تأثير الزيت الطيار لنبات الآس *Myrtus communis* في نمو وفعالية بعض الأنواع البكتيرية المرضية وخميره *Candida albicans*

صفاء الدين احمد شنتر القيسي*

تاريخ قبول النشر 2007/11/7

الخلاصة:

أجري البحث على الزيت الطيار المستخلص من أوراق نبات الآس*Myrtus Communis* لدراسة تأثيره في نمو وفعالية الانواع البكتيرية *Staphylococcus aureus* ، *Streptococcus pyogenes* ، *Klebsilla pneumoniae* ، *Pseudomonas aeruginos*a فضلاً عن خميره *Candida albicans* .أظهرت النتائج ان للزيت الطيار تأثير مثبطاً تجاه نمو وفعالية المايكروبات المختبرة ، حيث كان التركيز المثبط الادنى (MIC) Minimum Inhibitory Concentration للأنواع البكتيرية *S. aureus* ,*S.pyogenes*, *E.coli* ,*P.aeruginosa*. كالأتي (5 , 2.5 , 1.25 , 2.5) % على التوالي وبالنسبة للخميرة هو (5) % فيما كان التركيز القاتل الأدنى (MBC) Minimum Bactericidal Concentration للأنواع البكتيرية أعلاه هو (10 , 5 , 2.5 , 5) % على التوالي وللخميرة هو (10) %.

المقدمة :

الى وقت ليس ببعيد ونتيجة لدخول المضادات الحيوية المصنعة كيميائياً في المجالات الطبية لم يعد هناك مجال لأستخدام مستخلصات النباتات الطبية كمضادات للأحياء المجهرية ، وبالنظر لخصوصية ومحدودية فعالية بعض المضادات تجاه بعض المسببات المرضية فضلاً عن تأثيراتها الحياتية ، والمقاومة التي تنتج من قبل الأحياء المجهرية تجاهها تم الرجوع مرة أخرى الى أستخدام النباتات والاعشاب الطبية في بلدان كثيره من العالم (1)ومن هذه النباتات التي لها فعالية طبية هو نبات الأس *Myrtus communis* والذي يصنف من رتبة الأسيات Myrtales وهي تعود للعائلة الأسية Myrtaceae(2,3) وقد اظهرت العديد من الدراسات التي قام بها بعض العلماء والباحثين ان لمستخلصات اجزاء مختلفة من نبات الاس وكذلك الزيت الطيار ان لها تأثيراً فعالاً ومثبطاً للعديد من الميكروبات ومنها البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام والكثير من الانواع الفطرية والخمائر(4,5,6,7,8,9,11,12), ولما للزيت الطيار لنبات الاس من اهمية طبية اجريت الدراسة لمعرفة تاثير هذا الزيت في نمو وفعالية بعض الانواع البكتيرية الموجبة والسالبة لصبغة كرام وكذلك خميرة *C.albicans* و المعزولة من حالات مرضية مختلفة وذلك باستخدام طريقة التخافيف الدقيقة باستخام الوسط الغذائي السائل(Broth micro titer dilution methods) والتي تستخدم لأول مرة لتقدير تأثير التراكيز المختلفة للزيت الطيار المستخلص من نبات الاس حيث تعطي نتائج اكثر دقة من بقية الطرق المستخدمة.

المواد وطرائق العمل :-

2-1 الأوساط الزرعية المستخدمة :-

تم تحضير الأوساط الزرعية المدرجة أدناه حسب تعليمات الشركة المجهزة وضبط الأس الهيدروجيني لها الى الرقم (7)، ثم عقمت بالمؤصدة عند درجة حرارة (121) مْ وضغط (15) باوند/ انج² ولمدة (15) دقيقة وتضمنت هذه الأوساط :-

1-وسط المرق المغذي Nutrient Broth (NB) :-

وأستعمل لتنمية عزلات البكتريا وتنشيطها وهذا الوسط مجهز من شركة Oxoid .وحضر بأذابة 13 غم في لتر من الماء المقطر.

2-وسط الاكار المغذي Nutrient Agar (NA) :-

أستعمل الوسط لدراسة فعالية الزيت الطيار تجاه العزلات البكتيرية وكذلك لحفظ العزلات وهومجهز من شركة Biolife وحضر باذابة 23 غم في لتر من ألماء المقطر.

3- وسط أكار الماكونكي (MA) MacConkey Agar :-

أستعمل الوسط لتنمية البكتريا السالبة لصبغة كرام وهو مجهز من شركة Oxoid وحضر بأذابة 51.5غم في لتر من الماء المقطر .

4- وسط أكار السبروید (SDA) Sabouraud Dextrose Agar :-

أستخدم هذا الوسط لتنمية وحفظ عزلات خميره *C. albicans* ولفحص حساسيتها تجاه الزيت الطيار ، وهو مجهز من شركة Mast Diagnostics حضر بأذابة 50 غم في لتر من الماء المقطر.

* المدرس المساعد جامعة بغداد/كلية العلوم للبنات/قسم علوم الحياة

5- وسط بطاطا دكستروز السائل (PDB) Potato Dextrose Broth :-

حضر الوسط مختبرياً وحسب تعليمات شركة (Oxoid) وعقم بنفس الطرق السابق واستخم الوسط لتنمية الخميره وعمل فيه التخافيف.

2.2- تحضير عينة نبات الأس:-

تم الحصول على أوراق نبات الأس *Myrtus communis* الخضراء وقد جمعت العينات من مناطق الكرادة والجادرية والسيدية في مدينة بغداد ، جرى ذلك خلال شهري كانون الثاني وشباط لسنة 2006 .

2.3 استخلاص الزيت الطيار Extraction of Essential Oil:-

أتبع في ذلك طريقة(13) وكالأتي:-

1-جمعت اوراق النبات وغسلت جيداً بالماء المقطر وقطعت الأوراق الى قطع صغيرة الحجم

2-ثم وضعت في الدورق الزجاجي لجهاز استخلاص الزيت الطيار Clavanger وأضيف اليها الماء المقطر بنسبة (1:5) حجم/ وزن حيث وزن (100) غرام من اوراق النبات الطرية ، واضيف لها (500) مل من الماء المقطر.

3- استخلص الزيت لفترة تراوحت بين الساعتين الى أربع ساعات وبدرجة حرارة (100) مْ

4- أستبدلت العينة النباتية لحين جمع كمية كافية من الزيت في قنينة زجاجية معقمة ومعتمة وحفظ في الثلاجة بدرجة حرارة (4) مْ.

2.4 جمع العزلات البكتيرية والخميره:-

تم الحصول على العزلات البكتيرية والخميره من مختبر الصحة المركزي التابع لوزارة الصحة حيث تم عزل الانواع البكتيرية والخميره من عينات مرضية شخصت هناك وذلك من خلال اجراء مجموعة من الفحوصات البايوكيميائية لغرض التشخيص .

2.5 تحضير عالق البكتريا والخميره:-

حضر عالق البكتريا والخميره وذلك بنقل جزء من مزروع الانواع البكتيرية والخميره النامية على اوساطها الصلبة الى انبوبة اختبار حاوية على (10) مل من الوسط السائل (NB) و (PDB) المعقم ، وبعد مدة حضانة (18) ساعة وبدرجة حرارة (37) م ، عملت تخافيف للمزروع تضاعفية وحددت الكثافة الضوئية للمزروع المخفف بأستخدام جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer وعلى طول موجي قدره (420) نانوميتر .

3- دراسة تأثير الزيت الطيار لنبات الأس في نمو وفعالية الانواع البكتيرية والخميره:-

أتبعت في ذلك طريقة التخافيف الدقيقة بأستخدام الوسط الغذائي السائل (Broth Micro dilution method), (14)

وتمت كالأتي :-

1-عقمت مجموعة من الأنابيب الزجاجية ذات سدادات بلاستيكية محكمة وأضيف اليها (0.1) مل من عالق البكتريا والخميره حسب التخافيف المناسبة.

2-أضيف حجم (300) مايكرولتر من الوسط الغذائي السائل (NB) للبكتريا وللخميره (PDB) على التوالي للانابيب أعلاه.

3-أضيف للانابيب مادة Tween 80 بتركيز (0.3) % لكافة الانابيب.

4-أضيف الزيت الطيار الى الانبوب رقم (1) ليكون فية تركيز الزيت (20)% .عملت تخافيف متسلسلة من التركيز اعلاه وذلك بنقل (100) مايكرولتر من الانبوب (1) الى الانبوب (2) وهكذا لبقية الانابيب لحين الوصول الى الانبوب الذي فية تركيز الزيت (0.31)% فكانت النسب المئوية للزيت الطيار في الانابيب كالاتي :(0.31, 0.62, 1.25, 2.5, 5, 10, 20).على التوالي.

5-حضنت الانابيب لمدة (24) ساعة وبدرجة حرارة (37) مْ بعد ذلك أخذت (100) مايكرولتر من كل تركيز ووضعت في طبق زجاجي معقم وصب الوسط الصلب المعقم والمبرد لـ (45-50) مْ ومزج جيداً لكي يتجانس الوسط مع المزروع وتركت الاطباق لمدة زمنية لحين تصلب الوسط ثم حضنت الاطباق بدرجة حرارة (37) مْ ولمدة (24-48) ساعة ثم عمل ثلاث مكررات لكل تركيز. وبعد ذلك تم حساب عدد المستعمرات النامية لكل تركيز ومقارنتها مع معاملة السيطرة والذي يحتوي على جميع المكونات السابقة الذكر بدون أضافة الزيت الطيار .

4- دراسة تأثير الزيت الطيار لنبات الأس في النسبة المؤية لتكوين الانبوب الجرثومي لخميره *C. albicans*:

حضرت انابيب اختبار معقمة اضيف في كل انبوب (0.5) مل من بلازما الدم ، اخذت مستعمرة من خميره *C. albicans* نامية في وسط زرعي صلب واضيفت الى البلازما ثم اضيف اليها احجام مختلفة من الزيت الطيار للحصول على التراكيز :(0.31, 0.62, 1.25, 2.5, 5, 10, 20).% ، حضنت الانابيب بدرجة حرارة (26) م .

تم حساب عدد الخلايا المكونة للأنبوب الجرثومي بعد ساعة من مدة الحضانة وأستمر ذلك لمده (10) ساعات وذلك بأخذ قطرة من كل تركيز على شريحة

زجاجية وفحصت مجهرياً . تم مقارنة النتائج مع السيطرة.

التحليل الاحصائي / استخدم اختبار دنكن متعدد الحدود لمعرفة (Duncan Test),(15) لمعرفة معنوية تأثير التراكيز وتحت اي مستوى من مستويات الاحتمالية يكون هذا التاثير .

النتائج والمناقشة:

يتبين من الجدول (1) انه هناك تأثيركبير للزيت الطيار لنبات الأس في نمو وفعالية مختلف الانواع البكتيرية والخميرة قيد الاختبار وقد تناسب تأثير الزيت تناسباً طردياً مع التركيز حيث اضهرت التراكيز المختلفة للزيت تأثيراً مضاداًومتدرجاً للنمو لكافة الانواع المختبرة مقاساً بلوغارتم عدد الخلايا الحية حيث بلغ التركيز القاتل الادنى (**MBC**) لبكتريا *S.aureus* هو (5)% و *K.neumomiae* هو(5)% و *S.pyogenes* هو (2.5)% و *P.auroginos* هو (10)%اما بالنسبة لخميرة *C.albicans*فكانت قيمة التركيز القاتل الانى هي (10) % ، ونلاحظ من خلال النتائج ان قيمة التركيز المثبط الانى (**MIC**) للانواع البكتيرية هي (5 ، 1.25 ، 2.5 ، 2.5)% للأنواع , *P.aeruginosa* , *S.pyogenes* , *K . pneumoniae* ,*S. aureus* على التوالي في حين كان التركيز القاتل الادنى لخميره *C. albicans* هو (5)% (جدول رقم -1-) اظهرت نتائج التحليل الاحصائي وجود فروق معنوية عالية تحت مستوى احتمالية ($P<0.05$) ,اما بالنسبة للتراكيز الاخرى فكان تأثيرها اقل في الانواع قيد الاختبار. يتميز الزيت الطيار لنبات الاس بانه يحتوي على مستويات عالية من مركبات monoterpene hydrocarbon اهمها هو مركب Pinene- ومركب Limonene وCamphene و Linalool و1,8Cineole وTerpineol وLinalyl acetate وهي من المركبات الفينولية المهمة والفعالة من الناحية الطبية (17,16).و قد يعزى سبب قابلية زيت الأس في تثبيط نمو الانواع البكتيرية والخميرة الى قدرة هذا الزيت والذي هو عبارة عن مركبات تربينية احادية على تحليل جدار الخلية كما انه يؤدي الى اضعاف الفعاليات الحيوية داخل الخلية وذلك من خلال التداخل مع وظيفة الغشاء السايتو بلازمي متمثلة بعملية بناء البروتين وبالتالي تثبيط وايقاف هذة العملية وكذلك اعاقة عملية النقل الفعال للايونات والاملاح عبر هذا الغشاء(18).

ان دور الزيوت العطرية في تثبيط نمو الكائنات الحية المجهرية يعود بالاساس الى قدرتها على اضعاف الفعاليات الايضية الابتدائية ومنها فعالية Succinate dehydrogenase وارتباطه مع الـ NADH فضلاً عن ايقاف عملية الفسفرة التأكسدية وسلسلة انتقال الاكترونات التي تجري في خلال عملية التنفس للخلية. ويتضح من خلال النتائج التي تم الحصول عليها في هذة الدراسة انها تتطابق مع ما ذكره (9) والذي اوضح من خلال دراسته ان للزيت الطيار لنبات الاس تاثيرا مثبطا لنمو بعض الانواع البكتيرية الموجبة والسالبة لصبغة كرام وبعض الخمائر والفطريات في حين جاءت بعض النتائج مخالفة لماذكره (4) والذي اوضح من خلا ل دراسته ان المستخلص المائي الاوراق نبات الاس الحاوي على الزيت الطيار تاثيرا مثبطاً للبكتريا الموجبة لصبغة كرام في حين لم يكن له تاثيرا مثبطا للبكتريا السالبة لصبغة كرام قيد الاختبار.

أما بالنسبة لنتائج تأثير الزيت الطيار في النسبة المئوية لتكوين الانبوب الجرثومي في خميرة *C.albicans* ,يتضح من خلال الجدول (2) ان للزيت الطيار فعالية تثبيطية تامة تجاه تكوين الانبوب الجرثومي للخميرة عند التراكيز (20,10)% وللساعات العشرة على التوالي، اما التراكيز الاقل من ذلك فأظهرت تأثيراً مضاداً متدرجاً في النسبة المئوية لتكوين الانبوب الجرثومي مع زيادة التركيز. وتبين من خلال نتائج التحليل الاحصائي وجود فروق معنوية وتحت مستوى احتمالية (0.05) عند التراكيز (20,10,5,2.5)%

ويمكن ان تعزى قابلية الزيت الطيار في تثبيط قدرة الخميرة على تكوين الابوب الجرثومي الى ان هذا الزيت يؤدي الى حصول عملية نضوب في الطاقة داخل خلية الخميرة فضلاً عن تأثر مجموعة من الفعاليات الايضية داخل الخميرة بفعل الزيت منها انتاج الايثانول ethanol production وعملية انتاج السبورات Sporulation . (17)

جدول (1) تأثير تراكيز مختلفة من الزيت الطيار لنبات الاس في حيوية خلايا الانواع البكتيرية وخميرة*C.albicans*

CFU* / الجراثيم	تراكيز الزيت الطيارلنبات الأس (%)							عامل السيطره Control
	20	10	5	2.5	1.25	0.62	0.31	
S. aureus	0 ±0.00 F	0 ±0.00 F	0±0.00 F	8±1.00 E	20 ± 1.55 D	80 ± 2.55 C	168±1.55 B	220 ±0.00 A
K.Pneumoniae	0 ±0.00 D	0 ±0.00 D	0±0.00 D	3 ±0.57 D	40 ±2.00 C	96 ±1.52 B	204 ±6.65 A	208 ±0.00 A

S. pyogenes	0 ±0.00 E	0 ±0.00 E	0±0.00 E	0 ±0.00 E	13 ±3.00 D	88 ±1.73 C	193 ±3.51 B	200 ±0.00 A
P.aeruginosa	0 ±0.00 F	0 ±0.00 F	20± 2.00 E	49 ±2.64 D	88 ±4.163 C	168 ±0.00 B	268 ±3.05 A	273 ±0.00 A
C. *albicans*	0 ±0.00 G	0 ±0.00 G	11 ± 1.52 F	50 ±2.08 E	95 ±0.577 D	186 ±1.15 C	251 ±1.00 B	255 ±0.00 A

*CUF: Colony Forming Unit

□ **الحروف المختلفة افقياً يعني وجود فرق معنويعند مستوى احتمالية(P<0.05)**

جدول (2) تأثير تراكيز مختلفة من الزيت الطيار لنبات الاس في النسبة المئوية لتكوين الانبوب الجرثومي لخميرة*C.albicans*

النسبة المئوية لتكوين الانبوب الجرثومي في خلايا الخميرة										
عدد ساعات المعاملة / تراكيز الزيت الطيار لنبات الاس(%)	الاولى	الثانية	الثالثة	الرابعة	الخامسة	السادسة	السابعة	الثامنة	التاسعة	العاشرة
% 20	0±0.00 E	0±0.00 C	0±0.00 E	0±0.00 E	0±0.00 E	0±0.00 E	0±0.00 F	0±0.00 G	0±0.00 D	0±0.00 G
% 10	0±0.00 E	0±0.00 C	0±0.00 E	0±0.00 E	0±0.00 E	0±0.00 E	0±0.00 F	0±0.00 G	0±0.00 D	0±0.00 G
% 5	2±0.00 D	2±1.00 C	3±0.00 D	6±0.00 D	8±1.52 D	11±0.57 D	13±0.57 E	15±1.00 F	17±0.57 C	21±1.33 F
% 2.5	3±1.00 CD	3±0.00 BC	5±0.57 D	6±0.57 D	9±1.00 D	13±1.55 D	16±0.00 E	18±0.00 E	20±0.00 C	29±0.57 E
% 1.25	4±0.57 C	6±0.57 B	9±1.52 C	16±1.66 C	20±0.00 C	22±0.57 C	29±0.66 D	35±0.00 D	40±0.57 B	42±0.00 D
% 0.62	6±0.00 B	10±2.00 A	11±1.15 BC	20±0.57 B	27±0.57 B	36±1.00 B	40±2.88 C	51±1.33 C	69±1.15 A	73±2.40 C
% 0.31	8±1.00 A	11±2.30 A	13±0.57 B	24±1.00 A	28±0.00 B	41±1.00 A	46±0.77 B	60±1.15 B	73±1.00 A	80±2.00 B
عامل السيطرة	8±0.00 A	12±0.00 A	16±0.00 A	26±0.00 A	35±0.00 A	41±0.00 A	50±0.00 A	66±0.00 A	73±0.00 A	86±0.00 A

□ **الحروف المختلفة عمودياً يعني وجود فرق معنوي عند مستوى احتمالية(P<0.05)**

المصادر:

1. Cowan, M.M. .1999.Plant Products as Antimicrobial agent. Clinical Microbiol.Rev.12 (4):564-582.
2. Chakravarty, H.L. 1976.Plant Wealth of Iraq (A dictionary of economic Plants) Vol.1 Botany directorate of Agricultural agravian Reform, Iraq, Baghdad.
3. الكاتب، يوسف منصور.2000.تصنيف النباتات البذرية. الطبعة الثانية .وزارة التعليم العالي والبحث العلمي.دار الكتب للطباعة والنشر،جامعة الموصل
4. Degrtyarova, A. P. 1962. Antimicrobial in *Myrtus communis*, *Eucalyptus Leavopinea* and *E.wilkinsonian*.Tr.Cas.Nikitsk, Botan. 36: 173-186.
5. Degrtyarova, A.P., and Poch inok, V.Ya. 1960. Physico Chemical and antibacterial Properties of Crystalline Substance isolated from the *Myrtus communis*, *Eucalyptus Leavopinea* and*E.wilkinsoniana*.for.Zh ur.(Kieve),15(6):47 -52.
6. Aplyak, I.V. and Degtyarova, H.P. 1963.Study of the antimicrobial effect of substance isolated from myrtie on the micro flora in canned food. Mikro.Biol.Shur.Akad. 25(6):19-23.
7. Deborrah, Rawal, B.D.,and Griffin, W.J. 1974.Antimicrobial action of the essential oil of some Australian myrtaceae with Special references to the activity of chromatographic fractions of oil of *Eucalyptus citriodora*. Plant medica, 26(2):184-189.

8. الزهيري, أحمد محمود حسين. 1982. دراسة بعض الصفات الكيميائية والدوائية لنبات الاس. رسالة ماجستير, جامعة بغداد, كلية الطب البيطري.

9. Rasool,I;Moosavi,M.L.;Rezaee,M.B. and Jamiand,K. 2002.Susceptibility of Microorganisms to *Myrtus communis* L. Essential oil and its chemical Composition J. of Agric. Sic. and Tech. 4 :3-4.

10. Bouzouita, N.; Kachouri, F.; Hamdi, M. and Chaabonui, M.M. 2003.Antimicrobial activity of essential oil from Tunisian aromatic Plants .Flavo.and Fragr.J.18 ;(5):380-383.

11. Divadison.P.M. 1993. Parabens and Phenolic Compounds.P.263-306 In P.M. Divadison and A.L.Branen(ed), Antimicrobials in food,2nd ed. New Yourk: Marcel Dekker, Inc.

12. Encyclopedia of Medicine: Aromatherapy- http://health.enotes.com/medicine-encyclopedia.2007 eNotes.com LLC.

13. Tassou, C.C.; Koutsoumanis, K. and Nychas, G.-J.E. 2000.Inhibition of *Salmonella enteridis* and *Staphylococcus aureus* in nutrient broth by essential Food Res.Inter. 33:273-280.

14. Hammer, K.A.; Carson, C.F.and Riely, T.V. 1999.Antimicrobial activity essential oil and other plant extract.J.Appli.Microbiol.86:985-990.

15. Duncan, J.I. 1955.Multiple F-test Multiple Range test.Biomietric. 1(1): 1-42.

16. Friis, I., Ed-Edwards, S., Desse, M.and Hedberg. 1995. Myrtaceae in Flora of Ethiopia and Eritrea (Addis Ababa), 2:71-106.

17. Naidu, A. S.; Bidlack, W.R.and Crecelins. 2000. Phytoantimicrobials in: Natural Food Antimicrobial System Aidu, A.S.eds, CRC (press, New York, 325-417).

18. Knobloch,K.: Weis,N.& Weigand..1986. Mechanism of antimicrobial activity of essential oil. Plant medica. 52; 556.

Effect of Volatile Oil of *Myrtus communis* on growth and activities of some types of Pathogenic Bacteria and *Candida albicans*

Safaa Al-Denn Ahmed Shanter Al-Qaysia*

*Assistant lecturer/ Department of Biology, College of Science for Women, University of Baghdad

Abstract:

This Study aimed to studying the effect of Volatile oil extracted from the leaves of *Myrtus communis* on the growth and activities of the following types of bacteria: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsilla pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and the yeast *Candida albicans*. The results showed an inhibitory effect of the oil on both the growth and activity of the tested microbes. This was reflected by the minimum inhibitory concentration (**MIC**) of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsilla pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* which was*:* (2.5, 1.25, and 2.5,5 % respectively), and the yeast (5) %. Also, the Minimum bactericidal concentration (**MBC**) to the bacteria mentioned above was (5, 2.5,5,10 % respectively) while the yeast was (10) %.

Key words: *Myrtus communis,* volatile oil, pathogenic bacteria