الفعالية التثبيطية لمستخلصات الكالس وأوراق نبات الكاردينيا *Gardenia jasminoides* باستخدام بعض المذيبات العضوية في نمو بعض الأنواع البكتيرية المرضية والخمائر

Antimicrobial Activity of *Gardenia jasminoides* Callus and Crude Leaf Extracts for some Organic Solvents against some Pathogenic Bacteria and Yeasts

زينة هاشم شهاب هدى سهيل عبد سمية فاضل حمد سارة هيثم صديق
كلية العلوم للبنات/ جامعة بغداد
Zina Hashem Shehab Huda Suhail Abid Sumaya Fadhil Hamad Sara Haitham
College of Science for Women/ University of Baghdad

المستخلص

اختبرت فعالية المستخلص الميثانولي الخام لكالس أوراق نبات الكاردينيا *Gardenia jasminoides* مع المستخلصات الخام لأوراق هذا النبات المحضرة باستعمال بعض المذيبات العضوية (الميثانول ،الايثانول , الايثر البترولي ،الاسيتون والكلوروفورم) في نمو عزلات البكتريا المرضية والخمائر، والتي تضمنت اربع عزلات موجبة لصبغة غرام *Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis, Streptococcus pyogenes, Bacillus cereus* واربع عزلات سالبة لصبغة غرام *Salmonella typhi, Escherichia coli, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa* فضلا عن خمائر *Candida albicans, Saccharomyces boulardii* بطريقة الانتشار بالحفر . لوحظ بان الفعالية التثبيطية للمستخلصات الخام قد تنوعت باختلاف مذيب الاستخلاص والكائن الدقيق, أعطى المستخلص الميثانولي الخام لكالس اوراق الكاردينيا المنمى على الوسط الغذائي MS (Murashige and Skoog) باستخدام منظمي النمو NAA(Naphthalen acitic acid) و BA (Benzyle adenine) تفوقاً على باقي المستخلصات الخام الاخرى حيث اظهر فعالية في تثبيط ثلاث عزلات موجبة لصبغة غرام وثلاث عزلات سالبة لصبغة غرام وكانت اعلاها لبكتريا *Staphylococcus aureus, Proteus vulgaris* ويليه مستخلصي الاسيتون والايثانول حيث ثبطا عزلتين موجبة لصبغة غرام وعزلتين سالبة لصبغة غرام، كما اظهرت جميع المستخلصات تثبيطاً في نمو خميرة *Candida albicans* في حين لم تظهر خميرة *Saccharomyces boulardii* تحسسا لأي من المستخلصات وعند اجراء تحليل High Performance)HPLC Liquid Chromatography تم الكشف عن بعض المركبات الفعالة وهي Quinic acid, Iridiods glycosides and Crocin حيث كانت نسبتها في الكالس الطري اعلى من نسبتها في الاوراق الطرية.

الكلمات المفتاحية: الفعالية التثبيطية، الكاردينيا، البكتيرية المرضية والخمائر

Abstract

The study was conducted to evaluate the inhibitory activity of methanol extract of *Gardenia jasminoides* leaves compared with leaf crude extracts for some organic solvents namely Methanol, Ethanol, Petroleum ether, Asetone and Chloroform on growth of some pathogenic bacteria and yeast, which included four gram positive isolates *Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis, Streptococcus pyogenes* and *Bacillus cereus* and gram negative isolates *Escherichia coli, Salmonella typhi, Proteus vulgaris* and *Pseudomonas aeruginosa* and some yeasts *Candida albicans* and *Saccharomyces boulardii*, by using well diffusion method. The inhibitory activity of extracts in the tested bacterial strains and yeasts was varied according to the type of extracting solvents and are tested microorganisms. The methanol callus extract which grown on Murashige and Skoog (MS) media by using (Naphthalen acitic acid) NAA and (Benzyle adenine) BA as growth regulator highly effective as compared to the other extracts as for inhibition of three gram positive bacteria and three gram negative bacteria,which include *Staphylococcus aureus* and, *Proteus vulgaris,* followed by acetone and ethanolic extracts which include two gram positive bacteria and two gram negative bacteria. All extracts had highly effect in growth of *Candida albicans* while all crude extracts didn't show any sensitivity against *Saccharomyces boulardii*, and when we'd done (High Performance Liquid Chromatography) HPLC test for detection of some active compound we found Quinic acid, Iridiods glycosides and Crocin which its rate in fresh callus was higher than fresh leaves.

Key words: Antimicrobial Activity, *Gardenia*, Pathogenic Bacteria and Yeasts

المقدمة

ازداد في الوقت الحاضر استخدام المستخلصات والمركبات البيولوجية الفعالة المعزولة من بعض النباتات الشائعة في معالجة الكثير من الاصابات الميكروبية [1]. حيث تنتج مركبات الايض الثانوي التي تعمل كمضادات للبكتريا والحشرات والملاريا وتدخل في تركيب كثير من العقاقير الطبية [2]. ومع تزايد مشكلة مقاومة البكتريا للمضادات الحياتية لذا دعت الحاجة إلى استخدام مركبات بديلة جديدة آمنة وفعالة للميكروبات [3] حيث يعد نبات الكاردينيا .*Gardenia jasminoides* Ellis احد النباتات المستخدمة في مجال الطب البديل في الدول الاسيوية ويضم جنس الكاردينيا حوالي 250 نوع من النباتات المزهرة التي تعود للعائلة Rubiaceae التي تنتشرفي المناطق الاستوائية وشبه الاستوائية لافريقيا, اسيا واستراليا. وهي شجيرات دائمة الخضرة يتراوح طولها من (2-6) قدم [4]. وقد أشار العديد من الباحثين إلى أهمية مستخلصات نبات الكاردينيا الطبية في معالجة ألام الرأس, القرحة المعدية, قاتل لليرقات, مانع للحمل, خافض للضغط, مسكن للآلام والحمى وكذلك يحتوي عوامل مضادة لفيروس الايدز ومثبط لإنزيمات

الأكسدة ومثبط لأنزيم Uncoupling protein 2 (UCP2) الذي يثبط إفراز أنزيم الأنسولين مما يتسبب بداء السكر من النوع الثاني كما له فعالية مضادة للفطريات والبكتريا [7,6,4,3]. وذلك لاحتواها على العديد من المركبات الفعالة مثل Crocetin, Crocin, Gardenoside, Geniposide Gardenin, [2]. ولأهمية النبات الطبية فقد اجري البحث للتحري عن الفعالية المضادة للبكتريا و الخمائر لمستخلص كالس نبات الكاردينيا المحضر باستخدام تقانة زراعة الانسجة النباتية و مقارنته مع الفعالية التثبيطية لاوراق هذا النبات وتحديد اهم المركبات الفعالة وتقدير تراكيزها مما يمكن من استخدامها كبدائل عن المضادات الحيوية في مجال صناعة الدواء او حتى بديلا عن المواد الحافظة في مجال صناعة الغذاء .

المواد وطرق العمل :

استحثاث كالس أوراق الكاردينيا

1. تحضير الأوساط الغذائية

حضر الوسط الغذائي Murashige and Skoog (MS) كامل القوة و بمعاملات مختلفة وكما يلي:

1. وسطMS الحاوي على منظمات النمو NAA بتركيز 1.0 ملغم/ لتر وBA بتركيز 3.0 ملغم/ لتر.
2. وسط MS الحاوي على منظمات النمو NAA بتركيز 2.0 ملغم/ لتر و BA بتركيز 3.0 ملغم/ لتر.
3. وسط MS الحاوي على منظمات النموNAA بتركيز 3.0 ملغم/ لتر و BA بتركيز 3.0 ملغم/ لتر.
4. وسط MS الحاوي علىNAA بتركيز 4.0 ملغم/ لتر وBA بتركيز 3.0 ملغم/ لتر.
5. وسط MS الحاوي علىNAA بتركيز 5.0 ملغم/ لتر وBA بتركيز 3.0 ملغم/ لتر.

وأضيف السكر بتركيز 30 غم/ لتر وعدل الأس الهيدروجيني الى 5.6-5.8 بواسطة جهاز قياس الأس الهيدروجيني و أضيف الاكار Agar-Agar بمعدل 8 غم/ لتر وعقمت الأوساط بجهاز الموصدة بدرجة حرارة 121 م و ضغط 1.04 كغم/ سم2.

2. تحضير الأجزاء النباتية لاستحثاث الكالس

أخذت قطع من أوراق نبات الكاردينيا و غسلت بالماء الجاري مدة نصف ساعة ثم بمحلول هايبوكلورات الصوديوم 5% وماء مقطر معقم بنسبة (1:1) حجم: حجم لمدة 5 دقائق ثم غسلت بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات متتالية لمدة 5 دقائق لكل مرة ثم زرعت على الأوساط المعدة لها و بواقع 10 مكررات لكل تركيز وحضنت الزروعات تحت فترة إضاءة 16 ساعة/ يوم وشدة إضاءة مقدارها 3000 لوكس، زرعت المعاملات ضمن التقسيم العشوائي الكامل Randomized Complete Design (RCD) و قورنت المتوسطات حسب اختبار LSD و بمستوى احتمال0.05.

جمع العينات النباتية لتحضير المستخلصات:

تم جمع الاوراق النباتية الطرية للكاردينيا من احدى حدائق مدينة بغداد حيث تم غسلها جيدا بالماء المقطر وتم تجفيفها بدرجة حرارة 37م لمدة 48 ساعة ثم طحنت بمطحنة نظيفة وحفظت لحين الاستخدام [3].

العزلات الميكروبية

تم الحصول على العزلات البكتيرية والخمائرالمدروسة معزولة ومشخصة من مختبر الاحياء المجهرية التابع لقسم علوم الحياة في كلية العلوم للبنات / جامعة بغداد.

تحضيرالمستخلصات النباتية

وزن 10 غم من مسحوق نبات اوراق الكاردينيا لكل نوع من المذيبات (الميثانول, الايثانول ,الأسيتون,الكلوروفورم , الايثرالبترولي) واضيف اليه 100 مل من المذيب العضوي المستخدم , ووضع في الحاضنة الهزازة بدرجة حرارة 37 م ولمدة 5-6 ساعات وبعدها رشح المزيج بواسطة 8 طبقات من الشاش الطبي ثم وزع الراشح في انابيب جهاز النبذ المركزي ونبذ بسرعة 4000 دورة/دقيقة ولمدة 10 دقائق. اخذ الرائق وصب في أطباق زجاجية نظيفة ووضعت الأطباق في الحاضنة بدرجة حرارة 37م لحين الحصول على المسحوق الجاف للمستخلص وقد اتبعت الخطوات أعلاه نفسها في تحضير كل المستخلصات مع اختلاف نوع المذيب العضوي في كل مرة (الميثانول, الايثانول ,الأسيتون,الكلوروفورم , الايثرالبترولي) وحفظت المستخلصات في الثلاجة بدرجة 4م لحين الاستعمال وحضرت جميع المستخلصات بتركيز نهائي 30 ملغم/مل باستخدام المذيب Dimethyl (DMSO) sulphoxide [10].

تحضير مستخلص الكالس

جمع الكالس المستحث من الأوراق النباتية ومن ثم جفف و طحن وتم استخلاصه بطريقة الاستخلاص الكحولي البارد (كحول الميثانول المطلق) بنسبة 10:1(كالس: كحول) وحضن بدرجة حرارة 25±2 م في حاضنة معقمة ومظلمة لمدة يومين ومن ثم رشح وجفف. وكررت الخطوات المذكورة سابقا وحضرت جميع المستخلصات بتركيز نهائي 30ملغم /مل [10].

تحضير عالق البكتريا والخمائر

اختيرت 4-5 مستعمرات من البكتريا والخمائرالمعزولة النامية على وسط الاكار المغذي للبكتريا ووسط اكار السابروبد المغذي للخمائر ونقلت الى انبوبة اختبارتحتوي على 10 مل من مرق مولر -هنتون للبكتريا ومرق السابروبد للخمائر على التوالي وحضنت بدرجة 37م لمدة 5-6 ساعات لحين ظهور العكورة وقد تمت مقارنة هذه العكورة مع عالق قياسي وهو انبوبة ماكفرلاند 0.5 للحصول على عالق مايكروبي بتركيز 1.5× 8^10 خلية/مل [11].

دراسة الفعالية التثبيطية للمستخلصات النباتية تجاه البكتريا والخمائر

استخدمت طريقة الانتشار بالحفر Agar well diffusion method لدراسة تأثير المستخلص الكحولي لكالس نبات الكاردينيا وتأثير المستخلصات العضوية المختلفة لأوراق هذا النبات (الميثانول ,الايثانول ,الاسيتون ,الكلوروفورم ,الايثرالبترولي) على العزلات البكتيرية والخمائر المذكورة اعلاه . وتم ذلك بنقل 0.1 مل من العالق البكتيري الذي يحتوي 1.5 × 8^10 خلية / مل. الى اطباق تحتوي وسط اكار مولر-هنتون Mueller- Hinton Agar ونشرعلى سطح الوسط الزرعي بواسطة ماسحة قطنية معقمة وتركت الاطباق ليجف العالق, اما عالق الخميرة فقد تم زرعه على وسط Sabouraud dextrose Agar بعدها عملت حفر بقطر6 ملم على سطح الوسط الزرعي الصلب وبأستخدام الثاقب الفليني cork borer المعقم. ونقلت المستخلصات المحضرة إلى الحفر وبحجم 50 مايكرولتر في كل حفرة مع بقاء حفرة واحد كسيطرة نقل إليها المذيب DMSO 10%، حظنت

الاطباق بدرجة 37م لمدة 24ساعة وحددت فعالية المستخلصات النباتية بقياس قطر منطقة التثبيط Inhibition zone حول الحفر مقاسة بالمليمترمطروحاً منه قطر الحفرة [12].

تحليل High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

تم إجراء تحليل HPLC باستخدام جهاز الكروموتوغرافيا السائلة نوع Shimadzu 2010 وذلك لتشخيص المركبات الفعالة الموجودة في الكالس الطري والأوراق الطرية لنبات *G. jasminoides* ومنها Iridiods , Quinic acid & Crocins , حيث تم الفصل باستخدام عمود C(18) مع محلول من الماء والميثانول كطور متحرك mobile phase وتم التحري بواسطة مطياف UV-Vis 2010SPD وعلى طول موجي 250 نانومتر حيث تم حقن 20 مايكروليتر في عمود HPLC وتم تحديد تركيز تلك المركبات الفعالة مقارنة مع منطقة الذروة peak area للعينة القياسية, وتم حساب تركيز المركبات الفعالة حسب المعادلة التالية:

Concentration (microgram\ml) = area of sample \ area of standard x conc. of standard.

التحليل الإحصائي

تم استخدام تصميم القطاعات العشوائية RCD لتحليل البيانات في تجربة استحداث الكالس وحسب اقل فرق معنوي LSD واستخدم البرنامج الإحصائي statistical analysis system (SAS) (2010) وقورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات باختبار اقل فرق معنوي Least significant differences LSD وتحت مستوى احتمالية $P \leq 0.05$ لتجارب قياس الفعالية التثبيطية لمستخلصات كالس واوراق الكاردينيا على البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة غرام والخمائر وكذلك في تقدير تركيز المركبات الفعالة للكالس والاوراق الطرية [13].

3- النتائج والمناقشة

تأثير منظمات النمو على نمو الكالس

أظهرت النتائج في جدول (1) نشوء الكالس من قطع الأوراق المزروعة على وسط MS والحاوي على منظمات النمو NAA و BA مع اختلاف في نشوء الكالس ونموه باختلاف تراكيز منظمات النمو, حيث كانت افضل توليفة هي المعاملة رقم (5)، إذ لوحظ زيادة معنوية في الوزن الطري للكالس, تلاه المعاملة (4) في حين كان اقل وزن طري للكالس في معاملة رقم (1). حيث ذكر [14] إن استخدام توليفة من الاوكسين والسايتوكاينين أفضل من استخدام كل منهما على انفراد في استحثاث الكالس و يعود السبب إلى حدوث توازن بين الاوكسينات والسيتوكاينينات مع التوازن الداخلي للخلايا التي تعمل على تشجيع الانقسام الخلوي واستطالة الخلايا, وقد يعزى السبب إلى الاوكسين الذي يؤثر بصورة مباشرة في توسيع الخلايا من خلال زيادة نشاط بعض الأنزيمات أو بنائها و المسؤولة عن زيادة ليونة الجدار ونفاذيته محدثاً توسعاً في الخلايا , وتتفق نتائج هذا البحث مع ما توصل إليه العديد من الباحثين إذ أشار كل من [15، 16] الى إن إضافة الاوكسين NAA بالتراكيز المرتفعة يحفز على تكون الكالس بدرجة أعلى من استعماله بتراكيز واطئة وخاصة بوجود السايتوكاينين في الوسط.

جدول (1): تأثير معاملات استحثاث الكالس المدروسة في الوزن الطري والوزن الجاف (غم)

المعاملة	المتوسط ± الخطأ القياسي	
	الوزن الطري	الوزن الجاف
1	0.002 ± 0.0812	0.001 ± 0.0770
2	0.001 ± 0.0740	0.003 ± 0.0920
3	0.05 ± 0.2330	0.001 ± 0.0231
4	0.04 ± 0.3570	0.003 ± 0.03660
5	0.08 ± 0.5310	0.003 ± 0.0487
قيم LSD	* 0.176	NS 0.0880

* (P≤0.05)، NS: غير معنوي.

تأثير مستخلص الكالس ومستخلصات المذيبات العضوية لأوراق نبات الكاردينيا

اظهرت نتائج جداول (2،3،4) إن مستخلص الكالس له تأثيراً متساوياً على البكتريا الموجبة لصبغة غرام والسالبة لصبغة غرام, حيث أثر على ثلاث بكتريا موجبة وثلاث أخرى سالبة وكان له أعلى فعالية تثبيطية لبكتريا *P. vulgaris* وبقطر منطقة تثبيط (10) ملم, تليه بكتريا *S .aureus* بقطر (10) ملم. يليه مستخلص الأسيتون الذي كان تأثيره على البكتريا الموجبة لصبغة غرام اعلى من البكتريا السالبة لصبغة غرام وكان أعلى فعل تثبيطي على بكتريا *S. aureus* و *E. faecalis* وبقطر منطقة تثبيط 10،7 ملم على التوالي وكان اقل تأثيراً في معدل التثبيط على البكتريا السالبة لصبغة غرام وكان بمعدل 8،6 ملم لبكتريا *P. vulgaris* و *P. aeruginosa* على التوالي. ويليه المستخلص الايثانولي الذي أثر على البكتريا السالبة لصبغة غرام وبمعدل تثبيط أعلى من الموجبة لصبغة غرام وكانت (8,10) ملم لبكتريا *E .coli* و *S. typhi* على التوالي وكانت 6 ملم كل من بكتريا *S. aureus* و *E. faecalis* على التوالي. أما بالنسبة للمستخلصات الاسيتون والايثانول كانت اقل تأثيراً مقارنةً بباقي المستخلصات على البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة غرام في حين لم يظهر مستخلص الكلوروفورم أي تأثير على البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة غرام. أما تأثير المستخلصات على الخمائر فلم تظهرخميرة *S .boulardii* أي تحسس لكل المستخلصات المدروسة في حين كانت خميرة *C. albicans* قد تحسست لكل المستخلصات المدروسة وكان أعلاها للمستخلص الميثانولي والاسيتوني .

جدول (2): الفعالية التثبيطية لمستخلص الكالس والمستخلصات العضوية لاوراق الكاردينيا على البكتريا الموجبة لصبغة غرام .

أنواع المستخلصات النباتية	معدل أقطار تثبيط البكتريا (ملم) المتوسط ± الخطأ القياسي				قيم LSD
	S. aureus	*E. faecalis*	*Strep. pyogens*	*B. cereus*	
كالس	0.18 ± 10	0.00 ± 0	0.05 ± 7	0.04 ± 6	* 3.50
ايثانول	0.04 ± 6	0.04 ± 6	0.00 ± 0	0.00 ± 0	* 2.75
ميثانول	0.37 ± 12	0.00 ± 0	0.00 ± 0	0.00 ± 0	* 4.20
أسيتون	0.18 ± 10	0.05 ± 7	0.00 ± 0	0.00 ± 0	* 4.00
كلوروفورم	0.00 ± 0	0.00 ± 0	0.00 ± 0	0.00 ± 0	NS 0.00
أيثر	0.00 ± 0	0.00 ± 0	0.18 ± 10	0.00 ± 0	* 4.10
قيم LSD	* 4.70	* 3.25	* 3.80	* 2.75	----

* (P≤0.05) ، NS: غير معنوي.

جدول (3): الفعالية التثبيطية لمستخلص الكالس والمستخلصات العضوية لاوراق الكارديا على البكتريا السالبة لصبغة غرام .

أنواع المستخلصات النباتية	معدل أقطار تثبيط البكتريا (ملم) المتوسط ± الخطأ القياسي				قيم LSD
	E. coli	*S. typhi*	*P. aeruginosa*	*P. vulgaris*	
كالس	0.04 ± 6	0.00 ± 0	0.05 ± 7	0.18 ± 10	* 3.50
ايثانول	0.18 ± 10	0.06 ± 8	0.00 ± 0	0.00 ± 0	* 4.03
ميثانول	0.00 ± 0	0.00 ± 0	0.00 ± 0	0.18 ± 10	* 4.10
أسيتون	0.00 ± 0	0.00 ± 0	0.04 ± 6	0.06 ± 8	* 3.52
كلوروفورم	0.00 ± 0	0.06 ± 8	0.00 ± 0	0.06 ± 8	* 3.00
أيثر	0.00 ± 0	0.18 ± 10	0.00 ± 0	0.00 ± 0	* 4.10
قيم LSD	* 4.00	* 4.75	* 3.25	* 5.20	----

* (P≤0.05).

جدول (4): الفعالية التثبيطية لمستخلص الكالس والمستخلصات العضوية لاوراق الكارديا على الخمائر .

أنواع المستخلصات النباتية	معدل أقطار تثبيط الخمائر (ملم) المتوسط ± الخطأ القياسي	
	C. albicans	*S. boulardii*
كالس	0.02 ± 5	0.00 ± 0
ايثانول	0.08 ± 9	0.00 ± 0
ميثانول	0.37 ± 12	0.00 ± 0
أسيتون	0.34 ± 11	0.00 ± 0
كلوروفورم	0.18 ± 10	0.00 ± 0
أيثر	0.18 ± 10	0.00 ± 0
قيم LSD	* 3.80	NS 0.00

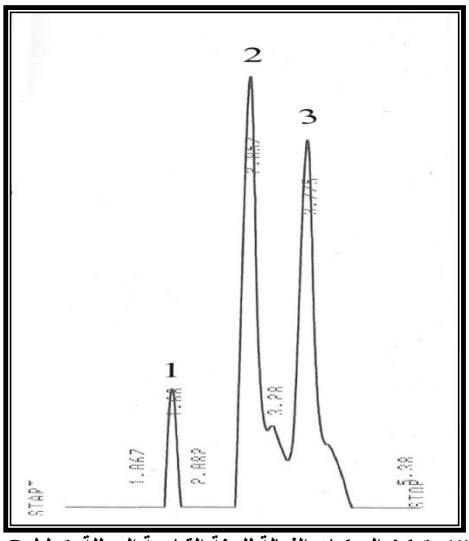
* (P≤0.05) , NS: غير معنوي.

تقدير تركيز بعض المركبات الفعالة للكالس الطري والأوراق الطرية لنبات الكارديا بتحليل HPLC

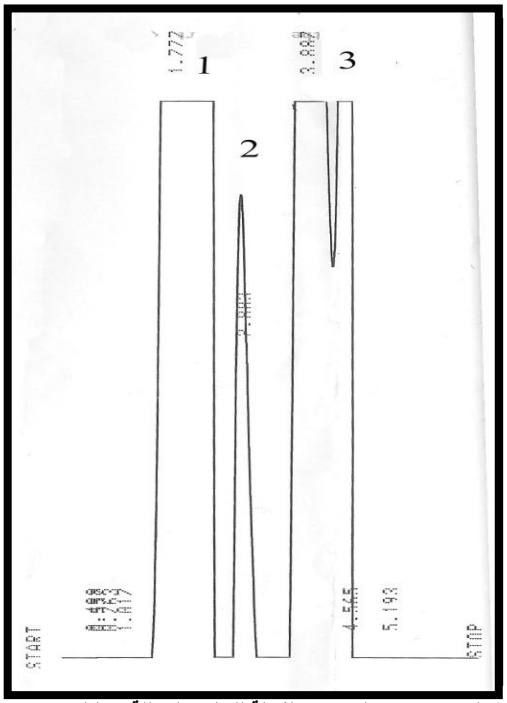
أظهرت نتائج تحليل HPLC لكالس وأوراق نبات الكارديا الطرية ظهور عدة مركبات فعالة وهي Glycosides ، Crocins Iridiod Quinic acid وكان تركيز هذه المركبات الفعالة في الكالس الطري أعلى من تركيزها في عينة الأوراق الطرية كما موضح في جدول (5) والأشكال 1,2,3 إن تركيز Iridiod glycosides كان 405.4 مايكرو غرام \مل حيث تفوق بمقدار أكثر ست مرات على تركيزها في الأوراق الطرية وكذلك في المركبين الآخرين كان الكالس أعلى تركيزا وذلك لظهور المركبات الفعالة في جهاز HPLC عند اخذ عينة مقدارها 100 ملغم من الكالس مقارنة مع ظهور تلك المركبات وقراءتها عند اخذ ما يعادل 3 غرام من الأوراق الطرية.

جدول (5): مقارنة تركيز بعض المركبات الفعالة للكالس الطري والأوراق الطرية لنبات الكارديا بتحليل HPLC.

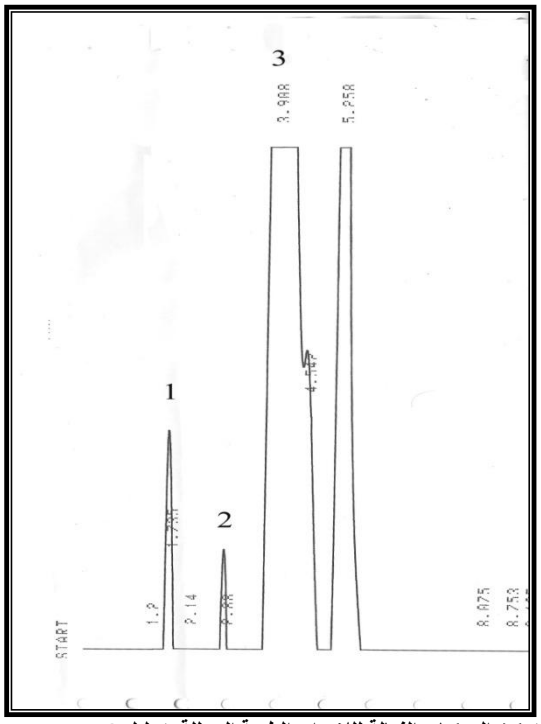
المركبات الفعالة	الكالس الطري		الأوراق الطرية	
	Retention time	(µg/ml) Con.	Retention time	(µg/ml) Con.
Iridiod glycosides	1.777	405.4	1.735	65
Quinic acid	2.883	27	2.88	30.5
Crocins	3.887	79.9	3.908	92.4



شكل (1): تركيز المركبات الفعالة للعينة القياسية المحللة بتحليل HPLC.
1= Iridiod glycosides , 2= Quinic acid , 3= Crocins



شكل (2): تركيز المركبات الفعالة للكالس المحللة بتحليل HPLC.
1= Iridiod glycosides , 2= Quinic acid , 3= Crocins



شكل (2) تركيز المركبات الفعالة للاوراق الطرية المحللة بتحليل HPLC.
1= Iridiod glycosides , 2= Quinic acid , 3= Crocins

يستنتج من ذلك إن لجميع المستخلصات المدروسة القابلية على تثبيط الأحياء المجهرية ولكن بصورة متفاوتة وذلك يعود لتباين طرائق الاستخلاص المستعملة واختلاف قطبية المذيب والتي أدت إلى اختلاف محتوى المستخلصات من المجموعات الفعالة [17], وان اختلاف الفعالية المضادة للأحياء المجهرية للمستخلصات النباتية يعتمد على نوع النبات والكائن ألمجهري [18] وأظهرت الدراسة تقاربا بين تأثر البكتريا السالبة والموجبة لصبغة غرام للمستخلصات وكان مستخلص كالس أوراق الكاردينيا أكثر فعالية في تثبيط البكتريا والخمائر المختبرة مقارنة بالمستخلصات الأخرى والذي يتفق مع ما جاءت به [20,19] بأن مستخلصات الكالس أكثر كفاءة من باقي المستخلصات الخام في تثبيط الأحياء المجهرية , وذلك لكون المركبات الناتجة من تقنية زراعة الأنسجة تكون أكثر سهولة للاستخلاص مع توافر الكالس على مدار السنة و يكون ذو نقاوة عالية [21]. مقارنة مع كمية الأوراق الطرية التي نحتاجها لاستخلاص المركبات الفعالة والتي تكون غير متوافرة على طول السنة وبالكميات المطلوبة. حيث تعتمد الفعالية التثبيطية للمركبات الطبيعية بصورة رئيسية على تركيبها وخواصها الكيميائية وأكد هذه النتائج عند إجراء فحص HPLC للكالس الطري والأوراق الطرية لنبات الكاردينيا التي أظهرت عدة مركبات فعالة منها Iridoid glycoside, Quinic acid , Crocin حيث اتفقت نتائجنا مع ما جاءت به [22] باعتبارها طريقة ناجحة للتحري النوعي والكمي لأهم المركبات الفعالة لنبات الكاردينيا لكونها مركبات حيوية قاتلة للبكتريا والفطريات. وتعزى القابلية التثبيطية لمستخلصات كالس الكاردينيا على الأحياء المجهرية إلى احتوائها على نسبة عالية من Iridoid glycoside وهي من مركبات Monoterpenoids حيث ترجع ميكانيكية عملها إلى وجود تشابك بين المركبات الكاره ه للماء المحبة للدهون lipophilic في أغشية البكتريا مما يؤدي إلى تمزقها وبالتالي

تمزق خلايا البكتريا وموتها [23] . كذلك تعود الكاردينيا إلى العائلة Rubiaceae وهي من اكثر الفصائل النباتية احتواء على القلويدات التي لها تأثيرات دوائية كثيرة ومنها Quinic acid [24] حيث تتداخل المركبات القلويدية مع DNA الخلية مما يؤدي إلى تثبيط البكتريا والخمائر [25], ومما سبق تتوضح عظمة الخالق في احتواء النبات على المركبات الكلايكوسيدية والقلويدية الذي ينتج عنه تاثيرا تازريا على كل من البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة غرام من خلال تاثيرها على الجدار الخلوي وتخليق البروتين.

المصادر

1. Mahalingam, R., Ambikapathy,V. and Panneerselvam. (2011). Studies on antifungal activities of some medical plants against *Ceratocystis paradoxa* causing pine apple disease. World J. Science and Technology. 1(7):10-13.
2. Ogundipe,O., Akinbiyi , O. and Moody, J.O. (1998). Antibacterial activities of essential ornamental plants. Nigeria J.Natural Products & Medicine. 2: 48p.
3. Shahidi Bonjar, G.H. (2004). Screening for antibacterial properties of some Iranian plants against two strains of *Escherichia coli*. Asian. J. of Plant Sciences.3(3):310-314. ISSN 1682-3974.
4. Al-Juboory, K.H., Skirvin, R.M. and Wiliams, D.J. (1998). Callus induction and adventitious shoot regeneration of *Gardenia* (*Gardenia jasminoides Ellis)*leaf explants.Scientia. Hortic. 72:171-78.
5. Chaichana, J., Niwatananaun,W.,Vejabnikul, S., Somana, S. and Chanskaow, S. (2009).Voltile constituents and biological activities of *Gardenia jasminoides* , J, Health Res. 23(3):141-45.
6. Hardman, H. (2006). Gardenia fruit compound starting point for diabetes therapy. Cell metabolism. Cell press, hhardman@yahoo.com.
7. Lee, J.H., Lee, D.U. and Jeong, C.S. (2009). *Gardenia jasminoides Ellis* ethanol extract and its constituents reduce the risks of gastric and reverse gastric lesions in rats. Food and Chemical Toxicology. 47:1127-31.
8. Tuchinda,P.Pompimon,W.;Reutrakul,V.;Pohmkotr,M. & Santisuk,T.(2002).Cytotoxic and anti HIV-1 constituents of *Gardenia obtusifolia* and their modified compound.Tetrahedron,58:8073-86.
9. Wei, X.H., Cheng, X.M., Shen, J.S.and Wang, Z.T. (2008). Antidepressant effect of yeuju-wan ethanol extract and its fractions in mice models of despair. J. Ethnopharmacol. 117:339-44.
10. Rani, I., Akhund, S.H., Suhail, M. and Abro, H. (2010). Antimicrobial potential of seed *Eruca sativa*, Pak. J. Bot. 42(4);2949-53.
11. عبد, هدى سهيل. (2009). تأثير المستخلص الكحولي لنبات القرنفل Clove (*Eugenia caryophyllus*) في نمو بعض الأنواع البكتيرية المرضية. مجلة بحوث التقنيات الإحيائية. (1)3: 72-78 .
12. القيسي, صفاء الدين احمد و محمد علي, هالة هيثم .(2009). تأثير مستخلصات أوراق نبات الدورانتا *Duranta repens* في نمو وفعالية بعض الأنواع البكتيرية المرضية وبعض الفطريات, مجلة ام سلمة. (1)6 :29-41.
13. SAS. (2010). Statistical Analysis System, User's Guide. Statistical. Version 9.1 ed. SAS. Inst. Inc. Cary. N.C. USA.
14. Mosleh, M. S. D. and Khetam, A. R. (2010). Effect of different concentration of Kinetin and NAA on micropropagation of *Gardenia jasmenoides*. J. Zankoy Sulaimani. 13(1): 102-120.
15. Jasim, A.M. (2000). Production of somatic embryos of date palms (*Phoenix dactylifera* L.). *In vitro* by liquid media culture. J.Basrah, Researchs. 24(1): 1-6.
16. سعد، احمد عبد الله . (2001). تأثير نوع الوسط الغذائي والسايتوكاينين في نشوء الكالس وتكون الأجنة الخضرية في نخيل التمر . *Phoenix dactylifera* L صنف الأشقر، رسالة ماجستير، قسم البستنة والنخيل، كلية الزراعة-جامعة البصرة-العراق.
17. حمدان، عامر حسين، ظاهر، عامر عبد الرحمن و القيسي، مهدي ضمد. (2009). مقارنة الكفاءة التثبيطية لمستخلصات بذور الخردل الأبيض تجاه بعض عزلات البكتريا الاختبارية. مجلة الزراعة العراقية. (14)4: 40-47.
18. الذهب, ازهار عمران . (1998). الفعالية التضادية لمستخلصات نباتية عراقية في بعض البكتريا الممرضة.رسالة ماجستير, كلية العلوم, جامعة بابل ، العراق.
19. Al-Juboory, I.A. (2006). *In vivo* and in vitro studies on the production of some secondary metabolites from *Salvia officinalis* L.and their antibacterial activity .M.Sc. thesis, College of Science, Al- nahrain University: 1o7 pp.
20. Al-azawy, N.S. (2007). Effect of flowers and callus extracts of *Matricaria chamomilla* on microorganisms causing eyes infection. M Sc., College of Science, Al- Nahrain University, Iraq.
21. Bourgand, F., Gravat, A. and Milesi, S. (2001). Production of plant secondary metabolites: historical perspective, PlantScience.161: 839-51.
22. Bergonzi, M.C., Righesch,C., Iscchi, B. and Bilia, A.R. (2012). Identification and qualification of constituents of *Gardenia jasminoides Ellis* (Zhizi) by HPLC – DAD – ESI-M, J. Food Chemistry. 134(2):1199-1204pp.
23. Cowan,M.M.(1999).Plant products as microbial agents, Clinical Microbiology Reviews, 12(4):564-820.
24. يحيى, توفيق الحاج. (2003). النبات والطب البديل, الطبعة الاولى, الدار العربية. بيروت – لبنان.
25. Al- Bayati, F.A. and Al-Mola, H.F. (2008). Antibacterial and antifungal activity of different parts of *Tribulus terrstris L*. growing in Iraq. J. Zhejiang Univ. Sci. 9(2):154-59.