التأثيرات الحيوية للأنثوسيانينات المستخلصة من ثمرة البرتقال في بعض انواع البكتريا

سعيد حميد محمد
قسم علوم الحياة/كلية التربية الأساسية / جامعة ديالى

استلم البحث في :5/اذر/2014 ، قبل البحث في 24/تشرين الثاني /2014

الخلاصة

يتناول البحث دراسة تأثيرات نوعين من الأنثوسيانينات المستخلصة من ثمرة برتقال "الحسناء" وهما من نوع ايفولفيولاس انثوسيانين (EvolvulusAnthocyonin) وميثيو لا أنثوسيانين البنفسجية (Methiola violet) ،في نوعين من البكتريا المرضية وهما الأشريكية القولونية (*Escherichia coli*) والمكورات العنقودية الذهبية (*Staphylococcus aureus*), وأظهرت النتائج ان المستخلصين لهما تأثير متقارب أذ كان قطر دائرة التثبيط (عدم النمو أو الخالية من النمو) بين 10-12 مم وأن المستخلص الأول عند تركيز 10^{-3} ملغم /مل له التأثير الأكبر.

الكلمات مفتاحية:- الأنثوسيانيات و بكتريا *E.coli* و بكتريا *Staphylococcus aureus*و هالة النمو .

المقدمة

الأنثوسيانينات والمركبات متعددة الفينول الأخرى هي من بين أهم المركبات التي تشغل علماء التغذية هذه الأيام. وهذه المركبات من أصناف الكيميائيات النباتية (Phytochemicals) الموجودة بتراكيز عالية ولاسيما في الفواكه والخضر كالعنب ,والبرتقال ,والشاي, والثوم, وغيرها من النباتات المتنوعة التي يعرف عن فعاليتها المضادة لمرض السرطان وضغط الدم وغيرها من الأمراض (2,1).

تتجمع الأنثوسيانينات والفلافونات في الحويصلات الخلوية (Vacuoles Cell)تحت قشرة النباتات والفواكه، وتوجد كذلك في الجذور والسيقان والأوراق. وفي الخلية النباتية، تتركز فـــي الحويصلات في المحلول المائي ويقال بأن رحيق أو عصارة الخلية يكون حامضيـآ ضعيـفآ أومتعادلآ مما يجعل الوان هذه الصبـغات ثابتة في هذه الظروف الحامضية الضعيفة.

الأنثوسيـانينات و الفلافونـات صبغات نباتية وهي التي تضـفي الألوان المختـلفة على زهــور النباتات. وتوجد في الطبيعة على هيئة كلايكوسيدات يحتوي بنـاؤها على وحدات سكرية وهي مركبـات أمفوتيرية تذوب في المـاء، وغالبـآ ما تكـون أملاحها الحامضية حمراء في حين تكون املاحها القاعدية زرقآ. وتتلون المحاليل المتعادلة من هذه المركبات باللون البنفسجي. والنواة الأم هي كلوريد فينيل بتروبريليوم (2-Phenylbenzopyrilium Chloride) المعروفة بكلوريد فلافيليوم (Flavylium Chloride).

يتناول البحث دراسة تأثير مركبات الأنثوسيانينات المستخلصة من نبات البرتقال Sinesis. L. (Osbeck) Citفي نوعين من البكتريا وهي الأشريكية القولونية (*Escherichia coli*) والمكورات العنقودية الذهبية(*Staphylococcus aureus*)، ومقارنة فعالياتها مع بعض المضادات الحيوية.

المواد وطرائق العمل

المواد المستعملة

المواد التي استعملت في هذا البحث من النوع التجاريالاعتيادي مصدره من شركة ريدل – دي – هان (Riedel- de – Heanوميرك (E. merck) وهي :-

(ا) اطباق بتري معقمة، (ب) مـاء معقم(محلول فسلجي)، (ج) عيدان خاصة بالمسحات (مسحات قطنية)،(د) (ناقل)(Loop)، (ه) اقراص ورق ترشيح معقمة (Wathman 1)، (و) اقراص مضادات حيوية مختارة للمقارنة (Neomycin و Sterptomycine و Cefaloxine). الشـركة المجـهزة Gist Brocades AB(Sweden)

(ر) مـزارع بكتيـريا الاشـريشا القولونيـة (Escherichia coli) , والمكـورات العنقودية الذهبية (staphylococcus aureus) النقية التي تم الحصول عليها من احد مختبرات الصحة المركزية للمستشفى التعليمي في ليبيا .

(أ) مزارع بكتريا نقية التي تم الحصول عليها من احد مختبرات الصحة المركزية للمستشفى التعليمي في ليبيا

طرائق العمـــل :-

(أ): استخلاص الانثوسانيات

تم استخلاص اللأنثـوسيانـيات من ثمرة البرتقال (الحسناء) واسمها العلمي *Citrus Sinesis. L.(Osbeck)*. تم تعيين درجات الانصهار للأنثوسيانيات بجهاز تعيين درجات الأنصهار الميكرسـكوبي من نـوع (Gallenkamp) ، وتم الأسـتخلاص بالخطوات الاتية:-

قطعت ثمرتان من ثمار (الحسناء) الى قطع صغيرة واستخلصت الانثوسيانيات بواسطة الميـثانـول المحمض (300مل+ 0.1Hcl%) في جـهاز الاستـخلاص (Soxhlte extraction apparatus) تم تركيز مستخلص الميثانول تحت ضغط مخلخل في 40م° وفصلت المادة المترسبة بالترشيح وحصلنا على مادة صلبة صفراء فاتحة بلورية دقيقة درجة انصهارها 280م°(3,4) .

ومن اجل معرفة مكونات المستخلص استعملنا شرائح كروماتوجرافيا الطبـقة الرقيـقة (TLC)ودلت النتائج على وجود نوعين من الانثوسيانيات في المستخلص(Evolvulus Anthocyonin , Methiola violet)، بعد مقارنة اطياف الاشعة فوق البنفسجية والمرئية للانثوسانيات المستخلص بالاطياف المختلفة للانثـوسيانـيات (المحاليل القياسية الجاهزة) . وتمت تنقية وفصل مكونات المستخلص السائـل وفصل مكونـاتـه بطريقة كروماتوجرافيا العمود باستعمال المبادلات الأيونية وتمليص العمود بمزيج من الميثانول والماء (5).

(ب) اعداد المعلق البكتيري:-

نأخذ ماء معقماً (5)ملم في انبوب ونأخذ بواسطة الناقل مستعمرة بكتيرية مفردة من المزرعة النقية لكل من نوعي البكتريا المزروعة في اطباق بتري ونفردها مبدئياً على جدار الأنبوب ونحركها في الماء حتى تختلط جيدا لتعطي معلقاً بكتيرياً(العدد التقريبي للخلايا البكتيرية هو 1.5×10^8 خلية / مل.(6)

(ج): اختبار انتشار القرص (Disk diffusion test):

تؤخذ المسحة القطنية وتغمس في المعلق البكتيري وتزرع البكتريا على طبق(muller – hinton Agar) بطريقة المسح الكامل على سطح الآجار حتى يتغطى تماماً بالمعلق وبمكررين توضع اقراص ورق الترشيح المعقمة في المواد المجهزة من مستخلصات الأنثوسيانين بتراكيز(50% ,25%) في انابيب على حدة وتترك ليوم واحد في المستخلصات لضمان تشبعها وبعد ذلك تؤخذ الاقراص المشبعة التي تم اعدادها وتوضع على سطح الآجار الملقح بواسطة ملقط معقم بحيث تتوزع بتناسق في الطبق. ويوضع على الطبق الثاني الملقح اقراص المضادات الحيوية بالطريقة نفسها وتحضن الأطباق في درجة 37°م لمدة 24 ساعة(6).

النتائج والمناقشة

تمت دراسة تأثير مستخلصات الانثوسيانينات (Methiola violet, Evolvulus Anthocyonin) على نوعين من البكتريا المرضية وهما الاشريكية القولونية (E.coli)والمكورات العنقودية الذهبية (Staphylococcus aureus) ويظهر من الجدولين (1) و(2) ان المستخلصين (1)و(2) لهما تأثير متقارباً `h, كان قطر دائرة تثبيط النمو أو الخالية من النمو 10 -12 مم وان المستخلص (1) له التأثير الأكبر أيضا كما هو واضح من الشكلين (1) و (2).

وعند دراسة تأثير بعض المضادات الحيوية في نمو نوعي البكتريا تحت الدراسة يلاحظ من الجدولين (3 و 4) والشكلين (3 و 4) ان المضادات الحيوية المستعملة في الدراسة قد ادت الى تثبيط نوعي البكتريا وان دائرة تثبيط النمو كانت بين 12– 16 مم في حالة المضاد ستربتومايسين و 10-12 مم في حالة نيومايسين مم وبين 12 - 16 مم في حالة سيفالوكسين.وهذه النتائج مقاربة لما حصلنا عليها بواسطة مستخلصات الانثوسيانينات. وتبين هذه الدراسة أن لهذه المستخلصات تأثيرات مهمة كمركبات مضادة للجراثيم. وهذه النتيجة ليست غير متوقعة لأن الانثوسيانينات المستخلصة تحتوي على مجاميع هيدروكسي فينولية عديدة. ولاسيا تلك التي تحتوي مواقع متجاورة في حلقة البترين الاروماتية ولهاتين المجموعتين المتجاورتين المقدرة على تكوين معقدات مع ايونات معدنية في أنزيمات مهمة في البكتريا ربما يكون السبب في اعاقة عمل هذه الأنزيمات في البكتريا وبالتالي موتها.(7,8)

وهنك آلية اخرى ربما تكون السبب في الفعالية المضادة للميكروبات وهي أن هذه المركبات باحتوائها على مجاميع هيدروكسي متجاورة تسلك سلوك مرتبطة (Ligand) جيدة يمكنها الارتباط مع أيونات المعادن الموجودة في جدران البكتريا مما يسبب تكسير جدران خلاياها ونضوح مكوناتها مما يؤدي إلى موتها. (9,10)

المصادر

1- Anesini, C. and perez, C.(1993) . Screening of plants used in Argentin folk fedicine for antimicrobial activity. J . Ethnopharma . , 39(20): 119-128.

2- AL-Rawi ,A . and Chakravart, H,L,. (1988) . Medicinal plants of Iraq . 2nd ed . Ministry of Agriculture and Irrigation , Baghdad .

3- Aborziza. M, Sarkis. J,(2004) " Extraction And Identificatio of Anthocyanins From The Orang Fruit "Hasna"" MSc Thesis, Almargheb University.

4-. Majumdir D.R.D.R , (2009) " The study of the methanol extract plantago major against gram (-) &(+) pathogens , Dep, of micro Abeda Inamdar senior collage , pane. w .j of micro& bio , 1322-1317(6-7)21.

5- Mosoke,Betty,E(2002) . " The Uses of plant colors Anthocyanine pigments and methods to Isolate them from plants ,"world woman congress .Department ofChemistry .Markere Univ , kampala – Uganda.

6- Baron ,E.J. and Finegold ,S .M .(1994). Diagnostic Microbiology .9th ed , the C.V. Mosby Co .,USA.

7- Reynolds , S.J,. Black ,D.W.; Borin , S.S ., Breuer , G.; Burmeister , l.f.; Fuortes, L.G.; Smith , T.F .; Stein , M.A.; Subramanian , P.; Thorne , P.S . and whitten , p .(2001) . Indoor environmental quality in six commercial office buildings in the Midwest United States . Apple . Occup . Inviron . HYg., 16 : 10650-10677

8- Reed ,J.D. (1995) . Nutritional toxicology of tannins related Polyphenols in forage Legumes . J. Ani.Soc., 73:1516-1528.

9-Hande, Toshio and Saito Norio (2002)"Rrevent progress in the chemisry of Helerocycles, 56, 633-699 . polyacelated Anthocyanines AS Flower color Pigments

10- Varel , I. and Vincent ,H .(2002) . Carvacrol and thymol reduce swim waste odor and pathogens : stapility of oils . curr . Microbiol ., 44:38-43.

جدول رقم (1): تأثير مستخلص الانثوسيانينات في نمو البكتيريا الأشريكية القولونية (Staphylococcus aureus)

تركيز المستخلص	معدل قطر دائرة التثبيط الخالية من النمو/ملم
المستخلص (25%E)	12
المستخلص (50%E)	10
المستخلص (25%M)	8
المستخلص (50%M)	6

القيم المذكورة في الجدول هي معدل لتجربتين (± 0.1)

جدول رقم (2): تأثير مستخلص الانثوسيانينات في نمو البكتيريا المكورات العنقودية الذهبية (E.coli)

تركيز المستخلص	معدل قطر دائرة التثبيط الخالية من النمو/ملم
المستخلص (25%E)	10
المستخلص (50%E)	9
المستخلص (25%M)	8
المستخلص (50%M)	4

القيم المذكورة في الجدول هي معدل لتجربتين (± 0.1)

* M,E تمثل المستخلص الأول والثاني على التوالي

جدول رقم (3) :حساسية بكتيريا الاشريكية القولونية (E.Coli) لبعض المضادات الحيوية

المضاد الحيوي	معدل قطر دائرة التثبيط الخالية من النمو/ملم
ستربتومايسين	16
نيومايسين	12
سيفالوكسين	6

القيم المذكورة في الجدول هي معدل

(± 0.1)

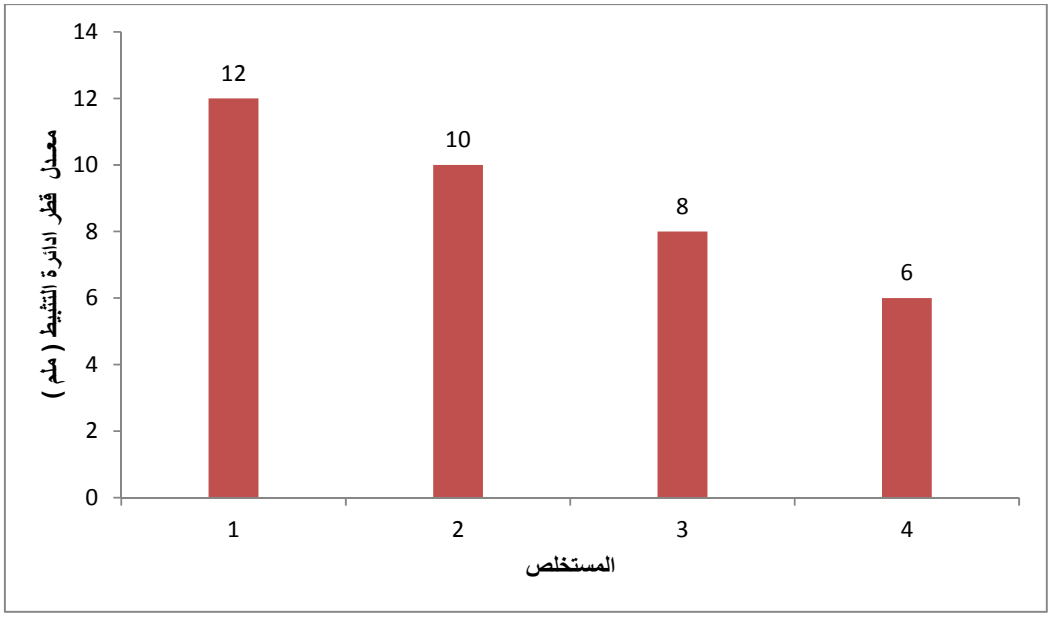
جدول رقم (4): حساسية بكتيريا المكورات العنقودية الذهبية

(Staphylococcus aureus)

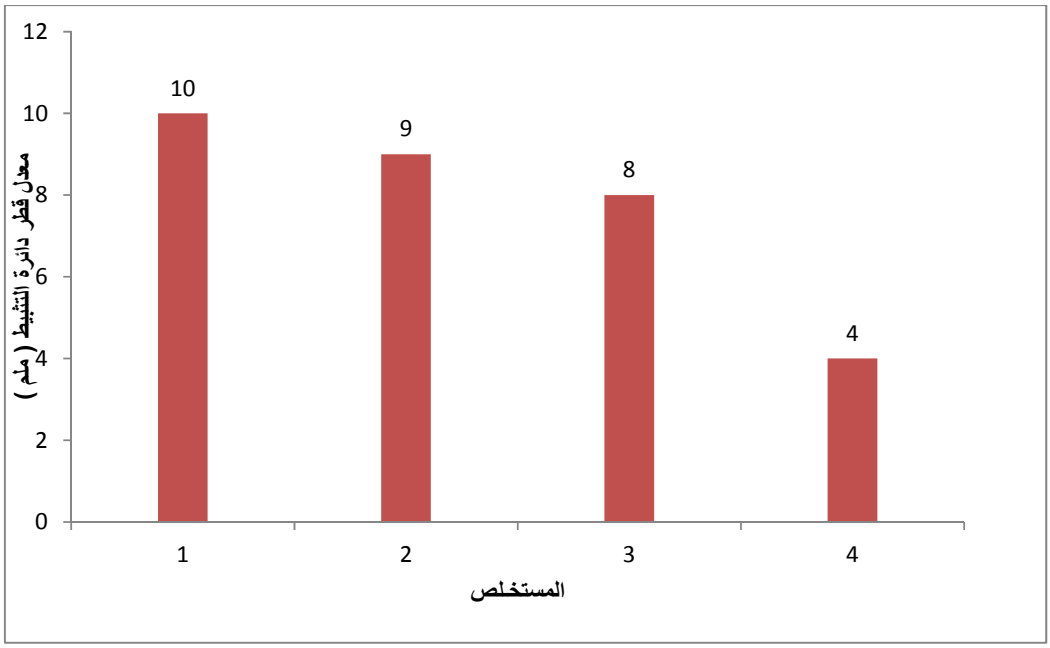
المضاد الحيوي	معدل قطر دائرة التثبيط الخالية من النمو/ملم
ستربتومايسين	12
نيومايسين	10
سيفالوكسين	16

القيم المذكورة في الجدول هي معدل لتجربتين

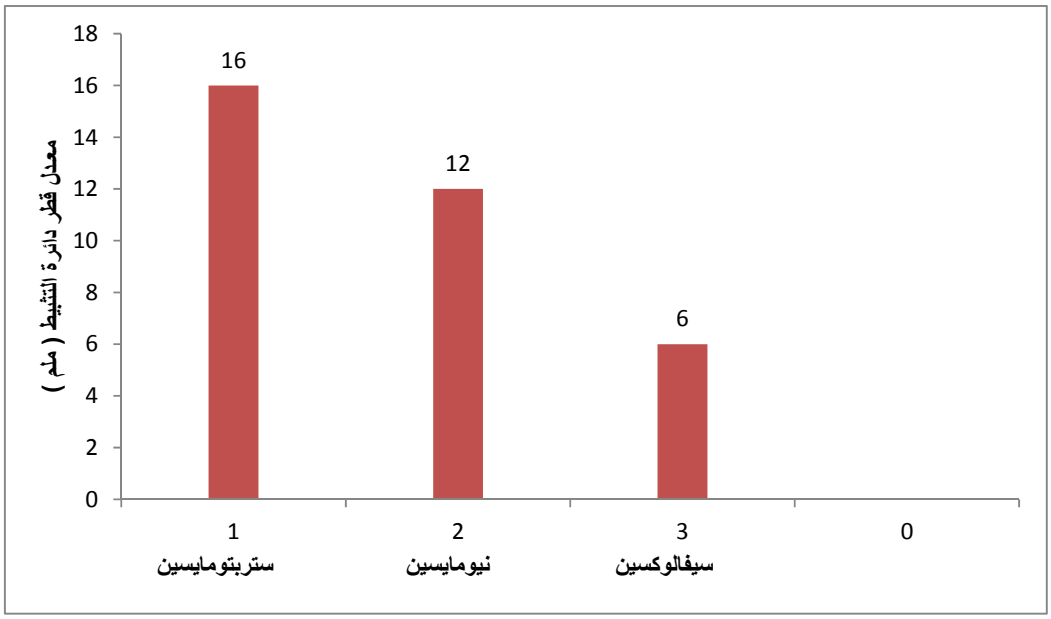
لتجربتين (± 0.1)



شكل رقم (1) : تأثير مستخلص الانثوسيانينات (M,E)في نمو البكتيريا *E.coli*



شكل رقم (2): تأثير مستخلص الانثوسيانينات (M,E)في نمو البكتيريا Staphylococcus aureus



شكل رقم (3) : تأثير بعض المضادات الحيوية td بكتيريا E.coli

شكل رقم (4) تأثير بعض المضادات الحيوية في بكتيريا Staphylococcus aureus

Biological Effect of Anthocyanin Extracted From the orange Fruit on Some Types of Pathological Bacteria

Saeed H. lMohommed
Dept.of Biology / College of Basic Education/ University of Diyala

Receivd in:5/March/2014, Accepted in :24/November/2014

Abstract

This research includes study of the effect of two kinds of Anthocyanin extracted , from extracted orange fruit (Anthocyanin Evolvulus ,Methiola Violet) on two types of pathological bacteria E.coli , staphylococcus aureus.

The result shows that two kinds of extraction have nearly similar effect , and there is Inhibition zone of no growth between 10-12mm ,and the extraction (1) that has concentration of 10-3 mol./L is more effective..

Key word: Anthocyanin, *E.coli , Staphylo coccus aureus*