تأثير مستخلص كحول الايثر النفطي الحار والبارد لاوراق الزيتون *Olea europea* في نمو بعض انواع البكتريا الممرضة

انعام عبد القادر حسن

جامعة بغداد / كلية التربية – ابن الهيثم

الخلاصة:

استهدفت الدراسة الحالية تاثير مستخلص كحول الايثر النفطي الحار والبارد لاوراق نبات الزيتون *Olea europea* في نمو اربع عزلات من البكتريا، عزلتان من البكتريا السالبة لملون غرام *Escherichia coli, Klebsiella sp.* وعزلتان من البكتريا الموجبة لملون غرام *Staphylococcus epidermis, S. aureus* اظهرت نتائج الفعالية التثبيطية لمستخلص اوراق الزيتون الحار والبارد تفاوتا في تاثيرهما تجاه البكتريا المشمولة بالدراسة اذ كان مستخلص الاوراق الحار اكثر فعالية تثبيطية مقارنة بمستخلص الاوراق البارد وكانت بكتريا*S. epidermis* الاكثر تاثيرا وبقطر تثبيط (1.6,1.4,1.2,1) سم وعند التراكيز (500,250,125,62.5) ملغم/مل، في حين لم تظهر اي نوع من العزلات اربع اي نوع من الاستجابة التثبيطية تجاه المستخلص البارد عدى بكتريا *Klebsiella sp.* وبقطر تثبيط (1)سم عند التركيز (500)مغلم/مل،

لقد اظهر الكشف عن الفلافونات في المستخلص المذكورين وجود المادة الفعالة فيهما.

المقدمة:

يعود نبات الزيتون *Olea europea* الى العائلة الزيتونية Oleaceae (1) تستخدم خلاصة اوراق هذا النبات في علاج العديد من الامراض مثل الانفلونزا، وضغط الدم وداء السكري ومضاد للبكتريا والفايروسات والطفيليات والفطريات، وذلك يعود لاحتواء اوراق الزيتون على العديد من المركبات الكيميائية phytochemicals ، اذ تشير الدراسات الى وجود مركب فينولي يسمى (Oleuropein) وهو مركب مضاد للاكسدة antioxidant ومثبط للجذور الحرة ومؤكسد جيد للبروتينات الدهنية المنخفضة الكثافة low density lipoproteins بالاضافة الى هذا المركب

تحوي اوراق الزيتون فلافونات اخرى مثل rutin flavonol, lutolin_7_glucoside flavones and hesperidin flavanone (2) وهي مركبات ايضية ثانوية تبنى في النبات كأستجابة لاصابة مايكروبية او نتيجة الجروح وهي تتكون من حلقة اروماتية واحدة او اكثر ومجموعة واحدة او اكثر من OH^- (4,3).

في السنين الاخيرة لوحظت الفائدة من المنتجات الطبيعية وبالاخص الحاوية على الفينولات والفينولات المتعددة حيث يعتقد ان لها دور في الصحة وتخفيف احتمال الاصابة بالامراض المزمنة حيث يوجد اكثر من 6000 مركب فينولي مكتشف لحد الان (4) بعد ان كان 800 مركب في فترة السبعينات من القرن الماضي (3). ولذلك فقد استهدفت الدراسة الحالية احد النباتات الحاوية على الفينولات المستعملة على نطاق واسع في بلدنا وتاثير هذا النبات على بعض انواع البكتريا الممرضة الشائعة.

المواد وطرائق العمل:

جمع العينات النباتية: تم جمع العينات النباتية من اوراق الزيتون المحلي في بغداد اذ قطفت الاوراق ثم نظفت وجففت بالظل وطحنت الاوراق بواسطة المطحنة، ثم وضعت في قناني معتمة ومعقمة بدرجة حرارة الغرفة حرارة (1–7) ايام لحين الاستعمال (5).

العزلات والاوساط الزرعية: اخذت من المستشفى من حالات الاصابة بالتهاب المجاري البولية وحالات الاسهال والتهاب العيون وشخصت في مختبر الاحياء المجهرية في كلية التربية / ابن الهيثم.

طريقة الكشف عن الفلافونات: اتبعت طريقة (10) للكشف عن الفلافونات حيث غلى (10)غم من مسحوق اوراق الزيتون الجاف مع (50)مل من الكحول الاثيلي (95%)، رشح المحلول وترك ليبرد ثم اضيف بضع قطرات من محلول كلوريد الحديديك (1%)، ودل ظهور اللون الاخضر المزرق على احتواء المستخلص على الفلافونات.

المضادات الحيوية: استعملت كل من المضادات الحيوية المضادة للبكتريا الاتية: (25mcg) Amoxicillin, (10 mcg) streptomycin, (100mcg) Piperacillin, (10mcg) Imipenem, (30mcg) Vancomycin, (10mcg) Gentamycin, (100) Peniciln G.

تحضير مستخلص كحول الايثر النفطي الحار والبارد لاوراق الزيتون:

مستخلص كحول الايثر النفطي الحار:اتبعت طريقة (9) حيث وزن(20)غم من مسحوق اوراق الزيتون و وضع في كشتبان (thumble) في جهاز الاستخلاص المستمر (soxhlet apparatus) واستعمل (250)مل من البتروليوم اثير استمرت عملية الاستخلاص مدة (4) ساعات بدرجة حرارة (60)°م بعدها رشح المحلول بورق ترشيح (Whatman No.1) ، ثم ترك المحلول ليجف بعد ذلك تم وزنه لمعرفة وزن المستخلص من الوزن الجاف للعينة النباتية. وزن بعد ذلك (0.05)غم من المسحوق اللزج للاوراق واذيب في (3) مل من الماء المقطر و(0.05)% من مادة Tween80 للحصول لى تركيز (500) ملغم/مل ووضع المستخلص في قناني معقمة ومعتمة ثم استعملت بعد ذلك مباشرة .

مستخلص كحول الايثر النفطي البارد: اتبعت طريقة (6) حيث وزن (20)غم من مسحوق اوراق الزيتون ووضع في بيكر واضيف له(250)مل من كحول الايثر النفطي ووضع على جهاز المحرك المغناطيسي، استمرت عملية الاستخلاص مدة (4) ساعات بدرجة حرارة الغرفة بعدها رشح المحلول بورق الترشيح (Whatman No.1) ، ثم ترك يجف بعد ذلك تم وزنه لمعرفة نسبة المستخلص من الوزن الجاف للعينة النباتية وكان الوزن (0.06)غم. اذيب المستخلص في (0.3)مل من الماءالمقطر و(0.05)% من مادة (Tween80) للحصول على تركيز 500ملغم/مل ووضع المستخلص في قناني معتمة ومقعمة ثم استعملت بعد ذلك مباشرة.

اختبار حساسية البكتريا تجاه المضادات الجيوية: اتبعت طريقة (8) والمسماة طريقة Kirby – Bauer Disk حيث زرعت العزلات البكتريا في وسط المرق المغذي ثم حضنت عدة (6)ساعات بدرجة حرارة (37°)م، ثم بعد ذلك حضرت الاطباق الحاوية على وسط الاكار المغذي وقسمت الاطباق بقلم التعليم الى 7 اجزاء متساوية ووضع رقم لكل مضاد حيوي اسفل كل طبق ووضعت معاملة السيطرة في الوسط، عملت ثلاث مكررات لكل بكتريا ثم وضعت ورقة ترشيح واحدة حاوية على المضاد الحيوي في كل جزء من الاجزاء السبعة، حضنت الاطباق بدرجة حرارة (37°)م ولمدة (24–48) ساعة، وبعد الحضن تم قياس اقطار مناطق التثبيط لكل مضاد حيوي وقورنت مع مكررات معاملة السيطرة الخالية من المضادات الحيوية .

اختبار حساسية البكتريا تجاه مستخلص كحول الايثر النفطي الحار والبارد لاوراق الزيتون: اتبعت نفس الطريقة اعلاه ولكن باستخدام التراكيز الاتية

(62.5،125،250،500)ملغم/مل لكل مستخلص الحار والبارد، حيث قسمت الاطباق بقلم التعليم الى اربعة اجزاء متساوية ووضع رقم لكل تركيز ووضعت معاملة السيطرة في الوسط لغرض المقاومة وعملت ايضا ثلاث مكررات لكل بكتريا وبعد الحضن قيست اقطار مناطق التثبيط لكل تركيز وقورنت مع مكررات معاملة السيطرة.

التحليل الاحصائي : استعملت طريقة ANOVA للتحليل الاحصائي وعند مستويات احتمالية (0.05،0.01،0.001) وذلك لغرض تقويم الاختلافات في نتائج المعاملات من حيث كونها معنوية (بتاثير المادة) او اختلافات غير معنوية (نتيجة الاخطاء المختبرية) كذلك لغرض المقارنة بين نتائج التاثير.

النتائج والمناقشة :

بينت عملية استخلاص اوراق الزيتون بواسطة كحول الايثر النفطي ان النسبة المئوية لكمية المستخلص الحار الى الوزن الجاف بلغت (2.5)%، اما المستخلص البارد (0.3)%، وبما ان الفينولات توجد في اوراق الزيتون وتذوب في الكحول الاثيلي (9,3) فان ذلك يتوافق مع نتيجة الكشف الموجبة عن الفنينولات لكلا المستخلصين الحار والبارد.

تاثير المستخلص الحار والبارد تجاه البكتريا:تتباين المضادات الحيوية بتايثراتها تجاه الانواع البكتريا حيث يكون بعضها ذا تثبيط اختياري للانواع البكتيرية في حين ان بعضها ذو استعمال واسع ضد الانواع البكتيرية وعموما فقد اظهرت نتائج الاختبار تباينا في قدرة المضادات الحيوية المستخدمة تجاه الانواع البكتيرية وتحت مستوى احتمالية (0.05،0.01،0.001) حيث كانت بكتريا .*Klebsiella sp* اكثر الانواع البكتيرية مقاومة للمضادات الحيوية تلتها بكتيرية *E.coli* ثم بكتريا *S.aurers* ثم بكتريا *S.epidermidis* (شكل1).

من الشكل (1) يلاحظ ان معظم العزلات البكتيرية كانت نوعا ما مقاومة للمضادات الحيوية وقد يعود ذلك كون البكتيريا المعزولة اتت من بيئة المستشفيات والسيطرة عليها تكون صعبة (10) وكانت القدرة التثبيطية للمضادات الحيوية وتحت مستوى احتمالية (0.05،0.01،0.001) اكثرها فعالية المضاد Impienem وتلاه Gentamycin ثم Streptomycin ثم Amoxicillin ثم Penicillin واخيرا Vancomycin الذي كان اقلهم فعالية واكثرهم مقاوم من قبل البكتيريا المدروسة.

يعود المضاد الحيوي Imipenem (N-formimidoylthienamycin) الى مجموعة Carbapenems وهي احدى مجاميع عقارات β-lactan التي تثبط بناء الجدار الخلوي للبكتريا وهو من العقارات الشائعة الاستعمال ويؤثر بشكل فعال تجاه البكتريا السالبة والموجبة لملون غرام والبكتريا اللاهوائية على حد سواء وبتراكيز قليلة ويمكن ان تؤخذ عن طريق الفم لان سميتها قليلة بالنسبة للانسان ولكنه يثبط من قبل انزيم dehydropeptidase الموجود في كلية الانسان فيجعلة غير فعال (11,10) .

اما المضاد Gentamycin فهو واسع الاستعمال ويؤثر في البكتريا العصوية اللاهوائية السالبة *Klebsiella* و *E.coli* لملون غرام وبعض انواع البكتريا الموجبة لملون غرام (شكل1) وهو ايضا يعود الى مجموعة Aminoglycosides وتعزى فعاليته الى تثبيط بناء البروتينات في البكتريا ولكنه في نفس الوقت له تاثير سمي تجاه الكلى والعصب القحفي الثامن للانسان.

كذلك يعود المضاد Sterptomycin الى نفس المجموعة السابقة وهو ذو استعمال واسع ويؤثر في البكتريا الموجبة والسالبة لملون غرام (شكل1) وهو من العقارات القديمة التي استبدلت باخرى جديدة ذات سمية اقل (11).

في حين يعود المضاد الحيوي Pieracillin الى مجموعة β-lactam التي تثبط نمو الجدار الخلوي للخلية البكتيرية ويؤثر في بعض انواع البكتريا السالبة لملون غرام اكثر من البكتريا لملون غرام (شكل1) ولكنه في نفس الوقت يسبب حساسية للانسان (10).

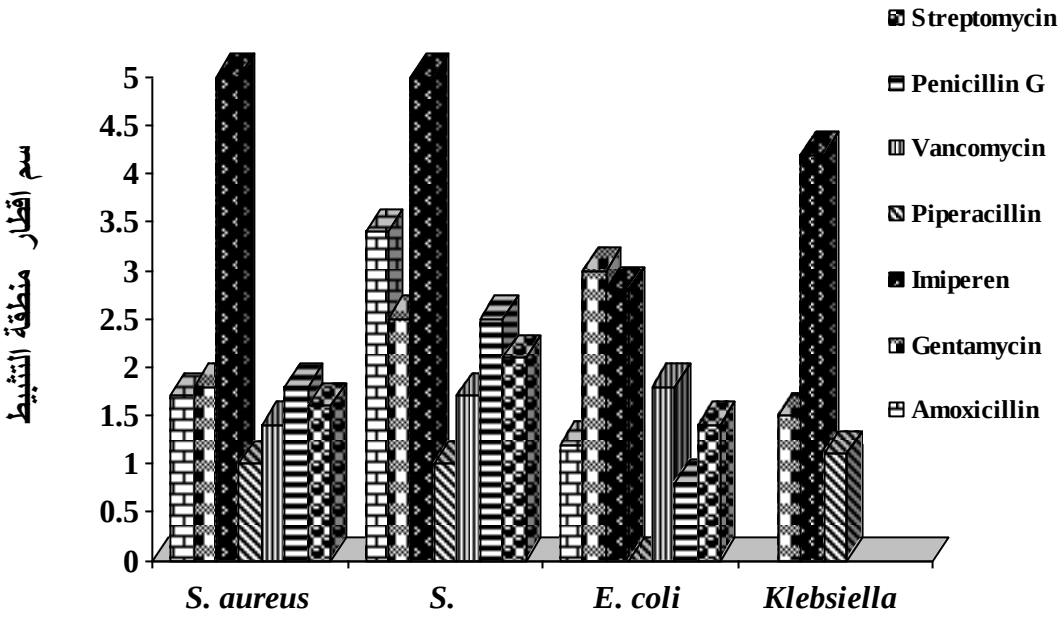
اظهرت البكتريا *Klebsiella* مقاومة تامه تجاه المضاد الحيوي Amoxicilln (شكل1) حيث لم يكن لم تاثير في البكتريا المذكورة اما البكتريا *E.coli* و *S.aureus* و *S.epidermidis* فقد تاثرت بشكل قليل بالمضاد الحيوي المذكور، يعود هذا المضاد الى مجموعة β-lactam وقد يعود ذلك الى قابلية الانواع البكتيرية الثلاث على انتاج انزيم β-lactamase الذي يرتبط بحلقة β-lactam ويعمل على تحطيم هذه الحلقة ومن ثم فشل المضاد الحيوي على القيام بعمله (12) اما المضاد الاخير فهو Vancomycin ببتيد سكري يثبط بناء جدار الخلية البكتيرية وهو ضيق الاستعمال وفعاليته تختلف عن فعالية بقية مجموعة β-lactam وهو مضاد سام بالنسبة للانسان ويستخدم لمعالجة الاصابات بيكتريا *S.aureus* (11,10) .

تاثير مستخلص كحول الايثر النفطي تجاه البكتريا:

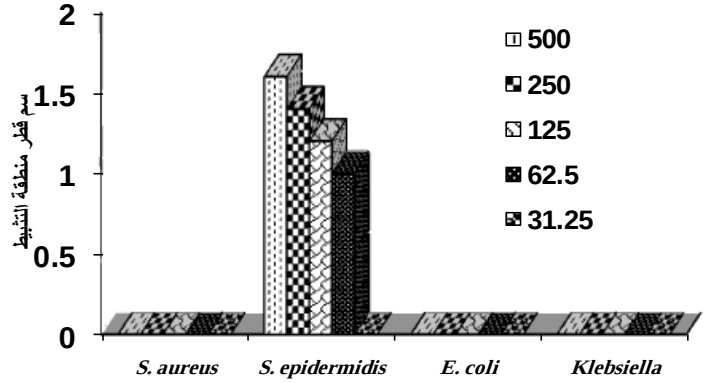
اظهرت نتائج تراكيز مختلفة من مستخلصي كحول الايثر النفطي لاوراق الزيتون الحار والبارد تاثير متفاوتا بالنسبة للبكتريا المدروسة وتحت مستوى احتمالية (0.05،0.01،0.001) (شكل3,2) وقد يعود هذا التفاوت الى ان مستخلصات النبات الفينولية تحتوي على glycosidic وربما تتسبب في عدم القدرة على تثبيط عدد من الكائنات المجهرية اوان طريقة الاقراص والحفر تعطي نتائج اقل فعالية وذلك لقلة الحجم او التركيز المطلوب وتستخدم هاتين الطريقتين لبيان الفعالية فقط (13)، وتشير النتائج التي تم الحصول عليها الى ان مستخلص اوراق الزيتون الحار ذو فعالية تثبيطية اكثر من المستخلص البارد شكل(2،3) وهذه النتيجة تتفق على ماذكره (14,2)بان اوراق الزيتون تحتوي عل الفينولات ، وحيث ان المركبات الفينولية تتاكسد في تفاعلات عالية الى كوانينات مضادة للبكتريا وجذور حرة ولها القدرة على تعطيل الادمصاص الميكروبي والانزيمات والبروتينات الناقلة للغلاف الخلوي. اما الميكانيكية التي يعتقد انها المسؤولة عن سمية الفلافونات تجاه الاحياء المجهرية المدروسة تشمل تثبيط الانزيمات بواسطة المركبات المؤكسدة من المحتمل خلال التفاعل مع مجموعة sulphhydryl او خلال تفاعلات غير متخصصة مع البروتينات (13,4) لذلك قد تعزى لها الفعالية التثبيطية.

يلاحظ من الشكل(2) ان مستخلص كحول الايثر النفطي الحار للاوراق كان ذو فعالية تثبيطية تجاه *S.epidermidis* في حين لم يكن له تاثير على بكتريا *S.aurus* و *E.coli* و *Klebsiella* اما مستخلص كحول الايثر النفطي البارد للاوراق فقد كان ذو تاثير ضعيف على البكتريا *Klebsiella* ومعدوم على الانواع البكتيرية الاخرى المدروسة شكل (3) وعلى العموم يلاحظ ان هناك علاقة طردية بين قطر التثبيط بالنسبة للبكتريا المتأثرة وبين تركيز المستخلصين اذ يزداد قطر التثبيط بازدياد التركيز والعكس صحيح وقد يعزى ذلك الى فعالية المستخلصين وتاثيرهما في نفاذية غشاء الخلية البكتيرية وعمل الانزيمات الناقلة حيث تتراكم المادة المستخلصة خارج الخلية البكتيرية وبالتالي تثبيط نموها (17,16,15) ان النتائج المذكورة قد تعزى الى فعالية الفلافونات وذلك لاحتواء مستخلصات كحول الايثر النفطي عليها (4,3) وبالتالي فان للمركبات الفلافونية تاثير تجاه البكتريا الموجبة والسالبة لملون غرام على حد سواء مع ملاحظة ان الفلافونات التي تفتقد مجموعة الهيدروكسيل OH^- السالبة على حلقة β تكون اقل فعالية ضد ميكروبية من تلك التي تحتوي على مجموعة OH^- السالبة الموجودة على حلقة β (4) وقد اوضحت دراسة (13) على بكتريا *S.aureus* حيث ان السلاسل الالفاتية الجانبية على حلقة

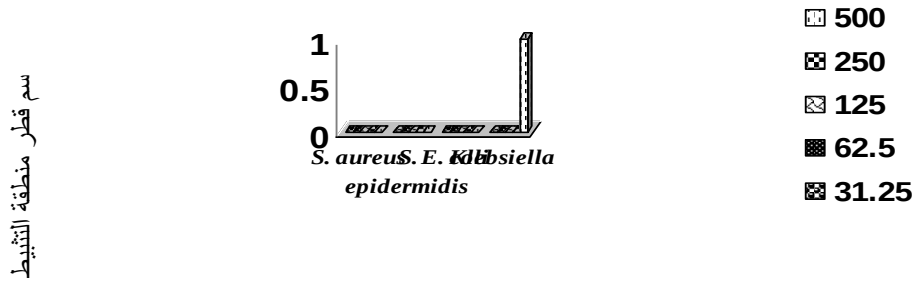
الفلافون A (3 او 5) تجعل جزيئة الفلافون اكثر حبا للدهون وتزيد من نشاطها المضاد للبكتريا مقارنة مع الفلافون غير المستبدل وكذلك الحال مع الفلافونات المحبة للدهون حيث ان الحلقة β الثلاثية الهيدروكسيل (18,14,9) و 3-OH الحر تزيد من الفعالية المضادة للفلافون تجاه بكتريا *S.aureus* .



شكل (1): تأثير المضادات الحيوية في انواع من البكتريا الممرضة



شكل (2): تأثير مستخلص الايثر النفطي الحار لاوراق الزيتون في البكتريا الممرضة



شكل(3): تأثير مستخلص الايثر النفطي البارد لاوراق الزيتون في البكتريا الممرضة

المصادر:

1. الكاتب، يوسف منصور (1988). تصنيف النباتات البذرية. الطبعة الاولى. دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة الموصل.

1. All rights reserved-Natural Factors Nutritional Products Ltd.*Enquiries custservcie@ naturaifactors.com*27500* July*Pg1 of 2.

3. Apak, R.; Güçlü, K.; Dernirata, B.; Özyürek, M.;Çelik,S.E.; Bektaşoǵlu,B. ;Berker,K.I. and Özyurt,D. (2007). Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay. Molecules, 12: 1496-1547.

4. Cowan, M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. Clin. Microbiol.Rev, 12(4):564-582.

5. Harborne, J.B. (1973). Phytochemical methods. C.x & Wyman Ltd.Norfolk: 278pp.

6. Deshmukh, S.D. and Borle, M.N. (1975).Studies on the insecticidal properties of indigenous plant product India. J.Ent.37 (1):11-18.

7. Bowen, I.H. and Perera, K.P.W. (1982). Alkaloids, comarins and flavonoids of *Micromelum zeylanicum* Phytochemistery, 21(2):433-437.

8. Atlas, R.M.; Brown, A.E. and Parks, L.C.(1995).Laboratory manual of experimental microbiology .Mosboy-Year book, Inc., St. Louis: 563 pp.

9. Schie, A.; Keller, P. and Carle , R. (2001). Determination of phenolic Acids and Flavonoids of Apple and per by High-performance Liquid Chromatogrphy. J. Chrom. A. 910: 265-273.

10. Levinson, W. and Jawetz, E. (2000). Medical microbiology & immunology (examination & board review), 6th. Singapore, New Delhi: 582 pp.

11. Talaro, K. and Talaro, A. (1996). Foundations in microbiology basic principles. Wm.C. Brown publishers; Dubuque: 542 pp.

12. Atlas, R.M. (1995).Principles of microbiology. Mosby-Year book, Inc., St.Louis:888pp.
13. Rauha, J. (2001).The search for biological activity in Finnish plant extracts containing phenolic compounds. Ph.D, Facul. Sc., Univ. Helsinki:72pp.
14. Angeh, J.E. (2006). Isolation and characterization of antibacterial compounds present in members of *Combretum* section Hypocateropsis .Ph.D, facul. Veterinary Sc., Univ.Performance.
15. Wasim, K.; Hag, I. and Asraf, M. (1995). Antimicrobial studies of the leaf of Cannabis *sativa* L.. Pak. J. Pharm. Sci., 8(1): 29-38.
16. Nutrition Research Vol.15, No.1, pp. 37-51, 1995 .
17. Life Sciences Vol.55, No.24, pp.1965_1971, 1994.
18. Chopra, R. N; Nayar, S. L. and Chopra, I. C. (1986). Glossary of Indian Medicinal plants (including the Supplement). Council of Scientific and Industrial Research, New Delhi.

Study the Effect of Alcoholic Petrolium ether extract Cold and Hot for leaves of olive (*Olea europea*) in Growth of some Pathogenic Bacteria

Assistant Leacture / Anaam A. Hasan
Baghdad University / College of Education Ibn AL-Haitham – Departmant of Biology

Abstract:

The aim of this study was to determine the effect of Alcoholic petrolium ether extract (Cold & Hot) for leaves of olive (*Olea europea*) in growth of foar strains of bacteria (i. e.) two gram negative *Klebsiella* sp. ; *Escherichia coli*, and two gram Positive *Staphylococcus epidermis* ; *Staphylococcus aureus*.

The results of the inhebitor activity of Cold & Hot extract for olive leaves showed different activity against the strains of bacteria that used in this study, the hot olive leaves extract was more antimicrobial activity compared to the cold olive leaves extract.

Concerning the bacterial isolates *S. epidermis* was more sensitive towards the hot olive leaves extract than the other bacterial isolates, it's diameter of inhibition zone was (1.6, 1.4, 1.2, 1)cm in concentrations (500, 250, 125, 62.5)mg/ml.

While the all strains of bacteria didn't show any inhibitor response towards the cold olive leaves extract except *Klebsiella* sp. In diameter of inhibition zone was (1)cm in concentration (500)mg/ml.

Analysis of the two extracts (Cold & Hot) carried out to determine they are content form flavonoid compounds.