دراسة التاثير البايولوجي للمستخلصات والحوامض الكاربوكسيلية المفصولة من ثمار نبات البنزهير *Citrus aurantifolia* في نمو عدد من الجراثيم السالبة والموجبة لصبغة كرام

مثنى جاسم محمد

قسم علوم الحياة، كلية التربية، جامعة الموصل، الموصل، جمهورية العراق

الكلمات الدالة: البنزهير، الحوامض الكاربوكسيلية، البكتريا

الملخص:

تم في هذه الدراسة فصل المستخلص الكحولي من ثمار نبات البنزهير (نومي البصرة) *Citruc aurantifolia* ثم فصلت الحوامض الكاربوكسيلية من المستخلص وشخصت وحدد التاثير التثبيطي لها في نمو ستة انواع من الجراثيم وهي *Staphylococcus aureus* و *Bacillus subtilis* و *Klebsiella pneumoniae* و *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa* و *Salmonella typhi* ، واستخدم المضادين الحيويين (Chloramphenicol و Ciprofloxacin) وفصل حامض الستريك باستخدام تقنية كروماتوكرافيا العمود (Column chromatography) على هلام السليكا. وكذلك باستخدام تقنية الطبقة الرقيقة (TLC plate) (Thin layer chromatography) وحسبت قيمة (Rf) (Rate of flow) الحامض. وقد اظهر المستخلص والحوامض الكاربوكسيلية تاثيرا تثبيطيا على نمو الجراثيم المستخدمة في الدراسة مقارنة بعينات السيطرة، اذ اظهر المستخلص الكحولي تاثيرا تثبيطيا متفاوتا ضد جميع انواع هذه الجراثيم بالمقارنة مع عينات السيطرة. اما الحوامض الكاربوكسيلية فقد اظهرت تاثيرا تثبيطيا اقل من المستخلص الكحولي على نفس الجراثيم، اذ اظهرت الحوامض تاثيرا تثبيطيا على الجراثيم *S. typhi* و *Staph. aureus* و *B. subtilis* مقارب لتاثير عينات السيطرة. فيما اظهرت تاثيرا متفاوتا في الجراثيم *K. pneumonia* و *E. coli* و *Ps. aeruginosa* .

المقدمة:

تعد النباتات الطبية مصدرا غنيا بالكثير من المركبات التي تدخل في صناعة الادوية والمستحضرات الطبية سواء المستخدم منها في الطب الشعبي او الطب الحديث(٢٢). ونتيجة لتوفر النباتات بانواعها المختلفة ولسهولة الحصول عليها، فضلا عن ارتفاع اسعار المواد المخلقة صناعيا الداخلة في صناعة الادوية وزيادة خطورتها على الصحة ازداد الاهتمام في مجالات البحث العلمي المختص في دراسة النباتات الطبية ونواتجها الطبيعية(١). وقد جرى الاهتمام في مراكز البحوث بالعديد من النباتات الطبية المنتجة للمركبات الفعالة بايولوجيا واكتسب نبات البنزهير (نومي البصرة) *Citrus aurantifolia* جانبا كبيرا من الاهتمام(١٣). وتتميز نباتات البنزهير بكونها اشجار دائمة الخضرة تنمو في عدد من بلدان العالم مثل المكسيك، ايطاليا، الهند وامريكا وتعتبر هذه الدول الموطن الاصلي لهذا النبات، ومن ثم بدأت تنتشر زراعته في مناطق متعددة من العالم(١١). وتعد ثمار نبات البنزهير الجزء الاهم في النبات، اذ تستخدم كطعام وشراب بارد وساخن شائع الاستخدام في كثير من البلدان(١٤). كما تتميز بكونها مصدرا رئيسا للحوامض الكاربوكسيلية وخصوصا منها حامض الستريك (citric acid) الذي يصل تركيزه احيانا الى (٣٥%) مقارنة بمشتقة الماليت التي لا تتجاوز نسبتها (١٥%) من مجمل المحتوى العضوي لهذا النبات. واكدت دراسات عديدة على ان السترات التي منها حامض الستريك تتركز في العصير الخلوي وبهذا تعطي صفة الحامضية لهذه الخلايا(٥).

كما درست عملية تكون حامض الستريك وتركيزه في العصير الخلوي واتضح ان معدل تغير الدالة الحامضية وما تحويه الخلية من ATP هو السبب المباشر في تركيزه داخل العصير الخلوي(٤).

اضافة الى وجود الاحماض العضوية في الثمار بتراكيز عالية فانها تحتوي على الزيت الاساسي Lime oil الذي يتكون من α and β-pinene و myrcene و limonene و terpinolene و 1,8-ceneole و linalool و borneol و citral وكميات قليلة من neral acetate و gernyl acetate (١٧).

ويستخدم Lime oil في علاج الكثير من الحالات المرضية، اذ يستخدم كمطهر ضد الفايروسات، مادة مقلصة، مشهي، مبيد للجراثيم، مسكن للحمى ومقوي(١٩).

ونظرا لزيادة مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية المخلقة صناعيا والناتجة من قدرة البكتريا على تعطيل عمل هذه الادوية من خلال توظيف بعض الانزيمات الخاصة التي تعمل على تقليل نفاذية الغشاء الخلوي وبالتالي منع هذه المضادات من الدخول الى الخلية(٢٣). كما ان للكثير من المضادات المخلقة صناعيا اثارا جانبية ضارة نتيجة لعدم استقراريتها على عكس بعض المركبات الطبيعية المفصولة من النباتات التي تتميز احيانا باستقرارية عالية، ولهذا ازداد الاهتمام بالنباتات الطبية كونها مصدرا طبيعيا لهذه المواد(٦).

ونظرا لاهمية النبات وما يحتويه من مركبات فعالة بايولوجيا هدفت الدراسة الحالية الى دراسة التاثير التثبيطي للمركبات المفصولة من نبات البنزهير في نمو عدد من الجراثيم.

مواد وطرائق العمل:

انواع الجراثيم المستخدمة في الدراسة:

Staphylococcus aureus
Bacillus subtilis
Klebsiella pneumoniae
Escherichia coli
Pseudomonas aeruginosa
Salmonella typhi

تم الحصول على جميع انواع الجراثيم السالبة والموجبة لصبغة كرام من قسم علوم الحياة-كلية التربية ما عدا جرثومة *Klebsiella pneumoniae* تم الحصول عليها من كلية الطب البيطري-جامعة الموصل.

جمع النبات وتصنيفه:

استخدم في هذه الدراسة ثمار نبات البنزهير (نومي البصرة) وتم الحصول عليها من احد المعاشب المحلية المتخصصة في بيع النباتات الطبية وجرى التحقق من صنف النبات المستخدم قيد الدراسة في كلية الزراعة والغابات- جامعة الموصل(٢).

تحضير المستخلصات الكحولية الخام:

حضرت المستخلصات باستخدام ثلاث انواع من المذيبات العضوية وهي (ايثر بترولي (٦٠-٨٠ °م) والكلوروفورم والكحول الاثيلي) واتبعت طريقة Grand وآخرون (١٩٨٨) في تحضير المستخلصات. اذ تمت عملية الاستخلاص تحت ظروف مبردة باستخدام الثلج بسحق النبات وخلطه مع المذيب بنسبة (١ غم/١٠ سم^3) وترك في الثلاجة مدة (٢٤ ساعة) ورشح باستخدام قمع بوخنر ثم بخر المذيب باستخدام جهاز المبخر الدوار بدرجة حرارة (٤٠ °م). واجريت العملية اعلاه باستخدام المذيبات العضوية الثلاثة على التوالي على مسحوق النبات نفسه.

فصل الحوامض الكاربوكسيلية:

يذاب النموذج النباتي المحضر في الفقرة اعلاه في الايثر ويستخلص باستخدام بيكاربونات الصوديوم، تفصل الطبقة المائية وتحمض باستخدام حامض الهيدروكلوريك المخفف ومن ثم تستخلص باستخدام الايثر، تفصل الطبقة العضوية ويبخر المذيب للحصول على الحوامض الكاربوكسيلية(١٢).

الكشف عن الحوامض الكاربوكسيلية:

تم الكشف عن الحوامض الكاربوكسيلية من خلال كشف الايودات-ايوديد وذلك باضافة قطرتين من محلول ايوديد البوتاسيوم الى قطرتين من محلول المادة المشبع في الكحول المتعادل ثم تضاف قطرتين من محلول ايودات البوتاسيوم وتوضع في حمام مائي مغلي مدة دقيقة واحد بعدها تبرد الانبوبة وتضاف عدة قطرات من محلول النشا فيلاحظ ظهور لون ازرق دلالة على ان المادة حامضية(١٨).

استخدام عمود الفصل الكروماتوكرافي (هلام السليكا mesh 120-60) لفصل المكونات الفعالة بايولوجيا من مستخلص النبات:

استخدم عمود الفصل الكروماتوغرافي على هلام السليكا لتجزئة الحوامض اذ تم غسل العمود بالمذيبات الاتية: الايثر البترولي، الايثر البترولي- الاسيتون (V/V 1:1) والاسيتون-ايثانول (V/V 1:1) على التوالي. ثم ركزت المستخلصات المفصولة بوساطة جهاز المبخر الدوار (٤٠ °م)(٧).

كشف وتشخيص الحامض:

شخص حامض الستريك باستخدام تقنية كروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة (TLC plate) باستخدام نظام المحلول المتكون من (بيوتانول-حامض الفورميك-ماء) (V/V 5:1:4) وتم اظهار البقع بواسطة كاشف (بلورات اليود) وتم قياس (Rf) الحامض المفصول من النبات ومقارنته مع (Rf) العينة القياسية(٩).

تعقيم المستخلصات المفصولة:

تم اذابة المستخلص المفصول في ثنائي مثيل السلفوكسيد (DMSO) بنسبة (٥:١) (V/W) للحصول على تركيز (٢٠٠ ملغم/مل) والذي يستخدم في تحضير التراكيز الاخرى لاحقا. وعقم المزيج بطريقة البسترة وبدرجة حرارة (٦٢ °م) لمدة (١٠ دقائق)(١٥).

اختبار الفعالية التثبيطية:

اتبعت طريقة Levne وآخرون (١٩٩٧) المعتمدة على طريقة (Vandepitte) وآخرون (١٩٩١). اذ تم تلقيح وسط المرق المغذي بمستعمرات مفردة من الجراثيم الستة التي سبق ذكرها اعلاه كلا على حدى وحضنت بدرجة(٣٧ °م) مدة (١٨-٢٤) ساعة، ثم خفف العالق الجرثومي بعد ذلك بالمحلول الملحي الفسيولوجي Normal saline بالمقارنة مع انبوبة الاختبار القياسية ماكفرلاند رقم (١) Macferland No. 1 بحيث يحتوي على (10^8) خلية/سم^3 من العالق الجرثومي ونشر على سطح وسط الاكار المغذي الاعتيادي باستخدام الناشر الزجاجي، وحضنت الاطباق في الحاضنة لمدة (٣٠) دقيقة لكي يحصل التشرب، ولدراسة الفعالية المضادة للمواد المفصولة من النبات على نمو الجراثيم فقد حضرت اقراص من ورق الترشيح (Whatman No. 1) بقطر (٦) ملم المشبعة بتراكيز مختلفة من المواد المراد اختبارها. ثم ثبتت الاقراص بواسطة ملقط معقم وحضنت بدرجة حرارة (٣٧ °م) مدة (١٨) ساعة. بعدها تم قياس مناطق التثبيط ومقارنتها مع المضادات الحيوية القياسية (Chloramphenicol, Ciprofloxacin) كعينة سيطرة موجبة(٢٠).

النتائج والمناقشة:

تم فصل المستخلص الكحولي من ثمار نبات البنزهير ثم استخلصت الحوامض الكاربوكسيلية من المستخلص بشكل نقي وتم التحقق من المركبات المفصولة باستخدام الكواشف الخاصة بالحوامض الكاربوكسيلية. اذ تم تحديد التاثير التثبيطي للمستخلص الكحولي والحوامض الكاربوكسيلية المفصولة من ثمار نبات البنزهير في نمو ستة انواع من الجراثيم السالبة والموجبة لصبغة كرام. وتبين من خلال الدراسة ان المستخلص الكحولي والحوامض الكاربوكسيلية لها فعالية تثبيطية عالية على الجراثيم المستخدمة في الدراسة مقارنة بالمضادين الحيويين (Chloramphenicol و Ciprofloxacin).

حيث اظهر المستخلص الكحولي تاثيرا تثبيطيا جيدا ضد جميع انواع الجراثيم المستخدمة قيد الدراسة بالمقارنة بعينات السيطرة. اذ اظهر المستخلص تاثيرا تثبيطيا عاليا على جرثومة *E. coli* تليها جراثيم *Staph. aureus* و *K. pneumoniae* و *S. typhi* بالتساوي، ثم جرثومة *B. subtilis* واخيرا جرثومة *Ps. aeruginosa* . وكان للمستخلص تاثير تثبيطي جيدا على جميع انواع الجراثيم قيد الدراسة مقارنة بالمضادات الحيوية المستخدمة كعينات سيطرة وكما مبين في الجدول (١).

الجدول (١): الفعالية التثبيطية للمستخلص الكحولي في نمو عدد من الجراثيم السالبة والموجبة لصبغة كرام (قطر دائرة التثبيط مقاس بالملم)

Conc. (mg/ml)	*Staph. aureus*	*B. subtilis*	*K. pneumoniae*	*E. coli*	*Ps. aeruginosa*	*S. typhi*
200	22	20	22	25	17	22
100	18	17	15	22	13	20
50	18	15	13	18	10	17
25	9	10	9	13	-	13
12.5	-	7	-	11	-	9

واظهرت الحوامض الكاربوكسيلية تاثيرا تثبيطيا على جميع الجراثيم المستخدمة قيد الدراسة، حيث كانت جرثومة *S. typhi* اكثر الجراثيم تاثرا مقارنة مع عينات السيطرة. يليها جرثومة *Staph. aureus* التي كان تاثير الحوامض عليها مساويا لتاثير عينات السيطرة. وكذلك اظهرت الحوامض تاثيرا في جرثومة *B. subtilis* مساويا لتاثير عينات السيطرة. فيما اظهرت الحوامض تاثيرا متفاوتا في الجراثيم *K. pneumoniae* و *E. coli* . واخيرا جرثومة *Ps. aeruginosa* اقل من تاثير عينات السيطرة على نفس الجراثيم وكما مبين في الجدول (٢).

الجدول (٢): الفعالية التثبيطية للحوامض الكاربوكسيلية في نمو عدد من الجراثيم السالبة والموجبة لصبغة كرام (قطر دائرة التثبيط مقاس بالملم)

Conc. (mg/ml)	*Staph. aureus*	*B. subtilis*	*K. pneumoniae*	*E. coli*	*Ps. aeruginosa*	*S. typhi*
200	17	13	8	11	10	19
100	15	10	-	9	7	15
50	12	-	-	7	-	11
25	9	-	-	-	-	7
12.5	-	-	-	-	-	-

مما سبق يتضح ان للمستخلص الكحولي والحوامض الكاربوكسيلية المفصولة من ثمار نبات البنزهير تاثيرا تثبيطيا على جميع انواع الجراثيم المستخدمة في الدراسة مقارنة مع المضادات الحيوية، وعند المقارنة بين تاثير كل من المستخلص الكحولي والحوامض الكاربوكسيلية يلاحظ ان تاثير المستخلص كان اعلى من تاثير الحوامض على جميع انواع الجراثيم مقارنة بالمضادين الحيويين (Chloramphenicol و Ciprofloxacin) وكما مبين في الجدول (٣).

الجدول (٣): الفعالية التثبيطية للمستخلص الكحولي والحوامض الكاربوكسيلية عند تركيز (٢٠٠) ملغم/سم^3 في نمو عدد من الجراثيم السالبة والموجبة لصبغة كرام مقارنة بعينات السيطرة (قطر دائرة التثبيط مقاس بالملم)

Compounds	*Staph. aureus*	*B. subtilis*	*K. pneumoniae*	*E. coli*	*Ps. aeruginosa*	*S. typhi*
Alcoholic extract	22	20	22	25	17	22
Carboxylic acid	17	13	8	11	10	19
Chloramphenicol 30 µg	17	13	10	13	-	16
Ciprofloxacin 5 µg	-	-	15	18	15	18

ان مستخلص نبات البنزهير يحتوي على العديد من المركبات ذات الفعالية البايولوجية العالية، ولهذه المركبات قابلية جيدة للقضاء على الجراثيم(١)، اذ يستخدم هذا المستخلص كعلاج ضد بعض انواع البكتريا التي تصيب الامعاء كما يستخدم كعلاج في حالات الاصابة بالزكام(٣). ويحتوي مستخلص نبات البنزهير على نسبة جيدة من الحوامض الكاربوكسيلية وخصوصا حامض الستريك الذي يعد من الحوامض ذات الفعالية البايولوجية(١٦) وان لهذا الحامض قابلية كبيرة في تثبيط نمو الجراثيم من خلال تحطيم جدار الخلية وبالتالي موتها(٥).

المصادر:

1. Ates D.A. (2003). Antimicrobial activities various medicinal and commercial plant extracts. Turk. J. Biol., 27: 157-162.
2. Baily L.H. (1977)."Manual of Cultivated Plant". 15th ed.,Macmillan Publishing Co., New York, USA.
3. Brune A. and Muller M. (2002). Vacuolar acidication in citrus fruits: Comparison between acid lime (*Citrus aurantifolia*) and sweet lime (*Citrus limettioides*) juice cells. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 127: 171-177.
4. Brune A.; Gonzalez P.; Goren R. and Zehavi U. (1998). Citrate uptake into tonoplast vesicles from acid lime (*Citrus aurantifolia*) juice cells. J. Cells J. Mem. Biol., 166: 197-203.
5. Clements R. (1964). Organic acids in citrus fruits. I. Varietal differences. J. Food Sci., 29: 276-280.
6. Eloff J.N. (1998). Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants?.J. Ethnopharmacol., 60: 1-8.
7. Gidding J.C.; Graushka E.; Killer R.V. and Cazes J. (1975)."Advanced in Chromatography". Marcel Deleker Inc., New York.
8. Grand A., Woudergem P.A., Verpartes R. and Pousset J.L. 1988. "Anti-infection phytotherapies of tree savannah sengl (west Afreca), II-Antimicrobial activity of 33 species". J. Ethnopharmacol., 22: 25-31.
9. Harborne J.B. 1973. "Phytochemical Methods", Halsted Press, John Wiley and Sons, New York.
10. Leven M., Vandenberghe D.A., Metens F., Vlietinck A. and Lammens E. (1997). Screening of higher plants for biological activities. I. Antibacterial activity. Planta. Medica., 36: 311-321.
11. Murata T. (1977). Studies on the postharvest physiology and storage of citrus fruit. J. Jpn. Soc. Hortic. Sci., 46: 283-287.
12. Nedime D. (2001). The isolation of carboxylic acids from the flowers of *Delphinium formosum*. Turk. J. CFhem., 25: 93-97.
13. Oboh P.A. and Agbonlahor D.E. (1992). Antibacterial activity of *Citrus aurantifolia* (lime) juice against some Gram positive and Gram negative bacteria. Ann. Nat., 2: 1-9.
14. Rasmussn G. (1964). Seasonal changes in the organic acid content of velencia orange fruit in Florida. J. Am. Soc. Hortic. Sci., 84: 181-187.

University of California Press, Oakland, California, USA.
20. Todar, K. (2002). Staphylococcus. J. Med. Microbiol., 1-9.
21. Vandepitte J., Engloback K., Piote P. and Heuk C. (1991). Basic laboratory procedures in clinical bacteriology. World Health Organization, Geneva.
22. Velickovic D.T.; Randjelovi N.V. and Ristic M. (2003). Chemical constituents and antimicrobial activity of the ethanolic extracts obtained from the flower. Leaf and steam of *Salvia officinalis*. J. Serb. Chem. Soc., 68: 117-124.
23. Walsh W. (2000). Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. Nature, 406: 775-781.
15. Riose J.L., Recio M.C. and Villar A. (1987). Antimicrobial activity of selected plant employed in the Spanish Mediterranean area. J. Ethnopharmacol., 21: 139-152.
16. Sadka A. and Dahan E. (2000). The role of aconitase expression and activity in citrate metabolism of sourlemon fruit. Physiol. Plant, 108: 255-262.
17. Sasson A. and Monselise (1977). Organic acid composition of Shamouti oranges of harvest and during prolonged postharvest storage. J. Am. Soc. Hortic. Sci., 120: 331-336.
18. Shriner R.L., Fuson R.C. and Curtin D.Y. (1964). The Systematic Identification of Organic Compounds. 5th ed., John Wiley & Sons, Inc., New York.
19. Sinclair W.B. (1984). The Biochemistry and Physiology of the Lemon and other *Citrus fruits*.

Study of Biological Activity of Extract and Carboxylic Acids Isolated from *Citrus aurantifolin* Fruit on Growth of Some Gram Positive and Negative Bacteria

Muthana Jasem Mohammed

Department of Biology, College of Education , University of Mosul, Mosul, Iraq

Abstract:

In this research work, the alcoholic extract was isolated from *Citrus aurantifolia* (fruit). The carboxylic acids were isolated from alcoholic extract and the inhibitory effect of these compounds were investigated on the growth of six types of bacteria, which were: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella Pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhi*, two antibiotics (Chloramphenicol and Ciprofloxacin) were used as a control. Citric acid was isolated by column chromatography packed with activated silica gel was used for fractionation of the compounds aforesaid from plant extract, then identificated by thin layer chromatography (TLC plate), Rate of flow (Rf) value. Isolated compounds showed better inhibiting effect than control samples, alcoholic extract showed strong inhibiting effect on all types of bacteria under study compared with control samples. Carboxylic acids showed inhibitory effect (but less than alcoholic extract) on *S. typhi*, *Staph. aureus* and *B. subtilis* equal to control samples, it showed less and varying effect on *K. pneumoniae*, *E. coli* and *Ps. aeruginosa* than control samples.