دراسة التأثير التثبيطي لأوراق نبات كف مريم *Vitex agnus-castus* على بعض الأنواع الفطرية والبكتيرية الممرضة

*أ.رمضان محمد عبد الرحمن **أ.رشا رمضان عطية

المستخلص: تم في المختبر دراسة تأثير مستخلصات أوراق نبات كف مريم على خمسة أنواع بكتيرية، هي: (*S. auraus* ، *E. coli* ، *P. aeruginosa* ، *S. paratyphi*) وخمس أنواع فطرية هي: (*A .nigar*، *V. albuatrum* ، *C. indicum*، *M.canis*، *T.equinum*) عند الاستخلاص خلال فترات زمنية (24،48،72) ساعة باستخدام مذيبي الأسيتون والميثانول، وتراوحت أقطار مناطق التثبيط ما بين (0-28ملم)، وخلصت الدراسة إلى أنه عند معاملة الفطريات بأوراق النبات المستخلصة بالميثانول كان التأثير قويًا، في حين كان التأثر ضعيفًا عند استخدام الأسيتون، وكان زمن الاستخلاص الأول هو الأكثر تأثيرًا، وباختبار المستخلصات النباتية على البكتيريا تفوق مذيب الأسيتون على مذيب الميثانول من حيث التأثير وكان زمن الاستخلاص الثاني هو الأقوى، وأوصت الدراسة بإجراء تجارب مستفيضة على نبات كف مريم بطرق حديثة وعلى مزيد من الميكروبات.

الكلمات المفتاحية: نبات كف مريم، مستخلصات الأوراق، أزمنة الاستخلاص، تحليل ANOVA، مناطق التثبيط.

المقدمة :

على الرغم من أن التطور في المجال الطبي غير المسبوق إلا أن العديد من الأمراض المعدية مازالت تشكل خطرًا على صحة الإنسان، وذلك من خلال ظهور العديد من السلالات المقاومة نتيجة الاستعمال العشوائي للمضادات الحيوية؛ لذا توجب علينا البحث عن مركبات جديدة ذات تأثير مضاد للجراثيم بحيث تكون مشتقة من النباتات، وقد أشارت العديد من الدراسات إلى قدرة بعض المستخلصات النباتية على تثبيط نمو عدد من البكتيريا والفطريات؛ لذلك اتجه الإنسان إلى استخدام بدائل عن الأدوية الصناعية تفاديًا لتأثيرها الضار على الصحة والحياة، فوجد في استخدام النباتات ومستخلصاتها فوائد كثيرة، ومن هنا بدأت كثير من الشركات الدوائية إنتاج أنواع من المستخلصات القائمة على مجموعة من الأعشاب الطبية المدروسة دراسة علمية بجرعات علاجية وخالية من السمية (بركة، الزكراوي، 2012)، وقد أثبتت التجارب أن المادة الفعالة المخلقة معمليًا لا تعطي نفس التأثير الفسيولوجي الذي تعطيه المادة ذاتها المستخلصة من النباتات الطبيعية، ليس هذا فحسب، بل إن الله سبحانه وتعالى قد أوجد في النبات الواحد أكثر من مادة فعالة تعمل كلها معًا على علاج المرض، وإن الحصول على بعضها نقية واستعمالها بمفردها قد يؤدي إلى قلة الفاعلية أو ظهور الآثار الجانبية التي يُحذر منها المهتمون بصحة الإنسان، وفي طليعتهم منظمة الصحة العالمية التي جاء في إحدى فقرات تقريرها الصادر في شهر نوفمبر 1977م أن أكثر ما يهدد حياة الإنسان هو إصراره على تلويث جسده بالأدوية الصناعية دون مبرر، وذلك سواء بالوصفات المتكررة أو بالتداوي الذاتي باستخدام الأدوية الحديثة (ناصر،2011).

وفي هذه الدراسة تم اختيار أوراق نبات كف مريم *Vitex agnus-castus* لمعرفة مدى إمكانية استخدام هذه الأوراق في تثبيط نمو بعض الأنواع الفطرية والبكتيرية الممرضة وذلك لوفرته في البيئة الليبية ولما يحتويه من مركبات فعالة قد يكون لها تأثير تثبيطي على الكائنات الميكروبية، ومن أمثلة هذه المركبات، الفلافونيدات، والجلايكوسيدات، والتربينات، والفينولات،

* محاضر، قسم الاحياء، كلية التربية، جامعة عمر المختار ramadan ly @yahoo.com
** محاضر، قسم الأحياء، كلية التربية، جامعة عمر المختار rasha.ramadan@omu.edu.ly

والصابونينات (هيكل، عبدالله. 1988)، والنبات عبارة عن شجيرة متساقطة الأوراق شتاءً، وتنتمي للفصيلة الفربينية، يتراوح ارتفاعها من مترين ونصف إلى أربعة أمتار، أوراقها مركبة على شكل راحة اليد تتكون من خمس إلى سبع وريقات، أزهارها صغيرة تظهر على شكل عناقيد زكية الرائحة لونها أبيض أو أزرق، وموطنها حوض البحر الأبيض المتوسط وآسيا الوسطى. تستطيع الشجيرة أن تتحمل حرارة قدرها 40 -45 درجة مئوية، كما أنها تتحمل الصقيع والتعرض لأشعة الشمس المباشرة، وكذلك تتحمل الجفاف والرياح، وهي تحتاج إلى تربة رطبة عميقة جيدة الصرف، تزرع للزينة في الحدائق والمنتزهات والشوارع وتصلح لعمل الأسيجة، ويستخلص من هذا النبات مادة فعالة لأمراض العيون وأمراض المعدة، ويكون تكاثرها بواسطة العقل والبذور (فارس، عامر. 2000).

الهدف من الدراسة:

لا شك في أن تحديد الهدف لكل عمل يساعد على اختيار أنجح الوسائل الكفيلة بتحقيق الغاية من هذا العمل في سرعة وسهولة؛ لهذا تم تحديد أهم الأهداف التي قامت لأجلها هذه الدراسة، وهي تتمحور حول ثلاث نقاط، هي:

1. دراسة تأثير مستخلصات أوراق نبات كف مريم خلال أزمنة استخلاص مختلفة على نمو خمسة أنواع من الفطريات، وخمسة أنواع من البكتيريا، الممرضة.
2. اختيار أفضل زمن استخلاص ذي تأثير مثبط لنمو الأنواع الفطرية والبكتيرية التي شملتها الدراسة.
3. اختيار أفضل المذيبات لاستخلاص المواد الفعالة من البذور المختبرة.

المواد وطرق البحث:

أولاً: المواد المستخدمة (أوراق النبات-فطريات-بكتيريا-مذيبات):

أ. الأوراق النباتية: تم استخدام أوراق نبات كف مريم *Vitex agnus-castus* في هذه التجربة بصفته عامل مؤثر في نمو أو تثبيط كائنات الدراسة، وتم تجميع الأوراق من منطقة وادي الكوف الواقعة في نطاق منطقة الجبل الأخضر بشرق ليبيا، وتم تعقيم السطح الخارجي لهذه الأوراق بغسلها بواسطة إيثيل ذي تركيز 10%، وغُسلت بعد ذلك بالماء المقطر عدة مرات للتخلص من أثر المعقم، وتم وضعها في فرن عند درجة حرارة 30 درجة مئوية لمدة خمس دقائق؛ وذلك للتخلص من الرطوبة، بعد ذلك تم طحن الأوراق بواسطة مطحن كهربائي وتم حفظها في أوعية زجاجية معقمة محكمة الإغلاق إلى حين الاستخدام (Alsaka *et al.* 2017).

ب. كائنات الدراسة: استُخدمت في هذه الدراسة خمسة أنواع من الفطريات تم الحصول عليها من مركز الثروة الميكروبية بمدينة القاهرة، حيث جلبت معرفة من قبل باحث في أكاديمية الدراسات العليا ببنغازي لغرض دراستها، وكذلك تم الحصول على خمسة أنواع من البكتيريا معرفة من معمل تحليل مستشفى مركز بنغازي الطبي.

1-الفطريات:

***Aspergallus nigar* -**: من الفطريات الشائعة الوجود في التربة، ويتبع الفطريات الأسكية الراقية، وهو يسبب الأعفان السوداء، ويتواجد مترمماً على المواد العضوية، يتميز بوجود الطور الجنسي في دورة حياته، وهو يكون جراثيم أسكية، تتواجد على الحوامل الكونيدية.

– ***Vertcillium albuatrum*** : من الفطريات الناقصة التي تعيش في التربة، وتسبب مرض الذبول الوعائي لنباتات العائلة الباذنجانية، عادةً ما تكون هيفاته شفافة ومستعمراته متوسطة الحجم، يبرز منها الحامل الكونيدي الذي يحمل جراثيم صغيرة وحيدة الخلية بيضوية الشكل رقيقة الجدار.

– ***Chrysosprium indicum*** : يتبع الفطريات الناقصة، وهو يعيش في التربة، هيفاته شفافة أو ملونة، يكون جراثيم كونيدية أحادية الخلية تتواجد على قمة الهيفة، وهي سميكة الجدار، ويعدَّ هذا الفطر من الفطريات المحللة للسليلوز في التربة، وهو يسبب أمراض جهازية للإنسان، وعادةً ما يصيب مناطق الجلد والفم والأنف.

– ***Microsporium canis***: يتبع الفطريات الناقصة، ويعيش في التربة، ويكون مستعمرات شفافة اللون، وينتج نوعين من الجراثيم: كبيرة وصغيرة تتواجد على حوامل كونيدية متفرعة، تتميز الهيفات والخلايا والجراثيم الكونيدية، بأنها ذات أنوية متعددة، ويتطفل هذا الفطر خارجيًا، ويصيب جلد الإنسان والحيوان.

– ***Trichophyton equinum*** : يعيش في التربة، ويكون مستعمرات منفصلة، وهي بيضاء اللون، ويُنتج مثل سابقه الجراثيم الكبيرة والصغيرة التي تكون ذات جدار أملس وتُحمل على أطراف الحوامل الكونيدية، ويصنف هذا الفطر على أنه من الفطريات الجلدية يصيب العديد من الأنواع الحيوانية، مثل: القوارض، والأبقار، والخنازير، والكلاب، وأيضًا القطط، كما أنه يصيب جلد الإنسان وأطرافه ويسبب التهابات في أظافر الأقدام أحيانًا تكون مزمنة.

2–البكتيريا:

في هذه الدراسة تم اختبار خمسة أنواع من المستخلصات البذرية على خمسة أنواع من البكتيريا، هي:

–***Staphylococcus aureus***: هذا النوع من البكتيريا يُعدُّ المسبب الرئيس لمعظم الأمراض البكتيرية، وهي موجبة الجرام، كروية، تتواجد منفردة، أو زوجية، أو في مجموعات، وهي غير متحركة، ولا تكون المحفظة (الكبسولة)، ولهذه البكتيريا القدرة على إفراز بعض الإنزيمات المقاومة للمضادات الحيوية، مثل: أنزيم البنسيلينيز (Penicillinase) المقاوم للبنسلين.

– ***Salmonella paratyphi***: بكتيريا عصوية، سالبة الجرام، تتحرك عن طريق الأسواط المحيطية، لا تكون الكبسولة، وهي تتواجد في التربة، وتصيب الإنسان والحيوان، وتصيب كذلك النبات، وتقاوم هذه البكتيريا المناعة الطبيعية بجسم الإنسان عن طريق منع حدوث عملية البلعمة والالتهام، وأيضًا عن طريق إفرازها السموم الداخلية والخارجية (Endotoxine–Exotoxine).

– ***Pseudomonas aeruginosa***: بكتيريا أشكالها عصوية وكروية، سالبة الجرام، ومعظمها هوائي، تتواجد في التربة والماء وتتطفل على الحيوان، وبعضها يسبب أمراض للإنسان والنبات، وهي متحركة ولا تنتج المحفظة، وتتميز هذه البكتيريا بإنتاجها لصبغة خضراء مزرقة، كما تفرز هذه البكتيريا السم الخارجي (Exotoxine).

– ***Escherichia coli***: بكتريا عصوية، سالبة لصبغة الجرام وهي موجودة بصورة طبيعية في الأمعاء عند الطيور وبقية الحيوانات الأخرى، وعلى الرغم من أن معظم أنواع هذه البكتيريا غير ممرضة داخل الجسم، إلا أنه يوجد عدد محدد خارج الأمعاء يتسبب أحيانًا في إحداث إصابة، وتكمن خطورة هذه البكتيريا في كونها تقاوم عملية البلعمة، وتستنزف الحديد في أجهزة الجسم، وتفرز سموم تعرف باسم (Colicins)، وهي تلتصق بالغشاء المخاطي للجهاز التنفسي.

– ***Listeria monocytogenes***: بكتيريا موجبة لصبغة الجرام، عصوية الشكل، وغير متجرثمة، وهي تنتج اللاكتيك أسيد من المواد الكربوهيدراتية، وتصيب الإنسان، وتتواجد في المهبل وقنوات الأمعاء، كما أنها تتواجد أحيانًا في تجويف الفم، وهي مسبب رئيسي للدمامل والخراجات (Tortora *et al.*, 1986).

ج. المذيبات المستخدمة في الدراسة: تم اختيار خمسة مذيبات عضوية مختلفة اعتمادًا على ما جاء في الدراسة التي قام بها (Raji *et al.*, 2016) جدول (1).

جدول (1) أنواع المذيبات المستخدمة في الدراسة ومصدرها.

الرقم	المذيب وتركيزه	الشركة المصنعة	بلد الصنع
1	الأسيتون 95%	B D H	England
2	الكلوروفورم 99%	P A R K	England
3	الميثانول 99.8%	N I C E	England
4	الإيثانول 98%	Riedel-dehaen	Germany
5	الهكسان العادي 98%	Riedel-dehaen	Germany

ثانيًا: طريقة العمل:

أ. عملية الاستخلاص: تمت عملية الاستخلاص حسب طريقة (Heskes *etal.*, 2018) حيث تمت إضافة 5 جرامات من مسحوق الأوراق– التي سبق أن طُحنت وحُفظت معقمة على حدة– إلى 100 مليليتر من المذيب المراد اختبار فعاليته في الاستخلاص، ومن ثم وضعت في الجهاز الهزاز بسرعة 100 دورة في الدقيقة تحت درجة حرارة الغرفة على ثلاث فترات زمنية مختلفة، هي: (24 ساعة للمستخلص الأول، و48 ساعة للمستخلص الثاني، و72 ساعة للمستخلص الثالث)، بعد ذلك أُخذت المستخلصات الناتجة وتم تبخيرها باستخدام جهاز التبخير (Rotary evaporator)، ثم أحتُسب الوزن الجاف المستخدم من الأوراق بعد ذلك أذيبت في ماء تم تقطيره مرتين.

ب. تحضير المزارع الفطرية: تمت زراعة الفطريات المشمولة بالدراسة، وهي: (*C. indicum* ، *V. albuatrum*، *A. nigar* ، *M. canis* ، *T. equinum*) على الوسط الغذائي ذي الرمز الاختصاري (PDA)، وهو Potato Dextrose Agar حسب ما جاء في طريقة الباحث (Asdadi *et al.*, 2014)، ووضعت في الحضانة عند درجة حرارة 27م، وفي فترات زمنية مختلفة (24–72ساعة) بحسب طبيعة نمو كل فطر، ثم أخذت كمية من مزرعة جديدة لكل فطر على حدى بواسطة إبرة معقمة، وغمست في 10 مليليتر من الماء المقطر، واحتسبت كمية اللقاح الفطري بأخذ مليليتر واحد من المعلق السابق، ووضع على شريحة العد الزجاجية.

ج. تحضير المزارع البكتيرية: تمت زراعة الأنواع البكتيرية المشمولة بالدراسة، وهي:

(*L. monocytogenes* ، *S. auraus* ، *E. coli* ، *P. aeruginosa* ، *S. paratyphi*) على الأوساط الغذائية (آجار الدم، الآجار المغذي)، ووضعت في الحاضنة عند درجة حرارة 37 درجة مئوية مدة 24 ساعة، وتم عمل معلق بكتيري لكل نوع من هذه البكتيريا، وذلك بأخذ مستعمرة بكتيرية من كل نوع وغمسها في 10 مليليتر من الماء المقطر، واحتسب عدد الجراثيم لكل مليليتر باستخدام شريحة العد (Ahmad *et al.*, 2016).

د. المعاملة بالمستخلص: تم تحضير (75) طبق بتري معقم، بحيث تم تخصيص (25) منها للفطريات تحتوي على الوسط الغذائي (PDA)، و(50) للبكتيريا، احتوت (25) منها على الوسط الغذائي آجار الدم، فيما احتوت الـ (25) الباقية على

الوسط الغذائي الآجار المغذي، وتم إعداد هذا العدد من الأطباق من أجل عمل مكررات من مزارع الكائنات الحية الداخلة في الدراسة؛ وذلك تحسبًا لأخطاء العمل والتلوث الناجم عن الزراعة الذي قد يؤدي إلى فساد أو عدم نمو بعض العينات، وبعد صب الأوساط الغذائية البكتيرية والفطرية في الأطباق تُركت حتى تتصلب ثم نُشرت كمية من تخفيف البكتيريا والفطريات المراد اختبار المستخلص عليها من مزارع حديثة بطريقة منتظمة، وتم التخلص من التخفيف الزائد بإمالة الطبق وسحب الكمية الزائدة من المزرعة بواسطة ماصة معقمة، ثم وضعت في المجفف عند درجة حرارة 37 درجة مئوية مدة ساعة بحسب طريقة (Ghannadi *et al.,* 2012).

تم أخذ عدد من الأنابيب الخزفية الصغيرة مفتوحة الطرفين–ويبلغ قطر كل فتحة منها 10 ملم–ووُضعت بانتظام على سطح الوسط الغذائي داخل الطبق، وقد تم مراعاة شروط التعقيم، حيث تم استخدام ملقط معقم لأخذ الأنابيب وتم تمريرها على اللهب ثم وضعت على سطح الوسط الغذائي بدون أي ضغط، ثم أضيف إلى الأنابيب الخزفية كمية معلومة من المستخلصات المراد اختبار تأثيرها الفعال ضد كائنات الدراسة (Yilar *etal.,* 2016).

التحليل الإحصائي:

تم إدخال النتائج باستخدام Microsoft Excel، وكانت أزمنة الاستخلاص تمثل الصفوف والأنواع البكتيرية، والفطرية تمثل الأعمدة، وعن طريق برنامج SPSS تم اختبار تحليل التباين الأحادي ANOVA لاختبار الفروق المعنوية لمتوسطات أقطار مناطق التثبيط للأنواع الفطرية والبكتيرية والمذيبات المستخدمة في الدراسة، وكذلك أُجريت اختبارات متعددة باستخدام ما يعرف إحصائيًا باسم الاختبارات البعدية لاختبار الفروق المعنوية عند مستوى معنوي ساوى 0.05 بين متوسطات أقطار مناطق التثبيط للأنواع الميكروبية المختبرة والمذيبات المستخدمة في الاستخلاص، وكذلك أزمنة الاستخلاص المختلفة.

النتائج:

أ. **اختيار المذيب المناسب:** لكي نقوم باختيار أفضل مذيب قادر على استخلاص المواد الكيميائية الفعالة والمؤثرة على الكائنات المختبرة، تم اختبار خمسة أنواع من المذيبات العضوية، كما هو موضح في الجدول (1)، وذلك بحسب طريقة (Sarac *et al.,* 2015)، وكان الغرض من استعمال هذه المذيبات هو استخلاص المواد الفعالة من أوراق نبات كف مريم، واختُبِرَ تأثير المستخلصات على فطريات الدراسة، ومن خلال النتائج لوحظ أن التأثير القوي كان لمستخلص الأسيتون والميثانول، وكان التأثير باقي المذيبات ضعيفًا، وعليه تم استخدام الأسيتون والميثانول في عملية الاستخلاص وتجربتها على كائنات الدراسة. جدول (2).

جدول (2) تأثير مستخلصات أوراق نبات كف مريم على نمو الأنواع الفطرية باستخدام خمسة مذيبات.

المذيبات	الفطريات				
	A. nigar	*V. albuatrum*	*C. indicum*	*M. canis*	*T. equinum*
كلوروفورم	+	-	-	+	+
أسيتون	+++	+++	++	+++	++
هكسان	-	-	+	-	-
ميثانول	+++	++	+++	++	++
ايثانول	-	+	-	-	-

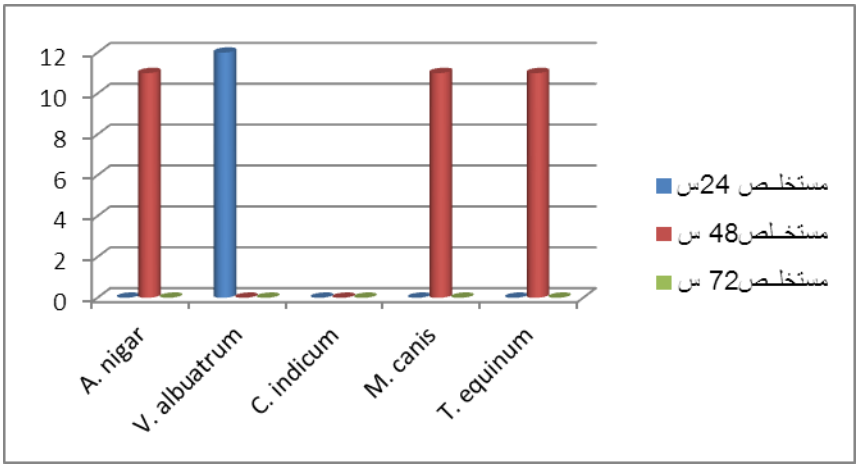
(-) عدم وجود تأثير واضح للمستخلص. (+) تأثير المستخلص ضعيف. (++) تأثير المستخلص متوسط. (+++) تأثير المستخلص قوي.

أولاً: تأثير مستخلصات أوراق نبات كف مريم على الفطريات باستخدام مذيب الأسيتون:

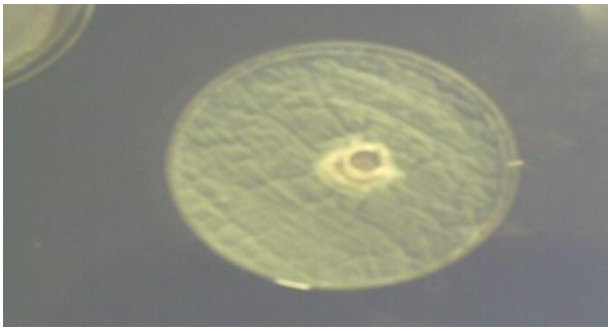
بتطبيق مستخلصات الأسيتون لأوراق نبات كف مريم على الأنواع الفطرية لوحظ أن معظمها قد أبدى مقاومة للمستخلصات حيث أن فطـر *V. albuatrum* كان متوسط قطر منطقة التثبيط التي أظهرها باستخدام المستخلص الأول (12 ملم)، وأبدى مقاومة عندما اختبر عليه المستخلص الثاني، (شكل 2) ؛ وكذلك الثالث. كما وأظهر الفطر *A. nigar* تأثرًا بسيطًا عندما اختُبر عليه المستخلص الثاني (11 ملم)، بينما أظهر الفطر مقاومة لباقي المستخلصات، وقد تبين من اختبار المستخلصات على الفطرين *M. canis* و *T. equinum* أن كليهما تأثر بنسبة ضئيلة جدًا بلغت عند استخدام المستخلص الثاني (11 ملم) لكل منهما، في حين أظهر كلهما مقاومة تامة عند استخدام المستخلص الأول والثالث، وأظهر فطر *C. indicum* مقاومة تامة لجميع المستخلصات. جدول (3)، وشكل (1).

جدول (3) تأثير مستخلصات الأسيتون لأوراق نبات كف مريم على نمو الفطريات المختبرة

المستخلصات	متوسط أقطار مناطق التثبيط بالمليمتر				
	A. nigar	*V. albuatrum*	*C. indicum*	*M. canis*	*T. equinum*
مستخلص24 س	**0**	**12**	**0**	**0**	**0**
مستخلص48 س	**11**	**0**	**0**	**11**	**11**
مستخلص72 س	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**



شكل (1) تأثير مستخلصات الأسيتون لأوراق نبات كف مريم على نمو الفطريات المختبرة



شكل (2) تأثير مستخلص الأسيتون الثاني لأوراق كف مريم على فطر *V. albuatrum*.

بين التحليل الإحصائي للنتائج السابقة عدم وجود فروق معنوية لتأثير مستخلصات الأسيتون لأوراق نبات كف مريم *Vitex agnus-castus* على الأنواع الفطرية المستهدفة بالدراسة، كذلك بين جدول تحليل التباين الأحادي (ANOVA) أن أزمنة الاستخلاص المختلفة لم تظهر أية فروق معنوية في التأثير على فطريات الدراسة.

(تأثير مستخلصات أوراق نبات كف مريم على الفطريات)

Group Statistics

نوع المذيب	N	Mean	Std.Devision	Std. Error Mean
مذيب الاسيتون	15	3.0000	5.15475	1.33095
مذيب الميثانول	15	12.2000	8.97775	2.31805

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
DATA	Equal variances assumed	2.501	.125	-3.442	28	.002	-9.2000	2.67297	-14.67533	-3.72467
	Equal variances not assumed			-3.442	22.326	.002	-9.2000	2.67297	-14.73871	-3.66129

تأثير الوقت علي نمو الفطر باستخدام مذيب الأسيتون (أوراق نبات كف مريم

ANOVA

DATA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	111.600	2	55.800	2.571	.118
Within Groups	260.400	12	21.700		
Total	372.000	14			

التأثير حسب نوع الفطر

ANOVA

DATA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	34.000	4	8.500	.251	.902
Within Groups	338.000	10	33.800		
Total	372.000	14			

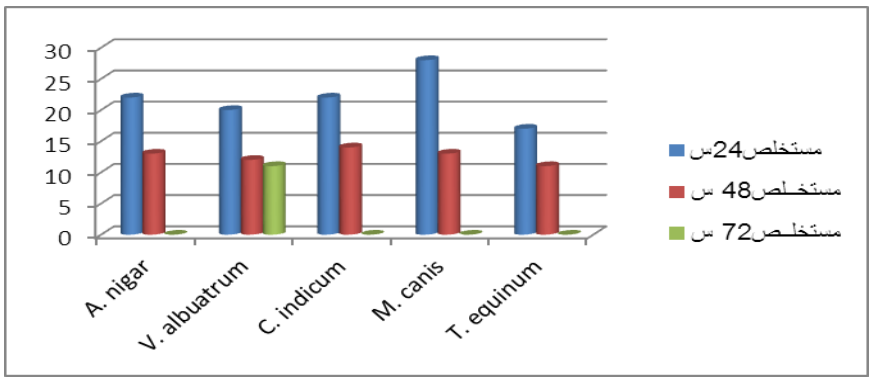
ثانياً: تأثير مستخلصات أوراق نبات كف مريم على الفطريات باستخدام مذيب الميثانول

من خلال اختبار المستخلصات الثلاث (24، 48، 72 ساعة) لأوراق نبات كف مريم المستخلصة بواسطة الميثانول أظهرت نتائجها أن المستخلص الأول كان له التأثير الأقوى على جميع الفطريات، فبلغ أعلى متوسط قطر منطقة تثبيط هو (28 ملم) على فطر *M. canis* (شكل 4) ، وأقل متوسط قطر منطقة تثبيط (17 ملم) على فطر *T. equinum* ، وتساوت أقطار مناطق التثبيط على فطر *A. nigar*، وكذلك فطر *C. indicum* حيث ساوت (22 ملم) .

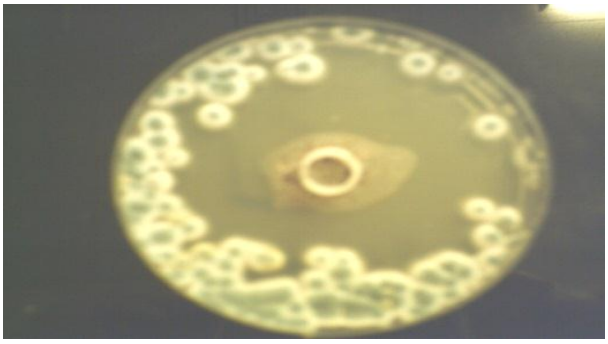
وباختبار تأثير المستخلص الثاني (48 ساعة) على نمو كافة الفطريات المختبرة، كان متوسط قطر مناطق التثبيط على فطر *T. equinum* قد ساوى (11 ملم)، وعلى فطر *M. canis*، وارتفع على فطر *A. nigar* ليصل إلى (13 ملم)، وعلى فطر *V. albuatrum* (12 ملم) وكان فطر *C. indicum* الأكثر تأثرًا، حيث ساوى متوسط قطر مناطق التثبيط (14 ملم). جدول (4)، وشكل (3). أما عند اختبار المستخلص الثالث (72 ساعة) على الفطريات، كان فطر *V. albuatrum* قد تأثر بنسبة بسيطة– تكاد أن تنعدم– مقدارها (11 ملم)، وأبدت جميع الأنواع الفطرية الأخرى مقاومة تامة للمستخلص.

جدول (4) تأثير مستخلصات الميثانول لأوراق نبات كف مريم على نمو الفطريات المختبرة

المستخلصات	متوسط أقطار مناطق التثبيط بالمليمتر				
	A. nigar	***V. albuatrum***	***C. indicum***	***M. canis***	***T. equinum***
مستخلص 24 س	**22**	**20**	**22**	**28**	**17**
مستخلص 48 س	**13**	**12**	**14**	**13**	**11**
مستخلص 72 س	**0**	**11**	**0**	**0**	**0**



شكل (3) تأثير مستخلصات الميثانول لأوراق نبات كف مريم على نمو الفطريات المختبرة



شكل (4) تأثير مستخلص الميثانول الأول على فطر *M. canis* .

بإجراء اختبار تحليل التباين في اتجاه واحد على مستخلصات الميثانول لأوراق كف مريم لمعرفة إذا ما كان لأزمنة الاستخلاص المختلفة أية فروق معنوية في التأثير على الفطريات، تبين أنه توجد اختلافات معنوية في التأثير، ولم تظهر نتائج الاختبارات الإحصائية وجود فروق معنوية في تأثير المستخلصات المذكورة سلفًا على الأنواع الفطرية المختبرة .

تأثير الوقت علي نمو الفطر باستخدام مذيب الميثانول (أوراق نبات كف مريم)

ANOVA

DATA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	961.600	2	480.800	34.590	.000
Within Groups	166.800	12	13.900		
Total	1128.400	14			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: DATA

LSD

صل تجريبي (I)	صل تجريبي (J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
24 ساعة	48 ساعة	9.2000*	2.35797	.002	4.0624	14.3376
	72 ساعة	19.6000*	2.35797	.000	14.4624	24.7376
48 ساعة	24 ساعة	-9.2000*	2.35797	.002	-14.3376	-4.0624
	72 ساعة	10.4000*	2.35797	.001	5.2624	15.5376
72 ساعة	24 ساعة	-19.6000*	2.35797	.000	-24.7376	-14.4624
	48 ساعة	-10.4000*	2.35797	.001	-15.5376	-5.2624

*. The mean difference is significant at the .05 level.

التأثير حسب نوع الفطر

ANOVA

DATA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	45.733	4	11.433	.106	.978
Within Groups	1082.667	10	108.267		
Total	1128.400	14			

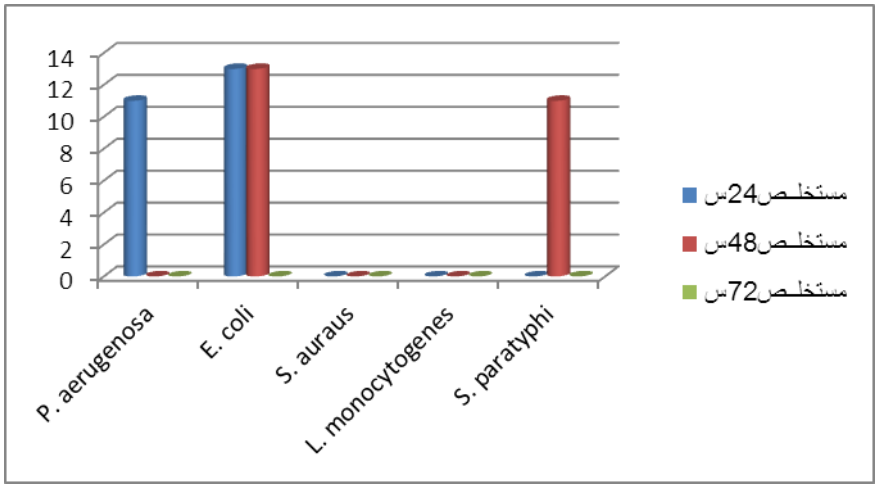
ثالثاً: تأثير مستخلصات أوراق نبات كف مريم على البكتيريا باستخدام مذيب الأسيتون .

من النتائج الواردة في الجدول (5) والشكل (5) يتبين أن استخدام المستخلص الثالث (72 ساعة) لم يسجل أي تأثير يذكر على الأنواع البكتيرية المختبرة، وعند اختبار المستخلص الأول (24 ساعة) على الأنواع البكتيرية المختبرة تراوح متوسط قطر مناطق التثبيط بين (12– 13 ملم) ، في حين لم يحقق المستخلص النباتي تفسه أي تأثير على بكتيريا *S. aureus*، أما

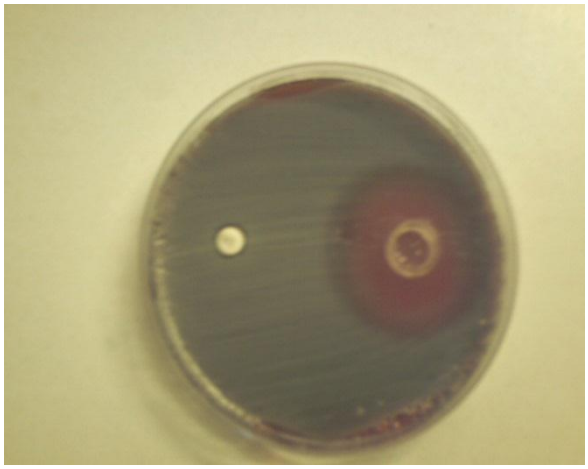
المستخلص الثاني فقد كان تأثيره واضحًا على بكتيريا *E. coli* حيث ساوى متوسط قطر مناطق التثبيط (16 ملم) (شكل 6)، ولم يظهر أي تأثير يذكر على بكتيريا *S. paratyphi* ، وتراوح التأثير على باقي الأنواع البكتيرية ما بين (12- 13 ملم) .

جدول (5) تأثير مستخلصات الأسيتون لأوراق نبات كف مريم على نمو البكتيريا المختبرة .

المستخلصات	متوسط أقطار مناطق التثبيط بالمليمتر				
	P. aerugenosa	*E. coli*	*S. auraus*	*L. monocytogenes*	*S. paratyphi*
مستخلص24س	13	13	0	12	12
مستخلص48س	12	16	13	13	0
مستخلص72س	0	0	0	0	0



شكل (5) تأثير مستخلصات الأسيتون لأوراق نبات كف مريم على نمو البكتيريا المختبرة .



شكل (6) تأثير مستخلص الأسيتون الثاني لأوراق نبات كف مريم على بكتيريا *E. coli* .

بيَّن التحليل الإحصائي للنتائج السابقة وجود فروق معنوية لتأثير مستخلصات الأسيتون لأوراق نبات كف مريم على الأنواع البكتيرية، وذلك عند الاستخلاص في أزمنة مختلفة، حيث ظهر أن المستخلص الثالث (72 ساعة) له فروق معنوية مع باقي الأزمنة، كما أظهرت نتائج التحاليل الإحصائية أنه عدم فروق معنوية في التأثر بالمستخلصات بين الأنواع البكتيرية الوارد ذكرها في الدراسة.

T-Test (تأثير مستخلصات أوراق نبات كف مريم على البكتيريا)

Group Statistics

نوع المذيب		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
DATA	مذيب الأسيتون	15	6.9333	6.77671	1.74974
		15	3.2000	5.51880	1.42495

اختبار T لعينتين مستقلتين

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
DATA	Equal variances assumed	5.990	.021	1.654	28	.109	3.7333	2.25656	-.88902	8.35569
	Equal variances not assumed			1.654	26.897	.110	3.7333	2.25656	-.89757	8.36424

تأثير الوقت علي نمو البكتيريا باستخدام مذيب الأسيتون (أوراق نبات كف مريم)

ANOVA

DATA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	362.133	2	181.067	7.738	.007
Within Groups	280.800	12	23.400		
Total	642.933	14			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: DATA

LSD

(I) صل جتس لها	(J) صل جتس لها	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
24 ه عل	48 ه عل	-.8000	3.05941	.798	-7.4659	5.8659
	72 ه عل	10.0000*	3.05941	.007	3.3341	16.6659
48 ه عل	24 ه عل	.8000	3.05941	.798	-5.8659	7.4659
	72 ه عل	10.8000*	3.05941	.004	4.1341	17.4659
72 ه عل	24 ه عل	-10.0000*	3.05941	.007	-16.6659	-3.3341
	48 ه عل	-10.8000*	3.05941	.004	-17.4659	-4.1341

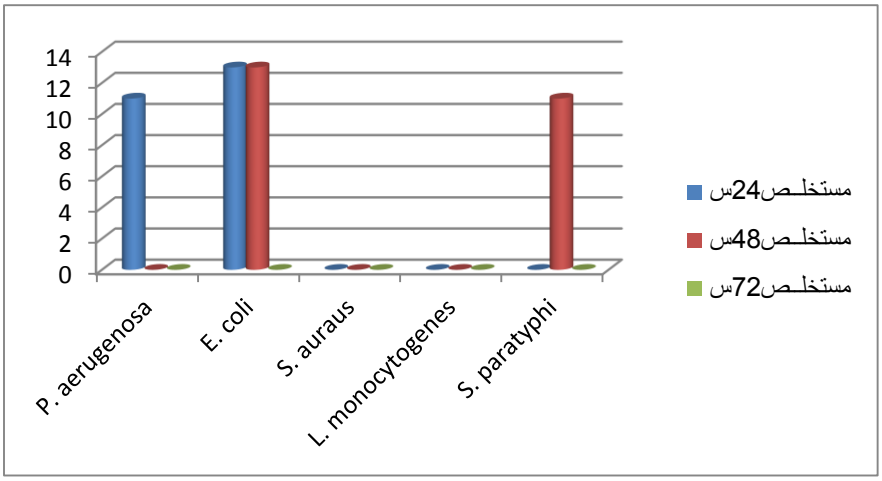
*. The mean difference is significant at the .05 level.

رابعًا: تأثير مستخلصات أوراق نبات كف مريم على البكتيريا باستخدام مذيب الميثانول:

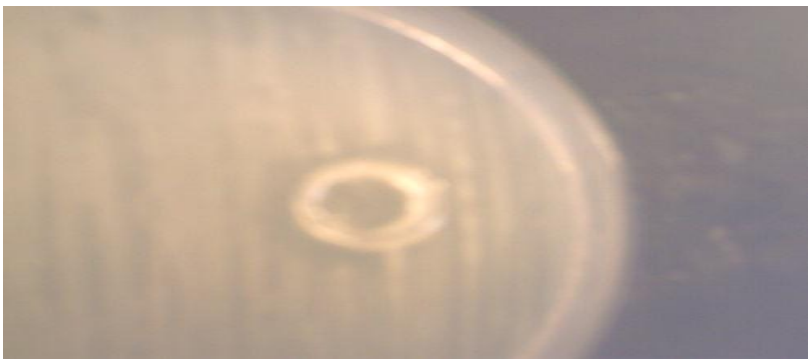
عند معاملة الأنواع البكتيرية المختلفة بمستخلصات أوراق نبات كف مريم لوحظ أنها أظهرت مقاومة شبه تامة لجميع أنواع المستخلصات، حيث كان التأثير ضعيفًا جدًا باستخدام المستخلص الثاني (48ساعة) على بكتيريا *S. paratyphi* وقد ساوى متوسط قطر منطقة التثبيط (11 ملم)، بينما قاومت البكتيريا المستخلص الأول (24 ساعة)، وكذلك الثالث (72ساعة). أما فيما يخص بكتيريا *E. coli* فقد ساوى متوسط قطر منطقة التثبيط (13 ملم) عند استخدام المستخلصين الأول والثاني، وانعدم التأثير تمامًا عند استخدام المستخلص الثالث، وعند اختبار تأثير المستخلص الأول على بكتيريا *P. aerugenosa* ،كان التأثير ضعيفًا جدًا، حيث ساوى متوسط قطر منطقة التثبيط (11 ملم) (شكل 8)، في حين أظهرت هذه البكتيريا مقاومة تامة لباقي المستخلصات شأنها في ذلك شأن بكتيريا *S. auraus* ، *L. monocytogenes* ، اللتين لم تتأثرا بجميع مستخلصات أوراق نبات كف مريم. جدول (6)، وشكل (7).

جدول (6) تأثير مستخلصات الميثانول لأوراق نبات كف مريم على نمو البكتيريا المختبرة:

المستخلصات	متوسط أقطار مناطق التثبيط بالمليمتر				
	P. aerugenosa	*E. coli*	*S. auraus*	*L. monocytogenes*	*S. paratyphi*
مستخلص24س	11	13	0	0	0
مستخلص48س	0	13	0	0	11
مستخلص72س	0	0	0	0	0



شكل (7) تأثير مستخلصات الميثانول لأوراق نبات كف مريم على نمو البكتيريا المختبرة:



شكل (8) تأثير مستخلص الميثانول الأول لأوراق نبات كف مريم على بكتيريا *P. aerugenosa*

من خلال النتائج الإحصائية والمتمثلة في إجراء اختبار تحليل التباين في اتجاه واحد (ANOVA) تبين عدم فروق معنوية في تأثير مستخلصات الميثانول لأوراق نبات كف مريم على الأنواع البكتيرية؛ وذلك بالاستخلاص في أزمنة مختلفة، كما لم تظهر النتائج وجود أي فارق معنوي في التأثير على الأنواع البكتيرية محل الدراسة.

التأثير حسب نوع البكتيريا

ANOVA

DATA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	80.267	4	20.067	.357	.834
Within Groups	562.667	10	56.267		
Total	642.933	14			

تأثير الوقت علي نمو البكتيريا باستخدام مذيب الميثانول (أوراق نبات كف مريم)

ANOVA

DATA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	76.800	2	38.400	1.318	.304
Within Groups	349.600	12	29.133		
Total	426.400	14			

التأثير حسب نوع البكتيريا

ANOVA

DATA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	152.400	4	38.100	1.391	.305
Within Groups	274.000	10	27.400		
Total	426.400	14			

المناقشة

إن مقاومة بعض الأنواع الميكروبية لكثير من المضادات شجع كثير من البُحاث على دراسة استخدام البدائل العشبية الطبيعية بصفته عامل مثبط لنمو الميكروبات الممرضة، وفي هذه التجربة تم استخدام مستخلصات أوراق نبات كف مريم لما يحتويه هذا النبات من مركبات كيميائية قد يكون لها تأثير تثبيطي للعديد من الميكروبات، فقد ذكر الباحث (Afarin *et al.*,2015) أن للزيوت العطرية للأجزاء الهوائية لنبات كف مريم تأثيرًا كبيرًا على بكتيريا *St.aureus* ، كذلك ذكر (Katiraee *etal.*,2015)، و(Niroumand *etal.*,2018) أن لهذا النبات تأثيرًا مثبطًا على العديد من الأنواع الفطرية، وفي دراسة أخرى قام بها (Ghannadi *etal.*, 2012) تم تقييم النشاط المضاد لبعض الأنواع البكتيرية باستخدام مستخلصات أجزاء من نبات كف مريم واتضح أن للمستخلصات تأثيرًا قويًا ضد الأنواع الميكروبية محل الدراسة، وفي هذه الدراسة لما تم اختبار تأثير

مستخلصات أوراق نبات كف مريم على الأنواع الفطرية أشارت النتائج إلى تفاوت واضح في التأثير، فكان التأثير قويًا عند معاملة الفطريات بمستخلصات الميثانول للأوراق، وقد اختلف هذا جزئيًا مع ما ذكره (Zahid *etal.,* 2016)، و(Kirmizibekmez *etal.,* 2016)، و(Abdel-lateef *etal.,* 2016) الذين بينوا أن لمركبات الفيتولكسينات (Phytoalexins) المتواجدة في نبات كف مريم، دورًا هامًا في التأثير على نمو الفطريات عندما يتم استخلاصها بالماء المقطر، في حين أن فاعليتها تقل عندما تستخلص بالمركبات الكيميائية، حيث أنها تتفاعل معها وتعطي مركبات متطايرة ذات وزن جزيئي صغير، واتضح ذلك عند استخدام مذيب الأسيتون في استخلاص المواد الفعالة من أوراق النبات واختبار تأثيرها على الفطريات، حيث كادت النتائج الإيجابية أن تنعدم، ولم يتأثر بالمستخلصات سوى فطر *Verticillium albuatrum* فقد كان تأثره غايةً في الضعف، أما باقي الفطريات فلم تكن نسبة تأثرها الضعيفة ذات أهمية تذكر، في حين تتفق نتائجنا مع ما ذكره (Sarac *et al.*, 2015) الذي خلص إلى أن الزيوت العطرية المستخلصة بالميثانول من أوراق نبات كف مريم تكون أكثر فاعلية في التأثير على الكائنات من تلك المستخلصة بالأسيتون، كما أوردت (Mari *et al.*, 2015) في دراستهم أن هناك مادة كيميائية يكثر وجودها في أجزاء من نبات كف مريم، وهي مادة (4-methylthio-3-butenyl isothiocyanate) لها تأثير فعال ضد بعض الأنواع الميكروبية عند استخلاصها بالميثانول. ومن خلال النتائج اتضح أنه عند اختبار مستخلصات الميثانول للأوراق النباتية على الفطريات كان تأثيرها كبيرًا وواضحًا، وذلك عند زمن الاستخلاص الأول (24 ساعة)، حيث كان فطر *M.canis* هو الأكثر تأثرًا، وعند اختبار المستخلص الثاني كانت نسبة التأثر متقاربة إلى حد كبير، فيما انعدم التأثير تقريبًا عند استخدام زمن الاستخلاص الثالث، وقد يرجع ذلك إلى أن المواد الفعالة غالبًا ما تكون متطايرة وعليه فإن زيادة زمن الاستخلاص يزيد من إمكانية تطايرها.

وبينت النتائج أنه عند اختبار مستخلصات أوراق نبات كف مريم على البكتيريا كان تأثيرها ضعيفًا مقارنةً مع تأثير نفس المستخلصات على الفطريات فبكتيريا *E. coli* كانت هي الأكثر تأثرًا ، وهذا مخالف لما جاء به (Afarin *etal.,* 2015)، وقد يرجع هذا الاختلاف إلى قيامه باستخلاص مادة Epsilion-polylysine من نبات كف مريم واستخدم تراكيز عالية منها ضد البكتيريا، وكانت الأوراق المستخلصة بالأسيتون، أكثر تأثيرًا على نمو البكتيريا من تلك المستخلصة بالميثانول، وهذا يتوافق مع ما ذكره (Sarac *etal.*, 2015).

التوصيات:

من خلال ما ظهر من نتائج نوصي بالتالي:

- إجراء المزيد من الدراسات المستفيضة حول تأثير المستخلصات الكيميائية لأوراق نبات كف مريم على أنواع وأعداد مختلفة من الفطريات والبكتيريا.
- القيام بتنقية المكونات الفعالة لأوراق النبات المدروس واختبار تأثيره التثبيطي ودراسة التأثير السمي له على الأحياء المجهرية.
- اختبار تأثير مستخلصات أوراق نبات كف مريم ومكوناتها الفعالة على حيوانات مختبرية مصابة بأمراض بكتيرية ومقارنة تأثيرها بما تحدثه العقاقير الصناعية من تأثير.
- التحري عن فاعلية باقي أجزاء النبات ودراسة تأثيرها التثبيطي ضد الميكروبات.

- في هذه الدراسة تم استخدام طريقة الرج؛ وذلك لاستخلاص المواد الفعالة من الأوراق، وعليه نوصي باستخدام الطرق الحديثة في فصل وتنقية المركبات الكيميائية من الأجزاء النباتية المختلفة التي قد تتطلب المزيد من الامكانات العلمية والمادية.

Summary: In the laboratory, the effect of the extracts of the leaves of the palm of Mary plant was studied on five bacterial species:(L. monocytogenes, S. auraus, E. coli, P. aeruginosa, S. paratyphi) and five fungal species:(A. nigar and V. albuatrum. , C. indicum, M. canis, T. equinum) upon extraction during time intervals (24,48,72) hours using acetone and methanol solvents, and the diameters of the inhibition zones ranged between (0-28 mm), the study concluded that when treating the fungi With plant leaves extracted with methanol, the effect was strong, while the effect was weak when using acetone, and the time of the first extraction was the most effective, and by testing the plant extracts on bacteria, the acetone solvent outperformed methanol in terms of effect, and the time of the second extraction was the strongest, and the study recommended conducting extensive experiments. On the plant of the palm of Mary in modern ways and more microbes.
key words :
Vitex agnus-castus, leaf extracts, extraction times, ANOVA analysis, inhibition zones.

المراجع العربية:

1- بركة، مراد عبدالرحمن. الزكراوي، أحمد مسعود. (**2012**) **دراسة ارتباط المقاومة للمضادات الحيوية بالمحتوى البلازميدي في عزلتين من بكتيريا السالمونيلا ودوره في اتساع طيف المقاومة الدوائية من البكتيريا المعوية**. قسم الحيوان، كلية العلوم، جامعة سبها، ليبيا.

2- فارس، علي محمود. عامر، مجيد أغا. (**2000**). **دراسة أولية حول منتجات الغابة الغير خشبية في منطقة الجبل الأخضر**. كتاب أبحاث المؤتمر العلمي الثاني للعلوم الزراعية بجامعة أسيوط، مصر.

3- ناصر، ناريمان صالح. (**2011**). **دراسة تأثير المستخلص المائي المغلي للحلبة على بعض الأنواع البكتيرية**. مجلة علوم الرافدين.22(2) : 33-39.

4- هيكل، محمد السيد. عبدالله، عبدالرازق عمر. (**1988**). **النباتات الطبية والعطرية**. منشأة المعارف، الطبعة الأولى، الاسكندرية، مصر.

Reference:

Abdel-Lateef, E.E.-S.; Hammam, O.A.; Mahmoud, F.S.; Atta, S.A.; El-Sayed, M.M.; Hassenein, H.I. Induction of apoptosis in HepG2 by Vitex agnus-castus L. leaves extracts and identification of their active chemical constituents by LC-ESI-MS. Asian Pac. J. Trop. Dis. 2016, 6, 539–548.

Afarin H, Dakhili M, Zolfaghari MR. Comparison of antimicrobioal effect of essential oil of Vitex agnus-castus with common antibiotics invitro. Qom Univ Med Sci J. 2015;9(3):12–9.

Ahmad, B.; Hafeez, N.; Ara, G.; Azam, S.; Bashir, S.; Khan, I. Antibacterial activity of crude methanolic extract and various fractions of Vitex agnus castus and Myrsine africana against clinical isolates of Methicillin Resistant Staphylococcus aureus. Pak. J. Pharm. Sci. 2016, 29, 1977–1983.

Asdadi A, Idrissi Hassani L, Chebli B, Moutaj R, Gharby S, Harhar H, et al. Chemical composition and antifungal activity of vitex agnus-castusL seeds oil growing in Morocco. J Mater Environ Sci. 2014;5(3):823–30.

Al Saka, F.; Daghestani, M.; Karabet, F. Composition and Antioxidant Activity of Vitex agnus-castus L. and Rosmarinus Officinalis, L. Leaves Essential Oils Cultivated in Syria. SM Anal Bioanal Tech. 2017, 2, 1010

Ghannadi A, Bagherinejad MR, Abedi D, Jalali M, Absalan B, Sadeghi N. Antibacterial activity and composition of essential oils from Pelargonium graveolens L'Her and Vitex agnus-castusL. Iran J Microb. 2012;4(4):171–76.

Heskes, A.M.; Sundram, T.C.; Boughton, B.A.; Jensen, N.B.; Hansen, N.L.; Crocoll, C.; Cozzi, F.; Rasmussen, S.; Hamberger, B.; Hamberger, B. Biosynthesis of bioactive diterpenoids in the medicinal plant Vitex agnus-castus. Plant J. 2018, 93, 943–958.

Katiraee F, Mahmoudi R, Tahapour K, Hamidian G, Emami SJ. Biological properties of Vitexagnus-castus essential oil (phytochemical component, antioxidant and antifungal activity) Biotechnol Health Sci. 2015;2(2):267–97.

Kırmızıbekmez, H.; Demir, D. Iridoid Glycosides and Phenolic Compounds from the Flowers of Vitex agnus-castus. Helv. Chim. Acta 2016, 99, 518–522.

Mari, A.; Montoro, P.; D'Urso, G.; Macchia, M.; Pizza, C.; Piacente, S. Metabolic profiling of Vitex agnus castus leaves, fruits and sprouts: Analysis by LC/ESI/(QqQ) MS and (HR) LC/ESI/(Orbitrap)/MSn. J. Pharm. Biomed. Anal. 2015, 102, 215–221.

Niroumand, M.C.; Heydarpour, F.; Farzaei, M.H. Pharmacological and Therapeutic Effects of Vitex agnus-castus L.: A Review. Pharmacogn. Rev. 2018, 12, 103–114.

Raji, M.; Molnar, M.; Bili´c, M.; Joki´c, S. The impact of extraction methods on isolation of pharmacologically active compounds from Vitex agnus-castus-a review. Int. J. Pharm. Res. Allied Sci. 2016, 5, 15–21.

Sarac, N.; Ugur, A.; Sen, B. In vitro antimutagenic activity of Vitex agnus-castus L. essential oils and ethanolic extracts. Ind. Crop. Prod. 2015, 63, 100–103.

Tortora, G. J., Funke, B., R. and Case, C. L. Microbiology an introduction. The Benjamin Cummings publishing company, Inc. (1986).

Yilar M, Yusuf B, Onaran A. Chemical composition and antifungal effects of Vitex agnus-castus L and Myrtus communis L Plants. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca. 2016;44(2):466–71.

Zahid, H.; Rizwani, G.H.; Ishaqe, S. Phytopharmacological review on Vitex agnus-castus: A potential medicinal plant. Chin. Herb. Med. 2016, 8, 24–29.