جامعة الشهيد حمه لخضر الوادي
كلية العلوم الدقيقة
قسم الكيمياء

رقم الترتيب:.....

الرقم التسلسلي:.....

مذكرة تخرج لنيل شهادة
ماستر أكاديمي في الكيمياء
تخصص: **كيمياء عضوية وتحليلية**
إعداد الطالبة: **شريف جهينة**

بعنوان

تقدير تأثير المستخلص الإيثانولي والمائي لحبوب الرمان الحلو والحامض على بعض أنواع البكتيريا

نوقشت يوم: 2017/06/07

لجنة المناقشة:

بوشقرة سماح	أستاذ مساعد أ	جامعة الشهيد حمه لخضر الوادي	رئيسا
تامة نور الدين	أستاذ مساعد أ	جامعة الشهيد حمه لخضر الوادي	ممتحنا
نغموش نصر صالح	أستاذ مساعد أ	جامعة الشهيد حمه لخضر الوادي	ممتحنا
زيدان محمد	أستاذ مساعد أ	جامعة الشهيد حمه لخضر الوادي	مؤطرا ومقررا

السنة الجامعية: 2016-2017

بسم الله الرحمن الرحيم

الإهداء

إلى من أحمل اسمه بكل فخر

إلى الذي لم يكل جهدا في إيصالي حيث وصلت

إلى من علمني أكون ومن أكون

إليك **أبي** الغالي

إلى من ربتني على الشرف والفضيلة وأعانتني بالدعوات

إلى سندي وقوتي وملاذي

إلى دنياي بهجتي وفؤادي

أليك يا بسمتي الغالية **أمي**

إلى أخوتي الأعزاء سدد الله خطاهم **إيهاب، روان وهيثم**

إلى الروح التي سكنت قلبي

زوجي العزيز

إلى خالتي المميزة وزوجها التي لم تبخل علينا بدعواتها في كل خطوات حياتي

إلى من كانوا ملاذي وملجئي وقاسموني كل لحظة من حياتي صديقاتي العزيزات

زهيرة، مامية وخولة

إلى من آثروني على أنفسهم وآزروني في ساعة العسرة واليأس وزرعوا في نفسي

بذرة الأمل زميلاتي **سعيدة، إيمان، بشيرة، سلسبيل، منال، أمينة**

إلى كل من لقنني حرفا **أساتذتي** الكرام

إلى كل زميلاتي وزملائي الأعزاء طلبة ماستر دفعة 2017.

جهينة

الشكر والعرفان

أحمد الله سبحانه وتعالى واشكره جزيل الشكر الذي بعونه وتوفيقه أتممت بحثي هذا.

الشكر وجزيل الشكر الى كامل أسرتي التي أعانتني وتحملتني طيلة إنجازي هذا العمل على رأسها والداي الكريمين

أتقدم بأسمى عبارات الامتنان والعرفان لأستاذي الفاضل المشرف على هذه الرسالة الأستاذ زيدان محمد على توجيهاته القيمة ونصائحه المتواصلة طيلة فترة بحثي.

وأتقدم بالشكر الى الأساتذة أعضاء لجنة المناقشة، الذين قبلوا مناقشة وإثراء هذا البحث.

وبكل فخر أقدم تشكراتي الى والدي الغالي الذي دعمني معنويا وقدم لي كل المساعدة فكان السند والقاموس الذي أستمد منه بعض المعارف عند عجزي ألف شكر

كما أتوجه بالشكر الخاص الى الأستاذين الفاضلين شمسه أحمد خليفة وخراز خالد على توجيهاتهما السديدة ونصائحهما القيمة.

كما لا يفوتني ان اذكر جميع أفراد مخبر VTRS على ما قدموه لي من نصائح ومساعدات، خاصة جميلة، كريمة وحفيظة.

دون أن أنسى الذين اعتبرهم بمثابة اخوتي واخواتي الأعزاء افراد دفعتي حيث أخص بالذكر عبد اللطيف، شعيب وطارق وأتمنى لهم جميعا كل التوفيق والنجاح.

كما اشكر كل من ساعدني من قريب أو من بعيد ولو بكلمة طيبة

الملخص

تمت دراسة الفاعلية البيولوجية لمستخلصات حبوب الرمان Punica granatum.L بنوعيه الحامض و الحلو والمتمثلة في دراسة مواد الأيض الثانوي والفعالية المضادة للأكسدة وكذا الفعالية المضادة للبكتيريا، وذلك من خلال المقارنة بين المستخلصات (ايثانول– ماء– مزيج (ايثانول+ماء)).

توصلنا من خلال هذه الدراسة إلى أن حبوب الرمان غنية بمواد الأيض الثانوي والمتمثلة في عديدات الفينول والفلافونيدات وتم كذلك تحديدا الفاعلية المضادة للأكسدة للمستخلصات السابقة باستخدام DPPH وTAC حيث كانت اقوى قيمة في المستخلص المزيج للرمان الحامض بالنسبة لـ DPPH المقدرة بـ 0.0601 g/l والمستخلص المائي بالنسبة لـ TACوالمقدرة بـ 512 mg/g

أما عن الفعالية التثبيطية للبكتيريا، فوجدنا السلالات البكتيرية كانت حساسة لمختلف المستخلصات حيث المستخلص الأكثر فعالية ضد البكتيريا كان المستخلص الإيثانولي لحبوب الرمان الحامض و كان قطر التثبيط 19 mm عند البكتيريا S. aureus، و يمكن ملاحظة أن حبوب الرمان الحامض اكثر فعالية ضد البكتيريا من حبوب الرمان الحلو.

الكلمات المفتاحية: مستخلصات حبوب الرمان، الأيض الثانوي، السلالات البكتيرية

Abstract

The study of secondary metabolites and antioxidant efficacy as well as anti-bacterial efficacy by comparing the extracts (ethanol-water-mixture (ethanol + water)).

of Punica granatum .L seeds both sweet and sour variants.

In this study we found that pomegranate seeds are rich in secondary metabolites of polyphenols and flavonoids. In addition, the antioxidant efficacy of the previous extracts has been determined using DPPH and TAC. The highest value in the extract was the sour pomegranate for DPPH, 0.0601 g/l, and water extracts for TAC and estimated at 512mg / g.

As for the effectiveness of the extracts in terms of their ability to inhibit bacteria, we found that bacterial strains were sensitive to the various extracts. However, the ethanol extract was the most effective when used against the bacteria P. aerogenosa with a damping diameter of 19mm.

We may conclude that sour pomegranate seeds are more effective against bacteria then sweet pomegranate seeds.

Key words: pomegranate seeds extracts, secondary metabolism, bacterial strains

الفهرس

الشكر والعرفان..... I
الملخص..... II
الفهرس..... IV
قائمة الأشكال..... XI
قائمة الجداول..... XIII
قائمة المختصرات..... XIV
مقـدمـــــة..... 1
المراجع..... 3

الفصل الأول

دراسة نباتية حول نبات الرمان *Punica granatum*.L

تمهيد..... 5
1- نبذة تاريخية عن نبات الرمان:*Punica granatum*.L..... 5
2- الأسماء الشائعة لنبات الرمان:*Punica granatum. L*..... 5
3- أنواع نبات الرمان: *Punica granatum. L*..... 6
3-1- الرمان الحلو:..... 6
3-2 الرمان المعتدل:..... 6
3-3 الرمان الحامض:..... 6
4- التصنيف النباتي لنبات الرمان: *Punica granatum*. L..... 6
5- الوصف النباتي لنبات الرمان *Punica granatum*. L:..... 7
6- الانتشار الجغرافي لنبات الرمان:*Punica granatum*.L..... 10
7- التركيب الكيميائي لنبات الرمان:*Punica granatum*.L..... 10
8- القيمة الغذائية لنبات الرمان:*Punica granatum*.L..... 11
9- الفوائد الطبية لنبات الرمان:*Punica granatum*.L..... 12

10- الاستعمالات الطبية لنبات الرمان:*Punica granatum.L*..... 13
10-1- الفعالية المضادة للالتهاب:..... 13
10-2- الفعالية المضادة للأكسدة:..... 13
10-3 الفعالية المضادة للسرطان: 14
المراجع..... 15

الفصل الثاني

الدراسة الكيميائية والفعالية البيولوجية

تمهيد:..... 18
1- المركبات الفينولية:..... 18
1-1- تعريف المركبات الفينولية:..... 18
1-2- مصدر الفينولات: 19
1-3- فوائد المركبات الفينولية:..... 19
1-4- أصناف المركبات الفينولية:..... 19
1-5- الاستعمالات العلاجية لعديدات الفينول:..... 21
2- الفلافونويدات:..... 21
2-1- تعريف الفلافونيدات: 21
2-2- تصنيف الفلافونيدات:..... 21
2-3- أهمية الفلافونيدات:..... 23
2-4- خصائص الفلافونيدات: 23
2-5- الكشف عن الفلافونيدات:..... 23
3- الجذور الحرة ومضادات الاكسدة:..... 24
3-1- الجذور الحرة:..... 24
3-1-1- تعريف الجذور الحرة:..... 24
3-1-2- أنواع الجذور الحرة:..... 24
3-1-3- أضرار الجذور الحرة:..... 25

3-2- مضادات الأكسدة: 25
3-2-1- تعريف مضادات الأكسدة:..... 25
3-2-2- تصنيف مضادات الاكسدة: 26
المراجع..... 28

الفصل الثالث

عموميات حول البكتيريا

تمهيد:..... 32
1- تعريف البكتيريا:..... 32
2- تركيب الخلية البكتيرية:..... 33
2-1- الجدار الخلوي:..... 33
2-2- غشاء بلازمي:..... 33
2-3- السيتوبلازم:..... 33
2-4- النواة:..... 34
3- تسمية البكتيريا:..... 34
4- أساس تصنيف البكتيريا:..... 34
4-1- من حيث شكل البكتيريا: 35
4-2- من حيث توزيع اسواطها:..... 35
4-3- من حيث الوسط الذي تعيش فيه:..... 35
4-4- من حيث التغذية:..... 35
4-5- من حيث طريقة التلوين: 35
4-6- من حيث أثرها على الإنسان:..... 36
4-6-1- بكتيريا نافعة (Bénéficial Bactérie):..... 36
4-6-2- بكتيريا انتهازية (Opportunistic Bactérie): 36
4-6-3- بكتيريا ضارة (Bactéries nocives):..... 36
5- البكتيريا المستعملة في الدراسة:..... 36

5-1- بكتيريا *Escherichia Coli*:..... 36
5-2- بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa*:..... 37
5-3- بكتيريا *Staphylococcus aureus*:..... 38
6- المضادات الحيوية:..... 40
6-1- تعريف المضادات الحيوية:..... 40
6-2- أنواع المضادات الحيوية:..... 40
6-3- طرق تأثير المضادات الحيوية:..... 40
6-3-1- مضادات تعمل على إيقاف نسخ ADN:..... 40
6-3-2- مضادات تعمل على تخريب بنية الغشاء الستيوبلازمي: 40
6-3-3- العمل على الغشاء الداخلي للبكتيريا: 40
6-3-4- العمل على الغشاء الخارجي للبكتيريا: 40
7- المقاومة البكتيرية:..... 41
7-1- تعريف المقاومة:..... 41
7-2- طرق التعرف على حساسية أو مقاومة البكتيريا للمضاد الحيوي:..... 41
7-2-1- طريقة التمديد:..... 41
7-2-2- طريقة الانتشار:..... 41
المراجع..... 42

الفصل الرابع

الأجهزة والطرق

1- جني عينات ثمار نبات الرمان:..... 46
2- الأجهزة و المواد المستعملة :..... 46
2-2- المواد المستعملة :..... 46
2-3- الأجهزة المستعملة:..... 47
3- تعريف الاستخلاص : 47
3-1 استخلاص سائل- صلب :..... 47

3-1-1- استخلاص على البارد (بالنقع): 47
3-1-2- الإستخلاص على الساخن:..... 48
4- تحضير المستخلصات المستعملة في الدراسة:..... 48
4-1- تحضير المستخلص المائي بالنقع:..... 48
4-2- تحضير المستخلص الإيثانولي المائي(مزيج) بالنقع: 48
4-3- تحضير المستخلص الإيثانولي بالغليان:..... 48
5- حساب المردودية الإنتاجية للمستخلصات: 51
6- تقدير الكمي بواسطة مطيافية الأشعة فوق بنفسجية-المرئية:..... 51
6-1- مطيافية الأشعة فوق البنفسجية-المرئية UV-visible: 51
6-2- تقدير المركبات الفينولية الكلية:..... 51
6-2-1- المنحنى القياسي لحمض الغاليك: 51
6-2-2- طريقة الكشف لعديد الفينولات : 52
6-3- التقدير الكمي للفلافونيدات:..... 53
6-3-1- المنحنى القياس لحمض الروتين:..... 53
6-3-2- طريقة الكشف عن الفلافونويد: 54
7- تقدير الفعالية المضادة للاكسدة بالطرق الكيميائية:..... 54
7-1- إختبار تثبيط الجذر الحر DPPH:..... 54
7-2- طريقة العمل:..... 55
8- إختبار القدرة الكلية المضادة للأكسدة (TAC):..... 56
8-1- طريقة العمل:..... 56
9- الفعالية المضادة للبكتيريا:..... 57
9-1- تحضير التراكيز المختلفة لكل مستخلص:..... 57
9-2- تنمية مزارع بكتيرية المستعملة:..... 57
9-3- تحضير وسط الزرع:..... 57
9-4- تحضير المعلق البكتيري:..... 58

5-9- تطبيق الأقراص:..... 58
المراجع..... 59

الفصل الخامس

نتائج ومناقشة

1- حساب مردود المستخلصات:..... 62
2- التقدير الكمي للفينولات باستخدام جهاز UV-visible:..... 63
3- التقدير الكمي للفلافونيدات باستخدام جهاز UV-visible:..... 64
4- الفعالية المضادة للأكسدة:..... 66
4-1- القدرة التثبيطية للجذر الحر DPPH :..... 66
4-1-1- الرمان الحـــلو:..... 66
4-1-2- الرمان الحامض:..... 67
4-2- قيم الفعالية الإرجاعية للأكسدة TAC:..... 69
5- الفعالية المضادة للبكتيريا:..... 70
5-1- الرمان الحلو:..... 70
5-1-1- المستخلص الإيثانولي:..... 70
5-1-2- المستخلص المائي:..... 71
5-1-3- المستخلص المزيج:..... 73
5-2- الرمان الحامض:..... 74
5-2-1- المستخلص الإيثانولي:..... 74
5-2-2- المستخلص المائي:..... 75
5-2-3- المستخلص المزيج:..... 76
الخاتمة..... 78
الملاحق..... 81

قائمة الأشكال

الشكل 1: شجرة نبات الرمان Punica granatum.L 5
الشكل 2: أشكال نبات الرمان *Punica granatum*.L 7
الشكل 3: أوراق نبات الرمان *Punica granatum*.L 8
الشكل 4: : زهرة نبات الرمان *Punica granatum*.L 8
الشكل 5: ثمرة نبات الرمان *Punica granatum*.L 9
الشكل 6: بذور نبات الرمان *Punica granatum*.L 9
الشكل 7: مراكز منشأ نبات الرمان *Punica granatum*.L من قبل العالم Vavilov 10
الشكل 8: الصيغة الكيميائية لمركب فينولي بسيط 19
الشكل 9: الهيكل الأساسي للفلافونيدات 21
الشكل 10: البنيات الرنينية في جزيئة DPPH. 25
الشكل 11: يوضح بنية BHA 26
الشكل 12: يوضح بنية BHT. 27
الشكل 13: يوضح بنية (GA) 27
الشكل 14: يمثل بنية البكتيريا 32
الشكل 15: صورة بالمجهر الإلكتروني لبكتيريا *E. Coli* 37
الشكل 16: صورة بالمجهر الإلكتروني لبكتيريا *P. aeruginosa* 38
الشكل 17: صورة بالمجهر الإلكتروني لبكتيريا *S. aureus* 39
الشكل 18: العينات قبل وبعد الطحن 46
الشكل 19: مراحل تحضير العينة 49
الشكل 20:مخطط عام للتجارب المنجزة 50
الشكل 21: لمنحى العياري لحمض الغاليك 52
الشكل 22: المستخلصات بعد إضافة كاشف الفولين 52
الشكل 23: آلية تشكيل المعقد الأصفر 53
الشكل 24: المنحنى القياسي لمحاليل الروتين. 53

الشكل 25: المستخلصات بعد الكشف عن الفلافونويد. 54
الشكل 26: معادلة تثبيط جذر DPPH في وجود مضادات الجذور الحرة. 55
الشكل 27: المستخلصات بعد إضافة محلول DPPH..... 56
الشكل 28: المستخلصات بعد إضافة محلول المولبيبيدات. 57
الشكل 29: أعمدة بيانية تمثل مردود المستخلصات المستعملة في الدراسة..... 62
الشكل 30: يوضح كمية عديدات الفينول بالملغ مكافئ لحمض الغاليك /g من وزن المستخلص 63
الشكل 31: يوضح كمية الفلافونيدات بالملغ مكافئ لروتين /g من وزن المستخلص. 65
الشكل 32: تمثل منحنى النشاطية للمستخلص الايثانولي في تثبيط الجذر الحر• DPPH 66
الشكل 33: : تمثل منحنى النشاطية للمستخلص المزيج في تثبيط الجذر الحر• DPPH 66
الشكل 34: : تمثل منحنى النشاطية للمستخلص المائي في تثبيط الجذر الحر• DPPH 67
الشكل 35: تمثل منحنى النشاطية للمستخلص الايثانولي في تثبيط الجذر الحر• DPPH 67
الشكل 36: تمثل منحنى النشاطية للمستخلص المزيج في تثبيط الجذر الحر• DPPH 68
الشكل 37: تمثل منحنى النشاطية للمستخلص المائي في تثبيط الجذر الحر• DPPH 68
الشكل 38: يوضح قيم مضادات الأكسدة الإرجاعية TAC..... 70
الشكل 39: أعمدة بيانية تمثل أقطار مناطق التثبيط (ملم) للمستخلص الإيثانولي للرمان الحلو..... 71
الشكل 40: أعمدة بيانية تمثل أقطار مناطق التثبيط (ملم) للمستخلص المائي للرمان الحلو..... 72
الشكل 41: أعمدة بيانية تمثل أقطار مناطق التثبيط (ملم) للمستخلص المزيج للرمان الحلو..... 73
الشكل 42: أعمدة بيانية تمثل أقطار مناطق التثبيط (ملم) للمستخلص الإيثانولي للرمان الحامض. .. 74
الشكل 43: أعمدة بيانية تمثل أقطار مناطق التثبيط (ملم) للمستخلص المائي للرمان الحامض. 75
الشكل 44: أعمدة بيانية تمثل أقطار مناطق التثبيط (ملم) للمستخلص المزيج للرمان الحامض. 76

قائمة الجداول

جدول 1: تصنيف نبات الرمان *Punica granatum*. L من طرف العالم Linné..... 6
جدول 2: : التركيب الكيميائي لبعض أجزاء نبات الرمان. 10
جدول 3: القيمة الغذائية للرمان، لكل 100 g من الجزء الصالح للأكل. 12
جدول 4: يوضح بعض أصناف عديد الفينولات. 20
جدول 5: بعض المركبات الفلافونيدية. 22
جدول 6: تصنيف البكتيريا *E.Coli* 37
جدول 7: تصنيف البكتيريا *P. aeruginosa* 38
جدول 8: تصنيف البكتيريا *S. aureus* 39
جدول 9: مردود المستخلصات المستعملة في الدراسة..... 62
جدول 10: يوضح النتائج المتحصل عليها من خلال دراسة كمية الفينولات..... 63
جدول 11: يوضح النتائج المتحصل عليها من خلال دراسة كمية الفلافونيدات. 64
جدول 12: تحديد مقدار IC_{50} لكل مستخلص..... 69
جدول 13: يوضح قيم الفعالية الإرجاعية للأكسدة TAC..... 69
جدول 14: أقطار مناطق التثبيط (ملم) للمستخلص الاثانولي للرمان الحلو. 70
جدول 15: أقطار مناطق التثبيط (ملم) للمستخلص المائي للرمان الحلو. 72
جدول 16: أقطار مناطق التثبيط (ملم) للمستخلص المزيج للرمان الحلو. 73
جدول 17: أقطار مناطق التثبيط (ملم) للمستخلص الإيثانولي للرمان الحامض. 74
جدول 18: أقطار مناطق التثبيط (ملم) للمستخلص المائي للرمان الحامض. 75
جدول 19: أقطار مناطق التثبيط (ملم) للمستخلص المزيج للرمان الحامض. 76

قائمة المختصرات

DPPH: 2.2- diphényl-1-picrylhydrazy

DMSO: dimethyl solphoxide

MH: Muler Hinton

***E. coli* :** *Escherichia coli*

***S. aureus* :** *Staphylococcus aureus*

P. aerogenosa : *Pseudomonas aerogenosa*

R : Rendement

T : Température

FeCl3 : Chlorure de fer

IC50 : Concentration inhibitrice 50 ou EC 50 Efficient concentration 50

TAC: Total antioxidant activity

SD : La déviation standard

ARP : Anti-radicalaire puissance

UV : Ultra-Violets

nm: Nanometer

µm: Micrometer

BHA: Butylated hydroxylanisole

G $^{+}$: Gram positive

G $^{-}$: Gram negative**.**

AND : Acide désoxyribonucléique

g: Gramme

mg : Milligramme

ml: Millilitre

A : Absorbance

µl: Microlitre

λ: الموجة طول

%: النسبة المؤوبة

A: الامتصاصية الضوئية

I%: النسبة المؤوية للتثبيط

ملم: وحدة الميليمتر

مقدمة

مقـــدمـــــــة

تعتبر النباتات الطبية من أقدم وأكثر أنواع التداوي انتشارا في العالم، ورغم الانتشار الواسع للعقاقير المصنعة في الوقت الحالي إلا أن العلاج بالمواد الطبيعية ما يزال يشكل الخيار الأمثل عند العديد من شعوب العالم. ظهر استعمال النباتات الطبية في العلاج مع شعوب ما قبل التاريخ إذ تشير بعض المخطوطات الى أن المصريين القدامى قد طوروا العديد من العقاقير من مصادرها الطبيعية ويصفها الأطباء للكثير من الأمراض، [1] ويعد المجتمع العربي من أحرص المجتمعات على تدوين واستخدام النبات في معالجة الأمراض، فقد برع الكثيرون منهم في هذا المجال حتى وصل هذا الى البلدان المجاورة. [2]

ومن بين هذه النباتات التي جرى تداولها هي نبات الرمان *Punica granatum*.L حيث يعد الرمان من الفصيلة الرومانية، أحد أقدم الثمار التي عرفها الانسان، وعرف في ثقافات الشعوب والأمم السابقة وقد شرف الرمان بالذكر ثلاث مرات في القرآن الكريم لقوله تعالى: "فِيهِمَا فَاكِهَةٌ وَنَخْلٌ وَرُمَّانٌ فَبِأَيِّ آلَاءِ رَبِّكُمَا تُكَذِّبَانِ" سورة الرحمن آية 68,69، وهو أيضا يعتبر من الفواكه الصيفية، موطنه الأصلي إيران. حيث تناولت كثير من الدراسات تأثير المستخلصات النباتية على نمو الأحياء المجهرية وبالتالي إمكانية استخدامها في علاج بعض الامراض الناتجة عن الإصابات الميكروبية المختلفة، فعلى الصعيد المحلي أجريت عدة دراسات حول تأثير المستخلصات النباتية للرمان على الميكروبات، [3] [4] وتطورت الأبحاث حوله خلال السنوات السبع الأولى من هذا القرن، وتضاعف عدد الدراسات في هذا المجال، وسعي العلماء في البحث عن مكوناته. [5]

ويعتبر الرمان غذاء صحي مثالي، مضاد للأكسدة ومهيأ لانتفاع الجسم به مباشرة، فقد هيأه الله بأن جعله طعاماً ذا قيمة غذائية عالية فهو غذاء ودواء في آن واحد. [6] وهذا لاحتوائه على العديد من المركبات الفعالة من أهمها البولي فينول مثل: الأنثوسيانين، الفلافونويدات، الصابونيات، الستيرويدات، وكذلك الأحماض الأمينية. [7]

ركزت الكثير من الدراسات والأبحاث العلمية المخبرية والسريرية على اختبار قدرة مركبات الرمان الآنفة الذكر على مقاومة أنواع السرطان ومنع الالتهابات والتقليل من حدة بعض الأمراض المزمنة كالسكري، وقد استخدم الرمان ومنتجاته في تحضير الكثير من العلاجات الطبية لأمراض العين والحساسية وتنظيف الفم وتحسين المناعة. [5]

مقـدمـة

ومن أجل معرفة مدى أهمية وتأثير طرق الاستخلاص في الفعالية المضادة للبكتيريا، تم إنجاز هذا البحث والمتمثل في استعمال طريقتين للاستخلاص (النقع، الغليان) بمذيبات مختلفة (إيثانول، ايثانول+ماء ماء).

وإظهار الطريقة الأمثل لاستخلاص المواد الفعالة من هذا النبات والاهم من ذلك ابراز المستخلص الأكثر فعالية للنشاطية المضادة للأكسدة والبكتيريا. لذلك قسم هذا العمل الى:

الجزء النظري:

الفصل الأول: دراسة نباتية حول نبات الرمان.

الفصل الثاني: دراسة كيميائية والفعالية البيولوجية.

الفصل الثالث: عموميات حول البكتيريا.

الجزء العملي:

الفصل الرابع: الأجهزة والطرق المتبعة في الدراسة.

الفصل الخامس: نتائج ومناقشة.

المراجع

[1] بن خناثة م.، 2014- المساهمة في دراسة نبات الكلخة *Ferula Vesceritensis* مذكرة تخرج لنيل شهادة ماستر أكاديمي، جامعة قاصدي مرباح. ورقلة. ص: 83.

[2] بن عاشورة صبرينة البتول، الفعالية المضادة للأكسدة الزيوت الطيارة والمركبات الفينولية لـ Deverra scoparia مذكرة تخرج لنيل شهادة ماجستير في الهندسة الكيميائية، تخصص التحضير العضوي والفيتوكيمياء، جامعة قاصدي مرباح ورقلة. 2007.

[3] محمد، سالم حسين، تأثير المستخلصات النباتية على نمو بعض أنواع من البكتيريا، مجلة البصرة للعلوم الزراعية 55-65 1995.

[4] غضبان، أمال كاظم، دراسة التركيب الكيميائي لمسحوق الفلفل الأسود Peper nigrium والتأثير التثبيطي للمستخلص في بعض الجراثيم المرضية ومحتوى للحم البقري المفروم من الاحياء المجهرية، مجلة البصرى للعلوم الزراعية 8(2) ص: 47-54، 1995.

[5] عزت الفارس.، الرمان غذاء ودواء، ماجستير قسم التغذية، كلية الصيدلة، الرمان وفوائده، جامعة البترا الأردنية 2004.

[6] الشاوش ف.، حامد ف.، العيسي. 2006 تحديد الصفات النوعية والكيميائية لأهم طرز الرمان Punica granatum في اليمن مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية. المجلد 22. العدد2 ص: 227.

[7] قيثار ر.، الشطي ص.، 2002 – تأثير الفعالية التعاضدية لبعض المستخلصات النباتية على نمو بعض الأحياء المجهرية، قسم صناعات الغذائية والالبان، كلية الزراعة، جامعة البصرى. ص:231.

الفصل الأول

دراسة نباتية حول نبات الرمان

Punica granatum.L

تمهيد

تكتسب شجرة الرمان أهمية كبيرة نظرا للخصائص العديدة المتميزة بها فمن الناحية الجمالية فهي أشجار أوراقها وأزهارها ذات مظهر جمالي جذاب فضلا عن العديد من الفوائد الطبية التي يمكن الحصول عليها من جميع أجزاء هذا النبات. [1]

1- نبذة تاريخية عن نبات الرمان: *Punica granatum*.L

الرمان من أهم وأطيب أنواع الفاكهة التي عرفتها البشرية منذ قديم الزمان. ويعتبر غذاء صحي مثالي واقي، فهو مضاد للأكسدة وهو ذا قيمة غذائية عالية فهو يعتبر غذاء ودواء في نفس الوقت.

عرفه قدماء الفراعنة والإغريق قبل الرومان، فذكر في كتب كثيرة ونقش على جدران المعابد والقصور القديمة [2] عرفوه باسم ارهامني ومنها اشتق الاسم القبطي ارمين او رمن الذي اشتق من الاسم العبري رمون والعربي رمان. تمت زراعة الرمان منذ العصور القديمة لثمارها الصالحة للأكل وازهارها الكبيرة المستعملة في الزينة وكان يعرف عند الشعوب المصرية، الفينيقية، الرومانية، واليونانية [3]، ينتمي الرمان الى العائلة الرمانية Punicaceae والجنس Punica وهو الوحيد في العائلة ويضم نوعين نباتيين الأول P. granatum والثاني هو P.protopunica Balf . [1]

2- الأسماء الشائعة لنبات الرمان: *Punica granatum. L*

الاسم العلمي: *Punica granatum. L*

الاسم العربي: رمان

الاسم الفرنسي: Grenadier

الاسم الإنجليزي: Pomegranate

الشكل 1: شجرة نبات الرمان Punica granatum.L

3- أنواع نبات الرمان: *Punica granatum. L*

وفي الدراسة ذكر ان أنواع الرمان كالتالي: [4]

3-1- الرمان الحلو:

وهو من أهم أنواع الرمان والأجود كبير الحجم وأملس وشديد الحمرة، رقيق القشرة كثير الماء.

3-2 الرمان المعتدل:

وهو أقل جودة لونه يميل إلى اللون الأخضر وحبوبه قليلة الماء ومعتدل في حموضته.

3-3 الرمان الحامض:

فهو حامض جدا ولا يستعمل الا للعلاج وبعض أنواع المأكولات، بذوره صلبة وقليلة الماء.

4- التصنيف النباتي لنبات الرمان: *Punica granatum*. L

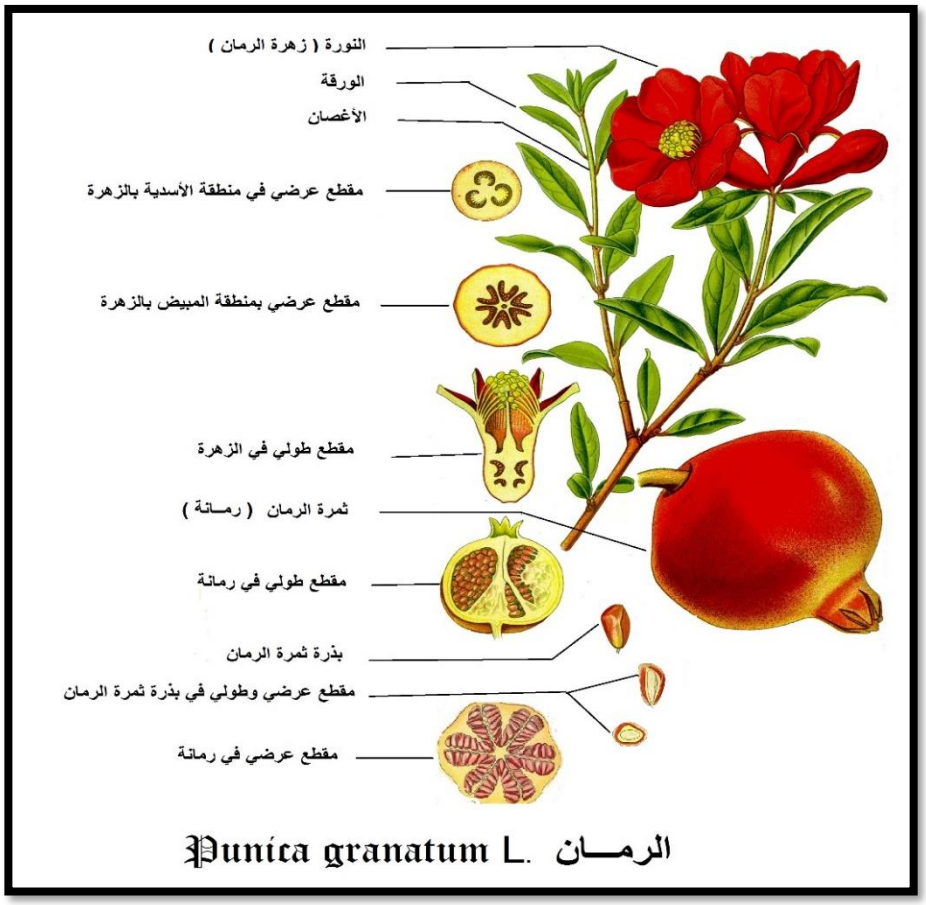
في القرن الثامن عشر (1707-1778) Carl von Linné، والذي يعتبر الأب الروحي للتصنيف ابتكر التصنيف على أساس الاختلافات في الأعضاء الجنسية والتجمع وطول الاسدية. هذا التصنيف وصفها بأنها مصطنعة، ومع ذلك كان يستخدم كمرجع لمئات السنين وهي أيضا لا تزال تستخدم على نطاق واسع جدا. [5]

جدول 1: تصنيف نبات الرمان *Punica granatum*. L من طرف العالم Linné

المملكة	النباتية
الشعبة	النباتات البذورية Spermaphytes
تحت شعبة	كاسيات البذور Angiospermes
قسم	المنغوليات Magnoliopsida
رتبة	الأسية Myrtales
العائلة	الرومانية Punicaceae
الجنس	الرمان Punica
الصنف	الرمان المثمر *Punica granatum*.L

5- الوصف النباتي لنبات الرمان *Punica granatum*. L:

هي شجرة متوسطة الحجم متساقطة الأوراق لا يزيد ارتفاعها عن 3-5 م غير منتظمة الشكل كثيرة التفرع وتعطي سرطانات عديدة بالقرب من سطح الأرض [6]. والافرع اسطوانية ملساء ضاربة للسمرة مرنة وتتحول ببعض الفريعات الجانبية الى اشواك قصيرة. [7]، والشكل2 يمثل جميع أجزاء نبات الرمان.



الشكل 2: أشكال نبات الرمان *Punica granatum*.L

الورقة:

الأوراق رمحيه الشكل بسيطة تامة الحافة ناعمة الملمس لونها اخضر داكن متقابلة الوضع على الافرع [6] يتراوح طولها ما بين 3الى 7 سم وعرضها 2سم. [8]

الشكل 3: أوراق نبات الرمان *Punica granatum*.L

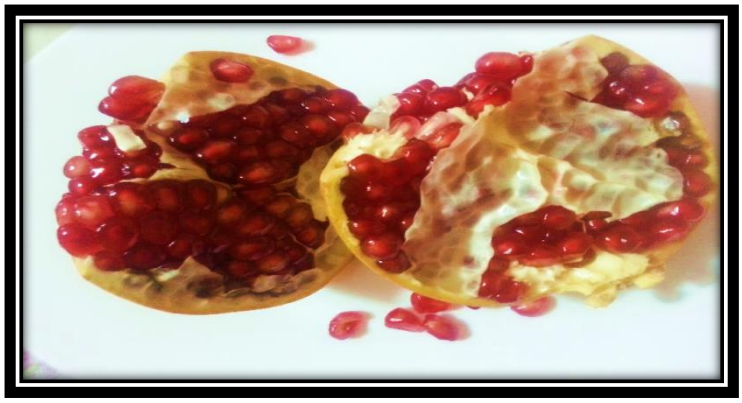
الزهرة:

الازهار ذات حامل قصير شبه جالسة على الافرع ذات لون احمر وكذلك التويج احمر أيضا ويتراوح عدد السبلات من 5 الى 7 والاسدية كثيرة حمراء اللون والميسم يكون مطمورا بين خيوط الأسدية أو يكون في مستواها أو خارجا عنها والمبيض صغير. ويتركب المبيض من طبقتين يفصل بينهما غشاء شفاف وتتكون كل طبقة من عدة حجرات وتكون عادة ثلاث حجرات في احداهما وخمس في الأخرى وتنفصل كل حجرة بغلاف رقيق شفاف يوجد بكل حجرة بروز لحمي سميك يمثل جدار المبيض وتزهر الأشجار في شهر مارس وأفريل. [6]

الشكل 4: زهرة نبات الرمان *Punica granatum*.L

الثمار:

الثمرة شبه كروية الشكل ويختلف قطرها من صنف لآخر ويتراوح بين 6 الى 12 سم ولون الثمرة يختلف من الأخضر الى الأصفر أو الأحمر او الأرجواني حسب الأصناف. [6]



الشكل 5: ثمرة نبات الرمان *Punica granatum*.L

البذور:

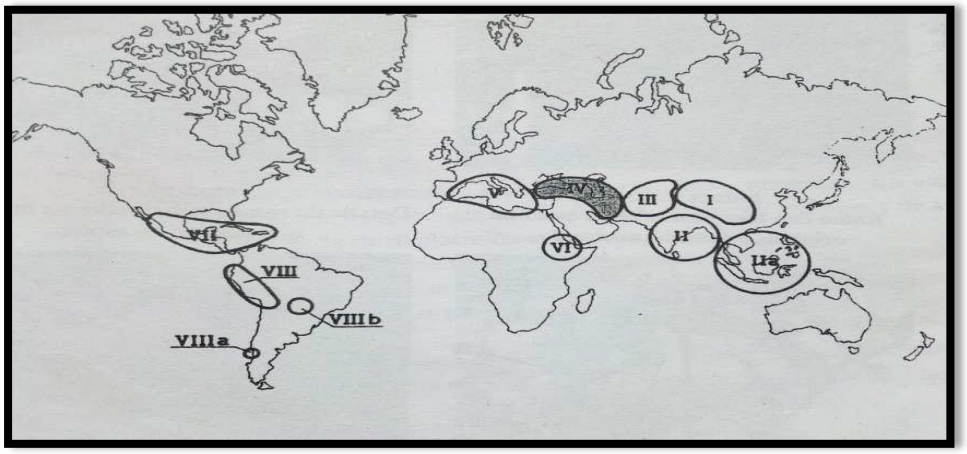
البذور مضلعة وهي عبارة عن الاغطية الخارجية الطرية التي تحيط بالبذور الصلبة وهذه الاغطية ممتلئة بسائل عصيري يختلف لونه من الأبيض الى الوردي والاحمر القاني حسب الصنف ويحتوي على سكريات واحماض وأصباغ ومواد أخرى. [6]

الشكل 6: بذور نبات الرمان *Punica granatum*.L

6- الانتشار الجغرافي لنبات الرمان: *Punica granatum*.L

يذكر أن منشأ الرمان يعود إلى بلاد فارس (إيران) والعراق ومنها انتقل إلى المنطقة العربية والجنوب الغربي للقارة الآسيوية، وهو ما يعرف الآن بمنطقة الشرق الأوسط في الخارطة الجيوسياسية والتي تشمل بلاد الشام وجزيرة العرب وإيران وتركيا، ثم إلى منطقة البحر الأبيض المتوسط ومنها إلى الصين والهند، وأخيرًا إلى الجنوب الغربي من الولايات المتحدة الأمريكية. [9] حيث انها تنمو على ارتفاعات كبيرة من سطح البحر تصل 2300م كما تنمو في بعض المناطق الساحلية والدافئة. [1]

يعتبر نبات الرمان من النباتات المتأقلمة بالمناطق الصحراوية خاصة بولاية الوادي، حيث يقدر المساحة الإجمالية المزروعة بـ235 هكتار بجميع الأصناف والانواع وبإنتاج سنوي مقدر بـ18000 قنطار.[10]



الشكل 7: مراكز منشأ نبات الرمان *Punica granatum*.L من قبل العالم Vavilov [11]

7- التركيب الكيميائي لنبات الرمان: *Punica granatum*.L

على مدى العقد الماضي، أحرز تقدم كبير في إنشاء الآليات الدوائية من الرمان ولوحظ ان جميع أجزاء النبات له خصائص علاجية، فمن مكوناته حمض الاليجيك، حمض البونيكونيك، الفلافونويدات، أنثوسيانيدينس، الانثوسيانين، وفلافونول الاستروجين وفلافونيس، الجدول التالي يمثل المكونات الرئيسية للنبات الرمان لبعض أجزائه.

جدول 2: : التركيب الكيميائي لبعض أجزاء نبات الرمان. [12] [13]

الجزء من الثمرة	التركيب الكيمائي
عصير الرمان	أنثوسيانيد، غلوكوز، حمض الأسكوربيك، حمض الألجيك، حمض الغاليك، روتين، كرستين، أحماض أمنية، حمض الكافيك، العديد من المعادن خاصة الحديد.
زيت بذور الرمان	95% زيت البينيك، حمض الإيلاجيك، واحماض أخرى دهنية.
زهرة الرمان	حمض الغاليك، حمض الأورسوليك، ماسلينيك، ثلاثي التربان، ومكونات أخرى.
قشرة الثمرة	احماض دهنية، فلافونول، فلافون،انثوسيانيدين، التربينات، الفلافونويد، الصابونيات الستيرويدات، التانيات
جذور الثمرة واللحاء	الإيلاجيتانين، بونيكالين، بونيكالاجين، بيبيريدين، القلويدات.

8- القيمة الغذائية لنبات الرمان: *Punica granatum*.L

يحتوي الرمان أيضا على العديد من العناصر والمعادن، مثل البوتاسيوم والفوسفور والكالسيوم والمغنيسيوم والحديد والزنك والنحاس. هذا الأخير ضروري لتكوين الهيموجلوبين والكولاجين، حيث يدخل في تكوين العديد من الإنزيمات. فهو أيضا مصدرا هاما للفيتامين ج هذا الفيتامين المضاد للأكسدة يساهم في تقوية العظام والغضاريف والأسنان واللثة، وبالإضافة إلى ذلك يحمي الجسم من الالتهابات ويعزز امتصاص الحديد الموجود في النبات ويسرع الشفاء. [A]

جدول 3: القيمة الغذائية للرمان، لكل 100 g من الجزء الصالح للأكل. [5]

العناصر الغذائية	القيمة الغذائية
الماء	80.97 g
البروتين	0.95 g
الدهون	0.30 g
كربوهيدرات	17.17 g
ألياف غذائية	0.6 g
كالسيوم	3 mg
الحديد	0.30 mg
مغنسيوم	3 mg
فسفور	8 mg
بوتاسيوم	259 mg
صوديوم	3 mg
زنك	0.12 mg
نحاس	0.070 mg
فيتامين ج	6.1 mg
فيتامين د	0
فيتامين ب	0.596 mg

9- الفوائد الطبية لنبات الرمان: *Punica granatum*.L

قد تم استخدام الرمان لعدة قرون في الطب التقليدي. للمجموعة الكبيرة والمتنوعة من الخصائص المسندة إليها تشير إلى أن هذه الشجرة هي دواء لكل داء. فوجد ان لنبات الرمان فوائد طبية عديدة وكل جزء من أجزاءه له خواص علاجية مختلفة حيث تستعمل قشوره في علاج امراض البطن والاسهال لاحتوائها على مواد دابغة للمعدة والجسم الثمرة مقوي للقلب أما عصير الثمرة فهو مرطب ومبرد، كما ان لقشور الرمان استخدامات علاجية عديدة اخرى اضافة الى ما ذكر فهي تعتبر من أشد الادوية قتلاً للديدان

الشريطية كما تستخدم في علاج الزحار وغيرها. [14] كما أن نقيع مسحوق والساق والجذور يستخدم في علاج الاسهال او الديزنتري لأنها تعمل على تغير طبيعة البروتينات الأمعاء كما يقلل من ارتشاح السوائل فضلا عن أنه يقتل الجراثيم ويمتص السموم الجرثومية. [15]

10- الاستعمالات الطبية لنبات الرمان: *Punica granatum.L*

ركزت الكثير من الدراسات والأبحاث العلمية المخبرية والسريرية على اختبار قدرة مركبات الرمان الآنفة الذكر على مقاومة أنواع السرطان ومنع الالتهابات والتقليل من حدة بعض الأمراض المزمنة كالسكري، وقد استخدم الرمان ومنتجاته في تحضير الكثير من العلاجات الطبية لأمراض العين والحساسية وتنظيف الفم وتحسين المناعة.

10-1- الفعالية المضادة للالتهاب:

وفي محاولة لمعرفة تأثير مستخلص الرمان على التهاب المفاصل وتآكلها، Osteoarthritisوهو مرض شائع لدى كبار السن وجد الباحثون أن مستخلص ثمرة الرمان قد أدى إلى التقليل بشكل ملحوظ من تآكل المادة الغضروفية الموجودة في مفاصل الساق، وعمل على المحافظة على سلامة الغضروف وتحسين كفاءته الوظيفية مخبرياً .وقد عزى الباحثون تلك الخاصية الاستطبابية للرمان وعصيره إلى وجود المواد المانعة للالتهابات والتي من أهمها الأنثوسيانيدينات Anthocyanidins التي ثبتت قدرتها على منع الالتهابات. [9]

10-2- الفعالية المضادة للأكسدة:

يعد عصير الرمان مصدراً مهماً لمضادات الأكسدة المتمثلة بالمركبات الفينولية والأنثوسيانينية .ومن أهم المركبات الفينولية وخصوصاً المشتقات أحادية وثنائية الغلوكوز للدلفيندين(Delphinidine) والسيانيدين (Cyanidine)والبيلارغونيدين(Pilargodinine)، ومشتقات لحمض الإلاجيك، والتانينات الأخرى القابلة للحلمأة، التي تساهم جميعها في النشاط المضاد للأكسدة.

الدراسات الوبائية تشير إلى أن استهلاك الفواكه والخضار العالية المحتوى بالفينولات مرتبط بخفض أخطار أمراض القلب الوعائية والدماغية والأورام السرطانية وتعود هذه التأثيرات المفيدة للفينولات ومن ضمنها الأنثوسيانينات، نتيجة لقدرتها على كبح الجذور الحرة التي لو بقيت ستلحق الضرر والأذى بجميع خلايا الجسم. [16]

10-3 الفعالية المضادة للسرطان:

ثبت أن خلاصة الرمان في الجرعات العلاجية تسبب موتا طبيعيا للخلايا السرطانية دون أن تؤثر على الخلايا السليمة.

الخلايا السرطانية لديها القدرة على أن تصبح خلايا السليمة تسمى عملية التمايز حيث يمكن للفلافونويد حمل هذا التمايز مع انخفاض السمية، مما يجعلها مفيدة لعلاج سرطان الدم، مكافحة سرطان البروستاتا، و أيضا ضد أنواع أخرى من السرطان مثل الأمعاء وسرطان الثدي [10] وهذا لاحتوائه على كميات وافرة من حمض(Acide Ellagic) اذ أن هذا الحمض يتميز بقدرته الفائقة على الحد من نمو الخلايا السرطانية [17] حيث ثبت أنه يوقف نمو الخلايا السرطانية ويمنع انتشارها ويزيد من معدلات الموت الطبيعي للخلايا السرطانية كما ثبتت فعاليته العالية في علاج والوقاية من سرطان المثانة البولية حيث أنه يوقف نمو السرطان كما يتدخل في العوامل الوراثية للخلايا السرطانية بما يؤدي إلى موتها في النهاية يحفز التئام الجروح ويقوي الأنسجة الرخوة وهذا أيضا يمكن أن يساهم في منع الخلايا السرطانية من الانتشار وهذا راجع للفعل المضاد للأكسدة وتثبيط الجذور الحرة. [B].

المراجع

المراجع بالغة العربية:

[1] الشاوش ف.، حامد ف.، العيسي. 2006 تحديد الصفات النوعية والكيميائية لأهم طرز الرمان Punica granatum في اليمن مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية. المجلد 22. العدد2 ص 227.

[2] حجازي، أحمد توفيق(1999)، الموسوعة الصحية. دار أسامة للنشر والتوزيع، عمان-الأردن.

[4] محسن الحاج، (2000)، طب الأعشاب تراث وعلم، دار صبح للطباعة والنشر والتوزيع.

[6] د. فرجيني فارس نعمان، د. مادلين راشد سورسن، د. أحمد صلاح الدين. الإدارة المركزية للإصلاح الزراعي، معهد البحوث البساتين، مركز البحوث الزراعية، نشرت 10مارس 2014.

[7] متولي أ.، الوكيل ح.، 2010 – خدمة الحصلات البستانية(الفاكهة). مصر العربية، ص:338.

[9] عزت الفارس.، الرمان غذاء ودواء، ماجستير قسم التغذية، كلية الصيدلة، الرمان وفوائده، جامعة البترا الأردنية.

[10] السلسلة الإحصائية ب لمديرية الفلاحة بالوادي لسنة 2016.

[14] قيثار ر.، الشطي ص.، 2002 – تأثير الفعالية التعاضدية لبعض المستخلصات النباتية على نمو بعض الأحياء المجهرية، قسم صناعات الغذائية والالبان، كلية الزراعة، جامعة البصرى. ص:231.

[15] سعدي، شكري أبراهيم، عبد الله القاضي محمد، صالح عبد الكريم، (1988). النباتات الطبية والعطرية والسامة في الوطن العربي. جامعة الدول العربية والمنظمة العربية للتنمية الزراعية. الخرطوم. ص: 59-61.

[16] غياث مصباح سمينة، راما عتمه، تأثير معاملات تصنيع عصير الرمان في النشاط المضاد للأكسدة وعلاقته بالفينولات، مجلة جامعة دمشق 2015 المجلد (31) العدد 3 ص:169/167.

المراجع بالغة الأجنبية:

[3] AHMED S., WANG N., HAFEEZ B., CHERUVU K., and 2005- Haqqi TM: Punica granatum L extract inhibits IL- tbeta- induced expression of matrix metalloproteinases by inhibiting the activation of MAP kinases and NF-kappaB in human chondrocytes in vitro .135. P: 2096-2102.

[5] WALD E., 2009- le grenadier (punica grantum) : plantehistorique tevolutions therapeutique srecentes. Le diplôme d'état de docteur en pharmacie, université henri poincare nancy 1. P : 158.

[8] PARRENO M., 2013- Development and assessment of pomegranate (*Punica granatum* L.) Derived food products. Rich in bioactive phytochemicals. These doctored. université Miguel Hernàndez de Elche :199..

[11] HMID I., 2014- contribution à la valorisation alimentaire de la grenade marocaine (Punica granatum L.) : caractérisation physicochimique, biochimique et stabilité de leur jus frais. Thèse de doctorat .Université d'Angers, French. p : 180.

[12] BEN ABDENNEBI M., 2012- Le grenadier tunisien (*Punica granatum*) stimule le transport de glucose dans les cellules musculaires C2C12 via la voie. Insulinodépendante de l'Akt et la voie insulino-indépendante de l'AMPK. Mémoire présenté à la Faculté de Médecine en vue de l'obtention du grade de Maîtrise en pharmacologie. Université de Montréal. P : 82.

[13] JULIE JURENKA, MT (SSCP), Therapeutic application of Pomedranate (Punica granatum.L) A Reviw Article.

[17] CHAKRABORTY M., GARACHH D., PATEL A., KAMATH V., 2012- Phytochemical and pharmacological profile of Punica granatum an overview, Vol.3. No. 2. P: 67.

مواقع إلكترونية:

[A] http://beschretiens.Free.Fr/bible/cantique.php

[B] https://ar.wikipedia.org/wiki/رمان

الفصل الثاني

الدراسة الكيميائية والفعالية البيولوجية

تمهيد:

جميع الكائنات الحية لديها الأيض الأساسي الذي يوفر لها الجزيئات الأساسية من احماض نووية، دهون، بروتينات، أحماض الأمينية وغيرها بالإضافة لهذا عدد كبير من المركبات والتي تأتي نتيجة التفاعلات الكيميائية، حيث تسمى هذه المركبات بالأيض الثانوي [1] والتي تم فصلها من النباتات والكائنات الحية الدقيقة، وغالبا ما تصنف كمركبات لا ترتبط مباشرة بتطور ونمو أو تنفس النباتات، [2] إذ يمكن تصنيفها حسب تركيبها الكيميائي الى ثلاث مجموعات كبيرة وهي:

التربينات ومشتقاتها.

المركبات الفينولية.

المضادات الحيوية والفيتامينات.

القلويدات وأشباهها. [3]

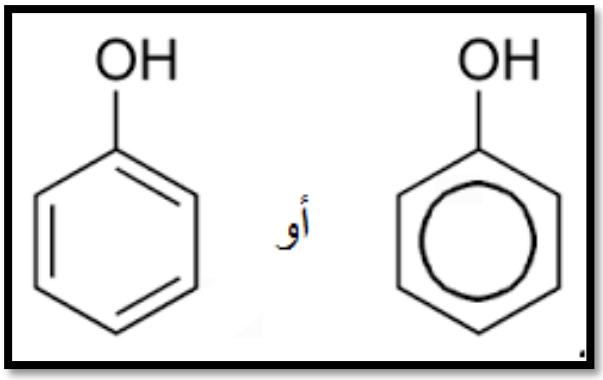
وتمت دراسة المركبات الفينولية في هذه الدراسة.

1- المركبات الفينولية:

1-1- تعريف المركبات الفينولية:

تشكل المركبات الفينولية أو متعدد الفينول مجموعة كبيرة من منتجات الأيض الثانوي نظرا لكثرة عددها وتباين هيكلها البنائية، [4] وهي واسعة الانتشار في المملكة النباتية وذات تراكيب متعددة وتندمج ضمن المركبات العطرية لرائحتها الخاصة، [5] تتميز بأنها تحمل حلقة بنزينية أو أكثر في هيكلها العام، مرتبطة بمجموعة هيدروكسيلية OH أو أكثر [6] وهذا الاختلاف في عدد الحلقات يجعلها تنقسم إلى عدة أقسام أهمها الأحماض الفينولية حيث القسم الأكبر منها الفلافونويدات. [7]

تشارك المجموعات الفينولية في الدفاع ضد الاخطار البيئية لهذا نجد أن هناك نسبة كبيرة تقدر بـ 80% منها موجودة على انسجة البشرة (القشرة) للفواكه، وهي أيضا مسؤولة عن ظهور الألوان في النباتات. [8]



الشكل 8: الصيغة الكيميائية لمركب فينولي بسيط.

1-2- مصدر الفينولات:

توجد المركبات الفينولية في العديد من الأطعمة ذات المصدر النباتي وتحديدا الفواكه حيث يمكن أن تصل ما بين 100-500 ملغ /غ في بعض الفواكه: التفاح، العنب، الكرز، المشروبات (القهوة والشاي) والشكولاطة، بينما توجد بصورة أقل في الخضر والحبوب. حيث يحتوي الخضر على ما يقارب 25-100 ملغ/غ. [7] [9]

تعد الفواكه غير الناضجة غنية جدا بالمركبات الفينولية مثل (الفلافونول) يمكن الحصول عليها من البصل، التفاح والفاصوليا الخضراء، وغيرها من المركبات الأخرى المتواجدة في بقية الأغذية. [10]

1-3- فوائد المركبات الفينولية:

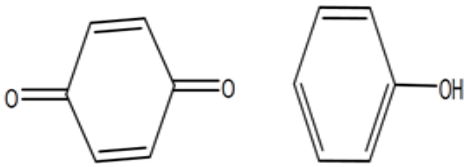
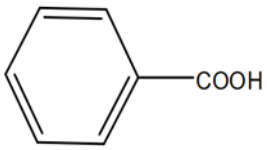
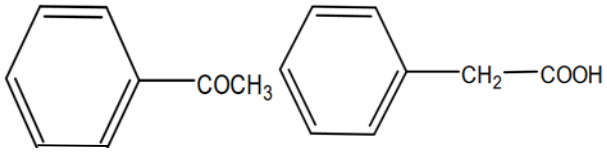
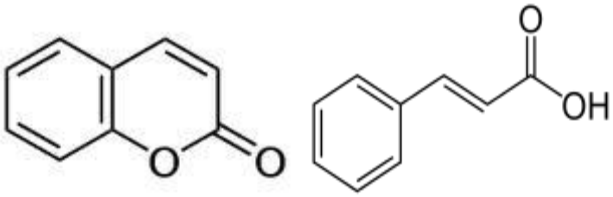
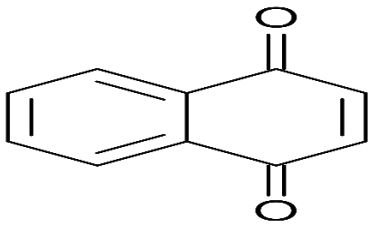
هي آسرات للجذور الحرة وممخلبات للأيونات المعدنية مما يمنحها خصائص مضادة للأكسدة ذات أهمية حسب بنيتها حيث تعمل بمنح ذرة الهيدروجين الى الجذور الحرة الناتجة أثناء الأكسدة اللبيدية مثل: جذر البيروكسيل (ORO°) أو الكوكسيل (OR°)، لهذه البوليفينولات المتواجدة بصفة خاصة في الشاي أثر مفيد ضد أمراض القلب الوعائية. [11]

1-4- أصناف المركبات الفينولية:

توجد العديد من التصنيفات التي قسمت المركبات الفينولية الى مجموعات، فقد صنفها العالم Dacosta حسب بنيتها الى أقسام أهمها: الأحماض الفينولية، الفلافونويد، التنينات، الستلبينات، اللقنان، الصبونيات [12] أما العالمان Harborne و Simmonds فصنفاها حسب انتشارها وتعقيدها إلى عائلة المركبات الفينولية قليلة الانتشار (فينولات بسيطة)، وأخرى واسعة الانتشار (أحماض فينولية، الفلافونيدات

الكومارينات)، وأيضا المركبات الفينولية المتواجدة على شكل بوليمرات. [13] وهذا الجدول يوضح بعض أصناف المركبات الفينولية:

جدول 4: يوضح بعض أصناف عديد الفينولات. [14]

رقم ذرة الكربون	الهيكل الأساسي	الصنف	البنية الأساسية
6	C_6	الفينولات البسيطة البنزوكينونات	
7	C_6–C_1	الأحماض الفينولية	
8	C_6–C_2	أسيتوفينون أحماض الفينيلاسيتيك	
9	C_6–C_3	أحماض السينامك الكومارينات	
10	C_6–C_4	النافطوكينون	

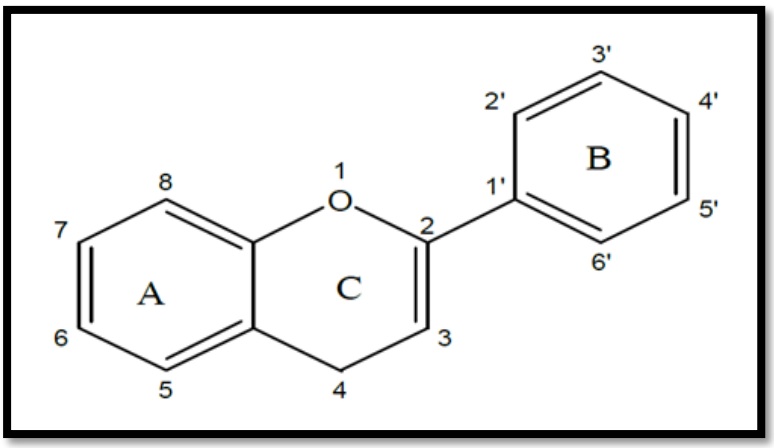
1-5- الاستعمالات العلاجية لعديدات الفينول:

تستخدم عديدات الفينول بشكل متزايد في الاستعمالات العلاجية، فهي تحتوي على مكونات فعالة لعديد من الأمراض: مضادة للسرطان، مضادة للالتهابات، مضادة للفيروسات، مضادة للجراثيم، ومكافحة لتصلب الشرايين، وهي أيضا مضادة للأكسدة. [15]

2- الفلافونيدات:

2-1- تعريف الفلافونيدات:

الفلافونيدات أصل هذه التسمية يوناني مشتقة من كلمة Flavus وتعني اللون الأصفر تمثل غالبا المركبات المسؤولة عن اللون الأصفر المميز للأزهار، الثمار، وأحيانا الأوراق، وهي عبارة عن عائلة واسعة من مركبات عديدات الفينول التي ينتجها النبات، حيث تمثل القسم البالغ الأهمية من عمليات الأيض الثانوي، تحوي على أكثر من 4000 نوع، وتملك بنية كيميائية مشتركة يتكون فيها الهيكل الكربوني من 15 ذرة كربون (C_6-C_3-C_6) في هيكلها الأساسي موزعة على ثلاث حلقات (A, B, C). [3] [16]

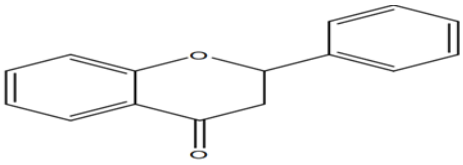
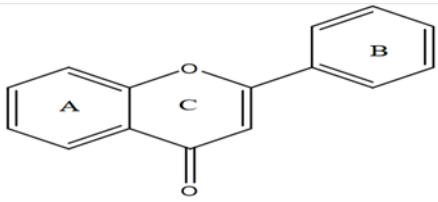
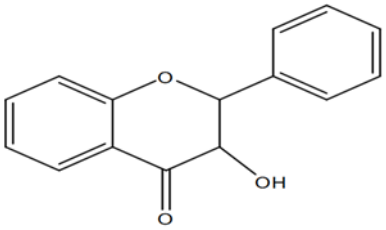
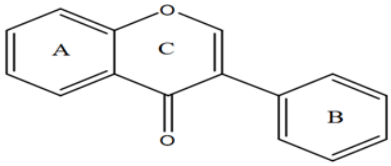
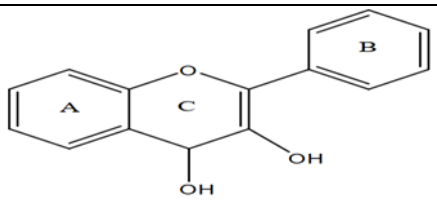
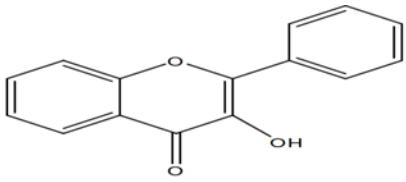
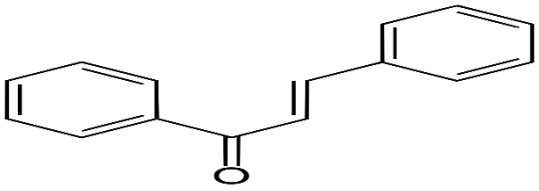


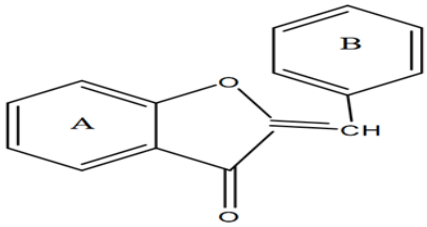
الشكل 9: الهيكل الأساسي للفلافونيدات.

2-2- تصنيف الفلافونيدات:

بنيويا تتفرع إلى عدة أنواع تبعا لعدد، موضع وطبيعة المستبدلات التي في الأغلب تكون عبارة عن مجموعات ميتوكسيل أو هيدروكسيل، الجدول التالي يوضح مختلف أقسام هذه المركبات.

جدول 5: بعض المركبات الفلافونيدية. [14]

البنية الأساسية	اسم المركب
	Flavanone
	Flavone
	Dihydroflavonol ou flavonol
	Isoflavone
	Flavo-3 , 4-diol
	Flavonol
	Chalcone

اسم المركب	البنية الأساسية
Aurone	

2-3- أهمية الفلافونيدات:

للفلافونيدات وظائف وادوار عديدة عند النبات منها الحماية ضد الاشعة فوق بنفسجية (UV) وضد الاكسدة وبعض الفلافونيدات مثل (الفلافونول، الفلافان) لها خاصية تثبيط الفطريات وأيضا لها أهمية في تلوين الأزهار والفواكه، وبعضها الأخر لها القدرة على منع انتشار الخلايا السرطانية. [15] [17]

2-4- خصائص الفلافونيدات:

الفلافونيدات وهي مركبات هيدروكسيلية ذات صفة حمضية ضعيفة، تذوب في القواعد القوية مثل: هيدروكسيد الصوديوم، قابلة للذوبان في الكحولات والأسيتون ومختلف المذيبات العضوية القطبية.

أما الفلافونيدات الأقل قطبية مثل: الإيزوفلافونات والفلافونولات، التي تحتوي على مجموعة ميثوكسيلية مستبدلة، فهي قابلة للذوبان في المذيبات العضوية غير قطبية كالكلوروفورم والأيثر. [18]

2-5- الكشف عن الفلافونيدات:

يمكن الكشف عن الفلافونيدات بالألوان المميزة التي تعطيها مع الكثير من الكواشف التي تستخدم في الدلالة على المركبات الطبيعية من بينها:

كلوريد الألمنيوم (5%): يعطي بقع صفراء في وجود المادة الفلافونيدية التي تحمل مجموعة هيدروكسيل في الموضع 5.

هيدروكسيد الصوديوم: يعطي بقع صفراء أو برتقالية مع جميع الفلافونيدات.

حمض الكبريت المركز: يعطي في وجود كل الفلافونيدات ألوان صفراء أو برتقالية. [19]

3- الجذور الحرة ومضادات الاكسدة:

3-1- الجذور الحرة:

3-1-1- تعريف الجذور الحرة:

الجذور الحرة هي أنواع كيميائية ذرات او جزيئات تملك إلكترون أو أكثر غير مزدوج، يكون معظمها شديد الفعالية (تتفاعل بسرعة) مع مركبات أخرى محاولة اقتناص ما ينقصها من إلكترونات لتصل الى الثبات الكيميائي، [20] كثير من التفاعلات البيولوجية تقوم بأكسدة مواد التفاعل بكون الأكسجين الجزيئي هو المستقبل النهائي للإلكترونات، الذي يدخل في تشكيل الأنواع الأكسجنية النشطة. [21]

3-1-2- أنواع الجذور الحرة:

3-1-2-1- التقسيم على أساس الاستقرار:

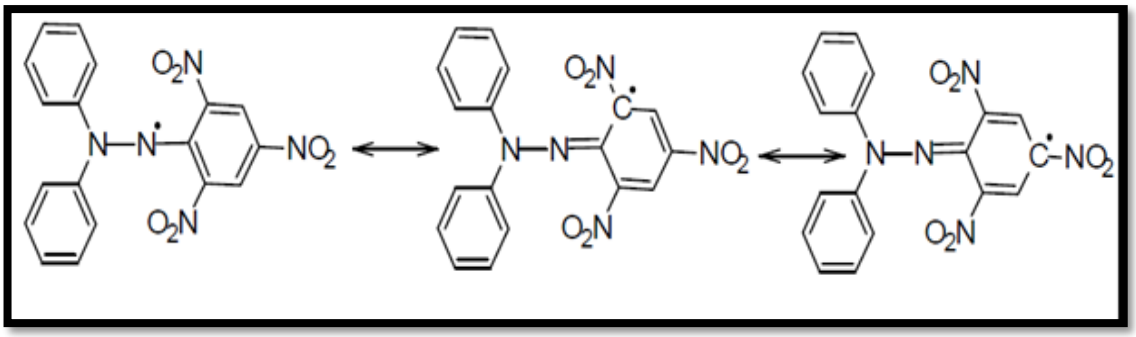
أ- الجذور الحرة النشطة أو غير المستقرة:

وهي التي تقدر أعمارها بالميكرو ثانية وتصل حتى بالبيكوثانية، يشمل هذا النوع الجذور ذات العناصر مثل: ذرات الهيدروجين والنتروجين والفلور، والكلور والبروم واليود والجذور التي لها وزن جزيئي صغير مثل: الميثيل(CH_3)، الإيثيل(C_2H_5)، الفنيل(C_6H_5) والهيدروكسيل(OH)، وطاقة تنشيطها تقترب من الصفر. [22]

ب- الجذور الحرة المستقرة:

وهي التي لها أعمار طويلة تقدر بالثواني أو الساعات او حتى أيام مثل جذور ثلاثي بكريل هايدرازيل (DPPH) فمحلول الجذر الأول يكون ذو لون أصفر ومستقرا بدرجة حرارة الغرفة لبعض ساعات، أما الجذر الثاني فيكون مادة صلبة ذات لون بنفسجي مسود ويكون مستقرا لعدة أيام.

ونستطيع القول بأن معظم الجذور الأروماتية التي تشتمل على تراكيب رنينية متعددة في تركيبها الجزيئي تكون مستقرة في أغلب الأحيان ويعزى استقرار هذا النوع من الجذور لعدم تمركز الإلكترون المنفرد بموقع معين في تركيب الجذر، وخير مثال على ذلك تمركز الإلكترون المنفرد بجذر DPPH. [23]



الشكل 10: البنيات الرنينية في جزيئة DPPH.

إن إزالة الجذور الحرة بواسطة مضادات الأكسدة مهمة جدا لصحة وحياة الكائن الحي ومع ذلك فالجذور الحرة ليست بمجرد مواد ضارة فحسب، لكنها قد تكون في بعض الأحيان بمثابة السلاح الذي يستخدمه الجسم للدفاع عن نفسه. [14]

3-1-2-2- التقسيم على أساس النوع:

يمكن تقسيمها الى جذور حرة أو جذور أكسجينية، جذور حرة نتروجينيه (أكسيد النتريك وثنائي أكسيد النتروجين) وجذور حرة دهنية. [24]

3-1-3- أضرار الجذور الحرة:

تخضع الخلية لظاهرة التوتر الأكسدي وهذا عندما لا تتمكن الأنظمة المضادة للأكسدة من مواجهة تدفق الأنواع الأكسيجينية المتكونة، مما يسبب ضرر واقع على الحامض النووي تؤدي أي طفرات مما ينتج عنها موت الخلايا او تسرطنها، وإما ضرر واقع على البروتينات والذي يؤدي إلى تغير طبيعة البروتينات ومن ثم وظيفتها او تحولها إلى اشكال جديدة مما يؤدي إلى أمراض المناعة الذاتية. [25]

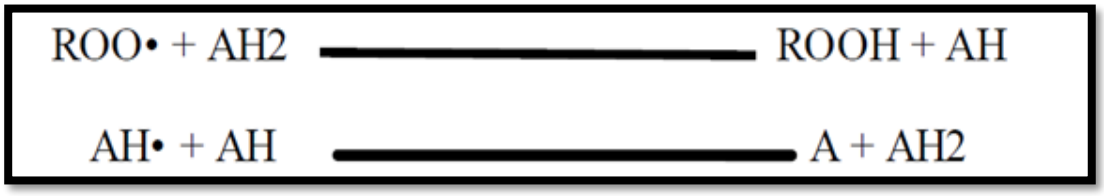
أما أخطر الأضرار هي التي تقع على مستوى الدهون، او الأكسدة الفوقية للدهون، ويشتمل على زيادة سيولة الجدران الخلوية وتطفر الحامض النووي ومن أضرارها أيضا تثبيط السلسلة التنفسية للميتوكندري، زيادة نشاط الإنزيمات المصاحبة لتوتر الأكسدة. [26]

3-2- مضادات الأكسدة:

3-2-1- تعريف مضادات الأكسدة:

هي مركبات إما ترتبط بالجذور الحرة فتعمل على تفويضها لتستقر وتمنع بذلك التأثير الضار الذي تلحقه بالجسم، إذ تعتبر نظاما دفاعيا ضد الضغط التي تسببه ذرات الأوكسجين الشاردة لحماية خلايا

الجسم، وإما لأنها تمنع تكوين الجذور الحرة او ان تصلح الضرر الناتج عنها أي هو عبارة عن مواد مانحة لذرات الهيدروجين أنها تتحد مع الجذر وتحوله الى مركب مستقر كما هو موضح في المعادلة التالية:



والدور الأساسي لمضادات الأكسدة هو كسر سلسلة التفاعلات الجذرية الناتجة من الاكسدة وتستطيع ان تعدل او تصلح الإتلاف الذي تسببه الجذور الحرة. [27]

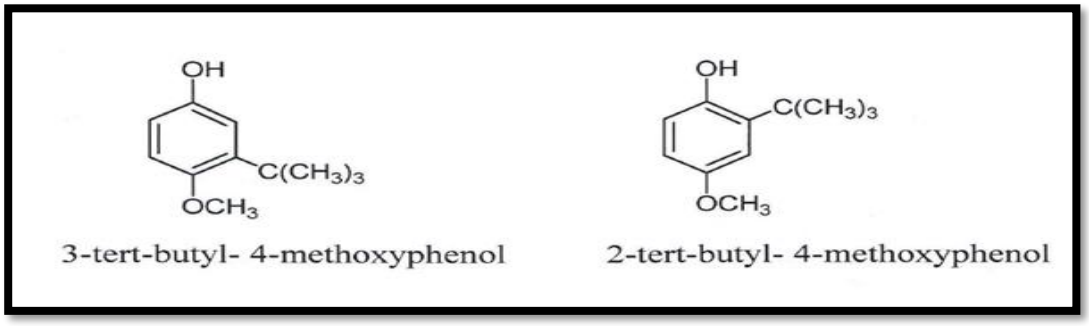
3-2-2- تصنيف مضادات الاكسدة:

3-2-2-1- مضادات أكسدة طبيعية:

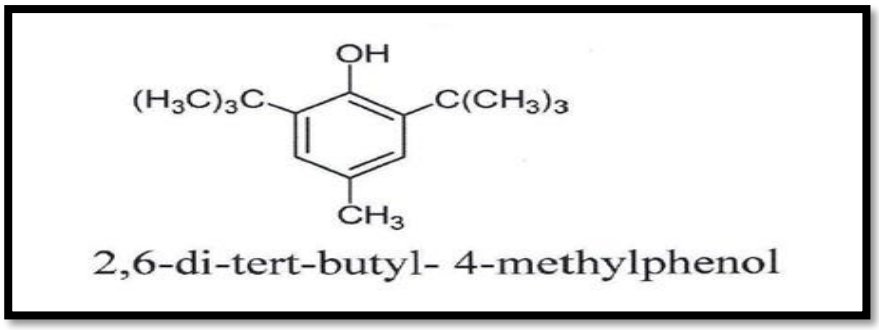
ونقصد بذلك ما تنتجه المادة الحية من مضادات كالإنزيمات الجلوتاثيون والكتلاز والبيروكسيداز والفيتامينات مثل: فيتامين C والفيتامين E وتتعداها إلى المعادن الطبيعية كالزنك والسيلنيوم وغيرها. [28]

3-2-2-2- مضادات اكسدة مصنعة:

تعتبر عنصر أساسي يجب إضافته للأطعمة المعلبة للتقليل من إفسادها إلى أقصى حد وذلك لتأكسدها قبل غيرها، وكذا تستعمل في الصناعة كصناعة المطاط والمشتقات البترولية منها: (BHA) Butylhdroxyanisoleو Butylhydroxytoluene (BTH) وحمض الغاليك والغالات. [23]



الشكل 11: يوضح بنية BHA.



الشكل 12: يوضح بنية BHT.

الشكل 13: يوضح بنية (GA).

المراجع

المراجع بالغة العربية:

[3] العابد إ.،2007 – دراسة العالية المضادة للبكتيريا و المضادة للأكسدة للمستخلص القلويدي الخام لنبات الضمران *Traganum nudatum* . مذكرة ماجستير في الكيمياء. جامعة قاصدي مرباح، ورقلة ص: 106.

[4] بوبطيمة ا.، 2012–مقارنة بين الطريقة الفيتو كيميائية والطريقة الإلكترو كيميائية في دراسة فينولات بعض نوى التمر المحلي. مذكرة ماستر أكاديمي. جامعة قاصدي مرباح. ورقلة ص: 97.

[6] بن سلامة ع. ا.، 2012–النشاطات المضادة للأكسدة والمثبطة للإنزيم المؤكسد للكزانثين لمستخلصات أوراق L. *Hertia cheirifolia*. مذكرة مقدمة لنيل شهادة الماجستير في البيوكيمياء. جامعة فرحات عباس. سطيف. ص: 90.

[7] جرموني م.، 2009– النشاطية المضادة للأكسدة لمستخلصات نبتة الخياطة *Teucrium polium* مذكرة لنيل شهادة الماجستير في البيوكيمياء و الفيزيولوجيا التجريبية. جامعة فرحات عباس. سطيف ص: 95.

[11] عابد هاجر2011 الفعل الوقائي للمستخلص الفلافونيدي من الإلتهاب النفروني المحرض بـ Paccetamol لدى الجرذان، مذكرة ماجستير، جامعة منتوري. قسنطينة ص:34.

[13] بن عشورة صبرينة البتول، الفعالية المضادة للأكسدة الزيوت الطيارة والمركبات الفينولية لـ Deverra scoparia مذكرة تخرج لنيل شهادة ماجستير في الهندسة الكيميائية، تخصص التحضير العضوي والفيتوكيمياء، جامعة قاصدي مرباح ورقلة. 2007.

[14] بن خناثة م.، 2014– المساهمة في دراسة نبات الكلخة *Ferula Vesceritensis* مذكرة تخرج لنيل شهادة ماستر أكاديمي، جامعة قاصدي مرباح. ورقلة. ص: 83.

[20] بو القندول ر.، 2011– الدور الوقائي لبعض المستخلصات الفلافونيدية ضد الالتهاب الكبدي المحرض بالباراسيتامول لدى الجرذان، أطروحة ماجستير. جامعة منتوري قسنطينة. ص: 93.

[22] بوقوادة م.، دراسة فيتوكيميائية للبيبيدات والفينولات في بعض أنواع التمر المحلي، مذكرة ماجستير، جامعة قاصدي مرباح. ورقلة. 2008.

[23] ربيعي ع. ك، المساهمة في دراسة الفعالية المضادة للأكسدة لمستخلصات بروبوليس جنوب الجزائر بالطرق الكيميائية والكهروكيميائية، مذكرة تخرج لنيل شهادة الماجستير، تخصص كيمياء تحليلية ومراقبة المحيط، جامعة قاصدي مرباح ورقلة (2010).

[24] ريدة ا.، 1999-الجذور الجرة جملة مضادات المؤكسدات وداء التهاب المفاصل الرثياني.مجلة جامعة دمشق، المجلد 15، العدد2.ص:1-6.

[26] مسعي م.أ، دراسة فيتوكيميائية للبيبيدات والفينولات لنوى خمسة أنواع من التمر المجني من منطقة ورقلة، مذكرة ماجستير ورقلة(2013).

[27] بوبلوطة ح.، 2009-النشاط المضاد للتأكسد وإمكانية وقاية المستخلث الميثانولي لنبتتي *Matricaria pubescens* و*Centaurea Incana* على السمية الكبدية. مذكرة ماجستير، جامعة متنوري قسنطينة. ص: 125.

[28] حوة إ.، 2013-دراسة الفعالية البيولوجية لبعض نبات العائلة الشفوية والفعالية ضد الاكسدة. مذكرة ماجستير في الكيمياء، جامعة قاصدي مرباح، ورقلة.ص:109.

المراجع بالغة الأجنبية:

[1] MOHAMMEDI Z ., 2013-Etude phytochimique et activités biologiques de quelques plantes médicinales de la région nord et sud-ouest de l'Algérie. Thése doctorat. Université Abou Bekre. 170p.

[2] ZEGHEB N., L'effet antibactérien de l'extrait flavonoidique de plante (Zygophyllum album.L). Mémoire de fin d'etude en vue de l'obtention du diplôme MASTER. Université Mohemed Khider Biskra. 73p.

[5] Aira. Activité anti-oxydante, et caractérisation phénolique du fruit de palmier amazonien Oenocarpus bataua (patawa). Thése pour le doctorat en phytochimis. Université des Antilleset de la Guyane, (2012).

[8] Harbone J.B biochemistry of phenolic compounds, academic press, london and newyork.

[9] BENHAMMOU N., 2012- Activité antioxydant des extraits des composes phénolique de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien. Thése doctorat. Université Aboubakar Belkaid. Tlemcen. 174p.

[10] Abdelghafour M, radioltse gamma des flavonoides. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools formation de depsides, Thése de doctorat (2003).

[12] Salah Eddine L., Etude phytochimique et activité biologique d'extrait de feuilles de Phoenix dactylifera L dans région du Sud d'Algérie (la région

d'Oued Souf), Thése présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en sciences Université Mohamed Khider Biskra (2014).

[15] ATHAMENA S., 2009- Etude quantitative flavonoides des grains de Cuminum cyminum et Les feuilles de Rosmarinus officinalis et l'evaluation de l'activité biologique. Mémoire présenté pour l'obtention du diplôme de Magister. Université El-Hadj Lakher Batna. 12p.

[16] Jean B., pharmacognnosie phytochimie plantes médicinales, 3 éme edition Technique et Documention, paris(1999).

[17] S, Fiorucis,. Activité biologique de composé de la famille des Flavonoides: Approche par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire se de doctorat de l'Université Nice 2006.

[18] BAHRI HANAA, ZOUZOU SALIHA (201-2011) Evaluation biologique des extrait issus des plants Ferula Vesceritensis et Devevra Scoparia, Mémoire DES, Université de Kasdi Merbah Ouragla, p: 11.

[19] El Hazimi, H (1995). Les produits Naturelles, Université du Roi Saoud, Djada.

[25] ANYASOR G., KAYODE O., 2010- Comparative Antioxidant, Phytochemical and Proximate Analysis of Aqueous and Methanolic Extracts of Vernonia amygdalina and Talinum triangulare. Pakistan Journal of Nutrition 9 (3).p: 259-246.

الفصل الثالث

عموميات حول البكتيريا

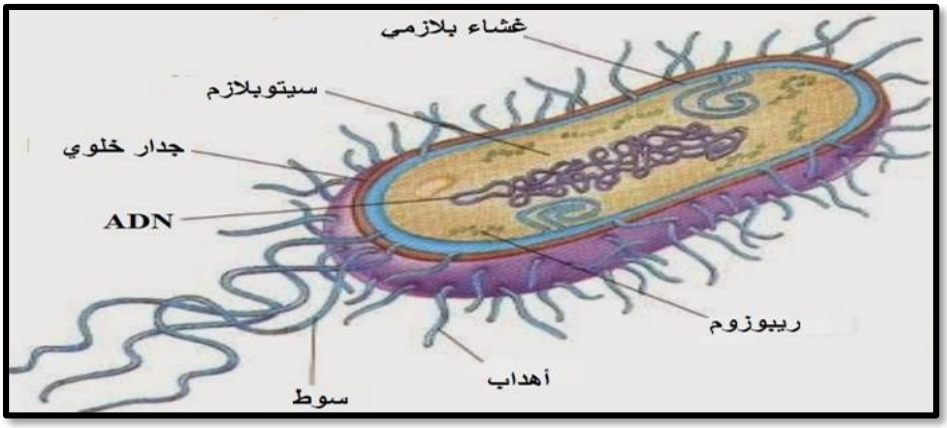
تمهيد:

المكروب هو وصف للكائنات المجهرية الدقيقة التي لا يمكن ملاحظتها إلا بالمجهر فهي تشمل الفيروسات والبكتيريا والفطريات والطحالب، فقد كان للمجهر الأثر الكبير في اكتشافها فهي موجودة في كل مكان حولنا في التربة في الهواء في الأغدية وداخل وخارج أجسامنا حيث أن الكائنات الدقيقة تعتبر أكثر عددا من الكائنات الحية إذ ما قورنت بالكائنات الأخرى، حيث ان اول من اكتشف البكتيريا العالم الكيميائي الفرنسي لويس باستور (Louis Pasteur) في عام 1859 فقد اكتشف البكتيريا الهوائية واللاهوائية من خلال تجاربه على التخمر، واكتشف أيضا طعمها، حيث أرتبط اسمه بعملية البسترة لقتل الكائنات الحية المجهرية المتواجدة في السوائل.

أما العالم الألماني روبرت كوخ Robert Koch فقد عمل على اكتشاف علاقة البكتيريا بالمرض وهو أول من عمل مزارع نقية للبكتيريا. حيث ارتبط اسم البكتيريا مع الامراض المسببة لها إلا ان العلوم الحديثة اثبتت ان البكتيريا تلعب دورا هاما في الصناعات الغذائية والدوائية والتخلص من المواد العضوية وغير العضوية. [1] [2]

1- تعريف البكتيريا:

هي عبارة عن كائنات دقيقة الحجم لا ترى إلا بالمجهر أحادية الخلية بدائية النواة (Procaryote) تكون إما كروية او عصوية او حلزونية حيث يتراوح طولها بين الميكرو متر الواحد الى بضعة أعشار الميكرو متر، [3] حيث انها تستطيع العيش لأعوام طويلة وتتحمل جميع الأحوال غير المناسبة من ارتفاع درجة الحرارة الى انخفاضها وغيرها من الظروف القاسية وعند تحسن ظروفها تتخلص من الغشاء السميك وترجع كما كانت في السابق. [4]



الشكل 14: يمثل بنية البكتيريا

2- تركيب الخلية البكتيرية:

تتركب الخلية البكتيرية من اربعة أجزاء أساسية وهي:

جدار خلوي.

غشاء بلازمي.

سيتوبلازم.

النواة.

وأربعة أجزاء غير ضرورية لحياة البكتيريا وهي:

البذور.

الاسواط

الحافظة.

الهدبيات.

الأجزاء الأساسية:

2-1- الجدار الخلوي:

وهو الذي يعطى للخلية النباتية شكلها الثابت والمميز، كما انه يقوم بحماية محتويات الخلية الداخلية ويتركب الجدار من مادتين هما مادة الكربوهيدرات والبيبتيدات

2-2- غشاء بلازمي:

وهو غشاء رقيق جدا مكون من دهون وبروتينات، وظيفته المشاركة في عملية الانقسام، ويتميز بخاصية النفاذية الاختيارية ويحتوي على كثير من الإنزيمات الهامة مثل إنزيم التنفس وذلك لعدم احتواء الخلية البكتيرية على الميتوكوندريا.

2-3- السيتوبلازم:

يتكون من خليط معقد من مواد بروتينية وكربوهيدراتية ودهون وأحماض أمينية واملاح وفيتامينات، وتوجد هذه المواد مذابة في الماء أو معلقة فيه ووظيفة السيتوبلازم انه مركز العمليات الحيوية بالخلية ويتكون حوالي% 85 من وزنه ماء و15% مواد صلبة كما يحتوي السيتوبلازم مواد غذائية مدخرة.

وأيضا توجد بها حبيبات من مادة ARN تعرف بالريبوزومات، وظيفتها تكوين البروتينات سواء كانت تركيبة أو وظيفية مثل الإنزيمات والهرمونات، وكذلك يوجد بها حبيبات مكونة من ADN تحمل صفات (جينية) معينة وتعرف بالبلازميدات.

2-4- النواة:

النواة في البكتيريا نواة بدائية توجد مغموسة في السيتوبلازم وتتكون من خليط من الحامض النووي (ADN) ولكنها لا يوجد لها غلا ف نووي ولا تحتوي عصير نووى. [5]

دورة حياة الخلية تتركز في استمرارية انقسامها، حيث حوالي كل 20 دقيقة نتقسم الخلية البكتيرية لإعطاء خليتين جديدتين فخلال ساعات تعطي خلية بكتيرية واحدة الملايين من الخلايا، واغلب البكتيريا تتكاثر بطريقة الانشطار الثنائي.

وأيضا لدرجة الحرارة تأثير على بقاء وتكاثر البكتيريا، فمنها من تعيش في درجات الحرارة المنخفضة ومنها من تعيش في درجات الحرارة العالية بالإضافة إلى ان pH المثالي لنمو البكتيريا هو في حدود pH=7 وإن الأوساط التي تكون غنية بالماء والرطوبة تعتبر وسط جيد لتكاثر البكتيريا. [6]

3- تسمية البكتيريا:

تأخذ البكتيريا أسماء ثنائية Binominal بحيث يشير المقطع الأول من الاسم إلى الجنس والمقطع الثاني إلى النوع. وقد يحمل اسم الجنس شكل البكتيريا، كما هو الحال في Staphylococcus، Streptococcus او اسم المكتشف مثل E. coli.

أما بالنسبة للنوع فقد يشير إلى المرض كما هو الحال (Cholerae) (Vibrio Cholerae)، أو مكان عزلها كما هو الحال في E. coli تعزل في une Cole أو قد يحمل صفات اللون مثل Staphylococcus aureus (aureus أي ذهبية). [7]

4- أساس تصنيف البكتيريا:

تختلف البكتيريا في قدرتها على استعمال مصادر الطاقة وإنتاج الغازات (CO_2 الناتج من الغلوكوز)، وفي إفراز السموم والإنزيمات، وأيضا تختلف من حيث البنية وشكل الخلايا والقدرة الإمراضية، وكذلك حساسيتها للمضادات الحيوية. هذه الاختلافات أظهرت طرقا حيوية متعددة لتميز البكتيريا.

إن الهدف الأساسي من تصنيف البكتيريا هو التعرف على أنواع مختلفة من البكتيريا وتشخيصها ووضع أسمائها في مجموعات لدراسة كل من العلاقة فيما بينها وطبيعتها الوراثية، حيث تم تصنيفها كالتالي:

4-1- من حيث شكل البكتيريا: [8]

البكتيريا الكروية: وهي البكتيريا التي تأخذ شكل الكريات الصغيرة، حيث يتراوح قطرها 0.1 nm إلى 4nm ولها عدة أشكال منها كروية متجمعة بشكل سبحة (بكتيريا سبحية)، وبكتيريا كروية عنقودية.

البكتيريا العصوية: وهي البكتيريا التي تأخذ شكل العصيات صغيرة

البكتيريا الحلزونية: وهي البكتيريا التي تأخذ شكل حلزوني.

البكتيريا الواوية: وهي البكتيريا التي تأخذ شكل الواو.

4-2- من حيث توزيع اسواطها: [8]

وحيدة السوط (monotrichous): التي يخرج سوط واحد من أحد قطبي الخلية البكتيرية.

سوطية الطرف (lophotricous): وفيها تخرج حزمة سوطية من قطب واحد في الخلية البكتيرية.

سوطية الطرفين(amphitrichous): وهي التي يخرج سوط واحد أو حزمة سوطية من كل قطب من أقطبي الخلية البكتيرية.

محيطة الأسواط (eritrichous): وفيها تنتشر الأسواط من جميع اتجاهات جول سطح الخلية البكتيرية.

4-3- من حيث الوسط الذي تعيش فيه: [4]

فيمكن تقسيمها إلى ثلاثة أنواع.

بكتيريا هوائية(Aerobic): وهي البكتيريا التي تعيش فقط في وجود الهواء الجوي حيث تعتبر المصدر الرئيسي لتسمم الأغذية.

بكتيريا لاهوائية (Anaerobic): وهي البكتيريا التي تعيش في غياب الهواء الجوي.

بكتيريا لاهوائية اختيارية (Facultative Anaerobic): وهي البكتيريا التي تستطيع العيش في وجود الهواء الجوي أو عدمه.

4-4- من حيث التغذية:

بكتيريا ذاتية التغذية: هي البكتيريا التي تستهلك الكربون للنمو.

بكتيريا عضوية التغذية: هي البكتيريا التي تحصل على الكربون من تحليل المواد الذاتية كالسكر.

4-5- من حيث طريقة التلوين: [9] [10]

يفسر الاختلاف بين البكتيريا في تركيب جدار الخلية بالتلوين، حسب تقنية غرام Gram نسبة للعالم البلجيكي J.Gram المكتشفة سنة 1884، حيث قسمت إلى نوعين:

بكتيريا (G^+): عند تلوينها تمتص اللون وتظهر ارجوانية

بكتيريا(G^-): لا تمتص أو قليلة الامتصاص للون وتحرر صبغا وتظهر حمراء.

يظهر جدار الخلية(G^+) أسمك من جدار الخلية(G^-) التي بدورها تحتوي على غشاء خارجي إضافي.

4-6- من حيث أثرها على الإنسان:

يمكن تقسيمها إلى ثلاثة أنواع:

4-6-1- بكتيريا نافعة (Bénéficial Bactérie):

وهي التي تقدم للإنسان والحيوان خدمات نافعة، يوجد نوع من أنواع البكتيريا يعيش في أمعاء الإنسان وتساعده على عملية الهضم وتفرز بعض المواد المفيدة للجسم، وهناك نوع آخر يعيش في التربة، ويلعب دورا هامها في غذاء النبات وتستعمل الأنواع الأخرى في صناعة منتجات الألبان وبعض الأدوية. [2] [11]

4-6-2- بكتيريا انتهازية (Opportunistic Bactérie):

وهي بكتيريا تعيش في جسم الأنسان بدون أن تسبب له أي ضرر أو أذى ألا عند نقص مناعة الانسان، متحولة إلى بكتيريا ضارة تسبب العديد من الأمراض مثل التهاب اللوزتين.

4-6-3- بكتيريا ضارة (Bactéries nocives):

وهي بكتيريا تهاجم جسم الانسان مسببه له الأمراض متفاوتة الخطورة مثل: الكوليرا، التيفويد والسل. [4]

5- البكتيريا المستعملة في الدراسة:

Escherichia coli

Pseudomonas aerogenosa

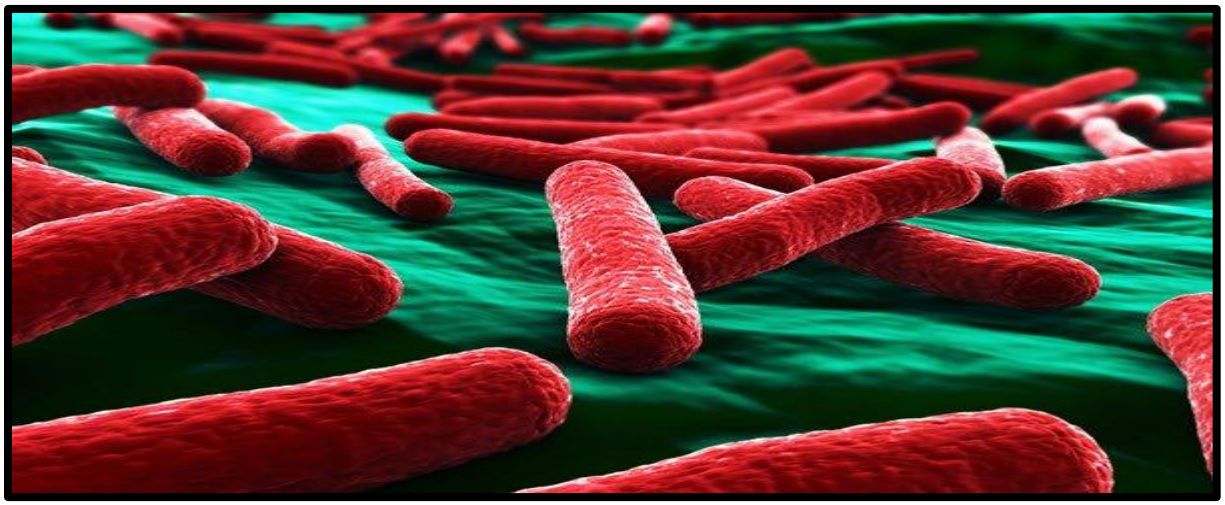
Staphylococcus aureus

5-1- بكتيريا *Escherichia Coli*:

هي بكتيريا موجودة في الجهاز الهضمي للإنسان او الفضلات الحيوانية، (G^-) عصوية الشكل ذات أبعاد من 1µm الى 3µm ،سالبة غرام (G^-)، تتكاثر بسرعة عند درجة حرارة 37° تمتاز بأنها تنتج كمية CO_2 مساوية لكمية الـO_2 تؤدي الى تحميض اللبن وبالتالي تخثره. إضافة إلى تسببها لعدة أمراض: كأمراض الجهاز التنفسي، التهاب الزائدة الدودية، التهاب القلب، الإسهال الطفيلي، وتتسبب في ارتفاع شديد في درجة الحرارة عند انتشارها في الدم. [12] [13]

جدول 6: تصنيف البكتيريا *E.Coli* [4]

Bactérie	المملكة
Proteobactérie	التصنيف
Gammaproteobacteria	القسم
Enterobacteriales	الرتبة
Enterobacteriaceae	العائلة
Escherichia	النوع
Escherichia coli	الصنف



الشكل 15: صورة بالمجهر الإلكتروني لبكتيريا *E. Coli*

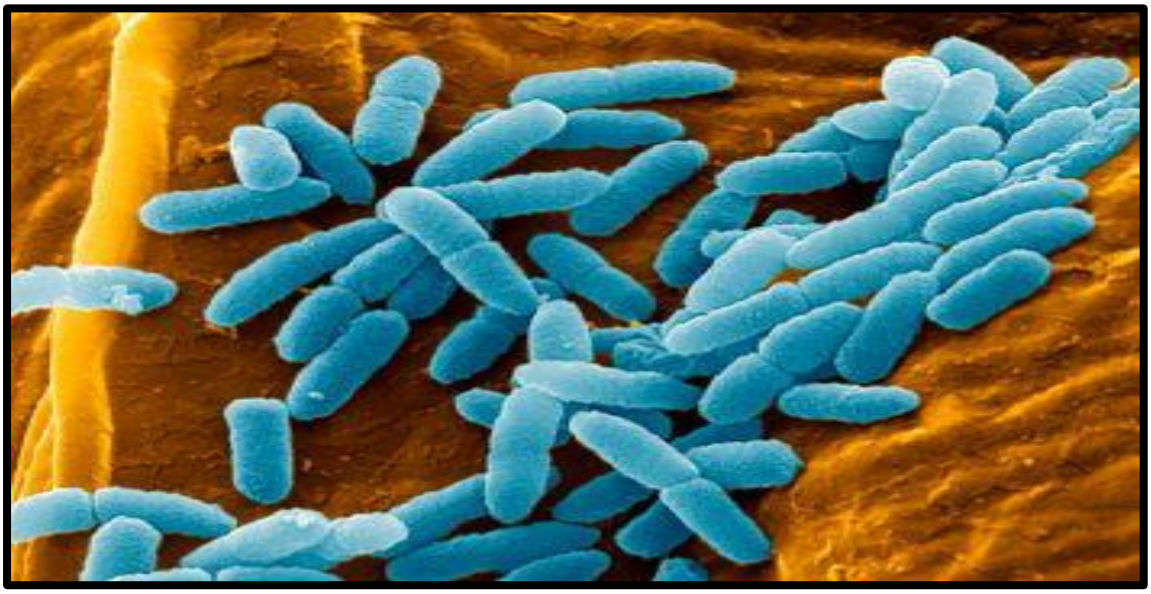
5-2- بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa*:

هذه البكتيريا من نوع G^+ متحركة هوائية، وعبارة عن عصيات مستقيمة بأسواط طرفية، وهي من أقوى أنواع البكتيريا المقاومة طبيعيا لمعظم المضادات الحيوية، وذلك لامتلاكها القدرة على التصدي لهذه المضادات بعدة طرق، مصدرها الجهاز الهضمي للإنسان، الماء أو التربة، تعمل هذه البكتيريا على الإتلاف السطحي للأغذية المبردة ومحللة للدهون الموجودة في اللبن مما يؤدي إلى تغير لونه وطعمه، كما ترتبط هذه البكتيريا بحالات العدوى المكتسبة في المستشفيات خصوصا في غرف العمليات الجراحية، وهي أيضا تنمو في نطاق حراري واسع ما بين 34 الى 43 ويبلغ عرضها 0.5µm إلى 1µm أما طولها ما بين

1.5um إلى 4 um، تعتبر ممرضة للإنسان والحيوان حيث تسبب تعفن كل من العين والحروق والجروح كما تسبب أمراض الرئتين والسحايا. [14] [15]

جدول 7: تصنيف البكتيريا *P. aeruginosa* [4]

Bactérie	المملكة
Pseudomonabactéries	التصنيف
Gammaproteobacteria	القسم
Enterobacteriales	الرتبة
Enterobacteriaceae	العائلة
Pseudomonas	النوع
Pseudomonas aeruginosa	الصنف



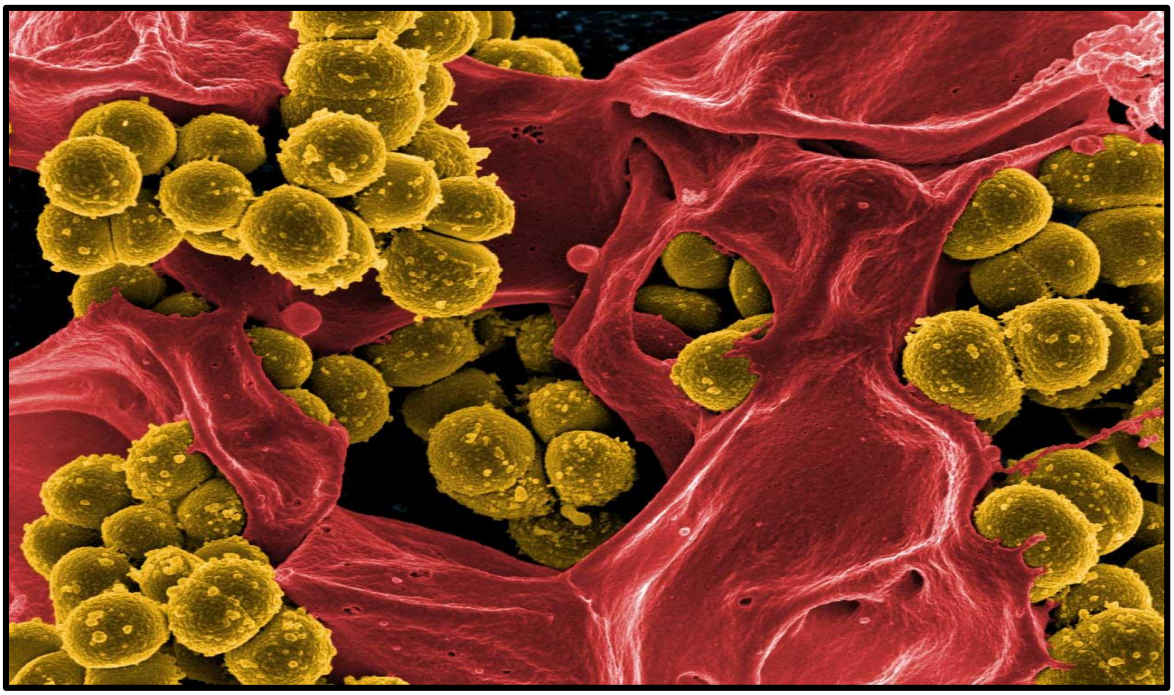
الشكل 16: صورة بالمجهر الإلكتروني لبكتيريا *P. aeruginosa*

5-3- بكتيريا *Staphylococcus aureus*:

هي بكتيريا كروية الشكل ذات لون أصفر براق عديمة الحركة تكون على شكل عناقيد مكومة من النوع G^+ قطرها حوالي 1µm تتواجد عند الإنسان في الجلد والأمعاء والجهاز التناسلي وعلى الوجه تنمو بالتنفس الهوائي أو التخمر وهي مسؤولة عن تشكل الصديد، مسببة للعديد من الأمراض من بينهم التهابات جلدية خطيرة التهاب الرئتين وتسمم الدم وغيرها. [16] [17]

جدول 8: تصنيف البكتيريا *S. aureus* [4]

Bactérie	المملكة
Firmicutes	التصنيف
Bacilli	القسم
Bacillales	التربة
Staphylococcaceae	العائلة
Staphylococcus	النوع
Staphylococcus aureus	الصنف



الشكل 17: صورة بالمجهر الإلكتروني لبكتيريا *S. aureus*

6- المضادات الحيوية:

6-1- تعريف المضادات الحيوية:

وهي عبارة عن مركبات كيميائية عضوية تتكون نتيجة للتفاعلات الأيضية لبعض الأحياء الدقيقة، والتي تكون ذات فعالية انتقائية على الدقائق العضوية الممرضة تحت تراكيز ضعيفة، فهي تستطيع إيقاف وتثبيط نموها وتكاثرها وتسمى البكتيريوستاتيك.

وتستعمل المضادات الحيوية حاليا كنوع من المواد الكيميائية الطبيعية العلاجية لعلاج الكثير من الأمراض الميكروبية [18] [19] [20]

6-2- أنواع المضادات الحيوية:

تنقسم المضادات الحيوية الى قسمين:

مضادات حيوية كابحة لنشاط الخلية البكتيرية: يمنع تكاثرها وهو ما يساعد على القضاء عليها.

مضادات حيوية قاتلة للخلية البكتيرية: إما عن طريق التأثير على جدار خليتها، أو التسبب في انتفاخ خليتها وانفجارها، أو حتى بمنع تكوين البروتين داخل الخلية. [20]

6-3- طرق تأثير المضادات الحيوية:

6-3-1- مضادات تعمل على إيقاف نسخ ADN:

من بين الأسباب التي تسببها المضادات الحيوية اضطراب عمل ADN مما يمنع الخلية من الانقسام وتكوين الإنزيمات الخاصة بذلك.

6-3-2- مضادات تعمل على تخريب بنية الغشاء الستيوبلازمي:

بعض المضادات الحيوية تؤثر على هندسة Apidoprotine لهذا الغشاء وتحللها مما يؤدي الى فقد السيتوبلازم الكروموزومي. [21]

6-3-3- العمل على الغشاء الداخلي للبكتيريا:

المضاد الحيوي له خواص سطحية التي تمكنه من تخريب عمل نفاذية الغشاء الداخلي، ويسمح بطرد المواد السائلة خارج البكتيريا وهذا ما يدمرها. [22]

6-3-4- العمل على الغشاء الخارجي للبكتيريا:

المضاد الحيوي يوقف تركيب الجدار بتثبيط transpeptidase هذا ما يمنع تركيب peptidoglycane وهذا ما يوقف نموها وعملها. [22]

7- المقاومة البكتيرية:

7-1- تعريف المقاومة:

ظهرت المقاومة البكتيرية مباشرة بعد بداية استعمال المضادات الحيوية ضد الامراض المعدية، وقد أصبحت أمرا مستعصيا على الأطباء لأنها في تطور مستمر ونقول عن البكتيريا أنها مقاومة إذا كانت تستطيع النمو والتكاثر في وجود نسبة المضاد الحيوي تفوق النسبة المعتادة وهي نوعان:

مقاومة طبيعية.

مقاومة مكتسبة. [23]

7-2- طرق التعرف على حساسية أو مقاومة البكتيريا للمضاد الحيوي:

7-2-1- طريقة التمديد:

تعتمد على إجراء تخفيف متدرج للمضادات الحيوية في أنابيب اختبار او تخفيف الآجار في الاطباق ثم يزرع الميكروب، ويتم تحديد اقل جرعة مثبطة لنمو الميكروب CMI وبالطبع المضاد الحيوي ذو أقل CMI هو الذي يتم اختياره بعد النظر في ظروف المريض.

7-2-2- طريقة الانتشار:

وهي أسهل ولكنها أقل دقة، تتم بفرد كمية ثابتة من البكتيريا على سطح الآجار ومن ثم وضع أقراص المضادات ذات تركيز معلوم وتحضن مقلوبة لمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة 37 م°، هي الأكثر استعمالا في المستشفيات لتشخيص الأمراض المعدية، و يكون الوسط المستعمل صلبا من أهم الأوساط و أكثرها تداولا الوسط الجيلوزي مثل وسط Muller Hinton .

يحضر الوسط الجيلوزي بصبه في علب بيتري، من ثم تزرع البكتيريا على الوسط بطبقة مجانسة وتترك لتجف وبعد ذلك توضع أقراص الاختبار المشبعة بالتراكيز المختلفة للمضاد الحيوي المراد اختبار فعاليته، تؤخذ العينة بعد ذلك للحاضنة وتحضن العينة مقلوبة لمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة37 م°. [24]

المراجع

المراجع بالغة العربية:

[1] بابا عربي الياس، دراسة بعض املاح الفسفونيوم ودراسة فعاليتها البيولوجية على بعض أنواع من البكتيريا عند مزجها مع البنيسلين V، مذكرة التخرج لنيل شهادة الماجستير، تخصص كيمياء عضوية تطبيقية، جامعة قاصدي مرباح ورقلة(2009).

[2] لبوزم.2012–الدراسة الفيتو كيميائية لنبتة Rhetinolepis lonadioides Coss (الزيوت الطيارة والليبيدات). مذكرة ماستر أكاديمي، جامعة قاصدي مرباح ورقلة ص:80.

[4] حوة إ.، 2013–دراسة الفعالية البيولوجية لبعض نبات العائلة الشفوية والفعالية ضد الاكسدة. مذكرة ماجستير في الكيمياء، جامعة قاصدي مرباح، ورقلة.ص:109

[5] مجلة العلوم، تحديات المقاومة البكتيرية،15 العدد 10 أكتوبر/تشرين الأول(1999).

[6] العابد إ.،2007 – دراسة العالية المضادة للبكتيريا و المضادة للأكسدة للمستخلص القلويدي الخام لنبات الضمران *Traganum nudatum* . مذكرة ماجستير في الكيمياء. جامعة قاصدي مرباح، ورقلة ص: 106

[9] أبو الذهب م.، الكشير ح.، القزاز س.، عاية ش.، 1997 البكتيريا. دار المعارف. الجزء الأول. ص:20

[21] د. عادل نوفل، جامعة دمشق، كتاب الكيمياء الصيدلانية (الجزء النظري)، (1981).

[22] تامة ن د.،2007 – تحضير ودراسة التفاعلية الكيميائية لمشتقات الالكيليدين بيتونوليد وفعاليته البيولوجية. مذكرة تخرج لنيل شهادة الماجستير. جامعة قاصدي مرباح ورقلة ص:39–40

المراجع بالغة الأجنبية:

[3] PARRENO K., 2013– Development and assessment of pomegranate (Punica granatum.L) derived food produts. Rich in bioactive phytochemicals. Thése doctora.

[7] J.P.Euzeby: Abrégé de Bactériologie Générale et Médicale, à l'usage des étudiants de l'école Nationale Vétérinaire de Toulouse Courriel CV SBSV Peseudomonas.

[8] Courvalin.P .Interpretative reading of antimicrobial susceptibilitiy testes.(1992).

[10] Leclere, H. Izard D., Husson M.O., Watter P,. Jakbezak E.. Microbiologie générale Nouvelle édition. Doin édition-paris (1983).

[11] P. Munro, G. Flatau, E. Lemichez. Bacteria and the ubiquity pathway.(2007).

[12] D. Anthony, M.D.Harris, J.A.Johnson,P.J Glenn, J.K. Johnson, P.Bali more. Haw important is pqtient-transmission is extended – spectrum β-lactamase Escherichia-coli acquition. (March 2007).

[13] MELLIES J., BARRON A., CARMONA A., 2007- Enterpathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence gene regulation. Infection and Immunity. p:4199-4210.

[14] J.N. Joffin, C. Schuter. Pseudomonas et apparentés ou bactéries gram négatif aérobies strictes (2003).

[15] POOL K., 2001- Multidrug effux pumps and antimicrobial resistance in Pseudomonas aeruginosa and releted organisms. *J.* MOL. Microbiol. Biotechnol. (2001)3(2):255-264.

[16] ADEGOKE A., KOMOLAFE A., 2009- Multidrug resistant Staphylococcus aureus in clinical cases in Ile-Ife, Southwest Nigeria. International Journal of Midicine and Medical Sciences. Vol. 1 (3), p: 68-72.

[17] Staphylococcus, Un article de Wikipédia, l'encylopédie libre. (Juillet 2007).

[18] Zhang J. Synthéses of Phophinic Acide and Aza β and γ-lactams as Potential Inhibitors of D, D-Peptidqses and β-lactamases. These of doctor at University Catholique de Louvain (2003).

[19] Solensky R., Earl HS., Gruchalla RS... Lack of penicillin resensitization in patients with a history of penicillin allergy after receiving repeated penicillin courses. Arch Intern Med (2002).

[20] Corvaglia A.R.. Role résidus d'antibiotique dans environnements hydrique sur la sélection et la diffusion de bactéries résistantes des genres Aeromonas, Acinetobacter et Legionella. Thése de doctorat l'Université de Genéve(2006).

[23] J. Seignalet. Alimentation et Spondylarthrite. Polyarthrite rumatoide et bactéries intestinales (2005).

[24] V. Gurin-Faublée, C. Carrt. L'antibiogramme : principes, méthodologie, intérêt et limites. Journées nationales GVT – INRA. (1999)P:5-12.

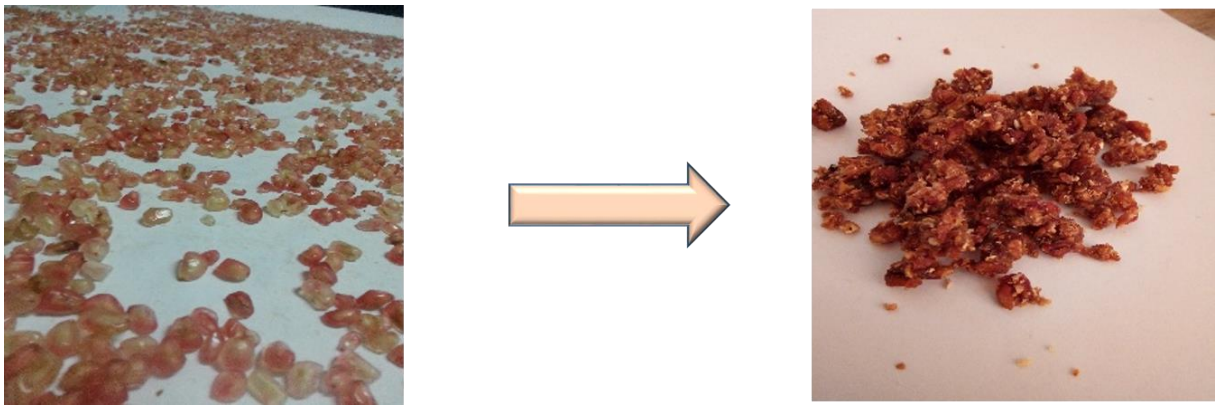
الفصل الرابع
الأجهزة والطرق

تم العمل على مستوى مخابر العلوم الدقيقة ومخبر تثمين وترقية الموارد الصحراوية (VTRS) في جامعة الشهيد حمة لخضر بالوادي.

1- جني عينات ثمار نبات الرمان:

النبات المستعمل في هذه الدراسة هو نبات الرمان *Punica granatum.L* الذي تم الحصول عليه من مزرعة شعر إبراهيم التي تقع بمنطقة زقب (بلدية قمار) بعد فصل القشر عن الحب وبجمع الحب وتجفيف في الظل وبعيدا عن الرطوبة للحفاظ عن المواد الفعالة الموجودة فيه من 2016/11/07 الى غاية 2017/01/17.

بعد التجفيف يتم طحن الحب بواسطة هاون للحصول على مسحوق شبه ناعم يحفظ داخل علب في مكان بارد وجاف للاستعمال لاحقا في العمل.



الشكل 18: العينات قبل وبعد الطحن

2- الأجهزة و المواد المستعملة :

2-2- المواد المستعملة :

ايثانول 80% (CH_3-CH_2-OH) (96%).

ماء مقطر.

كاشف فولين (Réactif de Folin-Ciocalteau) ($3H_2O-P_2O_513WO_35MoO_310H_2O$)

محلول كربونات الصوديوم(Na_2Co_3) (99.8%)(M=105.99g/mol).

محلول ثلاثي كلوريد الالمونيوم ($AlCl3,H_2O$)(97%)(M=241.43g/mol).

موليبدات الالمونيوم Molybdate d'ammoniom.

حمض الغاليك ($C_7H_6O_5,H_2O$)، (99%).

حمض الأسكوربيك (acide ascorbic)، ($C_6H_8O_6$)، (99%).

الروتين ($C_{27}H_{30}O_{16}$)، (97%)، (M=664.58g/mol).

حمض الكبريتيك (H_2SO_4)، (98%).

فوسفات الصوديوم ($NaPO_4$)

DPPH ذو النقاوة (99%).

. DMSO

gélose nutritive.

الماء الفزيولوجي.

2-3- الأجهزة المستعملة:

ميزان الكتروني حساس.

مخلاط مغناطيسي.

جهاز المبخر الدوراني Rotavapeur.

جهاز مطيافية الاشعة الفوق البنفسجية –المرئية UV-Visible.

معقمة Autoclave.

حاضنة.

3- تعريف الاستخلاص :

الاستخلاص هو سحب العامل النشط أو المادة النقية من مواد صلبة أو سائلة إن كان صلب يسمى إستخلاص سائل–صلب وإن كان سائل يسمى إستخلاص سائل–سائل، في هذه الدراسة سيتم الاعتماد على استخلاص سائل –صلب الذي له عدة أشكال ترتبط بعوامل مختلفة.

3-1 استخلاص سائل- صلب :

3-1-1- استخلاص على البارد (بالنقع):

تعتمد هذه الطريقة على وضع المادة الخام داخل إناء يحتوي على كمية محددة من المذيب ، بحيث يكون حجم المذيب المستعمل يغطي المادة الخام بنسبة تقريبية قدرها (المذاب 1V /المذيب 3V) في الظروف العادية (ضغط ودرجة حرارة الغرفة) مع التحريك من حين إلى لإخر، تترك مدة زمنية معينة، خلالها يتم

إنتقال المركبات المراد فصلها من المادة الخام إلى المذيب، تتبع عملية الفصل بعملية الترشيح لنزع الشوائب وترسبات الحب المطحون. وطبعا تنستعمل طريقة النقع للمواد التي تتأثر و تتفكك بالحرارة .

3-1-2- الإستخلاص على الساخن:

هذه الطريقة سريعة نسبيا عن سابقتها ،حيث يتم غمس المادة الخام في المذيب مع التسخين، ونستعمل هذه الطريقة للمواد التي لا يمكن إستخلاصها إلا تحت درجة حرارة عالية ولا تتأثر بإرتفاعها. [1] [2]

4- تحضير المستخلصات المستعملة في الدراسة:

والمتمثلة في كل من المستخلص المائي والمستخلص المزيج (ايثانول+ماء) المحضر عن طريق النقع والمستخلص الإيثانولي المحضر عن طريق الغليان لكل من حبوب الرمان الحلو والحامض فنتحصل على ست مستخلصات نستعملها في دراسة.

4-1- تحضير المستخلص المائي بالنقع:

بواسطة الميزان الالكتروني نزن كتلة من الحبوب قدرها 20g نضعها في بيشر ونضيف لها 200ml من الماء المقطر ونقوم بتغطيت البيشر بورق البرافيلم ونضعها فوق مخلاط مغناطيسي لمدة 24 سا لغرض النقع. بعد ذلك نرشح المستخلص باستعمال ورق الترشيح Whattmanو توضع رشاحة المادة المستخلصة في جهاز المبخر الدوراني Rotavapeur حتى نتحصل على مستخلص ذو قوام سميك.

4-2- تحضير المستخلص الإيثانولي المائي(مزيج) بالنقع:

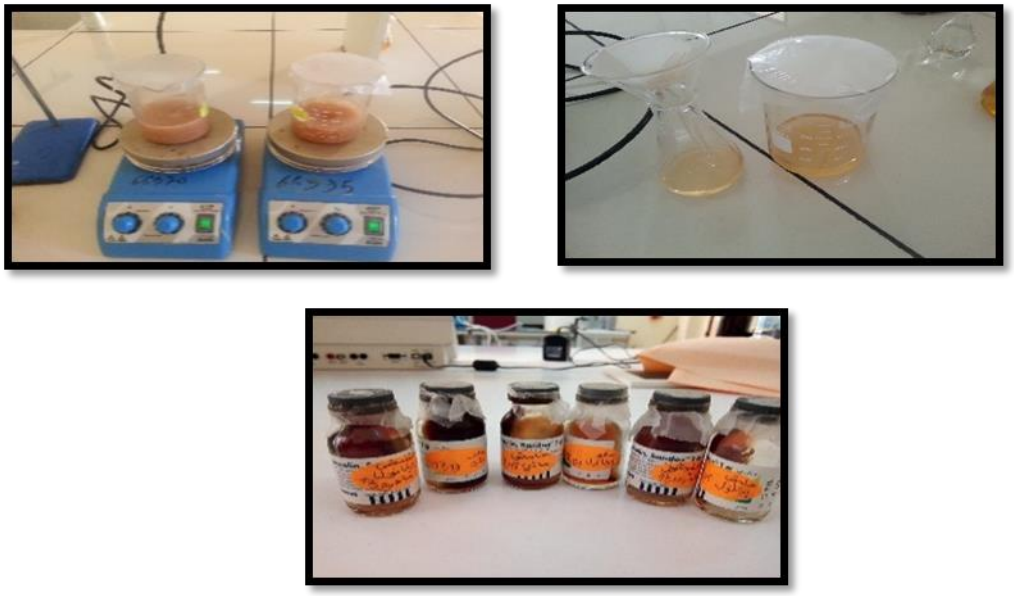
بواسطة الميزان الالكتروني نزن كتلة من حبوب الرمان قدرها 20g نضعها في بيشر ونضيف 40ml من الماء المقطر و160ml من الإيثانول بنسبة حجمية (8-2)ونقوم بتغطيت البيشر بورق البرافيم ونضعها فوق مخلاط مغناطيسي لمدة 24 سا لغرض النقع. ثم نقوم بترشيح المستخلص باستعمال ورق الترشيح Whattman وتوضع أيضا رشاحة المادة المستخلصة في جهاز المبخر الدوراني Rotavapeur حتى نتحصل على مستخلص ذو قوام سميك.

4-3- تحضير المستخلص الإيثانولي بالغليان:

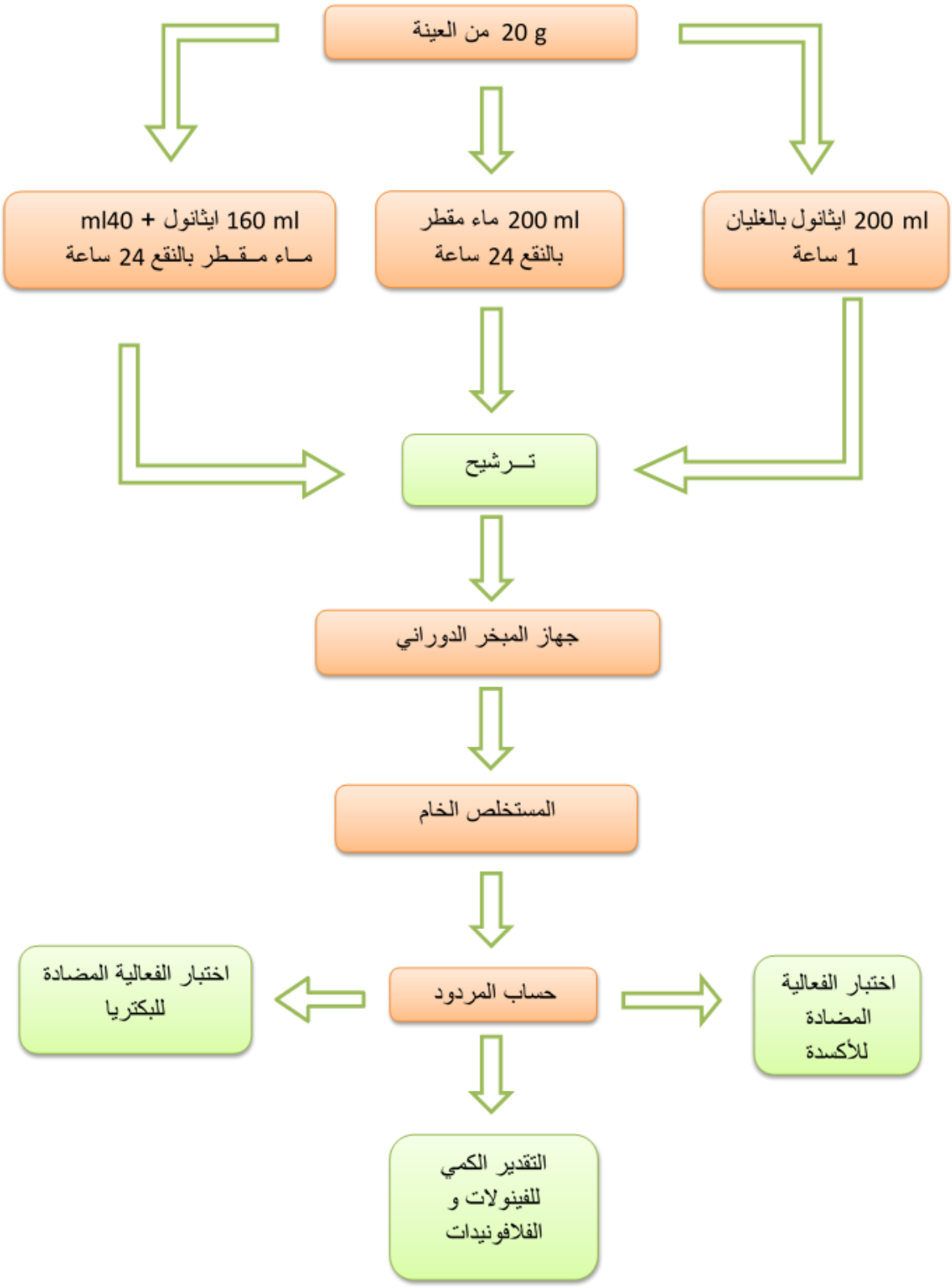
بواسطة الميزان الالكتروني نزن كتلة من احبوب الرمان قدرها 20g نضعها في دورق مائي ونضيف200ml من الإيثانول ونقوم بعملية التسخين بالتقطير بواسطة Réfrigérent فوق مخلاط مغناطيسي لمدة 1 ساعة. ثم يرشح المستخلص باستعمال ورق الترشيح Whattman وتوضع المادة

المستخلصة في جهاز المبخر الدوراني Rotavapeur ونتركه تحت التهوية حتى نتحصل على مستخلص ذو قوام سميك.

ملاحظة: هذه الخطوات السابقة تكرر مع الرمان الحلو والحامض لنتحصل على المستخلصات الستة



الشكل 19: مراحل تحضير العينة.



الشكل 20:مخطط عام للتجارب المنجزة

5- حساب المردودية الإنتاجية للمستخلصات:

المردودية الإنتاجية للمستخلصات هي النسبة بين كتلة المادة النباتية الجافة المستخلصة التي تم الحصول عليها والتي نرمز لها بـ (M_F) على كتلة المادة النباتية الجافة المستخدمة ويرمز لها بالرمز (M_I) ويحسب بالعلاقة التالية: [3]

$$R\% = (M_F/M_I) \times 100$$

M_F: الكتلة النهائية .

M_I: الكتلة الابتدائية .

R%: المردودية الإنتاجية للمستخلصات بـ % .

6- تقدير الكمي بواسطة مطيافية الأشعة فوق بنفسجية-المرئية:

6-1- مطيافية الأشعة فوق البنفسجية-المرئية UV-visible:

تعد هذه التقنية من أقدم طرق التحليل الكيفي والكمي وأكثرها إستخداما ، تساعد في تحديد البنى الكيميائية للمركبات، ومن أهم طرق التقدير الكمي طريقة قياس الإمتصاصية (الكثافة الضوئية) للمحاليل، حيث مجالها الكهرومغناطيسي (طولها الموجي) ما بين 400-800 nm. [4]

6-2- تقدير المركبات الفينولية الكلية:

تم تقدير كمية الفينولات باستخدام كاشف فولين (Folin-Ciocalteau) [5] حيث أن هذا الآخير يتكون من حمض فوسفونتغستيني ($H_3P_{12}O_{40}$) وحمض فوسفومولیبیدیك ($H_3PMO_{12}O_{40}$)، وتعتمد هذه الطريقة على ارجاع مكوناتة كاشف الفولين بواسطة المركبات الفينولية لإعطاء كينون أو كيتون ذات اللون الأزرق. [6]

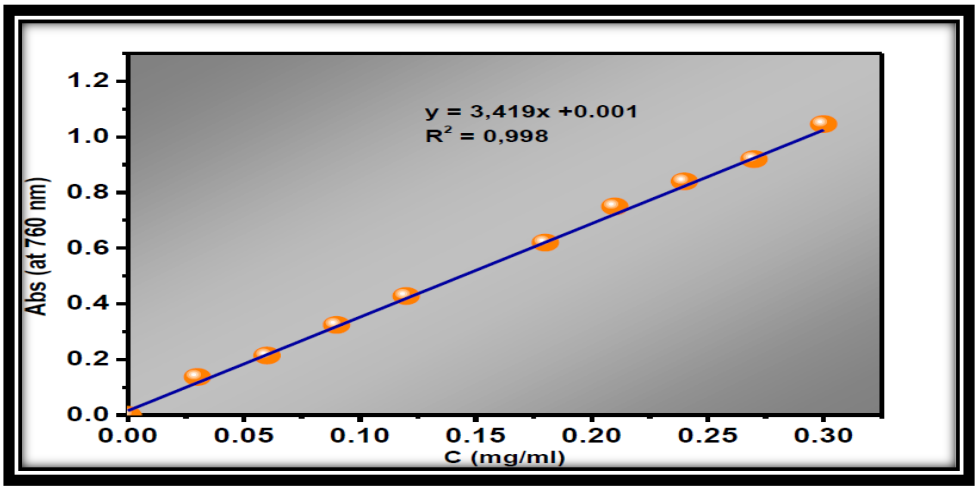
وتمت تقدير كميتها بواسطة جهاز مطيافية الاشعة فوق بنفسجية-المرئية عند طول موجة λ_{max} =765nm

6-2-1- المنحنى القياسي لحمض الغاليك:

قمنا بتحضير تراكيز مختلفة تتراوح مابين (0.3-0.03 مع/ملل) نأخذ من كل محلول 0.2ml في أنبوب إختبار ثم نضيف لها 0.5ml من كاشف (Folin) الممدد 10 مرات ثم نضعها في الضلام لمدة 5

دقائق ، بعدها نضيف 0.8ml من كربونات الصوديوم ونرج الأنابيب جيدا ونضعها في الضلام لمدة 30 دقيقة. [5]

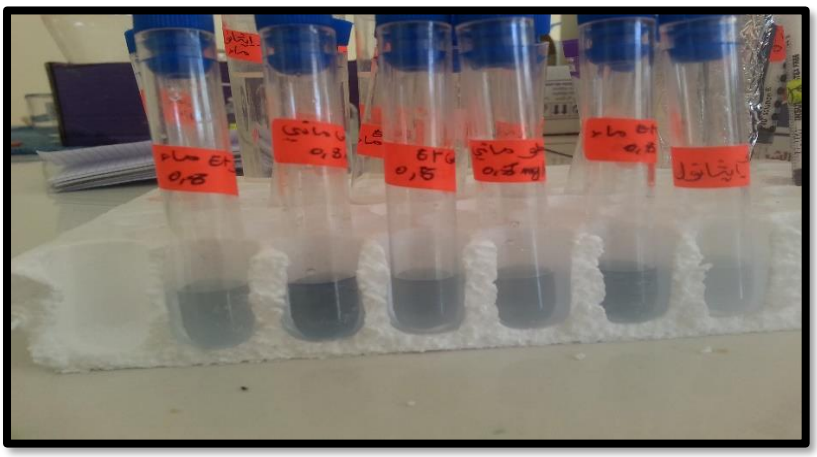
بعدها نقوم بقراءة النتيجة في جهاز مطيافية الأشعة فوق بنفسجية في طول موجة λ_{max} =765nm



الشكل 21: لمنحى العياري لحمض الغاليك.

6-2-2- طريقة الكشف لعديد الفينولات والتحديد الكمي:

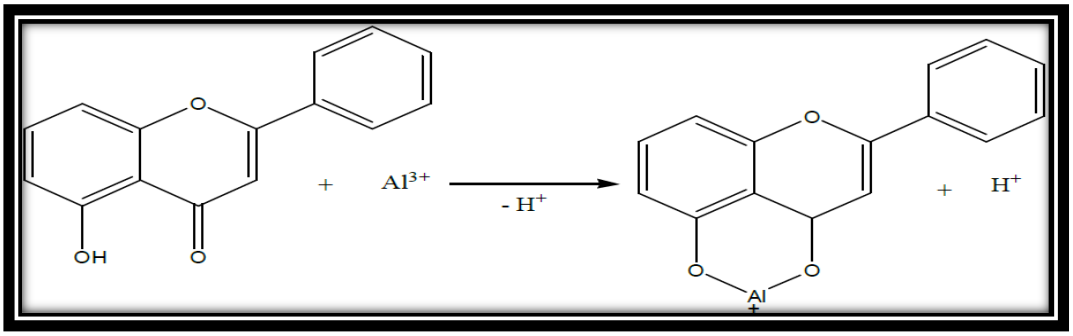
نقوم بتحضير المستخلص الأم وهذا بإذابة 0.05g من كل عينة موجودة لدراسة، ومن هذا الأخير نقوم بتحضير تراكيزمقدرة ب 0.8ml ونأخذ من كل تركيز 0.2ml ونضيف له 1ml من كاشف الفولين (Folin-Ciocltеai)، يترك في الضلام لمدة 5 دقائق ثم نضيف له 8.0ml من محلول كربونات الصوديوم بتركيز 7.5% ، ونتركه في الظلام لمدة 30 دقيقة، حتى نتحصل على اللون المطلوب وتتم القراءة في طول الموجة المذكورة سابقا.



الشكل 22: المستخلصات بعد إضافة كاشف الفولين.

6-3- التقدير الكمي للفلافونيدات:

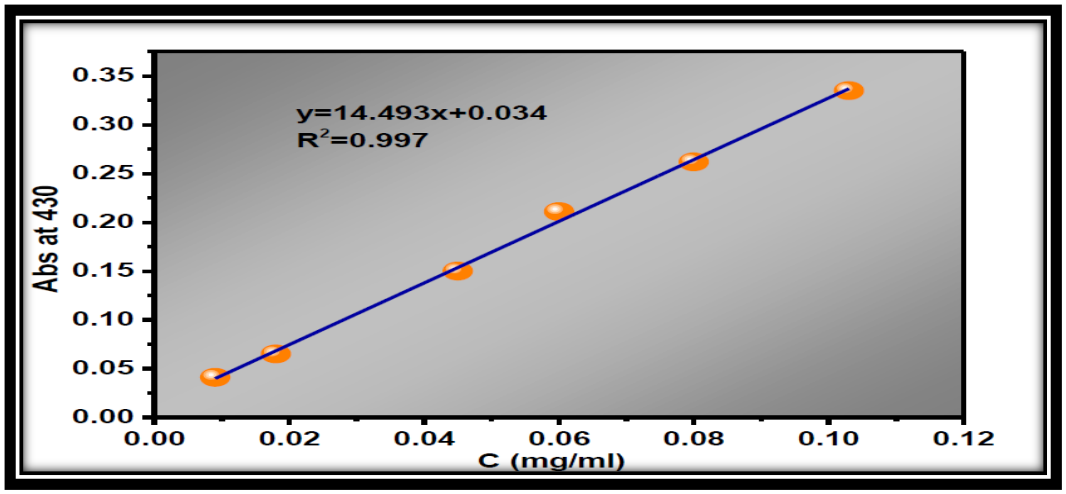
إعتمدنا في هذه الطريقة على استعمال محلول ثلاثي كلور الألمنيوم ($AlCl_3$) وهذا لقدرته على تكوين المعقد الأصفر بينه وبين مجموعة الهيدروكسيل (OH) الموجودة في الحلقات البنزينية للفلافانويدات ويمتص عند طول الموجة λ_{max}=430nm. [6]



الشكل 23: آلية تشكيل المعقد الأصفر

6-3-1- المنحنى القياس لحمض الروتين:

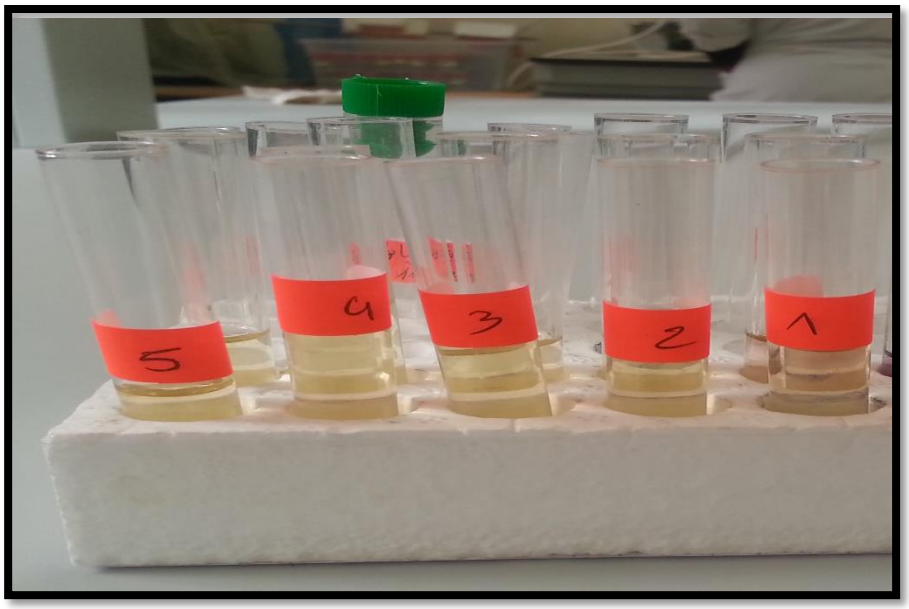
قمنا بتحضير تراكيز مختلفة من محلول الروتين (Rutine) محصورة ما بين (0.1-0.02ملغ/ملل) نأخذ 1mlمن كل تركيز ثم نضيف له 1ml من محلول ثلاثي كلور الألمنيوم $AlCl_3$ ونتركها في الظلام لمدة 30 دقيقة ، بعدها نقوم بقراءة الامتصاصية في جهاز مطيافية الأشعة فوق بنفسجية UV-visible عند طول موجة λ_{max}=430nm.



الشكل 24: المنحنى القياسي لمحاليل الروتين.

6-3-2- طريقة الكشف عن الفلافونيدات والتحديد الكمي:

قمنا باستعمال كلوريد الألمنيوم $AlCl_3$ ، نأخذ 0.5ml من التراكيز المختلفة للمستخلصات ونضيف لها 0.5ml من محلول $AlCl_3$ بتركيز 2% ونتركها في الظلام لمدة ساعة حتى يتغير اللون إلى الأصفر تقرأ الإمتصاصية عند طول الموجة 430nm، نستعمل منحنى الروتين كمرجع قياسي لتحديد كمية الفلافانويدات .



الشكل 25: المستخلصات بعد الكشف عن الفلافونويد.

7- تقدير الفعالية المضادة للاكسدة بالطرق الكيميائية:

7-1- إختبار تثبيط الجذر الحر DPPH:

يعتمد هذا الإختبار على استعمال جذر DPPH ثنائي فينيل بكريل هايدرازيل (diphenyl picrylhydrazyl) المشتق من جزيئة DPPH-H [7] ذو اللون البنفسجي الداكن والذي يتحول إلى اللون الأصفر عند ارجاعه بواسطة المركبات المضادة للأكسدة عند طول موجة λ_{max}=517nm [8]

وبإستعمال جهاز مطيافية الأشعة فوق بنفسجية وذلك لقياس مقدار الإنخفاض في الإمتصاصية هذا الإنخفاض في الإمتصاصية يمكننا من معرفة قدرة كفاءة العينات من تثبيط الجذور.[9] وتحسب نسبة التثبيط المئوية وفق العلاقة التالية:

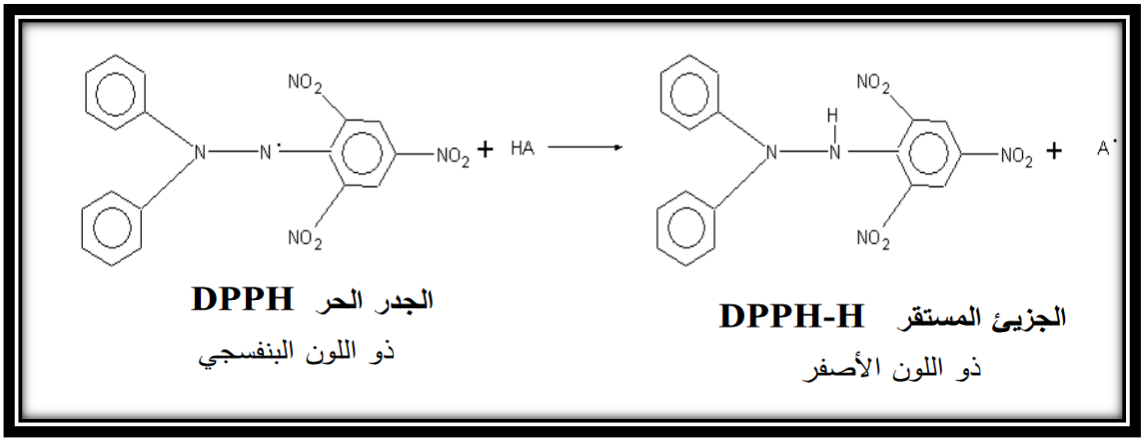
$$I\% = [(A_0 - A_i)/A_0] \times 100$$

A_0= امتصاصية DPPH عند (517nm).

A_i = الامتصاصيةDPPH في وجود المادة المدروسة بعد 30 دقيقة عند (517nm).

I%= نسبة تثبيط العامل المضاد للأكسدة

بعدما نرسم المنحنى نحسب IC_{50} (تركيز المحلول لتثبيط 50% من جذور DPPH).



الشكل 26: معادلة تثبيط جذر DPPH في وجود مضادات الجذور الحرة. [9]

7-2- طريقة العمل:

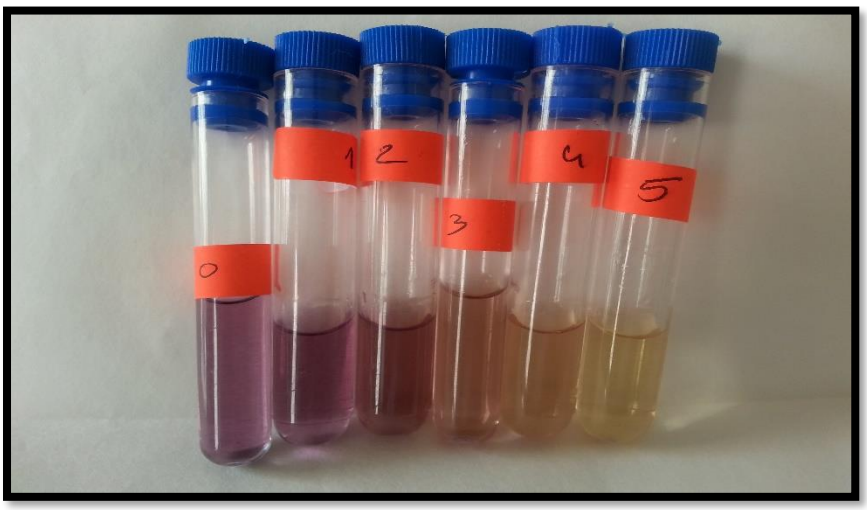
✓ **تحضير DPPH :**

قمنا بتحضير المحلول وذلك بإذابة 4mg من DPPH في 100ml من الميثانول لنحصل على محلول بنفسجي داكن ، يحفظ في الظلام وفي درجة حرارة مناسبة للحفاظ على خصائصه.

✓ **تحضير المحلول المدروس:**

نقوم بتحضير تراكيز مختلفة من المستخلصات المخففه (كل مستخلص المذيب المناسب له) نأخذ 1ml من كل تركيز ونضعها في انابيب إختبار ثم نضيف لها 1ml من محلول DPPH نتركها في الظلام لمدة 30دقيقة ثم نقوم بقراءة الامتصاصية في جهاز UV-visible عند طول موجة λ_{max}=517nm.

تجرى نفس العملية مع حمض الأسكوربيك قصد مقارنة فعالية المضادة للجذور الحرة والأكسدة للعينات المدروسة مع حمض الأسكوربيك.



الشكل 27: المستخلصات بعد إضافة محلول DPPH.

8- إختبار القدرة الكلية المضادة للأكسدة (TAC):

اعتمدنا في قياس القدرة الكلية المضادة للأكسدة للمستخلصات على استعمال طريقة الفوسفومولبيدات phosphomolybdenum الذي يعتبر إختبار مباشر وسريع لقياس القدرة الإرجاعية لمضادات الأكسدة تعتمد على إرجاع الموليبيدات (MoO_{4-2}) Molybdate إلى Molybden (Mo) وهذه الاخيرة يتميز بلون أخضر فاتح. [10]

إن إجمالي الفعالية المضادة للأكسدة تقدر كميا بواسطة جهاز UV-VISBEL حيث يستعمل حمض الغاليك كفينول مرجعي عند طول موجي λ_{max} = 695nm [11]

8-1- طريقة العمل:

تحضير محلول الموليبدات:

4mM: موليبدات الأمونيوم $(NH_4)_2$ MoO4.

0.6M: حمض الكبريتيك (H_2SO_4).

28mM: فوسفات الصوديوم (Na_3PO_4).

تحضير المحلول المدروس:

نقوم بتحضير تركيز قدره 0.5 mg/ml من كل مستخلص، و نأخذ من كل تركيز 0.1ml في أنابيب ونضيف له 1ml من الموليبدات ونضعه في حمام مائي تحت درجة حرارة 95°C لمدة ساعة فنتحصل على اللون الأخضر، و نتركها تبرد ثم نقوم بقراءة الامتصاصية في طول موجةλ_{max}=695 nm

الشكل 28: المستخلصات بعد إضافة محلول المولييبيدات.

9- الفعالية المضادة للبكتيريا:

في هذه الدراسة قمنا باختبار الفعالية البيولوجية للمستخلصات السابقة والمتمثلة في المستخلص المائي والإيثانولي (النقع والغليان) وهذا بتطبيقها على ثلاث سلالات بكتيرية ممرضة، والتي تم الحصول عليها من مخبر التحاليل الطبية والميكروبيو المرجان (خليف أسماء). وهي كالتالي:

Escherichia coli

Pseudomonas aerogenosa

Staphylococcus aureus

9-1- تحضير التراكيز المختلفة لكل مستخلص:

قمنا بتحضير أربعة تراكيز مختلفة واستعملنا كمذيب DMSO وهي (5mg/ml، 10mg/ml، 15mg/ml، 20mg/ml).

9-2- تنمية مزارع بكتيرية المستعملة:

قمنا بتنشيط المستعمرات البكتيرية وذلك بأخذ مسحة منها باستعمال العود القطني وتنميتها في وسط زراعي Muler-Hinton (MH) الغني بمادة Mannitol ثم وضعناها في الحاضنة لمدة 24 ساعة تحت درجة حرارة 37°.

9-3- تحضير وسط الزرع:

قمنا بتحضير أوساط الزرع وذلك بتسخين وسط الزرع Muler-Hinton (MH) في حمام مائي ونقوم بسكب كمية منه في علبة بيتري ذات قطر 9 سم حتى تصل ارتفاع 1سم ونتركها حتى تتماسك

ملاحظة: نقوم بجميع المراحل العملية أمام موقد بنزن لخلق وسط معقم.

9-4- تحضير المعلق البكتيري:

نقوم بوضع 3ml من الماء الفيزيولوجي المعقم في ثلاثة أنابيب اختبار معقمة، بعدها نغمس الماسح القطني المعقم في المعلق البكتيري ثم يمسح به كامل الوسط الجاف لأوساط الزرع المحضرة سابقا وتوزع على مستوى السطح بشكل خطوط متلاصقة ومنتظمة.

9-5- تطبيق الأقراص:

بواسطة ملقط معقم نأخذ الأقراص المشبعة بالمستخلصات المختلفة التراكيز داخل علب بيتري، ثم توضع العلب بشكل مقلوب في الحاضنة لمدة 24 ساعة تحت درجة حرارة 37°.

ولمعرفة مدى حساسية البكتيريا وتأثير المضاد الحيوي، نقيس قطر التثبيط بعد مرور الفترة الزمنية المذكورة سابقا وكنتيجة لهذا الاختبار يمكن أن نحدد درجة حساسية البكتيريا اتجاه المضاد الحيوي، ويمكن القول أن:

- بكتيريا مقاومة (غير حساسة) للمضاد الحيوي إذا كان القطر أقل من 8ملم.
- بكتيريا متوسطة الحساسية للمضاد الحيوي إذا كان القطر ما بين 9 و14 ملم.
- بكتيريا حساسة للمضاد الحيوي إذا كان القطر ما بين 15و 20ملم.
- بكتيريا حساسة جدا للمضاد الحيوي إذا كان القطر أكبر من 20ملم.**[12]**

المراجع

المراجع بالغة العربية:

[6] ربيعي ع. ك، المساهمة في دراسة الفعالية المضادة للأكسدة لمستخلصات بروبوليس جنوب الجزائر بالطرق الكيميائية والكهروكيميائية، مذكرة تخرج لنيل شهادة الماجستير، تخصص كيمياء تحليلية ومراقبة المحيط، جامعة قاصدي مرباح ورقلة (2010).

[7] العابد إ، دراسة الفعالية المضادة للبكتيريا والمضادة للأكسدة لمستخلص القلويدات لنبات الضمران *Traganum nudatum* ، تخصص كيمياء عضوية تطبيقية، جامعة قاصدي مرباح ورقلة.

[11] بسمة شمسة، دراسة مقارنة للمردودية و النشاطية المضادة للأكسدة في المستخلص الكحولي و المائي عند نبات L *Zygophyllum album.*، مذكرة تخرج لنيل شهادة ماستر أكاديمي ،علوم الطبيعة والحياة ، جامعة الوادي 2015.

المراجع بالغة الأجنبية:

[1] Shohami E., Gati I., Biet-Yannai E., Trombovle V., Kohen R., Neuratrauma J., (2009).

[2] Chevion S., Chevion M., Chock P.B., Beecher G.R, Jornale of Medicinal Food (1999).

[3] BOUKRIN H., 2014 – Contribution à l'etude phytochimique des extraits bruts des épices contenus dans le mélange Ras-el hanout. Théme Master Academique. Université Kasdi Merbah Ouragla. P: 99.

[4] Asadi S, Ahmadiani A, Ali Esmaeili A, Sonboli A, Ansari N, Khodagholi F. In vitro antioxidant activities and an inverstigation of neuroprotection by six Sabiria species from Iran: A comparative study. Food Chemical and Toxicology (2010).

[5] Y.I. Tur'yan, P. Gorenbein, R. Kohen. Journal of Electroanalytical Chemistry 571 (2004) 183-188.

[8] P. Molyreux, Song Klan Karin J.sci technol., 26(2004) 211-219.

[9] Bogdanov, S;Lullman, C.and Martin, P. Honey quality, method of analysis and international regulatory standards: A Review of the work the international honey co mmission. Swiss Research Centre, 2000.

[10] ARDESTANI A., YAZDANAPARASTR., 2007. Inhibitory effects of ethyl acetate extract of Teucrium polium on in vitro protein glycoxidation. Food and Chemical Toxicology. 45: 2402-2411.

[12] Poncea. G;Fritzr; Del Vallc.et Rouras I. Antimicrobial activity of essential oils of the native microflora of organic Swiss chard. Lebensmittel-Wissenxchuft and Technologie ,(2003)

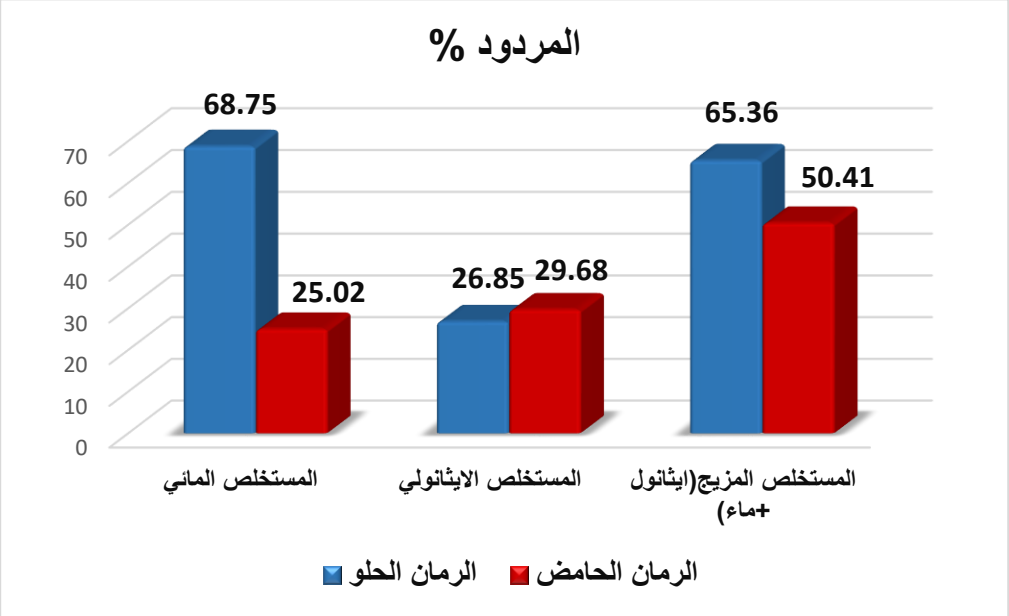
الفصل الخامس

نتائج ومناقشة

1- حساب مردود المستخلصات:

جدول 9: مردود المستخلصات المستعملة في الدراسة.

نوع الرمان	المستخلص	كتلة العينة بـg	الكتلة المستخلصة بـ g	المردود بـ %
رمان حامض	المستخلص المائي	20	5.005	25.02
	المستخلص الإيثانولي	20	5.937	29.68
	المستخلص مزيج	20	10.083	50.41
رمان حلو	المستخلص المائي	20	13.750	68.75
	المستخلص الإيثانولي	20	5.371	26.85
	المستخلص مزيج	20	13.072	65.36



الشكل 29: أعمدة بيانية تمثل مردود المستخلصات المستعملة في الدراسة.

من خلال المنحنى والنتائج المبينة في الجدول نجد ان مردود الاستخلاص في الرمان الحلو أكثر من مردود الرمان الحامض خاصة في المستخلص المائي ومستخلص المزيج(ايثانول+ماء) حيث كانت النسب

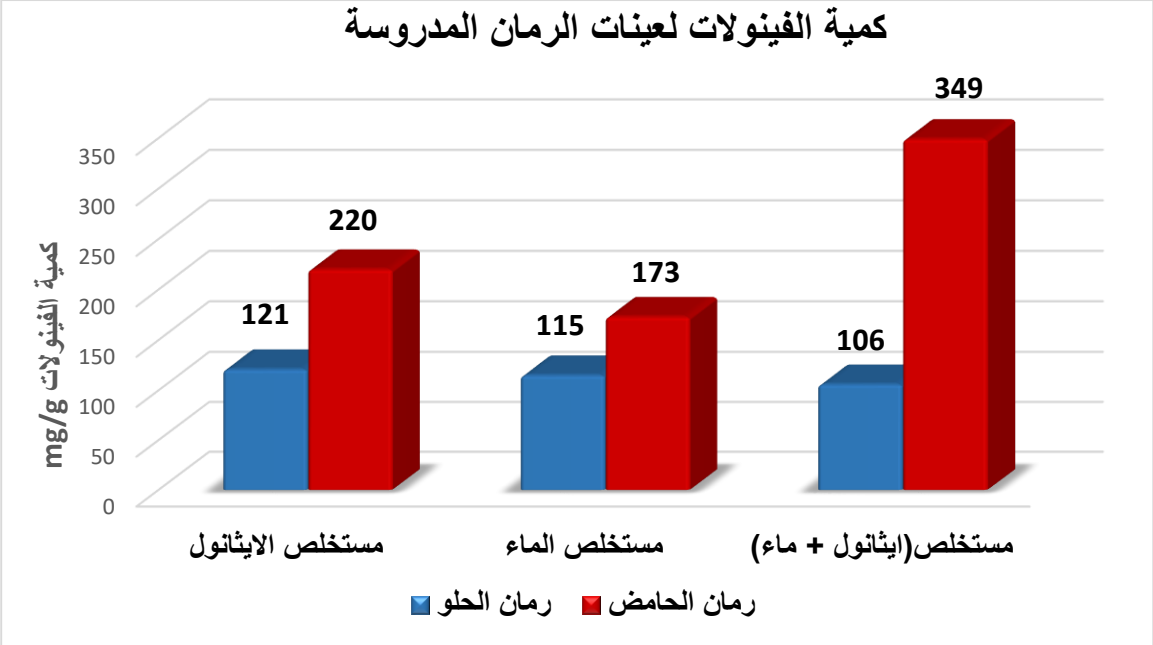
على التوالي 68.75% و 65.36%، أما بالنسبة للرمان الحامض كانت أعلى نسبة في مستخلص المزيج (ايثانول+ماء) وهذا راجع لنوع المذيب المستخدم وطريقة الاستخلاص.

2- التقدير الكمي للفينولات باستخدام جهاز UV-visible:

من خلال التجارب والأبحاث التي قمنا بها أثناء سيرورة البحث تم التحصل على النتائج التالية:

جدول 10: يوضح نتائج المتحصل عليها من خلال دراسة كمية الفينولات.

	رمان حامض			رمان حلو		
العينات	مستخلص إيثانولي	مستخلص مائي	مستخلص ايثانول+ماء	مستخلص إيثانولي	مستخلص ايثانول +ماء	مستخلص مائي
الامتصاصية	0.589	0.465	0.934	0.325	0.286	0.308
تركيز الفينولات mg/ml	0.179	0.138	0.279	0.097	0.085	0.092
كمية الفينولات mg/g	220	173	349	121	106	115
SD	±3.3939	±1.8826	±1.919	±1.919	±1.97922	±2.8075



الشكل 30: يوضح كمية عديدات الفينول بالملغ مكافئ لحمض الغاليك /g من وزن المستخلص

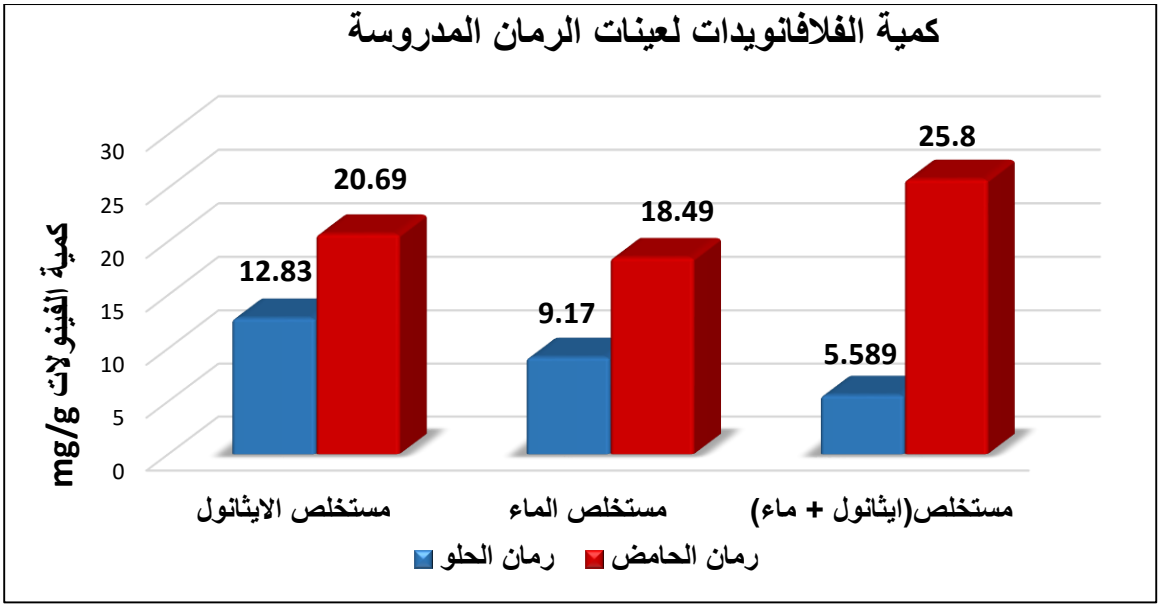
الملاحظ من خلال النتائج المدونة في الجدول أن أعلى كمية للفينولات هي لعينة الرمان الحامض المستخلص بواسطة (ايثانول + ماء) حيث قدرت قيمتها 349 mg/g، وأقل قيمة لعينة الرمان الحلو المستخلص (ايثانول + ماء) حيث بلغت 106 mg/g، بينما المستخلص الإيثانولي للرمان الحامض قدر بـ 220 mg/g كان أكثر من المستخلص الإيثانولي للرمان الحلو اذ قدرت قيمتها بـ 121 mg/g أما بالنسبة للمستخلص المائي للرمان الحامض بلغت قيمتها 173 mg/g بينما 115 mg/g للمستخلص المائي للرمان الحلو، عموما عينات الرمان الحامض كانت أكبر كمية للفينولات من عينات الرمان الحلو، ومن هنا يمكننا القول أن الرمان الحامض يحوي كمية فينولات أكثر من الرمان الحلو، وهذا راجع للتركيب الكيميائي لكل مستخلص.

3- التقدير الكمي للفلافونيدات باستخدام جهاز UV-visible:

أثناء حساب كمية الفلافونيدات لعينات الرمان والمستخلصات المدروسة تم الحصول على النتائج المدونة في الجدول أدناه:

جدول 11: يوضح نتائج المتحصل عليها من خلال دراسة كمية الفلافونويد.

العينات	حامض ايثانول	حامض ماء	حامض ايثانول+ماء	حلو ماء	حلو ايثانول +ماء	حلو ايثانول
التركيز/mg ml	1	1	1	1	1	1
الامتصاصية	0.334	0.302	0.408	0.169	0.115	0.220
تركيز الفلافونيدات Mg/ml	0.02069	0.01849	0.0258	0.00917	0.005589	0.01283
كمية الفلافونيدات mg/g	20.69	18.49	25.8	9.17	5.589	12.83
SD	±2.3869	±1.8826	±1.919	±1.8075	± 0.2512	±1.919



الشكل 31: يوضح كمية الفلافونيدات بالملغ مكافئ لروتين /g من وزن المستخلص.

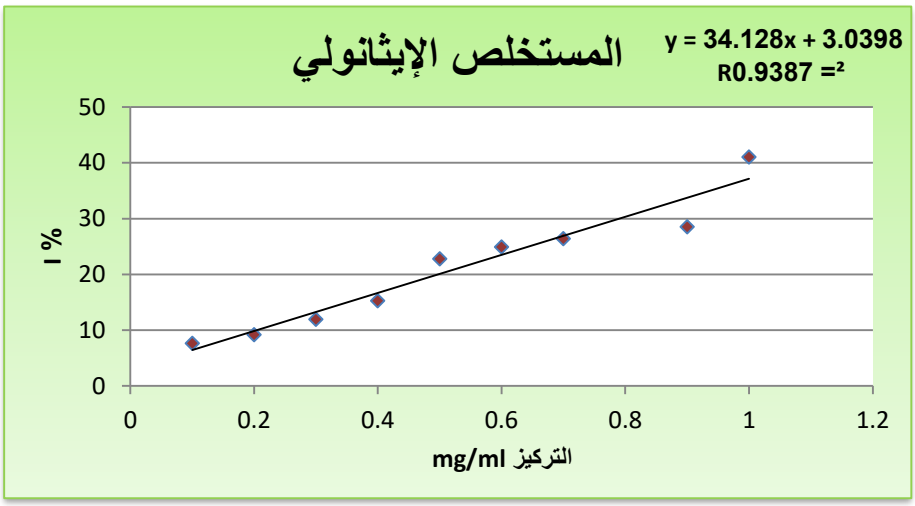
الملاحظ من خلال النتائج المدونة في الجدول أن أعلى كمية للفلافونيدات هي لعينة الرمان الحامض المستخلص بواسطة (ايثانول + ماء) حيث قدرت قيمتها بـ25.8mg/g، وأقل قيمة لعينة الرمان الحلو المستخلص (ايثانول + ماء) بـ5.589 mg/g، عموما عينات الرمان الحامض كانت أكبر كمية للفلافونيدات من عينات الرمان الحلو، ومن هنا يمكننا القول ان الرمان الحامض يحوي كمية فلافونيدات أكثر من الرمان الحلو، ومنه نستنتج أن هناك علاقة طردية بين تركيز الفينولات وتركيز الفلافونويد أي انه كلما زاد تركيز الفينولات زاد تركيز الفلافونويد.

4- الفعالية المضادة للأكسدة:

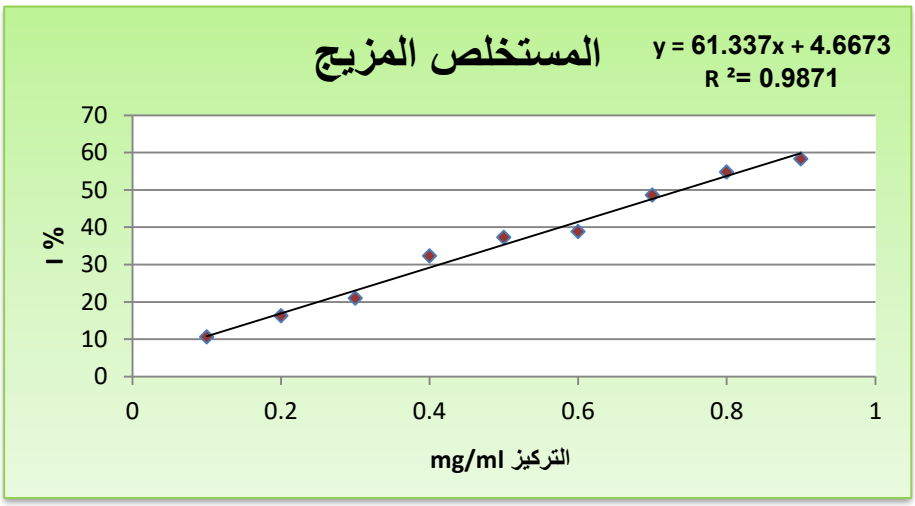
4-1- القدرة التثبيطية للجذر الحر DPPH :

من خلال قياس مقدار كسح الجذور عند تراكيز مختلفة لمستخلصات حبوب الرمان والمقارنة مع المنحنى العياري لحمض الأسكوربيك تحصلنا على النتائج التالية:

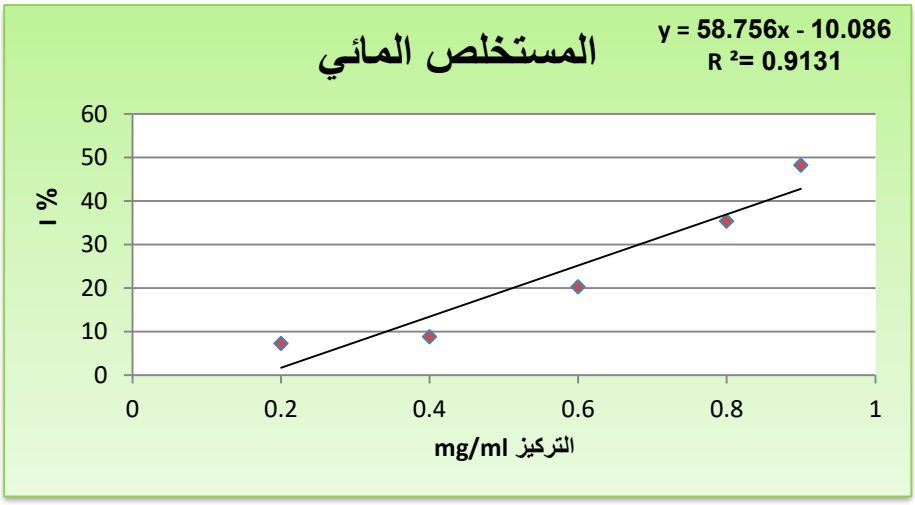
4-1-1- الرمان الحـــــلو:



الشكل 32: تمثل منحنى النشاطية للمستخلص الإيثانولي في تثبيط الجذر الحر• DPPH

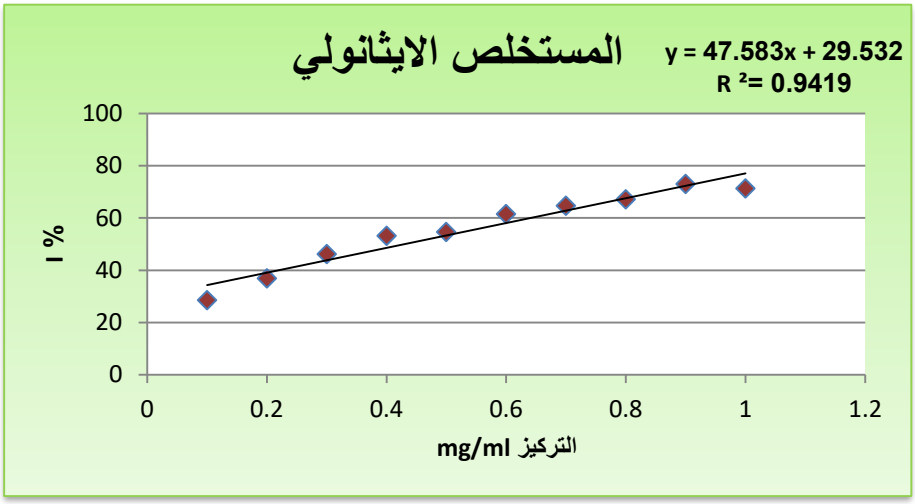


الشكل 33: : تمثل منحنى النشاطية للمستخلص المزيج في تثبيط الجذر الحر• DPPH

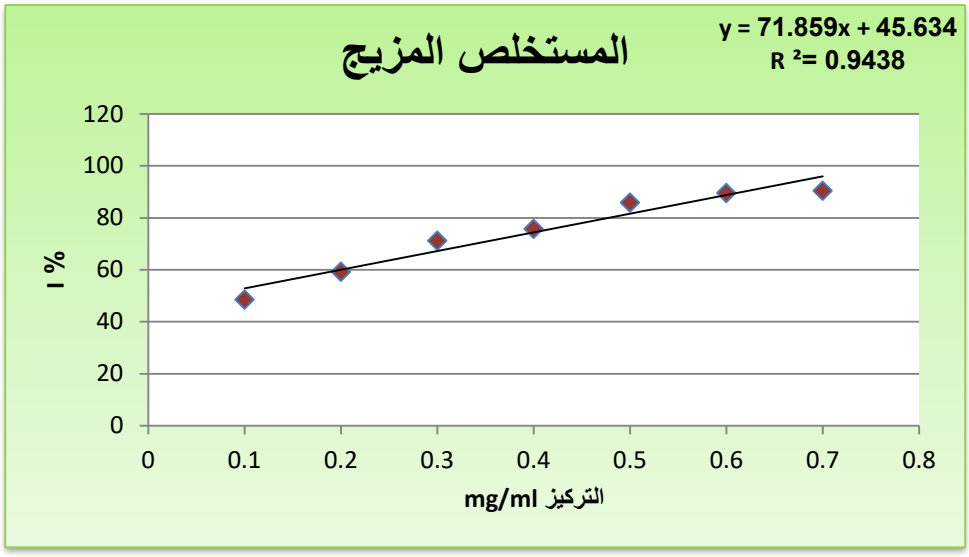


الشكل 34: : تمثل منحنى النشاطية للمستخلص المائي في تثبيط الجذر الحر• DPPH

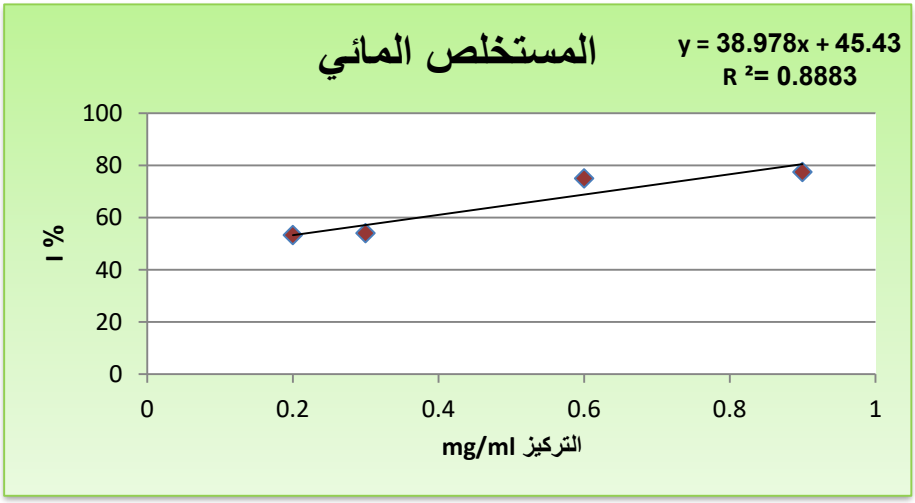
4-1-2- الرمان الحامض:



الشكل 35: تمثل منحنى النشاطية للمستخلص الإيثانولي في تثبيط الجذر الحر• DPPH



الشكل 36: تمثل منحنى النشاطية للمستخلص المزيج في تثبيط الجذر الحر• DPPH



الشكل 37: تمثل منحنى النشاطية للمستخلص المائي في تثبيط الجذر الحر• DPPH

من خلال المنحنيات والممثلة لنشاطية الجذر الحر والتي من خلالها تحسب قيمة IC_{50} للعينات علما أن القيمة الأقل لها تعني التأثير التثبيطي الأفضل، القيم مبينة في الجدول أدناه:

جدول 12: تحديد مقدار IC_{50} لكل مستخلص.

العينة	الرمان الحـــلو			الرمان الحـامض		
	المستخلص المائي	المستخلص الإيثانولي	المستخلص (ايثانول+ماء)	المستخلص المائي	المستخلص الإيثانولي	المستخلص (ايثانول+ماء)
IC_{50}(g/L)	1.022	1.3760	0.7390	0.1172	0.4301	0.0601
ARP	0.9784	0.7267	1.3531	8.5324	2.3250	16.6389

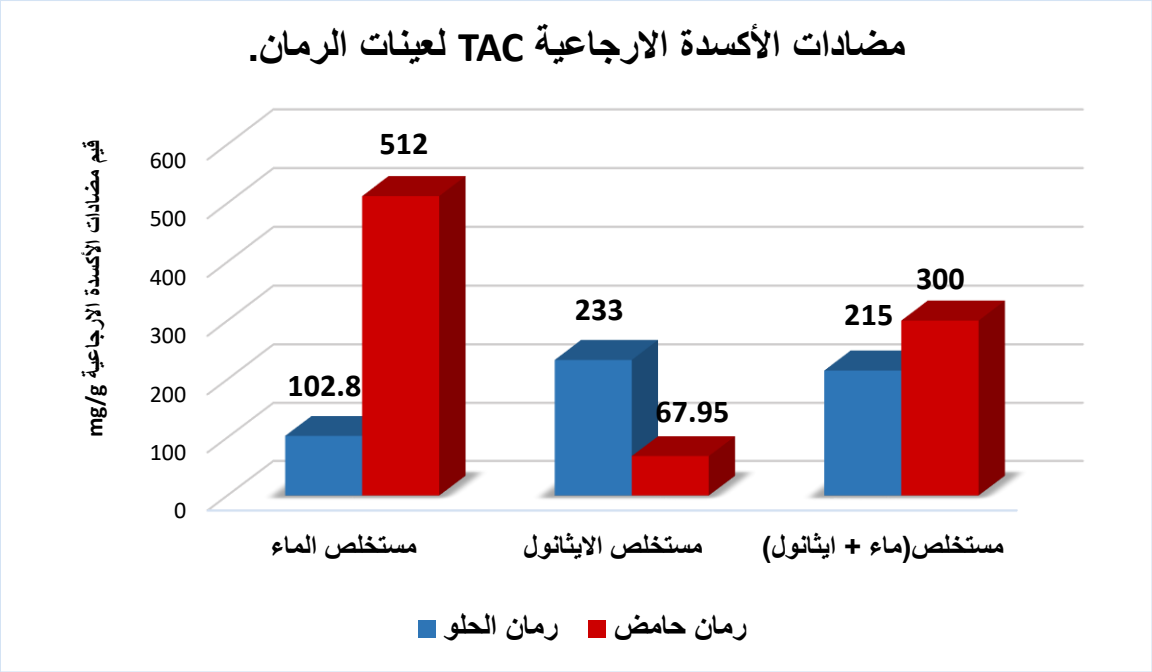
نلاحظ من النتائج المسجلة في الجدول أعلاه أن نتائج مستخلصات الرمان الحامض كانت أقوى من نتائج الرمان الحلو حيث سجلت أقوى قيمة في مستخلص المزيج(ايثانول+ماء) للرمان الحامض بقيمة g/l 0.0601 وأضعف قيمة هي للرمان الحلو قدرت بـ 1.3760g/l حيث يمكننا القول ان الرمان الحامض له فعالية أكبر من نظيره الرمان الحلو وهذا أيضا ما لاحظناه في المركبات الفينولية وكذا مركبات الفلافونيدات والتي من المعلوم أن الفعالية ضد الجذور الحرة تعزى في المقام الأول الى هذه المركبات.

4-2- قيم الفعالية الإرجاعية للأكسدة TAC:

أثناء الدراسة تم تحصل على النتائج التالية:

جدول 13: يوضح قيم الفعالية الإرجاعية للأكسدة TAC.

العينات	حلو ايثانول	حلو ماء	حلو ايثانول+ماء	حامض ايثانول	حامض ماء	حامض ايثانول+ ماء
التركيز mg/g	0.5	2	0.5	2	0.5	0.5
الامتصاصية	0.212	0.375	0.107	0.247	0.468	0.273
تركيز mg/ml	0.116	0.205	0.107	0.135	0.256	0.150
قيم اختبار النشاطية mg/g TAC	233	102.8	215	67.95	512	300
SD	16.9884	5.9845	23.933	1.3513	1.544	13.1274



الشكل 38: يوضح قيم مضادات الأكسدة الإرجاعية TAC.

من خلال ما تحصلنا عليه من نتائج وجدنا أن أكبر قيمة لاختبار النشاطية هي للمستخلص الإيثانولي للرمان الحامض قدرت بـ512 mg/g، واقل قيمة للمستخلص المائي للرمان الحامض بـ67.95 mg/g، أما مستخلص المزيج للرمان الحامض بلغت 300 mg/g حيث فاقت المستخلص الإيثانولي للرمان الحلو215 mg/g، هذه الفروق في النتائج راجعة لاختلاف المعادن الموجودة في كل مستخلص.

5- الفعالية المضادة للبكتيريا:

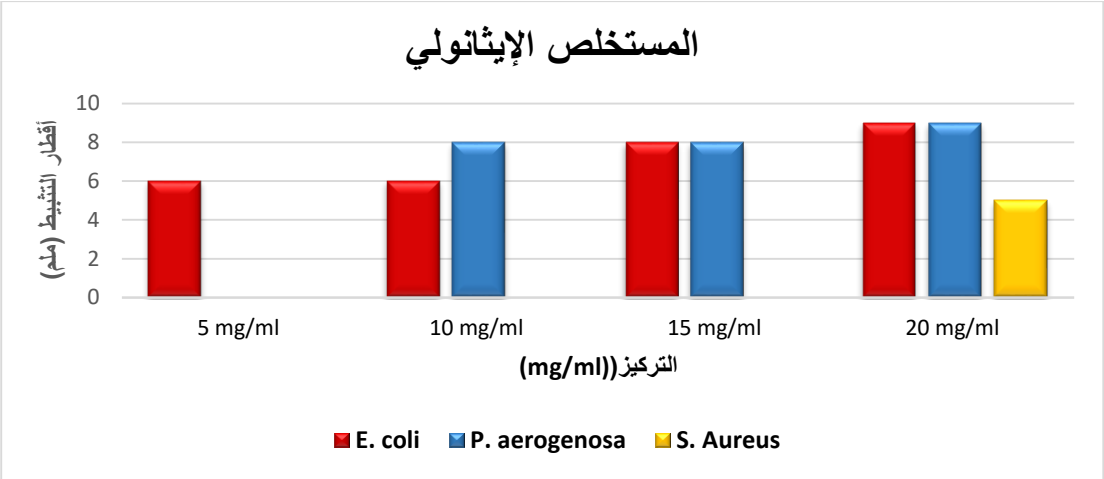
5-1- الرمان الحلو:

5-1-1- المستخلص الإيثانولي:

بعد الزرع و الحضن لمدة 24 ساعة ، نقوم بقياس قطر التثبيط حول الأقراص المشبعة بالتراكيز المختلفة للمستخلصات

جدول 14: أقطار مناطق التثبيط (ملم) للمستخلص الاثانولي للرمان الحلو.

التركيز نوع البكتيريا	5 mg/ml	10 mg/ml	15 mg/ml	20 mg/ml
E. coli	6	6	8	9
P. aerogenosa	-	8	8	9
S. aureus	-	-	-	5



الشكل 39: أعمدة بيانية تمثل أقطار مناطق التثبيط (ملم) للمستخلص الإيثانولي للرمان الحلو.

من خلال الجدول 14 والشكل 39 نلاحظ أن المستخلص الإيثانولي للرمان الحلو عند E. coli كان أعلى قطر تثبيط في التركيز 20 mg/ml قدرت بـ 9mm أما بالنسبة للتركيز 15 mg/ml بلغ قطر التثبيط 8mm بينما سجل أقل قطر تثبيط عند التراكيز 10 mg/ml و5 بلغ 6mm.

أما عند P. aerogensa نلاحظ ان أعلى قطر تثبيطي سجل في التركيز 20 mg/ml بلغ 9mm أما التراكيز 15 mg/ml و10 بلغ قطر التثبيط 8mm، وبالنسبة للتركيز 5 mg/ml لم يظهر أي قطر تثبيطي.

أما عند S.aureus كان أعلى قطر تثبيط عند التركيز 20 mg/ml اذ بلغ 5mm أما باقي التراكيز لم تسجل أي أقطار تثبيط.

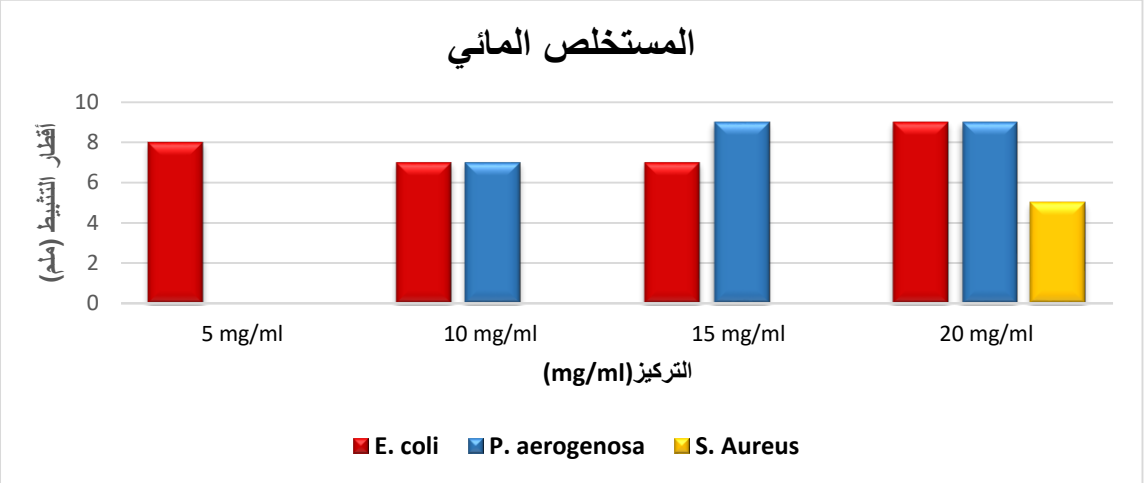
ومنه يمكن القول أن E. coli وP. aerogensa متوسطة الحساسية للمستخلص الإيثانولي للرمان الحلو.

5-1-2- المستخلص المائي:

بعد الزرع و الحضن لمدة 24 ساعة ، نقوم بقياس قطر التثبيط حول الأقراص المشبعة بالتراكيز المختلفة للمستخلصات

جدول 15: أقطار مناطق التثبيط (ملم) للمستخلص المائي للرمان الحلو.

التركيز نوع البكتيريا	5 mg/ml	10 mg/ml	15 mg/ml	20 mg/ml
E. coli	8	7	7	9
P. aerogenosa	–	7	9	9
S. aureus	–	–	–	5



الشكل 40: أعمدة بيانية تمثل أقطار مناطق التثبيط (ملم) للمستخلص المائي للرمان الحلو.

من خلال الجدول 15 والشكل 40 نلاحظ أن المستخلص المائي للرمان الحلو عند E. coli كان أعلى قطر تثبيط في التركيز 20 mg/ml قدرت بـ 9mm أما بالنسبة للتركيز 5 mg/ml بلغ قطر التثبيط 8 mm بينما سجل أقل قطر تثبيط عند التراكيز 15 mg/ml و 10 بلغ 7mm.

أما عند P. aerogensa نلاحظ ان أعلى قطر تثبيطي سجل في التراكيز 20 mg/ml و15 بلغ 9mm أما التركيز10mg/ml بلغ قطر التثبيط 7mm وبالنسبة للتركيز 5 mg/ml لم يظهر أي قطر تثبيط.

أما عند S.aureus كان أعلى قطر تثبيط عند التركيز 20 mg/ml اذ بلغ 5mm أما باقي التراكيز لم تسجل أي أقطار تثبيط.

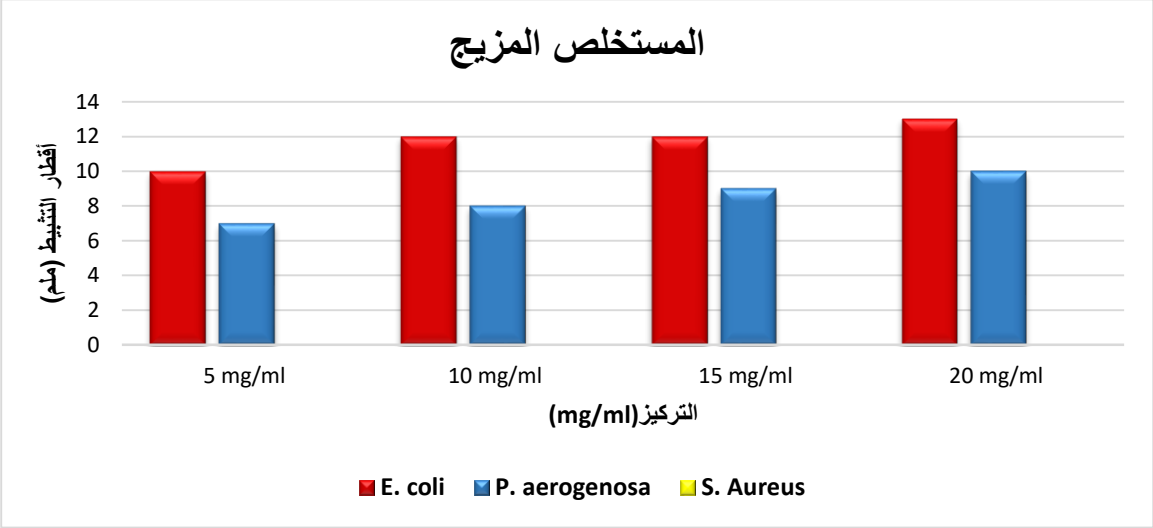
ومنه يمكن القول أن E.coli و P. aerogensa متوسطة الحساسية للمستخلص المائي للرمان الحلو.

5-1-3- المستخلص المزيج:

بعد الزرع و الحضن لمدة 24 ساعة ، نقوم بقياس قطر التثبيط حول الأقراص المشبعة بالتراكيز المختلفة للمستخلصات.

جدول 16: أقطار مناطق التثبيط (ملم) للمستخلص المزيج للرمان الحلو.

التركيز نوع البكتيريا	5 mg/ml	10 mg/ml	15 mg/ml	20 mg/ml
E. coli	10	12	12	13
P. aerogenosa	7	8	9	10
S. aureus	–	–	–	–



الشكل 41: أعمدة بيانية تمثل أقطار مناطق التثبيط (ملم) للمستخلص المزيج للرمان الحلو.

من خلال الجدول 16 والشكل 41 نلاحظ أن المستخلص المزيج للرمان الحلو عند E. coli كان أعلى قطر تثبيط في التركيز 20 mg/ml قدرت بـ 13mmأما بالنسبة للتراكيز mg/ml للتراكيز15 و 10بلغ قطر التثبيط 12mmبينما سجل أقل قطر تثبيط عند التركيز 5 mg/ml قدره 10 mm.

أما عند P. aerogensa نلاحظ ان أعلى قطر تثبيط سجل في التركيز 20 mg/ml بلغ 10mm أما التراكيز 15 mg/ml و10 بلغ قطر التثبيط على التوالي9 mm و8و وبالنسبة للتركيز 5 mg/ml سجل أقل قطر تثبيطي قدر بـــ7mm.

أما عند S. aureus لم يظهر أي قطر تثبيطي عند جميع التراكيز.

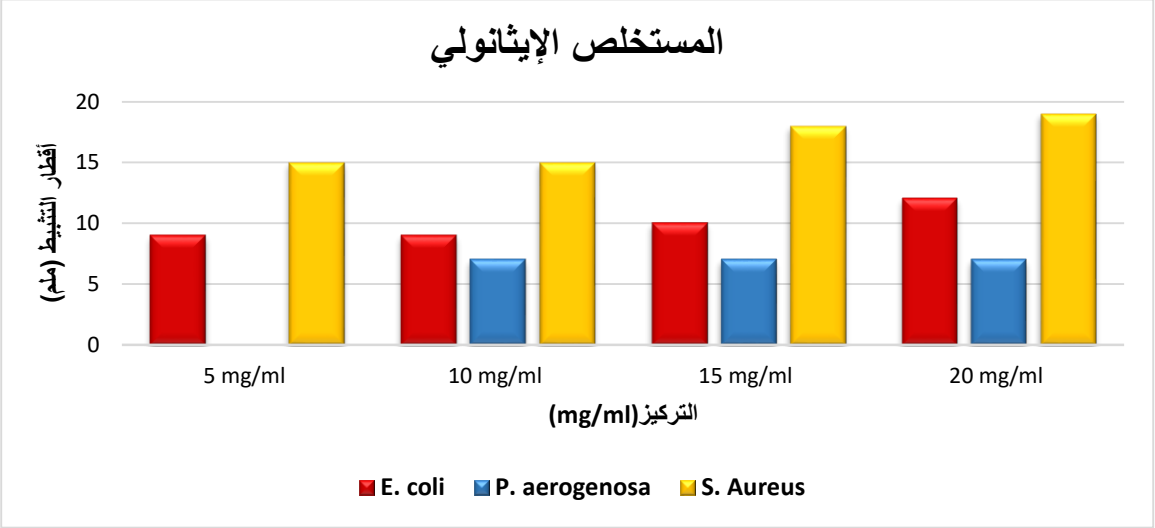
ومنه يمكن القول أن E. coli متوسطة الحساسية للمستخلص المزيج للرمان الحلو.

5-2- الرمان الحامض:

5-2-1- المستخلص الإيثانولي:

جدول 17: أقطار مناطق التثبيط (ملم) للمستخلص الإيثانولي للرمان الحامض.

التركيز نوع البكتيريا	5 mg/ml	10 mg/ml	15 mg/ml	20 mg/ml
E. coli	9	9	10	12
P. aerogenosa	-	7	7	7
S. aureus	15	15	18	19



الشكل 42: أعمدة بيانية تمثل أقطار مناطق التثبيط (ملم) للمستخلص الإيثانولي للرمان الحامض.

من خلال الجدول 17 والشكل 42 نلاحظ أن المستخلص الإيثانولي للرمان الحامض عند E. coli كان أعلى قطر تثبيط في التركيز 20 mg/ml قدرت بـ 12mm أما بالنسبة للتركيز 15mg/ml بلغ قطر التثبيط 10 mm بينما سجل عند التراكيز 10 mg/ml و5 قطر قدره 9mm.

أما عند P. aerogensa نلاحظ ان التراكيز 20 و15 و10 mg/ml سجلت نفس قطر التثبيط وقدره 7mmوبالنسبة للتركيز 5 mg/ml لم يسجل أي قطر تثبيط.

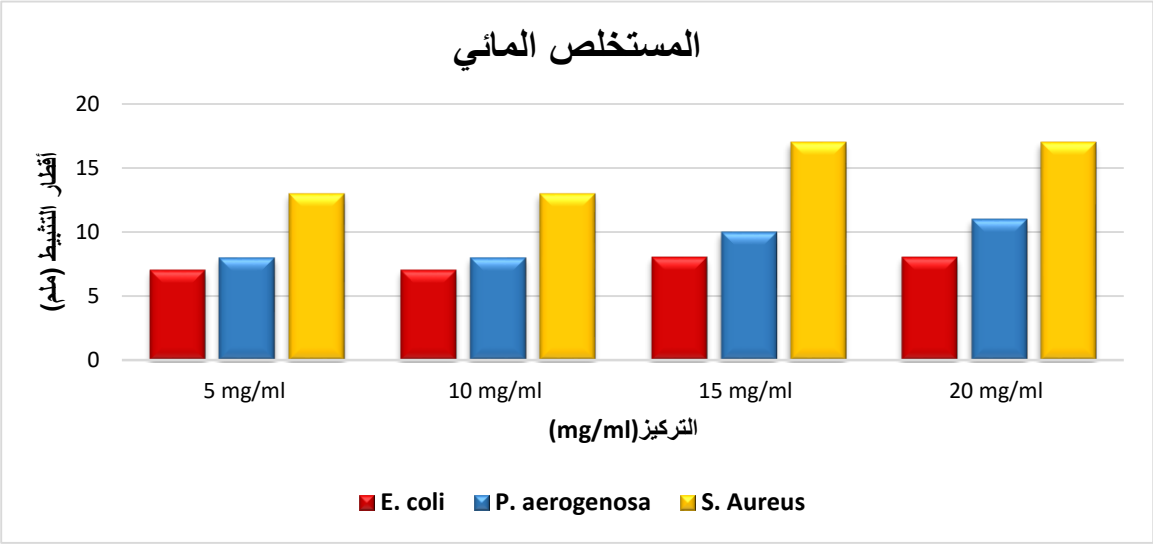
أما عند S.aureus كان أعلى قطر تثبيط في التركيز 20 mg/ml قدرت بـ 19mm أما بالنسبة للتركيز 15 mg/ml بلغ قطر التثبيطية 18 mm بينما سجل عند التراكيز 10 mg/ml و5 قطر قدره 15mm.

ومنه يمكن القول أن S.aureus حساسة للمستخلص الإيثانولي للرمان الحامض.

5-2-2- المستخلص المائي:

جدول 18: أقطار مناطق التثبيط (ملم) للمستخلص المائي للرمان الحامض.

التركيز نوع البكتيريا	5 mg/ml	10 mg/ml	15 mg/ml	20 mg/ml
E. coli	7	7	8	8
P. aerogenosa	8	8	10	11
S. aureus	13	13	17	17



الشكل 43: أعمدة بيانية تمثل أقطار مناطق التثبيط (ملم) للمستخلص المائي للرمان الحامض.

من خلال الجدول 17 والشكل 43 نلاحظ أن المستخلص المائي للرمان الحامض عند E. coli كان أعلى قطر تثبيط في التراكيز 20 mg/ml و15 قدرت بـ8mm أما بالنسبة للتراكيز 10mg/ml و5 بلغ قطر التثبيط 7 mm.

أما عند P. aerogensa أعلى قطر تثبيط في التركيز 20 mg/ml بلغ11mm بينما التركيز 15 mg/ml بلغ قطر التثبيط 10mm أما بالنسبة للتراكيز 10mg/ml و5 بلغ قطر التثبيط 8 mm.

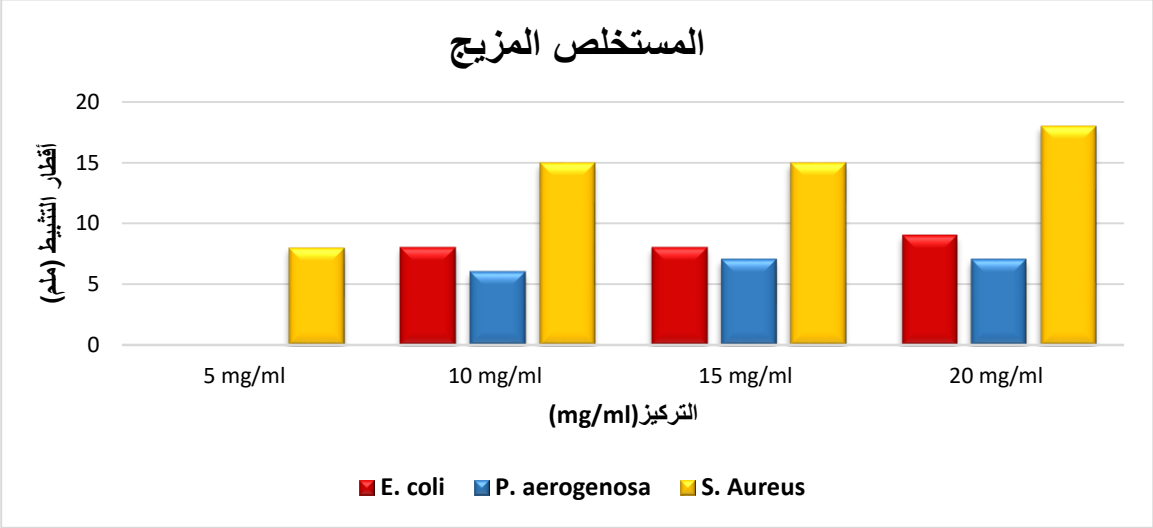
أما عند S.aureus كانت أعلى قطر تثبيط في التراكيز 20 mg/ml و15 قدرت بـ17mm أما بالنسبة للتراكيز 10 mg/ml و5 بلغ قطر التثبيط 13mm.

ومنه يمكن القول أن S.aureus حساسة للمستخلص المائي للرمان الحامض.

5-2-3- المستخلص المزيج:

جدول 19: أقطار مناطق التثبيط (ملم) للمستخلص المزيج للرمان الحامض.

التركيز نوع البكتيريا	5 mg/ml	10 mg/ml	15 mg/ml	20 mg/ml
E. coli	-	8	8	9
P. aerogenosa	-	6	7	7
S. aureus	8	15	15	18



الشكل 44: أعمدة بيانية تمثل أقطار مناطق التثبيط (ملم) للمستخلص المزيج للرمان الحامض.

من خلال الجدول 18 والشكل 44 نلاحظ أن المستخلص المائي للرمان الحامض عند E. coli كان أعلى قطر تثبيط في التركيز 20 mg/ml قدر بـ9mm أما بالنسبة للتراكيز10mg/ml و 15 بلغ قطر التثبيط8mm بينما لم يظهر أي قطر تثبيط عند التركيز 5mg/ml.

أما عند P. aerogensa أعلى قطر تثبيط في التركيز 20 mg/ml و15 بلغ7mm بينما التركيز 10mg/ml بلغ قطر التثبيط 6mm أما بالنسبة للتراكيز 5mg/ml لم يظهر أي قطر تثبيط.

أما عند S.aureus كان أعلى قطر تثبيط في التركيز 20 mg/ml قدر بـ18mm أما بالنسبة للتراكيز 15 mg/ml و10 بلغ قطر التثبيط 15mmبينما التركيز 5mg/ml بلغ قطر التثبيط8mm.

ومنه يمكن القول أن S.aureus حساسة للمستخلص المزيج للرمان الحامض.

ومن هنا نستطيع القول بأنه كلمت زاد التركيز زادت الفعالية المضادة للبكتريا.

الخاتمة

الخاتمة

ازداد الاهتمام اليوم بالنباتات الطبية على الرغم من التطور الحاصل في العلوم الطبية بمختلف تخصصاتها إذ نلاحظ تفضيل استخدامها على استعمال المستحضرات الكيميائية المصنعة، ومن بين هذه النباتات الأكثر استعمالا في منطقتنا هو نبات الرمان *Punica granatum*.L لاحتوائه على العديد من المركبات الفعالة، كما أن له فوائد علاجية كثيرة منها ما أثبتها العلم وأخرى لازالت قيد البحث، لهذا السبب قمنا بهذه الدراسة لجزء مهم جدا لهذا النبات ألا وهو حبوب الرمان لاختبار الفعالية المضادة للبكتيريا.

للكشف عن التركيب الكيميائي لحبوب الرمان الحلو والحامض قمنا بتحضير ثلاث مستخلصات لكلاهما، مستخلص إيثانولي (بالغليان)، مستخلص مائي(بالنقع)، مستخلص مزيج (ايثانول+ماء، بالنقع) اذ كان اعلى مردود في المستخلص المائي للرمان الحلو والمقدرة بـ68.75% وأقل مردود في المستخلص المائي للرمان الحامض بنسبة 25.02%.

المستخلصات المتحصل عليها تحوي على نسبة من المركبات الفينولية ولتقديرها إستعنا بجهاز مطيافية الأشعة فوق بنفسجية–المرئية (UV-visible)، تم تقدير كمية الفينولات الكلية استعمال كاشف Folin وكاشف كلوريد الأمونيوم $AlCl_3$ لتقدير كمية الفلافونيدات حيث أظهرت النتائج تفوق المستخلص المزيج(ايثانول+ماء) للرمان الحامض في كمية المركبات الفينولية الفلافونيدات عن باقي المستخلصات اذ قدرت كمية الفينولات الفلافونيدات بـ (349 mg/g، 25.8 mg/g).

ومن أجل تدعيم الفعالية البيولوجية قمنا باختبار الفعالية المضادة للأكسدة، حيث استعملنا طريقتين وهما اختبار DPPH واختبار TAC (موليبيدات الفوسفات) وقد تبين في كلا الطريقتين نشاطية معتبرة للمستخلصات، فيما يخص DPPH أظهرت النتائج ان المستخلص المزيج للرمان الحامض لديه فعالية أكبر في تثبيط الجذر $DPPH^{\bullet}$ حيث قدرت قيمة (IC_{50}) بـ 0.0601g/l أما بالنسبة للـــ TACكان المستخلص المائي للرمان الحامض الفعالية الأكبر في إرجاع موليبيدات الفوسفات والمقدرة بـ512mg/g.

أما دراسة الفعالية البيولوجية للمستخلصات السابقة استعملنا أنوع من سلالات بكتيرية مختلفة مزروعة في وسط(MH) وهذا بالاعتماد على طريقة الانتشار بالأقراص، حيث يتم تحديد اقطار التثبيط لمختلف التراكيز للمستخلصات، أظهرت هذه المستخلصات فعالية متفاوتة لكل مستخلص حيث أظهرت فعالية أكبر عند التراكيز العالية خاصة لمستخلصات الرمان الحامض ضد بكتيريا S. aureus بلغ أكبر قطر تثبيط

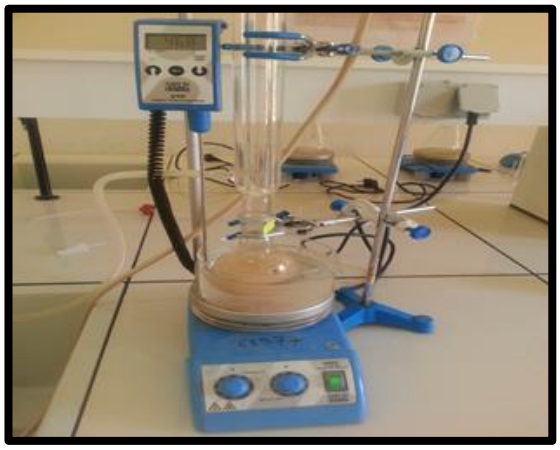
الخاتمة

19mm في المستخلص الإيثانولي على عكس مستخلصات الرمان الحلو لم تظهر فعالية إلا عند التركيز 20mg/ml للمستخلص الإيثانولي والمائي.

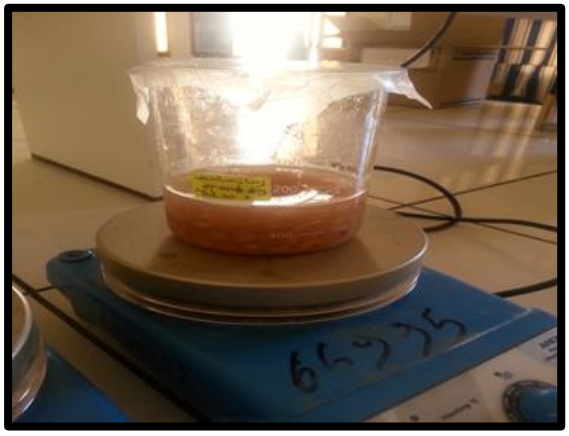
انطلاقا من هذه النتائج استنتجنا أن الفعالية المضادة للبكتيريا لحبوب الرمان الحامض أكبر منها بالنسبة لحبوب الرمان الحلو، وهذا قد يكون راجع لبعض المركبات الموجودة في الرمان الحامض ولا يمكن التأكيد على أن هذه المركبات تعود لها هذه الخاصية، لذلك وجب التعمق أكثر وطرح مشاريع بحث لاستكمال هذه الدراسة مستقبلا لتحديد المركبات التي تلعب دورا هاما في هذه الفعالية.

الملاحق

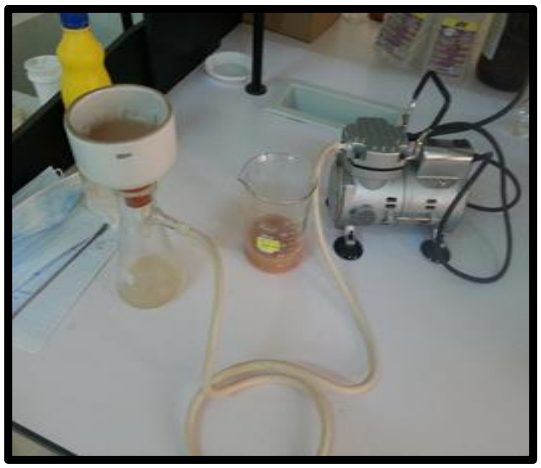
الملاحق



الاستخلاص بالغليان



الاستخلاص بالنقع



الترشيح تحت الفراغ

جهاز UV-visible

الميزان الحساس

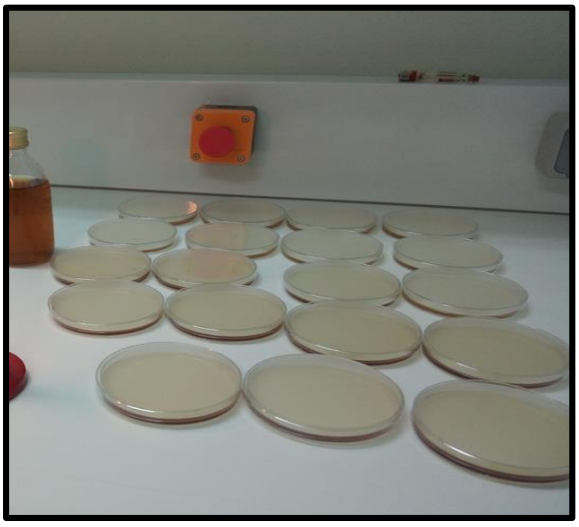
جهاز المبخر الدوراني

حاضنة

موقد بنزن

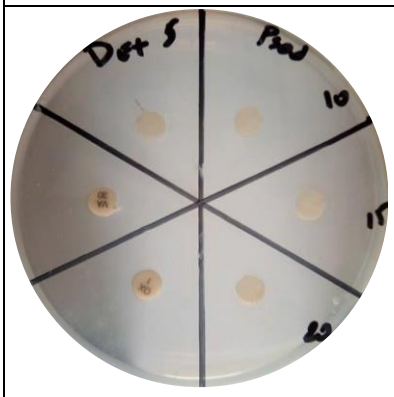
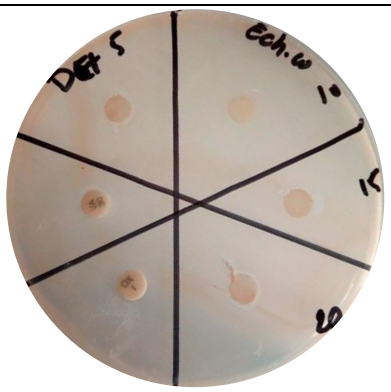
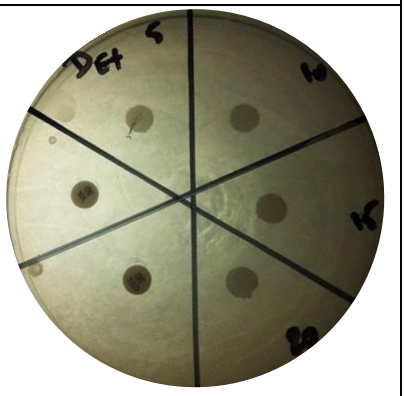
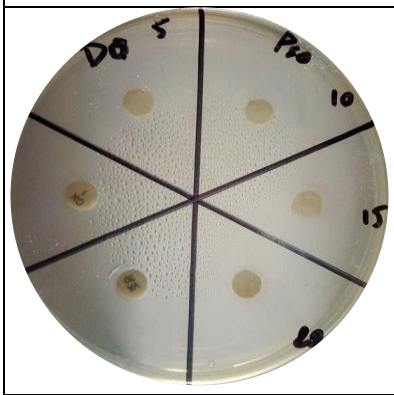
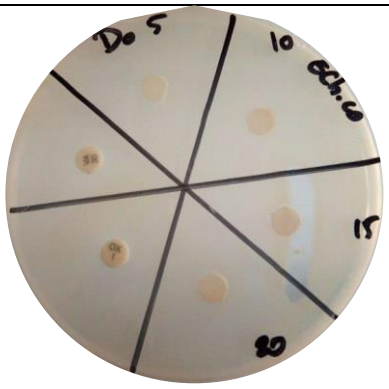
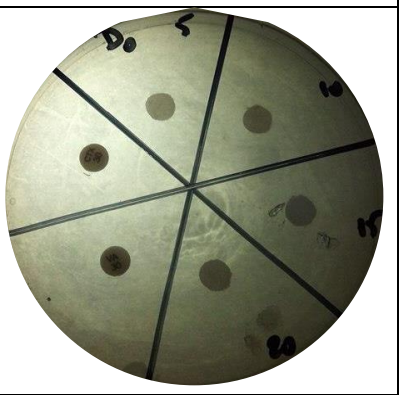
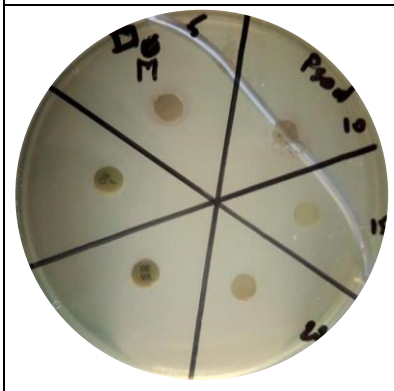
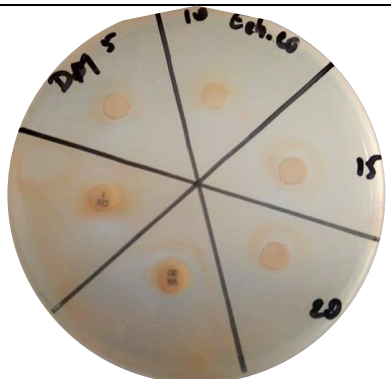
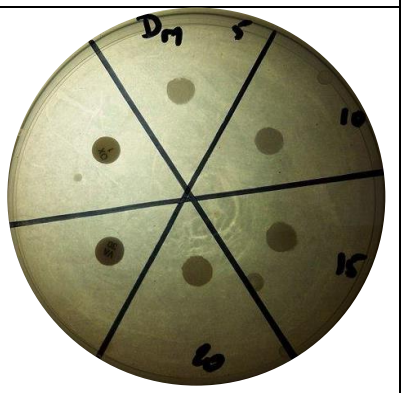
أقراص Whattman معقمة

جهاز التعقيم

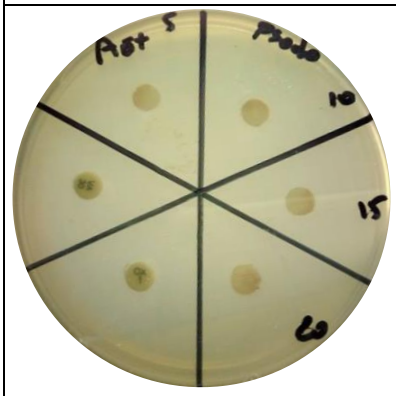
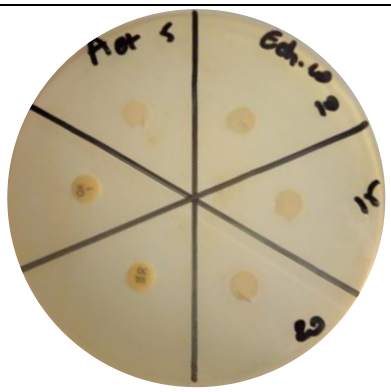
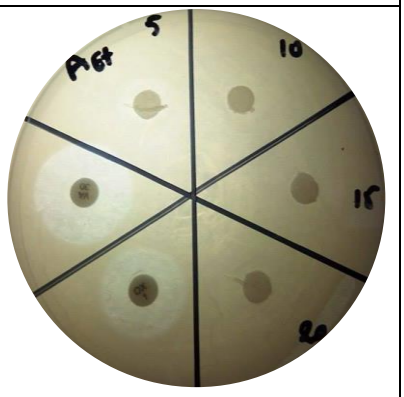
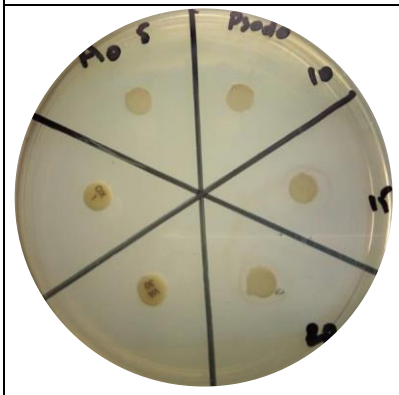
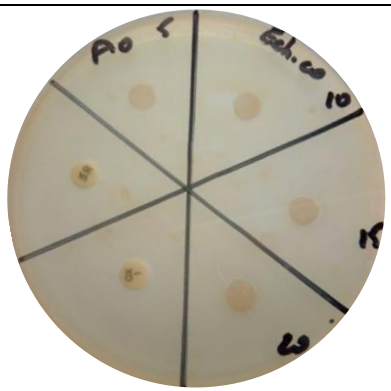
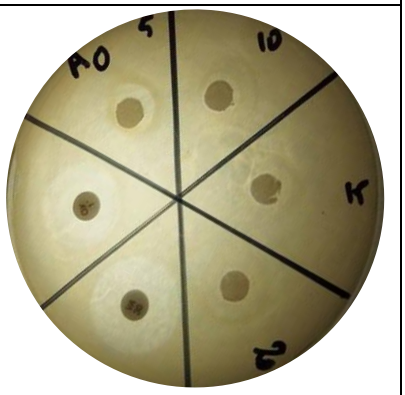
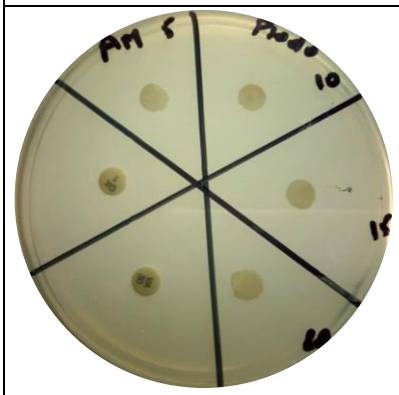
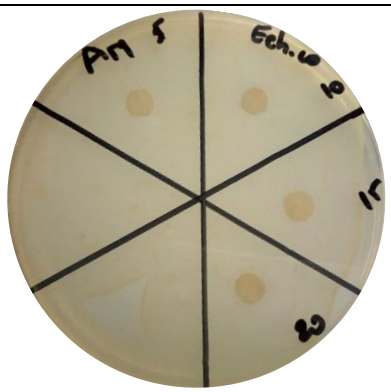
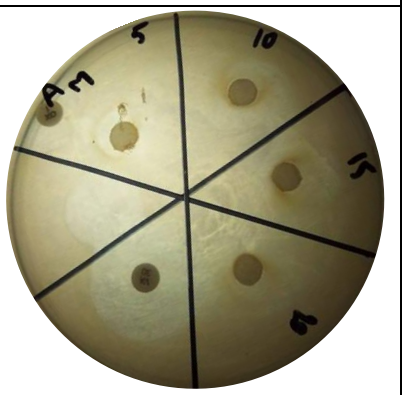


تحضير الاوساط

ملحق 2: يوضح الأقطار التثبيطية للبكتيريا في مختلف مستخلصات الرمان الحلو

المستخلص الايثانولي		
		
P. aerogenosa	***E. coli***	***S. aureus***
المستخلص المائي		
		
P. aerogenosa	***E. coli***	***S. aureus***
المستخلص المزيج		
		
P. aerogenosa	***E. coli***	***S. aureus***

ملحق 3: يوضح الأقطار التثبيطية للبكتيريا في مختلف مستخلصات الرمان الحامض

المستخلص الايثانولي		
		
P. aerogenosa	***E. coli***	***S. aureus***
المستخلص المائي		
		
P. aerogenosa	***E. coli***	***S. aureus***
المستخلص المزيج		
		
P. aerogenosa	***E. coli***	***S. aureus***

تم بحمد الله

ملخص

تمت دراسة الفاعلية البيولوجية لمستخلصات حبوب الرمان*Punica granatum*.L بنوعيه الحامض و الحلو والمتمثلة في دراسة مواد الأيض الثانوي والفعالية المضادة للأكسدة وكذا الفعالية المضادة للبكتيريا، وذلك من خلال المقارنة بين المستخلصات (ايثانول– ماء– مزيج (ايثانول+ماء)).

توصلنا من خلال هذه الدراسة إلى أن حبوب الرمان غنية بمواد الأيض الثانوي والمتمثلة في عديدات الفينول والفلافونيدات وتم كذلك تحديدا الفاعلية المضادة للأكسدة للمستخلصات السابقة باستخدام DPPH و TACحيث كانت اقوى قيمة في المستخلص المزيج للرمان الحامض بالنسبة لـ DPPH المقدرة بـg/l 0.0601 والمستخلص المائي بالنسبة لـ TACوالمقدرة بـ mg/g 512

أما عن الفعالية التثبيطية للبكتيريا، فوجدنا السلالات البكتيرية كانت حساسة لمختلف المستخلصات حيث المستخلص الأكثر فعالية ضد البكتيريا كان المستخلص الإيثانولي لحبوب الرمان الحامض و كان قطر التثبيط 19mmعند البكتيريا S. aureus، و يمكن ملاحظة أن حبوب الرمان الحامض اكثر فعالية ضد البكتيريا من حبوب الرمان الحلو.

الكلمات المفتاحية: مستخلصات حبوب الرمان، الأيض الثانوي، السلالات البكتيرية.

Abstract

The study of secondary metabolites and antioxidant efficacy as well as anti-bacterial efficacy by comparing the extracts (ethanol-water-mixture (ethanol + water)).

of Punica granatum .L seeds both sweet and sour variants.

In this study we found that pomegranate seeds are rich in secondary metabolites of polyphenols and flavonoids. In addition, the antioxidant efficacy of the previous extracts has been determined using DPPH and TAC. The highest value in the extract was the sour pomegranate for DPPH, 0.0601 g/l, and water extracts for TAC and estimated at

512 mg / g

As for the effectiveness of the extracts in terms of their ability to inhibit bacteria, we found that bacterial strains were sensitive to the various extracts. However, the ethanol extract was the most effective when used against the bacteria S. aureus with a damping diameter of 19mm.

We may conclude that sour pomegranate seeds are more effective against bacteria then sweet pomegranate seeds.

Key words: pomegranate seeds extracts, secondary metabolism, bacterial strains.