

تأثير المستخلص المائي لقشور ثمرة نبات الرمان *Punica granatum* في

نمو الطحلب *Oscillatoria amoena*

حيدر عبد الواحد مالك الغانمي

قسم علوم الحياة/ كلية التربية/ جامعة القادسية

استلم البحث في : 1/كانون الاول/2014 ، قبل البحث في : 15/اذار/2015

الخلاصة

تناولت الدراسة الحالية بيان اثر المستخلص المائي لقشور نبات الرمان في نمو طحلب *Oscillatoria amoena*، والمعزول من نهر الديوانية و العائد إلى شعبة الطحالب الخضراء المزرقه ، إذ تم قياس تأثير المستخلص في الطحلب من خلال حساب العدد الكلي للخلايا وقيم الامتصاصية للطحلب.

استعملت التراكيز 3.5، 7 و 14 ملغم/مل من مستخلص قشور ثمرة نبات الرمان فضلا عن مجموعة السيطرة (Control). أظهرت النتائج أن تعريض الطحلب إلى التركيز 14 ملغم/مل أدى إلى انخفاض النمو بشكل حاد، أما التراكيز الأخرى 3.5، 7 ملغم/مل فقد انخفض فيها النمو أيضا وبشكل تدريجي. أما قيم الامتصاصية فقد أظهرت انخفاضا ينسجم مع عدد الخلايا خلال مدة التعريض.

الكلمات المفتاحية: مستخلص نباتي، رمان، *Oscillatoria amoena*

المقدمة

استعملت النباتات منذ مدة طويلة من الزمن كمصدر مفضل للعلاجات الطبيعية لديمومة صحة الإنسان، ومؤخراً قد أجريت دراسات مكثفة حول تلك النباتات. وطبقاً لتقارير منظمة الصحة العالمية، التي أكدت على أن النباتات الطبية هي أفضل مصدر للحصول على العديد من الأدوية [1، 2]. أن حوالي 80% من سكان البلدان المتطورة يستعملون الأعشاب التقليدية التي تتألف من مكونات مشتقة من نباتات طبية، مما يتطلب المزيد من البحث من أجل فهم أعمق لخصائصها وتأثيراتها العلاجية [3].

تحتوي النباتات والأعشاب الطبية على مواد كيميائية ذات فائدة واضحة تسهم في علاج الأمراض التي تصيب الإنسان والحيوان وتشمل الزيوت الطيارة والكلايكوسيدات والصابونيات والتانينات والقلويدات والدهون والسكريات والراتنجات والاستيرويدات [4]، ومن بين تلك النباتات ذات الأهمية الطبية قشرة نبات ثمار الرمان الاسم العربي له: رمان، والاسم الانكليزي: Pomegranate، والاسم اللاتيني (العلمي): *Punica granatum L.* ينتمي نبات الرمان الى العائلة الرمانية Punicaceae وهو من الأشجار النفضية التي تنمو إلى ارتفاعات تصل 5-8 متر وتعد من النباتات المقاومة للظروف البيئية إذ تنتشر زراعتها من جنوب شرق أوروبا إلى شرق آسيا [5]. تحتوي العائلة الرمانية على جنس واحد هو *Punica L.* ويزرع نوع واحد في العراق هو *Punica granatum* [6].

تحتوي جميع أجزاء شجرة الرمان على التانين التي تستعمل كمادة قابضة (Astringent) فضلاً عن المواد البروتينية والسكرية والمعادن كالفسفور والحديد والكبريت واليوتاسيوم [7]. وذكر [8] بأن قشرة ثمار الرمان تحتوي على التانين Tannin والراتنج Resin والسكر Sugar والقلويدات Alkaloids، وتستعمل في حالات الإسهال والزحار وطرود الديدان لاسيما الديدان الشريطية. واستعملت من قبل الأوربيين كمحلول غرغرة [6]. تعد الطحالب مجموعة من الكائنات الحية التي تتراوح من الخلية الوحيدة الشكل إلى الأعشاب البحرية العملاقة وهي متواجدة في كل مكان وفي أغلب الأحيان تسبب طعماً ورائحة غير مستساغة في الماء الصالح للشرب بسبب إطلاق المركبات الكيميائية أما من الخلايا الحية أو من تلك الخلايا الميتة أو المتفسخة [9].

والطحالب الخضر المزرقّة أحد الشعب الطحلبية، التي تكون مسؤولة عن أغلب التأثيرات غير مناسبة في المياه كالتطعم والرائحة و انسداد مرشحات محطات تصفية المياه و قلة الأوكسجين و السمية و لهذه الأنواع القدرة على إنتاج مواد تعطي طعماً عفناً إلى المياه مثل geosmin و 2-methylisoborneol (2-MIB)، التي تعد من المركبات التربينية terpenoids المتطايرة [10]، ويعد طحلب *Oscillatoria amoena* من الطحالب الخضر المزرقّة المنتجة لهذه المركبات في المياه [11، 12]

طرائق العمل

الوسط ألزري المستعمل لتنمية الطحلب

استعمل الوسط ألزري BG-11 والمحور من قبل [13] لتنمية العزلة الطحلبية (جدول 1). حضر الوسط ألزري بشكل محاليل خزينة Stock solution حفظت بدرجة حرارة 4°C في الثلاجة وبدون تعقيم لحين استعمالها، حيث تم خلط كميات محددة منها عند تحضير الوسط ألزري وأكمل الحجم بالماء المقطر حسب الحجم المطلوب ثم عقم الوسط ألزري بعد ذلك باستعمال جهاز المؤصدة Autoclave بدرجة حرارة 121°C وضغط 1.5 باوند/انج ولمدة 15 دقيقة وعدل الرقم الهيدروجيني إلى 7.1 بعد تبريد المحلول لتجنب حصول الترسيب.

عزل وتنقية الطحلب

تم عزل الطحلب المدروس *Oscillatoria amoena* (اللوحة 1) من نهر الديوانية ولغرض الحصول على مزرعة وحيدة الطحلب Unialgal Culture استعملت الطريقة الموضحة من قبل [14] إذ تم اخذ خيط واحد من العينة بواسطة ماصة باستور محورة Pasteur pipette باستعمال مجهر ضوئي مقنوب ونقلت إلى قطرة معقمة وكررت العملية لحين الحصول على طحلب وحيد (Optika/Italy).

تم تنقية مزارع وحيدة الطحلب من الجراثيم وفقاً إلى [15] التي تتضمن: الغسل بواسطة الطرد المركزي، حيث فصلت الجراثيم عن الطحالب بواسطة الطرد المركزي والغسل بالوسط ألزري المعقم، وجرت عملية الطرد المركزي للعينة بسرعة 3000 دورة / دقيقة لمدة 5 دقائق، ثم أزيل الراشح ووضع بدله ماء مقطر معقم إلى الراشب (الخلايا الطحلبية)، أعيدت هذه العملية 12 مرة على الأقل. وللتأكد من نقاء العزلة من التلوث زرعت في طبق بتري يحتوي على وسط الاكار المغذي Nutrients Agar وحضن لمدة 24 ساعة في 37°C [13]

اعتمدت المصادر [16] و [17] في تشخيص الطحلب *Oscillatoria amoena*: والمبين تصنيفه ادناه:

Division : Cyanophyta

Class : Cyanophyceae

Order : Oscillatoriales

Family : Oscillatoriaceae

Species : *Oscillatoria amoena*

جمع العينات النباتية وتحضير المستخلص المائي :

جمعت عينات نبات الرمان من السوق المحلية في مدينة الديوانية، وشخصت من قبل أ.م.د. سهيلة حسين باجي المختصة بعلم التصنيف في قسم علوم الحياة- كلية التربية - جامعة القادسية . فصلت القشرة وتركزت في المختبر لمدة أسبوع واحد بدرجة 25 °م لغرض تجفيفها. استعملت مطحنة كهربائية لطحن القشرة والحصول على مسحوق حفظ في قناني زجاجية، بعدها اخذ 15 غم من مسحوق قشرة ثمار الرمان وأضيف إليه 100مل من الماء المقطر، وضع المزيج في الحاضنة الهزازة بدرجة 37 °م ولمدة 24 ساعة . رشح المستخلص باستعمال أوراق ترشيح (Whatman no.1,2,3)، نبذ الراشح بجهاز النبذ المركزي لمدة 10 دقائق بالسرعة 2500 دورة/دقيقة، جفف المستخلص في الحاضنة بدرجة حرارة 37 °م لمدة 72 ساعة للحصول على مسحوق جاف [18].

قياس نمو الطحلب

حضنت المزارع الحاوية على الطحلب (250مل) في الحاضنة الضوئية تحت شدة إضاءة 27 مايكروانشتاين/متر²/ثا وبدرجة حرارة 25 °م. أخذت القراءات يوميا من خلال طريقة العدد الكلي للخلايا باستعمال شريحة الهيماسايتوميتر (Heamacytometer)، وذلك بوضع 1مل من العينة بعد رجها جيدا على سطح كل ردهة من ردهتي شريحة العد، ثم وضع غطاء الشريحة وفحصت تحت المجهر عند قوة تكبير X40 باستعمال طريقة القطاع المستعرض Transect الموضحة من قبل [19]، وذلك بحساب الخيط الطحلي الواحد على انه خلية واحدة. إما الكثافة الضوئية Optical density فقد استعمل جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer نوع (UV-Visible Apple, Japan) على طول موجي 750 نانومتر لقياس كثافة الخلايا للنماذج يوميا ولمدة 14 يوما إذ تم تصفير الجهاز على الوسط الزرعي BG-11 قبل المعاملة بالطحلب [20] كما في الشكل (1 و 2).

تأثير المستخلص في نمو الطحلب:

استعملت ثلاثة تراكيز من المستخلص المائي لقشور ثمرة الرمان وهي 3.5، 7 و 14 ملغم/مل فضلا عن مجموعة السيطرة (Control)، وبواقع ثلاثة مكررات لكل تركيز. حضنت المزارع في حاضنة ضوئية تحت شدة إضاءة 27 مايكروانشتاين/متر² وبدرجة حرارة 25 °م [21].

النتائج والمناقشة

أظهرت نتائج الفحص الحيوي شكل (3 و 4) انه عند تعريض الطحلب إلى تراكيز مختلفة من المستخلص المائي لقشور نبات الرمان (3.5، 7 و 14) ملغم/مل وجود اختلافات في أعداد خلايا الطحلب لهذه التراكيز مقارنة مع معاملة السيطرة، فكان من الملاحظ عند متابعة نمو الطحلب أثناء مدة المعاملة إذ جمعت العينات للفحص ابتداء من اليوم الرابع (بداية الطور الأسّي) اعتماداً على وحدة السيطرة للطحلب التي تم تحديد منحني النمو لها سابقاً كما في الشكل (1 و 2) في حصول انخفاض في عدد الخلايا الكلي مقارنة بمعاملة السيطرة ومنذ اليوم الرابع من التعريض وبلغ هذا الانخفاض ذروته في اليوم الثامن، وقد لوحظ ان شدة الانخفاض ازدادت بزيادة التركيز للمعاملات فظهر اقصى انخفاض عند التركيز (14) ملغم/مل في اليوم الثامن من التعريض. أما قيم الامتصاصية فقد أظهرت انخفاضا مماثلا لعدد الخلايا خلال مدة التعريض التي امتدت إلى اليوم الثامن، إذ أن التجربة توقفت في اليوم الثامن بسبب الانخفاض الحاد في نمو الطحلب وعند التركيز 14 ملغم/مل. يلاحظ بصورة عامة بان المكونات الفعالة للنباتات الطبية يتفاوت تأثيرها اعتمادا على التراكيز المستعملة من المستخلصات وأعداد الكائنات الخاضعة للفحص، فضلاً عن ظروف إجراء التجربة [22].

ان التأثير الفعال للمستخلص المائي لقشرة ثمار نبات الرمان بشكل عام ربما يعود إلى احتوائها على مادة التانين (Tannin)، فقد ذكر [23] ان الصفات الدوائية الموجودة في الرمان تعود الى مادة التانين، ويمكن تفسير آلية عمل التانينات والمركبات الفينولية الموجودة في قشرة ثمار الرمان على قابليتها لترسيب البروتينات الموجودة في الغشاء الخلوي او في داخل الخلية الحية عند نفاذها من خلال الغشاء وتكوين أو اصر هيدروجينية بين مجاميع الهيدروكسيل الفينولية الحرة والمتعددة (Phenolic hydroxyl) والمركبات النيتروجينية او البروتينات ومن ثم تثبط فعالية بعض الانزيمات الضرورية في الكائن الحي وان أكثر التانينات تعقيدا تلك الموجودة في الرمان والتوت البري [24].

كما ذكر [25] ان لحامض التانيك الذي هو نوع من أنواع التانينات ذو تأثير تثبيطي في نمو نوعين من الهائمت النباتية *Dunaliella salina* و *Skeletonema costatum* المعزولة من بحيرة سيلستون شمال خليج المكسيك عند استعمال خمسة تراكيز من حامض التانيك 3، 6، 12، 16 و 20 ملغم/لتر إذ لاحظوا ان التركيز الأعلى 20 ملغم/لتر هو الأكثر تثبيطا" لنمو هذين الطحليين. كذلك تؤثر التانينات في فعالية انزيم الفوسفاتيز القاعدي Alkaline phosphatase مثل Ellagic acid الذي يثبط عمل هذا الإنزيم المهم بالنسبة للطحالب إذ يساعد الطحلب في الحصول على الفوسفات من المركبات الفسفورية العضوية في البيئة المحيطة [26].

أما الطريقة الأخرى التي تفسر الفعل التثبيطي للتانينات من خلال ارتباطها مع ايون الحديدوز وهذا الارتباط يكون أقوى مع المركبات الفينولية المتعددة Polyphenols مما هو عليه في المركبات الفينولية البسيطة وبذلك قد يصبح الحديد عاملا محددا لنمو الطحالب لاسيما في بحيرات المياه العسرة [27]. كما تعمل التانينات على انها منظّعات نمو قد تحفز او تثبط النمو حيث لوحظ أنها تؤثر في عملية تحطيم الأوكسجين من قبل الانزيمات المؤكسدة وان الفينولات التي تحتوى على مجموعتين من الهيدروكسيل (OH) تعمل كمثبطات للنمو، وبهذا فهي تعمل على عدم التفاعل مع الأوكسجين غير ان

الفينولات الحاوية على مجموعة هيدروكسيل واحدة تعمل على تحطيم الأوكسجين وبذلك تفسح مجالا لأنزيمات الأكسدة لأداء دورها [28].

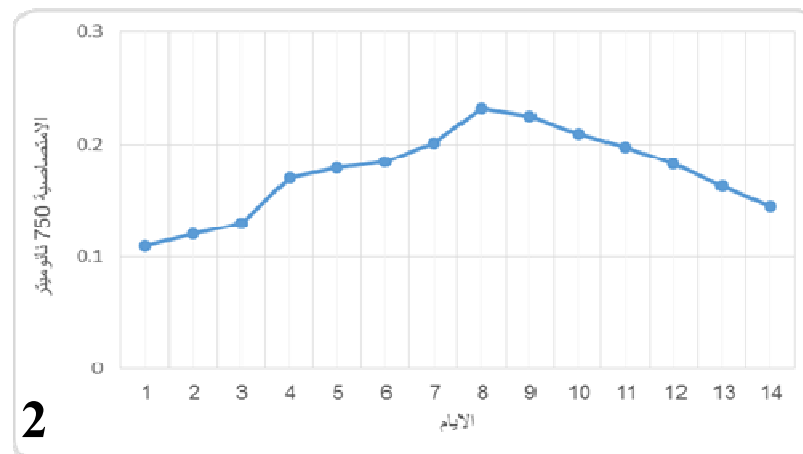
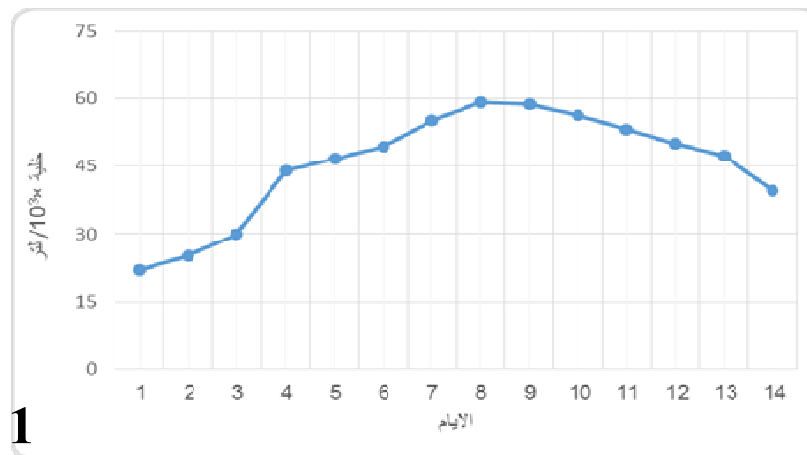
المصادر

1. Santos, P.R.V.; Oliveira, A.C.X. and Tomassini, T.C.B. (1995). Controle microbiológico de produtos fitoterápicos. Rev. Farm. Bioquim., 31: 35-38.
2. Nascimento, G.G.F.; Locatelli, J.; Freitas, P. C. and Silva, G. L.(2000). Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. Braz. J. Microbiol., 31(4): 247-256.
3. Ellof, J. N. (1998). Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants?, J. Ethnopharmacol., 60(1): 1-8.
4. المنظمة العربية للتنمية الزراعية (1988). النباتات الطبية والعطرية والسامة في الوطن العربي. جامعة الدول العربية، الخرطوم.
5. Duke, J. (2003). Phytochemical and ethnobotanical data bases. Agricultural Research Service, www.ars-grin. Gov.
6. Townsend, C.C. and Guest, E. (1980). Flora of Iraq. The botany directorate, ministry of agriculture and agrarian reform, Vol. 4. Baghdad, Iraq.
7. حسين، فوزي طه قطب (1979). النباتات الطبية: زراعتها ومكوناتها. الدار العربية للكتاب، تونس.
8. Al-Rawi, A. and Chakravarty, H.L. (1988). Medicinal plants of Iraq. 2nd ed. Ministry of Agriculture and Irrigation, Baghdad.
9. Hawkins, P. R.; Runnegar, M. T.; Jackson, A .R. and Falconer I.R. (1985). Severe hepatotoxicity caused by the tropical Cyanobacterium (blue-green alga) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju isolated from a domestic water supply reservoir.. Appl. Environ. Microbiol., 50(5): 1292-1295.
10. Palumbo, F.; Ziglio, G. and Der Beken ,A.V.(2002) Detection Methods for Algae, Protozoa and Helminths in Fresh and Drinking Water. John Wiley and Sons Ltd. Baffins Lane, Chichester, West Sussex PO19 1UD, England. 1-15p.
11. Tsuchiya, Y., Matsumoto, A., and Okamoto, T.(1981). Identification of volatile metabolites produced by blue- green algae, *Oscillatoria splendida*, *O. amoena*, *O. geminata*, and *Aphanizomenon* species. J. Pharm. Soc. Jpn. Yakugaku Zasshi 101:852–856.
12. Jüttner, F. and Watson, S.B. (2007). Biochemical and Ecological Control of Geosmin and 2-Methylisoborneol in Source Waters. Appl. Environ. Microbiol., 73(14): 4395-4406.
13. Rippka, R.; Deruelles, J.; Waterbury, J.B.; Herdman, M. and Stanier, R.Y. (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria, J.Gen. Microbiol.,111(1):1-61.
14. Rippka, R. (1988). Isolation and purification of cyanobacteria: Methods In Enzymology, Academic Press, Inc., 167:3-27.
15. Wiedeman, V. E. ;Walne , P. L. and Trainor, F.R. (1964). A new technique for obtaining axenic culture of algae. Can. J. Bot. 42(7): 958-959.
16. Desikachary, T.V.(1959).Cyanophyta. New Delhi, London Acad. press 686p.
17. Prescott, G.W. (1973). Algae of the western Great Lakes Area. William,C., Brown, Co. Pub., Dubuque, Iowa., 977p.
18. Fehri, B.; Aiache, J.; Memmi, A.; Korbi, S. and Lamaison, J. (1994). Hypotension, Hypoglycemia, hypouricemia recorded after repeated administration of aqueous leaf extract of *Olea europaea*. J. Pharm. Belg. 49 (2): 101-109.
19. Martinez , M. R.; Chakross , R. and Pandpanastico , J.P. (1975) Notes on phytoplankton Technique Using Haemocytometer. Phil. Agric. 59: 1-12.

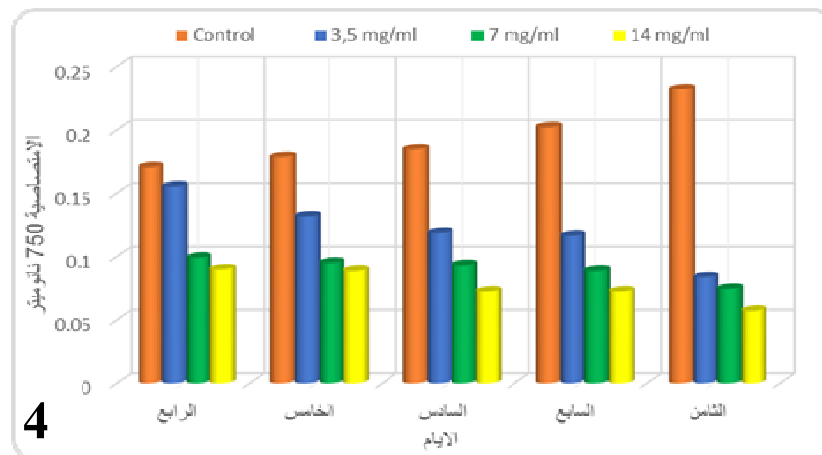
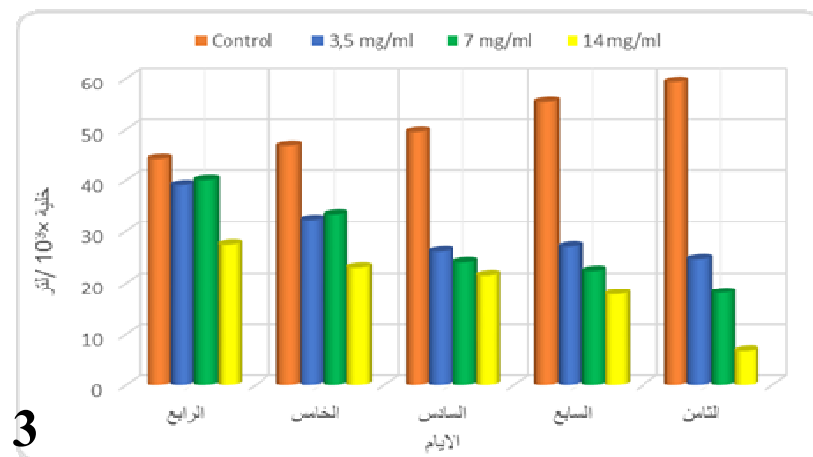
- Ernst, A.; Deicher, M.; Herman, P. M. J. and Wollenzien, U. I. A. (2005). Nitrate and Phosphate Affect Cultivability of Cyanobacteria from Environments with Low Nutrient Levels. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(6): 3379-3383.
- Andersen, R. A. (2005). *Algal Culturing Techniques*. Physiological Society of America, Elsevier Academic press, 589P.
- Varel, I. and Vincent, H. (2002). Carvacrol and thymol reduce swine waste odor and pathogens: stability of oils. *Curr. Microbiol.*, 44: 38-43.
- Segura, J. J.; Morales-Ramos, L. H.; Verde-Star, J. and Guerra, D. (1990). Inhibición del crecimiento de *Entamoeba histolytica* Y, E. invadens producida por la raíz del granado (*Punica granatum* L.). *Arch. Invest. Med. (Mex.)*, 21:235-239.
- Barrett, A. and Ndou, T. (2013) Inhibition of α -Amylase and Glucoamylase by Tannins Extracted from Cocoa, Pomegranates, Cranberries, and Grapes *J. Agric. Food Chem.*, 61 (7), 1477–1486.
- Herrera-Silveira, J.A. and Ramfrez-Ramfrez, J.(1996). Effects of natural phenolic material (tannin) on phytoplankton growth *Limnol. Oceanogr.*, 41(5):1018-1023.
- Wetzel, R. G.(2001) *Limnology: Lake and River Ecosystems* .3rd ed. Elsevier Science (USA).
- Gross, E. M. and Sütfield, R.(1994). Polyphenols with algicidal activity in the submerged macrophyte *Myriophyllum Spicatum* L., *Acta. Hortic* . 381:710-716
28. كيرك، ديفيد(1988). علوم الحياة اليوم. ترجمة (محمد سليم صالح وجماعته) الجزء الثاني. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة الموصل.

جدول رقم (1): مكونات الوسط الزراعي BG-11 المستعمل لتنمية الطحلب الأخضر المزرق

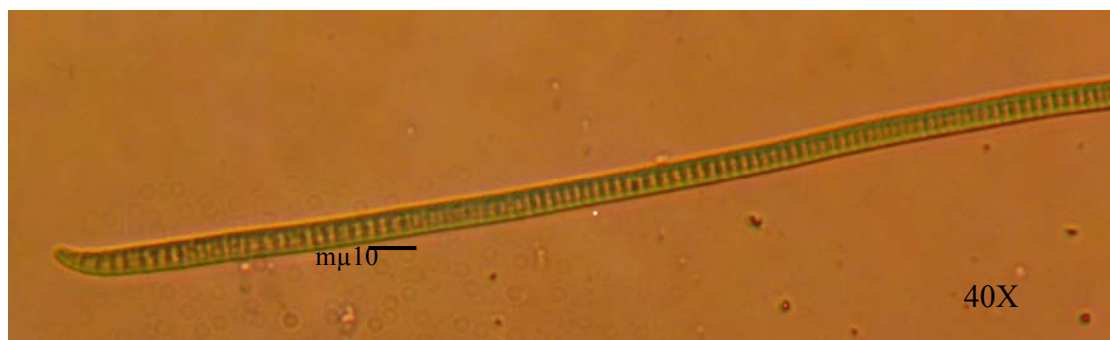
Compound	Stock	ml/Liter	Trace Metal	Amount
NaNO ₃	150 g/l	10 ml	H ₃ BO ₃	2.86
K ₂ HPO ₄	40 g/l	1 ml	MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.81
MgSO ₄ ·7H ₂ O	75 g/l	1 ml	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.222
CaCl ₂ ·2H ₂ O	36 g/l	1 ml	NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0.39
Citric acid	6 g/l	1 ml	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.079
Ferric ammonium	6 g/l	1 ml	Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0.04
EDTA (disodium salt)	1 g/l	1 ml	Distilled	1.0 l
Na ₂ CO ₃	20 g/l	1 ml		
Trace metal mix A5	see blow	1 ml		
Agar(if needed)	-	12 g		



شكل رقم (1 و 2) : منحنى النمو للطحلب *Oscillatoria amoena* بوساطة: أ: طريقة العد الكلي (خلية $\times 10^3$ /لتر) ب: الكثافة الضوئية



شكل رقم (3 و4): تأثير مستخلص قشور ثمرة نبات الرمان في: أ: العدد الكلي لخلايا طحلب *Oscillatoria amoena* (خلية $\times 10^3$ / لتر) ب: قيم الامتصاصية لخلايا طحلب *Oscillatoria amoena*



لوحة رقم (1): الطحلب الاخضر المزرق *Oscillatoria amoena* المعزول من نهر الديوانية



Effect of Aqueous Extract of Pomegranate Fruit Peel *Punica granatum* on the growth of *Oscillatoria amoena*

Haider A. Al-Ghanmi

Dept. of Biology \ College of Education \ University of Al- Qadisiya

Received in :1/December/2015 , Accepted in :15/March/2015

Abstract

The current study dealt with the effect of water extract of pomegranate peel plant on *Oscillatoria amoena* growth that isolated from Diwaniya river, The effect of the pomegranate extract was measured by calculating the total number of cells and the absorbance values of the alga.

Three concentrations were used 3.5, 7 and 14 mg/ml from extract of pomegranate fruit peel in addition to the control group. The results showed that exposing the alga to concentrate 14 mg/ml led to lower growth sharply, while the rest of the concentrations 3.5 and 7 mg/ml also decreased the growth gradually. The absorbance values showed a decline similar to the number of cells during the period of the exposure.

Keywords: Plant extract, Pomegranate, *Oscillatoria amoena*