# الفعالية التثبيطية لمركب الاوجينول المنقى من الزيت الطيار لأزهار نبات القرنفل ضد بعض العزلات البكتيرية الملوثة للحم المفروم

لبيب احمد كاظم الزبيدي

سهى محمد إبراهيم

وزارة العلوم والتكنولوجيا/ دائرة البيئة والمياه .

صبا رياض خضير الطائي

الجامعة المستنصرية / كلية العلوم / قسم علوم الحياة

**الخلاصة:**

تضمن البحث إجراء كشف نوعي للمجاميع الفعالة في الزيت الطيار لأزهار نبات القرنفل المستحصل عليه من المركز الوطني للإعشاب الطبية، وأظهرت النتائج وجود جميع المجاميع الفعالة ما عدا الكلايكوسيدات والكومارينات، قدر المحتوى الفينولي الكلي للزيت الطيار فبلغ 95.3%. اجري الكشف الأولي على مركبات الزيت الطيار باستخدام تقنية كروموتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC)، وبلغ معدل الجريان (RF) 0.59 وتساوت مع النموذج القياسي للمقارنة، تمت التنقية والكشف الكمي والنوعي لمركبات الزيت الطيار باستخدام تقنية كروموتوغرافيا السائل العالي الأداء (High performance liquid chromatography-HPLC)، فأظهرت النتيجة وجود مركب الاوجينول بزمن حجز بلغ 11.517 بينما بلغ زمن حجز نموذج الاوجينول القياسي 11.373 مما يدل على نقاوة النموذج المستخلص فضلاً عن استخدام الأشعة تحت الحمراء بجهاز (Fourier Transform Infrared –FTIR) فأظهر المجاميع C=O ما بين (2800 - 3000) وهي منطقة البصمة الوراثية للمركب فضلاً عن ظهور الآصرة المزدوجة لذرة الكاربون عند نقطة 3003.17 والتي تطابقت مع النموذج القياسي فضلاً عن المناطق الأليفاتية والأروماتية والكحولات

والفينولات للمركب القياسي الذي قورن به النموذج المنقى. تم في هذا البحث ايضا دراسة الفعالية التثبيطية للاوجينول المنقى ضد بعض انواع البكتريا الملوثة لبيئة اللحوم وهي *Salmonella arizonae* و *Staphylococcus xylosus* والتي تم عزلها من اللحم المفروم المحلي، وكذلك تأثيره على العدد الكلي للبكتريا الهوائية ، فبلغ التركيز المثبط الأدنى (Minimum Inhibition Concentration-MIC) لمركب الاوجينول المنقى 0.025% في عزلة السالمونيلا والمكورات العنقودية بينما كان التركيز الأدنى القاتل للبكتريا (MBC- Minimum Bactericidal Concentration) للعدد الكلي للبكتريا الهوائية وبلغ تركيز 0.01% لمركب الاوجينول MBC لبقية العزلات ألمختبرة. أظهرت عزلة *S. xylosus* مقاومة لفعالية مركب الاوجينول المنقى أعلى من عزلة *Sal. arizonae*.

**الكلمات المفتاحية : الفعالية التثبيطية، الاوجينول المنقى، *Salmonella arizonae* ، *Staphylococcus xylosus* ، اللحم المفروم.**

## المقدمة:

يعد اللحم وسطاً مثاليا لنمو كثير من ألأحياء الدقيقة وذلك لتوفر الرطوبة والمركبات النتروجينية والعناصر الأساسية الأخرى وبعض الفيتامينات, فضلا عن سهولة تلوثه بمصادر التلوث المختلفة كالماء والهواء والتربة، لهذا توجد على اللحوم المفرومة أعداد من البكتريا أعلى مما تحويه القطع الكبيرة وذلك لان للحم المفروم مساحة سطحية كبيرة حيث تعطي فرصة اكبر للأحياء الدقيقة بالنمو نتيجة للمساحات الهوائية وتوفر الأوكسجين (الطائي،1987). ينتمي نبات القرنفل ***Dianthus Caryophyllus*** الى العائلة ***Myrtaceae***، حيث يزرع القرنفل في العديد من دول جنوب شرق اسيا منها الهند واندونيسيا وجنوب الصين (FAO, 1989). يحتوي نبات القرنفل على مركبات عديدة منها مركب الاوجينول (Eugenol) الذي يعتبر احد المركبات الأساسية لزيت القرنفل، الذي ينتج من براعم زهور نبات القرنفل حيث يحتوي على مركب الاوجينول، وخلات الاوجينول (4-allyl-2-methoxyphenol acetate)، caryophyllene، ونواتج ثانوية أخرى بنسبة 60 – 90 % (Kamel *et al.*, 2007). اكدت العديد من الدراسات امتلاكه فعالية مضادة للأكسدة (Singh and Goel, 2012) فضلا عن احتواء نبات القرنفل على العديد من المركبات الفعالة منها

Kaempferol وVanillic acid (Bhowmik *et al* ,2012) كذلك احتوائه على العديد من المجاميع الفعالة منها التانينات والصابونيات والقلويدات والفينولات وهو من التوابل العطرية المهمة التي تحتوي على المركبات الرئيسية الضرورية والمسؤولة عن نشاطات المضادة للميكروبات القوية (Kumar *et al.,* 2012 )، كما يمتلك فعالية مضادة للبكتريا والفطريات (Pandey and Singh, 2011;). يستخدم تقليدياً كمنكه ومواد مضادة للميكروبات في الغذاء. يعتبر مركب الاوجينول من مركبات فنيل بروبانية وهي واحدة من المجاميع الفنيل التي لها اهمية كبيرة في انتشار الرائحة العطرة للنبات ويمكن عزلها من الزيوت الطيارة والثابتة من انسجة النبات وعزل التربينات الطيارة التي هي دهون سالسيكية (الذائبة في الدهون) وهي مركبات فينولية طبيعية(Bhowmik *et al.,* 2012).لذا هدف بحثنا الى استخلاص وتنقية مركب الاوجينول من الزيت الطيار لازهار نبات القرنفل من خلال استخدام تقنيات كيمياوية للكشف والتنقية وبيولوجية لاختبار فعاليته التثبيطية في العزلات البكتيرية الملوثة للحم المفروم خارج الجسم الحي (*In vitro*).

**المواد وطرائق العمل:**

**المحاليل والكواشف :**

حضرت المحاليل والكواشف (reagents) لفحوص الكاتاليز والاوكسيديز والكوفاكس والمثيل الأحمر حسب الطريقة التي ذكرها Harely and Prescott (1996)، بينما حضرت الكواشف بندكت (Benedect) ومايير (Mayer) وواكنر(Wagner) و فهلنك (Fehling) حسب ما ورد في Smolensk *et al.* (1972)، وحضر كاشف فوكس بروسكاور(Voges–Proskauer reagent) فضلا عن المحلول الملحي الفسيولوجي (Physiological Saline Solution) والمحاليل (1% كلوريد الحديديك (1% Ferric Chloride) و1% خلات الرصاص (1% Lead Acetate) و1% كلوريد الزئبقيك حسب ما ذكره Atlas *et al.*(1995). حضر محلول ثابت العكرة القياسي– مكفرلاند (Mcfarland standard) وفق ماجاء في Baron & Finegold (1994).

**الأوساط الزرعية :**

حضرت الأوساط الزرعية حسب تعليمات الشركات المجهزة وضبط الرقم الهيدروجيني المناسب لها، ثم عقمت جميع الأوساط بالمؤصدة (Autoclave) عند درجة حرارة 121م (1.5 باوند/انج$^2$) مدة 15 دقيقة ماعدا الأوساط التي عقمت بالغليان وهي الأوساط (Tetrathionat Broth-TB و Xylose Lysine Desoxycholate Agar-XLD و Bismoth Sulfite Agar-BSA و Hektoen Enteric Agar-HEA).

**الزيت النباتي :**

تم الحصول على الزيت الطيار لأزهار نبات القرنفل من المركز الوطني للإعشاب الطبية وتم إجراء الكشف النوعي المجاميع الفعالة في الزيت الطيار لبراعم نبات القرنفل مركبات الزيت الطيار لنبات القرنفل واتبعت طريقة Shihata (1951) و Harborne (1973) لتقدير الرقم الهيدروجيني والكشف عن المجاميع الفعالة كما مبين في جدول (1).

جدول(1): طرق الكشف النوعي عن المجاميع الفعالة في الزيت الطيار لبراعم نبات القرنفل.

| مجاميع الفعالة | نوع الكاشف | نتيجة الكشف |
|---|---|---|
| القلويدات | 1- كاشف ماير<br>2- كاشف واكنر | راسب أبيض +<br>راسب بني + |
| التانينات | 1- خلات الرصاص 1%.<br>2- كلوريد الحديديك 1%. | راسب أبيض هلامي +<br>ظهور لون أخضر مزرق + |
| الراتنجات | كحول أثيلي في ماء مقطر مغلي + حامض HCL. | ظهور عكورة + |
| الصابونيات | 1- رج المستخلص.<br>2- كلوريد الزئبقيك. | رغوة كثيفة لمدة طويلة +<br>راسب أبيض + |
| الكومارينات | هيدروكسيد الصوديوم + ورق ترشيح + مصدر UV. | ظهور لون أصفر + |
| الفلافونات | كحول أثيلي +هيدروكسيد البوتاسيوم | لون أصفر + |
| الفينولات | كلوريد الحديديك 1% | لون أخضر مزرق + |
| تربينات | كلوروفورم+ حامض الخليك اللامائي+ حامض الكبريتيك المركز | ظهور لون بني (مباشرة) + |
| ستيرويدات | كلوروفورم + حامض الخليك اللامائي + حامض الكبريتيك المركز | ظهور لون أزرق غامق (فترة أطول) + |

تم تحديد المحتوى الفينولي الكلي في الزيت الطيار لأزهار نبات القرنفل (كحامض أوليك) بالاعتماد على الطريقة التي ذكرها Amin *et al.*(2006) باستخدام كاشف فولن (Folin-Ciocalteau reagent). استخدمت طريقة Harbone (1973) في الكشف وفصل مركبات الزيت الطيار لأزهار نبات القرنفل حيث أن الطور الثابت كانت ألواح هلام السيليكا بسمك 1 ملم، والطور المتحرك يتكون من *N*.Hexan - Chlolroform بنسبة (2:3) على الترتيب لتعطي بقع عند تعرضها للأشعة فوق البنفسجية بطول موجي 264 نانومتر بعد تجفيفها ويتم حساب معدل الجريان ( Rate flow- Rf) وقورنت النتائج مع Rf لمركب الاوجينول القياسي. استخدمت تقنية كروموتوكرافيا السائل عالي الأداء (High performance liquid chromatography-HPLC) لتنقية وتقدير كمي ونوعي لمركب الاوجينول، حيث تكون الطور المتحرك من محلول الاسيتونايتريت (Acetonitrit) وماء مقطر خال من الأيونات وبنسبة (60:40) على التوالي، مزجت جيداً للتخلص من الفقاعات الهوائية لتصبح جاهزة للاستخدام. أجريت عملية الفصل باستخدام العمود (C18)، بمعدل جريان 1.4 مليلتر/ دقيقة، وبطول موجي عند 210 نانوميتر. حقن 10 مايكرولتر من نموذج المستحصل من عملية القشط للبقع التي تساوى فيه معدل الهجرة مع معدل الهجرة للنموذج القياسي وبعد عملية الغسل النموذج المغسول. قورن زمن الاحتجاز لمركبات النموذج مع زمن احتجاز مركب الاوجينول القياسي . اجري الكشف عن حركيات ونوع الترابطات في مركب الاوجينول المنقى باستخدام تقنية المطياف بالأشعة تحت الحمراء مقارنة بمركب الاوجينول القياسي من اجل التأكد من نقاوة المركب وذلك بأخذ 0.3 مليلتر من النموذج ووضع بين قرصين من بروميد البوتاسيوم (KBr)، ووضعت في الحامل الخاص بتلك الأقراص، ووضعت في مسار شعاع الـــ(IR) في جهاز FT-IR (Shimadzu, Japan) وتم تحليل المخطط البياني لطيف الأشعة تحت الحمراء لنموذج المنفى مقارنة بالنموذج القياسي.

العزلات البكتيرية :

عزلت بكتريا السالمونيلا *Salmonella* spp. وذلك بنقل 1.0 مليلتر من التخفيف الأول للحم المفروم المحلي من خلال إضافة 10 غرام من اللحم مفروم الى90 مليلتر من المحلول المنظم الفسيولوجي(normal saline) من جهة والى وسط تتراثايونيت السائل من جهة أخرى، وحضن مدة (24+2) ساعة وبدرجة حرارة 37 م. نقل بعد ذلك الى الأوساط الزرعية (أكار زايلوز- لايسين- ديسوكسي كوليت وأكار البزموث-كبريتيد وأكار هكتون-انتيريك) وحضن مدة (48±2) ساعة وبدرجة حرارة37 م، ونقلت عدة مستعمرات من اللاتي أعطت نتيجة ايجابية في الأوساط الثلاث أنفة الذكر الى الأنابيب *الحاوية* على وسط (Triple Sugar Iron Agar-TSI) ووسط (Lysine Iron Agar-LIA) ثم حضنت الأنابيب مدة (48+2) ساعة و(24+2) ساعة على التوالي بدرجة حرارة 37م، وكذلك لوسط أكار اليوريا (Urea Agar- UA) حيث وضع في أنابيب اختبار بشكل مائل، وبعد أن لقح الوسط بالبكتريا الموجبة للوسط (TSI) حضنت الأنابيب بدرجة حرارة 37 م مدة (24±2) ساعة (Atlas *et al.*, 1995). استعملت أشرطة api20E لتأكيد تشخيص بكتريا السالمونيلا، بينما درست الصفات الشكلية للمستعمرات وخلايا بكتريا المكورات العنقودية، وأجريت الاختبارات الكيموحيوية (إنتاج إنزيم الكاتاليز، إنتاج إنزيم الأوكسيديز، تحلل الدم و تخمر سكر المانيتول) استناداً الى ما ذكره Holt *et al.*(2000). استعملت أشرطة api staph. لتأكيد تشخيص بكتريا المكورات العنقودية. اعتمدت طريقة تخفيف الاوجينول بالأكار مع الوسط الزرعي وحسب ما ذكرت في (Atlas *et al.*,1995) في دراسة الفعالية التثبيطية للمركب المنقى بتراكيز مختلفة في البكتريا المعزولة من اللحم المفروم المحلي وتحديد التأثير المثبط(MIC) والقاتل للبكتريا (MBC) لمركب الاوجينول المنقى في العزلة البكتيرية *Sal. arizonae* والعزلة البكتيرية *S. xylosus* والعدد الكلي للبكتريا الهوائية كل على انفراد والمعزولة من اللحم المفروم. حضرت تراكيز تصاعدية من المنقى (0.025, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2و 0.25,1, 1.5, 2 و2.5)% على التوالي وأضيفت الى الوسط الزرعي كل على انفراد، ولقحت الأوساط بالعزلات

البكتيرية أعلاه وحضنت بدرجة حرارة (37±2) و قدر التركيز المثبط الأدنى (MIC) على انه أقل تركيز لمسحوق أو مستخلص قلف الدارسين الذي أدى الى قتل البكتريا مقارنة مع السيطرة وقدر التركيز الأدنى لقتل البكتريا بالتركيز الذي أدى الى قتل البكتريا بنسبة 99.9% مقارنة مع السيطرة.

**التحليل الاحصائي :**

تم تحليل نتائج تأثير تراكيز المستخلصات المستخدمة في نمو الأحياء الدقيقة قيد الدراسة إحصائياً وقورنت الفروق المعنوية بين المعدلات باختبار أقل فرق معنوي (LSD) على مستوى احتمالية أقل من 0.05 باستخدام البرنامج الإحصائي SPSS. Ver.18 لتحليل البيانات.

**النتائج والمناقشة:**

تعد المجاميع الفعالة من النواتج الأيضية الثانوية التي لها أهمية دفاعية للنبات ضد الأحياء الدقيقة والحشرات، والتي يستفاد منها الإنسان في مجالات متعددة من الأغذية والأدوية وغيرها (Cowan, 1999). أظهرت نتائج الكشف النوعي للمجاميع الفعالة للزيت الطيار بوجود القلويدات، الراتنجات، الصابونينات، الفينولات، التانينات والفلافونات، التربنينات والستيرويدات فيما خلت من الكومارينات واتفقت هذه النتائج مع ما جاء به Sunil *et al.*, (2012).

جدول (2):المجاميع الفعالة في الزيت الطيار لأزهار نبات القرنفل.

| المادة | المجاميع الفعالة | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| الزيت الطيار لأزهار نبات القرنفل | فينولات | راتنجات | كلايكوسيدات | صابونيات | تانينات | فلافونات | كومارينات | تربينات وستيرويدات | قلويدات |
| | ++ | + | - | + | + | ++ | - | ++ | + |

- (+ ) النتيجة موجبة.
- (++) شدة ناتج التفاعل.
- (-) النتيجة سالبة.
- النتائج معدل لثلاث مكررات.

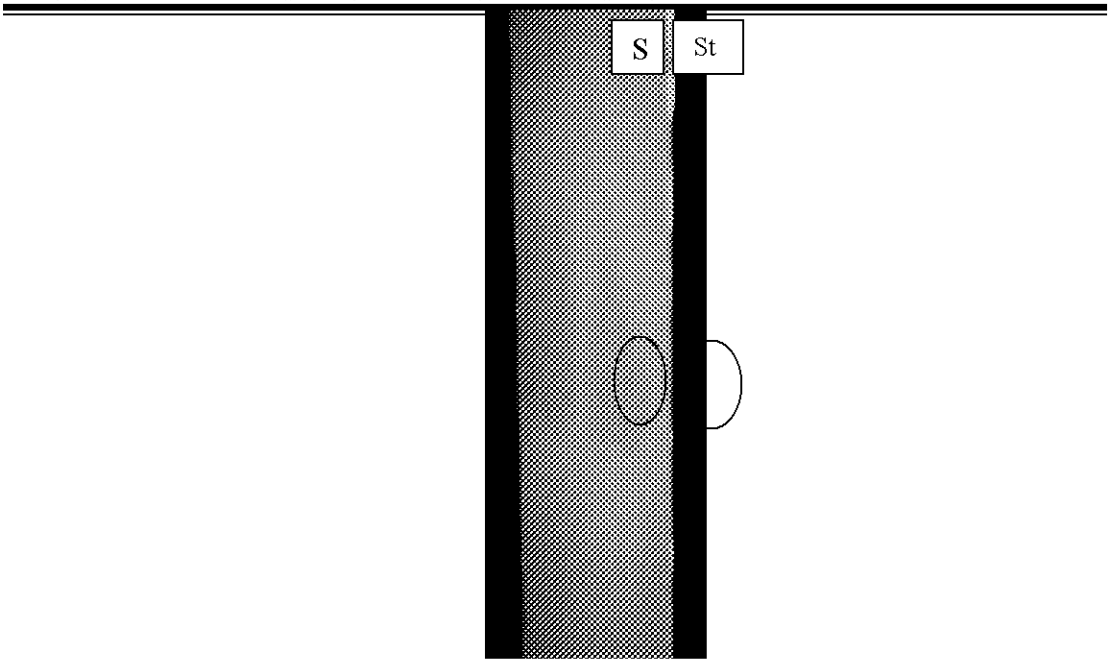
تباين احتواء العديد من النباتات والأعشاب الطبية على المجاميع الفعالة والذي ظهر نتيجة إجراء الفحوصات الكيموحيوية مع العديد من هذه النباتات، بينت دراسة الزبيدي وجماعته (2006) وجود مجاميع فعالة في المستخلص الزيتي لقلف الدارسين الصيني فيما خلت من التانينات والمركبات الفينولية، فيما كشفت عمران وآخرون (2011) عن المجاميع الفعالة في المستخلصين المائي والكحولي لنبات الجت فظهر احتواء المستخلص المائي على المجاميع الفعالة (الفلافونات، الصابونيات، الكلايكوسيدات، الفينولات، التربينات والستيرويدات، الراتنجات) باستثناء الكومارينات والقلويدات بينما لم يحتوي المستخلص الكحولي على الكومارينات فقط مع اختلاف المحتوى بين المستخلصين كماً ونوعاً.

يبين جدول (2 ) ان المحتوى الفينولي الكلي في للزيت الطيار لأزهار نبات القرنفل قد اظهر نسبة عالية بلغت 95.3% بينما وجد الزبيدي وآخرون (2011) إن المحتوى الفينولي الكلي لمستخلصات درنات نبات الكركم (المائية الساخنة، موجات فوق الصوتية، الكحولية والزيتية) قد اختلفت في محتواها من المجاميع الفعالة كما ونوعا.

جدول2: المحتوى الفينولي الكلي للزيت الطيار لأزهار نبات القرنفل.

| المادة | المحتوى الفينولي الكلي% |
|---|---|
| الزيت الطيار لأزهار نبات القرنفل | 95.3 |

استخدمت أوراق الطبقة الرقيقة وألواح هلام السيليكا P.64 وبسمك1ملم لكشف وفصل مركبات الزيت الطيار لأزهار نبات القرنفل حيث بلغ معدل الهجرة للمركبات (Rf) 0.59 للمركب الأعلى تركيزا في الزيت الطيار وبلون بني محمر ( Brown to red) عند نقطة الفصل مقارنة بنموذج الاوجينول القياسي الذي بلغ Rf له 0.59 مما يثبت الحصول على مركب الاوجينول بصورة نقية كما موضح بالشكل (1).

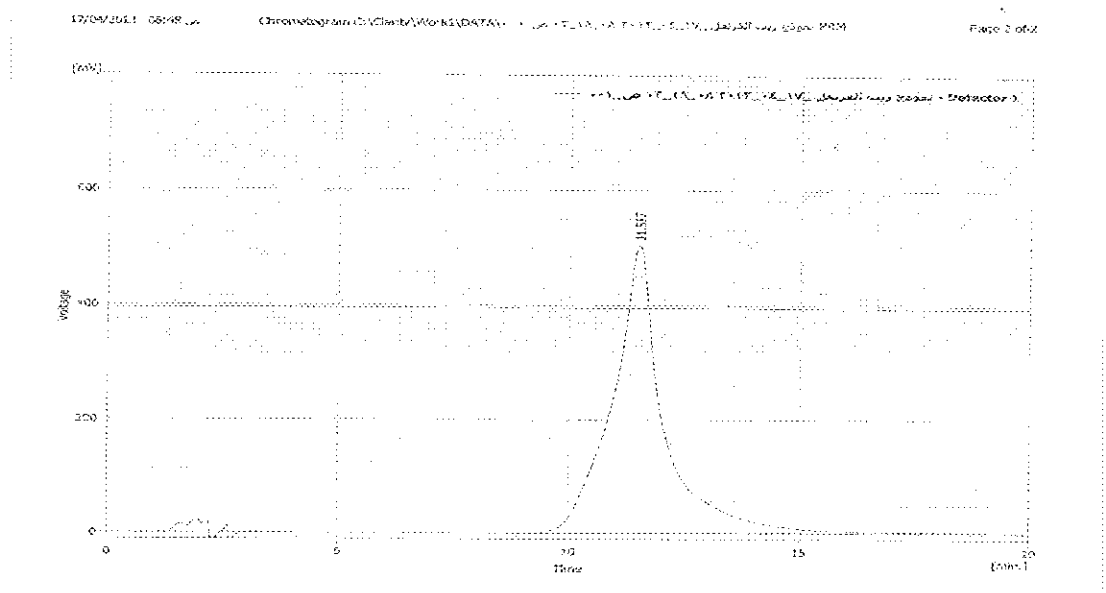



شكل (1) : ورق الطبقة الرقيقة للكشف عن الاوجينول المستخلص من براعم نبات القرنفل مقارنة بالنموذج النقي.

اتفقت هذه النتيجة مع Bhowmik *et al.*, (2012)، حيث أكد على أحتواء نبات القرنفل على الاوجينول (Eugenol). أخذت هذه المنطقة بعملية القشط واجري عيلها عملية التنقية والفحوصات التشخيصية كيمياوياً باستخدام تقنيات HPLC و FTIR. تم الحصول على زمن الحجز عند HPLC للنموذج زيت القرنفل بلغ (11.517) مقارنة بزمن النموذج النقي القياسي (11.373) ( شكل 2 وجدول 3). تتفق هذه النتيجة مع ما جاء به Rahimi (2012) حيث أكد احتواء نبات القرنفل على نسبة عالية من مركب الاوجينول.

**جدول (3) زمن الاحتجاز القياسي والتركيز لمركب الاوجينول المنقى باستخدام تقنية HPLC.**

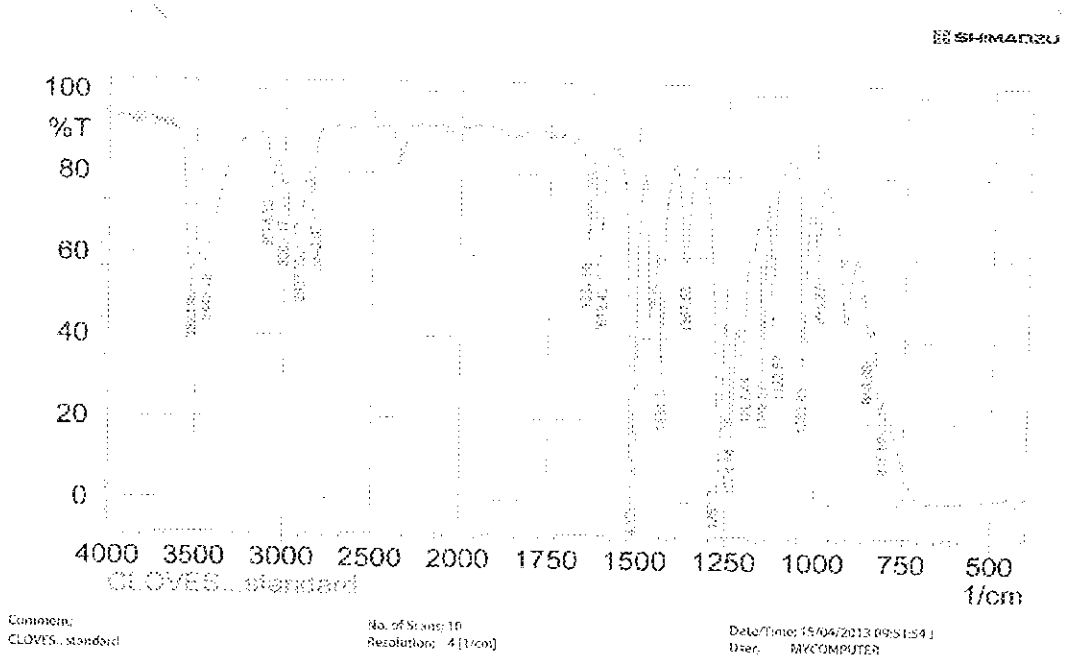
| Compound | Retention time (minute) | Area | Concentration (ppm) | Percentage % |
|---|---|---|---|---|
| Eugenol | 11.517 | 98729.248 | 1599.4 | 15.99 |



**شكل 2: مخطط كروماتوكراف السائل فائق الاداء (HPLC) للتنقية والكشف عن مركب الاوجينول في الزيت الطيار لأزهار نبات القرنفل عند طول موجي 210 نانوميتر.**

استخدمت تقنية FTIR في إكمال الفحوصات التشخيصية التي أثبتت حصول على المجاميع C=C bonded عند نقطة 2841.15 و 2916.37 و 2935.66 و 2956.87 في منطقة البصمة الوراثية والتي تعتبر منطقة الحركة الخاصة لكل مركب وتختلف عما موجود من المركبات الأخرى، فضلاً عن ظهور الآصرة المزدوجة لذرة الكاربون عند نقطة 3003.17 والتي تبينت مطابقتها مع النموذج القياسي فضلاً عن المناطق الأليفاتية والأروماتية (العطرية) ومنطقة الكحولات والفينولات للمركب القياسي الذي قورنت به النماذج المستخلصة من عملية التنقية. أظهر مركب الاوجينول المنقى معدل جريان 3522.02 والذي اظهر تطابقا مع النموذج القياسي الذي بلغ معدل جريانه عند 3525.88 كما في شكل 3 و4، وتوافقت هذه النتيجة مع نتائج دراسة Rahimi (2012) الذي أظهر معدل جريان لمركب الاوجينول عند 3514.3.

شكل (3):مخطط تحليل بالمطياف بالأشعة تحت الحمراء لمركب الاوجينول لنبات القرنفل.

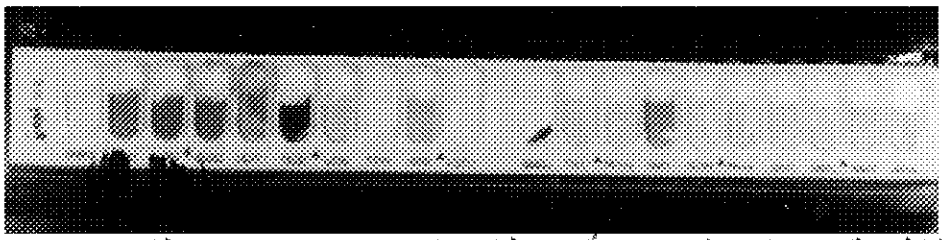



**شكل (4): مخطط تحليل مركبات النموذج القياسي للزيت الطيار لنبات القرنفل بالأشعة تحت الحمراء**

يعتبر الاوجينول هو احد مركبات الفينل بروبان مثل الانيثول والاستراكول وسيناميك الاديهايد والموجودة في المسار الايضي وبتتابع في زيوت نبات القرنفل حيث ان للاوجينول قابلية ضعيفة في الذوبان في الماء وذو فائدة كبيرة اعلى من بقية المركبات الموجودة في نبات القرنفل وفتحت له استخدامات عدة ومن خلال صفاته الأخرى وهو زيت اصفر شاحب، رائق، وله طعم لاذع.

للعزل الأولي لبكتريا السالمونيلا من عينات اللحم المفروم المحلي استخدم وسط مرق التتراثايونيت (Tetrathionate broth) لاحتوائه على مادة sodium thiosulfate، فضلا عن إضافة محلول اليود (Iodine solution)، واللذان يعدان مثبطين لنمو بكتريا (*E. coli*) (Shapton and Gould,1969)، فيما استخدم وسط نقيع القلب والدماغ (Brain Heart Infusion Agar) لتحفيز نمو السالمونيلا. وبعد نشر0.1 مليلتر من ألمزروع ألبكتيري في الأوساط المرق (السائلة) أعلاه وعند ظهور عكورة واضحة على الأوساط الصلبة (XLD) و(HEA) و (BSA)، واعتبر ذلك عزلا ثانويا انتخابيا، حيث ظهرت على وسط (XLD) الحاوي على مادة sodium thiosulfate مستعمرات صفراء مع مراكز سود وبدون مراكز سود، فيما ظهرت على وسط (HEA) الحاوي على أملاح الصفراء (Bile salt) مادة مثبطة للبكتريا الموجبة لملون كرام مستعمرات صفراء ذات لمعان مع وبدون مراكز سود لإنتاجها كبريتيد الهيدروجين $H_2S$ (المستعمرات ذات مركز أسود). أما فيما يخص وسط (BSA) وهو من الأوساط الانتخابية المهمة للسالمونيلا لاحتوائه على مادة bismuth sulfate وصبغة brilliant green والتي تعد مثبطات لبكتريا القولون ( Wilson and Blair,1927). فقد ظهرت مستعمرات بنية غامقة لماعة ذات مركز أسود غامق وكذلك مستعمرات سود لماعة، واعتمدت هذه الصفات الأولية أساساً للتشخيص الأولي للعزلات. وبعد نقل مستعمرة ممثلة عن كل مجموعة من المستعمرات التي وصفت أعلاه الى وسط مائل أكار حديد ثلاثي السكر (TSI) بوصفه دليل على إنتاج البكتريا لغاز $H_2S$ ووسط مائل أكار الحديد واللايسين (LIA). أظهر وسط (TSI) اللون الغامق مائل الى الاسوداد حول طعنة الناقل المعدني وبقاء اللون الأرجواني للوسط

(LIA) وقاعدي التفاعل حول طعنة الناقل المعدني (Loop), وهذا يدل على نتيجة موجبة. نقلت تلك المستعمرات التي أعطت نتيجة موجبة الى وسط (UA) فكانت النتيجة سالبة (ظهور لون أصفر) التي تدل على عدم إنتاج اليوريا (Andrews,1992)، وبذلك تم الحصول على عزلة مشخصة تعود لجنس السالمونيلا، مستعمراتها صفراء ذات مركز أسود معزولة من وسطين (HEA) و (XLD). بغية التعرف على نوع البكتريا المعزولة بشكل تأكيدي أجري الفحص api 20E على العزلة المشخصة على أنها تعود الى جنس السالمونيلا. دونت نتيجة الفحص الموجبة عند حدوث تغير لوني في أنابيب الشريط بعد انتهاء فترة الحضن وإضافة الكواشف، في حين كانت النتيجة سالبة عند عدم تغير اللون, حسب ما هو مثبت بـــ api profile index, حيث أظهرت النتيجة ان العزلة لبكتريا *Salmonella arizonae* التي أعطت نتيجة سالبة لكل من الاختبارات URE, TDA, IND, VP, GEL وINO، في حين أظهرت نتيجة موجبة لاختبارات ONPG, ADH, LDC, ODC, CIT, H2S, GLU, MAN, SOR, RHA, SAC, MEL, AMY وARA . مقارنة مع السيطرة السالبة متمثلة بالشريط غير المزروع شكل(5).

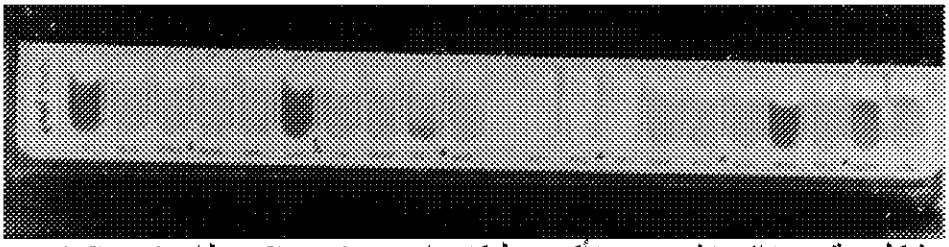




شكل رقم4: نتائج تشخيص تأكيدي لبكتريا *Sal. arizonae* بنظام api 20E.

استخدم وسطين لعزل بكتريا المكورات العنقودية هما Mannitol Salt Agar- MnA) و(Staphylococcus 110 Medium- Staph110) من اللحم المفروم لاحتوائهما على نسبة عالية من ملح الطعام ليثبط نمو معظم البكتريا السالبة لملون كرام ويحفز نمو بكتريا المكورات العنقودية والتي ظهرت على شكل مستعمرات صفراء على وسط (MnA) وشاحبة على وسط (Staph-110)، حيث نقلت مستعمرة على شريحة زجاجية وتم تصبيغها بملون كرام وظهرت الخلايا متكورة ومتكتلة وموجبة لملون كرام. أجرى بعد ذلك فحصي الكاتاليز و الأوكسيديز وكانت النتيجة موجبة للفحص

الأول وسالبة للثاني، وكانت نتيجة فحص تخمر سكر المانيتول موجبة (تغير اللون الى الأصفر) وتحلل الدم من نوع بيتا (β) وبذلك تم الحصول على عزلة صفراء واحدة والذي يمكن أن يكون تشخيصاً أولياً، وتم تأكيد التشخيص باستخدام نظام api Staph. شكل(5)، وتبين إنها بكتريا *Staphylococcus xylosus*.



شكل رقم5:نتائج تشخيص تأكيدي لبكتريا *S. xylosus* بنظام api Staph.

يبين جدول 4 إن الفعالية التثبيطية لتراكيز مختلفة من مركب الاوجينول المنقى في العزلات البكتيرية من اللحم المفروم قد تباينت حيث اظهر مركب الاوجينول المنقى بتركيز 0.025 % فعالية تثبيطية دنيا في العزلتين البكتيريتين *Sal. arizonae* و *S. xylosus* وبلغت $47.00\times10^{3}$ و $4.00\times10^{4}$ خلية/ مليلتر على التوالي مقارنة بنموذج السيطرة والذي بلغ $34.00\times10^{4}$ و $41.00\times10^{5}$ خلية/ مليلتر على التوالي واكتسب فرقا معنويا عند مستوى احتمالية ($P\leq0.05$) ولكن اظهر تركيزا قاتلا ادني للعدد الكلي للبكتريا الهوائية وعند هذا التركيز، بينما اظهر عند التركيز 0.1% تركيزا قاتلا ادني للبكتريا المعزولة من اللحم المفروم.

جدول (4): الفعالية التثبيطية والتركيز المثبط الأدنى (MIC) والتركيز الأدنى القاتل للبكتريا (MBC) لمركب الاوجينول المنقى في بعض البكتريا المعزولة من اللحم المفروم.

| تركيز مركب الاوجينول المنقى % | نوع البكتريا | | |
|---|---|---|---|
| | *Sal. arizonae* | *Staph. Xylosus* | Total count of aerobic bacteria |
| | معدل العدد الكلي ( خلية/ مل) ± الخطأ القياسي | | |
| سيطرة (بدون معاملة) | 518.80±$^{4}$10×34.00 أ | $^{5}$10×41.00 ± d835.74 أ | 20567.50±$^{8}$10×43.00 أ |
| 0.025 | 73.45±$^{3}$10×47.00 ب* | 297.5± $^{4}$10 ×4.00 ب * | d385.76± $^{3}$10×110.00 ب* |
| 0.05 | 15.93 ± $^{2}$10×7.80 ب* | 75.74± $^{3}$10×47.00 ب* | 82.5±$^{2}$10×10.00 ج |
| 0.1 | 0.02± 10×2.10 ب | 0.03± 10×7.80 ب | 0.14±10×18.00 ج |
| 0.2 | 0.001± 2 ب | 0.001±10 ب | 0.05± 34 ج |
| 0.4 | صفر | صفر | 0.001±8ج |
| 0.6 | صفر | صفر | صفر |
| 0.8 | صفر | صفر | صفر |
| 1.0 | صفر | صفر | صفر |
| 2 | صفر | صفر | صفر |

- المعدلات التي تحمل حروف متماثلة ضمن العمود الواحد لا تختلف معنويا.
- لاحتمالية عند مستوى اقل من (0.05).
- المعدلات لثلاثة مكررات.
- الرمز (*) يشير الى (MIC) بينما الرمز (*) يشير الى (MBC).

يتبين مما تقدم ان فعالية مركب الاوجينول المنقى التثبيطية ضد بكتريا *Sal. arizonae* أعلى من فعاليته ضد بكتريا *S. xylosus*، وذلك لأنه عندما تتعرض خلايا الأحياء الدقيقة الى اجهادات يمكن ان تخلق مواد حامية (Protectants) في داخل الخلايا أو تجمعها من البيئة المحيطة بها بعمليات النقل الفعال وان هذه المواد الحامية هي مجموعة من المواد تضفي الحماية على الخلايا وتختلف حسب نوع الخلايا أو نوع الإجهاد المعرضة له أوغيرها من العوامل غير الطبيعية، ومن هذه المواد الكلوتاميت

(Glutamate) والمانيتول (Mannitol) والكربوهيدرات ومواد أخرى (الخفاجي،2003). ان*Staphylococcus xylosus* أحد هذه الأحياء الدقيقة. تتفق هذه النتائج مع ما توصل إليه Nascimento *et al.* (2000) من إن البكتريا الموجبة لملون كرام أكثر تأثراً بالمستخلصات النباتية من البكتريا السالبة لملون كرام وذلك لان البكتريا السالبة لملون كرام تمتلك غشاء خارجياً مكون من مادة LPS- Lipopolysaccharide وبروتينات معقدة ودهون فوسفاتية تمنع دخول الكثير من المواد المضادة الى داخل الخلية البكتيرية. يعتقد ان سبب هذه الفروق في (MIC وMBC) بين التراكيز المختلفة هـــو الاختلاف في تراكيز المجاميع الفعالة في مركب الاوجينول المنقى.

نوصي بدراسة تأثير تغير الرقم الهيدروجيني (pH) على ألفعالية ألتثبيطية لمركب الاوجينول ودراسة إمكانية استخدامه ضد الأحياء الدقيقة المرضية داخل الجسم الحي (*in vivo*), وكذلك فحص ألسمية الوراثية للمركب الاوجينول للتأكد من سلامتها، باستخدام فحوص معتمدة.

**المصادر :**


- الخفاجي, زهرة محمود, 2003. حفظ مزارع الخلايا الحية- معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الإحيائية للدراسات العليا, جامعة بغداد, العراق.
- الطائي, منير عبود جاسم,1987. تكنولوجيا اللحوم والأسماك. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، جامعة البصرة.
- الزبيدي، لبيب احمد كاظم القيسي، مهدي ضمد ونور ية عبد الحسين علي، (2006). عزل وتشخيص بعض البكتريا الملوثة للحم المفروم وتحديد تراكيز مسحوق ومستخلصات قلف نبات القرفة (الدارسين) الصيني المثبطة والقاتلة الدنيا للبكتريا. مجلة ام سلمة للعلوم، 3: 399-406.
- ا

لزبيدي، لبيب احمد كاظم ومهدي ضمد القيسي،( 2009). التأثير التثبيطي لمستخلصات ثمار نبات الكزبرة في بعض البكتريا الملوثة للحم المفروم . مجلة الزراعة العراقية،14: 189-194.

- الزبيدي، لبيب احمد؛ ياسين، هشام جميل؛ فرحان، ياسمين ابراهيم و عصام شاكر حمزة (2011). فعالية تضاد الأكسدة، المحتوى الفينولي الكلي لمستخلصات درنات نبات الكركم وبطرق استخلاص مختلفة. عدد خاص للمؤتمر العلمي الأول لعلوم الحياة. كلية التربية للبنات/ جامعة الكوفة.

■ عمران، سحر غازي؛ الزبيدي، لبيب احمد؛ حمود، سلمان عبود؛ عبد الرزاق، ميعاد عدنان وياسمين إبراهيم فرحان (2011) الفعالية التثبيطية لمستخلصات نبات الجت في عزلات الأحياء المجهرية وإمكانية استخدامها في حفظ الاغذية. عدد خاص للمؤتمر العلمي الأول لعلوم الحياة، كلية التربية للبنات/ جامعة الكوفة.

- Amin,I.; Norazaidah, Y., Emmy Hainida, K.I. (2006). Antioxidant activity of extracts from the fruiting bodies of aegeria var. alba. Food Chemistry, 89; 533-539.
- Andrews, W. (1992). Manual of Food Quality Control Microbiological Analysis, FAO Food and Nutrition paper, 14/4, Rev.1, FAO, Rome.
- Atlas, R. M.; Brown, A. E. & Parks, L. C. (1995). Laboratory Manual of Experimental Microbiology. Mosby Company-Yearbook, Inc., St. Louis.
- Baron, E. T. & Fingold, S. M. (1994). Diagnostic Microbiology. 9th ed. Mosby Company. U.S.A.
- Bhowmik, D.; Kumer, K. P.; Yaday,A.; Srivastava,S. and Paswan, S. (2012). Recent Trends in Indian Traditional Herbs Syzgium aromaticum and its Health Benefits. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry,1(2): 6-17.
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. Clin. Microbiol. Rev., 12 (4): 564-582.
- Desmukh, S. D. and Borle, M. N. (1975). Studies on the insecticidal properties of indigenous plant products. Indian. J. Enth. Pharm., 37(1): 11-18.
- Food and Agriculture Organization (FAO). (1988). FAO production Yearbook, Vol.52, Rome. Italy.
- Harborne, J. B. 1988. Phytochemical Methods, Aguide to modern techniques of plant analysis. Champman and Hall, London, New York.
- Harley, J.P. & Prescott, L. M. (1996). Laboratory Excerses in Microbiology, 3rd. McGraw-Hill, Boston: pp: 484.
- Holt, J.G.; Krieg, N. R., Sneatgh, P.H.; Staley, J.T.& William, S.T. (1994). Bergy's Manual of Determinative Bacteriology, 9th ed. William Wilkins Co. Baltimor.
- Kamel C, Hafedh H, Tarek Z, Amel BKN, Mahmoud R, Kacem M, Amina B (2007). The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzigium aromaticum* L. Myrtaceae): A short review. Phytother. Res., 21(6): 501-506.
- Kumar,K.P.; Yadav, A.; Srivastava, S.; Paswan, S. and Dutt, A. S. (2012). Recent trends in Indian traditional herbs *Syzygium aromaticum a*nd health benefits. Journal of Pharmacongnocy and Phytochemistry, 1(1):6-17.
- Pandey, A.and Singh, P.(2011).Antibacterial activity of *Syzygium aromaticum* (clove) with metal ion effect against food borne pathogens. Asian Journal of Plant Science and Research, 1(2):69-80.
- Rahimi, A.A.; Ashnagar, A. and Nikoei, H. (2012). Isolation and characterization of 4-allyl-2-methoxyphenol (eugenol) from clove buds marketed in Tehran city of Iran. International Journal of ChemTech Research, 4(1):105-108.
- Shapton, D. A. & Gould, G. W. (1969). Isolation Methods of Microbiologists. Academic Press. London.

- Shihata, I.M. (1951). Apharmacological study of *Anagallis arvensis*. MSc. Thesis, Faculty of Vet. Med. Cairo Univ. Egypt.
- Singh, J.; Anupama B. and Goel, S. P. (2012). *Eugenia caryophyllata* Thunberg (Family Myrtaceae): A Review. International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences, 3 (4):1469-1475.
- Smolensk,S.J.; Silnis, H. & Franswarth, N.R.(1972). Alkaloid screening, Part I. Lioydia, 35(1): 31-34.
- Wilson, W.J. and Blair, E. M. McV. (1927). Use of glucose bismuth sulphite iron medium for the isolation of *B. proteus*. J. Hyg., 26, 374.


# Inhibitory activity of purified eugenol compound from volatile oil of clove plant flowers against some bacterial isolates that contaminated ground meat.

Labeeb Ahmed Al-Zubaidi Saba Riad Khudhaier Al-TaieSuha Mohammed Ibrahim


## Abstract:

The research was include the qualitative active groups in cloves volatile oil detection that gained from medicinal herbals republic center was carried out and the results showed the presence of all active groups except glycosides and coumarins. The total phenolic content in volatile oil was detect and reached 95.3%. The primary detection of Volatile oil compound was carried out by thin layer chromatography technique (TLC), the Rate flow was (Rf) reached to 0.59 and equaled with standard sample for compression. The purification and quantitative and qualitative detection of volatile oil compounds was carried out by using high performance liquid chromatography technique (HPLC), the result was showed presence Eugenol compound in Retention time 11.517 while the standard Eugenol was recorded 11.373 which indicates the purity of sample extract. as well the use of Infrared radiation with instrument Fourier Transform Infrared radiation (FTIR) showed C = O groups at (2800 to 3000) an area of fingerprinting as well as the emergence of double bond carbon atom at the point of 3003.17 and showing compliance with the standard sample as well all areas of aliphatic, aromatic, alcohols and phenols compounds for standard sample that compared with purified sample. Also, the inhibition activity of the eugenol compound was studied against some bacterial species that contaminated meat environment included *Salmonella arizonae* and *Staphylococcus xylosus* that isolated from locally ground meat, as well as its effect on the total count of aerobic bacteria. The Minimum Inhibition Concentration (MIC) purified eugenol compound was 0.025% with *Salmonella* and *Staphylococcus* isolated bacteria but Minimum Bactericidal Concentration (MBC) with total count of aerobic bacteria and the MBC reached 0.1% with others tested bacteria. *S. xylosus* showed resistance to the eugenol compound activity over than with *Sal. arizonae*.


**Key words:** Inhibitory activity, Purified Eugenol, ***Salmonella arizonae***, ***Staphylococcus xylosus*** , ground meat.