

## 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 aeruginosa* فضلاً عن خميره *Candida albicans*. أظهرت النتائج ان للزيت الطيار تأثير مثبطاً تجاه نمو وفعالية المايكروبات المختبرة ، حيث كان التركيز المثبط الأدنى (MIC) Minimum Inhibitory Concentration للأنواع البكتيرية *S. aureus* ، *S. pyogenes* ، *E. coli* ، *P. aeruginosa* كالتالي ( 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 لاستخدام مستخلصات النباتات الطبية كمضادات للأحياء المجهرية ، وبالنظر لخصوصية ومحدودية فعالية بعض المضادات تجاه بعض مسببات المرضية فضلاً عن تأثيراتها الحياتية ، والمقاومة التي تنتج من قبل الأحياء المجهرية تجاهها تم الرجوع مرة أخرى الى استخدام النباتات والاعشاب الطبية في بلدان كثيرة من العالم ( 1 ) ومن هذه النباتات التي لها فعالية طبية هو نبات الآس *Myrtus communis* والذي يصنف من رتبة الأسيات Myrtales وهي تعود للعائلة الأسيية Myrtaceae (2,3) وقد اظهرت العديد من الدراسات التي قام بها بعض العلماء والباحثين ان لمستخلصات اجزاء مختلفة من نبات الآس وكذلك الزيت الطيار ان لها تأثيراً فعالاً ومثبطاً للعديد من الميكروبات ومنها البكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام والكثير من الانواع الفطرية والخمائر (4,5,6,7,8,9,11,12)، ولما للزيت الطيار لنبات الآس من اهمية طبية اجريت الدراسة لمعرفة تأثير 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 التخفيف الدقيقة باستخدام الوسط الغذائي السائل (Broth micro titer dilution methods) والتي تستخدم لأول مرة لتقدير تأثير التراكيز المختلفة للزيت الطيار المستخلص من نبات الآس حيث تعطي نتائج اكثر دقة من بقية الطرق المستخدمة.

### المواد وطرائق العمل :-

#### 1-2 الأوساط الزرعية المستخدمة :-

تم تحضير الأوساط الزرعية المدرجة أدناه حسب تعليمات الشركة المجهزة وضبط الآس الهيدروجيني لها الى الرقم ( 7 ) ، ثم عقرت بالمؤسدة عند درجة حرارة ( 121 ) م° وضغط ( 15 ) باوند/ انج<sup>2</sup> ولمدة ( 15 ) دقيقة وتضمنت هذه الأوساط :-

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

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

#### 2-وسط الأكار المغذي (NA) Nutrient Agar :-

أستعمل الوسط لدراسة فعالية الزيت الطيار تجاه العزلات البكتيرية وكذلك لحفظ العزلات وهو مجهز من شركة Biolife وحضر بأذابة 23 غم في لتر من الماء المقطر .

#### 3- وسط أكار الماكونكي (MA) MacConkey

#### Agar :-

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

#### 4- وسط أكار السبرويد (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 .

أُتبع في ذلك طريقة التخفيف الدقيقة باستخدام الوسط الغذائي السائل (Broth Micro dilution method), (14)

وتمت كالاتي :-

1- عقت مجموعة من الأنابيب الزجاجية ذات سدادات بلاستيكية محكمة وأضيف إليها (0.1) مل من عالق البكتريا والخميره حسب التخفيف المناسبة.

2- أضيف حجم (300) مايكرو لتر من الوسط الغذائي السائل (NB) للبكتريا وللخميره (PDB) على التوالي للأنابيب أعلاه.

3- أضيف للأنابيب مادة Tween 80 بتركيز (0.3) % لكافة الأنابيب.

4- أضيف الزيت الطيار الى الأنبوب رقم (1) ليكون فيه تركيز الزيت (20) % . عملت تخفيف متسلسلة من التركيز اعلاه وذلك بنقل (100) مايكرو لتر من الأنبوب (1) الى الأنبوب (2) وهكذا لبقية الأنابيب لحين الوصول الى الأنبوب الذي فيه تركيز الزيت (0.31) % فكانت النسب المئوية للزيت الطيار في الأنابيب كالاتي: (0.62، 0.31، 1.25، 2.5، 5، 10، 20) . على التوالي.

5- حضنت الأنابيب لمدة (24) ساعة وبدرجة حرارة (37) م° بعد ذلك أخذت (100) مايكرو لتر من كل تركيز ووضعت في طبق زجاجي معقم وصب الوسط الصلب المعقم والمبرد لـ (45-50) م° ومزج جيداً لكي يتجانس الوسط مع المزروع وتركت الاطباق لمدة زمنية لحين تصلب الوسط ثم حضنت الاطباق بدرجة حرارة (37) م° 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 اضافة الزيت الطيار .

4- دراسة تأثير الزيت الطيار لنبات الأس في النسبة المئوية لتكوين الأنبوب 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 الأنابيب بدرجة حرارة (26) م° .

تم حساب عدد الخلايا المكونة للأنبوب الجرثومي بعد ساعة من مدة الحضانة وأستمر ذلك لمدة (10) ساعات وذلك بأخذ قطرة من كل تركيز على شريحة زجاجية وفحصت مجهرياً . تم مقارنة النتائج مع السيطرة.

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

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

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 استخراج الزيت الطيار Extraction of Essential Oil :-

Essential Oil :-

أُتبع في ذلك طريقة (13) وكالاتي:-

1- جمعت اوراق النبات وغسلت جيداً بالماء المقطر وقطعت الأوراق الى قطع صغيرة الحجم ثم وضعت في الدورق الزجاجي لجهاز استخراج 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) م°

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

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 انبوية اختبار حاوية على (10) مل من الوسط السائل (NB) و (PDB) المعقم ، وبعد مدة حضانة (18) ساعة وبدرجة حرارة (37) م° ، عملت تخفيف للمزروع تضاعفية وحددت الكثافة الضوئية للمزروع المخفف باستخدام جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer وعلى طول موجي قدره (420) نانوميتر .

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

هذه العملية وكذلك اعاقا 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 الاكتروونات التي تجري في خلال عملية التنفس للخلية. ويتضح من خلال النتائج التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة انها تتطابق مع ما ذكره (9) والذي اوضح من خلال دراسته ان للزيت الطيار لنبات الاس تأثيراً مثبطاً لنمو بعض الانواع البكتيرية الموجبة والسالبة لصبغة كرام وبعض الخمائر والفطريات في حين جاءت بعض النتائج مخالفة لما ذكره (4) والذي اوضح من خلال دراسته ان المستخلص المائي الاوراق نبات الاس الحاوي على الزيت الطيار تائيراً مثبطاً للبكتريا الموجبة لصبغة كرام في حين لم يكن له تأثيراً مثبطاً 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 (10, 20) % ولل ساعات 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)

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

### النتائج والمناقشة:

يتبين من الجدول (1) انه هناك تأثير كبير للزيت الطيار لنبات الاس في نمو وفعالية مختلف الانواع البكتيرية والخميرة قيد الاختبار وقد تناسب تأثير الزيت تناسباً طردياً مع التركيز حيث اظهرت التراكيز المختلفة للزيت تأثيراً مضاداً ومتدرجاً للنمو لكافة الانواع المختبرة مقياساً بلوغارتم عدد الخلايا الحية حيث بلغ التركيز القاتل الاذنى (MBC) ليكتريا *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 الاذنى هي (10) % ، ونلاحظ من خلال النتائج ان قيمة التركيز المثبط الاذنى (MIC) للانواع البكتيرية هي (5 ، 1.25 ، 2.5 ، 2.5) % للانواع ، *P.aeruginosa* ، *S.pyogenes* ، *K . pneumoniae* ، *S. aureus* على التوالي في حين كان التركيز القاتل الاذنى 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* و *Camphene* و *Linalool* و *1,8Cineole* و *Terpineol* و *Linalyl acetate* وهي من المركبات الفينولية المهمة والفعالة من الناحية الطبية (16, 17). وقد يعزى سبب قابلية زيت الاس 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 الساييتو بلازمي متمثلة بعملية بناء البروتين وبالتالي تثبيط وايقاف

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

CFU* الجراثيم	تراكيز الزيت الطيار لنبات الاس (%)							عامل السيطرة Control
	20	10	5	2.5	1.25	0.62	0.31	
<i>S. aureus</i>	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
<i>K.Pneumoniae</i>	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
<i>S. pyogenes</i>	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
<i>P.aeruginosa</i>	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
<i>C. albicans</i>	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 أفقياً يعني وجود فرق معنوي عند مستوى احتمالية ( $P<0.05$ )

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

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

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

الكتب للطباعة

والبحرث العلمي. دار  
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*

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

- In P.M. Divadison and A.L.Branen(ed), Antimicrobials in food, 2<sup>nd</sup> 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. Biometric. 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.
  - 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

## 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