزل البكتيريا انطلاقا من الدم، الفضلات و حتى الدم [43]،و مستعمرات الـــ *Salmonella* ملساء من النوع (S :Smooth) تتراوح ما بين 2-3 ملم بعد 24 ساعة من الحضانة في 37°م [44].

- *Escherichia coli*:

تم عزله لأول مرة من طرف Escherich سنة 1885م، تعتبر من الأنواع البكتيرية الأكثر دراسة من طرف مؤسسي علم الميكروبيولوجيا [45].

ينتمي إلى عائلة Enterobacteriaceae تتميز بأنها عصوية متحركة بأسواط جسمية (Ciliature péritriche)، سالبة الغرام، هوائية اختياريا، وهي عائل طبيعي في الجهاز الهضمي [46-39] و تكون النوع الأساسي الذي يعيش بشكل طبيعي في الأمعاء الغليظة للإنسان، كما تسبب أمراض التهاب الغشاء البريتوني(péritonites) و ممرضة للجهاز البولي عند تواجدها بأعداد كبيرة، كذلك تعتبر واحد من أهم أسباب الإسهال الحاد في العالم و هي تحدث عدد كبير من القتلى في الدول النامية وهذا راجع لإنتاجها سموم داخلية(Endotoxine) مثل Entérotoxine [46-45].

يتراوح طولها 6 ميكروميتر و عرضها من 0.3 إلى 1 ميكروميتر، تنمو بسرعة في أوساط مثالية بعد24 ساعة من الحضانة في درجة حرارة 37°م، منتجة لغاز H_2S عند تخميرها للسكريات (لاكتوز، مانيتول، سوربيتول) هذا الاختبار الأخير يعتبر واحد من الخصائص المميزة لهذا النوع إلى جانب امتلاكها لمولدات الضد (lipopolysaccharides) Antigène O, Antigène H flagellaire.

تتميز *E.coli* بحساسيتها الكبيرة لمعظم المضادات الحيوية الأساسية النشطة على العصويات السالبة الغرام.

- *Enterobacter cloacae*:

ينتمي إلي عائلة Entérobactériaceae و هي عصويات سالبة الغرام تتواجد طبيعيا علي الجلد و في السوائل المخاطية لكن تتواجد بكمية قليلة بالخصوص في الجهاز الهضمي، الجهاز التنفسي

و الشرج، وهي تعتبر جد خطرة وهذا راجع لإفرازها لإنزيمات خارجية. من الخصائص المميزة لهذا الجنس هو كثرة الحركة و هذا راجع لامتلاكها لأسواط جسمية و عدم احتواءها علي كبسولة باستثناء بعض الأنواع مثل: *E. aerugenes*، كذلك إنتاجها لصبغات صفراء مثل النوع: *E. cloacaea* [47].

- *Klebsiella pneumoniae*:

خاصة *Klebsiella pneumoniae* ينتمي إلي عائلة Enterobacteriaceae تعتبر من بين البكتيريا البيئية (تتواجد في الماء، تربة، هواء،...)، كذلك تتواجد في براز الإنسان بشكل طبيعي و غالبا ما تعتبر من بين بكتيريا الجلد و المخاطية، و لكن تتواجد بكمية قليلة في الجهاز الهضمي و الجهاز التنفسي و التربة [39-45-46-47-48].

عبارة عن عصويات سالبة الغرام، هوائية اختياريا، تنمو بسهولة في أوساط مثالية أو أوساط اختيارية بعد 24 ساعة من الحضانة في درجة حرارة 37°م حيث تعطي مستعمرات دائرية من 3–4 ملم، لزجة، منتفخة، شفافة، تخمر الجلوكوز و اللاكتوز مع إنتاجها لغاز H_2S، غير متحركة لكن تحتوي على كبسولة متعددة السكاكير(Capsule polyosidique) يرجع لها الشكل اللزج المميز لمستعمرات *Klebsielles* و تعود لها خاصية القدرة العالية علىٰ مقاومة المضادات الحيوية [45] مثل: Ampicilline و ticarciline و مقاومتها لعملية البلعمة (Phagocytose).

من الخصائص الأنتيجينية المميزة لهذا النوع هو وجود Antigène O, antigène M (muqueux) [39] كذلك ما يميز هذا النوع هو عدم إنتاجها أو تكوينها لأي مادة سامة.

- *Pseudomonas aerugenosa*:

تم عزل جنس *Pseudomonas* سنة 1882م من طرف Carle Gessard [45-46]، انطلاقا من قيح أزرق لإصابة جلدية بعد الجراحة، لذلك تدعى بالعصويات الزرقاء (Bacille pyocynique) المشتقة من الاسم اللاتيني: Puon= Pus و kuanos= bleu foncé [39-45-46-47].

ينتمي هذا الجنس إلى عائلة Pseudomonadaceae تنتشر بالتربة و المياه وفي السوائل المخاطية للأنف و المجاري التناسلية والبولية وكذلك في القيح، وهي المسؤولة على إحداث إصابة تعفنية خطيرة و الملاحظة خصوصا في الوسط الجراحي بنسبة 10%، كما تتميز بمقاومتها الشديدة للمضادات الحيوية خاصة Pénicillines من المجموعة A و المعقمات، وهي شائعة الانتشار في المحيط كما تستعمل البشرة و السائل المخاطي للمريض [45]، النوع الأكثر انتشارا و المعروف جدا هو النوع *P. aeruginosa* المشتقة من الاسم اللاتيني Aruginosa =couvert de rouille [39-46].

تعتبر العصويات الزرقاء بكتيريا متطفلة، انتهازية سالبة الغرام هوائية إجباريا و دقيقة حيث يتراوح طولها من 1.5 إلى 3 ميكروميتر و عرضها 0.5 إلى 0.8 ميكرومتر، كثيرة الحركة و هذا راجع لامتلاكها لسوط واحد قطبي (mono triche) [45-46].

تنمو بسهولة على جميع الأوساط في وجود الهواء في درجة حرارة 37°م أو30°م.

تنبعث منها رائحة عطرية خاصة بـ Seringa [39-46] راجعة إلى إنتاج

Ortho-amino-acétophénone الوسيط في ميتابوليزم Tryptophane و غير مرتبطة بإنتاج الصبغات[46]، أما شكل مستعمرات هذا النوع خاص ومميز حيث نلاحظ مستعمرات كبيرة (Large) La، مستعمرات صغيرة Sm(Small) و مستعمرات هلامية M (Muqueuse) [39-46].

الـ*P.aeruginosa* هي بكتيريا تتوجد عند أي مريض و تقوم بإفراز عدد من الإنزيمات مثل: Phospholipase C, protéase, élastases [49] و السموم مثل:

- سموم خارجية بروتينية (Exotoxine protéique) مثل: Hémolysine, exotoxines coA enzyme S, cytotoxine [39-46-49].

- سموم داخلية مثل: Endotoxine glucido-lipido-protéique , entérotoxine [47].

تفرز *P.aeruginosa* صبغات، هذه الأخيرة تعتبر واحدة من الخصائص المميزة لهذا النوع و المساعدة في تعريف العصويات الزرقاء و هما نوعين:

- ❖ صبغة Pyocyanine : صبغة زرقاء اللون تذوب في الماء و الكلوروفورم.
- ❖ صبغة Pyoverdine : صبغة صفراء مخضرة و مشعة تذوب في الماء وغير ذوابة في الكلوروفورم [39-45-46-47].

من بين الخصائص المميزة كذلك امتلاكها لمولدات الضد مثل: Antigène somatique O [47].

تعتبر كذلك المسؤولة على عدد كبير من الإصابات الرئوية، أمراض الجهاز البولي و التناسلي، إصابات الجلد و O.R.L، Oculaire،Ostéo-articulaires [39-45].

2- البكتيريا الكروية الموجبة الغرام:

- *Staphylococcus aureus*:

تم تعريفها من طرف لويس باستور سنة 1879 [39-47]، حيث أعطى وصف لهذه الحبيبات الدقيقة التي تتجمع في شكل ثنائيات كروية (diplocoques) أو في شكل كومة صغيرة بشكل عنقود

عنب(grappes de raisin)، وفي سنة 1883 أطلق Ogston إسم staphylocoque المنقسم إلى شطرين والذي يتناسب مع تعريف لويس باستور [46]:

Kokkos: حبوب متجمعة على شكل كومة غير منتظمة.

Staphylos: عنقود عنب.

وفي سنة 1884م أخذ Rosenbach [46] مزرعات نقية لهذه البكتيريا، وقسمها إلى قسمين على حسب لون المستعمرة.

جنس *Staphylococcus* ينتمي إلى عائلة Micrococcaceae ، يتواجد بشكل شبه دائم في الأنف (سدادة الأنف الداخلية) (*S. aureus* 30-40%, *S. epidermidis* 30-100%) غالبا على الجلد

(*S. epidermidis* 85-100%) [45] و الغدد الجلدية وفي الأغشية المخاطية للحيوانات ذوات الدم الحار وعلى كثير من المواد الغذائية، كذلك وجدت في العجان (المسافة بين عضو التناسل و الشرج) ، النوع المثالي *S.aureus* [45-50].

تعتبر هذه البكتيريا كثيرة التواجد في الطبيعة، موجبة الغرام، هوائية وغير هوائية إختياريا، لها القدرة على تحليل كريات الدم الحمراء، يمكنها إفراز سموم بجسم العائل أو في بيئة النمو، فهي سلالات ممرضة، كما قد تحدث تسمما غذائيا، كما تفرز هذه البكتيريا مجموعة من السموم الداخلية[50].

تظهر هذه البكتيريا تحت المجهر على شكل كرويات موجبة الغرام، يتراوح قطرها من 0.8 إلى 1ميكرومتر، غير متحركة، غير متجرثمة (asporulée) ، و عادة لا تكون كبسولة

(sans capsule) ، تنمو في أوساط مثالية بعد 24 ساعة من الحضانة، ذات نظام تنفسي وتخمري (تخمر المانيتول)، كذلك يمكن عزلها على وسط اختياري (وسط زائد الملوحة) يدعى

Chapman (NaCl 7.5) و هذه تعتبر من الميزات الخاصة لهذا النوع، إضافة إلى مقاومتها للتركيز المرتفع من الملح، تقاوم الحرارة حتى 60°م و الجفاف (لعدة أشهر) و ملوحة الماء [39-46-47].

يمكن أن يقسم هذا الجنس إلى مجموعتين على حسب لون المستعمرات، بيضاء أو مصفرة (ذهبية=aureus)، وهذا راجع لإفرازها صبغات حامضية Caroténoïdes [45].

- تعد *S.aureus* جد خطرة و هذا راجع لإفرازها لعدد من السموم و الإنزيمات من بين هذه السموم Toxineα, β, δ, γ و Staphylolysines المضادة للبالعات و المتسببة للموت الخلوي

لخلايا البشرة كذلك Leucocidines الذي يدمر و يتلف الخلايا متعددة الأنوية (Polynucléaires) وسموم أخرى مثل:

- Hémolysine, entérotoxines.

- Toxine pyrogènes: Toxines épidermolytique (exfoliatines), Toxines du Syndrome du Choc Toxique (TSCT), Succinic oxydase facter

كذلك تمتاز بإفرازها لإنزيمات خلوية خارجية (enzymes extracellulaires) مثل:

Staphylocoagulase, DNase المسؤول عن تكون مسمار داخل الأوعية الدموية و fibrinolysine (Staphylokinase)، كما تفرز إنزيمات أخرى مثل:

Hyaluronidases, désoxyribonucléase, lipases, estérases, nucléases, fibrinolyse, coagulase libre ou liés.

- جميع سلالات *S.aureus* تمتلك عوامل أنتيجينية على السطح تستعمل في التصنيف (حوالي 30عامل أنتيجيني) و تقسمين أساسيين (Système de Pillet et système d 'Oeding)
- ذات فعالية إنزيمية مثل الفعالية:

Lipasiques, estérasiques, protéasiques, phosphasiques [49-46-45-39].

IV – حساسية البكتيريا للمضادات الحيوية:

هناك نوعان من العوامل المضادة للبكتيريا هما:

1. العوامل الفيزيائية:

و هي تضمن قتل الجراثيم وذلك بتغيير الظروف الفيزيوكيميائية لها، أو توقف تضاعفها و بالتالي نموها و قتلها.

2. العوامل الكيميائية:

هي كل المواد التي تقوم بمجرد ملامستها للبكتيريا بتوقيف تضاعفها أي الفعل المثبط (Bactériostatique)، أو تعمل على قتلها أي الفعل القاتل (Bactéricide) [51].

إن اكتشاف المضادات الحيوية قد أعطى دفعا لمحاربة الأمراض المعدية، و بالتالي أعطت هذه الجزيئات أي المضادات الحيوية أمل للحياة. كذلك من اجل كل كائن حي معزول، البحث عن مقاومتها لهذه المضادات ضروري. المقاومة للمضادات الحيوية ظاهرة نجدها عند الإنسان و الحيوان.

الجدول-4- يبين حساسية بعض السلالات البكتيريا للمضادات الحيوية. تجدر الإشارة إلى انه دائما يجب التأكد من هذه الحساسية عن طريق Aromatogramme.

الجدول-4-: حساسية السلالات البكتيريا للمضادات الحيوية.

Souche bactérienne	**Antibiotiques aux quels les souches sont sensibles**
Escherichia coli	Amino-Pénicillines, céphalosporines, quinolones, aminosides, Triméthoprime-sulfaméthoxazole[45-46]. L'ampecilline, Colistine, les Tétracyclines [45].
Klebsiella pneumoniae	Céphalosporines[39-46], aminosides, La costine, l'acide nalidixique, l'association thriméthoprime-sulfamithoxazole[46].
Salmonella typhimurium	L'ampicilline, céphalosporines, tétracyclines [43].
Staphylococcus aureus	Aminosides (Gentamicine et tobramycine), Macrolides (spiramycine), les lincosamines (la clyndamycine), Vancomycine, Pristinamycine, Rifampicine [45].
Enterobacter cloacaea	Aminosides, colistine, l'Acide nalidixique, l'association Triméthoprime-Sulfaméthoxazole.
Pseudomonas aeroginosa	Carbénicilline, ticarciline,(gentamicine, tobramycine), colistine [39-47], céphalosporines de la troisiéme génératio (cefsulodine , céftazidime). Quinolones de la deuxième génération (péfloxacine, ciprofloxacine). Carboxypénicillines (carbénicilline, ticarcilline), les acylureidopénicillines (ozlocilline, la pipéracilline)[45].

V- تقنية القياس (Aromatogramme) :

Aromatogramme هي طريقة تحليلية تسمح لنا بتوضيح فعل الزيت العطري على الجراثيم أو الميكروبات. و تعرف هذه الطريقة على أنها قياس للمنطقة المثبطة بعد انتشار محتوى القرص من الزيت العطري. نقول أن الجرثومة حساسة إذا كانت هناك هالة حول القرص و قطرها مدرج ضمن المجال المرجعي. في حين أن الفعل المقاوم لهذه الجرثومة أو الكائن الحي المجهري فسر بغياب الهالة، يعني أن هناك نمو للبكتيريا حول القرص.

VI- التركيز الأدنى المثبط CMI: (Concentration minima Inhibitrice) Détermination de la CMI

تعرف CMI [57] على أنها أدنى تركيز ممكن من المضاد الحيوي الذي يؤدي إلى تثبيط كل نمو بكتيري مرئي بعد 18إلى 24 ساعة من الحضانة في درجة حرارة 37°م.

يمكن تحديد CMI إما في وسط صلب (طريقة الانتشار على وسط صلب) أو وسط سائل، لكن وقع اختيارنا في إنجاز هذا البحث على الطريقة الأولى وهذا لسهولة تحقيقها في مخابر البحث وعدم تكلفتها.

الجزء العملي

I-الهدف:

دراسة النشاط المضاد للبكتيريا لزيت عطري لنبتة طبية ذات أهمية علاجية *Salvia officinalis* (L) (sauge) تم بمخبر الميكروبيولوجيا بالمخبر الجامعي (جامعة جيجل). الهدف من هذه الدراسة هو معرفة هل لهذا الزيت العطري أي تأثير مضاد للبكتيريا أم لا.

تم إجراء هذا الاختبار على سلالات بكتيرية مختلفة (موجبة الغرام، وسالبة الغرام):

Escherichia coli ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853,
Staphylococcus aureus ATCC 29213, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603.
Enterobacter cloacae, Salmonella typhimurium.

II-الوسائل:

من أجل دراسة التأثير المضاد للبكتيريا للزيت العطري لـــ:(L) *Salvia officinalis* نحتاج إلى وسائل وأجهزة لضمان إجراء هذا البحث و المتمثلة في مايلي:

1. جهاز التقطير المائي البخاري CLEVENGER .
2. مجموعة من أنابيب الإختبار لتحضير الأوساط المغذية السائلة، و النسق في التراكيز المستعملة في الـــAromatogramme، و الـــCMI.
3. ورق واتمان لتحضير الأقراص الخاصة بالـــ Aromatogramme.
4. الأوساط المغذية Chapman، Héktoen، Mueller-Hinton.
5. الحمام المائي لإذابة الأوساط المغذية الصلبة.
6. الملقط، الماصة(10مل و 5مل و 1مل)، ممصات باستور.
7. الحاضنة.
8. جهاز الأوتوكلاف و الفرن للتعقيم.
9. الإيثانول المخفف لإجراء النسق من التخفيفات للزيت الطيار.
10. جهاز قياس الكثافة الضوئية.

2- دراسة النشاط المضاد للبكتيريا للزيت الطيار لـ:(L) *Salvia officinalis* تم على مرحلتين :

2-1- Aromatogramme عن طريق الانتشار على وسط صلب (طريقة الأقراص):

من أجل تحديد مدى حساسية السلالات البكتيرية للعوامل المضادة للبكتيريا و تقدير جرعة (تركيز) الزيت الطيار القادرة على إحداث هذا التأثير، نلجأ إلى طريقة Aromatogramme عن طريق الانتشار على وسط صلب، حيث تحضر الأقراص بورق واتمان التي تشبع بالتركيز المحدد من الزيت العطري (أو المواد المراد معرفة تأثيرها المضاد للبكتيريا كمستخلص الزيت النباتي في حالة بحثنا هذا)

بواسطة Micropipette و توضع بواسطة الملقط في أحواض بترية على الوسط الصلب تكون مشبعة مسبقا بلقاح بكتيري بطريقة المسح، و تعتبر هذه الطريقة شائعة الاستعمال في مخابر الميكروبيولوجيا و هذا راجع لسهولة تحقيقها و تعتبر كذلك طريقة غير مكلفة بالمقارنة مع الطرق الأخرى، و بالمقابل تعطي نتائج جيدة حيث تمكننا من معرفة مدى حساسية البكتيريا للزيت العطري المستخلص [52-53-54-55-56].

في بحثنا هذا استعملنا طريقة NCCLS ,

(National Commit for Clinical Laboratory Standards) و تختلف هذه الطريقة على حسب نوع البكتيريا:

- البكتيريا المتطلبة (Bactéries exigeantes) .
- البكتيريا غير المتطلبة(Bactéries non exigeantes) .

لتحقيق Aromatogramme يجب احترام الشروط التقنية التالية:

- **الوسط [56-57]:**

الوسط الملائم لتحقيق Aromatogramme هو وسط Mueller-Hinton (M-H) حيث يعتبر الوسط المثالي على حسب قوانين O.M.S (Organisation Mondiale de la Santé).

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

- **تحضير الأقراص:**

المضادات الحيوية العادية التي تستعمل في الاختبار المضاد للبكتيريا تكون على شكل أقراص ذات قطر 6 ملم. و من أجل تحقيق نفس الشروط تحضر الأقراص بورق واتمان رقم 3 وتقص إلى أقراص ذات قطر 6 ملم بالتدقيق [57]، هذه الأخيرة عند القص يجب أن تكون دائرية بانتظام و هذا لتسهيل عملية الإنتشار و قياس منطقة التثبيط، بعدها نقوم بتعقيمها حيث توضع في أنبوب زجاجي يحوي 10 ملل من الماء المقطر و توضع في جهاز الأتوكلاف مدة 20 دقيقة في درجة حرارة120°م، بعدها يتخلص من الماء و تفرغ في أطباق بترية وتوضع في الحاضنة حتى تجف تماما.

- **اللقاح البكتيري Inoculum :**

لتحضير اللقاح البكتيري يجب أن تكون السلالة البكتيرية نقية واللقاح البكتيري من 2 إلى 3 .10^6 بكتيريا/ ملل، وهذا من أجل الحصول على مستعمرات متفرقة وسهلة العزل، وهذا بعد الحضانة مدة 18 إلى 24 ساعة (تكون البكتيريا في مرحلة الثبات) في وسط غير مغذي.

تعديل اللقاح البكتيري من 2 إلى 3. 10^6 بكتيريا/ملل ضروري من أجل نوعية التحليل.

2-2- تحقيق الـ Aromatogramme [58]:

أ- تحضير اللقاح البكتيري :

- انطلاقا من مزرعة بكتيرية عمرها 18 ساعة في وسط العزل، تكشط خمس مستعمرات متفرقة
- و متشابهة تماما بواسطة إبرة التلقيح (L'ance de platine) أو ماصة باستور (Pipette Pasteur) دائرية.
- تفرغ ماصة باستور في أنبوب يحوي 10 ملل من الماء الفيزيولوجي المعقم 0.9%، يرج الأنبوب جيدا حتى الحصول على معلق بكتيري متجانس تقاس الكثافة الضوئية بجهاز Spectrophotomètre
- و يتم القياس بوضع أنبوب شاهد يحتوي على الماء الفيزيولوجي المعقم 0.9% عند طول الموجة625 نانومتر، و يجب أن يكون مجال كثافة المعلق البكتيري ما بين0.08 إلى 0.10 كثافة ضوئية.

- اللقاح البكتيري يمكن أن يعدل و هذا بإضافة للمزرعة البكتيرية (المعلق البكتيري) عدة مستعمرات عندما تكون غير كثيفة، أو إضافة الماء الفيزيولوجي عندما تكون المزرعة البكتيرية كثيفة.
- الزرع(L'ensemencement) يجب أن يكون في 15 دقيقة التي تلي تحضير المعلق البكتيري.

ب-الزرع (L'ensemencement) :

- تبلل الممسحة المعقمة بالمعلق البكتيري.
- تمرر الممسحة (écouvillon) على الجدار الداخلي للأنبوب وهذا لأجل التخلص من أكبر كمية من المعلق.
- تمرر الممسحة على كامل السطح الصلب الجاف من الأعلى إلى الأسفل بخطوط متقاربة جدا، تكرر هذه العملية مرتين حيث في كل مرة يدار الطبق بمقدار 60°م.
- في حالة زرع عدة أطباق، يجب أن تبلل الممسحة في كل مرة.
- بواسطة ملقط معقم (Pince stérile) توضع الأقراص المشبعة بالمستخلصات الطبيعية على السطح الصلب.

ت-قبل التحضين Pré-incubation:

- تترك الأطباق مدة 15 دقيقة في حرارة الغرفة لتجف وكذلك من أجل انتشار جيد للمادة الفعالة (مضادات حيوية أو مستخلصات طبيعية) انطلاقا من القرص.
- تحضن الأطباق مدة 18 ساعة في درجة حرارة37°م.

ث-القراءة (La lecture):

- يقاس قطر منطقة التثبيط (la zone d'inhibition) بالمليمتر بالتدقيق بواسطة المسطرة.

ج- التعليق (Interpretation):

تتم مقارنة النتائج بالقيم المرجعية (valeur critique) (أي بعد قياس قطر منطقة التثبيط يتم مقارنتها مع Diagrammes المرجعية[القطر المرجعي 15ملم]) و هذا من أجل تصنيف البكتيريا ضمن الأصناف: حساسة، متوسطة الحساسية، و أخيرا 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 عن السلالة أنها حساسة (Sensible).

من أجل تقدير التأثير المضاد للبكتيريا لمستخلص الزيت الأساسي للنوع النباتي المريمية أو *Salvia officinalis* (L) استعملنا السلالات البكتيرية التالية:

السلالات المرجعية: التي زودنا بها معهد باستور(الجزائر).

►- *Escherichia coli* ATCC 25922.

►- *Pseudomonas aerugenosa* ATCC 27853.

►- *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603.

►- *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

سلالات تم عزلها من خلال عينات مختلفة من مرضى بالمستشفى الجامعي ابن باديس (قسنطينة) مثل: pus, ponctions pleurales, ponctions d'ascites et gorge .

فالنوع *Salmonella typhimurium* تم التعرف عليه بالمستشفى الجامعي بقسنطينة، أما الجنس Enterobacter، فقمنا بإجراء الاختيارات البيوكيميائية للتعرف على هذا النوع البكتيري وهي:

Citrate, H_2S, Lactose, Mobilité, Indole, VP, ONPG, RM.

1-لمعرفة ما إذا كانت هذه البكتيريا تستعمل السيترات كمصدر للكربون نقوم أولا بتحضير معلق البكتيري وهذا بأخذ مستعمرتين أو ثلاثة بواسطة إبرة التلقيح و وضعها في أنبوب إختبار يحتوي على الماء الفيزيولوجي المعقم و بعد عملية الرج نقوم بأخذ كمية من المعلق البكتيري بواسطة إبرة تلقيح

معقمة و زرعها على المستوى المائل(La pente) للوسط Citrate de simence بعدها نقوم بوضعها في الحاضنة في درجة حرارة 37°م لمدة 24 ساعة، و القراءة تكون كمايلي:

- نمو البكتيريا + تغير اللون من الأزرق إلى الأخضر المزرق= + Citrate.
- عدم نمو البكتيريا + عدم تغير اللون= - Citrate.

2-لمعرفة ما إذا كانت هذه البكتيريا متحركة أم لا، تستعمل اللاكتوز أم لا، منتجة لغاز H_2S، نقوم بعملية الزرع بالوخز في المنتصف بواسطة خيط إبرة تلقيح معقمة أخذت بواسطتها مجموعة من البكتيريا انطلاقا من المعلق البكتيري، بعدها نقوم بوضعها في حاضنة في درجة حرارة 37°م لمدة 24 ساعة. القراءة تكون كمايلي:

-نمو البكتيريا حول جدار الفتحة التي أحدثة بخيط إبرة التلقيح فقط = البكتيريا غير متحركة.

-توغل نمو البكتيريا في معظم المناطق الداخلية المحيطة بالفتحة المركزية= البكتيريا متحركة.

-تغير اللون من الأحمر إلى الأصفر= + Lactose.

-بقاء اللون الأحمر= - Lactose .

-ظهور بقع سوداء=+ H_2S.

-عدم ظهور البقع السوداء=-H_2S .

3-أما بالنسبة للـIndole نقوم بأخذ كمية من البكتيريا بواسطة إبرة التلقيح و وضعها في الوسط Urée Indole و نضعها في الحاضنة في درجة حرارة 37°م لمدة 24 ساعة. بعد إنقضاء المدة المحددة نلاحظ تعكر في الوسط، نضيف قطرات من Réactif de Covaks .

-في حالة ما إذا تشكلة حلقة حمراء اللون على السطح= + Indole.

-وإذا لم تتشكل الحلقة الحمراء على السطح= -Indole.

4-لمعرفة ما إذا كانت هذه البكتيريا تملك الإنزيم β-galactosidase نقوم بتحضير معلق بكتيري و نضيف إليه قرص ONPG، نقوم بوضع الأنبوب في الحاضنة لمدة 24 ساعة في درجة حرارة 37°م. و تكون القراءة كمايلي:

-(+)ONPG: ظهور اللون الأصفر= وجود الإنزيم β-galactosidase.

-(-)ONPG : الوسط عديم اللون= عدم وجود الإنزيم β-galactosidase.

5- VP : توضع مجموعة من البكتيريا المحمولة على إبرة التلقيح من معلق بكتيري في الوسط clark et lubs يرج الأنبوب ويوضع في الحاضنة لمدة 24 ساعة في درجة حرارة 37°م. بعد انقضاء الـ 24 ساعة نلاحظ تعكر الوسط (يفسر بنمو البكتيريا)، يضاف إلى الوسط المتفاعل VP:

(Réactif Voges Proskauer) يضاف أولا VP_1 ثم نرجه بعدها نضيف VP_2 ثم نرج مرة أخري ثم نقوم بالقراءة:

-إذا كان هناك تغير في اللون من الأصفر إلى الأحمر= VP+/RM-

-إذا لم يكن هناك تغير في اللون= VP-/RM+

و النتائج مبينة في الجدول-5-.

الجدول-5-: نتائج الإختبارات البيوكيميائية للـــEnterobacter .

RM	ONPG	Citrate	H_2S	Lactose	Mobilité	Indole	VP	الاختبار / البكتيريا
-	-	+	-	+	+	-	+	Entérobacter

و انطلاقا من هذه النتائج تمكنا من معرفة نوع الجنس Enterobacter و هو النوع *E. cloacae*.

وفي الأخير، هذه السلالات استعملت طيلة فترة إنجاز هذا البحث، و للمحافظة عليها فنية يتم إعادة الزرع كل بداية أسبوع على أوساط اختيارية على حسب نوع السلالة البكتيرية المختبرة: وسط Héktoen بالنسبة لـــ Entérobactéries و*P. aeroginosa*، وسط Chapman بالنسبة لـــ *S. aureus* و هذا باستعمال طريقة NCCLS: تؤخذ مستعمرتان أو ثلاثة بواسطة إبرة التلقيح لتوضع في أنبوب إختبار به ماء فيزيولوجي ونقوم بعملية الرج حتى نتحصل على المعلق البكتيري بعدها وبواسطة إبرة تلقيح معقمة نقوم بإعادة الزرع في الوسط المغذي الصلب الخاص لكل بكتيريا و ذلك على شكل خطوط متقاربة لتوضع في الحاضنة لمدة 24 ساعة في درجة حرارة 37°م.

أجريت اختبارات أولية وهذا لمعرفة مدى حساسية السلالات البكتيرية لمستخلص الزيت النباتي لـــ (L) *Salvia officinalis* و تحديد التراكيز التي لها تأثير على البكتيريا في البداية ثم أكملت الدراسة بإجراء التخفيف في الوسط السائل لتحديد التركيز الأدنى المثبط (CMI) Concentration Minimale Inhibitrice .

الاختبار: تم اختبار التأثير المضاد للبكتيريا مع كل السلالات المختبرة وهذا بتشريب كل قرص بـــ 10 µl من مستخلص الزيت النباتي لـــ (L) *Salvia officinalis* .

2-3-التركيز الأدنى المثبط CMI:

Détermination de la CMI (Concentration minimale Inhibitrice)

أ- تحضير النسق من التراكيز المختلفة للمستخلص [48-58]:

نقوم بتحضير المحلول الأم وذلك بإذابة 20 ملغ من مستخلص الزيت النباتي في 10 ملل من الإيثانول المخفف، مع الإشارة إلى أن هذا الزيت النباتي قد تم حفظه في الثلاجة طيلة فترة إنجاز هذا البحث في درجة حرارة +4° م.

و انطلاقا من المحلول الأم المتحصل عليه 2000 µg/ml نقوم بتحضر مجموعة من التراكيز المتناقصة و المتدرجة تنازليا، و النموذج موضح في الجدول -6-.

الجدول-6- تحضير مجموعة التراكيز.

التركيز الإبتدائي (المادة الفعالة)µg/ml	الحجم بالملتر	حجم الإيثانول بالملتر	التركيز النهائي µg/ml
2000µg/ml	6.4 ملل من المحلول الأم	3.6 +ملل	128 µg/ml
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

إن تحضير مجموعة من التراكيز بهذه الطريقة استعملت لمدة طويلة من أجل تحديد CMI المضادات الحيوية التجارية.

كما هو معلوم الإيثانول يستعمل كمعقم، لكن في بحثنا هذا قامت الأستاذة المشرفة بتحضير الإيثانول المخفف لحد معين وذلك بإضافة الماء المقطر المعقم و تم التأكد من ذلك بإجراء تجربة حيث قمنا بسكب 18 ملل من الوسط Mueller-Hinton في علبة بيتري أضيف إليها 2 ملل من الإيثانول المخفف وبعدها قمنا بعملية الزرع إنطلاقا من البكتيريا المختبرة بواسطة إبرة تلقيح معقمة ثم وضعها في الحاضنة لمدة 24 ساعة في درجة حرارة 37°م. و بعد إنقضاء الوقت اللازم وجدنا بأن هناك نمو للبكتيريا و منه نستنتج بأن الإيثانول لا يملك أي نشاط مضاد للبكتيريا مع جميع السلالات البكتيرية المدروسة.

ب-المبدأ: [48-49]

♦- يوم الأول:

- تحضر مزارع بكتيرية في طور الثبات لكل سلالة من السلالات تحت الدراسة عمرها 18 ساعة (المزرعة أو المعلق البكتيري يكون ذا كثافة متجانسة).
- يعاد زرع (0.1 ملل من معلق العصويات السالبة الغرام، 0.3 ملل من *Staphylococcus aureus* و *P. aeruginosa*) من هذه المزارع البكتيرية في 10 ملل من الوسط السائل المغذي Mueller-Hinton.
- توضع بعد ذلك الأنابيب في الحاضنة تحت التحريك كل 15 دقيقة، في درجة حرارة 37°م لمدة تتراوح ما بين 3 إلى 5 ساعات، حتى بداية ظهور تعكر خفيف (حوالي 10^7 بكتيريا/ ملل).
- يأخذ 1 ملل من كل أنبوب، ويوضع في أنبوب آخر يحوي 10 ملل من الوسط Mueller-Hinton درجة حرارته 37° م.
- تؤخذ علب بتري فارغة و يوضع في كل علبة 2 ملل من كل تخفيف من مجموعة التراكيز المحضرة مسبقا ابتداء من أقل تركيز إلى أكبر تركيز مع وضع طبق شاهد (يحوي 18 ملل من Mueller-Hinton و 2 ملل من الإيثانول).

- يضاف إلى كل علبة 18 ملل من Mueller-Hinton ذائبة ذات حرارة 45°م، تحرك الأطباق جيدا لأجل ضمان الانتشار الجيد للمادة الفعالة للمستخلص النباتي في كامل العلبة.
- تترك الأطباق لعدة دقائق فوق الطاولة في شروط التعقيم و هذا حتى يتم تصلب الوسط.
- تجفف الأطباق لمدة 30 دقيقة في الحاضنة تحت درجة حرارة 37°م (الأطباق مفتوحة).
- تتم عملية الزرع في كل علبة بشكل خطوط (strie) بواسطة إبرة التلقيح أو بواسطة ماصة باستور دائرية، على جميع الأطباق المحتوية على مستخلص الزيت النباتي و الطبق الشاهد.
- تحضن الأطباق لمدة 18 ساعة في درجة حرارة 37°م.

♦- **يوم الثاني:**

تقرأ النتائج من أجل تحديد التراكيز الأدنى المثبطة (التركيز من أجل لا تظهر أي مزرعة بكتيرية مرئية).

من أجل ضمان الحصول على نتائج متناهية الدقة فقد كنا نحرص على إعادة كل اختبار من 3 إلى 4 مرات و ذلك من أجل التأكد من النتائج المتحصل عليها.

3- النتائج:

3-1- نتائج الـ Aromatogramme:

أقطار مناطق تثبيط مستخلص الزيت الأساسي النباتي لنبات المريمية قيست بعد 18 ساعة من الحضانة. أقطار التثبيط مدونة في الجدول -7-.

الجدول-7-: قطر منطقة تثبيط الزيت الأساسي لكل نوع من البكتيريا المختبرة.

النتائج / البكتيريا	القطر بالملم			
	128µغامل	64 µ غامل	32 µغامل	16 µغامل
Escherichia coli ATCC 25922	18	16	16	12
Pseudomonas aerugenosa ATCC 27853	22	20	18	14
Klebsiella pneumoniae ATCC 700603	24	22	20	14
Staphylococcus aureus ATCC 29213	28	28	26	22
Salmonella typhimurium	24	24	22	18
cloacae Enterobacter	20	18	18	16

من خلال نتائج Aromatogramme نلاحظ أن كل السلالات البكتيرية استجابت استجابة جيدة، حيث تبين أن هناك علاقة تتناسب بين الجرعة و قطر منطقة التثبيط، فكلما زادت كمية مستخلص الزيت النباتي زادت منطقة التثبيط، مما قادنا إلى الاستنتاج بأن هناك علاقة ما بين الجرعة و الفعل المضاد للبكتيريا.

نتائج Aromatogramme كذلك تشير إلى أن الزيت العطري له تأثير على الكرويات الموجبة الغرام أكثر من العصويات السالبة الغرام حيث كان قطر منطقة التثبيط بالنسبة لـ *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 **28** ملم، كذلك عند المقارنة بين العصويات السالبة الغرام فنلاحظ أن السلالات البكتيرية *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 و *Salmonella typhimirium* أكثر حساسية للزيت العطري (حيث كان قطر مناطق التثبيط **24** ملم لكل منهما) من *Pseudomonas aerugenosa* ATCC 27853، هذه الأخيرة أكثر حساسية من *Enterobacter cloacae*، أما بالنسبة لـ *Escherichia coli* ATCC 25922 فكانت السلالة البكتيرية الوحيدة التي أبدت أقل حساسية لمستخلص الزيت النباتي حيث كان قطر منطقة التثبيط **18** ملم، و لكن تعتبر قيمة معتبرة إذا ما قورنت مع المضادات الحيوية الاصطناعية النشطة على هذا النوع من الميكروبات.

3-2- نتائج CMI:

النتائج مدونة في الجدولين التاليين:

الجدول-8- قيم CMI للسلالات الموجبة الغرام.

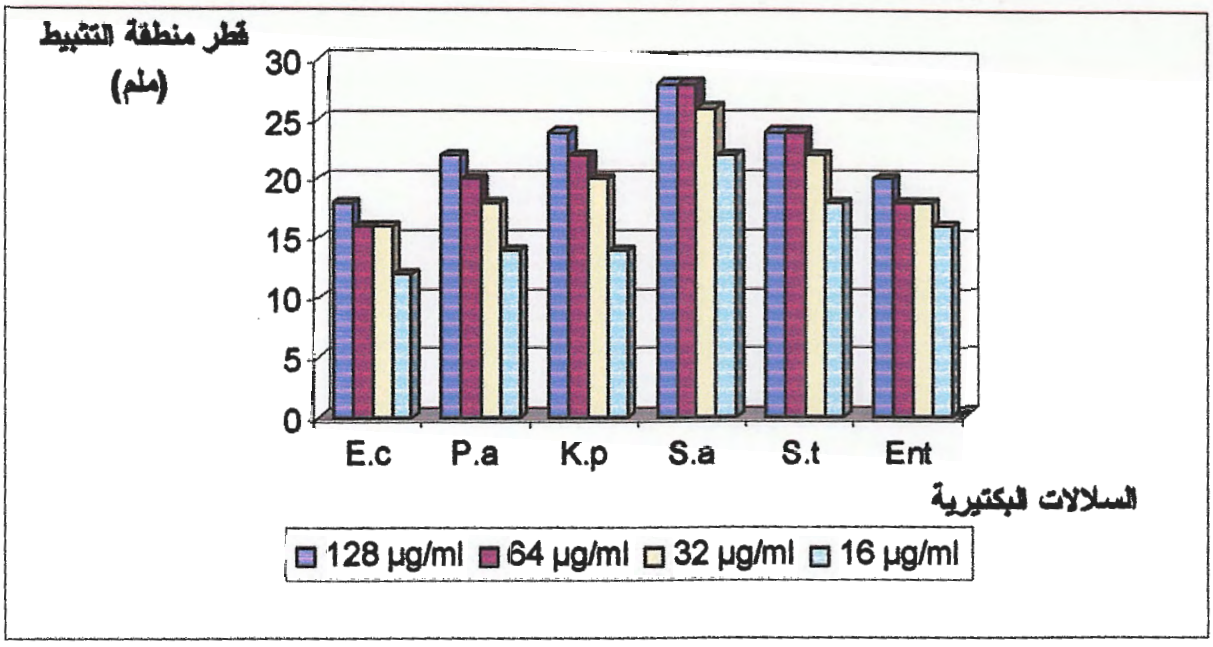
السلالة	CMI (µg/ml)
***S. aureus* ATCC 29213.**	**5**

الجدول-9- قيم CMI للسلالات السالبة الغرام.

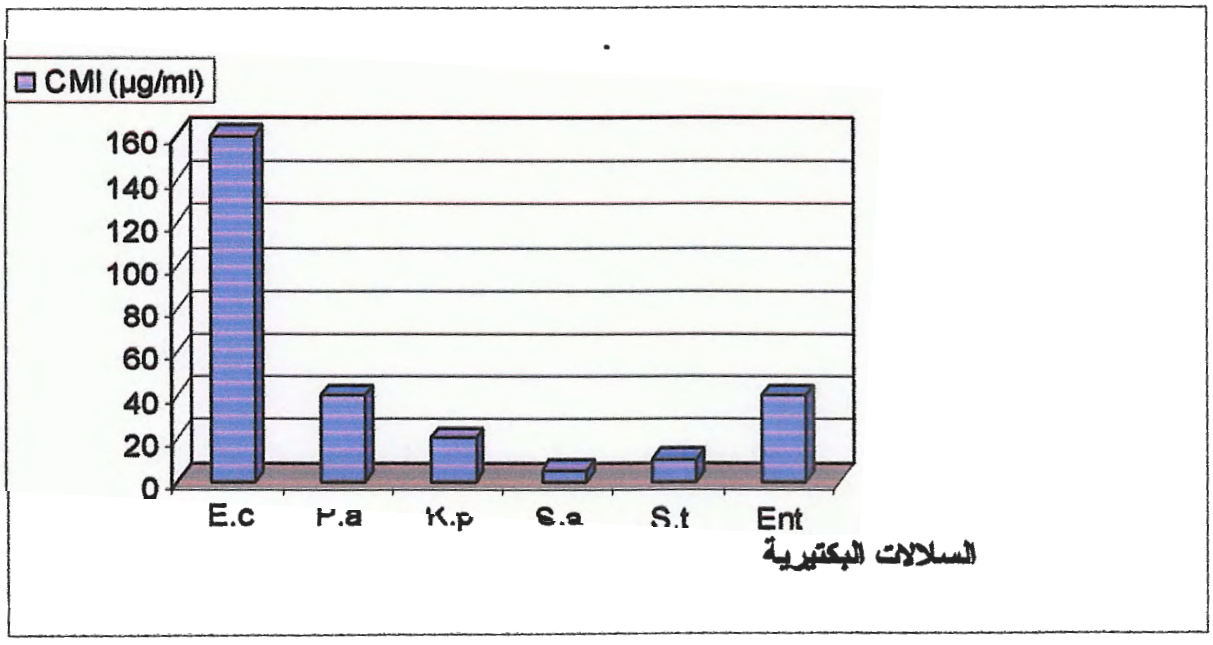
السلالة	CMI (µg/ml)
***P. aeruginosa* ATCC 27853**	**40**
***E. coli* ATCC 25922**	**160**
***Klebsiella pneumoniae* ATCC 27853**	**20**
Enterobacter cloacae	**40**
Salmonella typhimurium	**10**

بمقارنة النتائج المتحصل عليها من الـ CMI النتائج مع السابقة للـ Aromatogramme نلاحظ بأن هناك توافق فيما بينهما، إذ نلاحظ بأن البكتيريا ***E. coli*** لها قطر منطقة تثبيط الأصغر بالمقارنة مع بقية الميكروبات، و يوافق ذلك ارتفاع كبير في التركيز الأدنى المثبط. و على العكس بالنسبة للـ ***S. aureus*** **لها أقطار منطقة التثبيط كبيرة مقارنة مع البكتيريا الأخرى يوافقها في ذلك انخفاض في التركيز الأدنى المثبط.**

و الأعمدة البيانية التالية، تلخص النتائج المتحصل عليها:



البيان-1-: قطر منطقة تثبيط الزيت الأساسي لكل نوع من البكتيريا المختبرة.

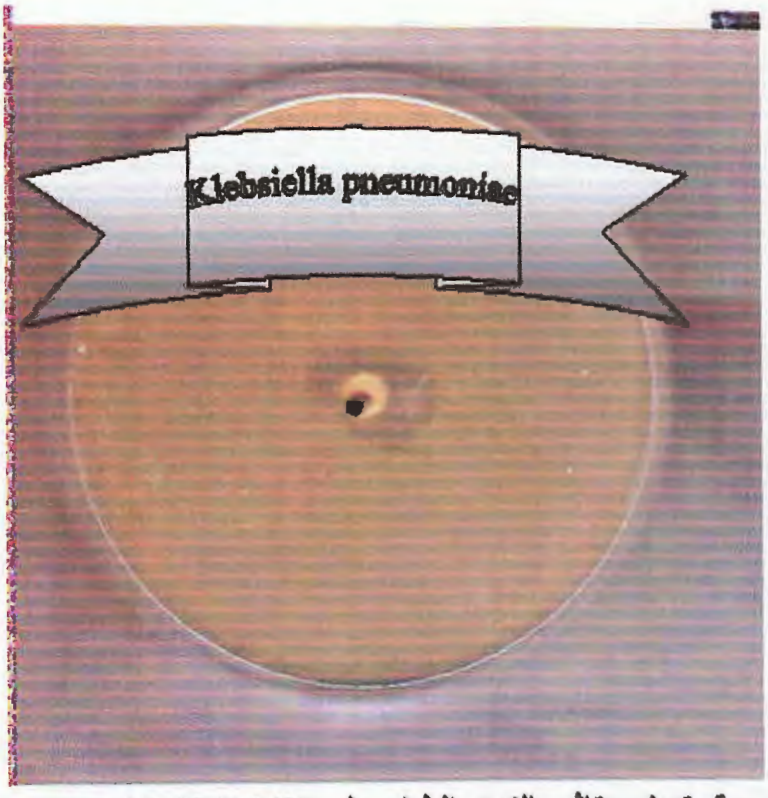


البيان-2-: قيم الـ CMI لمختلف السلالات المختبرة.

Ent : ***Enterobacter cloacae.***
S.t : ***Salmonella typhimurium.***
S.a ATCC : ***S. aureus*** **ATCC 29213.**
K.p ATCC : ***Klebsiella pneumoniae*** **ATCC 27853.**
P.a atcc : ***P.aeruginosa*** **ATCC 27853.**
E.c ATCC: ***E. coli*** **ATCC 25922.**

الصورة(3):الصورة توضح تأثير الزيت الطيار على ***Salmonella typhimurium***

الصورة(4): الصورة توضح تاثير الزيت الطيار على ***Staphylococcus aureus*** ATCC 29213



الصورة(5): الصورة توضح تاثير الزيت الطيار على *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603

الصورة(6): الصورة توضح تاثير الزيت الطيار على *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

الصورة(7): الصورة توضح تأثير الزيت الطيار على *Enterobacter cloacae*

الصورة(8): الصورة توضح تأثير الزيت الطيار على *Escherichia coli* ATCC 25922

III- مناقشة النتائج:

دراسة الفعل المضاد للبكتيريا لمستخلص الزيت العطري للنبتة (L) *Salvia officinalis* على مختلف السلالات البكتيرية عن طريق Aromatogramme أعطى لنا أقطار تختلف باختلاف السلالات البكتيرية المختبرة، حيث لاحظنا قيم مهمة مع الكرويات الموجبة الغرام *S. aureus* و العصويات السالبة الغرام خاصة: *Salmonella typhimurium* و *Klebsiella pneumoniae* .

كذلك من خلال نتائج Aromatogramme لاحظنا أن الزيادة في تركيز مستخلص الزيت النباتي تؤدي إلى زيادة في منطقة التثبيط، لذا نستنتج بأن هناك علاقة ما بين الجرعة و الفعل المضاد للبكتيريا.

من خلال نتائج CMI و المتوافقة مع نتائج Aromatogramme نستنتج بأن مستخلص الزيت العطري يمتلك فعالية مضادة للبكتيريا مع كل السلالات البكتيريا المدروسة و بشكل خاص الكرويات الموجبة الغرام حيث تحسست *S. aureus* لتركيز ضئيل جدا قدر بـــ **5** (µg/ml) ، كذلك الزيت العطري له فعالية كبيرة على العصويات السالبة الغرام حيث كان التركيز **10** (µg/ml) و **20** (µg/ml) كافي لإيقاف نمو كل من *Salmonella typhimurium* و *Klebsiella pneumoniae* على التوالي، أما *P. aeruginosa* و *Enterobacter cloacae* تأثرت بالتركيز (µg/ml) 40، و أخيرا *E. coli* تطلبت تركيز أكبر و الذي قدر ب (µg/ml) 160 و الذي يعتبر تركيز كبير بشكل عام.

أظهرت الدراسة الببليوغرافية للزيت العطري للنبتة (L) *Salvia officinalis* على احتوائها على مركب تربيني أساسي بنسبة أكثر من 50% في جميع أنواع (L) *Salvia officinalis*، وهو Thujone [60-61-62]، هذا الأخير المعروف بفعاليته المضادة للميكروبات { الفعالية المضادة للبكتيريا و الفطريات} [30]، و لذلك يمكن تفسير النتائج الجيدة المحصل عليها للزيت العطري للنبتة *Salvia officinalis* (L) قد يرجع إلى وجود مثل هذه المركبات في الزيت العطري المدروس، بالإضافة إلى المركبات الرئيسية الأخرى المعروفة بفعاليتها المضادة للميكروبات مثل: Carvacrol، α-Pinène.

الخاتمة

الخاتمة

أبدى الزيت الطيار المتحصل عليه من نبتة المريمية الشائعة (L) *Salvia officinalis* بطريقة التقطير بالبخار نشاطا مضادا على جميع السلالات البكتيرية المختبرة، و النتائج المتحصل عليها من الأنتيبوغرام L'Antibiogramme تبين أن هذا الزيت له فعالية كبيرة خاصة مع الكرويات الموجبة الغرام: *Staphylococcus aureus* ، حيث سجلنا بعد القياس أن قطر منطقة التثبيط يقدر بـــ 28 ملم.

و أبدى هذا الزيت نفس الفعالية مع العصيات السالبة الغرام خاصة:

Salmonella typhimurium، *Klebsiella pneumoniae* و التي أعطت مناطق تثبيط قطرها تقدر بـــ 24 ملم.

أما نتائج الـــ CMI ، فجاءت متوافقة مع النتائج المتحصل عليها من الأنتيبوغرام L'Antibiogramme. أي أن الكرويات الموجبة الغرام كانت أكثر منه من العصيات السالبة الغرام.

المراجع

BIBLIOGRAPHIE **المراجع :**

المراجع باللغة الأجنبية:

1- Lu, Y; Foo, L. Y. Polyphenolics of *Salvia*. Phytochemistry (2002), (59), 117-140.

2- Ulubelen, A; Topeu, Eris, C. Phytochemistry (1994), (36), 971-974.

3- Lu, Y; Foo, L. Y. Flavonoids and phenolic glycosides from *Salvia officinalis*. Phytochemistry (2000), (55), 263-267.

4- Cuvelier, M. E; Kichard, H; Berst, C. Journal of the American Oil Chemists Society (1996), (73), 645-652.

5- El Sayed, N. H; Khalifa, T. L; Ibrahim, M; Mabry, T. J. Fitoterapia (2001), (72), 850-853.

6- Li, W; Gu, J; Chen, H. Zhu, X. Chemical abstracts (1998), 129, 298334(d).

7- Popa, D. P; Pasechnik, GSI. Higher terpenoids of some species of Labiatae. Kim. Prir Soeden (1974), (4), 529-30.

8- Huang, Y. S; Zhang, T. J. Antioxidative effect of three water soluble components isolation of *Salvia miltiorrhiza in vitro*. Chemical abstract (1992), 116, 228208y.

9- Baricevic, Dea; Bartol, Tomaz.The biological/pharmacological activity of the Salvia genus. Medicinal and Aromatic Plants Industrial Profiles (2000), 14, 143-184.

10- Perry, Nicolette; Howes, Melanie-Jayne; Houghton, Peter; Perry, Elainé. Why sage may be a wise remedy: Effects of *Salvia* on the nervous system. Medicinal and Aromatic Plants-Industrial Profiles (2000), 14, 207-223.

11- Roger, T. J. Les plantes qui guérissent. Pauplona. Encyclopédie des plantes médicinales (2000), (30), 591.

12- Cabo, J; Crespo, M. E; Jimenez, J; Navarro, C; Peran, E; Zarzuelo, A. The essential oil of *Salvia lavandulifolia* Vahl subsp. oxyodon. Plantes Medicinales et Phytotherapie (1987), 21(2), 116-21.

13- Ramadan, A; Afifi, N. A; Fathy, M. M; El-Kashoury, E. A; El-Naeneey, E. V. Some pharmacodynamic effects and antimicrobial activity of essential oils of certain plants used in Egyptian folk medicine. Veterinary Medical Journal Giza (1994), 42(1(B)), 263-70.

14- Shapiro, S; Meier, A; Guggenheim, B. The antimicrobial activity of essential oils and essential oil components towards oral bacteria. Oral Microbiology and Immunology (1994), 9(4), 202-8.

15- Peana, A; Satta,; Moretti, Mario Domenico, L; Orecchioni, M. A study on choleretic

51- Le Minor, L; Veron, M. Bactériologie Médicale. Edition Flammarion (1ère édition). Paris. (1982).

52- Barry et Al. Lorian,Procedure for testing antimicrobial agents in agar media : theorical considerations. antibiotics in laboratory medicine, Williams, Wilking, baltimore, 2nd édition, (1986).

53- Bauer, A. W; Kirby, W. M; Sherris, I; Turk, M; Am, J. Clin. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. Pathol, (1986), 45: 493-496.

54- Comité OMS d'experts de la standardisation biologique, 28ème rapport, série de rapports technique n° 610, OMS Genève, (1977), 106-138.

55- NCCLS Standard for antimicrobial susceptibility testing by diffusion methods. NCCLS Documents (1985), 5:4.

56- H. M; Sherris, J. C. Antimicrobial susceptibility testing. Ericsson,. Report of an international collaborative study. Acta Pathol. Microbiol. Scand, Sect. B, Suppl, (1971), 217-:1-90.

57- Le Minor, L; Veron, M. Bactériologie médicale. Edition Flammarion (2 éme édition) Paris. (1989).

58- Courvalin, P; Flandrois, J. P; Goldstein, F; Philippon, A; Sirot, J. L' antibiogramme automatisé mpc-vigot. Paris. (1988).

59- Rahal, K; Tali-Maamar; Benslimani, A ; Belouni, R; Missoum, M.F.K. Standardisation de l'Antibiogramme a l' Echelle nationale Selon les Recommandations de L' OMS. 2 ème Edition (2001).

60- Jalsenjak; Vesna; Peljnjak, S; Kustrak, Danica. Microcapsules of sage oil: essential oil content and antimicrobial activity. Pharmazie (1987), 42(6), 419-20.

61- Farag, R. S; Salem, H.; Badei, A. Z. M. A; Hassanein, D. E. Biochemical studies on the essential oils of some medicinal plants. Fette, Seifen, Anstrichmittel (1986), 88(2), 69-72.

62- Holeman. M; Berrada, M; Bellakhdar, J; Ilidrissi, A; Pinel, R. Comparative chemical study on essential oils from *Salvia officinalis, S. aucheri, S. verbenaca, S. phlomoides* and *S. argentea*. Fitoterapia (1984), 55(3), 143-8.

المراجع باللغة العربية:

22- الشحات نصر أبو زيد. النباتات العطرية و منتجاتها الزراعية والدوائية. رقم الإيداع 92/8982 الطبعة الثانية 1992. ص.(23-30)، (32-33)، (49-65)، (309-320). I.S.B.N 977-258-028-4

المراجع من الويب:

18- http://www.a.pia.umontreal.ca/gardrat/cours/APP15 000/ exemples/herbiers/ Froment/sauge.html-12K.

الملحق

مكونات الوسط: **Chapman**

خلاصة اللحم.....1غ/ل

كلورير الصوديوم.....75غ/ل

البيبتون.....10غ/ل

جيلوز.....15غ/ل

المانيثول.....10غ/ل

احمر الفينول.....0.025غ/ل

Mueller Hinton

نقيع لحم البقر.....1غ/ل

هيدروليزات الكازيين.....75.5غ/ل

النشاء.....1.5غ/ل

جيلوز.....10غ/ل

Héktoeh

البيبتون(Peptone).....12غ

خلاصة الخميرة(Extrait de levure).....3غ

اللاكتوز(Lactose).....12غ

السكروز(Saccharose).....12غ

الساليسين(Salicine).....2غ

سيترات الحديد الثلاثي(Citrate de FerIII).....1.5غ

مؤشر الكبريت (الحديد الثلاثي) (FeIII).....9غ

ديزوكسيكولات(Désoxycolate).....1.5غ

فوشين(Fushine).....0.1غ

مؤشر الpH.....65غ

NaCl.....5غ

$Na_2S_2O_3$.....5غ

الأجار.....13ملغ

قائمة الكلمات المختصرة

L.O.S.T.	أتحصل على المركبات العلاجية- قسنطينة.
Type R	: Type Rough.
Type S	: Type Smooth.
µm	: **micro mètre.**
ATCC	: American Culture Type Collection.
NCCL	: National Committee for Clinical Laboratory Standards
O.M.S.	: Organisation Mondiale de la Santé.
RM	: Rouge de Méthyle.
VP	: Voges Proskauer.
Citrate	: Citrate de Simmons.
ONPG	: Orthonitrophényl galactopyranoside.
CMI	: Concentratio Minimale Inhibitrice.
µl	: **micro litre.**
µg/ml	: **micro gramme par milli litre.**
M-H	: Mueller-Hinton.
ml	: **milli litre.**
mm	: **milli mètre.**
ATB	: Anti-Biotique.
CHU	: Centr Hospitalo-Universitaire.
g (غ)	: gramme.

من إعداد:	الموضوع:	تاريخ المناقشة 2005/07/02
بخوش خالد بلقاسم فاتح زقار فارس	دراسة النشاط المضاد للبكتيريا للنبتة *Salvia officinalis* (L)	

الملخص:

يكمن هدف بحثنا في دراسة النشاط المضاد للبكتيريا للزيت الطيار للنبتة *Salvia officinalis* (L) من العائلة الشفوية، تحوي هذه الأخيرة حوالي 4000 نوع و 350 جنس من النباتات العشبية التي تتوزع في جميع أنحاء العالم و بصفة خاصة في منطقة البحر الأبيض المتوسط.

أبدى الزيت الطيار فعالية مضادة للعديد من السلالات البكتيرية و بشكل خاص الكرويات الموجبة الغرام: *Staphylococcus aureus* .

الكلمات المفتاحية:

الشفويات؛ الزيت الطيار؛ التأثير المضاد للبكتيريا؛ *Salvia officinalis* (L) .

Résumé :

Notre travail consiste à déterminer l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de l'espèce *Salvia officinalis* (L), appartenant à la famille des labiées (Lamiaceae). Cette dernière compte près de 4000 espèces et 350 genres de plante distribuées à travers le monde et plus particulièrement dans la région méditerranéenne.

L'étude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle du *Salvia officinalis* (L) a manifesté une bonne activité *vis-à-vis* des souches testées et surtout les cocci à GRAM (+) : *Staphylococcus aureus*

Mots clés :

Labiées(Lamiaceae); *Salvia officinalis* (L); Huile essentielle; Activité antibactérienne.

Abstract :

Our work consisted to study of the antibacterial activity of the essential oil of the spieces *Salvia officinalis* (L), belonging to the Lamiaceae. This family includes 4000 spieces and 350 genus, widely distributed in the world, specially in the Mediterranean area.

The study of the antibacterial activity of the essential oil showed a good activity against the different tested strains, particularly the GRAM (+) bacteria: *Staphylococcus aureus*

Key words:

Labiatae; *Salvia officinalis* (L); Essential oil; Antibacterial activity.