فصل المركبات الكحولية من الزيت الاساسي لخشب الصندل (wood) *Santalum album* ودراسة تاثيرها البايولوجي في نمو بعض انواع الجراثيم السالبة والموجبة لصبغة كرام

مثنى جاسم محمد

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

الكلمات الدالة: الصندل، الزيت الاساسي، المركبات الكحولية، الجراثيم

الملخص:

تم في هذه الدراسة فصل الزيت الاساسي Essential oil من خشب نبات الصندل (wood) *Santalum album* وفصلت المركبات الكحولية Alcoholic compounds من الزيت والتي تشمل الكحول α,β-santalol واشباهه التركيبية. وحدد التاثير التثبيطي للزيت الاساسي والمركبات الكحولية في نمو عدد من الجراثيم وهي: *Bacillus subtilis* و *Staphylococcus aureus* و *Pseudomonas aeruginosa* و *Escherichia coli* و *Salmonela typhi* و *Klebsiella pneumoniae* واستخدم المضادين الحيويين Amikacin و Chloramphenicol كعينات سيطرة. اذ اظهر الزيت الاساسي تاثيرا تثبيطيا متباينا مقارنة بالمضادات الحيوية واظهر اعلى تاثير على جرثومة *S. typhi* تليها جرثومة *B. subtilis* ثم جرثومة *E. coli* اعلى من تاثير المضادات الحيوية. كما اظهر الزيت تاثيرا تثبيطيا على جرثومة *Staph. aureus* مساوي لتاثير المضادات الحيوية، فيما لم يظهر الزيت أي تاثير على جرثومتي *Ps. aeruginosa* و *K. pneumoniae* مقارنة بالمضادات الحيوية. اما المركبات الكحولية المفصولة من الزيت فقد اظهرت تاثيرا متباينا، اذ اظهرت المركبات تاثيرا تثبيطيا عاليا على الجراثيم *B. subtilis* و *E. coli* و *Staph. aureus* و *S. typhi* و *Ps. aeruginosa* اعلى من تاثير المضادات الحيوية، بينما لم تؤثر المركبات الكحولية على جرثومة *K. pneumoniae* . بناءا على النتائج الواردة يتضح ان للمركبات الكحولية تاثيرا تثبيطيا اعلى من تاثير الزيت الاساسي على الجراثيم المستخدمة في الدراسة.

المقدمة:

استخدمت النباتات الطبية منذ القدم كعلاج للامراض التي عانى منها الناس، اذ تركت هذه النباتات اثارا واضحة في شتى حضارات العالم (٧) واليوم وبعد التطور التكنولوجي الهائل الذي شهده العالم، ازداد تعلق البشر بالنباتات الطبية واستخدامها كعلاج فعال ضد الكثير من الامراض (٥) وان مصطلح النباتات الطبية لا يقتصر فقط على الاعشاب بل يشمل ايضا كل اصناف المملكة النباتية بما فيها الاشجار (٢٩) اذ تعتبر اشجار نبات الصندل من بين النباتات الطبية المهمة لما تحتويه هذه الاشجار من مركبات ذات فعالية بايولوجية عالية تستخدم في علاج بعض الحالات المرضية (٢١،٢) وهي اشجار صغيرة دائمة الخضرة ذات افرع جانبية اسطوانية الشكل، يتميز خشبها Sapwood بلون ابيض اما خشب Heartwood يتميز بلون اصفر مائل الى البني (٢٦،٢٤). ويوجد اكثر من (٢٥) نوع من هذه الاشجار تنمو في مناطق مختلفة من العالم مثل الهند الذي يعتقد انه موطنها الاصلي وجنوب اسيا واستراليا وجزر الهاواي (٢٧،٢٠). ولهذه الاشجار اسماء عدة منها Santalum album و Sandal wood و Chandana و White sandal wood و White Saunders و Yellow sandal wood تنتمي الى عائلة Santalaceae (١٤،٢٨).

ان الجزء الاهم في هذه الاشجار هو الخشب الذي يحتوي على Volatile oil ٢،٥%، Resin و Tannic acid ، اما الزيت الاساسي فهو الجزء الاهم من بين المركبات التي يحتويها الخشب(١٥) اذ يتكون الزيت الاساسي من α,β-santalol 90%، α-trans bergamalol 5% ، z-nuceferol 1.5% ، unidentified 1% ، z-lonceol 1.8% ، helifolenol 0.8% (١٩).

ولهذا الزيت استخدامات طبية عديدة منها علاج الامراض الجلدية وخصوصا الامراض التي تصيب البشرة (١١) كما يغذي بصيلات الشعر ويمنع تساقطه (٤) ويستخدم في علاج الالتهابات (١٦) بالاضافة الى فعاليته التثبيطية ضد الفطريات والبكتريا والفايروسات (١). وبشكل عام فان للزيوت الاساسية المفصولة من النباتات اهمية كبيرة في صناعة الادوية والمضادات الحيوية (١٣) اذ تحتوي هذه الزيوت على مركبات ذات فعالية بايولوجية عالية(١٧).

ومن بين اهم المركبات الفعالة بايولوجيا الموجودة في الزيت الاساسي لخشب الصندل هي المركبات الكحولية، اذ تتميز هذه المركبات بفعالية تثبيطية عالية ضد الجراثيم (٨) ونتيجة لزيادة مقاومة الجراثيم ضد الكثير من المضادات الحيوية. وللحاجة الملحة لتطوير مضادات ذات فعالية، لجأ بعض الباحثون الى النباتات الطبية ليجدوا فيها بديلا مناسبا (٩).

وفي دراستنا الحالية على خشب نبات الصندل *Santalum album* (wood) تم فصل الزيت الاساسي من الخشب ودراسة تاثير مكوناته في نمو الجراثيم، لذا فقد هدفت الدراسة الحالية الى تحديد التاثير التثبيطي للزيت الاساسي ومكوناته الفعالة في نمو عدد من الجراثيم السالبة والموجبة لصبغة كرام.

المواد وطرائق العمل:

انواع الجراثيم المستخدمة في الدراسة:

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

تم الحصول على جميع انواع الجراثيم المستخدمة في الدراسة من قسم علوم الحياة / كلية التربية فيما عدا جرثومتي *Staphylococcus aureus* و *Klebsiella pneumoniae* فقد تم الحصول عليها من كلية الطب البيطري-جامعة الموصل.

جمع النبات وتصنيفه:

استخدم في هذه الدراسة خشب الصندل، اذ تم الحصول عليه من احد المعاشب المتخصصة في بيع النباتات الطبية، وجرى التحقق من صنف النبات في كلية الزراعة والغابات / جامعة الموصل (٣).

فصل الزيت الاساسي من خشب الصندل:

تم فصل الزيت الاساسي من خشب الصندل باستخدام طريقة التقطير البخاري Steam distillation ، اذ تم تقطيع ٢٥٠ غم من الخشب وسحقه وتهيئته لعملية الفصل، ووضع المسحوق في دورق دائري يربط مع جهاز التقطير البخاري ويمرر عليه بخار الماء المقطر وما ان تبدأ عملية الفصل يتم جمع المادة المفصولة (المتقطرة) وهي مزيج من الزيت المفصول من المسحوق والماء المتكثف في الجهاز، وكررت العملية اكثر من مرة لنفس المسحوق، وفي كل مرة تستغرق العملية ٣-٤ ساعات للتأكد من الحصول على جميع الزيت الموجود في مسحوق الخشب. وبعد اتمام عملية التقطير تم جمع المزيج الناتج (الماء + الزيت) ليفصل باستخدام قمع الفصل، فنحصل على الطبقة الزيتية (١٠).

فصل المركبات الكحولية:

تذاب كمية مناسبة من الزيت الاساسي الذي تم فصله في الخطوة السابقة في خلات الاثيل وتستخلص باستخدام محلول مائي من بيكاربونات الصوديوم. ثم تفصل الطبقة العضوية ويعاد استخلاصها باستخدام محلول مائي من هيدروكسيد الصوديوم، ثم تفصل الطبقة العضوية ويبخر المذيب بواسطة جهاز المبخر الدوار بدرجة حرارة ٤٠ °م. والمواد المفصولة هي عبارة عن مزيج من المركبات الكحولية (١٢).

الكشف عن الكحولات:

يمكن تعيين الكحولات كما ونوعا من خلال كشف الزانثات الذي يتم بواسطة تفاعل الكوكسيد البوتاسيوم مع ثنائي كبريتيد الكاربون لتكوين زانثات الكيل البوتاسيوم. فعند اجراء هذا الكشف يتكون راسب اصفر باهت وهذا يعني انه كشف موجب للكحولات مما استوجب كشف اكثر دقة لتحديد نوع الكحول فيما اذا كان اوليا او ثانويا او ثالثيا، اذ تم استخدام كشف N-بروموسكسيناميد. وجرى الكشف باذابة الكحول في محلول البروم المذاب في رابع كلوريد الكاربون ثم اضافة N-بروموسكسيناميد وقد ظهر لون برتقالي ثابت وهذا يدل على ان الكحولات التي تم فصلها من الزيت كحولات اولية (٢٥).

تعقيم المركبات المفصولة:

تم اذابة المواد المفصولة في ثنائي مثيل السلفوكسيد (DMSO) بنسبة (٥:١) (V/W) للحصول على تركيز (٢٠٠) ملغم/مل والذي يستخدم في تحضير التراكيز (١٠٠، ٥٠، ٢٥، ١٢,٥) ملغم/مل ثم عقم المزيج بطريقة البسترة وبدرجة حرارة (٦٢) °م لمدة (١٠) دقائق(٢٣).

اختبار الفعالية التثبيطية:

اتبعت طريقة Leven واخرون (١٩٩٧) (١٨) المعتمدة على طريقة Vandepitte واخرون (١٩٩١) (٣١)، اذ تم تلقيح وسط المرق المغذي بمستعمرات مفردة من الجراثيم التي سبق ذكرها اعلاه كلا على حدى ثم حضن الوسط 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) Macfrland No. 1 بحيث يحتوي على ^{٨}١٠ خلية/سم^{٣} من العالق الجرثومي ونشر (٠,١) سم^{٣} من العالق الجرثومي المخفف على سطح وسط الاكار المغذي الاعتيادي باستخدام الناشر الزجاجي، ثم حضنت الاطباق في الحاضنة مدة (٣٠) دقيقة لكي يحصل التشرب. ولدراسة الفعالية المضادة للمركبات المفصولة من النبات في نمو الجراثيم فقد حضرت اقراص من ورق الترشيح (Whatman No. 1) بقطر (٦) ملم المشبعة بتراكيز مختلفة من المواد المفصولة من النبات المراد اختبارها، ثم ثبتت الاقراص بواسطة ملقط معقم وحضنت بدرجة حرارة (٣٧) °م مدة (٢٤) ساعة. بعدها تم قياس مناطق التثبيط ومقارنتها مع المضادات الحيوية القياسية (Chloramphenicol, Amikacin) كعينة سيطرة موجبة(٣٠).

النتائج والمناقشة:

فصل الزيت الاساسي من خشب نبات الصندل ثم جزئ للحصول على المركبات الكحولية لدراسة فعاليتها البايولوجية.

وتم تحديد التاثير التثبيطي للزيت الاساسي والمركبات الكحولية المفصولة من خشب نبات الصندل *Santalum album* في نمو ستة انواع من الجراثيم السالبة والموجبة لصبغة كرام. اذ اظهر الزيت الاساسي تباينا كبيرا في تاثيره على نمو الجراثيم المستخدمة في الدراسة، فقد ظهر اعلى تاثير تثبيطي للزيت الاساسي على جرثومة *S. typhi* تليها جرثومة *B. subtilis* اعلى من تاثير المضادات الحيوية. وكذلك اظهر الزيت الاساسي تاثيرا تثبيطيا على جرثومة *E. coli* اعلى من تاثير المضادات الحيوية، في حين اظهر الزيت الاساسي تاثيرا تثبيطيا على جرثومة *Staph. aureus* مساوية لتاثير المضادات الحيوية، بينما لم يؤثر في جرثومتي *Ps. aeruginosa* و *K. pneumoniae* مقارنة بالمضادات الحيوية (Amikacin و Chloramphenicol) كما مبين في الجدول (١).

الجدول (١): الفعالية التثبيطية للزيت الاساسي المفصول من خشب الصندل في نمو عدد من الجراثيم السالبة والموجبة لصبغة كرام (قطر دائرة الثبيط مقاس بالملم)

Conc. mg/ml	*B. subtilis*	*Staph. aureus*	*Ps. aeruginosa*	*E. coli*	*S. typhi*	*K. pneumoniae*
200	22	16	-	18	23	-
100	18	12	-	13	21	-
50	15	10	-	12	18	-
25	14	9	-	9	15	-
12.5	10	7	-	-	9	-

اما المركبات الكحولية فقد اظهرت تاثيرا تثبيطيا متباينا على انواع الجراثيم المستخدمة في الدراسة، اذ ظهر اعلى تاثير للمركبات الكحولية على جرثومة *B. subtilis* تليها جرثومة *E. coli* واعلى من تاثير المضادات

الحيوية. واظهرت المركبات الكحولية تاثيرا تثبيطيا متساويا على جرثومتي *Staph. aureus* و *S. typhi* وفي نفس الوقت اعلى من تاثير المضادات الحيوية. كما اظهرت المركبات الكحولية تاثيرا تثبيطيا على جرثومة *Ps. aeruginosa* اعلى من تاثير المضادات الحيوية. فيما لم يظهر أي تاثير للمركبات الكحولية على جرثومة *K. pneumoniae* مقارنة بالمضادات الحيوية (Amikacin و Chloramphenicol) كما مبين في الجدول (٢).

الجدول (٢): الفعالية التثبيطية للمركبات الكحولية المفصولة من الزيت الاساسي في نمو عدد من الجراثيم السالبة والموجبة لصبغة كرام (قطر دائرة الثبيط مقاس بالملم)

Conc. mg/ml	*B. subtilis*	*Staph. aureus*	*Ps. aeruginosa*	*E. coli*	*S. typhi*	*K. pneumoniae*
200	25	20	15	21	20	-
100	22	17	10	19	14	-
50	18	14	9	15	12	-
25	15	12	-	12	11	-
12.5	13	7	-	10	7	-

وتشير النتائج التي سبق ذكرها ان للزيت الاساسي والمركبات الكحولية تاثيرا تثبيطيا عاليا على معظم انواع الجراثيم مقارنة مع المضادات الحيوية، فقد اظهرت المركبات الكحولية تاثيرا تثبيطيا اعلى من تاثير الزيت الاساسي على جميع انواع الجراثيم المستخدمة في الدراسة فيما عدا جرثومة *S. typhi* كان تاثير الزيت الاساسي اعلى من تاثير الكحولات. بينما لم يؤثر الزيت الاساسي والمركبات الكحولية على جرثومة *K. pneumoniae* مقارنة بالمضادات الحيوية (Amikacin و Chloramphenicol) كما مبين في الجدول (٣).

الجدول (٣): الفعالية التثبيطية للزيت الاساسي والمركبات الكحولية المفصولة من خشب الصندل عند تركيز (٢٠٠) ملغم/مل في نمو عدد من الجراثيم السالبة والموجبة لصبغة كرام مقارنة بعينات السيطرة (قطر دائرة الثبيط مقاس بالملم)

Compounds	*B. subtilis*	*Staph. aureus*	*Ps. aeruginosa*	*E. coli*	*S. typhi*	*K. pneumoniae*
الزيت الاساسي	22	16	-	18	23	-
المركبات الكحولية	25	20	15	21	20	-
Amikacin (30 µg/disk)	15	17	-	-	-	-
Chloraphenicol (30 µg/disk)	13	16	9	13	17	9

يعد الزيت الاساسي لخشب الصندل من المكونات الفعالة بايولوجيا والمستخدمة حديثا في بعض الادوية المضادة للجراثيم، فقد ثبت ان لهذا الزيت قابلية في القضاء على بعض انواع الجراثيم التي تصيب الانسان وخصوصا منها التي تصيب البشرة (٦)، اذ يحتوي الزيت الاساسي على مجموعة من المركبات الكحولية مثل Santalol واشباهه التركيبية (١٩)، وتشكل مركبات α,β-Santalol نسبة كبيرة من الزيت قد تصل الى (٩٠%)، وتتميز هذه المركبات بفعالية بايولوجية عالية، اذ تؤثر في نمو الجراثيم (٢٢).

References:

1. Aureli P. and Costantini A. (1992). Antimicrobial activity of some plant essential oils against Listeria monocytogenes. J. Food Prot., 55: 344-348.
1. Bacchi S.K. (1985). Germination of open pollinated seeds and survival of seedlings from selected trees of Santalum album. Myforest, 21: 221-224.
2. Baily L.H. (1977). "Manual of Cultivated Plant". 15th ed., Macmillan Publishing Co., New York, USA.
3. Bapat V.A and Rao P.S. (1979). Somatic embrtogenesis and plantlet formation in tissue culture of sanda (wood) (Santalum album). Annals of Botany, 44, 629-659.
4. Borris R.P. (1996). Natural products research perspectives from a major pharmaceutical company. J. Ethnopharmacol., 51: 29-38.
5. Brantner A. and Grein E. (1994). Antibacterial activity of plant extract used externally in tradition medicine. J. Ethropharmacol., 44: 35-40.
6. Dastur J.F. (1970). Medicinal plants of Indian and Pakistan D.C. Taraporerala Sans and Co. Private lid Bombay, India, p. 212.
7. Deans S.G. and Ritchi G. (1987). Antimicrobial properties of plant essential oils. Int. J. Food Microbiol., 5: 165-180.
8. Dever L.A. and Dermody T.S. (1991). Mechanisms of bacterial resistance to antibiotics. Arch. Int. Med., 151: 886-895.
9. Donald L.P., Gary M.L., Georgs S.K. and Randall G.E. (1990). "Introduction to Organic Laboratory Techniques". Amiroscale Approach, Saunders College Publishing, pp. 48-667.
10. Ehleringer J.R. and Schulze E.D. (1985). Xylem tapping mistletoes: Water or nutrient parasites? Science, 227: 1479-1481.
11. Eloff J.N. (1998). Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? J. Ethnopharmacol., 60: 1-8.
12. Farag R.S., Daw Z.Y. and Hewed F.M. (1989). Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. J. Food Protec., 52: 665-667.
13. Gjerum L., Fax J. and Ehrhart Y. (1995). Sandal wood seed nursery plant tatien technology. RAS, Noumea, New Caledonia.
14. Ioneragan O.W. (1990). Historical review of Sandal wood (Santalum album) search in Western Australia. Department of Conservation and Land Management.
15. Isrnan M. (1999). Pesticides based on plant essential oil. Outlook, 10: 68-72.

16. Janssan A.M. and Sheffer J.J. (1987). Antimicrobial activity of essential oil. Plant Med., 53: 395-398.
17. 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.
18. Raclomiljac A.M. (1998). Santalum album plantatious: A complex interaction between parasite and host. Ph.D. Thesis, Murdoch University, Perth, Australia.
19. Radomiljac A.M. and McComb J.A. (1998). Xylem transfer of organic solutes in Santalum album. Annals of Botany, 82: 675-682.
20. Rai S.N. (1990). Status and cultivation of sandal wood in India. USDA Forest Service Technical Report, 66-71.
21. Rao P.S. and Bapat V.A. (1992). Micropropagation of sandal wood (sandal (wood)). Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 193-210.
22. 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.
23. Semathi R.A. (1983). Breeding of Sandal. A tropical Hardwood tree. F.R.I. Dehra Dun.
24. 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.
25. Sindhu H.C. and Sharma C.R. (1991). Self pollination in sandal (Santalum album). Mysofrest, 27(2): 171-175.
26. Sindhu H.C. and Sujatha M. (1989). Pollination studies in Santalum album. Curr. Set., 58: 629-630.
27. Srinivasan V.V. and Sivar V.A. (1992). Sandal (Santalum album). Dehra Dun: Indian Council of Forest Research and Education.
28. Taylor R.S. (1996). Antimicrobial activities of Southern Nepalese medicinal plants. J. Ethonopharmacol., 50: 97-102.
29. Todar K. (2002). Staphylococcus. J. Med. Microbiol., 1-9.
30. Vandepitte J., Engloback K., Piote P. and Heuk C. (1991). Basic laboratory procedures in clinical bacteriology. World Health Organization, Geneva.

Separation the Alcoholic Compounds From the Essential Oil of *Santalum album* (wood), and Study the Biological Effect on Some Gram Positive and Negative Bacteria

Muthana Jasem Mohammed

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

Abstract:

In this study the essential oil was separated from *Santalum album* (wood), then the alcoholic compounds which include α,β-Santalol and its isomers were separated and determine the inhibitory effect of essential oil and these compounds on the growth of some bacteria, which include: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae* and used the antibiotics (Amikacin and Chloramphenicol) as control.

The essential oil showed high effect on *S. typhi*, *B. subtilis* and *E. coli* respectively, it showed equal inhibiting effect on *Staph. aureus* in comparison with antibiotics, while there was no effect on *Ps. aeruginosa* and *K. pneumoniae* in comparison with antibiotics.

The alcoholic compounds which isolated from the essential oil showed different inhibiting effect on bacteria under study, it showed high effect on *B. subtilis*, *E. coli*, *Staph. aureus*, *S. typhi* and *Ps. aeruginosa* and it was no effect on *K. pneumoniae* in comparison with antibiotics.

The study showed that the inhibiting effect of alcoholic compounds was more than the essential oil effect on bacteria which used in this study.