

التركيب الكيميائي للزيت العطري الطيار لثمار القرنفل وتأثيره المضاد الجرثومي

باسم إيليا بطاح

* مدرس في قسم الكيمياء الحيوية والأحياء الدقيقة، كلية الصيدلة، جامعة انطاكية السورية الخاصة

basem.battah3@damascusuniversity.edu.sy

الملخص

تم استخلاص الزيت العطري الطيار لثمار القرنفل من ثمار القرنفل الجافة بطريقة الجرف ببخار الماء، وتم تحديد نسبته المئوية والتي كانت تساوي 8.3% من وزن الثمار الجافة. تم التحديد النوعي والكمي لأهم المكونات الرئيسية للزيت العطري الطيار لثمار نبات القرنفل وهي الأوجينول والكاروفيلين وولات الأوجينول وألفا هيوميلين (كاري أوفيلين) باستخدام تقانة الكروماتوغرافية الغازية وذلك بالمقارنة مع مركبات عيارية. حيث أن الأوجينول هو المكون الرئيسي في الزيت الطيار والذي بلغت نسبته 81.3%. تم دراسة وتقييم الفعالية المضادة للجراثيم للزيت العطري الطيار لثمار القرنفل ضد سلالات جرثومية معزولة سريريا متعددة المقاومة على أكثر من صاد حيوي (الكليسيلا الرئوية *Klebsiella pneumoniae*, الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa*, العنقودية الرئوية *Streptococcus pneumoniae*, العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus*). أظهر الزيت العطري الطيار لثمار القرنفل فعالية جيدة مضادة للجراثيم على وسط صلب ضد السلالات الجرثومية المدروسة عند تطبيقه بتركيز تتراوح ما بين 25% و 100% في وسط صلب. كما تم تقييم الفعالية المضادة للجراثيم للزيت العطري الطيار لثمار القرنفل على وسط سائل وتم تحديد التركيز المثبط الأدنى (MIC) minimum inhibitory concentration ضد السلالات الجرثومية (الكليسيلا الرئوية *Klebsiella pneumoniae* والزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* والعنقودية الرئوية *Streptococcus pneumoniae* والعنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus*) وكانت (6.25 µl/ml، 6.25 µl/ml، 25 µl/ml، 6.25 µl/ml) على التوالي. أظهرت النتائج على وسط صلب وعلى وسط سائل فعالية عالية لثمار القرنفل الأساسي ضد الجراثيم المدروسة المعزولة سريريا والمقاومة على المضادات الحيوية. كما أن هناك حاجة لإجراء المزيد من الدراسات لتقييم فعاليته على مكروبات أخرى وتقييم السمية الخلوية والجرعة الفعالة داخل الجسم الحي *In vivo*.

الكلمات المفتاحية: ثمار القرنفل، أوجينول، الزيت العطري الطيار، استخلاص، الكروماتوغرافية الغازية، الفعالية المضادة للجراثيم، سلالات جرثومية، سورية.

تاريخ الإيداع: 2024/05/19

تاريخ القبول: 2024/07/16



حقوق النشر: جامعة دمشق -

سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق

النشر بموجب الترخيص

CC BY-NC-SA 04

Chemical composition of clove fruits essential oil and its antibacterial effects

Basem Elia Battah*

*Department of Biochemistry and Microbiology, Antioch Syrian Private University
basem.battah3@damscusuniversity.edu.sy

Abstract

The essential oil of the clove fruits was extracted by distilled water, and the percentage was determined, which was equal to 15.5% of the weight of the dry fruits. The main components of essential oil of the clove fruits (eugenol, caryophyllene, eugenol acetate and alpha-humelene) were identified qualitatively and quantitatively using gas chromatography GC by comparison with pure standards. The eugenol being the main component (81.3% w/w).

The antibacterial activity of clove fruits essential oil was evaluated and studied against multi drug resistance bacterial strains (MDR) clinically isolated (*Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumonia*, *staphylococcus aureus*). The clove fruit essential oil demonstrated a good antibacterial activity on solid medium with concentration between (25-100)%. Also, the antibacterial activity was determined on a liquid medium by calculating the minimal inhibitory concentration of the clove fruit essential oil against MDR clinically isolated strains (*Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *streptococcus pneumonia*, *staphylococcus aureus*) and were (6.25 µl/ml , 25µl/ml , 6.25µl/ml, 6.25µl/ml) respectively. The obtained results demonstrated a significant effect of clove fruit essential oil against MDR clinically isolated bacteria. More results are needed to evaluate the activity of clove fruit essential oil against other microorganisms, cytotoxic effect and the *in vivo* effective dose.

Keywords: clove fruits, essential oil, extraction, gas chromatography, antibacterial activity, bacterial strains, syria.

Received: 19/05/2024

Accepted: 16/07/2024



Copyright: Damascus University- Syria, The authors retain the copyright under a CC BY- NC-SA

1. المقدمة:

نبات القرنفل شجرة دائمة الخضرة، لها شكل مخروطي، مزهرة، ذات زهر رباعي الأجزاء، ولها رائحة عطرية قوية، يبلغ متوسط ارتفاع شجرة القرنفل من ثمانية إلى إثني عشر متراً، لون ثمارها أحمر ويتحول إلى البني بعد جفافها. الأسم العلمي للقرنفل بالانجليزية Clove وهو من الفصيلة الآسية *Myrtaceae*، واسمه اللاتيني *Syzygium aromaticum*، الجزء المستعمل الثمار والتي يطلق عليها بالتسمية الشائعة بأكباش القرنفل (الورع، 197، 45)؛ (حسن آغا وزملاؤه، 2012، 25)؛ (سالم، 1987، 12). يبدي زيت القرنفل الأساسي العديد من التأثيرات الدوائية والحيوية. تستخدم ثمارها المجففة عالمياً كمنكهات في الكثير من الأطعمة، وهي واحدة من أقدم وأشهر التوابل المعروفة كيهارات، بالإضافة إلى تأثيراتها الطبية الكثيرة والمفيدة كما يستعمل أيضاً نظراً لتأثيراته المضادة للميكروبات (أحمد، 1997، 40)؛ (الحسن، 2016، 20)؛ (محي الدين، 2012، 19). إضافة لتأثيراته المضادة للميكروبات، يعرف القرنفل بتأثيراته كمضاد أكسدة، مسكن، مخدر، مضاد للالتهاب، مبيد الحشرات. كما استعمل القرنفل قديماً لشفاء الحروق والجروح في الطبّ الشّعبي Traditional medicine. كما وصف القرنفل أيضاً بأنه طارد للحمى، مطهر، معقم للمعدة، يشفي من القروح وآلام الرأس، يحمي من الأوبئة، يساعد على الهضم، يسكن آلام الأسنان، يخفف الالتهابات التحسسية، ينه القلب والمعدة كما تم وصفه بأنه آمن من قبل إدارة الأغذية والأدوية FDA (Choi H.S et al, 2002, 1713)؛ (Miething Holger et al, 1989, 43)؛ (Wallis et al, 1992, 333). وقد تبين حديثاً أن مغلي القرنفل مع الشاي الأحمر يساعد على الشفاء من سرطان الرئة ويقضي على الربو وحساسية الصدر والكحة المزمنة، كما ويساعد بالإقلاع عن التدخين (الحسن، 2016، 20).

هناك عدة طرائق عملية من أجل استخلاص زيت ثمار القرنفل، ولعل أهمها: والاستخلاص بالمحلات العضوية عند درجة غليان المحل باستخدام جهاز سوكسيلييه، الجرف ببخار الماء، والاستخلاص بطريقة النقع بالمحلات العضوية عند درجة حرارة الغرفة (دهان، 1992، 33)؛ (Felix et al., 1997, 120)؛ (wagner et al., 1996, 88).

يتوقف تركيب الزيت العطري لثمار القرنفل على العامل الوراثي للنبات، كما يتأثر بعدة عوامل بيئية وفيزيولوجية مثل: عمر النسيج ونضجه والمناخ والتربة وظروف التخزين وكذلك طريقة الاستخلاص؛ ويكون الفارق في تركيب الزيوت العطرية كميّاً أكثر منه نوعياً (Huet, 1991, 55).

يتركب الزيت العطري الطيار لثمار القرنفل من العديد من المكونات الكيميائية أهمها: الأوجينول eugenol والكاروفيللين caryophyllene وأوجينول أسيتات eugenol acetate وألفا هيوميلين α -humelene (كاري أوفيللين α -caryophyllene) (الورع، 197، 45)؛ (Johnson, 199, 507). تبلغ نسبة الأوجينول في الزيت العطري الطيار لثمار القرنفل ما بين 80-84 %، ولأوجينول خواصاً معقمة، ويستخدم بشكل شائع في العيادات السنية وذلك لخواصه المضادة للبكتيريا المسببة لأمراض الفم وتسوس الأسنان، حيث يستخدمه أطباء الأسنان لتعقيم الفجوات والجذور السنية أثناء علاجها (دهان، 1992، 33)؛ (Johnson, 199, 507). الأوجينول هو المكون الرئيسي للزيت العطري الطيار لثمار القرنفل، ويسمى حسب التسمية الدولية 4-أليل 2-ميثوكسي فينول، وهو مركب ذو رائحة مميزة، صيغته الجزيئية $C_{10}H_{12}O_2$ وكتلته المولية 164,201462 غ/مول، درجة غليانه $253^{\circ}C$ وكتافته 1,06 كغ/ل، وهو قابل للذوبان في الإيثانول وثنائي كلورو ميثان، وقليل الذوبان في الماء والكلوروفورم (IUPAC, 1965, 345)؛ (Johnson, 199, 507).

ازداد مؤخراً معدل الوفيات والأمراضية نتيجة لفشل معالجة الإنتانات الجرثومية، حيث تعد معالجة الإنتانات الجرثومية متعددة المقاومة على المضادات الحيوية من التحديات الصعبة التي تواجه العاملين في المجال الصحي وتظهر أهمية هذه المشكلة بشكل خاص في المشافي، حيث أن حوالي 15% من مرضى المشافي مصابين بإنتانات جرثومية، هؤلاء المرضى هم أكثر عرضة للإصابة بإنتانات مقاومة على الأدوية، حيث يكون استعمال المضادات الحيوية متكرراً، ومن الممكن أن يكون المرضى مثبطين مناعياً (Hassan, 2017, 478). تعد كلاً من جراثيم الكلبسيلا الرئويّة *Klebsiella pneumoniae* والرئيفة الرنجرية *Pseudomonsa aeruginosa* من سلبيات الغرام والمكورات العقدية الرئويّة *streptococcus pneumoniae* والعنقودية

الذَّهَبِيَّة *Staphylococcus aureus* من إيجابيات الغرام وهي من أهم الجراثيم التي من الممكن أن تكون سبباً لحالات المقاومة على المضادات الحيوية (Battah, 2021, 179). تشكل جراثيم الكلبسيَّة الرئويَّة *Klebsiella pneumoniae* متعددة المقاومة تهديداً رئيسياً بشكل خاص عند كبار السن والمثبطين مناعياً كما تعد من الأسباب الرئيسية لإنتانات المشافي المكتسبة (Yang SK et al., 2020, 819)؛ (Podschun et al., 1998, 589)؛ (Solomon et al., 2014, 938). والأكثر من ذلك تعد جراثيم المكورات العفويَّة *Streptococcus pneumoniae* السبب الرئيسي لذات الرئة المكتسبة بالمشافي (K et al., 2018, 227) Acs، كما تعد جراثيم الرنفة الرنجرية *Pseudomonas aeruginosa* والتي هي من سلبيات الغرام السبب الرئيسي لإنتانات للمجاري التنفسية والمجاري البولية والحروق والجروح والتي من الممكن أن تكون إنتانات معدنة وصعبة المعالجة (Kavanaugh NL et al., 2022, 57). ظهرت السلالات الجرثومية المقاومة مؤخراً نتيجة للاستعمال العشوائي للمضادات الحيوية وعدم التشخيص الدقيق لمسببات الأمراض المعدية كما تطورت العديد من آليات المقاومة ضد المضادات الحيوية والتي جعلت من علاجات أمراض الإنتانات الجرثومية أكثر تعقيداً مما دعا إلى الحاجة الملحة لإيجاد علاجات بديلة لمواجهة هذه المشكلة وزيادة فعالية المضادات الحيوية المستخدمة للحد من انتشار السلالات المقاومة والمعالجة الفعالة للإنتانات الجرثومية (battah, 2022, 97)؛ (Palucci et al., 2018, 172). تتميز الزيوت العطرية الأساسية بأنها زيوت طيارة غير منحلة بالماء ومنحلة بالمحلات العضوية مثل الإيثانول والكحول. يعود التأثير المضاد الجرثومي للزيوت العطرية الأساسية نظراً لاحتوائها على العديد من المكونات التي من الممكن أن لها تأثير مضاد جرثومي عبر آليات غير نوعية مثل التداخل مع الغشاء الدسم للخلية الجرثومية مؤدياً إلى موت الخلية واستهداف مضخات قذف الدواء efflux pump، مما يجعل هذه الزيوت فعالة تجاه السلالات المقاومة والسلالات المشكلة للبيوفلم أو الفلم الحيوي Biofilm المقاوم على المضادات الحيوية (Brozyna et al., 2021, 24). يهدف هذا البحث تقييم الفعالية المضادة للجراثيم لزيوت ثمار القرنفل بتركيز مختلفة ضد سلالات جرثومية معزولة سريراً متعددة المقاومة على المضادات الحيوية.

2. هدف البحث Aim of the Research:

يهدف البحث إلى:

- استخلاص الزيت العطري الطيار لثمار نبات القرنفل باستخدام طريقة الجرف ببخار الماء، وتحديد نسبته بالنسبة لوزن الثمار.
- تحديد نسبة المكونات الرئيسية في الزيت العطري الطيار لثمار القرنفل باستخدام تقانة الكروماتوغرافية الغازية وذلك بالمقارنة مع مركبات عيارية نقية.
- دراسة الفعالية المضادة للجراثيم للزيت العطري الطيار أو الزيت الأساسي لثمار القرنفل ضد سلالات جرثومية متعددة المقاومة على المضادات الحيوية معزولة سريراً.

3. مواد وطرائق البحث Materials and Methods of Research:

1.3 أدوات البحث Equipment :

- جهاز الكروماتوغرافية الغازية من إنتاج شركة Shimadzu، نموذج QP2010-GC-MS، صنع اليابان.
- مبخر دوّار من إنتاج شركة Normschliff نموذج VV1، من صنع ألمانيا.
- ميزان الكتروني حساس بدقة 0.05mg من إنتاج شركة Sartorius نموذج ED224S، من صنع ألمانيا.

2.3 مواد البحث materials :

أوجينول عياري 99% وكاروفيللين عياري $\geq 80\%$ وأوجينول أسيتات عياري 98% وألفا هيوميلين 96% من إنتاج شركة sigma- Aldrich الأمريكية، كبريتات الصوديوم اللامائية 99.8% من إنتاج شركة ميرك الألمانية، إيتانول 99.9% وثنائي إيثيل إيثانول 99.9% من إنتاج شركة ميرك الألمانية.

3.3. الاختبارات والتحليلات Tests and Analysis:

1.3.3. استخلاص الزيت العطري الطيار من ثمار القرنفل بطريق الجرف ببخار الماء:

تم وزن 100 غ من ثمار القرنفل المطحونة ثم نقعت في الماء المقطر لمدة ساعة وجرفت ببخار الماء حتى نفاذ الزيت من العينة المدروسة. بعد ذلك تم استخلاص الزيت العطري من القطارة المائية باستخدام ثنائي إيثيل إيتير، ثم بخرت القطارة الإيثيرية باستخدام المبخر الدوار تحت ضغط منخفض عند درجة الحرارة 30-40°C للحصول على الزيت العطري الطيار لثمار نبات القرنفل. ثم جفف الزيت الناتج بكبريتات الصوديوم اللامائية sodium sulphate anhydrate. تم حساب نسبة الزيت العطري الطيار بالنسبة إلى وزن الثمار.

2.3.3. تحديد نسبة المكونات الرئيسية في الزيت العطري الطيار لثمار القرنفل:

تم إجراء التحليل الكروماتوغرافي الغازي GC على الزيت العطري الطيار لثمار القرنفل وذلك بالمقارنة مع مركبات عيارية وذلك بتطبيق الشروط التالية (wagner et al., 1996, 88):

العمود الكروماتوغرافي A fused silica capillary column HP5-MS (30 m x 0.32 mm, film thickness 0.25 µm)

الحجم المحقون	1 ميكروليتر من العينة المدروسة بعد تمديدتها 25 مرة بالأسيتون
الغاز الحامل	الهيليوم
درجة حرارة الحاقن	250°C
درجة الحرارة البدائية	60° C يتم الحفاظ عليها لمدة 8 min
درجة الحرارة النهائية	180° C يتم الحفاظ عليها لمدة 5min
سرعة التسخين	3 درجة في الدقيقة ضمن المجال 180°- 60° C

تم حساب النسبة المئوية للمكونات الرئيسية في الزيت العطري الطيار المدروس بتقانة الكروماتوغرافية الغازية GC بالمقارنة مع مركبات عيارية نقية، حيث تمت مقارنة المساحة العائدة لقمم المكونات في العينة المدروسة مع المساحة العائدة للمركبات العيارية. تم إجراء التحليل الكروماتوغرافي باستعمال جهاز Shimadzu QP2010-GC-MS. تم تمديد العينة 25 مرة بالأسيتون، حيث تم حقن 1 ميكروليتر بالعمود. عمود سيليكيا شعري مدمج HP5-MS (30 m x 0.32 mm, film thickness 0.25 µm). تم استعمال الهيليوم كغاز حامل.

3.3.3. عزل السلالات الجرثومية:

تم أخذ 50 عينة دم من مشفى الأطفال بدمشق، ثم زرعت على الأوساط الزرع الملائمة، ثم عزلت السلالات الجرثومية المدروسة (الكليسيلا الرئوية *Klebsiella pneumoniae*، الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa*، العفديّة الرئويّة *Streptococcus pneumoniae*، العنقوديّة الذهبية *Staphylococcus aureus*) باستخدام الأوساط الانتقائية والطرائق الميكروبيولوجية التقليدية.

4.3.3. حساسية السلالات الجرثومية ضد المضادات الحيوية باستعمال اختبار قرص الانتشار أو اختبار تفسّي القرص disk

:diffusion test

تم تقييم حساسية السلالات الجرثومية (الكليسيلا الرئوية *Klebsiella pneumoniae*، الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa*، العفديّة الرئويّة *Streptococcus pneumoniae*، العنقوديّة الذهبية *Staphylococcus aureus*) ضد مجموعة من المضادات الحيوية شائعة الاستعمال ضد هذه السلالات وهي: gentamicin و amikacin و ampicillin و vancomycin، وذلك باستعمال قرص (Bioanalyse) Kriby bauer، وتم تحديد الحساسية بقياس قطر منطقة التثبيط لكل مضاد حيوي ضد السلالات المدروسة (Jorgensen et al., 2009, 49).

5.3.3. تحديد الفعالية المضادة للجراثيم للزيت العطري الطيار لثمار القرنفل على وسط صلب:

تم تقييم الفعالية المضادة للجراثيم باستعمال طريقة انتشار بئر - آغار - well - agar . تم تحضير وسط Mueller-Hinton Agar (BiomerieuxFrance) صلب ضمن أطباق بتري. تم زرع السلالات الجرثومية المذكورة سابقاً (الكليبيلا الرئوية *Klebsiella pneumoniae*, الزائفة الزنجارية *Pseudomona aeruginosa*, العقديّة الرئوية *Streptococcus pneumoniae*، العنقوديّة الذهبية *Staphylococcus aureus*)، ومن ثم تم قطع بئر من الوسط الصلب 6mm باستعمال cork borer عقيم وملئ هذا البئر بـ 20 ميكروليتر من زيت العطري الطيار لثمار القرنفل. تمت قراءة النتائج بعد الحضان لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37 درجة مئوية.

6.3.3. تحديد الفعالية المضادة للجراثيم للزيت العطري الطيار لثمار القرنفل في وسط سائل:

تم تقييم الفعالية المضادة للجراثيم للزيت العطري الطيار لثمار القرنفل ضد السلالات الجرثومية: (الكليبيلا الرئوية *Klebsiella pneumoniae*، الزائفة الزنجارية *Pseudomona aeruginosa*، العقديّة الرئوية *Streptococcus pneumoniae*، العنقوديّة الذهبية *Staphylococcus aureus*) في وسط المرق المغذي السائل (LB broth (Tmedia, India) مع DMSO (sigma aldrich) بنسبة 10% بدرجة حرارة 37 درجة مئوية. تم تحضير سلسلة متناقصة التراكيز من الزيت العطري الطيار لثمار القرنفل وفق التراكيز: (100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56, 0 µl/ml) وتم زرع المحلول الجرثومي لكل سلالة من السلالات بتركيز 5×10^3 CFU/ml وتركها للنمو بتماس مع الجراثيم بدرجة حرارة 37 درجة مئوية. بعد 24 ساعة تم قراءة النتائج وتحديدها باستعمال مقايسة microplate alamarblue (Battah et al., 2019, 66).

4.3. النتائج والمناقشة:

1.4.3. استخلاص الزيت العطري الطيار من ثمار القرنفل بطريق الجرف ببخار الماء:

تم استخلاص الزيت العطري الطيار من ثمار القرنفل بطريقة الجرف ببخار الماء، فكانت نسبته تساوي 8.3 % من وزن الثمار.

2.4.3. تحديد نسبة المكونات الرئيسية في الزيت العطري الطيار لثمار القرنفل:

تم إجراء التحليل الكروماتوغرافي الغازي GC على الزيت العطري الطيار لثمار القرنفل وذلك بالمقارنة مع مركبات عيارية نقية، حيث تميز كل مكون بزمن احتباس retention time خاص به، فكان زمن الاحتباس للأوجينول 12.3 دقيقة، وزمن الاحتباس للكاروفيلين 13.1 دقيقة، وزمن الاحتباس لـ α -هيوميلين 13.7 دقيقة، وزمن الاحتباس للأوجينول أسيتات 14.5 دقيقة. والجدول رقم 3 يبين أزمنة الاحتباس للمكونات الرئيسية للزيت العطري الطيار لثمار القرنفل.

الجدول (3): أزمنة الاحتباس retention times للمكونات الرئيسية للزيت العطري الطيار لثمار القرنفل

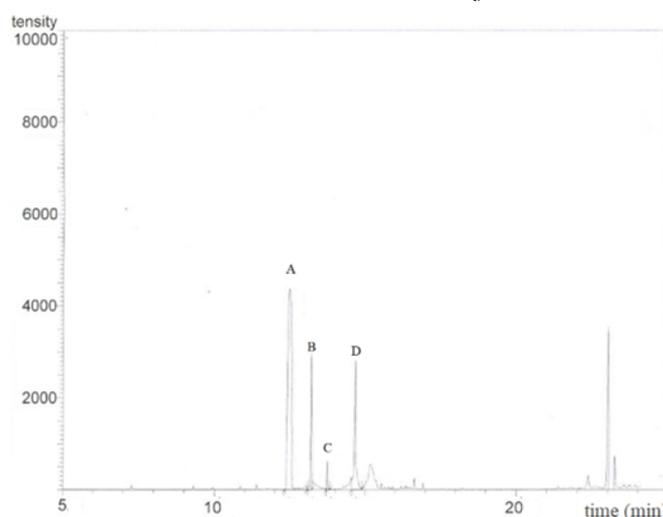
المكونات الرئيسية للزيت العطري الطيار لثمار القرنفل The main components of essential oil of the clove fruits	زمن الاحتباس (دقيقة) Retention time (min)
الأوجينول Eugenol	12.3
الكاروفيلين caryophyllene	13.1
ألفا-هيوميلين (ألفا-كاري أوفيلين) α -humelene (α -caryophyllene)	13.7
أوجينول أسيتات Eugenol acetate	14.5

ومن خلال مقارنة مساحات القمم العائدة للمكونات الرئيسية في الزيت العطري الطيار لثمار القرنفل مع مساحات القمم العائدة للمركبات العيارية المحضرة وفق تراكيز محددة تبين أن الأوجينول هو المكون الرئيس بالنسبة للمكونات الأخرى والذي بلغت نسبته 81.3% من وزن الزيت الطيار، بينما بلغت نسبة الكاروفيلين 2.11% و α -هيوميلين 0.23% وأوجينول أسيتات 1.87%. ويبين الجدول رقم 4 النسب المئوية للمكونات الرئيسية في الزيت العطري الطيار لثمار القرنفل.

الجدول (4): النسب المئوية للمكونات الكيميائية الرئيسية في الزيت العطري الطيار لثمار القرنفل.

المكونات الرئيسية للزيت العطري الطيار لثمار القرنفل The main components of essential oil of the clove fruits	النسبة المئوية للمكون بالنسبة لوزن الزيت % Percentage of the components by weight of essential oil (%)
الأوجينول Eugenol	81.3%
الكاروفيلين Caryophyllene	2.11%
ألفا-هيوميلين (ألفا-كاري أوفيلين) α -humelene (α -caryophyllene)	0.23%
أوجينول أسيتات Eugenol acetate	1.87%

ويبين الشكل رقم (3) الكروماتوغرام الناتج لدى إجراء التحليل الكروماتوغرافي الغازي GC للزيت العطري الطيار المستخلص من ثمار القرنفل، والذي يظهر قمم المكونات الرئيسية في الزيت.



الشكل (3): الكروماتوغرام الناتج لدى إجراء التحليل الكروماتوغرافي الغازي GC للزيت العطري الطيار لثمار القرنفل حيث تمثل القمم:

(A: eugenol, B: caryophyllene, C: humelene, D: eugenol acetate)

3.4.3. التأثير المضاد الجرثومي للزيت العطري الطيار لثمار القرنفل clove fruit essential oil ضد سلالات جرثومية

معزولة سريريا على وسط صلب:

تم التحري عن الفعالية المضادة للجراثيم للزيت العطري الطيار لثمار القرنفل على وسط صلب (Mueller-Hinton agar) ضد أربعة سلالات جرثومية معزولة سريريا (الكليسيلا الرئوية *Klebsiella pneumoniae*, الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa*, العنقودية الرئوية *Streptococcus pneumoniae*، العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus*) ومتعددة المقاومة على مجموعة من المضادات الحيوية (vancomycin, ampicillin, amikacin, gentamicin) حيث أظهرت جراثيم الكليسيلا الرئوية مقاومة على كل من (vancomycin, ampicillin, gentamicin) وحساسية على amikacin وجراثيم الزائفة الزنجارية مقاومة على كل من (ampicillin, gentamicin) وحساسية على كل من (amikacin و vancomycin)، بينما أظهرت العنقودية الرئوية والعنقودية الذهبية مقاومة على كل من (ampicillin, amikacin, gentamicin) وحساسية على vancomycin، كما تعد هذه الجراثيم من الجراثيم التي من الممكن أن تطور آليات مقاومة مختلفة وتقوم بتشكيل الفلم الحيوي Biofilm والذي يعد شكل من أشكال المقاومة الجرثومية على المضادات الحيوية والذي يقلل من فعالية هذه الأدوية (Gurung et al., 2019, 14). كما هو موضح بالدول رقم (5) والشكل رقم (4).

الجدول(5): يوضح تصنيف حساسية الأنواع الجرثومية الأربعة تجاه الصادات الحيوية المتبعة في هذه الدراسة (S:sensitive ،R:reistant) .

	Vancomycin	Ampicillin	Amikacin	Gentamycin
<i>Klebseilla pneumonia</i>	R	R	S	R
<i>Pseudomonas areuginosa</i>	s	R	S	R
<i>Streptococcua pneumpnia</i>	s	R	R	R
<i>Staphylococcus aureus</i>	S	R	R	R



الشكل (4): يوضح حساسية السلالات الجرثومية المدروسة تجاه الصادات الحيوية المتبعة في هذه الدراسة.

تم قياس منطقة التثبيط *inhibiting zone* على وسط صلب باستعمال تراكيز مختلفة من زيت ثمار القرنفل كما هو موصوف في الجدول رقم (5). أظهرت نتائج دراسة التأثير المضاد الجرثومي ملحوظة للزيت العطري الطيار لثمار القرنفل فعالية ضد الجراثيم سلبية الغرام والجراثيم إيجابية الغرام. لوحظ بأن التراكيز الفعالة للزيت العطري الطيار لثمار القرنفل ضد السلالات الجرثومية الأربعة على وسط صلب تتراوح ما بين 25% و 100%. حيث أظهرت التراكيز 25% و 50% و 100% للزيت فعالية أقل تجاه جراثيم الكليسيلا الرئوية *Klebsiella pneumoniae* من فعاليتها ضد جراثيم كل من الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* والعقدية الرئوية *Streptococcus pneumoniae* والعنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* ، حيث كان قطر منطقة التثبيط لجراثيم الكليسيلا الرئوية *Klebsiella pneumoniae* يساوي (15mm) عند استعمال تركيز 25% و (20mm) عند استعمال التراكيز 50% و 100% من الزيت. بينما كان قطر منطقة تثبيط النمو لجراثيم الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* يساوي (20mm) عند استعمال التراكيز 25% و 50% و يساوي (30mm) عند استعمال التركيز 100%. وكان أيضا قطر منطقة التثبيط لجراثيم العقدية الرئوية *Streptococcus pneumoniae* يساوي (17mm) عند استعمال تركيز 25% من الزيت، و يساوي (20mm) عند استعمال التركيز 50% من الزيت و يساوي (30mm) عند استعمال التركيز 100% من الزيت، وكان قطر منطقة تثبيط النمو لجراثيم العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* يساوي (20mm) عند استعمال تركيز 25% و 50% و (25mm) عند استعمال تركيز 100%. كما هو موضح بالجدول رقم(6) والشكل رقم (5). تتفق نتائج هذه الدراسة مع دراسة Dulal وزملائه (2021, 250, dulal et al.)، حيث أظهرت تلك الدراسة فعالية ملحوظة للزيت العطري الطيار لثمار القرنفل على وسط صلب ضد جراثيم الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* عند تطبيق تراكيز مختلفة من الزيت تتراوح ما بين 25% و 50% ، حيث تراوح قطر منطقة التثبيط ما بين (17mm – 24mm) وكانت هذه الفعالية أقوى من فعالية الزيت ضد جراثيم الكليسيلا الرئوية *Klebsiella pneumoniae* عند تطبيق نفس التراكيز المذكورة، حيث تراوح قطر منطقة التثبيط ما بين (14mm–16mm) في الدراسة و كانت الفعالية أيضا أقوى ضد جراثيم العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* عند مقارنتها مع نتائج الدراسة حيث تراوح قطر منطقة التثبيط ما بين (16mm-18mm). أظهرت دراسة Dulal أيضا فعالية ملحوظة مثبطة للنمو الجرثومي على وسط صلب ضد مجموعة أخرى من الجراثيم (العقدية المقيحة *Streptococcus pyogenes*). كما تتفق أيضا نتائج دراستنا هذه مع دراسة أخرى (Anandhi et al., 2022, 41) والتي أظهرت فعالية ملحوظة للزيت العطري الطيار لثمار القرنفل ضد جراثيم الكليسيلا الرئوية *Klebsiella pneumoniae* وجراثيم الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* مع فعالية تثبيطية ضد

جراثيم الزائفة الزنجارية *Pseudomona aeruginosa* أقوى من فعاليته ضد جراثيم الكلبسيلا الرئوية *Klebsiella pneumoniae* وأظهرت الدراسة أيضا فعالية ضد جراثيم الإشريكية القولونية *Escherichia coli*. بينت نتائج الدراسة فعالية ملحوظة لزيت ثمار القرنفل ضد السلالات الأربعة المقاومة المدروسة الكلبسيلا الرئوية *Klebsiella pneumoniae* , الزائفة الزنجارية *Pseudomona aeruginosa* , العقديّة الرئوية *Streptococcus pneumoniae* , العنقوديّة الذهبية *Staphylococcus aureus* . يعود التأثير المضاد الجرثومي للزيت العطري الطيار لثمار القرنفل إلى الأوجينول والمركبات الفينولية (Dorman, 2000, 32). تؤثر هذه المركبات عن طريق التداخل مع الجدار الخلوي الفوسفوليبيدي للجراثيم وتزيد من نفوذته وبالتالي موت الجرثوم. كما تعد هذه المكونات مسؤولة أيضاً عن تمسخ البروتينات الجرثومية (Kamel, 2007, 501)، وبالتالي تملك الزيوت الأساسية آليات تأثير كمضادات جرثومية مختلفة عن المضادات الجرثومية المستعملة حالياً. وهذا ما يفسر نتائج الدراسة وفعالية الزيت العطري الطيار لثمار القرنفل ضد العديد من السلالات الجرثومية من إيجابيات الغرام ومن سلبيات الغرام، وحتى السلالات متعددة المقاومة على أكثر من صاد حيوي، حيث يمكن للزيت العطري الطيار لثمار القرنفل أن يكون مضاد جرثومي بديل ضد هذه السلالات الجرثومية متعددة المقاومة.

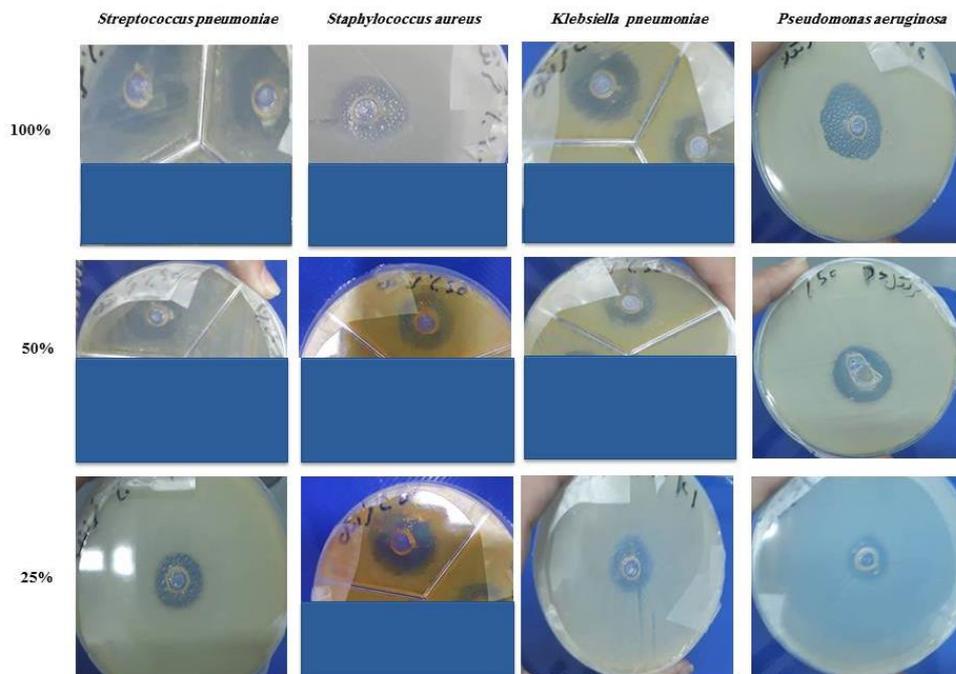
الجدول رقم (6) : التأثير المضاد الجرثومي لزيت ثمار القرنفل الأساسي أو الطيار *clove fruit essential oil* على وسط صلب (Mueller-

Hinton agar). تم زرع السلالات الجرثومية الأربعة المعزولة سريريا (الكلبسيلا الرئوية *Klebsiella pneumoniae* , الزائفة الزنجارية

Pseudomona aeruginosa , العقديّة الرئوية *Streptococcus pneumoniae* , العنقوديّة الذهبية *Staphylococcus aureus*) على وسط

صلب وعلى تماس مع تراكيز مختلفة من زيت ثمار القرنفل الأساسي (5%, 10%, 25%, 50%, 100%). تم الحصول على النتائج بقياس منطقة التثبيط بعض حضان الجراثيم المزروعة على وسط صلب لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37 درجة مئوية.

Concentration of clove fruit essential oil	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
100%	25 mm	25mm	30 mm	20 mm
50%	20 mm	20mm	20 mm	20 mm
25%	17 mm	20mm	20 mm	15 mm
10%	0 mm	0mm	0 mm	0 mm
5%	0 mm	0mm	0 mm	0 mm



الشكل (5): يوضح الشكل نتائج اختبار فعالية زيت القرنفل بتراكيز مختلفة (100% - 50% - 25%) على وسط صلب تجاه السلالات الجرثومية المدروسة سريريا (الكلبسيلا الرئوية *Klebsiella pneumoniae* , الزائفة الزنجارية *Pseudomona aeruginosa* , العقديّة الرئوية *Streptococcus pneumoniae* والعنقوديّة الذهبية *Staphylococcus aureus*).

4.4.3. تحديد التركيز المثبط الأدنى للزيت العطري الطيار لثمار القرنفل في وسط سائل:

تهدف هذه الدراسة إلى تحديد التركيز المثبط الأدنى للزيت العطري الطيار لثمار القرنفل ضد الجراثيم المدروسة حيث تم تحديد هذا التركيز في وسط سائل وبتماس مباشر ما بين الجرثوم والزيت لما في ذلك من أهمية في تحديد التركيز المثبط الأدنى (MIC) minimum inhibitory concentration، حيث تم تحضير سلسلة من التراكيز المتناقص لزيوت ثمار القرنفل في المرق المغزي LB broth بوجود 10% DMSO (0, 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100). وتم زرع السلالات الجرثومية (الكليسيلا الرئوية *Klebsiella pneumoniae*, الزائفة الزنجارية *Pseudomona aeruginosa*, العفديّة الرئويّة *Streptococcus pneumoniae*، العنقوديّة الذهبية *Staphylococcus aureus*) بتركيز 5×10^3 CFU/ml. بعد حوالي 24 ساعة من الحضان بدرجة حرارة 37 درجة مئوية. تم تقييم فيما إذا كان هناك أي تأثير مثبط أدنى للنمو الجرثومي باستعمال معايرة microplate alamar blue (Battah et al., 2019, 66) وتم تحديد التركيز المثبط الأدنى (MIC) minimum inhibitory concentration والتركيز القاتل الأدنى (MBC) minimum bactericidal concentration كما هو موضح بالجدول رقم (6). حيث بينت النتائج بأن الزيت العطري الطيار لزيوت ثمار القرنفل فعال ضد السلالات الجرثومية الثلاثة المدروسة (الكليسيلا الرئويّة *Klebsiella pneumoniae*, الزائفة الزنجارية *Pseudomona aeruginosa*، العفديّة الرئويّة *Streptococcus pneumoniae*، العنقوديّة الذهبية *Staphylococcus aureus*)، فكانت قيم التركيز المثبط الأدنى MIC تتراوح ما بين (6.25 µl/ml – 25 µl/ml).

وقد اتفقت نتائج دراستنا مع دراسة أخرى أجريت على مجموعة من السلالات المعزولة سريريا لجراثيم الزائفة الزنجارية *Pseudomona aeruginosa* حيث أظهرت الدراسة فعالية ملحوظة للزيت العطري الطيار لثمار القرنفل ضد هذه الجراثيم وكان التركيز المثبط الأدنى MIC يتراوح ما بين (5 – 18 mg/ml) (Chaie et al., 2007, 501). وفي دراسة أخرى أجريت لتقييم فعالية زيت ثمار القرنفل على جراثيم الإنتانات التنفسية أثبتت الدراسة فعالية الزيت العطري الفعال لثمار القرنفل ضد جراثيم العفديّة الرئويّة *Streptococcus pneumoniae*، حيث كانت قيمة التركيز المثبط الأدنى MIC (0.06mg/ml) (et al., 2019, 123). أثبتت الدراسات أيضا فعالية الزيت العطري الطيار لثمار القرنفل ضد جراثيم الكليسيلا الرئويّة *Klebsiella pneumoniae* والإشريكية القولونية *Escherichia coli* وكانت قيم التركيز المثبط الأدنى 0.078% حجم/حجم ضد الجرثومتين المدروستين (Kamilla, 2022, 25). وبالمقارنة مع دراسات أخرى كانت قيم التركيز المثبط الأدنى MIC (0.625 mg/ml) للزيت العطري الطيار لثمار القرنفل ضد جراثيم العنقوديّة الذهبية *Staphylococcus aureus* (Jian-Guo, 2016, 77). كما يمكن ملاحظة اختلافات بسيطة جداً ويمكن اعتبارها متساوية في التركيز المثبط الأدنى من الزيت بين الدراسات المختلفة وهذا يعود لعدة عوامل منها نسب المكونات الفعالة الموجودة في الزيت واختلاف السلالات الجرثومية المدروسة. وقد أثبتت الدراسات السابقة فعالية ملحوظة لزيوت ثمار القرنفل ضد العديد من السلالات الجرثومية المرجعية أو المعزولة سريريا، إيجابية أو سلبية الغرام وهذا يؤكد النتائج التي تم الحصول عليها ويثبت التأثير المضاد الجرثومي للزيت العطري لثمار القرنفل وبتركيز قليلة من الزيت.

الجدول رقم (7): يظهر الجدول التركيز المثبط الأدنى MIC والتركيز القاتل الأدنى MBC لزيوت ثمار القرنفل *clove fruit essential oil* ضد

سلالات جرثومية معزولة سريريا متعددة المقاومة على الأدوية MDR (الكليسيلا الرئويّة *Klebsiella pneumoniae*، الزائفة الزنجارية *Pseudomona aeruginosa*، العفديّة الرئويّة *Streptococcus pneumoniae*، العنقوديّة الذهبية *Staphylococcus aureus*)

Essential oil	MIC µl/ml <i>Streptococcus pneumoniae</i>	MBC µl/ml <i>Streptococcus pneumoniae</i>	MIC µl/ml <i>Staphylococcus aureus</i>	MBC µl/ml <i>Staphylococcus aureus</i>	MIC µl/ml <i>Klebsiella pneumoniae</i>	MBC µl/ml <i>Klebsiella pneumoniae</i>	MIC µl/ml <i>Pseudomonas aeruginosae</i>	MBC µl/ml <i>Pseudomonas aeruginosae</i>
<i>Clove fruit essential oil.</i>	6.25 µl/ml	12.5 µl/ml	6.25 µl/ml	12.5 µl/ml	6.25 µl/ml	12.5 µl/ml	25 µl/ml	50 µl/ml

5. الاستنتاجات والتوصيات:

بينت نتائج الدراسة على الزيت العطري الطيار لثمار القرنفل ومن خلال مقارنة النسب المئوية للمكونات الرئيسية للزيت وجد أن الأوجينول هو المكون الرئيسي في الزيت والذي بلغت نسبته فيه 81.3%. وبعد دراسة التأثير المضاد الجرثومي لزيت ثمار القرنفل الأساسي، أظهر الزيت فعالية ملحوظة مضادة لجراثيم إيجابية وسلبية الغرام معزولة سريريا ومتعددة المقاومة على المضادات الحيوية (الكليبيلا الرئوية، *Klebsiella pneumoniae*, الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa*, العفوية الرئوية *Streptococcus pneumoniae*، العفوية الذهبية *Staphylococcus aureus*)، حيث كانت قيم التركيز المثبط الأدنى MIC تتراوح ما بين (6.25µl/ml - 25µl/ml). هناك حاجة لمزيد من الدراسات للتحري من التأثير المضاد للمكروبات antibacterial لزيت ثمار القرنفل الأساسي و ذلك بإجراء دراسات فيروسية وجرثومية وفطرية و طفيلية أخرى، كما يوصى بإجراء دراسات السمية للخلايا cytotoxicity من أجل تقييم فعالية الزيت العطري الطيار لثمار القرنفل داخل جسم الكائن الحي *In vivo*.

المراجع

- أحمد صالح دهيمش، 1997، " مفردات النباتات الطبية وطرائق المعالجة بها (الجزء الأول)", دار النبتة؛ عمان. 40-55.
- الحسن شبانه، 2016، " كتاب النباتات لصحة الفم والأسنان"، مكتبة نور (مكتبة إلكترونية رقمية للكتب). 20-33.
- الورع حسان، 1997، " النباتات الطبية والعطرية"، منشورات جامعة حلب. 45-55.
- حسن آغا محمد عصام؛ الشماع عصام؛ النوري محمد سمير، 2012، " العقاقير وكيمياء العقاقير"، منشورات جامعة دمشق. 25-33.
- دهان محمد، 1992، " تكنولوجيا الزيوت"، منشورات جامعة حلب. 33-40.
- سالم مختار، 1987، " أعشاب لكنها دواء"، دار المريخ للنشر؛ الرياض. 12-17.
- محي الدين لبنية، 012، " التوابل - تصنيفها ومكوناتها وفوائدها العلاجية"، دار الصابوني للنشر والتوزيع؛ القاهرة. 19-23.
- Acs K, Balazs VL, Kocsis B, Bencsik T, Boszormenyi A, Horvath G .(2018). Antibacterial activity evaluation of selected essential oils in liquid and vapor phase on respiratory tract pathogens. *BMC Complement Altern Med* 18: 227.
- Battah B .(2021). Emerging of bacterial resistance: an ongoing threat during and after the Syrian crisis. *J Infect Dev Ctries* 15: 179-184.
- Battah B .(2022). Mesenchymal Stem Cells: Potential Role against Bacterial Infection. *Journal of Biosciences and Medicines* 10: 97-113.
- Battah B, Chemi G, Butini S, Campiani G, Brogi S, Delogu G, Gemma S (2019) A Repurposing Approach for Uncovering the Anti-Tubercular Activity of FDA-Approved Drugs with Potential Multi-Targeting Profiles. *Molecules*.24,66-75.
- Brozyna M, Paleczny J, Kozłowska W, Chodaczek G, Dudek-Wicher R, Felinczak A, Golebiewska J, Gorniak A, Junka A .(2021). The Antimicrobial and Antibiofilm In Vitro Activity of Liquid and Vapour Phases of Selected Essential Oils against *Staphylococcus aureus*. *Pathogens*, 10, 34-44.
- Choi H.S. ; Sawamura M. ; Kondo Y. (2002) *Jornal of Food Science*, 67, 13-18 .
- Felix D. ; Melle. J. P. ; Routaun Boka .(1997). *Handbook of plant and fungal toxicants"*, New-York, 120-125.
- Gurung J, Khyriem AB, Banik A, Lyngdoh WV, Choudhury B, Bhattacharyya P .(2013). Association of biofilm production with multidrug resistance among clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* from intensive care unit. *Indian J Crit Care Med* 17, 14-18.
- Hassan Ahmed Khan FKBRM. (2017). Nosocomial infections: Epidemiology, prevention, control and surveillance. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 478-482.
- Huet, R. , 1991, Les Huilles essentielles d'agrumes. *Fruits* , 46(5):51-57.
- H J Dorman, S G Deans (2000) Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *journal of applied microbiology*, 88, 32-45.
- IUPAC.(1965). Standard Methods of the oils and fats , 5th ed., Butter worth's, London. 345-350.
- Johnson C. B.; Kirby J. ; Naxakis G.; Pearson S.(1999). Substantial UV-B-mediated induction of essential oils in sweet basil (*Ocimum basilicum L.*)" , *Phytochemistry* , 51(4): 507-510.
- Jian-Guo Xu, Ting Liu, Qing-Ping Hu, Xin-Ming Cao .(2016). Chemical Composition, Antibacterial Properties and Mechanism of Action of Essential Oil from Clove Buds against *Staphylococcus au*. *Molecules* 21, 77-90.
- Jorgensen JH, Ferraro MJ (2009) Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clin Infect Dis* 49: 49-55.
- Kamel Chaieb, Hafedh Hajlaoui, Tarek Zmantar, Amel Ben Kahla-Nakbi, Mahmoud Rouabhia, Kacem Mahdouani, Amina Bakhrouf. (2007). The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzigium aromaticum L.* Myrtaceae): a short review. *pathology research*, 21, 501-506.
- Kamilla Ács, Viktória L.Balázs1, Béla Kocsis, Tímea Bencsik, Andrea Böszörményi, Györgyi Horváth (2022) Antibacterial activity evaluation of selected essential oils in liquid and vapor phase on respiratory tract pathogens. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18, 25-33.
- Kavanaugh NL, Ribbeck K .(2012). Selected antimicrobial essential oils eradicate *Pseudomonas spp.* and *Staphylococcus aureus* biofilms. *Appl Environ Microbiol* 78, 57-61.

- Miething Holger ; Seger Volkmar.(1989).Separation of non-polar compounds by droplet counter-current chromatography", J.Chromatographia, 2, 433-437.
- P.Anandhi, M.Tharani, S.Rajeshkumar, T.Lakshmi. (2022) . Antibacterial activity of cinnamon and clove oil against wound pathogens . Journal of Population *Therapeutics & Clinical Pharmacology*, 28, 41-46 .
- Pankaj Kumar Sagar, Poonam Sharma, Rambir Singh .(2019) Antibacterial efficacy of different combinations of clove, eucalyptus, ginger, and selected antibiotics against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *AYU journal*, 41, 123-129.
- Palucci I, Delogu G .(2018). Host Directed Therapies for Tuberculosis: Futures Strategies for an Ancient Disease. *Chemotherapy* 63, 172-180.
- Podschun R, Ullmann U .(1998). Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev* 11, 589-603.
- sharaddha dulal, sujan chaudhary, chirangibi dangi, shiv nandan sah (2021) antibacterial effect of essential oils (clove oil, castor oil and ginger oil) against human *pathogenic bacteria*. 4, 250-255.
- Solomon SL, Oliver KB .(2014). Antibiotic resistance threats in the United States: stepping back from the brink. *Am Fam Physician* 89: 938-941.
- Trimmen. H ; Bentley. R.(1992). *Medicinal plants* , Allied Book center, Dehradun India.333-350
- Wagner H. ; Bladt S.(1996). *Plant drug analysis* , spreinger– verlag , Berli-Heidelberg. 88-96.
- Wallis T. E. (1991).*Textbook of pharmacognosy*, Delhi-India. 435-450.
- Yang SK, Yusoff K, Thomas W, Akseer R, Alhosani MS, Abushelaibi A, Lim SH, Lai KS .(2020). Lavender essential oil induces oxidative stress which modifies the bacterial membrane permeability of carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae*. *Sci Rep* 10, 819-825.