مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (30) العدد (2) 2008
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (30) No. (2) 2008

دراسة الفعالية المضادّة للفطريات لخلاصات مختلفة للفطر *Lactarius sp.* تجاه بعض الفطريّات الممرضة

الدكتورة ميساء يازجي*
راميا سعود**

(تاريخ الإيداع 24 / 1 / 2008. قبل للنشر في 2008/3/10)

□ الملخّص □

تم اختبار الفعالية المضادة للخلاصات الإيتانولية والميتانولية والمائية للنوع *Lactarius sp.* تجاه الأنواع الفطرية المجهرية الممرضة الآتية:

(Trichophyton mentagrophytes,T.rubrum, Epidermophyton floccosum, Fusarium oxysporum, Botrytis cinerea, Aspergillus niger,Candida albicans).

بينت نتائج البحث أنّ الخلاصتين الميتانولية والايتانولية ذات فعالية تثبيطية عالية تجاه معظم الفطريات المختبرة، بينما كانت الخلاصة المائية أقلّ الخلاصات فعالية. أثرت الخلاصات الثلاث في تثبيط نمّو النوع *Trichophyton mentagrophytes* بشكل واضح ، وبالتركيز (8 mg / ml) وبأقطار تثبيط تراوحت بين (3-20mm)، بينما ثبطت الخلاصتين الإيتانولية والميتانولية فقط نموّ النوعين *Aspergillus niger , Botrytis Cinerea* ، وكانت جميع الأنواع الأخرى المختبرة مقاومة لجميع الخلاصات، كما اختلفت الخلاصات الثلاث بتناقص أو فقدان فعاليتها بعد المعاملة بدرجتي الحرارة 60^oC و 100^oC.

الكلمات المفتاحية: الفطر *Lactarius sp.* – الفعالية الصادية للفطريات– الخلاصات الإيتانولية والميتانولية والمائية– الفطريات المجهرية.

* أستاذ مساعد – قسم النبات– كلية العلوم– جامعة تشرين– اللاذقية– سورية.
** طالبة دراسات عليا(دكتوراه)– قسم النبات-- كلية العلوم –جامعة تشرين– اللاذقية– سورية.

مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (30) العدد (2) 2008
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (30) No. (2) 2008

A Study of Anti-fungal Effectiveness of Different Extracts of *Lactarius sp.* against some Pathogenic Fungi

Dr. Maysa Yaziji *
Ramia Saoud **

(Received 24 / 1 / 2008. Accepted 10/3/2008)

□ ABSTRACT □

In this study, we have tested the effectiveness of three extracts (Ethanol, Methanol, aqueous) of Mushroom, *Lactarius sp.* against the following pathogenic microfungi *(Trichophyton mentagrophytes,T.rubrum, Epidermophyton floccosum, Fusarium oxysporum ,Botrytis cinerea, Aspergillus niger, Candida albicans).*The results show that Methanolic and ethanolic extracts have a higher inhibitory effectiveness against most of the tested fungi, while the aqueous extract is the least effective of all. The three extracts have clearly trigerred inhibiting the growth of such a species as *Trichophyton mentagrophytes*; in concentration (8 mg/ml) with inhibitory diameters ranging between 3 and 20mm, While the Ethanolic and Methanolic extracts have inhibited only the species *Aspergillus niger* and *Botrytis cinerea;* all other tested species have resisted all the extracts. The three extracts differ in the decrease or loss of their effectiveness after being exposed to temperatures ranging between ($60^{o}C$) and ($100^{o}C$).

Keywords: *Lactarius sp,* antibiotic activity, Ethanolic and Methanolic, aqueous, extracts, microfungi

* **Associate Professor, Department of Botany, Faculty of Science, Tishreen University Lattakia, Syria.**
****Postgraduate Student, Department of Botany, Faculty of Science, Tishreen University Lattakia, Syria.**

مقدمة:

تميز القرن العشرين بإنجازات مهمّة في دراسة المواد الفعالة بيولوجياً من أصل نباتي،وكان لاستخدام الفطريات الراقية في هذا المجال أثرٌ كبيرٌ في توسيع مجال اكتشاف المركبات الفعالة، حيث تم عزل عدد من المركبات المتنوعة في البنية وطريقة التأثير (Belova,2001).

ومع تطوّر الأبحاث في العقدين الماضين تمّ عزل وتحديد هوية عدد من المواد الاستقلابية الفعالة بيولوجياً مثل الصادات الحيوية وبعض الأنزيمات ومواد حيوية أخرى من الفطريات، حيث تملك هذه المواد خواص مضادة للأحياء الدقيقة (فطريات، جراثيم،فيروسات) والطفيليات، ومضادة للالتهاب والأكسدة، ومدّرة للبول، ومقوّية للكبد والقلب، ومحفّزة للجهاز المناعي ومضادة لبعض الأورام.

تمثلّ الدعاميات، سواء الجسم الثمري أو المشيجة، مخزوناً كبيراً غير مدروس لعددٍ من المركّبات المضادة للأحياء الدقيقة. فقد تمت دراسة خلاصات (204) نوعاً من الدعاميات، جمعت من إسبانيا وتبين أنّ خلاصات (109) نوعاً منها ذات فعالية مضادة للميكروبات (Werner,2004;Laborde *et al*,1999).

وقد بيّنت دراسة Suay *et al.*, (2000) بأنّ الفطريات الصفائحية من رتبة (*Agaricales*) تضم أنواعاً تنتج مواد مضادة للفطريات أكثر من تلك للفطريات المسامية، بالإضافة إلى ذلك فإن العديد من الأنواع الصفائحية مثل: *Agaricus bisporus , Lentinus edodes , Rhodopaxillus nudus* وأنواع تابعة لأجناس الـ *Lactarius* و *Russula* تحوي صادات حيوية ذات تأثيرات مضادة فيزيولوحياً للفطريات والفيروسات والجراثيم والأورام (Gbolagade and fasidi, *et al*.,2005;stamets,2002).

إنّ ظاهرة إفراز المضادات الحيوية من قبل عدد من الفطريات الدعامية المشكلة للميكوريزا في التربة معروفة منذ زمن بعيد (Nonis,1982;Seymour,1978)، وهي تؤكّد امتلاك هذه الفطريات لمركّبات تمنع نمو كثيرٍ من الأحياء الدقيقة الممرضة للنباتات ، فقد بينت بعض الدراسات أنّ بعض الأنواع مثل:

Laccaria laccata,Paxillus involuts تنتج صادات حيوية تمنع نمو الفطر *Fusarium Oxysporum* المسبب لعفن شتلات الصنوبر (Duchesne *et al.*,1988;*Sampangi et al.*,1986) أيضاً ويظهر أنّ الفطر *Hebeloma crustuliniform* يفرز مواد طيارة تثبط نمو الفطر *Pythium ultimum* (Perrin,1983) وبشكل عام فإنّ دراسة فعالية الخلاصات النباتية والزيوت الأساسية المستخلصة من نباتات راقية ضد نمّو الفطريات الخيطية وخاصة الجلدية قد تمّت في أبحاث سابقة متعدّدة (souza *et al.*,2003; yaziji,1993; lima *et al.*,1993).

ولكن تبقى الأبحاث التي تهدف لدراسة فعالية الفطريات القبعية ضد الفطريات الخيطية الجلدية قليلة ومحدودة مقارنةً مع الدراسات التي تمت على الجراثيم وخاصة بالنسبة لأنواع الـ *Lactarius*
(Gezer *et al*.,2006;Gbolagade and fasidi, 2003;vidari *et al*.,1995)

أهميّة البحث وأهدافه:

ينتشر في مناطق مختلفة من الساحل السوري أنواع متعدّدة تابعة للجنس *Lactarius* (سعود،2003)، يوجد بعضها في بيئات متنوعة وبكميات كبيرة، ولم تتم أيّ دراسة عليها من قبل، مثل النوع *Lactarius sp*. والذي يمكن أن يكون مصدراً للعديد من المركبات المضادة للأحياء الدقيقة ومنبعاً لمواد تفيد في نواح كثيرة، لهذا فقد هدف

1- الحصول على خلاصات كحولية (إيتانولية وميتانولية) ومائية من الأجسام الثمرية الكاملة للفطر القبعي *Lactarius sp.* .

2- دراسة الفعالية المضادة للفطريات للخلاصات وتأثيرها على نمّو بعض الفطريات الممرضة للإنسان والحيوان والنبات وبتراكيز مختلفة.

3- تحديد مدى ثبات فعالية الخلاصات بعد تعريضها لدرجات حرارة مختلفة وبفترات زمنية مختلفة.

4- تحديد الخلاصات الأكثر تأثيراً من ناحية، وتحديد أنواع الفطريات الممرضة الأكثر حساسية من ناحية أخرى.

موادّ البحث وطرائقه:

أولاً: عينات الفطر *Lactarius sp.*

تم جمع الأجسام الثمرية للفطر الدعامي *Lactarius sp.* صورة (1) بكميات كافية لتحضير الخلاصات في الفترة الواقعة بين (2006-2004) من بعض مناطق الساحل السوري(حقول الزيتون) ذكرت في بحث سابق (سعود، 2003) وتمّ إحضارها إلى المختبر (في قسم البيولوجيا-كلية العلوم) لإجراء الدراسة عليها.

صورة(1)

ثانياً: الأنواع الفطرية المختبرة:

لدراسة الفعالية الصادية لمستخلصات الفطر *Lactarius sp.* استخدمنا بعض الفطريات الممرضة الجلدية *Trichophyton mentagrophytes, T.rubrum, Epidermophyton floccosum*

بالإضافة إلى الـ *Candida albicans* حيث تم الحصول عليها من مشفى الأسد الجامعي باللاذقية_ بالإضافة إلى الفطريات الممرضة على النباتات؛ وهي *Botrytis Cinerea, Fusarium oxysporum* التي تم

الحصول عليها من مختبر الوقاية_ كلية الزراعة_ جامعة تشرين _ وكذلك استخدمنا الفطر *Aspergillus niger* الذي يعدّ من أكثر فطريات العفن انتشاراً ويسبب أمراضاً متعدّدة.

ثالثاً: أوساط الزراعة المستخدمة:

تم استخدام الأوساط الآتية لزراعة الأحياء الدقيقة:

أ- وسط Sabouraud لزراعة الفطريات الجلدية و *Candida albicans* و *Aspergillus niger*.

ب- وسط PDA لزراعة الفطريات الممرضة النباتية.

رابعاً: تحضير الخلاصات الفطرية:

تم إضافة (150 mL) ايتانول وميتانول وماء مقطر معقم بشكل منفصل إلى (15 g) بودرة فطر مجفف بالهواء ومسحوق بشكل مسبق، وتركت مغطاة في الظل بدرجة حرارة المختبر لمدة (7 أيام) بالنسبة للخلاصتين الإيتانولية والميتانولية ولمدة (72 ساعة) بالنسبة للخلاصة المائية، ثم رشّحت الخلاصات وبشكل منفصل بأوراق ترشيح (watmann l)، وبعد ذلك جفّفت الرشاحة حتى حصلنا على عجينة لينة القوام (Gbloagade and fasidi,2003) تم حفظها في البّراد لحين إجراء الاختبارات عليها.

خامساً: تقدير الفعالية المضادة للفطريات للخلاصات الفطرية:

استخدمنا الماء المقطّر المعقّم كمخّفف،حيث تمّ حلّ كلّ خلاصة على حده فيه ، واستخدمنا طريقة التخفيف بالآغار للفطريات الخيطية (*T.mentagrophytes* ، *T.rubrum* ، *E.floccosum* ، *F.oxysporum* ، *B.cinerea* ، *A.niger*). تم تحضير محلول أمّ وأُخذت كميات مختلفة منه وأُضيفت إلى وسط الزراعة في الدرجة ($45^{\circ}C$) قبل التصلب للحصول على تراكيز نهائية في الأطباق تعادل (1,2,4,8,16mg/mL)، ثم تركت الأطباق لتبرد ، بعدها زرعت بالفطريات الممرضة بواسطة إبرة زراعة معقمة.

تم إجراء بعض الأطباق الشاهدة التي زرعت بالفطريات فقط بمعزل عن الخلاصات، حضنت الأطباق بالدرجة (28^0C) وقرئت النتائج بعد تمام نمو الشاهد، وسجلت أقطار النمو بالميليمتر، وتم حساب قطر التثبيط بناءً على الفرق بين أقطار المستعمرات الشاهدة والمعاملة بالخلاصات.

أما بالنسبة للفطر *C.albicans* فقد استخدمنا طريقة ثقب الآغار (pelczar *et al.*, 1972) حيث تم حفر ثقوب بقطر 5mm في الوسط الملقح بالفطر والمتصلّب بشكل مسبّق، بعد ذلك حقنت هذه الثقوب بكميات مختلفة من الخلاصات وذلك للحصول على التراكيز، ثم تركت الأطباق في درجة حرارة الغرفة لتجفّ الخلاصات وحضنت بالدرجة (28^0C) وقرئت النتائج بعد (48 ساعة).

سادساً: تأثير درجة الحرارة على فعالية الخلاصات المثبطة لنمو الفطريات :

اختبرنا تأثير الدرجة (60^0 C) والدرجة(100^0C) ،حيث وضعنا الخلاصات الفعالة، سواء أكانت كحولية أم مائية، في حمام مائيّ ساخن بدرجة (60^0 C) لمدّة $\frac{1}{2}$ ساعة، ولمدّة (5 دقائق) في الدرجة (100^0C) ثم أجرينا اختبار الفعالية على الأنواع التي أبدت حساسية تجاه هذه الخلاصات بالطريقة المذكورة سابقاً (Hirasawa *et al.*,1999).

النتائج والمناقشة:

1- فعالية الفطر *L.sp.* تجاه الفطريات الممرضة المختبرة:

ينتمي الفطر *L.sp.* المستخدم في بحثنا هذا إلى فصيلة *Russulaceae* المتميزة بإعطاء سائل حليبي عند الخدش أو الجرح، وهو من الأنواع المنتشرة بكثرة برياً في الغابات السنديانية والصنوبرية في الساحل السوري، كما شوهد بكميات كبيرة في حقول الزيتون في مناطق مختلفة من الساحل (سعود،2003).

إن دراسة فعالية الخلاصات المائية والكحولية للفطر *L.sp.* على بعض الفطريات المجهرية التي تمّت في هذا البحث، بيّنت وجود تأثير واضح لبعض هذه الخلاصات على نمو بعض هذه الفطريات.

لقد اختلفت حساسية الفطريات المختبرة تجاه الخلاصات المختلفة (جدول2) وكان الفطر *T.mentagrophytes* الوحيد الذي أبدى حساسية تجاه الخلاصات جميعها، التي بلغت حدّها الأعظمي في التركيز (8mg/mL)، وكانت الخلاصة الميتانولية الأكثر فعالية وبلغ قطر التثبيط (الفرق بين قطري المستعمرتين) في هذا التركيز الأخير (20mm) لوحة (1) بينما بلغ قطر التثبيط مع كلّ من الخلاصة الإيتانولية والمائية (3mm,19mm) على الترتيب.

يعدّ النوع *T.mentagrophytes* مسؤولاً عن عددٍ من الأمراض الجلدية على الجلد الأجرد وفروة الرأس وأشعار الذقن،والأظافر، التي تصيب الإنسان والحيوان على حدّ سواء وقد تّبين لنا في دراسة سابقة لتحديد الفعالية الصادية للخلاصات المائية لبعض الفطريات الدعامية ضدّ بعض الأحياء الدقيقة في الزجاج (يازجي وسعود،2007) أن الخلاصات المائية لكلّ من فطريّ *Omphaletus oleaerius* و *Coprinus micaceus* تؤثّر على نمو هذا الفطر الجلدي وبتراكيز ضعيفة تبدأ من (1mg/mL) بالنسبة لـ *C.micaceus* كما بين (Rosa *et al.*,2003) أنّ المضادّ الفطري *Phellinsin A* المستخلص من الفطر *Phellinus sp.* قادر على تثبيط نمو *T.mentagrophytes* بوضوح مّما يدلّ على وجود عدد من المركّبات والمضادات المستخلصة من أنواع متعدّدة من فطريات قبعية مختلفة وتنحل بمحلات مختلفة(ماء أو ايتانول أو ميتانول) تؤثر على نمو هذا الفطر الجلدي.

بالمقابل، لم يكن لأيّ من خلاصات الفطر القبعي *L.sp.* أيّ تأثير على نمّو الفطريات الجلدية الأخرى المختبرة (*E.floccosum, T.rubrum*) وعلى *C.albicans* جدول (1)، ولكن هذا لايعني أنّ هذا الفطر لا يحوي مركّبات تؤثر على نمّو هذه الفطريات؛ لأنه ربّما خلاصات بمحلات أخرى لهذا الفطر تستطيع استخلاص مركّبات تملك فعالية مثبطة لنمو هذه الفطريات الجلدية، ويمكن مقارنة هذا مع تأثير خلاصات لفطرّيات قبعية مختلفة على نمّو بعض الفطريات الجلدية الأخرى التابعة لجنس البويغاء (*Microsporum*)، حيث بيّنت إحدى الدراسات *Gbolagad and fasidi* ,2005)أنّ الخلاصات الميتانولية للفطر *Daedalea elegans* والفطر *Tricholoma iobayens* لم تثبّط نمّو النوع *M.canis* حتّى في تراكيز عالية تصل إلى 20mg/mL بينما تبيّن أنّ الخلاصة الإيتانولية للفطر القبعي *Lycoperdon gigantum* تثبط نمو النوع *M.boulardi* بشكل كبير وبقطر تثبيط يصل إلى(17mm)، أمّا الخلاصة الميتانولية للفطر القبعّي نفسه فكان تأثيرها ضعيفاً وقطر التثبيط لم يتجاوز (5mm) بينما لم يلاحظ أيّ تأثير للخلاصة المائية لهذا الفطر على الفطر الجلدي نفسه.

كما ويمكن مقارنته مع تأثير بعض خلاصات النبات *Hyptis ovalifolia* على بعض الفطريات الجلدية (*Souza et al.*,2003)، فقد وجد الباحثون أنّ الخلاصات المائية لهذا النبات لم تكن فعّالة تجاه *T.mentagrophytes* و*T.rubrum* بينما كانت الخلاصة الميتانولية والزيوت الأساسية لهذا النبات ذات فعالية واضحة و بتراكيز منخفضة جداً تجاه الفطر *T.rubrum* كذلك تملك أنواع *Oudemansilla*

(*O.radicata,O.mucida*) مركّبات فعّالة حيوياً قادرة أن تثبط نمّو الفطريات الجلدية بأجناسها الثلاثة *Microsporum,Epidermophyton,Trichophyton* وتقتل *C.albicans* (Rosa *et al.*,2003) مّما يدلّ على أنّ الفعالية المضادة للفطريات القبعية تجاه الفطريات الجلدية تختلف باختلاف الفطر القبعي والمحلاّت المستخدمة للاستخلاص من جهة، وباختلاف الفطر الجلدي المختبر من جهة أخرى.

أما بالنسبة إلى الفطريات الأخرى فقد تبين بأنّ الخلاصات الكحولية فقط للفطر *L.sp.* تثبط نمو كل من *A.niger,B.cinerea* ، بينما لم تبد الخلاصة المائية أيّ تأثير على هذين الفطرين، وكان التأثير الأكبر للخلاصات الكحولية في التركيز (8mg/ml) أيضاً جدول (2)، حيث قدرت أقطار تثبيط نمّو الفطر *B.cinerea* بـ (15mm) و(7mm) مع وجود الخلاصتين الإيتانولية والميتانولية على الترتيب، بينما وصلت أقطار تثبيط نمو الفطر *A.niger* إلى (9mm) و(13mm) بوجود نفس الخلاصتين لوحة (2) وقد توافقت نتائجنا هذه مع نتائج Gbolagade and fasidi, (2003) حيث يبّين أنّ نمّو الفطر *A.niger* يتأثر بشكل واضح بالخلاصات الكحولية (إيتانولية وميتانولية) للفطر القبعي *Lycoperdon Pusilum* بينما لم يكن للخلاصة المائية أيّ فعالية تجاه هذا الفطر .

هذا وقد كانت الخلاصة الميتانولية للفطر *L.sp.* ذات فعالية أكبر من تلك للإيتانولية تجاه الفطر *A.niger* (جدول2) وذلك على عكس ما وجد Gbolagade and fasidi(2003) مع الخلاصات الكحولية للفطر *L.pusilum* ولكن على الرغم من أن نمو الفطر *A.niger* قد تثبّط بوجود الخلاصات الكحولية لـ*L.sp.* إلّا أنّ تبوغه قد ازداد بشكل ملحوظ في الأطباق المعاملة بهذه الخلاصات حيث لاحظنا تشكل أبواغ سوداء داكنة بغزارة وكثافة كبيرة في هذه الأطباق مقارنة مع الشاهد لوحة(2) (صورة 3−4) وكان الباحثون Kim *et al* (2001) قد حصلوا على نتيجة مشابهة عندما درسوا تأثير المركّب 20(2g)-Lupen-3-one المستخلص من النوع *Daedalea Tricolor* على الفطر*A.niger* ،وباعتقادنا ربما تعود هذه الظاهرة إلى شكل من أشكال مقاومة هذا الفطر لتأثير المضادات ومثبطات النمو المختلفة التي يخضع لها، أو يمكن أن تكون الخلاصة منشطة لعملية التبوغ.

أما فيما يتعلق بالفطرين *C.albicans* و*F.oxysporum* فقد تبين أنهما مقاومان لجميع خلاصات الفطر *L.sp.* المدروسة في هذا البحث ،ولم يتأثر نموهما بهم بل على العكس كانت الخلاصة المائية محفّزة لنمّو الفطر *F.oxysporum* في حين بيّن (جهار) في دراسته (2005) بأنّ الخلاصة النقية لصفائح الفطر الدعامي *pleurotus ostreatus* ثبطت نمو النوع *F.oxysporum* بقطر تثبيط(17mm) بينما لم تتمكن خلاصة الأجسام الثمرية للفطر الدعاميّ نفسه من تثبيط نموه. وقد توافقت نتائجنا هذه مع نتائج عددٍ من الدراسات التي بيّنت أنّ النوع *C.albicans* ، بشكل خاص، مقاومة للعديد من مركّبات وخلاصات عدد من الفطريات القبعية

(Gezer *et al.*, 2006;2005، جهار ;Souza paccola *et.*,2001)

الجدول (1) يبين فعالية خلاصات النوع*Lactarius sp* تجاه الفطريات الممرضة المختبرة:

الفطريات المختبرة	الخلاصة الإيتانولية	الخلاصة الميتانولية	الخلاصة المائية
Trichophyton mentagrophytes	+	+	+
T. rubrum	.	.	.
Epidermophyton floccosum	.	.	.
Fusarium oxysporum	.	.	.*
Botrytis Cinerea	+	+	.
Aspergillus niger	+*	+*	.
Candida albicans	.	.	.

+ : فعال ، – : غير فعال. .* : منشط للنمو ، +* : فعال و محفز للتبوغ

الجدول (2) يبين أقطار التثبيط للفطريات الممرضة المثبطة مقدّرة بـ mm مقارنة مع متوسط قطر نمّو الشاهد

التركيز / الفطريات المختبرة	أقطار التثبيط للفطريات الممرضة المثبطة مقدرة بـ mm															متوسط قطر نمو الشاهد
	خلاصة إيتانولية							خلاصة ميتانولية			خلاصة مائية					
	1	2	4	8	16	1	2	4	8	16	1	2	4		16	
T.mentagrophytes	8	8	12	19	9	.	6	12	20	13	.	1	2	3	4	31
B.cinerea	8	10	10	15	7	3	5	5	7	6	.	.	.	.	.	31
A.niger	.	1	4	9	3	4	2	8	13	4	.	.	.	.	.	24

تراكيز الخلاصات المستخدمة مقدرة بـ 1 ,2 ,4 , 8 , 16 mg / ml

الجدول (3) يبين نسب تثبيط نمّو الفطريات الممرضة المثبطة بخلاصات النوع *Lactarius sp.* %

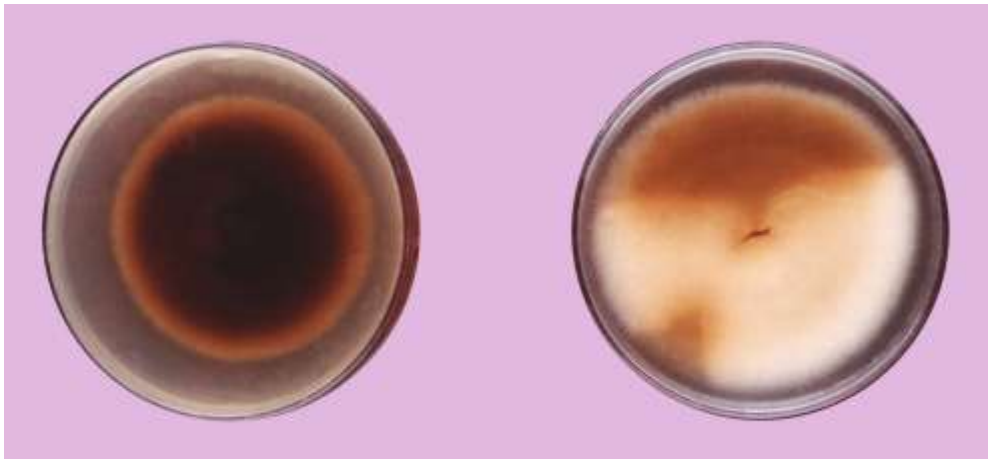
التركيز / الفطريات المختبرة	نسب تثبيط نمّو الفطريات المثبطة %															متوسط قطر نمو الشاهد
	الخلاصة الإيتانولية					الخلاصة الميتانولية					الخلاصة المائية					
	1	2	4	8	16	1	2	4	8	16	1		4	8	16	
T.mentagrophytes	26	26	36	61	29	0	19.4	39	64.6	42	0	3	6.5	10	13	31
B.cinerea	26	32.3	32.3	48.4	22.6	10	16.2	16.2	22.6	19.4	0	0	0	0	0	31
A.niger	0	4.2	17	37.5	12.4	4.2	4.2	33.4	54.2	4.2	0	0	0	0	0	24

2 mg/ml شاهد

4 mg/ml شاهد

8 mg/ml شاهد

لوحة (1) توضح تأثير تراكيز مختلفة من الخلاصة الميتانولية لـ *Lactarius sp.* على النوع *T. mentagrophytes*



شاهد (16 mg/ml)

صورة (3) تأثير الخلاصة الإيتانولية للفطر. *Lactarius sp* على نمو النوع *T. mentagrophytes* (16 mg/ml) السطح السفلية"

شاهد (8 mg/ ml)

صورة (4) توضح تأثير الخلاصة الميتانولية للفطر. *Lactarius sp* على نمو النوع *A. niger*

شاهد (8 mg/ ml)

صورة (5) توضح تأثير الخلاصة الإيتانولية للفطر. *Lactarius sp* على نمو النوع *A. niger*

عند تحديد نسب تثبيط نمّو الفطريات المختبرة بوجود الخلاصات المختلفة جدول(3)، لاحظنا وجود اختلافات في فعالية الخلاصات الثلاث للفطر *L.sp.* حيث يبدأ تأثير الخلاصة الإيتانوليّة على الفطرين *T.mentagrophytes* و *B.cinera* اعتباراً (1mg/ml) وبنسب تثبيط تبلغ (26%) بينما لا يبدأ تأثير هذه الخلاصة على الفطر *A.niger* إلّا اعتباراً من التركيز (2mg/ml) وبنسبة تثبيط خفيفة(4.2%)، ثم ترتفع النسب لتصل حدّها الأعظمي في التركيز (8mg/ml)، في حين لم يبدأ تأثير الخلاصة الميتانولية على *T.mentagrophytes* إلا اعتباراً من التركيز (2mg/ml) ويصل الحد الأعلى لتأثير هذه الخلاصة على الفطريات الحساسة لها في التركيز (8mg/ml) بنسب تثبيط كبيرة وأعلى من تلك للخلاصة السابقة وتعادل (64.6%) و(22.6%) و (54.2%) تجاه *B.cinera,T.mentagrophytes* و *A.niger* على الترتيب، ثم تعود النسب جميعها لتتراجع وتنخفض بشكل كبير في التركيز (16mg/ml)، وكأن الخلاصات الخام لهذا الفطر تحتوي على مواد محفّزة للنمّو إلى جانب الموادّ المضادة وعند ازدياد التركيز يبدو فعلها واضحا" وهذا يستدعي عزل المركّبات التي تتمتع بفعالية مضادة للنمو والموجودة في الخلاصات بشكل نقي ودراسة تأثيرها على هذه الفطريات والذي سوف يتمّ في بحث لاحق .

يبين التباين في تأثير الخلاصات المختلفة للفطر *L.sp.* على فطريات خيطية مختلفة (ممرضة للإنسان والحيوان والنبات) أن الفطر *L.sp.* يمتلك مركّبات متعدّدة تؤثر على نمو عددٍ من الفطرّيات المجهريّة وتختلف هذه المركبات بانحلاليتها في المحلات المختلفة مما يؤكد اقتراح Olokel kolawole (1988) بأنّ المركّبات الفعالة بيولوجيا" في أي نبات طبي ربما تختلف بانحلاليتها تبعاً للمحلات الاستخلاصية المستخدمة.

من خلال النتائج السابقة (جدول3-2) يمكن اعتبار الكحول الميتلي محلاً مناسباً لاستخلاص المواد المضادة للنمو من الفطر *L.sp.* يليه الكحول الإيتيلي ثم الماء وهذا مخالف لما وجده Gbolagade and fasidi (2003) على فطريات *Pusilum* و *L.gigantum* حيث كان الكحول الإيتيلي أفضل المحلاّت يليه الكحول الميتيلي ثم الماء ممّا يدلّ على اختلاف المركّبات المضادة باختلاف الأنواع الفطرية .

2- دراسة تأثير درجات الحرارة على الفعالية المضادة للفطريات للخلاصات المختلفة :

تمت دراسة فعالية الخلاصات المختلفة للنوع *L.sp.* بعد معاملتها بدرجتي حرارة (60^0C) و (100^0C) ولفترات زمنية مختلفة تجاه الفطريات المثبطة فقط. وقد تبّين أنّ الخلاصات الفعالة لم تكن ثابتة حرارياً جدول (4) . حيث تناقصت فعالية الخلاصتين الإيتانولية والميتانولية بعد معاملتها بالدرجة (60^0C) لمدة نصف ساعة بشكل حاد تجاه *B.cinerea* بنسبة (66.7%) للأولى و (71.4%) للثانية حيث تناقصت أقطار التثبيط إلى 5mm و 2mm مقارنة مع الشاهد غير المعامل بالحرارة، بينما فقدت كلتا الخلاصتين فعاليتهما بشكل كامل في الدرجة (100^0C) لمدة (5) دقائق، في حين ازدادت الفعالية التثبيطية للخلاصة الإيتانولية بشكل ملحوظ ضد النوع (*A.niger*) عند معاملتها بالدرجة (60^0C) لمدة نصف ساعة وبلغ قطر التثبيط (14mm) في التركيز (8mg/ml) وهو أكبر مما هو عليه بالتركيز نفسه بالنسبة للخلاصة غير المعاملة والبالغ (9mm) بينما تناقصت الفعالية بنسبة (22.2%) فقط عندما عوملت بالدرجة (100^0C) حيث كان قطر التثبيط 7mm، بالمقابل فقدت الخلاصة الميتانولية فعاليتها ضدّ النوع نفسه عندما عوملت بالدرجة نفسها.

الجدول (4) يبين أثر درجات الحرارة المرتفعة على فعالية الخلاصات النوع *Lactarius sp.* ضد الفطريات الممرضة المثبطة في التركيز (8 mg/ml)

المعاملة	النوع	الخلاصة الإيتانولية	شاهد بدون معاملة	الخلاصة الميتانولية	شاهد بدون معاملة	الخلاصة المائية	شاهد بدون معاملة
60°30min C	*T.mentagrophytes*	7	19	11	20	0	3
100°5min C		3		3		.	
60°30min C	*B.cinerea*	5	15	2	7	.	.
100°5min C		0		0		.	
60°30min C	*A.niger*	14	9	2	13	.	.
100°5min C		7		0		.	

أقطار التثبيط مقدره ب mm

لقد تناقصت فعالية هاتين الخلاصتين بشكل واضح تجاه النوع *T.mentagrophytes* بعد معاملتها بالدرجة (60^0C) لمدّة نصف ساعة بنسبة (63.1%) للإيتانولية و(45%) للميتانولية وفقدت كلاهما (85%) من الفعالية بالدرجة (100^0C).مما يدلّ أنّ المركبات التي تؤثر على هذا النوع قد تكون أكثر ثباتاً من المركّبات الأخرى عند تعريضها لحرارة مرتفعة. في حين فقدت الخلاصة المائية فعاليتها بالكامل ضدّ هذا النوع في الدرجة (60^0C).وقد بينت بعض الدراسات السابقة (Gbolagade and fasidi, 2003; Hirasawa *et al.*,1999) أنّ خلاصات مائية وكحولية لبعض الفطريات القبعية *L.edodes* و *L.pusilum* تناقصت فعاليتها بالدرجة (60^0C) وتفقدها بالكامل بالدرجة (100^0C) تجاه بعض الجراثيم والفطريات الممرضة وهذا يدل على أنّ المركبات الفعالة المختلفة الموجودة في *Lactarius sp.* لا تتأثر جميعها بالحرارة في الدرجة نفسها ، فبعضها يتخرب بالكامل وبعضها الآخر أكثر ثباتاً.

الاستنتاجات والتوصيات:

من خلال النتائج السابقة يمكن أن نستنتج:

1- تحتوي الخلاصات المائية والكحولية للفطر القبعي *L.sp.* على مركّبات استقلابية طبيعية تثبّط نموّ بعض الفطريات المجهرية.

2- تمتلك الخلاصة الميتانولية فعالية تثبيطية عالية مقارنة مع الخلاصتين الإيتانولية والمائية.

3- تأثر النوع *T.mentagrophytes* فقط من بين الفطريات الجلدية المختبرة بالخلاصات الثلاث.

4- لم تبد الخلاصة المائية أيّ تأثير سوى على *T.mentagrophytes*.

5- كان التركيز(8mg/ml)هو التركيز الأعظميّ لفعالية الخلاصات.

6- اختلفت فعالية الخلاصات الثلاث المستخدمة بتناقص أو فقدان فعاليتها بعد المعاملة بدرجتي الحرارة (60^0C) و (100^0C) .

المراجع:

1- سعود، راميا. *دراسة بيئية تصنيفية للفطريات الكبيرة Macromycetes* في بعض مناطق الساحل السوري. أطروحة ماجستير ،قسم النبات،كلية العلوم،جامعة تشرين، سورية، 2003، 264 .

2- يازجي،ميساء؛ سعود، راميا. *دراسة الفعالية الصادية لثلاثة فطريات دعامية (Basidiomycetes) ضد بعض الأحياء الدقيقة في الزجاج (invitro)*. قبل للنشر في مجلة جامعة تشرين للدراسات والبحوث العلمية – سلسلة العلوم البيولوجية بتاريخ 2007/12/30.

3- جهار،عبد الله . *عزل أورومات فطرية من أجسام ثمرية فطرية سامّة وأخرى صالحة للأكل واختبار قدرتها لإنتاج الصادات الحيوية ضدّ جراثيم ممرضة فوق الأوساط الآغارية الجامدة.أطروحة دكتوراة*. جامعة حلب، 2005، 180

4-BELOVA, N. V. *Studies of Biologically active Metabolites from Macromycetes* in *the V. L. Komarov Botanical Institute, Russian Academy of sciences*. I. J. Medicinal Mushrooms,vol. 3, 2001, 117 .

5-DUCHESNE,L.C.;PETERSON,R.L.;ELLIS,B.E. *Interaction between the ectomycorrhizal fungus paxillus involutus and pinus resinosa induces resistance to fusarium oxysporum.* Can .j.bot.vol.66,1988a,558-562.

6-GBOLAGADE, J. S. and FASIDI, I. O. *Antimicrobial activities of two Nigerian edible macro- fungi lycoperdon pusilum* (Bat. Ex) and *lycoperdon giganteum (pers.)*, African J. Biomedical Research, vol. 6, 2003, 85- 90.

7-GBOLAGADE, J.S. and FASIDI, I.O. *Antimicrobial activity of some selected Nigerian mushroom*. African. J. Biomedical research, vol. 8,No.2, 2005,83- 87

8-GEORGII, A. and KORTINC, H. C. *Antifungal susceptibility testing with dermatophytes.* Mycoses. 34, 1991, 193- 199.

9-GEZER, K.; DURU, ME.; KIVRAK, I.; TURKOGLU, A.; MERCAN, N.; TURKOGLU, H. and GULCAN, A. *Free- radical scavenging capacity and antimicrobial activity of wild edible mushroom from turkey.* African, J. Biotechnology, vol. 5(20), 2006 , 1924- 1928.

10-HIRASWA, M.; SHOUJI, N.; NETA, T.; FUKUSHIMA, K.; *TAKADA, K. Three kinds of antibacterial substances from lentinus edodes (Berk.) sing. (shiitke, an edible mushroom).* I. J. antimicrobial agent,1999, 151- 157.

11-KIM, M. E.; JUNG, R. H. and MIN, J. T. *purification structure determination and biological activities of 20(29)- lupen- 3- one from Daedaleopsis tricolor (Bull. exFr.) Bond. Et sing- Bull. Korean chem*. Soc. vol. 22, No.1, 2001,59- 62.

12-LABORDE, F. L. *Guaranteeing a safe Mushroom product: the HACCP Approach. Mushroom news*. 47(9): 1999,4- 7.

13-LIMA, E. O.; GOMPERTZ, O. F.; *GIESBRECHT and PAULO,M. Q. In vitro antifungal activity of essential oils obtained from officinal plants against dermatophytes.* Mycoses 63, 1993, 333- 336.

14-NONIS, U. *Mushrooms & toadstools, A colour field guid.* David & charles, London, 1982,360.

15-OLOKE, J. O. and KOLAWOLE, D. O. *The antibacterial and antifungal activities of Certain Components of Aframomum melegueteа fruits*. Fitoterapia, 59(5), 1998 , 384 – 388.

16-PELCZAR,J.R.;MICHAL,J.; REID,R.D.Microbiology. Mc.Graw-Hill,1972,947.
17-PERRIN, R.;GARBAYE,J.,*Influnce of ectomycorrhizae on infectivity of pythium-infested solis and substarates.* Plant soil,vol.71,1983,345-351.
18-ROSA, L. H.; MACHADO, K. M. G.; JACOB, C. C.; CAPELARI, M.;ROSA, C. A.; ZANI, C. L. *Screening of Brazilian basidiomycetes for antimicrobial activity*. Mem Inst oswaldo cruz, vol. 98(7), 2003 , 967- 974.
19-SAMPANGI, R.; PERRIN,R. *Attempts to elucidate the mechanisms involved in the protective effect of laccaria laccata against fusarium oxysporum.in*:GIANIAZZI.p.x GIANIAZZI,S., *physiological and genetical aspects of mycorrhizae. INRA, paris*,1986,807-810.
20-SEYMOUR, J. *The color nature library mushrooms and toadstools*, crecent books,1978,564.
21-SOUZA, L. KH. MA. de OLIVEIRA, C.; FERRI, P. H.; OLIVEIRA JUNIOR, J. G.; SOUZA JUNIOR, A. H.; LISBOA FERNANDES, F.I.O.; SILVA, M. R. R. *Antimicrobial activity of Hyptis ovalifolia* towards *dermatophytes*. Mem Inst. vol. 98, No.7, 2003,5.
22-SOUZA PACCOLA, E. A.; MAKI, C. S.; NOBREGA, G. M. A.; PACCOLA MEIRELLES, L. D. *Antigonistic effect of edible Mushroom extract on candida albicans growth*. Braz. J. microbial, vol. 32, No.3, 2001, 5
23- STAMETS, P. *Anovel antimicrobial from mushrooms* . Herbalgram, 2002,28- 33.
24-SUAY, I.; ARENAL, F.; BASILIO CABELLO, M.;DIEZ, M. T.*Screening of basidiomycetes for antimicrobial activities*. Antonie van Leeuwenhoek. 78, 2000,129-139.
25-VIDARI, G.;VITA – FINAI, P.; ZANOCCHI, A.M. *A bioactive Tetraprenyl ylphenol* from *Lactarius Lignyotus.* J. Natural products,vol . 58, No.6 , 1995 ,893 – 896.
26-WERNER,P.*mushroom as Medicines* ? mycena news, 2004,3.
27-YAZIJI,M.*Etude de l'action antifongique des substances d'origine naturelle sur la croissance de microsporum gypseum, cultiv'e in vitro."Observation en microscopie photonique et en microscopie electronique a transmission"* 1993,285.