الفعالية التضادية لبعض المستخلصات النباتية ضد فطر *Aspergillus niger* المعزول من نبات البصل *Allium cepa* L.

*أحلام القمودي زعيط *سعاد محمد أبوالغيث

المستخلص: تهدف هذه الدارسة إلى عزل وتعريف فطر *Aspergillus niger* من أبصال نبات البصل المصابة بهذا الفطر ودراسة تأثير المستخلصات النباتية المائية الساخنة والباردة لأوراق كلا من نبات المورينجا *Moringa oleifera* Lam. ونبات الزعتر *Thymus vulgaris* ونبات الإكليل *Rosmarinus officinalis* L. والبراعم الزهرية لنبات القرنفل *Syzygium aromaticum* L. على نمو فطر *Aspergillus niger* . تم تنمية الفطر باستخدام الوسط الغذائي Malt Extract Agar عند درجة حرارة 28±2°م، وقد أظهرت النتائج أن المستخلصات المائية للنباتات المستعملة كان لها تأثير متفاوت على نمو الفطر. حيث اظهر المستخلص المائي الساخن لنبات الإكليل عند تركيز 5% أعلى تثبيط للنمو الفطري وبنسبة تثبيط 30.49% يليه نفس المستخلص عند تركيز 10% بنسبة تثبيط 26.90%، ثم المستخلص الساخن لنبات المورينجا عند تركيز 5% بنسبة تثبيط 26.80%، والمستخلص المائي البارد لنبات الإكليل عند تركيز 10% بنسبة تثبيط 17.14 %.

الكلمات الدالة: *Aspergillus niger*، تثبيط النمو، المستخلص النباتي، الأمراض الفطرية.

المقدمة:

ينتمي البصل *Allium cepa* L. إلى العائلة البصلية Alliaceae وهو من المحاصيل الاقتصادية الهامة التي تزرع على نطاق واسع في المناطق الاستوائية والمعتدلة في العالم (كماز وديوان، 2017) وهو نبات عشبي ثنائي الحول يعطي محصول الأبصال في موسم النمو الأول وتتكون البذور في الموسم الثاني ويستخدم البصل في تغذية الإنسان وله العديد من الفوائد الطبية (لهمود ومنحر، 2016) و(Al Babele2016، *et al.*). يصاب البصل بالعديد من الأمراض الفطرية أما في الحقل أو في الحصاد أو أثناء التخزين ومنها مرض العفن الأسود المتسبب عن الفطر (El-Nagerabi, 2004 and Abdalla *Aspergillus niger*) التي تكون ابواغه محمولة بالهواء وينتقل من جزء لأخر عن طريق الاتصال المباشر، ويعد الفطر *A. niger* واحد من أكثر أنواع جنس *Aspergillus* المعروفة التي تسبب العفن الأسود على الثمار والخضار (كماز وديوان، 2017)، إضافة إلى كونه معروف كملوث للطعام كما يصيب البذور إصابات جهازية عندما تكون

* قسم علم النبات/ كلية العلوم/ جامعة الزاوية ah.zaet@zu.edu.ly
* قسم علم النبات/ كلية العلوم/ جامعة الزاوية s.khaleefa@zu.edu.ly

الظروف ملائمة للفطر حيث انه بعد الحصاد يمكن ملاحظة الجراثيم الكونيدية على شكل تجمعات بأعداد كثيفة (السلامي ،2011).

فطر الاسبرجلس *Aspergillus niger* وصفه لأول مرة Tiehem سنة 1767 حيث يكون سطح المستعمرات مغطى بتجمعات كثيفة من الكونيديات السوداء، تتخذ المستعمرة بداية النمو اللون الأبيض وعند اكتمال النمو تتحول إلى اللون الأسود (Emmons *et al.*، 1970). وتشير معظم الدراسات أن لهذه الفطريات القدرة على إنتاج أنواع كثيرة من السموم الفطرية المعروفة بقدرتها على إحداث أمراض كثيرة للإنسان والحيوان (AL-Assaaf *et al.*، 2011) كسرطان الكبد وتوورومات الأجهزة التناسلية والإجهاض والنزف الدموي.

على الرغم من النتائج السريعة والفعالة التي يمكن الحصول عليها نتيجة استخدام المبيدات الكيميائية في مكافحة الأمراض الفطرية إلا أن التوسع في استخدامها قد أدى إلى الإخلال بالتوازن البيئي وظهور سلالات مقاومة من الفطور اتجاه بعض المبيدات الفطرية مما يزيد من التكلفة (Al-Naser and Ezz Aldden, 2014) و(Matloob and Alkiaf, 2015) ويرى اغلب الباحثين أن المبيدات الإحيائية والمستخلصات النباتية لا تقل كفاءة عن المبيدات الفطرية (التريكي والمحيشي،2015) و(AL-Jawhary, 2012) ونظرا لشيوع استخدام النباتات الطبية في الطب الشعبي الليبي فضلاً عن استخداماتها الغذائية ولأن هذه النباتات الطبية غير سامة ومأمونة الاستعمال وليس لها أثار جانبية ضارة وموجودة في البيئة الليبية، فقد اتجهت أنظار الباحثين إلى استخدام المستخلصات النباتية كمضادات للأحياء المجهرية الممرضة ومنها الفطريات ولقلة وجود دراسات محلية سابقة حول استخدام بعض المستخلصات النباتية لتثبيط نمو فطر الأسبرجلس فقد تم إجراء هذه الدراسة التي تهدف إلى:

1. عزل وتعريف فطر *Aspergillus niger* من أبصال نبات البصل المصابة.
2. دراسة تأثير بعض المستخلصات النباتية على النمو القطري لفطر *A. niger*.

المواد وطرق العمل Materials and Methods

أجريت هذه الدراسة بمعامل مركز الصحة الحيوانية بالزاوية في خريف 2020م حيث تم تجميع الأنواع النباتية المستخدمة كمستخلصات في البحث من المنطقة الغربية ومن محلات العطارة واستعملت أجزاء نباتية مختلفة (الجدول 1).

جدول (1) النباتات وأجزائها المستخدمة في الدراسة:

الاسم العربي والإنجليزي	الاسم العلمي	العائلة	العضو النباتي المستعمل
المورينجا Moringa	*Moringa oleifera* Lam.	Moringaceae	الأوراق
الزعتر Thymus	*Thymus vulgaris*	Lamiaceae	المجموع الخضري
الإكليل Rosemary	. *Rosmarinus officinalis* L.	Lamiaceae	الأوراق
القرنفل Clove	*Syzygium aromaticum* L	Myrtaceae	البراعم الزهرية الجافة

عزل الفطر: Isolation of the fungus

تم عزل فطر *Aspergillus niger* من عدة رؤوس من البصل المصاب وذلك من خلال تقطيعها إلى قطع بأبعاد 3*4*4 ملم من حافة العفن ثم تعقيم سطحها بالكحول الإيثيلي بتركيز 70% لمدة دقيقة واحدة وجففت على ورق ترشيح معقم وغسلت بعدها بماء مقطر ومعقم عدة مرات وجففت بشاش معقم، وضعت 5 قطع نباتية في كل طبق بتري يحتوي على وسط غذائي Malt Extract Agar (MEA) المصنع من قبل شركة (oxoid) يحتوي على المضاد الحيوي chloramphenicol 25 ملجم/لتر وذلك بعد تعقيمه في جهاز التعقيم البخاري (Autoclave) على درجة حرارة 121°م وضغط 1جوي لمدة 20 دقيقة، بعدها وضعت الأطباق في جهاز التحضين عند درجة حرارة 28± 2°م لمدة 5-7أيام(Atia and Esh, 2005).

تعريف الفطر: Identification of the fungus

تم تعريف الفطر عن طريق دراسة الشكل الظاهري للمستعمرة وشكل الأبواغ ولونها واستخدام المراجع العلمية المتخصصة (في ذلك Domsh *et al.,* 1980 ، Gilman, 1957).

تحضير مستخلص النبات: Preparation of plant extract

تم استخلاص المكونات النباتية في وسط مائي بارد والساخن، وذلك بغسل الأعضاء النباتية المستخدمة بماء الحنفية لإزالة الغبار والشوائب ثم غسلت بماء مقطر، وجففت في الظل في حجرة لفترة من الوقت حتى تم التخلص من الرطوبة، وتم وزن 20 جرام من كل نبات بعد طحنه في جهاز الطحن ونُقع في 100مل ماء مقطر ومعقم لمدة 24 ساعة، وفي اليوم التالي تم ترشيح المستخلص باستعمال قمع يحتوي على ورقة ترشيح Watman رقم1، ثم رشح مرة أخرى باستعمال مرشح بكتيري 0.22 µm(Restek) وتم الحصول على المستخلص بتركيز 20% (Fawzi *et al.,* 2009).

خطوات العمل:

تم تحضير الوسط الغذائي آجار مستخلص الشعير (MEA) كما ذكر سابقا، وُبرد على حمام مائي درجة حرارته 40 °م، مُزجت المستخلصات النباتية مع الوسط الغذائي MEA قبل أن يتصلب لتحضير التركيز 0.0، 2.5، 5، 10 %، أُجريت هذه الطريقة بثلاث مكررات لكل تركيز، وزع على أطباق بتري قطرها 9 سم حوالي 20 مل لكل طبق ولُقحت الأطباق بلقاح فطري بقطر5 ملم أخذت من حافة مزرعة فطرية عمرها (7) أيام بواسطة ثاقب فلين معقم ووضعت في مركز الطبق وحضنت الأطباق بدرجة حرارة

28±2 °م لمدة (7) أيام، أما معاملة المقارنة Control فاستخدم فيها الوسط الغذائي MEA فقط.

استخدمت المعادلة التالية لمعرفة النسب المئوية للتثبيط من خلال قياس معدل قطرين متعامدين للمستعمرة الواحدة (Iqbal *et al.*, 2004 ,Khalil *et al.*, 2005) كما يلي:

$$\text{النسبة المئوية لتثبيط النمو} = \frac{\text{متوسط قطر منطقة النمو للسيطرة} - \text{متوسط قطر منطقة النمو بوجود المستخلص}}{\text{متوسط قطر منطقة النمو للسيطرة}} \times 100$$

التحليل الإحصائي:

صممت التجربة وفق نظام تصميم القطاعات العشوائية الكاملة (RCBD) بثلاث مكررات. وتم تحليل البيانات باستخدام طريقة MIXED procedure في البرنامج الإحصائي SAS 9.4 لتقدير المتوسط والخطأ المعياري. تم الفصل بين المتوسطات باستخدام باختبار اقل فارق معنوي LSD ($P<0.05$).

النتائج والمناقشة:

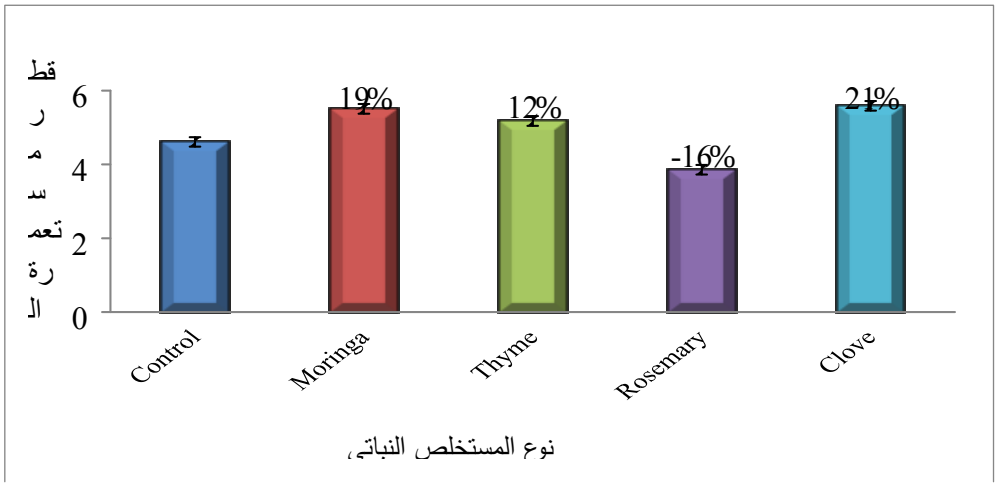
أجريت هذه الدراسة بهدف تقييم تأثير بعض المستخلصات المائية لأوراق نباتات كلا من المورينجا والزعتر والإكليل والقرنفل على النمو القطري لفطر *Aspergillus niger* والذي يصيب نباتات البصل. وأوضحت النتائج وجود تباين في تثبيط النمو الفطري بنسب مختلفة. وقد يعود ذلك إلى اختلاف كمية المواد الفعالة الموجودة في المستخلصات النباتية المختلفة. حيث أظهرت نتائج دراسة التأثير المثبط للمستخلصات المائية الباردة والساخنة لنباتات سابقة الذكر على النمو القطري لفطر

Aspergillus niger تأثير مختلف. حيث كان التأثير معنويا (P<.0001) لكل من نوع المستخلص النباتي والتداخل بين نوع وتركيز المستخلص النباتي بالإضافة إلى تأثير المشترك بين نوع المستخلص النباتي ودرجة الحرارة والتركيز جدول2:

الجدول(2) يبين قيم الاحتمالية للتأثيرات الأساسية والمتداخلة لكلا من نوع المستخلص النباتي ودرجة حرارة المستخلص وتركيزه على نمو الفطر متمثلا في قطر المستعمرة الفطرية (سم).

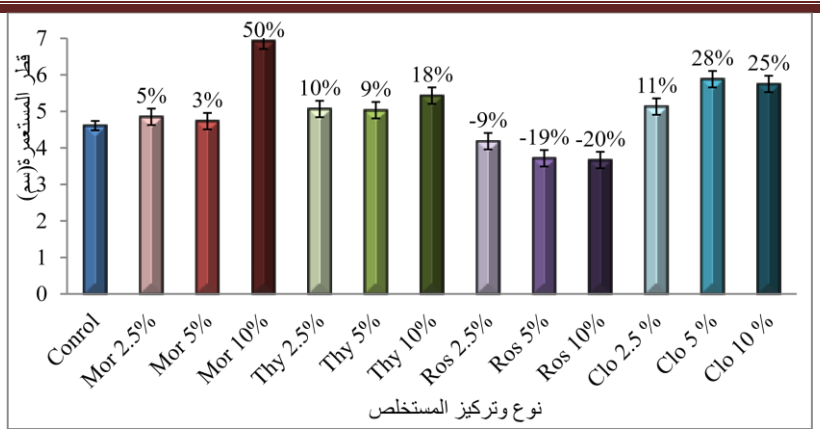
التأثير	قيم الاحتمالية
تأثير نوع المستخلص النباتي	<.0001
تأثير التداخل بين نوع المستخلص النباتي والتركيز	<.0001
تأثير التداخل بين نوع المستخلص النباتي ودرجة الحرارة والتركيز	<.0001

كما أوضحت النتائج أن أقل معدل للنمو القطري لفطر *A. niger* كان باستخدام مستخلص نبات الإكليل حيث كان مستخلص نبات الإكليل الأكثر تأثير في تثبيط نمو الفطر بشكل عام وبنسبة تثبيط 16% مقارنة بالشاهد شكل (1).



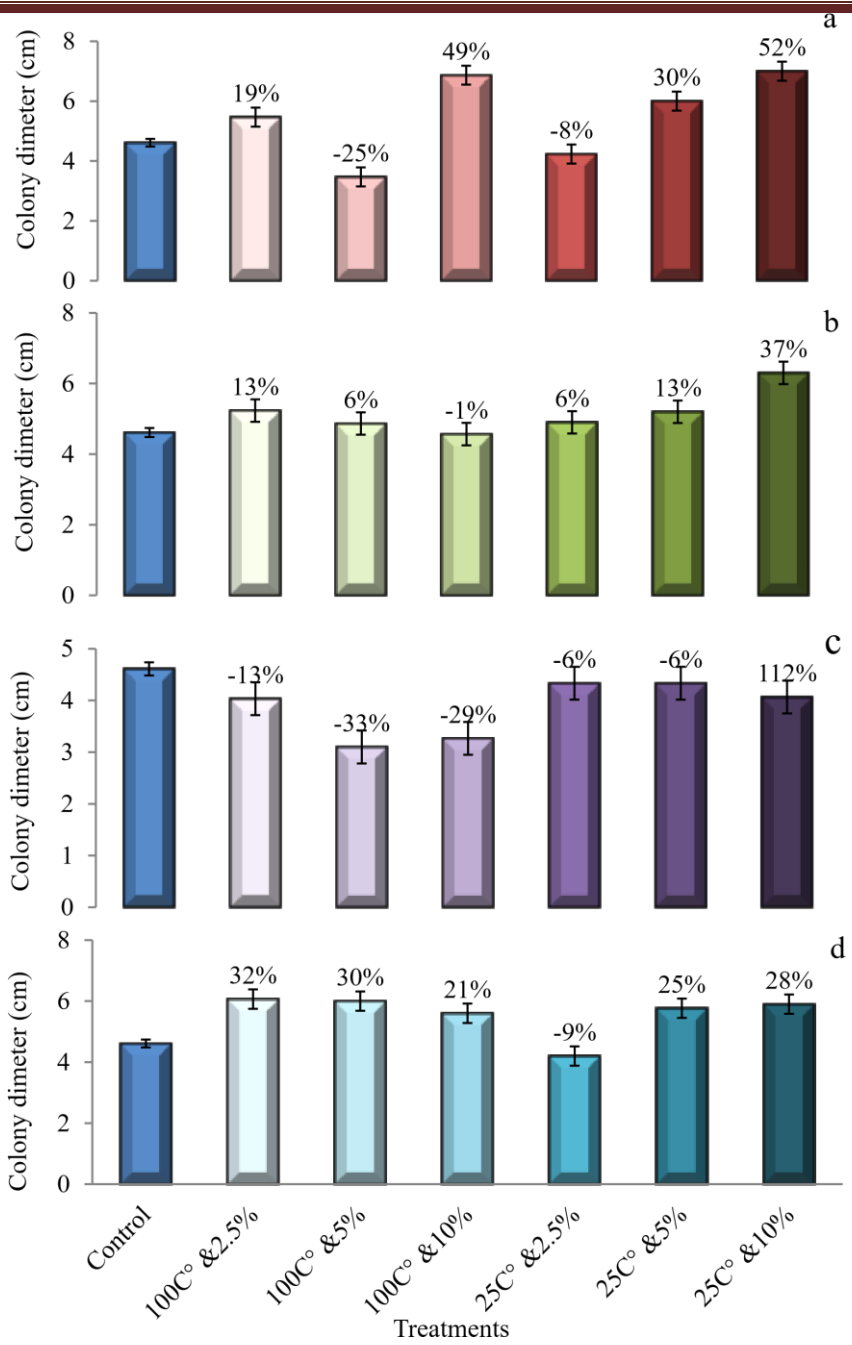
الشكل(1). التأثير الرئيسي لنوع المستخلص النباتي المستخدم. تم حساب متوسط البيانات عبر درجتين للحرارة وثلاثة تراكيز للمستخلص وثلاث مكررات لكل مستخلص ويشير العمود إلى متوسط القيمة والخطوط الرأسية أعلى الأعمدة تشير إلى الخطأ المعياري. تشير النسب المئوية اعلى الأعمدة إلى الزيادة أو النقصان لكل مستخلص مقارنة بالشاهد.

وبينت نتائج هذه الدراسة أن مستخلص نبات الإكليل عند تركيز 10% كان الأكثر فاعلية في تثبيط النمو القطري للفطر تحت الدراسة ويليه عند تركيز 5% ومن ثم عند تركيز 2.5% على التوالي لنفس المستخلص النباتي كما بالشكل (2).



الشكل (2). التأثير المشترك لكل من نوع المستخلص وتركيز المستخلص النباتي المستخدم. تم حساب متوسط البيانات عبر درجتين للحرارة وثلاثة تراكيز للمستخلص وثلاث مكررات لكل مستخلص ويشير العمود إلى متوسط القيمة والخطوط الرأسية أعلى الأعمدة تشير إلى الخطأ المعياري. تشير النسب المئوية اعلى الأعمدة إلى الزيادة أو النقصان لكل مستخلص مقارنة الشاهد.

كما أظهرت النتائج المتحصل عليها في هذه الدراسة أن مستخلص نبات المورينجا عند تركيز 5% ودرجة حرارة 100°م يليه التركيز 2.5% عند درجة حرارة 25°م كان له تأثير سلبي على النمو القطري لفطر *A. niger* شكل(3a). بينما مستخلص الزعتر المحضر عند درجة حرارة 100 °م وتركيز 10% كان له تأثير على معدل النمو القطري للفطر بنسبة -1% وهذه النتيجة تتفق مع دراسة سابقة (الفلاح، 2020) والتي أشارت إلى أن المستخلص المائي الساخن لنبات الزعتر له تأثير مثبط لفطر *A. niger* كما أن نتائج هذه الدراسة أكدتها دراسة مماثلة (ابوزخار واحسي، 2019) والتي أشارت بوجود تأثير تثبيطي لمستخلص نبات الزعتر على نمو فطر *Cladosporium* spp. شكل (3b). كذلك أشارت النتائج إلى أن مستخلص نبات الإكليل المحضر عند درجة حرارة 100°م وتركيز 5% كان الأفضل في تثبيط معدل النمو القطري بنسبة -33% يليه التركيز 10% بنسبة -29%، بينما التركيز 5، 2.5% ودرجة حرارة 25°م كان الأقل في تثبيط نمو الفطر لنفس المستخلص ويرجع التأثير التثبيطي لمستخلص الإكليل لوجود الفلافونيدات والتانينات المضادة للميكروبات كالفطريات والخمائر (خذارن، 2019) شكل (3c) .



الشكل(3). التأثير المشترك لكل من نوع المستخلص (a) الموارينجا، (b) الزعتر، (c) الإكليل، (d) القرنفل ودرجة الحرارة أثناء تحضير المستخلص وتركيز المستخلص النباتي المستخدم. تم حساب متوسط البيانات عبر درجتين للحرارة وثلاثة تراكيز للمستخلص وثلاث مكررات لكل مستخلص ويشير العمود إلى متوسط القيمة والخطوط الرأسية أعلى الأعمدة تشير إلى الخطأ المعياري. تشير النسب المئوية أعلى الأعمدة إلى الزيادة أو النقصان لكل مستخلص مقارنة بالشاهد.

كما أشارت الدراسة إلى أن مستخلص نبات القرنفل المستخلص عند درجة حرارة 25°م وتركيز 2.5% كان له تأثير مثبط على نمو الفطر *A. niger* حيث انخفض معدل النمو القطري للفطر بنسبة -9% مقارنة بالكنترول وتطابقت نتائج هذه الدراسة مع نتائج دراسة سابقة (الساعدي وآخرون، 2013) والتي أشارت إلى أن المستخلص المائي البارد لنبات القرنفل له تأثير مثبط على نمو فطر *Aspergillus flavus* وكذلك تتفق مع نتائج دراسة حديثة على أنواع فطرية أخرى من نفس

الجنس الفطري (الفلاح، 2020) والتي أوضحت أن مستخلص نبات القرنفل عند تركيز 2% له تأثر مثبط لنمو فطر *Aspergillus* sp، بينما باقي المعاملات كانت لها تأثير محفز على معدل النمو القطري للفطر شكل(3d).

كما تم حساب نسبة التثبيط لكل المعاملات المشار إليه بالجدول (3) حيث كان أعلى تثبيط بنسبة 30.43% عند تركيز 5% يليه 26.90% عند تركيز 10% لمستخلص نبات الإكليل الساخن، يليه مستخلص المورينجا الساخن بنسبة تثبيط 26.80% عند تركيز 5%، كما كان المستخلص البارد لنبات الإكليل عند تركيز 10% له تأثير مثبط بنسبة 17.24% يليه 14.80% لمستخلص نبات القرنفل البارد عند تركيز 2.5%.

جدول (3) تأثير معاملات المستخلصات النباتية وتركيزاتها على نسبة تثبيطها لفطر *Aspergillus niger*

نوع المستخلص	control	%2.50	%5	%10	المتوسط
مورينجا ساخن	0	%15-	%26.80	%45.03-	8.3-
مورينجا بارد	0	%11.20	26.84-	%47.99-	15.9-
زعتر ساخن	0	10.57-	%2.74-	%3.59	2.43-
زعتر بارد	0	%2.08-	%8.33-	%31.25-	10.41-
إكليل ساخن	0	%9.64	%30.49	%26.90	16.75
إكليل بارد	0	%11.63	%11.63	%17.14	10.1
قرنفل ساخن	0	31.73-	30.43-	%21.73-	20.97-
قرنفل بارد	0	%14.80	16.83-	%19.67-	5.42-
المتوسط	0	%2-	%2.03-	%14.76-	4.5725-

الخاتمة:

هدفت الدراسة إلى اختبار تأثير المستخلصات المائية الساخنة والباردة لأوراق كلا من نبات المورينجا ونبات الزعتر ونبات الإكليل والبراعم الزهرية لنبات القرنفل على نمو القطري لفطر *Aspergillus niger* في الوسط المغذي Malt Extract Agar. وقد بينت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروقات معنوية بين مستخلصات النباتات في تأثيرها على النمو القطري للفطر. حيث بينت النتائج وجود اختلاف في فعالية المستخلصات النباتية وتثبيطها لنمو الفطر مقارنة بالشاهد. حيث بلغت أعلى نسبة تثبيط30.49% و26.90% عند استخدام مستخلص نبات الإكليل، يليها 26.80% عند استخدام مستخلص نبات المورينجا. وقد يعود السبب في الفعل التثبيطي للمستخلص المائي لهذه النباتات على النمو الفطري إلى احتواء المستخلصات المائية لنباتات على مركبات كيميائية تعمل كمضادات فطرية. وتوصي هذه الدراسة بإجراء كشف لتحديد طبيعة وتركيب المواد الفعالة لهذه النباتات.

المراجع:

1. ابوزخار، فرحات علي؛ احسي، رمضان سالم أحمد (2019). دراسة تأثير بعض المستخلصات النباتية المائية على نمو بعض الفطريات المرافقة لبذور القمح *Triticum aestivum* مخبريا. المجلة الدولية للعلوم والتقنية. 19:1-27.

2. السلامي، انتصار عبدالحميد (2011). الفعالية التضادية لمستخلص الكحول الإثيلي لأوراق نبات فرشة البطل *Callislemon rugulosus* في فطر *Aspergillus niger*. مجلة الفرات للعلوم الزراعية، 3(1): 95-103.

3. التريكي، فوزية؛ المحيشي، فتحية (2015). تأثير مستخلص المائي نبات النعناع على نمو فطر *Aspergillus niger*. الندوة الثانية حول نظريات وتطبيقات العلوم الأساسية والحيوية.

4. الساعدي، هادي علوان محمد؛ الكرطاني، ياسر موفق؛ الزبيدي، نجم عبدالله (2013). تأثير المستخلصات النباتية الخام لنباتات القرفة والقرنفل والزعتر على نمو عزلة الفطر *Aspergillus flavus* المنتجة للافلاتوكسين B1. مجلة ديالي للعلوم الزراعية، 5(2): 593-602.

5. الفلاح، هناء ونيس (2020). تقدير كفاءة بعض المستخلصات النباتية على نمو بعض الفطريات الممرضة لبذور الفاصوليا. مجلة التربوي. 17: 4- 22.

6. خذران، هناء (2019). تأثير المذيب في استخلاص المركبات الفينولية من نبات إكليل الجبل *Rosmarinus officinalis* رسالة ماجستير. جامعة قاصدي مرباح ورقلة-الجزائر.

7. كماز، برير أحمد ناصر؛ ديوان، مجيد متعب (2017). تأثير بعض عزلات الفطر Aspergillus niger على تعفن أبصال البصل Onion (Allium cepa L.) ومقاومتها بالمستخلص المائي الحار للزنجبيل Ginger. مجلة الكوفة للعلوم الزراعية. 9(4): 181-199.

8. لهمود، ولاء ياس؛ منحر، لمى فؤاد (2016). عزل وتشخيص الفطريات المصاحبة لنمو البصل بأنواعه الأبيض والأصفر والأخضر والأحمر المزروع في المناطق المحيطة بمحافظة القاديسية. Microbioloy Classification .QR 1-74.5

9. **AL-Assaaf, S. T., AI-Nuaymi, A. S. H.,and Mohammed, S. E. (2011).** The Inhibitory effect of some medicinal plants extracts in fungus *Aspergillus niger* مجلة أبحاث كلية التربية الأساسية 10(4).

10. **AL-Babele, R.; Trabi, B. A.; Jabour, M. and Morashed, R. (2016).** Effect of foliar sprayingwith some natural extracts and GA_3no the growth and seed production of onion (Allium cepa L.) Damascus University Journal of Agricultural Sciences32(1): 185-200.

11. **AL-Jawhary, I. F. H. (2012)**. Effect of Acetone extracts to some plants on barley seeds –born Fungi in Musrata city, J. of Thi _Qar Univ. Research, 1(2):191-206**.**

12. **Al-Naser, Z. A. and Ezz Aldden, D. (2014).** Activity of some plant extracts against Alternaria alternata & Fusarium oxysporum and compared with fungicides in vitro. Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies – Biological Sciences Series, 36(3): 31-46.

13. **Atia, M. M. M. and Esh, A. M. H. (2005).** Role of biotic and a bioticagents on controlling alternaria fruit rots of tomato and pepper. Annals Agric. Sci. Moshtrhor, 43 (4): 1423-1440, Egypt.

14. **Domsh, H. H.; Gams, W. and Anderson, T. (1980).** Compendium of soil fungi. Academic Press, London, (PP.859).

15. **El-Nagerabi, S. A. F. and Abdalla, R. M. O. (2004).** Survey of seedborne fungi of Sudanese cultivars on onion, with new records. Phytoparasitica, 32(4): 413-416.

16. **Emmons, C. W., Binford, C. H. and Utz, J. P. (1970).** Medical Mycology. Second ed., Lea and Febiyer Philadelphia, U. S. A.

17. **Fawzi, E. M.; Khalil, A. A. and Afifi, A. F. (2009).** Antifungal effect of some plant extract on *Alternaria alternata* and *Fusarium oxysporum.* African J. Biotechnol., 8 (11): 2590 - 2597.

18. **Gilman, J. C. (1957).** A manual of soil fungi. Iowa State Univ. Press, Ames, Iowa, USA, (PP.450).

19. **Iqbal, M. C. M.; Jayasinghe, U. L. B.; Herath, H. M. T.; Wijesekara, K. B. and Fujimoto, Y. (2004).** A fungistatic chromene from *Ageratum conyzoides* . Phytoparasitica, 32: 119.

20. **Khalil, A. B.; Dabaneh, B. F. and Anfoka, G. H. (2005).** Antifungal activity of medicinal plants from Jordan environemental. Plant Pathology, 4: 130.

21. **Matloob, A. A. H. and Alkaif, M. A. I. K. (2015)**. Isolation and identification of some Fungi caused Broad bean root and crown root disease by some plant extracts and Bioagents *Trichoderma viride* in. مجلة كربلاء للعلوم الزراعية. 2(4): 88-114.