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 : ١/كانون الاول/٢٠١٤ ،قبل البحث في :١٥/اذار/٢٠١٥

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 المزرقة ، إذ تم قياس تأثير المستخلص في الطحلب من خلال حساب العدد الكلي للخلايا وقيم الامتصاصية للطحلب.

استعملت التراكيز ٣,٥، ٧ و١٤ ملغم/مل من مستخلص قشور ثمرة نبات الرمان فضلا عن مجموعة السيطرة (Control). أظهرت النتائج أن تعريض الطحلب إلى التركيز ١٤ ملغم/مل أدى إلى انخفاض النمو بشكل حاد، أما التراكيز الاخرى ٣,٥، ٧ 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 [١، ٢] . أن حوالي ٨٠% من سكان البلدان المتطورة يستعملون الإعشاب التقليدية التي تتألف من مكونات مشتقة من نباتات طبية، مما يتطلب المزيد من البحث من أجل فهم أعمق لخصائصها وتأثيراتها العلاجية [٣].

تحتوي النباتات والأعشاب الطبية على مواد كيمياوية ذات فائدة واضحة تسهم في علاج الأمراض التي تصيب الإنسان والحيوان وتشمل الزيوت الطيارة والكلايكوسيدات والصابونيات والتانينات والقلويدات والدهون والسكريات والراتنجات والاستيرولات [٤]، 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 ٥-٨ متر وتعد من النباتات المقاومة للظروف البيئية إذ تنتشر زراعتها من جنوب شرق أوربا إلى شرق آسيا [٥]. تحتوي العائلة الرمانية على جنس واحد هو *Punica* L. ويزرع نوع واحد في العراق هو *Punica granatum* [٦].

تحتوي جميع أجزاء شجرة الرمان على التانين التي تستعمل كمادة قابضة (Astringent) فضلاً عن المواد البروتينية والسكرية والمعادن كالفسفور والحديد والكبريت والبوتاسيوم [٧]. وذكر [٨] بأن قشرة ثمار الرمان تحتوي على التانين Tannin والراتنج Resin والسكر Sugar والقلويدات Alkaloids، وتستعمل في حالات الإسهال والزحار وطرد الديدان لاسيما الديدان الشريطية. واستعملت من قبل الأوربيين كمحلول غرغرة [٦]. 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 اطلاق المركبات الكيميائية أما من الخلايا الحية أو من تلك الخلايا الميتة أو المتفسخة [٩].

والطحالب الخضر المزرقة احد الشعب الطحلبية، التي تكون مسؤولة عن أغلب التأثيراتِ غير مناسبةِ في المياه كالطعم 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-MIB) 2-methylisoborneol، التي تعد من المركبات التربينية terpenoids المتطايره [١٠]، ويعد طحلب *Oscillatoria amoena* من الطحالب الخضر المزرقة المنتجة لهذه المركبات في المياه [١١،١٢]

طرائق العمل

الوسط ألزرعي المستعمل لتنمية الطحلب

استعمل الوسط الزرعي BG-11 والمحور من قبل [١٣] لتنمية العزلة الطحلبية (جدول١). حضر الوسط الزرعي بشكل محاليل خزينة Stock solution حفظت بدرجة حرارة ٤°م في الثلاجة وبدون تعقيم لحين استعمالها، حيث تم خلط كميات محددة منها عند تحضير الوسط ألزرعي وأكمل الحجم بالماء المقطر حسب الحجم المطلوب ثم عقم الوسط ألزرعي بعد ذلك باستعمال جهاز المؤصدة Autoclave بدرجة حرارة ١٢١ ° م وضغط ١,٥ باوند/انج ولمدة ١٥ دقيقة وعدل الرقم الهيدروجيني إلى 7.1 بعد تبريد المحلول لتجنب حصول الترسيب.

عزل وتنقية الطحلب

تم عزل الطحلب المدروس *Oscillatoria amoena* (اللوحة ١) من نهر الديوانية ولغرض الحصول على مزرعة وحيدة الطحلب Unialgal Culture استعملت الطريقة الموضحة من قبل [١٤] اذ تم اخذ خيط واحد من العينة بوساطة ماصة باستور محورة Pasteur pipette باستعمال مجهر ضوئي مقلوب ونقلت إلى قطرة معقمة وكررت العملية لحين الحصول على طحلب وحيد (Optika/Italy).

تم تنقية مزارع وحيدة الطحلب من الجراثيم وفقاً الى [١٥] التي تتضمن : الغسل بوساطة الطرد المركزي، حيث فصلت الجراثيم عن الطحالب بوساطة الطرد المركزي والغسل بالوسط ألزرعي المعقم ، وجرت عملية الطرد المركزي للعينة بسرعة ٣٠٠٠ دورة / دقيقة لمدة ٥ دقائق ، ثم أزيل الراشح ووضع بدله ماء مقطر معقم إلى الراسب (الخلايا الطحلبية)، أعيدت هذه العملية ١٢ مرة على الأقل. و للتأكد من نقاء العزلة من التلوث زرعت في طبق بتري يحتوي على وسط الاكار المغذي Nutrients Agar وحضن لمدة ٢٤ ساعة في ٣٧مْ [١٣]

اعتمدت المصادر [١٦] و[١٧] 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 وتركت 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 10دقائق بالسرعة 2500 دورة/دقيقة، جفف المستخلص في الحاضنة بدرجة حرارة 37 مْ لمدة ٧٢ ساعة للحصول على مسحوق جاف [١٨].

قياس نمو للطحلب

حضنت المزارع الحاوية على الطحلب (٢٥٠مل) في الحاضنة الضوئية تحت شدة إضاءة ٢٧ مايكروانشتاين/متر^{٢}/ثا وبدرجة حرارة ٢٥ْم. أخذت القراءات يوميا من خلال طريقة العدد الكلي للخلايا باستعمال شريحة الهيماسايتوميتر (Heamacytometer)، وذلك بوضع ١مل من العينة بعد رجها جيداً على سطح كل ردهة من ردهتي شريحة العدّ، ثم وضع غطاء الشريحة وفحصت تحت المجهر عند قوة تكبير X٤٠ باستعمال طريقة القطاع المستعرض Transect الموضحة من قبل [١٩]، وذلك بحساب الخيط الطحلبي الواحد على انه خلية واحدة. إما الكثافة الضوئية Optical density فقد استعمل جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer نوع (UV-Visible Apple, Japan) على طول موجي ٧٥٠ نانومتر لقياس كثافة الخلايا للنماذج يوميا ولمدة ١٤ يوماً إذ تم تصفير الجهاز على الوسط الزرعي BG-11 قبل المعاملة بالطحلب [٢٠] كما في الشكل (١و ٢).

تأثير المستخلص في نمو الطحلب:

استعملت ثلاثة تراكيز من المستخلص المائي لقشور ثمرة الرمان وهي ٣,٥، ٧ و١٤ ملغم/مل فضلا عن مجموعة السيطرة (Control)، وبواقع ثلاثة مكررات لكل تركيز. حضنت المزارع في حاضنة ضوئية تحت شدة اضاءة ٢٧ مايكروانشتاين/متر^{٢}/ثا وبدرجة حرارة ٢٥ مْ [٢١].

النتائج والمناقشة

أظهرت نتائج الفحص الحيوي شكل (٣ و٤) انه عند تعريض الطحلب إلى تراكيز مختلفة من المستخلص المائي لقشور نبات الرمان (٣,٥، ٧ و١٤) 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 الآسي) اعتماداً على وحدة السيطرة للطحلب التي تم تحديد منحني النمو لها سابقاً كما في الشكل(١و٢) 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 (١٤) 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 ١٤ملغم/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 [٢٢].

ان التأثير الفعال للمستخلص المائي لقشرة ثمار نبات الرمان بشكل عام ربما يعود إلى احتوائها على مادة التانين (Tannin)، فقد ذكر[٢٣] إن 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 أواصر هيدروجينية بين مجاميع الهيدروكسيل الفينولية الحرة والمتعددة (Phenolic hydroxyl) والمركبات النتروجينية او البروتينات ومن ثم تثبط فعالية بعض الانزيمات الضرورية في الكائن الحي وان أكثر التانينات تعقيدا تلك الموجودة في الرمان والتوت البري [٢٤].

كما ذكر[٢٥] ان لحامض التانيك الذي هو نوع من أنواع التانينات ذو تأثير تثبيطي في نمو نوعين من الهائمات النباتية *Dunaliella salina* و*Skeletonema costatum* المعزولة من بحيرة سيليستون شمال خليج المكسيك عند استعمال خمسة تراكيز من حامض التانيك ٣، ٦، ١٢، ١٦ و ٢٠ ملغم/لتر إذ لاحظوا إن التركيز الأعلى ٢٠ ملغم/لتر هو الأكثر تثبيطا" لنمو هذين الطحلبين. 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[٢٦].

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 [٢٧]. كما تعمل التانينات على انها منظمات 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 [٢٨].

المصادر

١. Santos, P.R.V.; Oliveira, A.C.X. and Tomassini, T.C.B. (1995). Controle microbiogico de produtos fitoterapicos. Rev. Farm. Bioquim., 31: 35-38.

٢. 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.

٣. 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.

٤. المنظمة العربية للتنمية الزراعية (١٩٨٨). النباتات الطبية والعطرية والسامة في الوطن العربي. جامعة الدول العربية، الخرطوم.

٥. Duke, J. (2003). Phytochemical and ethnobotanical data bases. Agricultural Research Service, www.ars-grin. Gov.

٦. Townsend, C.C. and Guest, E. (1980). Flora of Iraq. The botany directorate, ministry of agriculture and agrarian reform, Vol. 4. Baghdad, Iraq.

٧. حسين، فوزي طه قطب (١٩٧٩). النباتات الطبية: زراعتها ومكوناتها. الدار العربية للكتاب، تونس.

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

٩. 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.

١٠. 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 IUD, England. 1-15p.

١١. 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.

١٢. 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.

١٣. 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.

١٤. Rippka, R. (1988). Isolation and purification of cyanobacteria: Methods In Enzymology, Academic Press, Inc., 167:3-27.

١٥. 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.

١٦. Desikachary,T.V.(1959).Cyanophyta. New Delhi, London Acad. press 686p.

١٧. Prescott, G.W. (1973). Algae of the western Great Lakes Area. William,C., Brown, Co. Pub., Dubuque, Lowa., 977p.

١٨. 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.

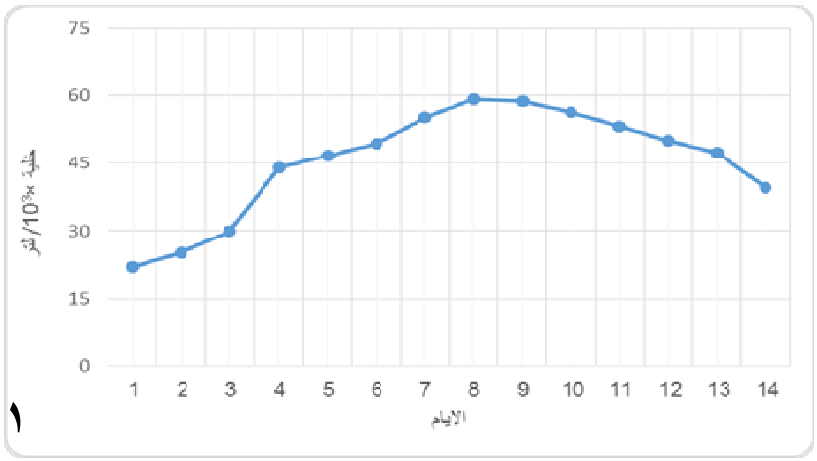
١٩. Martinez , M. R.; Chakross , R. and Pandpanastico , J.P. (1975) Notes on phytoplankton Technique Using Haemocytometer. Phil. Agric. 59: 1-12.

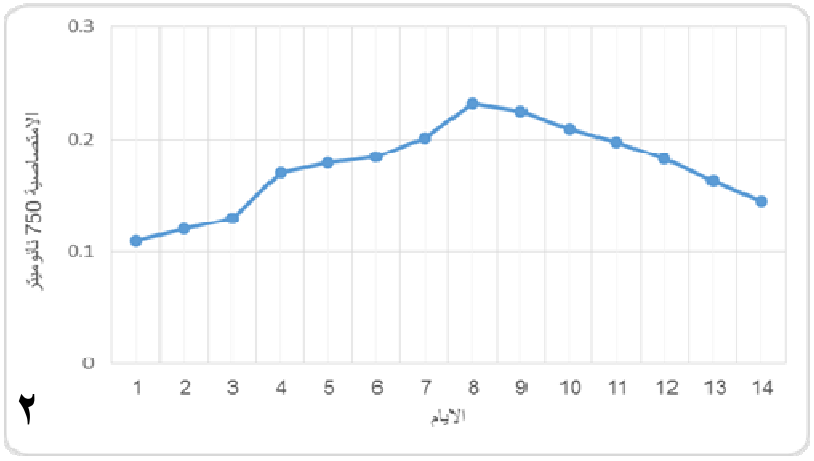
٢٠. Ernst, A.; Deicher, M.; Herman, P. M. J. and Wollenzien, U. I. A. (2005). Nitrate and Phosphate Affect Cultivability of Cyanobacteria from Environments with Low Nutrient Levels. Appl. Environ. Microbiol., 71(6): 3379-3383.
٢١. Andersen, R. A. (2005). Algal Culturing Techniques. Physiological Society of America, Elsevier Academic press,. 589P.
٢٢. Varel, I. and Vincent, H. (2002). Carvacrol and thymol reduce swine waste odor and pathogens: stability of oils. Curr. Microbiol., 44: 38-43.
٢٣. Segura, J. J.; Morales-Ramos, L. H.; Verde-Star, J. and Guerra, D. (1990). Inhibicion del crecimiento de Entamoeba histolytica Y, E. invadens producida porla raiz del granado (*Punica granatum* L.). Arch. Invest.Med.(Mex.), 21:235-239.
٢٤. 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.
٢٥. Herrera-Silveira, J.A. and Ramfrez-Ramfrez, J.(1996). Effects of natural phenolic material (tannin) on phytoplankton growth Limnol. Oceanogr., 41(5):1018-1023.
٢٦. Wetzel, R. G.(2001) Limnology: Lake and River Ecosystems .3rd ed. Elsevier Science (USA).
٢٧. Gross, E. M. and Sütfeld, R.(1994). Polyphenols with algicidal activity in the submerged macrophyte *Myriophyllum Spicatum* L., Acta. Hortic . 381:710-716
٢٨. كيرك، ديفيد(١٩٨٨).علوم الحياة اليوم .ترجمة (محمد سليم صالح وجماعته) الجزء الثاني.وزارة التعليم العالي والبحث العلمي .دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة الموصل.

جدول رقم (١) :مكونات الوسط ألزرعي BG-11 المستعمل لتنمية الطحلب الأخضر المزرق

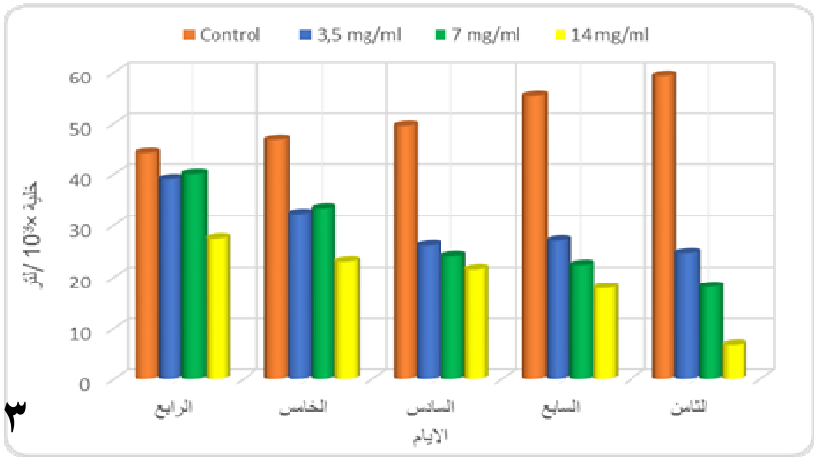
Compound	Stock	ml/Liter
$NaNO_3$	150 g/l	10 ml
K_2HPO_4	40 g/l	1 ml
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	75 g/l	1 ml
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	36 g/l	1 ml
Citric acid	6 g/l	1 ml
Ferric ammonium	6 g/l	1 ml
EDTA (disodium salt)	1 g/l	1 ml
Na_2CO_3	20 g/l	1 ml
Trace metal mix A5	see blow	1 ml
Agar(if needed)	-	12 g

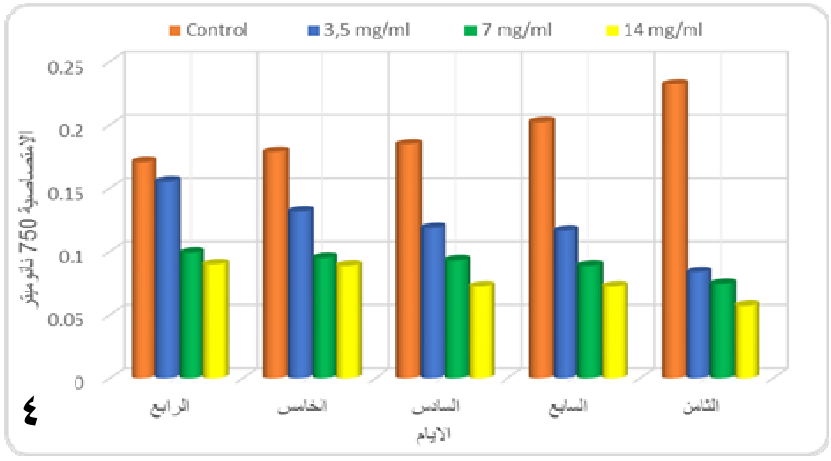
Trace Metal	Amoun
H_3BO_3	2.86
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	1.81
$ZnSO_4 \cdot 7H_2$	0.222
$NaMoO_4 \cdot 2H$	0.39
$CuSO_4 \cdot 5H_2$	0.079
$Co(NO_3)_2 \cdot 6$	0.04
Distilled	1.0 l



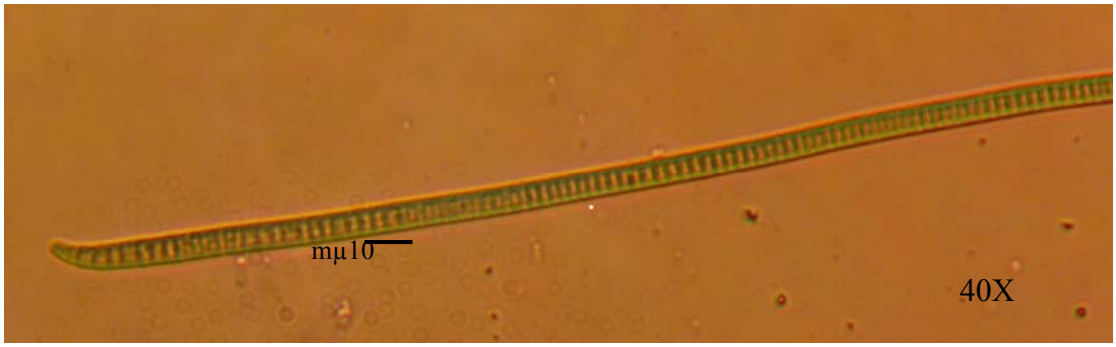


شكل رقم (١ و٢) : منحنى النمو للطحلب *Oscillatoria amoena* بوساطة: أ: طريقة العد الكلي (خلية × ١٠٣/لتر) ب: الكثافة الضوئية





شكل رقم (٣ و٤): تأثير مستخلص قشور ثمرة نبات الرمان في: أ:العدد الكلي لخلايا طحلب *Oscillatoria amoena* (خلية × ١٠٣/لتر) ب: قيم الامتصاصية لخلايا طحلب *Oscillatoria amoena*



لوحة رقم (١): 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*