المجلة العراقية
لبحوث السوق وحماية المستهلك
المجلد (10) العدد (2)
لسنة 2018

دراسة التأثير التآزري للمستخلص الكحولي لنبات الزعتر البري مع المضادات الحياتية على بكتريا الزوائف الزنجارية

عبدالله قيس طلب الجميلي[1]*   أ. د احمد محمد تركي[2]
[1] قسم علوم الحياة، كلية العلوم ، جامعة الانبار، الانبار، العراق. abadullhkaistalab@gmail.com
[2] الاستاذ الدكتور، قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة الانبار، الانبار، العراق. Drahmed201316@yahoo.com

تاريخ استلام البحث: 2018/4/25   تاريخ قبول النشر: 2018/6/3

الخلاصة

تضمنت الدراسة الحالية جمع 144 عينة توزعت ما بين 106 عينة منها تعود لمصادر سريرية (Clinical source) للمرضى الراقدين في المستشفيات، و 38 عينة تعود لمصادر بيئية تمثلت بالماء والتربة للتحري عن وجود بكتريا *P. aeruginosa* اذ أظهرت نتائج العزل الحصول 45 عزلة لبكتريا *P.aeruginosa*، وأجري فحص الحساسية لجميع العزلات البكتيرية المنتخبة والبالغ عددها 45 عزلة اتجاه 11مضادا حيويا تباينت مقاومة العزلات للمضادات الحياتية، اذ ابدت المضادات Cefixime و Cefotaxime و Tetracycline و Amoxicillin و Erythromycin و Methicillin و Cloxacillin و Naidixic acid مقاومة اتجاه عزلات بكتريا *P.aeruginosa* وبنسب مقاومة ما بين 77.7%، 73.3%، 84.4%، 82.2%، 80%، 77.7%، 77.7 و 73.3% على التوالي، في حين ابدت اغلبية العزلات حساسية عالية، اذ كانت نسبة المقاومة للمضادا Meropenem بواقع 13.3%. و حدد التركيز المثبط الادنى للمستخلص الكحولي لنبات الزعتر البري *Thymus vulgaris* وكان التركيز المثبط الادنى لمستخلص الزعتر البري 15 ملغم/ مللتر، وتم دراسة الفعالية الضد ميكروبية للمستخلص الكحولي لنبات الزعتر البري في تثبيط نمو وانتاج عوامل الضراوة في بكتريا *P. aeruginosa* المعزولة من مصادر سريرية وبيئية، واشارت النتائج الى ان مستخلص الزعتر البري له فعالية ضد عزلات الزوائف الزنجارية. ودرس الفعل التارزي للمضادات الحيوية مع المستخلص الكحولي لنبات الزعتر البري، اذ تم اختيار ثمانية انواع من المضادة التي قاومتها بكتريا *P. aeruginosa* واختبار فعاليتها بوجود المستخلص الكحولي لنبات الزعتر البري بتركيز (15ملغم/ ملم) الذي اعطى اقل تركيز مثبط ادنى (MIC) اتجاه بكتريا *P. aeruginosa* باستخدام المضادات Cefixime و Cefotaxime و Tetracycline و Amoxicillin و Erythromycin و Methicillin و Cloxacillin و Naidixic acid. اظهرت النتائج ان بكتريا *P. aeruginosa* زادت حساسيتها للمضادات الحيوية المستعملة بوجود المواد الفعالة للمستخلص النباتي.

الكلمات المفتاحية : التأثير التآزري، الزعتر البري، الزوائف الزنجارية.

STUDY THE SYNERGISM EFFECT OF ALCOHOL EXTRACT OF *Thymus vulgaris* WITH ANTIBIOTICS AGAINST *pseudomonas aeruginosa.*

Abdullah Kais Talab AL-jumaily [1] * *Ahmad Mohammed Turkie*[2]
1. Department of Biology, College of Science, Al-Anbar University, Al-Anbar, Iraq abadullhkaistalab@gmail.com
2. Prof. Dr. Department of Biology, College of Science, Al-Anbar University, Al-Anbar, Iraq. Drahmed201316@yahoo.com

ABSTRACT

The current study includes 144 samples were 106 bacterial samples belonging to the clinical sources, 38 bacterial samples belonging to the environmental sources to investigate the presence of bacteria *P. aeruginosa*. The results of diagnosis clarified that there are 45 bacterial isolates belonging to the bacterium *P. aeruginosa* The examination of the sensitivity of all bacterial isolates was done for elected 45 isolation towards the 11 antibiotic by spread method on the dishes. The results showed that the resistance ratio toward Cefixim, Cefotaxim, Tetracycline, Amoxicillin, Cloxacillin, Methicillin, Erythromycin and Naldixic acid was 77.7, 73.3, 84.4, 82.2, 80, 77.7, 77.7 and 73.3 respectively, While most isolates were sensitive to all of the antibiotic, Meropenem as did

* البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الاول.

the proportion of resistance to this antibiotic 13.3%. Minimum inhibitory concentration (MIC) of the alcohol extract of *Thymus vulgaris* was determined. Results obtained showed that MIC of *Thymus vulgaris* extract was 15 mg/ ml. The antimicrobial activity of the alcohol extract of *Thymus vulgaris* was investigated for the purpose of inactivation of growth and production of virulence factors of *P.* aeruginosa that was isolated from clinical and environmental sources. The Results showed that alcohol extract of *Thymus vulgaris* had an inhibitory effect against *P. aeruginosa* The study was also carried out to study the synergism effect of antibiotics in presence of active compounds of the alcohol extract of *Thymus vulgaris*, where eight types of antibiotics were chosen that have resistance by *P. aeruginosa* and determined activity in presence of alcohol extract of Thymus vulgaris in concentration (15 mg /ml) that given Minimum inhibitory concentration (MIC) against *P. aeruginosa*, These antibiotics were Cefixim, Cefotaxim, Tetracycline, Amoxicillin, Erythromycin, Methicillin, Cloxacillin, and Naldixic acid. The Results showed that *P. aeruginosa* increased sensitivity to these antibiotics used in presence of active compounds of the alcohol extract of Thymus vulgaris.
Key words : synergism effect, *Thymus vulgaris*, *pseudomonas aeruginosa.*

INTRODUCTION المقدمة

الزعتر البري هو نبات عشبي معمر ينتمي الى العائلة الشفوية Lamiaceae يتميز بكون السيقان مضلعة تتحول بالتدريج الى سيقان خشبية كلما تقدمت بالعمر والاوراق صغيرة رفيعة ومتطاولة اما الازهار فتكون صغيرة ذات لون ازرق او ارجواني تزهر منتصف الصيف (**Rheeand & Kim, 1999**)، يمتلك الزعتر البري عددا من المركبات الكيميائية تتراوح بين 30 الى 60 مركب كيميائي تختلف فيما بينها من ناحية التراكيز والفعاليات الحيوية، تتمثل بمركبات الفينولات phenols والثايمولات Thymol بنسبة 40 % وكارفاكرول carvacrol بنسبة 15% والزيوت الطيارة Volatile oil بنسبة25 % وكذلك مركبات اخرى (**Guynot *et al* ., 2003**)، و يتمتع نبات الزعتر البري بقابلية كبيرة على التأثير في العديد من الانواع البكتيرية السالبة والموجبة لصبغة كرام مثل *S. aureus* و *Salmonella typhi* و *aeruginosa*. *Pseudomonas* و *Citrobacter* sp. و *Micrococcus* sp. و *Bacillus subtilis*، وذلك لاحتوائه على مركبات مهمة طبيا مثل Thymol و Carvacrol و Caffeic acid و Tannins و Terpenoids، التي تتميز بفعاليتها التثبيطية تجاه الجراثيم (**Dorman & Deans, 2000**)، اذ تعمل هذه المركبات على تحليل الغشاء الخلوي البكتيري وذلك عن طريق تحليل الغشاء الخارجي للبكتريا السالبة لصبغة كرام مما يؤدي الى تحرر lipopolysaccharides (LPS) وزيادة نفوذية الغشاء السايتوبلازمي، كما تعزى الفعالية المضادة للبكتريا الى احتواء الزعتر على التانينات والمركبات الفينولية الاخرى فضلا عن الفلافونويدات التي تتميز بقدرتها على تكوين معقد مع البروتينات الذائبة والخارج خلوية وكذلك مع جدار الخلية البكتيرية، وتقوم الفلافونويدات الكارهة للماء بتمزيق الاغشية الخلوية للبكتريا (**Fayad *et al*., 2013**).

MATERIALS AND METHODS طرائق العمل

Collection of samples جمع العينات

جمعت 144 عينة من مصادر سريرية وبيئية إذ تم الحصول على العينات من مختبرات بعض المستشفيات في بغداد والرمادي شملت مستشفى الطفل المركزي ومستشفى الكندي ومستشفى الرمادي العام للمدة من (2017/10/15) ولغاية (2018/1/15) كما مبين في (الجدول، 1) .

جدول (1): أعداد وأنواع الحالات المرضية والبيئية المأخوذة في الدراسة.

نوع العينة	مسحات الحروق	مسحات الجروح	مسحات الأذن	عينات الادرار	عينات التليف الكيسي	عينات المياه	عينات التربة
العدد	30	31	20	21	4	20	18
المجموع	144						

Antimicrobial Susceptibility Test فحص حساسية البكتريا تجاه المضادات الحيوية

أجري فحص الحساسية لجميع العزلات البكتيرية واستعملت طريقة Kirby Bauer المذكورة من لدن (**Grigore *et al*., 2010**) للتعرف على مدى حساسية العزلات البكتيرية التي حصلنا عليها، وقد استعملت مجموعة من أقراص

المضادات الحيوية وهي Tetracycline, Amoxicillin ,Erythromycin Cefixime, Cefotaxime, Ciprofloxacin ,)Methicillin, Cloxacillin , Meropenem , Naidixic acid , Impienem، استعمل المضاد Methicillin بسبب انتقال مقاومته من البكتريا Gve^{+} الى البكتريا Gve^{+})، اذ تم تحضير عالق لخلايا الاحياء المجهريه المنشطة بعد تشخيصها ونشر بوساطة مسحة قطنية معقمة على وسط Muller-Hinton Agar بطريقة التخطيط ثم ترك الطبق لمدة 15دقيقه لجفاف المزروع وزرعت الاقراص على الوسط الزرعي بمعدل 5-4 اقراص لكل طبق وحضنت بدرجة حراره 37م لمدة 24 ساعة ثم قياس قطر منطقة تثبيط النمو حول كل قرص وعدت البكتيريا حساسة S او مقاومه R حسب المواصفات القياسية الواردة في CLSI, 2013 .

جمع وتحضير نبات الزعتر البري Collection and Preparation the *Thymus vulgaris*

تم الحصول على نبات الزعتر البري من قضاء الرطبة (محافظة الانبار) بصورة طازجة (Fresh) بتاريخ 2017/6/20 ثم شخص من قبل الدكتورة سكينة عباس عليوي في معشب كلية العلوم جامعة بغداد، غسل النبات بالماء المقطر لإزالة الاتربة الملتصقة به ثم جفف على الشمس، بعدها اخذ 50 غم من اوراق النبات وطحنت باستعمال مطحنة كهربائية صغيرة Electric Grinder لغرض الحصول على مسحوق ناعم حفظ المسحوق في اكياس بلاستيكية نظيفة تم تعليمها باسم النبات وتاريخ الجمع ثم حفظت في مكان مظلم بعيد عن الرطوبة.

تحضير المستخلص الكحولي لنبات الزعتر البري

Preparation the alcoholic Extract of *Thymus vulgaris*

تم وزن 50 غم من المسحوق النباتي الجاف لأوراق نبات الزعتر البري واضيف اليه 500 مللتر من كحول الميثانول methanol بتركيز 99% ثم ترك في جهاز الاستخلاص المستمر(Soxhlet device) لمدة 12 ساعة ، بعد ذلك تم التخلص من الكحول عن طريق وضع الاطباق في الحاضنة بدرجة حرارة 40م لمدة خمسة ايام لحين جفافه بصورة كاملة، بعد ذلك حضر المحلول الخزين عن طريق اذابة 4غم من مسحوق المستخلص في 10 مللتر من Dimethyl Sulfoxide (DMSO) للحصول على تركيز 400 ملغم/مل ثم تعقيمه بالترشيح باستخدام اوراق ترشيح Filter papers (قطر 0.22 مايكرومتر) وحفظ في قناني زجاجية نظيفة ومعقمة لحين الاستعمال.

تحديد التركيز المثبط الأدنى Determination of minimum inhibitor concentration (MIC)

استعملت طريقة الانتشار بالأقراص Disc diffusion method وبحسب طريقة (**Baydar ,2004**)، حضرت سلسلة تخافيف من المحلول الخزين المحضر بتركيز 400 ملغم/مللتر بعد اذابته مع المذيب العضوي Dimethyl Sulfoxide اذ خفف الى التراكيز التالية، (100، 75، 50، 25، 15، 10) ملغم/مللتر باستعمال قانون التخفيف C1V1=C2V2 ثم حضرت الاقراص من ورق الترشيح نوع Whatmman No. 1 باستخدام ثاقبة ورق بقطر 6 ملم وعقمت بجهاز المؤصدة، ثم غمرت تلك الاقراص مع هذه التخافيف المحضرة، باستعمال ماسحة قطنـية تم نشر 100مايكرولتر من عالق البكتريا *P. aeruginos* على وسط Muller-Hinton agar بالاتجاهات كلها للحصول على نمو متجانس، مع استعمال المذيب العضوي Dimethyl Sulfoxide كعينة سيطرة سالبة للمقارنة (Control)، وباستعمال ملقط معقم نقلت تلك الاقراص الى الوسط الزرعي ثم حضنت الاطباق في الحاضنة بدرجـة 37م لمدة 24 ساعـة، بعدها يتم قياس قطر التثبيط باستعمال مسطرة مدرجة حيث اقل قطر تثبيطي هو ال MIC.

اختبار فعالية مستخلص نبات الزعتر البري على بكتريا الزوائف الزنجارية

Antimicrobial activity of *Thymus vulgaris* against *P. aeruginosa*

استعملت طريقة الانتشار بالأقراص Disc diffusion method اذ استعملت هذه الطريقة للتحري عن تأثير المستخلص الكحولي لأوراق نبات الزعتر البري في تثبيط نمو بكتريا الزوائف الزنجارية *P. aeruginosa* اذ اعتمد التركيز المثبط الادنى (MIC) اذا نشر جزء من الزرع البكتيري باستعمال مسحة قطنية معقمة على وسط مولر– هنتون اكار Muller-Hinton agar بشكل متعامد ومتجانس بعد تدوير الطبق ليتوزع العالق البكتيري بشكل متساوي ثم تركت الاطباق لتجف في درجة حرارة الغرفة لمدة 10 دقائق، حضرت اقراص من ورق ترشيح نوع Whatmman No. 1 باستعمال ثاقبة ورق بقطر 6 ملم وعقمت بجهاز المؤصدة، غمرت هذه الاقراص مع المستخلص النباتي (MIC) باستعمال ملقط معقم. وضعت الاقراص المغمورة بالمستخلص النباتي على الاطباق وبمعدل قرص واحد لكل طبق وبمعدل ثلاث مكررات مع استعمال قرص مشرب بالماء المقطر استخدم كسيطرة سالبة (Control)، حضنت الاطباق عند درجة حرارة 37م ولمدة 24 ساعة، بعد الحض تم قياس قطر منطقة التثبيط حول كل قرص بالملمتر بوساطة مسطرة مدرجة.

اختبار فعالية مستخلص نبات الزعتر البري في تثبيط الغشاء الحيوي

Determination the activity of *Thymus vulgaris* for inhibition of Biofilm Production

بعد تحديد التركيز المثبط الادنى MIC للمستخلص النباتي، استخدم تحت التركيز المثبط الأدنى Sub mic لدراسة تأثير المستخلص الكحولي لنبات الزعتر البري في انتاج الغشاء الحيوي استعملت طريقة صفيحة المعايرة الدقيقةMicro Titer Plate (MTP)، بواسطة ماصة دقيقة Micro pipette نقل 100 مايكروليتر من العالق الجرثومي لبكتريا *P. aeruginosa* كثافته (10^8) بعد مطابقته مع Mac flarand لكل العزلات الى حفر صفيحة مسطحة مصنوعة من مادة Polystyrene مكونة من 96 حفرة، ثم اخذ 100 مايكرولتر من التركيز تحت التركيز المثبط الادنى (Sub MIC) واضافته الى حفر الصفيحة التي تحتوي العالق الجرثومي مع معاملة سيطرة الذي هو عبارة عن وسط زرعي من دون بكتريا (100مايكرولتر وسط زرعي بدون بكتريا و 100 مايكرولتر ماء مقطر معقم)، وحضنت الاطباق بدرجة حرارة 37م لمدة 24 ساعة، بعد مدة الحضن، غسلت كل الحفر بمحلول دارئ الفوسفات الملحي phosphate buffer (saline) ذي اس هيدروجيني مقداره 7.2 للتخلص من الخلايا البكتيرية غير الملتصقة، ثم صبغت بصبغة البنفسج البلوري (Crystal violet) تركيزه 0,1% لمدة 5 دقائق.

غسلت الحفر بالماء المقطر لأزاله الصبغة الزائدة كررت العملية ثلاث مرات ،ثم تركت الاطباق لتجف , اضيف 200 مايكرولتر من كحول الميثانول 95% إلى الحفر وقيس طيف الامتصاص إلى الحفر وقيس طيف الامتصاص (OD) ((Optical dencity) للخلايا البكتيرية الملتصقة والمصبغة بوساطة جهاز قارئ الأليزا (ELISA reader) بطول موجي 630 نانومتر قدرت درجة تكوين الغشاء الحيوي بحسب المعادلة الاتية:

قدرة تكوين الغشاء الحيوي = طيف الامتصاص لنموذج الاختبار– طيف الامتصاص لمعاملة السيطرة.

اختبار الفعل التأزري للمضادات الحياتية بوجود المستخلص النباتي

Determination synergism effect of antibiotics in presence plant extract

بعد اجراء اختبار حساسية البكتريا للمضادات الحياتية، تم اختيار 8 انواع من المضادات الحياتية وهي Cefixim**,** Cefotaxime, Tetracycline, Amoxicillin, Erythromycin, Methicillin, Cloxacillin and) Naldixic acid**)** التي قاومتها البكتريا لاختبار فعاليتها بوجود المستخلص الكحولي لنبات الزعتر البري نشر جزء من الزرع البكتيري باستعمال مسحة قطنية معقمة على وسط اكار مولر–هنتون Muller-Hinton agar بشكل متجانس بعد تدوير الطبق ليتوزع العالق البكتيري بشكل متساوي، ثم تركت الاطباق لتجف بدرجة حرارة الغرفة لمدة 10 دقائق، نقلت اقراص المضادات الحياتية المراد اختبارها باستخدام ملقط معقم وغمرة في المستخلص النباتي الذي اعطى تركيز مثبط ادنى (MIC) وبحسب طريقة (**Baydar (2004**، بعدها وضعت تلك الاقراص على الطبق الزرعي وبمعدل ثلاث مكررات لكل عزلة مع الضغط وبلطف على كل قرص باستعمال ملقط معقم وحضنت عند درجة حرارة 37م لمدة 24 ساعة، بعد الحضن تم قياس قطر منطقة التثبيط حول كل قرص بالمليمتر بوساطة مسطرة مدرجة.

النتائج والمناقشة RESULTS AND DISCUSSION

العزل والتشخيص Isolation and Identification

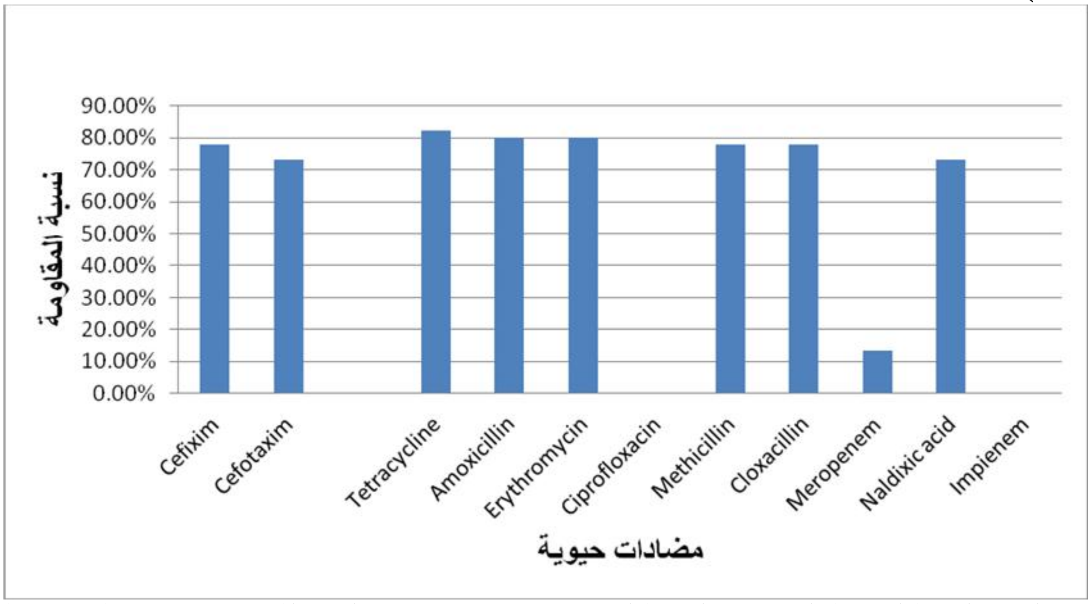
بعد ان تم جمع العينات خلال مدة لا تتجاوز الساعة زُرعت النماذج باستعمال الناقل Loop بطريقة التخطيط على وسط آكار الماكونكي الصلب ثم حضنت الأطباق في الحاضنة بدرجة حرارة 37م ولمدة (24) ساعة، وبعد مدة الحضن قرأت، النتائج أذ تكون بكتريا *P. aeruginosa* تكون غير مخمرة لسكر اللاكتوز، ثم نُقيت هذه المستعمرات أكثر من مرة للحصول على عزلات نقية لغرض التشخيص التأكيدي للزوائف الزنجارية، اوضحت نتائج التشخيص المجهري والكيموحيوي المتمثلة في اختبار الاوكسديز والكتاليز واختبار الحركة واختبار انتاج الصبغات أن هناك 45 عزلـــة بكتيرية تعود الى بكتريـا *P. aeruginosa* وبواقع 39 عزلة سريرية و 6 عزلة بيئية عائدة الى بكتريا *P. aeruginosa* (جدول، 2**)**.

جدول (2): توزيع بكتريا *P. aeruginosa* في نماذج الحالات السريرية والبيئية.

التسلسل	مصدر عزلة العينة	عدد النماذج	العينات الموجبة	النسبة المئوية %
1	مسحات الحروق	30	15	%50
2	مسحات الجروح	31	13	%41.93
3	مسحات التهاب الاذن	20	5	%25
4	التليف الكيسي	4	4	%100
5	عينات الادرار	21	2	%9.52
6	عينات التربة	18	2	%11.11
7	عينات المياه	20	4	%20
المجموع		144	45	%31.25

اختبار الحساسية تجاه المضادات الحياتية Antimicrobial Susceptibility Test

أجري فحص الحساسية لجميع العزلات البكتيرية المنتخبة والبالغ عددها 45 عزلة تجاه 11مضادا حيويا بطريقة الانتشار على الاطباق (Disc diffusion method) (الشكل، 1) وتم تحديد مقاومة هذه العزلات للمضادات الحيوية اذا بينت النتائج ان نسبة المقاومة كانت 77.7% للمضاد Cefixim بينما كانت نسبة المقاومة للمضادات Cefotaxim و Tetracycline 73.3 و 84.4% على التوالي في حين كانت نسبة المقاومة للمضادات Amoxicillin، Erythromycin، Methicillin، Cloxacillin و Naldixic acid 82.2 و 80 و 77.7 و 77.7 و 73.3% على التوالي، في حين ابدت اغلبية العزلات حساسية عالية للمضاد Meropenem ومقدارها 13.3 %، ويعزى سبب مقاومة بكتريا *P. aeruginosa* الى قدرة البكتيريا على التقليل من نفاذية الغشاء الخلوي او تغير الموقع الهدف من خلال بناء بروتينات اضافيه ذات الفه قليله جدا للمضادات وايضا قدرتها من تخليق انزيمات البيتا لاكتميز التي تثبط عمل المضاد (**Kalemba & Kunicke, 2003**).



شكل (1): النسب المئوية لمقاومة المضادات الحيوية لبكتريا *P. aeruginosa* المعزولة من مصادر بيئية وسريرية.

تحديد التركيز المثبط الأدنى Determination of minimum inhibitor concentration (MIC)

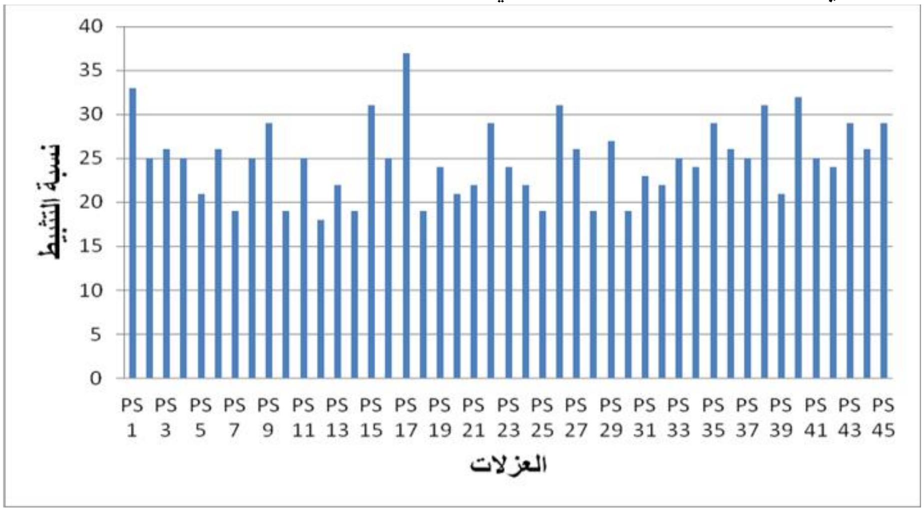
حضرت سلسلة تخافيف من المحلول الخزين (400 ملغم/مللتر) اذ تدرجة التخافيف بتراكيز (150، 100، 75، 50، 25، 15، 10) ملغم/مللتر باستعمال قانون التخفيف C1V1=C2V2، ثم حضرت الاقراص من ورق الترشيح نوع Whatmman No. 1 باستخدام ثاقبة ورق بقطر 6 ملم وعقمت بجهاز المؤصدة، ثم غمرت تلك الاقراص مع هذه التخافيف المحضرة، باستعمال ماسحة قطنـــية تم نشر 100مايكروليتر من عالق البكتريا (مللتر/عكرة 10^8) والذي تم الحصول عليه بالمقارنة مع انبوبة مكفرلاند القياسية 0.5 standard (MacFarland tube) على وسط Muller-Hinton agar بالاتجاهات كلها للحصول على نمو متجانس، مع استعمال المذيب العضوي DMSO كعينة سيطرة سالبة للمقارنة (Control)، وباستعمال ملقط معقم نقلت تلك الاقراص الى الوسط الزرعي ثم حضنت الاطباق في الحاضنة بدرجة 37م لمدة 24 ساعــة، بعدها يتم قياس قطر التثبيط باستعمال مسطرة مدرجة، اذ اظهرت النتائج ان التركيز 15هو الذي اعطى اقل قطر تثبيطي (MIC) واستعمل هذا التركيز لبقية التجارب لدراسة تأثيره على عوامل ضراوة بكتريا *P. aeruginosa* .

اختبار فعالية مستخلص نبات الزعتر البري على بكتريا الزوائف الزنجارية

Antimicrobial activity of *Thymus vulgaris* against *P. aeruginosa*

اعتمد التركيز المثبط الادنى (MIC) لدراسة تأثير مستخلص نبات الزعتر البري في تثبيط بكتريا الزوائف الزنجارية، اظهرت النتائج تأثير واضح لمستخلص نبات الزعتر البري في تثبيط بكتريا *P. aeruginosa* كما مبين في (الشكل، 2)، تعود فعالية الزعتر البري في تثبيط البكتريا الى احتوائه على مركبات تؤثر في نمو البكتريا الممرضة كالمركبات الفينولية التي تتكون من 40% من الثايمول و3.6% من الكارفكول اضافة الى الفلافونيدات ومواد عفصية التي تتميز بفعاليتها تجاه البكتريا الممرضة السالبة والموجبة لصبغة كرام (**Janssen *et al.*,1987**)، اذ تعمل المركبات الفينولية على تثبيط الانزيمات المسؤولة عن التفاعلات الأساسية بتداخلها مع البروتينات مما يؤدي الى مسخ البروتين ومن ثم عدم قدرة البكتريا على الاستمرار او البقاء ، فضلا عن ذلك قدرة المركبين (الثايمول والكارفكول) على تحليل غشاء الخلية

البكتيرية وبالتالي خروج المواد الخلوية خارج الخلية البكتيرية ومن ثم موت الخلية البكتيرية (**Marino *et al*., 2001**) وقد اكد ذلك الباحث **Mohammed (2007)** خلال دراسته على مستخلص نبات الزعتر البري كمضادة ميكروبي تجاه عدد من البكتريا الممرضة الذي اوضح بان سمية هذه المركبات تجاه البكتريا يعود الى عمل ثقوب في الغشاء البلازمي للخلية البكتيرية مما يؤدي الى فقدان الغشاء وظيفته وبالتالي موت الخلية البكتيرية.

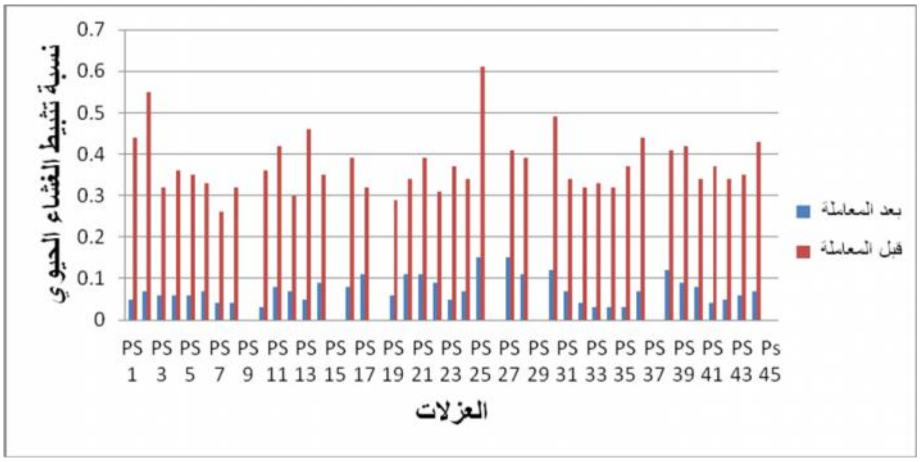


شكل (2): تأثير المستخلص الكحولي لنبات الزعتر البري تجاه بكتريا *P. aeruginosa* المعزولة من عينات سريرية وبيئية.

اختبار فعالية مستخلص نبات الزعتر البري في تثبيط الغشاء الحيوي

Determination the activity of *Thymus vulgaris* for inhibition of Biofilm Production

بعد تحديد التركيز المثبط الادنى MIC للمستخلص النباتي، استعمل تحت التركيز المثبط الأدنى Sub mic لدراسة تأثير المستخلص الكحولي لنبات الزعتر البري في انتاج الغشاء الحيوي لجميع العزلات قيد الدراسة استخدمت طريقة صفيحة المعايرة الدقيقة Micro Titer Plate (MTP)، اظهرت النتائج كفأت مستخلص نبات الزعتر البري في تثبيط الغشاء الحيوي لبكتريا كانت اعلى فعالية تثبيط لمستخلص الزعتر البري ضد العزلة PS 11، PS 33، PS 34، PS35 بلغت 0.03 على التوالي، بينما أوطأ فعالية تثبيط كانت ضد العزلة PS 25، PS 27 بلغت 0.15 على التوالي *P. aeruginosa* كما مبين في(الشكل، 4).



شكل (4): فعالية المستخلص الكحولي لنبات الزعتر البري في تثبيط الغشاء الحيوي لبكتريا *P. aeruginosa*

اتفقت نتائج الدراسة الحالية (حيث تراوحت قيم التثبيط بين 0.03 - 0.15) مع العديد من الدراسات حول دور مستخلص نبات الزعتر البري في تثبيط الغشاء الحيوي كالدراسة التي اجراها الباحث (**Al-Shuneigat (2014** حول استخدام مستخلص الزعتر في تثبيط عملية الالتصاق لبكتريا *P. aeruginosa* على الخلايا الطلائية البولية حيث وجدت من خلال دراسته بان مستخلص نبات الزعتر ذو فعالية في تثبيط الغشاء الحيوي، فعالية مستخلص نبات الزعتر البري تعود الى المحتوى العالي من مادة thymol التي تتكون من مجموعة phenolic hydroxyl group التي تعتبر مضادة ميكروبي فضلا عن احتوائه على مادة Carvacrol التي تعمل على تغير نفاذية الغشاء البلازمي للبكتريا وتحلله (**Fayad *et al* ., 2013**)، كما ان العديد من النباتات العطرية وبالخصوص *Thymus vulgaris.* تعد ذا تأثير جيد ضد جرثومة *P. aeruginosa* ، وفي السنوات الاخيرة كثفت البحوث حول استعمال الزعتر البري لفعاليته كمضادات ميكروبية فمعظم مكونات الزيوت التي درست كانت لها فعالية ضد الميكروبات فالمركبات الاساسية Thymol, Carvacrol, Linalool and Eugenol لمعظم الزيوت الاساسية النباتية تبين بانها تمتلك طيف واسع من الفعالية ضد الميكروبات، ومنها ما هو قاتل للبكتريا او مثبط حسب التركيز المستعمل. آلية بانها تدخل الخلية وتتداخل مع عملية الايض الخلوية Cellular Metabolism فيما بينت دراسات اخرى بان الفينولات ومنها Carvacrol and Eugenol تزعزع (Disturb) الغشاء الخلوي وتصل الى الموقع الفعال في الانزيم (**Guynot *et al*., 2003**).

اختبار الفعل التأزري للمضادات الحياتية بوجود المستخلص النباتي

Determination synergism effect of antibiotics in presence plant extract

في هذه التجربة تم اختيار ثمانية انواع من المضادة التي قاومتها بكتريا *P. aeruginosa* واختبار فعاليتها بوجود المستخلص الكحولي لنبات الزعتر البري بتركيز (15ملغم/ مللتر) الذي اعطى اقل تركيز مثبط ادنى (MIC) تجاه بكتريا *P. aeruginosa* المضادات المستعملة هي Cefixim، Cefotaxim، Tetracycline، Amoxicillin، Erythromycin، Methicillin، Cloxacillin و Naldixic acid. اظهرت النتائج ان بكتريا *P. aeruginosa* زادت حساسيتها للمضادات الحيوية المستخدمة بوجود المواد الفعالة للمستخلص النباتي اي حصول حالة تآزر Synergism او ما يسمى الفعل المشترك بين المضادات الحيوية والمستخلص النباتي كما في (الجدول ، 3) .

جدول (3) : اقطار مناطق التثبيط للمضادات الحيوية بصورة منفردة ومع للمستخلص الكحولي لنبات الزعتر البري تجاه بكتريا *P. aeruginosa*

No	CFM	TE	CTX	AMC	CX	NA	ME	E
PS 1	34	33	28	24	26	32	25	26
PS 2	43	41	33	25	26	43	28	29
PS 3	39	43	31	27	22	24	23	20
PS 4	30	30	23	23	24	29	20	26
PS 5	23	33	23	25	22	20	28	25
PS 6	31	30	27	20	27	29	25	22
PS 7	20	20	24	27	26	19	28	27
PS 8	24	24	22	26	25	25	22	22
PS 9	30	29	26	22	25	29	21	27
PS 10	19	28	29	29	23	20	20	23
PS 11	24	27	25	26	21	25	25	20
PS 12	50	33	23	26	23	51	20	27
PS 13	21	25	23	22	23	22	21	23
PS 14	40	53	23	29	22	52	25	20
PS 15	33	31	26	26	21	32	22	21
PS 16	30	29	24	28	29	31	22	26
PS 17	51	52	27	28	22	51	25	26
PS 18	27	26	24	23	20	32	24	26
PS 19	24	25	24	21	21	24	24	26
PS 20	22	23	25	22	27	22	24	27
PS 21	21	25	26	24	25	22	25	25
PS 22	30	20	22	27	30	25	29	27
PS 23	23	25	25	29	27	24	25	24
PS 24	21	26	24	24	22	23	18	22
PS 25	20	21	23	21	26	20	22	25
PS 26	33	34	20	26	22	33	21	23

PS 27	30	25	24	27	25	26	27	24
PS 28	19	23	22	24	26	19	28	23
PS 29	33	32	27	23	25	32	24	21
PS 30	19	21	23	18	25	19	20	18
PS 31	25	24	21	32	25	25	21	26
PS 32	24	23	20	25	24	22	27	19
PS 33	25	24	24	26	24	23	23	27
PS 34	26	25	26	24	25	25	22	23
PS 35	30	29	26	28	21	29	25	22
PS 36	28	24	25	26	25	26	27	25
PS 37	22	29	27	24	21	25	25	22
PS 38	30	32	29	28	26	31	21	21
PS 39	22	23	24	26	21	22	25	24
PS 40	30	24	23	24	22	27	24	25
PS 41	33	32	28	21	27	32	21	26
PS 42	21	27	25	26	24	25	23	25
PS 43	30	29	28	25	21	30	27	24
PS 44	24	31	25	26	23	26	25	21
PS 45	28	32	24	23	26	30	26	26

Cefixim (CFM) , Cefotaxime (CTX) , Tetracycline (TE) , Amoxicillin (AMC) , Erythromycin (E), Methicillin (ME) , Cloxacillin (CX) and Naldixic acid (NA)

اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع اغلب الدراسات المحلية والعالمية كالدراسة الدي اجرها الباحث **Bassole & Juliani (2012**) الذي وجد ان مستخلص نبات الزعتر اعطى فعلا تآزري مع المضادات الحيوية تجاه البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام، اكدت العديد من الدراسات ان للمركبات النباتية فعلا تآزريا مع المضادات الحيوية حتى ضد بعض الانواع المقاومة للمضادات الحيوية وهذه الفعالية توصف احيانا بانها فعالية تحويرية او تعديلية للمقاومة resistance modifying/modulating activity فالمركبات النباتية تغير من نسبة تدفق المضاد الى داخل الخلية اذ ان المقاومة البكتيرية لأغلب المضادات الحياتية تأتي عملية طرح المضاد او تفريغه خارج الخلية بعملية Antibiotic efflux وبعملية مسيطر عليها وراثيا، وانظمة الطرح efflux systems هذه عبارة عن بروتينات غير متخصصة بنوع معين من الادوية non-drug-specific proteins بإمكانها تمييز وضخ طيف واسع من المواد الكيميائية غير المرغوبة بدون تغيير او تحطيم للمركب، وهذه العملية تقلل من تركيز العقار داخل الخلية الى مستوى غير ضار بها وبالتالي فان قيمة MIC لذلك العقار ستكون اعلى بكثير من المتوقع، وهذا النظام يسمى Multi-drug resistance efflux pumps ويرمز لو MDR ويوجد في البكتيريا الموجبة والسالبة ويشفر لو اما كروموسوميا او بلازميديا . في البكتيريا السالبة لصبغة كرام، فضلا عن وجود هذا النظام فان عملية نفاذ او دخول العقار الى داخل الخلية محدودة بسبب الغشاء ثنائي الطبقة المحيط بها والمسئول عن المقاومة الذاتية والمكتسبة الملاحظة في هذه المجموعة من البكتيريا، وقد وجد في دراسات حديثة ان بعض النباتات تنتج مواد مثبطة لعمل هذه المضخات(Efflux Pump Inhibitors) فضلا عن المركب الفعال، مما يسهل دخول المادة الفعالة الى داخل البكتريا الموجبة والسالبة حتى مع وجود تلك الانظمة الدفاعية .لذلك هناك ادلة على امكانية استخدام المستخلصات النباتية لزيادة حساسية البكتيريا للمضادات الحياتية خاصة تلك المقاومة لها (**Sibanda & Okoh, 2007**) .

المصادر REFERENCES:

I. AL- Obaidi, F. N. K., Al-Noor, O. H. S. T. H. & Ezzat, M. O. (2013). Water and alcohol extraction of thyme plant (*Thymus vulgaris*) and activity study against bacteria, tumors and used as anti-oxidant in margarine manufacture. *Innovative Systems Design and Engineering*, 4(1): 41-51.

II. Al-Shuneigat, J. M., Al-Tarawneh, I. N., Al-Qudah, M. A., Al- Sarayreh, S. A., Al-Saraireh, Y. M. & Al-Shurafa, K. (2014). Chemical composition and antibacterial properties of *Ruta graveolens* L. essential oil grown in northern Jordan. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 8(2): 139-143.

III. Bassole, I. H. N. & Juliani, H. R. (2012). Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*, 17: 3989-4006.

IV. Baydar, H., Sagdic, O., Ozkan, G. & Karadogan, T. (2004). Antibacterial activity and composition of essential oils from oiganum, thymbra and satureja species with commercial importance in Turkey. *Food Control*, 15: 169-172.

V. CLSI. (2016). *Performance Standard for Antimicrobial Susceptibility Testing.* Twenty-SIX Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute.

VI. Dorman, H. J. D. & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88: 308-316.

VII. Grigore**,** A. P., Colceru-mihul, I. N. A., Bubueanu, S., Draghici, C. E. & Ichim, M. (2010). Chemical composition and antioxidant activity of *Thymus vulgaris* L. volatile oil obtained by two different methods. *Romanian Biotechnological Letters*, 15(4): 5436-5443.

VIII. Guynot, M. E., Ramos, A. J., Setó, L., Purroy, P., Sanchis, V. & Marín, S. (2003). Antifungal activity of volatile compounds generated by essential oils against fungi commonly causing deterioration of bakery products. *Journal of Applied Microbiology*, 94: 893-899.

IX. Janssen, A. M., Scheffer, J. J. C. & Baerheim, S. A. (1987). Antibacterial activity of essential oils: A1976-1986 literature review. Aspects of the test methods. *Pland Medical*, 53: 395-398.

X. Kalemba, D. & Kunicke, A. (2003). Antibacterial and antifungal Properties of Essential Oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10: 813-829.

XI. Martins, A. P., Salgueiro, L. & Concalves, M. J. (2001). Essential oil compostion and antimicrobial activity of three zingiberaceae from S. Tome principle. *Planta Med*., 67: 580-584.

XII. Mehrgan, H. F., Mojab, S. P. & Poursaeed, M. (2008). Antibacterial activity of *Thymus pubescens* methanolic extract. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 7(4): 291-295.

XIII. Mohammed, M. (2007). Evalution of antibacterial activity of selected Iranian essential oil against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in nutrient broth medium. *Pakstan Journal of Biology Sciences*, 10: 3693-3697.

XIV. Rhee, G., J. & Kim, E., H. (1999). Activities of ketonic fraction from leptospermum scoparum alone and synergism in combination with some antibiotics against various combination with some antibiotics against bacterial strains and fungi. *Yakhak Hoeji*, 43: 716-728.

XV. Salman, M. T., Khan, R. A. & Shukla, I. (2008). Antimicrobial activity of *Nigella sativa* L. Seed oil against multi drug resistant bacteria from clinical isolates. *Natural Product Radiance*, 4(l): 10-14.

XVI. Sibanda, T. & Okoh, A. I. (2007). The challenges of overcoming antibiotic resistance: plant extracts as potential sources of antimicrobial and resistance modifying agents. *African Journal of Biotechnology*, 6(25): 2886-2896.