جامعة بنغازي

كلية العلوم – قسم علم النبات

عنوان الرسالة

النشاط المضاد البكتيري لمستخلص عصير الليمون على حيوية البكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة الجرام

Antibacterial activity of lemon extract on the viability of Gram positive & Gram Negative bacteria

مقدمة من

مراد عبدالرازق رمضان

إشـــراف

د. محمد فرج الحاسي

قدمت هذه الرسالة لكلية العلوم كمتطلب جزئي لنيل درجة الماجستير في علوم النبـات (أحياء دقيقة)

2016-2015

جامعة بنغازي
كلية العلوم - قسم علم النبات

عنوان الرسالة

النشاط المضاد البكتيري لمستخلص عصير الليمون على حيوية البكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة الجرام

Antibacterial activity of lemon extract on the viability of Gram positive & Gram Negative bacteria

مقدمة من :

مراد عبدالرازق رمضان

لجنة المناقشة :

د. محمد فرج الحاسي.....

(مشرفا رئيسيا)

أ. د. صالحة فرج بن جويرف.....

(ممتحنا داخليا)

د. فرج محمد شعيب.....

(ممتحنا خارجيا)

يعتمد

د. حسين محمد علي التاجوري — رئيس قسم علم النبات.

د. حسين محمد البرعصي — عميد كلية العلوم.

بسم الله الرحمن الرحيم

ظَهَرَ الْفَسَادُ فِي الْبَرِّ وَالْبَحْرِ بِمَا كَسَبَتْ أَيْدِي

النَّاسِ لِيُذِيقَهُمْ بَعْضَ الَّذِي عَمِلُوا لَعَلَّهُمْ يَرْجِعُونَ

صدق الله العظيم

سورة الروم / أية (41)

الاهداء

إلى من أحمل أسمه بكل افتخار والدي العزيز

إلى معنى الحب وإلى معنى الحنان أمي الحبيبة

إلى من أظهروا لي ما هو أجمل من الحياة إخوتي

إلي من جعل الله بيني وبينه مودةً ورحمة زوجتي

الشكر والتقدير

أشكر الله مولاي وخالقي الذي من علي بإتمام هذا العمل المتواضع مع رجائي أن يتقبله مني ويجعله خالصاً لوجهه الكريم . انطلاقا من قوله تعالى { ومن يشكر فَإِنَّما يشْكُر لِنَفْسِهِ} ومن قول الرسول ﷺ (لا يشكر الله من لا يشْكر الناس) وإيمانا بفضل الاعتراف بالجميل وتقديم الشكر والامتنان لأصحاب المعروف فإني أتقدم بالشكر الجزيل والثناء العظيم لكل من ساعد في إنجاح هذه الرسالة وأخص بالذكر : أستاذي ومشرفي الفاضل الدكتور محمد فرج الحاسي على قبوله الإشراف على هذا البحث ومتابعته له منذ الخطوات الأولى وعلى ما منحنى من صدر واسع ونصح وإرشاد ساعد على إخراج هذا العمل بهذه الصورة . كما وأتقدم بالشكر الجزيل الي منتسبي مختبر الميكروبيولوجي في مستشفى مركز بنغازي الطبي . كما وأتقدم بالعرفان والتقدير إلي السادة أعضاء هيئة التدريس في كلية العلوم الأفاضل كذلك نشكر كل من ساعد على إتمام هذا البحث وقدم لنا العون ومد لنا يد المساعدة وزودنا بالمعلومات اللازمة لإتمام هذا البحث.

المحتويات

Contents

صفحة

الآية..... I

الاهداء..... II

الشكر والتقدير III

المحتويات IV

قائمة الجداول..... V

قائمة الأشكال..... V

قائمة الاختصارات..... XI

الخلاصة..... XII

قائمة الجداول

List of Tables

جدول(1). يوضح أقطار منطقة تثبيط لتراكيزمستخلص عصير الليمون.....33

جدول(2). يوضح أقطار منطقة تثبيط مستخلص عصير الليمون والمضادات الحيوية 45

جدول(3). يوضح نتائج الكشف الأولي عن المركبات الفعالة في مستخلص عصير الليمون 63

قائمة الأشكال

List of Figures

شكل1. جهاز تعريف البكتيريا Phoenix 23

شكل2. التأثير القاتل لتراكيز مستخلص عصير الليمون على بكتيريا *S. aureus* 34

شكل3. التأثير القاتل لتراكيز مستخلص عصير الليمون على بكتيريا *K. pneumonia* 35

شكل4. التأثير القاتل لتراكيز مستخلص عصير الليمون على بكتيريا *S. typhi* 36

شكل5. التأثير القاتل لتراكيز مستخلص عصير الليمون على بكتيريا *C. freundii* 37

شكل6. التأثير القاتل لتراكيز مستخلص عصير الليمون على بكتيريا *S. epidermidis* 38

شكل7. التأثير القاتل لتراكيز مستخلص عصير الليمون على بكتيريا *P. aeruginosa* 39

شكل8. التأثير القاتل لتراكيز مستخلص عصير الليمون على بكتيريا *S. pyogenes* 40

شكل9. يوضح تأثير تراكيز عصير الليمون بالمليمتر على البكتيريا 41

شكل10. تأثير عصير الليمون والمضادات الحيوية على البكتيريا *S. aureus* 48

شكل11. تأثير عصير الليمون والمضادات الحيوية بالمليمترعلى البكتيريا *S. aureus* 49

شكل12. تأثير عصير الليمون والمضادات الحيوية على البكتيريا *K.pneumonia* 50

شكل13. تأثير عصير الليمون والمضادات الحيوية بالمليمترعلى البكتيريا *K.pneumonia*..51

شكل14. تأثير عصير الليمون والمضادات الحيوية على البكتيريا *S. typhi* 52

شكل15. تأثير عصير الليمون والمضادات الحيوية بالمليمترعلى البكتيريا *S. typhi* 53

شكل16. تأثير عصير الليمون والمضادات الحيوية على البكتيريا *C. freundii* 54

شكل17. تأثير عصير الليمون والمضادات الحيوية بالمليمترعلى البكتيريا *C. freundii* 55

شكل18. تأثير عصير الليمون والمضادات الحيوية على البكتيريا *S.epidermidis* 56

شكل19. تأثير عصير الليمون والمضادات الحيوية بالمليمترعلى البكتيريا *S.epidermidis*..57

شكل20. تأثير عصير الليمون والمضادات الحيوية على البكتيريا *P. aeruginosa* 58

شكل21. تأثير عصير الليمون والمضادات الحيوية بالمليمترعلى البكتيريا*P. aeruginosa*59

شكل22. تأثير عصير الليمون والمضادات الحيوية على البكتيريا *S. pyogenes* 60

شكل23. تأثير عصير الليمون والمضادات الحيوية بالمليمترعلى البكتيريا *S. pyogenes* ..61

شكل24. يوضح اختبار الكشف عن الفلافونيدات Flavonoids 64

شكل25. يوضح اختبار الكشف عن التانينات Tannins 65

شكل26. يوضح اختبار الكشف عن الفينولات Phenols 66

شكل27. يوضح اختبار الكشف عن الكاربوهيدرات Carbohydrate 67

شكل28. يوضح اختبار الكشف عن البروتينات Proteins 68

شكل29. يوضح اختبار الكشف عن القلويدات Alkaloids 69

شكل30. يوضح اختبار الكشف عن السكريات المختزلة Reducing Sugar 70

شكل31. يوضح اختبار الكشف عن الأحماض الامينية Amino acids 71

شكل32. يوضح اختبار الكشف عن الجلايكوسيدات Glycosides 72

شكل33. يوضح اختبار الكشف عن الصابونيات Saponines 73

الفصل الاول

Chapter One

المقدمة
Introduction

1. المقدمة.....1

2.1 الهدف من الدراسة.....6

الفصل الثاني

Chapter Two

دراسات سابقة
Literature reviews

2. دراسات سابقة.....11

الفصل الثالث

Chapter Three

المواد وطرق العمل
Material and Methods

1.3.الأجهزة والمواد المستعملة..... 19

2.3.المواد الكيميائية والأوساط الغذائية 20

1.2.3.المواد الكيميائية.....20

2.2.3.الأوساط الغذائية.....21

3.2.3.المضادات الحيوية.....21

4.2.3.الكواشف المستخدمة.....22

3.3. مصدر وعزل العينات البكتيرية 22

4.3.الطرق العامة.....24

1.4.3.التحضين.....24

2.4.3.حفظ المزارع البكتيرية 24

5.3.. تقدير عدد الخلايا البكتيرية باستخدام مقياس ماكفرلاند 24

6.3. التحليل الكيميائي النباتي النوعي 26

7.3.النبات المستخدم في الاختبار.....28

8.3.اختبار فعالية المستخلصات النباتية ضد الجراثيم المعزولة.....28

الفصل الرابع

Chapter Four

النتائج
Results

1.4.البكتيريا المعزولة.....30

2.4.اختبار فعالية مستخلص عصير الليمون ضد البكتيريا المعزولة.....30

3.4. مقارنة فعالية مستخلص عصير الليمون مع فعالية المضادات الحيوية ضد البكتيريا..... 41

4.4. الكشف الأولي عن المركبات والمجاميع الفعالة في مستخلص عصير الليمون 62

الفصل الخامس

Chapter Five

المناقشة
Discussion

5.المناقشة.....74

الاستنتاج.....83

الخلاصة.....84

المراجع.....85

List of abbreviations

Staphylococcus aureus	*S. aureus*
Staphylocooccus epidermidis	*S. epidermidis*
Streptococcus pyogenes	*S. Pyogenes*
Klebsiella pneuomonia	*K. pneuomonia*
Pseudomonase aeruginosa	*P. aeruginosa*
Salmonella typhi	*S. typhi*
Citrobacter freundii	*C. freundii*
Citrus limon	*C. limon*
Muller hinton agar	MHA
Nutrient agar	NA
Amoxicillin	AMO
Ampicillin	AMP
Cefotaxime	CTX
Tetracycline	TE
Gentamicin	GM
Penicillin	PN
Amikacin	AK
Identification of microbes	ID
Antimicrobial susceptibility	AST

الملخص

Abstract

يكمن الهدف الأساسي من هذه الدراسة الحالية في عملية استخلاص وتعريف نشاط المركبات المضادة البكتيرية وإيضاح النشاط المضاد البكتيري لمركبات مستخلص عصير الليمون Lemon extract وإيضاح النشاط المضاد البكتيري لمستخلص الليمون ضد البكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة الجرام . ككائنات دقيقة مقاومة وحساسة للمضادات الحيوية . تتركز هذه الدراسة على النشاط المضاد البكتيري وجهد خلاصة عصير الليمون . تعتبر المركبات النشطة بيولوجياً التي توجد في مستخلص الليمون عادة ما تركزت في هذه الدراسة على مزيد من الاهتمام . يحتوي مستخلص عصير الليمون على مصادر غنية من Flavanones و فلونيدات أخرى وعلى الفينولات والتانينات والقلويدات والصبونينات إلى أخره التي تلعب دورا كبيرا كمثبطات مضادة ميكروبية . أو ضحت مستخلصات عصير الليمون تأثيرا نشطاً مضاداً ميكروبياً ضد البكتيريا *P. aeruginosa* و *K. pneumonia* و *S. epidermid* و *S.typhi* و *C. freundii* و *S. aureus* و *S. pyogenes* عند تراكيز 100% و 75% . بينما أوضح تأثير تراكيز 50% أكثر مقاومة خصوصاً ضد البكتيريا *K. pneumonia* والبكتيريا *S.typhi* والبكتيريا *S. pyogenes* . أما تركيز المستخلص 25% أوضح أكثر مقاومة لمعظم أنواع البكتيريا المعرضة لتأثير المستخلص ماعدا البكتيريا *S. aureus* . اشتملت في هذه الدراسة دور تأثير بعض المضادات الحيوية على هذه الأنواع البكتيرية وذلك من أجل مقارنتها بتأثير مستخلص الليمون . أوضحت النتائج بأن هناك تشبها كبيراً في مدى تثبيط كلٍ من المستخلص والمضادات الحيوية المستخدمة في هذه الدراسة .

الفصل الأول

المقدمة

Introduction

منذ ألاف السنين وأسلافنا القـدماء يبحثون عن النباتات النـافعة ويعـزلون المكونات النشطة المفيدة ليكتشفوا خصائصها ويستخرجـون منها المواد الفعالة Active ingredients لاعتقادهم أن الأمراض بأعراضها المختلفة يمـكن شفائها أو تخـفيض آلمها نوعا ما باستعمال بعض الأغذية ذات المصادر النباتية أبو زيد ، (1986) . حيث تعد العقاقير المضادة للأحياء المجهرية Antimicrobial drugs من أهم اكتشافات الباحثين خلال القرن العشرين إذ أنها قللت من نسب أو معدل الوفيات بدرجة كبيرة ، كما أنها ساهمت في معالجة الكثير من المشاكل الصحية الناتجة عن نشاط الأحياء المجهرية الممرضة ، إلا انه في أواخر القرن أثبتت الدراسات إن الجراثيم بإمكانها إن تكتسب المقاومة Resistance لمثل هذه العقاقير أو المكونات الفعالة النشطة بعد عدة أجيال ، نظرا لانتقال جينات المقاومة Resistance genes فيما بينها ونتيجة لذلك أستنتج العلماء أن التعـاطي المفرط لمثل هذه العقاقير قد يؤدي إلى ظهـور السلالات المقـاومـة لهذه العقاقير. (2004) , Uwaezuoke and Aririatu .

إن ظهور وانتشار مقاومة المضادات الحيوية Resistance of antibiotics بين أنواع سلالات البكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة الجرام Gram positive and Gram negative bacteria دفع الباحثين المهتمين بمجال العلاج إلي اكتشاف بدائل علاجية للمضادات الحيوية ومن هذه البدائل النباتات الطبية وما تحتويه من مكونات فعالة مضادة للجراثيم مثل الفينولات Phenols وأشباه القلويدات Alkaloids والزيوت

الأساسية Essential oils و الراتنجات Resins و غيرها من المواد الطبيعة التي أكدت تأثيراتها التثبيطية في علاج الأمراض الجرثومية ، فضلا عن ذلك عدم توفر معلومات دامغة تؤكد إمكانية الجراثيم على اكتساب صفة المقاومة لمثل هذه المكونات الفعالة (Essawi and Srour , (2000. وقد اتجهت الدراسات في السنوات الأخيرة إلي التحري عن التأثير الحيوي للنباتات الطبية على الجراثيم الممرضة Pathogenic microorganisms مثل جرثومة الالتهاب الرئوي (بكتيريا التدرن الرئوي) *Klebsilla pneumonia* ولاسيما ذات المقاومة المتعددة Multiple drug resistant وحصل الباحثون على نتائج واضحة حول تأثير المركبات الفعالة النشطة (النواتج الإيضية) لهذه النباتات على النمو البكتيري (2003)., Duke *et al* ، وعلى الرغم من إنتاج عدد من المضادات الحيوية الجديدة صناعيا ذات التأثير الفعال في الثلاث العقود الأخيرة ، إلا أن الكائنات الحية الدقيقة الممرضة لديها القدرة على مقاومة هذه العقاقير بشكل عام وذلك لان البكتيريا لديها القدرة الوراثية لنقل واكتساب المقاومة للأدوية (2000) ., Gislene *et al* .

على الرغم من التقدم العلمي الذي حدث في مجال علم الكيمياء والذي فتح الطريق لتصنيع الكثير من العقاقير والمواد الكيميائية التي تدخل في صناعة الأدوية إلا أن للمستخلصات النباتية خصوصية وأفضلية في هذا المجال ، فالنبات الواحد يحتوي على أكثر من مادة فعالة تعمل مع بعضها في صيغة متكاملة لعلاج المرضى و هذه الميزة لا تتوفر في العقاقير المصنعة مختبرياً فضلاً عن تأثيراتها الفسيولوجية العالية ، كما أن للمواد الكيميائية تأثيرات جانبية Side effects عند الاستخدام المتكرر والتي لا تظهر آنياً بل بعد مدة طويلة من استخدام الدواء الجميلي و آخرون ، (2007) .

لقد أشار الكثير من الباحثين في مجال المضادات الطبيعية للأحياء المجهرية إلي استخدام المستخلصات النباتية Plant extracts لأسباب عديدة منها وفرتها وسهولة الحصول عليها ، وقلة كلفتها والأهم من هذا كله هو أنها أكثر أماناً لقلة تأثيراتها الجانبية (Adel and Mahasneh , 1999) ، وحيثُ اليوم نعيش صحوة عالمية تتجه نحو الأعشاب الطبية أذا ثبتت الأبحاث العلمية أن كثيراً من هذه الأعشاب تحتوي مركبات علاجية مهمة وكثيراً ما يصعب أو يستحيل محاكاتها أو تركيبها معملياً سيد. (1984) ، وحيثُ أن قشور الحمضيات غنية بمصادر Flavonoids والجلايكوتيدات Glycosides ووالكومارينات Coumarins و السيتوستيرول Sitosterol والزيوت الطيارة (2007) ., *et al* Shahnah ، وقد أظهرت التحاليل الكيميائية لمستخلص قشور الليمون على وجود الفلافونويدات Flavonoids و الصابونيات Saponins والسيترويدات Steroids و التربينات Terpenoids و التانينات Tannins وأشباه القلويدات Alkaloids التي أظهرت تأثيرا واضحاً على خمس أنواع من البكتيريا المسببة للمرض Pathogenic bacteria والتي تتمثل في البكتيريا *Staphylococcus aureus* و *Bacillus subtilis* و *Escherichia coli* و *Klebsiella pneumonia* و *Salmonella typhi* (2011) , Ashok *et al* .

في حين يستعمل الليمون الحامض كمادة مقوية ومنقية للدم و خافض للحرارة و منشط لكريات الدم البيضاء و مدرار للبول ومخفض للضغط ، كما أنه له تأثير فعال في تثبيط النمو البكتيري و الفطري (2000) , Rudolf and Volker ، حيث أن عصير الليمون يظهر تبايناً كبيراً مع مجموعة متنوعة في تكوينه إذ انه يحتوي على الأحماض إلي حدٍ كبير ، وحامض الستريك من المركبات السائدة والتي قد تصل نسبته إلي 5% أو أكثر من الوزن الطازج للعصير، وكذلك يعتبر عصير الليمون من العصائر الغنية

بفيتامين B1, B2 و Niacin (1977) . Hawley ، وتعمل الفلاونويدات Flavonoids كمادة مباشرة و مضادة للأكسدة Antioxidants ولديها القدرة على تعديل الأنشطة الإنزيمية و تمنع تكاثر الخلايا البكتيرية (2000), Duthie and Crozier ، و كذلك تلعب دورا دفاعياً ضد مسببات الأمراض من البكتريا و الفطريات والفيروسات (2004), Sohn *et al* . .

تلعب فعالية الزيوت الطيارة في تثبيط نمو البكتيريا الموجبة لصبغة الجرام Gram positive bacteria مقارنة ببكتيريا السالبة لصبغة الجرام Gram negative bacteria التي أوضحت تثبيطاً متوسطاً(2006), Eturk *et al*. ، وللفينولات Phenols دور مهماً في تنشيط الإنزيمات المسئولة عن التفاعلات الإيضية الأساسية وذلك من خلال تداخلها أو تفاعلها المتخصص مع البروتينات مما يؤدي إلي تحلل البروتين Protein denaturation ومن ثم يؤدي إلي عدم قدرة البكتيريا في الاستمرار في النمو (1991), Hamburger *et al*. وتتميز الفلافونويدات Flavonoids بقدرتها على تمزيق أو تفكك الأغشية الخلوية Cellular membranes عن طريق تكوين معقدات مع البروتينات الخارجية الموجدة بالبكتيريا (1994), Tusckhiya *et a l*. ، أما التانينات فلها القدرة على تحفيز الخلايا البلعمية أو (الالتهامية) Phygocytic cell التي من شأنها تلعب دوراً في تحطيم البروتينات والتراكيب الأخرى المتواجدة على جدار الخلية البكتيرية مثل المحافظ Capsules التي تسهم بشكل أو بأخر في عملية التصاق الخلايا البكتيرية Bacterial adhesions . أما فعالية الزيوت فقد عزت الدراسات إلي احتوائها على التربينات Turbines التي لها فعالية تثبيطية للبكتيريا لأنها تعمل على تمزيق الأغشية الخلوية بواسطة المركبات المحبة للدهون Lipophilic compounds (1998), Amaral et *al* . .

حيث كان التأثير التثبيطي واضحاً لمستخلص عصير الليمون على سبع سلالات من نوع بكتيريا *Vibrio cholera* وتعرف هذه البكتيريا باسم الكوليرا الأسيوية Asian cholera التي بدورها تسبب التهابات معوية والإسهال الحاد وارتفاع في ضغط الدم في غضون ثلاث ساعات مؤدية في نهاية الأمر إلي الوفاة ، ويرجع سبب الإصابة بها غالباً نتيجة شرب المياه الملوثة Contaminated water (1998) . Camella and Beiley ، حيث تعتبر من أنواع البكتيريا المسئولة عن ارتفاع عدد الوفيات في المدن النامية نتيجة الالتهابات ، وبحث العلماء كبديل منخفض التكلفة بديلاً عن المضادات الحيوية المنتجة صناعياً بسبب ارتفاع أسعارها والعمل في مشروع العلاج بالنباتات الطبية لاحتوائها على مركبات مضادة للميكروبات وبذلك يمكن استخدامها في علاج الأمراض المعدية التي تسببها البكتيريا المسببة للأمراض Pathogenic bacteria مثل البكتيريا الغائطية (القولون) *E.coli* والبكتيريا المكورات العنقودية *S.aureus* والبكتيريا الزائفة الزنجارية *P.aeruginosa* والبكتيريا العصية القشية *B.subtilis* والتي تنتشر على نطاق واسع في الطبيعة مما قد تسبب في الوفيات وأمراض خطيـــرة بين السكان (2002) . Dubey and Maheshwari .

ويتميز مستخلص عصير الليمون بفعلتيه التضادية ضد البكتيريا Antagonistic effect وذلك بسبب وجود نسبة كبيرة من حامض الستريك Citric acid والزيوت الطيارة Volatile oils وبعض المواد مثل Linalyl acetate ، Linalol ، Turpinol والـ Cymen. وان انخفاض الأس الهيدروجيني pH له تأثير قوي في مقاومة البكتيريا بسبب حساسية البكتيريا له علي (2010) ، حيثُ يعمل عصير الليمون على إزالة السموم وكعامل مضاد للجراثيم لاحتوائه على Ascorbic acid كما أن عصير الليمون فعال جداً

في علاج حب الشباب ويعمل على تقشير الجلد وهي خطوة مهمة في عـــلاج حب الشباب Acne vulgaris (2013), Shinkafi and Ndanusa .

2.1. الهدف من الدراسة Aim of the study

1. تهدف هذه الدراسة إلى اختبار تأثير حيوية مستخلص عصير الليمون *Citrus lemon l.* الذي يعتبر من مكونات الليمون ذات الصبغة المضادة البكتيرية Antibacterial agents على البكتيريا الموجبة والسالبة الجرام المعزولة معملياً ، ومعرفة تأثير هذا المستخلص على نموها وحيويتها ومقارنتها بتأثير المضادات الحيوية الفعالة الأخرى .

2. الكشف الكيميائي الأولي لمستخلص عصير الليمون Lemon extract عن محتواه من المركبات الفعالة الأخرى .

الفصل الثاني

الدراسات السابقة

Literature reviews

لقد ازداد الاهتمام في السنوات الأخيرة بالنباتات والأعشاب الطبية باستخدامها كمصادر رئيسية لإنتاج العقاقير الطبية أو كمصدر للمواد الفعالة النشطة فيتركب الدواء ، كما تستعمل كمادة خام لإنتاج بعض المركبات الكيميائية وفي إنتاج بعض المواد الدوائية ، فقد تناولت كثير من الدراسات تأثير المستخلصات النباتية على الأحياء المجهرية و بالتالي إمكانية استخدامه في علاج بعض الأمراض الناتجة من الإصابات الميكروبية المختلفة (Cowan , 1999) . في الآونة الأخيرة أجريت العديد من الدراسات حول تأثير مستخلصات النباتات على الممرضات المختلفة من البكتيريا و الفطريات ودور هذه المستخلصات في معالجة الأمراض و الإصابات المتسببة عن هذه الممرضات ، وكذلك دراسة فعالية بعض من هذه المستخلصات النباتية ضد مسببات الممرضات بما فيها الجراثيم.

ففي اليابان درس (Hideo e *t al* ., (2007 تأثير مستخلصات الشاي الأخضر والكيوي و عصير الليمون وعصير التفاح ضد بعض الجراثيم الممرضة والمتمثلة في جراثيم بكتيريا القولون *Escherichia coli* والبكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* والبكتيريا *Staphylococcus aureus* والبكتيريا *Bacillus subtilis* حيث كان مستخلص عصير الليمون أكثر تأثيراً تثبيطياً من المستخلصات النباتية الأخرى ، وتشير النتائج بأن انخفاض الرقم الهيدروجيني pH يعتبر عاملاً مهماً في تثبيط نمو الجراثيم .

فـي الهند أجريت دراسة قام بها (2012) ., Rajendra *et al* لمعرفة مدى الفـعالية الضــد ميـكروبية للمستخلصـــات النباتية من عصير الليمون و الثوم و الزنجبيل و الجوافة على مسببات الأمراض للإنسان مثل كلٍ من البكتيريا و , *S. aureus P. aeruginosa* و *B. subtilis* و *S. abony* و *E.coli* حيثُ اظهر مستخلص عصير الليمون أعلي تأثير تثبيطي على البكتيــريا *P. aeruginosa* و *S. abony* وبأقطار تثبيطية Inhibition diameter واضــحة تتــراوح مابين 16-22 مليمتر .

كما درس عبداللة, (2009) في العراق فعالية المستخلصات النباتية من نبات السماق و نبات الشلغم وعصير الليمون في تثبيط نمو بكتيريا *K. pneumonia* و *S. aureus* حيثُ وجد أن عصير الليمون أقوى تأثيراً من المستخلص المائي لنبات السماق في تثبيط نموا البكتيريا ، إما المستخلص المائي لنبات الشلغم لم يعطي أي تأثير مثبط على نمو البكتيريا .

أشارت الدراسة التي قام بها كلٍ من (2011)., Preetha *et al* في الهند في تحديد مدى فعالية مستخلص عصائر الحمضيات على بكتيريا الكوليرا اللولبية *Vibrio Cholera* وهي مــن أكثر مسببات الأمراض الحادة للأمعاء والتي تسبب في الوفاة ، وكـــان عصير الليمون من بين الحمضيات الأعلى معدل تثبيطي البكتيريا، وأشاروا إلي أن الليمـــون والحمضيات لديها القدرة أو نشاط تثبيطي على نشاط ضد بكتيريا الكوليرا مقارنة مـع المضاد الحيوي إيرثرومايسين Erythromycin وأشـاروا أيضاً إلي أن مستخلصات الحمضيات تعتبـر من أنشط المستخلصات تأثيراً وذات خصائص مشابهه نوعاً ما للمضادات الحيوية .

أشار Waidulla *et al* ., (2010) إلـــي أن الخـواص الضد ميكروبية لمستخلصات عصائر بعض الحمضيات من الليمون و النارنج و عصير العنب ضد أنواع من البكتيريا الموجبـــة والسالبة لصبغة الجرام والمتمثلة بجراثيم مثل جـــراثيم بكتيريا *S. aureus* و *Proteus vulgaris* والبكتيـــريا *P. aeruginosa* ومقارنتها بفاعلية تأثير أربع أنواع من المضادات الحيوية مثل كلٍ من المضاد الحيوي Ampicillin و Trimethoprim و Nalidixic acid و Gentamicin حيثُ لوحظ كلٍ من عصير الليمون والنارنج تأثيرا قاتلا على ثلاث أنواع من الجراثيم بأقطار تثبيطية تتراوح ما بين 10–20 ملم وكذالك اثبتوا من خلال هذه الدراسة التطبيقية بأن تأثير هذه الحمضيات أعطى نتيجة أفضل من المضادات الحيوية عندا استخدامها كمجموعة سيطرة أو قياس .

أجريت دراسة قام بها (2011)., Ashok *et al* تتعلق بتأثير المستخلصات الكحولية لقشور الليمون مستخدما المركبات الآتية مثل Petroleum ether و Ethanol و Ethyl acetate كمستخلصات كحولية ضد بعض أنواع البكتيريا مثل *E. coli* و *S. aureus* و *S. typhi* و *B. subtilis* و *K . pneumonia* ، حيث بينت هذه النتائج أن مستخلص الأستون Acetone أوضح أكثر تأثيراً تثبيطياً ضد هذه الأنواع البكتيريا الممرضة حيث كانت مناطق التثبيط الميكروبي تتراوح مابين 13–16 ملم ، واستنتج الباحثون في هذه الدراسة التطبيقية من خلال هذه الدراسة بأن مستخلص قشور الليمون مساوي تماماً للمضاد الحيـوي ميثيسيلين MJethicillin و المضاد الحيوي بنسلين Penicillin من حيث الفعالية التثبيطية لنشاط أو حيوية هذه الجراثيم سالفة الذكر .

وفي حين أشارت الدراسة التي قام بها (2011) ., Amit *et al* لمعرفة نشاط المضاد الميكروبي لعصير الليمون وكذالك المستخلصات المائية والكحولية لقشور وبذور الليمون على الجراثيم الممرضة *E. coli* و *S. aureus* و *P. aeruginosa* حيثُ أعطى مستخلص الميثانولي من قشور الليمون أعلى قيمة تثبيطيه تتراوح حوالي 23 ملم ضد البكتيريا *P. aeruginosa* بينما المستخلص الإيثانولي من بذور الليمون أوضح أقصى منطقة تثبيط تتراوح حوالي 25 ملم ضد البكتيريا *P. aeruginosa* ، وقد أوضح عصير الليمون أقصى منطقة تثبيط له تتراوح حوالي 28 ملم ، بينما كان المضاد الحيوي Tetracycline المستخدم كعينة سيطرة أو قياس بين منطقة أقطار التثبيط على الجراثيم الثلاثة ما بين 22 – 23 ملم .

في دراسة قام بها (2007)., Adedeji *et al* في نيجيريا لمعرفة مدى الفاعلية ضد ميكروبية لمستخلص عصير الليمون ضد بكتيريا *P. aeruginosa* المعزولة من الأذن ، حيثُ أظهرت هذه البكتيريا حساسية عالية لمستخلص عصير الليمون في جميع العزلات وكانت مناطق التثبيط تتراوح ما بين 7–22 ملم ، بينما كـــان تأثيـر المضاد الحيـــوي Gentamicin أوضح تأثيراً تثبيطياً على بعض العزلات ، إلا أنه لم يؤثر على البعض الأخر وكانت مناطق التثبيط تتراوح ما بين 7–17 ملم .

في دراسة قام بها (2010) ., Pinkee *et al* في الهند لمعرفة تأثير فعالية المستخلص الإيثانولي لأوراق الليمون ضد بعض أنواع من البكتيريا المسببة للأمراض مثل *E .coli* و *S. aureus* و *S. typhi* و *B. subtilis* و *K. pneumonia* و *P. aeruginosa* حيثُ أشارت هذه الدراسة بان البكتيريا الغائطية (بكتيريا القولون) *E. coli* أوضحت حساسية مفرطة Hypersensitivity عند تعرضها للمستخلص الإيثانولي لأوراق الليمون ، بينما كانت

باقي الجراثيم اقل حساسية من تأثير المستخلص ، حيث أظهرت التحاليل الكيميائية للكشف عن المواد الفعالة احتواء المستخلص على Steroid وTannins و Alkaloids التي قد تكون مسئولة عن نشاط ضد البكتيريا المسببة للمرض ، بينما لم تعطي أو توضح التحاليل الكيميائية نتيجة ايجابية لـ Flavonoids و Saponines .

ومن خلال الدراسة التي قام بها (2012) , Bansode and Chavan لإيضاح مدى تأثير مستخلصات كلٍ من عصير الليمون *Citrus limon* وعصير البرتقال *Citrus Orantium* ضد النشاط الحيوي للجراثيم المعزولة إكلينيكياً مثل *E. coli* و*Salmonella paratyphy* و *Sigella sonnei* و مقارنتها بفاعلية المضاد الحيوي Ampicillin كعينة سيطرة أو قياس وبينت النتائج أن لعصير الحمضيات تأثير تثبيطي مشابه لتأثير المضاد الحيوي Ampicillin وأشار الباحثان إلى أن التحليل الكيميائي لعصير الليمون والبرتقال أوضحا أحتوهما على مادة Tannins و Flavonoids و Phenols .

ومن خلال الدراسة التطبيقية التي أجراها (2009) ., Sule *et al* حول دور تأثير المستخلص المائي والكحول الإيثانولي لأوراق نبات القطن *Gossypium spp* المختلط مع عصير الليمون ضد البكتيريا الممرضة المعزولة سريرياً مثل , *E. coli* و *Klebsilla. spp* والبكتيريا *Shigella. spp* و*Salmonella .spp* حيث أشار الباحثان إلى أن عادة ما يستخدم ورق القطن مع عصير الليمون في نيجيريا لعلاج الالتهابات المعوية الحادة حيث كانت نتائج مستخلص الإيثانولي لأوراق القطن مع عصير الليمون أكثر فعالية من المستخلص المائي .

ومن خلال الدراسة الحديثة التي قاما بها (2013) , Shinkafi and ndanusa لمعرفة النشاط المضاد للبكتيريا من خلال تأثير مستخلص عصير الليمون على البكتيريا المسببة لحب الشباب *Acne vulgaris* من البكتيريا *Staphylococcus aureus* و*Staphylococcus epidermidis* و *Propionibacteriu macnes* المعزولة من الصدر والوجه والظهر حيثُ بينت النتائج الفعالية التثبيطية في التركيزات العالية 60% ، 80% ، 100% بينما كانت التركيزات 20% ، 40% المنخفضة لعصير الليمون غير فعالة اتجاه هذه الجراثيم .

تشير الدراسات إلي أن الليمون *Citrus limon* يحتوي على قلويدات وهي ذات نشاط مضاد للسرطان وكذالك ذات نشاط مضاد للجراثيم وتحوي أيضا على فلافونيدات التي لديها طيف واسع للنشاط البيولوجي بما في ذلك مضاد للجراثيم والفطريات والفيروسات حيث تعمل مركبات الفلافونويد كمضاد للأكسدة ولديها القدرة على تعديل الأنشطة الإنزيمية وتمنع تكاثر الخلايا (2013), Mohanapriya *et al* .

وأجريت دراسة تم فيها استخدام مستخلصات كحولية لقشور الليمون كمادة فعالة مضادة للميكروبات ضد بكتيريا *Salmonella typhimurium* والبكتيريا *P . aeruginosa* و من خلال النتائج لوحظ تأثير تثبيطي واضح للمستخلصات الكحولية ، وأشار الباحث إلي أن قشور الحمضيات تعتبر مصدراً غنياً بالـflavanones والعديد من Polymethoxylated flavones التي تعتبر عاملا مهماً مضادا للميكروبات (2011),. Maruti *et al* .

أوضحت الدراسات إلي أن الليمون يعتبر من النبات الغنية بالفيتامينات مثل (A , B_2 , B_{12} , PP , C) وأيضا غني بالحديد و الكلس والبوتاس و الفوسفور و

الكربوهيدرات و البروتين والدهن ، ويحتوي أيضا على نسبة عالية من الستزين ، وأثبتت الدراسات أن لليمون عدة فوائد طبية داخلية مثل القضاء على الكوليرا و الأنفلونزا و الوقاية من إمراض الفم ويعتبر قابض للأوعية ومخثر للدم ومهدي للأعصاب وكذالك منظم للغدة الدرقية وله القدرة على ترميم الأنسجة ومعالجة إمراض الروماتيزم والنقرس وارتفاع ضغط الدم وتصلب الشرايين ويعمل على زيادة من إدرار البول ويطهر المجاري البولية ، ومن فوائده الخارجية تضميد الجروح وعلاج للقروح وكذالك علاج لجفاف الجلد وحب الشباب العمري ، (2000) .

وفي دراسة قام بها (2010),. Bina *et al* وذلك من خلال تأثير مضاد للميكروبات من مستخلص عصير الليمون ضد بكتيريا ضمة الكوليرا *Vibrio cholerae* وكان معدل التثبيط وصل إلي 28 ملم حيثُ أشار الباحثون إلي أن لعصير الليمون تأثيراً وقائياً قوياً ضد الكوليرا وكانت باقي النتائج اقل فعالية اتجاه بكتيريا *Enterobacter spp* و *Citrobacter spp* و *E. coli* حيث يتراوح قطر التثبيط ما بين 8–9 ملم وكان مستخلص عصير الليمون غير فعال ضد بكتيريا *Shigella ssp* و *Salmonella typhi* و ssp *Klebsiella* .

ومن خلال الدراسة التي قام بها (2012),Kumar *et a l.* تقييم النشاط المضاد للبكتيريا من مستخلصات نباتية مثل الثوم *Allium sativum* والزنجبيل *Zingiber officinale* والجوافة *Psidium guajava* و الليمون ضد مسببات الأمراض من بكتيريا *B.Subtilis* و *E. coli* و *P. aeruginosa* و *S. aureus* و *Salmonella spp* حيث بينت المستخلصات النباتية تأثيرات تثبيطية واضحة اتجاه الجراثيم الممرضة حيثُ لوحظ أيضاً أن مستخلص عصير الليمون أوضح أكثر تثبيطاً اتجاه بكتيريا *E. coli* و *P. aeruginosa* مقارنة بالأنواع الأخرى التي تمت عليها الدراسة.

خصائص الليمون Lemon characters

اسم الشائع هو شجرة الليمون lemon tree أما الاسم العلمي هو *Citrus limon l.* العائد لعائلة الحمضيات Rutaceae حيث تحتوي هذه العائلة على أحماض عضوية Organic acids مثل حمض الستريك و حمض ألماليك و كذلك تحتوي على سيترات البوتاسيوم و الكالسيوم و فيتـامين C و B ، حيث إن لها تأثير فعـال على نشا ط البكتيريا (2013) ،. Mohanapriya *et al* ، حيث يعتبر الليمون من النباتات الطبية فهي يحتوي على القلويدات Alkaloids التي لهـا تأثير مضاد للبكتيريا وكذلك على الخـــلايا السرطانية (2000) ., Kawaii *et al* . وكذالك تحتوي الحمضيات على مركبات الفلافونويدات Flavonoiods بكميات كبيرة و هي مضادة للجراثيم و للفطريات ومضادة للفيروسات (2006), Ahmad *et al* .

أثبتـت الدراسـات الحديثـة و بواسـطة التحليـل الكيميـائي أن عصـير الليمـون Lemon juice يحتوي علـى البروتينـات Proteins و الكاربوهيـدرات Carbohydrates و الفينـولات Phenols و الفلافونيـدات Flavonoides و الصـابونيات Sapoines و الجلايكوتيـدات Glycosides و التانينـات Tannins و السـترويد Steroid و السـكريات المختزلـة Reducing sugar التي كان لهـا تـأثير واضـح علـى نمو بكتيريا القولون *Escherichia coli* والبكتيريا *Shigella sonnei* والبكتيريا *Salmnella . paratyhy* . Bansode and Chavan , (2012)

قُسمت محتويات النباتات عموماً إلى مجموعتين رئيستين اعتماداً على فعاليتها النعيمى و الجبوري ، (2006) .

1. المكونات غير الفعالة Inactive constituents:

وهي المواد التي ليس لها تأثير طبي مثل السيليلوز واللجنين ومعظم مكونات خلايا النبات .

2. المكونات الفعالة Active constituents:

وهي المواد التي يُعزى لها الأثر الطبي أو الفسيولوجي للنبات ولها قيمة دوائية كبيرة، وقد قُسمت هذه المكونات على أساس صفاتها الكيميائية والطبيعية إلى عدة أقسام هي :-

1.القلويدات Alkaloids :-

هي عبارة عن قواعد أزوتية معقدة التركيب من أصل نباتي، ومعظم القلويدات تحتوي على حلقة أو أكثر وغالبا ما يكون النيتروجين فيها على هيئة أمين ثانوي أو ثالثي ، وهي مهمة في الصناعة الصيدلانية ، وقد كان مصدر القلويدات في الماضي النباتات الزهرية إلا انه في الوقت الحاضر قد تم عزل الكثير من هذه المركبات من مصادر مختلفة مثل الحشرات والكائنات البحرية الدقيقة ولا يزال عدد القلويدات التي تم استخلاصها من النباتات الزهرية يفوق عدد القلويدات التي تم استخلاصها من المصادر الأخرى ومن أمثلتها Colchicine وCaffeine إبراهيم ، (2009) ، وهناك نظريات عديدة حول أهمية هذه المركبات للنباتات ، منها وجودها كمنظم لنمو النبات أو كمواد دفاعية يملكها النبات ضد الكائنات الأخرى فضلاً عن أهميتها في التوازن الأيوني في النبات الحمداني وأيوب، (1990) .

2.الفلافونيدات Flavonoid:-

هي عبارة عن مركبات فينولية ذات نشاط مضاد للأكسدة ، وهي ذات نشاط مضاد للميكروبات وكذلك تقوم بتثبيط الخلايا السرطانية وتستخدم كـــــذلك في علاج إمراض القلب والأوعية الدمـــــوية ومن أمثلتها Anthocyanin وBetacyanin والكاروتين Carotene (2000), Evan ، وتتشكل الفلافونيد أساسا من العنصر ذي البنية C_6-C_3-C_6 موزعة على ثلاث حلقات تدعى الفلافون Flavon والذي يعتبر المركب الأساسي للفلافونويدات إبراهيم ,(2009) ، حيث تعتبر مركبات الفلافونويد هي المسئولة عن ألوان الزهور وحماية النبات من الميكروبات والحشرات ولها قابلية الذوبان في الماء (2011)., Amalesh et *al* والمـركبات الفلافونيدية تمتلك خواصاً مضادة للميكروبات واسعة الطيف Broad Spectrum وذلك لقابليتها على إذابة البروتينات الخلوية، وتحطيم الغشاء الخلوي (1990), Vishwakarma

3. البروتينات Proteins :-

هي عبارة عن جزيئات كبيرة تتألف من سلاسل طويلة من وحدات فرعية تسمى الأحماض الامينية ، حيثُ لديها العديد من الاستخدامات العلاجية في الوقاية من الأمراض حيثُ تدخل في تركيب الأجسام المضادة التي تزيد من المناعة الطبيعية لمقاومة الأمراض والالتهابات التي تصيب الجسم (2002), Bruce *et al* .

4. الصابونيات Saponines:-

هي عبارة عن تربينات ثلاثية حقيقية في صورة جلايكوسيدات ويتعدد السكر ليصل من اثنين إلي عشرة ، وعلية فالصابونيات ذات وزن جزيئي عالي ، وقد اشتق اسمها من الكلمة اليونانية Sapo بمعنى صابون لأنها تعطي رغوة كثيفة إذا رجت مع الماء أو الكحولات المخففة

وتستمر لمدة طويلة إبراهيم ، (2009) ، وهي شائعة في عدد كبير من النباتات وهي ذات تأثير تثبيطي على الجراثيم ويكون طعمها مر (2008),. Muthana *et al* .

5. الزيوت الطيارة Volatile Oils :-

هي عبارة عن خليط من المواد ذات رائحة عطرية وطيارة وهي تربينات أحادية وسيسكوتربينات وهي عبارة عن مركبات أوكسجينية لا تذوب في الماء والكحول وتستخدم الزيوت الطيارة في المجالات العلاجية كمواد طاردة للديدان أو مدرة للبول وعلاج الغازات المعدية والمعوية وتستخدم في تصنيع الروائح والعطور ومستحضرات التجميل إبراهيم ،(2009)، وتعد مواد مطهرة لفعلها القاتل للجراثيم والفطريات المختلفة ومن أمثلتها اليوكالتول و السيسول التي توجد في أوراق نبات اليوكاليتوس جبوري ،(2006) ، وزيـوت الاليسين (Allicin) فـي أبصـال الـثوم سعدالدين ،(1986).

6.الجلايكوسيدات Glycosides :-

هي عبارة عن مواد تتكون من جزء سكري و أخر غير سكري وتعد من نواتج الإيض الثانوي أي أنها لا تنتج في المراحل المبكرة من عمر النبات وتعود فعالية الجلايكوسيدات المضادة للأحياء المجهرية إلي الجزء الغير سكري في تركيبها، ويختلف الجزء السكري من جلايكوسيد لأخر مما قد يكسب الجلايكوسيدات فعالية عالية وطيف واسع في التأثير الحديثي و آخرون ،(2013) ، وهي عديمة اللون وذات طعم مر وسمية خفيفة وتذوب في الماء و الكحول ومن أمثلتها الروتين (Rutin) والسينوسايد Sennosides والنيرين والنيريانثين سعد الدين ،(1986) .

7.الدباغيات Tannines :-

هي عبارة عن مجموعة من المركبات الفينولية متعددة الحلقات توجد في جميع أجزاء النبات تقريباً، وتعود فعاليتها المضادة للبكتيريا إلي مقدرتها على تحطيم البروتينات والتراكيب الأخرى المتواجدة على جدار خلية البكتيريا (مثل بروتين الفلاجلين Flagellin الموجود في الأسواط وبروتين البلين Pillin الموجود في الشعيرات الجنسية) مما قد يسبب في إعاقة عملية حركة البكتيريا وكذلك في عملية التصاقها Adhesins والإنزيمات وبعض البروتينات الناقلة الموجودة ضمن الغشاء الخلوي وتصنف التانينات إلي مجموعتين تانينات قابلة للتحلل وتانينات مكثفة وكلاهما تتميز بفعالية تضادية تجاه الإحياء المجهرية وبعض أفرادها له قابلية على تثبيط إنزيمات البيروكسيديز في الأحياء بدائية النواة الحديثي و آخرون ، (2013). وللتانينات أهمية طبية بسبب خواصها القابضة وقابليتها السريعة في شفاء الجروح والتئامها وتساعد في تكوين الأنسجة الجديدة ولها تأثير مطهر لقدرتها على قتل الجراثيم المختلفة والفطريات والخمائر (1997),.Molan *et al* .

الفصل الثالث

المواد وطرق العمل

Material and Methods

1.3. الأجهزة والمواد المستعملة Instruments and Materials

الحاضنة Incubator شركة Hamilton International موديل YLD - 6000 .

الحاضنة الهزازة Shaker incubator من شركة Stuart scientific ، المملكة المتحدة .

جهاز التعقيم البخاري Autoclave من شركة Hirayama manufacturing corporation اليابان موديل .YX-280B.

فرن كهربائيElectric oven من شركة Santena ، إيطاليا.

المجهر الضوئي Light Microscopes شركة Olympus موديل CX21FS1.

الميزان الحساس Sensory balance من شركة Sartarius laboratory ، ألمانيا .

جهاز تعريف السلالات البكتيرية BD Phoenix 100 من شركة Phoenix ، الولايات المتحدة.

ثلاجة لحفظ العينات شركة Sharp، اليابان .

الماصات ميكرون (100، 1000) Eppendorf ، ألمانيا .

أوراق الترشيح Filter paper شركة Whatman International .

ابر حقن معقمة Sterile syringe من شركة B|Braun، ألمانيا .

جهاز قياس الـ pH شركة ProMinent، ألمانيا .

جهاز للتسخين Heater شركة Electrothermal، بريطانيا.

أطباق بتري المعقمة Sterile Petri dish شركة Plsastiques.

Swab Cotton شركة LP-ITALIANA . إيطاليا .

بارافلم Parafilm Rolls شركة American National Can .

شرائح Microscope Slides 26×76mm شركة Citoglas .

غطاء شرائح Microscope Slides Cover Slips 22×22mm شركة Supe Rior .

القطن المعقم Sterile cotton شركة Winner medical .

الشاش المعقم Gauze Sterile شركة Winner medical .

القفازات Gloves شركة Sempermed .

جميع الأدوات الزجاجية شركة Supe Rior .

قنينة غسل Wash bottle 250 ml شركة LP-ITALIANA .

ابر العزل البلاستيكية من شركة Cultiplast ، ايطاليا .

مجهر مزود بكاميرا تصوير شركة Olympus .

الأكياس المعقمة Autoclave bags شركة LP-ITALIANA .

2.3.المواد الكيميائية والأوساط الغذائية Media Chemicals and Nutrient

1.2.3. المواد الكيميائية Chemicals

1.الإيثانول Ethanol والميثانول Methanol من شركة Baker .

2.هيدروكسيد الصوديوم NaOH وكربونات الصوديوم Na_2CO_3 و كبريتات النحاسيك$CuSo_4$

و خلات الرصاص $C_4H_6O_4Pb$ من شركة BRAMAR Chemie ألمانيا.

4. حمض الكبريتيك H_2SO_4 و كلوروفورم $CHCl_3$ من شركة Fischer - Chemie ألمانيا.

2.2.3. الأوساط الزراعية Culture media

1- Nutrient Agar (NA) الشركة المصنعة Oxoid الولايات المتحدة.

2- Muller-Hinton Agar (MHA) الشركة المصنعة Oxoid الولايات المتحدة.

3- Nutrient Broth (NB) الشركة المصنعة Oxoid الولايات المتحدة.

3.2.3. المضادات الحيوية Antibiotics

جميع المضادات الحيوية المستخدمة من قبل شركة Oxid . الولايات المتحدة .

No.	Antibiotics	Symbol	Concentrations (µg/µl)
1	Ampicillin	AMP	250/2
2	Amoxicillin	AMO	200/2
3	Tetracycline	TE	250/2
4	Penicillin	PN	200/2
5	Amikacin	AK	250/2
6	Cefotaxime	CTX	250/2
7	Gentamicin	GM	80/2

4.2.3. الكواشف Reagents

1. **كاشف موليش Molisch Reagent** أُستخدم هذا الكاشف في اختبار الكربوهيدرات.

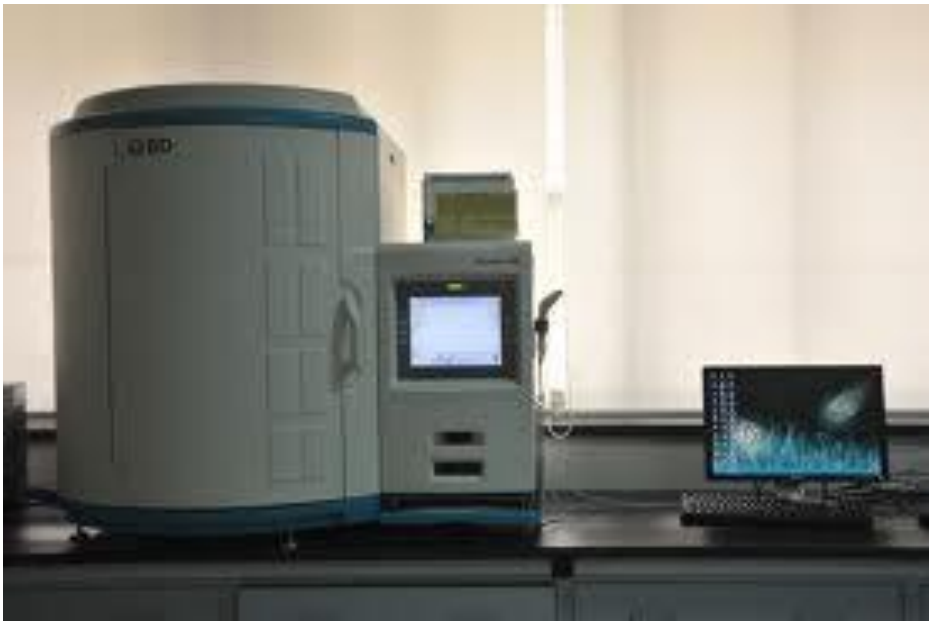
2. **كاشف بندكت Benedict Reagent** أُستخدم هذا الكاشف في اختبار السكريات المختزلة.

3. **كاشف فولين Folin Reagent** أُستخدم هذا الكاشف في اختبار الفينولات.

4. **كاشف دراجندروف Reagent Dragendroff** أُستخدم هذا الكاشف في اختبار القلويدات .

3.3. مصدر وعزل العينات البكتيرية Source & Isolation bacterial samples

تم عزل كل من البكـــــتيريا *Staphylococcus aeurus* و البكـــــتيريا *Staphylococcus epidermidis* والبكــتيريا *Streptococcus pyogenes* والبكـــــتيريا *Kebsiella pneumonia* والبكــتيريا *Pseudomonas aeruginosa* والبكـــــتيريا *Citrobacter freundii* و البكتيريا *Salmonella typhi* من عينات مرضى معرفة بواسطة جهاز الفونكس Phoenix تم الحصول عليها من مركز بنغازي الطبي.



شكل 1 : B.D. Phoenix

4.3 الطرق العامة General methods

1.4.3. التحضين Incubation

تعتبر فترة حضانة الكائنات الدقيقة من أهم الخطوات الأساسية في التطبيقات المعملية الخاصة بالكائنات الدقيقة نظرا لما تلعبه هذه الخطوة من أهمية في عملية النمو . تحضن الأطباق المحتوية على الجراثيم البكتيرية في درجة حرارة 37 درجة مئوية لمدة 24-48 ساعة في حاضنة معتمة .

2.4.3. حفظ المزارع البكتيرية Preservation of bacterial cultures

تم حفظ المزارع البكتيرية في المبرد على هيأة أطباق مشمعة على أسطح الأنابيب الغذائية المائلة Slant cultures ، تبقى هذه المزارع فترة من الوقت في ظروف بيئية باردة وذلك لمنع تكاثرها المفرط في وضع تخزيني Stock culture بعد فترة من الوقت تجرى عملية الزرع الجزئي Sub-culturing وذلك من أجل تنشيط الخلايا البكتيرية وزيادة حيويتها .

5.3. تقدير عدد الخلايا البكتيرية باستخدام مقياس ماكفرلاند McFarland standard

تم تحضير العالق البكتيري حسب طريقة (Anandi and Juan , 2009) وذلك بنقل مستعمرتان من البكتيريا في أنبوبة اختبار تحتوي على 5 مل من المحلول الملحي Saline مع الرج لمدة دقيقة لمقارنتها بمقياس ماكفرلاند و الشائع في معامل البكتيريا استخدام 0.5 McFarland standard وهي عبارة عن خلط 0.05 مل من كلوريد الباريوم $BaCl_2$ تركيزه1% مع 9.95 مل من حامض الكبريتيك $H2SO_4$ تركيزه 1% في أنبوبة اختبار تحتوي

على 5 مل من المحلول الملحي مع الرج فيتكون راسب من كبريتات الباريوم barium sulfate precipitate ويمكن مقارنة المعلق البكتيري مع أنبوبة ماكفرلاند بالنظر وذلك بوضع ورقة مخططة بخطوط سوداء خلف الأنبوبتين فإذا تم رؤية الخطوط بنفس الوضوح فهذا يدل على أن عكارة المعلق البكتيري يساوي تقريباً مقياس ماكفرلاند والتي تقدر بـ 1.5×10^8 خلية /ملم وفي حال كان المعلق البكتيري خفيف العكارة يتم زيادة عكارته ليحاكي مقياس ماكفرلاند .

6.3. التحليل الكيميائي النباتي النوعي Qualitative phytochemical analysis

تم الكشف عن البروتينات حسب طريقة (Ashok *et al* ., 2012) . اماالجلايكوسيدات و الفينولات و الكربوهيدرات والأحماض الامينية و السكريات المختزلة بالاعتماد على طريقة (Yadav and Munin , 2011) . والتانينات والصابونيات و الفلافونيدات والقلويدات حسب طريقة (محسن وآخرون ، 2010) .

1. اختبار موليش للكشف عن الكربوهيدرات

Molisch's test for the detection of Carbohydrates

تم خلط مستخلص عصير الليمون 1 مل مع 2 مل من كاشف موليش في انبوبة اختبار جيداً ويتم بعدا ذلك إضافة 2 مل من حمض الكبريتيك المركز H_2SO_4 بعناية على ملامس لسطح أنبوبة الاختبار فعندا ظهور حلقة بنفسجية داكنة في المنطقة الفاصلة فهذا يدل على وجود الكربوهيدرات.

2. اختبار بندكت للكشف عن السكريات المختزلة

Benedict test for the detection of reducing sugars

تم خلط مستخلص عصير الليمون 1 مل مع 2 مل من كاشف بندكت في أنبوبة اختبار وثم توضع أنبوبة الاختبار في ماء مغلي لمدة 10 دقائق فيتكون راسب بني محمر، وهذا يدل على وجود السكريات المختزلة.

3. اختبار بيوريت للكشف عن البروتينات

Biuret test for the detection of proteins

تم خلط مستخلص عصير الليمون 1مل مع 1مل من محلول هيدروكسيد الصوديوم ذو تركيز 10% في أنبوبة اختبار ويتم بعد ذلك إضافة 1مل من محلول كبريتات النحاسيك تركيزه 0.7% فيتكون لون بنفسجي يدل على وجود البروتينات .

4. اختبار سالكوفسكي للكشف عن الجلايكوسيدات

Salkowski test for the detection of Glycosides

تم خلط مستخلص عصير الليمون 1 مل مع 2 مل من الكلوروفورم مع إضافة 2 مل من حامض الكبريتيك المركز H_2SO_4 في أنبوبة الاختبار مع الرج بحذر فيتكون حلقة ذات لون بني محمر وهذا يدل ذ على وجود الجلايكوسيدات.

5. اختبار الكشف عن الفينولات **Detection test for phenols**

تم خلط مستخلص عصير الليمون 1 مل مع 2 مل من كاشف فولين تركيزه 10% في أنبوبة اختبار مع إضافة 2 مل من محلول كربونات الصوديوم Na2CO3 وننتظر لمدة 15 دقيقة في درجة حرارة الغرفة فيتكون لون ازرق دليل على وجود الفينولات .

6. اختبارالنينهيدرين للكشف عن الاحماض الامينية

Ninhydrin test for the detection of Amino acids

تم خلط مستخلص عصير الليمون 1 مل مع 2 ملم من حلول النينهيدرين تركيزه 0.2% في أنبوبة اختبار فيتكون لدينا اللون الأزرق دليل على وجود الأحماض الامينية .

7. اختبار الكشف عن التانينات Detection test for Tannins

تم خلط مستخلص عصير الليمون 1 مل مع 2 مل من محلول خلات الرصاص تركيزه 1% في أنبوبة اختبار فيتكون لدينا راسب هلامي القوام دليل على وجود التانينات .

8. اختبار دراجندروف للكشف عن القلويدات

Dragendroff test for the detection of Alkaloids

تم خلط مستخلص عصير الليمون 1 مل مع 2 مل من كاشف دراجندروف في أنبوبة اختبار فيتكون لدينا لون أصفر دليل على وجود القلويدات .

9. اختبار الكشف عن الفلافونويدات Detection test for Flavonoids

يتم خلط مستخلص عصير الليمون 1 مل مع 1 مل من كحول الميثانول تركيزه 40% في أنبوبة اختبار مع الرج ثم يضاف 1 مل من محلول هيدروكسيد الصوديوم NaOH فيتكون لدينا لون أصفر دليل على وجود الفلافونويدات .

10. اختبار الكشف عن الصابونيات Detection test for Saponins

تم خلط مستخلص عصير الليمون 2 مل مع 5 مل من الماء المقطر في أنبوبة اختبار مع الرج بقوة فيتكون لدينا رغوة مستقرة دليل على وجود Saponins . اختبار أخر يتم فيه إضافة

1مل من عصير الليمون مع 1مل من كاشف كلوريد الزئبق المائي تركيزه 5% في أنبوبة اختبار فيتكون راسب ابيض يدل على وجود الـ Saponins.

7.3. استخلاص عصير الليمون Extraction of Lemon Juice

تم الحصول على ثمار الليمون من السوق حيثُ نقوم بغسلها جيداً بالماء ومن ثم مسح الجزء الخارجي للثمرة بالكحول الإيثانول Ethanol تركيزه 70% . يجمع العصير بواسطة حقنة معقمة Sterile syringe ثم يوضع المستخلص في أنبوبة زجاجية محكمة الغلق وبعيدا عن الضوء المباشر حتى نتمكن من تلافي تأثير الضوء المباشر Photo inactivation ثم بعد ذلك توضع في المبرد بدرجة 18 درجة مئوية إلى حين الاستعمال .

8.3.اختبار فعالية مستخلص عصير الليمون والمضادات الحيوية ضد انواع البكتيريا المعزولة

Efficiency test of Lemon Juice extracts & Antibiotics against isolated bacteria

استخدمت طريقة الانتشار في الحفر Well diffusion methods من قبل كل من Bansode and Chavan , (2012) و ذلك بصب 20 مل من الوسط الغذائي Muller–Hinton Agar (MHA) لكل طبق بترى. تتُرك الأطباق بعدها لمدة (15–30) دقيقة لحين تصل إلى مرحلة الجفاف ، وثم بعد ذلك يلقح الوسط بواسطة مسحة قطنية معقمة Sterile swab من معلق بكتيري كثافة خلاياه (1.5×10^8 خلية/ ملليتر) . ثم تقارن مع المحلول القياسي ماكفرلاند ، وتم عمل حفر بقطر8 مل لكل حفرة باستخدام ثاقب فليني Cork borer معقم بواسطة اللهب. وتم تحضير تراكيز مختلفة من عصير الليمون باستخدام

الماء المقطر Distilled water بنسبة 25 % ، 50 % ، 75 % ، 100 % ، حيثُ تم إضافة 100 مايكرو ليتر من التراكيز المختلفة لكل حفرة مستخدماً ماصة دقيقة أوتوماتيكية ذات أغطية معقمة ، وكذالك يتم مقارنة أعلى تركيز مثبط لعصير الليمون مع مجموعة من المضادات الحيوية بنفس الطريقة . تحضن بعدها الأطباق عند درجة حرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة في الحاضنة ، ثم تسحب الأطباق ويتم قياس قطر منطقة التثبيط بالملمتر علماً أن منطقة التثبيط Inhibition zone هي المنطقة الخالية من النمو الجرثومي .

الفصل الرابع

النتائـــج

Results

1.4.البكتيريا المعزولة Isolated bacteria

تم اختيار أنواع من البكتيريا الموجبة والسالبة التي تم جمعها (أنظر المواد وطرق العمل) وذلك من أجل معرفة دور مستخلص الليمون *Citrus Limon l.* الذي يعتبر من المركبات الإيضية الثانوية Secondary metabolites التي تلعب دوراً قاتلاً مميزاً على العديد من الخلايا البكتيرية الممرضة والغير ممرضة . لقد تم اختيار هذه الأنواع البكتيرية لمعرفة مدى استجابتها اتجاه هذه المركبات الإيضية . لقد كانت نتائج هذه التجربة واعدة و واضحة وذلك من خلال التأثير المباشر على هذه الخلايا .

2.4 . .اختبار فعالية مستخلص عصير الليمون ضد البكتيريا المعزولة .

Efficiency test of Lemon juice extract against isolated bacteria

بينت النتائج المتحصل عليها من خلال تأثير التراكيز Concentrations المختلفة من عصير الليمون من حيث اختلاف فاعليتها القاتلة اتجاه البكتيريا *K. pneumonia* (شكل 3) و البكتيريا *C.freundii* (شكل 5) و البكتيريا *P. aeruginosa* (شكل 7) و البكتيريا *S.typhi* (شكل 4) والبكتيريا *S.pyogenes* (شكل 8) والبكتيريا *S. aureus* (شكل 2) و البكتيريا *S. epidermidis* (شكل 6) ومن خلال هذا التأثير القاتل ، فقد أوضحت هذه النتائج بأن التركيز 100% من مستخلص عصير الليمون عند

الأس الهيدروجيني pH 1.70 أوضح تأثير قاتل ضد البكتيريا ، فقد أوضحت البكتيريا *S. aureus* أعلى حساسية Sensitivity اتجاه تطبيق المستخلص حيث سجل قطر منطقة انعدام النمو بحوالي35 ملم (جدول1) ثم تليها والبكتيريا *P. aeruginosa* والبكتيريا *S. epidermidis* بقطر يبلغ حوالي مابين 29-30 ملم . أما بالنسبة للبكتيريا *C.freundii* والبكتيريا *S.typhi* فقد كان قطر منطقة انعدام النمو يتراوح مابين27-28 ملم والبكتيريا *S.pyogenes* بقطر يبلغ حوالي25 ملم . بينما كانت البكتيريا *K. pneumonia* أقل حساسية حيث كان قطر منطقة انعدام النمو يبلغ حوالي 20 ملم.

بينما كان تأثير تركيز 75% من المستخلص عند الأس الهيدروجيني pH 1.75 على البكتيريا *S. aureus* أعلى حساسية بقطر يبلغ حوالي 30 ملم. ثم تليها البكتيريا *C.freundii* بقطر يبلغ حوالي 24 ملم . بينما كانت معدلات قطر منطقة انعدام النمو الخاص لكلٍ من البكتيريا *S.typhi* والبكتيريا *P.aeruginosa* والبكتيريا *S. epidermidis* تتراوح ما بين19–21 ملم . أما فيما يتعلق منطقة انعدام النمو لمستخلص الليمون على البكتيريا *K. pneumonia* بقطر يبلغ حوالي 10 ملم . بينما كانت البكتيريا *S.pyogenes* مقاومة Resistant للتركيز سالف الذكر (جدول1) ، وكانت نتائج تركيز 50% من المستخلص عند pH 1.80 اتجاه البكتيريا *S. aureus* واعدة حيث بلغت منطقة انعدام النمو حوالي 25 ملم. حيث أوضحت كلٍ من البكتيريا *C.freundii* والبكتيريا *S. epidermidis* استجابتها لتأثير تركيز مستخلص الليمون حيث بلغت منطقة انعدام النمو بحوالي 18 ملم. أما البكتيريا *P. aeruginosa* فقد كان قطر الناتج من تأثير هذا المستخلص عليها يبلغ حوالي 15 ملم . بينما كانت البكتيريا *S.pyogenes* والبكتيريا *K. pneumonia* والبكتيريا

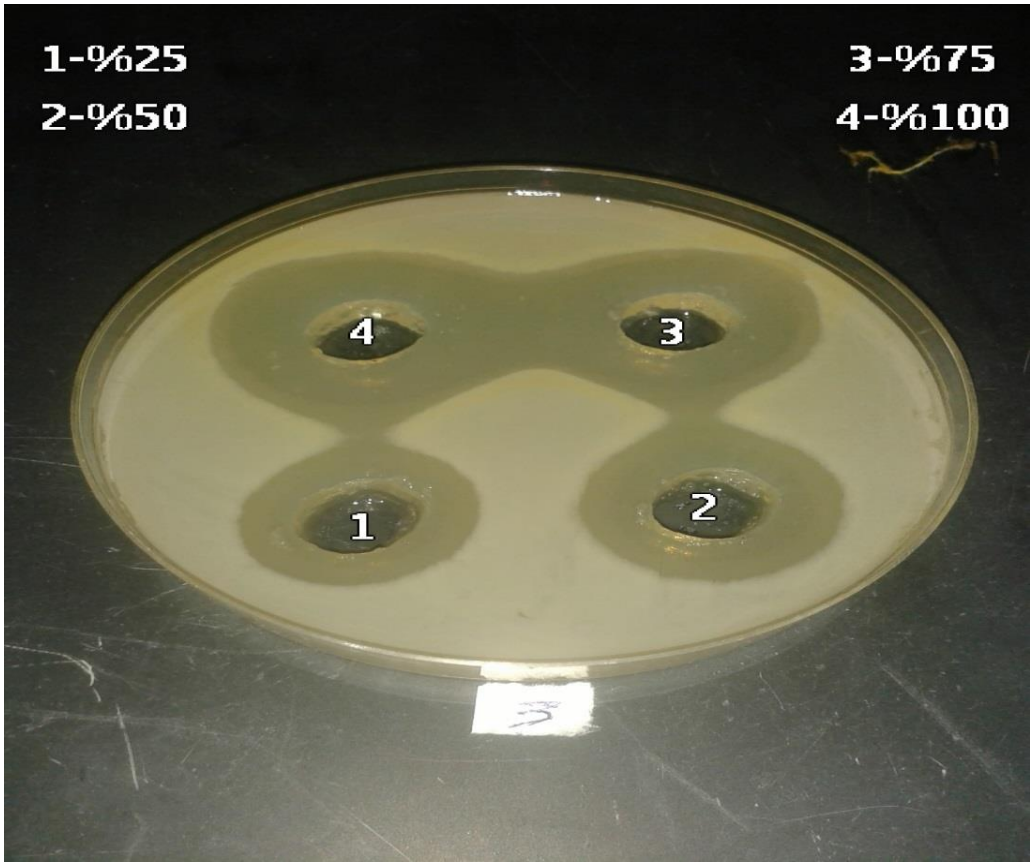
S.typhi مقاومة Resistant لتأثير التركيز (جدول1) أما عند التركيز 25% من المستخلص ذو الأس الهيدروجيني pH 1.86 فقد بينت النتائج أن جميع أنواع البكتيريا مقاومة للمستخلص ماعدا البكتيريا *S.aureus* التي أوضحت تأثير قاتل يبلغ حوالي 23 ملم (جدول 1) .

ومن خلال النتائج المدونة في (جدول1) يتضح أن أقطار مناطق انعدام النمو على البكتيريا الواقعة تحت الدراسة بينت نتائج تأثيرية ايجابية كبيرة في قتل جميع أنواع البكتيريا ولكن كانت هذه النتائج متباينة في مدى التأثير حسب نوع البكتيريا والتركيز المستخدم والرقم أو الأس الهيدروجيني pH حيث كانت هناك زيادة واضحة في معدل قطر مناطق انعدام النمو للبكتيريا Inhibition zones كلما زاد أو أرتفع معدل تركيز المستخلص Concentration rate (شكل 9) ، حيث تبين من خلال ذلك أن البكتيريا *S.aureus* (شكل 1) بينت أكثر تفاعلاً مع المستخلص مؤدية إلى الإفراط في الحساسية أي حساسية عالية . لقد تم تكرار هذه المعاملة لكل نوع من أنواع البكتيريا الواقعة تحت الدراسة بواقع ثلاث مرات حيث أوضحت من خلال هذه المعاملة أن استجابة هذه الأنواع البكتيرية أعطت نفس النتائج بالنسبة إلى سابقاتها الأولى (*S.aureus*) وذلك من خلال استخدام التراكيز الآتية : 25% ، 50% ، 75 % ، 100% بمقدار عينات المستخلص تتراوح حوالي 100 ميكرون (جدول 1) .

جدول 1: أقطار منطقة التثبيط بالمليمتر لتراكيز مستخلص عصير الليمون المختلفة .

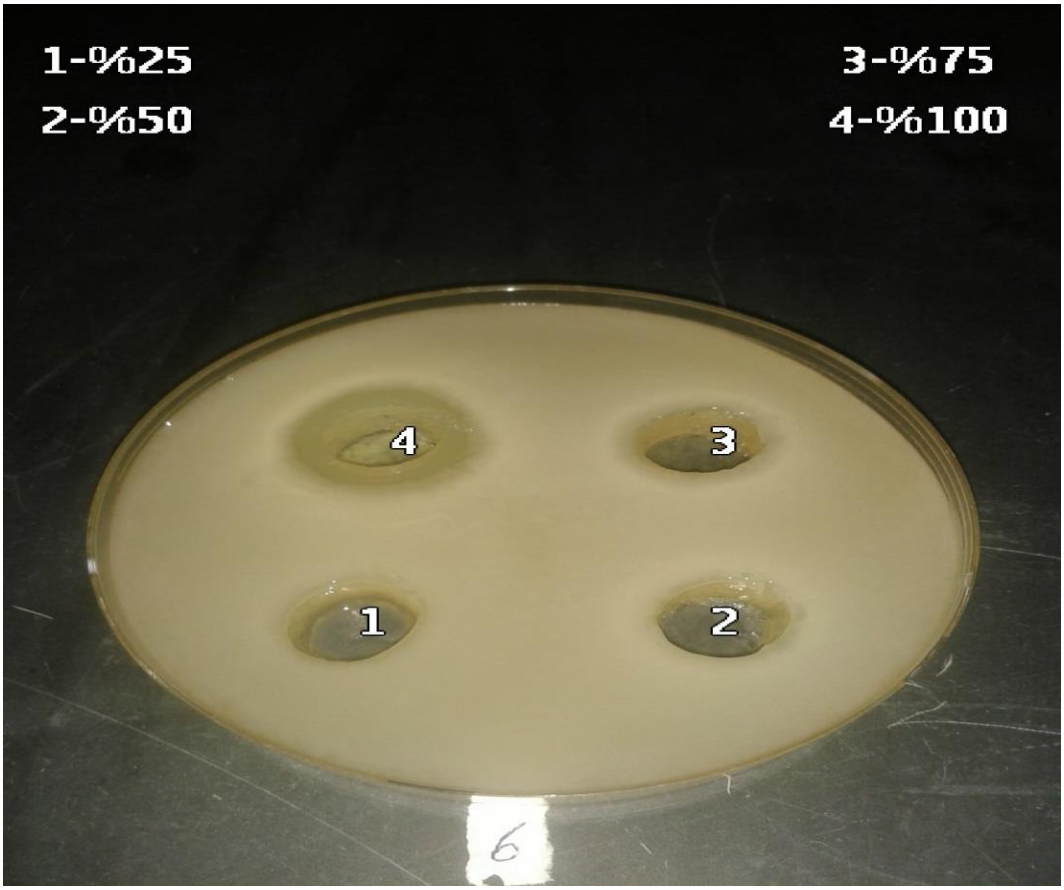
Tested bacteria	Lemon juice concentration and Inhibition zones (mm)			
	%100	%75	%50	%25
S. aureus	35	30	25	23
K. pneumonia	20	10	R	R
S. typhi	27	20	R	R
C. freundii	28	24	18	R
S. epidermidis	30	21	18	R
P. aeruginosa	29	19	15	R
S. pyogenes	25	R	R	R
PH	1.70	1.75	1.80	1.86

حيث تعني R مقاومة Resistant .



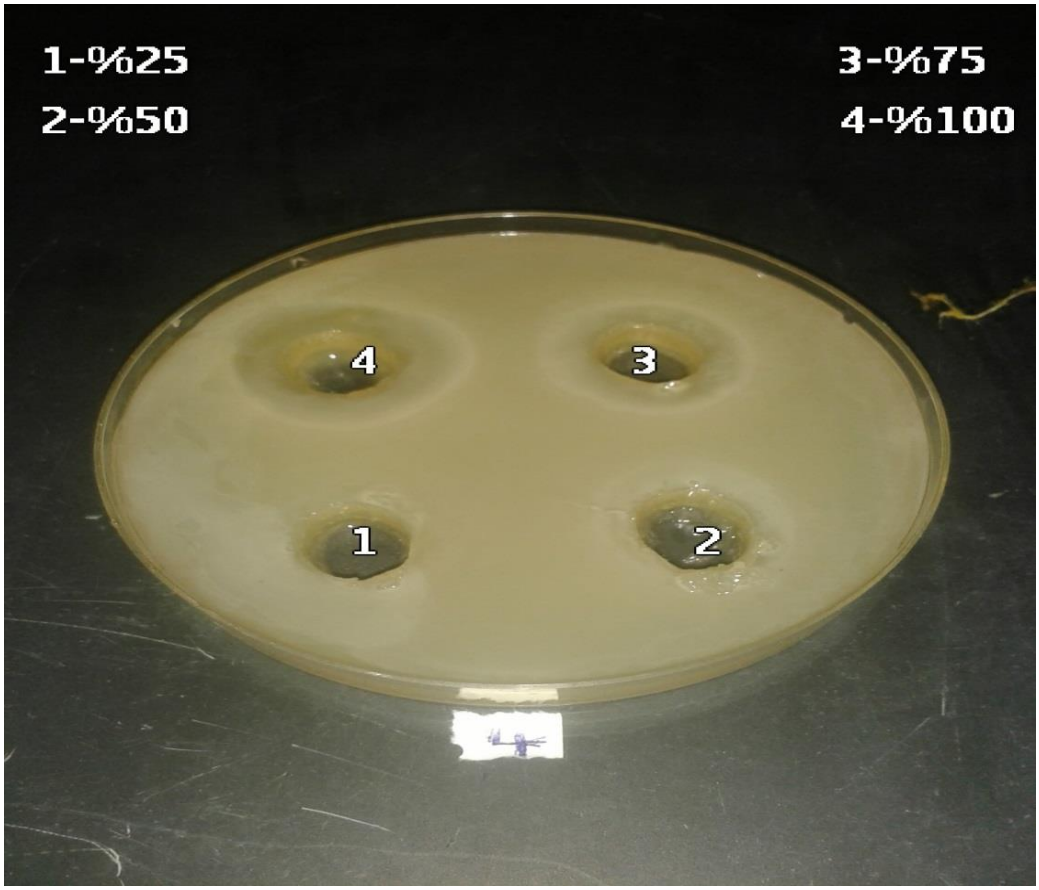
شكل 2 : التأثير التثبيطي لمستخلص عصير الليمون على البكتيريا

Staphylococcus aureus



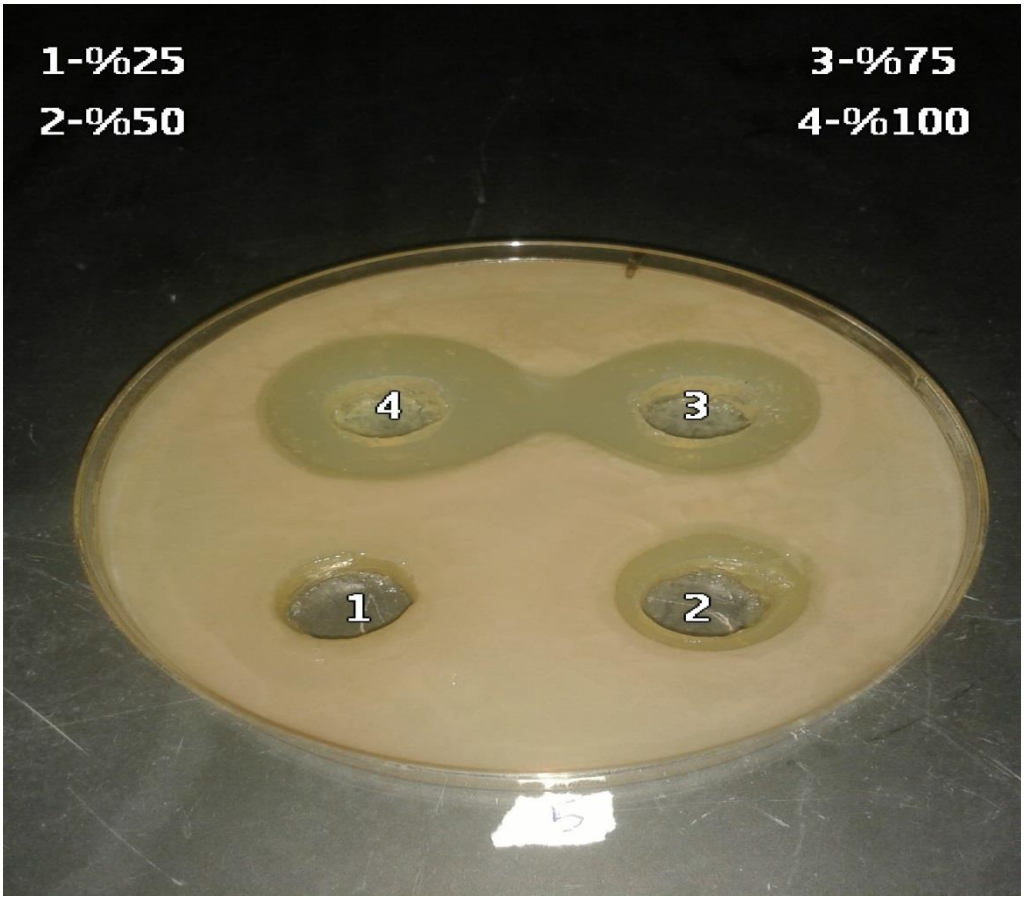
شكل 3 : التأثير التثبيطي لمستخلص عصير الليمون على البكتيريا

Klebsiella pneumonia



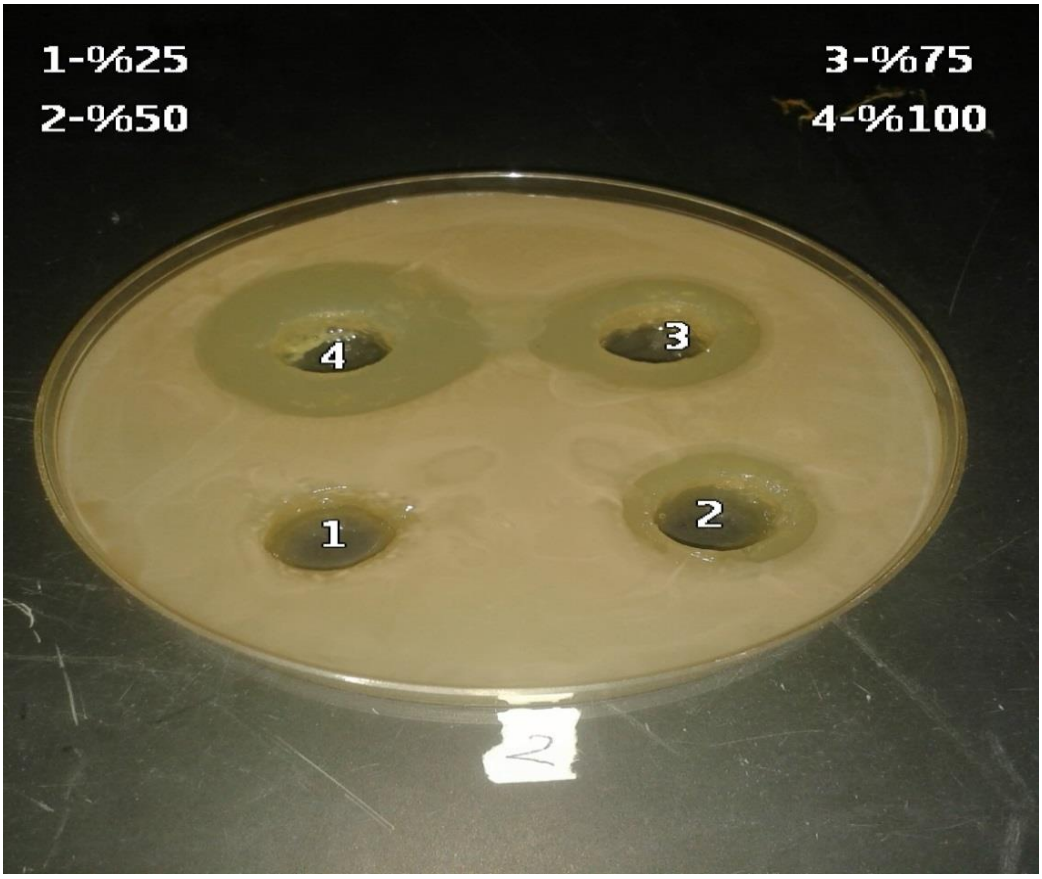
شكل 4 : التأثير التثبيطي لمستخلص عصير الليمون على البكتيريا

Salmonella typhi



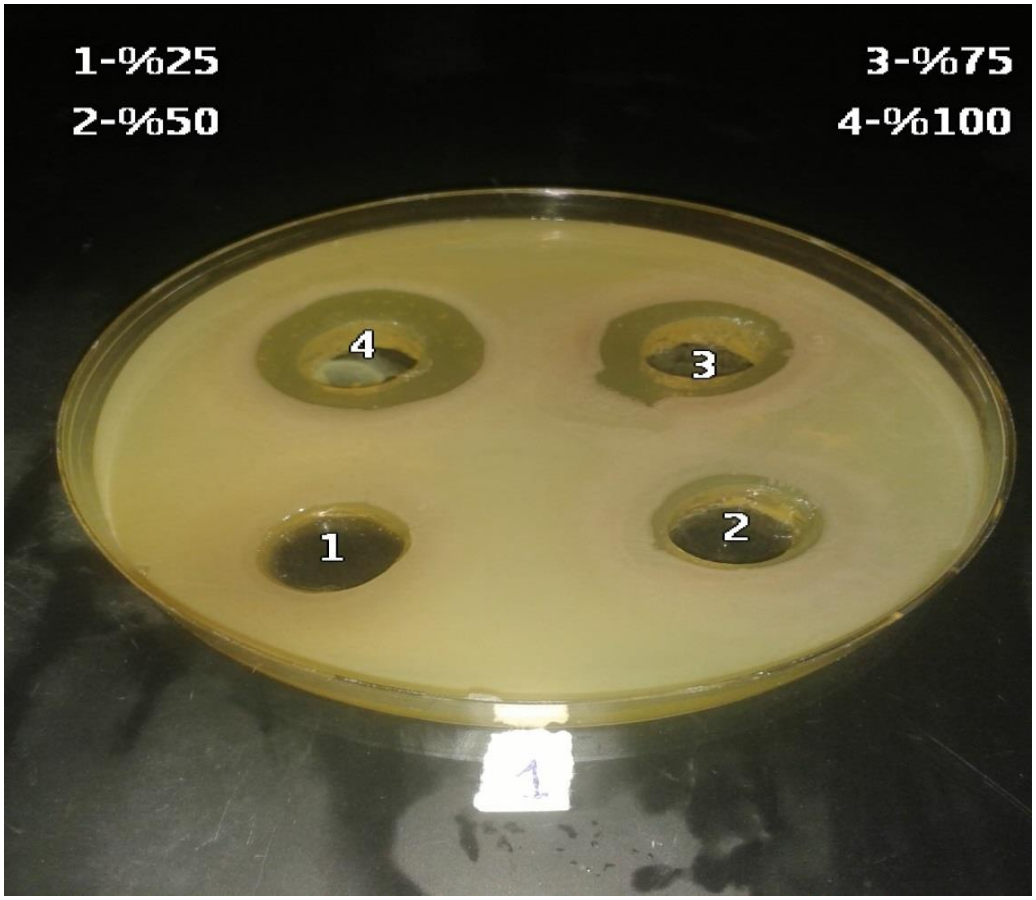
شكل 5 : التأثير التثبيطي لمستخلص عصير الليمون على البكتيريا

Citrobacter freundii



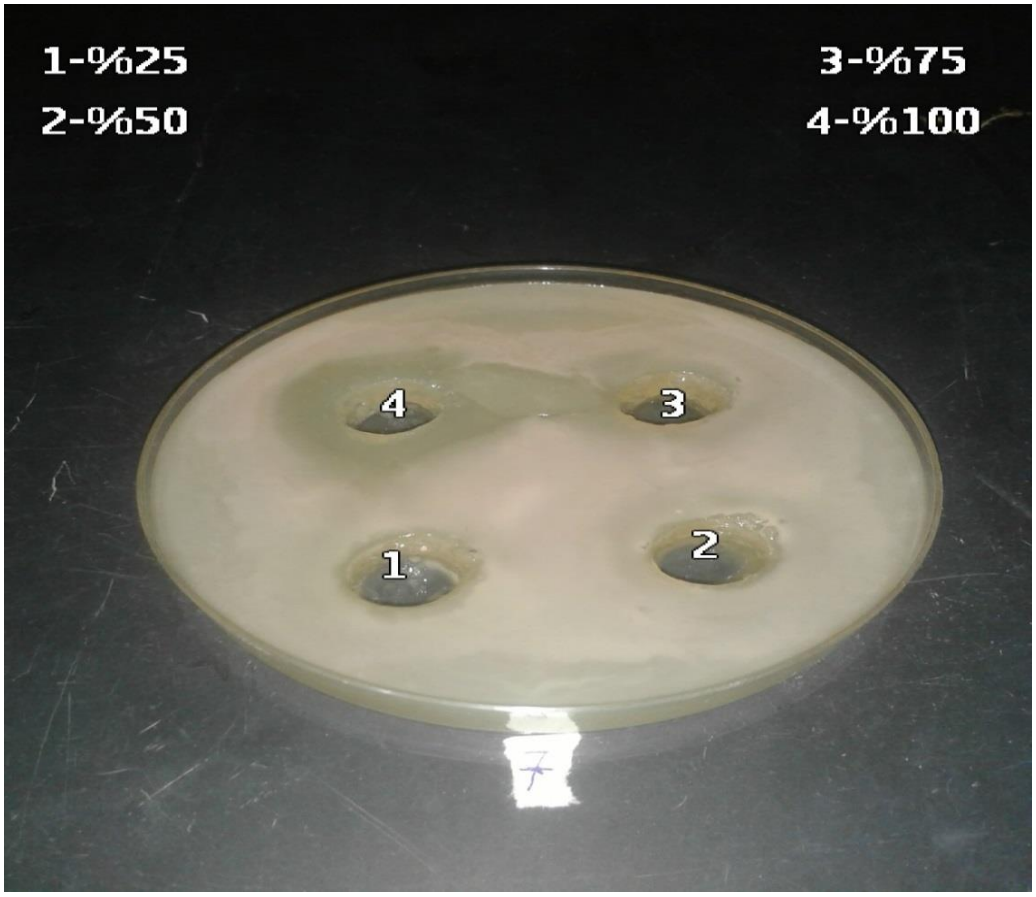
شكل 6 : التأثير التثبيطي لمستخلص عصير الليمون على البكتيريا

Staphylococcus epidermidis



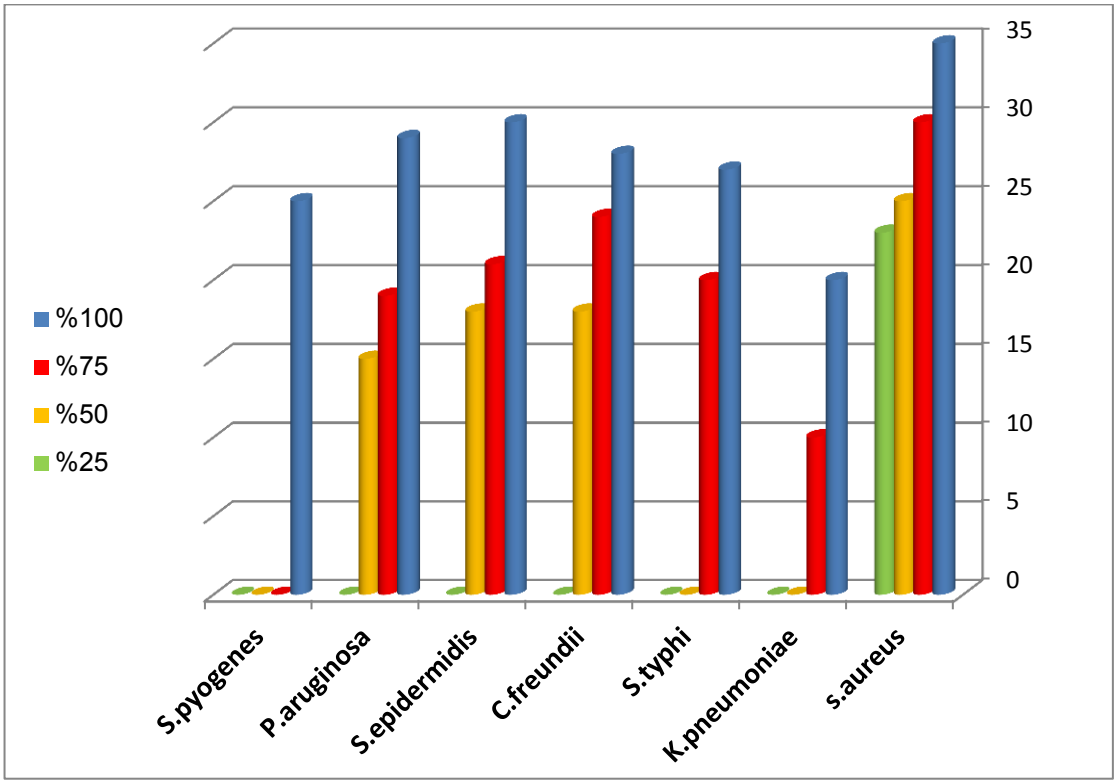
شكل 7 : التأثير التثبيطي لمستخلص عصير الليمون على البكتيريا

Pseudomonas aruginosa



شكل 8 : التأثير التثبيطي لمستخلص عصير الليمون على البكتيريا

Streptococcus pyogenes



شكل 9 : يوضح تأثير تراكيز عصير الليمون بالملمتر على البكتيريا

3.4 مقارنة اختبار فعالية مستخلص عصير الليمون مع فعالية المضادات الحيوية ضد البكتيريا الواقعة تحت الدراسة .

Comparison to test the effectiveness of the extract, lemon juice with the effectiveness of antibiotics against bacteria under study .

تم استخدام مستخلص عصير الليمون في هذا الاختبار بتركيز 100 % لكونه سجل أعلى معدل لمنطقة انعدام النمو على جميع أنواع البكتيريا (شكل 9) ومقارنتها بمجموعة من المضادات الحيوية المستخدمة في المقارنة التأثيرية (جدول 2) ، حيثُ بينت النتائج المتحصل عليها من خلال هذا الاختبار دور تأثير المضادات الحيوية وعصير الليمون على أنواع من البكتيريا منها بكتيريا *S. aureus* (شكل 10) حيثُ سجل قطر منطقة التثبيط بالنسبة للمضاد الحيوي Ampicillin والمضاد الحيوي Amoxicillin ما بين36-37 ملم (جدول2) وسجل قطر منطقة انعدام النمو لكلٍ من المضاد الحيوي Amikacin والمضاد الحيوي Gentamicin ما بيـــن 32-33 ملم أمـــا المضاد الحيوي Cefotaxime فقد سجل منطقة انعدام النمو بقطر تبلغ حوالي 29 ملم .

بينما المضاد الحيوي Penicillin تبلغ حوالي 20 ملم ، بينما كانت البكتيريا مقومة للمضاد الحيوي Tetracycline . في حين سجل قطر منطقة انعدام النمو بالنسبة لمستخلص عصير الليمون 35 ملم . أما بالنسبة للبكتيريا *K.pneumonia* (شكل12) حيثُ سجل معدل قطر منطقة انعدام النمو بالنسبة للمضاد الحيوي Amikacin 37 ملم والمضاد الحيوي Gentamicin 34 ملم . أما المضاد الحيوي Cefotaxime 30 ملم وكان معدل قطر منطقة انعدام النمو لكلٍ من المضاد الحيوي Ampicillin والمضاد الحيوي Amoxicillin يتراوح ما بين 22-23 ملم . بينما كانت البكتيريا مقومة للمضاد الحيوي Penicillin و

Tetracycline وسجل قطر منطقة انعدام النمو بالنسبة لمستخلص عصير الليمون 20 ملم (جدول 2). أما بكتيريا *S. typhi* (شكل14) فقد سجلت قطر منطقة انعدام النمو بالنسبة للمضاد الحيوي Cefotaxime تتــراوح 32 ملم، أما المضاد الحيوي Amikacin ملم . وسجل قطر منطقة انعدام النمو الخاصة بالمضاد الحيوي Gentamicin 23 ملم . والمضاد الحيوي Ampicillin 20 ملم ، والمضاد الحيويAmoxicillin 18 ملم . أما المضاد الحيوي Tetracycline فقد أثر على البكتيريا من خلال قطر يبلغ حوالي15 ملم .

بينما كانت البكتيريا مقاومة للمضاد الحيوي Penicillin وكان قطر منطقة التثبيط بالنسبة لمستخلص عصير الليمون 35 ملم(جدول 2)، أما بكتيريا *C. freundii* (شكل 16) فقد سجلت منطقة انعدام النمو عند استعمال أو تطبيق للمضاد الحيوي Cefotaxime الذي بلغ حوالي 39 ملم . وتطبيق المضاد الحيوي Amikacin الذي نتج عنه تكوين منطقة تتراوح حوالي 37 ملم. أما المضاد الحيوي Gentamicin فقد أنتج تكوين منطقة تبلغ حوالي 34 ملم. أنتج تطبيق كلٍ من المضاد الحيوي Ampicillin منطقة انعدام النمو تتراوح حوالي 30 ملم والمضاد الحيوي Amoxicillin منطقة انعدام النمو تتراوح تقريباً 27 ملم بينما كانت البكتيريا مقاومة بدرجة واضحة للمضاد الحيوي Penicillin والمضاد الحيوي Tetracycline اللذان لم يتمكنا من تثبيط البكتيريا أي بمعنى مقاومة لتأثير هذان المضادان، وكان قطر منطقة انعدام النمو بالنسبة لمستخلص عصير الليمون 28 ملم (جدول2) .

أما فيما يتعلق ببكتيريا *S. epidermidis* (شكل18) فقد أوضحت منطقة انعدام النمو عند تطبيق تأثير المضاد الحيوي Ampicillin يتراوح حوالي 25 ملم والمضاد الحيويAmoxicillin حوالي 24 ملم ، بينما كانت البكتيريا مقاومة لباقي المضادات الحيوية

المتمثلة في كلٍ من المضاد الحيوي Amikacin و Gentamicin و Penicillin وTetracycline و Cefotaxime و كان قطر منطقة انعدام النمو بالنسبة لمستخلص عصير الليمون 30 ملم (جدول2) . أما بكتيريا *P. aruginosa* (شكل20) فقد سجلت قطراً يبلغ حوالي36 ملم عند تطبيق المضاد الحيوي Amikacin أما Gentamicin يبلغ حوالي 35 ملم. وكذالك تأثير تطبيق المضاد الحيوي Amoxicillin على البكتيريا سجل منطقة انعدام النمو يبلغ قطرها حوالي 28 ملم ، بينما بين تأثير المضاد الحيوي Ampicillin منطقة انعدام النمو تبلغ حوالي 19 ملم . حيث بينت البكتيريا مقاومة لكلٍ من المضاد الحيوي Penicillin والمضاد الحيوي Tetracycline والمضاد الحيوي Cefotaxime وكان قطر منطقة انعدام النمو بالنسبة لمستخلص عصير الليمون 29 ملم (جدول2) .

أما بكتيريا *S. pyogenes* (شكل 22) فقد سجلت قطراً لمنطقة انعدام النمو يبلغ حوالي 30 ملم . وعند تطبيق المضاد الحيويAmikacin ، وكذلك المضاد الحيوي Gentamicin الذي أوضح منطقة انعدام النمو تبلغ حوالي 28 ملم ، إضافة إلى ذلك سجل كلٍ من المضاد الحيوي Ampicillin منطقة انعدام النمو تبلغ حوالي 26 ملم والمضاد الحيوي Amoxicillin تبلغ حوالي 23 ملم. ولقد أشارت التجارب التي أجريت بأن البكتيريا تعتبر من أكثر أنواع البكتيريا مقاومة للمضاد الحيوي Penicillin والمضاد الحيوي الحيوي Tetracycline والمضاد الحيوي Cefotaxime . حيث بين مستخلص الليمون تأثيراً قاتلاً وذلك من خلال تكوين قطر منطقة انعدام النمو يتراوح حوالي 25 ملم (جدول 2) .

جدول 2 : أقطار منطقة التثبيط لمستخلص عصير الليمون والمضادات الحيوية بالملمتر.

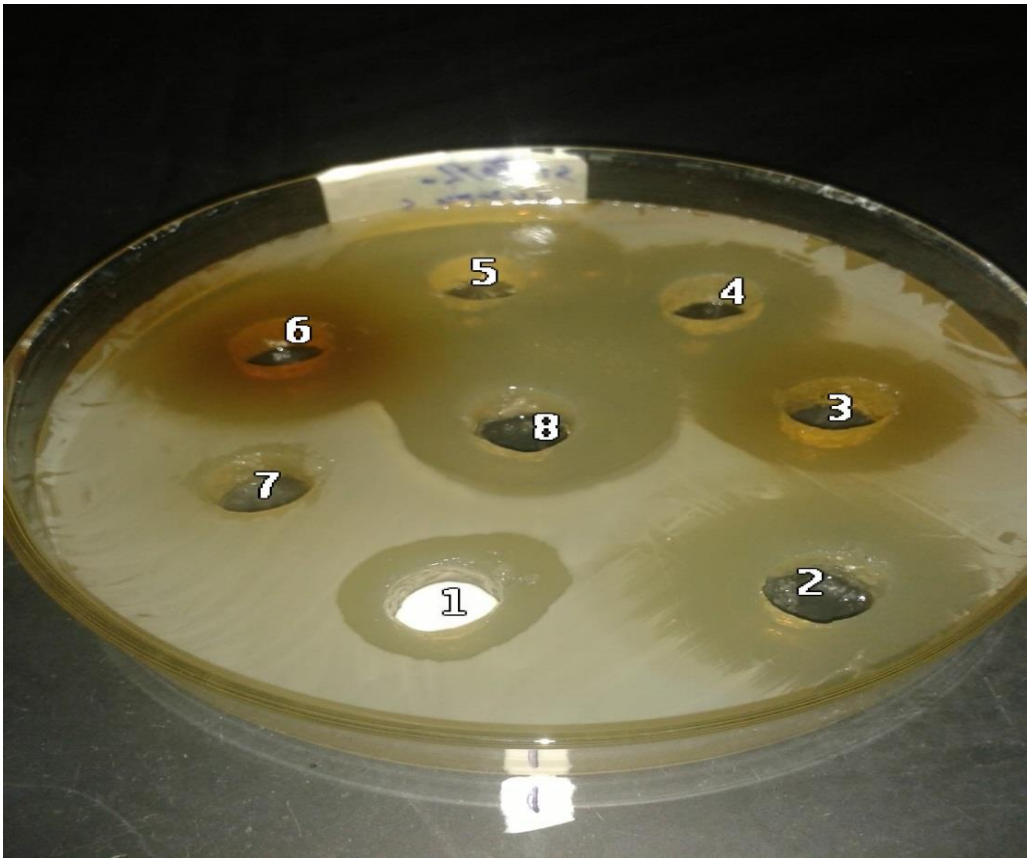
Tested bacteria	Inhibition zone (mm)							
	AMP	AMO	TE	PN	AK	CTX	GM	Lemon
S. aureus	36	37	R	20	32	29	33	35
K. pneumonia	22	23	R	R	37	30	34	20
S. typhi	20	18	15	R	30	32	23	27
C. freundii	30	27	R	R	37	39	34	28
S. epidermidis	25	24	R	R	R	R	R	30
P. aeruginosa	19	28	R	R	36	R	35	29
S. pyogenes	26	23	R	R	30	R	28	25

حيث R تعني مقاومة و AMO المضاد الحيوي Amoxicillin وAMP المضاد الحيوي Ampicillin و TE المضاد الحيوي Tetracycline و GM المضاد الحيوي Gentamicin و CTX المضاد الحيوي Cefotaxime و AK المضاد الحيوي Amikacin و PN المضاد الحيوي Penicillin .

من خلال النتائج المدونة في (جدول 2)، تنوعت نتائج دراسة التأثير القاتل للمضادات الحيوية وذلك بسبب التنوع في مدى آلية تأثير كل مضاد حيوي وكذلك أيضاً كل نوع من أنواع البكتيريا الداخلة في هذه الدراسة . ومن خلال ذلك لوحظ أن المضاد الحيوي Ampicillin كان من أكثر أنواع المضادات فعالية أو تأثيراً (قاتلاً) على البكتيريا *S. aureus* (شكل 11) بقطر يبلغ حوالي 36 ملم وكذلك المضاد الحيوي Amoxicillin الذي أوضح قطراً لمنطقة انعدام النمو يبلغ حوالي 37 ملم ، بينما أوضحت البكتيريا مقومة للمضاد الحيوي Tetracycline بخلاف البكتيريا *S. typhi* (شكل15) التي أوضحت منطقة انعدام النمو تبلغ حوالي 15 ملم وكذلك المضاد الحيوي Penicillin الذي لم يؤثر إلا على البكتيريا *S. aureus* (شكل 11) بقطر يبلغ حوالي 20 ملم . بينما أوضحت البكتيريا *C. freundii* (شكل 17) حساسية مفرطة مقارنة بالمضاد الحيوي Cefotaxime الذي أنتج قطراً لمنطقة انعدام النمو يبلغ حوالي 39 ملم ، أما المضاد الحيوي Gentamicin فقد بين أكثر فاعلية على البكتيريا *P. aeruginosa* (شكل 21) من خلال منطقة انعدام النمو بقطر يتراوح مابين 35 ملم ، أما فيما يتعلق بالمضاد الحيوي Amikacin فقد بين هذا المضاد أعلى معدل تأثير على كلٍ من البكتيريا *K. pneumonia* (شكل 13) والبكتيريا *P. aeruginosa* (شكل 21) من خلال منطقة انعدام النمو يتراوح حوالي 37 ملم .

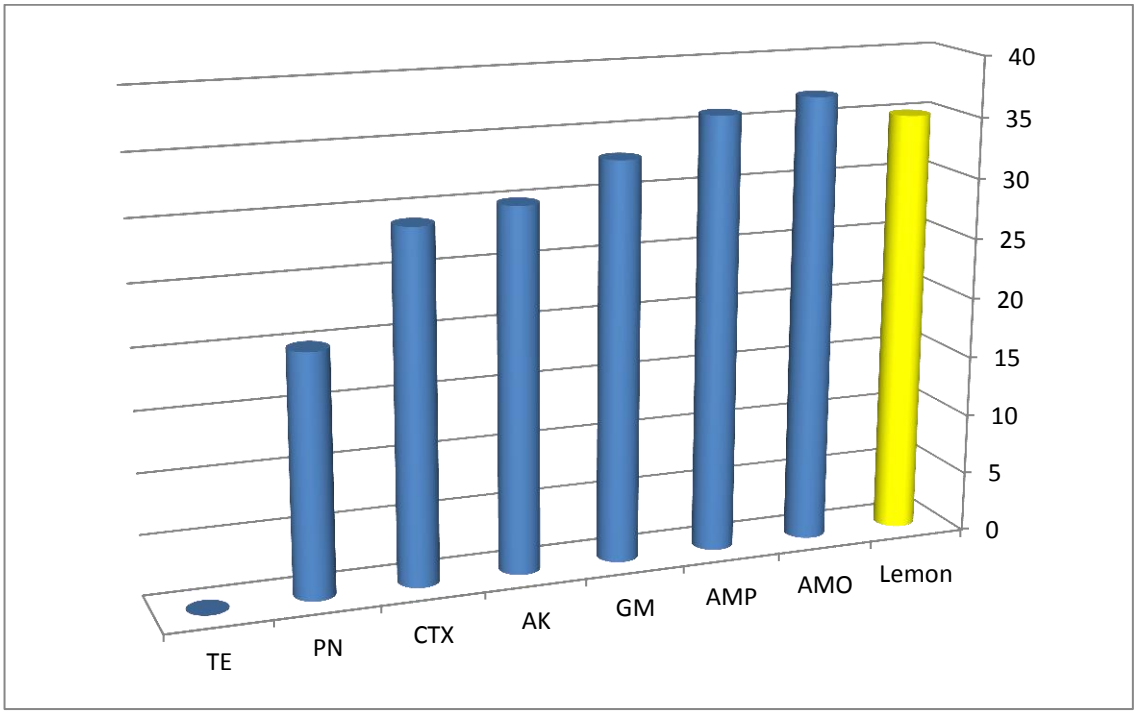
ومن هنا يأتي دور المستخلص الذي يمتاز بفاعلية عالية كما هو متوقع وذلك من خلال قدرته على قتل معظم أو جميع أنواع البكتيريا الداخلة في هذه الدراسة أي بمعنى أن هذه البكتيريا تعتبر حساسة بدرجة عالية نظراً إلى ما تحتويه هذه الأنواع البكتيرية من مواد مضادة للميكروبات Antimicrobial agents . ومن خلال هذه النتائج التي تبين تفوق محتويات المستخلص على بعض من المضادات الحيوية المستخدمة في هذه الدراسة كقياس Indicator

أو للمقارنة في مستويات التأثير . لقد تم تطبيق تكرار هذه المعاملة من كل نوع من أنواع البكتيريا ثلاثة مرات وذلك من أجل اخذ متوسط 3 قراءات . تم استخدام كمية محددة من المستخلص تقدر بحوالي 100 ميكرون وكذلك أيضاً نفس الكمية من المضادات الحيوية على جميع أنواع البكتيريا القابلة للتأثير وذلك لتحديد الفارق في التأثير التثبيطي كما هو موضح في الأشكال الآتية :



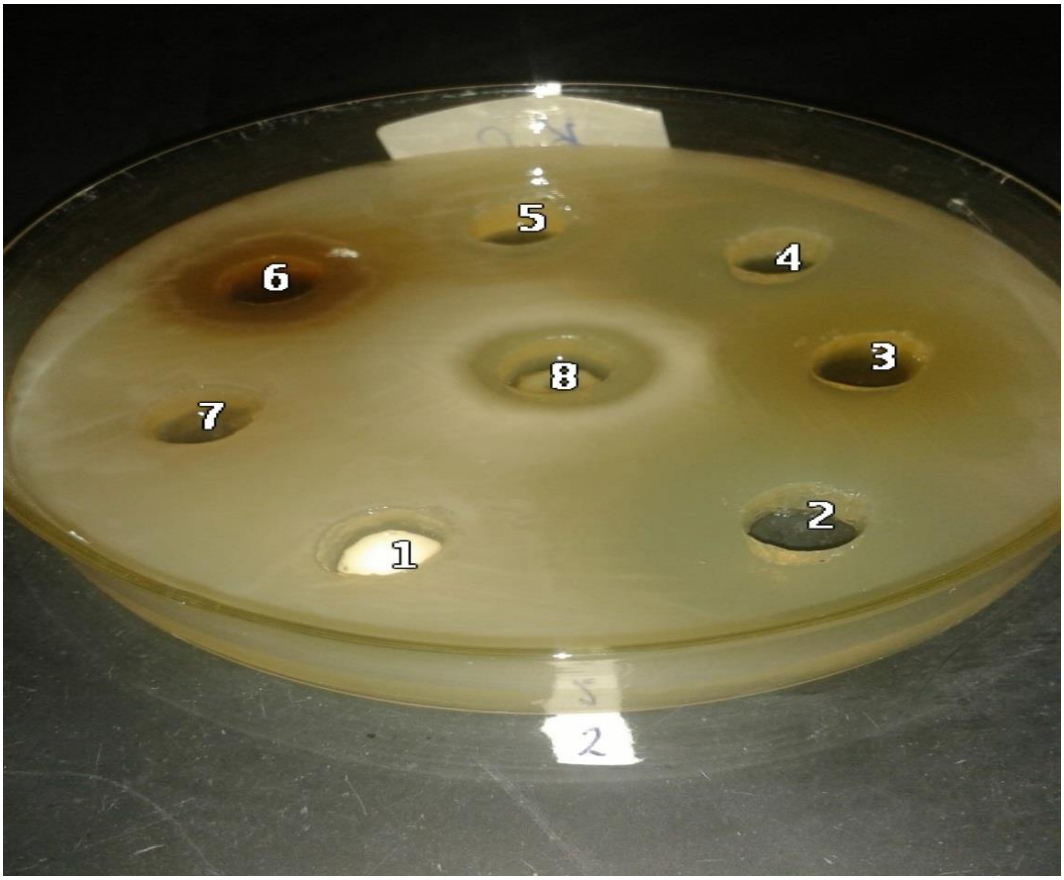
شكل 10: التأثير التثبيطى لمستخلص عصير الليمون والمضادات الحيوية على بكتيريا *Staphylococcus aureus*

1. Penicillin Lemon juice ، 2. Amikacin ، 3. Cefotaxime ، 4 . Gentamicin ، 5. Ampicillin 6. Amoxicillin،7. Tetracycline ، 8. extract crude 100%



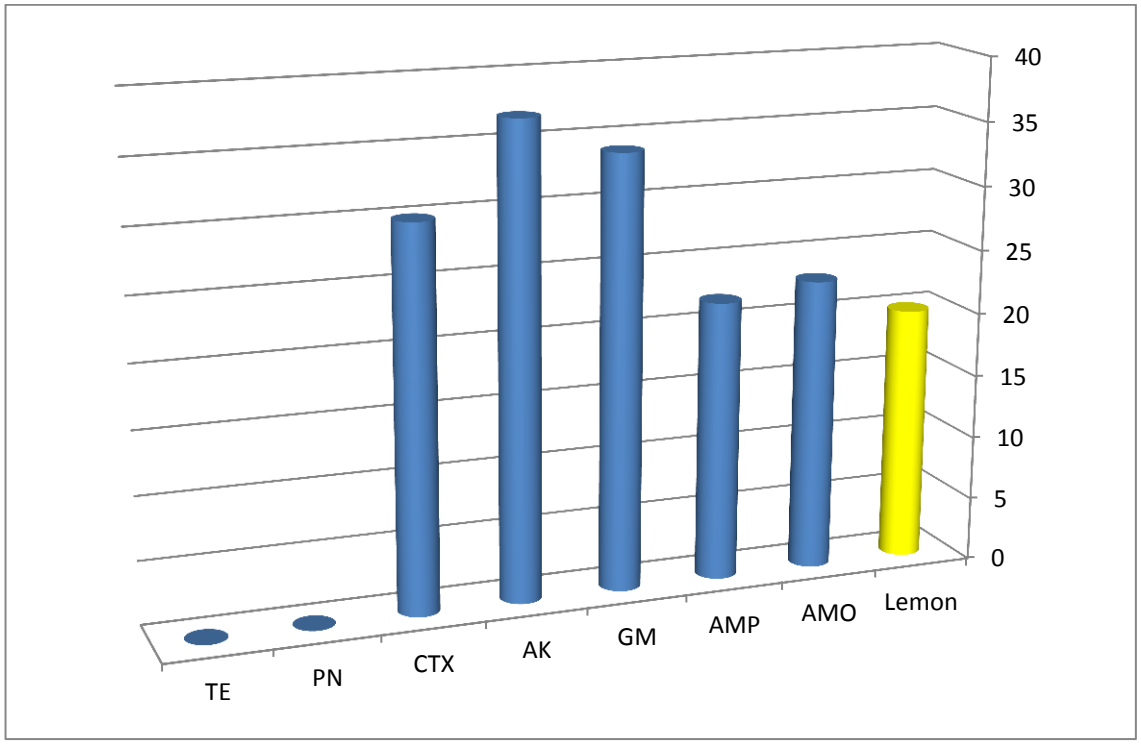
شكل 11 : تأثير مستخلص عصير الليمون والمضادات الحيوية بالمليمتر على البكتيريا *Staphylococcus aureus*

PN. Penicillin ، AMO. Amoxicllin ، AMP. Ampicillin ، TE. Tetracyclin
GM. Gentamicine ، CTX. Cefotaxime ، AK. Amikacin



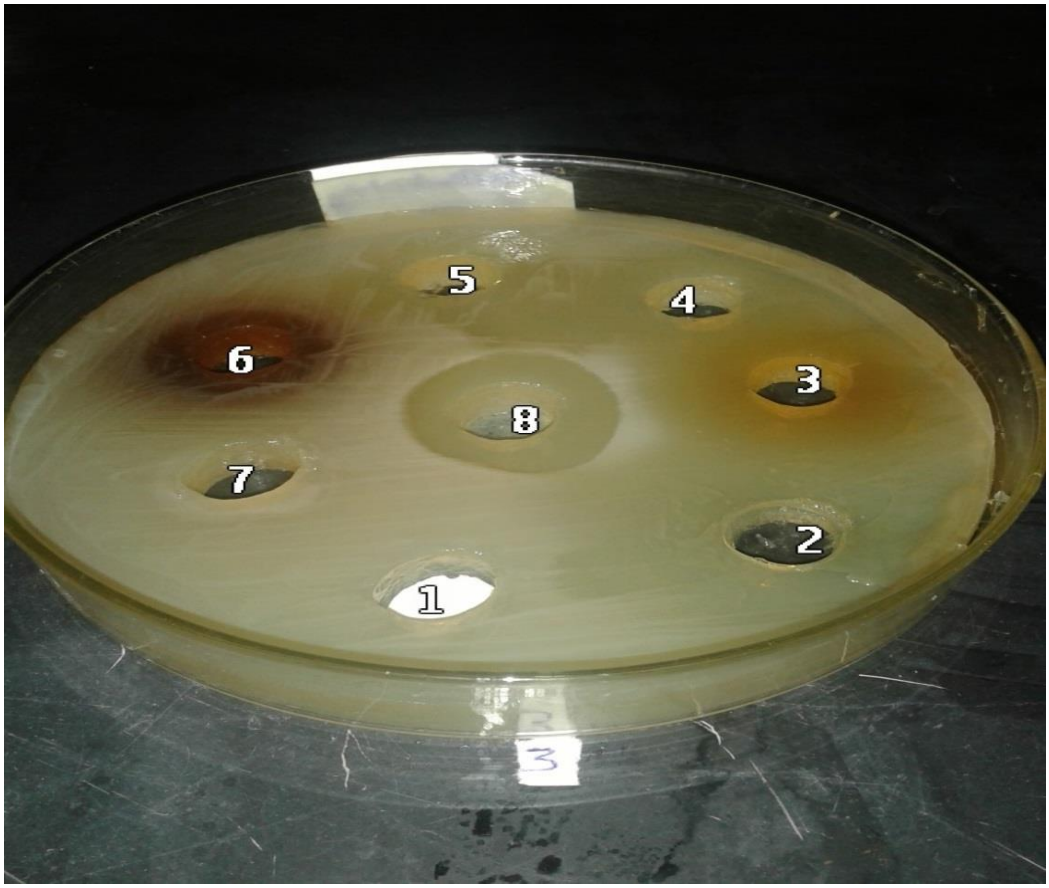
شكل 12 : التأثير التثبيطى لمستخلص عصير الليمون والمضادات الحيوية على بكتيريا *Klebsiella pneumonia*

1. Penicillin Lemon juice ، 2. Amikacin ، 3. Cefotaxime ، 4 . Gentamicin ، 5. Ampicillin 6. Amoxicillin،7. Tetracycline ، 8. extract crude 100%



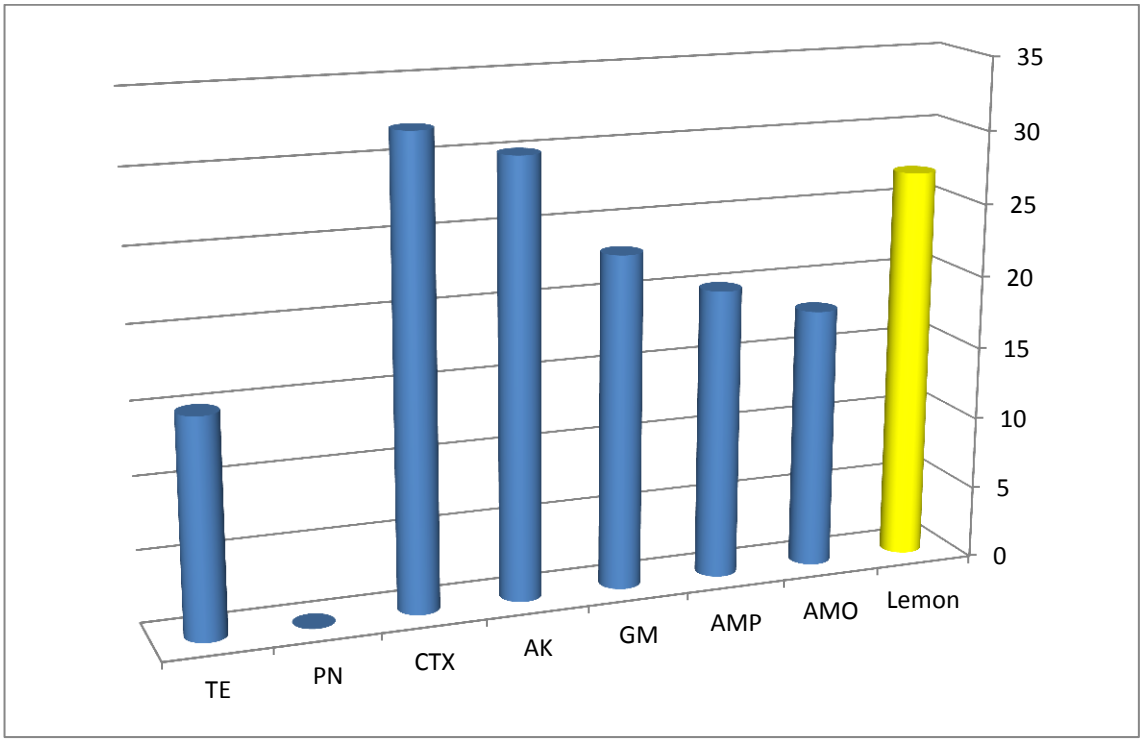
شكل 13 : تأثير مستخلص عصير الليمون والمضادات الحيوية بالمليمتر على البكتيريا *Klebsiella pneumonia*

PN. Penicillin ، AMO. Amoxicllin ، AMP. Ampicillin ، TE. Tetracyclin
GM. Gentamicine ، CTX. Cefotaxime ، AK. Amikacin



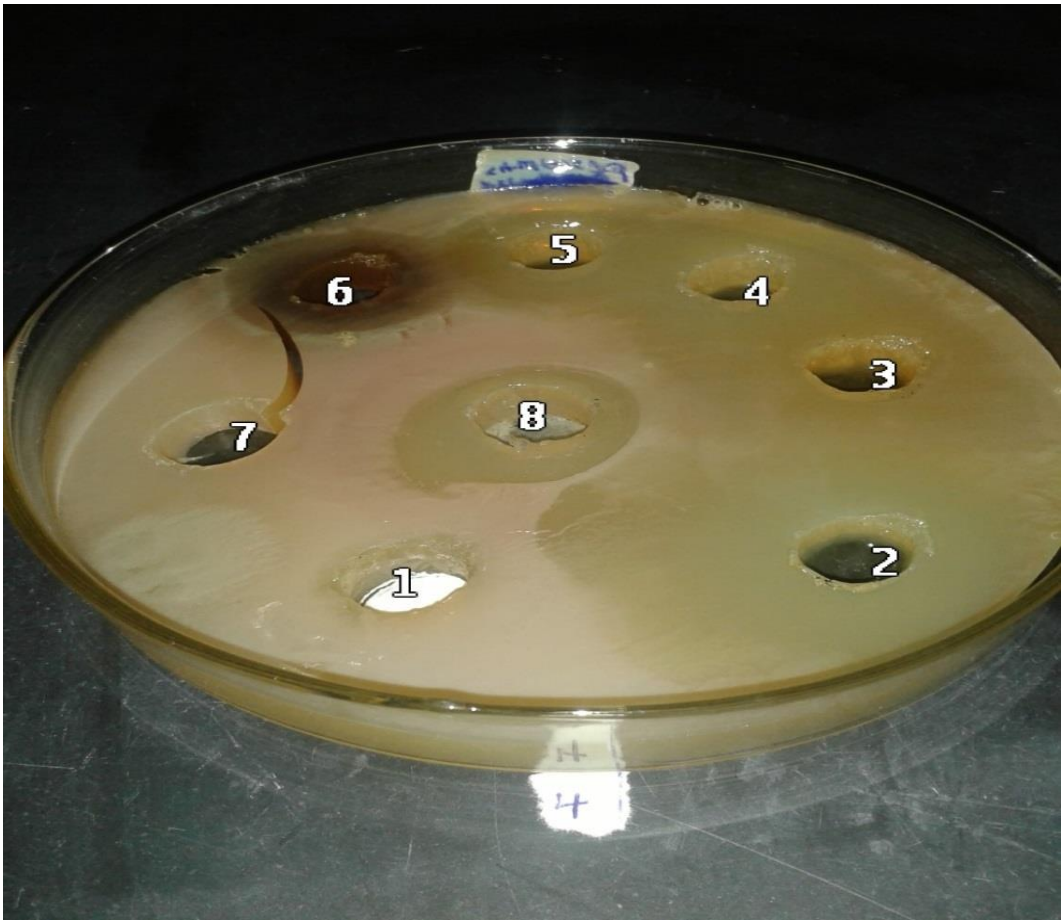
شكل 14 : التأثير التثبيطي لمستخلص عصير الليمون والمضادات الحيوية على بكتيريا *Salmonella typhi*

1. Penicillin Lemon juice ، 2. Amikacin ، 3. Cefotaxime ، 4 . Gentamicin ، 5. Ampicillin 6. Amoxicillin،7. Tetracycline ، 8. extract crude 100%



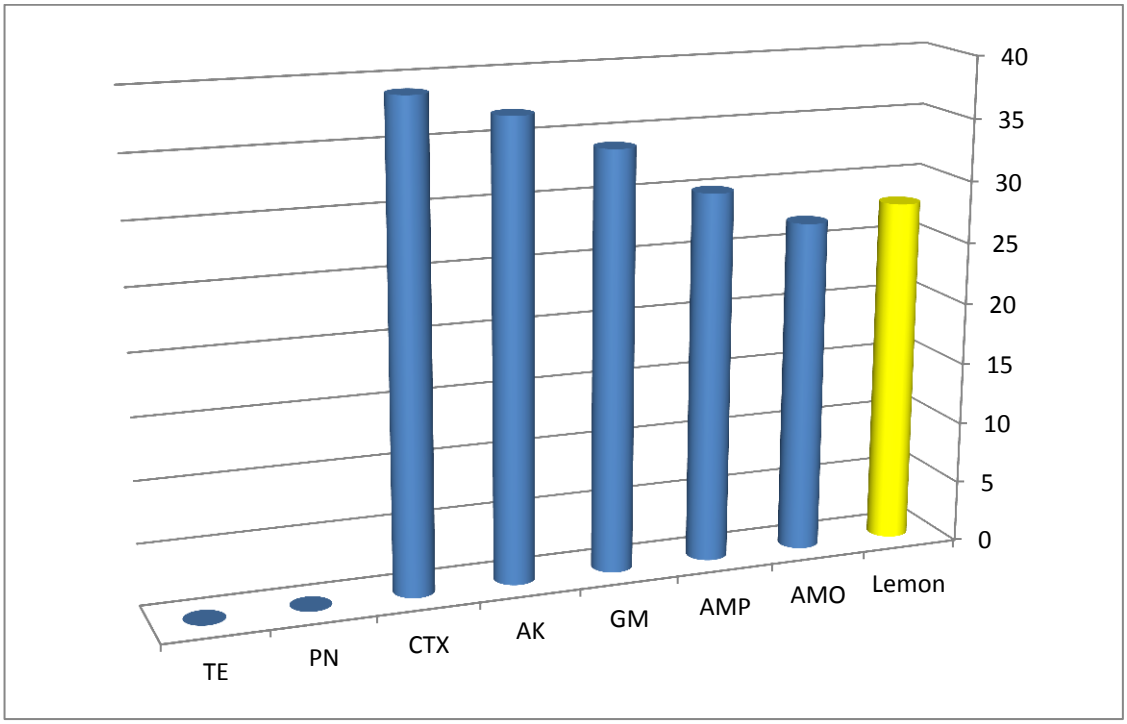
شكل 15 : تأثير مستخلص عصير الليمون والمضادات الحيوية بالمليمتر على البكتيريا *Salmonella typhi*

PN. Penicillin ، AMO. Amoxicllin ، AMP. Ampicillin ، TE. Tetracyclin
GM. Gentamicine ، CTX. Cefotaxime ، AK. Amikacin



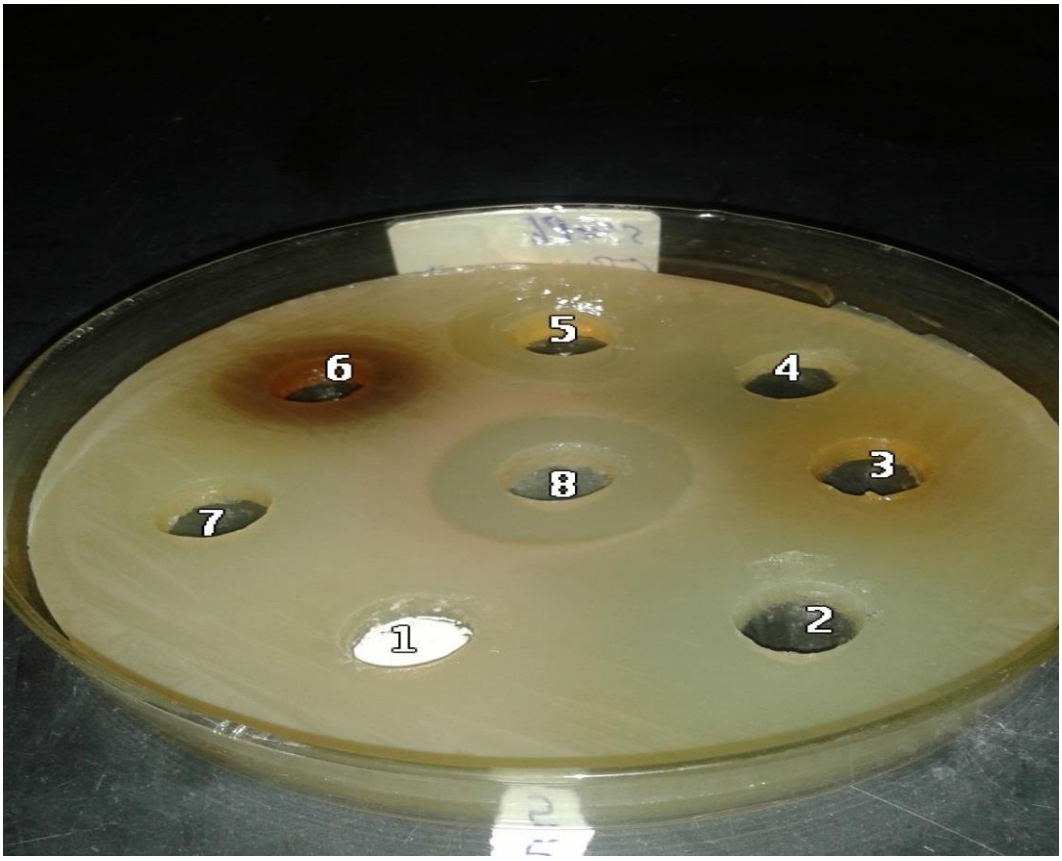
شكل 16 : التأثير التثبيطى لمستخلص عصير الليمون والمضادات الحيوية على بكتيريا *Citrobacter freundii*

1. Penicillin Lemon juice ، 2. Amikacin ، 3. Cefotaxime ، 4 . Gentamicin ، 5. Ampicillin 6. Amoxicillin،7. Tetracycline ، 8. extract crude 100%



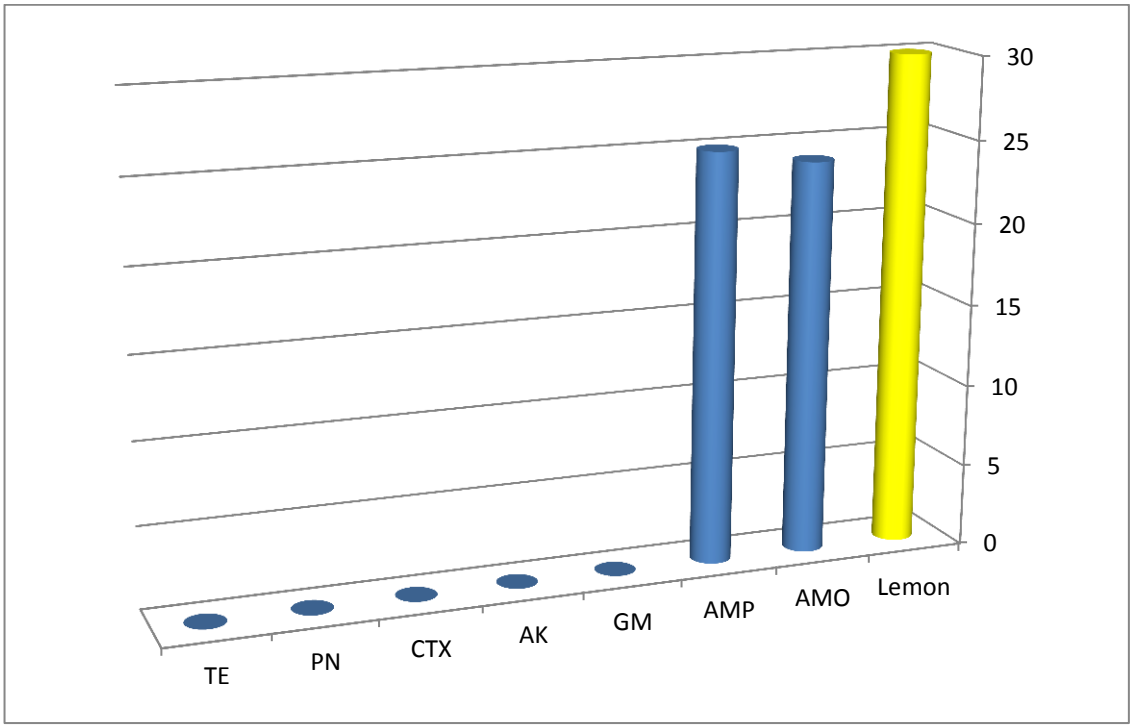
شكل 17 : تأثير مستخلص عصير الليمون والمضادات الحيوية بالمليمتر على البكتيريا *Citrobacter freundii*

PN. Penicillin ، AMO. Amoxicllin ، AMP. Ampicillin ، TE. Tetracyclin
GM. Gentamicine ، CTX. Cefotaxime ، AK. Amikacin



شكل 18 : التأثير التثبيطي لمستخلص عصير الليمون والمضادات الحيوية على بكتيريا *Staphylococcus epidermidis*

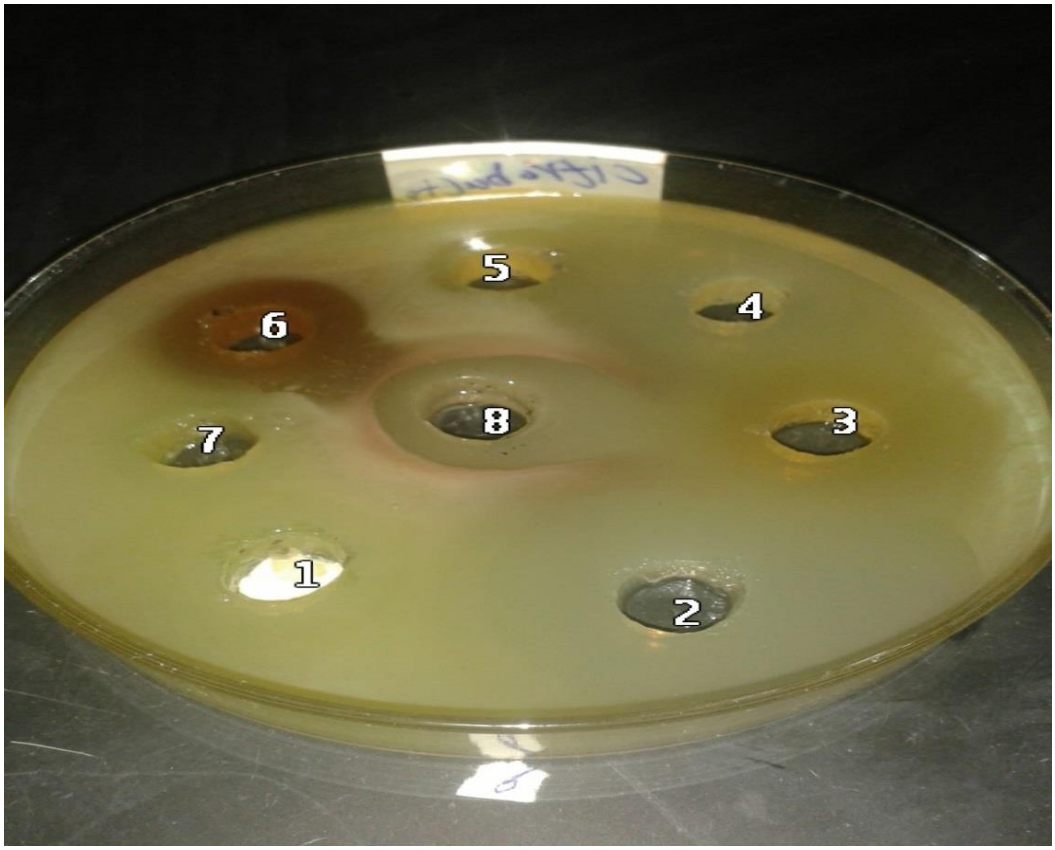
1. Penicillin Lemon juice ، 2. Amikacin ، 3. Cefotaxime ، 4 . Gentamicin ، 5. Ampicillin 6. Amoxicillin،7. Tetracycline ، 8. extract crude 100%



شكل 19 : يوضح تأثير مستخلص عصير الليمون والمضادات الحيوية بالمليمتر على البكتيريا

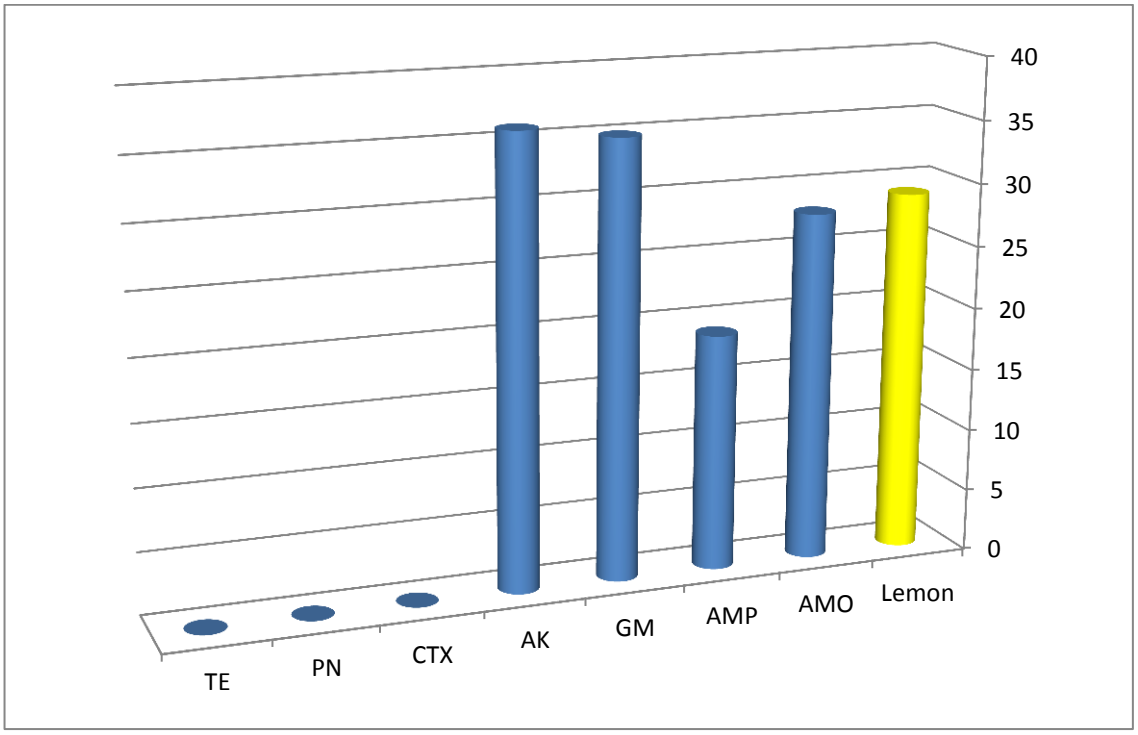
Staphylococcus epidermidis

PN. Penicillin ، AMO. Amoxicllin ، AMP. Ampicillin ، TE. Tetracyclin
GM. Gentamicine ، CTX. Cefotaxime ، AK. Amikacin



شكل 20 : التأثير التثبيطى لمستخلص عصير الليمون والمضادات الحيوية على بكتيريا *Pseudomonas aruginosa*

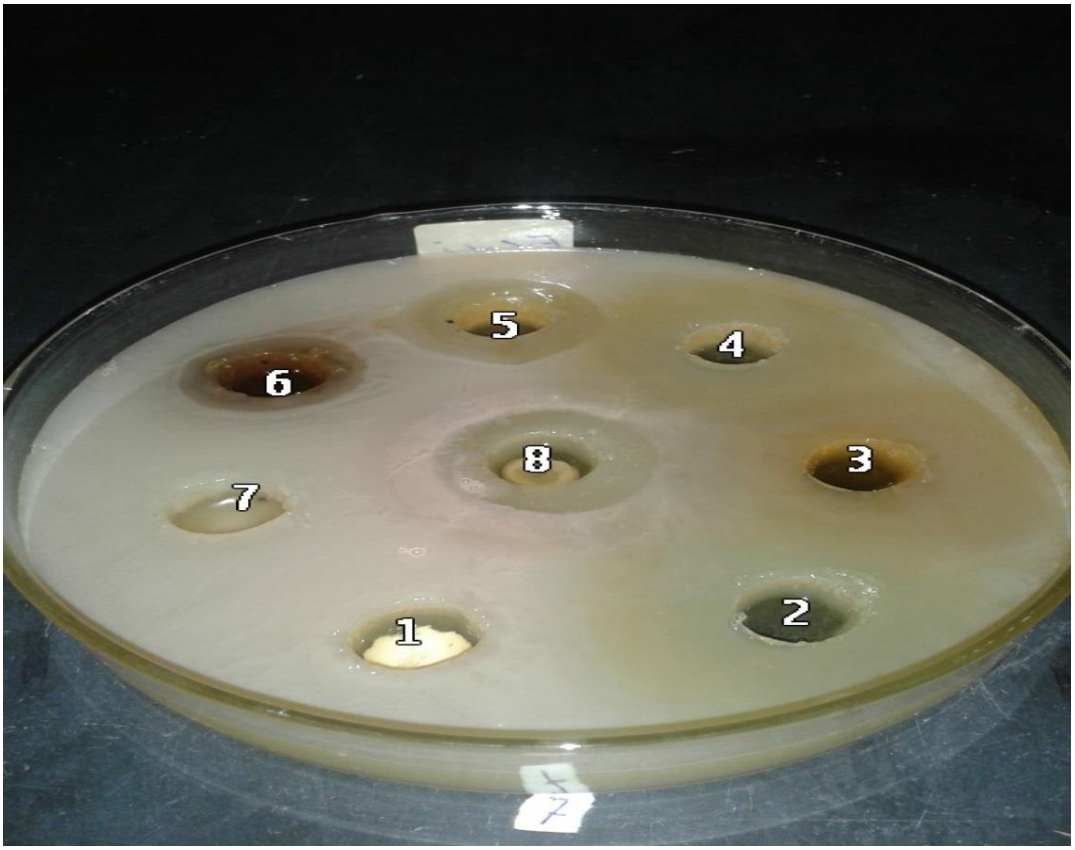
1. Penicillin Lemon juice ، 2. Amikacin ، 3. Cefotaxime ، 4 . Gentamicin ، 5. Ampicillin 6. Amoxicillin،7. Tetracycline ، 8. extract crude 100%



شكل 21 : تأثير مستخلص عصير الليمون والمضادات الحيوية بالمليمتر على البكتيريا

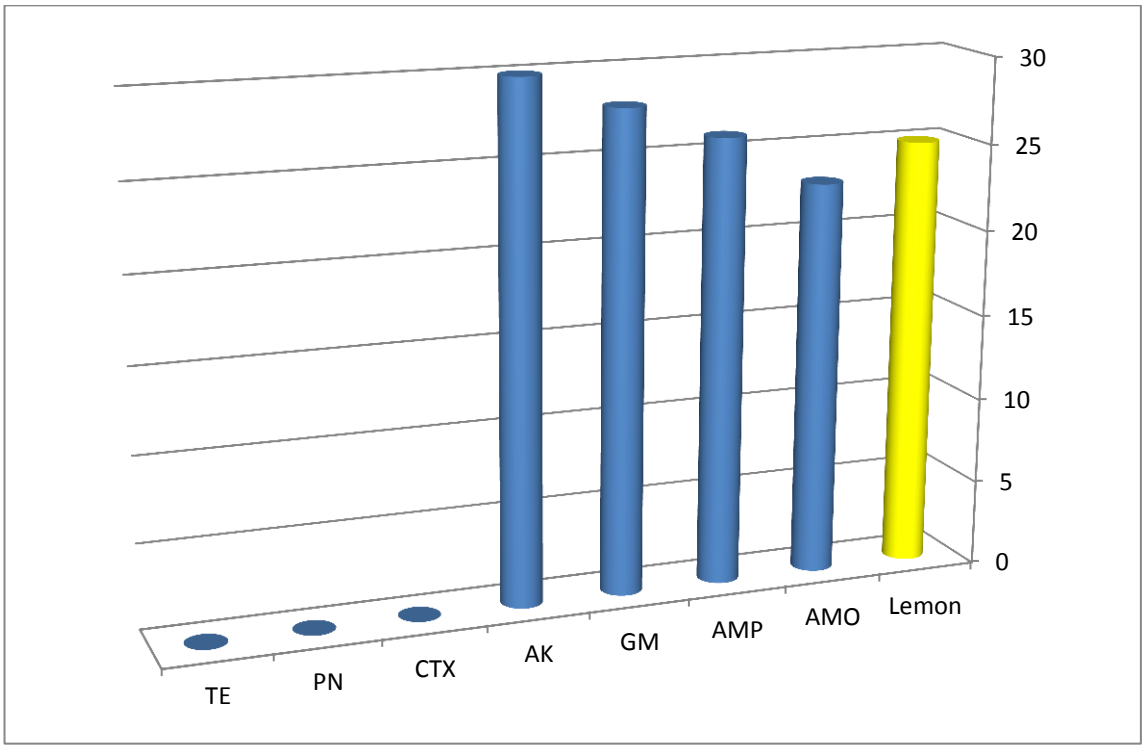
Pseudomonas aruginosa

PN. Penicillin ، AMO. Amoxicllin ، AMP. Ampicillin ، TE. Tetracyclin
GM. Gentamicine ، CTX. Cefotaxime ، AK. Amikacin



شكل 22 : التأثير التثبيطى لمستخلص عصير الليمون والمضادات الحيوية على بكتيريا *Streptococcus pyogenes*

1. Penicillin Lemon juice ، 2. Amikacin ، 3. Cefotaxime ، 4 . Gentamicin ، 5. Ampicillin 6. Amoxicillin،7. Tetracycline ، 8. extract crude 100%



شكل 23 : تأثير مستخلص عصير الليمون والمضادات الحيوية بالمليمتر على البكتيريا

Streptococcus pyogenes

PN. Penicillin ، AMO. Amoxicllin ، AMP. Ampicillin ، TE. Tetracyclin
GM. Gentamicine ، CTX. Cefotaxime ، AK. Amikacin

4.4 نتائج الكشف الأولي عن المركبات والمجاميع الفعالة في مستخلص عصير الليمون

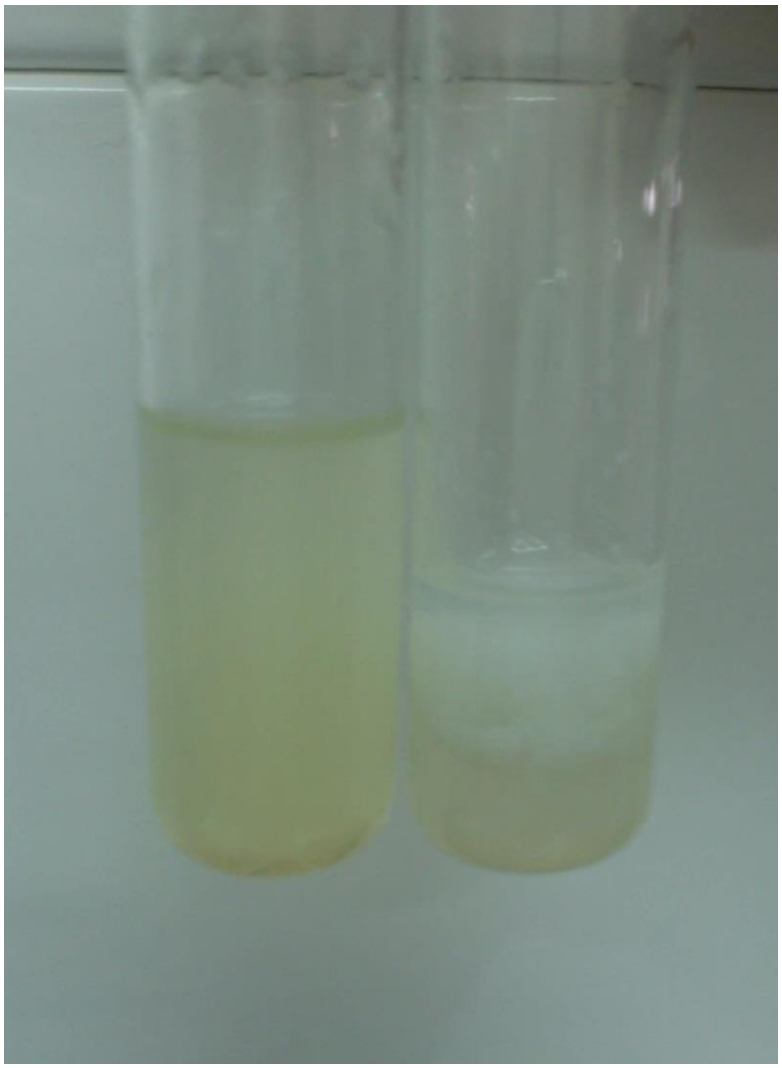
Results for the initial detection vehicles and groups active in the extract of lemon juice

من خلال جدول (3) أظهرت نتائج التحليل الكيميائي الأولي لمستخلص عصير الليمون احتوائها على مركبات فعالة حيثُ أعطى الاختبار نتيجة موجبة مع الفلافونيدات Flavonoids والتانينات Tannin والصابونيات Saponines والفينولات Phenols و القلويدات Alkaloids وكذالك بين اختبار موليش للكشف عن الكربوهيدرات Carbohydrates نتيجة موجبة ، وقـد تم أيـضاً أجراء اختبار بيوريت للكشف عن البروتينات Proteins وكانـت النتيجة المتحصل عليها موجبة ، وأظهر اختبار بندكت نتيجة موجبة مع السكريات المختزلة Reducing Sugar ، وكذلك تم أجراء اختبـار النينهيدرين للكشف عن الأحماض الامينية Amino acids حيث بين نتيجة موجبة أيـضاً ، وكذلك أجرى اختبار سالكوفسكي للكشف عن الجلايكوسيدات Glycosides حـيث وضح نتيـجة موجبة مع الاختبار كما هو موضح في الإشكال الآتية :

جدول 3 : نتائج الكشف الأولي عن المركبات الفعالة في مستخلص عصير الليمون .

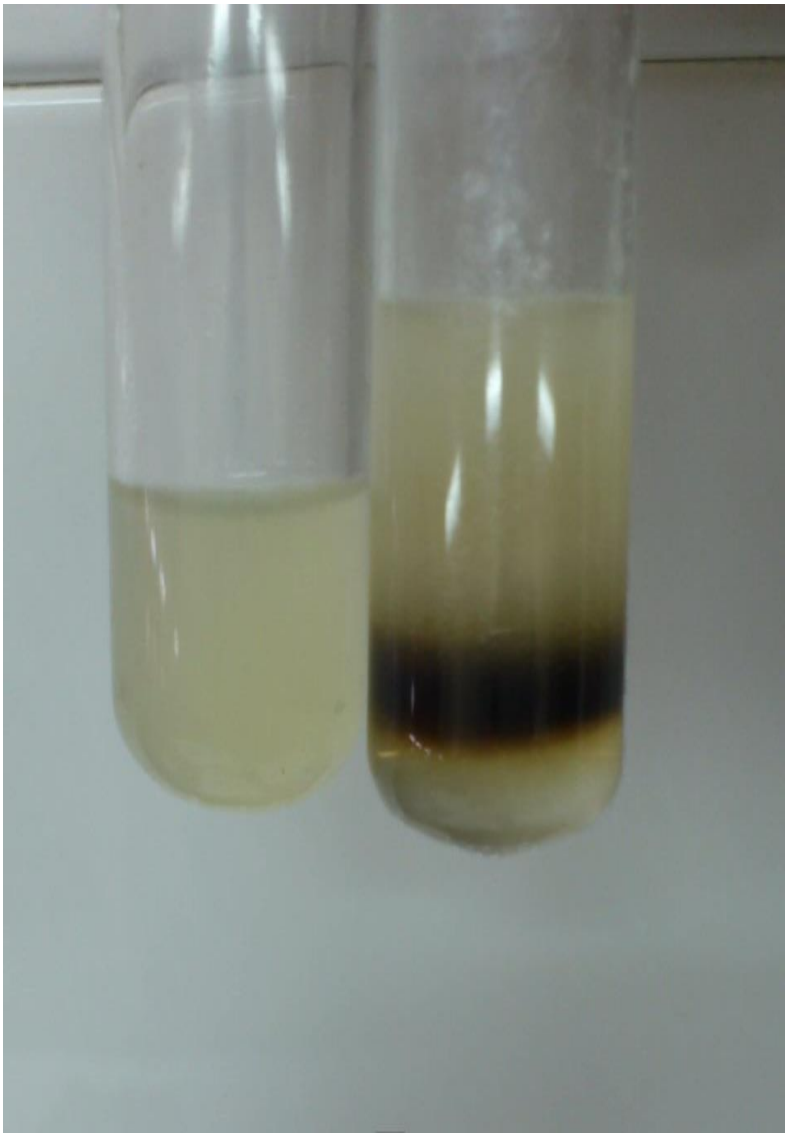
المركب الفعال	الكاشف المستخدم	دليل الكاشف	مستخلص عصير الليمون
الفلافونيدات Flavonoids	كحول اثيلي+NaOH	ظهور لون أصفر	+
التانينات Tannins	خلات الرصاص 1%	ظهور راسب هلامي القوام	+
الصابونيات Saponines	رج المستخلص	ظهور رغوة لمدة طويلة	+
الفينولات Phenols	كاشف فولين	ظهور لون أزرق	+
الكاربوهيدرات Carbohydrate	كاشف مولش	ظهور حلقة بنفسجية داكنة	+
البروتينات Proteins	اختبار بيوريت	ظهور لون بنفسجي	+
القلويدات Alkaloids	كاشف دراجندروف	ظهور لون أصفر	+
السكريات المختزلة Reducing Sugar	كاشف بندكت	راسب بني محمر	+
الأحماض الامينية Amino acids	كاشف النينهيدرين	ظهور لون أزرق	+
الجلايكوسيدات Glycosides	اختبار سالكوفسكي	ظهور حلقة ذات لون بني محمر	+

شكل 24 : اختبار الكشف عن Flavonoids

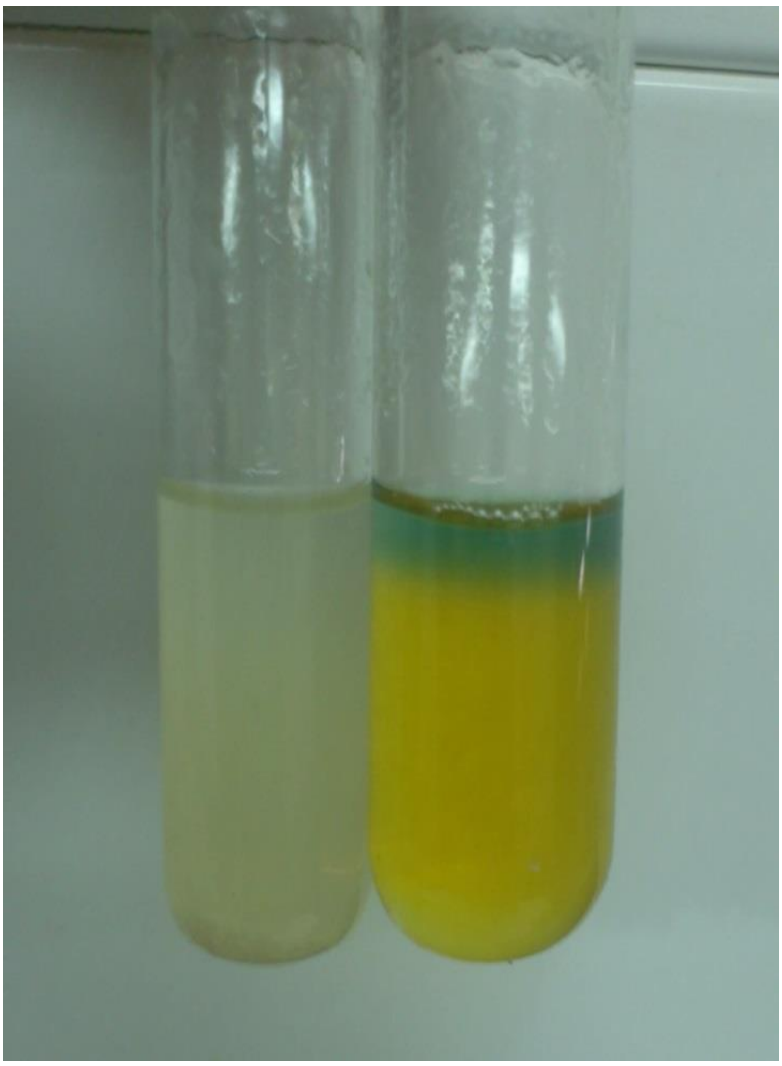


شكل 25 : اختبار الكشف عن Tannins

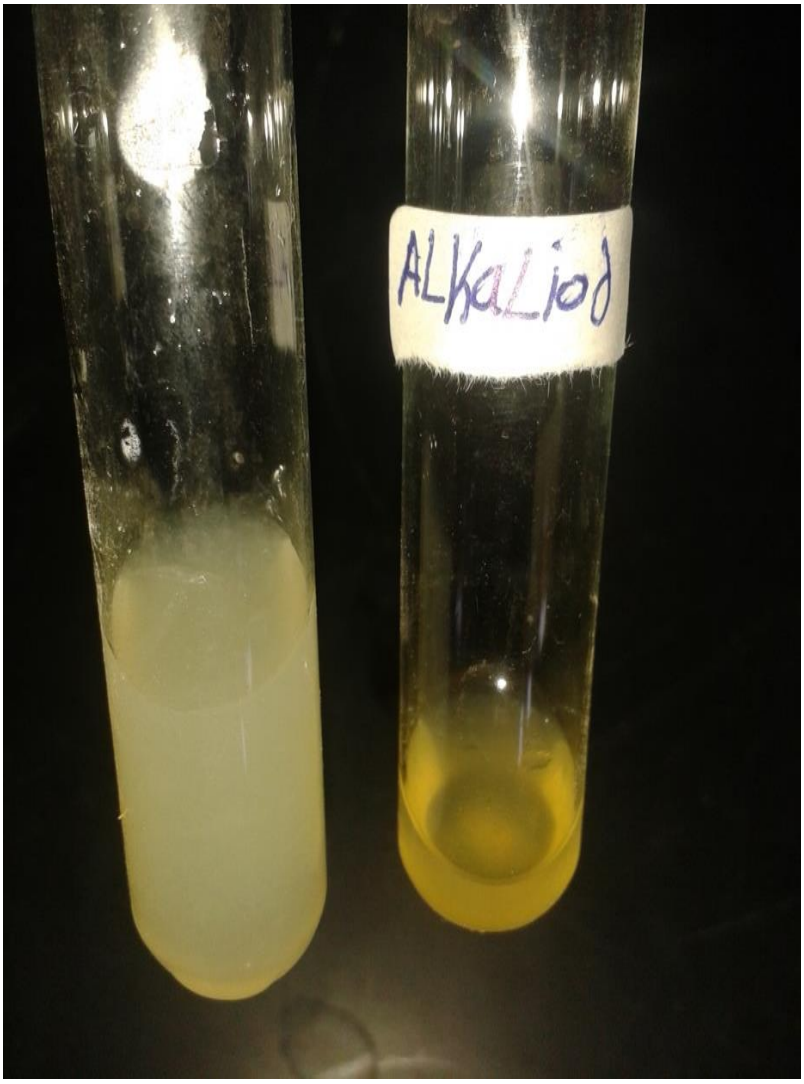
شكل 26 : اختبار الكشف عن Phenols



شكل 27 : اختبار الكشف عن Carbohydrate

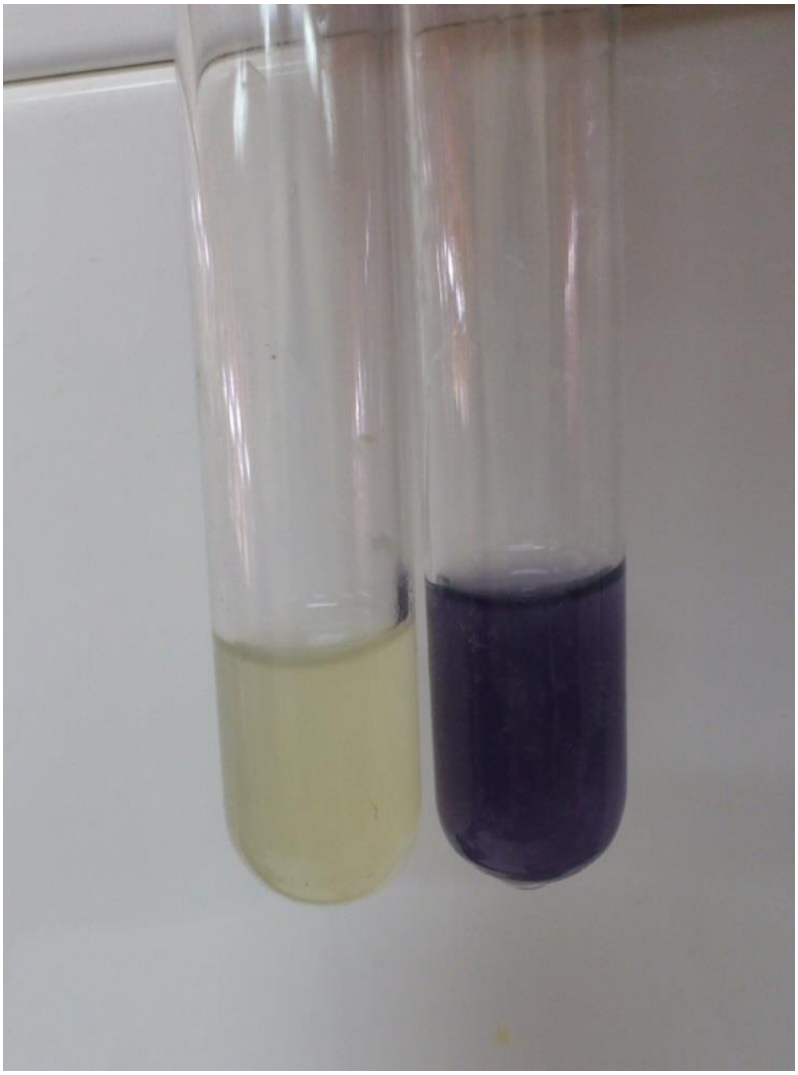


شكل 28 : اختبار الكشف عن Proteins

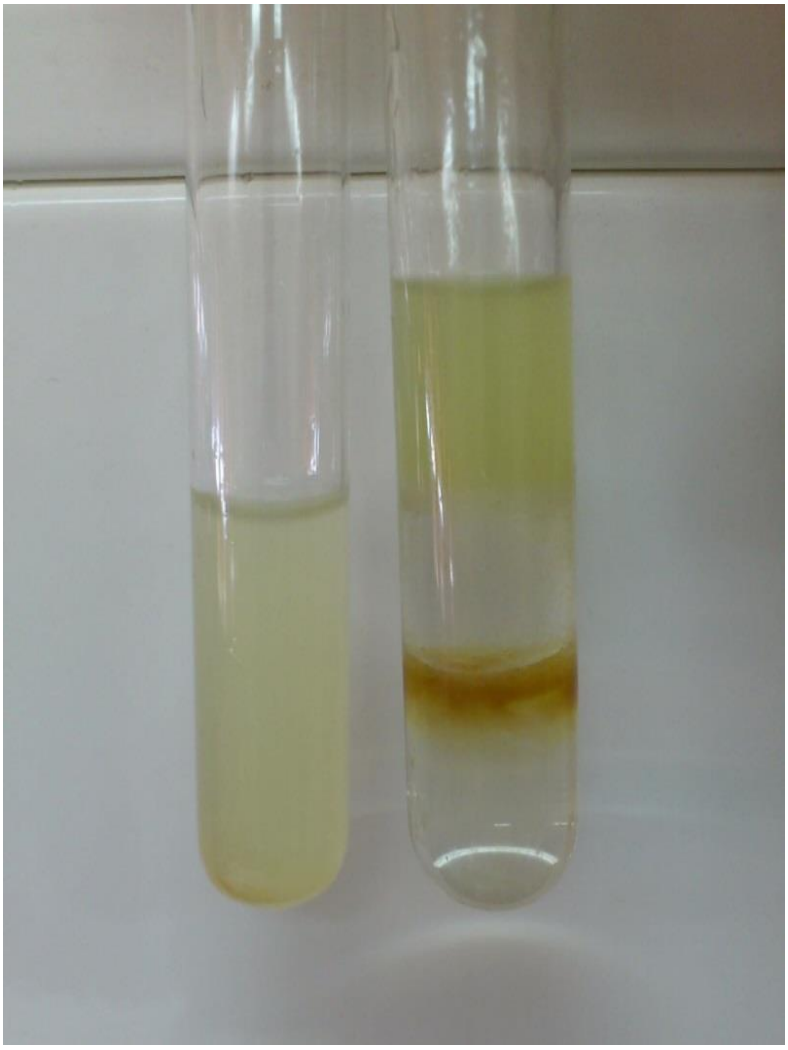


شكل 29 : اختبار الكشف عن Alkaloids

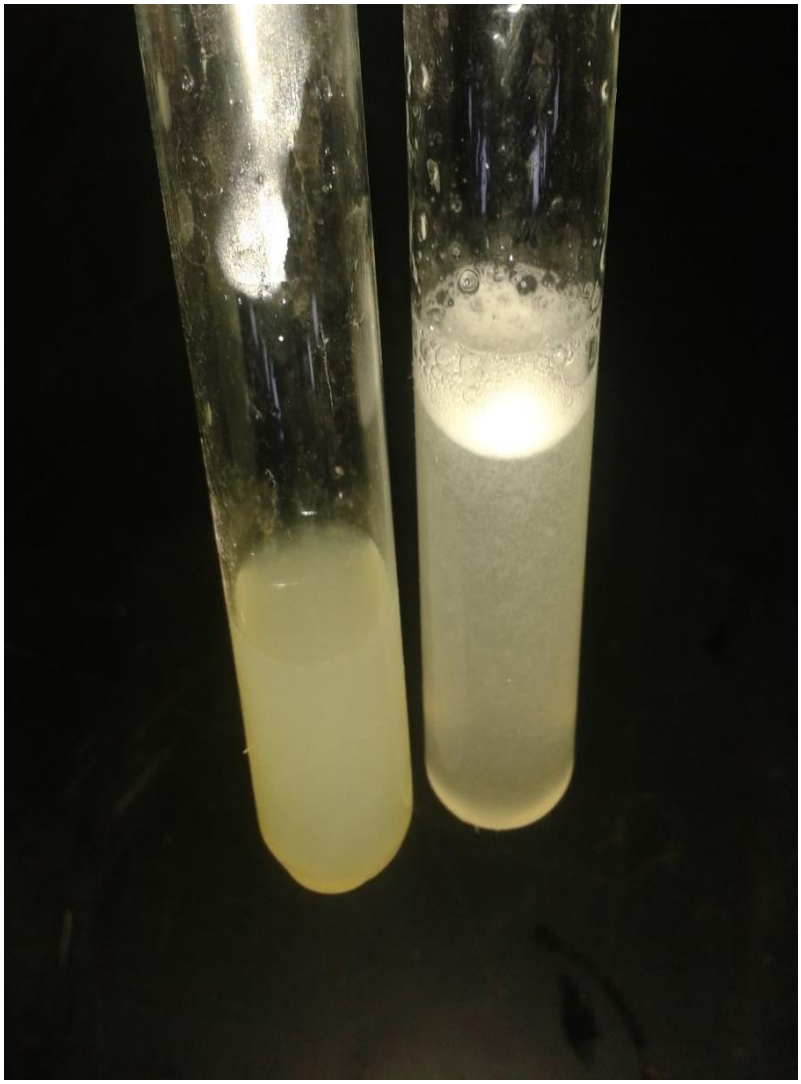
شكل 30 : اختبار الكشف عن Reducing Sugar



شكل 31 : اختبار الكشف عن Amino acids



شكل 32 : اختبار الكشف عن Glycosides



شكل 33 : اختبار الكشف عن Saponines

الفصل الخامس

المناقشة

Discussion

تعتبر ثمرة الليمون من أهم المصادر المهمة والمتوفرة لأجل العناية الصحية وكذلك تعتبر من أنظمة العناية الصحية المتممة Complementary health care ، وبما لا يدع مجالا للشك ، فإن عصائر ثمرة الليمون تحتوي على مواد ذات قيمة طبية التي لم تكتشف مكوناتها الدقيقة بعد . إلا أن في الآونة الأخيرة تم إجراء دراسات مستفيضة لمعرفة أو إجراء مسح شامل لمعرفة مكونات مستخلص ثمرة الليمون من ناحية النشاط المضاد الميكروبي Antimicrobial activity . ومن خلال الدراسات الحديثة فقد ثبت أن مستخلص ثمرة الليمون تحتوي على مكونات غنية بالمركبات ذات أنشطة مضاد ميكروبية Antimicrobial activities . أجريت في هذه الدراسة التطبيقية الحالية ، اختبارات لمعرفة النشاط المضاد البكتيري و التحليل النبات الكيميائي Phytochemical analysis لمستخلص ثمرة الليمون الغنية بالمركبات الفينولية Phenolic compounds . لقد أوضحت العديد من الدراسات بأن الخصائص التي يحتويها مستخلص الليمون تكمن فـي قدرتها على احتوائها على العديد من المركبات الفينولية ذات القدرة الفائقة كمركبات مضادة للأكسدة Antioxidant properties. غالبا ما تأتي مضادات الأكسدة الطبيعية من خلال النباتات في شكل أو على هيئة مركبات مثل الفلافينويد Flavonoid والأحماض الفينولية (Bansode and Chavan ,(2012 .

وتعتبر الفلافينويدات من المواد الفينولية المهيدركسلة (أي إضافة مجموعة الهيدروكسايل) المخلقة حيويا بواسطة النبات نتيجة الاستجابة للعدوى الميكروبية والموجودة على هيئة مواد

مضادة ميكروبية ضد العديد من الكائنات الدقيقة في الكائن الحي *In vivo*. غالبا ما يكون نشاط هذه المواد راجعة طبقاً إلى قدرتها على التفاعل المعقد مع البروتينات الذائبة خارج الخلية Extracellular وكذلك مع جدار الخلية البكتيرية ذو التركيب المعقد .

تتميز المواد الكيميائية التثبيطية الفعالة باحتوائها على خصائص مضادة بكتيرية. حيث اقترحت الدراسة الحالية أن مستخلصات عصائر ثمرة الليمون تعتبر ذات قدرة كبيرة من حيث احتوائها على عوامل مضادة بكتيرية Antibacterial agents ضد العديد من البكتيريا المعوية Enteric bacteria حيث يمكن استعمالها أيضاً كعقار بديل في معالجة عدوى البكتيريا المعوية . أوضحت نتائج تقدير النشاط المضاد البكتيري دليلا واعداً للنشاط المضاد الميكروبي لعصائر الليمون (الحمضيات) الطازجة ضد العوامل المسببة لمرض الأمعاء الميكروبي . بينت النتائج عن وجدود مكونات ذات الأهمية الطبية في مستخلص الليمون التي تلعب دورا أساسياً كمواد علاجية مهمة كمضادات بكتيرية مؤثرة على نشاط الخلايا. استنتجت كثيراً من الدلائل في الدراسات المبكرة أو السابقة التي أكدت تشابهاً في المحتوى الكيميائي للنبات Phytochemical التي بدورها تلعب دوراً مهماً كمادة نشطة حيوياً Bioactive وبناء عليه يجب أن ينظر إلى هذه المستخلصات (مستخلص ثمرة الليمون) كمصدر جيد للعقاقير المفيدة للإنسان من الناحية الإكلينيكية (Bansode and Chavan, 2012) .

من خلال هذه الدراسة التطبيقية التي أجريت في معامل قسم النبات كلية العلوم حيث أستخدم مستخلص عصير الليمون على نشاط وحيوية العديد من أنواع البكتيرية ذات الاهتمام في معرفة أنشطة هذا المستخلص التثبيطي Inhibitory activities ضد البكتيريا الداخلة في هذه الدراسة مثل : البكتـيريا *Staphylococcus aureus* و البكتـيريا

Staphylococcus epidermidis والبكـــتيريا *Streptococcus pyogenes* والبكـــتيريا *Klebsilla pneumonia* و البكـــتيريا *Pseudomonas aeruginosa* والبكـــــتيريا *Citrobacter freundii* و البكتيريا *Salmonella typhi* ، بالإضافة إلى استخدام بعض المضادات الحيوية كمثبطات بكتيرية أو كعوامل مضادة للبكتيريا وذلك من أجل مقارنة مدى تأثير مستخلص الليمون على نشاط البكتيريا .

وقد بينت النتائج و مناطق التأثير (انعدام النمو) البكتيريا Inhibition zones الداخلة في الدراسة من جراء تأثير المضادات الحيوية ، حيث لاحظنا أن البكتيريا *Staphylococcus epidermidis* تعتبر من أكثر أنواع البكتيريا مقاومة Resistant لبعض المضادات الحيوية مخالفا لمدى تأثير مستخلص الليمون ، وهذا دليل على أن هذا المستخلص يمتلك خصائص كيميائية مؤثرة على نشاط البكتيريا المستخدمة في الدراسة . لقد أوضحت المضادات الحيوية وكذلك مستخلص عصير الليمون مقارنة واضحة من حيث مدى التأثير على هذه البكتيريا . لقد كان هناك تشابها Homology واضحا لمستخلص الليمون و المضاد الحيوي AMO و المضاد الحيوي AMP على نشاط كلٍ من البكتيريا *S. aureus* والبكتيريا *Klebsilla pneumonia* والبكتيريا *Citrobacter freundii* و البكتيريا *Streptococcus pyogenes* و هذا دليل على أن هناك تشابها كيميائيا في طريقة التأثير Mode of action . أما فيما يتعلق ببقية البكتيريا الأخرى فإن هناك تباينا مميزا فيما بين مدى تأثير المستخلص ومدى تأثير بقية المضادات الحيوية الأخرى .

ومن خلال هذه النتائج فقد أتضح أن هذا المستخلص يمتلك خاصية قاتلة أو كعوامل مضادة Antibacterial agents التي بدورها تعمل على التأثير على أيض Metabolism

وحيوية الخلايا البكتيرية ، مما قد تسهم في التأثير على النشاط الحيوي للبكتيريا الممرضة . تختلف تأثير المضادات الحيوية Antibiotics عن تأثيرات المستخلص نظرا لطبيعة المكونات الطبيعية لجزيئات العصير مثل الفينول والمكونات الكيميائية الأخرى السابقة الذكر .

تلعب تراكيز مستخلص الليمون دورا مهما في تحديد مدى قدرة هذا المستخلص في تثبيط هذه الخلايا . ومن خلال هذه الدراسة ، فقد أشارت النتائج بأن هناك تبايناً واضحا من خلال التراكيز المستخدمة ، حيث أشارت هذه الدراسة بأن تركيز 100 % و تركيز 75% أوضح قدرة عالية على التأثير(منطقة انعدام النمو) مقارنة مع بقية التراكيز ، ويرجع السبب في ذلك إلى مدى الحساسية التي ولدتها هذه التراكيز في إحداث التأثير القاتل على البكتيريا وهذا ما يتفق مع (2010) , Zahra . أما بقية التراكيز كانت في حقيقة الأمر متدنية من حيث مدى منطقة انعدام النمو الناتج من تطبيق هذه التراكيز . فقد تم ملاحظة أن بعض البكتيريا مثل *Klebsilla pneumonia* و البكتيريا *Salmonella typhi* و البكتيريا *Streptococcus pyogenes* عند استخدام التراكيز المنخفضة بينت أو أوضحت مقاومة عالية مقارنة مع بقية التركيز الأخرى . لقد أوضحت النتائج أن التراكيز العالية من المستخلص لها القدرة على التغلغل من خلال ميكانيكية الغشاء البلازمي Plasma membrane التي تتميز بقدرة فائقة في عملية النفاذية الاختيارية Selective permeability . ومن جهة أخرى تتباين أنواع البكتيريا الموجة والسالبة لصبغة الجرام في قدرتها على السماح لجزيئات مستخلص الليمون الكيميائية نظرا للاختلاف في مكونات تركيب طبقة جدار الخلية المتمثلة بطبقة البيتيدوجليكان وهذا مايتفق مع نتائج (2013) , Shinkafi and ndanusa .

لقد أقترح أن النشاط المضاد البكتيري Antibacterial activity للحامض العضوي في الأس الهيدروجين المنخفض Low pH يرجع أساساً إلى التركيب المفكك كيميائياً الكاره للماء Hydrophobic ذو السمية الخلوية Cytotoxicity ، لآن تـراكيز الحامض تتميز بنشاط مضاد بكتيري ضد أنـواع مختـلفة مـن البكتيريـا (2002)., Hasegawa *et al* . هذا التأثير الناتج من جراء فعل عصير الليمون يمكن أن يكون راجعاً إلى بعض المواد ذات النشاط المضاد البكتيري التي تشمل حامض الستريك Citric acid و أحماض أخرى . Lee *et al* ., (1987)

ومن خلال الكشف الكيميائي على العناصر النشطة كيميائياً في مستخلص الليمون التي يعتقد أنها تعلب دوراً تثبيطياً أو فاعلية تثبيطية عالية عند تطبيقها على البكتيريا الداخلة في هذه الدراسة . لقد تم الكشف عن المركبات الكيمائية الفعالة في مستخلص عصير الليمون مثل الفلافونيدات Flavonoids و التانينات Tannins و الصابونيات Saponines و الفينولات Phenols و الكربوهيدرات Carbohydrates و البروتينات Proteins و القلويدات Alkaloids و السكريات المختزلة و الأحماض الأمينية و الجلايكوسيدات Glycosides حيث بينت نتائج الكشف الأولى الكيميائي عن المركبات الفعالة في مستخلص عصير الليمون، حيث أظهرت النتائج احتواء مستخلص عصير الليمون على أغلب المركبات الفعالة التي تم الكشف عنها في هذه الدراسة ، وكانت هذه النتائج موافقة لنتائج . Bansode and Chavan , (2012)

لقد بينت النتائج التي تم الحصول عليها من خلال هذه الدراسة أن الصابونيات تلعب دورا مهما من ضمن المكونات التثبيطية الفعالة ، وهذا يتفق مع النتائج التي تحصل عليها (2008) ,. Muthana *et al* التي تتعلق بدور الصابونيات التثبيطي المستخلص من حبة

البركة *Nigella sativa* ضد بعض أنواع من البكتيريا الممرضة مثل البكتيريا *S. aureus* والـ *Bacillus subtilis* والـ *P. aeruginosa* والـ *K. pneumonia* والـ *P. vulgaris* والـ *S. typhi* .

لقد أوضح (2012),. Rajendra *et al* أن معظم المكونات المضادة الميكروبية المستخلصة من النبات كمركبات أيضية ثانوية Secondary metabolites تعتبر غنية بالمركبات الكيميائية الفعالة مثل Tannins و Terpenoids و Alkaloids و Falvonoids التي وجدت معمليا تتميز بخصائص مضادة ميكروبية ، حيث اتفقت هذه النتائج مع النتائج التي تحصلنا عليها من دراسة تأثير مستخلص الليمون على أنواع البكتيريا التي أجريت عليها الدراسة .

لقد أو ضحت (2013), Nada and Zainab أن مستخلص عصير الليمون *Citrus limon* يتميز بخصائص مضادة ميكروبية ، خصوصا ضد بعض أنواع البكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة الجرام وكذلك الخمائر . هذه النتائج تتفق مع النتائج التي تحصلنا عليها من هذه الدراسة المتعلقة بتأثير دور مستخلص ثمرة الليمون على نمو وحيوية البكتيريا سالفة الذكر.

لقد بين تأثير مستخلص عصير الليمون الذي يحتوى بدوره على مركبات أو مجامع فعالة في تثبيط نمو البكتيريا قيد الدراسة ، إذ أظـهرت النتائج فاعلية ايجابية في تثبيط نمو هذه البكتيريا، ولكن كانت هذه النتائج المتحصل عليها متباينة حسب نوع البكتيريا والتركيز المستخدم . حيث يلعب نوع المادة الكيميائية الداخلة في عملية الاستخلاص دور مهما في عملية التأثير التثبيطي ، إذ أشـــار (2006),. Masood *et al* إلـى أن مستخلص أوراق نبات

الغار *Laurus nobilis* تمتلك فعالية تثبيطية تجـــاه البكتيريا الموجبة لصبغة الجرام Gram positive bacteria ، وهذا قد يعود إلى أن هناك بعض المواد أو المكونات الكيميائية الفعالة تذوب في المحلول الكحولي أفضل من إذابتها في الماء ، إذا وجد أن المستخلص الكحولي يبين أو يوضح أفضل فاعلية تثبيطية ضد البكتيريا .

ومن خلال هذه الدراسة أيضاً نلاحظ أن الفاعلية القاتلة لمستخلص عصير ثمرة الليمون تعود أساساً لوجد الفلافونيدات والقلويدات Alkaloids والفينولات التي يعتقد بأن لها القدرة على تمزيق وتغيير هيكلية الأغشية الخلوية Cellular membranes مما يؤدي إلى تكوين معقدات مع البروتينات الخارجية الموجودة فيها Extracellular proteins التي بدورها يؤدي إلى الإخلال بوظيفة الحركة Motility إضافة إلى النفاذية Permeability function (Tuschiya *et al* ., 1994) . إضافة إلى ذلك تعمل الفينولات على تنشيط الإنزيمات المسؤولة على التفاعلات الإيضية Metabolic reactions الأساسية وذلك من خلال تداخلها مع البروتينات مسببة في مسخ أو تفسخ البروتين Protein denaturation الذي بدوره يعطل عملية نمو البكتيريا المستهدفة (Hamburger *et al* ., 1991) . أما فيما يتعلق بدور التانينات Tannins في عملية التثبيط الميكروبي (البكتيري) ، فإنها تتميز كيميائياً بقدرتها على تحفيز الخلايا البلعمية Phagocytic cell وكذلك فاعليتها العالية في تحطيم البروتينات والتراكيب الأخرى المتواجدة على جدار خلية البكتيريا (مثل بروتين الفلاجلين Flagellin الموجود في الأسواط وبروتين البلين Pillin الموجود في الشعيرات الجنسية) مما يقد يسبب في إعاقة عملية حركة البكتيريا وكذلك في عملية التصاقها Adhesions .

لقد بينت هذه الدراسة التطبيقية أن مستخلص الليمون ذو تأثير عالٍ من حيث التأثير القاتل على الكائنات البكتيرية الداخلة في الدراسة مقارنة مع تأثير المضادات الحيوية وهذا ما يتفق مع دراسة (2010),*Waidulla et al.* ، إلا أن هناك بعض التشابهات في دور مستخلص الليمون على البكتيريا *S. aureus* فمثلا هناك شبه تشابه إلى حدٍ ما مع تأثير المضاد الحيوي AMO والـ AMP أي بمعنى أن هناك تشابه في طريقة التأثير Mode of action وهذا يتفق مع دراسة كل من (2012), Bansode and Chavan . إن دور كلٍ من المضاد الحيوي AMO و المضاد الحيوي AMP اللذان يعتبران من المضادات الحيوية ذات الطيف الواسع Broad spectrum antibiotics أي بمعنى يؤثر على معظم أنواع البكتيريا ، إن هذا التشابه يدل على أن المادة الكيميائية الفاعلة في مستخلص عصير الليمون يتشابه إلى حدٍ ما مع دور هذان المضادان من حيث التأثير الواسع على البكتيريا . ومن خلال ذلك يتبين لنا أن المستخلص يمتلك تأثير أو طيفاً واسعا على البكتيريا الداخلة في هذه الدراسة .

وقد بينت نتائج تأثير مستخلص الليمون مقارنة مع تأثير كلٍ من المضاد الحيوي GM والمضاد الحيوي AK على البكتيريا *K. pneumonia* ، فقد لوحظ أن مستخلص الليمون بين كفاءة منخفضة أو تأثير منخفض مقارنة مع تأثير المضادان GM و AK وهذا يتفق مع دراسة قام بها (2007),Adedeji *et al.* . ويرجع السبب في ذلك إلى أن المضادان يتميزان بتأثير تثبيطي عالي ، حيث يتلخص الأول GM بدوره في التداخل مع عملية تخليق البروتين Protein synthesis في البكتيريا من خلال تغيير شكل جزء الرايبوسوم 30S التابع للرايبوسوم 70S . أما المضاد الحيوي AK فيتميز بتثبيط إنتاج البكتريا للبروتين ويسبب موت الخلية البكتيرية.

وقد كان تأثير مستخلص الليمون على البكتيريا *S. epidermidis* فنلاحظ المستخلص أثر بطريقة عالية أي أنه ذو تثبيط عالي على هذه البكتيريا . بمعنى أن هذا المستخلص يحتوي على عوامل مضادة بكتيرية ذات تأثير واسع متشابها إلى حدٍ ما مع طريق تأثير هذان المضادان التثبيطي .

تعرضت كلٍ من البكتيريا *P. aeruginosa* و البكتيريا *Streptococcus pyogenes* إلى تأثير مستخلص عصير الليمون و كذلك تأثير المضادات الحيوية سالفة الذكر . لقد أوضحت البكتيريا *P. aeruginosa* والبكتيريا *S. pyogenes* استجابة متشابهة إلى حدٍ ما للمستخلص وكذلك المضاد الحيوي AMO . كما أسلفنا سابقاً بأن المضاد الحيوي AMP يعتبر من المضادات الحيوية ذات التأثير الواسع Broad spectrum antibiotic الذي يعمل على الاتحاد مع مثبطات إنزيم Penicillinase بمعنى أن المستخلص يحتوي على مثبطات إنزيمية قد تسهم في تثبيط عملية تخليق البروتين التي تعتبر من العوامل المهمة في تخليق البروتين في خلية البكتيريا .

الاستنتاج

Conclusion

1. لقد استنتج من هذه النتائج أن مستخلص عصير الليمون ذو جهد تأثيري قوي كعوامل مضادة ميكروبية Antibacterial agents ضد الخلايا البكتيرية . وهكذا ، يمكن استعماله في علاج الأمراض المعدية Infectious diseases المسببة بواسطة الميكروبات المقاومة ، كمضاد بكتيري جيد في كثيرا من الحالات المرضية .

2. لقد تم استنتاج أن مستخلص عصير الليمون يحتوي على العديد من المثبطات البكتيرية التي بدورها تعمل على التداخل مع وظائف العضيات البكتيرية الحيوية في داخل وخارج الخلية مثل عملية تخليق البروتين ونفاذية الغشاء البلازمي.

3. من خلال هذه الدراسة التطبيقية ، نلاحظ أن مستخلص عصير الليمون يعتبر من المواد الإيضية الثانوية التي تلعب دورا مهما كمثبطات لنمو بعض أنواع البكتيريا .

4. يحتوي مستخلص عصير الليمون على العديد من المواد أو المركبات الفعالة التي تتشابه في طرق تأثيرها مع المضادات الحيوية .

5. تتباين معظم أنواع الخلايا البكتيرية في مدى استجابتها لتأثير مستخلص الليمون .

6. نستنتج من خلال تأثير مستخلص عصير الليمون إيضاح دور هذا المستخلص مقارنة مع بعض دور المضادات الحيوية التثبيطي الداخلة في هذه الدراسة حتى يتسنى لنا معرفة التشابه التأثير التثبيطي .

Abstract

The main objective of the current study is extraction of Antibacterial compounds and demonstration of Antibacterial activity of *lemon* extract (*Citrus lemon*) against A Gram positive and Negative bacteria . As microorganism are becoming resistant to present day antibiotics . My study focuses on Antibacterial activity and potential of the lemon extract. Biologically active compounds present in the lemon extract have always been of great interest . The extract of lemons fruits is a rich source of flavanones and many other flavones , Phenols , Tannins , Alkaloids , Saponins etc , The lemon extract shows strong Antibacterial activity against *P. aeruginosa* , *K. pneumonia* , *S. epidermidis* , *S.typhi* , *C. freundii* , *S. aureus* . *S. pyogenes* , on 100% & 75% . While the effect of concentrations of 50% and showed more resistant especially to *K. pneumonia* , *S.typhi* ,. and *S. pyogenes* . Concentration of 25% of the extract shows more resistant for most bacterial species except *S. aureus* . which gives moderate effect. Some antibiotics has been involved in this study to compare the similarity effect of the lemon extract. Thy results showed that more homology of the effect of both extract and antibiotics which used in this study.

المراجع العرابية

1. **إبراهيم ، العابد** (2009) . دراسة الفعالية المضادة للبكتيريا والمضادة للأكسدة لمستخلص القلويدات الخام لنبات الضمران *Traganum nudatum* . رسالة ماجستير . قسم علم الكيمياء - كلية العلوم، جامعة قاصدي مرباح، الجزائر.

2. **أبو زيد ، الشحات نصر** (1986) . النباتات والاعشاب الطبية. الطبعة الاولى، دار البحار - بيروت .

3. **الجميلي ، عصام فاضل و خالد ، عبدالرازق حبيب و سرى مؤيد عبدالمجيد** (2007) . تأثير المستخلص الزيتي لأوراق حشيشة الليمون *Cymbopogon citratus* في نمو الخمائر والبكتيرياالمعزولة من افواه الاطفال المصالبين بداء السلاق الفمي .كلية العلوم للنبات جامعة بغداد.

4. **الحديثي ، حسين جاسم وعبد القاهر ، ناهض عكلة و عبد القاهر ، فدوى وليد** (2013) . تأثير الكلايكوسيدات والتانينات المستخلصة من الفجل والريحان والرشاد في ثلاثة مواعيد متتابعة للحش في بعض انواع البكتريا كلية الزراعة ، جامعة الأنبار، العراق .

5. **الحمداني ، رعد إسماعيل، أيوب،مقداد توفيق** (1990) . الكيمياء العضوية المتقدمة. جامعة الموصل.

6. **العمري ، محمد مصطفى عبدالرازق** (2000) . الفوائد الطبية للنباتات و الأغذية ، دار الزهران للنشر والتوزيع ، عمان.

7. **النعيمى ، أسامة محمد و الجبورى ، صبحى حسين** (2006) . التأثير المثبط لبعض المستخلصات النباتية على جرثومة السبحات القيحية كلية العلوم قسم علوم الحياة ، كلية التمريض ، جامعة الموصل ، العراق .

8. **سيد ، محمود درويش** (1984) . المداواة باستعمال النباتات الطبية ، مؤتمر الطب الإسلامي مؤسسة الكويت للتقدم العلمي . الكويت.

9. **سعد الدين ، شروق محمد كاظم** (1986) . الأعشاب الطبية . الطبعة الأولى. دار الشؤون الثقافية العامة . وزارة الثقافة والأعلام . بغداد .

10. **علي ، زاهر محسن** (2010) . الفعالية التضادية لثمار الحمضيات Citrus fruit juice كمضادات حيوية لبعض انواع البكتيريا كلية العلوم ، جامعة الكوفة .

11. **عبدالله ، نبراس يحي** (2009). تأثير مجموعة من المستخلصات النباتية ضد بكتيريا *Klebisella pneumonia* و *Staphylococcus aureus* كلية العلوم ، جامعة الكوفة.

12. **محسن ، صبا جعفر و زوين ، لمى عبد الهادي و النصراوي ، ممدوح عبد الرزاق** (2010) . الفعالية التثبيطية لمستخلصات اوراق نبات الغار (*Laurus nobilis*) على بعض انواع البكتيريا .كلية العلوم . جامعة تكريت .

المراجع الاجنبية

13. Adel , M. and Mahasneh , A.(1999) . Antimicrobial activity of extracts of herbal used in the traditional medicine of Jordan. Journal. Ethnopharmacol . 64: 271-276.

14. Adedeji, G. B., Fagade, O. E. and Oyelade, A. A.(2007). Prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* in Clinical Samples and its sensitivity to Citrus Extract. African Journal of Biomedical Research. 10 : 183 – 187 .

15. Ahmad, M.M ., Salim, Z.R ., Iqbal, F.M and Sultan, J.I.(2006). Genetic Variability of essential oil Composition in Four Citrus Fruit Species. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 38:319-324.

16. Amaral , J . A ., Ekins , A ., Richards , S . R. and Knowles , R. (1998) . Effect of selected monoterpenes on methane oxidation denterfication and aerobic metabolism by bacteria pure culture, Applied . Environ. Microbial . 64:520-525 .

17. Amalesh , S ., Gouranga and Sanjoy, K .(2011). Roles of flavonoids in plants. International Journal of Pharmacy Sciences Technology.6: 0975-0525.

18. Amit, P., Arti, K. and Sudeep, K. T. (2011) . Evaluation of antimicrobial activity and phytochemical analysis of Citrus limon. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences. 13:117-127

19. Anandi, M. and Juan, C. P.(2009). Drug susceptibility testing for Mycobacterium tuberculosis. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 54:130-133.

20. Ashok , k ., Narayani , M ., Subanthini , A . and Jayakumar , M . (2011). Antimicrobial Activity and Phytochemical Analysis of Citrus Fruit Peels -Utilization of Fruit Waste. International Journal of Engineering Science and Technology.3: 415 - 420.

21. Ashok, K ., Jha1, K.K ., Dinesh, K . A . and Akhil , G. (2012) . Preliminary Phytochemical Analysis of Leaf and Bark (Mixture) Extract of Ficus Infectoria Plant . Journal Phytochemical research. 5: 71-77.

22. Bansode , D . S . and Chavan , M . D .(2012). Studies on antimicrobial activity and phytochemical analysis of citrus fruit juices against selected enteric Pathogens. International Research Journal of pharmacy.11: 120-126

23. Bina, L. J., Tista, P., Anjana, S. and Kayo, D. Y.(2010). Study of Antimicrobial Activity of Lime Juice Against *Vibrio Cholera*. Journal of Medical . 8 :144-147.

24. Bruce, R. T ., Davis, A. D and Kent, J. B.(2002). Production of Therapeutic Proteins in Plants. Journal of Food Science and Technology. 11 :252-264.

25. Camella , C and Bailey. (1998). A *Vibrio cholerae* pathogenicity island associated with epidemic and pandemic strains . Journal Ethnopharmacol 45: 22–34.

26. Cowan, M. M.(1999). Plant products as antimicrobial agents. Journal Microbiology. 12: 564- 582.

27. Duke , J. A ., JoBogenschutz , G. M ., DuCellier , J. and Duke , P.K.(2003). **CRC** Handbook of Medical Plant . CRC.

28. Duthie , G. and Crozier , A .(2000). Plant-derived phenolic antioxidants. Journal Current Opinion In Lipidology. 11: 43-47.

29. Dubey, R . C and Maheshwari , D.K. (2002). Practical Microbiology, S. Chand & Co. P. Ltd., Ram Nagar, New Delhi.

30. Erturk , O ., Ozbucak , T . B . and Bayrak , A . (2006) . Antimicrobial activities of some medicinal essential oils. Journal of Medical . 52 :58-62.

31. **Essawi, T. and Srour, M.** (2000). Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity, Journal. Ethnopharmacol . 70 : 343 – 349.

32. Evan, F , J.(2000). The Antimicrobial Effects of Flavonoid Extracts on Selected Bacteria. Journal Antimicrobial Agents Chemotherapy . 8:112-118.

33. Gislene, G.F., Locatelli , C.F., Paulo and Giuliana , L.S.(2000). Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic resistant bacteria . Journal Microbiology. 31: 247-256 .

34. Hamburger , H. and Hostettmann , K. (1991).The link between phytochemistry and Medicine .Phytochemistry . 30:3864-3874.

35. Hawley, G. (1977). The Condensed Chemical Dictionary. 19th Ed, Van Nostrand Reinhold Company, New York. 211 p.

36. Hasegawa , J ., Hara, K. Y., Nishina, T., Konuma, H. and Kumagi, S. (2002). Survival of Vibrio parahaemolyticus serovar O3: K6 strains under acidic . Journal of K erbala University. 8: 123-128.

37. Hideo, H. , Masako, I . ,Tomoko, K. , Tomoko, S. , Atsuko, M.,Norisuke, S and Yoshie, M. (2007). Effects of Tea and Fruits Juice on Bacterial Proliferation. Journal Chugokugakuen . 6: 5 -10.

38. Kawaii , S. T ., Yasuhiko, K. E ., Kazunori , Y. O ., Masamichi , K ., Meisaku , C . and Hiroshi , F.(2000). Quantitative study of flavonoids in leaves of *Citrus* plants. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 48: 3865-3871.

39. Kumar, S., Nancy., Singh, D. and Kumar, V.(2012). Evaluating The Antibacterial Activity of Plant Extracts Against Bacterial Pathogens. Journal of Drug Delivery and Therapeutics.2: 182-185.

40. Lee, R.F., Brlansky, R.H., Garnsey, S.M. and Yokomi , R.K . (1987). Traits of citrus tristeza virus important for mild strain cross protection of citrus. The Florida approach. Phytophylactica. 19:215-219.

41. Maruti , J. , Dhanavade, C. B. , Jalkute , S. G. and Kailash, D. S.(2011). Study Antimicrobial Activity of Lemon (*Citrus lemon L.*) Peel Extract. British Journal of Pharmacology and Toxicology. 2: 119-122.

42. Masood , N., Chaudhre , A. and Tariq , P. (2006) Bactericidal activity of black pepper,bay leaf, aniseed and coriander against oral isolation. 19:214-218.

43. Molan , A . L ., Menbb , W . C .; Attwod , G .t . Min , B .R .; Peters , J . S . and Barry , T . N . (1997). The effect tannins from two lotus species on protein degradation and bacterial growth in the rumen. Journal National Production . 22: 200-246.

44. Mohanapriya , M . , Lalitha , R. and Rajendran , R. (2013). Health and Medicinal Properties of Lemon (*Citrus limon*). International Journal of Ayurveda and Herbal Medicine. 31: 695-687.

45. Muthana, J. M ., Mohammed , T. M and Jasim , M. Y.(2008). Biological Effect of Saponins Isolated from *Nigella sativa* (seeds) on Growth of Some Bacteria. Journal of Medical Science.10:663-671.

46. Nada , K . H . and Zainab, A . C . (2013). Antimicrobial Activity of Different Aqueous Lemon Extracts . Journal of Applied Pharmaceutical Science. 3: 074-078.

47. Pinkee, P., Archana, M., Subhadip, H., Jinu, J. and Pradeep, M .(2010). In vitro antibacterial property of *Citrus limon* leaves. Journal Society of Applied Sciences. Asian Journal of Experimental Biological Sciences.9 :180-182

48. Preetha , B. and Judia , H.S. (2011) . Antibacterial Activity of Citrus Fruits against Vibrio Cholera. Journal Ethnopharmacol. 2: 14– 15.

49. Rajendra , S . , Rubin, D . , Nancy . and Rawat . (2012) . Antibacterlal Effects of Plants Extracts on Human Microbial Pathogens and Microbial Limit Tests . International Journal of Research in pharmacy and Chemistry 12: 2231-2781.

50. Rudolf, F.W. and Volker, F.(2000). Herbal Medicine . 2nd ed., revised And expanded.

51. Shahnah , S.M ., Ali , S., Ansari , H. and Bagri , P. (2007). New sequiterpene derivative from fruit peel of citrus limon . Journal of Pharmacology and Toxicology .75: 165-170.

52. Shinkafi, S.A and Ndanusa, H. (2013). antimicrobial activity of *Citrus limon* on *Acnevulgaris* (PIMPLES).International Journal of Science Inventions Today. 2: 397- 409.

53. Sohn, H.Y., Son, K.H ., Know, C.S. and Kang , S.S . (2004). Antimicrobial and cytotoxic activity of 18 prenylated flavonoids isolated from medicinal plants: *Morus alba* L., *Morus mongolica* Schneider, *Broussnetia papyrifera* (L.) Vent, *Sophora flavescens* Ait and *Echinosophora koreensis* Nakai. Phytomedicine. 11: 666 - 672.

54. Sule, I.O . , Agbabiaka, T.O. and Oyeyiola, G.P. (2009). Tradomedical Values of Cotton Leaf Plus Lemon Juice Against Clinical Bacterial Isolates. ethnobotanical leaflets Journal.13:522-531.

55. Tuschiya, H ., Sato , M ., Linum , M ., Yokoyama , J ., Ohyama, M ., Tanaka, T., Takasa , I . and Naimkawa , I. (1994). Inhibition of the growth of carcinogenic bacteria in vitro by plant flavones experiential. Journal Ethnopharmacol. 50:846-849.

56. Uwaezuoke, J. C. and Aririatu, L. E. (2004). A survey of antibiotic resistant *Staphylococcus aureus* strains from clinical sources on Owerri. Journal Applied Sciences Environ . 8: 67 – 69 .

57. Visshwakarma , R . A . (1990). Stereo selective synthesis of artecther from aremisinin . Journal National Production. 53: 216-217.

58. Waidulla , N.A . , Siba , M. A. and Nahla , O .T. (2010). Evaluation of the Anti bacterial Activity of Citrus Juices. An In Vitro Study. Al–Rafidain Journal. 10: 376-382.

59. Yadav, R. and Munin , A . (2011) . Phytochemical analysis of some medicinal plants. Journal of Phytology . 3: 10-14.

60. Zahra , M . A . (2010). Antagonism activity of citrus fruit juices on some pathogenic bacteria . Journal of Kerbala University. 8: 123-128.