مجلة جامعة دمشق للعلوم الأساسية
مجلد 39- عدد 1 (2023): 138-150

Damascus University Journal
for the Basic Sciences
Vol 39 No.1 (2023): 137-150

تعيين التركيب الكيميائي للزيت العطري المستخلص من قشور برتقال الفلانسيا (*Citrus sinensis*)، وتقييم نشاطه الحيوي على بعض الأحياء الدقيقة

خالد رمضان[1] د. سهيل نادر[2] د.أمينة إبراهيم[3]

[1]طالب ماجستير، قسم علم الحياة النباتية، كلية العلوم، جامعة دمشق، دمشق، سورية.
[2] أستاذ مساعد، قسم علم الحياة النباتية، كلية العلوم، جامعة دمشق، دمشق، سورية.
[3] مدرس، قسم الكيمياء، كلية العلوم، جامعة دمشق، دمشق، سورية.

الملخص

استخلص الزيت العطري من قشور البرتقال (صنف الفلانسيا) لعينتين من منطقتين مختلفتين بالعوامل البيئية. حُدد التركيب الكيميائي للزيت العطري بوساطة تقانة GC-MS، حيث كانت α-Limonene، وβ-Linalool، وβ-Myrcene أكثر المركبات وفرةً في زيت المنطقتين، مع وجود اختلاف طفيف بين الزيت العطري لقشور المنطقتين في نسب هذه المركبات، وتميز بوجود فعالية منخفضة في التخلص من الجذور الحرة. أبدت تراكيز مختلفة (10-25-50 µl/ 4ml) من الزيتين نشاطاً حيوياً على بعض الجراثيم مثل *Escherichia coli*، و*Staphylococcus aureus*، و*Klebsiella pneumoniae*، وعلى بعض الفطريات بتراكيز (5-50-100 µl/ 100ml) مثل: *Penicillium citrinum*، و*Aspergillus aculeatus*، وخميرة *Cryptococcus* sp.، وأبدت بعض الجراثيم مثل: *Pseudomonas aeruginosa*، و*Bacillus subtilis*، والفطريات مثل *Alternaria alternata* مقاومة عند تلك التراكيز، أما تأثير الزيت العطري في اختبار النشاط في الزجاج ضد الليشمانيا الجلدية، فكانت العيوشية بنحو 42–49% عند التركيز µM185 باختبار MTT.

الكلمات المفتاحية: قشور البرتقال، الزيت العطري، الفاعلية المضادة للتأكسد، GC-MS، النشاط الحيوي

حقوق النشر: جامعة دمشق –سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب الترخيص
CC BY-NC-SA 04

Determination of essential oil chemical composition extracted from Valencia orange peels (*Citrus sinensis*), and assessment of bio-activity against some micro-organisms

Khaled Ramadan[1] Dr. Souhail Nader[2] Dr. Amina Ibrahim[3]

1- Master Student, Botany Department, Faculty of Science, Damascus University, Damascus, Syria.
2- Assistant Professor, Botany Department, Faculty of Science, Damascus University, Damascus, Syria.
3- Doctor, Chemistry Department, Faculty of Science, Damascus University, Damascus, Syria.

Abstract

Essential oil has been extracted from two samples of orange peels (Valencia varity) obtained from two areas which are different in environmental factors. The chemical composition of essential oils has been identified by GC-MS; where α-Limonene, β-Linalool and β-Myrcene are the most compounds present in the two areas oil, and there is a slight difference in compounds ratio between the essential oil of the two areas, and showed low effectiveness in free radicals scavenging. Different concentrations of essential oils showed biological activity on some bacteria in concentrations (10-25-50 µl /4 ml): *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumonia*, and on some fungi in concentrations (25-50-100 µl/100 ml): *Penicillium citrinum*, *Aspergillus aculeatus*, *Cryptococcus* sp. Yeast, some bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* and *Alternaria alternata* from fungi showed a resistance in those concentrations, but the essential oil was effective *in vitro* assay against *Leishmania tropica* with vitality about 42-49% at 185 µM in the MTT test.

Keywords: Orange peels, Essential oil, antioxidant scavenging, GC-MS, Bio-activity.

Copyright: Damascus University- Syria, The authors retain the copyright under a CC BY- NC-SA

ISSN (online): 2789-6366
http://journal.damascusuniversity.edu.sy/index.php/index/index

المقدمة Introduction

تعد الحمضيات بشكل عام أكثر أنواع الفواكه المنتشرة في العالم، ولاسيما في المناطق المدارية، وتحت المدارية (Kamal *et al*., 2011). تنتج العديد من أصناف الحمضيات في عديد من البلدان متضمنةً منطقة جنوب آسيا (Rashid 2013). بلغ الإنتاج العالمي للبرتقال في عام 2015 نحو 48 مليون طن (Foreign Agricultural Service/USDA- Office of Global Analysis 2016)، مما يشير إلى أهمية هذا المحصول عالمياً، ويقدر الإنتاج من البرتقال في سورية بنحو 0.8 مليون طن في العام نفسه (مكتب الحمضيات 2016)؛ مما يمكّن من الحصول على الكثير من المخلفات الناتجة ولاسيما أن نصف المحصول تقريباً يكون بشكل مخلفات تمثل نحو 45–50% من الوزن (El-Sharnouby *et al*., 2013).

تتميز الحمضيات بشكل عام باحتوائها على كمية كبيرة نسبياً من الزيوت العطرية (الأساسية) الموجودة في الجيوب العطرية في الطبقة الأولى من غلاف الثمرة (Spiegel-Roy and Goldschmidt 1996)، وهي من أهم المكونات التي يمكن استعادتها كمنتجات ثانوية من مخلفات الحمضيات (Ranganna *et al*., 1983).

تعد الزيوت العطرية من الحمضيات من أهم المواد المستعملة كمضادات للتأكسد (Anagnostopoulou *et al*., 2006)، مما يمنع العديد من الأمراض المزمنة والاستفادة منها في الصناعات الغذائية والتجميلية (Dugo and Mondello 2011)، ويعد الزيت العطري للبرتقال من المواد الفعالة المضادة للجراثيم والفطريات (Al-Saadi *et al*., 2009; Velázquez-Nuñez *et al*., 2013; Hasija *et al*., 2015)؛ مما يجعلها أحد أهم النباتات الطبية المستعملة.

دُرست إمكانية استعمال الزيت العطري من قشور البرتقال كمصدر للوقود الحيوي، نظراً لكون خصائصه قريبة من خصائص البنزين، ودُرست خصائصه ونواتج استعماله في محرك الديزل (Purushothaman and Nagarajan 2009).

تكمن الخصائص المضادة للأحياء الدقيقة في قشور البرتقال ضمن D-Limonene، وTerpenes، وSesquiterpene، وOxygenated Monoterpene، وLinalool، واسترات الحموض، والفحوم الهيدروجينية الأليفاتية، وبعض الفحوم الهيدروجينية الأخرى (Hasija *et al*., 2015).

أشارت بعض الدراسات إلى وجود تأثير للزيت العطري للبرتقال بتراكيز مختلفة في بعض أنواع من الجراثيم والفطريات، ودراسات أخرى أظهرت مقاومة بعض الأنواع من الجراثيم والفطريات، كما بينت الدراسات أن الزيت العطري لقشور البرتقال يمتلك فعالية كمضاد للبراغيث والنمل الناري والذباب المنزلي وذلك لاحتوائه على نسبة عالية من مركب الليمونين بنحو 90–95%، ويمتلك هذا المركب بالإضافة إلى بعض مشتقاته نشاطاً حيوياً ضد *Leishmania*، و*Trypanosoma* (Graebin *et al*., 2010; Milind and Dev 2012).

الأهمية والأهداف Aims and Importance

تكمن أهمية البحث في إيجاد مادة حيوية متوافرة محلياً وبكثرة مضادة للجراثيم الممرضة والفطريات والليشمانيا؛ كبديل عن المضادات الكيميائية، ولاسيما بأن مصدر هذه المادة الحيوية يعد من المخلفات (القشور) الناتجة عن صناعة الحمضيات، ويهدف إلى:

- أولاً استخلاص الزيت العطري وتحليله بتقانة GC-MS.
- ثانياً دراسة المحتوى الكلي للفينولات، والفاعلية المضادة للتأكسد.
- ثالثاً دراسة فعاليته الحيوية ضد بعض أنواع من الجراثيم والفطريات والليشمانيا المدارية.

ISSN (online): 2789-6366
http://journal.damascusuniversity.edu.sy/index.php/index/index

المواد والطرائق Materials and Methods

المادة النباتية

جُمعت ثمار البرتقال (صنف الفلانسيا) من منطقتين الأولى: السيسنية (S) تقع في الجنوب الشرقي لمدينة طرطوس، والثانية: الجمعاشية (G) تقع في الشمال الشرقي لمدينة طرطوس، ومن الجدير بالذكر أن المنطقتين بينهما اختلاف بيئي نظراً لاختلاف الموقع الطبوغرافي.
تم العمل على الطبقتين الأولى والثانية من الثمرة (من دون اللب)، حيث قطعت إلى قطع صغيرة 1–2 سم.
حُصل على أنواع الجراثيم والفطريات (عزلات نقية من مختبر الأحياء الدقيقة – الدراسات العليا – قسم علم الحياة النباتية – كلية العلوم)، ونُشّطت على وسط الآغار المغذي Nutrient Agar ووسط Potato Dextrose Agar على التوالي، وحُصل على عينة الليشمانيا المدارية من مختبر المناعة – قسم علم الحياة الحيوانية – كلية العلوم.

1– استخلاص الزيوت العطرية

استخلص الزيت العطري من القشور الرطبة لعينات كل من المنطقتين بالتقطير بالبخار باستعمال جهاز كلافنجر، لمدة ساعتين، بوضع 200 غ من القشور الرطبة و400 مل ماء (Clevenger 1928)، وتم إعادة استعمال الماء الناتج المستعمل في الاستخلاص مرة ثانية مع إضافة القليل من الماء النقي 50 مل لتعويض النقص الناتج عن التبخر.

2– تحليل الزيوت العطرية

حُلِّل بطريقة الاستشراب اللوني الغازي Gas Chromatography (Agilent Technologies 7890A) في المختبر المركزي من كلية العلوم بجامعة دمشق، وذلك بحقن 1 ميكروغرام من الزيت العطري الممدد بالهكسان 9:1، وتطبيق البرنامج الحراري على النحو الآتي: 50 مْ إلى 250 مْ بمعدل 10 مْ/د و10 د في الدرجة 250 مْ، زمن العملية 30 د، الطور المتحرك غاز الهيليوم، معدل تدفق 1 مل/د بضغط 7.6522 بساي، العمود المستعمل HP-5MS 5% Phenyl Methyl Silox: 1785.43335 / C: 30 m × 250 µm × 0.25 µm 325 C°، واستعمال كاشف مطياف الكتلة Mass Spectrometry (Agilent Technologies 5975C - Ei)، وحُددت الأطياف بالاعتماد على المكتبة (NIST; National Institute of Standards and Technology)، وعرضت أهم المكونات بحسب نسبتها المئوية.

3– دراسة المحتوى الكلي للفينولات، والفاعلية المضادة للتأكسد.

استعملت طريقة كاشف الفولين لقياس المحتوى الكلي للفينولات (AlHafez *et al*., 2014; Shaghaghi *et al*., 2008)، أما الفاعلية المضادة للتأكسد فحضر محلول من الزيت العطري والإيتانول 84 ملغ/مل، يوضع في أنبوب اختبار 300 ميكروليتر محلول من الزيت العطري والإيتانول بتركيز 84 ملغ/مل، ثم يضاف لكل أنبوب 3 مل من محلول الـ DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) في الإيتانول (45 ميكروغرام/مل)، توضع الأنابيب بعد التحريك في مكان مظلم في درجة حرارة الغرفة مدة 30 د، ثم تقاس الإمتصاصية باستعمال جهاز Spectrophotometer (Spitzen) عند طول الموجة 515 نانومتر. عرضت النتائج بالمقارنة مع السلسلة العيارية لحمض الغاليك بتراكيز بين 0.2 و2 ميلي مول / ليتر كمركب مرجعي لاختبار كنس الجذور الحرة بسبب قدرته الإرجاعية الكبيرة، واستعمل القانون التالي لحساب قدرة الزيت العطري على تثبيط الجذور الحرة (Sarikurkcu *et al*., 2009):

$$IDPPH\ \% = [(Ab-Aa)/Ab] \times 100$$

حيث: Aa امتصاصية العينة، Ab امتصاصية العينة الشاهدة

4– دراسة النشاط الحيوي

4–1 دراسة النشاط الحيوي في الجراثيم

ISSN (online): 2789-6366
http://journal.damascusuniversity.edu.sy/index.php/index/index

حُضر معلق جرثومي متجانس، وأضيف منه 100 µl إلى الأنابيب المحتوية على 4 مل من وسط Mueller-Hinton Broth، بعد حضنها مدة 24 ساعة في حاضنة هزازة عند درجة حرارة 30 مْ قيس نمو الجراثيم فيها بوساطة جهاز ماكفرلاند McFarland، وبعد القياس مباشرةً أُضيف الزيت العطري بتراكيز (10 – 25 – 50 µl) إلى المزارع الجرثومية النامية في الأنابيب، وبعد 24 ساعة أخرى من الحضن تم القياس، وجرى معاملة الشاهد بالطريقة نفسها، وأما طريقة الحساب؛ فقد تم حساب النسبة المئوية لنمو الشاهد، والنسبة المئوية لنمو الجراثيم في الأنابيب المحتوية على الزيت العطري، وذلك من المعادلة (1)، ثم جرى حساب النسبة المئوية لنسبة نمو العينة المحتوية على الزيت العطري نسبةً للنسبة المئوية لنمو الشاهد وذلك حسب المعادلة (2) لحساب النسبة المئوية للتأثير.

(1) النسبة المئوية للنمو= (قياس اليوم الثالث – قياس اليوم الثاني/ قياس اليوم الثاني) × 100.

(2) النسبة المئوية للتأثير= (النسبة المئوية لنمو العينة المحتوية على الزيت العطري – النسبة المئوية لنمو الشاهد/ النسبة المئوية لنمو الشاهد) × 100.

4-2 دراسة النشاط الحيوي في الفطريات

أضيف الزيت العطري مع الوسط Potato Dextrose Agar بتراكيز (25 – 50 – 100 µl) في 100 مل من الوسط بعد تعقيمه ووصول حرارته للدرجة 50 مْ، وحُضنت الأطباق بعد زراعتها لمدة 3 أيام عند الدرجة 25 مْ (Velázquez-Nuñez *et al.*, 2013)، جرى حساب التأثير حسب المعادلة (3). أما بالنسبة للخمائر فقد اعتمد على كثافة نموها في قياس درجة تأثرها باختلاف تراكيز الزيت العطري.

(3) النسبة المئوية للتأثير= (قطر مستعمرة العينة – قطر مستعمرة الشاهد/ قطر مستعمرة الشاهد) × 100.

4-3 دراسة النشاط الحيوي في الليشمانيا المدرارية

حُل الزيت العطري – للمنطقتين– بمذيب DMSO وحضر محلول الأم بتركيز 4 ملغ/مل، ووضعت الطفيليات ضمن آبار صفيحة مكروية مؤلفة من 96 بئراً بتركيز 0.5 مليون خلية/مل، وعولجت بالتركيز 185 مل مول (2.5 µg/100 µl) المأخوذ من المحلول الأم، حضنت العينات في حاضنة الطفيليات عند درجة حرارة 26 مْ، لمدة 24 ساعة، وبعدها وُضع ملون MTT، وحضنت العينات مدة 3 ساعات، حُلت العينات بمحلول MTT، وقيست بجهاز قارئ الصفائح الميكروية على طول موجة 540 نانومتر، لمعرفة نسبة العيوشية في العينات المعالجة.

5- الدراسة الإحصائية

جرت الدراسة الإحصائية لخصائص قشور البرتقال والتركيب الكيميائي للزيت العطري للمنطقتين بتطبيق اختبار T. Student، وتطبيق اختبار One way ANOVA لاختبار الفروق بين نشاط الزيتين في الجراثيم والفطريات والليشمانيا الجلدية عند كل تركيز من التراكيز المدروسة، وذلك عند مستوى معنوية 0.05 وباستعمال برنامج SPSS V20.

النتائج والمناقشة Results and Discussion

1- نتائج استخلاص الزيت العطري

استعملت القشور الرطبة لزيادة المردود في المواد النشطة ولاسيما الليمونين (Kamal *et al.*, 2011)، ويعد الماء من أكثر المذيبات المستعملة، وتم استعماله للزيادة في الاقتصادية، جرى الاستخلاص خلال ساعتين، ولم يكن هنالك زيادة في مردود الزيت العطري بعد ساعتين من الاستخلاص. ويفضل حفظ الماء المستعمل في استخلاص الزيت العطري في البراد لكونه يحتوي على الفينولات المستخلصة خلال هذه المرحلة ولاسيما من قشور البرتقال التي تتميز بمحتوى عالٍ من الفينولات (M'hiri *et al.*, 2014).

يبين الجدول 1 أن القشور الرطبة قد شكلت نحو 40% من وزن الثمرة، ولم تصل إلى النسبة المرجعية (50%) لعدم أخذ الطبقة الثالثة خلال العمل، وليس هناك فرق ملحوظ في الرطوبة، أما الفرق في نسبة الزيت العطري فقد يعود لاختلاف العوامل البيئية من

ISSN (online): 2789-6366
http://journal.damascusuniversity.edu.sy/index.php/index/index

منطقة زراعة العينات، وقد توافقت نسبته مع (Siddiqi 2005) حيث أشار إلى أن نسبة الزيت العطري (0.2–0.5%)، وتتفق الكتلة الحجمية للزيت الأساسي للمنطقتين نسبياً مع نتائج (Hashmi *et al.*, 2012) حيث كانت 0.841 غ/مل.

الجدول 1. خصائص قشور البرتقال.

	S	G
نسبة القشور %	36.75	42.86
نسبة الرطوبة %	76.86	78.81
مردود الزيت للقشور الرطبة %	0.42	0.51
الكتلة الحجمية للزيت العطري غ/مل	0.8406 ±0.0026	0.8406 ±0.0005

2- نتائج تحليل GC-MS للزيت العطري

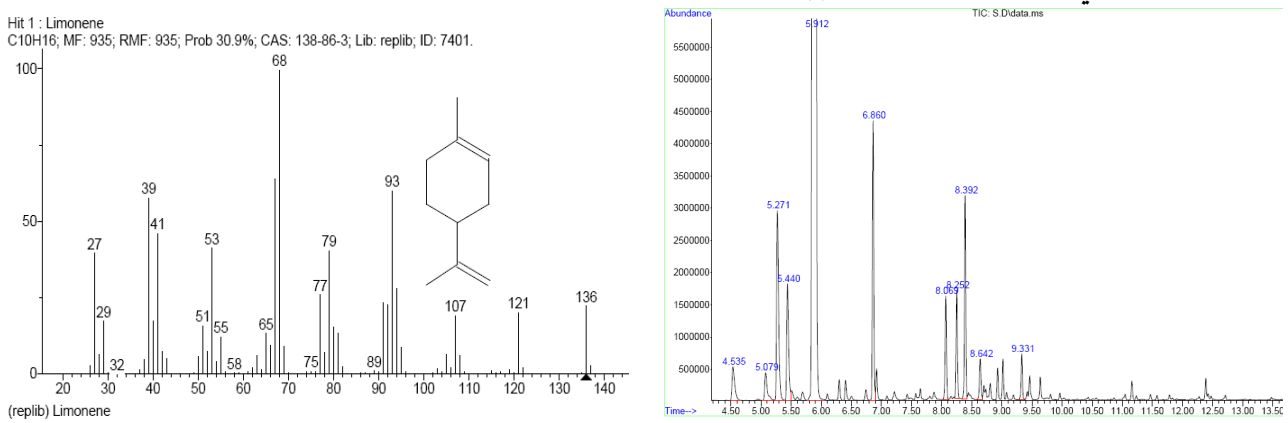
نجد من الجدول 2 أن هناك اختلاف طفيف بين النسبة المئوية لمكونات الزيت العطري لعينات المنطقتين من جهة، وبين مكونات الزيت العطري مرجعياً المختلفة فيما بينها أيضاً، وقد يعود ذلك إلى اختلاف الأصناف المدروسة مرجعياً واختلاف العوامل البيئية من منطقة زراعة الأصناف، وتوافقت أطياف المركبات الناتجة –أهمها مركب الليمونين– مع أطياف تلك المركبات مرجعياً (الشكل 1).

الجدول 2. نتائج تحليل GC-MS للزيت العطري للمنطقتين وبعض الدراسات المرجعية.

%	S	G	1	2	3	4	5
α-Limonene	81.99	83.23	88.4	84.2	80.9	96.62	86.18–96.80
β-Linalool	2.76	3.79	3.49	4.4	1.52	–	0.31–2.56
β-Myrcene	2.89	2.40	0.25	4.1	4.19	1.72	0.93–2.05
Octanal	1.69	1.59	–	–	–	–	0.09–0.68
1-Terpinen-4-ol	1.94	1.44	–	–	-	–	0-0.31
α-Terpineol	1.08	0.99	1.01	0.8	–	–	0-0.25
1R-α-Pinene	0.68	0.55	0.36	0.9	1.65	0.47	0.28–0.55
α-Citral	0.46	0.53	–	0.5	–	0.31	-
Sabinene	0.52	0.32	–	–	0.37	–	0.13–0.93
Valencene	0.21	0.29	–	–	1.20	–	0-0.31

1- (Lin *et al.*, 2010). 2- (Sharma and Tripathi 2008). 3- (Kamal *et al.*, 2011). 4-(Velázquez-Nuñez *et al.*, 2013). 5-(Dugo And Mondello 2011).

إما أنه غير موجود في العينة أو أنه غير محدد :(-)

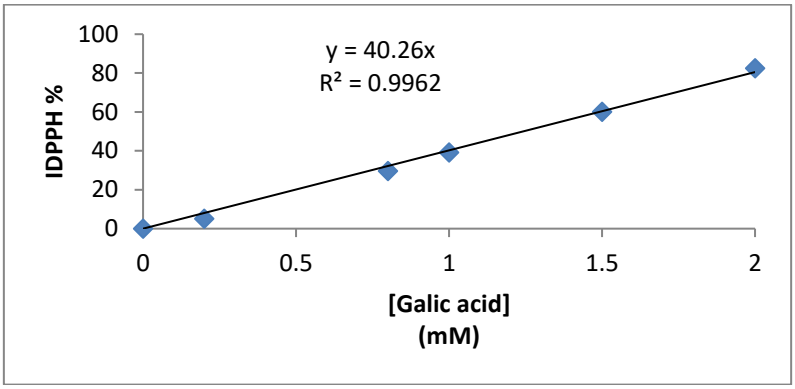


الشكل 1. (الأعلى) كروماتوغرام GC لتحليل الزيت العطري لمنطقة السيسنية، (الأسفل) طيف MS لمركب الليمونين.

ISSN (online): 2789-6366
http://journal.damascusuniversity.edu.sy/index.php/index/index

3- نتائج دراسة المحتوى الكلي للفينولات، والفاعلية المضادة للتأكسد

في دراسة المحتوى الكلي للفينولات فقد بينت نتائج تحليل الزيت العطري عدم احتوائه على أي نسبة محسوسة من المركبات الفينولية، أما فيما يتعلق بتحديد الفاعلية المضادة للتأكسد من خلال الاسقاط على منحني السلسلة المعيارية لحمض الغاليك (الشكل 2)، كانت النتائج متقاربة نسبياً بين الزيت العطري لعنيات المنطقتين، وهذه الفعالية ضعيفة مقارنة بمركب الغاليك، فالزيت العطري يحتاج لكمية 466.6 ضعف حمض الغاليك ليصل إلى النسبة نفسها من كنس الجذور الحرة (الجدول 3)، وأشار (Kamal *et al*., 2013) إلى انخفاض فعالية الزيت العطري لقشور البرتقال في كنس الجذور الحرة، وذلك قد يعود لعدم احتواء الزيت العطري على الفينولات بشكل أساسي.



الشكل 2. السلسة المعيارية لحمض الغاليك.

الجدول 3. الفعالية المضادة للتأكسد للزيت العطري.

	حمض الغاليك	السيسنية	الجمعاشية
الكمية	0.18 غ/ل	84 غ/ل	84 غ/ل
نسبة الكنس %	21	22.97 ±0.45	20.86 ±1.24

4- نتائج دراسة النشاط الحيوي

4-1 نتائج دراسة النشاط الحيوي في الجراثيم

بعد إجراء تجارب عديدة لتحديد الطريقة الأنسب لدراسة التأثير، ومنها طريقة الآبار، وطريقة الأقراص، وطريقة مزج الزيت مع الوسط في أطباق البتري، وطريقة الزرع السائل ضمن الأنابيب بإضافة وسط Mueller Hinton Broth؛ بالنسبة للجراثيم فكانت الطريقة الأخيرة هي الأنسب وهي طريقة معتمدة، مع العلم أنه يوجد اختلاف في التأثير تبعاً لاختلاف الطريقة (Omran *et al*., 2011).

أظهرت النتائج في الجدول 4 مقاومة بعض الجراثيم لهذا الزيت تماماً ضمن التراكيز المدروسة، وبعضها الآخر تباينت في مقاومتها تبعاً للتراكيز المختلفة؛ فمثلاً نجد أن نمو جراثيم *E. coli* انخفض بنسبة 71% عن نسبة نمو الشاهد وذلك عند التركيز 10 ميكروليتر، أما حالة المقاومة فكانت نسبة نمو الجراثيم أعلى من نسبة نمو الشاهد؛ وقد يعود ذلك إلى تحفيز التراكيز القليلة من الزيت العطري للجراثيم مما وصل بعضها مثل *B. subtilis* إلى نحو نسبة 2000% عن نسبة نمو الشاهد. يمتلك بعض الجراثيم حساسية عالية تجاه هذا الاختلاف الطفيف بالتراكيز لذلك يوجد اختلاف واضح في التأثير مع اختلاف التراكيز. يعود

ISSN (online): 2789-6366
http://journal.damascusuniversity.edu.sy/index.php/index/index

تأثير الزيت العطري لقشور البرتقال لوجود المواد الفعالة فيه ولاسيما Limonene، وLinalool، وMyrecene (Sharma and Tripathi 2008).

الجدول 4. تأثير الزيت العطري للبرتقال في بعض أنواع الجراثيم، التركيز (µl/ 4 ml).

الجراثيم المدروسة	المنطقة	10	25	50
Ecshericia coli	S	-71	-70.9	-5.71
	G	م	-14.3	م
Staphylococcus aureus	S	-29.35	-21.9	م
	G	-22.8	م	م
Klebsilla pneumoniae	S	-46	م	-57.4
	G	-47	م	-50
Psudomonas aeruginosa	S	م	م	م
	G	م	م	م
Bacillus subtilis	S	م	م	م
	G	م	م	م

– م: مقاوم، الإشارة –: انخفاض نسبة نمو العينة عن نمو الشاهد.

تبين وجود تأثير عدد من الزيوت العطرية للحمضيات ومنها البرتقال الذي أظهر نشاطاً ضد *Salmonella senflenberg*، و*Escherichia coli*، و*Staphylococcus aureus*، و*Pseudomonas* sp. (Dabbah *et al*., 1970)، ودُرس تأثير الزيت العطري من أصناف عديدة من البرتقال حيث أظهرت تأثيراً متبايناً في *Escherchia coli*، و*Salmonella typhii*، و*Klebsiella pneumoniae*، و*Enterobacter cloacae*، و*Pseudomonas fluorescence*، و*Proteus myxofaciens*، و*Staphylococcus epidermidis*، و*Streptococcus* sp. (Javed *et al*., 2011). وأظهرت دراسة قام بها (Lin *et al*., 2010) وجود نشاطاً للزيت العطري للبرتقال في *Vibrio parahaemolyticus*، و*Salmonella typhimurium*، و *Escherichia coli*، و*Staphylococcus aureus*.

أما آليات تأثير الزيوت العطرية المضادة للجراثيم غير مفهومة تماماً، ولكن هناك عدد من الآليات المقترحة (Holley and Patel 2005)، وجدت بعض الدراسات أن الجراثيم الإيجابية بصبغة الغرام تكون أكثر حساسية للزيوت العطرية –والمستخلصات النباتية– من الجراثيم السلبية بصبغة الغرام؛ وذلك يعود إلى النفاذية النسبية للغشاء الخارجي المحيط بالجراثيم السلبية بصبغة الغرام (Smith-Palmer *et al*., 2001)؛ نظراً للاختلافات البنيوية في جدار الخلية بين الجراثيم السلبية والإيجابية بصبغة الغرام (Adwan and Abu-Hasan 1998; Singariya *et al*., 2012)، وهذا التفسير لا يطابق نتائج هذا البحث نظراً إلى استعمال تراكيز قليلة، وتشير دراسات أخرى إلى أن هذه المقاومة تكون خلال فترة زمنية محددة من نمو الجراثيم السلبية بصبغة الغرام وبعد فترة زمنية أطول، فإن الزيوت العطرية يكون لها التأثير نفسه في كل من الجراثيم السلبية والإيجابية بصبغة الغرام (Tassou *et al*., 2000) وممكن حصول ذلك في البحث ولاسيما أن مدة تعرض الجراثيم للزيت نحو 24 ساعة.

لوحظت الحساسية المتباينة عند استعمال زيوت الحمضيات (Fisher and Phillips 2006)، وقد تعود آلية العمل إلى امتصاص الزيت إلى داخل الخلية؛ ويؤكد ذلك وجود فجوات داخل الخلايا، والتي لم تكن موجودة في خلايا الشاهد، إن السمة الكارهة للماء التي تميز الزيوت العطرية، تسمح بفصله عن الطور المائي في غشاء الخلية؛ وبالتالي يمكنه الدخول إلى الخلية،

ISSN (online): 2789-6366
http://journal.damascusuniversity.edu.sy/index.php/index/index

هناك زيادة في نفاذية غشاء الخلية بنحو 32 إلى 40 مرة في حال التعرض لبخار الزيت العطري؛ أي قد يكون أكثر نشاطاً، وهذا يدل على وجود آلية مختلفة لتأثير البخار؛ بسبب صغر حجم الجزيئات أو لوجود جسيمات معينة متبخرة من الزيت العطري (Fisher and Phillips 2009; Cox *et al*., 2000)، أما فيما يتعلق بالمقاومة فقد تعود إما لانتقائية جدار الخلية للمواد، أو لآلية الغشاء التراكمية (Al-Saadi *et al*., 2009).

4-2 نتائج دراسة النشاط الحيوي في الفطريات

لا يمكن اعتماد الطريقة السابقة لدراسة قياس تأثير الزيت العطري في الفطريات؛ لكون الفطريات تنتج مشيجة فطرية لا يمكن اعتماد قياسها بدقة بوساطة جهاز ماكفرلاند، لذلك تم الاعتماد على طريقة إضافة الزيت العطري مع الوسط المغذي (Lahuerta Zamora and Pérez-Gracia 2012).

يبين الجدول 5 أن فطر *A. alternata* أظهر مقاومة لهذا الزيت مع اختلاف التراكيز، وأظهرت فطريات *P. citrinum* و*A. aculeatus* انخفاضاً في قطر المستعمرات وكذلك انخفاض كثافة نمو خميرة *Cryptococcus* sp. تبعاً لزيادة التراكيز واختلاف نوعية الزيت؛ فقد يعود ذلك أولاً إلى لوجود حساسية للفطريات لهذه الفروق الطفيفة، وثانياً للاختلاف الطفيف في بعض المركبات الموجودة في الزيت العطري. مرجعياً أظهرت بعض الفطريات *Aspergillus niger*، و*Penicillium chrysosporium*، و*Fusarium acuminatum* مقاومة لتأثير الزيت العطري للبرتقال (Soni and Soni 2014)، وعلى العكس من ذلك فقد أظهر مركب الليمونين –الذي يمثل نسبة نحو 90% من العطري للبرتقال– تأثيراً في الفطريات *Penicillium* sp.، و*Aspergillus* sp.، و*A.niger*، و*Candida albicans* (Omran *et al*., 2011)، وأظهر الزيت العطري للبرتقال تأثيراً في نمو وشكل فطر *A. niger* بوساطة المجهر الالكتروني (Sharma and Tripathi 2008).

الجدول 5. تأثير الزيت العطري للبرتقال في بعض أنواع الفطريات، التركيز (µl / 100 ml).

الفطريات المدروسة	المنطقة	25	50	100
Penicillium citrinum	**S**	-38	-45.2	-66.6
	G	-23.8	-50	-57.1
Aspergillus aculeatus	**S**	-19.6	-16	-37.5
	G	-17.8	-25.89	-35
Alternaria alternata	**S**	م	م	م
	G	م	م	م
Cryptococcus sp.	**S**	++++	+++	++
الشاهد ++++	**G**	+++	++	+

- م: مقاوم، الإشارة –: انخفاض نسبة قطر نمو العينة عن نمو الشاهد.
- الإشارة +: نسبة نمو العينة.

أما آلية عمل الزيت العطري في الفطريات؛ فيقوم بتحطيم الخيوط الفطرية بشدة عن طريق إتلاف وفقدان صلابة الجدار الخلوي الذي يترافق مع انكماش السيتوبلاسما وزوالها، مما يؤدي إلى تلف الأفطورة، هذه التغيرات الناجمة غير عكوسة قد تكون بسبب تداخل مكونات الزيت العطري (مثل: الليمونين، واللينالول، والميرسين) مع التفاعلات الإنزيمية المكونة للجدار الخلوي؛ مما يؤثر في التنامي الفطري Morphogenesis (Sharma and Tripathi 2008)، يسبب الزيت العطري تغيرات مختلفة على خصائص ووظيفة غشاء الخلية الميكروبية عن طريق زيادة سيولة الغشاء وتغيير نفاذيته، والتراكيز المنخفضة تغير النفاذية فقط، أما التركيزات العالية تسبب أضرارا بالغة تصل إلى الموت (Carson *et al*., 2002; Tyagi and Malik 2011)، وأشار

ISSN (online): 2789-6366
http://journal.damascusuniversity.edu.sy/index.php/index/index

(Nychas 1995) أن بعض مكونات الزيت العطري قادرة على تخريب الأنزيمات المسؤولة عن إنتاش الأبواغ وإنتاج الطاقة وتصنيع المركبات الهيكلية أو تتداخل مع الأحماض الأمينية المشاركة في النمو.

3-4 نتائج دراسة النشاط الحيوي في الليشمانيا المدراية

اختلفت الدراسات السابقة في تحديد تركيز مركب الليمونين المثبط لنصف أعداد طفيليات الليشمانيا في العينة؛ واختير التركيز 185 µM كتركيز مرجعي مثبط لنصف أعداد أنواعها (Arruda *et al.*, 2009)، واعتمد في تحضير تركيز الزيت العطري على تركيز مركب الليمونين الذي يمثل النسبة الأكبر من تركيب الزيت.

الجدول 6. تأثير الزيت العطري بتركيز 185µM لقشور البرتقال في عيوشية طفيلي الليشمانيا الجلدية.

المنطقة	S	G
العيوشية	42.17	49.65

تعود الزيادة في تأثير زيت المنطقة (S) على تأثير زيت المنطقة (G) إلى زيادة تركيز بعض المواد الفعالة غير مركب الليمونين (الجدول 6)، كما أن التركيز المستعمل 185 µM يقابل 25.2 ppm هو آمن من الناحية الخلوية لأنه أقل من تركيز مركب الليمونين الموجود عادةً –كمادة مضافة آمنة مصنفة من قبل إدارة الأغذية والعقاقير الأمريكية– في المواد الغذائية مثل: الخبز والمثلجات والجيلاتين والحلويات،عند مستويات تتراوح 68–2300 ppm (NTP 1990).

أما آلية تأثير هذه المركبات في الليشمانيا فهي غير واضحة تماماً (Graebin *et al.*, 2010)؛ فقد تعود إلى تثبيط عملية إضافة زمرة Prenyl إلى البروتين؛ ولاسيما مجموعة Ras من بروتينات ربط نكليوتيدات الغوانين G-proteins (Arruda *et al.*, 2009)، أو تثبيط إنزيمات Farnesyltransferase، وGeranylgeranyltransferase (Crowell *et al.*, 1991)، أو إلى تثبيط تركيب مركب Dolichol ومركب Ubiquinone (Goulart *et al.*, 2004)، أو إلى تحفيز الخلايا على الدخول في الموت الخلوي المبرمج مثل مركب أوكسيد النتريك NO (Seiler and Raul 2005).

5- نتائج الدراسة الإحصائية

أظهرت نتائج الدارسة الإحصائية وجود فروق معنوية بين خصائص القشور، والتركيب الكيميائي للزيت العطري لكل من المنطقتين، حيث قيمة Sig أصغر من 0.05 مما يشير إلى رفض فرضية العدم H0: M1 = M2 (خصائص القشور والتركيب الكيميائي للزيت العطري لمنطقة السيسنية :M1، ولمنطقة الجمعاشية :M2)، وقبول الفرضية البديلة H1: M1 ≠ M2 أي وجود فروق معنوية بين خصائص القشور (الجدول 1) والتركيب الكيميائي لزيت قشور البرتقال للمنطقتين (الجدول 2)، وأيضاً وجود فروق معنوية في نتائج تأثير الزيت بين المنطقتين؛ فقد يعود ذلك للاختلاف الطفيف في المحتوى الكيميائي من المواد الفعالة في الزيت العطري؛ الذي يعود لتأثير العوامل البيئية (المناخية+الترابية) لمنطقتي أخذ العينات.

ISSN (online): 2789-6366
http://journal.damascusuniversity.edu.sy/index.php/index/index

الاستنتاجات:

1- تتميز قشور البرتقال بمحتوىً جيداً نسبياً من الزيت العطري.

2- يتميز الزيت العطري بوجود العديد من المركبات؛ إذ يمثل كل من α-Limonene وβ-Linalool، وβ-Myrcene أكثر المركبات وفرةً.

3- للزيت العطري فعالية ضد العديد من الأحياء الدقيقة، بالمقابل أبدى بعضها الأخر مقاومةً له.

4- يمكن استعمال الزيت العطري كمادة مقاومة لليشمانيا المدارية بتركيز آمن لخلايا الجسم.

التوصيات:

1- دراسة الزيوت العطرية للنباتات السورية، من حيث تركيبها الكيميائي وفعاليتها الحيوية.

2- دراسة أثر البيئات المختلفة السورية في الزيوت العطرية.

3- تحديد التطبيقات الصناعية والغذائية الممكنة للزيوت العطرية.

ISSN (online): 2789-6366
http://journal.damascusuniversity.edu.sy/index.php/index/index

المراجع References

1- Al-Saadi, N, H, M., Ahmad, N, S., Sa´eed, S, E (2009). Determination of some chemical compounds and the effect of oil extract from orange peel on some pathogens, Journal of Kerbala University, 7 (2): 33-39.
2- AlHafez, M., Kheder, F., AlJoubbeh, M (2014). Polyphenols, flavonoids and (-)-epigallocatechin gallate in tea leaves and in their infusions under various conditions, Nutrition & Food Science, 44 (5): 455-463.
3- Adwan, K., Abu-Hasan, N (1998). Gentamicin resistance in clinical strains of Enterobacteriaceae associated with reduced gentamicin uptake, Folia Microbiol (Praha), 43: 438-40.
4- Anagnostopoulou, M, A., Kefalas, P., Papageorgiou, V, P., Assimopoulou, A, N., Boskou, D (2006). Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (*Citrus sinensis*), Food Chemistry, 94: 19-25.
5- Carson, C, F., Me, B, J., Riley, T, V (2002). Mechanism of action of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 46: 1914-1920.
6- Citrus: World Markets and Trade, Foreign Agricultural Service/USDA- Office of Global Analysis (2016). https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/citrus.pdf
7- Clevenger, J, F (1928). Apparatus for thedetermination of volatile oil, Journal of American Pharmaceutical Association, 17 (4): 346-351.
8- Dabbah, R., Edwards, V, M., Moats, W, A (1970). Antimicrobial action of some citrus fruit oils on selected food-borne bacteria, Appled Microbiology, 19 (1): 27-31.
9- Dugo, G., Mondello, L (2011). Citrus oils composition, advanced analytical techniques, contaminants, and biological activity, CRC Press, Taylor & Francis Group.
10- El-Sharnouby, G, A., Aleid S, M., Al-Otaibi, M, M (2013). Conversion of processed citrus wastes into nutritional components, Food Processing & Technology, 4 (8): 1-5.
11- Fisher, K., Phillips, C (2006). The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus in vitro* and in food systems, Journal of Applied Microbiology, 101 (6): 1232-1240.
12- Fisher, K., Phillips, C (2009). The mechanism of action of a citrus oil blend against *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*, Journal of Applied Microbiology, 106 (4): 1343-1349.
13- Hashmi, S, H., Ghatge, P., Machewad, G, M., Pawar, S (2012). Studies on extraction of essential oil and pectin from sweet orange, Open Access Scientific Reports, 1, 291: 1-3.
14- Graebin, C, S., Madeira, M, de F., Yokoyama-Yasunaka, J, K, U., Miguel, D, C., Uliana, S, R, B., Benitez, D., Cerecetto, H., Gonzalez, M., da Rosa, R, G., Eifler-Lima, V, L (2010). Synthesis and in vitro activity of limonene derivatives against *Leishmania* and *Trypanosoma*, European Journal of Medicinal Chemistry, 45: 1524-1528.
15- Hasija, S., Ibrahim, G., Wadia, A (2015). Antimicrobial activity of *Citrus sinensis* (orange), *Citrus limetta* (sweet lime) and *Citrus limon* (lemon) peel oil on selected food borne pathogens, International Journal of Life Sciences Research, 3 (3): 35-39.
16- Holley, R, A., Patel, D (2005). Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials, Food Microbiology, 22 (4): 273-92.
17- Javed, S., Javaid, A., Mahmood, Z., Javaid, A., Nasim, F (2011). Biocidal activity of citrus peel essential oils against some food spoilage bacteria, Journal of Medicinal Plants Research, 5 (16): 3697-3701.

ISSN (online): 2789-6366
http://journal.damascusuniversity.edu.sy/index.php/index/index

18- Kamal, G. M., Anwar, F., Hussain, A. I., Sarri, N., Ashraf, M. Y (2011). Yield and chemical composition of Citrus essential oils as affected by drying pretreatment of peels, International Food Research Journal, 18 (4): 1275-1282.
19- Kamal, G, M., Ashraf, M, Y., Hussain, A, I., Shahzadi, A., Chughtai, M, A (2013). Antioxidant potential of peel essential oils of three pakistani Citrus species: *Citrus reticulata*, *Citrus sinensis* and *Citrus paradisii*, Pakistan Journal of Botany, 45 (4): 1449-1454.
20- Lahuerta Zamora, L., Pérez-Gracia, M, T (2012). Using digital photography to implement the McFarland method, Journal of the Royal Society Interface, 9 (73): 1892-1897.
21- Lin, C., Sheu, S., Hsu, S., Tsai, Y (2010). Determination of bactericidal efficacy of essential oil extracted from orange peel on the food contact surfaces, Food Control, 21: 1710-1715.
22- M'hiri, N., Ioannou, I., Ghoul, M., Mihoubi Boudhrioua, N (2014). Extraction methods of citrus peel phenolic compounds: a review, Food Reviews International, 30 (4): 265-290.
23- Milind, P., Dev, C (2012). Orange: range of benefits, International Research Journal Of Pharmacy, 3: 59-63.
24- NTP (1990). National Toxicology Program technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of d-limonene (CAS No. 5989-27-5) in F344/N rats and $B_6C_3F_1$ mice (Gavage Studies), NTP TR 347, NIH Publication No. 90-2802.
25- Nychas, G. J. E (1995). Natural antimicrobials from plants. In New Methods of Food Preservationed. Gould, G.W. pp. 58-89. London: Blackie Academic Professional.
26- Omran, S, M., Moodi, M, A., Amiri, B, N., Mosavi, S, J., Saeed, S, A, M, G, M., Shiade, S, M, J., Kheradi, E., Salehi, M (2011). The effects of limonene and orange peel extracts on some spoilage funai, International Journal of Molecular and Clinical Microbiology, 1:82-86.
27- Purushothaman, K., Nagarajan, G (2009). Performance, emission and combustion characteristics of a compression ignition engine operating on neat orange oil, Renewable Energy, 34: 242-245.
28- Ranganna, S., Govindarajan, V, S., Ramana, K, V, R., Kefford, J, F (1983). Citrus fruits. Part II. Chemistry, technology, and quality evaluation. B. Technology, C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 19 (1): 1-98.
29- Rashid, U., Ibrahim, M., Yasin, S., Yunus, R., Taufiq-Yap, Y.H., Knothe, G (2013). Biodiesel from *Citrus reticulata* (mandarin orange) seed oil, a potential non-food feedstock, Industrial Crops and Products, 45: 355-359.
30- Sarikurkcu, C., Arisoy, K., Tepe, B., Cakir, A., Abali, G., Mete, E (2009). Studies on the antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of *Vitex agnus-castus* L. Fruits from Turkey, Food and Chemical Toxicology, 47(10): 2479-2483.
31- Shaghaghi, M., Manzoori, J., Jouyban, A (2008). Determination of total phenols in tea infusions, tomato and apple juice by terbium sensitized fluorescence method as an alternative approach to the Folin-Ciocalteu spectrophotometric method, Food chemistry, 108 (2): 695-701.
32- Sharma, N., Tripathi, A (2008). Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem, Microbiological Research, 163: 337-344.
33- Siddiqi, N, A (2005). Debittering of sweet orange by resin. M. Tech. Thesis, College of Food Technology. Marathwada Krishi Vidyapeeth, Parbhani, M.S. (INDIA).
34- Singariya, P., Kumar, P., Mourya, K, K (2012). Antibacterial and antifungal potential of some polar solvent extracts of ashwagandha (Solanaceae) against the nosocomial pathogens, International Journal of Green Pharmacy, 55: 17-22.
35- Smith-Palmer, A., Stewart, J., Fyfe, L (2001). The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese, Food Microbiology, 18 (4): 463-470.
36- Soni, S., Soni, U, N (2014). In-vitro anti-bacterial and anti-fungal activity of select essential oils, International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 6 (6): 586-591.

ISSN (online): 2789-6366
http://journal.damascusuniversity.edu.sy/index.php/index/index

37- Spiegel-Roy, P., Goldschmidt, E, E (1996). Biology of Citrus, Cambridge University Press.
38- Tassou, C., Koutsoumanis, K., Nychas, G, J, E (2000). Inhibition of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* in nutrient broth by mint essential oil. Food Research International, 33: 273-80.
39- Tyagi, A, K., Malik, A (2011). Antimicrobial potential and chemical composition of *Eucalyptus globulus* oil in liquid and vapour phase against food spoilage microorganisms, Food Chemistry, 126 (1): 228-235.
40- USDA Nutrient Database (2014). United States Department of Agriculture, National Nutrient Database for Standard Reference Release 26, Fruits and Fruit Juices.
41- Velázquez-Nuñez, M, J., Avila-Sosa, R., Palou, E., López-Malo, A (2013). Antifungal activity of orange (*Citrus sinensis* var. Valencia) peel essential oil applied by direct addition or vapor contact, Food Control, 31: 1-4.

ISSN (online): 2789-6366
http://journal.damascusuniversity.edu.sy/index.php/index/index