------مجلة علوم الرافدين، المجلد 25، العدد 3، ص38-47، 2014------

استخلاص بعض الببتيدات المضادة للجراثيم من أزهار نباتات العائلة الكاردينية ودراسة فعاليتها تجاه بعض البكتريا المرضية

محمد عبد الله محمود
قسم علوم الحياة/ كلية التربية/ جامعة الموصل

محسن أيوب عيسى
قسم علوم الحياة/ كلية العلوم/ جامعة الموصل

(أستُلم 26/ 6 / 2013 ؛ قُبِل 9 / 9 / 2013)

الملخص

اجري هذا البحث بهدف عزل واستخلاص الببتيدات (نوع السايكلوتيدات) المضادة للجراثيم Antimicrobial peptides (Cyclotides) من أزهار نباتات العائلة الكاردينية Rubiaceae (الكاردينيا *Gardenia florid* والقهوة العربيـة *Coffea arabica*) وفصلها بتقنية الـ RP-HPLC ودراسة تأثيرها المضاد تجاه عدد من البكتريا المرضية الموجبة والسالبة لـصبغة كرام ذات المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية التي تـضمنت: *Staphylococcus aureus , Enterococcus faecalis,* ، *Pseudomona aeruginosa* ، *E.coli : 0157: H7* ومقارنة تأثير هذه الببتيدات مع بعض المضادات الحيوية.

بينت نتائج عزل وتنقية هذه الببتيدات النباتية (السايكلوتيدات) أمكانية الحصول عليها، وقد أظهرت نتائج الفصل بتقنية الـ RP-HPLC وجود (9) قمم امتصاص في مستخلص السايكلوتيدات الخام المعزول من ورد الكاردينيا و (8) قمم امتصاص من ورد القهوة العربية. تباينت قمم الامتصاص للسايكلوتيدات المعزولة من هذه النباتات في زمن الاحتبـاس، والنـسبة المئويـة للارتفاع والمساحة.

وتبين من نتائج التأثير المضاد لهذه السايكلوتيدات وجود تأثير واضح على جميع البكتريا المدروسة وبـصورة متباينـة، وعدم ظهور أي حالة مقاومة تجاهها. وكان التأثير الأفضل في حالة السايكلوتيدات المستخلصة من ورد القهوة العربية. وكـان نوعا البكتريا الموجبة لصبغة كرام هي الأكثر تأثرا خاصة في حالة السايكلوتيدات المعزولة من ورد القهوة العربية وبأقطـار تثبيط (33) ملم و (31) ملم لبكتريا السبحيات البرازية والعنقوديات الذهبية على التوالي.

الكلمات الدالة: الببتيدات المضادة للجراثيم، العائلة الكاردينية، السايكلوتيدات.

Extraction of some Antimicrobial Peptides from *Rubiaceae* Flowers and Studying their Activity Against some Pathogenic Bacteria

Mohammed A. Mahmood
Department of Biology/ College of Education
University of Mosul

Muhsin A. Essa
Department of Biology/ College of Science
University of Mosul

ABSTRACT

This research was performed to isolate and purify the Plant Antimicrobial peptides (Cyclotides type) from Rubiaceae family (*Gardenia florida* and *Coffea arabica*), and study their antimicrobial activity against some multidrug pathogenic bacteria (*Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis, Pseudomonas aeruginosa, E.coli: 0157: H7*), and compare it with theantibiotics effect.

The results of isolating and purifying these Cyclotides showed that it could be obtained from the studied plants. The RP-HPLC technique results showed that there were (9) absorption peaks in

cyclotide crud extract isolated from *Gardenia florida* flowers, (8) absorption peaks from *Coffea arabica*. These absorbing peaks of cyclotides varied in retention time, height and area percentages.

The results of the antimicrobial activity of the isolated cyclotides against studied pathogenic bacteria showed that all these peptides were effective with different ratios, and there was no resistance against them. Cyclotides isolated from *Coffea arabica* flowers were the best. Both types of gram-positive bacteria were the most effected, especially against cyclotides isolated from *Coffea arabica*, with (33) mm and (31)mm, inhibition zone for *E. faecalis* and *S. aureus* respectively.

Keywords: Antimicrobial peptides, *rubiaceae*, Cyclotides.

المقدمة

نتيجة لظهور وانتشار مشكلة المقاومة الجرثومية تجاه المضادات الحيوية وتطورها الى مستوى قد لا يمكن السيطرة عليه أتجه الباحثون والمختصون إلى البحث في البدائل العلاجية لهذه المضادات للتخلص من هذه المشكلة التي أصبحت صعبة الحل (Marshall and Arenas, 2003)، حيث نجح العديد من الباحثين في الحصول على ببتيدات طبيعية عزلت من أنواع مختلفة من الكائنات الحية، تمتاز بكونها طبيعة ولها دور فعال في القضاء على العديد من الأحياء المجهرية المرضية كالبكتريا والفطريات والفيروسات والطفيليات كما تمتاز بسهولة الإنتاج والحصول عليها وأنها اقل عرضة للمقاومة البكتيرية، (Liu *et al*., 2000 ; Vizioli and Salzet, 2003).

البيبتدات المضادة للجراثيم Antimicrobial Peptides (Amps) أسم معقد لا يمكن أن يعرف بصيغة ثابتة وقياسية، وهو أسم مشتق من صفات هذه البيتيدات وخواصها المختلفة ومصادرها المتنوعة، (Wang, 2010). وكذلك يمكن أن تعرف بأنها مجمل البيتيدات الدفاعية للمضيف والتي تدخل ضمن المناعة الذاتية كاستجابة لمؤثر خارجي أو بيئي وتوجد في كل الكائنات الحية، (Hancock and Sahl, 2006).

عزلت البيتيدات المضادة للجراثيم من أنواع مختلفة من الكائنات الحية ومنها النباتات، وكذلك من الأجزاء المختلفة من النبات نفسه، سواء من الأزهار أو الجذور أو الأوراق أو البذور أو الأغصان، وهذه البيتيدات المعزولة أختلفت في بعض صفاتها مثل شحنتها وثباتية تركيبها وحجمها وكذلك محتواها من الأواصر الثنائية الكبريت واحتوائها على أحماض أمينية معينة وغيرها(Pelegrini *et al*., 2011).

إن أكثر أنواع البيتيدات النباتية انتشارا والتي لها دور فعال في القضاء على العديد من الاحياء المجهرية هي البيتيدات النباتية من نوع السايكلوتايد Cyclotides التي عزلت من عدة نباتات زهرية بالأخص نباتات تابعة للعائلة البنفسجية و العائلة الكاردينية، والعائلة البقولية (Gruber *et al*., 2008; Poth *et al*., 2011). تعد العائلة الكاردينية من Rubiaceae العوائل المهمة والمميزة في أحتوائها على السايكلوتايد و كان الاكتشاف الأول لهذه البيتيدات في النباتات التابعة لهذه العائلة التي تنتشر انواعها المختلفة حول العالم، وتعد أزهار نباتي الكاردينيا والقهوة العربية (الصورة 1) من أهم مصادر السايكلوتايدات المعزولة من العائلة الكاردينية (Govaerts *et al*., 2006; Mulvenna, 2012).

هناك ما يقرب من (15-60) ببتيدا مختلفا من نوع السايكلوتيدات في كل نوع نباتي من الأنواع التابعة للعائلة الكاردينية وإن السايكلوتيدات المعزولة من العائلة الكاردينية كان لها دور فعال ضد العديد من أنواع البكتريا المرضية وكذلك الفيروسات وغيرها من الممرضات (Gould *et al*., 2012; Delprete, 2004; Govaerts *et al*., 2006).

ونظرا لأهمية هذه البيتيدات نوع السايكلوتايد بوصفها بدائل علاجية فعالة ولقلة الدراسات المحلية حولها فقد هدفت الدراسة الحالية الى استخلاص هذه البيتيدات من نباتات العائلة الكاردينية (وردة نبات الكاردينيا والقهوة العربية) ودراسة تأثيرها المضاد تجاه عدد من البكتريا المرضية الموجبة والسالبة لصبغة كرام ذات المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية.

الصورة 1: ورد الكاردينيا (A) / ورد القهوة العربية (B)

المواد وطرائق العمل

المواد

العزلات البكتيرية:

استخدمت أربع عزلات بكتيرية مرضية معزولة ومشخصة في قسم علوم الحياة-كلية العلوم-جامعة الموصل، اثنان منها تعود لمجموعة البكتريا السالبة لصبغة كرام وهـي *Pseudomonas auroginosa* و *E.coli* 0157: H7، واثنـان تعـود لمجموعة البكتريا الموجبة لصبغة كرام وهي *Staphylococcus aureus* و *Enterococcus faecalis*.

تم التأكد من تشخيص هذه العزلات بأجراء الاختبارات التشخيصية الملائمة وكما ورد في (Collee *et al*., 1996 ; Koneman *et al*., 2006)

النباتات المدروسة:

استخدمت ورود نبات الكارديني *Gardenia florida* التي تم الحصول عليها من المشاتل المحلية في محافظة نينوى وورود نبات القهوة العربية *Coffea arabica* والتي تم الحصول عليها من دولة اليمن العربية وكلاهما تابع للعائلة الكارديني ـة Rubiaceae وتم التأكد من تصنيفها في قسم علوم الحياة - كلية العلوم - جامعة الموصل وبالاستعانة بالمصادر الملائمة (الكاتب، 2000).

نظفت الأزهار وجففُت تحت أشعة الشمس وبجو الغرفة لحين الاستخدام وإجراء التجارب اللاحقة.

الأوساط الزرعية المحضرة:

الأوساط المستخدمة ضمن تجارب حساسية البكتريا المدروسة تجاه السايكلوتيدات في طريقـة الانتـشار الـشعاعي ذو الطبقتين Two-stage radial diffusion حضرت من مكوناتها الأساسية واعتمادا على (Shamova *et al*., 1999).

- الوسط A المستخدم في تجربة الانتشار ألشعاعي ذو الطبقتين Two-stage radial diffusion.

المكونات	التركيز غم/لتر ماء مقطر
Agarose	10
Trypticase soy broth	30
Sodium Phosphate	10

- الوسط B المستخدم في تجربة الانتشار الشعاعي ذو الطبقتين.

المكونات	التركيز غم/لتر ماء مقطر
agar	10
Trypticase soy broth	60

ضبط الـ pH لكل من الوسطين A وB بين 7.2 – 7.4، وعقما بجهاز الموصدة (Autoclave) بدرجـة حـرارة 121 م° وعند ضغط 15 باوند/انج^2 ولمدة 15 دقيقة.

المضادات الحيوية:

استخدمت الأقراص المجهزة من شركة Bioanalyse (Turkey) وبقطر (6) ملم وبالتراكيز المبينة في الجدول (1).

الجدول 1: أنواع وتراكيز المضادات الحيوية المستخدمة قيد الدراسة

المضاد الحيوي	الرمز	التركيز/مايكروغرام
Amikacin	AK	10
Ampicillin	AM	10
Amoxiclave	AMC	30
Cefotaxime	CTX	10
Ciprofloxacin	CIP	10
Erythromycin	E	10
Gentamicin	CN	30
Piperacillin	PRL	30
Tetracycline	TE	30
Tobramycin	TOB	10

طرائق العمل

حساسية العزلات البكتيرية المدروسة تجاه المضادات الحيوية:

أجري اختبار الحساسية للعزلات البكتيرية الأربعة قيد الدراسة تجاه مجموعة من المضادات الحيوية المبينة في الجدول (1)، وقد اتبعت طريقة Kirby-Bauer المحورة لهذا الغرض، حيث حضر معلق البكتريا الفتية المدروسة من خلال نقل مستعمرات من البكتريا إلى أنبوبة اختبار حاوية على 5 مل من المحلول الملحي الفسلجي المعقم، وضبط كثافة المعلق البكتيري تقريبيا عند $1.5*10^8$ خلية/مل بمقارنتها مع أنبوبة ماكفرلاند رقم (1)، غمرت مسحة قطنية معقمة في المعلق البكتيري ونشر على سطح وسط أكار مولر–هنتون، ثم وزعت أقراص المضادات الحيوية على الأطباق، وحضنت في درجة حرارة 37 م° ولمدة 18 – 24 ساعة، بعدها تم قياس منطقة التثبيط لكل مضاد وحيوي ومقارنتها مع الجداول الخاصة وذلك بالاعتماد على قياسات منظمة الصحة العالمية، (Vandepitte *et al*., 2003).

أستخلاص البتيدات المضادة للجراثيم من النباتات المدروسة:

استخلصت البتيدات المضادة للجراثيم نوع السايكلوتايد من ورود النباتات المدروسة بالاعتماد على (Daly *et al*., 2003) وكما يلي :

- جمعُ ما يقارب (50)غم من الورود الجافة وقطعت وهرست باستخدام هاون خزفي مع مراعاة عدم ارتفاع درجة الحرارة.
- غمرت في دورق حاوي على مزيج من (Dichlormethane و Methanol) بتراكيز مطلقة بنسبة 1:1 ولمدة يومين.
- رُشح المستخلص للتخلص من الأجزاء النباتية الكبيرة الباقية.

- وضع هذا المستخلص في قمع فصل حاوي على مزيج من كلوروفورم وماء بنسبة 1:1 مع الرُج المتكرر و مراعاة فتح صنبور قمع الفصل لخروج الغازات المتولدة من مزج هذه المواد.
- أخذت الطبقة العليا المتكونة في عمود الفصل (الحاوية على السايكلوتايد) وعوملت بجهاز التجفيد Lypholizer لتحويلها إلى مسحوق وحفظت لحين الاستخدام.

فصل السايكلوتايد بتقنية كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء-الطور المعاكس (RP-HPLC):
Reversed-Phase-High-Performance Liquid Chromatography

اجري العمل في قسم الكيمياء/ كلية العلوم/ جامعة الموصل بالاعتماد على (Selsted *et al*., 1993; Shamova *et al* ., 1999)، وتم فصل السايكلوتيدات باستخدام جهاز الـ HPLC ذو عمود فصل من نوع وحجم R.P. C18 Column. وبطور ثابت (Stationary Phase) غير قطبي، وطور متحرك (MobilePhase) قطبي، وبنسبة متدرجة من (1-60%) من Acetonitrile و (0.1%) من Trifluoroacetic acid (TFA)، وماء مقطر.

تأثير السايكلوتايد المفصولة على البكتيريا المدروسة:

درس تأثير السايكلوتايدات المستخلصة المضاد للجراثيم تجاه الأربعة انواع من البكتريا المدروسة بالاستناد الى طريقة (Selsted *et al* ., 1993)، المحدثة التي استخدم فيها طريقة الانتشار الشعاعي ذو الطبقتين Two-stage radial diffusions (Lehrer *et al*., 1991)، وتلخص الطريقة كالأتي:

- نشطت البكتيريا بزرعها على وسط Trypticase Soy broth (TSB) لمدة 18 ساعة للحصول على نمو في الطور اللوغارتمي.
- مزج (1) مل من معلق البكتيريا الذي يحتوي بحدود ($1.5*10^8$) خلية/ مل مع (10) مل من الوسط A المبرد وترك ليتصلب في طبق زجاجي ثم عملت حفر في طبقة الوسط المتصلب بقطر (4-mm).
- أخذ 1غم من مسحوق السايكلوتايد وأذيب في 10 مل من الماء المقطر (تركيز100 ملغ/مل) ووضع (5 µl) من هذا المحلول في كل حفرة، وحضنت في درجة 37 م° ولمدة 3-4 ساعات.
- بعد ذلك، أضيف (10) مل من الوسط B كطبقة عليا وتركت لتتصلب.
- حضنت الأطباق لمدة 18-24 ساعة وبدرجة 37م°.
- لوحظت مناطق التثبيط وسجلت.

النتائج والمناقشة

حساسية العزلات البكتيرية المدروسة تجاه المضادات الحيوية

يوضح الجدول (2) نتائج حساسية العزلات البكتيرية الأربعة قيد الدراسة *Stapylococcus aureus* ، *Enterococcus Pseudomonas aeruginosa, faecalis* ، *E.coli: 0157: H7* تجاه مجموعة من المضادات الحيوية المدروسة، حيث يلاحظ تباين هذه العزلات في نمط حساسيتها و مقاومتها لهذه المضادات.

فقد أظهرت عزلة جرثومة *Stapylococcus aureus* مقاومة مطلقة لجميع المضادات الحيوية المدروسة اما عزلة جرثومة *Pseudomonas aeruginosa* فقد كانت مقاومة لكل المضادات الحيوية المدروسة ما عدا مضادين حيويين هما Tetracycline و Amikacin، بينما أظهرت بكتريا *E.coli* 0157:H7 مقاومة لمعظم المضادات الحيوية المدروسة، وكانت حساسة لثلاثة منها وهي Tobramycin و Tetracycline و Gentamycin، أما بكتريا *Enterococcus faecalis* فقد كانت مقاومة لخمسة مضادات حيوية وهي Amikacin و Ampicillin و Amoxicillin/Clavulac acid و

Cefotaxime و Piperacillin فيما كانت حساسة للمضادات Ciprofloxacin وErythromycin و Getamycin و Tetracycline و Tobramycin.

الجدول 2: حساسية العزلات البكتيرية تجاه المضادات الحيوية المدروسة (قطر التثبيط بالملم)

E.coli 0157: H7	*Pseudomonas aeruginosa*	*Enterococcus faecalis*	*Staph. aureus*	البكتيريا / المضادات
R(6)	S(24)	R(6)	R(6)	Amikacin
R(6)	R(6)	R(6)	R(6)	Ampicillin
R(6)	R(6)	R(6)	R(6)	Amoxicillin / Clavulic acid
R(6)	R(6)	R(6)	R(6)	Cefotaxime
R(7)	R(9)	S(25)	R(6)	Ciprofloxacin
R(6)	R(6)	S(25)	R(6)	Erythromycin
S(19)	R(6)	S(30)	R(6)	Gentamycin
R(6)	R(6)	R(6)	R(6)	Piperacillin
S(20)	S(21)	S(22)	R(6)	Tetracycline
S(22)	R(9)	S(20)	R(6)	Tobramycin

(R) مقاومة (S) حساسة

وبصورة عامة يلاحظ من خلال هذه النتائج ان البكتريا المدروسة هي ذات مقاومة متعددة للمضادات الحيوية، ويعد ظهور البكتريا متعددة المقاومة للمضادات الحيوية التقليدية الشائعة مشكلة صحية وبيئية خطيرة، حيث ازدادت هذه المشكلة بشكل كبير وسريع خلال العقود الأخيرة مع انخفاض في عدد المضادات الحيوية الجديدة المكتشفة وزيادة الحاجة للبدائل ومن بينها الببتيدات المضادة للجراثيم، (Vizioli and Salzet, 2003 ; Oliveira *et al*., 2011).

فصل السايكلوناتيدات من النباتات المدروسة بتقنية الـ RP-HPLC

استخدم جهاز الـ HPLC لغرض فصل الببتيدات الموجودة في المستخلص الخام والتي تمثل الببتيدات من نوع السايكلوتيدات التي عزلت من ورود النباتات المدروسة (وردة الكاردينيا، وردة نبات القهوة العربية) لإعطاء فكرة عن عدد وحجم هذه الـسايكلوتيدات، و توضح الأشكال (1) و (2) أن هناك عددا من القمم الأمتصاصية الظاهرة والتي تمثل أنواع السايكلوتيدات المختلفة التي عزلت من هذه النباتات.

ويلاحظ من خلال الجدول (3) وجود (9) أنواع ببتيديه من السايكلوتيدات التي عزلت وفصلت عن بعضها من نبات وردة الكاردينيا تختلف عن بعضها في أزمان الاحتباس والنسبة المئوية للمساحة والارتفاع، إذ تراوحت هذه السايكلوتيدات ما بين البتيد رقم (1) في زمن احتباس (1.626) دقيقة، وبنسبة مئوية للارتفاع قدرت بـ (50.804%) ونسبة مئوية للمساحة (60.298%) والذي مثل اكبر السايكلوتيدات التي ظهرت، وبين البتيد رقم (9) في زمن احتباس (5.488) دقيقة، وبنسبة مئوية للارتفاع (0.067%) ونسبة مئوية للمساحة (0.038%) والذي مثل اصغر السايكلوتيدات الظاهرة.

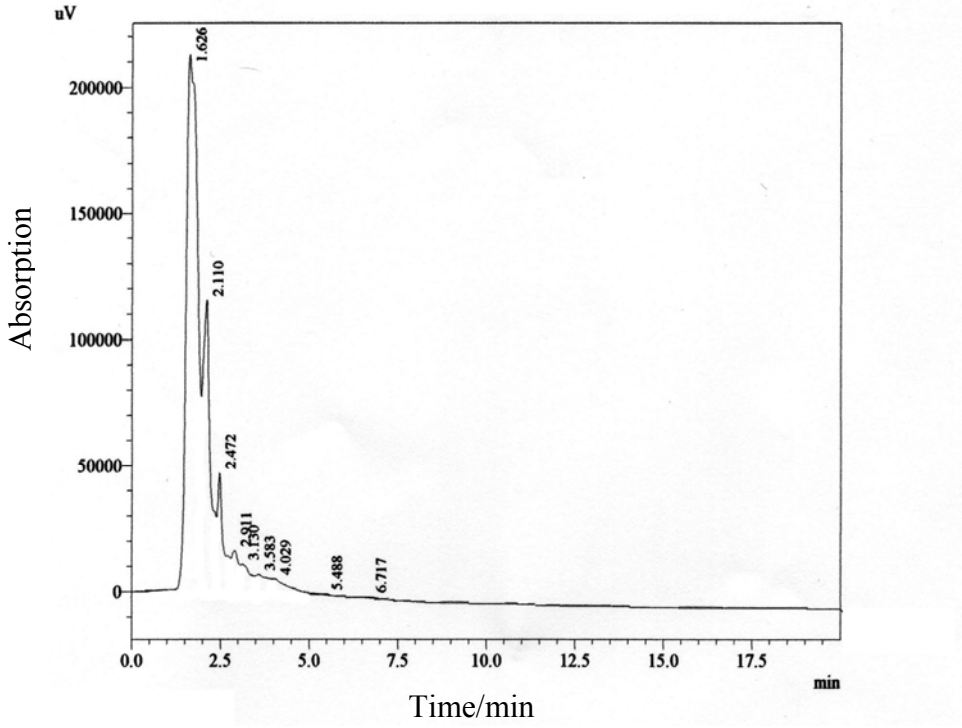
في حين يلاحظ من خلال الجدول (4) ظهور (8) أنواع ببتيدية من السايكلوتيدات المفصولة عن بعضها والمعزولة من ورود نبات القهوة العربية، والتي كانت مختلفة عن بعضها البعض في أزمان الاحتباس ونسبها المئوية للارتفاع وللمساحة، إذ تراوحت هذه السايكلوتيد ما بين البتيد رقم (1) الذي ظهر في زمن احتباس (1.640) دقيقة، وبنسبة مئوية للارتفاع قدرت بـ (77.148%) ونسبة مئوية للمساحة (71.74%) والذي مثل السايكلوتيد الأكبر والأقوى، وبين البتيد رقم (8) الذي يمثل اصغر السايكلوتيدات الظاهرة والذي ظهر في زمن احتباس (4.776) دقيقة، وبنسبة مئوية للارتفاع (0.004%) ونسبة مئوية للمساحة قدرت بـ (0.002%).

وتؤكد دراسة (Gruber *et al*., 2008) وجود السايكلوتيدات في العائلة الكارديبنية بصورة عامة، وخاصة في نبات القهوة، حيث تم تميز السايكلوتيد من نوع KalataB1 ودرست الجينات المسؤولة عن إنتاج هذه السايكلوتيدات في هذه العائلة ومدى التشابه في تركيب هذه الجينات المسؤولة عن إنتاجها في النباتات الأخرى التي تنتج السايكلوتيدات مثل نباتات العائلة البنفسجية.

وكذلك بينت دراسة (Nguyen *et al*., 2012) على المستخلص السايكلوتيدي المعزول من نبات العائلة الكارديبنية، الحصول على عدة قمم امتصاص قدرت بـ (15) ببتيدا، كان من ضمنها سايكلوتيد KalataB1 و Circulin A، وتمكنت هذه الدراسة من معرفة التراكيب الدقيقة الأساسية لهذه السايكلوتيدات، ومعرفة الفروقات البسيطة بينها وأحجامها، ودرس التأثير المضاد لبعض هذه السايكلوتيدات وخاصة Kalata B1 تجاه الأحياء المجهرية المختلفة.

الجدول 3: السايكلوتيدات المعزولة من ورد الكارديبنيا بتقنية الـ HPLC

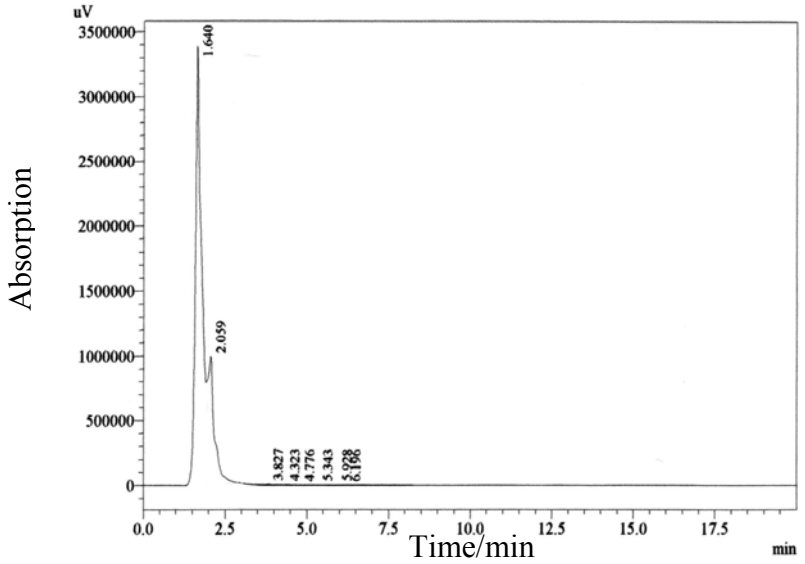
رقم البيتيد	زمن الاحتباس (Rt)	النسبة المئوية للارتفاع%	النسبة المئوية للمساحة%
1	1.626	50.804	60.292
2	2.110	27.655	21.347
3	2.472	11.330	7.501
4	2.911	4.025	3.084
5	3.130	2.771	2.736
6	3.583	1.802	2.507
7	4.029	1.426	2.379
8	6.717	0.120	0.116
9	5.488	0.067	0.038



الشكل 1: قمم الامتصاصية للسايكلوتيدات المعزولة من ورد الكارديبنيا باستخدام جهاز الـ HPLC.

الجدول 4: السايكلوتيدات المعزولة من ورد القهوة العربية بتقنية الـ HPLC

رقم الببتيد	زمن الاحتباس (Rt)	النسبة المئوية للارتفاع%	النسبة المئوية للمساحة%
1	1.640	77.148	71.741
2	2.059	22.714	28.181
3	3.827	0.078	0.037
4	5.343	0.020	0.014
5	4.323	0.016	0.010
6	6.196	0.013	0.009
7	5.928	0.008	0.006
8	4.776	0.004	0.002



الشكل 2: قمم الامتصاصية للسايكلوتيدات المعزولة من ورد القهوة العربية باستخدام جهاز الـ HPLC

تأثير السايكلوتايد المعزولة على البكتريا المدروسة:

يوضح الجدول (4) الفعالية التثبيطية للسايكلوتيدات التي عزلت من نباتات العائلة الكارديفية (ورد الكارديفيا و ورد القهوة العربية) حيث أظهرت النتائج تأثيراً تثبيطياً واضحاً على جميع انواع البكتريا المدروسة وبصورة متباينة وان تأثيرها كان اكبر في حالة البكتريا الموجبة لصبغة كرام، حيث يلاحظ أن قطر تثبيط سايكلوتيدات ورد القهوة العربية كان بحدود (31) ملم في حين كان قطر تثبيط سايكلوتيدات ورد الكارديفيا كان (26) ملم على عزلة بكتريا *S. aureus* التي كانت تحمل صفة المقاومة المتعددة لجميع المضادات الحيوية المدروسة مما يؤكد الدور الفعال للسايكلوتيدات المعزولة من هذه النباتات.

وكان تأثير هذه السايكلوتيدات واضحا ايضا على بكتريا *E. faecalis*، فقد أظهرت سايكلوتيدات ورد القهوة العربية وورد الكارديفيا أقطار تثبيطية ضد هذه العزلة البكتيرية بحدود (33) ملم و (30) ملم على التوالي، وهي نتيجة أفضل من جميع المضادات الحيوية المدروسة التي أثرت على هذه العزلة.

أما بالنسبة لبكتريا *Ps. aeruginosa*، فقد أثرت سايكلوتيدات العائلة الكارديفية على هذه العزلة البكتيرية تأثيراً متبايناً، حيث كان قطر تثبيط سايكلوتيدات ورد القهوة العربية (24) ملم، وهو تأثير مساوي لأفضل مضاد حيوي فعال على هذه البكتريا وهو المضاد الحيوي Amikacin وأفضل من جميع المضادات الحيوية الأخرى المدروسة ضد هذه البكتريا، في حين كان قطر تثبيط سايكلوتيدات ورد الكارديفيا محدودا بقطر (7) ملم.

وكانت الفعالية التثبيطية لهذه السايكلوتيدات على بكتريا *E.coli 0157: H7* متباينة أيضا وبأقطار تثبيط (19) ملم و (8) ملم لنباتات ورد القهوة العربية وورد الكاردينيا على التوالي.

تتفق نتائج دراستنا مع نتائج دراسة (Kaas *et al*., 2010) التي أوضحت تأثير سايكلوتيدات العائلة الكاردينيـة، ومنهـا سايكلوتيدات نبات القهوة العربية وبالأخص الأنواع Kalata B8, Circulin A في العديد من البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام، وحتى بعض الفطريات المرضية للإنسان من خلال تأثيرها المباشر في جدران وأغشية خلايا هذه الجراثيم وقتلها. كمـا أكدت دراسات أخرى على أهمية هذه السايكلوتيدات من العائلة الكاردينية وتأثيرها التثبيطي في البكتريـا الموجبـة والـسالبة لصبغة كرام وحتى المقاومة للمضادات، وكذلك بعض الفايروسات، (Gould *et al*., 2012; Mulvanna, 2012).

الجدول 5: التأثير التثبيطي (قطر التثبيط بالملم) للسايكلوتيدات المعزولة من المصادر النباتية المختلفة تجاه البكتريا المرضية المدروسة

البكتريا	اقطار التثبيط (بالملم) حسب مصدر السايكلوتايد	
	وردة الكاردينيا	وردة القهوة العربية
Staphylococcus aureus	26	31
Enterococcus faecalis	30	33
Pseudomonas aeruginosa	7	24
E.coli 0157: H7	8	19

ويعتقد أن آلية تأثير هذه البيتيدات مرتبط بالصفات المميزة والفريدة لها ومنها شكلها الدائري الحلقي وشحنتها الموجبة واحتوائها أواصر ثنائية الكبريت وصفات أخرى تجعلها مقاومة للتحلل البروتيني وكذلك استقطابها والتصاقها على الجدر و الأغشية البكتيرية وتغيير تركيبها وهندستها مما يؤدي إلى حدوث خلل في وظيفتها وبالتالي إلى موت البكتريا والقضاء عليها (Pelegrini *et al*., 2011).

تؤكد نتائج الدراسة الحالية إمكانية عزل واستخلاص البيتيدات المضادة للجراثيم من أزهار نباتي الكاردينيا والقهوة العربية وكذلك إثبات تأثيرها التثبيطي على أنواع مهمة من البكتريا المرضية ذات المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية وعدم ظهور اي مقاومة من قبل البكتريا المدروسة تجاه هذه البيتيدات، الأمر الذي يفتح الباب أمام دراسات أوسع في عزلها واستخلاصها من المصادر المختلفة ودراسة استخدامها كبدائل علاجية ملائمة.

المصادر العربية

الكاتب، يوسف منصور (2000). "تصنيف النباتات البذرية". دار الكتب للطباعة والنشر/ جامعة الموصل، الطبعة الثانية، العراق.

المصادر الأجنبية

Collee, J.G.; Fraser, A.G.; Marmion, B.P.; Simmon, A. (1996). "Practical Medical Microbiology". 14th ed., Churchill Livingstone, Inc., New York.

Daly, N.L.; Clark, R.J.; Craik, D.J. (2003). Disulfide Folding pathways of cysteine Knot proteins. *J. Biolog. Chem*., **278**(8), 6314-6322.

Delprete, P.G. (2004). "Rubiaceae. In Flowering plant Famillies of the American Tropics". New York Botanical garden press., pp. 328-333.

Gould, A.; Ji, Y.; Aboye, T.L.; Camarero, J.A. (2012). Cyclotides, a novel ultrastable ploypeptide scaffold for drug discovery. *Curr Pharm Des.*, **17**(38), 4294-4307.

Govaerts, R., Frodin, D.G.; Ruhsam, M.; Bridson, D.M.; Davis, A. (2006). A world checklist of Rubiaceae. *Scripta. Bot. Beig*., **40**, 35.

Gruber, Ch.W.; Elliott, A.G.; Ireland, D.C.; Delprete, P.G.; Dessein, S.; Goransson, U.; Trabi, M.; Wang, C.K.; Kinghorn, A.B.; Robbrecht, E.; Craik, D. (2008). Distribution and evolution of circular miniproteins in flowering plants. *The plant Cell*., **20**(9), 2471-2483.

Hancock, R.E.W.; Sahl, H. (2006). Antimicrobial and host-defense peptides as new anti- infective Therapeutic strategies. *Nature Biotech.,* **24**(12), 1551-1557.

Kaas, Q.; Westermann, J.; Heniques, S.; Craik, D.J. (2010). Antimicrobial peptides in plants. International CAB, Antimicrobial peptides: Discovery, *Design and novel Therapeutic Strategies*., **3**, 40-71.

Koneman, E.W.; Allen, S.P.; Janda, W.C. (2006). "Color Atlas and Text Book of Diagnostic Microbiology". 6th. ed. Lippincott-Willams and Wilkins publishers, Philadelphia, USA.

Lehrer, R.I.; Rosenman, M.; Harwing, S.S.L.; Jackson, R.; Eisenhauer, P. (1991). Ultra sensitive assay for endogenous antimicrobial polypeptides. *J. Immunol. Methods*., **137**,167-173.

Liu, Y.; Luo, J.; Xu, C.; Ren, F.; Peng, C.; Wu, G.; Zhao, J. (2000). Purification, characterization, and molecular cloning of the gene of a seed- specific antimicrobial protein from pokeweed. *Plant Physiology.,* **122**(4), 1015-1024.

Marshall, S.H.; Arenas, G. (2003). Antimicrobial peptides: A natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology. *Electronic J. Biotechnol.,* ISSN. **6**, 0717-3458.

Mulvenna, J. (2012). The cyclotide webpage. asite dedicated to cyclotide research. *Molecular Biodence*., 1-2.

Nguyen, G.K.T.; Lim, W.H.; Nguyen, Ph. Q. Th.; Tam, J.P. (2012). Novel Cyclotides and uncyclotides with Highly Shortened precursors from chassalia chartacea and effect of Methionine oxidation on Bioactivites. J.BC papers in press. *The American Society for Biochemistry and molecular Biology,* Inc.**287**(21), 17598-17607.

Oliveria, S.M.S.; Falcao-Silva, V.S.; Siqueira-Junior, J.P.; Costa, M.J.D.; Dinix, M.D.F. (2011). Modulation of drug resistance in *Staphylococcus aureus* by extract of mango (*Mangifera indical L*., Anacardiaceae) peel. *Rev. Bras. Farmac*., **21**(1), 1-5.

Pelegrini, P.B.; Del Sarto, R.P.; Silva, O.N.; Franco, O.L.; Grossi, M.F. (2011). Antibacterial peptides form plants: What they are and how they probably work. *Bioch. Res. Intern*., **9**, 1155.

Poth, A.G.; Colgrave, M.L.; Philip, R.; Kerenga, B.; Daly, N.L.; Anderson, M.A. (2011). Discovery of Cyclotides in the Fabaceae plant Family Provide new insights into the Cyclization, Evolution, and distribution of circular proteins. *ACS Chem. Bio*., **6**(4), 345-355.

Selsted, M.E.; Tang, Y.; Morris, W.; McGure, P.A.; Novotny, M.J.; Smith, W.; Henschen, A.H.; Cullor, J.S. (1993). Purification, primary structures, and Antibacterial Activities of B- Defensins, anew family of antimicrobial peptides from bovine Neutrophils. *J. Biol. chem*., **268**(9), 6641-6648.

Shamova, O.; Brogden, K.A.; Zhao, H.; Nguyen, T.; Kokryakov, V.N.; Lehrer, R. (1999). purification and properties of proline- Rich Antimicrobial peptides from Sheep and Goat Leukocytes. *Infect. Immun*.,**67**(8), 4106-4111.

Vandepitte, J.; Engback, K.; Piot, P.; Heuk, C.C. (2003). "Basic Laboratory Procedures in Clinical Bacteriology". World Health Organization. Geneva.

Vizioli, J.; Salzet, M. (2003). "Antimicrobial Peptides: New Weapons to Control Parasitic Infections?". Trends in Parasitology., Vol. 19.

Wang, G. (2010). "Antimicrobial peptides Discovery, Design and Novel Therapeutic Strategies Advances in Molecular and Cellular Microbiology". 18. University of Nebraska medical center Omaha, Nebraska, USA. pp. 41-71.