الجمهورية العربية السورية

جامعة دمشق

كلية الصيدلة

قسم العقاقير والنباتات الطبية

دراسة التأثير المضاد للفطور للزيت العطري المستخلص من قشور ثمار النارنج *Citrus× aurantium* من الفصيلة السذابية Rutacea

The Antifungal Effect of Essential Oil of *Citrus× aurantium* peels

أطروحة قدمت إلى قسم العقاقير- جامعة دمشق لنيل درجة الماجستير في العقاقير

إعداد: أسماء محمد سعيد الحبش

إشراف

د. رشا الخطيب

مشاركة

أ.د. محمد معروف

العام الدراسي

1437-2016

مدة البحث:

تاريخ البدء: 2013/3/24

تاريخ الانتهاء: 2015/5/4

تم العمل في:

1. مخبر الدراسات العليا - قسم العقاقير وكيمياء العقاقير – كلية الصيدلة- جامعة دمشق.
2. مخبر الدراسات العليا- قسم الأحياء الدقيقة – كلية الصيدلة- جامعة دمشق.
3. مخابر مديرية الرقابة الدوائية.

تاريخ مناقشة الرسالة:

2016/3/2 الساعة الحادية عشرة صباحاً على مدرج تشرين في كلية الصيدلة -جامعة دمشق

أمام أعضاء لجنة الحكم:

م.د رشا الخطيب: عضواً مشرفاً

أ.د عصام الشماع: عضواً

أ. د عصام الآغا: عضواً

وقد تم إجراء التصحيحات المطلوبة منها على الأطروحة.

السيرة الذاتية Curriculum Vita (CV)

المعلومات الشخصية:

- الاسم : أسماء محمد سعيد الحبش
- مواليد: دمشق 1988/01/01م
- هاتف: 0944652838
- البريد الالكتروني: asmaasweetlife@hotmail.com

الشهادات:

- بكالوريوس في الصيدلة والكيمياء الصيدلية – كلية الصيدلة- جامعة دمشق – 2010

النشرات العلمية:

التركيب الكيميائي للزيت العطري لقشور ثمار النارنج وتأثيره المضاد للفطريات في الزجاج، المجلة العربية للعلوم الصيدلانية.

تم قبول النشرة بتاريخ 15-03-2015 بانتظار النشر.

تصريح

الاسم الكامل: **أسماء محمد سعيد الحبش**.

مكان وتاريخ الولادة: سوريا- دمشق 1988/01/01.

عنوان البحث: **دراسة التأثير المضاد للفطور للزيت العطري المستخلص من قشور ثمار النارنج Citrus× aurantium من الفصيلة السذابية Rutacea**

لا يوجد أي جزء من هذه الأطروحة تم اقتباسه بالكامل من عمل علمًي آخر أو أنجز للحصول على شهادة أخرى في جامعة دمشق أو أية جامعة أخرى أو أي معهد تعليمي داخل أو خارج القطر.

لم يتم قبض أي مبلغ مادي أو مكافأة عينية سواء بشكل مباشر أو غير مباشر مقابل القيام بعمل يمس جوهر هذه الأطروحة أو نتائجها.

أتعهد بأنني لم أقل إلا الحقيقة ولم أخف شيئاً تحت طائلة المعاقبة والمحاسبة القانونية وعليه أوقع.

التاريخ توقيع الباحث

2016-3-2 أسماء محمد سعيد الحبش

الشكر

- أتقدم بجزيل الحمد والشكر لله عزّوجل الذي وفقني لإتمام هذا البحث.
- أشكر الأستاذ الدكتور عبد الحكيم نتوف عميد كلية الصيدلة ونائبيه الأستاذ الدكتور مصطفى العموري والأستاذة الدكتورة جمانة الصالح.
- الشكر الجزيل للأستاذ الدكتور عصام الشماع رئيس قسم العقاقير الذي كان لي عوناً في بحثي، وله مني كل الشكر لتحكيمه هذ البحث.
- أتقدم ببالغ الامتنان وجزيل العرفان إلى الأخت والصديقة الدكتورة رشا الخطيب التي وجهتني وأخذت بيدي وأشرفت على كل مراحل البحث، فلها مني كامل الاحترام والتقدير.
- الشكر الجزيل للأستاذ الدكتور محمد معروف على مشاركته في هذا البحث، والذي لم يبخل علي بالنصح والإرشاد والتوجيه والمساعدة، كما أشكره على الوقت والجهد الذي بذله ليكون البحث بأفضل صورة.
- الشكر الجزيل للأستاذ الدكتور محمد عصام حسن آغا الذي شرفني في تقييم بحثي.
- الشكر الجزيل للدكتور حبيب عبود لما قدمه لي من تسهيلات للعمل في مخابر مديرية الرقابة الدوائية.
- الشكر الجزيل للأستاذ الدكتور عماد القاضي لما قدمه لي من مساعدة.
- الشكر الجزيل لصديقتي الغالية نور الراشد على الجهد الذي بذلته في تدقيق البحث لغوياً.
- كل الشكر للعاملين والزملاء في قسم العقاقير وأخص بالذكر الصديقة الغالية هناء الحسين، والزملاء نسرين حسون ونور ياسين.
- كل الشكر للعاملين والزملاء في قسم الأحياء الدقيقة وأخص بالذكر الزميلة مروة الحبش والزميلة علياء عبد الوهاب والزميل طارق رقية.
- الشكر للصديقة الغالية رولا شكور لما قدمته لي من مساعدة ودعم.
- كل الشكر لكل من مد لي يد العون وأخص بالذكر السيد هاني الموعد والسيد ناصيف سرحان.

الإهداء

- إلى بلدي الجريح.....

سوريا

- إلى الذين حملوا أقدس رسالة في الحياة ...
إلى الذين مهدوا لنا طريق العلم والمعرفة ...
جميع أساتذتنا الأفاضل.....

- إلى الذي علمني أن أعمل بجد ودأب لأتمكن من تحقيق أمنياتي...
إلى الذي علمني أن أسعى لأعيش بهمة الأبطال وبراءة الأطفال وعقول العظماء.....

أبي الحبيب

- إلى التي اقتلعت من قلبي جذور اليأس وغرست بدلاً عنها براعم الأمل..
إلى من علمتني الصمود مهما تبدلت الظروف..
إلى من كانت دعواتها لي في السر والعلن خير زاد.

أمي الحبيبة

- إلى شريك الحياة..وتوأم الروح..
إلى من كان سنداً لي في كل خطوة من خطوات حياتي..
إلى من يأخذ بيدي دائماً بتفانٍ وإخلاص ويدفعني لأكون في القمة..
إلى من علمني الطموح وأهداني النجاح..

زوجي الغالي..
نبراس

- إلى رفاق الدرب..

إلى من رافقوني في حياتي منذ أن حملنا حقائب صغيرة وسرنا الدرب خطوة بخطوة..
إلى من كانوا لي خير عون وخير سند...

إخوتي وأخواتي
هبة، عمر، محمد، أنس

- إلى من غمروني بالعطف والحنان....
إلى من كانوا لي الأب والأم والأخوة..
إلى عائلتي الثانية..

عائلة زوجي

- إلى من معها سعدت، وبرفقتها في دروب الحياة الحلوة والحزينة سرت.
إلى من جلسنا معاً على مقاعد الدراسة..وشاءت الظروف أن نفترق..

صديقتي
ولاء

List of Contents قائمة المحتويات

1 مقدمة عامة 9

2 المستقلبات الأولية والثانويةPrimary and secondary metabolites 11

2.1 المستقلَبات الأولية Primary metabolites 11

2.2 المستقلَبات الثانوية Secondary metabolites 11

3 الزيوت العطرية Essential oils 12

3.1 لمحة عن الزيوت العطرية 12

3.2 التركيب الكيميائي للزيوت العطرية 12

3.2.1 التربينات Terpenes 13

3.2.2 المركبات العطرية Aromatic compounds 14

4 نبات البحث النارنج *Citrus aurantium* 16

4.1 مقدمة تاريخية 16

4.2 تصنيف النبات 16

4.3 استخدامات نبات النارنج الشائعة 18

4.4 شجرة النارنج 18

4.4.1 الوصف المورفولوجي 18

4.4.2 القسم المستعمل 19

4.5 التركيب الكيميائي 20

4.5.1 الزيت العطري Essential oil 20

4.5.2 الحموض الفينولية Phenolic acids 21

4.5.3 المركبات الفلافونوئيدية Flavonoid compounds 22

4.5.4 القلويدات Alkaloids 24

4.6 الدراسات الحديثة 24

4.6.1 التأثير المضاد للمِكروبات Antimicrobial effect 24

4.6.2 التأثير المضاد الفطريات Antifungal effect 25

4.6.3 التأثير المضاد للأكسدة Antioxidant effect 26

4.6.4 التأثير السمي للخلايا السرطانية Cytotoxic effect 26

4.6.5 التأثير الحال للقلق Anxiolytic effect 26

4.6.6 التأثير المضاد للالتهاب Anti-inflammatory effect 26

4.6.7 التأثير على مرض النقرس gout 27

4.6.8 التأثير المضاد للتشنج Antispasmodic effect 27
4.6.9 التأثير في حماية المعدة من القرحات Gastroprotection effect 27
4.6.10 التأثير الخافض للكولسترول والخافض لسكر الدم Hypocholesterolemic and Hypoglycemic effect 27
4.6.11 التأثير المضاد للاختلاج Anticonvulsant effect 27
5 الفطريات Fungi 28
5.1 طبيعة الفطريات The nature of fungi 28
5.2 الفطريات بوصفها عوامل ممرضة للإنسان Fungi as human pathogen 28
5.2.1 الفطريات الممرضة الحقيقية 29
5.2.2 الفطريات الانتهازية 29
5.3 نوع المبيضات البيض *Candida albicans* 31
5.3.1 مظهر المستعمرات 31
5.3.2 الأهمية السريرية 32
5.3.3 العوامل المضادة للفطريات المستخدمة في معالجة جنس المبيضات 32
5.4 النباتات كعوامل مضادة للفطريات 35
5.5 الطرائق المتبعة لتقدير الفاعلية المضادة للفطريات للزيوت العطرية في الزجاج 36
5.5.1 اختبار الانتشار بالآغار Agar diffusion test 36
5.5.2 اختبار التمديد بالمرق أو بالآغار Broth/Agar dilution test 36
5.5.3 اختبار التمديد الميكروني بالمرق Broth microdilution method 36
6 المواد والطرائق Materials and Methods 40
6.1 جمع عينات نبات النارنج واستخلاصها 40
6.1.1 جمع العينات 40
6.1.2 استخلاص الزيت العطري وحفظه 41
6.2 تحليل مكونات الزيت العطري الطيار 44
6.3 المعلومات المناخية 45
6.4 دراسة التأثير المثبط لنمو فطريات المبيضات البيض لعينات الزيوت العطرية المستخلصة من قشور ثمار النارنج ولمعياري الليمونين الميمن (+) والميسر (-) و للفلوكونازول 45
6.4.1 عزل عينة الفطر 46
6.4.2 دراسة تأثير المحلات لوحدها على نمو فطريات المبيضات البيض واختيار المحل المناسب لتمديد الزيت العطري والليمونين المعياري 47
6.4.3 دراسة التأثير المثبط لنمو فطريات المبيضات البيض للفلوكونازول 50
6.4.4 دراسة التأثير المثبط لنمو فطريات المبيضات البيض لعينات الزيوت العطرية غير المنحلة بالماء باستخدام مزيج من الماء المقطر والتوين 80 52
6.4.5 دراسة التأثير المثبط لنمو فطريات المبيضات البيض لمعياري الليمونين الميمن (+) والميسر (-) باستخدام مزيج من الماء المقطر والتوين 80 55

6.5 الدراسة الإحصائية: 56

7 النتائج Results 57

7.1 جمع عينات نبات النارنج واستخلاصها 57

7.2 تحليل مكونات الزيت العطري: 58

7.3 المعلومات المناخية: 62

7.4 دراسة التأثير المثبط لنمو فطريات المبيضات البيض للزيت العطري المستخلص من قشور ثمار النارنج ولمعياري الليمونين الميمن (+) والميسر (-) و للفلوكونازول: 62

7.4.1 دراسة تأثير المحلات لوحدها على نمو المبيضات البيض واختيار المحل المناسب لتمديد الزيت العطري والليمونين المعياري 62

7.4.2 دراسة التأثير المثبط لنمو فطريات المبيضات البيض للفلوكونازول 64

7.4.3 دراسة التأثير المثبط لنمو فطريات المبيضات البيض لعينات الزيوت العطرية غير المنحلة بالماء باستخدام مزيج من الماء المقطر والتوين 80 64

7.4.4 دراسة التأثير المثبط لنمو فطريات المبيضات البيض لمعياري الليمونين الميمن (+) والميسر (-) باستخدام مزيج من الماء المقطر والتوين 80 67

8 المناقشة Discussion: 71

8.1 دراسة تغير تركيب الزيت العطري تبعاً لتغيرات المناخ: 71

8.1.1 استخلاص عينات نبات النارنج: 71

8.1.2 تحليل مكونات الزيت العطري: 72

8.2 دراسة التأثير المثبط لنمو فطريات المبيضات البيض للزيت العطري المستخلص من قشور نبات النارنج ولمعياري الليمونين الميمن (+) والميسر (-) و للفلوكونازول: 73

8.2.1 اختيار المحل المناسب لتمديد الزيت العطري والليمونين المعياري: 73

8.2.2 دراسة التأثير المثبط لنمو الفطريات للفلوكونازول 74

8.2.3 دراسة التأثير المثبط لنمو فطريات المبيضات البيض لعينات الزيوت العطرية غير المنحلة بالماء باستخدام مزيج من الماء المقطر والتوين 80 75

8.2.4 دراسة التأثير المثبط لنمو فطريات المبيضات البيض لمعياري الليمونين الميمن (+) والميسر (-) باستخدام مزيج من الماء المقطر والتوين 80 76

9 الاستنتاجات Conclusions 78

10 المقترحات والتوصيات Suggestions and Recommendations 80

11 ملخص البحث باللغة العربية: 81

12 ملخص البحث باللغة الانكليزية 82

13 المراجع References: 83

Appendix الملحق..... 14
92

قائمة الأشكال List of Figures

الشكل (1) الصيغة العامة للايزوبرين 13
الشكل (2) صيغ بعض المركبات الموجودة في الزيوت الطيارة..... 15
الشكل (3) نبات النارنج..... 19
الشكل (4) البنية الداخلية لثمار الحمضيات الناضجة [19]..... 20
الشكل (5) صيغ بعض الحموض الفينولية والمركبات الفلافونوئيدية الموجودة في نبات النارنج..... 23
الشكل (6) صيغ القلويدات الموجودة في ثمار النارنج..... 24
الشكل (7) مستعمرات المبيضات البيض على وسط سابورو دكستروز آغار 31
الشكل (8) العوامل المضادة للفطريات وآلية عملها [49]..... 34
الشكل (9) نبات النارنج في مكان جمعه في مدينة دمشق (التقاط الباحثة). 41
الشكل (10) جهاز الاستخلاص Clevenger apparatus (التقاط الباحثة). 42
الشكل (11) ملخص لمراحل استخلاص الزيت العطري الطيار (التقاط الباحثة). 43
الشكل (12) جهاز الكروماتوغرافيا الغازيّة ومتحري مطياف الكتلة GC-MS (التقاط الباحثة). 45
الشكل (13) عزلة فطر المبيضات البيض *Candida albicans* (التقاط الباحثة). 47
الشكل (14) تحضير علب البتري الحاوية على مزيج من الوسط الزرعي والزيوت العطرية المختلفة (التقاط الباحثة). 54
الشكل (15) إضافة المعلق الفطري إلى علب البتري (التقاط الباحثة) 55
الشكل (16) مردود الزيت العطري لكل من العينات الثلاث المستخلصة خلال ثلاثة أشهر من فترة النضج. 58
الشكل (17) جزء من مخطط تحليل GC-MS لعينة الزيت العطري المستخلصة في الشهر الثاني من فترة النضج... 59
الشكل (18) التركيز الأدنى المثبط لنمو الفطريات للفلوكونازول بعد 72 ساعة من العمل (التقاط الباحثة)..... 64
الشكل (19) قيمة التركيز الأدنى المثبط لنمو الفطريات للزيت العطري المستخلص في شهر كانون الأول - التجربة الأولى- (التقاط الباحثة)..... 65
الشكل (20) متوسط قيمة MIC و IC_{50} لكل من عينات الزيت العطري الثلاث مع الانحراف المعياري..... 66
الشكل (21) التركيز الأدنى المثبط لنمو الفطريات لليمونين (+) - التجربة الثالثة - (التقاط الباحثة) 68
الشكل (22) التركيز الأدنى المثبط لنمو الفطريات لليمونين (-) - التجربة الثالثة - (التقاط الباحثة) 69
الشكل (23) متوسط قيمة MIC و IC_{50} لكل من الليمونين الميمن والميسر مع الانحراف المعياري 69
الشكل (24) مقارنة التأثير المثبط لنمو الفطريات لجميع العينات بالاعتماد على تراكيز MIC و IC_{50} 70
الشكل (25) مخطط GC-MS لعينة الزيت العطري المستخلصة في شهر كانون الأول..... 92
الشكل (26) مخطط GC-MS لعينة الزيت العطري المستخلصة في شهر شباط. 92
الشكل 27: العلاقة بين تراكيز عينة الزيت العطري المستخلصة خلال شهر كانون الأول ونسب تثبيط نمو المستعمرات الفطرية - التجربة الأولى-..... 97
الشكل (28) العلاقة بين تراكيز عينة الزيت العطري المستخلصة خلال شهر كانون الأول ونسب تثبيط نمو المستعمرات الفطرية -التجربة الثانية-. 97
الشكل (29) العلاقة بين تراكيز عينة الزيت العطري المستخلصة خلال شهر كانون الثاني ونسب تثبيط نمو المستعمرات الفطرية- التجربة الأولى-. 99
الشكل (30) العلاقة بين تراكيز عينة الزيت العطري المستخلصة خلال شهر كانون الثاني ونسب تثبيط نمو المستعمرات الفطرية -التجربة الثانية-. 99
الشكل (31) العلاقة بين تراكيز عينة الزيت العطري المستخلصة خلال شهر شباط ونسب تثبيط نمو المستعمرات الفطرية -التجربة الأولى-..... 101

الشكل (32) العلاقة بين تراكيز عينة الزيت العطري المستخلصة خلال شهر شباط ونسب تثبيط نمو المستعمرات الفطرية -التجربة الثانية-..... 101
الشكل (33) العلاقة بين تراكيز الليمونين – ونسب تثبيط نمو المستعمرات الفطرية -التجربة الأولى-. 103
الشكل (34) العلاقة بين تراكيز الليمونين – ونسب تثبيط نمو المستعمرات الفطرية -التجربة الثانية-. 103
الشكل (35) العلاقة بين تراكيز الليمونين – ونسب تثبيط نمو المستعمرات الفطرية -التجربة الثالثة-. 103
الشكل (36) العلاقة بين تراكيز الليمونين + و نسب تثبيط نمو المستعمرات الفطرية -التجربة الأولى-..... 105
الشكل (37) العلاقة بين تراكيز الليمونين + و نسب تثبيط نمو المستعمرات الفطرية -التجربة الثانية-..... 105
الشكل (38) العلاقة بين تراكيز الليمونين + و نسب تثبيط نمو المستعمرات الفطرية -التجربة الثالثة-. 105

قائمة الجداول List of tables

الجدول (1) : تصنيف نبات النارنج *Citrus aurantium* [89] 17
الجدول (2) نسبة وتركيب الزيت العطري لكل من قشور وأزهار النارنج والأوراق الفتية والهرمة [15]..... 21
الجدول (3) نسبة الفلافونوئيدات الاجمالية في نبات النارنج 22
الجدول (4) تحضير أوساط SDAلدراسة تأثير DMSO والميتانول على نمو المبيضات البيض. الحجوم المضافة والتراكيز النهائية للميتانول و DMSO. 49
الجدول (5) تحضير سلسلة تراكيز من المحاليل الممددة للفلوكونازول، الحجوم المضافة وتراكيز الفلوكونازول الناتجة..... 51
الجدول (6) تحضير سلسلة عيارية من المحاليل الممددة لعينات الزيوت العطرية باستخدام الماء المقطر والتوين 80، الحجوم المضافة وتراكيز الزيوت العطرية الناتجة. 53
الجدول (7) نسب كل من وزن القشور إلى وزن الثمار وحجم الزيت العطري إلى وزن القشور لكل من العينات الثلاث. 57
الجدول (8) نتائج تحليل GC-MS لعينة الزيت العطري المستخلصة في شهر كانون الثاني. 60
الجدول (9) النسب المئوية لمكونات الزيت العطري لقشور النارنج للعينات المستخلصة خلال الأشهر الثلاثة من فترة النضج. 61
الجدول (10) المعلومات المناخية خلال الأشهر الثلاثة التي تم جمع العينات فيها. 62
الجدول 11:قيم IC_{50} و MIC والانحراف المعياري لكل من عينات الزيوت العطرية والفلوكونازول..... 66
الجدول (12) قيم IC_{50} و MIC والانحراف المعياري لكل من الليمونين الميمن والميسر والفلوكونازول..... 68
الجدول (13) نتائج تحليل GC-MS لعينة الزيت العطري المستخلصة في شهر كانون الأول..... 93
الجدول (14) نتائج تحليل GC-MS لعينة الزيت العطري المستخلصة في شهر شباط. 94
الجدول 15: متوسط عدد المستعمرات الفطرية والنسبة المئوية لتثبيط المستعمرات الفطرية في كل من علب البتري الشاهدة وعلب البتري الحاوية على تراكيز مختلفة لمحاليل التمديد 95
الجدول 16: النسب المئوية لتثبيط نمو المستعمرات الفطرية عند استخدام تراكيز مختلفة من عينة الزيت العطري التي تم استخلاصها في شهر كانون الأول. تمثل القيم متوسط نتائج التجربتين المستقلتين. 96
الجدول (17) النسب المئوية لتثبيط نمو المستعمرات الفطرية عند استخدام تراكيز مختلفة من عينة الزيت العطري التي تم استخلاصها في شهر كانون الثاني. تمثل القيم متوسط نتائج التجربتين المستقلتين. 98
الجدول (18) النسب المئوية لتثبيط نمو المستعمرات الفطرية عند استخدام تراكيز مختلفة من عينة الزيت العطري التي تم استخلاصها في شهر شباط. تمثل القيم متوسط نتائج التجربتين المستقلتين..... 100
الجدول (19) النسب المئوية لتثبيط نمو المستعمرات الفطرية عند استخدام تراكيز مختلفة من الليمونين (–)، تمثل القيم متوسط نتائج التجارب الثلاث المستقلة. 102
الجدول (20) النسب المئوية لتثبيط نمو المستعمرات الفطرية عند استخدام تراكيز مختلفة من الليمونين (+)، تمثل القيم متوسط نتائج التجارب الثلاث المستقلة. 104

List of abbreviations قائمة الاختصارات

الاختصار	الاسم باللغة الانكليزية	الاسم باللغة العربية
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome	متلازمة عوز المناعة المكتسب
DMSO	Dimethyl Sulfoxid	ثنائي ميتيل السلفوكسيد
GC-MS	Gas Chromatography–Mass Spectrometry	الكروماتوغرافيا الغازية المربوط بمطياف الكتلة
IC_{50}	The half Inhibitory Concentration	التركيز المثبط للنصف
MIC	Minimum Inhibition Concentration	التركيز الأدنى المثبط
NSAIDs	Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs	مضادات الالتهاب غير الستيروئيدية
SDA	Sabouraud Dextrose Agar	سابورو دكستروز آغار

1 مقدمة عامة

تزايدت الإنتانات الفطرية المُسَبَّبة بالفطريات الانتهازية opportunists fungi بشكل كبير في العقود الماضية، وخاصة عند المرضى موهني أو مثبطي المناعة immunocompromised patients. وعلى الرغم من توافر مجموعة من المضادات الفطرية إلا أنّها تمتلك العديد من الآثار الجانبية مثل الاضطرابات المعدية المعوية gastrointestinal disturbances ، والسمية الكبدية hepatotoxicity، وهذا ما يدعو إلى البحث عن أدوية مضادة للفطريات ذات فاعلية أكبر وسمية أقل[1].

يمكن أن تُشكِّل المواد المستخلصة من النباتات مصدراً لعدد كبير من الأدوية المضادة للفطريات، وتلعب الزيوت العطرية Essential oils دوراً كبيراً في هذا المجال حيث بيّنت العديد من الدراسات امتلاكها خصائص مضادة للطفيليات والفيروسات والفطريات[2] [3]. يتواجد نبات النارنج بوفرة في سوريا، كما أثبتت العديد من الدراسات امتلاك الزيت العطري المستخلص من قشوره تأثيراً مُضادّاً للمِكروبات Antimicrobial effect [1] [4] [5]، مما دفعنا إلى اختيار النبات السابق في الدراسة.

إن الهدف من هذه الدراسة هو تحري الفاعلية المثبطة لنمو فطر المبيضات البيض *Candida albicans* (أحد أهم الفطريات الانتهازية) للزيت العطري المستخلص من قشور ثمار النارنج *Citrus aurantium* الذي ينمو في سوريا، حيث تم التحري بطريقة التمديد بالآغار Agar dilution test. كما تمّت دراسة تأثير الليمونين Limonene (المركب الأساسي الذي يدخل في تركيب الزيت العطري) المثبط لنمو فطر المبيضات البيض. وكذلك قمنا بدراسة تغير مردود وتركيب الزيت العطري لقشور ثمار النارنج خلال ثلاثة أشهر من فترة النضج وذلك تبعاً لتغيرات المناخ.

تتألف الدراسة من قسمين:

1- الدراسة النظرية: تتضمن لمحة عن الزيوت العطرية وتركيبها، ونبات النارنج والدراسات الحديثة المتعلقة به، ولمحة عامة عن الفطريات، وفطر المبيضات البيض المستخدم في الدراسة.

2- الدراسة العملية: تتضمن المواد والطرائق المستخدمة في البحث، والنتائج والمناقشة، وأخيراً الاستنتاجات والمقترحات والتوصيات.

الدراسة النظرية

Theoretical Study

2 المستقلبات الأولية والثانوية Primary and secondary metabolites

تُنتِج جميع النباتات مواد أساسية تُمكِّنها من الحياة والنمو والتكاثر، كما تقدِّم لها الطاقة اللازمة للقيام بالعمليات الحيوية تدعى هذه المواد المستقلَبات الأولية، بينما تُنتج بعض النباتات مواد أخرى تدعى المستقلَبات الثانوية [6 7].

2.1 المستقلَبات الأولية Primary metabolites

مواد يتم إنتاجها من قبل جميع النباتات وهي أساسية لحياة النبات ونموه وتكاثره.

تتضمن هذه المستقلبات:

- السكريات Carbohydrates.
- البروتينات Proteins.
- الدسم Fats.
- الحموض النووية Nucleic Acids [6 7].

2.2 المستقلَبات الثانوية Secondary metabolites

مواد يتم إنتاجها من قبل بعض النباتات وهي ليست ضرورية لنمو النبات وتكاثره، ولا تُنتَج بالضرورة في جميع الظروف.

وعلى الرغم من أنّ معظم هذه المستقلبات لاتزال مجهولة الوظيفة، إلا أنّ بعضها يلعب دوراً أساسياً في تكيف النبات مع بيئته، حيث يكون لها وظيفة دفاعية للنبات ضد الفطريات، والحشرات، والحيوانات العاشبة، أو قد تكون عطور أو مواد ملوَّنة جاذبة لعوامل التلقيح (الحشرات).

تتضمن هذه المستقلبات:

- القلويدات Alkaloids.
- المركبات الفينولية Phenolic compounds.
- التربينات Terpenes.

تندرج الزيوت العطرية وأغلب المواد الفعالة المستخلصة من النباتات ضمن المستقلبات الثانوية [6 7].

3 الزيوت العطرية Essential oils

3.1 لمحة عن الزيوت العطرية

عُرِفت الزيوت العطرية منذ القدم بتأثيراتها المضادة للجراثيم والفطريات والفيروسات [2]، كما عُرِفت بتأثيراتها المضادة للملاريا والمضادة للسرطان[8].

وهي مركبات طبيعية ذات تركيب معقد تتميّز برائحتها العطرية القوية، تنتجها النباتات العطرية كمستقلبات ثانوية Secondary metabolites [9]، معظمها سائلة في درجة حرارة الغرفة وبعضها صلبة أو راتنجية [2].

من الممكن أن يتم اصطناع الزيوت العطرية من قبل جميع أجزاء النبات: (البراعم، والأزهار، والأوراق، والسوق، والأغصان، والبذور، والثمار، والجذور، والخشب أو اللحاء)، ويتم تخزينها في الخلايا الإفرازية Secretory cells، والأجواف Cavities، والقنوات Canals، والخلايا البشروية Epidermic cells، والشعيرات الغدية Glandular trichomes [2 9].

تلعب الزيوت العطرية دوراً مهماً في حماية النباتات (بوصفها مضادات جرثومية وفيروسية وفطرية ومبيدات حشرية)، كما تحمي النبات من الحيوانات العاشبة عن طريق إنقاص شهية الحيوانات العاشبة لهذه النباتات. كما أنها قد تجذب بعض الحشرات لبعثرة غبار الطلع والبذور بينما تمنع الحشرات غير المرغوب بها من الاقتراب [9].

تشترك الزيوت العطرية بكونها مواد طيارة بدرجة حرارة الجو، وهذا ما يميّزها عن الزيوت الثابتة، لها قرينة انكسار ومعظمها يحرف الضوء المستقطب (فعالة ضوئياً)، منحلة في معظم المحلات العضوية والدسمة، تنجرف ببخار الماء وهذا ما يسبب رائحتها العطرية. كما أن وزنها الجزيئي منخفض[2].

تجري حالياً أبحاث مكثّفة حول العالم لدراسة فاعلية الزيوت العطرية والتربينات المكونة لها، وذلك نظراً لسميتها المنخفضة نسبياً وتوافرها الحيوي المرتفع، مما يعزز فائدتها في كل من المجال الطبي والغذائي (يمكن استخدامها كمواد حافظة للأغذية) [8].

3.2 التركيب الكيميائي للزيوت العطرية

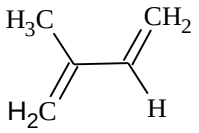
إن الزيوت العطرية مركبات طبيعية معقدة، حيث من الممكن أن يدخل في تركيبها حوالي 20-60 مركب ذي وزن جزيئي منخفض بتراكيز مختلفة تماماً. وهي تتميز بوجود مركبين أو ثلاثة مركبات

رئيسية تتواجد بتراكيز عالية نسبياً (20-70%) بالمقارنة مع المكونات الأخرى الموجودة بكميات قليلة. وبشكل عام فإن هذه المركبات الرئيسية هي التي تحدد الخصائص البيولوجية للزيوت العطرية.

تتضمن المركبات التي تدخل في تركيب الزيوت العطرية مجموعتين مختلفتين من حيث المنشأ (الاصطناع الحيوي). المجموعة الرئيسية هي التربينات، بينما تضم المجموعة الأخرى المركبات العطرية [9].

3.2.1 التربينات Terpenes

إنّ الوحدة الأساسية المكونة للتربينات هي مجموعة الايزوبرين Isoprene لذلك تدعى أيضاً الايزوبرينوئيدات Isoprenoid [8]، ومجموعة الايزوبرين هي أساس كربوني مؤلف من 5 ذرات كربون (C5). الشكل (**1**).



الشكل (1) الصيغة العامة للايزوبرين

تختلف المركبات التربينية من حيث عدد ذرات الكربون ووجود متبادلات. إلا أن الزيوت العطرية تحوي فقط على التربينات الأكثر تطايراً والتي يكون وزنها الجزيئي منخفض وتشمل:

- **أحاديات التربين** Monoterpenes (C10)**:** تشكل 90% من الزيوت العطرية .

تملك هذه المركبات صيغ متنوعة، يمكن أن تكون سلسلية مثل ترانس بيتا أوسمين *trans*-β-ocimene، أوحلقية مثل الليمونين limonene والبيتابينين β-pinene. وقد تحوي متبادلات مختلفة مثل الليناليول Linalool (غول تربيني) وخلات الليناليل linallyl acetate (استر تربيني). الشكل (**2**).

- **أحاديات ونصف التربين** Sesquiterpenes (C15): تملك أحاديات ونصف التربين الموجودة في الزيوت العطرية صيغ ووظائف مشابهة لأحاديات التربين مثل الفارنيزول Farnesol. الشكل (**2**).

قد تحتوي الزيوت الطيارة مركبات تربينية أخرى (لكن بنسب قليلة) تشمل:

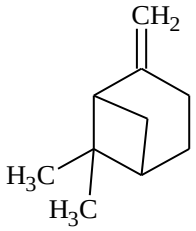
- نصف التربينات Hemiterpenes (C5)
- ثنائيات التربين Diterpenes (C20)
- ثلاثيات التربين Triterpenes (C30)

- التربينات الرباعية [9](C40) Tetraterpenes.

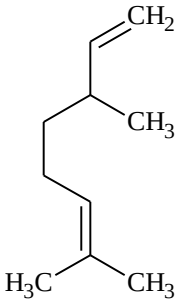
3.2.2 المركبات العطرية Aromatic compounds

تشتق من الفينيل بروبان phenylpropane، وتتواجد بشكل أقل من التربينات. مثل: الأنيتول Anethole، وألدهيد القرفة Cinnamaldehyde [9]. الشكل (**2**).

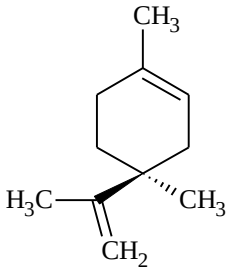
أحاديات التربين



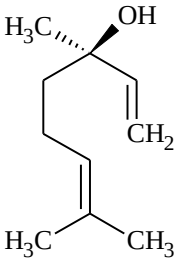
بيتا بينين



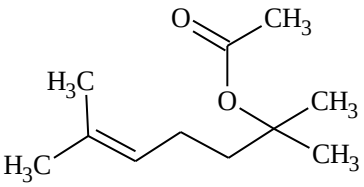
ترانس بيتا أوسمين



الليمونين

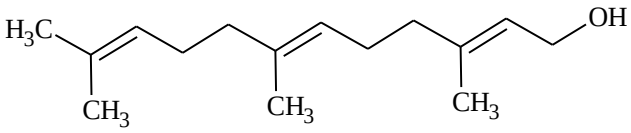


اللينالول



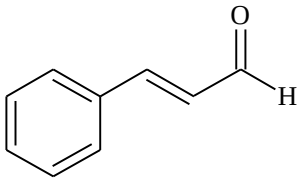
خلات اللينالیل

أحاديات ونصف التربين

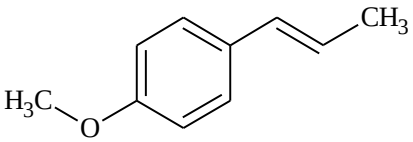


فارنيزول

المركبات العطرية



ألدهيد القرفة



الأنيتول

الشكل (2) صيغ بعض المركبات الموجودة في الزيوت الطيارة.

4 نبات البحث النارنج *Citrus aurantium*

4.1 مقدمة تاريخية

إنّ منشأ الحمضيات بشكل عام جنوب شرق آسيا [10]، ولقد انتشرت أشجار النارنج بداية في الهند وبلاد فارس، ثمّ تم إحضارها من شمال الهند إلى شرق إفريقيا وبلاد العرب وسوريا، وانتقلت إلى أوروبا خلال القرن الثاني عشر إما عن طريق العرب أو الصليبين [11]. كما ازدهرت زراعة النارنج بشكل كبير في مدينة إشبيليا الإسبانية حتى أطلق عليه اسم «برتقال إشبيليا»، حيث استخدم الأندلسيون أزهار هذه الشجرة في صناعة العطور.

وصف بعض العلماء نبات النارنج حيث قال عنه ابن البيطار في كتابه "الجامع لمفردات الأدوية والأغذية": (نارنج: شجرة ورقها أملس، لين، شديد الخضرة، ووردها أبيض طيب الرائحة، والنارنج ينفع من التهاب المعدة، ويقلع الطبوع والآثار السود من الثياب البيض ويزيلها، وإذا نقعت فيه الحجارة حللها).

كما قال عنه الأنطاكي في كتابه "تذكرة أولي الألباب": (نارنج : فارسي معناه أحمر اللون، وهو شجر ورقه بالنسبة إلى الليمون وغيره فيه ملاسة طيب الرائحة، زهره يحصل في الربيع ويمكن بقاء ثمرته مدة العام، وأجوده المستدير الأحمر المحبب القشر الخفيف، قشره يسكِّن المغص والقيء والغثيان والنزلات الباردة والتخَم. ومن خواصه أنه يحفظ الثياب من السوس، وأن رائحته تدفع الطاعون وفساد الهواء، وأنه يسهل الولادة)[88].

4.2 تصنيف النبات

لا تختلف شجرة النارنج Bitter Orange بالخصائص النباتية عن شجرة البرتقال Sweet Orange حيث ينتمي كلاهما لنفس الجنس وهما من نفس النوع وهو: *Citrus aurantium* L. من الفصيلة السذابية Rutaceae، ويختلفان تصنيفياً على مستوى الصنف فقط، حيث يسمى البرتقال الحلو *Citrus aurantium* var. *sinensis*L.، بينما يسمى النارنج الحقيقي *Citrus aurantium* L. var. *amara* [11]. الجدول (**1**).

هناك العيد من المرادفات للنارنج (*Citrus aurantium*) منها:

- البرتقال المر Bitter orange، البرتقال الأخضر Green Orange، البرتقال الإشبيلي Seville Orange، البرتقال الحامض Sour Orange [10 12].

الجدول (1) : تصنيف نبات النارنج *Citrus aurantium* [89]

المملكة	النباتية	Plantae
تحت المملكة	النباتات الوعائية	Tracheobionta
فوق الشعبة	النباتات البذرية	Spermatophyta
الشعبة	النباتات الزهرية	Magnoliophyta
الصف	ثنائيات الفلقة	Magnoliopsida
تحت الصف	الورديات	Rosidae
الرتبة	الصابونيات	Sapindales
الفصيلة	السذابية	Rutaceae
الجنس	الحمضيات	*Citrus*
النوع	النارنج	*Citrus aurantium*
الأصناف	الحقيقي	*Citrus aurantium* var*. amara* L.
	البرجموت	*Citrus aurantium* var*. bergamia* L.
	صغير الحجم	*Citrus aurantium*var*. Myrtifolia* L.

4.3 استخدامات نبات النارنج الشائعة

إنّ لفاكهة النارنج طعم حامض جداً، ومع ذلك فهي إحدى الفواكه الشائعة في بعض البلدان (مثل إيران)، كما أنها تؤكل مع الملح والفلفل الحار في المكسيك.

لقشور الثمار طعم مميز مرغوب وهي تستخدم في صناعة المربيات، حيث يعتبر هذا الاستخدام للقشور الأكثر انتشاراً. كما تستخدم القشور في العديد من المشروبات الكحولية، حيث تجفف ويتم إضافتها للبيرة البلجيكية التي تعرف باسم Orange Muscat، أما الزيت العطري فقد شاع استخدامه في العطور ومستحضرات التجميل وكمادة منكهة flavoring agent في الحلويات [10] [13].

يستخدم نبات النارنج بشكل أساسي للأغراض الطبية في الصين واليابان وكوريا، حيث تستخدم الفاكهة الكاملة غير الناضجة لمعالجة الاضطرابات الهضمية ولتحفيز إفراز الحمض المعدي وزيادة الشهية.

تستخدم خلاصة الثمار في الطب الشعبي لمعالجة: (اضطرابات الجهاز المعدي المعوي، والأمراض الفطرية الجلدية، وفقر الدم، والضعف العام، ونزيف شبكية العين، وقرحة الاثني عشري، وهبوط الرحم). أما استخدامه الطبي الأكثر شيوعاً في العالم فهو معالجة البدانة [10].

4.4 شجرة النارنج

4.4.1 الوصف المورفولوجي

شجرة دائمة الخضرة، متوسطة الحجم، ذات قمة مستديرة متكاثفة. يتراوح ارتفاع الشجرة من 3-10 متر.

الأوراق بسيطة، تتميز بوجود انتفاخ بين نصل الورقة والعنق، بيضوية بشكل عام، ذات نهاية مستدقة، حوافها خفيفة التسنن، السطح العلوي للورقة أخضر داكن لامع بينما يكون السطح السفلي شاحب، يتراوح طولها بين 7.5-10 سم [14].

الزهرة خنثى قد يصل قطرها إلى 25 ملم، بيضاء أو بيضاء مصفرّة، شمعية، ذات رائحة عطرية مميزة. تتوضع الأزهار إما منفردة أو مجتمعة بشكل عناقيد، ويتألف التويج من 5 بتلات سميكة مستطيلة ومقعرة، بينما يتألف الكأس من 5 سبلات. كما تحتوي الأزهار على 20 سداة على الأقل ذات مآبر صفراء وخيوط متصلة بقاعدة الزهرة على شكل مجموعات (4-5 مجموعات)[14 15 16]. الشكل (**3**).

الشكل (3) نبات النارنج

الثمرة كروية الشكل أو مسطحة تقريباً من الطرفين، يتراوح قطرها حوالي 7.5 سم، القشور سميكة وخشنة، ويكون لونها برتقالي عند النضج [14].

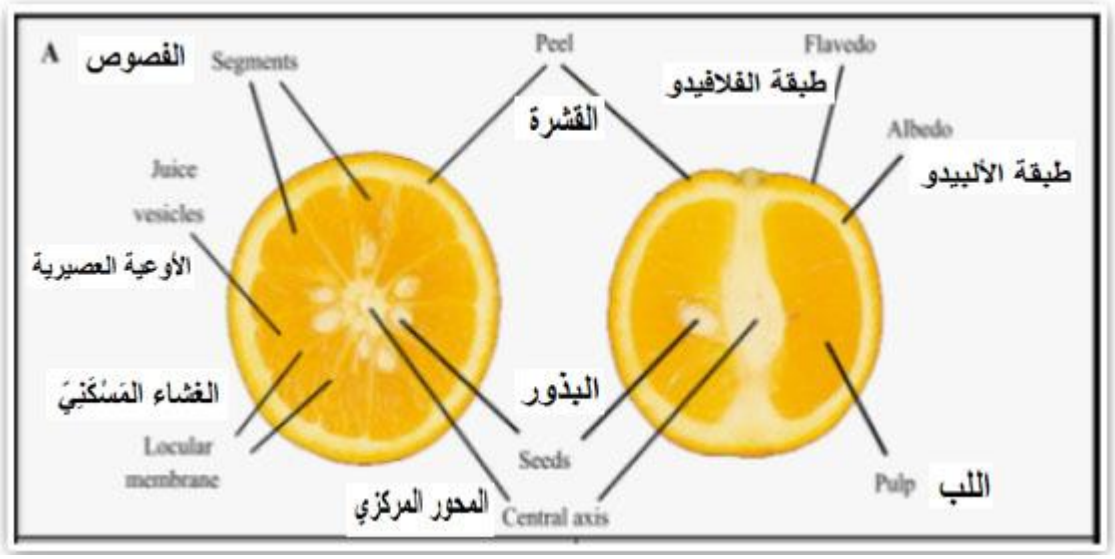
تتألف القشور من قسمين: الشكل (**4**).

- ايبيكارب epicarp أو فلافيدوflavedo: هي الطبقة السطحية الملونة للقشور، تحتوي على الغدد الزيتية والأصبغة، ومن هذه الطبقة يتم استخلاص الزيوت العطرية.
- ميزوكارب mesocarp أو ألبيدوalbedo: هي الطبقة الوسطى البيضاء، وهي عبارة عن نسيج اسفنجي القوام يحتوي في تركيبه على نسبة عالية من السيللوز والبكتين، وقد أثبتت الدراسات الحديثة أنّ هذه الطبقة غنية بالفينولات والفلافونوئيدات ولذلك فإنّ لها تأثيراً مضاداً للأكسدة [17 18].

لب الثمرة ذو طعم حمضي، ويحتوي على نسبة عالية من الماء (حوالي 85-90%) وعلى الكثير من الحزم الوعائية [14 19].

4.4.2 القسم المستعمل

الأقسام النباتية المستعملة طبياً من نبات النارنج هي الأزهار، والأوراق، وخلاصة القشور، وخلاصة الثمار [14].



الشكل (4) البنية الداخلية لثمار الحمضيات الناضجة [19].

4.5 التركيب الكيميائي

يحتوي نبات النارنج على مركبات تنتمي إلى مجموعات كيميائية مختلفة. تشمل هذه المركبات الزيت العطري والحموض الفينولية والمركبات الفلافونوئيدية المختلفة، والمركبات القلويدية.

4.5.1 الزيت العطري Essential oil

تحتوي كل من قشور الثمار والأوراق والأزهار على الزيت العطري بنسب متفاوتة. حيث تحوي القشور أعلى نسبة (0.5-2.5%) (مل/100 غ قشور) [11] [15] [20]، بينما لا تتجاوز نسبته 0.5% في بقية الأعضاء. الجدول (**2**).

أما فيما يتعلق بالتركيب الكيميائي، فالمركب الرئيسي في القشور هو الليمونين limonene، فقد تصل نسبته إلى 94%. بينما يكون اللينالول linalool هو المركب الرئيسي في الأوراق و الأزهار. كما يختلف تركيب الزيت العطري بين الأوراق الفتية و الهرمة. الجدول (**2**).

يدعى الزيت العطري المستخلص من الأزهار زيت النيرولي Neroli oil، بينما يدعى الزيت العطري المستخلص من أوراق النارنج الفتية والهرمة petitgrain oils [15].

الجدول (2) نسبة وتركيب الزيت العطري لكل من قشور وأزهار النارنج والأوراق الفتية والهرمة [15].

اسم المركب	التركيز % (مل/100 مل زيت عطري)			
	الأزهار	القشور	الأوراق الفتية	الأوراق الهرمة
ألفا بينين α-Pinene	1.35 ± 0.01	0.02 ± 0.53	0.19 ± 0.00	-
سابينين Sabinene	2.01 ± 0.20	0.18 ± 0.01	0.37 ± 0.00	0.22 ± 0.03
بيتا بينين β-Pinene	19.08 ± 0.18	0.62 ± 0.04	3.58 ± 0.01	1.90 ± 0.31
ميرسين Myrcene	1.59 ± 0.01	2.00 ± 0.04	1.63 ± 0.06	2.74 ± 0.32
ليمونين Limonene	12.04 ± 0.16	**94.67 ± 0.01**	0.53 ± 0.01	0.77 ± 0.09
ترانس بيتا أوسيمين *trans*-β-Ocimene	6.06 ± 0.01	-	4.08 ± 0.05	3.11 ± 0.21
لينالول Linalool	**29.14 ± 0.38**	0.76 ± 0.04	**58.21 ± 0.37**	**36.03 ± 0.60**
نيرول Nerol	0.83 ± 0.02	-	1.45 ± 0.02	2.89 ± 0.06
خلات اللينالیل Linalyl acetate	3.88 ± 0.40	0.18 ± 0.03	12.42 ± 0.13	23.00 ± 1.42
خلات الجيرانيل Geranyl acetate	2.59 ± 0.04	-	4.49 ± 0.11	8.70 ± 0.37
ألفا هومولين α-Humulene	-	-	0.10 ± 0.00	-
النسبة المئوية للزيت العطري (مل/100غ من القسم النباتي)	**0.12 ± 0.01**	**1.67 ± 0.07**	**0.27 ± 0.01**	**0.45 ± 0.02**

4.5.2 الحموض الفينولية Phenolic acids

يحتوي نبات النارنج على مركبات فينولية بسيطة كحمض الغاليك gallic acid، وبيروغالول pyrogallol، وحمض السيرنجيك syringic acid، وحمض الكافيئيك caffeic acid [21]. الشكل (**5**). حيث بينت الدراسات أن الأوراق تحتوي على أعلى نسبة من الفينولات (0.49 ± 44.41) ملغ /غ من الوزن الجاف (مكافئ لحمض الغاليك gallic acid)، تليها قشور الثمار التي تتراوح نسبة الفينولات الكلية فيها (0.88 ± 31.62) ملغ/غ من الوزن الجاف (مكافئ لحمض الغاليك gallic acid)[22]. بينما لا تتجاوز نسبة الحموض الفينولية الموجودة في أزهار النارنج في الخلاصة

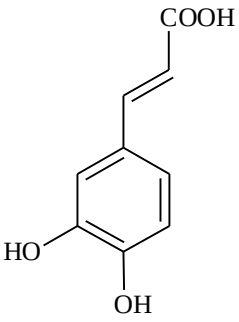
الميتانولية (0.05 ± 4.8) ملغ /غ من الوزن الجاف (مكافئ لحمض الغاليك gallic acid) [21]. أما في عصير النارنج فقد قدرت نسبة الفينولات الكلية (2.4 ± 56.9) ملغ /100 مل عصير[23].

4.5.3 المركبات الفلافونوئيدية Flavonoid compounds

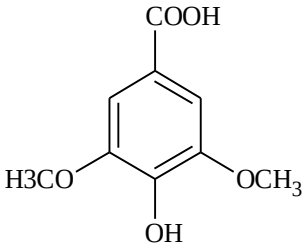
تحتوي أيضاً أوراق وأزهار وثمار نبات النارنج على فلافونوئيدات بنسب متفاوتة (روتين rutin، كيرسيتين quercetin ، نارنجين naringin [21]، 5-هيدوركسي-4َ،3َ،7،6- رباعي ميتوكسي فلافون 5-Hydroxy-6,7,3',4'tetramethoxyflavone (HTF) [24]، نوبيليتين Nobiletin، هيسبيريدين Hesperidin [20]). الشكل (**5**). كما تتفاوت أيضاً نسب الفلافونوئيدات حسب نوع الخلاصة. الجدول (**3**).

الجدول (3) نسبة الفلافونوئيدات الاجمالية في نبات النارنج

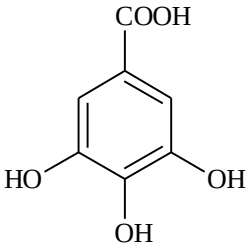
القسم المستعمل من النبات	نسبة الفلافونوئيدات الاجمالية
الأوراق	(0.07 ± 3.25) ملغ/غ من الوزن الجاف (مكافئ للكيرسيتين) [22].
الأزهار (خلاصة ميتانولية)	(0.05 ± 4.1) ملغ / غ من الوزن الجاف (مكافئ للروتين rutin)[21]
الأزهار (خلاصة إيتانولية)	(0.05 ± 3.83) ملغ/غ من الوزن الجاف (مكافئ للروتين rutin) [21]
الأزهار (خلاصة مائية)	(0.01 ± 1.88) ملغ/غ من الوزن الجاف (مكافئ للروتين rutin) [21]
قشور الثمار	(0.01 ± 1.17) ملغ /غ من الوزن الجاف مكافئ للكيرسيتين Quercetin [14] [22]
الثمار	0.8±7.7 (ملغ /100 مل)[23]



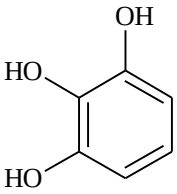
حمض الكافيئيك



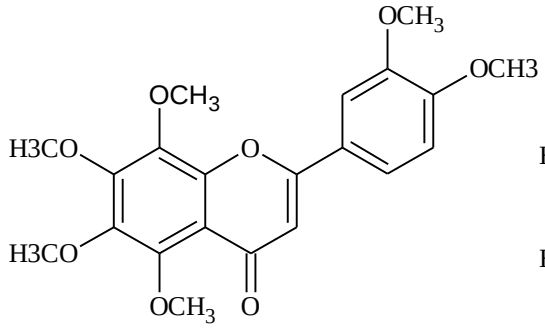
حمض السيرنجيك



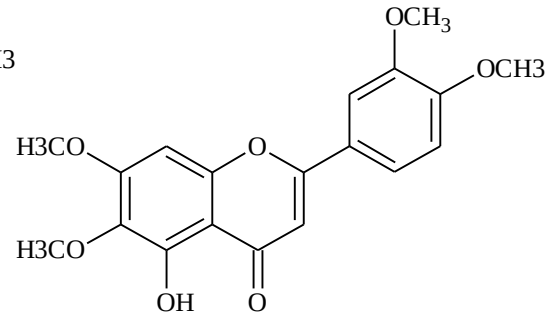
حمض الغاليك



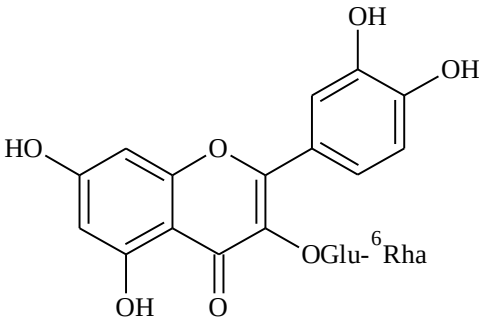
البيروغالول



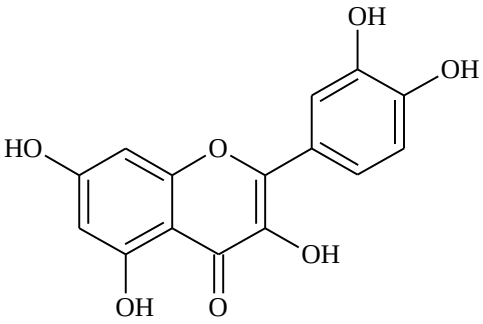
نوبيليتين



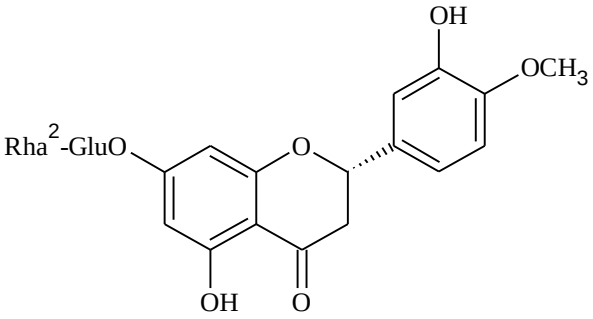
HTF



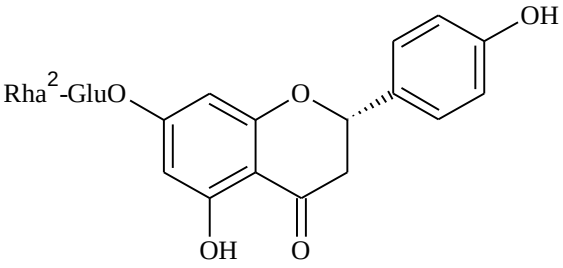
روتين



كيرستين



هيسبيريدين



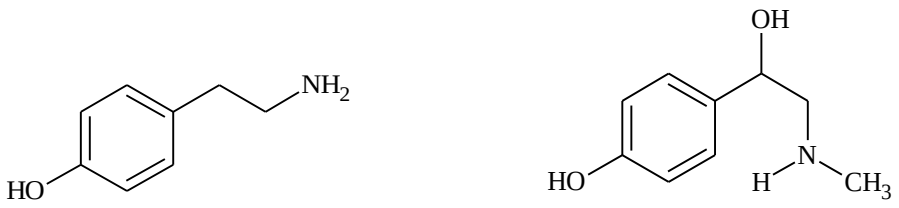
نارنجين

الشكل (5) صيغ بعض الحموض الفينولية والمركبات الفلافونوئيدية الموجودة في نبات النارنج.

4.5.4 القلويدات Alkaloids

تحتوي الثمار بشكل أساسي على القلويدات، وهي قلويد بارا سينفرين *p*-Synephrine وقلويد التيرامين Tyramine [23]. الشكل (**6**). لهذه القلويدات خواص أدرينرجية، فهي مشابهة في تركيبها الكيميائي للأَدْرِنالين adrenalin والنُورْأَدْرِنالين noradrenalin. ولذلك تستخدم كمضادات احتقان أنفية nasal decongestants. كما أصبح من الشائع استخدام خلاصة ثمار النارنج كمتمم غذائي خافض للوزن، حيث تسبب انخفاضاً في الوزن بسبب التأثير على مستقبلات ألفا وبيتا الأدرينرجية، والتي تؤدي إلى إنقاص حركة المعدة وبالتالي إنقاص الشعور بالجوع، كما أن قلويد السينفرين يزيد من استقلاب الشحوم عبر تحفيز مستقبلات بيتا الأدرينرجية [25 26].

هناك الكثير من الجدل حول سلامة استخدام خلاصة ثمار النارنج نظراً لاحتوائها على قلويد السينفرين المشابه جداً في تركيبه للفينيل إيفرين phenylephrine والإيفيدرين ephedrine، وبالتالي ما يرافقه من تأثيرات جانبية مثل تسرع القلب tachycardia وارتفاع الضغط hypertension [27 28].



بارا سينفرين *p*-synephrine **تيرامين tyramine**

الشكل (6) صيغ القلويدات الموجودة في ثمار النارنج.

4.6 الدراسات الحديثة

أثبتت الدراسات الحديثة التي تم إجراؤها على أعضاء مختلفة من نبات النارنج أنها تمتلك تأثيرات بيولوجية مختلفة منها:

4.6.1 التأثير المضاد للمِكروبات Antimicrobial effect

أظهر الزيت العطري المستخلص من أوراق وأزهار وقشور النارنج تأثيراً متفاوتاً على سلالات جرثومية مختلفة.

حيث أظهر الزيت العطري المستخلص من الأزهار تأثيراً مضاداً لبكتريا المَلْوِيَّة البَوَّابية *Helicobacter Pylori* المسببة للقرحة المعدية gastric ulcer (بقطر تثبيط يتراوح بين 1.2-1.6 سم)[29]. كما أظهر هذا الزيت العطري أكبر نسبة تأثير على الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aerugenosa* (بقطر تثبيط 1.9 سم)، بينما لم يكن له أي تأثير على المكورات العنقودية الذهبية *Staphlococcus aureus* [13]، بعكس الزيت العطري المستخلص من الأوراق الذي أظهر أكبر نسبة تأثير على المكورات العنقودية الذهبية (تراوح قطر التثبيط بين 3-4 سم)[30].

أما الزيت العطري المستخلص من قشور النارنج، فقد أظهر تأثيراً على جراثيم مختلفة منها العصوية الرقيقة *Bacillus subtilis* والمكيّرة الفلافية *Micrococcus flavus* (بقطر تثبيط 1.8، 1.9 سم على التوالي)[1]، بينما أظهرت الخلاصة الميتانولية للقشور طيف تأثير واسع على عدد كبير من الجراثيم منها: الإِشْرِيكِيَّةُ القولونِيَّة *Escherichia coli* (قطر التثبيط 1.8 سم) والعُنْقودِيَّةُ الذَّهَبِيَّة *Staphylococcus aureus* (قطر التثبيط 1.9 سم) والزائفة الزنجارية *Pseudomonas aerugenosa* [4] (قطر التثبيط 2.1 سم).
كما أظهرت خلاصة ثمار النارنج تأثيراً مضادّاً لجراثيم الإِشْرِيكِيَّةُ القولونِيَّة *Escherichia coli* (بقطر تثبيط 1.2 سم) والعُنْقودِيَّةُ الذَّهَبِيَّة *Staphylococcus aureus* (بقطر تثبيط 2.7 سم) [5].

4.6.2 التأثير المضاد الفطريات Antifungal effect

أظهر الزيت العطري المستخلص من الأزهار تأثيراً مثبطاً لنمو فطر المبيضات البيض *Candida albicans* (قطر التثبيط 2.2 سم) يقارب تأثير النستاتين (قطر التثبيط للنستاتين 2.5 سم)، بينما أعطى زيت الأزهار تأثيراً يفوق تأثير المعياري المستخدم على أنواع أخرى من الفطريات مثل الرشاشية المتطفلة *Aspergillus parasiticus* ، و المغزلاوية *Fusarium culmorum* [13].

أما الزيت العطري المستخلص من الأوراق فقد أظهر تأثيراً مثبطاً لنمو فطرالمبيضات البيض يفوق تأثير المعياري (تراوح قطر التثبيط 3.5-5 سم حسب الفصل الذي تم فيه جني العينة، بينما كان قطر التثبيط للنستاتين 3 سم) [30]. وأخيراً فقد أظهر الزيت العطري المستخلص من القشور طيف تأثير واسع ضد فطري الرشاشية السوداء *Aspergillus niger* والمبيضات التَّيرَبِيَّة *Geotrichum candidum* [31].

4.6.3 التأثير المضاد للأكسدة Antioxidant effect

أظهرت الدراسات أن للزيت العطري المستخلص من أوراق وأزهار وقشور النارنج (وخاصة الأوراق الهرمة) تأثيراً مضاداً للأكسدة [15]، كما أظهرت دراسة أخرى أن للفلافونوئيدات والحموض الفينولية المستخلصة من القشور تأثيراً مضاداً للأكسدة يفوق تأثير الزيت العطري [22].

4.6.4 التأثير السمي للخلايا السرطانية Cytotoxic effect

تمت دراسة السمية الخلوية على خطوط خلوية سرطانية متعددة في الزجاج لكل من الزيت العطري المستخلص من الأوراق والقشور، وكذلك الخلاصة الميتانولية للأزهار، والمركبات الفلافونوئيدية المعزولة من قشور الثمار.

أظهر الزيت العطري المستخلص من الأوراق تأثيراً سمياً على الخطوط الخلوية السرطانية لابيضاض اللمفاويات التائية Jurkat (Adult T cell leukemia) وابيضاض السلائف النقوية Human promyelocytic leukemia (HL60) [32]، بينما أظهر زيت القشور تأثيراً في إنقاص عيوشية خلايا سرطان القولون والمستقيم colorectal carcinoma [20]، وكذلك أظهرت الخلاصة الميتانولية للأزهار تأثيراً على سرطان القولون [21].

أظهرت الفلافونوئيدات المعزولة من قشور ثمار النارنج تأثيراً مضادّاً لسرطان الرئة غير صغير الخلايا non-small-cell lung cancer [33].

4.6.5 التأثير الحال للقلق Anxiolytic effect

أظهر كلٌّ من الزيت العطري للأزهار والقشور تأثيراً حالّاً للقلق، حيث أظهر الزيت العطري المستخلص من الأزهار تأثيراً في تخفيف القلق الذي يسبق العمليات الجراحية Preoperative Anxiety بالمقارنة مع الغفل placebo [34]، بينما اقترحت دراسات أخرى إمكانية استخدام الزيت العطري المستخلص من القشور كعلاج مساعد في حالات اضطرابات القلق anxiety disorders [35] أو في حالات الاكتئاب depression [36].

4.6.6 التأثير المضاد للالتهاب Anti-inflammatory effect

أظهرت كلٌّ من الفلافونوئيدات التي تم عزلها من قشور النارنج والخلاصة الميتانولية للأزهار تأثيراً مضاداً للالتهاب [21 37].

4.6.7 التأثير على مرض النقرس gout

أظهرت كلٌّ من خلاصة قشور وأوراق النارنج الايتانولية تأثيراً مثبطاً للاكزانتين أوكسيداز xanthine oxidase inhibitors، حيث يساعد تثبيط الأنزيم السابق على منع أو إبطاء تطور مرض النقرس والاضطرابات المرافقة له [38].

4.6.8 التأثير المضاد للتشنج Antispasmodic effect

أظهرت الخلاصة المائية لأزهار النارنج تأثيراً مضاداً لتشنج عضلة الرحم عند الجرذان، ويعتقد أن ذلك عبر حصر تدفق الكالسيوم في الخلايا [39].

4.6.9 التأثير في حماية المعدة من القرحات Gastroprotection effect

أظهر الزيت العطري المستخلص من قشور النارنج تأثيراً في حماية المعدة ضد القرحات المحدثة بمضادات الالتهاب غير الستيروئيدية NSAIDs (non-steroidal anti-inflammatory drugs) [40].

كما أظهرت دراسة أخرى أن لكل من فلافونوئيدات الهيسبيريدين hesperidin والنيوهيسبيريدين neohesperidin المستخلصة من قشور ثمار النارنج تأثيراً مضاداً للقرحات المعدية المحدثة بالاندوميتاسين indomethacin-induced peptic ulcers [41].

4.6.10 التأثير الخافض للكولسترول والخافض لسكر الدم Hypocholesterolemic and Hypoglycemic effect

أظهرت قشور النارنج (الطبقة البيضاء albedo) وخلاصة القشور (لكل من طبقة albedo و flavedo) تأثيراً خافضاً للكولسترول وخافضاً لسكر الدم [42] [43]. وفي دراسة أخرى أظهر فلافونوئيد النيوهيسبيريدين neohesperidin المستخلص من ثمار النارنج تأثيراً خافضاً لسكر الدم، كما أظهر تأثيراً خافضاً للكولسترول الكلي total cholesterol والغليسيريدات الثلاثية triglycerides [44].

4.6.11 التأثير المضاد للاختلاج Anticonvulsant effect

أظهر زيت النيرولي المستخلص من الأزهار تأثيراً مضاداً للاختلاج [45].

5 الفطريات Fungi

5.1 طبيعة الفطريات The nature of fungi

تشكل الفطريات مجموعة واسعة ومتنوعة من العضويات، يوجد معظمها كأحياء رمّية saprophytes في التربة وفي المادة العضوية المتحللة [46].

تمتاز بكونها حقيقيات النَّواة eukaryote تمتلك نواة مميزة، وتختلف عن الجراثيم التي تعتبر من بِدائِيَّاتُ النَّواة prokaryote [46 47].

تمتلك الفطريات جداراً صلباً يتألف بشكل رئيسي من عديدات السكاريد polysaccharides، والكيتين chitin، والبروتينات السكرية. في حين لا تمتلك الحيوانات جداراً خلويّاً، ويُشكِّل الجدار الخلوي السللوزي المكون الرئيسي عند النباتات. كما تعتبر الفطريات غيرية التغذية heterotrophic [46].

5.2 الفطريات بوصفها عوامل ممرضة للإنسان Fungi as human pathogen

يوجد حوالي 100 ألف نوع من الفطريات، يمتلك حوالي 500 نوع منها قدرة اِمراضيّة [46 48]، ويمتاز حوالي 100 نوع منها فقط بقدرتها على إحداث عدوى لدى الأشخاص الكفء مناعيّاً، بينما ترتبط اِمراضيّة الأنواع الأخرى بالأشخاص موهني أو مثبطي المناعة.

معظم الإنتانات البشرية الفطرية يكون سببها فطريات تعيش كأحياء رمية في البيئة وتنتقل إلى الإنسان عبر الطريق التنفسي أو الهضمي أو الجروح. يمكن أن تعيش بعض الفطريات بشكل رمّي عند الإنسان ولاتسبب عداوى إلا عند حدوث خلل في الحالة المناعية للمضيف [46].

يمكن تصنيف العداوى الفطرية إلى ثلاث مجموعات تبعاً لتوضع العدوى:

1- **أمراض فطرية سطحية Superficial mycoses:** تصيب هذه العداوى الطبقات السطحية للجلد والشعر والأظافر، وهي سريعة التشخيص وتستجيب عادة بشكل جيد للمعالجة.
2- **أمراض فطرية تحت جلدية Subcutaneous mycoses:** تصيب الأدمة والأنسجة تحت الجلد، وتحدث هذه العداوى عادة عند المرضى موهني أو مثبطي المناعة.
3- **أمراض فطرية جهازية Systemic mycoses:** تتميز هذه العداوى بأنها عميقة التوضع وتتوضع غالباً في الرئة، ومن الممكن أن تنتشر إلى أي عضو آخر [46].

تقسم الفطريات المسببة لهذه الإنتانات إلى قسمين:
فطريات ممرضة حقيقية true pathogenic fungi، وفطريات انتهازية opportunists fungi.

5.2.1 الفطريات الممرضة الحقيقية

تضم عدداً قليلاً من الفطريات، ينتمي معظمها إلى مجموعة الفطريات ثنائية الشكل dimorphic التي بإمكانها أن تغزو أنسجة المضيف الكفء مناعياً، وتتطور فيها مسببة أمراض عدة مثل داء النوسجات histoplasmosis.

غالباً ما تسبب هذه الفطريات عداوى لاعرضية أو ذات أعراض خفيفة تختفي بعد فترة قصيرة، ويكتسب الشخص المصاب بعد التعافي من هذه العداوى مقاومة طويلة. لكن يمكن أن تتطور الإصابة السابقة إلى مرض مزمن عند عدد قليل من المرضى. تنتشر هذه الأنواع من الفطريات في مناطق جغرافية محدودة [46].

5.2.2 الفطريات الانتهازية

تضم الفطريات الأقل فوعة والتي تستطيع غزو أنسجة المضيفين مثبطي المناعة فقط.
وعلى عكس الفطريات الحقيقية تسبب الفطريات الانتهازية في معظم الحالات عند المرضى السابقين عداوى خطيرة تترافق مع معدلات وفيات مرتفعة [48]. لا يكتسب المريض بعد التعافي من العداوى السابقة أية مقاومة أو حماية، بل من الممكن أن يصاب بها مرة أخرى عندما تنخفض مناعته. وعلى عكس الفطريات الممرضة الحقيقية تكون هذه الفطريات واسعة الانتشار في العالم[46].
من أهم الفطريات الانتهازية أنواع الخمائر التي تنتمي إلى جنس المبيضات *Candida* المسببة لداء المبيضات Candidosis، والأنواع التي تنتمي إلى جنس الرشاشيات *Aspergillus* المسببة لداء الرشاشيات Aspergillosis [46 48].

- **فطريات الرشاشيات *Aspergillus***

يمكن أن يسبب حوالي 20 نوعاً من الرشاشيات عداوى مختلفة لدى الإنسان، حيث تسبب إحدى الأنواع التالية معظم حالات العداوى:

الرَّشَّاشِيَّةُ الصَّفْراء *A. flavus*، الرَّشَّاشِيَّةُ الدَّخْناء *A.fumigatus*، الرَّشَّاشِيَّةُ السَّوداء *A. niger*، الرَّشَّاشِيَّةُ الأَرْضِيَّة *A. terreus*

تتواجد هذه الفطريات - بشكل رمّي - بشكل واسع في الطبيعة.

يترافق تكاثر هذه الفطريات مع إنتاج عدد كبير من الأبواغ التي يمكن أن تدعى أيضاً غبيرات conidia. يمكن أن يتراوح تركيز الغبيرات في الجو من 1- 100 غبيرة في المتر المكعب، ولذلك فهي تستنشق بشكل روتيني من قبل الإنسان، حيث يساعد حجمها الصغير (2-3 مكم) على الوصول إلى الجهاز التنفسي السفلي.

يتم مواجهة الرشاشيات من قبل جهازالمناعة لدى الأشخاص الكفء مناعياً، بينما تسبب العديد من الأمراض لدى موهني أو مثبطي المناعة [48].

- **فطريات المبيضات *Candida*:**

يضم جنس المبيضات حوالي 200 نوع، حيث يسبب 12 نوعاً منها فقط عداوى لدى الإنسان.

تتواجد هذه الأنواع بشكل طبيعي على السطوح الظهارية للفم والقناة المعدية المعوية والمهبل والجلد، وهي عادة غير مؤذية للإنسان الكفء مناعياً، ولكن يمكن أن تنمو وتسبب أمراض خطيرة عند مثبطي المناعة أو الأشخاص الذين يمتلكون مجموعة من العوامل المؤهبة للإصابة.

تشمل العوامل المؤهبة للإصابة بداء المبيضات:

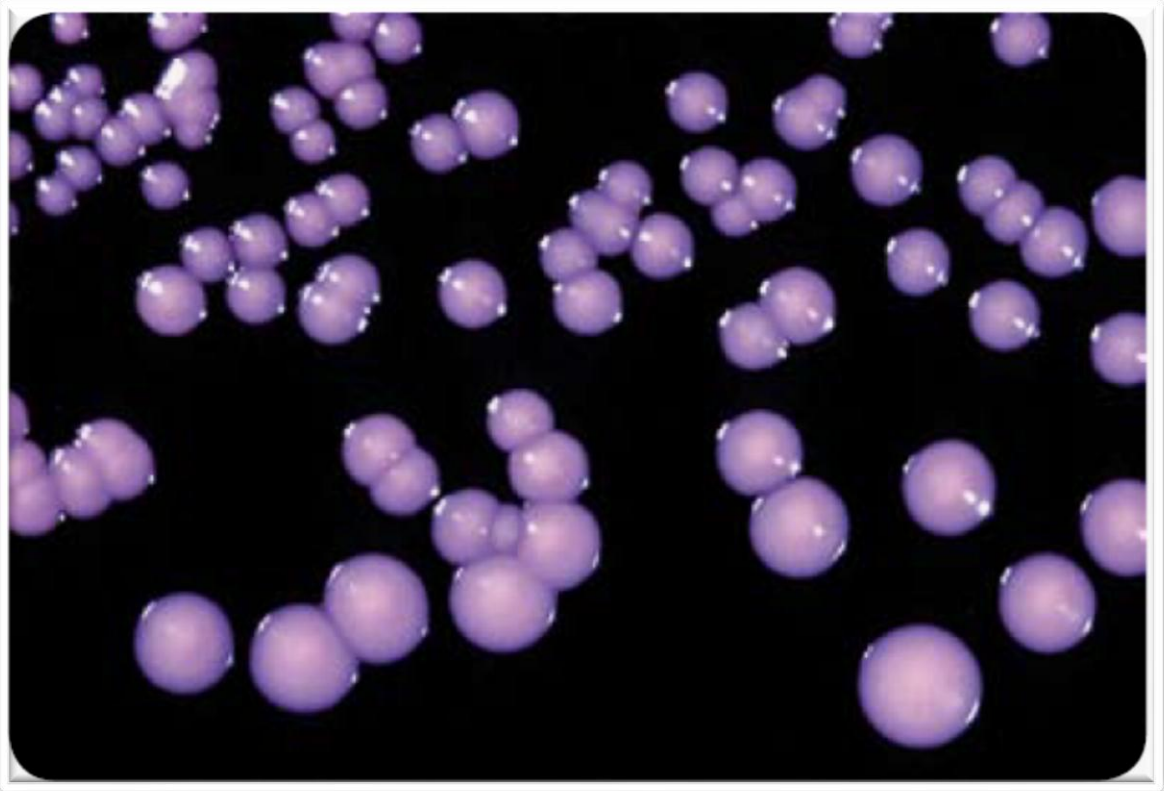
- **التثبيط المناعي immune-suppression:**
  ينجم عن الإصابة بالإيدز، أو المعالجة بمضادات السرطان، أوالمعالجة بالأدوية المثبطة للمناعة (كالأدوية التي تستخدم في حالات زرع الأعضاء).
- **القثطرة catheterization:**
  تسمح بالتماس المباشر بين خلايا الخمائر الموجودة على الجلد والأنسجة والأوعية الدموية.
- **الأطفال والمسنين.**
- **استخدام صادات حيوية واسعة الطيف:** حيث تسبب اختلال توازن الفلورا الطبيعية.
- **الخضوع لعمل جراحي للقناة المعدية المعوية.**

يسبب تكاثر خلايا المبيضات وتغلبها على الاستجابة المناعية الطبيعية عداوى واسعة عند الإنسان. قد تكون هذه العداوى سطحية تصيب الجلد والأغشية المخاطية للتجويف الفموي والمهبل، أوعميقة تصيب أعضاء مختلفة مثل الكلية والكبد والدماغ[48]. يعد نوع المبيضات البيض *Candida albicans* أحد أهم الفطريات الانتهازية ضمن جنس المبيضات[49].

5.3 نوع المبيضات البيض *Candida albicans*

5.3.1 مظهر المستعمرات

تظهر مستعمرات المبيضات البيض على وسط سابورو دكستروز آغار Sabouraud dextrose agar (SDA) بلون أبيض لماع، وسطح ناعم، وقوام شمعي. الشكل (**7**) [50].



الشكل (7) مستعمرات المبيضات البيض على وسط سابورو دكستروز آغار

5.3.2 الأهمية السريرية

تتواجد فطريات المبيضات البيض بشكل طبيعي في الفم والقناة الهضمية لدى 30-50% من الأشخاص، ومعظم الإصابات تكون ذاتية المنشأ [50].

تتراوح العداوى التي تسببها المبيضات البيض بين عداوى جلدية أو مخاطية إلى عداوى جهازية مهددة للحياة يمكن أن تصيب أي عضو، وتكون عادة واسعة الانتشار عند موهني المناعة [51 52].

5.3.3 العوامل المضادة للفطريات المستخدمة في معالجة جنس المبيضات

شهدت العقود الأخيرة ارتفاعاً كبيراً في العداوى الفطرية لدى الإنسان وظهور أنواع جديدة من الفطريات الممرضة، وكان لهذه العداوى أهمية كبيرة نتيجة زيادة حدوثها عند كل من مرضى عوز المناعة المكتسب (الايدز) (AIDS) acquired immunodeficiency syndrome ، والمرضى الذين أجري لهم زرع أعضاء، ومرضى السرطان، والمرضى الآخرين مثبطي المناعة immunocompromised [46 52].

تمتاز الفطريات الانتهازية - بشكل عام - بضعف حساسيتها للأدوية المضادة للفطريات. وقد سجل مؤخراً ارتفاع مقاومة هذه الفطريات للأدوية نتيجة لزيادة العداوى الفطرية، وزيادة استخدام الأدوية المضادة للفطريات، مما دفع العلماء إلى البحث عن المزيد من الأدوية الحديثة [46].

وعلى الرغم من توفر مجموعة من الأدوية المضادة للفطريات المستخدمة في المعالجة السريرية إلا أنّ عدداً قليلاً منها فقط يستخدم لمعالجة العداوى الموضعية أو الجهازية لجنس المبيضات[49].

وتشمل هذه المركبات الدوائية المجموعات التالية:

- **مجموعة الآزول Azoles**

تعتبر مركبات الآزول أكبر مجموعة من مجموعات الأدوية المضادة للفطريات مثل: فلوكونازول Fluconazole، ايتراكونازول Itraconazole، كيتوكونازول Ketoconazole، فوريكونازول Voriconazole بوساكونازول Posaconazole.

آلية عملها:

تثبط أنزيم lanosterol14-α-demethylase، المسؤول عن اصطناع الإرغوستيرول ergosterol (الستيرول الأساسي المكون لغشاء الخلية الفطرية)، مما يؤدي إلى تخريب غشاء الخلية الفطرية وموتها [49 53 54].

❖ **مجموعة الايشينوكاندين Echinocandins**

مثل: كابسوفانغين Caspofungin، ميكافانغين Micafungin، أنيدولافانغين Anidulafungin.

آلية عملها:

هي عبارة عن ببتيدات شحمية تثبط اصطناع الجدار الخلوي للخلية الفطرية نتيجة لتثبيطها لأنزيم (1,3)-β-D-glucan synthase. يؤدي تثبيط هذا الأنزيم إلى تثبيط اصطناع الغلوكان (عديد سكاريد أساسي يدخل في تركيب جدار الخلية الفطرية)، وبالتالي يتشكل جدار خلية فطرية ضعيف البنية مما يؤدي بالنهاية إلى حدوث تحال تناضحي osmotic lysis في الخلية وموتها [49 53].

❖ **مجموعة البولينات Polyenes**

مثل النستاتين Nystatin والأمفوتريسين ب Amphotericin B [49 53 54].

آلية عملها:

ترتبط هذه الأدوية مع الإرغوستيرول وتخربه، مما يؤدي إلى تشكل ثقوب مائية ضمن غشاء الخلية الفطرية، وتغير نفوذية الغشاء. وبالتالي يحدث تسرب للمكونات السيتوبلاسمية وموت الخلية الفطرية [49 53].

❖ **مضاهئات النوكليوزيد :Nucleoside Analogues**

تثبط هذه الأدوية اصطناع الدنا DNA والرنا RNA، يعتبر الفلوسيتوزين Flucytosine مثالاً على هذه الأدوية، وهو مضاهئ للبيريميدين pyrimidine [49]، وبالتالي يحدث تثبيط في اصطناع الدنا والرنا والبروتينات في الخلايا الفطرية [53].

❖ **العوامل الأخرى المضادة للفطريات**

- **الأللیل أمینات Allylamines والتیوکاربامات Thiocarbamates:** مثل التيربينافين terbinafine.

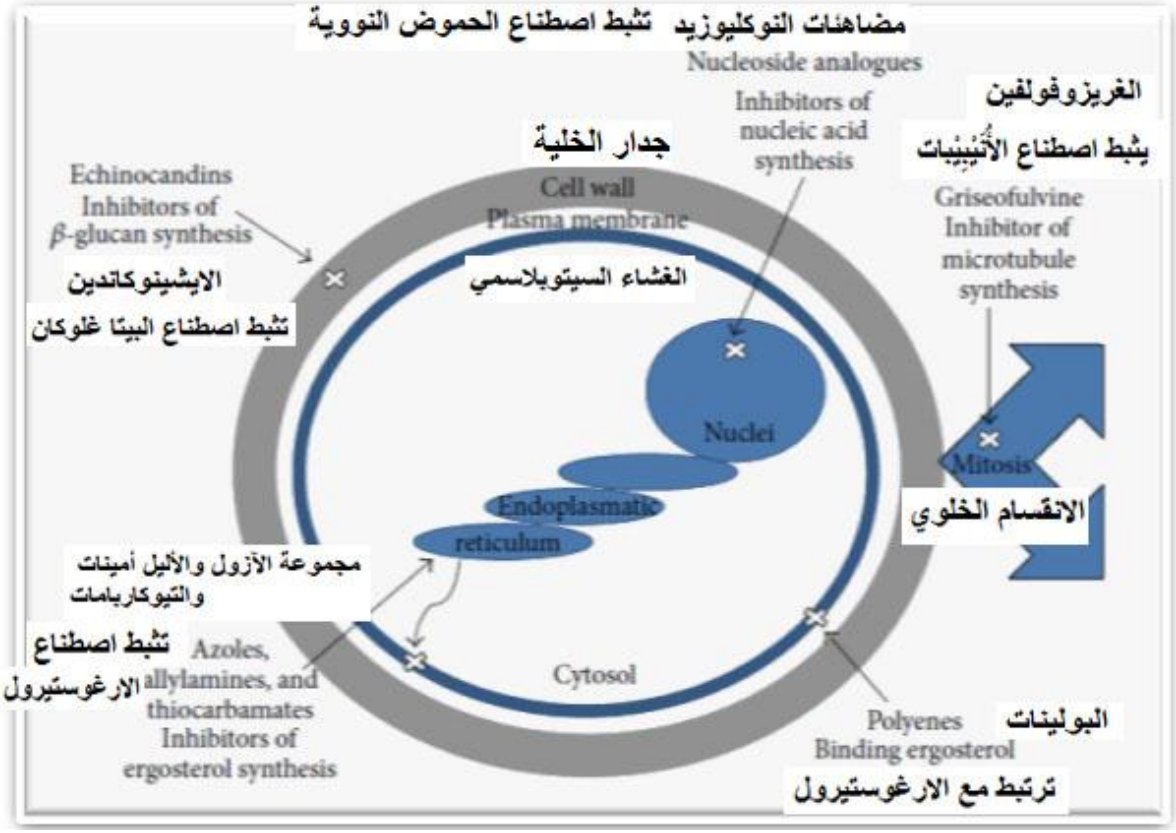
آلية عملها:

تخرب غشاء الخلية نتيجة تثبيطها لأنزيم squalene-epoxidase الهام لاصطناع الإرغوستيرول [49 53].

- **الغريزوفولفين Griseofulvin:**

يثبط تشكيل مغزل الانقسام spindle والأُنَيْبِيْبات السيتوبلازمية cytoplasmic microtubule، وبالتالي يثبط انقسام الفطر.

يوضح الشكل (**8**) العوامل المضادة للفطريات المستخدمة لمعالجة جنس المبيضات وآلية عملها



الشكل (8) العوامل المضادة للفطريات وآلية عملها [49].

تعاني مضادات الفطريات المتوفرة من سميتها، وصعوبة تناولها حيث يعطى العديد منها فقط عبر الوريد، وانخفاض فاعليتها، وتطور مقاومة لها [49 55]، مما يدعو للبحث عن معالجات بديلة ومركبات جديدة مضادة للفطريات [49].

5.4 النباتات كعوامل مضادة للفطريات

تحظى المنتجات الطبيعية باهتمام كبير من بين المصادر المختلفة للأدوية الجديدة المضادة للفطريات، لأنها تقدم فرصاً غير محدودة لعزل مركبات حديثة مضادة للفطريات [55].

أثبتت الدراسات أن عدداً كبيراً من المركبات التي عزلت من نباتات مختلفة تمتلك تأثيراً مضاداً للفطريات. قد يفوق هذا التأثير لبعض المركبات تأثيرالأدوية المستخدمة بوصفها مضادة للفطريات.

نذكر من هذه المركبات:

- **مشتقات الحموض الفينولية Phenolic acid derivatives [55 56 57 58]:**

مثل المركبات الفينولية المستخلصة من زيت عرجون (تفل) الزيتون Olive Pomace [57].

- **الفلافونوئيدات Flavonoids [55 59 60]:**

مثل الفلافونوئيدات المستخلصة من نبات الرتم Retama raetam [60].

- **الزيوت العطرية essential oil والتربينوئيدات [49 55 61]:**

بينت العديد من الدراسات أن للزيوت العطرية المستخلصة من نباتات مختلفة تأثيراً مثبطاً لنمو فطر المبيضات البيض، وهذا التأثير يفوق في كثير من الدراسات تأثير الفلوكونازول.

نذكر منها الزيت العطري المستخلص من نبات الكزبرة *Coriandrum sativum* L. [62 63]، وأزهار إكليل الجبل *Rosmarinus officinalis* [64]، وبذور الكمون Cuminum cyminum[65]، والخزامى lavender oil، والنعنع Peppermint oil، والقرنفل Eugenol oil، والزعتر Thyme oil [66].

كما أظهرت أيضاً بعض المركبات المستخلصة من الزيوت العطرية (مثل الأوجينول eugenol، الليناالول linalool ، الجيرانيوال geraniol، المنتول menthol، الكارفاكرول carvacrol) تأثيراً مثبطاً لنمو فطريات المبيضات البيض المقاومة للفلوكونازول[67].

حدّت قلة الأبحاث والدراسات السريرية المتعلقة بجرعة المركبات النباتية وتوافرها الحيوي وآلية تأثيرها من استخدامها في المعالجة، مما يدعو إلى ضرورة إجراء المزيد من الدراسات في هذا المجال[3].

5.5 الطرائق المتبعة لتقدير الفاعلية المضادة للفطريات للزيوت العطرية في الزجاج

5.5.1 اختبارالانتشار بالآغار Agar diffusion test

يعتمد هذا الاختبار على إشباع قرص ترشيح بالزيت العطري المراد قياس فاعليته، ثم وضعه على سطح آغار حاوٍ على الفطر المراد اختباره. تقدر الفاعلية المضادة للفطريات للزيت العطري بقياس قطر التثبيط.

ومع أن هذه الطريقة سهلة التطبيق وشائعة الاستخدام بشكل كبير، إلا أنها قد تؤدي إلى نتائج غير دقيقة خاصة عندما تكون المادة المراد اختبار فاعليتها ضعيفة الانحلال بالماء.

5.5.2 اختبار التمديد بالمرق أو بالآغار Broth/Agar dilution test

في اختبار التمديد بالمرق توضع سلسلة تراكيز مختلفة من المادة المطلوب قياس فاعليتها المضادة للفطريات في مستنبت سائل يحتوي على عدد محدد مسبقاً من نوع الفطريات المطلوب اختبارها، أما بالنسبة لاختبار التمديد بالآغار تضاف تراكيز متدرجة من المادة المختبرة ضمن الآغار الذي يتم صبه في أطباق البتري، ثم توضع كميات متساوية من الفطر المطلوب اختباره على سطح مستنبتات الآغار.

وتقدر الفاعلية المضادة للفطريات لكل من الطريقتين بحساب التركيز الأدنى المثبط لنمو الفطريات Minimum Inhibition Concentration (**MIC**)، والذي يعبر عن أدنى تركيز من المادة المختبرة يمنع النمو المرئي للسلالات الفطرية.

يوصف اختبار التمديد بالآغار بأنه اختبار معياري ذهبي "gold standard"، لأنه تغلب على مشاكل الانتشار بالآغار، كما أنه سمح بتحديد تركيز MIC للمواد المختبرة.

حدّت التكلفة المرتفعة لاختبار التمديد بالآغار والوقت الطويل الذي يستغرقه من استخدامه بشكل كبير في اختبارات قياس الفاعلية المضادة للفطريات.

5.5.3 اختبار التمديد الميكروني بالمرق Broth microdilution method

تسمح هذه الطريقة بإجراء العديد من التجارب في آنٍ واحد كما تسمح بحساب تراكيز MIC للمواد المختبرة بوقت وتكلفة أقل. ولكن تبقى هناك مشكلة ظهور نتائج غير دقيقة لبعض الفطريات (خاصة اللاهوائية) نظراً لنقص المواد المغذية في الوسط والتعرض الكبير للأوكسجين أثناء التجربة.

لا بدّ من الإشارة أيضاً إلى وجود العديد من الطرق الأخرى المتبعة، ولكنها طرق غير معيارية. وبشكل عام، تمتلك كل طريقة مساوئ ومحاسن يجب أخذها بعين الاعتبار عند الاختبار.

في الحقيقة تبقى اختبارات الفاعلية المضادة للفطريات للزيوت العطرية صعبة التطبيق نظراً لتطايرها بشكل كبير، وخواصها الكارهة للماء hydrophobicity والتي تتطلب في بعض الأحيان إضافة عامل فعال على السطح[68].

الدراسة العملية

Experemental study

هدف البحث Aim of study

1- دراسة التأثير المثبط لنمو الفطريات لكل من الزيت العطري الطيار المستخلص من قشور ثمار النارنج والليمونين (المركب الأساسي الذي يدخل في تركيب الزيت) بشكليه الميمن والميسر وذلك بالمقارنة مع الفلوكونازول (حيث استخدم فطر المبيضات البيض *Candida albicans* كنموذج للفطريات).

2- دراسة تغير مردود وتركيب الزيت العطري لقشور ثمار النارنج خلال فترة النضج تبعاً لتغيرات المناخ.

6 المواد والطرائق Materials and Methods

6.1 جمع عينات نبات النارنج واستخلاصها

جمعت ثلاث عينات من ثمار النارنج من مدينة دمشق خلال فترة النضج. تم استخلاص الزيت العطري من قشور الثمار للعينات الثلاث، وتم حفظه في درجة حرارة - 20° مئوية.

تم العمل كما يلي:

6.1.1 جمع العينات

جمعت ثلاث عينات من ثمار النارنج خلال ثلاثة أشهر من فترة النضج (كانون الأول 2013، كانون الثاني 2014، شباط 2014).

تم جمع العينات السابقة من أشجار مزروعة داخل منزل في الأحياء القديمة من مدينة دمشق. الشكل (**9**) (منطقة الميدان)، وذلك في الساعة السابعة صباحاً، حيث تكون نسبة الزيت العطري بحدودها العليا [69].

جمعت العينات خلال التواريخ التالية:

- العينة الأولى: 2013/12/28

- العينة الثانية: 2014/1/27

- العينة الثالثة: 2014/2/23

وتم التأكد من نوع النبات وتصنيفه من قبل الأستاذ الدكتور عماد القاضي.

الشكل (9) نبات النارنج في مكان جمعه في مدينة دمشق (التقاط الباحثة).

6.1.2 استخلاص الزيت العطري وحفظه

تم الاستخلاص بطريقة التقطير بالماء Hydrodistillation باستخدام جهاز استخلاص الزيوت العطرية Clevenger apparatus الموجود في مخبر الدراسات العليا - قسم العقاقير وكيمياء العقاقير – كلية الصيدلة- جامعة دمشق والموضح في الشكل (**10**).

الشكل (10) جهاز الاستخلاص Clevenger apparatus (التقاط الباحثة).

تم الاستخلاص وفقاً للخطوات التالية:

1- غُسلت الثمار بالماء المقطر، وجُففت باستخدام قطعة قماشية نظيفة.
2- وُزنت الثمار، وسُجِّل الوزن.
3- أُزيلت القشرة الخارجية ذات اللون البرتقالي (Flavedo) بأداة حادة، بحيث تحتوي على أقل كمية ممكنة من القشرة الداخلية البيضاء (Albedo).
4- وزنت القشور الناتجة، ثم تمّ حساب نسبة وزن القشور للثمار.

5- قُطِّعت القشور إلى قطع صغيرة لتحطيم الجيوب الزيتية، ووضعت في حوجلة جهاز الاستخلاص وأضيف لها ضعف حجمها ماء مقطر.
6- سخنت العينة لدرجة حرارة 80-90°مئوية لمدة 3 ساعات باستخدام قميص التسخين، ونتج عند انتهاء عملية التقطير طبقة زيتية علوية وطبقة مائية سفلية.
7- تم الانتظار إلى أن يبرد الزيت وينفصل تماماً عن الطبقة المائية.
8- تم حساب حجم الزيت الناتج والنسبة المئوية له.
9- جفف الزيت العطري بإضافة سلفات الصوديوم اللامائية، ثم تم ترشيحه.
10- كررت العملية السابقة لجميع العينات، وتم حفظ الزيت العطري الناتج ريثما يتم العمل عليه في أنابيب زجاجية عاتمة محكمة الإغلاق في درجة حرارة - 20° مئوية، حيث تسمح درجة الحرارة السابقة بالمحافظة على تركيب الزيت العطري الطيار دون أي تغيير[70]. يوضح الشكل (**11**) خطوات العمل.

الشكل (11) ملخص لمراحل استخلاص الزيت العطري الطيار (التقاط الباحثة).

6.2 تحليل مكونات الزيت العطري الطيار

- أجريت عملية تحليل مكونات الزيت العطري للعينات الثلاث السابقة في مخابر مديرية الرقابة الدوائية باستخدام جهاز الكروماتوغرافيا الغازيّة ومتحري مطياف الكتلة GC-MS من نوع GCMS –QP2010 plus, SHIMADZU, Kyoto, Japan. الشكل (**12**).

يمتلك الجهاز المواصفات التالية:

- العمود: OPTIMA 5 (100% dimethylpolysiloxane USP G1, G2, G38) سماكة الفيلم 0.25 مكرومتر، طول العمود 25 متر، وقطره 0.25 ملم.
- الغاز الحامل: الهيليوم بضغط 54 كيلو باسكال (K.pa).
- معدل الفصل (Split Ratio): 30:1
- الحاقن: أتوماتيكي، درجة حرارة الحاقن: 250° مئوية، نمط الحقن injection mode: فصل Split، حجم العينة المحقونة: 1 ميكرولتر.
- البرنامج الحراري:

  درجة حرارة الفرن 60 - 240° مئوية، ترفع بمعدل 3 درجات/ دقيقة.

  الزمن الكلي للبرنامج: 62 دقيقة.
- مطياف الكتلة: درجة حرارة مصدر الأيونات: 200° مئوية، قدرة التشظّي: 70 e.v.

- تم تحضير عينات الزيت العطري للتحليل بتمديده بالهيكسان النقي للحصول على تركيز 5%، حيث وضع 100 ميكرولتر من الزيت العطري ضمن أنبوب سعة 2 مل، وأكمل الحجم حتى 2 مل بالهكسان للحصول على التركيز السابق.

- تم التعرف على مكونات الزيت العطري باستخدام مكتبة Wiley الإلكترونية.

الشكل (12) جهاز الكروماتوغرافيا الغازيّة ومتحري مطياف الكتلة GC-MS (التقاط الباحثة).

6.3 المعلومات المناخية

تم طلب معلومات مناخية من مديرية الأرصاد الجوية في مدينة دمشق.

تتضمن هذه المعلومات: (معدل درجة الحرارة، معدل الرطوبة النسبية) خلال الأشهر الثلاثة التي تم فيها جمع عينات النبات واستخلاصه وهي: كانون الأول 2013، كانون الثاني 2014، شباط 2014.

6.4 دراسة التأثير المثبط لنمو فطريات المبيضات البيض لعينات الزيوت العطرية المستخلصة من قشور ثمار النارنج ولمعياري الليمونين الميمن (+) والميسر (-) و للفلوكونازول

تم العمل في مخبر الدراسات العليا- قسم الأحياء الدقيقة – كلية الصيدلة- جامعة دمشق. تم عزل سلالة نقية من المبيضات البيض *Candida albicans* من عينة براز بشرية، وتمت دراسة التأثير المثبط لنمو فطر المبيضات البيض لكل من العينات التالية:

- عينة الزيت العطري المستخلصة في الشهر الأول من النضج (كانون الأول 2013).
- عينة الزيت العطري المستخلصة في الشهر الثاني من النضج (كانون الثاني 2014).
- عينة الزيت العطري المستخلصة في الشهر الثالث من النضج (شباط 2014).
- الليمونين المعياري الميمن (+).

(*62118 FLUKA, SIGMA-ALDRICH*, USA***)*** (R-(+)-Limonene)

- الليمونين المعياري الميسر (-).

(*W504505, SIGMA-ALDRICH*, USA***)*** (S-(-)-Limonene)

- الفلوكونازول Fluconazole (Pfizer, New York, United States): الدواء الذي يوصى به لعلاج المبيضات البيض.

استخدمت طريقة التمديد في الآغار Agar dilution method، واستخدم الماء المقطر لتمديد الفلوكونازول نظراً لكونه قابل للانحلال في وسط مائي، بينما أجريت عدة تجارب لاختيار المحل المناسب لتمديد الليمونين والزيوت العطرية.

تم تحضير سلاسل تمديدات من الزيوت العطرية والليمونين بحلها في مزيج من الماء المقطر والتوين 80 بتركيز 0.5%. تراوحت التراكيز النهائية لكل من عينات الزيوت العطرية والليمونين المعياري في مستنبت الزرع بين 1-40 مكل/مل، وتراوحت التراكيز النهائية للفلوكونازول بين 1-40 مكغ/مل.

تم العمل وفقاً للخطوات التالية:

6.4.1 عزل عينة الفطر

تم زرع ثلاث عينات براز بشرية على وسط سابورو دكستروز آغار Sabouraud Dextrose SDA Agar (M063-500g, HIMIDIA,Mumbai, India) الذي تم تحضيره مسبقاً والمضاف له جنتامايسين Gentamicin (بحيث يكون تركيزه النهائي في الوسط 50 مكغ/مل). وبعد حضن لمدة 48 ساعة، تم التعرف على مستعمرات الفطريات الخمائرية التي نمت على مستنبت الزرع، وتم تنميط مستعمرات المبيضات البيض من قبل الأستاذ الدكتور محمد معروف وذلك اعتماداً على اختبار الأنبوب الإنتاشي. تم عزل مستعمرات المبيضات البيض واستفرادها على مستنبت SDA جديد والمحافظة عليها حتى انتهاء الدراسة. يمثل الشكل (**13**) السلالة النقية لفطر المبيضات البيض *Candida albicans*.

الشكل (13) عزلة فطر المبيضات البيض *Candida albicans* (التقاط الباحثة).

6.4.2 دراسة تأثير المحلات لوحدها على نمو فطريات المبيضات البيض واختيار المحل المناسب لتمديد الزيت العطري والليمونين المعياري

نظراً لعدم امتزاج الزيت العطري والليمونين مع وسط SDA عند إضافته بدون تمديد، فقد قمنا بالعديد من التجارب لاختيار محل يساعد على امتزاج كل من الزيت العطري والليمونين مع الوسط بحيث لايمتلك هذا المحل أي تأثير مثبط لنمو فطر المبيضات البيض.

شملت مجموعات المحلات التي تمّ اختبارها:

المجوعة الأولى:

1- ثنائي ميتيل السلفوكسيد Dimethyl Sulfoxid DMSO (anhydrous, ≥99.9%) (276855, *SIGMA-ALDRICH* , USA)

2- الميتانول Methanol (anhydrous, 99.8%) (322415, *SIGMA-ALDRICH*, USA)

المجموعة الثانية:

1- مزيج الماء المقطر مع ثنائي ميتيل السلفوكسيد بتركيز 0.5%.

2- مزيج الماء المقطر مع الميتانول بتركيز 0.5%.
3- مزيج الماء المقطر مع التوين 80 بتركيز 0.5%.

Tween 80 (P1754, *SIGMA-ALDRICH*, USA)

تم اختبار قابلية امتزاج جميع المحلات السابقة مع الليمونين والزيت العطري، ثم تم استبعاد كل من مزيج الماء المقطر مع ثنائي ميتيل السلفوكسيد بتركيز 0.5% و مزيج الماء المقطر مع الميتانول بتركيز 0.5% نظراً لكونها لا تسمح بامتزاج الزيت العطري والليمونين مع الماء المقطر ضمن التراكيز المستعملة. بينما سمح استخدام التوين 80 بتركيز 0.5% بامتزاج الزيت العطري والليمونين مع الماء المقطر، ومن ثم توزعه بشكل متجانس في مستنبت SDA.

تمت إضافة محلات المجموعة الأولى إلى مستنبت الزرع SDA بحيث نحصل على أوساط تحتوي على تراكيز من المحلات تتراوح بين 1- 10 % في كل مستنبت من مستنبتات الزرع المستخدمة.

بينما مزج الماء المقطر مع التوين 80 لينتج لدينا تركيز نهائي 0.5% من التوين في مستنبت SDA.

تم العمل كما يلي:

أولاً- تحضير وسط سابورو دكستروز آغار SDA

تم العمل في جو عقيم، حيث تم تحضير وسط سابورو دكستروز آغار كما يلي:

- تم وزن 65 غ من الوسط وحلّه ضمن حوجلة بالماء المقطر، حيث أكمل الحجم حتى ا لتر بالماء المقطر.
- مزج جيداً، ثم سخن حتى الغليان وتمام الانحلال.
- تم تعقيمه في جهازالصاد الموصد Autoclave بضغط 15 بار ودرجة حرارة 121° مئوية لمدة 15 دقيقة.
- تمت إضافة الجنتامايسين بتركيز 50 مكغ / مل من الوسط لمنع نمو الجراثيم، وذلك عندما أصبحت درجة حرارة الوسط بين 40-45° مئوية.

ثانياَ- تحضير سلسلة تراكيز من المحلّات المستخدمة

- تم تحضير 4 تراكيز نهائية في مستنبت الزرع لكل محلول تمديد من محاليل المجموعة الأولى تعادل: 1%، 2.5%، 5%، 10%.
- استخدمت علب بتري ذات قطر 6 سم للعمل في جميع المراحل.

- استخدمت ممصات معقمة لإضافة 1مل من محلول التمديد إلى علبة البتري الأولى، وأكمل الحجم حتى 10 مل بإضافة 9 مل من وسط SDA المحضّر والمعقم مسبقاً وذلك بعد إذابته على حمام مائي، ثم تم تدوير علبة البتري حول محورها ليمتزج الوسط مع المحلول بشكل جيد، وبذلك نكون قد حصلنا على تركيز 10%. حضرت باقي التراكيز بنفس الطريقة كما يوضح الجدول (**4**).

الجدول (4) تحضير أوساط SDAلدراسة تأثير DMSO والميتانول على نمو المبيضات البيض. الحجوم المضافة والتراكيز النهائية للميتانول و DMSO.

رقم علبة البتري	حجم المواد المضافة (مل)		تركيز محلول التمديد ضمن علبة البتري
	محلول التمديد DMSO أو ميتانول	وسط SDA	
1	1	9	%10
2	0.5	9.5	%5
3	0.25	9.75	%2.5
4	0.1	9.9	%1

- بالنسبة للمجموعة الثانية

أضيف التوين 80 إلى الماء المقطر بحيث يكون تركيز التوين 80 ضمن مستنبت SDA 0.5%. لتحقيق ذلك تم وضع 50 مكل من التوين 80 في أنبوب ايبيندروف وأكمل الحجم بالماء المقطر حتى 1 مل ومزج جيداً، وبذلك حصلنا على أنبوب يحتوي على 5% من التوين 80. أضيف محتوى الأنبوب السابق إلى علبة بتري وأكمل الحجم إلى 10مل من وسط SDA. حصلنا بالنتيجة على مستنبت SDA يحتوي على 0.5% من التوين 80.

- مزجت علب البتري جيداً وتركت حتى تمام التصلب، ثم وضعت في الحاضنة في درجة حرارة 37° مئوية لمدة 48 ساعة بعد قلبها على الوجه السفلي للتأكد من عدم حدوث أي تلوث قبل الزرع.

ثالثاً- تحضير المعلق الفطري وإضافته للوسط السابق

تم أخذ مستعمرة من مزرعة لفطر المبيضات البيض الذي تم عزله مسبقاً، وذلك بعد مرور 48 ساعة على تلقيح وسط الزرع. وضعت المستعمرة ضمن 1 مل مصل فيزيولوجي، ومزجت جيداً، حتى حصلنا على معلق للفطر.

تم حساب كثافة المعلق من خلال تعداد خلايا الفطر حيث أخذ 10 ميكرولتر من المعلق الفطري، وتم عدُّه بوساطة عدادة نيوباور Neubauer counting chamber، وفقاً لطريقة عد كريات الدم البيضاء. ثم تم تمديد المعلق بالمصل الفيزيولوجي للحصول على معلق نهائي للفطر بتركيز 10^3 خلية/مل.

تم إضافة 100 ميكرولتر من المعلق الأخير إلى كل من علب البتري السابقة، ثم مزج جيداً بتدوير علبة البتري حول محورها. وبعد الانتظار لمدة نصف ساعة حتى يجف المعلق، قلبت العلب ووضعت في الحاضنة في درجة حرارة 37° مئوية.

- تم تحضير علبة بتري شاهدة لا تحتوي أي زيت عطري أو أي دواء آخر أو أي محلول للتمديد. تم تحضيرها بإضافة 10مل من وسط الزرع فقط (شاهد إيجابي).
- تمت قراءة النتيجة بعد 48 ساعة من العمل. حيث تمت مقارنة عدد المستعمرات الفطرية الناتجة عن الشاهد الإيجابي وكل من محاليل التمديد السابقة.
- تم اختيار المحل الذي لم يكن له أي تأثير مثبط لنمو فطريات المبيضات البيض ضمن جميع التراكيز المستعملة لإكمال العمل.
- سجلت قيم التراكيز الدنيا المثبطة لنمو فطريات المبيضات البيض MIC الموافقة للمحلات الأخرى، حيث تمثل هذه القيمة أقل تركيز من المحل أدى إلى عدم حدوث أي نمو فطري مرئي في مستنبت الزرع.

6.4.3 دراسة التأثير المثبط لنمو فطريات المبيضات البيض للفلوكونازول

تمت الدراسة وفقاً للخطوات التالية:

أولاً- تحضير سلسلة تراكيز للفلوكونازول

تم تحضير مجموعة من التمديدات البدئية للفلوكونازول بحيث نحصل على محاليل ممددة بتراكيز: 10، 25 ، 50، 100، 200، 300، 400 مكغ/مل.

تم العمل كما يلي:

- استخدم محلول تسريب وريدي للفلوكونازول (Pfizer, New York, United States) بتركيز 2 ملغ/مل لتحضير سلسلة التمديدات.
- تتألف سلسلة التمديدات للفلوكونازول من 7 أنابيب، حضرت التمديدات باستخدام أنابيب ابيندروف سعة 1 مل.
- أضيف 200 مكل من محلول الفلوكونازول إلى الأنبوب الأول، وأكمل الحجم إلى 1 مل بالماء المقطر، ثم مزج جيداً.
- وبذلك حصلنا على تركيز بدئي 400 مكغ فلوكونازول /مل ماء مقطر.
- حضرت باقي التراكيز بنفس الطريقة كما هو موضح في الجدول (**5**).

الجدول (5) تحضير سلسلة تراكيز من المحاليل الممددة للفلوكونازول، الحجوم المضافة وتراكيز الفلوكونازول الناتجة.

رقم الأنبوب	الحجم المضاف (مكل)		تركيز الفلوكونازول (مكغ/مل)
	محلول فلوكونازول 2ملغ/ مل	الماء المقطر	
الأنبوب 1	200	800	400
الأنبوب 2	150	850	300
الأنبوب 3	100	900	200
الأنبوب 4	50	950	100
الأنبوب 5	25	975	50
الأنبوب 6	15	985	30
الأنبوب 7	5	995	10

ثانياً- تحضير الوسط ومزجه مع سلسلة التراكيز

- تم تحضير وسط سابورو دكستروز آغار SDA كما مر سابقاً (**الفقرة 6.4.2 أولاً**).
- استخدمت علب بتري ذات قطر 6 سم، واستخدمت ممصات معقمة لإضافة 9 مل من وسط SDA (المحضر والمعقم مسبقاً بعد إذابته على حمام مائي) و1مل من كل تركيز من تراكيز مجموعة التمديدات السابقة إلى كل علبة بتري. ثم تم تدويرعلب البتري حول محورها ليمتزج الوسط مع المادة بشكل جيد.
- بالنتيجة حصلنا ضمن علب البتري على تراكيز نهائية للفلوكونازول تراوحت بين 1- 40 مكغ/مل.

- مزجت علب البتري جيداً وتركت حتى تمام التصلب، ثم وضعت في الحاضنة في درجة حرارة 37° لمدة 48 ساعة بعد قلبها على الوجه السفلي للتأكد من عدم حدوث تلوث قبل الزرع.

ثالثاً- تحضير المعلق الفطري وإضافته للوسط السابق

استخدم نفس المعلق الفطري الذي تم تحضيره سابقاً، وتم زرع الأوساط وحضنها وفقاً لنفس الطريقة الموضحة سابقاً (**الفقرة 6.4.2 ثالثاً**).

- تم تحضير علبة بتري شاهدة لا تحتوي فلوكونازول أو أي دواء آخر أو أي محلول للتمديد. تم تحضيرها بإضافة 10مل من وسط الزرع فقط (شاهد إيجابي).

أعيدت كل تجربة ثلاث مرات.

تمت قراءة النتائج بعد 48 ساعة وبعد 72 ساعة من العمل السابق كما يلي:

- سجلت قيمة التركيز الأدنى المثبط لنمو فطريات المبيضات البيض MIC للفلوكونازول، حيث تمثل هذه القيمة أقل تركيز من الفلوكونازول أدى إلى عدم حدوث أي نمو فطري مرئي في الوسط الزرعي. سجلت التراكيز في كل تجربة ثم حسب المتوسط الحسابي والانحراف المعياري.

6.4.4 دراسة التأثير المثبط لنمو فطريات المبيضات البيض لعينات الزيوت العطرية غير المنحلة بالماء باستخدام مزيج من الماء المقطر والتوين 80

تمت الدراسة وفقاً للخطوات التالية:

أولاً- تحضير سلسلة تراكيز لكل عينة من عينات الزيوت العطرية

تم تحضير مجموعة من التمديدات البدئية لكل عينة من عينات الزيوت العطرية الثلاث، بحيث نحصل على محاليل ممددة للزيوت العطرية بتراكيز: 10، 25 ، 50، 100، 200، 300، 400 مكل/مل.

استخدم للتمديد مزيج من الماء المقطر مع التوين 80 الذي ساعد على استحلاب الزيت العطري ضمن الوسط المائي، وذلك بحيث يكون التركيز النهائي للتوين 80 في مستنبت الزرع 0.5 %.

تم العمل وفقاً للخطوات التالية:

- تتألف سلسلة التمديدات لكل عينة من عينات الزيوت العطرية من 7 أنابيب. حضرت التمديدات باستخدام أنابيب ابيندروف سعة 1 مل.

- أضيف إلى الأنبوب الأول 400 مكل من عينة الزيت العطري و50 مكل توين 80، وأكمل الحجم إلى 1 مل بالماء المقطر، ثم مزج جيداً.
- وبذلك حصلنا على تركيز بدئي ضمن الأنبوب يساوي 400 مكل زيت عطري في 1 مل من المحل و5 % توين 80.
- حضرت بقية التمديدات بنفس الطريقة الموضحة في الجدول (**6**).

الجدول (6) تحضير سلسلة عيارية من المحاليل الممددة لعينات الزيوت العطرية باستخدام الماء المقطر والتوين 80، الحجوم المضافة وتراكيز الزيوت العطرية الناتجة.

رقم الأنبوب	الحجم المضاف (مكل)			تركيز الزيت العطري (مكل/مل)
	عينة الزيت العطري	التوين 80	الماء المقطر	
الأنبوب 1	400	50	550	400
الأنبوب 2	300	50	650	300
الأنبوب 3	200	50	750	200
الأنبوب 4	100	50	850	100
الأنبوب 5	50	50	900	50
الأنبوب 6	25	50	925	25
الأنبوب 7	10	50	940	10

- أجري العمل السابق لكل عينة من عينات الزيوت العطرية الثلاث، بحيث حصلنا لكل عينة على سلسلة تمديدات تراوحت تراكيزها بين 10- 400 مكل/مل.

ثانياً- تحضير الوسط ومزجه مع سلسلة التراكيز

- تم تحضير وسط سابورو دكستروز آغار SDA كما مر سابقاً (**الفقرة 6.4.2 أولاً**).
- استخدمت علب بتري ذات قطر 6 سم واستخدمت ممصات معقمة لإضافة 9 مل من وسط SDA (المحضر والمعقم مسبقاً بعد إذابته على حمام مائي) و1مل من كل تركيز من تراكيز مجموعة التمديدات السابقة إلى كل علبة بتري. تم تدويرعلب البتري حول محورها ليمتزج الوسط مع المادة بشكل جيد.
- بالنتيجة حصلنا ضمن علب البتري على تراكيز نهائية لعينات الزيوت العطرية تراوحت بين 1-40 مكل/مل، واستخدم التوين 80 بتركيز 0.5% ضمن كل علبة بتري.
- مزجت علب البتري جيداً، وتركت حتى تمام التصلب، ثم وضعت في الحاضنة بدرجة حرارة 37° مئوية لمدة 48 بعد قلبها على الوجه السفلي للتأكد من عدم حدوث تلوث قبل الزرع.

ثالثاً- تحضير المعلق الفطري وإضافته للوسط السابق

استخدم نفس المعلق الفطري الذي تم تحضيره سابقاً. وتم زرع الأوساط وحضنها وفقاً لنفس الطريقة الموضحة سابقاً (الفقرة **6.4.2 ثالثاً**).

- تم تحضير علبة بتري شاهدة لا تحتوي أي زيت عطري أو أي دواء آخر أو أي محلول للتمديد. تم تحضيرها بإضافة 10مل من وسط الزرع فقط (شاهد إيجابي).
- أعيدت التجربة السابقة مرتين فقط، وذلك نظراً لاستهلاك كامل كمية الزيت العطري المستخلص وعدم إمكانية الحصول على كمية أخرى.

- يوضح الشكل (**14**) والشكل (**15**) المراحل السابقة.

الشكل (14) تحضير علب البتري الحاوية على مزيج من الوسط الزرعي والزيوت العطرية المختلفة (التقاط الباحثة).

1- إضافة محتوى كل أنبوب ايبيندروف إلى علبة بتري.

2- إضافة 9 مل من وسط SDA إلى كل علبة بتري.

الشكل (15) إضافة المعلق الفطري إلى علب البتري (التقاط الباحثة)

6.4.5 دراسة التأثير المثبط لنمو فطريات المبيضات البيض لمعياري الليمونين الميمن (+) والميسر (-) باستخدام مزيج من الماء المقطر والتوين 80

- في محاولة لفهم تأثير الزيوت العطرية السابقة المثبط لنمو المبيضات البيض، قمنا بدراسة تأثير الليمونين بنوعيه الميمن والميسر على نمو المبيضات البيض، نظراً لأن الليمونين هو المكون الأساسي الذي يدخل في تركيب جميع عينات الزيت العطري المستخلصة من قشور ثمارالنارنج.
- أعيدت نفس الطريقة الموضحة سابقاً (الفقرة **6.4.4**)، وحصلنا بالنتيجة ضمن علب البتري على تراكيز نهائية لمعياري الليمونين بنوعيه الميمن والميسر تراوحت بين 1- 40 مكل/مل، وعلى تركيز 0.5% من التوين ضمن كل علبة بتري.
- تم تحضير علبة بتري شاهدة لا تحتوي ليمونين أو أي دواء آخر أو أي محلول للتمديد. تم تحضيرها بإضافة 10مل من وسط الزرع فقط (شاهد إيجابي).
- أعيدت التجربة السابقة ثلاث مرات.

تمت قراءة النتائج لكل من الزيوت العطرية والليمونين بعد 48 ساعة من العمل السابق، كما يلي:

- سجلت قيمة التركيز الأدنى المثبط لنمو فطريات المبيضات البيض MIC لكل سلسلة، حيث تمثل هذه القيمة أقل تركيز من الزيت العطري أو الليمونين أدى إلى عدم حدوث أي نمو فطري مرئي

في مستنبت الزرع. سجلت التراكيز في كل تجربة ثم حسب المتوسط الحسابي والانحراف المعياري.

- أما بالنسبة لحساب التركيز المثبط لنمو 50% من فطريات المبيضات البيض IC50 فقد تم عد المستعمرات الفطرية ضمن علب البتري الموافقة للتراكيز الأقل من قيمة MIC لكل سلسلة، وذلك بالمقارنة مع عدد المستعمرات الفطرية للشاهد الإيجابي. تم رسم خط بياني للعلاقة بين تراكيز المادة المستخدمة ونسب تثبيط نمو المستعمرات باستخدام برنامج الاكسيل Excel 2013، وحسبت معادلة الخط المستقيم، ثم تم حساب قيمة التركيز الذي يسبب تثبيط 50% من نمو المستعمرات بالتعويض بالمعادلة السابقة. سجلت التراكيز في كل تجربة، ثم حسب المتوسط الحسابي والانحراف المعياري.

6.5 الدراسة الإحصائية:

أجريت الدراسة الإحصائية باستخدام اختبار ستيودنت Student's t-test وذلك عن طريق برنامج Excel 2013، حيث تم حساب قيم P value للمقارنة بين تركيب عينات الزيوت العطرية الثلاث، كما تم حسابها للمقارنة بين التأثير المثبط لنمو الفطريات لكل من العينات المدروسة والليمونين بنوعيه نسبة إلى تأثير الفلوكونازول. واعتبرت قيم P ذات أهمية عندما تكون أقل من 0.05 (P <0.05 value)

7 النتائج Results

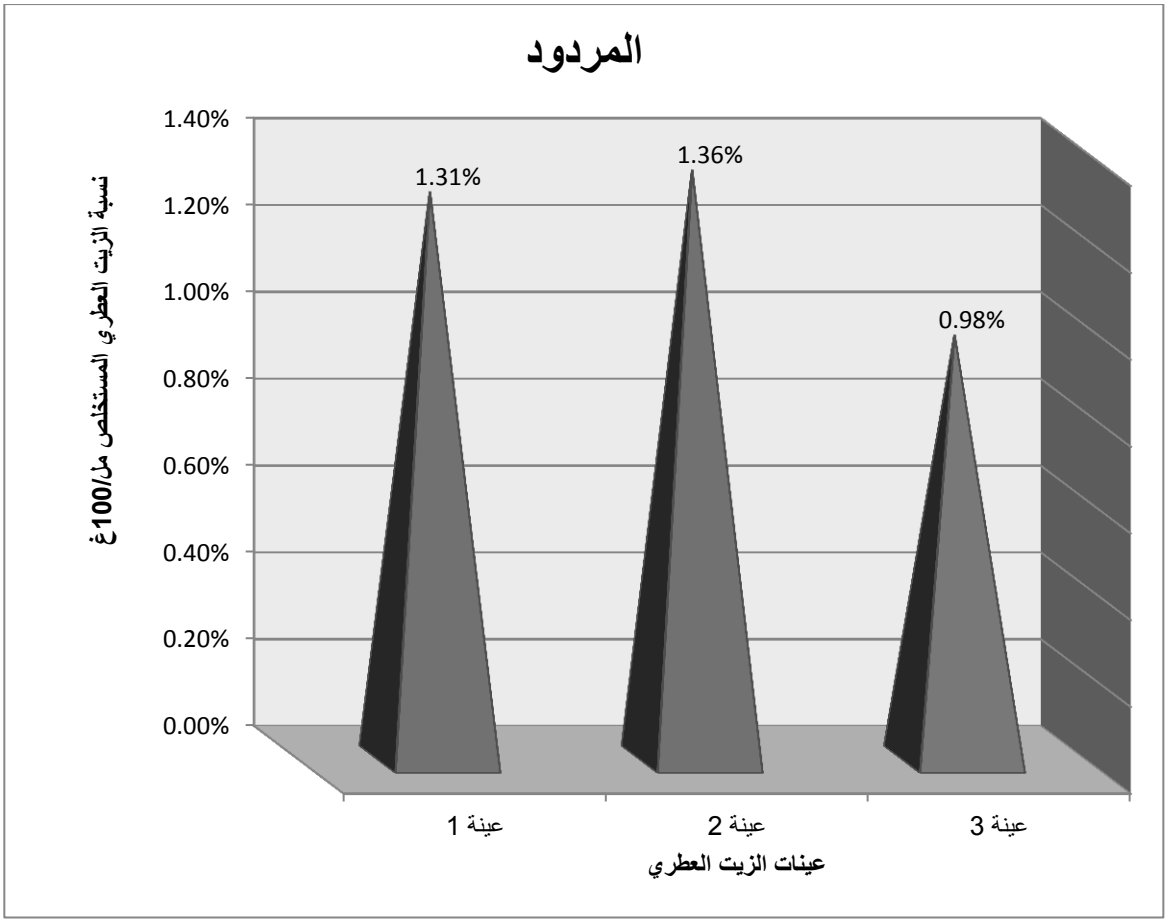
7.1 جمع عينات نبات النارنج واستخلاصها

- تراوحت نسبة وزن القشور إلى الثمار بين 22.6- 24.5% (غ/100غ) في العينات الثلاث، بينما تراوحت نسبة الزيت العطري المستخلص من القشور بين 0.98-1.36% (مل/100غ). الجدول (**7**).

الجدول (7) نسب كل من وزن القشور إلى وزن الثمار وحجم الزيت العطري إلى وزن القشور لكل من العينات الثلاث.

العينة وتاريخ جمعها	العينة الأولى 2013/12/28	العينة الثانية 2014/1/26	العينة الثالثة 2014/2/23
وزن الثمار	2046 غ	2797 غ	2063 غ
وزن القشور	501.8 غ	672 غ	468 غ
حجم الزيت العطري (مل)	6.6 مل	9.3 مل	4.6 مل
نسبة وزن القشور لوزن الثمار	%24.5	%24	%22.6
نسبة حجم الزيت لوزن القشور	%1.31	%1.36	%0.98

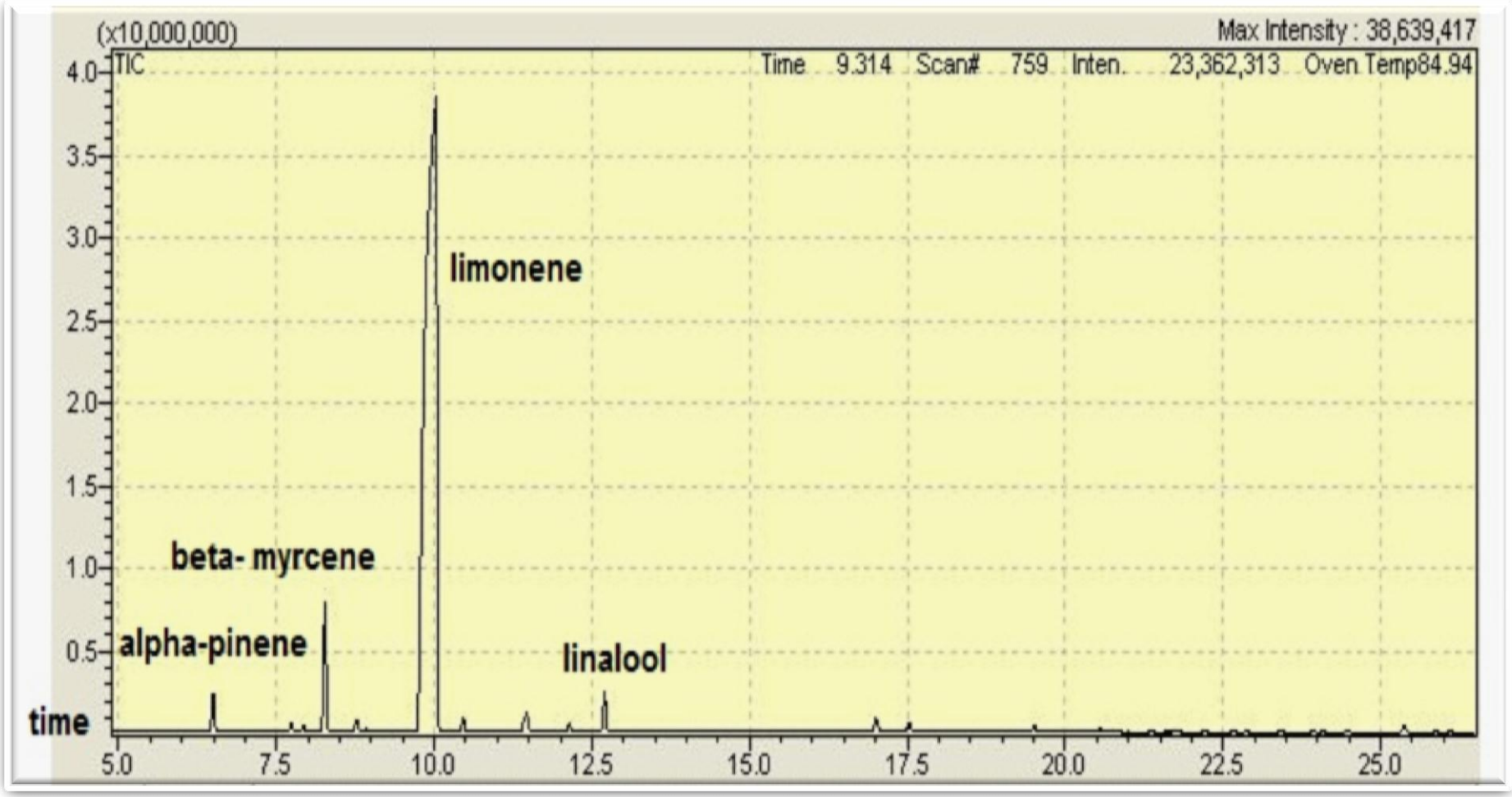
- كان لعينة الزيت العطري المستخلصة في الشهر الأول من فترة النضج (كانون الأول) وعينة الزيت العطري المستخلصة في الشهر الثاني من فترة النضج (كانون الثاني) مردود متقارب، حيث كان المردود 1.31% و 1.36% على التوالي، بينما انخفض المردود بشكل ملحوظ بالنسبة لعينة الزيت العطري المستخلصة في الشهر الثالث من فترة النضج (شباط) إلى قيمة 0.98% كما يوضح الشكل (**16**).



الشكل (16) مردود الزيت العطري لكل من العينات الثلاث المستخلصة خلال ثلاثة أشهر من فترة النضج.

7.2 تحليل مكونات الزيت العطري:

- أوضح تحليل مكونات الزيت العطري باستخدام جهاز GC-MS تقارباً واضحاً في نسب مكونات الزيت العطري لكل من العينات الثلاث.
- تم الكشف عن 15 مركب يدخل في تركيب الزيت العطري لقشور النارنج.
- يعد الليمونين المكون الأساسي في جميع العينات، حيث تراوحت نسبته بين 87.2%-89.58% من مكونات الزيت العطري، كما تم الكشف عن البيتا ميرسين واللينالول والألفا بينين في كافة العينات بنسب متفاوتة، بينما لم يظهر البيتا بينين في عينة شهر كانون الثاني. وظهر خلات اللينالیل في عينة شهر كانون الأول، بينما لم يظهر خلات النيريل في العينة السابقة، كما هو موضح في الشكل (**17**) والجداول (**8**) و (**9**). كما توضح الأشكال (**25**) و (**26**) والجداول (**13**) و (**14**) الموجودة في الملحق نتائج تحليل جهاز GC-MS لباقي العينات.
- بينت الدراسة الإحصائية عدم وجود فارق ذي دلالة إحصائية بين تركيب عينات الزيت العطري الثلاث **P Value > 0.05** .



الشكل (17) جزء من مخطط تحليل GC-MS لعينة الزيت العطري المستخلصة في الشهر الثاني من فترة النضج.

الجدول (8) نتائج تحليل GC-MS لعينة الزيت العطري المستخلصة في شهر كانون الثاني.

Peak	Ret. Time	Start Tm	End Tm	m/z	Area	Area %	Height	Height %	A / H	Name
1	6.497	6.442	6.558	TIC	5606811	1.03	2282974	3.95	2.45	**α.-pinen**
2	7.736	7.683	7.792	TIC	1248146	0.23	474677	0.82	2.62	**Sabinene**
3	8.266	8.183	8.35	TIC	23118194	4.24	7773055	13.46	2.97	**β.-Myrcene**
4	8.77	8.717	8.833	TIC	2085488	0.38	705287	1.22	2.95	**Octanal**
5	10.029	9.708	10.133	TIC	481238544	88.37	38473364	66.61	12.5	**Limonene**
6	10.461	10.392	10.542	TIC	2197750	0.4	767247	1.33	2.86	***trans*-.β-ocimene**
7	11.466	11.35	11.55	TIC	5183205	0.95	1168379	2.02	4.43	***Cis*-linalool oxide**
8	12.139	12.067	12.217	TIC	1462368	0.27	468792	0.81	3.11	***trans*-linalool oxide**
9	12.7	12.608	12.783	TIC	7486610	1.37	2367191	4.1	3.16	**Linalool**
10	17.006	16.917	17.1	TIC	3055022	0.56	830069	1.44	3.68	**α-Terpineol**
11	17.528	17.45	17.608	TIC	1668312	0.31	486708	0.84	3.42	**Decanal**
12	19.508	19.433	19.592	TIC	1289849	0.24	361873	0.63	3.56	**Neryl acetate**
13	25.373	25.292	25.45	TIC	1710212	0.31	472166	0.82	3.62	**Geranyl acetate**
14	30.763	30.683	30.85	TIC	2052859	0.38	547287	0.95	3.75	**BHT**
15	34.106	34	34.35	TIC	5217273	0.96	576746	1	9.04	**Diethyl phthalate**

الجدول (9) النسب المئوية لمكونات الزيت العطري لقشور النارنج للعينات المستخلصة خلال الأشهر الثلاثة من فترة النضج.

المكون	عينة كانون الأول%	عينة كانون الثاني%	عينة شباط %
Limonene	87.2	88.37	89.58
β.-Myrcene	4.42	4.24	4.18
Linalool	1.79	1.37	1.44
***Cis*-linalool oxide**	1.23	0.95	0.64
alpha.-pinene	1.04	1.03	0.97
Octanal	0.65	0.38	0.43
alpha-terpineol	0.62	0.56	0.49
Decanal	0.47	0.31	0.3
BHT	0.46	0.38	0.36
geranyl acetate	0.41	0.31	0.3
***Trans*-beta ocimene**	0.4	0.4	0.41
Linalyl acetate	0.38	-	-
***Trans*-linalool oxide**	0.36	0.27	0.64
Beta-pinene	0.3	-	0.23
Sabinene	0.27	0.23	0.23
Neryl acetate	-	0.24	0.24

7.3 المعلومات المناخية:

- بلغ معدل الرطوبة النسبية وفقاً للمعلومات المناخية، التي تم طلبها من مديرية الأرصاد الجوية- فرع المزة المركزي، خلال الشهر الأول من فترة النضج (كانون الأول) 70%، بينما بلغ خلال الشهر الثاني من فترة النضج (كانون الثاني) 63%، وخلال الشهر الثالث (شباط) 53%.
- بالنسبة لمعدل الحرارة الجافة خلال الأشهر الثلاثة، فقد بلغ في شهر كانون الأول 7.9°، وفي شهر كانون الثاني 7.7°، وفي شهر شباط 11.2°
- نستنتج مما سبق تناقص معدل الرطوبة النسبية على مدى الأشهر الثلاثة، بينما تقاربت معدلات الحرارة الجافة بالنسبة لشهر كانون الأول وكانون الثاني، وتزايدت بشكل ملحوظ خلال شهر شباط. كما يوضح الجدول (**10**).

الجدول (10) المعلومات المناخية خلال الأشهر الثلاثة التي تم جمع العينات فيها.

اسم المحطة	التاريخ	معدل الرطوبة النسبية %	معدل الحرارة الجافة (درجة مئوية)
المزة المركزي	**كانون الأول 2013**	70	7.9
	كانون الثاني 2014	63	7.7
	شباط 2014	53	11.2

7.4 دراسة التأثير المثبط لنمو فطريات المبيضات البيض للزيت العطري المستخلص من قشور ثمار النارنج ولمعياري الليمونين الميمن (+) والميسر (-) و للفلوكونازول:

7.4.1 دراسة تأثير المحلات لوحدها على نمو المبيضات البيض واختيار المحل المناسب لتمديد الزيت العطري والليمونين المعياري

أجريت تجارب عدة على مجموعتين من المحلات لتمديد كل من الزيت العطري والليمونين. كان الهدف من هذه التجارب اختيار محل يساعد على امتزاج كل من الزيت العطري والليمونين مع وسط SDA دون أن يمتلك هذا المحل أي تأثير مثبط لنمو فطر المبيضات البيض.

أ- <u>المجوعة الأولى:</u>

- امتزج كل من ثنائي ميتيل السلفوكسيد DMSO والميتانول Methanol بشكل جيد مع الليمونين والزيوت العطرية، وساعد على توزعها في مستنبت SDA فيما بعد.

- أعطى كلٌّ من ثنائي ميتيل السلفوكسيد DMSO والميتانول Methanol تأثيراً مثبطاً لنمو فطريات المبيضات البيض، حيث بلغ التركيز الأدنى لثنائي ميتيل السلفوكسيد DMSO المثبط لنمو الفطريات MIC 5% (5 مل DMSO في 100مل مستنبت SDA) وللميتانول 10% (10مل ميتانول في 100 مل مستنبت SDA).
- سمح استخدام DMSO بتركيز 1% والميتانول بتركيز 2.5% بالحصول على نمو فطري مشابه للنمو الفطري في علبة الشاهد الإيجابي Control، وبالتالي لا يؤثر الميتانول و DMSO عند استخدامهما بالتراكيز السابقة على نمو فطر المبيضات البيض. ولكنّ هذه التراكيز تعتبر تراكيز منخفضة غير كافية عملياً لاستخدامها في حل الزيوت العطرية، بل يجب استخدام تراكيز أكبر.

ب- **<u>المجوعة الثانية:</u>**

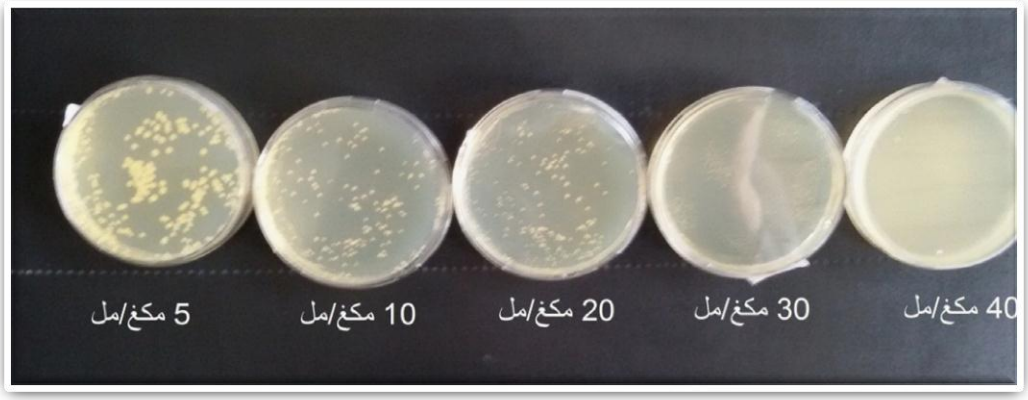
- لم يساعد كل من DMSO والميتانول بتركيز 0.5% على امتزاج الزيت العطري والليمونين مع الماء المقطر، ولذلك تم استبعاد مزيج المحلين السابقين من التجارب اللاحقة.
- سمح استخدام التوين 80 بتركيز 0.5% باستحلاب الزيت العطري مع الماء المقطر، وتوزعه بشكل متجانس في مستنبت SDA.
- لم يكن لمزيج المحل المكون من الماء المقطر والتوين 80 بتركيز 0.5% أي تأثير مثبط لنمو فطريات المبيضات البيض، حيث كان عدد المستعمرات الفطرية الناتجة عن هذا التركيز مشابهاً لعدد المستعمرات الفطرية في علبة الشاهد الإيجابي.

وبالتالي تم اختيار مزيج الماء المقطر مع التوين 80 بتركيز 0.5% كمحلول لتمديد الزيوت العطرية والليمونين.

يظهر الجدول (**15**) الموجود في الملحق تأثير المحلات السابقة على عدد المستعمرات النامية.

7.4.2 دراسة التأثير المثبط لنمو فطريات المبيضات البيض للفلوكونازول

- بلغ متوسط تركيزالفلوكونازول الأدنى المثبط لنمو فطريات المبيضات البيض MIC = 0 ± 40 مكغ/مل بعد 48 ساعة وبعد 72 ساعة من العمل.
- لم تسمح الطريقة المستخدمة بتحديد **IC_{50}**، حيث لوحظ عيانيّاً أنّ الفلوكونازول أدى إلى إنقاص حجم المستعمرات الفطرية وليس إنقاص عددها، ولم تكن المستعمرات الناتجة قابلة للعد حتى بعد 72 ساعة من العمل كما هو موضح في الشكل (**18**).



الشكل (18) التركيز الأدنى المثبط لنمو الفطريات للفلوكونازول بعد 72 ساعة من العمل (التقاط الباحثة).

7.4.3 دراسة التأثير المثبط لنمو فطريات المبيضات البيض لعينات الزيوت العطرية غير المنحلة بالماء باستخدام مزيج من الماء المقطر والتوين 80

تقاربت قيم MIC بينما تفاوتت قيم **IC_{50}** بشكل طفيف بين عينات الأشهر الثلاثة التي تم خلالها استخلاص الزيت العطري.

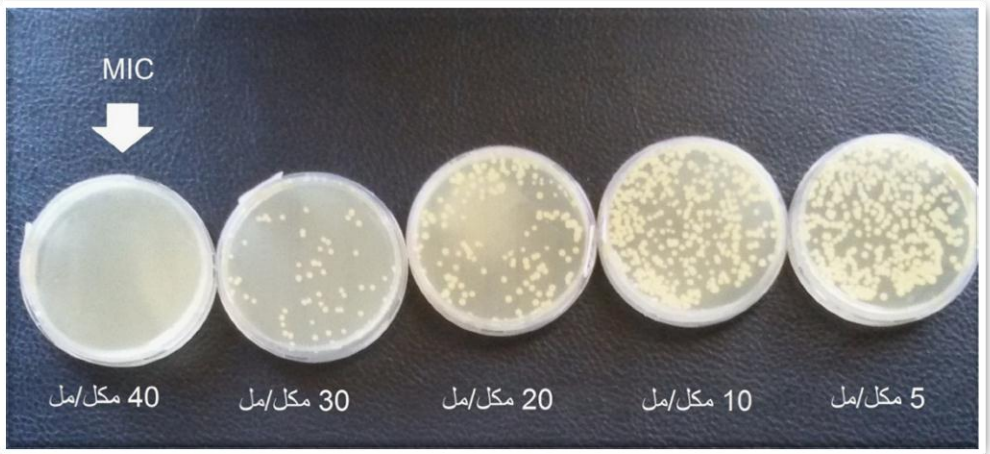
أ- <u>نتائج دراسة التركيز الأدنى المثبط لنمو المبيضات البيض MIC</u>

- بلغ متوسط التركيز الأدنى المثبط لنمو الفطريات لعينة شهر كانون الأول MIC = 40 مكل/مل، بينما كان متوسط التركيز لعينة الشهر كانون الثاني MIC = 35 مكل/مل، وبلغ لعينة شهر شباط MIC = 25 مكل/مل، وذلك بانحراف معياري SD 0 و7.07 و 7.07 على التوالي.
- بينت الدراسة الإحصائية عند المقارنة بين التراكيز الدنيا المثبطة لنمو المبيضات البيض MIC في عينات الزيوت العطرية المستخلصة خلال ثلاثة أشهر من فترة النضج عدم وجود

أي فوارق ذات دلالة إحصائية بين تأثير العينات الثلاث، حيث كانت قيم **P value** عند المقارنة بين جميع العينات أكبر من **0.05**.

- كما بينت الدراسة الإحصائية أن الفوارق بين التراكيز الدنيا المثبطة لنمو المبيضات البيض MIC لكل عينة من عينات الزيوت العطرية السابقة مع الفلوكونازول ليست ذات دلالة إحصائية، حيث كانت قيم **P value** عند المقارنة بين جميع العينات والفلوكونازول أكبر من **0.05**.

يوضح الشكل (**19**) نتائج إحدى التجارب



الشكل (19) قيمة التركيز الأدنى المثبط لنمو الفطريات للزيت العطري المستخلص في شهر كانون الأول - التجربة الأولى- (التقاط الباحثة).

ب- <u>نتائج دراسة التركيز الأدنى المثبط لنمو 50% من مستعمرات فطريات المبيضات البيض IC_{50}</u>

- بلغ متوسط التركيز المثبط لنمو 50% من مستعمرات فطريات المبيضات البيض لعينة شهر كانون الأول **IC_{50}=** 14.46 مكل/مل ، بينما كان التركيز لعينة شهر كانون الثاني **IC_{50} =** 9.64 مكل/مل، ولعينة شهر شباط **IC_{50}=** 8.62 مكل/مل، وذلك بانحراف معياري 0.21 و0.38 و 0.62 على التوالي.
- بينت الدراسة الإحصائية عند المقارنة بين التراكيز الدنيا المثبطة لنمو 50% من المستعمرات **IC_{50}** بين عينات الزيوت العطرية المستخلصة خلال ثلاثة أشهر من فترة النضج وجود فارق ذي دلالة احصائية بين عينة شهر كانون الأول وكل من عينتي شهر كانون الثاني وشباط **P Value<0.05**، بينما لم يكن هناك أي فارق ذي دلالة إحصائية بين عينتي شهر

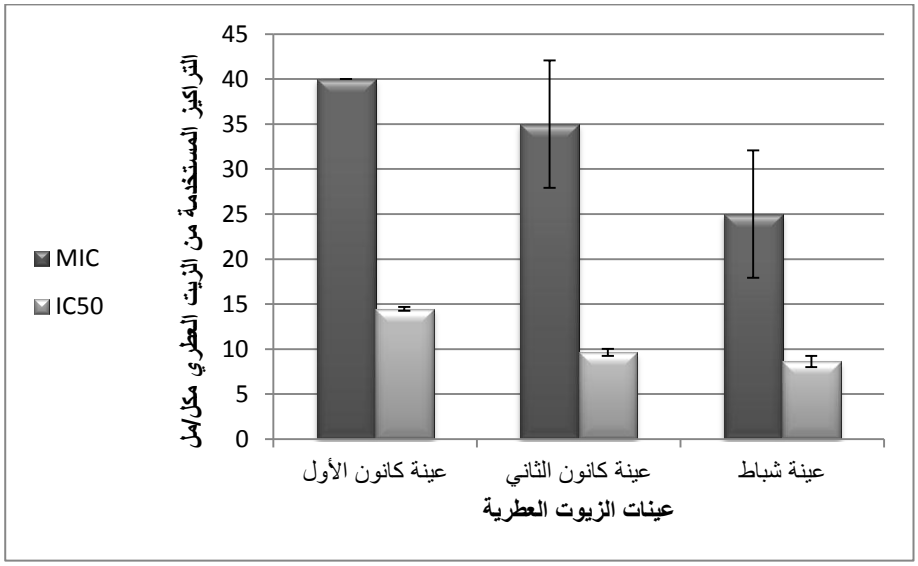
كانون الثاني وعينة شهر شباط **P Value>0.05**. أي أن تأثير عينة شهر كانون الأول أقل من تأثير كل من عينتي شهر كانون الثاني وشباط.

- لم يكن بالإمكان مقارنة النتائج السابقة مع الفلوكونازول، حيث لم تسمح الطريقة المستخدمة بتحديد **IC_{50}** للفلوكونازول، ولم تكن المستعمرات الناتجة قابلة للعد كما ذكرنا سابقاً.

يوضح الشكل (**20**) والجدول (**11**) تأثير العينات الثلاث. وتوضح الجداول (**16**) و (**17**) و (**18**) والأشكال (**27**) - (**28**)- (**29**) - (**30**) – (**31**) – (**32**) الموجودة في الملاحق النتائج الرقمية لعدد المستعمرات ومعادلة الخط البياني للعلاقة بين تراكيز الزيت العطري ونسبة تثبيط النمو الفطري، حيث استخدمت المعادلة لحساب **IC_{50}**.

الجدول 11:قيم IC_{50} و MIC والانحراف المعياري لكل من عينات الزيوت العطرية والفلوكونازول

المادة المدروسة	عينة كانون الأول	عينة كانون الثاني	عينة شباط	الفلوكونازول
متوسط تركيز IC_{50} (مكل/مل)	14.46	9.64	8.62	لم يتم تحديده
الانحراف المعياري	0.21	0.38	0.62	-
متوسط تركيز MIC (مكل/مل)	40	35	25	40
الانحراف المعياري	0	7.07	7.07	0



الشكل (20) متوسط قيمة MIC و IC_{50} لكل من عينات الزيت العطري الثلاث مع الانحراف المعياري.

7.4.4 دراسة التأثير المثبط لنمو فطريات المبيضات البيض لمعياري الليمونين الميمن (+) والميسر (-) باستخدام مزيج من الماء المقطر والتوين 80

أ- **نتائج دراسة التركيز الأدنى المثبط لنمو المبيضات البيض MIC**

- بلغ متوسط تركيز الليمونين الميسر(-) الأدنى المثبط لنمو فطريات المبيضات البيض MIC=13.33 مكل/مل وبلغ الانحراف المعياري 5.77، كما ثبط الليمونين الميمن النمو بنفس تركيز الليمونين الميسر وبنفس قيمة الانحراف المعياري، وبالتالي ليس هناك أي فرق بالتأثير بين الليمونين الميمن والميسر عند المقارنة بالاعتماد على تراكيز MIC.
- بينت الدراسة الإحصائية عند المقارنة بين التراكيز الدنيا المثبطة لنمو المبيضات البيض MIC لدى كل من الليمونين الميمن (+) والميسر(-) والفلوكونازول وجود فارق ذي دلالة إحصائية بين الليمونين بنوعيه والفلوكونازول **P<0.05**، أي أن التأثير المثبط لنمو فطر المبيضات البيض بالنسبة لليمونين هو أكبر من تأثير الفلوكونازول.
- عند المقارنة إحصائياً بين التراكيز الدنيا المثبطة لنمو المبيضات البيض MIC لدى كل من الليمونين الميمن والميسر وعينات الزيوت العطرية الثلاث، كانت قيمة P لعينة الزيت العطري لشهر كانون الأول أصغر من **0.05** أي أن هناك فارقاً ذا دلالة إحصائية، وهذا يعني أن التأثير المثبط لنمو فطر المبيضات البيض لكل من الليمونين الميمن والميسر أكبر من تأثير عينة الزيت العطري لشهر كانون الأول. بينما كانت قيمة P لعينة الزيت العطري لشهر كانون الثاني ولعينة الزيت العطري لشهر شباط أكبر من **0.05** ، أي أنه لا يوجد فوارق ذات دلالة إحصائية بين تأثير الليمونين بنوعيه وعينات الزيوت العطرية للشهرين السابقين.

ب- **نتائج دراسة التركيز الأدنى المثبط لنمو 50% من مستعمرات فطريات المبيضات البيض IC_{50}**

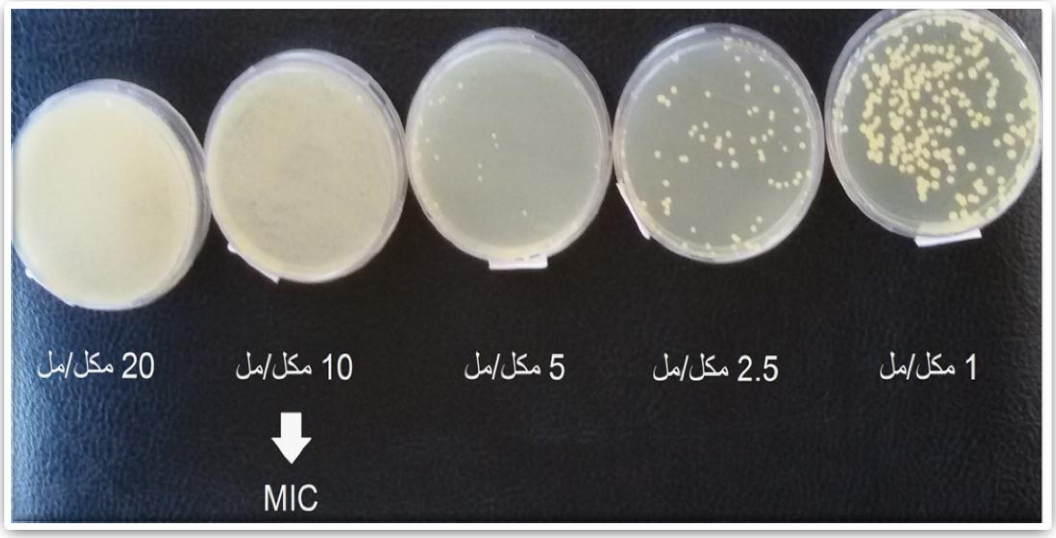
- بلغ تركيز الليمونين الميسر المثبط لنمو 50% من المستعمرات الفطرية IC_{50} = 4.49 مكل/مل وبلغ الانحراف المعياري 0.28. بينما بلغ لليمونين الميمن IC_{50} = 2.51 مكل/مل وبلغ الانحراف المعياري 0.13.
- بينت الدراسة الإحصائية وجود فارق ذي دلالة إحصائية بين تأثير الليمونين الميمن والميسر **P<0.05**، وبالتالي فإن التأثير المثبط لليمونين الميمن على نمو المبيضات البيض أكبر من التأثير المثبط لليمونين الميسر وذلك عند المقارنة بالاعتماد على تراكيز IC_{50} .
- بينت الدراسة الإحصائية عند المقارنة بين تراكيز IC_{50} لدى كل من الليمونين الميمن والميسر وعينات الزيوت العطرية الثلاث وجود فوارق ذات دلالة إحصائية بين كل من

الليمونين الميمن والميسر وعينات الزيوت العطرية الثلاث، حيث كانت قيمة P من أجل جميع العينات أصغر من 0.05.

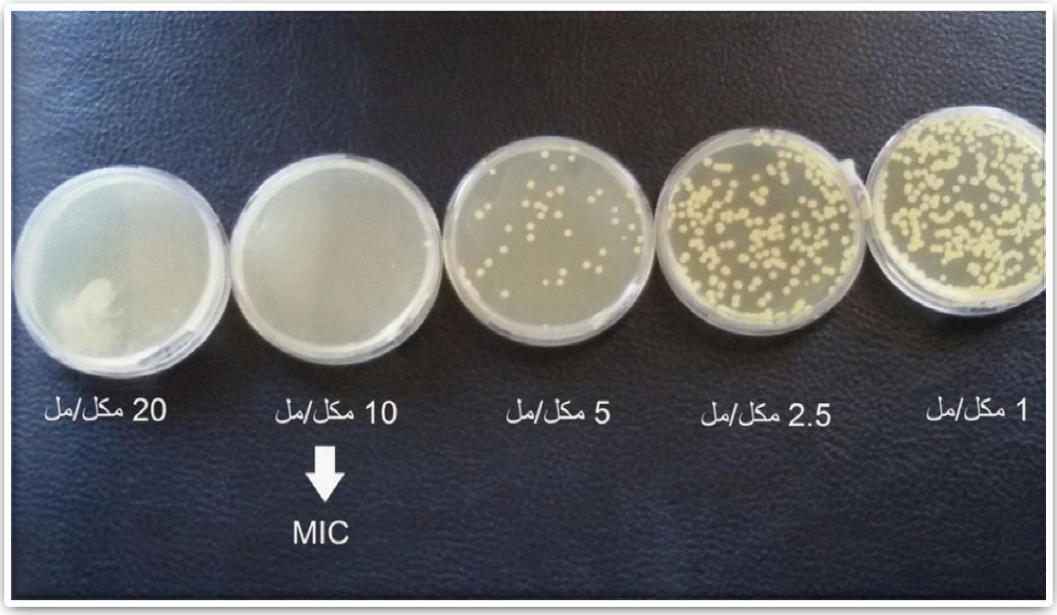
يوضح الجدول (**12**) كما توضح الأشكال (**21**) و (**22**) و (**23**) هذا التأثير، بينما توضح الجداول (**19**) و (**20**) والأشكال (**33**)، (**34**)، (**35**)، (**36**)، (**37**) و (**38**) الموجودة في الملاحق النتائج الرقمية لعدد المستعمرات، ومعادلة الخط البياني للعلاقة بين تركيز الليمونين ونسبة تثبيط النمو الفطري حيث استخدمت المعادلة لحساب IC_{50}.

الجدول (12) قيم IC_{50} و MIC والانحراف المعياري لكل من الليمونين الميمن والميسر والفلوكونازول

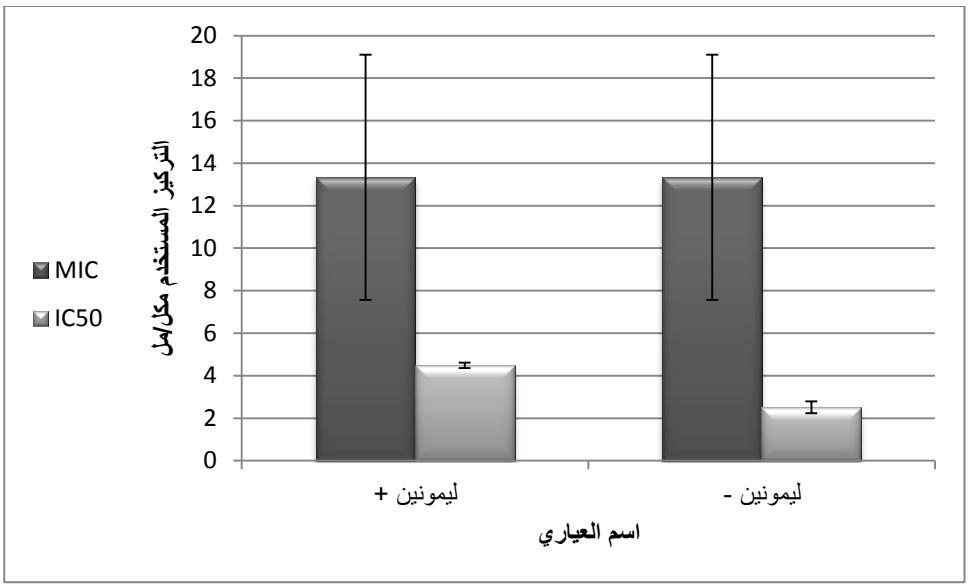
المادة المدروسة	الليمونين الميسر	الليمونين الميمن	الفلوكونازول
متوسط تركيز IC_{50} (مكل/مل)	4.49	2.51	لم يتم تحديده
الانحراف المعياري	0.28	0.13	-
متوسط تركيز MIC (مكل/مل)	13.33	13.33	40
الانحراف المعياري	5.77	5.77	0



الشكل (21) التركيز الأدنى المثبط لنمو الفطريات لليمونين (+) - التجربة الثالثة - (التقاط الباحثة)



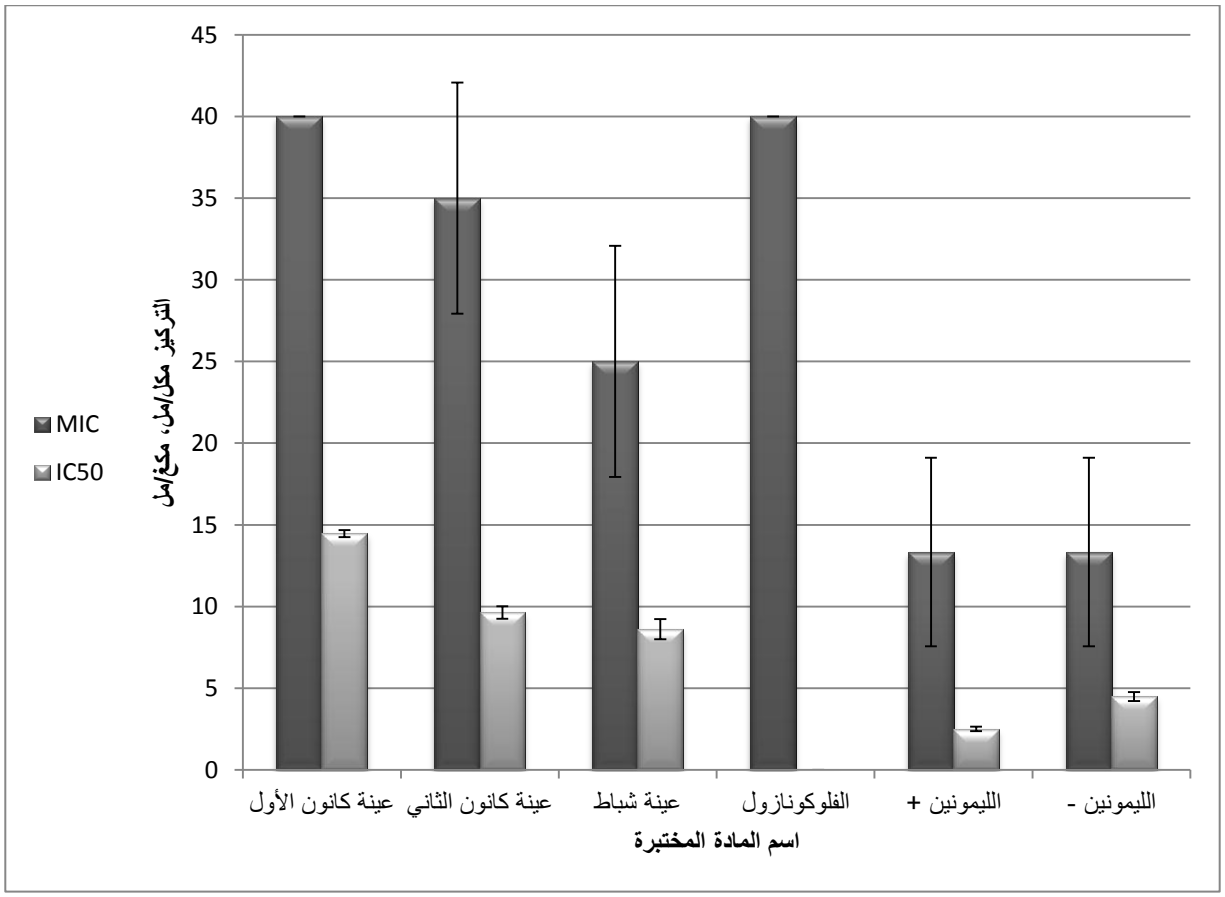
الشكل (22) التركيز الأدنى المثبط لنمو الفطريات لليمونين (-) - التجربة الثالثة - (النقاط الباحثة)



الشكل (23) متوسط قيمة MIC و IC_{50} لكل من الليمونين الميمن والميسر مع الانحراف المعياري

نستنتج مما سبق أن عينات الزيت العطري جميعها تمتلك تأثيراً مثبطاً لنمو فطر المبيضات البيض، وهذا التأثير لا يختلف حسب الشهر الذي تم فيه جني النبات عند المقارنة بين تراكيز MIC، كما أن هذا التأثير مساوي لتأثير الفلوكونازول. أما عند المقارنة بالاعتماد على تراكيز **IC_{50}**، فقد كان التأثير المثبط لنمو فطر المبيضات البيض لعينتي شهر كانون الثاني وشهر شباط متساوياً وكان هذا التأثير يفوق تأثير عينة شهر كانون الأول.

كما يمتلك الليمونين بنوعيه تأثيراً مثبطاً لنمو فطر المبيضات البيض يفوق تأثير الفلوكونازول ويفوق تأثير عينة شهر كانون الأول، ولكنه مساوي لتأثير كل من عينتي شهر كانون الثاني وشهر شباط وذلك عند المقارنة بالاعتماد على تراكيز MIC. أما عند المقارنة بالاعتماد على تراكيز **IC_{50}**، فقد كان التأثير المثبط لليمونين الميمن على نمو المبيضات البيض أكبر من تأثير الليمونين الميسر، كما كان تأثير الليمونين بنوعيه أكبر من تأثير عينات الزيوت العطرية الثلاث. كما يوضح الشكل (**24**).



الشكل (24) مقارنة التأثير المثبط لنمو الفطريات لجميع العينات بالاعتماد على تراكيز MIC و IC_{50}

8 المناقشة Discussion:

إنّ الهدف من هذا البحث هو دراسة تغير مردود و تركيب الزيت العطري لثمار النارنج خلال أشهر النضج الثلاثة وذلك تبعاً لتغيرات المناخ بالإضافة إلى دراسة التأثير المثبط لنمو فطر المبيضات البيض لكل من عينات الزيت العطري الثلاث والليمونين (المركب الأساسي الذي يدخل في تركيب الزيت) وذلك بالمقارنة مع الفلوكونازول.

8.1 دراسة تغير تركيب الزيت العطري تبعاً لتغيرات المناخ:

8.1.1 استخلاص عينات نبات النارنج:

- تراوح مردود الزيت العطري لقشور ثمار النارنج خلال الأشهر الثلاثة من فترة النضج بين 0.98-1.36%.

بالعودة إلى الدراسات العالمية، وجدنا تفاوتاً كبيراً في مردود الزيت العطري المستخلص من قشور ثمار النارنج بين الأبحاث المجراة في مناطق مختلفة من العالم.

كان مردود الزيت العطري في بعض الدراسات العالمية متوافقاً مع مردود الزيت العطري في دراستنا، حيث تراوح المردود في الدراسة التي أجراها .Boussaada et al في تونس، بين 0.8-1.3%[71]، كما كان المردود في دراسة .Sarrou et al في اليونان 1.67 % [15].

في دراسات أخرى كان مردود الزيت العطري لقشور النارنج أقل بكثير من مردود الزيت العطري في دراستنا، حيث كان المردود في دراسة .ESSADIK et al في المغرب 0.3% [72]، وتراوح المردود في الدراسة التي أجراها .Bourgou et al في تونس، بين 0.12-0.46% [73].

وكان مردود الزيت العطري في بعض الدراسات أكبر بكثير من مردود الزيت العطري في دراستنا، حيث بلغ المردود في دراسة .Odehet al في سوريا 2.1- 2.5% [20]، وبلغ في دراسة .Sharma et al في الهند 2% [74].

قد يعود السبب في تفاوت المردود إلى اختلاف المناخ والتربة في البلد الذي تم فيه جني النبات، وإلى اختلاف درجات الحرارة والرطوبة في السنة التي أجرى بها الباحث دراسته عن درجات الحرارة والرطوبة في السنة التي أجريت بها دراستنا. وكذلك القسم المستعمل من النبات وطريقة استخلاصه، فقد يعود سبب الحصول على مردود منخفض جداً في دراسة .Bourgou et al في تونس، إلى استخدام الباحث طبقة القشور البرتقالية (Flavedo) والبيضاء (Albedo)، مع ملاحظة أن الطبقة

البيضاء لا تحتوي على زيت عطري مما سبب انخفاض المردود [73]. بينما استعمل الباحث في دراسة Sharma et al. في الهند قشور النارنج المجففة وليست الطازجة مما أدى إلى ارتفاع المردود [74] .

- أعطت العينة التي تم استخلاصها في الشهر الثاني من فترة النضج (شهر كانون الثاني) أعلى مردود للزيت العطري (1.36%)، بينما كان مردود عينة الشهر الثالث من فترة النضج (شهر شباط) هو الأقل (0.98%). ولدى العودة للتغيرات المناخية بين الأشهر الثلاثة، لاحظنا انخفاض درجة الحرارة في شهر كانون الثاني (سجل معدل الحرارة الجافة 7.7°) وزيادة الرطوبة النسبية (63%) وذلك بالمقارنةً مع شهر كانون الأول وشهر شباط. من جهة أخرى، لاحظنا ارتفاع درجة الحرارة (سجل معدل الحرارة الجافة 11.2°) وانخفاض الرطوبة النسبية (53%) في شهر شباط.

يعزى ذلك لاختلاف نسبة تبخر الزيت العطري. حيث تساعد الحرارة المنخفضة والرطوبة المرتفعة على منع تبخر الزيت العطري، بينما تزداد نسبة تبخر الزيت العطري بارتفاع درجة الحرارة و انخفاض الرطوبة.

كانت هذه النتائج متوافقة مع دراسة أجراها Olle et al في استونيا على نباتات من الفصيلة المظلية، حيث أكد أن نسبة الزيت العطري في النبات تزداد مع انخفاض درجة الحرارة [75].

8.1.2 تحليل مكونات الزيت العطري:

- أظهر تحليل العينات باستخدام GC-MS أن المكون الأساسي للزيت العطري لقشور النارنج هو الليمونين، حيث تراوحت نسبته بين 87.2- 89.58% من مكونات الزيت العطري، يليه البيتامرسين بنسبة تراوحت بين 4.18-4.42%.
- كما احتوى الزيت العطري على مركبات مختلفة بنسب متفاوتة منها: (اللينالول، أوكسيد اللينالول، ألفا بينين، سابينين).

جاءت هذه النتيجة متوافقة مع العديد من الدراسات العالمية. ففي دراسة قامت بها Soković et al. في صربيا، كان المكون الأساسي لزيت قشور النارنج هو الليمونين بنسبة 90% [1]. وفي دراسة قام بها ESSADIK et al. في المغرب، كان الليمونين هو المكون الرئيسي لزيت قشور النارنج بنسبة 90.90 %، يليه اللينالول بنسبة 2.52% [72].

بينما كانت نسبة الليمونين في دراسة Costa et al. في البرازيل 98.66%، ونسبة البيتا مرسين 0.53% [35].

شكل الليمونين في دراسة Boussaada et al في تونس (87-92.2%)، والألفا بينين (0.3-0.4%)، والبيتامرسين (1.4-1.7%)، واللينالول (0.6-1.3%) [71]. كما تراوحت نسبة الليمونين في الدراسة التي قام بها .Odeh et al في سوريا (96- 97.5%) [20].

نلاحظ أن المكون الأساسي في نتائج جميع الدراسات السابقة هو الليمونين مع اختلافات في نسبته قد تعود إلى تأثير العوامل البيئية والتربة في مكان إجراء البحث.

- بالعودة إلى الجدول (**9**) الذي يوضح نسب الليمونين في دراستنا خلال الأشهر الثلاثة، نلاحظ أن الليمونين يزداد بشكل طفيف مع زيادة نضج النبات، ويكون ذلك على حساب تناقص باقي المكونات التي تنخفض بشكل واضح عند زيادة الليمونين.

جاءت هذه النتيجة متوافقة مع دراسة Boussaada et al [71] التي بينت أن الليمونين يزداد على حساب تخرب اللينالول ومشتقاته. في دراسة أخرى أجراها .Rowshan et al في إيران أكد تزايد نسبة الليمونين في قشور ثمار النارنج مع زيادة نضج النبات ليصل إلى أعلى مستوى عند اكتمال نضج النبات [76]. كما بينت دراسة .Bourgou et al في تونس، أن الليمونين يصل إلى أعلى مستوياته في المرحلة الأخيرة من فترة النضج[73].

8.2 دراسة التأثير المثبط لنمو فطريات المبيضات البيض للزيت العطري المستخلص من قشور نبات النارنج ولمعياري الليمونين الميمن (+) والميسر (-) و للفلوكونازول:

8.2.1 اختيار المحل المناسب لتمديد الزيت العطري والليمونين المعياري:

- أظهرت النتائج عدم إمكانية استخدام كل من ثنائي ميتيل السلفوكسيد DMSO والميتانول كمحل نظراً لامتلاكهما تأثيراً مثبطاً لنمو فطر المبيضات البيض، حيث بلغ التركيز الأدنى المثبط لنمو المبيضات البيض لثنائي ميتيل السلفوكسيد MIC = 5%، بينما لم يكن له أي تأثير عندما يكون تركيزه النهائي في الوسط الزرعي 1% أو أقل، وبلغ التركيز الأدنى المثبط لنمو المبيضات البيض للميتانول MIC = 10%، بينما لم يكن له أي تأثير عندما يكون تركيزه النهائي في الوسط الزرعي 2.5% أو أقل. كما أوضحت النتائج عدم إمكانية استخدام المحلات السابقة على شكل مزيج مع الماء المقطر نظراً لكونها لاتساعد على امتزاج الزيت العطري والليمونين مع الماء المقطر ضمن التراكيز المستخدمة.

جاءت هذه النتيجة بالتوافق مع دراسة Randhawa et al التي أجريت في الولايات المتحدة الأمريكية لتحري تأثير ثنائي ميتيل السلفوكسيد المثبط لنمو الفطريات، حيث أكد أن تركيز 10% من

ثنائي ميتيل السلفوكسيد يسبب تثبيطاً كاملاً لنمو المبيضات البيض، بينما لم يكن للتركيز 1.25% أي تأثير [77].

في دراسة أخرى أجراها Desiree et al في الكاميرون على نبات الشيح الحولي Artemisia annua، أكد أن تأثير الزيت العطري لنبات الشيح الحولي المثبط لنمو فطر المبيضات البيض يزداد بإضافة DMSO بتركيز 10%، وذلك عند استخدام طريقة الانتشار بالآغار Agar diffusion، حيث بلغ قطر التثبيط للزيت العطري بدون DMSO 30 ملم، وبلغ مع استخدام DMSO بتركيز 10% 36 ملم [78].

- ساعدت إضافة التوين 80 إلى الماء بحيث يكون تركيزه النهائي في مستنبت الزرع 0.5% على استحلاب الزيت العطري بشكل جيد مع الماء ومن ثم امتزاجه مع وسط SDA بشكل متجانس دون أن يكون له أي تأثير مثبط لنمو فطر المبيضات البيض.

جاءت هذه النتيجة متوافقة مع الدراسة التي أجراها .Inouye et al في اليابان، حيث بين أن إضافة التوين 80 بتركيز 0.5% إلى العديد من مكونات الزيوت العطرية (منها الليمونين واللينالول وألدهيد القرفة) لم يكن لها أي تأثير على تركيز MIC وذلك عندما استخدمت طريقة التمديد بالآغار (وهي نفس الطريقة المتبعة في بحثنا)[79].

في دراسة أجراها Matsuzaki et al في اليابان باستخدام طريقة التمديد الميكروني بالمرق Broth microdilution method، أوضح أن التركيز الأدنى المثبط لنمو الفطريات MIC ينخفض عند إضافة التوين 80 وذلك بالنسبة للعديد من الزيوت العطرية المستخلصة من نبات اكليل الجبل والخزامى، بينما لم يكن لإضافته أي تأثير في تركيز MIC لزيت الكافور، مما يأكد أن تأثير التوين 80 على تركيز MIC يختلف حسب الزيت العطري المستخدم وحسب الطريقة المتبعة لتقدير MIC [80].

8.2.2 دراسة التأثير المثبط لنمو الفطريات للفلوكونازول

- بلغ متوسط تركيزالفلوكونازول الأدنى المثبط لنمو فطر المبيضات البيض MIC= 40 ±0 مكغ/مل.

جاءت هذه النتيجة بالتوافق مع مرجع ELLIS et al، الذي بين أن تركيز الفلوكونازول الأدنى المثبط لنمو فطر المبيضات البيض يتراوح بين 0.03-64 مكغ/مل[81].

8.2.3 دراسة التأثير المثبط لنمو فطريات المبيضات البيض لعينات الزيوت العطرية غير المنحلة بالماء باستخدام مزيج من الماء المقطر والتوين 80

- أظهرت جميع عينات الزيت العطري لقشور ثمار النارنج للأشهر الثلاثة تأثيراً مثبطاً لنمو فطر المبيضات البيض دون وجود فوارق ذات دلالة احصائية مع تأثير الفلوكونازول، ولم يكن هناك فوارق ذات دلالة احصائية بين تأثير العينات حسب شهر الجني، وذلك عند المقارنة بالاعتماد على تراكيز MIC.

أظهرت نتائج العديد من الدراسات العالمية التأثير المثبط لنمو فطريات المبيضات البيض للزيت العطري المستخلص من أزهار وأوراق النارنج، وأعطى الزيت السابق تأثيراً مثبطاً لنمو فطر المبيضات البيض يقارب تأثير مضاد الفطريات المعياري المستخدم (النستاتين Nystatin)[13] [30]، بينما لم يتم التطرق إلى تأثير الزيت العطري المستخلص من قشور ثمار النارنج.

في دراسة أجراها .Verma et al في الهند على الزيت العطري المستخلص من قشور النارنج، أظهر الزيت العطري طيف تأثير واسع ضد فطري الرشاشية السوداء *Aspergillus niger* والمبيضات التَّيرَبِيَّة *Geotrichum candidum*، بينما لم يدرس تأثيره على فطريات المبيضات البيض[31]. وفي دراسة أجراها .KIRBAŞLAR et al في تركيا على مجموعة زيوت عطرية مستخلصة من جنس الحمضيات Citrus، أظهر الزيت العطري لقشور النارنج تأثيراً مثبطاً لنمو فطريات المبيضات البيض بقطر تثبيط أقل من قطر التثبيط الناتج عن مضاد الفطريات المعياري المستخدم (الكيتوكونازول Ketoconazole)، وذلك عند استخدام طريقة الانتشار بالأقراص Paper disk diffusion [82].

- عند المقارنة بالاعتماد على تراكيز $\mathbf{IC_{50}}$ بين عينات الزيوت العطرية المستخلصة خلال ثلاثة أشهر من فترة النضج كان تأثير عينة شهر كانون الأول أقل من تأثير كل من عينتي شهر كانون الثاني وشباط.

بالعودة إلى الجدول (**9**) نلاحظ تناقص نسبة الليمونين Limonene بشكل طفيف في عينة شهر كانون الأول بالمقارنة مع عينتي كانون الثاني وشباط ونلاحظ عدم تواجد مركب خلات النيريل Neryl acetate في عينة شهر كانون الأول، بينما يتواجد مركب خلات اللينالیل Linalyl acetate فقط في العينة السابقة، بالإضافة إلى اختلاف طفيف في نسب باقي المركبات الثانوية الداخلة في تركيب الزيت العطري.

في دراسة قام بها .Ellouze et al في تونس على الزيت العطري المستخلص من أوراق النارنج، أكد أن الاختلاف في نسب المركبات الثانوية الداخلة في تركيب الزيت العطري نتيجة التغيرات المناخية يؤثر على الفاعلية المضادة للمكروبات Antimicrobial effect لهذا الزيت العطري[30].

8.2.4 دراسة التأثير المثبط لنمو فطريات المبيضات البيض لمعياري الليمونين الميمن (+) والميسر (-) باستخدام مزيج من الماء المقطر والتوين 80

- أظهرت النتائج أن لكل من الليمونين الميمن والميسر تأثيراً مثبطاً لنمو فطرالمبيضات البيض بشكل متشابه (**MIC= 13.33 ± 5.77 µl/ml**)، وكان هذا التأثير أكبر من تأثير الفلوكونازول. وبمقارنة التراكيز المثبطة لنصف المستعمرات، وجدنا أن التأثير المثبط لليمونين الميمن على نمو المبيضات البيض (**IC_{50}= 2.51 ± 0.13 µl/ml**) أكبر من التأثير المثبط لليمونين الميسر (**IC_{50}= 4.49 ± 0.28 µl/ml**).

جاءت هذه النتيجة متوافقة مع دراسات عالمية، حيث بلغ التركيز الأدنى المثبط لنمو المبيضات البيض لليمونين الميمن (+) في دراسة أجراها .ORHAN et al في تركيا MIC= 8 µg/ ml [83].

كما أوضح .Omran et al في دراسة أجراها في إيران أن لكل من الليمونين الميمن والميسر تأثيراً مثبطاً لنمو المبيضات البيض، ولكن تأثير الليمونين الميسر كان أكبر. وهذا لا يتوافق مع نتيجة دراستنا، ربما يعود السبب في ذلك إلى اختلاف الطريقة التي اتبعها الباحث عن طريقة بحثنا، حيث قام الباحث بدراسة التأثير المثبط لنمو الفطريات بطريقة الانتشار في آبار الآغار Agar well diffusion وبطريقة الانتشار بالأقراص Paper disk diffusion، أما طريقتنا فهي التمديد في الآغار Agar dilution، وقد يعود السبب أيضاً إلى اختلاف مصدر فطرالمبيضات البيض المستخدم، حيث تم عزله من المهبل في الدراسة السابقة، بينما تم عزله من البراز في دراستنا [84].

- كان التأثير المثبط لنمو الفطريات لليمونين بنوعيه الميمن والميسر يفوق تأثير عينة الزيت العطري المستخلصة في شهر كانون الأول، بينما كان التأثير مشابه لتأثير كل من عينتي الزيت العطري المستخلصة في شهر كانون الثاني وشباط وذلك عند المقارنة بالاعتماد على تراكيز MIC، أما عند المقارنة بالاعتماد على تراكيز **IC_{50}** فقد وجد أن تأثير الليمونين بنوعيه المثبط لنمو المبيضات البيض أكبر من تأثير جميع عينات الزيوت العطرية الثلاث. مما يدل على أن المواد الأخرى الداخلة في تركيب الزيت العطري قللت من فاعلية الليمونين المثبطة لنمو فطر المبيضات البيض.

في دراسة أجراها .Rao et al في الولايات المتحدة الأمريكية على التأثير المثبط لنمو فطر المبيضات البيض لكل من زيت الأوريغانو العطري oregano oil و الكارفاكرول carvacrol

(المكون الرئيسي للزيت العطري)، كان الكارفاكرول ذو فاعلية أكبر من فاعلية زيت الأوريغانو العطري، حيث أكد Rao وجود تأثير تضادِّي (تثبيطي) antagonist effect بين الكارفاكرول والمواد الأخرى الداخلة في تركيب الزيت[85].

أيضاً في دراسة أجراها .SOKOVIĆ et al في صربيا على التأثير المثبط لنمو الفطريات لكل من الزيت العطري المستخلص من قشور ثمار النارنج والليمونين وذلك على فطريات الشَّعْرَوِيَّةُ الحَمْراء Trichophyton rubrum، وجد أن فاعلية الليمونين المثبطة للفطر أكبر من فاعلية الزيت العطري حيث كانت قيمة MIC لليمونين (MIC =5 µl/ml)، بينما كانت للزيت العطري (MIC 8 µl/ml) [86]

- إن آلية التأثير المثبطة لفطر المبيضات البيض لكل من الزيت العطري لقشور ثمار النارنج والليمونين لا تزال غير معروفة بشكل دقيق، ولكن دُرِست آلية التأثير المثبطة لفطر المبيضات البيض لبعض الزيوت العطرية في أبحاث عالمية عدة، وبينت هذه الدراسات أن الزيوت العطرية تعتمد فاعليتها المضادة للفطريات بشكل رئيسي على التأثير على الغشاء السيتوبلاسمي للخلية الفطرية.

ففي دراسة أجراها .Freires et al في البرازيل على الزيت العطري المستخلص من أوراق الكزبرة .Coriandrum sativum L (المركب الأساسي الذي يدخل في تركيبه هو الليناليول linalool)، أكد أن آلية تأثير هذا الزيت العطري المضاد لفطر المبيضات البيض تعتمد بشكل رئيسي على الارتباط مع إرغوستيرول ergosterol غشاء الخلية الفطرية، فتتغير نفوذية الغشاء وتؤدي بالتالي إلى موت الخلية الفطرية [63].

وفي دراسة أخرى أجراها .Chen et al في الصين على الزيت العطري المستخلص من بذور نباتُ الشِّبَث Anethum Graveolens (والذي يدخل في تركيبه بشكل أساسي الكارفون carvone والليمونين) أكد أن هذا الزيت العطري يستهدف بشكل أساسي الغشاء السيتوبلاسمي للخلية الفطرية لفطر المبيضات البيض[87] .

- تنبع أهمية دراستنا من كونها سلطت الضوء بشكل أكبر على مكونات الزيت العطري لقشور ثمار النارنج الذي ينمو في سوريا واختلاف مردود الزيت العطري وتركيبه حسب شهر جني العينة والتغيرات المناخية، كما درست التأثير المثبط لنمو فطر المبيضات البيض لهذا الزيت العطري، والذي تمت دراسته بطريقة التمديد بالآغارالتي سمحت لنا بحساب أدنى تركيز من الزيت العطري الذي يسبب تثبيطاً كاملاً لنمو الفطر **MIC**، كما سمحت لنا هذه الطريقة أيضاً بحساب أدنى تركيز من

الزيت العطري المثبط لنمو نصف المستعمرات الفطرية **IC_{50}**، وسمحت هذه الدراسة بتفسير تأثير الزيت العطري لقشور النارنج المثبط للمبيضات البيض والذي يعود بشكل أساسي لوجود الليمونين الذي ثبت امتلاكه تأثيراً مثبطاً لفطر المبيضات البيض.

9 الاستنتاجات Conclusions

1. يحتوي الزيت العطري لقشور ثمار النارنج المجموع من أشجار تنمو في مدنة دمشق على نسبة من الزيت العطري تتراوح بين 0.98-1.36%.
2. يزداد مردود الزيت العطري مع انخفاض درجة الحرارة الجافة وارتفاع الرطوبة النسبية، بينما تؤدي الحرارة المرتفعة والرطوبة المنخفضة إلى تناقص المردود.
3. يعتبر الليمونين المكون الأساسي لزيت قشور النارنج، وتزداد نسبته مع ازدياد نضج النبات على حساب تناقص باقي المكونات.
4. يبدأ نضج ثمار النارنج ابتداءاً من شهر كانون الأول وحتى شهر شباط. وإن الوقت المثالي لجني النبات يختلف حسب الهدف المرجو منه؛ فإذا كان الهدف مردود أكبر من الزيت العطري فيجنى النبات في الشهر ذي المتوسط الأدنى للحرارة والأكثر للرطوبة (وهو شهر كانون الثاني في دراستنا)، أما عندما يكون الهدف من الجني نسبة أكبر من الليمونين فيجنى النبات في الشهر الأخير من فترة النضج (شهر شباط)، حيث يكون الليمونين قد وصل إلى مستوياته العليا.
5. لا يمكن استخدام DMSO بتركيز أعلى من 1% والميتانول بتركيز أعلى من 2.5% عند دراسة التأثير المثبط لنمو فطر المبيضات البيض نظراً لكونهما يمتلكان تأثيراً مثبطاً لنمو هذا الفطر بالتراكيز السابقة، ويختلف هذا التأثير حسب نوع الفطر وحساسيته، كما لا يمكن استخدامهما بتراكيز أقل من ذلك على شكل مزيج مع الماء المقطر لأنها لا تساعد على امتزاج الزيت العطري مع الماء ضمن التراكيز المنخفضة.
6. ساعدت إضافة التوين 80 بحيث يكون تركيزه النهائي في الوسط 0.5% على استحلاب الزيت العطري وتوزعه بشكل متجانس ضمن وسط سابورو دكستروز آغار دون أن يكون له أي تأثير مثبط لنمو فطر المبيضات البيض ضمن التركيزالمستخدم.

7. يمتلك الزيت العطري المستخلص من قشور ثمار النارنج الذي تم جنيه في أي شهر من أشهر النضج تأثيراً مثبطاً لنمو فطر المبيضات البيض يشابه تأثير الفلوكونازول، ولكنه أقل من تأثير الليمونين.
8. تمت دراسة تأثير الليمونين الميمن والميسر لتفسير تأثير الزيت العطري ووجد أنه يمتلك تأثيراً مثبطاً لنمو فطر المبيضات البيض أكبر من تأثير الفلوكونازول، ووجد عند دراسة $\mathbf{IC_{50}}$ أن تأثير الليمونين الميمن أكبر من تأثير الليمونين الميسر.
9. تساهم المكونات الأخرى الداخلة في تركيب الزيت العطري بانخفاض تأثير الليمونين المثبط لنمو فطر المبيضات البيض.

10 المقترحات والتوصيات
Suggestions and Recommendations

1. دراسة التركيب الكيميائي والمردود والتأثير المثبط لنمو فطر المبيضات البيض للزيوت العطرية المستخلصة من أزهار وأوراق نبات النارنج الذي ينمو في سوريا، ومقارنتها مع تأثيرالزيت العطري لقشور الثمار.
2. جني ثمار النارنج من مناطق أخرى في سوريا مثل المناطق الساحلية والجبلية، ودراسة التركيب الكيميائي والمرود والتأثير المثبط لنمو فطر المبيضات البيض للزيت العطري المستخلص من قشور ثمار النارنج وربط ذلك بالعوامل المناخية والتربة.
3. دراسة تأثير الزيت العطري المستخلص من قشور ثمار النارنج المثبط لنمو فطريات أخرى مثل الرشاشيات *Aspergillus* وغيرها.
4. دراسة التأثير المثبط لنمو فطر المبيضات البيض للخلاصات المختلفة للقشرة البيضاء للنارنج (Albedo).
5. مشاركة المكونات الأخرى الداخلة في تركيب الزيت العطري لقشور ثمار النارنج مع بعضها، فقد لايكون التأثير ناتجاً بالضرورة عن مركب واحد، بل عن مشاركة مركبات عدة.

11ملخص البحث باللغة العربية:

جمعت ثلاث عينات من ثمار النارنج من مدينة دمشق خلال فترة نضج النبات وتم استخلاص الزيت العطري من قشور الثمار للعينات الثلاث. أجريت عملية تحليل مكونات الزيت العطري للعينات الثلاث السابقة باستخدام جهاز الكروماتوغرافيا الغازيّة ومتحري مطياف الكتلة GC-MS. تم تحديد حوالي 15 مركباً، وكان الليمونين هو المكون الأساسي (87.2 - 89.58%).

تمت دراسة التأثيرالمثبط لنمو الفطريات وذلك على فطر المبيضات البيض باستخدام طريقة التمديد في الآغار Agar dilution لكل من عينات الزيوت العطرية المستخلصة خلال الأشهر الثلاثة، وكذلك الليمونين المعياري بنوعيه الميمن والميسر، وذلك بالمقارنة مع المعياري المضاد للفطريات (الفلوكونازول).

أظهر الزيت العطري لقشور ثمار النارنج للعينات الثلاثة تأثيراً قوياً مثبطاً لنمو فطريات المبيضات البيض يشابه تأثير الفلوكونازول Fluconazole ، بينما كان تأثير الليمونين بنوعيه أكبر من تأثير الفلوكونازول.

12ملخص البحث باللغة الانكليزية

Three samples of the *Citrus aurantium* L. fruits were collected from Damascus during ripening stage and their peel oils were extracted.
The three samples of essential oils were analyzed by GC-MS. About 15 compounds were identified. Limonene was the main component (87.2-89.58%).

Antifungal effect was determined on *Candida albicans* by Agar dilution method for three samples of essential oils and the standard Limonene (R-S), compared with the standard antifungal (Fluconazole). The C*itrus aurantium* peel oils for three samples showed strong antifungal effect against *Candida albicans*, similar to the effect of fluconazole, and the two types of Limonene showed antifungal effect, more than the effect of Fluconazole.

13المراجع References:

1. Soković M, Glamočlija J, Marin P, Brkić D, Van Griensven L. Antibacterial Effects of the Essential Oils of Commonly Consumed Medicinal Herbs Using an In Vitro Model. *Molecules*. 2010;15:7532–7546.

2. Bassolé IHN, Juliani HR. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*. 2012;17(4):3989–4006.

3. Hyldgaard M, Mygind T, Meyer RL, Debabov D. Essential oils in food preservation : mode of action , synergies , and interactions with food matrix components. *Front. Microbiol.* 2012;3:1–24.

4. Tumane P M, Meshram V G, Wasnik D D. Comparative study of antibacterial activity of peel extracts of citrus aurantium L. (bitter orange) and citrus medical (lemon) against clinical isolates from wound infection. *Int J Pharm Bio Sci*. 2014;5(1):382–387.

5. Meléndez P a, Capriles V a. Antibacterial properties of tropical plants from Puerto Rico. *Phytomedicine*. 2006;13(4):272–276.

6. Dewick PM. Secondary metabolism: the building blocks and construction mechanisms. In: *Medicinal Natural Products*. 3rd ed.; 2009:7–38.

7. Hussain MS, Fareed S, Ansari S, Rahman MA, Ahmad IZ, Mohd S. Current approaches toward production of secondary plant metabolites. *J Pharm Bioallied Sci.* 2012;4(1):10–20.

8. Crozier A, Clifford MN. Terpenes. In: *Plant Secondary Metabolites Occurrence , Structure and Role in the Human Diet*.; 2006:47–94.

9. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils--a review. *Food Chem. Toxicol.* 2008;46(2):446–75.

10. Tracy T, Kingston R. Citrus aurantium. In: *Herbal Products: Toxicology and Clinical Pharmacology*. 2nd ed. Humana Press Inc.; 2007:233–244.

11. Evans WC, Evans D, Trease GE. Volatile oils and resins. In: *Trease and Evans Pharmacognosy*. 15th ed. W.B. Saunders; 2002:253–285.

12. Suryawanshi JAS. An overview of Citrus aurantium used in treatment of various diseases. *African J. Plant Sci.* 2011;5(7):390–395.

13. Haj Ammar A, Bouajila J, Lebrihi A, Mathieu F, Romdhane M, Zagrouba F. Chemical composition and in vitro Antimicrobial and Antioxidant Activities of citrus aurantium L. Flowers Essential Oil (Neroli Oil). *Pakistan J. Biol. Sci.* 2012;15(21):1034–1040.

14. Gruenwald J, Brendler T, Jaenicke C. Bitter Orange. In: *PDR for Herbal Medicines*.; 2000:338–339.

15. Sarrou E, Chatzopoulou P, Dimassi-Theriou K, Therios I. Volatile constituents and antioxidant activity of peel, flowers and leaf oils of Citrus aurantium L. growing in Greece. *Molecules*. 2013;18(9):10639–47.

16. Gaur R, Azizi M, Gan J, et al. Herbal Drugs and Herbal Drug Preparations:Bitter-Orange Flower Volume III. In: *British Pharmacopoeia*.; 2009:6787–6790.

17. Ramful D, Bahorun T, Bourdon E, Tarnus E, Aruoma OI. Bioactive phenolics and antioxidant propensity of flavedo extracts of Mauritian citrus fruits: potential prophylactic ingredients for functional foods application. *Toxicology*. 2010;278(1):75–87.

18. Zapata AD, Gaviria CA, Cavalitto SF, Hours RA, Rojano BA. Enzymatic maceration of albedo layer from sour orange (Citrus aurantium L .) with protopectinase-se and measurement of antioxidant activity of the obtained products. *LWT - Food Sci. Technol.* 2012;45(2):289–294.

19. Iglesias DJ, Cercós M, Colmenero-flores JM, et al. Physiology of citrus fruiting Review. *Braz. J. Plant Physiol.* 2007;19(4):333–362.

20. Odeh F, Rahmo A, Alnori S, Chaty E. THE CYTOTOXIC EFFECT OF ESSENTIAL OILS CITRUS AURANTIUM PEELS. *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.* 2012;1(6):1476–1487.

21. Karimi E, Hendra R, Oskoueian A, Z. H, E. Jaafar, Oskoueian E. Phenolic Compounds Characterization and Biological Activities of Citrus aurantium Bloom. *Molecules*. 2012;17:1203–1218.

22. Lagha-Benamrouche S, Madani K. Phenolic contents and antioxidant activity of orange varieties (Citrus sinensis L. and Citrus

aurantium L.) cultivated in Algeria: Peels and leaves. *Ind. Crops Prod.* 2013;50:723–730.

23. Ersus S, Cam M. Determination of organic acids, total phenolic content, and antioxidant capacity of sour Citrus aurantium fruits. *Chem. Nat. Compd.* 2007;43(5):607–609.

24. Lu Q, Yang L, Zhao H-Y, Jiang J-G, Xu X-L. Protective effect of compounds from the flowers of Citrus aurantium L. var. amara Engl against carbon tetrachloride-induced hepatocyte injury. *Food Chem. Toxicol.* 2013;62:432–435.

25. Onakpoya I, Davies L, Ernst E. Efficacy of herbal supplements containing Citrus aurantium and synephrine alkaloids for the management of overweight and obesity: a systematic review. *Focus Altern. Complement. Ther.* 2011;16(4):254–260.

26. Bahmani M, Eftekhari Z, Saki K, Fazeli-Moghadam E, Jelodari M, Rafieian-Kopaei M. Obesity Phytotherapy: Review of Native Herbs Used in Traditional Medicine for Obesity. *J. Evid. Based. Complementary Altern. Med.* 2015:1–7.

27. Stohs SJ, Preuss HG, Shara M. A review of the human clinical studies involving Citrus aurantium (bitter orange) extract and its primary protoalkaloid p-synephrine. *Int. J. Med. Sci.* 2012;9(7):527–38.

28. Stohs SJ. Problems with Citrus aurantium Information in “A Review on Botanical Species and Chemical Compounds with Appetite Suppressing Properties for Body Weight Control.” *Plant Food Hum Nutr*. 2013;68:329–331.

29. Bergonzelli GE, Donnicola D, Porta N, Corthe IE, Remy LM. Essential Oils as Components of a Diet-Based Approach to Management of Helicobacter Infection. *Am. Soc. Microbiol.* 2003;47(10):3240–3246.

30. Ellouze I, Abderrabba M, Sabaou N, Mathieu F, Lebrihi A, Bouajila J. Season’s variation impact on Citrus aurantium leaves essential oil: chemical composition and biological activities. *J. Food Sci.* 2012;77(9):173–80.

31. Verma RK, Chaurasia L, Kumar M. Antifungal activity of essential oils against selected building fungi. *Indian J. Nat. Prod. Resour.* 2011;2(4):448–451.

32. Majnooni M, Mansouri K, Gholivand M, Afnanzade N, Piriyaei M. Chemical composition, cytotoxicity and antioxidant activities of the essential oil from the leaves of Citrus aurantium L. *African J. Biotechnol.* 2011;11(2):498–503.

33. Park K Il, Park HS, Nagappan A, et al. Induction of the cell cycle arrest and apoptosis by flavonoids isolated from Korean Citrus aurantium L. in non-small-cell lung cancer cells. *Food Chem.* 2012;135(4):2728–2735.

34. Akhlaghi M, Shabanian G, Rafieian-Kopaei M, Parvin N, Saadat M, Akhlaghi M. Citrus aurantium blossom and preoperative anxiety. *Rev. Bras. Anestesiol.* 2011;61(6):702–712.

35. Costa C a R a, Cury TC, Cassettari BO, Takahira RK, Flório JC, Costa M. Citrus aurantium L. essential oil exhibits anxiolytic-like activity mediated by 5-HT(1A)-receptors and reduces cholesterol after repeated oral treatment. *BMC Complement. Altern. Med.* 2013;13.

36. Xing H, Zhang K, Zhang R, Shi H, Bi K, Chen X. Antidepressant-like effect of the water extract of the fixed combination of Gardenia jasminoides, Citrus aurantium and Magnolia officinalis in a rat model of chronic unpredictable mild stress. *Phytomedicine*. 2015;22(13):1178–85.

37. Kang SR, Park K Il, Park HS, et al. Anti-inflammatory effect of flavonoids isolated from Korea Citrus aurantium L. on lipopolysaccharide-induced mouse macrophage RAW 264.7 cells by blocking of nuclear factor-kappa B (NF-κB) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) signalling pathways. *Food Chem.* 2011;129(4):1721–1728.

38. Muthiah P. In vitro Xanthine Oxidase inhibitory activity of leaves, fruits and peel extracts of Citrus aurantium, Citrus limetta and Citrus lemon. *Int. J. Phytopharm.* 2012;2(3):77–80.

39. Ahangarpour A, Oroojan AA, Amirzargar A, Ghanavati M. Antispasmodic effects of Citrus aurantium flowers aqueous extract on uterus of non-pregnant rats. *Iran. J. Reprod. Med.* 2011;9(4):289–294.

40. Moraes TM, Kushima H, Moleiro FC, et al. Effects of limonene and essential oil from Citrus aurantium on gastric mucosa: role of prostaglandins and gastric mucus secretion. *Chem. Biol. Interact.* 2009;180(3):499–505.

41. Hamdan DI, Mahmoud MF, Wink M, El-Shazly AM. Effect of hesperidin and neohesperidin from bittersweet orange (Citrus aurantium var. bigaradia) peel on indomethacin-induced peptic ulcers in rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2014;37(3):907–15.

42. Osfor M, Hegazy A, Abd El-moaty M, Elmadbouly M, Afify A, Elbahnasawy AS. Hypo-Cholesterolemic and Hypoglycemic Effects of Orange Albedo Powder (Citrus Aurantium L.) on Male Albino Rats. *Int. J. Nutr. Food Sci.* 2013;2(2):70–76.

43. Sharma M, Fernandes J, Ahirwar D, Jain R. HYPOGLYCEMIC AND HYPOLIPIDIMIC ACTIVITY OF ALCOHOLIC EXTRACT OF CITRUS AURANTIUM IN NORMAL AND ALLOXAN-INDUCED DIABETIC RATS . *pharmacologyonline*. 2008;3:161–171.

44. Jia S, Hu Y, Zhang W, et al. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of neohesperidin derived from Citrus aurantium L. in diabetic KK-A(y) mice. *Food Funct.* 2015;6(3):878–86.

45. Azanchi T, Pouriaee H, Shafaroodi H, Asgarpanah J. The anticonvulsant effect of Citrus aurantium flowers. *Res. Pharm. Sci.* 2012;7(5).

46. Richardson MD, Warnock DW. Introduction. In: *Fungal Infection Diagnosis and Management*. 4th ed.; 2012:1–11.

47. Hanson JR. Fungi and the Development of Microbiological Chemistry. In: *The Chemistry of Fungi*.; 2008:1–15.

48. Kavanagh K, Sullivan D, Coleman D, Moran G. Fungal Diseases of Humans. In: *Fungi Biology and Applications*.; 2005:171–190.

49. Spampinato C, Leonardi D. Review Article: Candida Infections , Causes , Targets , and Resistance Mechanisms : Traditional and Alternative Antifungal Agents. *Biomed Res. Int.* 2013:1–13.

50. Campbell CK, Johnson EM. Identification of Yeasts. In: *IDENTIFICATION OF PATHOGENIC FUNGI*. second ed.; 2013:263–304.

51. Campbell CK, Johnson EM. Identification of Fungi in Sections, Smears and Body Fluids. In: *IDENTIFICATION OF PATHOGENIC FUNGI*. second ed.; 2013:305–321.

52. Wingard JR, Anaissie EJ. Impact of Invasive Fungal Infection on Patients Undergoing Solid Organ Transplantation. In: *Fungal Infections in the Immunocompromised Patient*.; 2005:45–74.

53. Richardson MD, Warnock DW. Chapter3: Antifungal drugs. In: *Fungal Infection Diagnosis and Management*. 4th ed.; 2012:32–89.

54. Kavanagh K, Abu-Elteen KH, Hamad M. Antifungal Agents for Use in Human Therapy. In: *Fungi Biology and Applications*.; 2005:191–217.

55. Rai M, Razzaghi-abyaneh M. Antifungal Activities of Plants and Other Natural Products. In: *Antifungal Metabolites from Plants*.; 2013:157–302.

56. Hussin NM, Muse R, Ahmad S, et al. Antifungal activity of extracts and phenolic compounds from Barringtonia racemosa L . (Lecythidaceae). *African J. Biotechnol.* 2009;8(12):2835–2842.

57. Winkelhausen E, Pospiech R, Laufenberg G. Antifungal activity of phenolic compounds extracted from dried olive pomace. *Bull. Chem. Technol. Maced.* 2005;24(1):41–46.

58. Barro N, ZERBO P, KONATÉ K, OUÉDRAOGO M, PATRICK VD. ANTIOXIDANT AND ANTIFUNGAL PROFILES OF PHENOL ACID RICH-FRACTIONS FROM SIDA URENS L. AGAINST MYCELIA GROWTH INHIBITION OF SOME ASPERGILLUS AND FUSARIUM SPECIES. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2014;6(1):174–178.

59. Orhan DD, Ozçelik B, Ozgen S, Ergun F. Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids. *Microbiol. Res.* 2010;165(6):496–504.

60. Edziri H, Mastouri M, Mahjoub MA, Mighri Z, Mahjoub A, Verschaeve L. Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of two flavonoids from Retama raetam flowers. *Molecules*. 2012;17(6):7284–93.

61. THORMAR H. Chemistry and Bioactivity of Essential Oils. In: *Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents*.; 2011:204–223.

62. Bersan SMF, Galvão LCC, Goes VFF, et al. Action of essential oils from Brazilian native and exotic medicinal species on oral biofilms. *BMC Complement. Altern. Med.* 2014;14(451):1–12.

63. Freires IDA, Mendonc R, Alencar SM De, et al. Coriandrum sativum L . (Coriander) Essential Oil : Antifungal Activity and Mode of Action on Candida spp ., and Molecular Targets Affected in Human Whole-Genome Expression. *PLoS One*. 2014;9(6).

64. Gauch L, Silveira-gomes F, Esteves RA, et al. Effects of Rosmarinus offi cinalis essential oil on germ tube formation by Candida albicans isolated from denture wearers. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2014;47(3):389–391.

65. Kamble VA. In vitro Anti-Fungal Activity of Cuminum cyminum (Cumin Seed) Essential Oil against Clinical Isolates of Candida Species. *Am. J. Phytomedicine Clin. Ther.* 2015;3:264–275.

66. Thosar N, Basak S, Bahadure RN, Rajurkar M. Antimicrobial efficacy of five essential oils against oral pathogens: An in vitro study. *Eur. J. Dent.* 2013;7(1):71–77.

67. Marcos-arias C, Eraso E, Madariaga L, Quindós G. In vitro activities of natural products against oral Candida isolates from denture wearers. *BMC Complement. Altern. Med.* 2011;11(1):119.

68. Jing L, Lei Z, Li L, et al. Antifungal Activity of Citrus Essential Oils. *J. Agric. Food Chem.* 2014:1–76.

69. Alpaslan Kaya D, Arslan M, Rusu L. EFFECTS OF HARVESTING HOUR ON ESSENTIAL OIL CONTENT AND COMPOSITION OF THYMUS VULGARIS. *Farmacia*. 2013;61(6):1194–1203.

70. Njoroge SM, Ukeda H, Sawamura M. Changes of the volatile profile and artifact formation in Daidai (Citrus aurantium) cold-pressed peel oil on storage. *J. Agric. Food Chem.* 2003;51(14):4029–35.

71. Boussaada O, Chemli R. Seasonal Variation of Essential Oil Composition of Citrus Aurantium L. var. amara. *J. Essent. Oil Bear. Plants*. 2007;10(2):109–120.

72. Essadik FZ, Haida S, Kribii A, Kribii AR, Ounine K. Antioxidant activity of Citrus aurantium L. var. amara Peel from western of Morocco, identification of volatile compounds of its essential oil by GC-MS and a preliminary study of their antibacterial activity. *Int. J. Innov. Sci. Res.* 2015;16(2):425–432.

73. Bourgou S, Rahali FZ, Ourghemmi I, Saïdani Tounsi M. Changes of peel essential oil composition of four Tunisian citrus during fruit maturation. *ScientificWorldJournal.* 2012.

74. Sharma D, Vashist H. Hydrodistillation and Comparative Report of Percentage Yield on Leaves and Fruit Peels from Different Citrus Plants of Rutaceae Family. *J. Plant Sci.* 2015;10(2):75–78.

75. Olle M, Bender I. The content of oils in umbelliferous crops and its formation. *Agron. Res.* 2010;8(Iii):687–696.

76. Rowshan V, Najafian S. Changes of Peel Essential Oil Composition of Citrus aurantium L. During Fruit Maturation in Iran. *J. Essent. Oil Bear. Plants*. 2015;18(4):1006–1012.

77. Randhawa M. Dimethyl Sulfoxide (DMSO) Inhibits the Germination of Candida albicans and the Arthrospores of Trichophyton mentagrophytes. *Jpn. J. Med. Mycol.* 2008;49:125–128.

78. Désirée C, René F, Jonas K. Antibacterial and Antifungal Activity of the Essential Oil Extracted by Hydro-Distillation from Artemisia annua Grown in West-Cameroon. *Br. J. Pharmacol. Toxicol.* 2013;4(3):89–94.

79. Inouye S, Tsuruoka T, Uchida K, Yamaguchi H. Effect of Sealing and Tween 80 on the Antifungal Susceptibility Testing of Essential Oils. *Microbiol.Immunol.* 2001;45(3):201–208.

80. Matsuzaki Y, Kakinoki Y, Nakamura M, Nishihara T, Tsujisawa T. Lamiaceae Peppermint Oil with Surfactant Showing Equal Antifungal Activity against Candida albicans to Rosemary Chemotype CINEOL. *SciRes*. 2014;(4):58–65.

81. ELLIS D, DAVIS S, ALEXIOU H, HANDKE R, BARTLEY R. Candida albicans (Robin) Berkhout. In: *Descriptions of medical fungi*. 2nd ed. AUSTRALIA: Mycology Unit; 2007:22.

82. KIRBAŞLAR FG, TAVMAN A, DÜLGER B, TÜRKER G. ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF TURKISH CITRUS PEEL OILS. *Pak. J. Bot.* 2009;41(6):3207–3212.

83. Orhan İE, ÖzçelİK B, Kartal M, Kan Y. Antimicrobial and antiviral eff ects of essential oils from selected Umbelliferae and Labiatae plants and individual essential oil components. *Turk J Biol*. 2012;36:239–246.

84. Omran S, Moodi M, Mohammad S, Amiri B, Mosavi S, Ghazi S. The Effects of Limonene and Orange Peel Extracts on Some Spoilage Fungi. *Int. J. Mol. Clin. Microbiol.* 2011;1:82–86.

85. Rao A, Zhang Y, Muend S, Rao R. Mechanism of Antifungal Activity of Terpenoid Phenols Resembles Calcium Stress and Inhibition of the TOR Pathway . *Am. Soc. Microbiol.* 2010;54(12):5062–5069.

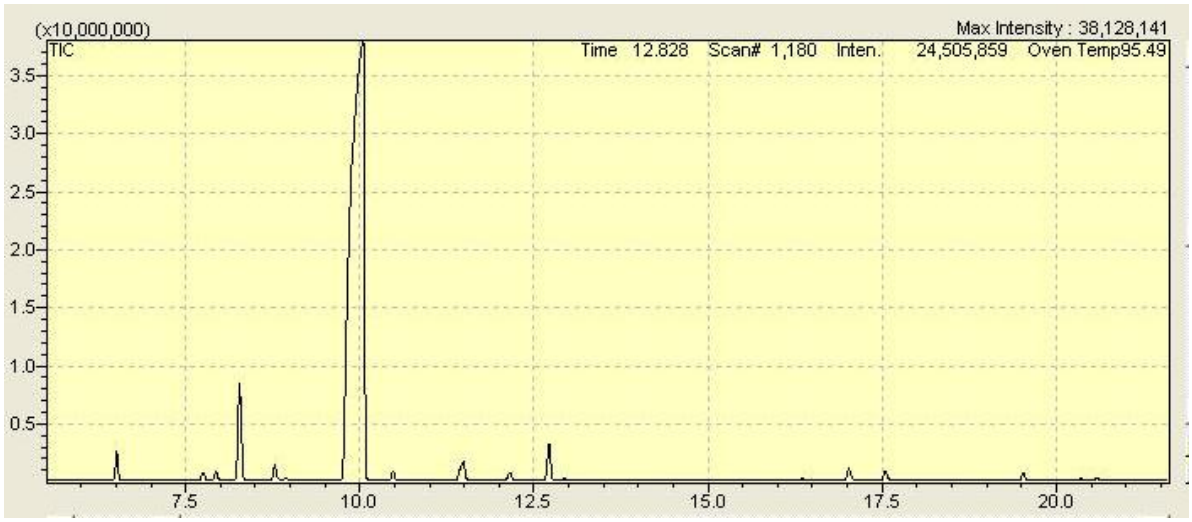
86. SOKOVIC M, GLAMOČLIJA J, ĆIRIĆ A, Brkić D. ANTIFUNGAL ACTIVITY OF THE ESSENTIAL OILS AND COMPONENTS IN VITRO AND IN VIVO ON EXPERIMENTALLY INDUCED DERMATOMYCOSES AT RATS. *Dig. J. Nanomater. Biostructures*. 2012;7(3):959–966.

87. Chen Y, Zeng H, Tian J, Ban X, Ma B, Wang Y. Antifungal mechanism of essential oil from Anethum graveolens seeds against Candida albicans. *J. Med. Microbiol.* 2013:1175–1183.

88. الوائلي أ، حرف النون، موسوعة الغذاء دواء، محلاتي، 2005، صفحة 354-356

89. إبراهيم ع ، خليف م، تقسيم النبات، الموالح- زراعتها ورعايتها وإنتاجها، الطبعة الأولى، 1997: صفحة 47-87

14 الملحق Appendix



الشكل (25) مخطط GC-MS لعينة الزيت العطري المستخلصة في شهر كانون الأول.

الشكل (26) مخطط GC-MS لعينة الزيت العطري المستخلصة في شهر شباط.

الجدول (13) نتائج تحليل GC-MS لعينة الزيت العطري المستخلصة في شهر كانون الأول.

Peak	Ret. Time	Start Tm	End Tm	m/z	Area	Area %	Height	Height %	A / H	Name
1	6.508	6.45	6.567	TIC	5924184	1.04	2441164	4	2.42	**alpha.-pinene**
2	7.749	7.7	7.808	TIC	1559473	0.27	603778	0.99	2.58	**Sabinene**
3	7.938	7.892	7.992	TIC	1722429	0.3	643259	1.05	2.67	**l-.beta.-Pinene**
4	8.277	8.2	8.35	TIC	25267220	4.42	8229983	13.49	3.07	**beta.-Myrcene**
5	8.784	8.725	8.85	TIC	3731928	0.65	1235638	2.02	3.02	**Octanal**
6	10.048	9.725	10.142	TIC	4.98E+08	87.2	37946374	62.19	13.12	**LIMONENE**
7	10.476	10.408	10.55	TIC	2292482	0.4	803992	1.32	2.85	**TRANS-.BETA.-OCIMENE**
8	11.484	11.367	11.567	TIC	7027946	1.23	1576163	2.58	4.45	**LINALOOL OXIDE CIS**
9	12.155	12.083	12.233	TIC	2073800	0.36	648738	1.06	3.19	**TRANS-LINALOOL OXIDE**
10	12.72	12.633	12.8	TIC	10251796	1.79	3135794	5.14	3.26	**LINALOOL L**
11	17.027	16.95	17.108	TIC	3553123	0.62	988836	1.62	3.59	**alpha.-Terpineol**
12	17.549	17.475	17.625	TIC	2710346	0.47	797051	1.31	3.4	**DECANAL**
13	19.527	19.458	19.608	TIC	2178338	0.38	628596	1.03	3.46	**Linalyl acetate**
14	25.395	25.325	25.475	TIC	2339349	0.41	653761	1.07	3.57	**Geranyl acetate**
15	30.791	30.717	30.875	TIC	2649323	0.46	687701	1.13	3.85	**BHT**

الجدول (14) نتائج تحليل GC-MS لعينة الزيت العطري المستخلصة في شهر شباط.

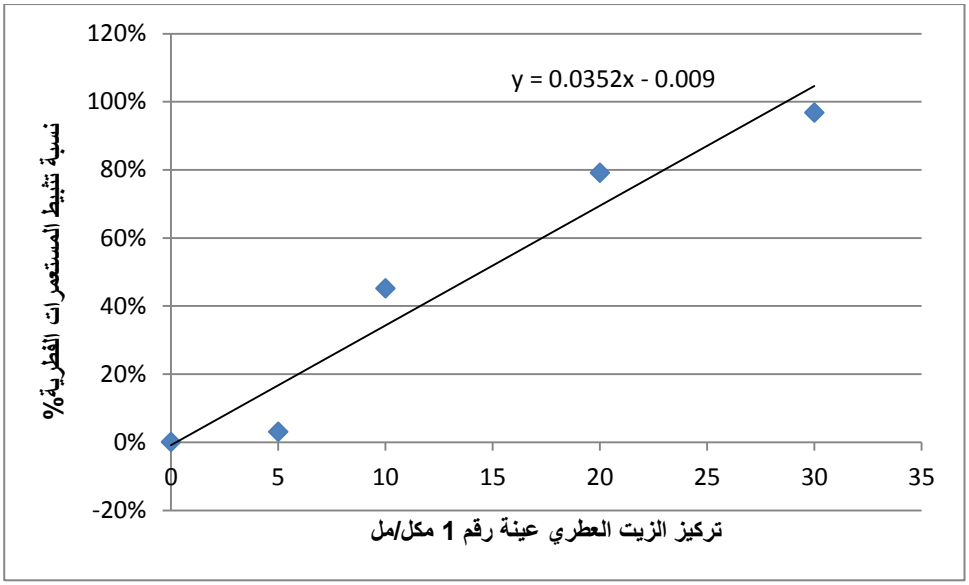
Peak	Ret. Time	Start Tm	End Tm	m/z	Area	Area %	Height	Height %	A / H	Name
1	6.503	6.442	6.567	TIC	5105797	0.97	2096196	3.77	2.43	**alpha.-pinene**
2	7.744	7.692	7.8	TIC	1198498	0.23	453446	0.82	2.64	**Sabinene**
3	7.933	7.8	7.992	TIC	1182048	0.23	440385	0.79	2.68	**l-.beta.-Pinene**
4	8.274	8.192	8.358	TIC	21961523	4.18	7337534	13.19	2.99	**beta.-Myrcene**
5	8.778	8.717	8.842	TIC	2270103	0.43	767797	1.38	2.95	**Octanal**
6	10.038	9.717	10.133	TIC	470333359	89.58	37973639	68.26	12.4	**LIMONENE**
7	10.471	10.4	10.55	TIC	2173586	0.41	759225	1.36	2.86	**TRANS-.BETA.-OCIMENE**
8	11.475	11.367	11.55	TIC	3354270	0.64	774533	1.39	4.33	**LINALOOL OXIDE CIS**
9	12.711	12.617	12.792	TIC	7547783	1.44	2327537	4.18	3.24	**L-LINALOOL**
10	17.017	16.933	17.1	TIC	2580787	0.49	699743	1.26	3.68	**alpha.-Terpineol**
11	17.539	17.467	17.617	TIC	1587001	0.3	475781	0.86	3.33	**DECANAL**
12	19.518	19.442	19.6	TIC	1273477	0.24	361263	0.65	3.52	**NERYL ACETATE**
13	25.381	25.3	25.45	TIC	1600686	0.3	438370	0.79	3.65	**Geranyl acetate**
14	30.773	30.692	30.858	TIC	1906176	0.36	486465	0.87	3.91	**BHT**
15	42.552	42.483	42.65	TIC	1063685	0.2	241650	0.43	4.4	**Nootkatane**

الجدول 15: متوسط عدد المستعمرات الفطرية والنسبة المئوية لتثبيط المستعمرات الفطرية في كل من علب البتري الشاهدة وعلب البتري الحاوية على تراكيز مختلفة لمحاليل التمديد

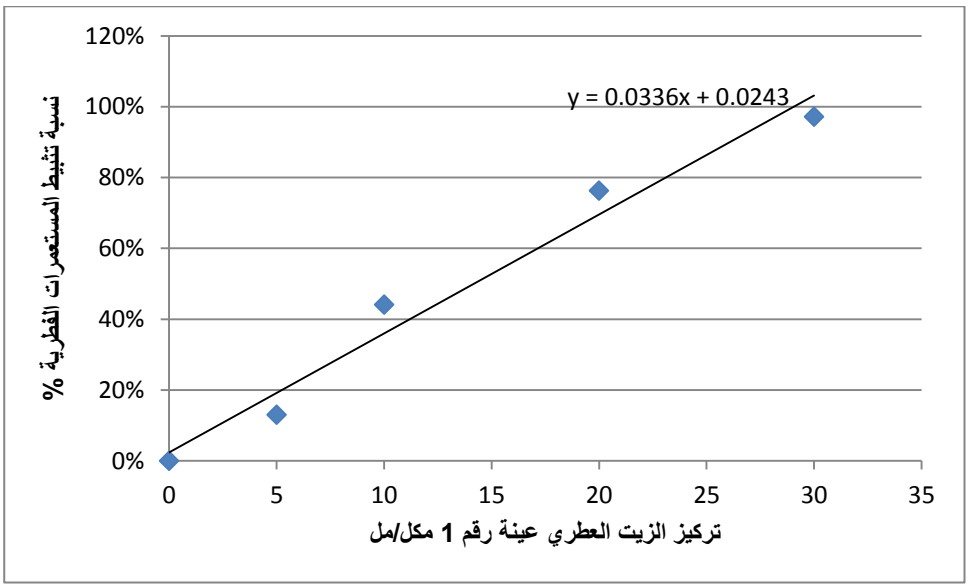
المحل المستخدم	التركيز	متوسط عدد المستعمرات الناتجة	الانحراف المعياري	متوسط النسبة المئوية لتثبيط المستعمرات %	الانحراف المعياري	عدد المستعمرات الفطرية في علب البتري الشاهدة	الانحراف المعياري
DMSO	%10	0	0	100	0	325	6
	%5	0	0	100	0		
	%2.5	196	8	39	4		
	%1	318	6	0.64	0		
ميثانول	%10	0	0	100	0		
	%5	46	5	46	5		
	%2.5	320	8	0	0		
	%1	318	11	1	1		
التوين 80	%0.5	321	2	1	1		

الجدول 16: النسب المئوية لتثبيط نمو المستعمرات الفطرية عند استخدام تراكيز مختلفة من عينة الزيت العطري التي تم استخلاصها في شهر كانون الأول. تمثل القيم متوسط نتائج التجربتين المستقلتين.

عينة الزيت العطري المستخلصة في شهر كانون الأول		تركيز الزيت ضمن أطباق البتري (مكل/مل)							معادلة الخط البياني	MIC مكل/مل	IC_{50} مكل/مل
		الشاهد الايجابي	تركيز 40	تركيز 30	تركيز 20	تركيز 10	تركيز 5	تركيز 2.5			
تجربة 1	عدد المستعمرات الفطرية	465	0	15	97	255	451	466	Y= 0.0352X - 0.009	40	14.46
	النسب المئوية لتثبيط نموالمستعمرات	%0	%100	%96.77	%79.14	%45.16	%3.01	%0			
تجربة 2	عدد المستعمرات الفطرية	345	0	10	82	193	300	350	Y= 0.0336X+0.0243	40	14.16
	النسب المئوية لتثبيط نمو المستعمرات	%0	%100	%97.10	%76.23	%44.05	%13.04	%0			
المتوسط الحسابي										40.00	14.31
الانحراف المعياري										0	0.21



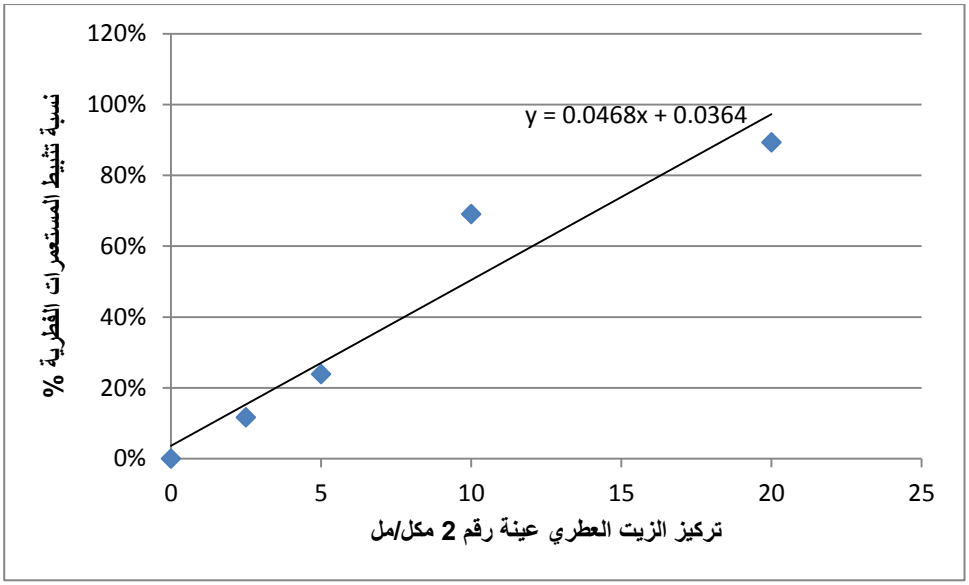
الشكل 27: العلاقة بين تراكيز عينة الزيت العطري المستخلصة خلال شهر كانون الأول ونسب تثبيط نمو المستعمرات الفطرية - التجربة الأولى-.



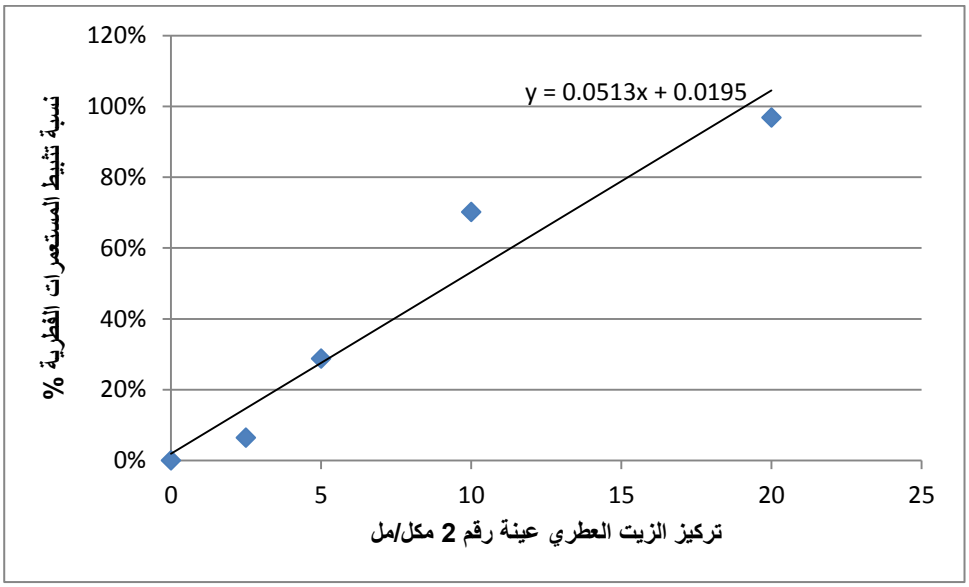
الشكل (28) العلاقة بين تراكيز عينة الزيت العطري المستخلصة خلال شهر كانون الأول ونسب تثبيط نمو المستعمرات الفطرية -التجربة الثانية-.

الجدول (17) النسب المئوية لتثبيط نمو المستعمرات الفطرية عند استخدام تراكيز مختلفة من عينة الزيت العطري التي تم استخلاصها في شهر كانون الثاني. تمثل القيم متوسط نتائج التجربتين المستقلتين.

عينة الزيت العطري المستخلصة في شهر كانون الثاني		تركيز الزيت ضمن أطباق البتري (مكل/مل)							معادلة الخط البياني	MIC مكل/مل	IC_{50} مكل/مل
		الشاهد الايجابي	تركيز 40	تركيز 30	تركيز 20	تركيز 10	تركيز 5	تركيز 2.5			
تجربة 1	عدد المستعمرات الفطرية	465	0	3	50	159	354	411	Y= 0.0468X+ 0.0364	40	9.91
	النسب المئوية لتثبيط نمو المستعمرات	%0	%100	%99.35	%89.25	%69.03	%23.87	%11.61			
تجربة 2	عدد المستعمرات الفطرية	345	0	0	11	103	255	323	Y=0.0513X+0.0195	30	9.37
	النسب المئوية لتثبيط نموالمستعمرات	%0	%100	%100	%96.81	%70.14	%28.70	%6.38			
المتوسط الحسابي										35.00	9.64
الانحراف المعياري										7.07	0.38



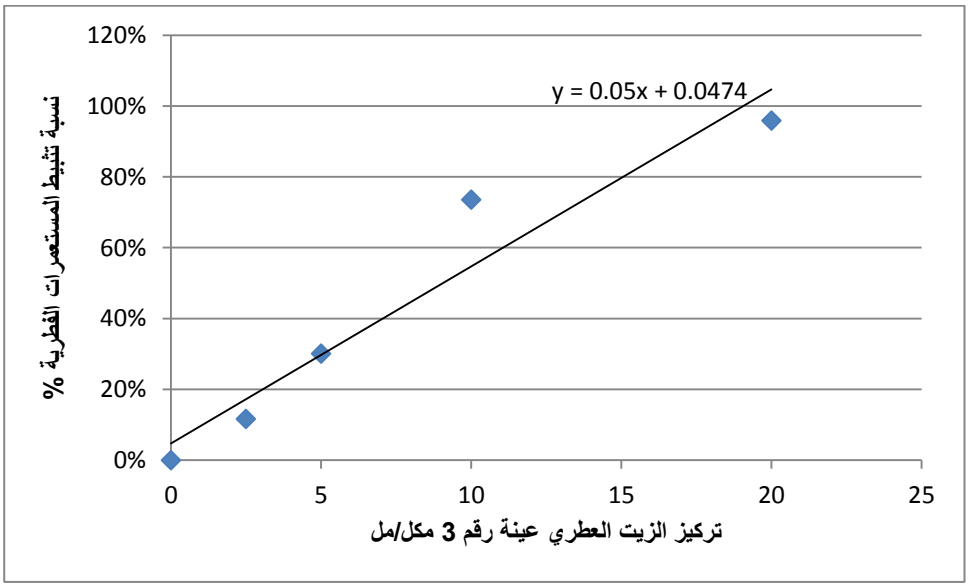
الشكل (29) العلاقة بين تراكيز عينة الزيت العطري المستخلصة خلال شهر كانون الثاني ونسب تثبيط نمو المستعمرات الفطرية- التجربة الأولى-.



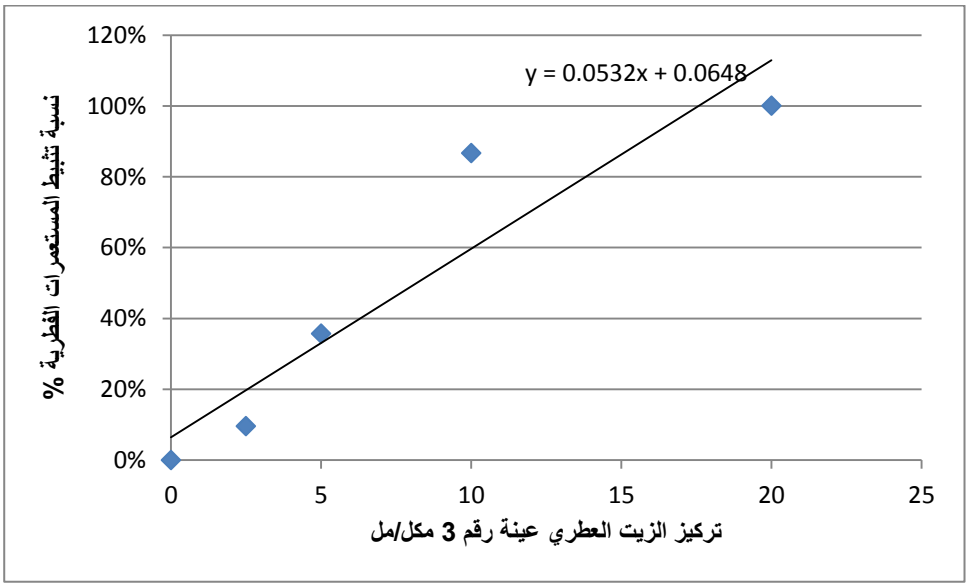
الشكل (30) العلاقة بين تراكيز عينة الزيت العطري المستخلصة خلال شهر كانون الثاني ونسب تثبيط نمو المستعمرات الفطرية -التجربة الثانية-.

الجدول (18) النسب المئوية لتثبيط نمو المستعمرات الفطرية عند استخدام تراكيز مختلفة من عينة الزيت العطري التي تم استخلاصها في شهر شباط. تمثل القيم متوسط نتائج التجربتين المستقلتين.

عينة الزيت العطري المستخلصة في شهر شباط		تركيز الزيت ضمن أطباق البتري (مكل/مل)							معادلة الخط البياني	MIC مكل/مل	IC50 مكل/مل
		الشاهد الايجابي	تركيز 40	تركيز 30	تركيز 20	تركيز 10	تركيز 5	تركيز 2.5			
تجربة 1	عدد المستعمرات الفطرية	465	0	0	19	123	288	411	Y=0.05X+0.0474	30	9.05
	النسب المئوية لتثبيط نموالمستعمرات	%0	%100	%100	%95.91	%73.55	%30.06	%11.61			
تجربة 2	عدد المستعمرات الفطرية	345	0	0	0	46	222	312	Y=0.0532X+0.0648	20	8.18
	النسب المئوية لتثبيط نمو المستعمرات	%0	%100	%100	%100	%86.67	%35.65	%9.56			
المتوسط الحسابي										25.00	8.62
الانحراف المعياري										7.07	0.62



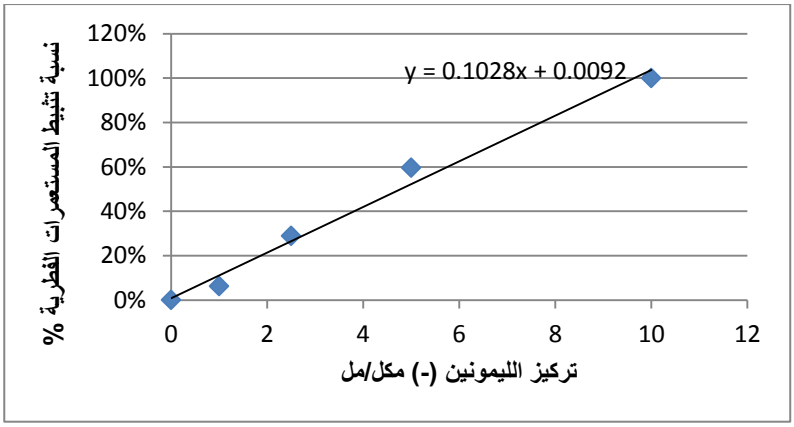
الشكل (31) العلاقة بين تراكيز عينة الزيت العطري المستخلصة خلال شهر شباط ونسب تثبيط نمو المستعمرات الفطرية -التجربة الأولى-.



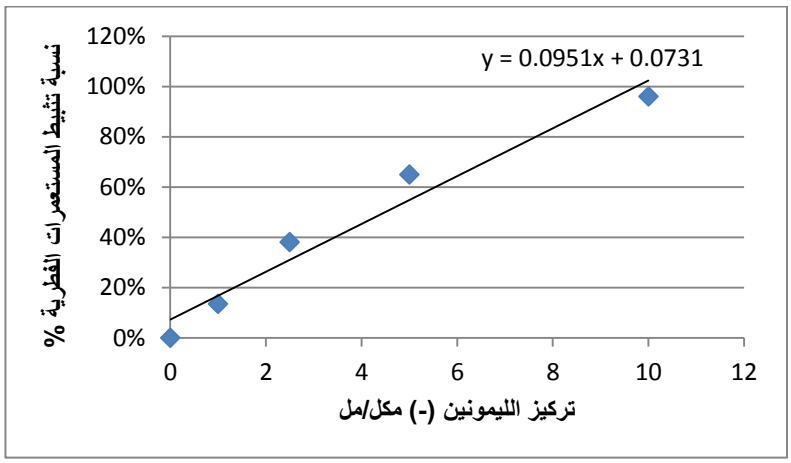
الشكل (32) العلاقة بين تراكيز عينة الزيت العطري المستخلصة خلال شهر شباط ونسب تثبيط نمو المستعمرات الفطرية -التجربة الثانية-

الجدول (19) النسب المئوية لتثبيط نمو المستعمرات الفطرية عند استخدام تراكيز مختلفة من الليمونين (–)، تمثل القيم متوسط نتائج التجارب الثلاث المستقلة.

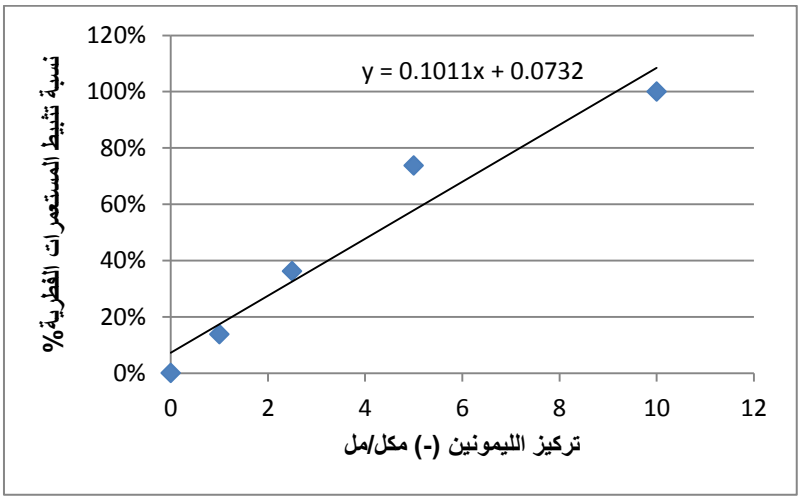
الليمونين (-)		تركيز الليمونين (-) ضمن علب البتري (مكل/مل)						معادلة الخط البياني	مكل/مل MIC	مكل/مل IC_{50}
		علب البتري الشاهدة	تركيز 20	تركيز 10	تركيز 5	تركيز 2.5	تركيز 1			
تجربة 1	عدد المستعمرات الفطرية	304	0	0	123	216	285	Y = 0.1028X + 0.0092	10	4.77
	النسب المئوية لتثبيط نموالمستعمرات	%0	%100	%100	%59.54	%28.95	%6.25			
تجربة 2	عدد المستعمرات الفطرية	570	0	23	200	353	493	Y = 0.0951X + 0.0731	20	4.49
	النسب المئوية لتثبيط نموالمستعمرات	%0	%100	%95.96	%64.91	%38.10	%13.51			
تجربة 3	عدد المستعمرات الفطرية	465	0	0	122	300	401	Y=0.1011X + 0.0732	10	4.22
	النسب المئوية لتثبيط نمو المستعمرات	%0	%100	%100	%73.76	%36.18	%13.76			
المتوسط الحسابي									13.33	4.49
الانحراف المعياري									5.77	0.28



الشكل (33) العلاقة بين تراكيز الليمونين – ونسب تثبيط نمو المستعمرات الفطرية -التجربة الأولى-.



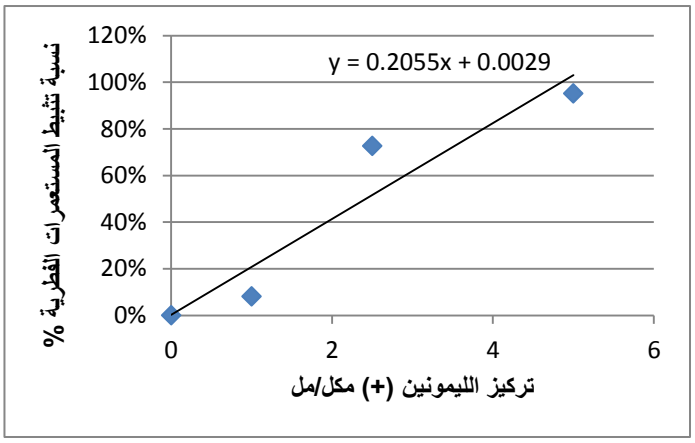
الشكل (34) العلاقة بين تراكيز الليمونين – ونسب تثبيط نمو المستعمرات الفطرية -التجربة الثانية-.



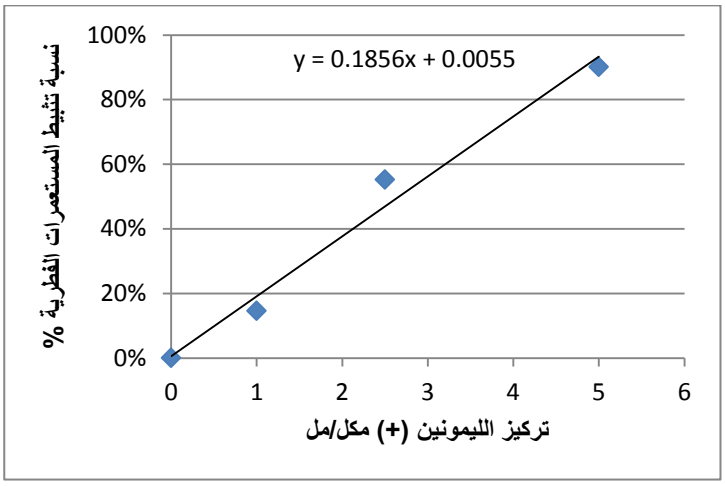
الشكل (35) العلاقة بين تراكيز الليمونين – ونسب تثبيط نمو المستعمرات الفطرية -التجربة الثالثة-.

الجدول (20) النسب المئوية لتثبيط نمو المستعمرات الفطرية عند استخدام تراكيز مختلفة من الليمونين (+)، ثمثل القيم متوسط نتائج التجارب الثلاث المستقلة.

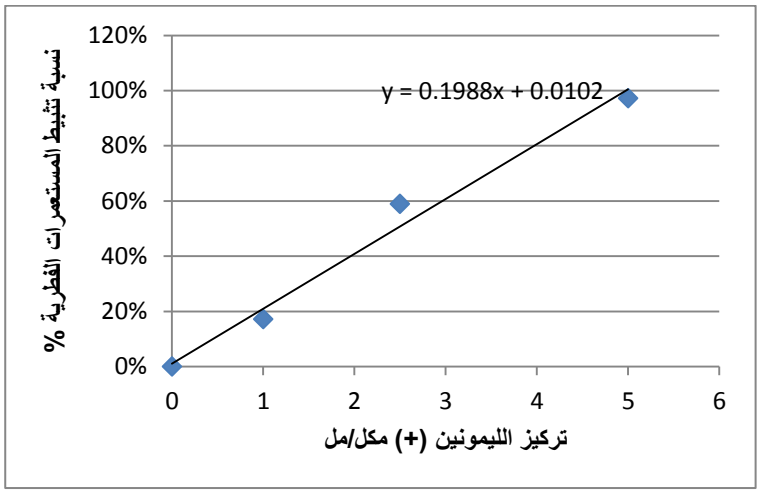
الليمونين (+)		تركيز الليمونين (+) ضمن علب البتري (مكل/مل)						معادلة الخط البياني	مكل/مل MIC	مكل/مل IC_{50}
		علب البتري الشاهدة	تركيز 20	تركيز 10	تركيز 5	تركيز2.5	تركيز 1			
تجربة 1	عدد المستعمرات الفطرية	570	0	4	28	156	524	Y= 0.2055X + 0.0029	20	2.42
	النسب المئوية لتثبيط نمو المستعمرات	%0	%100	%99.30	%95.10	%72.63	%8.10			
تجربة 2	عدد المستعمرات الفطرية	465	0	0	46	208	379	Y= 0.1856X+0.0055	10	2.66
	النسب المئوية لتثبيط نمو المستعمرات	%0	%100	%100	%90.11	%55.26	%14.62			
تجربة 3	عدد المستعمرات الفطرية	345	0	0	10	142	286	Y= 0.1988X+0.0102	10	2.46
	النسب المئوية لتثبيط نمو المستعمرات	%0	%100	%100	%97.10	%58.84	%17.10			
المتوسط الحسابي									13.33	2.51
الانحراف المعياري									5.77	0.13



الشكل (36) العلاقة بين تراكيز الليمونين + و نسب تثبيط نمو المستعمرات الفطرية -التجربة الأولى-.



الشكل (37) العلاقة بين تراكيز الليمونين + و نسب تثبيط نمو المستعمرات الفطرية -التجربة الثانية-.



الشكل (38) العلاقة بين تراكيز الليمونين + و نسب تثبيط نمو المستعمرات الفطرية -التجربة الثالثة-.