

الفعالية ضد ميكروبية للمستخلصات المائية والكحولية والزيت الطيار لبتلات ورد الجوري *Rosa damascena L.*

بشرى علي كاظم

جامعة بغداد - كلية العلوم

bushraa45@yahoo.com

تاريخ قبول النشر: ٢٠١٣/٥/١٩

تاريخ استلام البحث: ٢٠١١/٢/٢٢

الخلاصة

استخدمت في هذا البحث بتلات ورد الجوري *Rosa damascena L.* في تحضير ثلاثة أنواع من المستخلصات هي المائية والكحولية والزيت الطيار. أجريت على المستخلصات المحضرة مجموعة من الكشوفات الكيميائية فضلاً عن استخدام جهاز مطياف الأشعة تحت الحمراء لتحديد المواقع الفعالة فيها. أشارت النتائج الى وجود المركبات الفعالة (السبغايات والقلويدات والصابونينات والفلافونويدات والتربينات والستيرويدات والزيت الطيار) في المستخلصات المحضرة من ورد الجوري، كما اختبرت الفعالية ضد ميكروبية لهذه المستخلصات لأحد عشر نوعاً من الاحياء المجهرية (شملت سبعة أنواع من البكتريا واربعة انواع من الفطريات) المعزولة من أخماج الجروح والحروق، أثبتت نتائج التحليل الاحصائي بأستخدام اختبار L.S.D عند مستوى إحصائية 0.05 أن التركيزين 100 و 250 ملغم/مل من المستخلص المائي هما MIC و MBC على التوالي لكل من *Proteus mirabilis* و *Escherechia coli* و *Candida albicans* ، فيما عد التركيزان 50 و 250 ملغم/مل من المستخلص المائي هما MIC و MBC على التوالي لكل من *Staphylococcus aureus* و *Burkholderia mallei* و *Candida tropicalis* ، اما فيما يخص *Proteus vulgaris* و *Epidermophyton floccosum* فقد كان التركيز 125 ملغم/مل مثبطاً لنموها فيما كان التركيز 250 ملغم/مل قاتلاً لهما. أكدت النتائج عدم وجود أي تأثير يذكر للمستخلص المائي على كل من *Pseudomonas aeruginosa* و *Trichophyton mentagrophytes* وبتراكيزه المحضرة كافة. كما أظهرت النتائج أن التركيزين 16 و 32 ملغم/مل هما التركيزان (المثبط والقاتل) على التوالي من المستخلص الكحولي لكل من *Proteus mirabilis* و *Pseudomonas flouresence* فيما كان التركيزان 4 و 32 ملغم/مل هما التركيزان (المثبط والقاتل) على التوالي من المستخلص الكحولي لكل من *Burkholderia mallei* و *Escherechia coli* و *Candida albicans* بالاضافة الى *Candida tropicalis*. كما أن نتائج هذا البحث قد بينت أن كلا من *Epidermophyton floccosum* و *Trichophyton mentagrophytes* و *Staphylococcus aureus* و *Proteus vulgaris* قد ثبت نموها وقتلت عند التراكيز (8 ، 16) و (8 ، 32) و (4 ، 16) و (8 ، 32) ملغم/مل من المستخلص الكحولي على التوالي. إضافة إلى ذلك فقد أشارت النتائج الى الفعالية التثبيطية للمستخلص الزيتي على نمو الاحياء المجهرية قيد الدراسة كافة وبتراكيز يتراوح ما بين (2:1) و (3:1) فيما كانت التراكيز القاتلة لها تتراوح ما بين (3:1) و (4:1).

الكلمات الدالة:

بتلات ورد الجوري ، المستخلصات الكحولية والمائية والزيت الطيار ، الكشوفات الكيميائية.

The anti- microbial activity of the aquatic, alcoholic and volatile oil extracts of *rosa damascena l. Petals*

Bushra Ali Kadhim

University of Baghdad/College of Science

Received date:22/2/2011

Accepted date:19/5/2013

Abstract

The Petals of *Rosa damascena L.* had used in this research to prepare three types of extracts which were aquatic, alcoholic and volatile oil . A set of chemical tests were made on these prepared extracts, as well as, using the Fourier Transform Infrared spectrophotometer to detect the active positions in these extracts. The results showed the foundation of some active compounds (Tannines, Alkaloides, Saponins, Flavonoides, Terpens, Steroids and Volatile Oil) in prepared extracts of *Rosa damascena L.*, as well as, the anti-microbial activity of these extracts was tested on eleven types of microorganisms (contain seven types of bacteria and four types of fungi) which were isolated from burns and wound infections. The results of stastical analysis by using L.S.D. test at probability level 0.05 had proved that the concentrations 100, 250 mg/ml of aquatic extract had considered as the MIC and MBC for *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* and *Candida albicans* respectively, while the two concentrations 50, 250 mg/ml of aquatic extract had considered as the MIC and MBC for *Staphylococcus aureus* , *Burkholderia mallei* and *Candida tropicalis* respectively, and about the concern of *Proteus vulgaris* and *Epidermophyton floccosum* , the concentration 125 mg/ml had inhibited their growth and the concentration 250 mg/ml had killed them . Also the results affirmed there was no affect of aquatic extracts on *Pseudomonas aeruginosa* and *Trichophyton mentagrophytes* in all prepared concentrations. The results showed that the two concentrations 16, 32 mg/ml of alcoholic extract were inhibited and killed for *Proteus mirabilis* and *Pseudomonas flouresence* respectively, while the two concentrations 4, 32 mg/ml of the same extract were inhibited and killed for *Burkholderia mallei*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, as well as, *Candida tropicalis* respectively. The results of this research also indicated that the growth of *Epidermophyton floccosum* , *Trichophyton mentagrophytes* , *Staphylococcus aureus* and *Proteus vulgaris* was inhibited and killed by the alcoholic extract at the concentrations (8, 16), (8, 32), (4, 16) and (8, 32) mg/ml respectively. As well as, the results reffered to the inhibitory activity of volatile oily extract on the growth of all microorganisms under study at the concentrations between (1:2) and (1:3), while the killed concentrations between (1:3) and (1:4).

Keywords: The Petals of *Rosa damascene* aquatic, alcoholic and volatile oil , chemical test,

المقدمة

يعد ورد الجوري *Rosa damascena L.* ملك الورد Queen of Roses لما يتمتع به من منظر جميل ورائحة فواحة، يعود هذا النبات الى رتبة Rosales عائلة Rosaceae جنس *Rosa* الذي يضم أنواعاً وأصنافاً تصل الى 75 نوع [1]. بدأ استخدام ورد الجوري من سكان حضارات العالم القديم مثل حضارات مصر والاعريق والرومان، وكان يستخدم في بادئ الامر للتعبير عن الحب والابتهاج والسلام لجمال منظره، بالإضافة الى استخدامه لعلاج حالات الاغماء والغيبوبة والاكتئاب لرائحته الفواحة، كما استخدمت بتلات الورد منذ القدم لخصائصها القابضة والمقوية في علاج حالات نزف

الرئتين والسعال وأمراض الحلق والنفس المتفرح [2]. يملك ورد الجوري خصائص علاجية عديدة منها خصائص مهدئة
Anti-depressant، حيث أكدت الدراسات والابحاث العلمية التي أجريت في مؤسسة شيكاغو لبحوث وعلاجات الطعم
والرائحة وجامعة نيوجيرسي الاميريكية أن لزيت الورد تأثيراً مهدئاً للاعصاب ومزياً للأكتئاب ويجعل الشخص أكثر قدرة
على التواصل مع الآخرين لاحتواءه على مركبات كيميائية خاصة تمد الجسم بنوع معين من القدرة الشفائية عن طريق
تحفيز وتنشيط قدرات الجسم العلاجية الذاتية الكامنة فيه ويدخل الزيت الطيار الى الجسم عن طريق الجلد والاستنشاق ويؤثر
بشكل رئيسي في الخلايا الدماغية خصوصاً تلك المتخصصة بالذاكرة والعواطف مما يؤدي الى تحسن في الجسم والنفس
والعواطف ويزيل التوتر والاكتئاب وقد وجد ان تأثير زيت الورد يفوق تأثير دواء (Philodendron) المستخدم لعلاج
الحالات النفسية مثل التوتر والشد العصبي والاكتئاب[3]، فضلاً عن ذلك فأن للورد خصائص مضادة للالتهاب Anti-
inflammatory ومضادة للفايروسات والبكتريا Anti- bacterial وAnti- viral ومضادة للتشنجات Anti-
spasmodic وينقي الدم من السموم وله قدرة عالية في معالجة الجفاف وتغذية وشد البشرة وازالة إحمرار الجلد والاكزما
والالتهابات الجلدية الناجمة من الاصابة بفايروس الهريس Herpes virus وإيقاف النزف الدموي، كما يستخدم في معالجة
الاضطرابات المعوية وكسل الامعاء وتخفيف آلام الدورة الشهرية في النساء ومعالجة حصيات الصفراء وأوجاع الرأس
والظهر وكما مادة مسهلة Laxative، ويعود الاستخدام الطبي الواسع للورد لاحتواءه على 300 مركب عضوي كيميائي مثل
الصابونينات والفلافونويدات والمساعدة الانزيمي Q1 وفيتامين E ومضادات الاكسدة Anti- Oxidant [4] لهذا أرتأينا في
هذا البحث تحضير مستخلصات مائية وكحولية والزيت الطيار لورد الجوري ودراسة فعاليتها ضد ميكروبية ضد بعض
أنواع الاحياء المجهرية المعزولة من أخماج الجروح والحروق.

المواد وطرائق العمل

تحضير العينات النباتية:

استخدمت في هذا البحث الاوراق التويجية (Petals) لورد الجوري حيث جمعت الازهار في فترة الربيع من تاريخ
2011/4/1م ولغاية 2011/5/20م من مجمع الجادرية بعدها فرزت الاجزاء الزهرية وأخذت الاوراق التويجية للورد
وغسلت بالماء المقطر للتخلص من الغبار والاجزاء العالقة بها وحفظت في علبة زجاجية نظيفة وجافة ومعقمة في الثلاجة

لحين الاستخدام، وقبل بدء عملية الاستخلاص بدقائق قطعت الاوراق التوجيهية بواسطة سكين صغيرة الى قطع صغيرة واستخدمت مباشرة في عملية الاستخلاص حفاظاً على زيتها الطيار.

تحضير المستخلصات النباتية

1- تحضير المستخلص المائي:

وزن (100 غم) من الاوراق التوجيهية المقطعة أنياً الى قطع صغيرة ووضعت في دورق زجاجي وأضيف اليها (500 مل) من الماء المقطر المغلي وترك ليبرد مع التحريك المستمر، ثم رشح المحلول عبر طبقات من الشاش ومن ثم بورق ترشيح Whatmann No.2، وأخذ الراشح وبخر بجهاز المبخر الدوار Rotary Evaporator بدرجة حرارة (40)°م لحين الحصول على سائل كثيف، بعدها جفف السائل في حاضنة بدرجة حرارة (37)°م ولمدة ثلاثة أيام الى ان يتكون مسحوق مجفف، حفظ هذا المسحوق في قنينة زجاجية نظيفة جافة ومعتمة ووضع في الثلاجة لحين الاستخدام [5].

2- تحضير المستخلص الكحولي:

وزن (100 غم) من الاوراق التوجيهية المقطعة أنياً الى قطع صغيرة ووضعت في دورق زجاجي واضيف لها (200 مل) من الكحول الايثيلي بتركيز (80%)، ترك الدورق في حاضنة هزازة لمدة (24) ساعة بدرجة حرارة (37)°م ، ثم نبذ المستخلص بجهاز الطرد المركزي بقوة (2500) دورة/دقيقة لمدة (10) دقائق بعدها رشح الراشح بورق ترشيح Whatmann No.2، ثم عرض الراشح للتبخير بأستخدام جهاز المبخر الدوار Rotary Evaporator لحين الحصول على سائل كثيف، بعدها جفف السائل بدرجة حرارة (37)°م لمدة ستة أيام للحصول على مسحوق مجفف بقنينة زجاجية نظيفة جافة ومعتمة في الثلاجة لحين الاستخدام [6].

3- تحضير المستخلص الزيتي:

وزن (200 غم) من الاوراق التوجيهية المقطعة أنياً بواسطة سكين الى قطع صغيرة ووضعت في دورق زجاجي وأضيف اليها (500 مل) من الماء المقطر، ثم وضع الدورق في جهاز الاستخلاص البخاري الكلافنجر (Klafinger) من نوع Gerhardt صيني المنشأ ، وتم تشغيل الجهاز حيث تمت عملية الاستخلاص لمدة (4) أيام وبواقع أربع ساعات لكل يوم، تم خلال هذه المدة استخلاص الزيت الطيار من الاوراق التوجيهية وأعيدت عملية الإستخلاص للحصول على أكبر

كمية من الزيت المستخلص من ماء الورد ووضع في قنينة زجاجية لفصل الزيت الطيار عن باقي المواد المستخلصة والموجود في ماء الورد استخدمت طريقة الفصل الملحي، حيث وضعت كميات متساوية من المستخلص المتجمع ومحلول ملحي (NaCl) بتركيز 1% وخلطت جيداً بعدها لوحظ تجمع طبقة الزيت الطيار للأعلى، سحبت بواسطة سرنجة معقمة، جمع بعدها في قنينة زجاجية نظيفة ومحكمة الغلق وحفظت في الثلاجة لحين الاستخدام [7].

الكشوفات الكيميائية للمجاميع الفعالة في ورد الجوري

لأجراء هذه الكشوفات حضر محلول من مستخلص الاوراق التوجيهية قيد الدراسة وذلك بوزن (10 غم) من مسحوق المستخلصات الثلاث المحضرة في الفقرات السابقة كل على حدى، وأذيب في (50 مل) من الماء المقطر المعقم وسخن الى درجة الغليان ثم رشح المحلول وترك الراشح ليبرد ووضع في بيكر زجاجي نظيف واستخدم لأجراء الفحوصات التالية:-

١-الكشف عن التانينات Tannins:

أخذ ١ مل من المحلول النباتي المحضر سابقاً واضيف له ١مل من ١% خلات الرصاص واستدل على وجود الدباغيات بظهور راسب هلامي القوام، كما أخذ ١مل من المحلول النباتي وأضيف له ١ مل من محلول كلوريد الحديدك ١% واستدل على وجود الدباغيات بظهور اللون الاخضر المزرق [٨].

٢-الكشف عن الصابونينات Saponins:

تم الكشف عن هذه المادة بإتباع طريقة [9] وكما يأتي :-

أ- وضع ٣ مل من المحلول النباتي في أنبوبة اختبار و ٣مل من محلول كحولي ورجت الانبوبة بشدة ،ان ظهور رغوة كثيفة ولمدة طويلة دليل على جود الصابونينات.

ب- اضيف ١ مل من محلول كلوريد الزئبق الى ٥مل من المحلول النباتي ،ان ظهور راسب ابيض دلالة على النتيجة الموجبة.

ج- اخذت أنبويتي أختبار ووضع في كل واحدة منهما ٥مل من ١٠% محلول الدم، ثم أكمل الحجم في كل انبوبة الى ١٠ مل بإضافة ٥مل من المحلول الفسيولوجي لاحدهما ، وللاخرى ٥مل من المحلول النباتي، ان تغير اللون وتحلل كريات الدم الحمر والذي يتم تأكيده بفحص قطرة من كل أنبوب على شريحة زجاجية بواسطة المجهر دلالة على النتيجة الموجبة.

٣-الكشف عن الفلافونويدات **Flavonoids**:

أذيب ١٠غم من المسحوق النباتي في ٥مل من الكحول الايثيلي ٩٥% ثم رشح المحلول، واضيف له كمية متساوية من مزيج من الكحول الايثيلي مع هيدروكسيد البوتاسيوم بتركيز ٥٠% ، وظهور اللون الاصفر هو دلالة على ايجابية الكشف [10] .

٤-الكشف عن القلويدات **Alkaloids**:

باستخدام كاشف ماير Mayer ، حيث وضعت كميات متساوية من كاشف ماير مع المحلول النباتي ومزجت جيداً في زجاجة ساعة وان ظهور جزيئاتٍ لراسبٍ أبيض هو دلالة على ايجابية الفحص [11] .

٥-الكشف عن الكلايكوسيدات **Glycosides**:

أخذت كمية من المحلول النباتي ووضعت في أنبوبة اختبار واضيف اليها بضع قطرات من حامض HCl ووضعت في حمام مائي مغلي لمدة دقيقتين ثم اضيف اليها (٢ مل) من كاشف بندكت ووضع المحلول في حمام مائي مغلي لمدة (٥) دقائق و بظهور راسب ابيض دلالة على ايجابية الفحص [12].

٦ -الكشف عن التربينات والستيرويدات:

أذيب ١غم من المستخلص النباتي في قليل من الكلوروفورم (١-٢) مل واضيفت اليه قطرة من حامض الخليك اللامائي وقطرة من حامض الكبريتيك المركز و ظهور اللون البني دلالة على ايجابية الفحص [13].

7- تقدير الأس الهيدروجيني (pH):

قدرت قيمة الدالة الحامضية للمحلول النباتي (pH) وذلك باستخدام جهاز pH meter عند درجة حرارة المختبر [9].

٨-الكشف عن الزيوت الطيارة:

أخذ (10 مل) من كل من المستخلصات النباتية المحضرة ورشحت بعد ذلك وشبعت بها اوراق الترشيح وعرضت الى مصــــدر للاشعة فوق البنفسجية إذ يدل ظهور اللون الوردي البراق على وجود الزيوت الطيارة [13].

٩-الكشف عن المجاميع الفعالة في المستخلص النباتي باستعمال جهاز (FTIR):

اضافة الى اجراء الفحوصات الكيميائية المذكورة في الفقرات السابقة، استخدم جهاز مطياف الاشعة تحت

الحمراء (FTIR- 8300) Fourier Transform Infra Red Sepctrophotometer والمجهز من شركة (Shi-

MADZU لتحديد وجود بعض المجاميع الفعالة في المستخلصات (المائية والكحولية والزيتية) المحضرة ، حيث تم الحصول على منحنيات بيانية وسجلت نتائجها.

تحضير التراكيز المختلفة للمستخلص المائي والكحولي والزيتي لورد الجوري

حضرت التراكيز المختلفة للمستخلص المائي والكحولي والزيت الطيار لورد الجوري لغرض استخدامها في دراسة تأثيراتها على مجموعة من البكتريا والفطريات الممرضة وكما يأتي:

1- المستخلص المائي:

حضر محلول خزين Stock Solution من المستخلص المائي وذلك بأذابة (30) غم من المستخلص المحضر في (100) مل من الماء المقطر المعقم، ثم عقم المحلول باستخدام أوراق ترشيح غشائية (Millipore Filter) وبقطر μm 0.45 وباستخدام جهاز التفريغ Vaccum لإتمام عملية التعقيم، ثم حضرت منه التراكيز التالية:-
(50، 100، 125، 250) ملغم/مل.

2- المستخلص الكحولي:

حضر محلول خزين من المستخلص المحضر بأذابة (8) غم منه في (100) مل من الماء المقطر المعقم، ثم عقم المحلول باستخدام أوراق ترشيح غشائية (Millipore Filter) وبقطر μm 0.45 وباستخدام جهاز التفريغ Vaccum لإتمام عملية التعقيم ، ثم حضرت منه التراكيز التالية:- (4، 8، 16، 32) ملغم/مل.

3- مستخلص الزيت الطيار:

حضرت تراكيز مختلفة (حجم/حجم) من المستخلص الزيتي بأستعمال زيت عباد الشمس لغرض التخفيف وهذه التراكيز هي (1:1، 2:1، 3:1، 4:1) وضعت بعدها في أنابيب محكمة الغلق [14] .

الجراثيم المستخدمة

استخدم في هذا البحث أحد عشر نوعاً من الاحياء المجهرية الممرضة والمعزولة من حالات التهابات الجروح والحروق من المرضى الراقدين في ردهات (الحروق والجراحية) في مستشفى الامام علي (عليه السلام) في مدينة بغداد، حيث أخذت المسحات بطريقة معقمة وزرعت على اوساط (اكار الدم وأكار الماكونكي) لعزل الانواع البكتيرية المسببة للالتهاب ووسط سابرويد دكستروز أكار Sabouraud's dextrose Agar للتحري عن الفطريات المسببة للالتهاب، حيث عزلت هذه الاحياء المجهرية وشخصت مختبرياً وأعتماًداً على [15، 16] وهي:-

Proteus mirabilis , Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas fluorescens, Staphylococcus aureus, Burkholderia mallei, Escherichia coli, Candida albicans, Candida tropicalis, Epidermophyton floccosum, Trichophyton mentagrophytes.

تحضير العالق البكتيري

حضر عالق جرثومي لكل من الانواع البكتيرية السبعة وذلك بنقل (1-3) مستعمرات مفردة الى أنابيب اختبار حاوية على (5 مل) من المحلول الملحي الفسيولوجي ورج الانبوب جيداً، بعدها تم معايرة عكورة هذا الانبوب مع الانبوب الثالث لماكفر لاند والمجهز من شركة Becton الامريكية والحاوي على ($10^8 \times 1.5$) خلية بكتريا/مل لإستخدامه لاحقاً وكما جاء في [17].

تحضير العالق الفطري

حضر عالق فطري لكل من الانواع الفطرية الاربعة وذلك بأخذ (3) حملات بالعروة (Loop) من المستعمرات الفطرية النامية ووضعت في انبوب حاوي على (10) مل من المحلول الملحي الفسيولوجي ورج جيداً ثم حضرت من هذا الانبوب تخافيف عشرية ولغاية التخفيف الثالث (10^{-3}) والذي استخدم في التجربة القادمة [18].

تأثير التراكيز المختلفة للمستخلصات المحضرة في نمو الاحياء المجهرية قيد الدراسة

لدراسة التأثير استخدمت طريقة الانابيب (tube method) [19] حو التالي:-

1- حضرت مجموعة من الانابيب لكل من التراكيز المختلفة للمستخلصات المائية والكحولية والزيتية حيث وضع في كل منها (0.5 مل) من التركيز المراد اختباراه.

2- أضيف لكل أنبوب (0.5 مل) من العالق المعايير والمحضر سابقاً لكل نوع من الاحياء المجهرية قيد الدراسة.

3- حضر أنبوب السيطرة السالب الذي يحتوي على (0.5 مل من التراكيز المختلفة للمستخلصات الثلاث كل على حدى مع

0.5 مل من محلول الملح الفسيولوجي)، كما حضر أنبوب السيطرة الموجب الذي يحتوي على (0.5 مل من عالق الاحياء

المجهرية قيد الدراسة كل على حدى مع 0.5 مل من محلول الملح الفسيولوجي) لمقارنة النمو.

4- حضنت الانابيب في حالة البكتريا عند درجة حرارة 37°C مدة (18) ساعة، اما في حالة الفطريات فحضنت عند درجة

حرارة 25°C مدة أسبوع.

5- قرئت النتائج بملاحظة العكورة ومقارنتها مع أنبوب السيطرة (الموجب والسالب)، ففي حالة البكتريا أخذ حجم (0.01 مل) من كل انبوب بضمنها أنابيب السيطرة الموجب والسالب وزرعت على أطباق حاوية على وسط الاكار المغذي بطريقة النشر وباستعمال الناشر Spreader وحضنت بدرجة حرارة 37°م مدة (18) ساعة، بعدها حسب عدد المستعمرات النامية

ومن خلالها حدد التركيز المثبط الأدنى (MIC) والتركيز القاتل الأدنى (MBC) لكل مستخلص وسجلت النتائج [20] [21]، أما في حالة الفطريات فقد حسب الوزن الجاف لكل الانابيب المحضنة بضمنها انابيب السيطرة الموجب والسالب بعد ترشيع محتوياتها وتجفيفها في الفرن الكهربائي عند درجة حرارة 40°م مدة (6) ساعات ومن خلال الفرق في الوزن حدد التركيز المثبط الأدنى والتركيز القاتل الأدنى لكل مستخلص وسجلت النتائج [22] .

6- أجري التحليل الاحصائي للنتائج كافة باستخدام إختبار L.S.D وعند مستوى احتمالية [23, 24].

النتائج والمناقشة

درست في هذا البحث الفعالية ضد ميكروبية للمستخلصات الثلاث المحضرة من ورد الجوري وهي المستخلص المائي والكحولي والزيت الطيار حيث أستخدم أحد عشر نوعاً من الاحياء المجهرية المعزولة من أخماج الجروح والحروق بضمنها سبعة انواع من البكتريا وأربعة انواع من الفطريات والجدولان (1) و (2) يوضحان نتائج تشخيص البكتريا والفطريات المعزولة على التوالي.

جدول (1): نتائج تشخيص الأنواع البكتيرية قيد الدراسة

E. col	P. flourescence	B. mallei	P. aeruginosa	S. aureus	P. vulgaris	P. mirabilis	11
-	-	-	-	+	-	-	Gram stain
Bacilii	Bacilii	Bacilii	Bacilii	Cocci	Bacilii	Bacilii	Shape of bacterial cell
+	-	-	-	+	+	-	Indol
+	-	+	-	-	+	+	Methyl red
-	-	-	-	+	-	-	Voges-Proskauer
-	+	+	+	+	+	+	Citrate utilization
+	-	-	+	+	+	+	Motility
B-haemolysis	B-haemolysis	B-haemolysis	B-haemolysis	B-haemolysis	B-haemolysis	B-haemolysis	Growth on blood agar
-	-	-	-	+	+	+	Urease

-	-	+	-	+	-	-	Mannitol fermentation
-	-	-	-	+	-	-	Coagulase
+	+	+	+	-	+	+	Catalase
-	+	+	+	-	-	-	Oxidase
+	-	+	+	+	-	-	Growth at 42C°
-	+	-	-	-	-	-	Growth at 4C°

جدول (2) نتائج تشخيص الانواع الفطرية قيد الدراسة

الفطر	لون المستعمرات	الصفة المميزة للسلبورات	تكوين الاثيوب الجراثومي	تحليل اليوريا عند درجة 37°C	تخمير الكلوز مع انتاج غاز	تخمير الكالكتوز مع انتاج غاز	تخمير السكر مع انتاج غاز
<i>Candida albicans</i>	كريمي او ابيض	سلبورات برعمية صغيرة وسلبورات كلاميدية كبيرة سمكية	+	+	+ مع غاز	+ بدون غاز	+ بدون غاز
<i>Candida tropicalis</i>	كريمي أو أبيض	سلبورات برعمية صغيرة وسلبورات كلاميدية كبيرة سمكية	-	-	+ بدون غاز	+ بدون غاز	+ بدون غاز
<i>Epidermophyton floccosum</i>	بيضاء وبتقدم العمر صفراء شاحبة	كونيدات كبيرة صولجانية والصغيرة لم تلاحظ	-	-	+ بدون غاز	-	+ بدون غاز
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	بيضاء قطنية	كونيدات كبيرة اسطوانية وصغيرة صولجانية	-	-	+ بدون غاز	+ بدون غاز	+ بدون غاز

أجريت للمستخلصات الثلاث المحضرة كشافات كيميائية لمعرفة محتواها من المواد الفعالة، إذ أشارت نتائج هذه الكشافات الى احتواء كل من المستخلصات المائية والكحولية والزيتية لورد الجوري على المركبات الفعالة مثل الدباغيات والصابونينات والفلافونويدات والقلويدات والتربينات والسيرويدات اضافة الى الزيت الطيار الفعال إذ تعد جميع هذه المركبات فعالة جداً ولها استخدامات طبية وهذه النتيجة تتفق مع [25,26,27] إذ تعد التانينات مواد فعالة جداً لامتلاكها لخصائص قطبية وقابضة لهذا لها فعلاً سريعاً في معالجة الجروح وتكوين أنسجة جديدة، بينما كانت نتيجة الكشف عن الكلايكوسيدات سالبة إذ ان المستخلصات الثلاث (المائية، الكحولية والزيتية) لورد الجوري أعطت نتيجة سالبة لهذا الفحص،

أما بالنسبة لقياس الاس الهيدروجيني للمستخلصات المحضرة فقد كانت جميعها حامضية إذ كان المستخلص المائي ذو أس هيدروجيني (pH=5.8) والمستخلص الكحولي (pH=4.9)، فيما كان المستخلص الزيتي ذو أس هيدروجيني (pH=5.5)، وهذه صفة مهمة جداً إذ أنه من المعروف أن غالبية البكتريا الممرضة تحبذ pH متعادل 7.2 فضلاً عن أن الفطريات الممرضة للإنسان تحبذ pH الحامضي إذ يضبط pH وسط سابرويد دكستروز أكار عند (6.5) لذا

فإن أي تغيير في الأس الهيدروجيني الملائم لنمو الأحياء المجهرية يؤدي إلى تثبيط نموها لانخفاض الفعالية الحيوية لانزيماتها الايضية [28]، والجدول (3) يوضح هذه النتائج.

جدول (3) نتائج الكشوفات الكيميائية النوعية للمركبات الفعالة في المستخلصات المحضرة

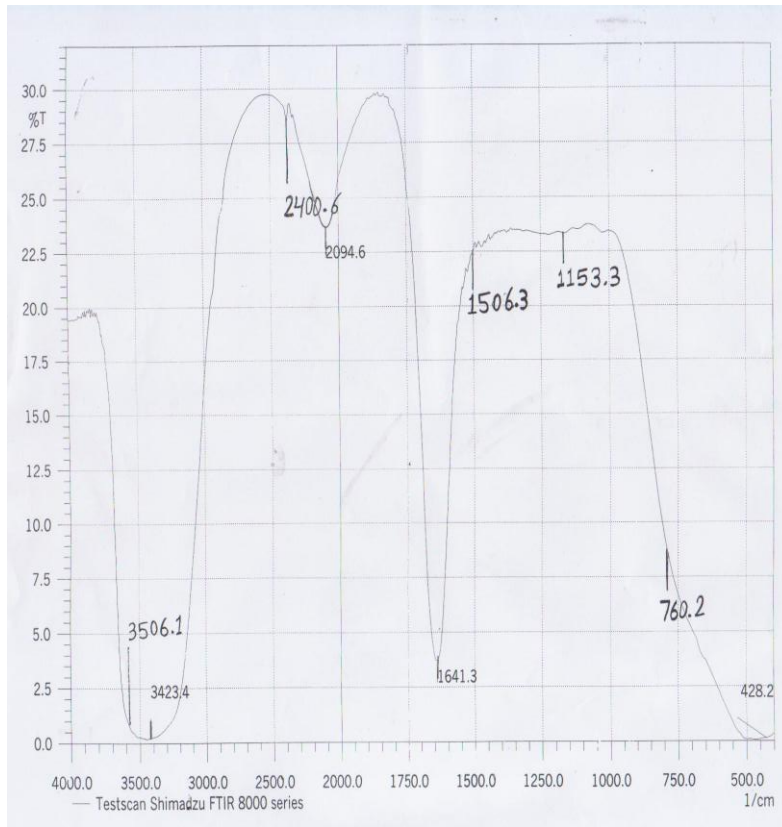
مستخلص ورد الجوري			المركب الفعال
الزيتي	الكحولي	المائي	
+	+	+	الدباغيات
+	+	+	الصابونينات
+	+	+	الفلافونويدات
+	+	+	تاقلويدات
+	+	+	التربينات
+	+	+	الستيرويدات
-	+	-	الكلايكوسيدات
+	-	+	الزيت الطيار
5.5	4.9	5.8	الاس الهيدروجيني

(+): تعني احتواء المستخلص على المركب الفعال

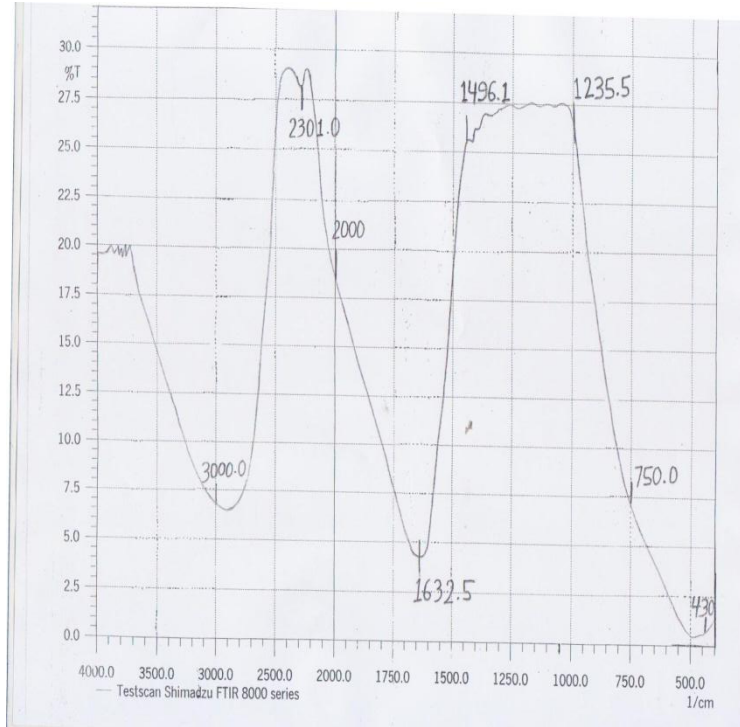
(-): تعني عدم احتواء المستخلص على المركب الفعال

أما فيما يخص الكشف عن المجاميع الفعالة للمستخلصات الثلاث باستخدام جهاز (FTIR)، فقد أظهرت منحنيات تحليل طيف الأشعة تحت الحمراء أن المستخلصات المائية والكحولية والزيتية لورد الجوري أظهرت نتائج متقاربة من حيث إحتوائها على مجاميع فعالة فقد لوحظ وجود مجموعة الهيدروكسيل الفعالة (OH) عند إمتصاصية تراوحت ما بين (3506-3000)، كما لوحظ ظهور متميز لمجموعة الامينات الفعالة (C=N) وبإمتصاصية تراوحت ما بين (2400-2200)، كما وجد ظهور المجموعة الاسترية ذات الاصرة المزدوجة (O=C-O) عند إمتصاصية تراوحت ما بين (1902-1641)، و مجموعة (C=C) الاروماتية عند إمتصاصية حزمية تراوحت ما بين (1641-1301) فضلاً عن ظهور مجموعة الاستر المفردة (C-O-C) وبإمتصاصية محصورة ما بين (1235-820)، وأخيراً لوحظ وجود امتصاصية

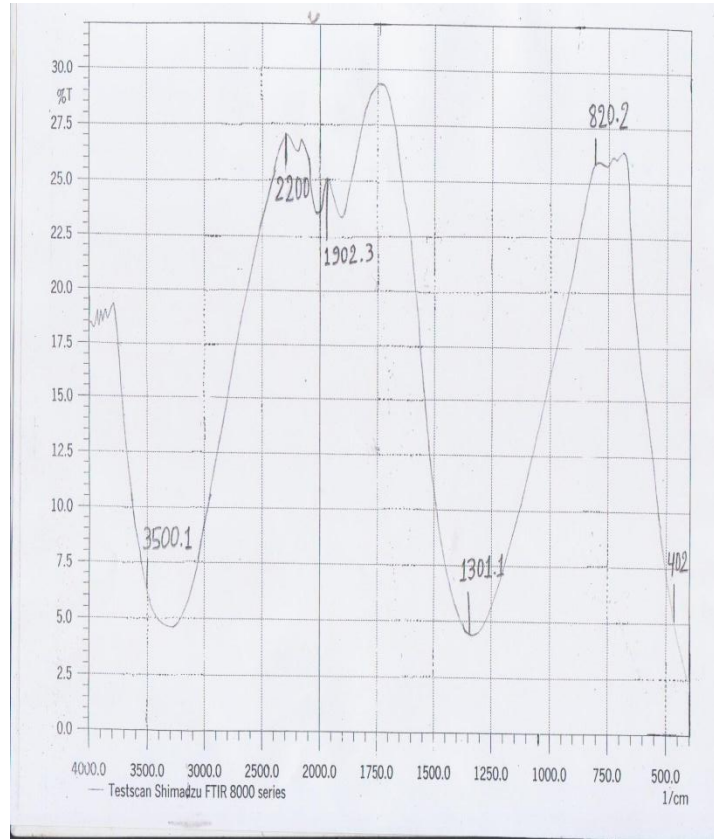
تراوحت ما بين (٤٠٢-٧٦٠) مما يدل على وجود المجاميع الاروماتية الفعالة وجميع هذه النتائج تتفق مع [29]، والذي يوضح الامتصاصية الحزمية المثالية لكل من المجاميع الفعالة السابقة الذكر، هذه النتائج فضلاً عن نتائج الكشوفات الكيميائية النوعية تؤكد وجود مركبات ومجاميع فعالة في المستخلصات المحضرة من ورد الجوري والأشكال (١) و(٢) و(٣) توضح هذه النتائج.



الشكل (١): منحنى تحليل طيف الاشعة تحت الحمراء للمستخلص المائي لورد الجوري



الشكل (٢): منحنى تحليل طيف الأشعة تحت الحمراء للمستخلص الكحولي لورد الجوري



الشكل (٣): منحنى تحليل طيف الاشعة تحت الحمراء للمستخلص الزيتي لورد الجوري

اما فيما يتعلق بدراسة تأثير التراكيز المختلفة المحضرة من المستخلصات الثلاث لورد الجوري على الاحياء المجهرية الممرضة والمعزولة من أخماج الجروح والحروق فقد اوضحت نتائج التحليل الاحصائي باستعمال إختبار L.S.D عند مستوى احتمالية 0.05 ما يلي:-

1- تأثير المستخلص المائي:

كان لهذا المستخلص تأثيراً على الاحياء المجهرية قيد الدراسة حيث وجد ان التراكيز 100 ملغم/مل منه هو التركيز المثبط الادنى لكل من *P. mirabilis* و *E. coli* و *C. albicans* فيما كان التركيز 250 ملغم/مل هو التركيز القاتل لها، كما تبين ان التركيز 50 ملغم/مل مثبطاً لنمو كل من *S. aureus* و *B. mallei* و *C. tropicalis* فيما كان التركيز 250 ملغم/مل قاتلاً لها، اما فيما يخص *P. vulgaris* و *E. floccosum* فقد كان التركيز 125 ملغم/مل مثبطاً لنموها فيما كان التركيز 250 قاتلاً لهما، فيما يتجلى لنا بوضوح عدم تأثر كل من *P.aeruginosa* و *T. mentagrophytes* بأي من تراكيز المستخلص المائي المحضرة في هذا البحث.

2- تأثير المستخلص الكحولي:

تبين من النتائج ان نمو كل من *B. mallei* و *E. coli* و *C. albicans* و *C. tropicalis* قد ثبت عند التركيز ٤ ملغم/مل فيما كان التركيز ٣٢ ملغم/مل قاتلاً لهم، كما يتضح ان التركيز ٨ ملغم/مل كان مثبطاً لنمو كل من *P. vulgaris* و *T. metagrophytes* فيما كان التركيز ٣٢ ملغم/مل قاتلاً لهما، اما فيما يخص كل من *P. mirabilis* و *P. flouresence* فقد كانت التراكيز (١٦ و ٣٢) ملغم/مل هي التراكيز المثبطة والقاتلة لها على التوالي، فيما تظهر النتائج ان التركيز ٨ ملغم/مل هو التركيز المثبط لنمو كل من *E. floccosum* و *P. aeruginosa* فيما كان التركيز ١٦ ملغم/مل تركيزاً قاتلاً للفطر *E. floccosum* فيما لم يبد أي تركيز قاتل لجرثومة *P. aeruginosa*.

٣- تأثير المستخلص الزيتي:

كان لهذا المستخلص تأثيراً على الاحياء المجهرية قيد الدراسة فقد كان التركيز ٢:١ مثبطاً لنمو كل من *P. aeruginosa* و *B. mallei* و *E. coli* و *C. albicans* فضلاً عن *C. tropicalis* فيما كان التركيز ٤:١ قاتلاً لهم، كما يتبين ان التركيز ٢:١ هو التركيز المثبط لنمو *P. flouresens* فيما عد التركيز ٣:١ قاتلاً لها، أما فيما يخص *P. mirabilis* و *P. vulgaris* و *E. floccosum* و *S. aureus* بالاضافة الى *T. mentagrophytes* فقد عد التركيز ٣:١ مثبطاً لنموهم فيما كان التركيز ٤:١ قاتلاً لهم.

مما تقدم من النتائج يتبين ان مستخلص الزيت الطيار لورد الجوري كان أفضل وأكثر تأثيراً على الاحياء المجهرية قيد الدراسة من المستخلص المائي والكحولي، حيث أنه قد ثبت نمو الاحياء المجهرية قيد الدراسة كافة بما فيها البكتريا والفطريات كما أنه استطاع ان يقتلها عند التركيز MBC، فيما استطاع المستخلص المائي ان يؤثر (تنشيط وقتل) على تسعة انواع من مجموع احد عشر نوعاً من الاحياء المجهرية قيد الدراسة، بينما لوحظ ان المستخلص الكحولي استطاع ان يثبط نمو الاحياء المجهرية قيد الدراسة عند التركيز MIC فيما استطاع ان يقتل عشرة من مجموع الاحياء المجهرية المستخدمة في البحث عند التركيز MBC، ان سبب هذه الاختلافات في القدرة على التنشيط والقتل يعود الى اختلاف طريقة الاستخلاص، كما قد يعزى الى ان مستخلص الزيت الطيار يحتوي على نسبة ١٠٠% من المواد البايولوجية القاتلة المثبطة لنمو الاحياء المجهرية كالدباغيات والصابونينات والفلافونويدات والقلويدات والتربينات والسترويدات (كما اثبتته نتائج الكشوفات الكيميائية وتحليل طيف الاشعة تحت الحمراء) فيما يحتوي المستخلص الكحولي والمائي على أقل من نسبة

١٠٠% من هذه المواد الفعالة البايولوجية والتي أدت الى هذا الاختلاف في التأثير على الاحياء المجهرية الممرضة قيد الدراسة، كما تشير النتائج ان فاعلية المستخلص المائي والكحولي والزيتي في علاج اخماج الجروح والحروق التي تسببها كلاً من *P. mirabilis* و *P. vulgaris* و *P. flourescence* و *S. aureus* و *B. mallei* و *E. coli* و *C. albicans* و *C. tropicalis* و *E. floccosum*، إذ أظهرت هذه المستخلصات الثلاث من التأثير على هذه الاحياء المجهرية (البكتريا والفطريات) وعند تراكيز مختلفة من MIC و MBC والتي اختلفت بحسب طبيعة كل كائن مجهري وهذا يعود الى احتواء تلك المستخلصات على مواد فعالة بايولوجياً كالقلويدات (كما اثبتته نتائج الكشوفات الكيمائية وتحليل طيف الاشعة تحت الحمراء) إذ أن لهذه المواد تأثيراً مضاداً للاحياء المجهرية من خلال ايقافها صنع الاحماض النووية في الخلية الحية المجهرية بتنشيط عمل انزيم DNA gyrase كما تؤثر في الوقت نفسه على المساعدات الانزيمية Co-enzyme التي تنتج في داخل الخلية المجهرية مثل folic acid [31,30]، فضلاً عن احتواء هذه المستخلصات على الانزيمات والكلايكوسيدات والزيت الطيار والتي تعد من المواد البايولوجية الفعالة في علاج الحروق ونزف الجروح لتأثيرها القابض للاوعية الدموية والمسكن للالم فضلاً عن ان لزيت الورد الطيار ترددات تتراوح ما بين ٥٢ - ٣٢٠ هيرتز والتي لها تأثيراً قاتلاً للاحياء المجهرية [34,33,32] مما تقدم نستنتج ان المستخلص المائي والكحولي والزيت الطيار لورد الجوري يمكن استخدامه في علاج اخماج الجروح والحروق التي تسببها مجموعة من البكتريا والفطريات ولاسيما قيد الدراسة، فيما بينت نتائج هذا البحث عدم تأثر كلاً من بكتريا *P. aeruginosa* والفطر *T. mentagrophytes* بأي من التراكيز المحضرة من المستخلص المائي لورد الجوري حصراً على الرغم من وجود المركبات الفعالة فيه وهذا قد يعزى الى كون هذين الكائنين المجهريين يتأثران بتراكيز اعلى من المستخلص المائي لورد الجوري من تلك المحضرة في دراستنا الحالية او أن هذا قد يعزى الى تعرض تلك الاحياء المجهرية الى مؤثرات خارجية فضلاً عن تعرضها الى مضادات حيائية وبجرع مختلفة اثناء علاج الانسان للامراض والاصابات التي تحدثها مما يكسبها المقاومة تجاه التأثير التنشيطي او القاتل للمضادات المايكروبية سواء كانت مضادات حيائية أم مركبات طبيعية فعالة مثل المستخلصات النباتية، كما ان ذلك قد يعود الى طبيعة البناء الخلوي للكائن المجهري والميكانيكية التي يمتلكها هذا الكائن في مقاومة تأثير المواد العلاجية المختلفة مثل الادوية

والمستخلصات النباتية [29] ، أو أن سبب هذه المقاومة أو عدم التأثر يعود إلى قدرة تلك الأحياء المجهرية لإنتاج إنزيمات
أيضية لها القدرة على تحليل المركبات الفعالة الموجودة في هذه المستخلصات كالأواصر

الأروماتية والأمينية والهيدروكسيلية التي يتحللها تنتج طاقة حيوية تستفاد منها الأحياء المجهرية نفسها في تكاثرها
ونموها [32]، والجدولان (٤) و(٥) يوضحان هذه النتائج.

جدول (٤): نتائج اختبار MIC و MBC للمستخلصات الثلاث لورد الجوري على الأنواع البكتيرية قيد الدراسة*

المستخلص الزيتي ٣		المستخلص الكحولي ٢		المستخلص المائي ١		البكتريا
MBC	MIC	MBC mg/ml	MIC mg/ml	MBC mg/ml	MIC mg/ml	
٤:١	٣:١	٣٢	١٦	٢٥٠	١٠٠	<i>P. mirabilis</i>
٤:١	٣:١	٣٢	٨	٢٥٠	١٢٥	<i>P. vulgaris</i>
٤:١	٢:١	-	٨	-	-	<i>P. aeruginosa</i>
٣:١	٢:١	٣٢	١٦	١٢٥	٥٠	<i>P. flouresens</i>
٤:١	٣:١	١٦	٤	٢٥٠	٥٠	<i>S. aureus</i>
٤:١	٢:١	٣٢	٤	٢٥٠	٥٠	<i>B. mallei</i>
٤:١	٢:١	٣٢	٤	٢٥٠	١٠٠	<i>E. coli</i>

-: لا يوجد تركيز قد أثر على البكتريا

*: استخدام اختبار L.S.D عند مستوى احتمالية 0.05

١: الانحراف المعياري لمعدل عدد المستعمرات في حالة المستخلص المائي يساوي ٠,٤٧

٢: الانحراف المعياري لمعدل عدد المستعمرات في حالة المستخلص الكحولي يساوي ٠,٨١٦

٣: الانحراف المعياري لمعدل عدد المستعمرات في حالة المستخلص الزيتي يساوي ٠,٤١

MIC: التركيز المثبط الأدنى

MBC: التركيز القاتل الأدنى

جدول (٥) نتائج اختبار MIC و MBC للمستخلصات الثلاث لورد الجوري على الأنواع الفطرية قيد الدراسة*

المستخلص الزيتي ٣		المستخلص الكحولي ٢		المستخلص المائي ١		الفطر
MBC	MIC	MBC mg/ml	MIC mg/ml	MBC mg/ml	MIC mg/ml	
٤:١	٢:١	٣٢	٤	٢٥٠	١٠٠	<i>C. albicans</i>
٤:١	٢:١	٣٢	٤	٢٥٠	٥٠	<i>C.tropicalis</i>
٤:١	٣:١	١٦	٨	٢٥٠	١٢٥	<i>E.floccosum</i>
٤:١	٣:١	٣٢	٨	-	-	<i>T.mentagrophytes</i>

-: لا يوجد تركيز قد أثر على الفطر

*: استخدام اختبار L.S.D عند مستوى احتمالية 0.05

١: الانحراف المعياري لمعدل الوزن الجاف في حالة المستخلص المائي يساوي ١,٢٤

٢: الانحراف المعياري لمعدل الوزن الجاف في حالة المستخلص الكحولي يساوي ١,٦٩

٣: الانحراف المعياري لمعدل الوزن الجاف في حالة المستخلص الزيتي يساوي ١,٥٣

MIC: التركيز المثبط الأدنى

MBC: التركيز القاتل الأدنى

المصادر

1. A. H. A.Al- Musawi: Plant Taxonomy. Dar Al- Kuttub for Printing and Publishing/Mosul- Iraq (1987).
2. Rose and Rose Legand: Therapeutical Application and New Finding.. Herbalist of MDidea Extracts Professional, 20th, Dec. (Article) (2010).
3. T. Blanks, S. Brown, B. Cosgrave, J. Woody, V. Bentley, N. O'sullivan, and N. Graydon,: The Body Shop Book of Well Being Mind, Body and Soul. London: Ebury Press. PP. (173-192) (2007) .
4. S. S. Garg,: Essential Oil As Therapeutics Natural Products Radiance. Amer. J. Pharmaco., 4: (18-26 (2005)).
5. H. M. Ali, Effect of Some plant Extracts Against *Entamoeba histolytica* That Growing in Culture Media. M. Sc. Thesis. Baghdad. Iraq (2007).
6. S. A. Zokian, Study of Biological Efficiency of Water and Ethanolic Extracts of Local *Equisetum arvense* L. M. Sc. Thesis. Baghdad- Iraq(2005).
7. A. S. Meklef,: Effect of Nitrogen Fertilizer on Growth, Volatile Oil Yield and Quality of Lemon Grass Plant *Cymbopogon citratus* (D. C.) Stapf. and the Effect of Its' Oil on Growth of Number of Fungi. Ph. D. Sc. Thesis. Baghdad- Iraq (2000).
8. I. M. Shihata, Apharmacological Study of *Anagollis arvensis*. M. D. Vet. Thesis. Cairo- Egypt (1951).
9. W. C. Evans,: Trease and Evans Pharmacog nosy. London. Philadelphia. Bailliere Tindall (1999)
10. H. J. Jaffer, M. J. Mahmod, A. M. Jwad, A. Naji, and A. Al- Nab: Phytochemical and Biological Screening of Some Iraqi plants. Fitoterapia, LIX, 299(1983) .

11. B. Fuhrman, M. Rosenblat, T. Tayek, K. Colemon, and M. Aviram: Ginger Extract Consumption reduces plasma Cholesterol, Inhibits LDL Oxidation and Attenuates. The medical Sciences and Ramabam Medical Center. Palestine; 130: 1124- 1131 (2000).
12. B. Abu- Shanab, G. Adwan, D. Abu- Safiyam and K. Adwan: Antibacterial Activities of some plant Extracts Utilized in Popular Medicine in Palestine. Turk. J. Bio., 28: 99-102 (2004).
13. Indian Herbal Pharmacopeia.: A joint Publication of Regional Research Laboratory, Council of Scientific and Industrial Research. Janmutawi, 1: (1-10) (1998) .
14. S.M Hadi: The Anti-microbial Activity of *Rosmatinus officinalis L.* Volatile Oil on Some Pathogenic Microorganisms . M. Sc. Thesis. Baghdad- Iraq . (2007)..
15. E. Jawetz, J. L. Melnic, and E. A. Adelberg,: Review of Medical Microbiology. 22th ed. Lange Medical Publications, Los Altos, California(2010) .
16. B. A. Forbes, D. F. Sahn, and A. S. Weissfeld,: Baily and Scotts' Diagnostic Microbiology. 18th ed. The C. V. Mosby Company (2005).
17. National Committee for Clinical Laboratory Standards.: Approved Standard: M7- A6. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria That Grow Aerobically, 6th ed. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa(2003).
18. J. A. Morello, H. E. Mizer and P. A. Granato,: Laboratory Manual and Workbook in Microbiology, Applications to Patient Care. 8th ed. McGrawHill, 269-272(2006) .
19. R. M. Perz, G. Y. Lagunam and A. Walkowski: Diuretic Activity of Mexican Equisetum. J. Ethano Pharmacol., 14 (2-3) , (1995)
20. S. Trakulsomboon, T. Kummalue, and W. Tiratcharriyakul,: Antibacterial Plants, J. Med. Assoc.Thia, 98 (9): 1466- 1473(2006) .
21. E. W. Koneman, S. D. Allen, W. M. Janade, P. C. Schreckenberger, and W. C Winnm: Koneman's Color Atlas and Text book of Diagnostic Microbiology. 6th ed. Pub. Lippincott William and Wilkins. (2005).
22. K. S. Bilgrami, and R. N. Verma: Physiology of Fungi. 2nd. ed. National Book Trust of India for Printing and Publishing(1988) .

23. A. Saleh, and M. Samer The Stastical Analysis by using SPSS Program. Al- Shorooq for Publishing and printing. Oman- Jordin (1998).
24. K. M. Al- Rawi: Introduction to Statistics. Dar Al- Kuttub for Printing and Pablishing- Mosul/Iraq(2000).
25. D. H. Taylor, D. L. Morris, D. Reffin, and K. S. Richards: Comparison of Albendazole, Mebendazole and Paraziquantel Chemotherapy of *E. histolytica* in Gerbil Model. Gut, 30: 1401- 1405(1999).

26. A. A. Latef,: The Antagonism Activity of some Local plant Extracts on Pathogenic Bacteria. M. Sc. Thesis. Babylon- Iraq (1998).
27. F. A. Mustafa, and A. Habash: The Antimicrobial Activity of Some Medical Plants. 5th Scientific Conference, College of Science- University of Babylon 19-20 May, CSASC Ar. V., 5: (243- 259) (2010).
28. M. R. Al- Saad: The Principle of Microbial Physiology. Dar Al- Kuttub for printing and publishing, Mosul- Iraq (1982).
29. Pantida, Kahwal; M. S. Bhatia, R. K. Thappa and K. L. Dhar: Sesonal Variation of Active Compound of Some Medical Plants. Ind. J. planta Medical., 48: 81- 82(1983) .
30. M. M. Cowan: Plant Products As Antimicrobial Agent. 12 (4): 564- 574, (1999).
31. G. Bertram and J. Anthony: Pharma- cology (Examination and Board Review). Appleton and Lange. Los Altos- California- USA. P. (267- 270) (1993).
32. F. T. Kuttub: The Medical Plants: Agriculture and Component. Dar Al- Marik for publishing and Printing, Suadia Arabia(1981) .
33. A. A. Al- Shamaa: Chemotherapy and Medical plants Chemistery. Dar Al- Kuttub for Printing and Publishing- Mosul/Iraq(1989):.
34. Pioneer Enterprise Company, :Medical Plants, J. P. Herbal. 1:16-20 (2001)

