الفعالية التثبيطية لأوراق نبات الزيتون صنف *Oleaeuropaea* على بعض خمائر المبيضات الممرضة

The inhibitory activity of olive leaves Oleaeuropaea on someyeasts pathogens

أكثم حميد جاسم
خليل أبراهيم بندر
قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة تكريت
ميلاد عدنان مزهر
قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة تكريت

Aktham H.Jassim
Khalil I. Bender
Biology Department /College of Science /Tikrit University
Milad A.Mezher
Biology Department / College of Education /Tikrit University

الخلاصة

أستهدفت الدراسة الحالية تحضير ثلاثة مستخلصات نباتية (مائي ، أسيتوني ، أيثانولي) من أوراق نبات الزيتون صنف *Oleaeuropaea* وكذلك أستخلاص بعض المركبات الفينولية من أوراق النبات من خلال تقنية HPLC وتحليلها كيميائياً من خلال جهاز FTIR لمعرفة التركيب الكيميائي لها ومن ثم قياس الفعالية التثبيطية لهذه المستخلصات والمركبات الفينولية تجاه بعض خمائر المبيضات الممرضة ، إذ تبين من خلال الدراسة أن المستخلص المائي كان الاكثر فعالية تجاه الخمائر وتلاه المستخلص الاسيتوني ثم الايثانولي الذي اقتصر تأثيره على خميرة *Candida*

glabrata و*Candida krusei* ، أما المركبات الفينولية فقد سجل المركب الفينولي Rutin تاثير على خميرة *C.albicans* و*C.glabrata* و*C.incopiscua* وبدون فروق معنوية بينهما بينما لم يسجل أي تأثير ضد بقية الخمائر ، بينما سجل المركب Quercetin تأثير ضد خميرة *C.parapsilosis* فقط ، وكان للمركب Vanillic acid تأثير ضد خميرة *C.glabrata* و*C.parapsilosis* فقط ، وعند مزج هذه المركبات وجد أن فعاليتها التثبيطية تزداد ضد أغلب الخمائر .

Abstract

The present study aimed at preparing three plant extracts (aqueous,acetonic,ethanolic) from *Oleaeuropaea* and extracting some phenolic compounds from plant leaves through HPLC technique and chemically analyzing them through FTIR to determine their chemical composition ,Then measuring the inhibitory activity of these extracts and the phenolic compounds towards some yeasts pathogens. The study showed that the aqueous extract was the most effective towards the yeast, followed by the acetone extract and then ethanol, which was effecton yeast *Candida glabrata*and *Candida krusei*only . The Phenolic compound Rutin had an effect on the yeast of *C.albicans*, *C.glabrata* and *C.incopiscua*, without significant differences between them andno effect was recorded against the rest of the yeasts. Quercetin recorded effect against *C.parapsilosis* only. Vanillic acid had effect against *C.glabrata* yeast and *C.parapsilosis* only, and when mixed these compounds found to be inhibitory effectiveness increases against most Yeast.

المقدمة

شهدت العقود الأخيرة ازدياد اهمية البحوث حول الاصابة المرضية الفطرية وتكرار حدوثها بجميع أشكالها ، وقد يعزى سبب ارتفاع معدل الاصابات الى التغييرات في الممارسة الطبية مع زيادة استخدام المضادات الحيوية واسعة الطيف و التعرض لفايروس نقص المناعة البشرية (الإيدز) [١] .أن داء المبيضات Candidiasis من الامراض الانتهازية الشائعة التي تكون ناتجة عن عدة انواع تعود لجنس المبيضات وتكون منها عدة أصابات منها الاصابات الفموية Oral thrush والجلدية Skin infection والجهازيةSystemic infection[٢] وتعد المبيضات البيضاء

C.albicans من اهم انواع المبيضات في احداث الامراضية لكونها انتهازية فهي تتواجد بشكل Norma flora في مكان تواجدها قبل الاصابة ، ويليها النوع*C.glabrata*المسؤول عن ١٦% من اصابات جهاز الدوران ، اضافة الى النوع *Ckefyr , C.krusei , C.parapsilosis* وغيرها من الخمائر الاخرى [٣]. ولعلاج هذه الممرضات استخدمت المضادات الفطرية ومنها البوليينات ،إلا أن الاستخدام المتزايد لهذه المضادات ادى الى ظهور سلالات مقاومة لانواع من المضادات الفطرية وقسم اخر وجد انها حساسة لمضادات اخرى ولم تعرف الية المقاومة لهذه المضادات [٤]. من هنا جاء التوجيه لإيجاد بدائل عن المضادات الفطرية باستخدام العديد من النباتات الطبية في علاج الامراض الجلدية والجهازية[٥]، ولقد استخدمت اوراق الزيتون في تحضير مستخلصات نباتية مضادة للعديد من الخمائر وهذا يعود الى احتواء هذه الاوراق على العديد من المركبات الفعالة مثل الفينولاتوالقلويداتوالتانيناتوالفلافونيدات وغيرها من المركبات الفعالة [٦] ، وتعتمد سمية المركب الفينولي للأحياء المجهرية على موقع وعدد المجاميع الهيدروكسيلية المرتبطة بالحلقة الاروماتية ، إذ كلما زاد عدد المجاميع زادت سمية المركب للأحياء المجهرية [٧]، إذ تعمل المركبات الفينولية على ترسيب البروتينات في أجسام الجراثيم عن طريق تكوين أواصر هيدروجينية بين مجاميع الهيدروكسيلالفينولية وبين البروتينات وبالتالي فأن ذلك يسبب الاخلال بوظيفة بعض الانزيمات المهمة والضرورية في أجسام تلك الجراثيم [٨] ، كما وجد أن بعض المركبات الفعالة ترتبط بالبروتينات المكونة للجدار الخلوي والانزيمات الموجودة في غشاء الخلية الجرثومية وبالتالي تدمير الجدار او الغشاء [٩] ، [١٠].

المواد وطرق العمل

١- جمع العينات الفطرية وتشخيصها :

تم الحصول على العينات الفطرية من جامعة كرميان / السليمانية والمشخصة تقنياً باستخدام جهاز الفايتك Vetic systemوالتي تعود لأشخاص مصابين بداء المبيضات Candidiasis وتم اعادة أعادة تشخيصها مختبرياً في مختبر الفطريات في كلية العلوم / جامعة تكريت للتأكد من صحة التشخيص باستخدام وسط CHROM agar الذي يصنف هذه العينات اعتماداً على الالوان التي تظهرها عند زرعها على هذا الوسط وحسب طريقة[١١]، وكذلك تم زرع العينات على وسط الـ Corn Meal Agar ومشاهدة الابواغ الكلاميدية التي تكونها وتم تحضير هذه الاوساط حسب تعليمات الشركة المصنعة والمثبتة على العلبة .

٢- جمع العينات النباتية :

تم جمع أوراق نبات الزيتون من مدينة الضلوعية خلال شهر آب ، حيث تم غسل الاوراق بماء معقم لإزالة الاتربة العالقة على سطحها وتم تجفيفها بدرجة حرارة الغرفة وبعد ذلك طحنت الاوراق باستعمال مطحنة كهربائية وحولت الى باودر جاف

ناعم ، وضع بعد ذلك في اكياس بلاستيكية محكمة لمنع وصول الرطوبة لحين الاستخدام.

٣- تحضير المستخلصات النباتية :

اتبعت طريقة [١٢] في تحضير جميع المستخلصات النباتية حيث تم اضافة ١٦٠ من محلول الاستخلاص الى ٤٠ غم من ورق الزيتون المطحون ومزج الخليط باستخدام جهاز الهزازShaker لمدة ساعة ومن ثم وضع الخليط في الثلاجة لمدة ٢٤ ساعة من اجل النقع ، بعد ذلك تم ترشيح الخليط باستخدام عدة قطع من الشاش اولا ومن ثم استخدام Millibore 0.45ميكرون لمنع مرور الجراثيم وتنقية المحلول من بقايا اوراق الزيتون الخشنة ووضع المحلول المحضر في انابيب زجاجية لحين الاستخدام .

٤- تنقية وتقدير المركبات الفينولية بجهاز كروموتوغرافيا السائل عالي الأداءHPLC :

تم اجراء هذا التحليل في (وزارة العلوم والتكنولوجيا / بغداد) إذ أتبعت الطريقة المذكورة من قبل [١٣] في العمل وكذلك تحليل النتائج .

٥- تحليل طيف الأشعة تحت الحمراء FTIR

اجري هذا التحليل كذلك في (وزارة العلوم والتكنولوجيا / بغداد) واتبعت الطريقة المذكورة من قبل [١٤] إذ تم أخذ كمية مناسبة من المستخلص وخلطت مع KBrونقلت إلى جهاز تحليل طيف الأشعة تحت الحمراء FTIR ضمن المدى من الأطوال الموجية (٢٠٠-٤٠٠٠) نانومتر .

٦- قياس فعالية التثبيطية ضد الجراثيم للمركبات الفينولية والمستخلصات النباتية ضد الخمائر

اتبعت طريقة [١٥] في قياس فعالية المستخلصات النباتية والمركبات الفينولية إذ لقح وسط مولر هنتون الصلب Muller Hinton Agar بوساطة ماسحة قطنة معقمة cotton swabمن العالق الفطري ، عملت حفر بقطر ٦ ملم على سطح الوسط الزرعي بوساطة الثاقب الفليني ووضعت التراكيز المحضرة من المستخلص بمقدار 0.15 (مل) لكل حفرة بوساطة ماصة دقيقة ، استخدم محلول الاستخلاص كنموذج للمقارنة ، بعدها تركت الأطباق في درجة حرارة الغرفة لمدة 20 (دقيقة) ، ثم حضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 مْ لمدة ٤٨ ساعة، حددت فعالية المستخلصات والمركبات الفينولية المعزولة بقياس قطر منطقة التثبيط (الهالة) حول كل حفرة .

النتائج والمناقشة

١- تشخيص العينات الفطرية:

١-١- التشخيص بأستعمال وسط الـ CHROM agar:

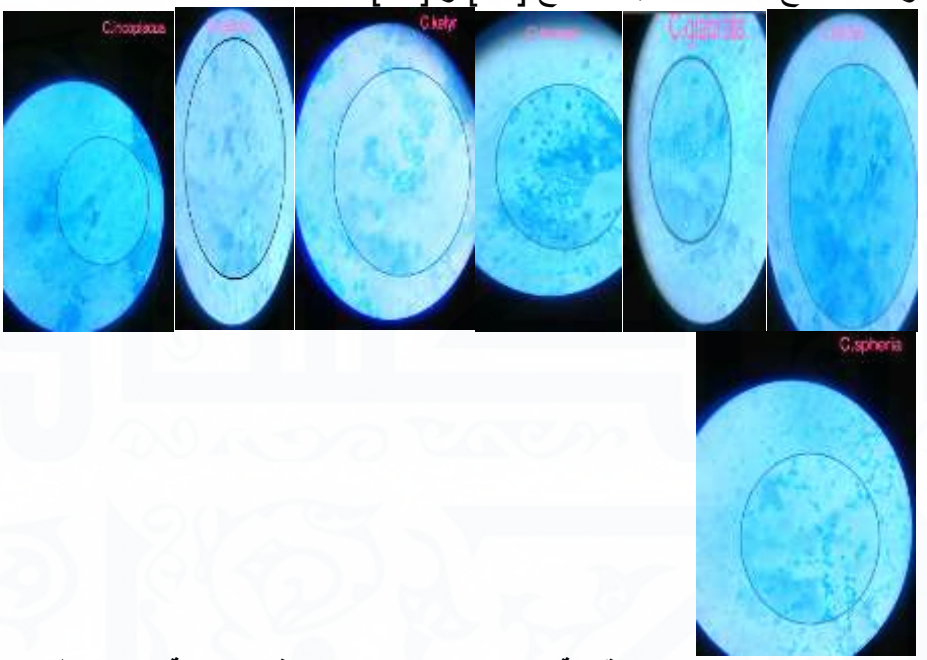
تبين من خلال تنمية العينات الفطرية على وسط CHROM agarان العينات الفطرية تعود الى جنس المبيضات *Candida*sppوالى الانواع , *C.albicans* *C.glabrata* , *C.kefyr* , *C.krusei* , *C.parapsilosis* ,

*C.spheria*أعتماداً على الالوان المثبتة من قبل الشركة المصنعة للوسط وحسب المصدر [١١] وكانت النتائج مطابقة لنتائج [١٦] و [١٧] ومؤكدة لنتائج تشخيص جهاز الفايتك.

شكل (١) صور توضح تنمية خمائر *Candida*spp على وسط CHROMagar

١-٢- التشخيص باستعم الوسط Corn Meal Agar(CMA)

اوضحت نتائج هذا التشخيص والموضحة في الشكل (٢) ان جميع العينات الفطرية لها القابلية على تكوين الابواغ الكلاميدية عدا الانواع *C.spheria* و*C.parapsilosis* وهذه النتائج جاءت مطابقة لنتائج [١٨] و [١٩].



شكل (٢) صور توضح قابلية الخمائر على تكوين الابواغ الكلاميدية على وسط CMA

٢- الفعالية ضد جرثومية للمستخلصات النباتية :

أظهرت الدراسة أن المستخلصات النباتية لأوراق نبات الزيتون صنف *Oleaeuropaea* كانت لها فعالية تثبيطية تجاه خمائر المبيضات الممرضة كما مبين في الجدول (١) الشكل (٣)، ان الفعالية المضادة للفطريات لهذه المستخلصات تعزى الى المركبات الفعالة التثبيطية في أوراق النبات وخصوصاً المركبات الفينولية والصابونيات والقلويدات والتانينات ، أن الفينولات تمتلك فعالية عالية ضد الخلايا الفطرية [٢٠] [٦]، إذ أن الحلقة الأروماتية في هذه المركبات تحتوي مجموعة هيدروكسيل (-OH) والتي تميل الى تكوين اصرة هيدروجينية مع الجزء الفعال من الانزيمات وبذلك فأنها تغير من حجوم هذه الانزيمات وخواصها وبالتالي لا تعد هذه الانزيمات فعالة في الخلية الفطرية فتؤدي لتوقف مسارات حيوية معينة في الخلية فيحدث توقف في نمو هذه الخلايا او هلاكها مباشرة ، كما ان المركبات الفينولية تؤثر على توازن المحتوى الخلوي من خلال احداثها اضرارا لبعض البروتينات الموجودة على الغشاء الخلوي فضلا عن ذلك فإنها تعمل على مسخ البروتين وان هذه المركبات تمتص من قبل أسطح البروتينات وتكون معقداً معها فيتغير شكل وحجم البروتينات فتتغير صفاتها وبالتالي تتغير طبيعة عملها فتتوقف احد المسارات الحيوية في الخلية فيتوقف نمو الخلية وتموت [٢١] ، اما الصابونيات فأن عملها بالدرجة الاولى يكون على الاركوستيرولErgosterol في غشاء الخلية الفطرية حيث تعمل على اتلافه مما يؤدي الى الغشاء حيويته وبالتالي تموت الخلية الخلية الفطرية [٢٢] ، اما التانينات فأنها تعمل على ترسيب البروتينات المرتبطة بالاغشية الخلوية للفطريات وبهذا فانها تؤثر على عملية دخول وخروج المواد من والى الخلية الفطرية [٢٣] ، اما القلويدات فأنها تقوم بعمل مشابه لما تقوم به الصابونيات وكذلك تعمل على أحداث اختلاف في الضغط الازموزي للخلية الفطرية وتلعب دور مهم في التداخل ببناء يروتينات الخلية وبذلك توثر سلباً على عملية بناء الدنا DNA[٢٤].

بينت النتائج الموضحة في الجدول (١) والشكل (٤) أن المستخلص المائي كان الاكثر فعالية تجاه الخمائر وكانت خميرة خميرة*C.albicans* الاكثر حساسية للمستخلص إذ بلغ متوسط قطر هالة التثبيط (١٤,٨) ملم وبدون فرق معنوي عن بقية الخمائر إذ بلغ متوسط قطر هالة التثبيط لخمائر *C.glabrata* و *C.krusei* و *C.kefyr* و*C.incopiscua* و *C.parapsilosis* و C.spheria (١٤,٠ – ١١,٥ – ١١,١ – ١١,٥ – ١١,٨ – ١٣,٩) ملم على التوالي ، وسجل التركيز ١٠٠% أعلى تأثير ضد جميع الخمائر وبدون فرق معنوي عن التركيز ٧٥% و ٥٠% إذ كان قطر هالة التثبيط لخميرة *C.albicans* عند التركيز ١٠٠% و ٧٥% و ٥٠% (١٧-١٦-١٤) ملم بينما كان قطر هالة التثبيط عند التركيز ٢٥%(١٢) ملم والذي كان مطابق لنتيجة [٢٥] ، وكان تأثير المستخلص بنفس التأثير وبدون فرق معنوي ضد خميرة *C.glabrata* إذ بلغ قطرهالة التثبيط عند التركيز ٢٥%-٥٠%-٧٥%-١٠٠% (١٢- ١٣-١٥-١٦) ملم على التوالي ، ضد خميرة *C.krusei* كان

قطر هالة التثبيط عند التركيز ٢٥%-٥٠%-٧٥%-١٠٠% (٨-١١-١٢-١٣) ملم على التوالي ، التركيز ٢٥% لم يسجل تاثير تثبيطي ضد خميرة *C.kefyr* بينما كان قطرهالة التثبيط عند التركيز ٥٠%-٧٥%-١٠٠% (١٥-١٤,٥-١٥) ملم على التوالي ، وكان قطر هالة التثبيط لخميرة *C.incopiscua* عند نفس التراكيز السابقة (٩-١١-١٢-١٤) ملم على التوالي ، وكان قطر هالة التثبيط لخميرة *C.parapsilosis* عند نفس التراكيز (١٢-١٤-١٠-١١) ملم على التوالي ، وكان للمستخلص نفس التأثير عند التركيز ١٠٠% و٧٥% ضد خميرة *C.spheria* إذ بلغ قطر هالة التثبيط (١٥) ملم وبدون فرق معنوي عن التركيز ٥٠% و٢٥% الذي بلغ متوسط قطر هالة التثبيط عندهما (١٣,٥ – ١٢) ملم على التوالي ، وتعزى هذه الفعالية للمستخلص المائي الى قابليته على أذابة المركبات الفعالة التثبيطية في أوراق نبات الزيتون وخصوصاً الفينولات وأملاح القلويدات (الماليك ، الطرطريك) والتانينات القابلة للتحلل في الماء إذ أن هذه المركبات لها فعالية تثبيطية عالية ضد الجراثيم الممرضة حسب دراسة [٢٦]،[٢٧] ، [٢٨] .

بعد المستخلص المائي يأتي المستخلص الاسيتوني من حيث الفعالية كما موضح في الشكل (٥)ولم تكن هناك فروق معنوية بين التراكيز ١٠٠% و ٧٥% و ٥٠% ولم يسجل التركيز ٢٥% اي تأثير ضد جميع الخمائر عدا خميرة *C.glabrata* و*C.krusei* والذي كان قطرهالة التثبيط عنده (٨) ملم ، في خميرة *C.albicans*كان قطر هالة التثبيط عند التركيز ١٠٠% و٧٥% (١٢) ملم وعند التركيز ٥٠% (١٠) ملم والتي جاءت مطابقة لنتائج [٢٩] ، تجاه خميرة *C.glabrata*كان للمستخلص تاثير عند جميع التراكيز إذ بلغ قطر هالة التثبيط عند التركيز ٢٥% و ٥٠% و ٧٥% و١٠٠% (٨-١٠-١٣-١٤) ملم على التوالي ، وكان ايضا جميع التراكيز فعالة ضد خميرة *C.krusei* إذ بلغ قطر هالة التثبيط (٨-٩-١١-١٢) ملم عند نفس التراكيز السابقة ، ضد خميرة *C.kefyr* كان قطر هالة التثبيط عند التراكيز ٥٠%- ٧٥%-١٠٠% (٩-١٠-١١) ملم على التوالي ، وكان تاثير المستخلص ضد خميرة *C.incopiscua*(١٢-١٣-١٥) ملم عند التركيز ٥٠%-٧٥%-١٠٠% على التوالي ، وضد خميرة *C.spheria* لم يسجل التركيز ٢٥% و ٥٠% اي تأثير تثبيطي بينما كان قطر هالة التثبيط ٧٥% (١٠) ملم وعند التركيز١٠٠% (١٢) ملم ،وتعزى هذه الفعالية الى أن الاسيتون يعد مذيباً عضوياً جيد للمركبات الفعالة التي تذوب في المذيبات العضوية مثل بعض التانينات والكلايكوسيدات والقلويدات والتربينات والتي لها فعالية تثبيطة من خلال تأثيرها على الغشاء الخلوي للخلية الفطرية وبالتالي التأثير على نفاذية الغشاء .

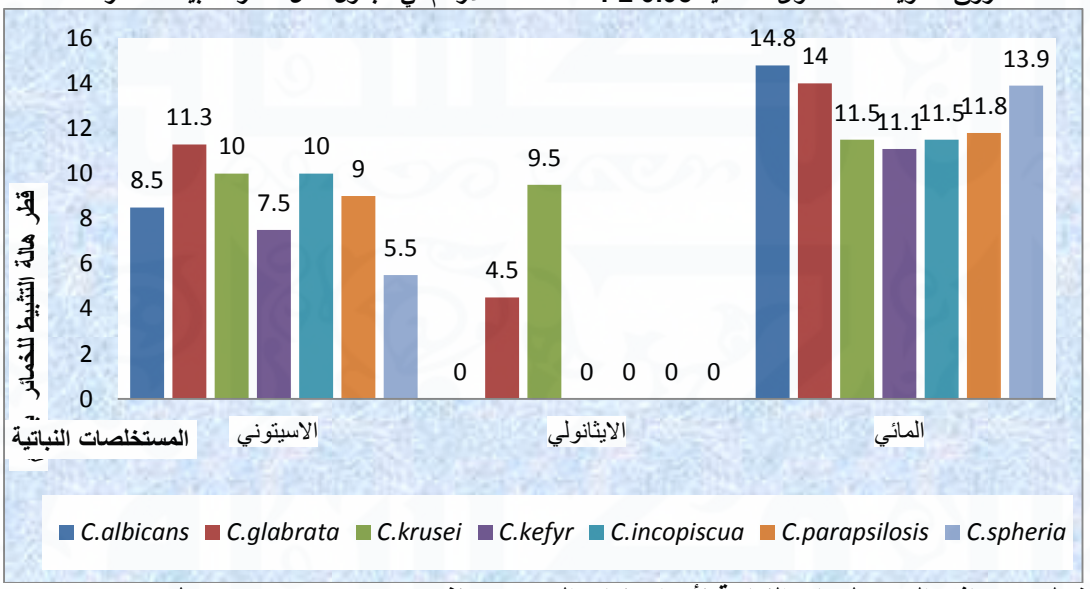
المستخلص الايثانولي كان الاقل تاثير على الخمائر كما مبين في الشكل (٦) وهذه الفعالية الواطئة للمستخلص يمكن أن تعزى الى عدم ذوبان أغلب المركبات الفعالة في المستخلص الايثانولي أو ذوبانها بكميات قليلة جعلت المستخلص يكون فعال عند التراكيز العالية فقط ، إذ لم يسجل المستخلص أي تأثير ضد خميرة

*C.albicans*و *C.kefyr*و *C.incopiscua*و *C.parapsilosis*و *C.spheria* التي كانت مقاومة للمستخلص عند جميع التراكيز ، بينما كان للمستخلص تاثير ضد خميرة *C.glabrata* وعند التركيز ٧٥% الذي بلغ قطر هالة التثبيط للخميرة عنده (٨) ملم وعند التركيز ١٠٠% الذي بلغ قطر هالة التثبيط عنده (١٠) ملم ، وضد خميرة *C.krusei* كان للمستخلص تأثير عند جميع التراكيز إذ بلغ قطر هالة التثبيط عند التركيز ٢٥% و ٥٠% (٨) ملم وعند التركيز ٧٥% (١٠) ملم و(١٢) ملم عند التركيز ١٠٠% .

نوع الفطر	نوع المستخلص	التركيز بـ ملغم / مل قطر هالة التثبيط بـ ملم				متوسط تأثيرالمستخلص	المتوسط التأثير للمستخلصات
		٢٥%	٥٠%	٧٥%	١٠٠%		
C.albicans	اسيتوني	١٧	١٨	١٦	١٧	A ١٧,٠	A ١٢,٨
	ايثانولي	٠	٨	١٠	١٢	DE ٧,٥	
	مائي	١٣	١٤	١٤	١٥	AB ١٤,٠	
متوسط التركيز في		b ١٠,٠	ab ١٣,٣	ab١٣,٣	a ١٤,٧		
C.glabrata	اسيتوني	١١	١٢	١٣	١٦	BC ١٣,٠	A ١٠,٨
	ايثانولي	٠	٧	٨	١٠	D ٦,٣	
	مائي	١٣	١٤	١٢	١٣	BC ١٣,٠	
متوسط التركيز في		b ٨,٠	a ١١,٠	a ١١,٠	a ١٣,٠		
C.krusei	اسيتوني	١٣	١٥	١٥	١٦	AB ١٤,٨	A ١٠,٢
	ايثانولي	٠	٨	٠	١٠	E ٤,٥	
	مائي	٩	١٠	١٢	١٤	C ١١,٣	
متوسط التركيز في		C ٧,٣	a ١١,٠	bc ٩,٠	a ١٣,٣		
C.kefyr	اسيتوني	١٢	١٦	١٤	١٥	AB ١٤,٨	A ٩,٧
	ايثانولي	٠	٠	٩	٠	E ٤,٨	
	مائي	٠	١٢	١٣,٥	١٥	C ١٠,١	
متوسط التركيز في		C ٤,٠	b ٩,٣	ab١٢,٢	١٣,٣		
C.incopiscua	اسيتوني	١٢	١٤	١٦	١٧	AB ١٤,٨	A ١١,٦
	ايثانولي	٦	٧	٩	١١	D ٨,٣	
	مائي	١١	١١	١٢	١٢,٥	C ١١,٦	
متوسط التركيز في		b ٩,٧	ab ١٠,٧	a ١٢,٣	a ١٣,٥		
C.parapsilosis	اسيتوني	١٤	١٧	١٧	١٨	A ١٦,٥	A ١٢,١
	ايثانولي	٦	٧	١٠	١٢	D ٨,٥	
	مائي	١٥	١٣	٨	١٠	C ١١,٥	
متوسط التركيز في		a ١١,٧	a ١٢,٣	a ١١,٣	a ١٣,٠		
C.spheria	اسيتوني	١١	١٢	١٢	١٤	BC ١٢,٣	A ٨,١
	ايثانولي	٠	٠	٠	٠	F ٠,٠	
	مائي	١١	١٢	١٢	١٣	BC ١٢,٠	
متوسط التركيز في		a ٧,٣	a ٨,٠	a ٨,٠	a ٩,٠		

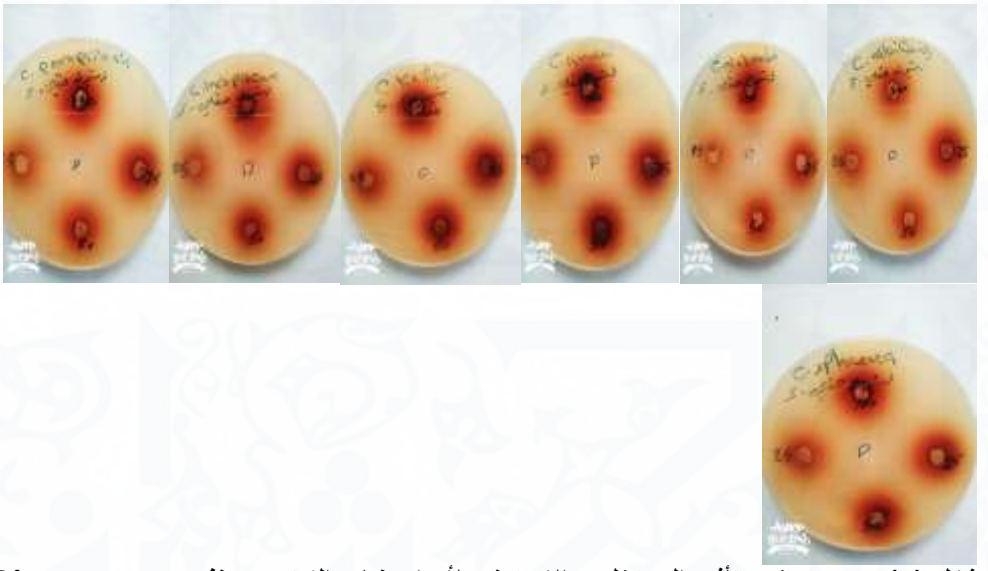
جدول (1) فعالية المستخلصات النباتية لأوراق نبات الزيتون *Oleaeuropaea* ضد بعض الخمائر الممرضة

*الحروف الكبيرة تشير الى الفروق المعنوية داخل العمود *الحروف الصغيرة تشير للفروق المعنوية بين الصفوف
*الفروق المنوية عند مستوى احتمالية P≤ 0.05 *الارقام في الجدول تمثل أقطار التثبيط للخمائر



شكل (٣) تاثير المستخلصات النباتية لأوراق نبات الزيتون صنف *Oleaeuropaea* على بعض الخمائر الممرضة

شكل (٤) صور توضح تأثير المستخلص المائي لأوراق الزيتون صنف *Oleaeuropaea* على بعض الخمائر الممرضة



شكل (٥) صور توضح تأثير المستخلص الاسيتوني لأوراق نبات الزيتون صنف *Oleaeuropaea* على بعض الخمائر الممرضة

شكل (٦) صور توضح تأثير المستخلص الايثانولي لأوراق ألزيتون صنف *Oleaeuropea*على بعض الخمائر الممرضة

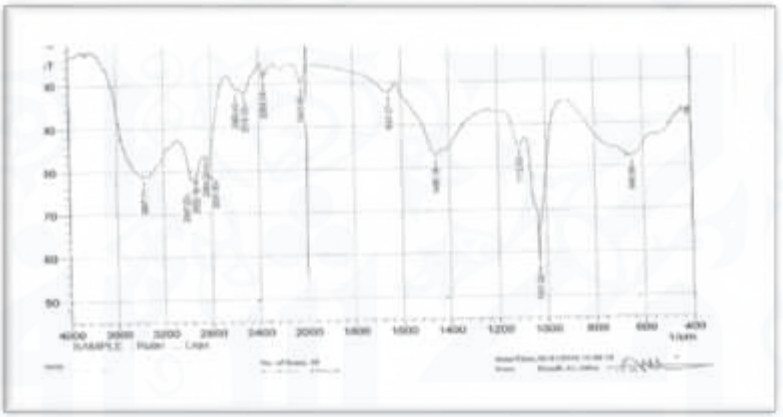
٣- تشخيص المركبات الفينولية بأستخدام تقنية HPLC:

بينت نتائج تحليل الـ HPLC أن هناك سبع مركبات فينولية في أوراق نبات الزيتون صنف *Oleaeuropaea*، وتم عزل ثلاث مركبات فينولية منها وهي Rutin وQuerticen وVanillic acidأستناداً الى زمن الاحتجاز Retention time ،

وجد من خلال النتائج أن المركب Rutin هو الاكثر تركيزاً إذ بلغ تركيزه ٨٦,٠٠% ملغم/ مل ومن ثم المركب Vanillic acid الذي بلغ تركيزه 12.41% ملغم/ مل وكان المركب Quercetin هو الاقل تركيزاً إذ بلغ تركيزه ٣,٠٩% ملغم / مل.

٤- تحليل المركبات الفينولية كيميائيا من خلال جهاز FTIR:

بينت النتائج الموضحة في الشكل (٧) أن حزم IR للمركبات الفينولية المعزولة من أوراق الزيتون *Oleaeuropaea*في المدى ١٠٣١,٩٢ (cm-1) والتي تعود الى مجموعة (C-O) ولوحظتحزمة في المدى ١١١٢,٩٣ (cm-1) والتي تعود (C-COH) ،و الحزمة ١٤٥٨,١٨ (cm-1) والتي تمتد بين مجاميع ((CH-CH2-CH3 ، و الحزمة ١٦٥١,٠٧ (cm-1) والتي تعود الى مجموعة الـC=C ( )، والحزمة ٢٨٣١,٥٠ و ٢٨٦٤,٤٠ (cm-1) والتي تعود الى مجموعة(CH) و (CH2) ، بينما تعود الحزمة ٢٩٤٧,٢٣ (cm-1) الى مجاميع الـ (CH-CH2-CH3)، والحزمة الاخيرة ٣٣٦٧,٧١ (cm-1) تعود الى مجموعة(C=O). وكانت هذه النتائج متقاربة بش كل كبير مع نتائج التحليل لكل من[٣٠] و[٣١] .



شكل (٧) تحليل الـ FTIR للمركبات الفينولية المستخلصة من أوراق نبات الزيتون صنف*Oleaeuropaea*

٥- الفعالية ضد جرثومية للمركبات الفينولية المستخلصة من أوراق نبات الزيتون صنف *Oleaeuropaea*ضد بعض خمائر المبيضات الممرضة

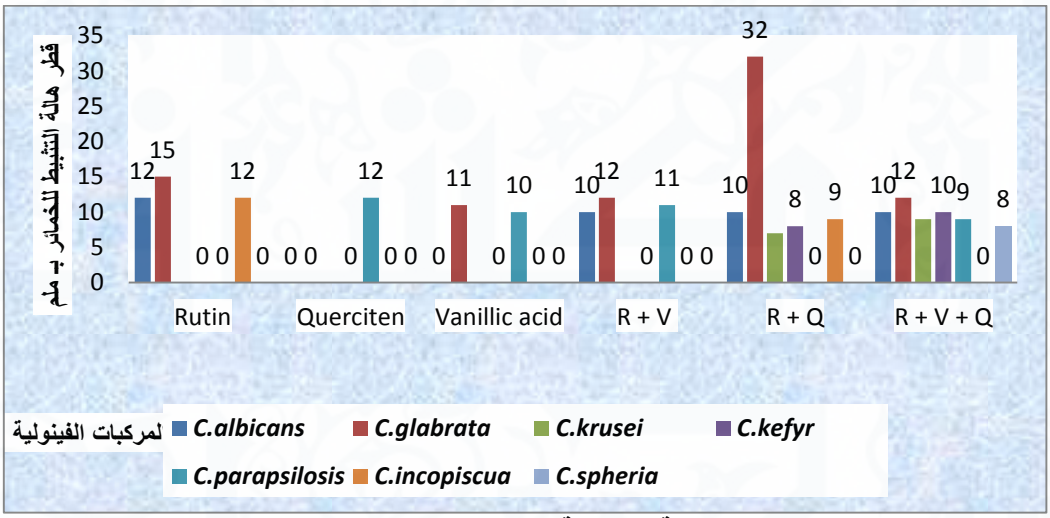
بينت النتائج التي تم الحصول عليها والموضحة في الجدول (٢) والشكل (٨) و (٩) أن المركب الفينوليRutin كان تأثيره الاكبر في خميرة *C.glabrata* اذ بلغ قطر هالة التثبيط (١٥) ملم ومن ثم خميرة *C.albicans* و *C.incopiscua* اذ بلغ قطر هالة التثبيط (١٢) ملم ولم تكن هناك فروق معنوية بينهم و لم يسجل المركب اي تأثير تثبيطي ضد بقية الخمائر ، اما المركب Quercetin فكان له تأثير مثبط فقط على خميرة *C.parapsilosis* اذ بلغ قطر هالة التثبيط (١٢) ملم وان هذه النتيجة جاءت مطابقة لنتيجة [٣٢] الذي وجد أن قطر التثبيط للخميرة *C.parapsilosis* بلغ (١٢,٥) ملم ، وكان للمركب الفينوليVanillic acid أعلى تاثير مثبط ضد خمائر الـ*C.glabrata* اذ كان قطر هالة التثبيط (١١) ملم وضد خميرة*C.parapsilosis* بلغ قطر هالة التثبيط (١٠) ملم ولم تكن هناك فروق معنوية بينهما ولم يسجل المركب اي تأثير ضد بقية انواع الخمائر ، بينما كان لمزيج (Rutin +Quercetin) اعلى تأثير ضد خميرة *C.glabrata* اذ بلغ قطر هالة التثبيط (٣٢) ملم وبفارق معنوي عن تأثيره ضد خميرة *C.albicans* و *C.krusei* و *C.kefyr* و*C.incopiscua* الذي بلغ قطر هالة التثبيط لكل منهما (١٠ – ٧ – ٨ – ٩) ملم على التوالي وبدون وجود فروق معنوية بين هذه الخمائر ، ، بينما المزيج (Rutin + Vanillic acid) كان له تأثير مثبط وبدون فروق معنوية ضد خميرة *C.albicans* اذ بلغ قطر هالة التثبيط لها (١٠) ملم وضد خميرة *C.glabrata* كان قطر هالة التثبيط (١٢) ملم وضد خميرة *C.parapsilosis*كان قطر هالة التثبيط (١١) ملم ولم يسجل اي تأثير ضد بقية الخمائر ، اما المزيج (Quercetin+Vanillic acid) فأن تأثيره كان متقارب ولم تسجل فروق معنوية بين اقطار هالة التثبيط للخمائر حيث بلغ قطر التثبيط لخميرة *C.albicans* (١٠) ملم ولخميرة *C.krusei* و *C.parapsilosis* و *C.spheria* بلغ قطر هالة التثبيط (٨) ملم وبلغ قطر هالة التثبيط (١١) ملم لخميرة *C.incopiscua* ولم تلاحظ اي فروق معنوية بين اقطارهالة التثبيط للخمائر، عند مزج هذه المركبات جميعاً (Rutin+ Vanillic acid +Quercetin) فان هذا المزيج كان له تأثير تثبيطي متقارب وبدون فروق معنوية بين جميع الخمائر عدا النوع *C.incopiscua*اذ بلغ قطر هالة التثبيط (١٠) ملم لخميرة *C.albicans*و *C.kefyr* وكان قطر هالة التثبيط لخميرة C.krusei و C.parapsilosis قد بلغ (٩) ملم ولخميرة *C.spheria* بلغ قطر هالة التثبيط (٨) ملم في حين كانت خميرة *C.glabrata* الاكثر تأثراً بالمزيج اذ بلغ قطر هالة التثبيط (١٢) ملم ان تأثير هذه المركبات يعتمد على نوع المركب الفينولي والمزيج وكذلك على نوع الفطر فبعض المركبات تعطي تأثيراً تأزرياً موجباً ضد بعض أنواع الخمائر كما في المزيج (Rutin+Quercetin) ضد خميرة *C.glabrata* والبعض

الاخر يعطي تأثيراً فعالاً بمفرده كما في الـ Rutin ضد خميرة *C.glabrata* وهذه النتائج تتفق مع نتائج[٢٠]، [٣١] بأن المركبات الفينولية يكون تأثيرها تأزري او غير تأزري وان التأثير يعتمد على نوع المركب ونوع الفطر وعدد مجاميع الهيدروكسيل المرتبطة في الحلقة الاروماتية اذ اشار [٣٣] انه كلما زادت مجاميع الهيدروكسيل (OH) زادت فعالية المركبات التثبيطية تجاه الخمائر والبكتريا الممرضة والذي اشار ايضا الى أن هذه المركبات لها القابلية على الارتباط بالجزء الفعال من الانزيمات للخلية الفطرية والبكتيرية وبالتالي تعطيل الامتصاص الميكروبي والانزيمات والبروتينات الناقلة للغلاف الخلوي .

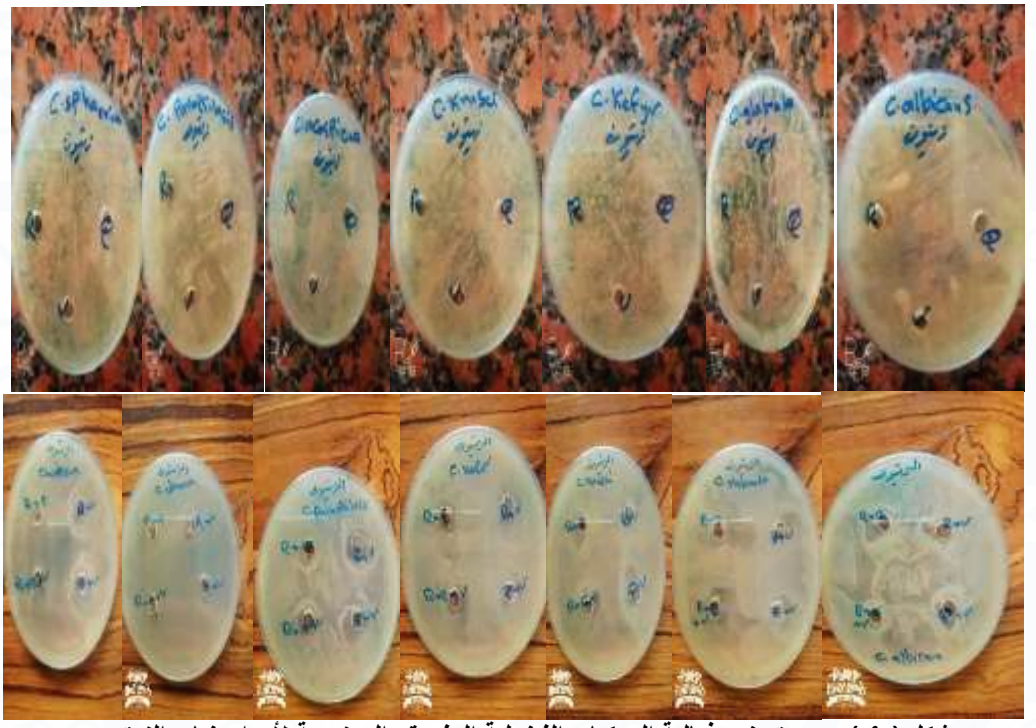
جدول (٢) فعالية المركبات الفينولية لأوراق الزيتون صنف Oleseuropaea ضد بعض خمائر المبيضات

الفطر / المركب	*C.albicans*	*C.glabrata*	*C.krusei*	*C.kefyr*	*C.parapsilosis*	*C.incopiscua*	*C.spheria*
R	a ١٢ A	a ١٥ B	NI	NI	NI	a١٢ A	NI
Q	NI	NI	NI	NI	١٢ A	NI	NI
V	NI	١١ A	NI	NI	١٠ A	NI	NI
R+Q	b ١٠ A	a ٣٢ A	b٧ A	b ٨ A	NI	b ٩ A	NI
R+V	b ١٠ A	١٢ BC	NI	NI	١١ A	NI	NI
Q+V	a ١٠ A	NI	a٨ A	NI	a٨ A	a ١١ A	a٨ A
R+Q+V	a ١٠ A	a ١٢ BC	a ٩ A	١٠ A a	a ٩ A	NI	a٨ A

*الحروف الكبيرة تشير الى الفروق المعنوية داخل العمود *الحروف الصغيرة تشير للفروق المعنوية بين الصفوف
*الفروق المنوية عند مستوى احتمالية P≤ 0.05 * NI تشير الى عدم وجود تثبيط



شكل (٨) تاثير المركبات الفينولية المعزولة من اوراق نبات الزيتون صنف Oleaeuropaea على بعض الخمائر الممرضة



شكل (٩) صور توضح فعالية المركبات الفينولية المفردة والممزوجة لأوراق نبات الزيتون *Oleaeuropaea* على بعض الخمائر الممرضة

المصادر

1. **Vazquez, J.A.(2010). Invasive fungal infections in the intensive care unit. SeminRespirCrit Care Med; 31: 7986.**
2. **Maza J L , Elguezabal N ,Prado C Ellacuria J .SolerI,Ponton J.(2002). Candida albicans adherence to resin-composite restorative dental material :Influence of whole human saliva . Oral Sirg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.94:589-92.**
3. **Satana, Dilek , GoncaErkoseGenc and ZayreErturan,(2010),"The antifungial susceptibilities of oral candida spp isolates from HIV-infacted patents ", African Journal of Microbiology Research , Vol.4(6),pp466-470.**
4. **Jorgenson, K. J.; Gotzsche, P.C.; Johansen, H.K. (2006). Voriconazole versusamphotericin B in cancer patients with neutropenia. Cochrane. Database. Syst. Rev, 7 : 1-3.**
5. **Mills Edward , Jean-Jacques Duguoa, Dan Perri , GideonKoren (2006) . Herbal Medicines in Pregnancy and Lactation .An Evidence-Based Approach ,London and NewYork.**
6. **Benavente-Garcia, O.; J. Castillo, J. Lorente, A. Ortuno, J.A. Del Rio.(2000).**

Antioxidant Activity of Phenolics Extracted from Oleaeuropaea L. Leaves. Food Chem., 68, 457-462.

7. **B. Tim , (2004) www. Highbeam . com/index.asp?homepage pp:18-22.**
8. **Reed,J.D.(1995).Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols. for age legumes .J.Animal Soc. 73:1516 – 1528.**
9. **N.Berkoff, (1998) http://www.Healthwell.com/hnb reakthroughs/ sep98/ flavonoids.cfm path=hw,.**
10. **J. Collee , A. Fraser , B. Marmion , A. Simmons , Mackie &Macartney(1996) practical medical microbiology . 14th(edn) ,**

11. **Hospenthal ,DR.; Beckius, ML.; Floyd, KL.; Horvath, LL and Murray, CK. (2006). Presumptive identification of Candida species other than C. albicans, C. krusei, and C. tropicalis with the chromogenic medium CHROMagar Candida. Ann ClinMicrobiolAntimicrob. 3(5). pp:1-10.**

12. **Al-Joboory , A. and Al-Rawi,M. (1994) . Natural pharmacology 1st ed . Dar Al-Huriah , Baghdad.**
13. **Amani, T. (2012). Characterization of poly phenols in tunisian olive with anticancer capacity using liquid chromatography coupled to mass spectrometry, Doctoral thesis, university of Ezmir.**
14. **Mostafa, M.H., Eman H. I., Fatma, E. (2012). Biosynthesis of Au nanoparticles**

using olive leaf extract, Arabian Journal of Chemistry, Vol 5, PP 431–437.

١٥. **الجابر ، غزوان طالب نوري (٢٠٠٨) . الفعالية ضد جرثومية لمستخلص أثنين من المركبات الفينولية لنبات السماق *Rhus*sp . مجلة أبحاث البصرة (العلميات) . العدد الرابع والثلاثون . الجزء الثاني . ص ٢٢-٣٢.**

16. **Al_Bajilan, Asoda Mohammed Noori.(2016). Study of the inhibitory of Snake Venom Macrovipra lantana against the Virulence factor of Vaginal Candida spp. 66-67.**

١٧. **حسين ، همام سعدي علي.(٢٠١٥). التحري عن العلاقة الوراثية ومقاومة عزلات ممرضة لأنواع خميرة المبيضات لبعض المضادات الفطرية بأستخدام مؤشرات ISSR. رسالة ماجستير. كلية العلوم/ جامعة تكريت. العراق.**

١٨. **جاسم ، نيران عبيد . حبيب ، رجاء علي . السعدي، علي حمود (٢٠١٥). عزل وتشخيص بعض انواع الخمائر *Candida* ودراسة حساسيتها ضد بعض المضادات . مجلة جامعة بابل للعلوم الصرفة والتطبيقية . العدد (٣) ، المجلد (٢٣) .**

19. **Saroj, G.K., MallikaR.k., Sugatha,K., Vivek, H.,(2013).Speciation of candida using chromogenic and corn meal agar with determination of fluconazole sensitivity.**
20. **Aytul, Kareem Kan (2010). Antimicrobial and Antioxidant a ctivities of olive leaf extract and its` food applications . GradueteSchoole of Enginering and Science of Izmir Technology. Master thesis.**
21. **Ayala-Zavala, J.F.; Silva-Espinoza, B.A.; Cruz-Valenzuela, M.R.; Villegas-Ochoa, M.A.; Esqueda, M.; González-Aguilar, G.A.;**

Calderón-López, Y.(2012). Antioxidant and antifungal potential of methanol extracts of Phellinusspp. from sonora, mexico. Rev. Iberoam. Micol. 29, 132–138.

22. Yendo, A.C.A.; Costa, F.; Gosmann, G. and Fett-Neto, A.G.(2010). Production of plant bioactive triterpenoidsaponins: Elicitation strategies and target genes to improve yields. Mol. Biotechnol. 46, 94–104.
23. Daniyan,S.Y.;Galadima,M.;Ijah,U.J.J.;Odama,L.E.;Yusuf,A.Y.andAbbas,Y.(2010). In vitro antimicrobial screening of piliostigmathonningii(shum)milne-red head leaves extracts against clinical isolates of methicillin resistant and methicillin sensitive
24. staphylococcus aureus.International Journal of pure and Applied Sciences.4(1):88-94
25. Evans,(2009). W.C. Trease and Evans' Pharmacognosy; Elsevier Health Sciences: New York, NY, USA.
26. Makirita, Winisia E. Chauka , Leonard J , and Musa Chacha .(2016). Antimicrobial and Cytotoxicity Activity of (Oleaeuropaea) in Tanzania . Journal of Medical Plants. 14(2) :1-9.

٢٧. حسن ، أنعام عبد القادر(٢٠١٢) .تأثير مستخلص كحول الايثر النفطي الحار والبارد لأوراق الزيتون في نمو بعض انواع البكتريا . جامعة بغداد / كلية التربية – ابن الهيثم . مجلة كلية التربية الاساسية . العدد (٧٥) .

٢٨. حسوني ، عادل عبيد . عمران ، محمد أحمد . يوسف ، دعاء كامل .(٢٠١١) . الفعالية الحياتية لعصير أوراق الزيتون الطازج على بكتريا الاشيريشياالقالونيةEscherichia coli . مجلة الفرات للعلوم الزراعية . ٣ (٣) : ٨١-٨٤.

٢٩. السعدي ، حسين عبد الرزاق عبود (٢٠١٢) . دراسة تأثير بعض المستخلصات النباتية والمضادات الفطرية على بعض الاصابات الفطرية الجلدية لعينات مرضية في مدينة كركوك . رسالة ماجستير، جامعة تكريت ، كلية العلوم ، علوم الحياة . العراق .

30. Faiza , Llias. Wahiba, Kholkhal. And GaourNasira .(2011). Antimicrobial and Antifungal of Olive (*Oleaeuropaea* L) from Algeria . Journal of Microbiology and Microtechnology . 1(2) : 69-73.
31. Alhamd, A.K. (2014). Improvement extraction of crude compounds from Iraqi olive leaves by appling water-base and alcoholic –base extraction and their biological application. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science, Volume 4, Issue 1, 183- 200

٣٢. الاسدي ، حنين عبد الامير.(٢٠١٥). الاستخلاص الكحولي لأوراق الزيتون العراقي وقياس فعاليتها المضادة للأكسدة والميكروبات . مجلة جامعة الانبار للعلوم البيطرية .المجلد (٨) العدد (١).

33. Tiago, Carlos Alves1, Isabel CFR Ferreira2, Lillian Barros2, Sónia Silva1, Joana Azeredo1 & Mariana Henriques,(2014) . Antifungal activity of phenolic compounds identified in flowers from North Eastern Portugal against Candida species. Future Microbiol. 9(2), 139–146.
34. Tyagi, Bhawna, Ashutosh Dubey1, A.K. Verma, SalilTiwari.(2015).Antimicrobial activity of phenolic copound against pathpgenic bacteria. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research . Article No. 04, Pages: 16-18