- المقدمة

Introduction

لا يستطيع الإنسان الإستغناء عن النباتات العشبية لما لها من أهمية في الحفاظ على صحة الإنسان لإحتوائها على العديد من المواد الفعالة التي لها دور في علاج العديد من الأمراض و لقد عرف إستخدام النباتات العشبية منذ الحضارات الفرعونية و اليونانية و الإسلامية و غيرها و اليوم الأبحاث تكشف لنا الكثير من الفوائد و الأسرار الطبية حيث يوجد على الأرض ما بين 250000 و 500000 نوع نباتي و النباتات العشبية المكتشفة حتى الآن ليست إلا جزء يسير من النباتات الموجودة في العالم حيث أن ما تمت دراسته حاليا لا يتجاوز 10% مما هو موجود في الطبيعة.

اعتبرت منظمة الصحة العالمية (WHO) أن النباتات العشبية من أهم مصادر العلاج للأمراض المختلفة. و يتميز إستخدام النباتات العشبية في علاج الأمراض الميكروبية بدلا من المضادات الحيوية بأنها أكثر أمانا و يسهل الحصول عليها و فاعليتها أكثر في بعض الأحيان بالمقارنة بالمضادات الحيوية و غير مكلفة إقتصاديا لذا فإن استخدام النباتات العشبية للعلاج انتشر في أرجاء العالم كبديل للمضادات الحيوية مثل النيستاتين Nystatin و الأمفوتريسين ب Amphotricin B و الأمبيسيللين Ampicillin و غيرها و التي تبين أن لها أضرار جانبية بالغة كالغثيان وعسر الهضم و الطفح الجلدي و الصداع و حدوث الضرر بالكلى والكبد و غيرها كما قد ظهرت بعض السلالات الميكروبية المقاومة لبعض المضادات الحيوية لذا كان الخيار الأمثل هو استعمال النباتات العشبية المضادة للميكروبات لعلاج تلك الأمراض الميكروبية .

تحتوي النباتات العشبية على عدة مكونات كيميائية ذات تأثير مثبط للميكروبات مثل الفينولات و الفلافونيدات و القلويدات و الزيوت العطرية و تكون هذه المكونات غالبا نواتج أيض ثانوية في النبات و تتواجد في أجزاء مختلفة منه و قد وجد أن هناك بعض النباتات العشبية المحلية و التي ثبت أن لها تاثير مثبط للعديد من الأنواع الميكروبية مثل نبات الحناء و السدر و الخزامى و الريحان و غيرها.

يختلف تأثير المواد الفعالة للنباتات العشبية على الميكروبات المختلفة و يقدر العلماء عدد الفطريات الموجودة على سطح الكرة الأرضية بحوالي 1.5 مليون نوع فطري تم تعريف 70000 نوع منها. ما يقارب 400 نوع من الفطريات تعد ممرضة للحيوانات و القليل منها يحدث أمراض فطرية للإنسان و يوجد أكثر من 200 نوع من السموم الفطرية التي ينتج ثلثيها فطريات تتبع جنس *Aspergillus* و *Penicillium* و *Fusarium* بالإضافة لفطريات تتبع حوالي 80 جنسا آخر و قد وجد أن بعض النباتات العشبية قد تكون مفيدة في تقليل أو وقف عملية إنتاج السموم الفطرية في الغذاء بواسطة بعض الفطريات المنتجة للسموم الفطرية وذلك من خلال تثبيط نمو تلك الفطريات و وقف قدرتها على إنتاج السموم الفطرية و من الأمثلة على تأثير النباتات العشبية المحلية على الفطريات السامة هو تأثير نباتي القرفة و البرسيم و اللذين يثبطان نمو الفطر *Aspergillus flavus* و قدرته على إنتاج السم الفطري Aflatoxin G1.

1-1 أهداف البحث

1- اختبار قدرة بعض النباتات العشبية المحلية و المسوقة تجاريا لدى العطارين في تثبيط بعض الفطريات الجلدية.

2- تقييم بعض الخلطات العشبية لدى العطارين و التي يستخدمها عامة الناس لعلاج الأمراض الجلدية على بعض الفطريات الجلدية في المعمل.

3- عمل مقارنة بين النباتات العشبية من ناحية الأفضل في التخلص من الفطريات الممرضة.

4- اختبار قدرة المستخلصات العشبية النباتية على الحد من نمو بعض الفطريات و إنتاجها للسموم الفطرية في البيئة السائلة.

2- الأبحاث السابقة

Literature Review

الأمراض البكتيرية و الفطرية تصيب ملايين الأشخاص حيث توجد البكتيريا و الفطريات الممرضة في البيئة المحيطة وتنتقل منها إلى الإنسان عبر الفم أو الأنف أو الدم أو الملامسة فتسبب له أمراض فطرية Mycoses و بكتيرية Bacterioses مختلفة (Murray *et al*., 2005) و لعلاج هذه الأمراض الميكروبية استعمل الإنسان المضادات الحيوية بكثره إلا أنها ظهرت لها أضرار جانبية كثيره مثل الغثيان وعسر الهضم و طفح جلدي و صداع و حدوث الضرر بالكلى والكبد و غيرها كما قد ظهرت بعض السلالات الفطرية المقاومة لبعض المضادات الحيوية (شاهين و عمر, 2008) ; (Speller, 1980) لذا كان الخيار الأمثل هو استعمال النباتات العشبية لعلاج الأمراض الميكروبية (القحطاني, 2007).

هناك حاجة ماسة للمزيد من البحث عن النباتات العشبية المحلية الفعالة في علاج الأمراض الميكروبية المختلفة و خاصة السلالات الميكروبية المقاومة للمضادات الحيوية المصنعة (Okigbo *et al*., 2005).

2-1 الميكروبات الممرضة للجلد Pathogenic microbes of skin.

2-1-1 البكتيريا Bacteria.

هناك عدة أنواع من البكتريا تسبب بعض الأمراض الجلدية مثل.

1- مرض القوباء (Impetigo) تصيب الأطفال بشكل خاص، معدية جداً. وهي تبدأ كرقعة حمراء، غالباً حول الأنف أو الفم، وبعد يوم أو يومين تتطور إلى عنقود من البثور الدقيقة، ثم تكون بعد ذلك قشرة صفراء بنية. وقد تشمل الأعراض الأخرى الحمى وتضخم الغدد الليمفاوية في الوجه أو الرقبة و تحدث العدوى بالمكورات العنقودية *Staphylococcus aureus* أو المكورات السبحية .*Streptococcus* spp أو كليهما في الطبقات العليا من الجلد (George and Rubin, 2003).

2- الدمامل (Abscesses) هي التهابات مؤلمة في جريبات الشعر والأنسجة تحتها. وهي نتوءات حمراء ممتلئة بالصديد تظهر غالباً على الوجه والرقبة والإبطين والردفين والفخذين و تنتج عادة من زحف المكورات

العنقودية من سطح الجلد إلى داخل جريبات الشعر و النسيج المحيط في طبقة الأدمة و غالبا ما تصيب الأشخاص المصابين بنقص المناعة (Ostler *et al*., 2004).

3- الالتهاب الخلوي (Cellular inflammation) يعد أكثر أنواع عدوى الجلد البكتيرية خطرا حيث تأتي العدوى بعد إصابة الجلد بحرق أو لدغة أو فتحة جراحية حيث تسبب العدوى حمى و قشعريرة و تورم ثم تمتد الإصابة إلى المستويات الأعمق من الجلد حيث تصيب النسيج الضام و قد تنتقل إلى الدم مسببة تسمم للدم و غنغرينا و غالبا ما تصيب الأشخاص المصابين بنقص المناعة و تسببها عدة أنواع بكتيرية (Murray *et al*., 2005).

2-1-2 الفطريات Fungi.

هناك العديد من الفطريات الممرضة للجلد و التي تسبب أمراض فطرية جلدية Cutaneous Mycoses و تكون أمراض ناتجة عن العدوى بفطر ممرض (pathogenic fungi) أو بفطر إنتهازي (opportunistic fungi) حيث تهاجم هذه الفطريات الطبقة الكيراتينية للجلد والشعر و الأظافر وتسبب بقع حلقية مؤلمة و متقشرة للجلد وتكسر للشعر وتلون الأظافر وزيادة سمكها و تسبب العديد من الأمراض التي تسمى Dermatophytoses التي تسببها الفطريات التي تسمى dermatophytes.

و أمراض Dermatophytoses منها مرض السعفة (التينيا) Tinea أو القوباء الحلقية ringworm. مرض السعفة يصيب طبقة الجلد والشعر و الأظافر ويصيب الإنسان والحيوانات من جميع الأعمار و منها tinea capitis الذي غالبا ما يصيب الأطفال.

يحدث المرض نتيجة للإصابة بأحد الأجناس الفطرية الممرضة وهي *Microsporum* و *Trichophyton* و *Epidermophyton* وهذه الفطريات محبة للكيراتين ومحللة له (Ostler *et al*., 2004). تصنف الإصابة بالتينيا حسب مناطق الإصابة إلى عدة أنواع وهي سعفة الجسم Tinea Corporis, سعفة المناطق الإربية Tinea Cruris, سعفة القدم (قدم الرياضي) Tinea Pedis, سعفة فروة الرأس Tinea Capitis, سعفة اللحية Tinea Barbae, سعفة اليد Tinea Manuum و سعفة الأظافر (Onychomycosis) Tinea Unguium (Murray *et al*., 2005).

هناك فطريات تسبب أمراض تسمى nondermatophytoses و هو مرض يصيب الأظافر غالبا Onychomycosis حيث أن حوالي 1.8 مليون شخص في المملكة المتحدة يعانون من فطريات الأظافر (Moore *et al*., 2011) و تسببها فطريات ليست من مجموعة dermatophytes حيث تسببه الفطريات *Scopulariopsis brevicaulis* و *Scytalidium dimidiatum* و *Scytalidium hyalinum* و أنواع تتبع أجناس فطرية أخرى مثل *Aspergillus* و *Fusarium* و *Candida* و تختلف الأضرار التي تحدث للأظافر بإختلاف

نوع الفطر الممرض (Scher and Daniel, 1990) و تصيب خميرة كانديدا في الغالب المناطق الرطبة من الجلد و الأغشية المخاطية بالفم و المهبل و النوع الشائع منها هو *Candida albicans* (السيد, 2008).

2-2 النباتات العشبية و أهميتها Herbal plants and there important

إعتمد الإنسان في الماضي على النباتات لمعالجة كافة الأمراض حيث أنه مع نمو الحضارات منذ القدم صار إستعمال الأعشاب الطبية أكثر تعقيدا و قد أورد Hippocrates (أبوقراط) في القرن الخامس قبل الميلاد 300 إلى 400 نبات طبي و بعدها في القرن الخامس الميلادي كتب Dioscorides كتابا في النباتات العشبية و أسماه *De Materia Medica* و الذي أصبح أساس لعلم الصيدلة و بعد ذلك كان للحضارة الإسلامية دورا كبيرا في الحفاظ على المكتسبات التي سبقت إلى تطوير هذا العلم (Cowan, 1999).

في الطب النبوي ذكرت أنواع عدة من النباتات العشبية منها الحناء و السدر و السنا و غيرها فقد روي عن سلمى أم رافع خادمة رسول الله صلى الله عليه و سلم أنها قالت: كان لا يصيب رسول الله صلى الله عليه و سلم قرحة و لا شوكة إلا و ضع عليها الحناء (بركة و فهيم, 1997).

يوجد على الأرض ما بين 250000 و 500000 نوع نباتي (Borris, 1996) و النباتات العشبية المعرفة حتى الآن ليست إلا جزء يسير من النباتات الموجودة في العالم حيث أن ما تمت دراسته حاليا لا يتجاوز 10% مما هو موجود في الطبيعة (منصور, 2005). يختلف تأثير النباتات العشبية فقد يكون مضاد للميكروبات أو الديدان أو مضاد للحساسية أو مضاد للسرطان و غيرها من التأثيرات العلاجية (Edeoga *et al*., 2005).

تأثير هذه النباتات العشبية ناتج عن تداخل نواتج الأيض الثانوية للنبات و التي تسمى المواد الفعالة مثل القلويدات, الزيوت العطرية, التانينات, الفينولات, الفلافونيدات. الستيرويدات و الراتنج. و هذه المواد لها القدرة على التأثير المثبط للميكروبات (Joshi and Edington, 1990) فمثلا في دراسة أجريت على المستخلص الميثانولي لأوراق نبات الحناء عند تركيز 50 mg/ml وجد أن له تأثير مثبط على بكتيريا *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Esherichia coli*, *Klebsiela pneumonia*, *Pseudomonas pseudoalcalgenes* كان متوسط قطر منطقة التثبيط و قدره 12, 8.5, 9, 9.5, 8.5 ملم على التوالي و عند تحليل النبات وجد أن المواد الفعالة فيه هي flavonoids, tannins, saponins, steroids, glycosides (Raja *et al*., 2013).

من المعروف أن حوالي 50% من الأدوية الحديثة مشتقة من نباتات فمثلا المورفين morphine و هو مسكن للآلام و منتج من نبات الخشخاش الأسود *Papaver somniferum*, الإفيدرين Ephedrine المستخدم لعلاج الربو من نبات إفيدرا *Ephedra vulgaris* و الأتروبين Atropine من نبات ست الحسن *Atropa belladonna* كما فصل مركب الكينين من نبات الكينا *Cinchora pubescens* و استخدم لعلاج مرض الملاريا و كذلك مركب الأميتين الذي فصل من جذور نبات عرق الذهب *Carapichea ipecacuanha* و يفيد في علاج الكحة و الدوسنتاريا كما أنه استخلص من جذور نبات الراولفيا *Rauwolfia serpentine* مركب الرزربين الذي يعالج فرط ضغط الدم و فصل مركب الإرجوتامين من فطر الإرجوت *Clavicepes purpurea* و الذي يستعمل لتعجيل الولادة و كذلك وجد أن مركب الكولشيسين الذي فصل من نبات اللحلاح *Colchicum autumnale* يستخدم لعلاج النقرس كما فصل المضاد الحيوي البنسلين من فطر *Penicillium cresogenum* (Baker *et al*., 1995) و (Prakash and Gupta, 2005) و (القحطاني, 2007) و لقد اتضح أن مركب Arbutin المفصول من نبات الأويسة *Vaccinium macrocarpon* فعال في تثبيط خميرة .*Candida* spp كما وجد أن نبات الختم الذهبي Hydrasis canadensis يحتوي على مركب Berberin المضاد للميكروبات (السيد, 2008).

يتميز إستخدام النباتات العشبية في العلاج بدلا من المضادات الفطرية الكيميائية بأنها أكثر أمانا و يسهل الحصول عليها و فعالة و غير مكلفة إقتصاديا (Siddiqui, 1993) كما تتميز النباتات العشبية عن العقاقير الكيميائية بأن النبات الطبي إذا أخذ كاملا (النبات الطبي بكل أجزائه بدون إستخلاص المادة الفعالة) فإنه يحتوي على العديد من المكونات الكيميائية الفعالة و التي تساعد في العلاج و رفع مناعة الشخص في الوقت نفسه و تحسين صحته في نواحي عدة و يوضح الجدول التالي (جدول 2-1) الفرق بين النباتات العشبية و العقاقير الكيميائية على صحة الإنسان (شوفالييه, 2010).

جدول 2-1 : الفرق بين تأثير النباتات العشبية و العقاقير الكيميائية على صحة الإنسان(شوفالييه, 2010), (القحطاني, 2007).

النباتات العشبية	العقاقير الكيميائية
مصدر واسع غير محدود لعلاج الأمراض المختلفة حيث أن هناك العديد من النباتات العشبية التي لم يكتشف تأثيرها بعد	مصدر محدود لعلاج الأمراض المختلفة حيث أن العقاقير الكيميائية قليلة مقارنة بالنباتات العشبية
مفعول النبات الطبي كعلاج على المدى الطويل و ليس سريع المفعول إلا أنه يعالج سبب المشكلة	مفعول العقاقير الكيميائية كعلاج على المدى القصير و يعالج المشكلة بشكل محدد.

إستخدام النباتات العشبية آمن إذا أخذت الجرعة المناسبة أو التخفيف المناسب	إستخدام العقاقير الكيميائية له أضرار جانبية مختلفة.
النباتات العشبية غير مكلفة إقتصاديا	العقاقير الكيميائية مكلفة إقتصاديا.

النباتات العشبية المحلية Local herbal plants

يعد كلا من نبات الحناء و الريحان و السدر و السنامكي و الشلياط و الحرجل من النباتات العشبية في المملكة العربية السعودية (القحطاني,2007) حيث ورد في الطب الشعبي المحلي إستعمال مغلي نبات الحناء كغرغرة لآلام الحلق و منقوع الأوراق يستعمل خارجيا لعلاج الأمراض الجلدية أما بالنسبة لنبات السدر فيستعمل أوراق و قشرة النبات لعلاج الجروح و بعض الأمراض الجلدية كما ورد أن نبات الشلياط فعال لعلاج أمراض الجهاز التنفسي أما بالنسبة لنباتي الحرجل و السنامكي فيستعملان كمسهل (الشنواني, 1994). و لقد تم عمل دراسات عدة على فعالية الكثير من النباتات العشبية المحلية فمثلا وجدت طيب في بحث أجرته

سنة 2008 أن بكتيريا *Staphylococcus aureus* تتأثر سلبيا بالمستخلص المائي لنبات السدر بتركيز 24 ملجم/مل.

3-2 علاج الأمراض الميكروبية Microbial disease treatment

1-3-2 المضادات الحيوية Antibiotics.

بداية إكتشاف المضادات الحيوية حدث في أوائل القرن العشرين سنة 1915م على يد العالم بول إيرليخ Paul Ehrlich الذي درس تأثير مواد كيميائية على أنواع من البكتيريا و البروتوزوا معمليا *in vitro* و في سنة 1929م إكتشف العالم ألكسندر فليمنغ أول مضاد حيوي و هو البنسلين و هذا ساعد كثيرا في إنقاذ العديد من المرضى خاصة الجنود الذين عانوا من الجروح الملتهبة و بعد ذلك سنة 1930م إكتشف الباحث جيرهارد دوميجيك صبغة البرونتوزويل prontosil التي تتحول في الجسم إلى مركب السلفونيلامايد sulfonillamide الذي وجد أن له القدرة على علاج بعض الإلتهابات الجرثومية داخل جسم الإنسان و بعدها تم تسويق مركبات السلفونيللامايدات المصنعة تجاريا و توالت بعد ذلك إكتشافات المضادات الحيوية و منها المضادات الفطرية و التي إزدهرت و اكتشف معظمها بين سنة 1950م و 1980م (شاهين وعمر, 2008). و هي تعتبر منتجات ثانوية تنتج طبيعيا بواسطة ميكروبات (بكتريا و فطريات و أكتينوميسيتات) أو تكون مصنعة كيميائيا (Hildreth *et al.*, 2009).

تختلف أنواع المضادات الحيوية فمنها مضادات بكتيرية و مضادات فطرية و كلاهم يستهدف تركيب مهم في الخلية الحية لذلك يقود إلى اما موتها أو وقف نموها و ذلك لإختلاف تركيب الجدار الخلوي لكلا منهما و الذي يستهدفه المضاد الحيوي (شاهين و عمر, 2008).

1-1-3-2 المضادات البكتيرية Antibacterial

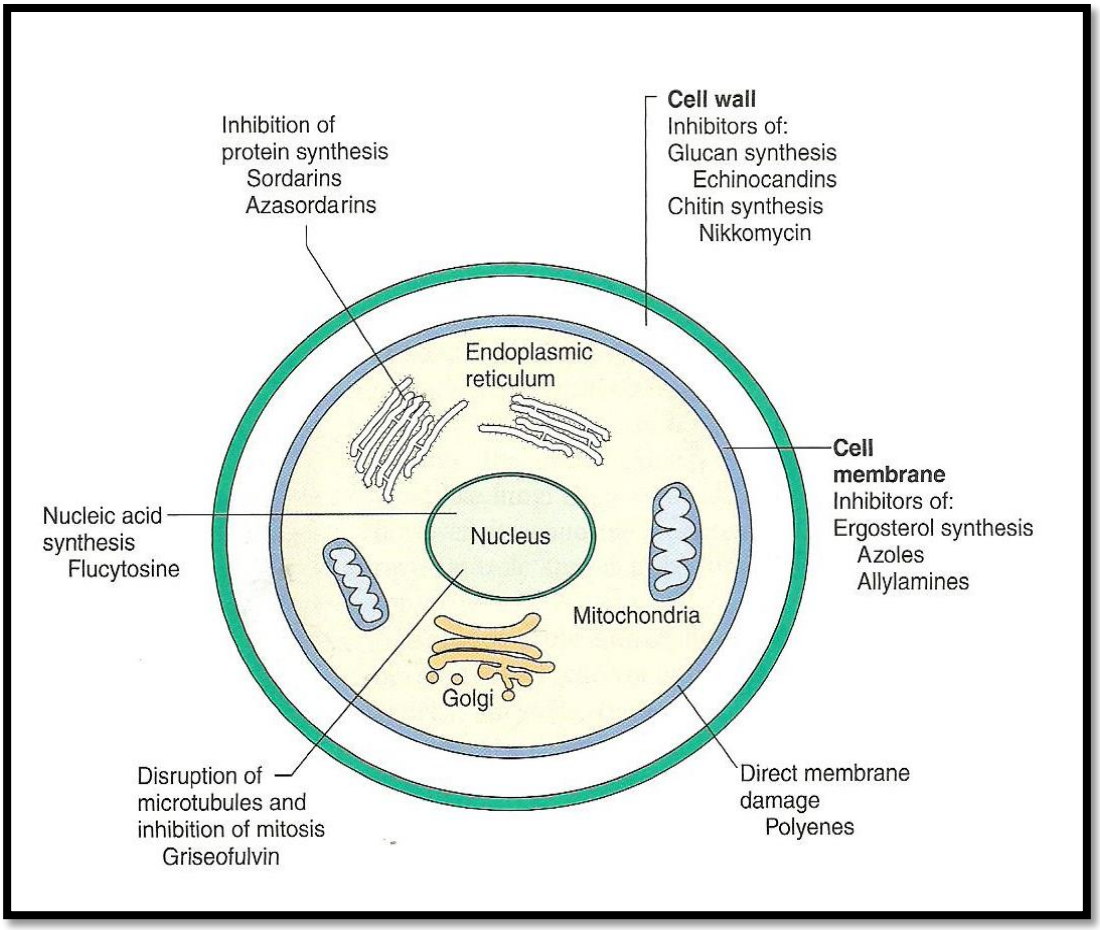
المضاد البكتيري أمبيسيلين Ampicillin:

أمبيسيلين Ampicillin هو مضاد بكتيري من مجموعة البنسلين نصف المركب حيث يتكون من البنسلين الطبيعي و مركب كيميائي يحتوي مجموعة الأمين وهو مضاد بكتيري واسع المدى ويعمل الأمبيسلين عن طريق منع إنزيم Transpeptidase والمسؤول عن بناء جدار البكتريا مما يؤدى إلى تحللها و يسبب الأمبيسيلين عدة أعراض جانبية منها الطفح الجلدي و القيء و الإسهال و التهاب الكلى (شاهين وعمر, 2008).

2-1-3-2 المضادات الفطرية Antifungal

أنتجت أنواع مختلفة من المضادات الفطرية مثل الآزولات و الأمفوتريسين ب و التي تختلف فيما بينها من ناحية قوة و طريقة تأثيرها و مدى تأثيرها على الفطريات الممرضة سواء كان واسع المدى (يؤثر على عدة أنواع فطرية) مثل المضاد الفطري Itraconazole أو ضيق المدى (يؤثر على عدد قليل من الأنواع الفطرية) مثل المضاد الفطري Fluconazole (Murray *et al*., 2005).

تؤثر المضادات الفطرية على الفطريات الممرضة سلبا من خلال عدة طرق تختلف بإختلاف المضاد الفطري و هذه الطرق موضحة بالشكل (2-1).



شكل 2-1: طرق تأثير المضادات الفطرية على خلية الفطر الممرض (Murray *et al.*, 2005).

أشهر المضادات الفطرية المستخدمة لعلاج الأمراض الفطرية الجلدية:

1- التربينافين Terbinafine.

مضاد للفطريات يحضر كيميائيا و يستخدم بشكل موضعي أو جهازي وفترة العلاج طويلة تصل إلى ثلاثة أشهر و هو فعال ضد Dermatophytes و *Candida albicans* و ذلك من خلال عمله على تثبيط أنزيم squalene epoxidase المسئول عن أحد خطوات تصنيع الإرجوستيرول ergosterol في خلية الفطر و من المعروف أن الإرجوستيرول من أهم مكونات الغشاء الخلوي للفطر بالتالي لا تتمكن الفطريات الممرضة من التكاثر. إستعمال هذا المضاد يصيب حوالي 10% من الحالات بإضطرابات في الجهاز الهضمي كالإسهال والغثيان وعسر الهضم كما يسبب هذا الدواء طفح جلدي و حكة و صداع ودوار وتزول الأعراض عند التوقف عن إستعماله كما أنه يسبب آلام في المفاصل والعضلات و أحيانا التهاب كبدي (Gupta and Shear, 1997).

2- النيستاتين Nystatin.

مضاد فطري موضعي ينتمي إلى مجموعة البولين polyene و تأثيره على االخلية الفطرية يكون عبر إرتباطه بالإرجوستيرول ergosterol الموجود على غشاء الخلية الفطرية بالتالي يحدث ثقوب في الغشاء الخلوي و هذا يؤدي إلى إختلاف تراكيز المواد داخل و خارج الخلية بالتالي تدمر الخلية الفطرية. الآثار الجانبية لهذا المضاد الفطري قليلة و تشمل الغثيان والقيء.

4- الأمفوتريسين ب Amphotericin B

أمفوتريسين ب Amphotericin B هو مركب واسع المدى ينتمي لمجموعة البولين وغالباً ما يستخدم لعلاج العدوى الجهازية الفطرية عن طريق الحقن بالوريد كما يستعمل حبوب لعلاج مرض القلاع و تكون آلية التأثير من خلال ارتباط الأمفوتريسين ب بالأرجستيرول، المكون الرئيسي للغشاء السيتوبلازمي في الفطريات كما أنه يؤدي عند توافره بتراكيز مناسبة، إلى إحداث ثقوب في هذا الغشاء الأمر الذي يؤدي إلى تسرب البوتاسيوم خارج الخلية وبالتالي موت الخلية. لهذا المضاد أضرار جانبية تشمل الضعف العام و القيء و الإسهال و الغثيان و الصداع (Murray *et al*., 2005).

3- الآزولات Azoles.

تؤخذ بشكل موضعي و تأثير هذه المضادات على الخلية الفطرية يكون من خلال تثبيط أنزيم -α-14 demethylase المسئول عن تحويل اللانوستيرول lanosterol إلى الإرجوستيرول ergosterol و هو المكون الأساسي لغشاء الخلية الفطرية بالتالي لا تتمكن الفطريات الممرضة من التكاثر. الآزولات المستخدمة لعلاج الأمراض الفطرية الجلدية هي الكلوتريمازول Clotrimazole و الإيكونازول Econazole و الميكونازول Miconazole و البيوتوكونازول Butoconazole و يسبب إستعمال هذه المضادات الفطرية حساسية الجلد dermatidis و تهيج منطقة الفرج vulvar irritation (شاهين و عمر, 2008).

2-3-2 مضادات ميكروبية نباتية المصدر Antimicrobial from plant source

هناك العديد من النباتات التي استخدمت لتأثيرها المضاد للميكروبات الناتج عن مركبات تكونها هذه النباتات كنواتج أيض ثانوية(Joshi *et al*., 2009; Nanasombat and Lohasupthawee 2005). ففي دراسة أجريت في البرازيل وجد أن المستخلص الكحولي لأوراق نبات الفلفل *Piper regnellii* أظهرت نشاط مضاد للفطريات الجلدية التالية وهي *Trichophyton rubrum* و *Microsporum canis* و *Microsporum gypseum* بتركيزتثبيطي أدنى وقدره 15.62, 15.62, 62.5 ميكروجرام لكل مللتر على التوالي . المستخلص الكحولي تم فصله على السيليكاجل إلى عدة مركبات منها 3-eupomatenoid الذي أظهر تركيز تثبيطي أدنى لفطر *Trichophyton rubrum* وقدره 50 ميكروجرام لكل مللتر (بالتالي هو أفضل فعالية من المستخلص الكحولي لتثبيط هذا الفطر) (Koroishi *et al*., 2008).

الزيت العطري essential oil لنبات الجزر *Daucus carota* يؤثر على الفطريات الممرضة للجلد أكثر من تأثيره على خمائر الكانديدا بتركيز تثبيطي أدنى و قدره 0.16 إلى 0.32 ميكروجرام لكل مللتر بينما كان أقل تأثير مثبط على الخمائر هو من 0.32 إلى 0.64 ميكروجرام لكل مللتر (Tavares *et al*., 2008).

مستخلص الكلورميثان الثنائي للساق و الأوراق لنبات *Burchellia bubaline* أظهر تركيز تثبيطي أدنى لفطر *Candida albicans* وقدره 0.39 و 0.15 ميكروجرام لكل مللتر على التوالي (Amoo *et al*., 2009).

في دراسة أجريت حول تأثير بعض النباتات العشبية المنتشرة في تنزانيا أظهرت أن مستخلص النباتات التالية و هي البروس *Abrus precatoorius*, *Harrisonia abyssinica*, *Zanthoxylum chalybeum*, أكاسيا النيل *Acacia nilotica*, *Cajanus cajan*, *Ziziphus mucronata*, *Dichrostachys cinerea*,

بلح , *Salvadora persica* شجرة الآراك , *Securidaca longepedunculata, Sclerocarya birrea,* الصحراء *Balanites aegyptiaca* , ريحان *Ocimum suave* , دباء هندي *Carica papaya* و هبيل *Combretum molle* له تأثيرمثبط على العدوى الجلدية بخميرة الكانديدا (Runyoro *et al*., 2006).

كما أظهر مستخلص نبات الجوافه *Psidium guajava* و المانجو *Mangifera indica* تأثير مضاد للميكروبات على *Bacillus anthracis, B. cereus, B. polymmyxa, B subtilis, Clostridium sporogenes, Corynbacterium pyogenes, E. coli, Klebsiella pneumonia, Pseudomonas aeruginosa, Ps. S. aureua, Flurescens, Serratia marcescens, Shigella dysenteria,* و *Streptococcus faecalis* عند تركيز 20 ملجم/ مل. و قد كان تأثير نبات *P. guajava* أكثر فعالية في تثبيط الميكروبات من نبات *M. indica* حيث أن منطقة التثبيط لنبات *P. guajava* تراوحت بين 12 ملم و 30 ملم بينما تراوحت منطقة التثبيط لنبات *M. indica* بين 11 و 28 ملم. و أقل تركيز مثبط MIC لنبات *P. guajav*a كان بين 0.31 و 0.63 ملجم/ مل فيما كان أقل تركيز مثبط MIC بالنسبة لنبات *M. indica* ما بين 1.25 و 10 ملجم/ مل (Akinpelu and Onakoya, 2006).

في دراسة أجراها Jahan *et. al*., (2010) على تأثير المستخلص الميثانولي للنباتات *Thuja occidentalis* ,*Vernonia anthelmintica, Dryopteris chrysocoma* و *Trachyspermum ammi* المثبط للبكتيريا و الفطريات. حيث أجري الإختبار على 6 أنواع بكتيرية وهي *E. coli, Citrobacter, Shigella flexenari, Yersinia aldovae, S. aureus Ps. Aeruginosa* و 6 أنواع فطرية هي *Saccharomyces cerevicia, Aspergillus parasiticus, Trichophyton rubrum, Macrophomina, Fusarium solani* و *C. albicans*. تأثير النباتات المضاد للبكتيريا كان على الترتيب التالي *T. ammi*> *V. anthelmintica*> *T. occidentalis*> *D. chrysocoma*. لوحظ أن نبات *T. ammi* ذو تأثير قوي على الميكروبات المستخدمة حيث لم يظهر نمو ميكروبي في الأطباق حيث أن تأثيره أفضل من بعض المضادات الحيوية المستخدمة للمقارنة وهي gentamicin, ampicillin, amoxicillin, itraconazole و amphoteracin B. كما أظهر نبات *V. anthelmintica* تاثير مضاد للعديد من الأنواع البكتيرية في التجربة بينما بالنسبة للأنواع الفطرية فقد أثر على نوع واحد وهو فطر *T. rubrum*.

في دراسة أجراها المولى (2010) حول تأثير المستخلص المائي و الكحولي لأوراق نبات الحناء على بعض الفطريات تبين أن المستخلص الكحولي للحناء عند تركيز 20 ملجم/ مل له تأثير مثبط على الفطريات *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. candidus*, *A. tamari*, *Fusarium culmorum*, *Penicillium spp.*, *Pythium spp.* و *Trichophyton mentagrophytes* حيث كان أعلى تثبيط للفطر *A. flavus* و أقل تأثير على فطر *A. niger*. بينما المستخلص المائي للحناء عند نفس التركيز كان أفضل تأثير تثبيطي له على الفطر *A. flavus* و *A. tamarii* ثم على الفطريات *A. niger*, *A. candidus* و *Fusarium culmorum* في حين لم يكن له تأثير على الفطريات *Penicillium spp.*, *Pythium spp.* و *T. mentagrophytes*. كما تبين أن أقل تركيز مثبط لكلا من المستخلص المائي و الكحولي لنبات الحناء هو 20 ملجم/ مل.

أجريت دراسة على أوراق نبات *Juglans regia* فوجد أن المستخلص الميثانولي لهذا النبات عند تركيز 60 mg/ml له تأثير مثبط على بكتيريا *Staphylocccus aureus* أكثر منه على بكتيريا *Agrobacterium tumefaciens* و متوسط قطر منطقة التثبيط 15 mm و 13 mm على التوالي (Rahman *et al*., 2013).

تبين في دراسة أخرى أن أقل تركيز مثبط للمستخلص المائي للحناء هو 5 ملجرام/ مل للفطر *A. flavus* و 10 ملجم/ مل للفطر *A. parasiticus* كما وجد في الدراسة التي أجراها Sharma and Sharma, (2012).

في دراسة حول تاثير نبات السنامكي على الميكروبات تبين أن المستخلص الميثانولي للنبات بتركيز 300 µg/disc فكان التثبيط للبكتيريا *B. cereus* بمقدار(12 ملم) و بالنسبة ل *Staphylococcus aureus* (14 ملم) و *Escherichia coli* (18 ملم) و *Vibrio mimicus* (16 ملم) و *Pseudomonas aeruginosa* (10 ملم) و *Candida albicans* (8 ملم) و *Sacharomyces cerevacae* (7 ملم) (Hossain *et. al*., 2012) .

أجريت دراسة على المستخلص الميثانولي لأوراق نبات الحناء عند تركيز 50 mg/ml فوجد أن له تأثير مثبط على بكتيريا *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Esherichia coli*, *Klebsiela pneumonia*, *Pseudomonas pseudoalcalgenes* بمتوسط تثبيط و قدره 12, 8.5, 9, 9.5, 8.5 ملم على التوالي و عند تحليل النبات وجد أن المواد الفعالة فيه هي flavonoids, tannins, saponins, steroids, glycosides

.(Raja *et al*., 2013)

2-3-2-1 تأثير النباتات العشبية المحلية Local herbal plants.

أجريت دراسة محلية حول تأثير نباتات محلية على فطريات ممرضة للإنسان فوجد أن المستخلص الكحولي لنبات حشيشة الليمون *Cymbopogon citrates* و اللانتانا *Lantana camara* و الدفلة *Nerium oleander* كان له تأثير قوي على الفطر *Trichophyton rubrum* و اتضح أن المستخلص الكحولي لنبات حشيشة الليمون كان الأشد تأثيرا ضد فطريات *Microsporum canis* و *M. gypseum* و *Trichophyton mentagrophytes* يليه نبات اللانتانا في شدة التأثير ثم الدفلة و الريحان *Ocimum basilicum* و أقلها تأثيرا كان أوراق الزيتون *Olea europaea* (Bokhari, 2009).

كما وجدت طيب (2008) أن بكتيريا *Staphylococcus aureus* هي الأكثر تأثرا بالمستخلص المائي لنبات السدر عند تركيز 24ملجم/مل بالمقارنة بالأنواع البكتيرية الأخرى في الدراسة و هي *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa* ,*Escherichia coli* و *Proteus mirablis*. المستخلص الإيثانولي للسدر لم يؤثر على البكتيريا *K. pneumonia* و *P. aeruginosa* في حين كان أفضل من الناحية التثبيطية على الميكروبات الأخرى في الدراسة مقارنة بالمستخلص المائي للسدر بمقدار طفيف يتراوح بين 1 و 2 ملم.

اختبر نبات *Plectranthus tenuiflorus* الذي يعد أحد النباتات العشبية المحلية في السعودية من ناحية تأثيره المضاد للميكروبات *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Candida albicans, Aspergillus fumigatus, A. niger* فوجد أن المستخلص الكحولي للنبات أفضل تأثيرا تثبيطيا من المستخلص المائي على البكتيريا*E. coli, S. aureus* و خميرة *C. albicans* و لقد كان تأثير المستخلص المائي لهذا النبات على الميكروبات *Pseudomonas aeruginosa, Aspergillus fumigatus, A. niger* أفضل منه على الميكروبات الأخرى في الدراسة (Al-Garni and Kabli, 2005).

سنة 2007, و جد Abed أن للزيت العطري المستخلص من نباتي الشبت*Anethum graveolens* و الشمر *Feoniculum vulgare* تأثيرا مضادا لكلا من البكتيريا *S. aureus, B. subtilis, E. coli, Ps. aeruginosa* و الخمائر *C. albicans, C. tropicalis, C. glabrata*.

2-3-2-2 المواد الفعالة في النباتات العشبية Effective materials in herbal plants.

المواد الفعالة في النباتات العشبية هي المركبات الكيميائية التي تسبب التأثير العلاجي للنبات الطبي و نادرا ما تتوزع في جميع أجزاء النبات إنما تتركز في جزء منه (القحطاني, 1428). و جدول (2-2) يوضح بعض المواد المستخلصة من النباتات العشبية وطريقة تأثيرها على الميكروبات.

في دراسة أجراها (Barrett, 2002) حول المواد الفعالة المستخلصة من النباتات العشبية و التي لها تأثير مثبط للفطريات و هي echinocanin-type lipopeptide FR901379 و Lipopeptidolactone FR901469 حيث تؤثر هذه المواد على الفطريات الممرضة من خلال تثبيطها لتكون 1,3-β-glucan المكون الأساسي لبناء جدار الخلية الفطرية و هذا يعني أن لهذه المواد سمية اختيارية تجاه الفطريات بحيث لا تؤثر على العائل.

وجد أن مركبات quinones و مشتقاتها مثل naphthoquinones التي تفصل من نبات الحناء لها تأثير مضاد للبكتريا *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* و *Enterococcus faecium* كما أظهر مركب Lawsone المسؤول عن لون الحناء له فعالية ضد الميكروبات *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Candida albicans*, *Microsporum gypseum* و *Trichophyton mentagrophytes* (Babu and Subhasree, 2009).

وجد أن المستخلص الميثانولي للسدر عند تركيز 6 mg/ml يثبط كلا من *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeroginosa*, *Klebsiela pneumonia*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *C. albicans* بمتوسط تثبيط و قدره 15.23, 14.61, 16.49, 16.51, 14.12, 16.63, 13.45 ملم على التوالي و ذلك يعود لإحتواء هذا المستخلص على glycosides, flavonoids, tannins, saponins, terpenoids (Mohammed *et al*., 2013).

الجدول 2-2: أهم المركبات النباتية الفعالة في مقاومة الميكروبات و طريقة تأثيرها على الميكروبات (Cowan, 1999).

Class	Subclass	Example(s)	Mechanism	Reference(s)
Phenolics	Simple phenols	Catechol	Substrate deprivation	(Peres *et al*., 1997)

		Epicatechin	Membrane disruption	(Toda *et al*., 1992)
	Phenolic acids	Cinnamic acid		(Fernandez *et al*., 1996)
	Quinones	Hypericin	Bind to adhesins, complex with cell wall, inactivate enzymes	(Duke, 1985)
	Flavonoids	Chrysin	Bind to adhesions	(Perrett *et al*., 1995)
	Flavones		Complex with cell wall	
		Abyssinone	Inactivate enzymes	(Taniguchi and Kubo, 1993)
			Inhibit HIV reverse transcriptase	(Ono *et al*., 1989)
	Flavonols	Totarol	-	(Kubo *et al*., 1993)
	Tannins	Ellagitannin	Bind to proteins	(Schultz, 1988)
			Bind to adhesions	(Scalbert, 1991)

			Enzyme inhibition, Substrate deprivation, Complex with cell wall, Membrane disruption and Metal ion complexation	(Haslam, 1996)
	Coumarins	Warfarin	Interaction with eucaryotic DNA (antiviral activity)	(Bose, 1958)
Terpenoids, essential oils		Capsaicin	Membrane disruption	(Cichewicz, and Thorpe. 1996)
Alkaloids		Berberine	Intercalate into cell wall and/or DNA	(Burdick, 1971)
Lectins and polypeptides		Mannose-specific agglutinin	Block viral fusion or adsorption	(Zhang and Lewis, 1997)
		Fabatin	Form disulfide bridges	(Estevez-Braun *et al*., 1994)

3-2-3-2 التأثير التآزري للنباتات العشبية Synergistic effect of herbal plants

هناك عدة دراسات حول فاعلية التأثير التآزري للنباتات العشبية كمضاد ميكروبي حيث يتآزر نباتين طبيين أو أكثر لإحداث تأثير تثبيطي قوي ضد الميكروبات.

في أحد الدراسات وجد أن خليط التوابل التالية و هي القرفة و الزنجبيل و القرنفل له تأثير مثبط أفضل على الميكروبات *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Candida albicans,*

Aspergillus niger و *Salmonella spp.* أفضل من تأثير كلا منها على حده. كما أن تأثير الزيوت العطرية لهذه النباتات التآزري أفضل من التأثير التآزري للمستخلصات النباتية (El-Kholi *et. al.*, 2012).

أجريت دراسة محلية حول تأثير خليط من العسل و المر *Commiphora molmol* و الحبة السوداء *Nigella sativa* بتركيزات مختلفة منها حيث وجد أنها تثبط تماما الميكروبات *S. aureus, E. coli, Proteus mirabilis, Streptococcus pyogenes* و *Morganella morganii* (Alzahrani *et. al.*, 2011).

4-2-3-2 تأثير الخلطات العشبية المضاد للميكروبات Effect of herbal mixtures as antimicrobial agents.

تستخدم خلطة عشبية جاهزة مكونة من مزيج مخفف من الزيت الأساسي لنبات العطرة *Pelargonium* spp. و القرفة *Cinnamon verum* و القرنفل *Syzygium aromaticum* و شجرة الشاي *Melaleuca alternifolia* لمعالجة الالتهابات الجلدية الفطرية (وايت و فوستر, 2008).

كما وجد أن و ضع ملعقة من مرهم مصنوع من نبات القرنفل *Syzygium aromaticum* أو الزعتر *Thymus Vulgaris* مع ملعقة من مرهم يحتوي على نبات الأذريون *Calendula officinalis* فعال لعلاج الأمراض الجلدية الفطرية Dermal mycoses (شوفالييه, 2010).

يستعمل خليط من مغلي الحبة السوداء Nigella sativa و يحلى بعسل النحل كمضاد للميكروبات و هناك أيضا شاي نبات العرقسوس *Glycyrrhiza glabra* مع نبات الختم الذهبي *Hedera canadensis* حيث يستخدم كمضاد للميكروبات (السيد, 2008).

4-2 سمية النباتات العشبية Toxicity test for herbal plants

اختبار سمية النباتات العشبية باستخدام المحلول الملحي المحتوي على يرقات الكائن البحري *Artemia salina* يعتبر طريقة جيدة (Sam, 1993). و تتميز هذه الطريقة التي تستخدم في تقدير السمية بأنها سهلة, غير مكلفة و تحتاج كمية قليلة من المستخلص النباتي لإجراء الإختبار كما أوضح Rahmatullah *et al.*, (2010). اسنخدمت تلك الطريقة في تقدير سمية بعض النباتات و منها نبات *Psidium guineense* الذي أظهر سمية عند تركيز 125 ميكروجرام/ مل ضد الكائن البحري *Artemia salina* (Brio *et al.*, 2011).

و في دراسة أخرى تم تقدير سمية 32 مستخلص إيثانولي و مستخلص بالهكسان للنباتات *Protium bahianum, P. heptaphyllum, Croton sellowii, C. rhamnifolius, C. jacobinensis, C. micans* و *Muntingia calabura*. فتبين أنه عند تركيز 250 ميكروجرام/ مل و وجد 19 مستخلص ليس لهم أي سمية أو لهم سمية منخفضة و 6 مستخلصات لها سمية متوسطة في حين أن 7 مستخلصات أظهرت سمية عالية (Ramos *et al*., 2009). مما تقدم تتضح أهمية قياس سمية المستخلصات النباتية قبل البدء بإستخدامها في العلاج.

أجرت (Bahamdin, 2011) دراسة محلية حول سمية الزيت العطري المستخلص بالإيثانول و الميثانول لنبات الريحان *Ocimum basilicum* حيث اختبرت سمية الزيت العطري على الكائن البحري *Artemia salina* فتبين أنه ليس له سمية حتى عند تركيز 400 ميكرولتر/ مل.

5-2 سموم الفطريات و أنواعها Mycotoxins and their kinds

السموم الفطرية عبارة عن نواتج أيض ثانوية للفطريات الخيطية وهي ذات وزن جزيئي منخفض و لها تأثير ضار على الإنسان و الحيوان إذا دخلت إلى أجسامها بكميات قليلة بالطرق الطبيعية مثل الفم و الجلد و الأنف وقد بلغ عدد السموم الفطرية التي تناولها العلماء بالدراسة حتى عام 1988 حوالي 350 سم فطري. وتنتج السموم الفطرية بواسطة العديد من أجناس الأعفان و أهم هذه الأجناس *Aspergillus* و *Penicillium* و *Fusarium* و هي من أكثر الأجناس المنتجة لأكثر من ثلثي السموم الفطرية المعروفة حتى الآن و ممكن أن النوع الواحد من الأعفان قد ينتج العديد من السموم الفطرية المختلفة و كذلك بعض السموم الفطرية تنتج بواسطة العديد من الأنواع الفطرية (البنا, 2001) و من أهم السموم الفطرية الأفلاتوكسينات Aflatoxins و قلويدات الإرجوت Ergot alkaloids و الأوكراتوكسينات Ochratoxins و الترايكوثيسينات Trichothecenes و باتيولين Patulin (Krogh, 1987).

6-2 تأثير المستخلصات النباتية على الفطريات السامة Toxicity of plant extract on toxigenic fungi

إستخدام النباتات العشبية للتخلص من الفطريات المنتجة للسموم الموجودة في الغذاء يتم من خلال طريقتين هما منع النمو الفطري على الغذاء و تقليل قدرة الفطريات المنتجة للسموم على إنتاج السموم الفطرية

و لتحقيق ذلك تضاف بعض النباتات العشبية إلى بعض الأغذية كمواد حافظة طبيعية تمنع النمو الفطري و تثبط من إنتاجها للسموم (Ronald and Santos, 2001).

و قد وجد العديد من المستخلصات النباتية و الزيوت العطرية تعمل على وقف النمو الفطري و تقليل إنتاج السموم الفطرية مثل الزيت العطري للقرفة الذي له تأثير فعال في تقليل النمو الفطري لفطر *Aspergillus flavus* و تثبيط إنتاجه للأفلاتوكسين (Michail *et al*., 1994).

كذلك وجد أن القرنفل cloves يثبط نمو الفطر *A. flavus* و *A. versicolar* و *A. ochraceus* (Hitokoto *et al*., 1980). وفي دراسة أجريت في الأرجنتين وجد أن القرنفل clove و الزعتر mountain thyme له تأثير تثبيطي على نمو فطر *Aspergillus flavus* بنسبة أكثر من 90% و على كمية إنتاج هذا الفطر من سم Aflatoxin B1 (Bluma *et al*., 2008).

حمض الفيروليك ferulic acid وهو حامض فينولي موجود بكثرة في نخالة القمح يؤثر على تكون سم Trichothecene B بواسطة فطر *Fusarium* له تأثير تثبيطي على نمو الفطر بنسبة 39% و 85% عند تركيز 2.5 و 5 ملم على التوالي بينما كانت بنسبة التناقص68%, 87%, 90%, 99% عند تركيز 0.1, 0.25, 0.5, 1ملم على التوالي (Boutigny *et al*., 2009).

في دراسة أجريت على الزيت العطري essential oil لنبات إكليل الجبل *Rosmarinus officinalis* حيث وجد أن له تأثير مثبط لإنتاج الأفلاتوكسين كذلك و جد أن الزيت العطري لنبات الإذخر *Cymbopogon flexuosus* بتركيز 1 ميكرولتر لكل مللتر يثبط إنتاج aflatoxin B_1 و وجد أن مادة Eugenol المستخلصة من هذا النبات لها تأثير مضاد للفطريات و مثبط لإنتاج الأفلاتوكسين عند 0.3 و 0.1 ميكرولتر لكل مللتر على التوالي (Rasooli *et al*., 2008).

كما أن مستخلص نبات الجامبول *Syzigium aromaticum* بتركيز 5 جرام لكل كيلوجرام عمل على تثبيط إنتاج Aflatoxin B_1 تماما (Reddy *et al*., 2010). كما وجد أن المستخلص المائي لنباتي *Lawsonia inermis* و *Murraya paniculata* معا عند تركيز 2.5 ملجرام/ مل أدى إلى تثبيط نمو فطري *A. flavus* و *A. parasiticus* تماما و كذلك إنتاجهما للسم الفطري أفلاتوكسين ب$_1$ (Aflatoxin B_1) (Sharma and Sharma, 2012).

في دراسة محلية اتضح من خلالها أن نبات القرفة و البرسيم و الزنجبيل يثبط نمو الفطر *Aspergillus flavus* و إنتاجه للسم Aflatoxin G_1 (Bokhari and Aly, 2008).

7-2 سمية المستخلصات النباتية على الخلايا السرطانية Toxicity of plants extracts on cancer cells

انتشر مرض السرطان بكثرة حيث أنه تسبب في 25% من الوفيات في الولايات المتحدة و حتى الآن لم يتم التوصل إلى علاج فعال تماما لمعالجة هذا الداء (Balachandran and Govindarajan, 2005). أكثر من 60% من العقاقير المضادة للسرطان حاليا مشتقة مباشرة أو بشكل غير مباشر من مصادر طبيعية (Cragg *et al*., 1997).

تم اختبار تأثير الزيوت العطرية للأزهار الجافة لنبات البابونج البري (blue chamomile) *Matricaria chamomilla* و الأوراق الجافة لنبات الميرامية (sweet marjoram) *Marjorana hortensis* في مصر ضد لوكيميا الخلايا النخاعية promyelocytic leukemia البشرية في مزرعة نسيجية تحتوي خلايا من نوع HL-60 و NB4.كان التأثير المضاد للسرطان للزيوت العطرية لكلا النباتين على خلايا NB4 أقوى منه على خلايا HL-60. عموما كان التأثير المضاد للسرطان للزيت العطري لنبات *M. chamomilla* على الخلايا السرطانية أفضل من التأثير المضاد للسرطان للزيت العطري لنبات *M. hortensis* (Romeilah, 2009).

وجد أن مستخلص الكلوروفورم لنبات الحناء عند تركيز 0.3 - 24.85 ميكروجرام/ مل يعد جرعة مميتة (LC_{50}) لخلايا الثدي السرطانية (MCF-7) و خلايا الكبد السرطانية (HepG2) (Chaudhary *et. al*., 2010).

في دراسة محلية حول تأثير الزيت العطري المستخلص بالإيثانول و الميثانول لنبات الريحان *Ocimum basilicum* المضاد للسرطان على نوعين من الخلايا السرطانية في المعمل و هما خلايا لمفاوية Lymphoma سرطانية و خلايا (Ehrlichascites) المسرطنة حيث وجد أنه فعال كمضاد للخلايا السرطانية عند تراكيز 300-400 ميكرولتر/ مل (Bahamdin, 2011).

3- المواد و طرق العمل

Material and methods

3-1 الكائنات الدقيقة المختبرة Test organisms

البكتيريا Bacteria.

تم الحصول على نوعين من البكتيريا الممرضة و هما المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* و البكتيريا العصوية *Bacillus subtilis* من مختبر الميكروبيولوجيا، كلية العلوم، جامعة الملك عبد العزيز, جدة, المملكة العربية السعودية.

الفطريات Fungi و الخمائر Yeasts

استخدمت في الدراسة 7 أنواع فطرية 4 منها ممرضة و منتجة للسموم و هي *Aspergillus flavus*, *A. niger* ,*A. parasiticus* ,*A. terreus* تم الحصول عليها من مختبر الميكروبيولوجي, مستشفى الجامعة، جامعة الملك عبدالعزيز, جدة، المملكة العربية السعودية أما الثلاثة أنواع الأخرى و هي الفطريات الممرضة للجلد *Trichophyton tonsurans* ,*Microsporum canis* ,*M. gypseum* فقد تم الحصول عليها من مختبر الميكروبيولوجي, المستشفى العسكري، الرياض، المملكة العربية السعودية.

بينما مزرعة خميرة *Candida albicans* فقد تم الحصول عليها من مختبر الميكروبيولوجي, مستشفى الجامعة، جامعة الملك عبدالعزيز, جدة، المملكة العربية السعودية.

بالنسبة لخميرة *Candida albicans* التي عزلت من المريضة ب Candidiasis بين أصابع القدمين فقد تم تعريفها في مختبر مستشفى الملك فهد, جدة, المملكة العربية السعودية.

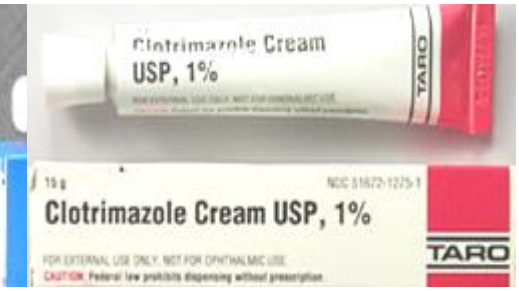
3-2 حفظ الكائنات الدقيقة Microorganisms preservation

تحفظ البكتيريا على بيئات الآجار المغذي المائلة أما الخمائر فعلى بيئات آجار السابوراد المائل و بالنسبة للفطريات فكانت بيئات آجار دكستروز البطاطس المائلة ثم حفظت جميع العينات بعد تنميتها عند 4 °C مئوية مع مراعاة تجديد جميع الميكروبات المحفوظة مرة كل ستة أشهر.

3-3 المواد الكيميائية

استخدم الأسيتون aceton, الكحول الايثيلي المطلق 99% ethanol, , رابع أوكسيد الأوزميوم, فورمالدهيد, تولوين Toluin, حمض الفورميك formic acid, إيثيل أستات ethyle acetate و مركب dimethyl sulfoxide (DMSO) و التي تم الحصول عليها من شركة Sigma للكيماويات (St louis, Mo., U.S.A.).

المضادات الحيوية المستخدمة (شكل 3-1) كانت على النحو التالي و هو Ampcillin كمضاد بكتيري قياسي للبكتريا أما الفطريات فاستخدم لها مضاد فطري قياسي عباره عن علاج تجاري اسمه Antifungal nail liquid حيث المادة الفعالة فيه هي undecylenic acid و الذي تم اختياره بعد أن وجد أنه الأفضل في تأثيره المثبط للفطريات مقارنة بتأثير المضادات الفطرية الأخرى المستعملة التجارية منها و هي Nystatin و Clotrimazole و المضاد الفطري Amphotreicin B و التركيز المستعمل للمضادات الحيوية تم تخفيفه ليصبح مشابها لتخفيف النباتات المستخدمة و هو 10 ملجرام/ملل.



شكل 3-1: المضادات البكتيرية و مضادات الفطريات المختلفة المستخدمة في هذه الدراسة.

4-3 البيئات المستخدمة Media used

1- بيئة آجار الدكستروز المغذي Nutrient agar medium

تستخدم بيئة آجار الدكستروز المغذي (Sigma) كوسط غذائي لتنمية البكتيريا و تتكون تلك البيئة من المكونات التالية التي تتألف من (جرام / لتر): 3 جرام مستخلص اللحم والبيبتون 5 جرام و درجة الحموضة pH7.

2- بيئة آجار دكستروز البطاطس Potato dextrose agar

يتم استخدام بيئة آجار دكستروز البطاطس (Sigma) كوسط غذائي لتنمية الفطريات و تتألف من (جرام/ لتر): 25 جرام نشا البطاطس، 20 جرام دكستروز في درجة الحموضة pH5.6 (Difco, 1953).

3- بيئة آجار السابوراد Sabouraud agar

تستخدم بيئة آجار السابوراد (Sigma) لنمو الخميرة. و تتألف من (جرام/ لتر): 40 جرام سكر السكروز والبيبتون 10 جرام عند pH 5.6 (Sigma) (Booth، 1971).

بعد إعداد البيئات يتم تعقيمها تحت ضغط 15 رطل عند 121 °C لمدة 20 دقيقة باستخدام الأوتوكلاف (Sanyo, Labo. Autoclave MLS-3780).

5-3 النباتات العشبية المحلية Local herbal plants

جمعت أوراق النباتات التالية و هي الحناء *Lawsonia inermis* (شكل 3-2) و السدر -*Ziziphus spina christi* (شكل 3-3) و السنامكي *Cassia senna* (شكل 3-4) كأوراق جافة من محلات العطارين, جدة, المملكة العربية السعودية أما نباتي الشلياط *Sysimbrium irio* (شكل 3-5) و الحرجل *Solenostemma arghel* (شكل 3-6) فقد تم الحصول على الأوراق الخضراء للنباتين من قسم النبات, جامعة الملك سعود, الرياض, المملكة العربية السعودية. وتم تنظيف أوراق النباتات التي تم جمعها، واستبعدت الأجزاء المصابة والتالفة ثم طحنت الأوراق بعد تجفيفها (تم تجفيفها بوضعها في أكياس ورقية في درجة حرارة الغرفة) و بعد ذلك حفظت في علب زجاجية نظيفة عند درجة حرارة 4 °C (أبو زنادة, 2007).

1-5-3 تعريفها و إستخلاصها و حفظها Identification, extraction and preservation

تعريف النباتات العشبية المحلية Local herbal plants identification

تم تعريف النباتات التي تم جمعها و الحصول على أسماء النباتات اللاتينية بمرجعية كلا من سعادة الدكتوره ناهد مراد، كلية العلوم – قسم الأحياء- تخصص فلورا نباتية، جامعة الملك عبد العزيز و الدكتوره أماني عواد, كلية العلوم – قسم الأحياء- تخصص كيمياء النبات, جامعة الملك سعود.

شكل 3-2: الأوراق الجافة لنبات الحناء *Lawsonia inermis* المستخدمة.

شكل 3-3: الأوراق الجافة لنبات السدر *Ziziphus spina-christi* المستخدم .

شكل 3-4: الأوراق الجافة لنبات السنامكي *Cassia senna* المستخدم.

أ- أوراق نبات الشلياط *Sysimbrium irio*

ب- أوراق نبات الحرجل *Solenostemma arghe*

شكل 3-5: أوراق نباتي الشلياط *Sysimbrium irio* (أ) و نبات الحرجل *Solenostemma arghel* (ب).

إستخلاص النباتات العشبية Extraction of herbal plants

تم استخلاص النباتات بالطريقة المبتلة wet technique و فيها استخدم الإستخلاص المائي أو بالمذيبات العضوية (الأسيتون أو الكحول الإيثيلي) و ذلك بأخذ 40 جرام من مطحون أوراق كل نبات تحت التجربة و يستخلص في 100 مل ماء مقطر في الإستخلاص المائي أو 100 مل من كلا من الأسيتون أو الكحول الإيثيلي في الإستخلاص الأسيتوني أو الكحولي و يتم غسل الراشح النباتي 3 مرات ب 100 مل من مادة الإستخلاص المستخدمة.

المستخلص النباتي الخام لكل نبات يكون عباره عن (300 مل) يعمل له ترشيح خلال قمع بخنر Buncher funnel و بإستخدام ورق ترشيح (Whatman No. 4). المستخلص يتم تركيزه تحت ضغط بإستخدام باستخدام جهاز التبخير الدوار Rotary evaporator (Heidolph) عند درجة حرارة 40 °C (Sisti, *et al*., 2007) ثم يعاد تذويب 1 جم من المستخلص النباتي المتبقي بعد التبخير ب 10 مل من محلول Dimethyle sulfoxide (DMSO) (Sigma) بالتالي يتم تحضير تركيز من المستخلص النباتي لأوراق النباتات المستعملة و قدره 10 ملجم/ مل و يعمل من هذا التراكيز محاليل مخففة ليصبح تركيزها (2.5 , 5) ملجم/ مل (المعيني و آخرون, 2008).

حفظ المستخلصات النباتية Preservation of plant extractes

المستخلص النباتي يحفظ في أوعية داكنة محكمة الغلق مبردا عند درجة حرارة 4- °C لحين الإستخدام (Koroishi, *et al*., 2008).

3-6 النشاط المضاد للميكروبات Antimicrobial activities

3-6-1 إعداد معلق ماكفرلاند 0.5 MacFerland

معلق ماكفرلاند القياسي يعد نموذج لعمل معلق ميكروبي يكون عدد الميكروبات فيه محددة بالتالي يناسب عمل بعض التجارب المخبرية التي تتطلب تلقيح محدد (Habeeb *et al*., 2007). لعمل معلق ماكفرلاند نضع 0.5 مل من كلوريد الباريوم $BaCl_2\,2H_2O$ يحضر بإذابة 1.17 جرام من كلوريد الباريوم في 100 مل من حمض الكبريتيك عياريته 0.18 M. يتم توزيع المحلول في أنابيب لها نفس الحجم والمقاس و تغلق بإحكام لمنع تبخر محتواها وتخزن بعيدا عن الضوء في درجة حرارة الغرفة و تكون صالحة كمعلق قياسي لمدة 6 أشهر و قبل الإستعمال تخلط بواسطة هزاز Vortex (Andrews, 2004).

3-6-2 إعداد المعلق الميكروبي Microbial suspension

للبكتيريا و الخمائر For bacteria and yeasts

يعد المعلق ميكروبي بتركيز مقارب لمعلق ماكفرلاند 0.5 القياسي. حوالي 3-5 مستعمرات نقية من البكتيريا أو الخمائر المختبرة تؤخذ بواسطة مسحة قطنية معقمة و توضع في أنبوب زجاجي يحتوي على 5 مل ماء مقطر معقم، ثم يرج الأنبوب المحتوي على معلق العينة حتى يكون مقارب لتركيز معلق مكفارلاند 0.5 و يضبط التركيز وفقا لذلك بإضافة المزيد من الماء أو الميكروب حتى يطابق المعلق الميكروبي معيار

مكفارلاند 0.5، الموافق للتركيز 10^8 خلية لكل وحدة/مل (CFU/ml) للبكتيريا و الموافق للتركيز 10^6 خلية لكل وحدة/ مل (CFU/ml) من الخميرة (Mihajilov-krstev *et al*., 2010; Adigüzel *et al*., 2005) .

للفطريات For fungi

يتم إعداد معلق فطري بتركيز مقارب لمعلق ماكفرلاند 0.5 القياسي. تؤخذ الجراثيم الفطرية بواسطة إبرة معقمة و توضع في أنبوب زجاجي يحتوي على 5 مل ماء مقطر معقم، ثم يرج الأنبوب المحتوي على معلق العينة حتى يكون مقارب لتركيز معلق مكفارلاند 0.5 و يضبط التركيز وفقا لذلك بإضافة المزيد من الماء أو الجراثيم الفطرية حتى يطابق المعلق الميكروبي معيار مكفارلاند 0.5، الموافق للتركيز 10^4 خلية لكل وحدة/ مل (CFU/ml) (Adigüzel *et al*., 2005; Mahesh and Satis, 2008) .

3-6-3 تأثير المضادات الحيوية على الميكروبات Antimicrobial effect of antibiotics

استخدم في هذه الدراسة طريقة الثقوب Agar well diffusion لدراسة تأثير المضادات الحيوية القياسية للمقارنة الموجبة positive control بالنباتات العشبية فيما يستخدم الماء المقطر المعقم كمقارنة سلبية negative control للنباتات العشبية.

استخدمت أطباق بتري معقمة بقطر 90 ملم تحتوي على بيئة الآجار المغذي الصلبة والمعقمة (15 مل). بعد تجديد المزارع الميكروبية يؤخذ بالمسحة القطنية cotton swab من معلق اللقاح و تمرر على سطح البيئة كاملا لضمان انتشار الميكروبات على السطح بعد ذلك يتم عمل 3 ثقوب باستخدام الثاقب الفليني cork-borer المعقم و قطر كلا منها 7 ملم في كل طبق لإيجاد المتوسط. بعد ذلك أضيف في الثقوب 50 ميكرولتر من المضاد الحيوي (تركيزه 10 ملجم/ مل) باستخدام micropipette ثم تترك الاطباق بعد ذلك لمدة 45 دقيقة في درجة حرارة الغرفة لينتشر المضاد الحيوي في البيئة ثم تحضن الأطباق التي تحوي فطريات عند 28 °C لمدة 48 ساعة فيما تحضن الأطباق التي تحوي بكتيريا و خمائر عند 37 °C لمدة 24 ساعة بعدها يؤخذ متوسط قطر منطقة التثبيط بالمليمتر ± حيث أجريت جميع التجارب في ثلاث تكرارات (Joshi *et al*., 2009; Perez *et al*., 1990).

4-6-3 تأثير النباتات العشبية المضاد للميكروبات Antimicrobial effect of herbal plants

استخدم في هذه الدراسة طريقة الثقوب Agar well diffusion لدراسة تأثير النباتات العشبية المضاد للميكروبات حيث تستخدم أطباق بتري معقمة بقطر 90 ملم تحتوي على بيئة الآجار المغذي الصلبة والمعقمة (15 مل). بعد تجديد المزارع الميكروبية يؤخذ بالمسحة القطنية cotton swab من معلق اللقاح و تمرر على سطح البيئة كاملا لضمان انتشار الميكروبات على السطح بعد ذلك يتم عمل 3 ثقوب باستخدام الثاقب الفليني cork-borer المعقم و قطر كلا منها 7 ملم في كل طبق لإيجاد المتوسط بعد ذلك أضيف في الثقوب 50 ميكرولتر من مستخلص النبات المضاد (تركيزه 10 ملجم/ مل) باستخدام micropipette ثم تترك الاطباق بعد ذلك لمدة 45 دقيقة في درجة حرارة الغرفة لينتشر المستخلص النباتي في البيئة ثم تحضن الأطباق التي تحوي فطريات عند 28 °C لمدة 48 ساعة فيما تحضن الأطباق التي تحوي بكتيريا و خمائر عند حرارة 37 °C لمدة 24 ساعة بعدها أخذ متوسط القيمة لقطر منطقة التثبيط بالملمتر حيث أجريت جميع التجارب في ثلاث تكرارات (Joshi *et al*., 2009; Perez *et al*., 1990).

تم اختبار تأثير الخلطة العشبية الأولى على مريضة ب Candidiasis بين أصابع القدمين (in vivo) حيث تم وضع الخلطة العشبية على المنطقة المصابة مرة واحدة يوميا لمدة شهر (السيد, 2008).

3-4-6-1 تقدير أقل تركيز نباتي مثبط Determination of minimum inhibitory concentration of plant

استخدمت طريقة الثقوب Agar well diffusion لدراسة تأثير تراكيز مختلفة من المستخلصات النباتية هي 2.5, 5, 10 ملجم/مل لتقدير أقل تركيز نباتي مثبط للميكروبات المستخدمة و هو أقل تركيز نباتي يحدث تثبيط للميكروبات و ذلك لتقييم مقاومة الميكروب و مدى فعالية المستخلص النباتي. (المعيني و آخرون, 2008); (Mohammed *et al*., 2013).

3-4-6-2 التأثير التآزري للمستخلصات النباتية Synergistic effect of plant extractes

تم دراسة التأثير التآزري لمستخلصين نباتيين أو اكثر على الميكروبات و يكون ذلك بإضافة كمية من المستخلص النباتي مع كمية مساوية من المستخلص النباتي الآخر (1:1) مل و ترج جيدا ثم يعمل اختبار التأثير التثبيطي لهما معا بطريقة الثقوب Agar well diffusion (Alzahrani *et. al*., 2011).

3-4-6-3 تأثير الخلطات العشبية المضاد للميكروبات Antimicrobial effect of herbal mixtures

الخلطات العشبية المستخدمة جاهزة و تم الحصول عليها من محلات مختلفة للعطارة بجدة و قد استخدمت 3 خلطات عشبية مختلفة و مكونة من نباتات عدة غير معروفة النسب (نسبة كل نبات إلى الآخر):

الخلطة العشبية الأولى: نبات الميرامية, إكليل الجبل, الحناء و السنامكي.

الخلطة العشبية الثانية: نبات الحناء و السنامكي.

الخلطة العشبية الثالثة: نبات السدر و الميرامية.

استخدم في هذه الدراسة طريقة الثقوب Agar well diffusion لدراسة تأثير الخلطات العشبية المضاد للميكروبات حيث تستخدم أطباق بتري معقمة بقطر 90 ملم تحتوي على بيئة الآجار المغذي الصلبة والمعقمة (15 مل). بعد تجديد المزارع الميكروبية يؤخذ بالمسحة القطنية cotton swab من معلق اللقاح و تمرر على سطح البيئة كاملا لضمان انتشار الميكروبات على السطح بعد ذلك يتم عمل 3 ثقوب باستخدام الثاقب الفليني cork-borer المعقم و قطر كلا منها 7 ملم في كل طبق لإيجاد المتوسط بعد ذلك أضيف في الثقوب 50 ميكرولتر من مستخلص الخلطة العشبية (تركيزه 10 ملجم/ مل) باستخدام micropipette ثم تترك الاطباق بعد ذلك لمدة 45 دقيقة في درجة حرارة الغرفة لينتشر مستخلص الخليط العشبي في البيئة ثم تحضن الأطباق التي تحتوي على الفطريات عند 28 °C لمدة 48 ساعة فيما تحضن الأطباق التي تحوي بكتيريا و خمائر عند 37 °C لمدة 24 ساعة بعدها أخذ متوسط قطر منطقة التثبيط بالملم حيث أجريت جميع التجارب في ثلاث تكرارات. (Joshi *et al*., 2009; Perez *et al*., 1990) .

7-3 التغير المورفولوجي لجراثيم الفطريات تحت المجهر الالكتروني الماسح Morphological change of fungi under scanning electron microscope

تنمى الأنواع الفطرية المستخدمة في 5 مل من بيئة دكستروز البطاطس المغذي و يضاف لها 2 مل من المستخلص الأسيتوني لنبات الحناء (تركيزه 10 ملجم/ مل) أو 2 مل ماء مقطر بالنسبة للعينات الضابطة و بعد ذلك تحضن العينات عند 28 °C لمدة 48 ساعة ماعدا خميرة *Candida albicans* فتحضن عند 37 °C لمدة 24 ساعة على بيئة سابوراد السائل (Abd Zaher et al., 2010).

بعدها يتم عمل طرد مركزي للعينات عند 3000 لفة في الدقيقة (rpm) لمدة نصف ساعة ثم تجمع الخلايا ليتم إعدادها للفحص بالمجهر الإلكتروني الماسح في كلية العلوم, شطر البنين, جامعة الملك عبدالعزيز.

استخدمت المحاليل الآتية لتثبيت العينات لفحصها بالمجهر الإلكتروني الماسح و هي.

1- محلول التثبيت الاولي

Paraformaldehyde 2%

Glutaraldehyde 2.5%

Sodium Caodylate Buffer 0.1 M

pH 7.4

2- محلول التثبيت الثانوي

Osmium Tetroxide 1g

Distilled Water 100 ml

تبعًا للطريقة المعدلة ل (الخليفة والصالح، ١٩٩٥) و التي تشمل الخطوات التالية:

أ- التثبيت Fixation

- وضع الخلايا في محلول التثبيت الأولي مدة 24 ساعة عند درجة حرارة 4 °C
- غسل الأقراص ثلاث مرات في محلول منظم لمدة 15 دقيقة
- وضع الأقراص في محلول التثبيت الثانوي (رابع أكسيد الأوزميوم 1% (Osmium tetroxide)) لمدة ساعة عند درجة حرارة 4 °C.

ب- عملية نزع الماء Dehydration

- إمرار أقراص العينة في سلسلة تصاعدية التركيز من الإيثانول المتدرج (30%, 50%, 70%, 90%,95%).
- نقل العينة إلى الإيثانول المطلق لمدة 30 دقيقة و يغير خلالها الإيثانول مرتين.

ج- التجفيف Drying

- استخدام طريقة التجفيف لدرجة النقطة الحرجة وذلك باستخدام جهاز (SAMDRI – PVT – 3B)
- نقل العينات التي تم تجفيفها بطريقة النقطة الحرجة إلى حامل العينات Conducting Paint–Silver و تلصق على سطح الحامل الذي به طلاء الفضة الموصل.
- تغطى العينة المراد فحصها بطبقة رقيقة من الذهب (كمادة موصلة للإلكترونات) باستخدام جهاز (FINE COAT ION SPUTTER JFC) .

د- فحص العينات Observation

فحص العينات باستخدام المجهر الإلكتروني الماسح (Scanning Electron Microscope) (Jeol SM-6360LV) في وحدة المجهر الإلكتروني, جامعة الملك عبدالعزيز.

8-3 اختبار سمية النباتات العشبية Toxicity test for herbal plants

هذا الإختبار استخدم فيه يرقات الربيان (Brine shrimp larve) *Artemia salina* الذي ينمى في ماء بحري و ذلك لإختبار سمية المستخلص الأسيتوني للحناء. تم اختيار المستخلص الأسيتوني لنبات الحناء لكونه أفضل مستخلص من المستخلصات تحت الدراسة من الناحية التثبيطيه للميكروبات المختبرة. لتطبيق هذا الإختبار تم تنمية بيض الربيان في أحواض خاصة بها مضخة للهواء بالتالي فإن البيض يفقس خلال 48 ساعه عند حرارة الغرفة 25 °C معطيا أعدادا كبيرة من اليرقات Larva (Carballo *et. al*., 2002; Kivcak *et. al*., 2002).

- المحلول الملحي Saline water لتنمية بيض الربيان Brine shrimp eggs.

يقسم الحوض الخاص بتنمية بيض الربيان إلى جزئين بواسطة لوح زجاجي يوضع على مسافة 1 سم من أسفل الحوض و يحتوي على عدة ثقوب تستعمل ليوضع فيها بيض الربيان. يغطى أحد الأجزاء بورقة داكنة اللون لعمل بيئة مظلمة في ذلك الجزء و هذا ملائم ليفقس البيض بينما يترك الجزء الآخر معرضا لأشعة الشمس. المحلول الملحي (ماء بحري صناعي معقم) يعد بإذابة 38 جرام من ملح البحر في لتر ماء مقطر و يوضع في الحوض ثم يضاف لقاحين spatulas من بيض الربيان في الجزء المظلم. يترك الحوض بعد ذلك لمدة يومين عند درجة حرارة 25 °C ليفقس بيض الربيان و تسبح اليرقات بإتجاه الجزء المضيء. تستخدم الماصة لجمع 10 يرقات من الجزء المضيء و توضع في قمع يحتوي 4.5 مل من المحلول الملحي الصناعي. (Pisutthanan *et. al*., 2004; Krishnaraju *et. al*., 2005).

- اختبار السمية Toxicity test

- تعد محاليل مختلفة التركيز من المستخلص الأسيتوني للحناء (50- 400 µl/ml)
- يؤخذ 0.5 مل من كل محلول و يضاف كل منها إلى 4.5 مل من المحلول الملحي للربيان المحتوي على 10 يرقات.
- يترك أحد الأقماع التي تحوي المحلول الملحي للربيان بدون إضافة المستخلص ليكون معيار قياسي control لمقارنة النتائج.
- تحفظ هذه المحاليل في درجة حرارة الغرفة لمدة 24 ساعة مفتوحة تحت الضوء و يتم عمل التجربة في 3 تكرارات لكل تركيز (Krishnaraju *et. al*., 2005).

- اليرقات الحية يتم عدها بواسطة المجهر الضوئي و كذلك الميتة في كل قمع و تسجل النتائج و تحسب النسبة المئوية للوفيات Mortality (Lachumy *et. al*., 2010).

3-9 الكشف عن السموم الفطرية بإستخدام تقنية الطبقات الكروماتوجرافية الرقيقة

Screening for mycotoxins using Thin Layer Chromatography (TLC)

3-9-1 تنمية العزلات Growth of Isolates

تم تنمية 4 أنواع فطرية و هي *A. flavus, A. niger, Aspergillus terreus* و *A. parasiticus* على بيئة (PDA) لإختبار قدرتها على إفراز السموم الفطرية طبقا لطريقة Samson and Vanreenen-Hoekstra, (1988) حيث انه بإستخدام ثاقب فليني Cork-borer معقم قطره 8 ملم يؤخذ جزء من النمو الفطري من كل طبق بتري يحوي بيئة (PDA) تحت ظروف التعقيم. بعدها يوضع اللقاح الفطري بمنتصف طبق بتري. ثم تحضن الأطباق عند 28 °C لمدة 7 أيام لتصبح جاهزة لكي تستخلص السموم الفطرية منها.

3-9-2 إستخلاص السموم الفطرية Extraction of mycotoxins

تستخلص السموم الفطرية من العينات الفطرية تبعا لطريقة Filtenborg and Frisvad, (1980) كالتالي:

1) يحضر محلول (كلوروفورم : ميثانول) بنسبة (1:2) داخل قنينة صغيرة داكنة اللون Dark Small Begos تستخدم لإستخلاص السموم بحيث يوضع 5 مل من المحلول داخل كل قنينة. ثم ينقل عدد من الأقراص الفطرية من كل مستعمرة بواسطة إبرة التلقيح لتوضع داخل كل قنينة من القنينات المحتوية على 5 مل من محلول (2كلوروفورم : 1ميثانول) و ترج جيدا لإتمام الإستخلاص. بعد ذلك تحفظ القنينات الصغيرة المحتوية على المستخلصات لكل فطر على حده عند درجات حراره منخفضة جدا 20- °C لحين الإستخدام.

3-9-3 إعداد المحاليل القياسية للسموم Preparation of standerd toxins

يحضر المحلول القياسي standerd solution للسموم الفطرية المستخدمة في الدراسة عن طريق تذويب البلورات النقية للسموم أفلاتوكسين ب$_1$, ج$_1$, ج$_2$ (Aflatoxin B_1, G_1, G_2) , استرجماتوسيستين

Sterigmatocystin و ربراتوكسين ب Rubratoxin B و التي تم الحصول عليها من شركة Sigma في إيثانول مطلق بمقدار 1 مليجرام توكسين لكل 1 مل من الإيثانول و يتم تحضير تخفيفات عدة من تلك السموم الفطرية (10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}) و تحفظ عند درجة حرارة 20- °C لحين إستخدامها.

4-9-3 فصل و تعريف السموم الفطرية على الطبقات الكروماتوجرافية الرقيقة Separation and identification of mycotoxins on thin layer chromatography

تستخدم المستخلصات الفطرية و التي تم استخلاصها كما في (3-9-2) لإجراء الفصل و التعريف للسموم الفطرية بإستخدام تقنية الطبقات الكروماتوجرافية Thin Layer Chromatography (TLC) و تلك الطبقات عبارة عن ألواح رقيقة من الألمنيوم مغطاة بطبقة رقيقة من السليكا جل Silica gel من نوع Whatman, TLC aluminium backed Kieselgel 60 plates, Silica gel, 250 mm (Merch, Types 5553 and 5554), 20 × 20 cm.

1) يقسم لوح الألمنيوم الكروماتوجرافي إلى 4 مربعات (10×10) سم و تترك مسافة 1.5 سم من أسفل ويوضع خط مستقيم ثم يقسم الخط إلى عدة أقسام متساوية حيث توضع نقاط Spots من مستخلص الفطر و كذلك المحلول القياسي.

2) بإستخدام الماصة الدقيقة الأتوماتيكية Micropipette توضع عدة نقاط على لوح الألمنيوم الكروماتوجرافي بمقدار 20 ميكرولتر من المستخلص الفطري و حوالي 10 ميكرولتر من المحلول القياسي للسم الفطري ثم تجفف جميع النقاط بمجفف الهواء air drier.

3) ينقل لوح الألمنيوم الكروماتوجرافي بواسطة ملقاط داخل جار زجاجي خاص بالفصل الكروماتوجرافي و الذي تم تحضير الوسط المتحرك mobile phase بداخله و هو (تولوين : إيثيل استات : 90% حمض الفورميك) بنسبة (1:4:5) على التوالي.

4) يترك اللوح الكروماتوجرافي داخل الجار Chromato Tanks المغطى بغطاء زجاجي حتى يصعد الوسط المتحرك إلى ما قبل نهاية لوح الألمنيوم بحوالي 2 سم ثم يخرج لوح الألمنيوم بواسطة ملقاط و يجفف بإستخدام مجفف الهواء.

5) تفحص الألواح الكروماتوجرافية بالأشعة فوق البنفسجية بواسطة جهاز Chromato Vue- Cabinet الذي يعمل بالأشعة فوق البنفسجية من نوع Model CX-50 Cabinet و طولها الموجي يتراوح بين القصير 254 نانومتر و الطويل 366 نانومتر.

عند فحص الطبقات الكروماتوجرافية و التي تحوي نقاط المستخلص و السموم الفطرية تحت الدراسة بجهاز الأشعة فوق البنفسجية يمكن تعريف السموم الفطرية ثم تقدير كميتها من خلال مقارنتها بالمحاليل القياسية فإذا تبين أن للمستخلص و المحلول القياسي لون فلورسنتي واحد بنفس مستوى (R_f) فهذا يدل على قدرة الفطر على إفراز السم الفطري المحدد. بالنسبة لبعض السموم الفطرية فإنها تحتاج إلى معاملات خاصة لإظهارها فمثلا الإسترجماتوسيستين يحتاج لكي يظهر إلى أن يرش ب 24% كلوريد الألمنيوم ثم يعرض للحرارة 110 °C لمدة 10 دقائق في حين أن كلا من الأفلاتوكسين و الربراتوكسين ب لا تحتاج إلى معاملة لكي تظهر. بعد ذلك يمكن تحديد كمية السم الفطري الذي يفرزه الفطر بعمل تخفيفات من المحلول القياسي للسم الفطري((Bokhari, (1993); Mobasher, (1993); Samson *et al*., (2000)) .

3-10 تأثير النباتات العشبية على الفطريات المنتجة للسموم Effect of herbal plant on toxigenic fungi

تمت اضافة المستخلصات النباتية مع البيئة الصلبة بتركيز 50 ملجم/ مل مع المقارنة بالمجموعة الضابطة (control) بدون اضافة المستخلصات النباتية. بعد تحضين الأطباق عند درجة 28 °C لمدة 7 أيام ثم تقدير النمو الفطري عن طريق قياس قطر المستعمرة و تقدير السم الفطري بطريقة الاستخلاص من البيئة الصلبة.

3-10-1 إستخلاص السم الفطري من البيئة Extraction of mycotoxin

استخدمت في هذه الدراسة طريقة الإستخلاص من البيئة الصلبة (Extraction from solid media) لإستخلاص السم الفطري لمعرفة تأثير النباتات العشبية على قدرة الفطريات المختبرة على إنتاج بعض السموم الفطرية و ذلك باتباع الخطوات التالية :

1- تؤخذ أطباق بتري التي تم اختبار تأثير النباتات العشبية المضاد للميكروبات فيها حيث يخلط 50 جم من البيئة لكلا منها ب 250 مل من محلول (ميثانول : ماء) بنسبة (4:5 بالحجم) في دورق مخروطي سعة 250 مل ثم يوضع بعد ذلك في خلاط معدني Waring blander (33BL900 Series, Kenwood) و يستمر الخلط لمدة دقيقتين.

2- يوضع المخلوط الناتج في جهاز الطرد المركزي Centrifuge موديل EBA 20 من شركة Hettich لمدة 15 دقيقة على سرعة 500 لفة / دقيقة. ثم يتم عمل ترشيح عبر قمع زجاجي مثبت في دورق مخروطي متصل بأنبوبة تفريغ للهواء.

3- يغسل الراشح المتبقي Filtrate بحوالي 50 مل من محلول (ميثانول : ماء) بنسبة (4:5) ثم يعاد فصل الراشح في قمع الفصل Reparatory funnel سعة 250 مل. بعد ذلك يضاف 100 مل هكسان Hexan إلى قمع الفصل.

4- تغسل طبقة الهكسان العلوية بإضافة 50 مل من محلول (ميثانول : ماء) بنسبة (4:5).

5- تجمع طبقة الميثانول المنفصلة و طبقة غسيل الهكسان ثم يتم تركيزها باستخدام جهاز التبخير بمكثف عند 80 °C لإزالة الميثانول.

6- المحلول المركز المتبقي في جهاز التبخير بمكثف و لفصل السموم الفطرية الموجودة فيه تتم بإضافة الكلوروفورم في قمع الفصل أولا بمقدار 75 مل ثم يكرر الفصل بالقمع مرتين بواسطة 50 مل كلوروفورم.

7- تجمع طبقة الكلوروفورم من قمع الفصل و تجفف بجهاز التبخير عند 60 °C ثم تعاد إذابة المستخلص ب 10 مل إيثانول و يوضع في القنينات الصغيرة داكنة اللون و تغلق و تحفظ عند درجة حرارة منخفضة جدا لحين إجراء التقدير الكمي للسم الفطري (Sorenson *et al*., 1967).

2-10-3 التقدير الكمي للسموم الفطرية بواسطة الطبقات الكروماتوجرافية الرقيقة Quantification of mycotoxins by thin layer chromatography (TLC)

بعد التأكد من إفراز الفطر للسموم الفطرية بمطابقة المستخلص الفطري مع المحلول القياسي في اللون و المستوى حيث يتم حساب قيمة عامل هام يعرف ب (R_f) يقدر بالنسبة بين المسافة التي يقطعها السم الفطري إلى المسافة التي يقطعها المذيب و تختلف قيمة R_f بإختلاف نظام المحاليل المستعمل.

$$R_f = \frac{\text{المسافة التي يقطعها السم الفطري}}{\text{المسافة التي يقطعها المذيب}}$$

تستخدم طريقتين للتقدير الكمي للسموم الفطرية و هما التقدير الكمي للسم باتجاه واحد بواسطة الطبقات الكروماتوجرافية الرقيقة Quantification of mycotoxin by 1- dimensional TLC و التقدير الكمي للسم في

اتجاهين بواسطة الطبقات الكروماتوجرافية الرقيقة Quantification of mycotoxin by 2- dimensional TLC (نجار, 2007).

11-3 تقدير سمية مستخلص نبات الحناء على الخلايا السرطانية Toxicity of aceton extract of *Lawsonia inermis* on tumor cell

تم الحصول على خلايا Breast Carcinoma (HTB-26), Colon cancer (HTB-38) و Ehrlich Carcinoma السرطانية و الحصول على النتائج من المعهد القومي للأورام, مصر. الخلايا تنمى في بيئة PRMI 1640 (Sigma, USA) مع مصل جنين العجل Fetal calf serum 10% (FCS) (Gipco, USA) عند 37 °C في جو رطب يحتوي 95% هواء و 5% ثاني أكسيد الكربون CO_2 لمدة 48 ساعة. الخلايا السرطانية تعامل بجرعات مختلفة من المستخلص الأسيتوني للحناء (10, 100, 200, 300, 400 µl/ml) لمدة 24 ساعة. تم اختيار المستخلص الأسيتوني لنبات الحناء لكونه الأقوى تأثيرا على الميكروبات في التجربة. الخلايا السرطانية تم عمل طرد مركزي لها بمقدار 5000 لفة/ دقيقة rpm لمدة دقيقتين ثم يزال الجزء الطافي و يتم عدها باستعمال شريحة hemocytometer بعد صبغها بأزرق التريبان trypan blue (Sigma, USA) المذاب في محلول ملحي (1:1 v/v). تقييم حيوية الخلايا و تحسب الجرعة نصف المميتة و هي التي تكون مميتة ل 50% من الخلايا السرطانية و يرمز لها (LD_{50}). تكرر التجربة 3 مرات لكل تركيز بالمعهد القومي للأورام, مصر.

12-3 التحليل الإحصائي Statistical analysis

التحليل الإحصائي يعد بإستخدام الحاسب الآلي لوصف البيانات و تحليلها إحصائيا عبر برنامج Statistical Package for Social Science (SPSS) (windows, version 16). تم تحديد درجة تباين النتائج في التجارب بحساب المتوسط الحسابي (Mean) ± الإنحراف المعياري (Standard deviation (SD)) و هذا يعني (Mean ± SD).

4- النتائج

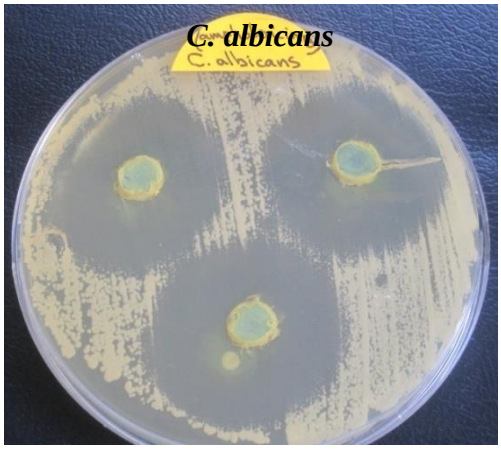
Results

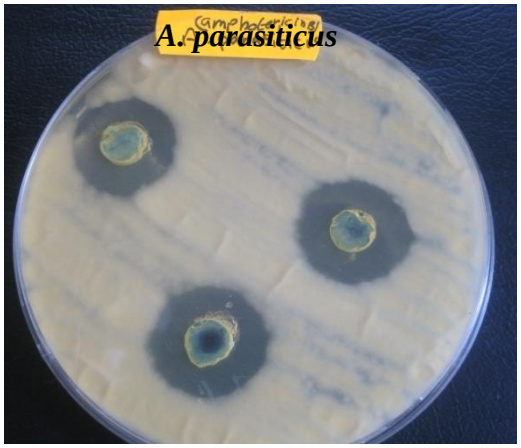
4-1 تأثير المضادات الحيوية على الميكروبات Antibiotic effect on microbes

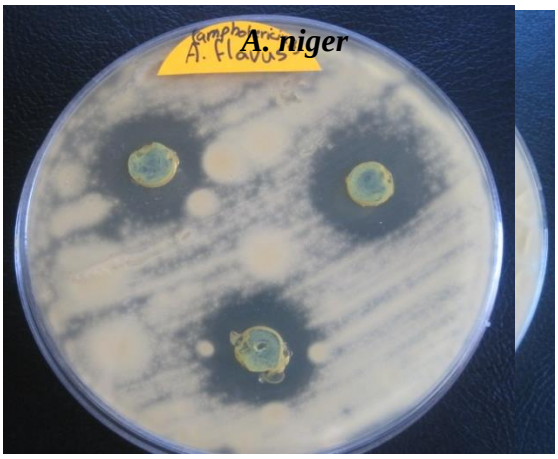
لمعرفة قوة تأثير النباتات العشبية يتم في البداية اختبار تأثير المضادات الفطرية على الفطريات المستخدمة و من ثم مقارنتها بالنباتات العشبية المختبرة و استخدمت 4 أنواع من المضادات الفطرية (Anti fungal nail liquid, Amphotericin B, Nestatin, Clotrimazole) و تراوحت النتائج للمضادات الفطرية بين المضاد القوي و المتوسط و الضعيف من ناحية التأثير المثبط للفطريات فالمضاد الفطري التجاري (AFNL)

(Anti fungal nail liquid) كان أفضل و أقوى المضادات المختبرة فقد أعطى تثبيطا كاملا لنمو الفطريات المستخدمة لذا اعتبر (standard antifungal) و يعد المضاد الفطري قوي إذا كان (متوسط قطر منطقة التثبيط 35 - 45 ملم) و المضاد الفطري متوسط التأثير (متوسط قطر منطقة التثبيط يتراوح بين 25 - 34 ملم) و مضاد فطري ضعيف التأثير (متوسط قطر منطقة التثبيط يتراوح بين 15 - 24 ملم) حيث وجد أن المضاد الفطري Amphotericin B قوي التأثير على خميرة *Candida albicans* و له تأثير ما بين المتوسط و الضعيف على الفطريات الأخرى أما المضاد الفطري Nystatin و Clotrimazole فيتراوح تأثيرها ما بين المتوسط إلى الضعيف على الميكروبات المستخدمة و يتضح ذلك في شكل(4-1) و الجدول (4-1).

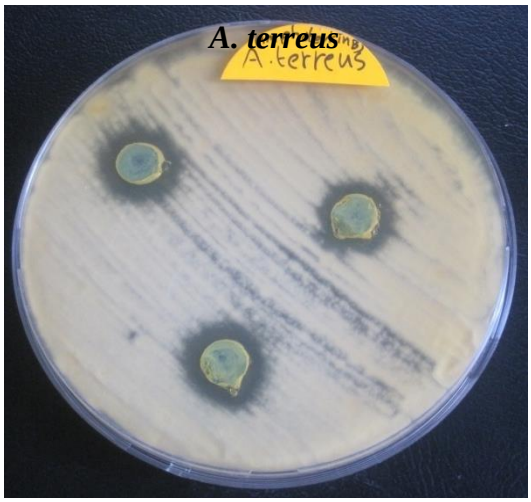
و لمعرفة قوة تأثير النباتات العشبية على البكتيريا يتم في البداية اختبار تأثير المضاد البكتيري أمبيسيلين Ampicillin (standard antibacterial) على البكتيريا المستخدمة و من ثم مقارنتها بالنباتات العشبية المختبرة فكان له تأثير مثبط فعال على كلا من البكتيريا *B. subtilis* و *S. aureus* حيث كان متوسط قطر التثبيط 24 و 22 ملم على التوالي و يتضح النتائج في الجدول (4-2).







A. flavus



A: ***Aspergillus*****, C:** ***Candida***

شكل 4-1: تأثير المضاد الفطري Amphotericin B على بعض الفطريات المستخدمة.

جدول 4-1: تأثير المضادات الحيوية الفطرية على نمو الفطريات المستخدمة.

الفطريات المختبرة	المضادات الفطرية Antifungal agent متوسط قطر منطقة التثبيط (ملم) ± SD			
	Antifungal nail liquid (AFNL)	Amphotericin B	Nystatin	Clotrimazole
Candida albicans	45 ± 0.01	35 ± 0.44	30 ± 1.7	17 ± 0.55
Aspergillus flavus	45 ± 0.03	20.7 ± 1.9	19.5 ± 0.23	16.3 ± 0.44
Aspergillus terreus	45 ± 0.02	15.3 ± 0.4	14 ± 3.1	13.2 ± 0.77
Aspergillus parasiticus	45 ± 0.04	20.7 ± 1.4	20 ± 0.44	15.5 ± 0.48

16.2 ± 1.4	21.3 ± 0.77	23 ± 3.1	45 ± 0.02	***Aspergillus niger***
18 ± 0.44	29.2 ± 0.4	30.2 ± 0.77	45 ± 0.05	***Trichophyton tonsurans***
17.5 ± 1.4	26 ± 3.1	27.5 ± 0.44	45 ± 0.03	***Microsporum canis***
16.9 ± 3.1	25.5 ± 0.44	26.7 ± 5.3	45 ± 0.02	***Microsporum gypseum***

جدول 4-2: تأثير الامبيسيلين Ampicillin على نمو البكتيريا المستخدمة.

البكتيريا	أمبيسيلين Ampicillin متوسط قطر منطقة التثبيط (ملم) ± SD
Bacillus subtilis	24 ± 1.23
Staphylococcus aureus	22 ± 0.4

2-4 النباتات العشبية Herbal plants effect

1-2-4 تأثير النباتات العشبية المضاد للميكروبات Effect of herbal plants as antimicrobial

استخدمت المستخلصات المائية و الكحولية و الأسيتونية لكل من أوراق نبات الحناء و السدر و السنامكي كل على حده عند تركيز 10 ملجرام/ملل و كذلك استخدم المستخلص الكحولي لنباتي الشلياط و الحرجل عند نفس التركيز لمعرفة مدى تأثير هذه المستخلصات على تثبيط النمو للبكتيريا *Bacillus subtilis* و *Staphylococcus aureus* و الفطريات *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. parasiticus*, *A. terreus*,

Trichophyton tonsurans, Microsporum canis, M. gypseum و خميرة *Candida albicans* و قد أظهرت نتائج الإختبارات في الجداول (4-3) و (4-4) و (4-5) ما يلي:

- خميرة *C. albicans* كانت الأكثر تأثرا بالنباتات العشبية مقارنة بالميكروبات الأخرى يليها في ذلك الفطر *Trichophyton tonsuran* ثم *M. canis* و *A. terreus* ثم *A. flavus* ثم *B.subtilis* ثم *S. aureus* ثم *A. parasiticus* ثم *M. gypseum* بينما كان الأقل تأثرا هو *A. niger* حيث أدى المستخلص الأسيتوني للحناء إلى تثبيط الميكروبات *C. albicans, T. tonsurans, M. canis, A. terreus, A. flavus, B. subtilis, S. aureus, A. parasiticus, M. gypseum, A. niger* بمقدار 22, 21, 19.7, 19.7, 19.3, 19.1, 18.9, 18.7, 17.7, 16.7 على التوالي و عموما كان تأثير المستخلصات النباتية المثبط على الفطريات أفضل منه على البكتيريا.

- وجد أن مستخلص نبات الحناء كان الأكثر فعالية في تثبيط الميكروبات المستخدمة يليه في ذلك نبات السدر ثم السنامكي, الشلياط, الحرجل حيث نجد أنه في فطر *A. niger* كان تأثير المستخلص الكحولي المثبط لنبات الحناء و السدر و السنامكي و الشلياط و الحرجل هو 17, 14, 13.3, 10, 9.4 ملم على التوالي.

- المستخلص الأسيتوني للنباتات كان غالبا هو الأكثر تأثيرا تثبيطيا على الميكروبات المستخدمة يليه المستخلص الكحولي ثم المائي حيث أن التأثير المثبط للمستخلص الأسيتوني لنبات السنامكي على خميرة *C. albicans* بمتوسط قطر منطقة التثبيط 13 ملم بينما للمستخلص الكحولي فكان 12.7 ملم أما تأثير المستخلص المائي فهو 10.7 ملم .

بالنسبة لتأثير المستخلصات المائية و الكحولية و الأسيتونية للنباتات المختبرة على الفطريات فلا يوجد أي من المستخلصات النباتية المختبرة قد أدى إلى تثبيط كامل للنمو كما حدث بإستخدام المضاد الفطري القياسي (AFNL).

أما بالنسبة لتأثير المستخلصات المائية و الكحولية و الأسيتونية للنباتات المختبرة على الفطريات مقارنة بالمضاد الفطري Amphotericin B بشكل عام أقل باستثناء التأثير التثبيطي للمستخلص الأسيتوني و الكحولي لنبات الحناء على فطر *A. terreus* فقد تبين أن متوسط قطر منطقة التثبيط (19.7, 16.7ملم) على التوالي فقد كان أفضل من التأثير التثبيطي للمضاد Amphotericin B على فطر *A. terreus* حيث متوسط قطر منطقة التثبيط (15.3 ملم) في حين أن التأثير المثبط للمستخلص المائي لهذا النبات على ذلك الفطرمساوي لتأثير المضاد الفطري Amphotericin B. كذلك نجد أن التأثير التثبيطي على كلا من فطر *A.flavus, A. parasiticus* للمستخلص الكحولي لنبات الحناء (17.7, 18ملم) و أيضا بالنسبة للمستخلص الأسيتوني لنبات الحناء (19.3, 18.7ملم) حيث كانا مقاربين لتأثير المضاد Amphotericin B (20.7 ملم) بفارق تثبيطي بسيط تراوح بين 1

و 3 مل. و أيضا تأثير المستخلص المائي لنبات الحناء المثبط لفطر *A. flavus* حيث كان متوسط قطر منطقة التثبيط (17.6ملم) كان مقاربا لتأثير المضاد Amphotericin B بفارق تثبيطي و قدره 3.1مل.

كان التأثير التثبيطي للمستخلص المائي و الكحولي و الأسيتوني لنبات الحناء على نمو فطر *A. terreus* (15.3, 16.7, 19.7ملم) على التوالي أفضل من المضاد الفطري النيستاتين بمتوسط قطر منطقة التثبيط 14 ملم.

أما التأثير المثبط للمستخلص الكحولي و الأسيتوني لنبات الحناء على كلا من الفطريات *A. terreus, A. flavus, A. niger, A. parasiticus, C. albicans, M. canis, T. tonsurans* فقد كان أفضل من المضاد الفطري ايتراكونازول Itraconazole و كذلك بالنسبة للمستخلص الأسيتوني لنبات الحناء (17.7ملم) و المستخلص الكحولي لنبات السدر(17.4ملم) على الفطر *M. gypseum* حيث كان متوسط قطر منطقة التثبيط للإيتراكونازول (16.9 ملم)و أيضا المستخلص المائي لنبات الحناء بالنسبة للفطريات *A. terreus, A. flavus, C. albicans* (15.3, 17.6, 17ملم) على التوالي فقد كان أفضل من التأثير التثبيطي للإيتراكونازول حيث متوسط قطر منطقة التثبيط (17, 16.3, 13.2ملم) على التوالي.

تأثير مستخلص نبات الحناء على الميكروبات The effect of *Lawsonia inermis* extract on microbes

.

المستخلص الأسيتوني لنبات الحناء كان الأقوى تأثيرا على كلا من *C. albicans, A. flavus, B.subtilis, S. aureus, A. parasiticus, A. terreus, T. tonsurans, M. canis, M. gypseum, A.niger* حيث كان متوسط منطقة التثبيط 22, 19.3, 19.1, 18.9, 19.7, 18.7, 21, 19.7, 17.7 ملم على التوالي و يليه المستخلص الكحولي بتثبيط و قدره 22, 17.7, 17.5, 17.3, 18, 16.7, 20.7, 18.9, 16.7 ملم على التوالي ثم تأثير المستخلص المائي و الذي كان17, 17.6, 17.4, 17.2, 14, 15.3, 13.5, 12.6, 12.2ملم على التوالي بينما المستخلص الكحولي لنبات الحناء كان الأفضل تأثيرا مثبطا على الفطر *A. niger* (17 ملم) يليه المستخلص الأسيتوني (16.7 ملم) ثم المستخلص المائي (13 ملم).

تأثير مستخلص نبات السدر على الميكروبات The effect of *Ziziphus Spinoza* extract on microbes.

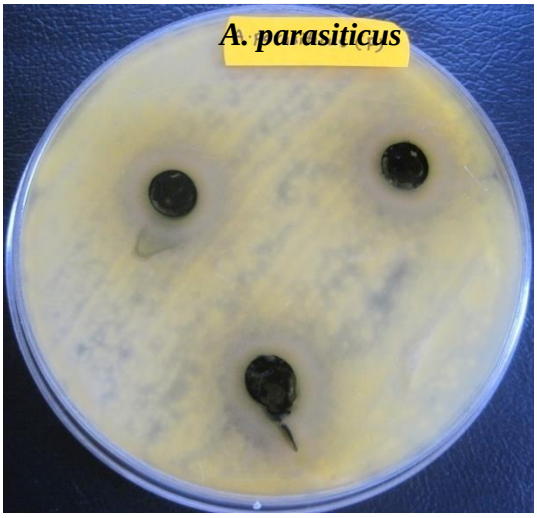
المستخلص الأسيتوني لنبات السدر كان الأفضل تأثيرا على الميكروبات *A. flavus* و *B. subtilis* و *S. aureus* بقطر منطقة تثبيط حوالي (15, 14.8, 14.6 ملم على التوالي) يليه الكحولي (13, 12.8, 12.6 ملم على التوالي) ثم المستخلص المائي (14.3, 14.2, 14 ملم على التوالي) بينما على خميرة *C. albicans* كان المستخلص المائي لنبات السدر (16 ملم) هو الأقوى تأثيرا يليه المستخلص الكحولي (15.7 ملم) ثم الأسيتوني (15.3 ملم) و على فطر *A. terreus* كان المستخلص الأسيتوني لنبات السدر هو الأفضل في التثبيط (12.3 ملم) يليه المستخلص المائي (10.7 ملم) ثم الكحولي (10 ملم) أما على الفطر *A. parasiticus*, *A. niger*, *T. tonsurans*فقد كان المستخلص الأسيتوني (14.3, 14.1, 17.3 ملم) هو الأقوى يليه المستخلص الكحولي (13, 14, 16.6 ملم) ثم المائي (12, 12.3, 12 ملم) أما بالنسبة للفطرين *M. canis*, *M. gypseum* فقد كان المستخلص الكحولي لنبات السدر هو الأقوى تأثيرا (17, 17.4 ملم) يليه المستخلص الأسيتوني (16, 16.7 ملم) ثم المائي (13.2, 11.7 ملم).

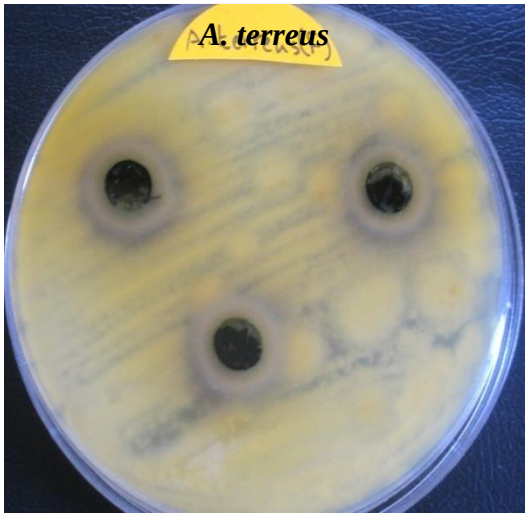
تأثير مستخلص نبات السنامكي على الميكروبات The effect of *Cassia senna* extract on microbes.

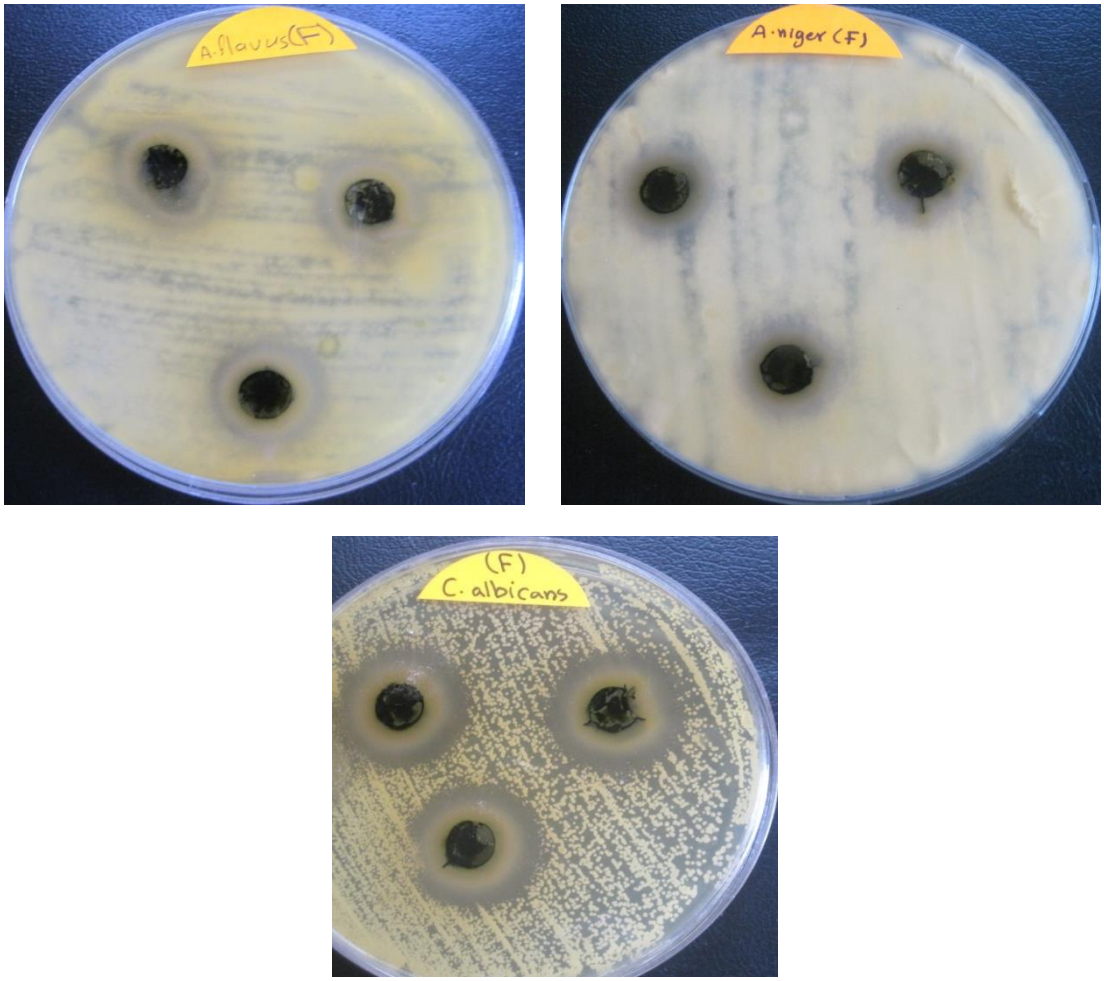
المستخلص الأسيتوني لنبات السنامكي هو الأقوى تأثيرا مثبطا على خميرة الكانديدا و فطر *T. tonsurans*, *M. canis*, *M. gypseum* حيث كان قطر منطقة التثبيط هو (13, 15.4, 15.7, 15.3 ملم) على التوالي يليه المستخلص الكحولي (12.7, 15.3, 15.4, 14.7 ملم) ثم المائي (10.7, 13.7, 12.6, 11 ملم) بينما المستخلص المائي للسنامكي هو الأفضل تثبيطا بالنسبة لفطر *A. flavus*, A. niger و بكتيريا *B. subtilis* و *S. aureus* يليه المستخلص الكحولي و الأسيتوني. في حين أن المستخلص الكحولي هو الأفضل تأثيرا تثبيطيا على فطري *A. terreus*, *A. parasiticus* (12.7, 13 ملم) على التوالي و يليه المستخلص الأسيتوني (12, 12.7 ملم) على التوالي ثم المائي (10, 11 ملم) على التوالي.

تأثير نباتي الشلياط و الحرجل على الميكروبات The effect of *Sysimbrium irio* and *Solenostemma arghel* extract on microbes

تأثير المستخلص الكحولي لنبات الشلياط *Sysimbrium irio* المثبط على الميكروبات كان أفضل من المستخلص الكحولي لنبات الحرجل *Solenostemma arghel* إلا أن تأثير النباتين المثبط عموما على الميكروبات المستخدمة ضعيف مقارنة بالنباتات الأخرى.

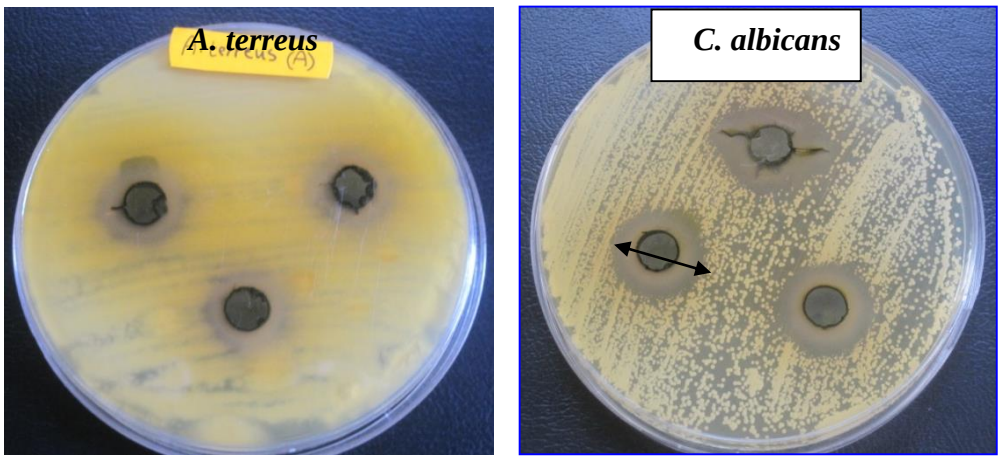






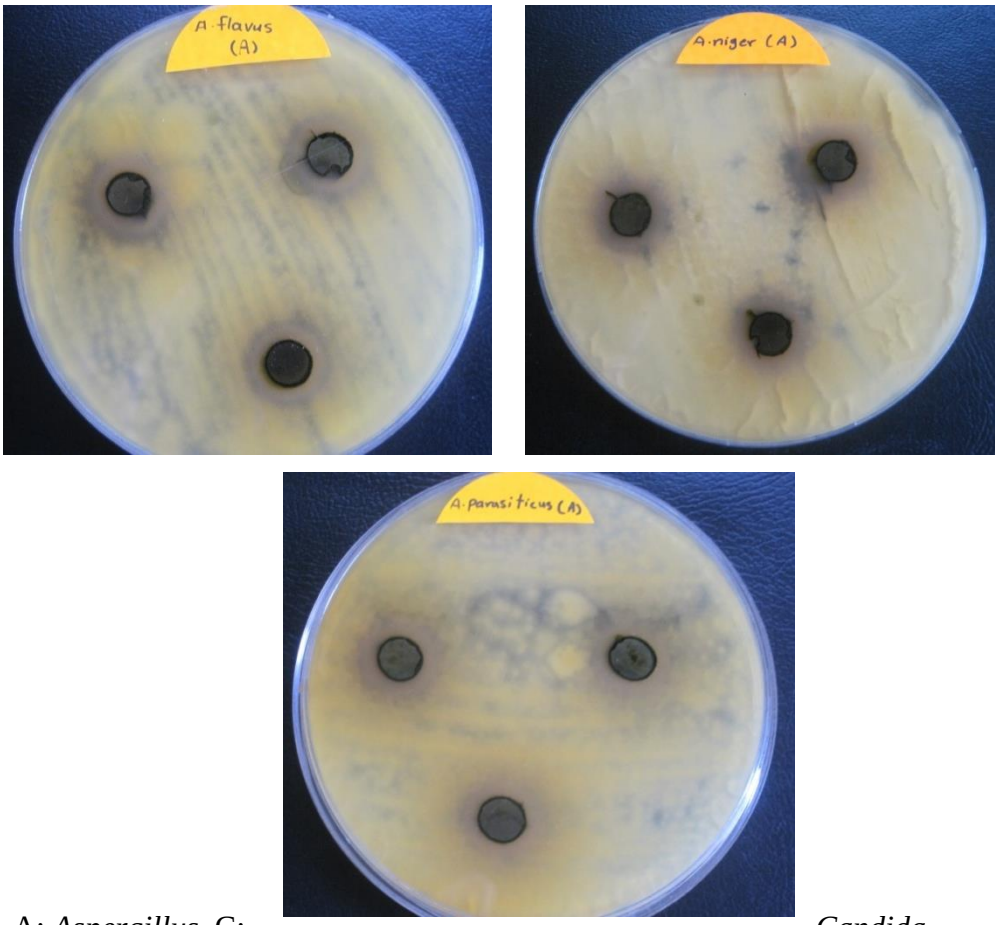
A: *Aspergillus*, C: *Candida*

شكل 4-2: تأثير المستخلص الأسيتوني لنبات الحناء على الفطريات المختلفة.



A. flavus

A. niger



A: *Aspergillus*, C: *Candida*

شكل 4-3: تأثير المستخلص الكحولي لنبات الحناء على الفطريات المختلفة .