جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة بابل
كلية العلوم
قسم علوم الحياة

اختبار كفاءة تراكيز مختلفة من المستخلص الكحولي لنباتي *Euphorbia prostrata* و *Euphorbia hypercifolia* في تثبيط النمو الشعاعي للفطرين *Aspergillus flavus* و *Penicillium sp* .

الطالب.

سكينة حيدر عبد زيد.

المشرف.

ا. د. ابتهال معزعبد المهدي الحسيني.

1444هـ **May/2023**

بسم الله الرحمن الرحيم

(اقْرَأْ بِاسْمِ رَبِّكَ الَّذِي خَلَقَ ﴿١﴾ خَلَقَ الْإِنْسَانَ مِنْ عَلَقٍ ﴿٢﴾ اقْرَأْ وَرَبُّكَ الْأَكْرَمُ ﴿٣﴾ الَّذِي عَلَّمَ بِالْقَلَمِ ﴿٤﴾ عَلَّمَ الْإِنْسَانَ مَا لَمْ يَعْلَمْ ﴿٥﴾)

صدق الله العظيم

[سورة العلق]

شكر وتقدير

حمد الله عز وجل اوّلا واخرًا على فضله العظيم الذي منحني إياه ..
ثم أتقدم بالشكر الجزيل الى الأستاذة الدكتورة ابتهال معز عبد المهدي لمساعدتها الدائمة
وعطائها المستمر لإنجاز هذا البحث ..

وإلى جميع زملائي الأعزاء

الخلاصة

هدفت الدراسة الحالية دراسة الكشف عن المركبات الفعاله في نوعي النبات(*prostrate Euphorbia* و*Euphorbia hypercifoli*) ودراسه تأثير الكحولي على نمو الفطرين الممرضين *Aspegillus flavus* و *Penicillium sp*. حيث بينت الدراسة وجود عدد من المركبات الفعاله في النوعين . كما اضهر نبات *E.prostrate* افضل نسبة تثبيط على نمو الفطر*A.flavus* من فطر *Penicillum.sp.*وبنسب 16.34و 37.67 و74.11 عند التراكيز 10,30,40 ملغم\مل على التوالي .

في حين كانت نسبة التثبيط لنبات *E.hypercifoli* على نمو الفطرين بمعدلات مختلفة حيث كان معدل التثبيط لفطر *A.flavus* 10.69% *بينما* 10.17% *تأثيرا على نمو Penicillum .sp* هذا يدل على وجود حالm التثبيط للمستخلص الكحولي على النمو الفطرين وكفاءة عالية.

المحتويات

1.المقدمة.....1

2.استعراض المراجع 4

2.1 Aspergillus flavus.....4

2.2 مميزات 5

2.3إنتاج الأفلاتوكسين والمواد السامة الأخرى.....5

2.4إنتاج مواد ذات خصائص مضادة للجراثيم.....6

2.6الخصائص العامة.....8

2.7 المستخلصات النباتية 8

2.8 الأهمية الطبية والاقتصادية للجنس وللنوعين قيد الدراسة.....9

الفصل الثالث 11

1. الطرق ومواد العمل.....11

الفصل الرابع 16

النتائج والمناقشة.....16

المصادر بالعربية 23

References : 24

الفصل الأول

المقدمة

الفصل الاول

1.المقدمة

الفطريات هي كائنات حية حقيقية النواة تنتشر انتشاراً واسعاً في الأوساط المختلفة فهي توجد في التربة الرطبة والجافة، وفي المياه العذبة والمالحة وفي الهواء حتى ارتفاعات شاهقة منه. يهاجم الكثير منها النباتات والحيوانات والإنسان وتكون ممرضة له. كما تشاهد هذه الفطريات في كثير من الأغذية مسببة فساد الكثير منها، و قد تساهم في تسوية وانضاج بعضها مثل الجبن الركفور. ومن الفطريات ما يستفاد منه كغذاء مثل أنواع من الفطر البايزيدي، كما أن منها مايختلط على الآكل فتكون له سماً قاتلاً (المملكة النباتية ,2.15). الفطريات بالغة الأهمية اقتصاديا فالخمائر مسؤولة عن التخمر في معظم الصناعات الغذائية من إنتاج منتجات الحليب من ألبان وأجبان وصناعة الخبز إلى صناعة المشروبات الكحولية. كما تشكل زراعة فطر عيش الغراب مصدر غذائي مهم في العديد من البلدان. للفطريات أيضا أهمية بيئية فهي المحللات الأولية لجثث الحيوانات والنباتات الميتة في العديد من الأنظمة البيئية. كما تظهر على سطوح الخبز القديم بشكل عفن.بدأ باستخدام بعض أنواع الفطريات في بدايات القرن الماضي كمصدر أساسي للمضادات الحيوية مثل البنسيلين. وهي واسعة الانتشار، تضم ما يزيد عن (100) ألف نوع لذلك وضعت ضمن مملكة مستقلة بحد ذاتها تسمى مملكة الفطريات , وتعتبر الفطريات من الكائنات حقيقية النواة فهي تمتلك نظام غشائي داخلي يحيط بالنواة والعضيات السيتوبلازمية الأخرى، كما أن لها جدار خلوي يتكون من كميات من السكريات المتعددة «السيليلوز» والكايتين، والفطريات من الكائنات الحية غير ذاتية التغذية حيث تعتمد على غيرها من الأحياء للحصول على احتياجاتها الغذائية (الرحمة، 2003)، وتتباين الفطريات من حيث الحجم والمعيشة والشكل، فهي تعيش أما معيشة متكافلة، أو معيشة مترممة ، وبعضها تعيش معيشة متطفلة أما من حيث الشكل فمنها ما يكون وحيدة الخلية كالخمائر والتي قد تكون بيضوية أو كروية، ومنها ما يكون متعددة الخلايا كالأعفان أما من حيث الحجم فمنها كبير يرى بالعين المجردة مثل فطريات عيش الغراب ومعظمها صغيرة الحجم لا ترى إلا بالمجهر . تتكاثر الفطريات بطرق عديدة لا جنسياً عن طريق الانشطار الثنائي «وهذا نادر الحدوث في الفطريات»، أو بتكوين جراثيم لا جنسية «وهو الأكثر شيوعاً» أو بالتبرعم، كما أن العديد منها قد تتكاثر جنسياً وذلك عن طريق تكوين جراثيم جنسية وهذا يحدث عندما تكون الظروف غير ملائمة (الرحمة، 2003). وتتميز الفطريات بأن لها مدى واسع للنمو في درجات الحرارة المختلفة والتي تتراوح بين (5-55مْ) أو أكثر، وبالرغم من المدى الحراري الواسع للفطريات فإن الدرجة المثلى لأغلب الفطريات المترممة يتراوح بين (22-30مْ) بينما

تتراوح الدرجة المثلى في الفطريات المتطفلة بين (30-37مْ) ومعظم الفطريات تكون هوائية تحتاج الأوكسجين لنموها ولا تستطيع النمو والقيام بكافة العمليات الحيوية المختلفة إلا بوجوده وهذه تسمى بالفطريات الهوائية الإجبارية، كما أن بعض منها مثل فطر الخميرة تكون لا هوائية اختيارية أي تستطيع النمو في غياب الأوكسجين أو وجوده. كما تفضل الفطريات النمو في الأوساط الحامضية المنخفضة (Ph) يتراوح بين (5-6) (الرحمة، 2005). الفطريات مجموعة كبيرة من النباتات تتباين في أشكالها، وهي في مجموعها تشبه الطحالب إلا أنها خالية من الكلوروفيل. فهي تتكون من ثالوس أي لاتتميز إلى جذور وسيقان وأوراق. بعضها يتكون من خلية واحدة، ومعظمها عديد الخلايا، تنتظم في خيوط تعرف باسم الهايفات , ومجموع الهيفات التي تكون جسم الفطر تسمى ميسيليوم. الميسيليوم قد تكون هيفاته وحيدة الخلية غير مقسمة بجدر عرضية أو تكون هيفاته عديدة الخلايا أي أنها مقسمة بجدر عرضية. تتكون جدر الخلايا الفطرية عادة من الكيتين الموجود في جدر الحشرات، وقد تتكون من السليولوز. تحتوي الخلايا على نواة واحدة وقد تحتوي على نواتين، وقد تكون عديدة النوايات يبطن الجدار غشاء بلازمي يوجد بينه وبين الجدار في بعض المناطق حبيبات صغيرة غير معروفة وظيفتها بالضبط تسمى لوماسومات lomasomes . ينغمس في سيتوبلازما الخلية فجوة عصارية وميتوكندريا وشبكة إندوبلازمية وجليكوجين وريبوسومات ونظراً لعدم وجود اليخضور (الكلوروفيل) في خلايا الفطريات ' فأن الفطريات تتغذى تغذية غير ذاتية، فتعيش عيشة رمية أو طفيلية، ومنها ما يستطيع أن يعيش رميّاً أو طفيلياً حسب الظروف، والبعض منها يعيش معيشة تعاونية ولهذا فهي تستطيع أن تفرز أنزيمات خارجية لتحليل المواد الغذائية الموجودة في الوسط الذي تعيش فيه وجعلها في صورة قابلة للامتصاص، والمواد المخزنة في أجسام الفطريات غالبا ماتكون في صورة نشا حيواني (غلايكوجين) أو زيوت.

أن للجنس .L *Euphorbia* 25 نوعاً , وفي الموسوعة النباتية العراقية أوضح (Radcliffe-Smith 1980, أن هنالك ما يقارب 44 نوعا لمجنس .L *Euphorbia* من بينها نباتات عشبية وأشجار وشجيرات وكذالك نباتات عصارية وشبه عصارية ومنها ذات سيقان مشوكة) ذات اشكال شبيه بالصباريات متميزة عنها بوجود الحليب المطاط. كنبات طبي وأيضاً يحتوي على مادة سامة , كما أجريت دراسات لأنواع مختلفة للجنس L *Euphorbia* توضح التأثير المضاد لبعض أنواع البكتريا والفطريات . تم في الدراسة الحالية تسليط الضوء حول الكشف عن المكونات الكيميائية Phytochemical compounds في المستخلص بأستخدام الطرق الكيميائية و تقدير الفعالية التضادية للمستخلص النباتي ضد الفطريات ولكلا النوعين.

الفصل الثاني

استعراض المراجع

الفصل الثاني

2.استعراض المراجع

Aspergillus flavus 2.1

الفطر بيئي يمكن أن يؤثر على أنه عامل ممرض انتهازي ، ومنتج للسموم الفطرية وكمواد ملوثة للمحاصيل والمنتجات الغذائية. يمكن أيضًا العثور عليها ملوثة للجلود والأقمشة والدهانات وأكياس غسيل الكلى المكسورة والعدسات اللاصقة اللينة والأدوية المفتوحة وغيرها .يتم توزيعه على نطاق واسع في الطبيعة ومع الأجناس والأنواع الأخرى مهمة في تحلل المواد العضوية. تلعب هذه دورًا أساسيًا في دورة الكربون والنيتروجين .يتمتع هذا الجنس بتنوع استقلابي كبير ، فضلاً عن قدرة كبيرة على نشر وتكاثر الكونيديا ، نظرًا لأن رأسه الكونيدي يمكن أن ينتج أكثر من 500000 كونيديا. تنتشر الكونيديا في الهواء ويمكن أن تصل إلى العديد من الاماكن. توجد حتى في الصحارى وعالية في الغلاف الجوي. هذا هو السبب في أن أي شخص يمكن أن يسبب الحساسية بسبب فرط الحساسية عندما يكون هناك تعرض مستمر. يمكن أن يسبب أيضًا أمراضًا خطيرة في المرضى الذين يعانون من كبت المناعة ، ويتصرفون مثل مسببات الأمراض الانتهازية. من ناحية أخرى ، *A. flavus* يتطور على الحبوب مثل الذرة والأرز والفول السوداني ، وسوف ينتج عنها مواد سامة. من بينها: السموم الكبدية المسببة للسرطان والأفلاتوكسين ، والتي تصيب الإنسان والحيوان.

في المناطق الاستوائية .تنتشر في الديوك الرومية والدجاج وباء داء الرشاشيات في الجهاز التنفسي بسبب استهلاك الحبوب الملوثة بالأفلاتوكسين ، مما يتسبب في وفاة 10٪ من افراخ الدجاج ، بينما يتسبب في الإجهاض في الأبقار والأغنام. (Frontiers in plant sciences. 2018)

من ناحية أخرى ، نعم أ. فلافوس يتطور على الحبوب مثل الذرة والأرز والفول السوداني ، وسوف ينتج عنها مواد سامة. من بينها: السموم الكبدية المسببة للسرطان والأفلاتوكسين ، والتي تصيب الإنسان والحيوان.

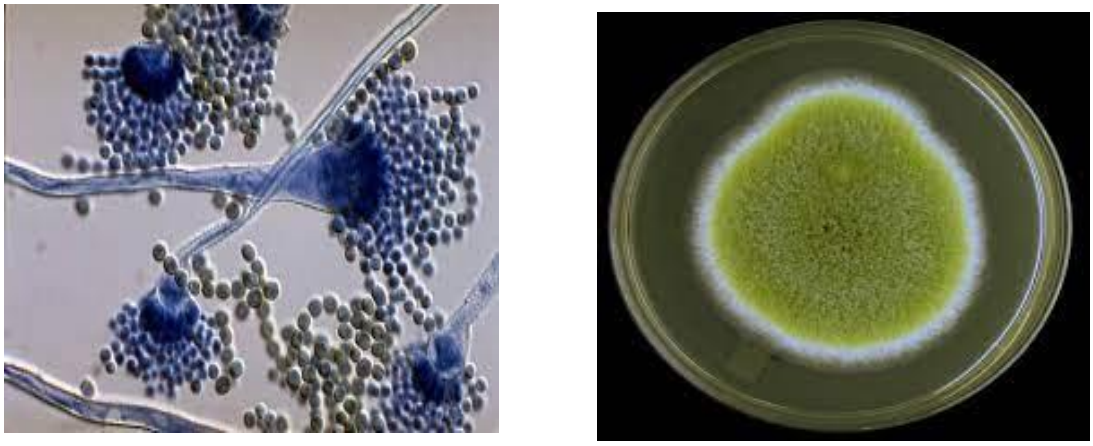


Figure.1 : Aspergillus Flavus

2.2 صفات فطر *Aspergillus Flavus*

يتميز جنس الرشاشيات بشكل عام بأنه من كائنات المجهرية تعود الى (Deuteromycetes) ؛ أي أنهم يتكاثرون اللاجنسي فقط. ومع ذلك ، في بعض الأنواع ، بما في ذلك أ. فلافوس من المعروف أن أشكاله تعود الى (Ascomycetes)، أي أن لديهم التكاثر الجنسي .ميزة أخرى مهمة أسبرجيلوس، فلافوس هي أنها يمكن أن تنتج مستقلبات ثانوية. هذا يعني أنه ليس لديهم وظيفة مباشرة في التمثيل الغذائي الفسيولوجي للفطر ، بل يعملون كعامل دفاع عن بيئة معادية .يتم تصنيعها أثناء تطور الفطريات ، وتسمى الأفلاتوكسين ، من بين مركبات أخرى. على الرغم من أنها ليست خاصية فريدة من نوعها أ. فلافوس، حيث يتم إنتاجها أيضًا بواسطة *A. parasiticus* ، و *A. nomius*. ينشأ الخطر عندما يثبت الفطر نفسه وينتج مواد سامة على الحبوب والبقوليات ، والتي سيستهلكها البشر والحيوانات لاحقًا .يمكن أن تؤثر الفطريات أيضًا على أوراق النباتات التي تضررت سابقًا من الحشرات في المناخات الحارة والرطبة ، وهي شائعة جدًا في المناطق الاستوائية .تنتشر في الديوك الرومية والدجاج وباء داء الرشاشيات في الجهاز التنفسي بسبب استهلاك الحبوب الملوثة بالأفلاتوكسين ، مما يتسبب في وفاة 10٪ من افراخ الدجاج، بينما يتسبب في الإجهاض في الأبقار والأغنام.

2.3 إنتاج الأفلاتوكسين والمواد السامة الأخرى

إن الأفلاتوكسينات هي أقوى المواد الطبيعية المسببة للسرطان الكبدي الموجودة. بهذا المعنى، أسبرجيلوس، فلافوس ينتج 4 أفلاتوكسين (B1 و B2 و G1 و G2)، حسب نوع السلالة.

أسبرجيلوس، فلافوس يتم تصنيفها إلى مجموعتين وفقًا لحجم تصلبها ، حيث تحتوي المجموعة الأولى سلالات L (على تصلب أكبر من 400 ميكرومتر)والمجموعة الثانية سلالات S (بها تصلب أصغر من 400 ميكرومتر .يتم إنتاج الأفلاتوكسين الأكثر شيوعًا B1) و (B2 بواسطة السلالتين L و S ، لكن الأفلاتوكسينات G1 و G2 تنتج فقط من سلالات .S نوع الأفلاتوكسين B1 هو الأكثر سمية ، وله قدرة كبيرة على تسمم الكبد ومسرطن ، لذلك يمكن أن يسبب التهاب الكبد الحاد إلى سرطان الخلايا الكبدية. بطريقة مماثلة، أسبرجيلوس، فلافوس ينتج حمض السيكلوبيازونيك الذي يسبب تنكس ونخر الكبد وإصابة عضلة القلب وتأثيرات سمية عصبية .إلى جانب ذلك ، فإنه ينتج مركبات سامة أخرى مثل ستريجماتوسيستين ، وحمض كوجيك ، وحمض بيتا- نتروبروبيونيك ، والأسبيرتوكسين ، والأفلاتريم ، والسم الجليوتوكسين وحمض الرشاشيات.

2.4 إنتاج مواد ذات خصائص مضادة للجراثيم

أن *A.flavus* تنتج 3 مواد ذات نشاط مضاد للجراثيم. هذه المواد هي حمض الرشاشيات والفلافيسين والفلافاسدين .يحتوي حمض الرشاشيات على نشاط جراثيم أو مبيد للجراثيم ضد بعض البكتيريا موجبة الجرام وسالبة الجرام اعتمادًا على التركيز الذي يتم استخدامه فيه .البكتيريا الرئيسية المصابة هي: العقدية -β الحالة للدم ، المكورات العنقودية الذهبية ، البكتيريا المعوية الهوائية ، المكورات المعوية البرازية ص الإشريكية القولونية .من جانبه ، فإن الفلافيسين له تأثير مضاد للجراثيم العقدية-β الحالة للدم ، عصيات الجمرة الخفية ، الوتدية الخناق ، المكورات العنقودية الذهبية ، المكورات العنقودية البشروية ، البروسيلا المجهضة ، العصوية الرقيقة ، الشيغيلة الزحارية ص ضمة الكوليرا .وفي الوقت نفسه ، فإن الفلافاسيدين مادة لها خصائص بيولوجية وكيميائية تشبه إلى حد بعيد البنسلين.

Kingdom of fungi

Phyllum: Ascomycota

Class: Eurotiomycetes

Order: Eurotiales

Family: *Aspergillaceae*

Genus: *Aspergillus*

Species: *flavus*.

2.5 فطر *Penicillium sp*

فطرالبنسيليوم هو جنس من االفطريات التي تعود الى Ascomycota. تم وصفه لأول مرة من قبل عالم الفطريات الألماني هاينريش لينك في عام 1809 وكان تصنيفها معقدًا .في البداية كان موجودًا في Deuteromycetes(الفطريات غير الكاملة) ، حيث لم يُعرف سوى حالته اللاجنسي . في وقت لاحق وجد أن بنسيليوم يتوافق مع الحالات تيليومورفيك (الجنسية) من الجنسين يوبينيسيليوم من الفطريات الزائدة .حالة صورة بصرية بنسيليوم يتميز بخيوط عديم اللون . عند وضعها في وسط الاستزراع المختبري ، تتحول المستعمرات من اللون الأزرق والأخضر المزرق إلى اللون الوردي .فطر البنسيليوم ينمو على منتجات عضوية مختلفة ، وتشكل طبقة من ألوان مختلفة. هذا الجنس رمي ويمكن أن ينمو في بيئات مختلفة .العديد من الأنواع ذات أهمية كبيرة للبشر. تم الحصول على البنسلين (أول مضاد حيوي يستخدم في الطب) من .P الكريسوجينوم. من ناحية أخرى ، فإن ما يسمى بالجبن الأزرق يكتسب خصائصه من خلال نشاط تحلل الدهون ومحلل البروتين لأنواع بنسيليوم .بعض الأنواع ضارة بالصحة. هذه تنتج سموم مختلفة مثل ochratoxins التي تضر بالجهاز الكلوي تلوث سموم الأوكرات بالحبوب والجبن ، كما تتراكم في دهون الحيوانات التي يستهلكها البشر. تؤثر هذه السموم على نظام الكلى .تم العثور على الباتولين في الحبوب والمكسرات. يمكن أن يضعف جهاز المناعة ويهاجم الجهاز العصبي. أنواع أخرى تضر بأطعمة مختلفة مثل الخبز والحمضيات. بعضها من مسببات الأمراض الحيوانية والبشرية.

Figure.2 : Penicillium Sp.

2.6 الخصائص العامة

تتميز المجموعة بفصل خيوط وشعيرات شكل mycelia. عندما ينمو في المختبر ، فإنه ينتج مستعمرات ذات فطريات متراصة وحواف محددة جيدًا. تنمو المستعمرات بسرعة ولها مظهر صوفي أو قطني. في البداية تكون بيضاء ثم تتحول إلى خضراء مزرقة أو خضراء مصفرة أو وردية .يتم إنتاج الأبواغ الجنسية (الأبواغ الأسكوية) في أسكي (أجسام الفاكهة) التي يمكن أن تكون خشبية أو أكثر نعومة في الملمس حسب المجموعة .السمة الأكثر بروزًا للجنس هي تطوير حوامل كونية متفرعة الشكل. تسمح الأنواع المختلفة من تفرع الكونيديوفور بالتمييز بين الأنواع .إن conidiophore منظم جيدًا وله محور تتشكل منه الفروع .(mutules) يتم تشكيل Phialides (خلايا على شكل زجاجة تنتج كونيديا) على الحبيبات. هذه هي الشخصية الأكثر أهمية للتمييز بين أنواع الجنس. حاليا يشمل الجنس جميع أنواع بنسيليم ، فضلا عن الأنواع Eladia و Torulomyces و Chromocleista و Hemicarpenteles.توجد أنواع أسكي بخلايا متساوية الأبعاد (جوانب متساوية) ، بجدران صلبة جدًا (مصلبة). يستغرق Asci شهورًا حتى ينضج ، وفي بعض الحالات ، تفشل الأبواغ الأسكوية في النضوج . تتميز الحالة اللاجنسية بفياليدات واسعة أمبولة أو على شكل زجاجة .يقع الجنس في عائلة Aspergillaceae وقد تم تقسيمه إلى نوعين فرعيين (الرشاشيات ص بنسيليوم) و 25 قسمًا. نواع بنسيليوم يمكن أن تتطور في بيئات متنوعة ولها توزيع عالمي. افراده قادره على العيش في ظروف قاسية من درجات الحرارة أو الملوحة أو درجة الحموضة أو الإجهاد المائي .حضور ال بنسيليوم أكثر من 400 نوع من النباتات. تم العثور عليها في المناطق شديدة البرودة مثل شبه القطب الشمالي والتندرا .في البيئات المالحة ، وجود أنواع بنسيليوم نباتات داخلية من الأعشاب البحرية أو تنمو في التربة عالية الملوحة.الأنواع الأخرى قادرة على التطور في التربة شديدة الحموضة بشكل طبيعي أو عن طريق الأنشطة البشرية ، مثل النفايات السائلة للتعدين ومياه الصرف الصناعي.

2.7 المستخلصات النباتية

هي مركبات طبيعية تستخرج من أجزاء النبات (أوراق, أزهار, ثمار) و تحتوي على مواد فعالة و تكون غالباً على شكل مستخلصات مائية أو كحولية أو زيوت أو مساحيق و لها طرق تأثير متعددة في مكافحة الآفات و الأمراض . تتميز المستخلصات النباتية بعدة خصائص أهمها:.لا توجد مخاطر من تطور صفه المقاومة للآفات بسبب تعدد اساليب التأثير,.غير ضارة بالبيئة أو الإنسان والحيوان, يمكن استخدامها سوياً مع الأعداء الطبيعية compatible , تتحلل في التربة أو البيئة بسرعة بفعل العوامل

الطبيعة والأحياء الدقيقة, رخيصة التكاليف في تحضيرها وتصنيعها مقارنه بالمبيدات الكيمائية, فترة تحريمها قصيره جداً, تسبب أضرار أقل للكائنات غير المستهدفة، مما يمنع من ظهور آفات ثانوية بشكل وبائي, لا تحدث أضرار معاكسة على نمو النباتات وحيوية البذور , ذات سمية منخفضه جدا لغير الحشرات. اما بالنسبة لتاثيراتها الغير مرغوب فيها فهي تأثيرها على الآفات غالباُ يكون بطيء, تتأثر سريعاً بالظروف الطبيعية، ولها قدرة أقل للتخزين، حيث تتأثر بأشعة الشمس المباشرة, قد يكون بعضها سام للإنسان والحيوان, قد لا تتوفر على مدار العام خصوصا اذا كانت من النباتات الموسمية.

2.8 الأهمية الطبية والاقتصادية للجنس وللنوعين قيد الدراسة

هنالك عدة أنواع ضمن العائلة السوسبية تحوي مركبات سامة , خاصة تمتى في الجنس ***Euphorbia***,

(Ramalho *et.al*., 2017). استخدم الجنس علاج لدغات الثعابين , snakebites وبعضها كنباتات زينة كالنوع , ***Euphorbia milli*** وأجناس أخرى ذات أهمية اقتصادية منيا نبات زيت الخروع ***Ricinus communis L.*** و(شجرة المطاط Mwine and) . ***rubber tree (Hevea esculenta)*** . (Damme, 2011). كما ذكر (Refahy , 2011) أن عدة انواع للجنس أظهرت نشاط أو فعالية كمبيد للرخويات. molluscicidal activity فضلاً عن مادة الحليب Latex التي يكثر تواجدها في افراد العائلة السوسبية , كما أستخدمت كمنشط , Tonic مخدر , Narcotic مضاد لمربو anti asthmatic , فعالة ضد الزحار , dysentery الأسياڼ Diarrhea والمغص Colic خاصة داء الأميبيات , فقد أستخدم كبخاخ للانف كٻ أو مركب ضد الالتهابات الفيروسية , والجيوب الأنفية , افرازات الانف المزمنة , أيضاً لمعالجة الأغشية المخاطية المبطنة للأنف كٻ الجافة والملتهبة واعراض الانفلونزا (Bijekar and Gayatri, 2014) وفيما يخص النوع , *E.prostrata* Ait. فقد أوضحت دراسة (Single and Pathak , 1989)أن المستخلص الكحولي لهذا النوع خصائص كمضاد للألتهابات Anti-inflammatory , مسكن للألم , Analgesic تخثر الدم فضلاً عن خصائص ألتئام الجروح(Rauf et.al ,2012 وله قدرة مضادات الأكسدة القصوى .

الفصل الثالث

الطرق ومواد العمل

الفصل الثالث

١.٣ الطرق ومواد العمل

1- مصدر الفطريات

تم ال حصول على الفطريات (*Aspergillus flavus* و *Penicillium sp.*) من مختبر عزل الفطريات و السموم الفطرية المتقدم \كلية العلوم – جامعة بابل.

2- الاوساط المستخدمة

- *وسط البطاطا دكستروز اكار potato Dextrose Agar (PDA)*

حضر الوسط الجاهز حسب توصيات الشركه المصنعه باذابة 39غم من مسحوق وسط البطاطا دكستروز اكار في كمية من الماء المقطر و اكمال الحجم للوصول الى لتر واحد اضيف الى الوسط الحيوي Chloramphenicol بمقدار250ملغم\لتر ثم وزع في دوارق زجاجيه سعه 250 مل وسدت فوهاتها بسداد قطني محكم وعقمت بالمؤصدة بدرجه حراره 121م وضغط 15باوند\انج لمده 20 دقيقة بعدها ترك الوسط ليبرد ثم صب في اطباق بتري بحسب الغرض من التجربة

3- جمع العينات النباتية Plant collection

تم الحصول على العينات النباتية للنوعين *Euphorbia prostrata* و *Euphorbia hypericifolia* , من وحدة المعشب في كلية العلوم \جامعة بابل (, وقد شخصت الأنواع من قبل أ.م.د. شيماء محي حسون / كلية العلوم / جامعة بابل . تم الحصول على مسحوق نباتي جاف ثم حضر منه المستخلصات الكحولية للدراسة .

4- تحضير المستخلص النباتي preparation of Plant extraction

حضر المستخمص النباتي أستناداً الى طريقة(Akowauh *et.al*.,2004) و (Bazzano and Serdula , 2003) مع بعض التحويرات البسيطة. وقد أستخدم المستخلص الكحولي Alcoholic extract (methanolic) كمذيب .

المستخلص الكحولي Alcoholic (methanolic) extract

تمت عملية الأستخلاص عمى النحو الأتي :

1) **طُحنت الأوارق الجافة من النوعين *E.prostrata , E.hypericifolia* بأستخدام الطاحونة الكهربائيه للحصول على الباودر .**
2) **وضعً 80 gm من كل نموذج نباتي في دوارق حجمية 1 L . في خليط (كحولي مكون من (ماء , ميثانول) (400 ml + 400 ml) مع غلق فتحة الوعاء بورق الألمنيوم بأحكام لتفادي تبخر المزيج ولمنع الأكسدة الهوائية .**
3) **وضًعت الدوارق في حمام المائي هزاز بدرجة 37 لمدة نصف ساعة وبسرعة عالية .**
4) **رشحت المستخلصات على مرحلتين الأولى بأستخدام الشاش الطبي والثانية بأستعمال عدة طبقات من ورق الترشيح نوع(Whatman 1) .**
5) **اخذ الراشح ووضع في جهاز الطرد المركزي بسرعة 2500 rpm لمدة (10) دقائق ثم جفف الراشح في طبق زجاجي في الحاضنة بدرجة 45 لمدة 2-5 يوم. قشط المستخلص بعد جفافه وحفظ في اوعية نظيفة لحين الاستخدام .**

5 - دراسة تأثير المستخلصات النباتية في معدل نمو الفطريات

حضر الوسط الغذائي PDA واضيف الية المستخلص النباتي للجزء المستخدم ولجميع النباتات قيد الدراسة وكلا على انفراد حسب التراكيز المدروسة وبنسبة (10و20و30) ملغم \مل من المستخلص بحجم 1مل اضيف الى كل طبق من الوسط الغذائيPDA لكل تركيز على حدة في اطباق بتري قطرها 9سم ولقحت مراكز الاطباق ب 1سم من مستعمرة الفطر النامي على الوسط الغذائي بعمر خمسة ايام وبواقع ثلاث مكررات لكل تركيز حضنت الاطباق بدرجة حرارة 25م ولمدة 7 ايام , وحسبت مسافة النمو بعد مرور 6 ايام من ظهر المستعمرة بقطرين متعامدين يمران بمركز القرص(فياض , .1997)بالمقارنة بعينة السيطرة الخالية من المستخلص النباتي وتم حساب النسبة المئوية للتثبيط للنمو الفطري بحسب معادلةAbbot الواردة من قبل (شعبان و الملاح.1993)

معدل اقطار النمو في السيطرة –معدل اقطار النمو في المعاملة

معدل التثبيط = ــ ×100

معدل اقطار النمو الفطري في السيطرة

6- طرق الكشف الكيميائي

- كواشف القلوانيات Alkaloides reagents

أ - كاشف ماير Mayers reagents .

حضر باذابة (12.5)غم من كلوريد الزئبقيك و (5)غم من يوديد البوتاسيوم في لتر من الماء المقطر ويستخدم للكشف عن عموم القلوانيات وذلك بأضافة (1 – 2) مل من المستخلص المائي والكحولي فيظهر راسب ابيض الى اسمر؟ (2006 , الرماحي ; 1984 , Harbone and Antherden) .

ب. كاشف حامض التانيك :

حضر الكاشف بتركيز1 % حامض التانيك الذي يستعمل لترسيب القلوانيات بأضافة (1 – 2)مل الى (5)مل من المستخلص المائي او الكحولي فيظهر تعكر ابيض مسمر (الدرويش ، 1983) .

- كواشف الفينولات Phenoles reagents

أ . كاشف 1% خلات الرصاص Leadacetate reagents

وهو محلول مائي من 1% خلات الرصاص وتفيد في الكشف عن التانينات اليسيرة وذلك بأضافة كمية من الكاشف الى كمية مساوية من المستخلص المائي او الكحولي فيظهرراسب اخضر مزرق (المختار، 1994 ; السلامي ، 1998) .

ب. كاشف 1% هيدروكسيد البوتاسيوم KoH

يستخدم للكشف عن Furanocou marins والفلافونيدات وذلك بأضافة 1% من محلول هيدروكسيد البوتاسيوم لكمية مساوية من المتخلص المائي و الكحولي فيظهر لون اصفر مخضر (Harbone , 1984).

- كواشف التربينات Terpenoid Reagents

أ . كاشف الرغوة Foan reagent

الكشف عن وجود السابونين ، حيث ترج قنينة محكمة الغلق تحوي على كمية من المستخلص المائي فعند ظهور الرغوة الكثيفة فوق سطح المستخلص تبقى مدة طويلة وهذا دليل على وجود التربينات (Harbon , 1984 ; المختار ، 1991) .

ب. كاشف كلوريد الزئبيقيك Hgcl2 reagent

الكشف عن وجود السابونين من التربينات وذلك بأضافة (1 – 2) مل من كلوريد الزئبقيك في (5) مل من المستخلص المائي أو الكحولي فيظهر راسب ابيض (المختار ، 1994 ; Harbone , 1984) .

الفصل الرابع

النتائج والمناقشة

الفصل الرابع

النتائج والمناقشة

1- الكشف عن بعض المركبات الكيميائية Detection of some phytochemical compounds

خلال الدراسة الحالية أكدت الاختبارات الكيميائية الأولية النوعية للمستخلص الميثانولي النوعين *E. prostrata* و *E. hypericifolia* وجود alkaloids , phenols , saponins , terpenes , steroids جدول (1.4) . وقد أعتبر وجود هذه المواد الكيميائية النباتية في النوعين تحت الدراسة مؤشراً على أنه قد يكون لهما بعض الإمكانات الطبية. وتوافقت النتائج الحالية مع دراسات أخرى أكدت وجود مجاميع كيميائية فعالة في مستخلص أوراق بعض أنوع الجنس *Euphorbia* ومنها النوع *E. prostrata* قيد الدراسة كدراسة (Hariyadi, 2020).

جدول (1.4) الكشف عن المركبات الفعالة في المستخلص الكحولي للنباتين *E.prostrata* و *E.hypericifalia*

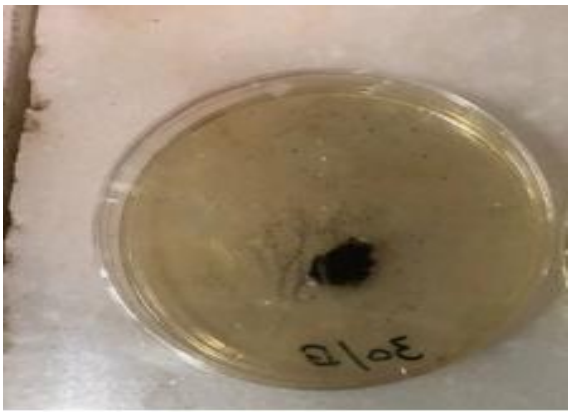
نوع المركبات الفعالة	*E.prostrata*	*E.hypericifalia*
الكشف عن الفينولات	+	+
الكشف عن القلويدات	+	-
الكشف عن الصابونيات	+	+
الكشف عن التربينات	+	+
الكشف عن الستيرويدات	+	-

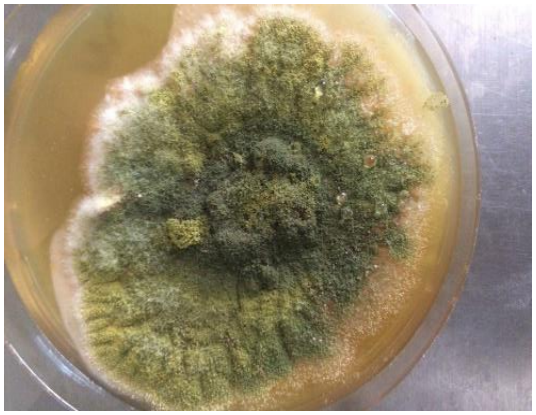
2- تأثير المستخلص الكحولي لأوراق النوع *E. prostrata* في تثبيط النمو الشعاعي للفطرين الممرضين *Aspergillus flavus* و *Penicillium* sp. باستخدام طريقة الانتشار (MIC).

بينت نتائج الدراسة الحالية الموضحة في الجدول (2.4) أن المستخلص ذو فعالية تثبيطيه عالية حيث أن معدل أقطار النمو للمستعمرات الفطرية تناسبت عكسياً مع الزيادة في تركيز المستخلص النباتي . بينما نجد ان النسبة المئوية لتثبيط الفطريات تتناسب طردياً مع تركيز المستخلص إذ بلغت نسبة تثبيط المستخلص للفطر *Aspergillus flavus* عند التراكيز (16.34%عند تركيز ١٠) و (٣٧.٦٧% عند تركيز ٢٠) و ٧٤.١١%عند تركيز ٣٠) , ملغم/ مل على التوالي . أما فاعلية المستخلص الكحولي التثبيطية تجاه الفطر *Penic1illium sp* فقد كانت النسب المئويه للتثبيط عند التراكيز (٢١.٨٨%عند تركيز ١٠) و (٣٩.٧٥% عند تركيز ٢٠) و 56.25%عند تركيز ٣٠%) (10 , 20 , 300) ملغ / مل على التوالي , مقارنة بنسبة التثبيط لمعاملة السيطرة صوره (1.4). يعود السبب في مقدرة المستخلص النباتي على تثبيط نمو الفطريات هو ذوبان بعض المركبات ذات الفعالية البيولوجية كالراتنجات التي تُعد من العوامل المضادة للفطريات (Savluchinske *et al* ., 1997) . كذلك ذكر(Cowan,1999) قدرة الكحول على استخلاص المركبات الفعالة كالقلويدات ,الفينولات ,الفلافونيدات والتانينات أكثر من الماء , إذ أن هذه المركبات تمتلك فعالية مضادة للفطريات , فضلاً عن ذلك تعمل هذه المركبات على ترسيب بروتين الخلية من خلال قدرتها على الاتحاد معه فتغير من طبيعته كما تعمل على تحلل أغشية الخلية الحية كونها مذيب جيد للمواد الدهنية مما يؤدي الى خروج محتويات الخلية للخارج فتموت الخلية الفطرية (Tylor and Osborne ,1996) .

جدول (2.4) تأثير تراكيز مختلفة للمستخلص الكحولي ميثلنو لاوراق النبات E.prostrata في نمو الفطرين *A.flavas* و *Penicillium sp*

التراكيز ملغم/مل	نوع الفطر (نسبة التثبيط 100%)		المعدل
	A.flavas	Penicillium sp	
السيطرة	0	0	0
10	16.34	21.88	19.11
20	37.67	39.75	38.71
30	74.11	56.25	65.18
المعدل	32.03	29.47	





صورة (1.4) توضح تأثير المستخلص الكحولي لأوراق النبات *E.prostrata*

في نمو الفطرين *A.flavas* و *Penicillium sp*

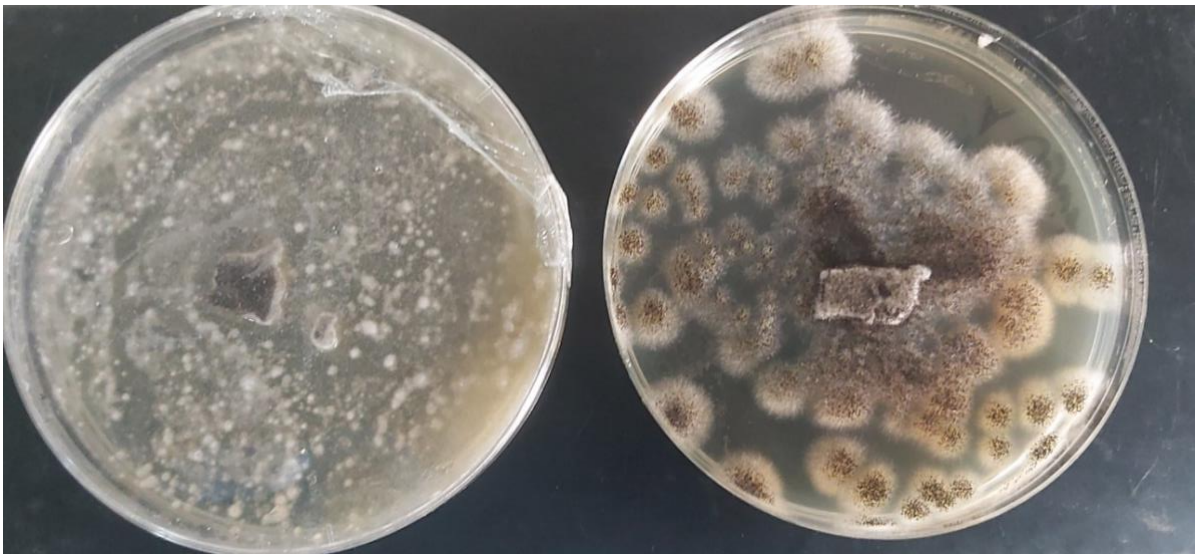
3- تأثير المستخلص الكحولي لأوراق *E.hypericifolia* في تثبيط النمو الشعاعي للفطرين *Aspergillus flavus* و *Penicillium sp*.باستخدام طريقة الانتشار (MIC) .

بالنسبة لتأثير المستخلص الكحولي لأوراق النوع *E.hypericifolia* جدول (3.4) . بينت النتائج أن هنالك زيادة طردية في نسب التثبيط بأزدياد تركيز المستخلص . إذ بلغت النسبة المئوية لتثبيط الفطر *Aspergillus flavus* (2.11% % عند التراكيز 10) و (16.33عند تركيز 20) و(24.33عند تركيز 30) ملغم / مل على التوالي . في حين كانت النسب المئوية لتثبيط الفطر*Penicillium* sp (8.56عند تركيز ١٠%) و(١٠ عند تركيز ٢٠%) و (٢٢.١١عند تركيز 30%) عند نفس التراكيز وعلى التوالي صورة (2.4).

كما اشار كل من (Kivanes and Akgul , 1996 ; Gills , 1992) أن الفعل المثبط لبعض المستخلصات النباتية ضد الكائنات الحية المجهرية قد يكون في احتواءها على زيوت اساسية غنية بالمركبات الفعالة المضادة للفطريات والتي تذوب في الكحول ولا تذوب في الماء كما اتضح ذلك من الكشف الكيميائي للمستخلص النباتي والذي يحتوي على مواد فعالة ذات اهمية كبيرة .

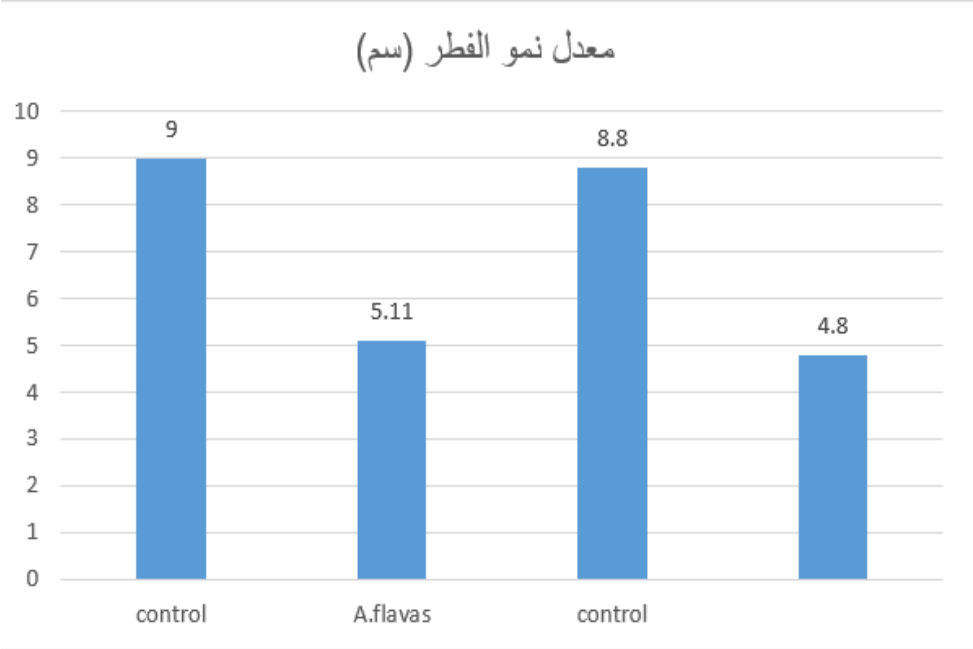
جدول (4.3) تأثير تراكيز مختلفة للمستخلص الكحولي ميثلنو لاوراق النبات *E.hypericifalia* في نمو الفطرين *A.flavas* و *Penicillium sp*

التراكيز ملغم/مل	نوع الفطر (نسبة التثبيط 100%)		المعدل
	A.flavas	Penicillium sp	
السيطرة	0	0	0
10	2.11	8.56	5.34
20	16.33	10	13.17
30	24.33	22.11	23.22
المعدل	10.69	10.17	

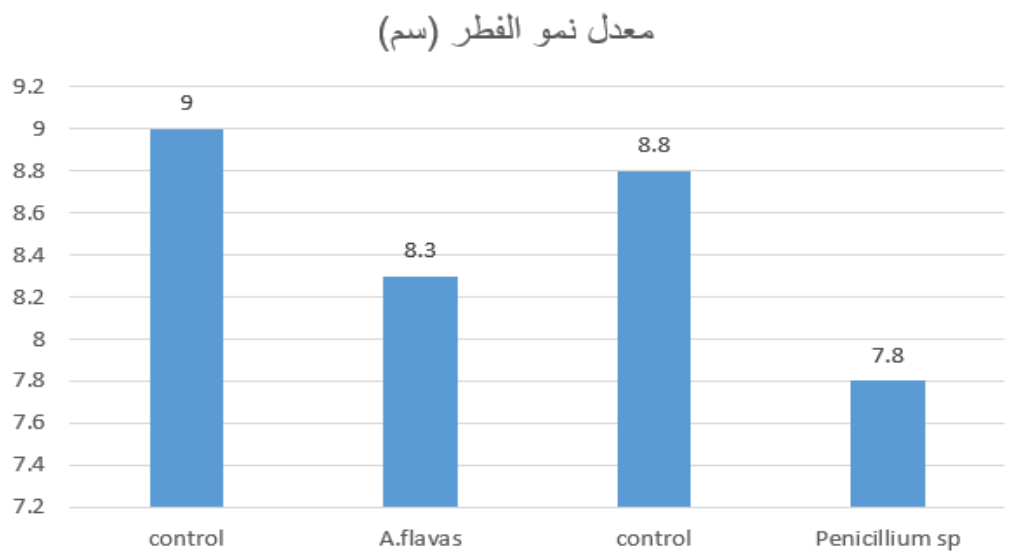


صورة (2.4) توضح تأثير المستخلص الكحولي لاوراق النبات *E.hypericifalia*

في نمو الفطرين *A.flavus* و *Penicillium sp*



شكل (1.4) يوضح معدل تأثير تراكيزالمستخلص الكحولي لاوراق النبات *E.prostrata* على نمو الفطرين *Aspergillus flavus* و *Penicillium sp.*



شكل (2.4) يوضح معدل تأثير تراكيز المستخلص الكحولي لأوراق النبات *E. hypericifalia* على نمو الفطرين *Aspergillus flavus* و *Penicillium sp.*

المصادر بالعربية

-د،حسوني جدوع عبد الله، د، صبا رياض خضير، اشرف سامي حسن، البيئة، بيئة الحيوان والنبات والاحياء المجهرية،دار دجلة عمان، 2015 ص 260

-شعبان, عواد ونزار مصطفى الملاح (1993(. المبيدات .دار الكتب الطباعة والنشر . جامعة الموصل .

-عامر عبد الفتاح الكيلاني،الموسوعة الطبيعية،عمان.2014 ص 189

-فياض، محمد عامر (1977) . استجابة تراكيب وراثية مختلفة من زهرة الشمس Heliathus annus L. للإصابةبالفطر Macrophomina phaseolina ودور بعض الطرق الاحيائية في المقاومة اطروحة دكتوراه . كلية الزراعة . جامعة بغداد.

-كتاب المملكة النباتية د.حسين العروسي وعماد الدين وصفي - الباب الخامس- ص 90

References:

-Abbot, W. S. (1925). A method of Computing the effectiveness of an insecticide. J. Ent., 18: 265-267.

-Acosta R (2006) Selection of *Penicillium* producers of antifungal peptides for use in meat products. Memory to qualify for the title of Doctor. Faculty of Veterinary Medicine, University of Extremadura, Spain. 288 p.

-Amaike S. Keller N. Aspergillus, Flavus. Annu Rev Phytopathol. 2011; 49:107-133 2. Ryan KJ, Ray C. Cherice. Microbiology of Medicine, 2010. 6th ed. McGraw-Hill, New York, USA

-Arenas R. Medical Mycology Photographer. 2014. 5th Ed. Mc Graw Hill, 5th Mexico.

***Aspergillus flavu*s**

-Bonifaz A. Basic Medical Mycology. 2015. Fifth Edition. Mc Graw Hill, Mexico DF.

-Cabañes J, Bragulat MR, Castellá G (2010) Ochratoxin species producer in the genus *Penicillium* . Detox 2: 1111-1120.

-Casas-Rincón G. General Mycology. 1994. Second Edition Central University of Venezuela, Library Editions. Venezuela Caracas.

-Contributors to Wikipedia. Aspergillus, Flavus. Wikipedia the free encyclopedia. September 10, 2018, at 11:34 a.m. UTC. Available at: Wikipedia.org.

-Cowan, M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. Clin. Microbiol. Rev. 12, 564–582.

-Cuervo Maldonado S, Gomez-Rincon J, Rivas B, Guevara F. Update on aspergillosis with focus on invasive aspergillosis. infection. 2010; 14 (2): 131-144

-Gills, L.S. (1992). Ethnomedical uses of plants in Nigeria. Uniben Press. Edo. State Nigeria. 212.

-Hariyadi, D. M. and Sahu , V.K. (2020) . Euphrbia Prostrate extract potent Anti-inflammatory and Anti-arthritic activity in Downregulating the increased expression of Pro-inflammatory cytokines . Pharmaceutical Sciences, 26(4), 370-378.

-Houbraken and RA Samson (2011) Phylogeny of *Penicillium* and the separation of Trichomoniasis into three families. Studies in Mycology 70: 1-51.

-Kivanec, M. and Akgul, A. (1996). Antibacterial activities of essential oils from Turkish spices and citrus. Flavour Fragr. J. 1:175-179.

-Koneman E, Allen S, Janda W, Schirkenberger B, Wayne W (2004). Microbiological diagnosis. (5th ed.). Argentina, editorial Panamericana SA

-Majumdar R, Libar M, Mak B, et al. The Aspergillus flavus Spermidine Synthase (spds) gene is required for normal growth, aflatoxin production, and pathogenesis of maize kernel infection. Frontiers in plant sciences. 2018; 9:317

-Pildain M, Cabral D, Vaamonde G. Population of Aspergillus flavus in peanuts grown in different agro-ecological zones in Argentina, morphological and toxicological characterization. mouth. 2005; 34 (3): 3-19

-Rocha A. The antibacterial activity of Aspergillus flavus. Memories of the Oswaldo Cruz Institute Rio de Janeiro, Brazil. 1944; 41 (1): 45-57

-Samson RA, N Yilmazi, J Houbraken, H Spierenburg, KA Seifert, SW Peterson, J Varga, JC Frisvad (2011) Phylogeny, nomenclature of the genus *Tellomyces* ,and taxa of residence in *Penicillium* subgenus *Biverticillium* . Studies in Mycology 70: 159-183.

-Savluchinske Feio, S., Roseiro, J.C., Gigante, B., Marcelo-Curto, M.J., (1997) . Method on multiwell plates for the evaluation of the antimicrobial activity of resin acid derivatives. J. Microbiol. Methods 28, 201–206..

-Taylor T.N. Osborne J.M. (1996). The importance of fungi in shaping the paleoecosystem. Rev. Palaeobot. Palynol. 90, 249–262.

-Visagie CM, J Houbraken, JC Frisvad, SB Hong, CGW Klaassen, G Perrone, KA Seifert, J. Varga, T Yaguchi, RA Samson (2014) Identification and nomenclature of the genus *Penicillium* . Studies in Mycology 78: 343-371.

-Yadav A, P Verma, V Kumar, P Sangwan, S Mishra, N Panjiar, V Gupta, AK Saxena (2017) Biodiversity of the genus *Penicillium* in different habitats. In: KV Gupta and S Rodríguez-Canto (Editor). New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering. *Penicillium* system properties and applications. Elsevier, UK.