وزارة التعليم العالي والبحث العلمي ,

جامعة القادسية ,

كلية العلوم ,

قسم علوم الحياة

دراسة التأثير التثبيطي للمستخلص الكحولي لاوراق نبات الزيتون في نمو الفطر *Aspergillus niger* المعزول من مرضى التهاب الاذن الخارجية

بحث مقدم الى كلية العلوم – قسم علوم الحياة
كجزء من متطلبات نيل درجة البكالوريوس

علوم / علوم الحياة

من قبل الطالبة : سارة كاظم عبد الأمير

باشراف ا .م .د علي عبد الهادي ماهود

1439/1440هـ

2018 /2019 م

بسم الله الرحمن الرحيم

(قالوا سبحانك لا علم لنا الا ما علمتنا انك انت العليم الحكيم)

صدق الله علي العظيم

سورة البقرة (٣٢)

الإهداء ...

إلى التي يلازمني دعائها باستمرار..
فتراني أحيا وأواصل المشوار.. أمي الحنونة

إلى الذي علمني الجود والوفاء..
ومن تضحياته تعلمت الوقوف بوجه الإعصار..أبي العزيز

إلى الذين بسمتهم تطل علي باستمرار..
كأنهم ورودا و أشجار.. أخوتي الأعزاء

إلى الذين أرى علمهم وسط الليل نهار..
أساتذتي الأفاضل

سارة

شكر وتقدير

الحمد لله رب العالمين والصلاة والسلام على صادق الوعد الأمين وأهل بيته الطيبين الطاهرين ومن سار على هديهم إلى يوم الدين.

نتقدم بوافر الشكر والتقدير وفائق الامتنان إلى السيد المشرف (أ. م . د علي عبد الهادي ماهود) لاقتراحه موضوع البحث والأشراف على انجازه ودعمه المتواصل لنا طيلة مراحل البحث دون أن يبخل علينا بالنصح والإرشاد .

.

كما نتقدم بجزيل الشكر والتقدير والامتنان إلى عمادة كلية العلوم , قسم علوم الحياة .

وأخيرا واجب الوفاء يحتم أن نتقدم بالتقدير والامتنان إلى كل من مد يد العون والمساعدة لنا لإتمام هذا البحث.

سارة

الخلاصة:

درس تأثير المستخلص الكحولي للأوراق نبات الزيتون *Olea europea* في النمو الشعاعي والوزن الجاف للفطر *Aspergillus niger* المعزول من مرضى التهاب الاذن الخارجية .

أوضحت النتائج ان للمستخلص الكحولي تأثير مثبط لنمو الفطر على الوسط الغذائي الصلب PDA اذا تراوحت معدلات اقطار المستعمرات ما بين (18.40 – 30.66) ملم للتراكيز المختلفة للمستخلص بالقياس مع معاملة السيطرة والتي بلغ فيها معدل اقطار المستعمرة 90 ملم كما أوضحت النتائج ان مستخلص أوراق نبات الزيتون الكحولي قد خفض من معدلات الوزن الجاف للفطر *Aspergillus niger* بصورة معنوية بالقياس مع معاملة السيطرة عند مستوى احتمال 5% اذ تراوحت معدلات الوزن الجاف للفطر المدروس ما بين (0.13 – 0.28) غم للتراكيز المختلفة للمستخلص بالقياس معاملة السيطرة والتي بلغ فيها معدل الوزن الجاف للفطر (0.78) غم .

المقدمة :

يعتبر مرض التهاب الاذن الخارجية من الامراض المهمة والمنتشرة بشكل كبير والتي يعاني منها فئات عمرية مختلفة وهذه الاصابة تستهدف بشكل رئيسي الاذن وقد تكون الإصابة من النوع الحاد او من النوع المزمن وتحصل في بعض الأحيان مضاعفات مختلفة مما يزيد من خطورة هذا المرض (Bernstein , 2000).

هناك عدة أنواع من الاحياء المجهرية تساهم في حدوث هذا المرض مثل الفيروسات وكذلك البكتريا والفطريات واحيانا يكون المسبب للمرض كائن مجهري واحد او اكثر في الإصابة ذاتها (Kenna *et. al.* , 1986).

في الآونة الأخيرة ازداد معدل هذه الإصابات خصوصا لدى مرضى ضعف المناعي وكذلك نتيجة لاستخدام المضادات الحيوية المختلفة واذا فان الفطريات المتواجدة في الاذن الخارجية ممكن ان تكون انتهازية وتسبب إصابات للاذن (Kikuchi *et. al.* , 1994) . وقد اشارت بعض الدراسات ان الفطريات تشكل نسب عالية من الاحياء المجهرية المسببة لمرض التهاب الاذن الخارجية , وان الفطر *Aspergillus niger* كانت نسبته 17.1% من بين المسببات المرضية (Al- Faris *et. al* ., 1998) وكذلك وجد ان بعض الفطريات قد لا تصيب الاذن الخارجية فقط وانما من الممكن ان تتطور الاصابه وتسبب التهاب الاذن الوسطى وان الكثير من المرضى الذين يعانون من الإصابات المزمنة للاذن الخارجية هم بشكل رئيسي مصابون بأحد أنواع الفطريات إضافة الى إصابة بكتيرية حادة (Ho *et. al.* , 2006) بشكل يتضمن العلاج لاصابات الاذن الخارجية تنظيف الاذن وسحب السوائل ومن ثن استعمال المضادات الفطرية المناسبة مثل (Nystatin او Amphotrecin B).

وبالنظر الى ازدياد مقاومة بعض الفطريات المضادات الفطرية وبالإضافة الى الاثار الجانبية لاستخدام مثل هذه المضادات كان لابد من البحث عن بدائل امنة ومن هذه البدائل استخدام المستخلصات النباتية والمنتجات الطبيعية ومنها نبات الزيتون والذي يعتبر من الأشجار المعمرة والغنية بالمواد الفعالة ومنها زيت الزيتون والذي له استخدامات عديدة اذ يحتوي على مضادات الاكسدة ويعمل على خفض الام الروماتزم ويحافظ على طراوة الجلد ورونقه وكذلك على مرونة الشعر (Caruso *et. al.* , 2001).

لذا هدفت هذه الدراسة لمعرفة التأثير التثبيطي للمستخلص الكحولي لاوراق نبات الزيتون في نمو الفطر *Aspergillus niger* المعزول من مرضى التهاب الاذن الخارجية , وقد شملت خطة البحث ما يلي :-

1. جمع أوراق نبات الزيتون وتحضير المستخلص الكحولي .
2. اختبار تأثير المستخلص الكحولي لاوراق نبات الزيتون والمحضر بتراكيز مختلفة في نمو الفطر *Aspergillus niger* الوسط الغذائي الصلب PDA والسائل PDB .

المواد وطرائق العمل : -

جمع الأجزاء النباتية : تم جمع أوراق ازهار الزيتون من احدى حدائق في مدينة الديوانية ثم غسلها باستخدام الماء العادي ثم باستخدام الماء المقطر ثم جففت بدرجة حرارة الغرفة وطحنت باستخدام مطحنة كهربائية وضعت في عبوات جافة لحين الاستعمال .

تحضير المستخلص الكحولي : تم تحضير المستخلص الكحولي لاوراق نبات الزيتون بالاعتماد على ما ورد في (Harborne , 1984) كالاتي , تم اخذ 10 غرام من مسحوق الجاف لجزء النباتي قيد الدراسة واضيف اليه 200 ml من الكحول الايثانول في دورق زجاجي سعته 500 ml ومن ثم سخن الدورق بدرجة حرارة 40° ثم ترك لمدة 24 ساعة ورشح باستخدام أوراق ترشيح بعد ذلك مرر المحلول من خلال مرشح بكتيري Millipore بقطر 0.22 ميكرون ليكون جاهز للاستخدام .

العزلات : - تم الحصول على عزلة الفطر *Aspergillus niger* وبصورة نقية من دراسة سابقة للاذن في مختبر الفطريات في قسم علوم الحياة في كلية العلوم جامعة القادسية وتم تشخيص الفطر النقي بالاعتماد على الأسس التصنيفية بالاعتماد على مصادر : - (Barnettoo . (Huntrer , 1972 ; Domschetal , 1989

تأثير المستخلص الكحولي لاوراق نبات الزيتون في النمو الاشعاعي للفطر *Aspergillus niger*

لتحديد التأثير التثبيطي للمستخلص الكحولي لاوراق نبات الزيتون في النمو الاشعاعي لفطر قيد الدراسة انبعثت تقنية الغذاء المسموم وذلك بتحضير ثلاث تراكيب وهي (20 , 15, 10)% وكذلك معاملة السيطرة اطباق بتربة حاوية وسط PDA فقط تركت الاطباق لتصلب الوسط الزرعي فيها , نقلت قطعة فطرها 7.5 m من مزرعة نقية للفطر قيد الدراسة بواسطة الثاقب الفليني ومن ثم حضنت الاطباق بدرجة حرارة 25º وبثلاث مكررات لكل معاملة , بعدها تم قياس النمو باستعمال المسطرة الاعتيادية بواقع معدل ثلاث اقطار متعامدة بعد وصول الفطري في معاملة السيطرة الى حافة الطبق (Dixit *et. al.* , 1976) .

تأثير المستخلص لاوراق نبات الزيتون في الوزن الجاف لفطر *Aspergillus niger* تم دراسة تاثير المستخلص الكحولي لاوراق نبات الزيتون في الوزن الجاف لفطر قيد الدراسة وذلك باستخدام دوارق زجاجية سعة 250 ml وضع فيها 50 ml من الوسط الغذائي السائل PDB حضرت بعدها ثلاث تراكيز (20 , 15, 10)% اما معاملة السيطرة تضمنت الوسط الغذائي فقط بعدها لقحت الدوارق بقطعة من الفطر بقطر 7.5 mm وبثلاث مكررات وحضنت الدوارق بدرجة حرارة 25º م لمدة سبعة أيام ومن ثم تم ترشيح النمو الفطري باستخدام ورق ترشيح وجففت الدوارق في الفرن في درجة حرارة 60º م لمدة 24 ساعة بعد ذلك تم قياس الوزن الجاف لكل فطر (محمود 1985) .

التحليل الاحصائي : تم تحليل النتائج احصائيا لتحديد الفروق المعنوية باستخدام اختبار دنكن متعدد الحدود.

الجدول (1) :

تأثير المستخلص الكحولي للأوراق نبات الزيتون على النمو الشعاعي على *Aspergillus niger* .

التركيز (%)	معدل نمو الشعاعي للفطر (ملم)
10	30.66 b
15	26.76 b
20	18.40 c
Control	90 a

تمثل النتائج معدل ثلاث مكررات .

المعدلات التي تحمل نفس الاحرف لا تختلف معنويا حسب اختبار دنكن عند مستوى احتمال 5% .

تأثير المستخلص الكحولي لاوراق نبات الزيتون في الوزن الجاف للفطر *Aspergillus niger* : أوضحت النتائج البينة في الجدول (2) بان للتراكيز المختلفة للمستخلص الكحولي لاوراق نبات الزيتون تأثير واضح في تثبيط النمو للفطر المدروس على الوسط الغذائي السائل PDB بالقياس مع معاملة السيطرة عند مستوى احتمال 5% أوضحت النتائج ان بزيادة تركيز المستخلص الكحولي يزداد تأثير المواد الفعالة المضادة لنمو الفطر وبالتالي يقل الوزن الجاف وهذا يؤكد النتائج السابقة الخاصة بالنمو الشعاعي للفطر *Aspergillus niger* .

جدول (2) تأثير المستخلص الكحولي لاوراق نبات الزيتون في الوزن الجاف للفطر *Aspergillus niger* :

التركيز (%)	معدل الوزن الجاف للفطر (غم)
10	0.28 b
15	0.23 c
20	0.13 d
Control	0.78 a

تشمل النتائج معدل ثلاث مكررات .

المعدلات التي تحمل نفس الاحرف لا تختلف معنويا حسب اختبار دنكن عند مستوى احتمال 5% .

النتائج والمناقشة :

تأثير المستخلص الكحولي لاوراق نبات الزيتون على النمو الشعاعي للفطر *Aspergillus niger* :

أوضحت النتائج (الجدول 1) ان التراكيز المختلفة للمستخلص الكحولي لاوراق نبات الزيتون تأثير واضحا مثبطا في النمو الشعاعي للفطر *Aspergillus niger* على الوسط الغذائي الصلب PDA بالقياس مع معاملة السيطرة عند مستوى احتمال 5% وان بزيادة التراكيز يزداد تأثير المواد الفعالة والمضادة لنمو الفطر المدروس ويقل قطر المستعمرة وتحتوي أوراق نبات الزيتون على مركبات فينولية ومركبات مضادة للاكسدة وفينولات وهي من المركبات الايضية الثانوية (Cowan , 1999) .

المصادر

1. محمود, انتصار عبد الحميد . (1985). تأثير المستخلصات النباتية على بعض الفطريات المسببة للامراض النباتية . رسالة ماجستير / كلية الزراعة – جامعة بغداد .

2. Al-Faris, E.A.;Abdughani, H.;Mukhdomi, G.H.;Kamal,A. & Al-Muhaimeed, H.S.(1998). Microbiology and antimicrobials sensitivity of suppurative otitis media.J. Saudia med;4:417-422.
3. Betnstein, J.M.(2000). Waldeyers ring and otitis media: The nasopharyngeal tonsil and otitis media. Int.pediator.Otorrhinolalryngol; 1:127-132.
4. Ho,T. ;Vrabec, J.T.l Yoo,D. & Coker, N.J.(2006). Otomycosis: clinical features and treatment implication. Otolaryngol Head Neck Surg.Nov;5787-791.
5. Kenna, MA.;Bluestone, C.D. & Reilly, J.S(1986). Medical management of CSOM without cholrcreatoma children . Laryngoscope;2:146-149.
6. Kikuchi, A.;Funakubo, t. & Kohsyu,H.(1994). A study of fungal infection in otorhinolaryngology > Acta. Otolaryngol.stockh; 511:224-227.
7. Cowan, M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agent . Clin. Microbiol.Rev, 12(4):564-582.
8. Caruso, D.; Visioli, F.; Patelli, R.; Galli, C. & Galli, G (2001). Urinary excretion of olive oil phenols and their metabolites in humans. Metabolism, 50: 1426-1428.
9. Barnett, H.L. & Hunrer, B.B. (1972). IIIustrated genera of imperfect fungi. Burgess publ. Co., Minnesota. 3 rd ed.
10. Dixit, S.N.; Tripathi, S.C. & Upadhyey , R.R. (1976). The antifungal substance of rose flower (*Rosa indica*). Economic Botany. , 30:371-373.
11. Domsch, K.H.; Gams, W. & Anderson, T.H. (1980). Compendium of soil fungi. Academic prees., London , New York, Toronto, Sydney, San Framcisco, Vol. 1.
12. Harborne , J.B. (1984) .Phytochenical methods . A guide to modern techniques of plant analysis. 2 nd ed. London . New York. Chapman & Hall.