جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة كربلاء
كلية التربية للعلوم الصرفة – قسم علوم الحياة

تأثير التسميد الحيوي ببكتيريا ***Bacillus subtilis*** و ***Pseudomonas fluorescens*** في بعض مؤشرات النمو لنبات البابونج واستخدام المستخلص الكحولي لأزهاره في منع تخثر الدم

أطروحة مقدمه إلى مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء
وهي جزء من متطلبات نيل درجة الدكتوراه فلسفة في علوم الحياة - نبات - (تقانات إحيائية)

تقدمت بها
ناجحة محمد باري احمد

بإشراف
أ.د. كاظم محمد إبراهيم الصميدعي

1437 هـ

2015 م

ٱلْحَمْدُ لِلَّهِ ٱلَّذِى لَهُۥ مَا فِى ٱلسَّمَٰوَٰتِ وَمَا فِى
ٱلْأَرْضِ وَلَهُ ٱلْحَمْدُ فِى ٱلْءَاخِرَةِ ۚ وَهُوَ ٱلْحَكِيمُ
ٱلْخَبِيرُ ﴿١﴾ يَعْلَمُ مَا يَلِجُ فِى ٱلْأَرْضِ وَمَا يَخْرُجُ
مِنْهَا وَمَا يَنزِلُ مِنَ ٱلسَّمَآءِ وَمَا يَعْرُجُ فِيهَا ۚ
وَهُوَ ٱلرَّحِيمُ ٱلْغَفُورُ ﴿٢﴾

صدق الله العظيم

سبأ الآية ١-٢

الإهـداء

الى :

- روح والدي ووالدتي واخي رحمهم الله.
- لمن تحملوا العناء طيلة فترة البحث واخص منهم زوجي واولادي منار ، حيدر ، حسين ، مهند ، وحفيدتي رقية ... وفقني الله لاسعادهم.
- اساتذتي الافاضل
- وطني الغالي حماه الله من كل مكروه وبسط الأمن والآمان في ربوعه ...

اهدي جهدي المتواضع

الباحثة

شكر وتقدير

الحمد لله رب العالمين والصلاة والسلام على أمام المتقين وسيد المرسلين اشرف الخلق أجمعين أبو القاسم محمد وعلى أهل بيته الأطهار المنتجبين الأخيار.

يسعدني ويطيب لي بعد أن منّ الله بإتمام أطروحتي أن أتقدم بجزيل شكري وتقديري البالغ إلى عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة في جامعة كربلاء ، وأخص بالذكر والعرفان والتقدير الأستاذ الدكتور (نجم عبد الحسين) عميد الكلية لرعايته الكريمة طيلة فترة انجاز البحث سائلاً من الله العلي القدير أن يحفظه ويرعاه دوماً لخدمة العلم .

ومن الوفاء والعرفان بالجميل أن أسجل شكري وتقديري الخالص إلى أستاذي الفاضل العزيز الدكتور(كاظم محمد إبراهيم) على ما بذله من جهود علمية حثيثة واقتراحه خطة البحث وإشرافه العلمي المتواصل طيلة فترة أنجاز البحث سائلاً من الله أن يحفظه لخدمة العلم مرضاة لله سبحانه وتعالى .

أجد الزاماً عليّ أن اشكر السيد رئيس لجنة المناقشة الأستاذ الدكتور (مؤيد صبري شوكت) والسادة أعضاء اللجنة ، الأستاذ الدكتور (عبد الجاسم محيسن جاسم) ، والأستاذ الدكتور (مجيد كاظم عباس) والأستاذ المساعد الدكتور (علي عبد الكاظم جاسم) والأستاذ المساعد الدكتور (قيس حسين عباس) ، لتفضلهم بقبول قراءة ومناقشة الأطروحة وما قدموه من توجيهات وملاحظات علمية سديدة ، والتي ساهمت بشكل فاعل في أغناء الأطروحة وإظهارها بالشكل الأمثل فجزاهم الله عني ألف خير .

ولا يفوتني أن أتقدم بفائق شكري وتقديري العميق إلى الأستاذ الدكتور (علي حمود السعدي) المقوم العلمي والتي استزدت من علمه الوافر وملاحظاته العلمية من خلال مراجعته الدقيقة لفصول الأطروحة وكما أشكر ايضاً الدكتور (علي ذياب محي) المقوم اللغوي ، فجزاهم الله خير الجزاء.

وأنا اكتب هذه الكلمات لابد لي أن أقدم شكري وامتناني إلى أساتذتي الأفاضل في قسم علوم الحياة متمثلا بالسيد رئيس وأعضاء مجلس القسم وأخص بالذكر الدكتور (نصير ميرزة) والأستاذ (حسين عبد اللطيف) لمساهمتهم الفاعلة خلال فترة أنجاز البحث .

ومن العرفان والواجب لزاماً عليّ ان اسجل شكري العميق إلى الأستاذ الدكتور (سامي عبد الرضا الجميلي) قسم التحليلات المرضية في كلية العلوم الطبية التطبيقية في جامعة كربلاء لما بذوله من جهود علمية حثيثة قد أسهمت بشكل فاعل طيلة فترة انجاز البحث سائلاً من الله العلي القدير ان يحفظه وان يمد في عمره مرضاة لله سبحانه وتعالى .

كما اسجل شكري وتقديري الى الاستاذ اياد في الكلية التقنية في المسيب والأستاذ احمد ابو ايلاف في كلية الزراعة جامعة بغداد لتعاونهم معي في أعداد واخراج الاطروحة بالشكل العلمي المناسب .

تقديراً ووفاءً أقدم أعظم وأجمل كلمات الشكر والوفاء الى والدي الحبيب ووالدتي الحبيبة وأخي الغالي (رحمهم الله) والذي لم يمهلهم العمر ليشهدوا ثمرة جهدي العلمي ، كما وأقدم شكري وامتناني إلى أخوتي الأعزاء والى زوجي الحبيب سندي وقرة فؤادي أولادي لمؤازرتهم لي طيلة فترة الدراسة سائلاً من الله العلي القدير أن يحفظهم جميعاً من كل مكروه .

وأخيراً أشكر كل من قدم يد العون لي وعذراً لمن فاتني ذكره . ومن الله التوفيق

الباحثة

الخلاصة

اجريت الدراسة في حقل النباتات الطبية والبيت الحيواني التابع الى كلية الصيدلة / جامعة كربلاء ، بهدف معرفة تأثير التسميد الحيوي Biofertilization بكتيريا *Bacillus subtilis* و *Pseudomonas fluorescens* والاثنان معاً (*B. subtilis + Ps. Fluorescens*) في الصفات المورفولوجية والفسلجية لنبات البابونج *Matricaria chamomile* وتأثيرها ايضا في كمية المواد الفعالة للمستخلصات الكحولية لازهار البابونج، بصفتها مواد مانعة لتخثر الدم (Anti-coagulant) داخل الجسم الحي (*In vivo*) وخارج (*In vitro*) ، ومعرفة تأثيراتها في بعض صفات الدم ومعاييره الفسلجية في ذكور الفئران (Sprague dawley) المعاملة بهذه المستخلصات وفصل المركبات بتقنية (Thin Layer Chromatography, T.L.C) من المستخلصات الفينولية الخام لازهار نبات البابونج.

اوضحت نتائج الدراسة ارتفاعا معنويا في معدل عدد الافرع الخضرية اذ بلغت لمعاملة Comtrol ومعاملة *ps. fluorescons.* ومعاملة *Ps.* ومعاملة *B.subtilistps fluoresens* (11.9 /نبات ، 17.6/نبات ، 19.6/نبات ، 37.6/نبات) على التوالي. كما لوحظ زيادة في معدل عدد النورات الزهرية عند مقارنتها مع معاملة السيطرة اذ بلغت 14.16 لمعاملة *B.* و 14.2 لمعاملة *Ps.* في حين بلغت عند معاملة (*B. + Ps.*) 22.63 مقارنة مع معاملة السيطرة الذي بلغ 10.11. في حين بلغت اطوال النباتات المعاملة بـ (*B. + Ps.*) اذ بلغت 44.21 سم و 50.33 سم لمعاملة *B.* و 55.56 سم لمعاملة *Ps.* مقارنة مع معاملة السيطرة التي سجلت 35.69 سم. اما بالنسبة لتأثير التسميد الحيوي في الصفات الفسلجية، فقد اثبتت النتائج تفاوت النسب المئوية للزيت الطيار المستخلص من معاملات التسميد الحيوي قيد الدراسة اذ اعطت معاملة (*B. + Ps.*) اعلى نسبة مئوية للزيت بلغت 25.28% مقارنة مع معاملة C و *B.* و *Ps.* والبالغة 8.76 و 11.68 و 12.91% على التوالي. كما سجل ارتفاعا في جاهزية العناصر الكبرى والصغرى(النتروجين N ، الفسفور P ، البوتاسيوم K ، الحديد Fe ، المنغنيز Mn ، النحاس Cu ، الزنك Zn والمغنيسيوم Mg) في اوراق نبات البابونج في المعاملات المدروسة .

كما بينت نتائج التحليل الاحصائي تفوق معاملة (*B.* + *Ps.*) معنويا في زيادة معدلات قيم الكلوروفيل A و والكلوروفيل B اذ بلغ اعلى معدل لقيمة الكلوروفيل A (4.21) ملغم / 100 غم متفوقة على معاملة السيطرة ومعاملة *B.* ومعاملة *Ps.*، اذ بلغت قيمة الكلوروفيل A 1.41 ، 2.19 و 2.35 ملغم / 100 غم من الوزن على التوالي. كما وازدادت قيم الكلوروفيل B في معاملة (*B.* + *Ps.*) اذ وصل اقصاه 3.78 ملغم / 100 غم متفوقة على المعاملات C و *B.* و *Ps.* والتي بلغت 1.45 ، 2.01 و 2.25 ملغم / 100 غم . بينت نتائج البحث بأن لنوع البكتريا المستخدم في التسميد الحيوي ولكل معاملة تأثيرات واضحة في زيادة صفة الوزن الجاف لازهار نبات البابونج اذ تفوقت معاملة *B.* + *Ps.* وبلغت 1.55 غم مقارنة مع المعاملات C و *B.* و *Ps.* والتي بلغت 0.031 ، 0.060 و 0.060 غم على التوالي.

اوضحت نتائج الكشف الاستدلالي (الترسيبي) للمستخلصات الكحولية لازهار نبات البابونج باحتوائ على المركبات الفينولية ، والقلويدية والتربينية اضافة الى الكلايكوسيدات. بلغت قيمة الجرعة القاتلة لنصف الحيوانات المختبرية LD_{50} للمستخلص الايثانولي لازهار نبات البابونج ولكافة معاملات التسميد الحيوي 9875 ملغم / كغم من وزن الجسم وبطريقة الحقن تحت الجلد . كما ولوحظ ارتفاعا معنويا في زمن النزف وزمن التخثر وزمن البروثرومبين وزمن الثرومبوبلاستين اذ اظهرت معاملة المستخلص الكحولي لازهار النباتات المعاملة *B.* + *Ps.* وعند الجرعة 1250 ملغم / كغم زيادة واضحة في زمن النزف وزمن التخثر اللذان بلغا 9.01 و 8.99 دقيقة على التوالي مقارنة مع معاملة السيطرة والتي بلغت معدلاتهما 2.89 و 2.66 دقيقة. كما ولوحظت زيادة معنوية في زمن البروثرومبين والثرومبوبلاستين اذ بلغ معدلهما 23.09 و 43.69 ثانية مقارنة مع معاملة السيطرة البالغة 11.31 و 20.73 ثانية . ادت المعاملة الى تغيرات معنوية في المعايير الوظيفية للدم اذ سببت انخفاضا في معدلات تركيز خضاب الدم عند المقارنة بمعاملة السيطرة ، وكانت معاملة الـ *B.* الاكثر انخفاضا عند الجرعة 1250 ملغم / كغم اذ بلغت 11.78 غم / ديسيليتر ، كما حصل ارتفاعا في معدل ترسيب كريات الدم الحمراء Erythrocytes Sedimentation Rate (E.S.R) وفي معدل العدد

الكلي لخلايا الدم البيضاء ولمستخلص معاملة *B. + Ps.* عند الجرعة 1250 ملغم / كغم تأثير في هذا الارتفاع ، اذ بلغت 9023.56، و 8033.11 و 8033 ملم^3 / 10^3 على التوالي مقارنة مع معاملة السيطرة البالغة 5901.21 و 5901.21 و 5331.50 ملم^3 / 10^3 على التوالي.

من جانب اخر فقد بينت النتائج انخفاضا معنويا في معدلات اعداد كريات الدم الحمراء والصفائح الدموية اذ بلغا 2.99 ×10^6 كرية / ملم^3 و 301.01× 10^3صفيحة / ملم^3 على التوالي لمستخلص *B. + Ps.* الكحولي عند مقارنته مع معاملة السيطرة اذ بلغتا 8.23× 10^6 كرية / ملم^3 و 666.15× 10^3 صفيحة / ملم^3 على التوالي.

ان التراكيز العالية (1000 و 1250) ملغم / كغم من مستخلصات أزهار البابونج ولمعاملات التسميد الحيوي بـ *B.* و *Ps.* و (*B. + Ps.*) قد سببت توسعا في الاوعية الدموية واحتقانها مع نزف وتورم الخلايا وتنكس خلوي (Cellular degeneration) مع ارتشاح في الخلايا اللمفاوية في منطقة الاحتقان لكل من اعضاء الكبد ، الكلى ، الطحال ولجميع مستخلصات التسميد الحيوي بالبكتيريا المدروسة وبدرجات متفاوتة . بينت الدراسة ان اقل تركيز مضاد لتخثر الدم لمستخلص (*B. + Ps.*) بلغ 25 ملغم / سم^3 من الدم ولم تتأثر مكونات الدم الاساسية عند معاملة الدم بالمستخلص والتركيز اعلاه وان مستخلص *B. + Ps.* يعمل عمل الهيبارين (Heparin) وليس كعمل سترات الصوديوم وان مدة الخزن لم تؤثر في الفعالية البايولوجية للمستخلص والمركبات المعزولة منه . كما وتم عزل ثلاثة مركبات من المستخلص الفينولي الخام لازهار نبات البابونج مع تحديد لون و R.F (قيم التحرك النسبي Relative flow) بوساطة العين المجردة والاشعة فوق البنفسجية (U.V) وحضرت منه التراكيز 2.5 و 5 و 7.5 و 10 ملغم / مل واختبرت على الفئران لبعض صفات الدم المدروسة سابقا ، وظهر بأن المركب (2) وبالتركيز 2.5 ملغم / مل يماثل عمل مستخلص *B. + Ps.* واللذان يعملان عمل الهيبارين كمادة مانعة لتخثر الدم.

المحتويات

التسلسل	الموضوع	الصفحة
	الخلاصة باللغة العربية	I
	المحتويات	IV
	قائمة الجداول	IX
	قائمة الاشكال	XI
	قائمة الصور / الجزء النباتي	XII
	قائمة الصور / الجزء الحيواني	XIII
	قائمة المختصرات	XIV
1	الفصل الاول – المقدمة **Introduction**	**1**
1-1	المقدمة	1
2-1	الهدف من الدراسة	2
2	الفصل الثاني – مراجعة المصادر **Literature Review**	3
1-2	فسلجة واهمية بكتريا *B. subtilis*	**3**
2-2	استحثاث المقاومة الجهازية (I.S.R)	4
3-2	الاسمدة الحيوية البكتيرية Bacterial biofertilizers	5
4-2	اهمية الاحياء المجهرية في التسميد الحيوي	8
5-2	فسلجة واهمية بكتريا *Pseudomonas fluorescens*	10
6-2	اثر المزج بين الاحياء المجهرية والاداء الحياتي لها	12
7-2	نبات البابونج	13
1-7-2	تسمية ووصف نبات البابونج	13
2-7-2	الظروف البيئية المؤثرة في نمو نبات البابونج	14
8-2	الاهمية الطبية للبابونج	15
9-2	المركبات الفعالة لنبات البابونج	17
10-2	النباتات الطبية الاخرى واثرها في تخثر الدم	19
11-2	تخثر الدم Blood coagulation	20
12-2	عوامل تخثر الدم Factors of blood coagulation	21
13-2	انحلال الفبرين او تحلل الخثرة Clot resolution	22

14-2	انواع الخثر الدموية Types of glots	23
15-2	مضادات التخثر ذات الأصل الحيواني	24
16-2	مضادات التخثر ذات الاصل النباتي	25
17-2	آلية تخثر الدم	25
18-2	اسباب زيادة تخثر الدم	26
19-2	مضادات التخثر في الزجاج	27
20-2	الاسبرين وتخثر الدم	28
21-2	الايض الثانوي في النباتات Secondary metabolism in plants	28
3	الفصل الثالث – المواد وطرائق العمل **Materials and Methods**	**31**
1-3	المواد الكيميائية المستعملة في الدراسة Chemicals	31
2-3	الاوساط الزرعية المستخدمة في الدراسة	33
3-3	الاجهزة المستعملة في الدراسة	33
4-3	تحضير لقاح البكتيريا	35
1-4-3	تحضير لقاح بكتيريا *Bacillus subtilis*	35
2-4-3	تحضير لقاح بكتيريا *Pseudomonas fluorescens*	35
3-4-3	مزج نوعي البكتيريا *B. subtilis* و *P. fluorescens*	36
5-3	زراعة نبات البابونج Chamomile لغرض الدراسة	36
1-5-3	تعقيم النورات الزهرية	37
2-5-3	تلقيح البذور بلقاح *B. subtilis* و *Ps. Fluorescens* ومزج اللقاحين معا	37
6-3	الزراعة في تربة غير معقمة في الحقل	38
7-3	دراسة مؤشرات النمو	41
1-7-3	دراسة مؤشرات النمو (المورفولوجية ، الفسلجية) قبل التزهير	41
2-7-3	تقدير محتوى الكلوروفيل	41
3-7-3	تقدير النسبة المئوية للزيت الطيار	42
4-7-3	تقدير الوزن الجاف لازهار نبات البابونج	43
5-7-3	تقدير الكثافة الكلية لبكتيريا الـ *B. subtilis* و *Ps. Fluorescens* ومزج نوعي البكتيريا	43

3-8	تحضير مستخلصات الازهار لنبات البابونج وللمعاملات المدروسة	43
3-8-1	الكشف عن المركبات الفعالة للمستخلص الكحولي لازهار نبات البابونج ولكل معاملة من المعاملات المدروسة	44
3-8-2	فصل وتنقية المركبات الفعالة	45
3-9	الكواشف الاستدلالية للمجاميع الفعالة في المستخلص الكحولي لازهار نبات البابونج	45
3-10	تحضير مستخلص المركبات الفينولية الخام لازهار البابونج ولمعاملة التسميد الحيوي ببكتيريا *B. subtilis + Ps. fluorescens*	47
3-11	تهيئة الحيوانات المختبرية	49
3-12	تعيين الجرعة القاتلة LD_{50} بطريقة الحقن تحت الجلد	49
3-13	تحضير جرع مستخلصات ازهار نبات البابونج لمعاملات التسميد الحيوي ببكتيريا *B.* و *Ps.* وبكتيريا (*B. + Ps.*) قيد الدراسة	50
3-14	المعاملة بالمستخلص الايثانولي لازهار نبات البابونج المعاملة بالتسميد الحيوي قيد الدراسة	50
3-15	تحضير محاليل دراسة الدم	50
3-16	دراسة صفات تخثر الدم	51
3-17	دراسة الصفات الوظيفية للدم	52
3-18	محاليل التحضيرات النسيجية	55
3-19	الدراسات النسيجية The Histological studies	55
3-20	اختبار التأثير المضاد للتخثر لمستخلصات ازهار نبات البابونج المعاملة بالتسميد الحيوي ببكتيريا *B. subtilis* و *Ps. fluorescens* و *B. subtilis + Ps. fluorescens* خارج الجسم الحي	56
3-21	تحديد التركيز الادنى من مستخلصات ازهار البابونج المعاملة بالتسميد الحيوي لمنع تخثر الدم	56
3-22	آلية عمل مستخلصات ازهار البابونج المعاملة ببكتيريا *B.* و *Ps.* و (*B. + Ps.*) بوصفها مضادات لتخثر الدم	57
3-23	آلية عمل المركبات (1 ، 2 و 3) المعزولة من المستخلص الفينولي الخام لازهار نبات البابونج *M. chamomile* وتراكيزها بصفتها مضادة لتخثر الدم	57

24-3	مدة ثبات فعالية المستخلص الكحولي لمعاملة (*B.* + *Ps.*) المضادة لتخثر الدم	58
25-3	التصميم التجريبي والتحليل الاحصائي Experimental design and statistical analysis	58
4	**الفصل الرابع – النتائج والمناقشة Results and Discussion**	**59**
1-4	كثافة نوعي البكتيريا *B. subtilis* و *Ps. fluorescens* في وسط زرعي واحد	59
2-4	جاهزية العناصر الكبرى والصغرى	60
3-4	الوزن الجاف لازهار نبات البابونج	68
4-4	تأثير التسميد الحيوي في كثافة البكتريا بجذور نبات البابونج	69
5-4	تأثير التسميد الحيوي في ارتفاع نبات البابونج	70
6-4	تأثير التسميد الحيوي في معدلات عدد الافرع الخضرية والنورات الزهرية لنبات البابونج	72
7-4	تأثير التسميد الحيوي في النسبة المئوية للزيت الطيار لازهار نبات البابونج	75
8-4	تأثير التسميد الحيوي في معدلات كلوروفيل A و B لاوراق نبات البابونج	77
9-4	الكشف الكيميائي التمهيدي الاستدلالي عن المجاميع الفعالة لمستخلصات نبات البابونج	79
10-4	تأثير كفاءة المستخلصات والجرع لازهار نبات البابونج ولمعاملات التسميد الحيوي في بعض صفات تخثر الدم	81
11-4	تأثير التسميد الحيوي لمستخلصات ازهار البابونج في المعايير الفسلجية لدم الحيوانات المختبرية	85
12-4	تأثير جرع مستخلصات ازهار البابونج في المعايير الفسلجية لدم الحيوانات المختبرية	87
13-4	تأثير حزم المركبات المعزولة من المستخلص الفينولي على بعض صفات تخثر الدم	92
14-4	تأثير تراكيز المركب (2) في بعض صفات تخثر الدم	93
15-4	الدراسات النسيجية Histological studies	94

16-4	تحديد التركيز الادنى من مستخلصات ازهار البابونج المعاملة بالتسميد الحيوي ببكتيريا *B.* و *Ps.* و (*B.* + *Ps.*) لمنع تخثر الدم	103
17-4	آلية عمل مستخلصات ازهار البابونج المعاملة بالتسميد الحيوي ببكتيريا الـ *B.* و *Ps.* و (*B.* + *Ps.*) بصفته مضادا لتخثر الدم	103
18-4	مدة ثبات الفعالية لمستخلص ازهار البابونج لمعاملة التسميد الحيوي ببكتيريا (*B.* + *Ps.*) بصفته مضادا لتخثر الدم	103
19-4	آلية عمل المركبات (1 ، 2 و 3) المعزولة من المستخلص الفينولي الخام لازهار نبات البابونج وتراكيزها بصفتها مضادة لتخثر الدم	103
	الفصل الخامس الاستنتاجات والتوصيات Conclusions & Recommendations	**104**
	الاستنتاجات	104
	التوصيات	105
	المصادر References	**106**
	المصادر العربية	**110-106**
	المصادر الاجنبية	125-111
	الخلاصة باللغة الانكليزية	A-C

قائمة الجداول

الرقم	العنوان	الصفحة
1	الصفات الكيميائية والفيزيائية لتربة الحقل	40
2	كثافة بكتيريا *B. subtilis* و *Ps. fluorescens* عند زرعهما في وسط زرعي واحد	59
3	جاهزية العناصر الكبرى لاوراق نباتات البابونج لمعاملات التسميد الحيوي ببكتيريا *B. subtilis* و *Ps. fluorescens* ومعاملة (*Ps. + flourescens + B. subtilis*)	60
4	جاهزية العناصر الصغرى لاوراق نباتاتات البابونج لمعاملات التسميد الحيوي ببكتيريا *B. subtilis* و *Ps. Fluorescens* ومعاملة (*Ps. + flourescens + B. subtilis*)	64
5	الوزن الجاف لازهار نباتات البابونج المعاملة بالتسميد الحيوي ببكتيريا *B. subtilis* و *Ps. fluorescens* ومعاملة (*Ps. + flourescens + B. subtilis*)	68
6	تأثير التسميد الحيوي ببكتيريا *B. subtilis* و *Ps. fluorescens* ومعاملة (*Ps. + flourescens + B. subtilis*) في المنطقة المتأثرة بالجذور لنبات البابونج المعامل به	69
7	الكشف الكيميائي التمهيدي الاستدلالي (الترسيبي) للكشف عن المجاميع الفعالة لمستخلصات ازهار البابونج المعاملة بالتسميد الحيوي ببكتيريا الـ *B. subtilis* و *Ps. fluorescens* و (*Ps. + flourescens + B. subtilis*)	80
8	تعيين الجرعة القاتلة للنصف (LD_{50}) Lethal dose للمستخلص الايثانولي لازهار البابونج ولكافة المعاملات قيد الدراسة	80
9	تأثير كفاءة مستخلصات ازهار البابونج لمعاملات التسميد الحيوي بكتيريا *B. subtilis* و *Ps. fluorescens* و (*Ps. + flourescens + B. subtilis*) في بعض صفات تخثر الدم لحيوانات التجربة المعاملة قيد الدراسة	81
10	تأثير جرع مستخلصات ازهار البابونج لمعاملات التسميد الحيوي ببكتيريا الـ *B. subtilis* و *Ps. fluorescens* و (*Ps. + flourescens + B. subtilis*) في بعض صفات تخثر الدم	82
11	تأثير التداخل بين نوع المستخلص لازهار البابونج المعاملة بالتسميد الحيوي لبكتيريا الـ *B. subtilis* و *Ps. fluorescens* و (*Ps. + flourescens + B. subtilis*) وجرع المستخلصات في بعض صفات تخثر الدم	83
12	تأثير التسميد الحيوي لمستخلصات ازهار البابونج المعاملة ببكتيريا الـ *B. subtilis* و *Ps. fluorescens* و (*Ps. + flourescens + B. subtilis*) على المعايير الفسلجية لدم ذكور الجرذان قيد الدراسة	86
13	تأثير جرع مستخلصات ازهار البابونج المعاملة بالتسميد الحيوي ببكتيريا الـ *B. subtilis* و	88

	Ps. fluorescens و (*Ps. + flourescens + B. subtilis*) في المعايير الفسلجية لدم ذكور الجرذان قيد الدراسة	
14	تأثير التداخل بين انواع مستخلصات ازهار البابونج المعاملة بالتسميد الحيوي ببكتيريا الـ *B. subtilis* و *Ps. fluorescens* و (*Ps. + flourescens + B. subtilis*) في معايير الدم الفسلجية لذكور الجرذان قيد الدراسة	89
15	المركبات المعزولة وقيم التحرك النسبي والوان الحزم المفصولة من مستخلص المركبات الفينولية لازهار نبات البابونج *M. chamomile* باستخدام تقنية (T.L.C)	92
16	تأثير حزم المركبات المعزولة من مستخلص المركبات الفينولية الخام لازهار نبات البابونج *M. chamomile* في بعض صفات تخثر الدم لذكور الجرذان قيد الدراسة	92
17	تأثير تراكيز المركب (2) في بعض صفات تخثر الدم لذكور الجرذان قيد الدراسة	93

قائمة الأشكال

رقم الشكل	العنوان	الصفحة
1	انحلال الفيرين	22
2	مسار الايض الثانوي في النباتات	30
3	تأثير معاملات التسميد الحيوي ببكتيريا *B.* و *Ps.* والـ (*B.* + *Ps.*) في ارتفاع نباتات البابونج *M. chamomile*	71
4	تأثير معاملات التسميد الحيوي ببكتيريا الـ *B.* و *Ps.* والـ (*B.* + *Ps.*) في زيادة معدلات الافرع الخضرية لنبات البابونج *M. chamomile*	73
5	تأثير معاملات التسميد الحيوي ببكتيريا الـ *B.* و *Ps.* والـ (*B.* + *Ps.*) في زيادة معدلات النورات الزهرية لنبات البابونج *M. chamomile*	73
6	تأثير معاملات التسميد الحيوي ببكتيريا الـ *B.* و *Ps.* والـ (*B.* + *Ps.*) في نسبة الزيت المئوية لازهار نبات البابونج *M. chamomile*	76
7	تأثير معاملات التسميد الحيوي ببكتيريا الـ *B.* و *Ps.* والـ (*B.* + *Ps.*) لقيمة الكلوروفيل (A) والكلوروفيل (B) لاوراق نبات البابونج *M. chamomile*	77
8	تأثير معاملات التسميد الحيوي ببكتيريا الـ *B.* و *Ps.* والـ (*B.* + *Ps.*) لقيمة الكلوروفيل (B) لاوراق نبات البابونج *M. chamomile*	78

قائمة الصور / الجزء النباتي

رقم الصورة	العنوان	الصفحة
1	ازهار نبات البابونج *M. chamomile*	39
2	النورات الزهرية لازهار نبات البابونج المستخدمة في المستخلصات	39

قائمة الصور / الجزء الحيواني

رقم الصورة	العنوان	الصفحة
1	مقطع في نسيج طبيعي لكبد حيوانات التجربة غير المعاملة	96
2	احتقان شديد في الاوعية الدموية في نسيج الكبد عند المعاملة بالمستخلص الكحولي بتركيز 1250 ملغم / كغم	96
3	تورم في الخلايا الكبدية عند المعاملة بتركيز 1000 ملغم / كغم	97
4	نزف في الوريد المركزي للكبد عند المعاملة بالمستخلص الكحولي بتركيز 1250 ملغم / كغم	97
5	تنكس غيمي مع تورم في خلايا الكبد مع تفجي الهيولي عند المعاملة بتركيز 1250 ملغم / كغم	98
6	مقطع في نسيج طبيعي لكلية حيوانات التجربة غير المعاملة	98
7	ارتشاح متفاوت في النسيج الكلوي عند المعاملة بتركيز 1250 ملغم / كغم	99
8	نسيج كلوي يظهر حجم الكبيبات الكلوية عند المعاملة بتركيز 1000 ملغم / كغم	99
9	احتقان في الاوعية الدموية لنسيج الكلية عند المعاملة بالمستخلص الكحولي 1250 ملغم / كغم	100
10	مقطع في نسيج طبيعي لطحال حيوانات التجربة غير المعاملة	100
11	احتقان شديد في الجيوب الوريدية في نسيج الطحال عند المعاملة بتركيز 1000 ملغم / كغم و 750 ملغم / كغم	101
12	زيادة في النسيج اللمفي في نسيج الطحال عند المعاملة بتركيز 1250 ملغم / كغم	101
13	احتقان شديد وتفجي الهيولي في نسيج الطحال عند المعاملة بتركيز 1250 ملغم / كغم	102

قائمة المختصرات

List of Abbreviations

C	Control
B.	*Bacillus subtilis*
Ps.	*Pseudomonas fluorescens*
M	*Matricaria chamomile*
T.L.C	Thin layer chromatography
E.S.R	Erythrocytes Sedimentation Rate
P.C.V	Packed Corpuscular Volume
I.S.R	Induced Systemic Resistance
PGPR	Plant Growth Promoting Rhizobacteria
IAA	Indole -3- acetic acid
VOCs	Volatile Organic compounds
GA	Gibberellin
U.V	Ultra Violate
K.B	King's Medium Broth
p.p.m	Part per million
DMSO	Dimethyl sulfo oxide
EDTA	Disodium ethylene diamine tetra acetic acid
R.F	Relative flow
C.K	Cytokinin
LD_{50}	Lethal dose50
R.f	Relative flow

الفصل الأول
المقدمة
Chapter One
Introduction

1- المقدمة : Introduction

نظراً للتطور الكبير في مجالات توظيف الاحياء المجهرية في الانتاج الصناعي لذا فان استخدامها لم يعد مقتصراً على انتاج المركبات الصناعية والغذائية بل تعداه ليشمل انتاج مركبات دوائية وكيميائية وأهمها المضادات الحياتية (Antibiotics) ، منظمات النمو (Crowth regulators) ،المبيدات (Pesticides)، الاسمدة الحيوية (Biofertilizers) ، الطاقة والغاز الحيوي (المصلح والحيدري ، 1989).

استخدمت حديثاً تقنية لأسمدة الحيوية التي تساهم في تجهيز النباتات بقدر كبير من المغذيات كالعناصر المعدنية ومنظمات النمو لغرض تحسين كمية ونوعية الانتاج الزراعي (ابو عرقوب ، 2000).

يعد نوع الكائن المجهري المستثمر صناعياً مفتاحاً لنجاح او فشل العملية الاحيائية ، اذ ينبغي ان تكون له صفات ومميزات عامة اذا ما اريد للعملية الصناعية الاحيائية النجاح. وفي هذا المجال نال نوعا البكتيريا *Bacillus subtilis* و *Pseudomonas fluorescens* مركز الصدارة لامتلاكهما الكثير من مواصفات العامل الحيوي في مجالات تصنيع الاسمدة الحيوية (Safiyazov *et al*., 1995).

وقد اشارت دراسات عدة الى دور عزلتي البكتيريا *B. subtilis* و *Ps. Fluorescens* في زيادة النمو الخضري للنبات من خلال انتاجها العديد من المركبات المحفزة للنمو Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) وانعكاس ذلك على الحاصل ايجابياً (Burr *et al*., 1978 ؛ Kloeppr *et al*., 1980). اضافة لقابليتها على انتاج العديد من المضادات الحياتية مثل Pyrrolnitrin و Pyoleoteorin المثبطة لنمو العديد من المسببات المرضية في العديد من المحاصيل الاقتصادية المهمة (Yuming *et al*., 2003).

أجريت عدة دراسات في العراق على جنس *Bacillus* spp. ومنها دراسة للسيطرة على مرض تعفن الحنطة (الجميلي واخرون ، 2000). ونظراً لاهمية التسميد في العمليات الزراعية وسوء استعمال الاسمدة الكيميائية وما يتبعه من تأثيرات سلبية في البيئة فضلاً عن كلفتها العالية ، لذا تم التركيز في دول العالم المتقدم على استعمال الاسمدة الحيوية وبنطاق واسع لما تسببه من مؤشرات معنوية في النمو المورفولوجي والفسلجي للمحاصيل (الهيتي واخرون ، 1996 ؛ Zhang *et al*., 2002 ؛ Ryu *et al*., 2004).

ونتيجة للزيادة الكبيرة في عدد سكان العالم وارتقاء الوعي الصحي لدى الشعوب ، ازداد الطلب على الاعشاب الطبية المصنعة وبكميات كبيرة نظراً لكون الادوية التي يتناولها المريض تعمل في اغلب الاحيان على شفاء المرض ظاهرياً لكن تبقى مسبباته كافية لتتحول الى حالة مزمنة لاحقاً وقد تؤثر في مناعة ومقاومة الجسم للامراض الاخرى (المياح ، 2001).

درس العلماء والباحثون النباتات الطبية والتحري عن تأثيراتها وفوائدها العلاجية بشكل عام (قطب ، 1981 ؛ Nemecz ، 2000). شاع استعمال نبات البابونج *Matricaria chamomile* في الطب الشعبي

حيث عزلت العديد من مركباته الفعالة طبياً ، كالمركبات الفينولية والمتمثلة بالفلافونيدات ، والمركبات التربينية المتمثلة بالزيوت فضلاً عن الكلايكوسيدات وتعد مصدراً للسكريات ، والدهون ، والفيتامينات ، والزيوت العطرية وصبغات الازولين الصفراء (الدرويش ، 1983 ؛ Anne ، 2001 ؛ Repolles ، 2006). كما برزت الاهمية العلاجية لنبات البابونج ضد عدد من الامراض وخاصة في معالجة تخثر الدم (الطرفي ، 2006 ؛ Shivanada ، 2007). وظفت كل من بكتيريا *B. subtilis* و *Ps. Fluorescens* كأسمدة حيوية (Biofertilizers) لمعرفة مدى تأثيراتها في نمو نبات البابونج وكمية المواد الفعالة في مستخلصات الازهار واختبارها كمواد مانعة لتخثر الدم داخل وخارج الجسم الحي (Smith ، 2006).

1-1 الهدف من الدراسة :

بالنظر لقلة الدراسات في العراق في مجال التسميد الحيوي للنباتات الطبية ومنها البابونج وتأثير محتوياتها في معالجة امراض الدم وخصوصاً في تخثر الدم ، تم تطبيق ذلك على ذكور الفئران المختبرية ، وعلى ضوء ما سبق هدفت الدراسة الحالية الى : الحصول على سماد حيوي كفوء لنبات البابونج عبر المحاور الآتية :

1- التحري عن تأثير لقاح بكتيريا *B. subtilis* و *Ps. fluorescens* في تحسين نمو نبات البابونج وبعض الصفات المورفولوجية والفسلجية ومكوناته من مركبات الايض الثانوي المستخلص من ازهار النبات.

2- تحديد نوعية وتركيز المواد المانعة لتخثر الدم وزمن التخثر داخل الجسم الحي.

3- الكشف عن تلك المواد باستخدام تقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة Thin Layer Chromatography (TLC).

4- تجريع الحيوانات المختبرية بالمركبات الفعالة ودراسة تأثير ذلك في زمن تخثر الدم داخل الجسم الحي.

5- اجراء الفحوصات النسيجية في المعاملات التجريبية.

الفصل الثاني
استعراض المراجع
Chapter Two
Literature Review

2- مراجعة المصادر : **Literatures Review**

2-1 فسلجة وأهمية بكتريا ***B. subtilis***

ان اغلب الانواع التابعة لجنس بكتيريا *Bacillus* spp. لها القابلية على العيش داخل التربة بشكل مترممات (Saprophytes) ولها القابلية ايضاً للاحتفاظ بحيويتها بهيئة سبورات ساكنة وتتأثر بشكل كبير بالعوامل البيئية مثل تغاير درجات الحرارة ، انماط الزراعة ، نسجة التربة ، مستويات ملوحة التربة حيث يمكن ان تنمو بمحلول ملحي يتراوح بين 2 – 25% من كلوريد الصوديوم (Nicholson , 2002 ; Garbera *etal.*, 2003 ; Felske *etal.*, 2006 , Tilak). كما انها تتواجد بكثرة في منطقة الرايزوسفير (Rhizosphere) بواقع $10^3 – 10^6$ خلية / غم وزن طري. ومن اهم الانواع التابعة لهذا الجنس والمنتشرة في الترب الزراعية *B. subtilis* و *B. cereus* و *B. mycoides*. (Nicholson , 2002).

بين Todar , (2003) بأن بكتيريا *B. subtilis* يمكنها تحطيم المركبات العضوية كالدهون والكربوهيدرات والبكتين والسليلوز وجعلها مصدراً للطاقة والكربون. واشار (Kinsinger ; Fall *et al.*, 2003 , 2003) الى قابلية هذه البكتيريا على انتاج المضاد الحيوي Surfactin إذ وجدوا بأن النباتات الحاوية جذورها على كثافة عالية من بكتيريا *B. subtilis* المنتجة لهذا المضاد الحيوي توفر حماية كافية ضد المسببات المرضية.

اوضح Chen *etal* (2007) كفاءة البكتيريا *B. subtilis* في انتاج المضادات الحيوية المتعددة البروتينات الدهنية مثل المضاد الحيوي turin A كبروتين دهني له القدرة على كبح نمو العديد من الفطريات الممرضة اضافة الى المضادات الاخرى مثل Surfachin و Bacillomycin و Bacillysin و Bacillibactin ، كما وانتجت بكتيريا *B. subtilis* المضاد الحيوي Subtilisin المضاد لكثير من الفطريات الممرضة للنبات عند تنميته على الاوساط التخمرية الصلبة Solid state fermentation (Bhaskar *et al.*, 2008).

بين(2000) Kerovuo *etal* وآخرون كفاءة بكتيريا *B. subtilis* في انتاج انزيم Phytase المحطم Phytic acid والذي يؤثر بدوره في جاهزية الفوسفات في التربة اضافة الى تحطيم جدران خلايا الكثير من الفطريات ، كما وادى بدوره الى استحثاث الانبات في نبات الذرة وزيادة في معدلات اطوال النبات وزيادة في

طول المجموع الجذري والخضري (Idriss *et al., 2007*). ومقدرة بكتيريا *B. subtilis* في انتاج انزيم Chitinase المحطم لمادة الكايتين الموجود في اغلب الفطريات الناقصة .

اشار Kloepper *etal* (1988) ان الكثير من الاحياء المجهرية التي تستوطن منطقة الرايزوسفير لها المقدرة على تشجيع نمو النبات عندما تضاف الى البذور او الجذور والاوراق من خلال افرازها بعض المواد المنشطة للنمو المسماة بـ (PGPR) وتشمل الاجناس الاتية : *Bacillus* sp. ، *Pseudomonas* و *Azotobacter* .

كما وبينت الابحاث بمقدرة بكتيريا *B. subtilis* لانتاج الهرمون النباتي Indole acetic acid (IAA) بتركيز 10^{-6} – 10^{-7} مول / لتر في المزرعة السائلة وبفترة تحضين 24 ساعة (Idris *etal* (2007 واوضح Rekha *etal* (2006) لكفاءة هذه البكتيريا في انتاج IAA وكذلك المركبات العضوية الطيارة Volatile organic compound (VOC_3) اضافة الى الاثيلين .

2-2 استحثاث المقاومة الجهازية **Induced Systemic Resistance : (I. S.R)**

اشارت العديد من الدراسات الى ان عملية تحفيز المقاومة الجهازية (I.S.R) تم عن طريق عوامل حيوية غير مرضية توجد في منطقة المحيط الجذري الرايزوسفير وتمثلت هذه العوامل الحيوية بأنواع تابعة لجنس البكتيريا *Bacillus* spp. و *Pseudomonas* sp. على ان لا يحدث تفاعل بشكل مباشر بين البكتيريا والممرض (Ton *et al.*, 2002). ويعد انتاج المضادات الحيوية وتحفيز المقاومة الجهازية من الطرق المهمة والمكملة الواحدة للاخرى ، اذ تقوم المضادات الحيوية بأضعاف او قتل جزئي للممرضات تليها حدوث حالة توازن بين المجاميع الميكروبية المضعفة والنبات يكون في حالة دفاعية مميزة نتيجة لتحفيز اليات الدفاع بفعل البكتيريا والذي ينعكس ايجابياً في نمو النبات (Bakker *et al.*, 2003).

وبين Mathiyaz hagan *etal* (2004) قابلية البكتيريا *B. subtilis* على انتاج المواد الساحبة للحديد Siderophores بتحطيمها Garboxylate type وكذلك Hydroxamate type اضافة الى انتاجها للمركبات العضوية الطيارة (VOCs) والتي من ضمنها Methyl salicylic acid ومركب Methyl jasmonic acid . واشار Zhang *etal* (2008) بأن للمركبات العضوية الطيارة (VOCs) ايضاً دور في

زيادة كفاءة البناء الضوئي وزيادة مستوى السكر في كل من الاوراق والجذور والسنبلة لنبات *Arabidopsis thaliana* وبالتالي زيادة حيوية النبات وتقليل تأثير الشيخوخة الى حد كبير.

بين Samiyappan and Rajendran (2008) الى ان البكتيريا *B. subtilis* ادت الى زيادة في قابلية نبات القطن لمقاومة مرض سقوط البادرات Dampping off وذلك بزيادة معدلات انتاج Chitinase و Endogluconase و Peroxidase اضافة الى انزيم Phenol oxidase .

وتوصل العاشور (2009) بأن المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. subtilis* ساهم في زيادة انبات بذور نبات الباميا وبشكل معنوي وحماية كاملة من الاصابة بفطريات *Fusarium oxysporum* . كما واثبت ايضاً بامتلاك *B. subtilis* قابلية عالية في انتاج الهرمونات المنظمة والتي اسهمت وبشكل فاعل في زيادة الانتاج كماً ونوعاً.

3-2 الاسمدة الحيوية البكتيرية (Bacterial biofertilizers)

الاسمدة الحيوية عبارة عن مكونات حية ذات اصل ميكروبي تحوي خلايا بكتيرية وتضاف بشكل لقاح الى وسط نمو النبات ولها اهمية اقتصادية في مجال الزراعة من خلال زيادة جاهزية بعض العناصر الغذائية ، او من خلال اهميتها في تحليل المخلفات العضوية فضلاً عن دورها في افراز بعض الانزيمات (Enzymes) والهرمونات النباتية (Phytohormones) واهميتها في السيطرة الحيوية. (الشحات ، 2007)

تنتج الاسمدة الحيوية من عزل وتنقية وتوصيف احياء مجهرية مختلفة وتنقيتها واكثارها في مزارع ملائمة لحين استعمالها بوصفها لقاحاً يخلط مع البذور قبل الزراعة او تعفر به جذور البادرات او تضاف مباشرة في الحقل قرب جذور النباتات النامية وعادة ما تحمل على مواد عضوية مختلفة بعد اجراء اختبار الحيوية وبقائها لمدة مناسبة (الاسدي ، 2013).

نتيجة لارتفاع تكاليف استعمال الاسمدة الكيميائية الذي يعود اساساً الى الكميات المستعملة سنوياً من هذه الاسمدة فضلاً عن تلويث البيئة اتجهت الدراسات الحديثة الى استخدام الكائنات المجهرية بدلاً من الاسمدة

الكيميائية لتوفير العناصر الغذائية للنبات عن طريق حيوي من اجل خفض تكاليف الانتاج الزراعي وتقليل التلوث البيئي. اذ تستعمل الاسمدة الحيوية للتقليل من اضافة الاسمدة الكيميائية بما لا يقل عن (25%) فضلاً عن دورها في الحد من مشكلات التلوث البيئي وتعمل على استدامة الزراعة. تتباين انواع البكتيريا التي تضاف كسماد حيوي وتتباين استعمالاتها من حيث كونها تحرر للفسفور او المؤدية الى تحرير عنصر البوتاسيوم فضلاً عن وجود بعض الانواع التي تقوم بتحليل المواد العضوية . ولعل من اهم الانواع المستعملة في مجال التسميد الحيوي *Bacillus subtilis* و *Pseudomonas fluorescers* و *Rhizobia* sp. بانواعها المختلفة وتعد بكتيريا .sp *Azotobacter* و *Azospirillum* . وهناك انواع من الطحالب مثل الطحالب الخضراء المزرقة Blue green algae او السيانوبكتريا Cyanobacteria او بعض النباتات السرخسية المائية Water fern التي يطلق عليها بالازولا Azola التي يعيش في داخلها طحلب يسمى nabaena يستطيع تثبيت النتروجين الجوي ولذا تستعمل الطحالب في تسميد حقول الرز .(الشحات ، 2007).

قسمت الاسمدة الحيوية الى مجاميع حسب طبيعتها ووظائفها وكما مبين : المجلة العراقية لعلوم التربية (2010)

الجدول (1) تقسيم الأسمدة الحيوية حسب طبيعتها ووظائفها

No	Groups	Examples
N_2 fixing biofertilizers		
1.	Free-living	*Azotobacter , clostridium , Anabaenna*
2-	Symbiotic	*Rhizobium , Azollae*
3	Associativc Symbiotic	*Azospirllium*
P. solubilizing Biofertilizers		
1-	Bacteria	*Bacillus subtilis , Pseudomonas striate*
2-	Fungi	*Penicillum sp. , Aspergillus awemori*
P. mobilizing Biofertilizers		
1-	Arbusculer mycorrhize	*Glomus sp., Gigaspora sp.*
2-	Ectomycorrhize	*Laccaria sp., Botetus sp., Amanite spp.*
3-	Ericoid mycorrhize	*Pezizelle aricae*
4-	Orchid mycorrhize	*Rhizoctonia solani*
Biofertilizers for Micro nutrients		
1-	Silicate zinc solubilizers	*Bacillus sp.*
Plant Growth Promoting Rhizobacteria		
1-	Pseudomonas	*Pseudomonas fluorescens*

4-2 أهمية الإحياء المجهرية في التسميد الحيوي :

تؤثر الاحياء المجهرية الموجودة في التربة تأثيراً مهماً في تنظيم حركة المواد العضوية المتحللة وتوفير العناصر الغذائية للنبات مثل الفسفور والنتروجين والكربون ، فضلاً عن كونها تزيد من قابلية المجموع الجذري

في امتصاص العناصر الغذائية مما يؤثر ايجاباً في زيادة حاصل النبات. يختلف السماد الحيوي عن السمادين العضوي والكيميائي بتوفره طبيعياً وسهولة انتاجه ورخص ثمنه (Chen , 2007). وبين(2004) *Woitke etal* كفاءة بكتيريا *B. subtilis* في زيادة معدلات المساحة الورقية لنبات الطماطة تحت ظروف الشد الملحي اذ سبب المستحضر الحيوي للبكتيريا اعلاه زيادة في المساحة الورقية بمقدار 1.6 مرة مقارنة مع معاملة السيطرة.

اشار(2005)Thind *etal* الى كفاءة بكتيريا *B. subtilis* في زيادة معدل ارتفاع طول الساق في نبات الرز في حين وصل الى 71.8 سم / نبات متفوقاً على معاملة المقارنة والتي بلغت فيها الى 69.88 سم / نبات. وأثر المستحضر الحيوي ايضاً في زيادة معدل طول الجذر حيث بلغ 14.76 سم / نبات متفوقاً على معاملة السيطرة والتي بلغ فيها المعدل الى 8.52 سم / نبات.

توصل(2007)Swain *etal* الى التأثير السمادي الفعال للمستحضر الحيوي لبكتيريا *B. subtilis* في زيادة الوزن الطري لجذور نبات اليام فبلغ معدله 5.21 غم / نبات متفوقاً على معاملة السيطرة والتي بلغت 1.24 غم / نبات وكذلك بينت تلك الدراسة تأثيراً ايجابياً في زيادة الوزن الطري للساق في معاملة المستحضر الحيوي اذ اظهرت تفوقاً على سائر المعاملات فبلغ معدل الوزن الطري للساق 4.19 غم / نبات متفوقاً على معاملة السيطرة والتي بلغت 1.02 غم / نبات . وسببت البكتيريا ايضاً زيادة في معدلي الوزن الجاف لكل من الساق والجذر فبلغا 0.47 غم / نبات و 0.39 غم / نبات على التوالي متفوقاً على معاملة السيطرة والتي بلغ فيها المعدلين الى 0.12 غم / نبات و 0.11 غم / نبات للساق والجذر على التوالي ، وقد علل(2007) Swain *etal* ذلك بقدرة البكتيريا على انتاج منظمات النمو (Growth regulators) من خلال تنميتها في وسط زرعي سائل يحوي بادئات الحامض الاميني Tryptophan وكذلك امكانية البكتيريا على تصنيع الاوكسين (IAA) والجبرلين في منطقة المحيط الجذري معتمدة على النواضح الجذرية في منطقة الجذر.

اوضح كل من(2008) Haike andl Atef الاثر السمادي الفعال لبكتيريا الـ *B. subtilis* في زيادة معدلات الانبات في بذور نبات الخيار اذ اعطى المستحضر الحيوي اعلى نسبة انبات من بين المعاملات وبلغت 97.78% متفوقة على معاملة السيطرة بدون اضافة لقاح الفطر الممرض والتي بلغ فيها نسبة الانبات الى 95.33% وتراجعت النسبة في معاملة السيطرة بوجود العامل الممرض الى *Pythium ultimum* الى

ادنى مستوى فبلغت 48.89% بسبب التأثيرات المرضية لهذا الفطر ، واظهر المستحضر الحيوي ايضاً كفاءة في زيادة معدلات ارتفاعات بادرات نبات الخيار اذ بلغ معدل الارتفاع في معاملة المستحضر الحيوي 28.09 سم / نبات متفوقاً على معدل الطول في معاملة السيطرة بدون ممرض حيث بلغ المعدل 27.63 سم / نبات ، وانخفض معدل الارتفاع في معاملة المقارنة بوجود الفطر الممرض الى 22.5 سم / نبات.

وبينت الاسدي (2013) أهمية المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. subtilis* والمحمل على مادة كاربونات الكالسيوم كفاءة في تثبيط نمو الفطرين *Aspergillus flavus* و *Aspergillus parasiticus* وبتركيز 0.1 غم / لتر من المستحضر الحيوي. واشارت ايضاً الى فعالية المستحضر الحيوي *B. subtilis* في حماية بذور الحنطة والشعير والذرة الصفراء من الاصابة بالفطريات المذكورة اعلاه والتلوث بسم الافلاتوكسين مع زيادة نسبة الانبات في الحبوب المعاملة بالمستحضر الحيوي ،فضلاً عن السلامة الصحية للمستحضر اذ لم تظهر أي تأثيرات مرضية او صحية على الحيوانات المختبرية المعاملة بها.

واوضح العاشور (2009) ان التركيز 5 غم / لتر من المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. subtilis* هو الاكثر تثبيطاً لفطري *Fusarium oxysporium* و *Rhizoctonia solani* وبنسب تثبيط عالية ، واسهم كذلك في زيادة معايير النمو وجاهزية العناصر ومعايير الانتاج لنبات الحنطة.

5-2 فسلجة وأهمية بكتريا ***Pseudomonas fluorescens***

وصفت العديد من الاحياء المجهرية في مجال الاضافات الحيوية والتسميد الحيوي وخاصة الاحياء الدقيقة المتوطنة في التربة او المحمولة فيها واحتلت انواع البكتيريا التابعة لجنس *Pseudomonas* وخاصة بكتيريا *P. fluorescens* الاولى ومركز الصدارة في هذا الجانب الحيوي لعدة اسباب منها سهولة العزل

والمعالجة فضلاً عن الصفات البيئية والفسيولوجية التي تجعلها مرشحة في جانب التسميد الحيوي Biofertilization وعلى النحو الاتي :

1- الموطن الطبيعي للبكتيريا هو التربة وتخصصها الدقيق على المواد العضوية في المنطقة المتأثرة بالجذور والـ Rhizosphere فضلاً عن قابليتها في الاستغلال نواضح الجذور في التغذية ومن ثم تواجدها على سطوح الجذور مباشرة Rhizoplane (Sands and Rovira1971).

2- تنتج البكتيريا انواعاً عديدة من المضادات الحيوية في موقع تواجدها مثل Phenazine ، Phloroglucinol ، Pytoluteorin و Oomycin التي كان لهم دور فعال وايجابي في منع سقوط البادرات في البنجر السكري. اضافة الى ذلك فان بكتيريا *P. fluorescens* تنتج العديد من المركبات الطيارة Volatile compounds مثل الامونيا وسيانيد الامونيا HCN (Rosales *etal.*, 1995). وتم تحديد عن عدد من العوامل المؤثرة في انتاج تلك المركبات مثل الزنك ، درجة الحرارة ، التلامس السطحي ، الجهد المائي ومصادر الكربون والحديد.

3- وجد من خلال الدراسات ان المنتجات الايضية لبكتيريا *P. flourescens* هي عوامل الاستحثاث الفعالة للمقاومة الجهازية (Gava and Dowling, 1994). اما Kessman *etal* (1994) وآخرون فقد استعملوا عوامل استحثاث كيميائية واحيائية لاستحثاث مقاومة جهازية في التبغ والخيار ضد الضرر من المبيد Paraquat وكلوريد النحاس . (Xiang *et al.*, 1995).

4- ادى استخدام هذه البكتيريا الى زيادة معنوية في كل من اوزان المجموع الجذري والخضري وطول النبات والوزن الجاف للرز وانعكس ذلك ايجابياً على الحاصل كماً ونوعاً للرز (الهيتي وآخرون ، 1996).

5- اعطى اللقاح البكتيري *P. fluorescens* حماية لبذور وبادرات الحنطة وخفض معدلات الاصابة بالفطر *Rhizoctonia solani* في النبات وبمعنوية عالية بلغت 4.1% في حين بلغت في معاملة المقارنة بـ 24.5% وزيادة عالية ايضاً من الانتاج (الجميلي والوائلي ، 2000).

6- اشار الكرخي (2001) الى قابلية سلالة البكتيريا *P. fluorescens* على تثبيط نمو الفطر *R. solani* في الوسط الزرعي بنسبة 100% وكذلك تفوق معاملة اللقاح البكتيري في خفض النسبة المئوية لموت البادرات الطماطة الى 18.44% بينما بلغت في معاملة المقارنة حوالي 90%.

7- بين الرواشدة (2002) بأن العلاقة بين نوعي البكتيريا *P. flurorecens* و *Azospirillium irakense* هي علاقة تعايشية اضافة الى امكانية استعمال المنتوج الحيوي بين نوعي البكتيريا احيائياً مع تفضيل التركيز 100 غم / كغم بذور اذ اظهر المنتوج كفاءة عالية في مؤشرات النمو والانتاجية العالية لمحصول الطماطة.

8- في عام 1978 تم ضم انواع جنس *Pseudomonas* الى مجموعة PGPR من قبل(1992) Kloepper, حيث افترض عدد من الاليات التي تحفز بها البكتيريا نمو النبات بشكل مباشر او غير مباشر وتتلخص كالاتي :

A- الآليات المفترضة لتحفيز نمو النبات بشكل مباشر من بكتيريا PGPR

الية	التأثير المحفز لنمو النبات
تثبيت النتروجين المرافق للجذر	محتوى النتروجين والعناصر المغذية
تثبيط تخليق الاثيلين في النبات	طول الجذور
اذابة الفسفور	محتوى الفسفور والعناصر المغذية
اكسدة الكبريت	محتوى الغذاء للمجموع الخضري
زيادة نفاذية الجذور	امتصاص الغذاء .

زيادة النترات	محتوى النتروجين .
استحثاث المقاومة الجهازية للممرضات	خفض تطور الاعراض المرضية
انتاج الاوكسين ، سايتوكينين ، او الجبريلين	المواد الحية للجذر او الفروع ، تفرع الجذور

B- الآليات المفترضة لتحفيز نمو النبات بشكل غير مباشر من بكتيريا PGPR

الية	التأثير المحفز لنمو النبات
زيادة في العقد الجذرية للبقوليات	محتوى النتروجين ، زيادة الانتاج
زيادة في العقد الجذرية لنبات الالدر (Alder)	محتوى النتروجين
زيادة تكرار الاصابة بفطريات المايكورايزا الداخلية	العناصر المغذية
زيادة عدد المايكورايزا الخارجية لاطراف الجذور	العناصر المغذية
كبح البكتيريا الضارة على سطح الجذور	العناصر المغذية

6-2 أثر المزج بين الاحياء المجهرية والاداء الحياتي لها:

نظراً للتأثيرات الفعلية والايجابية في زيادة نمو النبات وتأثيره المثبط في الممرضات اتجه التفكير الى زيادة ومضاعفة هذه التأثيرات عن طريق اضافة مواد محفزة او مساعدة للبكتيريا لاعطاء نتائج وتحفيز افضل لنمو النبات.

لاحظ(1995) Raaijmarkers *etal* ان خلط بكتيريا *P. flourescens* وبكتيريا *P. putida* اعطى نظام مقاومة عال ضد الفطر *Fusarium oxysporium* المسبب لمرض الذبول الفيوزارمي على الفجل ، تمثلت بافراز مركبات Siderophores (المواد المخلبية) من قبل *P. putida* وتحفيز المقارنة الجهازية من النوع *P. flourescens* اذ كانت نسبة الاصابة 43% مقارنة بالنباتات غير المعاملة اذ بلغت نسبة الاصابة فيها بـ (73%).

وجد(1996) Duffy *etal* ان استعمال اللقاح البكتيري لبكتيريا *P. flourescens* مع الفطر *T. koningii* ضد الفطر *Gramiisvar mihii* المسبب لمرض الفناء (Take-all) على محصول الحنطة اعطى كبحاً افضل للمرض مقارنة باستعمال الفطر لوحده او البكتيريا لوحدها اذ قامت بحماية البذور قبل

انباتها وبعد الانبات حيث قدم الفطر والبكتيريا حماية مشتركة. وبين(1999) DeBoor *etal* ان استعمال الخلط بين السلالات المتوافقة من البكتيريا *P. flourescens* يعطي نتائج ايجابية في كبح الممرضات ، مثل استخدام سلالات متوافقة من بكتيريا اثبت قابلية فائقة في كبح نشاط الفطر *Fusarium oxysporium* على نبات الفجل وتقليل نسبة الاصابة بالذبول وزيادة في الانتاج كماً ونوعاً.

اشار الرواشدة (2002) الى امكانية المزج بين بكتيريا *P. flourescens* وبكتيريا *Azospirillium irakense* لمكافحة الفطر *F. oxysporium* ولانتاج سماد حيوي منهما لتحسين نمو وانتاج الطماطة حيث اعطى التركيز 100 غم/كغم بذور اعلى مؤشرات للنمو وخفض نسبة الاصابة بالذبول الفيوزارمي.

2-7 نبات البابونج

2-7-1 تسمية ووصف نبات البابونج

يعود جنس نبات البابونج Matricaria الى العائلة Compositae والاسم الشائع له هو البابونج الالماني German chamomile (قطب ، 1981). الاسم العلمي لنبات البابونج طبقاً للقوانين الدولية للتسمية النباتية *Chamomilla matricaria* (Rauschert , 1990). البابونج نبات عشبي يبلغ ارتفاعه نحو (15–50) سم ساقه قائم سريع النمو ، كثير التفرع يزهر بعد (6–8) اسابيع من انباته. اوراقه متبادلة ، ريشية، عديمة السويق ، خضراء داكنة اللون، تتكون زهيرات من نورات هامة او رأسية لها رائحة التفاح ولهذا يسمى بتفاح الارض (مقبول والساكت ، 1995).

تتكون الزهرة من نوعين من الازهار ، زهيرات شعاعية بيضاء ، واخرى قرصية صفراء اللون كثيرة العدد ، صغيرة الحجم ، ويتراوح قطر النورة الزهرية من (1.5 – 2) سم (قطب ، 1980 ومقبول والساكت ، 1995 ، الطبال ، 2000). وهناك نوع اخر من البابونج الذي يعود الى جنس واحد هو البابونج الروماني (Roman chamomile) الذي يختلف عن البابونج المحلي بالصفات الاتية :

1– الساق مدادة وليست قائمة ترتفع على الارض فقط عند اطرافها .

2– الازهار كثيرة العدد ، وتوجد في اكثر من محيط واحد ، اما الازهار القرصية فعددها اقل من البابونج المحلي (الالماني) (قطب ، 1980 ؛ محمود مجيد ، 1988).

2-7-2 الظروف البيئية المؤثرة في نمو البابونج

تؤثر عوامل كثيرة في نمو نبات البابونج منها درجة الحرارة اذ تؤثر في النمو الكلي للنبات وعلى تكوينه للاوراق وبالتالي كفاءة التركيب الضوئي ، وبما ان المركبات الفعالة لاي نبات طبي هي عبارة عن نواتج ثانوية لذا فأن طبيعة ونوعية الزيت الطيار Volatile oil تتأثر بدرجات الحرارة العالية(Franz , 1986) .

بين(Jedreszko and Suchorsca (1988 ان الزيادة في محتوى الزيت لها علاقة مباشرة بنمو النبات وانتاج المادة الجافة والمواد الناتجة والمواد المخزونة في النبات نتيجة للعمليات الحيوية. البابونج نبات شتوي يتحمل البرودة ولكنه يحتاج الى نهار مشمس وكلما كان الجو دافئاً كلما كان نموه افضل ونسبة المكونات الفعالة تكون اكبر. وقد اثبتت التجارب انه ينمو في مختلف الترب ولكن افضل تربة لزراعته هي التربة التي تتميز بوجود نسبة جيدة من الطين ، اذ تزرع البذور نثراً في المشاتل ثم تنقل الشتلات الى التربة بعد شهر من زراعتها (كامل وكامل ، 2000).

يفضل التبكير في زراعة البابونج والتبكير في الشتل ايضا وافضل موعد هو نهاية شهر ايلول واوائل شهر تشرين الاول ، بذور البابونج رهيفة لذا يراعى زراعتها في ارض سبق ريها ولا تروى الا بعد انباتها حتى لا تتجمع مع مياه الري . النبات يحب الماء ولذلك يتوقف عدد الريات على نوع التربة ومدى احتفاظها بالماء (باشي ، 2004).

تكون زهرة البابونج قابلة للقطف عندما تحتوي على اعلى نسبة من الزيت الطيار ، وقد اثبتت التجارب ان انسب وقت لجمع الازهار هو بعد 3–4 ايام من اكتمال نمو الزهرة ، وان انسب وقت لجمع الازهار هو وقت الظهيرة لاحتوائها على اعلى نسب من الزيت الطيار ، وهذا يخالف القاعدة المعروفة العامة التي تقول : (ان النباتات الطبية التي تحتوي على زيوت طيارة يجب ان تجمع في الصباح الباكر) ويعرف الوقت المناسب لجمع الزهرة بوساطة ازهارها فاذا كانت الازهار مائلة الى اعلى فان النورة الزهرية تكون مازالت لم يكتمل نضجها بعد ، اما اذا كانت مائلة الى اسفل فان النورة تكون قد نضجت وتأخر موعد نضجها ، اما اذا كانت الازهار الشعاعية في وضع افقي فان هذا يدل على الوقت المناسب لجمع النورات الزهرية (محمود ومجيد ، 1988 ؛ وكامل وكامل ، 2000).

8-2 الاهمية الطبية للبابونج

يعد البابونج من النباتات المقدسة ، اذ يطلق عليه في اوربا بمصطلح Cure all أي (العناية بكل شيء) وفي المانيا يطلق عليه alleszutrat والتي تعني (القدرة على كل شيء) Capable of all thing (Tyler , 1994 ؛ Presser , 2000 ؛ Juras , 2004).

يستعمل البابونج الالماني في مجال الغذاء لاحتواءه على بعض المركبات مثل (Rutin ، Thiamin ، Niacin و Choline) كذلك يحتوي على بعض الفيتامينات منها فيتامين A وفيتامين C (Anon ، 2001). بعد الميلاد ظهرت الحضارة الرومانية ، وقد استعمل البابونج بشكل واسع الطبيب الروماني Pliny مؤلف كتاب (التاريخ الطبيعي) الذي وصف البابونج وبين استعمالاته الطبية واهميته العلاجية ، اضافة الى الكثير من العلماء الرومان منهم جالينوس ، وابو قراط اذ وجدا في كتاباتهم بحث علمي شامل تضمن الاستعمالات الطبية للبابونج (Pappas , 2006 ؛ Foster , 2000 ؛ Salaman , 1992).

وقال جالينوس عن البابونج : هو قريب القوة من الورد في اللطافة ، لكنه حار وحرارته كحرارة الزيت ، ملطف ، مرخ ، مسكن الاورام الحارة يقوي الاعضاء العصبية ، مقوي للدماغ ، نافع للصداع ، ينفع الرمد والبثور والحكة والجرب ، يذهب اليرقان ، يدرر البول ويخرج الحصاة ويدرر الطمث وينفع في كل حمى (Repcak and Senior 1993 ؛ Mazokopakis , 2005).

واشار Avallone *etal* (2000) ان مغلي البابونج له تأثير في تحفيز المناعة ويساعد تحفيز هرمون Thyroxine . لا يستعمل البابونج اكثر من 14 يوماً ، 3 مرات يومياً لانه مهدئ قوي وقد يصاب المستعمل له بالغثيان ، تؤدي التراكيز العالية منه الى النوم (Anonymous , 1991). ولا يجمع بينه وبين الادوية الحاوية على الحديد لانه يحتوي على مادة Tannin التي تقوم بسحب الحديد.

(Gilbert , 2007 و Fraunfelder , 2004 ؛ WHO , 1999)

اثبتت الدراسات ان البابونج يعمل مضاداً للاكسدة ويفيد في مرض سرطان الجلد (Flavallon *et al*., 2000 و Zeilmann , 2003). يشابه مستخلص البابونج الوارفارين من حيث أحتوائه على الكومارين ودوره في منع تخثر الدم وذلك لارتباطه مع فيتامين K ويقلل من هذا الفيتامين الذي يعد عاملاً مهماً في عملية تخثر

الـــــدم ، وعنـــــد اســـــتعماله مـــــع الوارفـــــارين يجـــــب استشـــــارة الطبيـــــب المختـــــص (Wang *et al.*, 2005 ؛ Heck *et al.*, 2000 ؛ Blumenthal *etal.*, 2000)

يستعمل البابونج في علاج الزكام او يزيل الاحتقان ويستعمل لمعالجة التهاب الانف والاذن والجيوب الانفية والحنجرة وبحة الصوت والسعال المزمن واجفان العين المصابة بالتهاب الغدد الدهنية فضلاً عن أستعماله لعلاج آلام الروماتيزم (Al-Rawi , 1990).

كما ويستعمل ايضاً لمعالجة امراض اللثة والديدان الطفيلية والملاريا والتعرقات وتشققات الجلد ويزيل اثار السموم من الجسم وازالة البثرات الموجود في الفم (Mill , 1991). وقد سجل رسمياً في عدد من دساتير الادوية فيه كثير من الدول منها (استراليا ، مصر ، فرنسا ، السويد وروسيا).

(New wall *et al.*, 1996 ؛ Bradley, 1992).

يعد البابونج مشروباً اساسياً يتناوله الناس في الصباح في الدول الاوربية ، يقيه من نزلات البرد والام المغص (Krivenko *et al.*, 1989 ؛ Wichti and Bisset , 1994 ؛ Bruncton,1995). يستعمل شاي البابونج طارداً للغازات او يستعمل لدوار السفر والرشح الانفي والقلق النفسي ويحفز الانتباه الذهني (قطب ، 1980 ؛ الزبيدي وآخرون 1996).

وجد ان مستخلص البابونج يقوم بالتئام الجروح ويعالج الطفح الجلدي عند استعماله موضعياً على شكل Cream مع الـ hydrocortisone بنسبة (0.025%). ويقلل ايضاً من التهابات الجلد. (Vanketel , 1987 ؛ WHO , 1999).

اكدت التجارب ان الجزء الفلافوني Flavonoides او المستخلص الخام للبابونج يستعمل ضد الالتهابات الجلدية في داء حب الملوك Corton وان مادتي apigenin والـ Lutcolin هي اكثر فعالية من عقار Indomethacin (Della Logia , 1990 ؛ Brinker , 2001). ووجد ان المستخلص الكحولي لازهار البابونج له تأثير مثبط (Bacteriostatic) في نمو جراثيم *Streptococcus mutants* و *Staphyllococcus aureus* وله تأثير مبيد (Bacterocides) لبكتريا *Bacillus megatherium* (Cinco, 1983).

يستعمل مغلي البابونج في حالات التهاب المسالك البولية ويجلب النوم والراحة والهدوء لذا يستعمل كشراب للصغار يساعدهم على النوم في الليل (Yamada *et al.*, 1996 ؛ Gyllenhaal *et al.*, 2000 ؛ Maddocks , 2004).

توصل(2009) Ali and Enas الى ان المستخلص الكحولي لازهار البابونج بعد خلطها بنسبة 50% من الكوفيرات لمعالجة الالتهابات الجلدية في جلد الفئران المصابة بالبكتيريا الممرضة *Staphyllococcus aureus* والفطر *Candida albicans* وبتركيز 40 ملغم / مل.

2-9 المركبات الفعالة لنبات البابونج

وجد(1987)Carle *etal* ان الزهيرات القرصية لنبات البابونج تحتوي على صبغات صفراء وهي الازولين كمادة مهدئة وتحتوي ايضاً على الفلافونويدات التي يساعد في حماية الجلد من الاشعة فوق البنفسجية ، اما الابجنين فله ايضاً تأثير مهدي ومزيل للتعب والقلق.

اشار كل من(1997) Meyer (1999) and Schikhe إلى إن مادة الازولين الموجودة في ازهار البابونج هي مادة فعالة ومن خواصها انها تحتوي على حوامض دهنية وغير مشبعة كزيت الزيتون ، وللتفريق بين مادة الازولين الموجودة في البابونج والازولين الموجودة في النباتات الاخرى فقد اطلق اسم (شام ازولين) وهو ازرق اللون في نبات البابونج.

تستخدم تقنية TLC (Thin Layer Chromatography) و HPLC (High Performance Liquid Chromatography) لعزل وتشخيص المركبات الفعالة (Radell *et al.*, 1981 ؛ Dolle *et al.*, 1985 ؛ Tyler *et al.*, 1988). اضافة الى الزيوت الطيارة التي هي خليط معقد من المواد الهيدروكربونية والمركبات الاروماتية Aromatic المتكونة جميعاً بالتخليق الحيوي عن طريق عمليات التمثيل الغذائي ، وتوجد بصورة متجمعة ومتراكمة في الانسجة لبعض الاعضاء المختلفة كالازهار والجذور والاوراق والنباتات العطرية (ابو زيد ، 2001). كما وتوجد تغايرات في مكونات زيت البابونج تعتمد على حجم العينات المستخدمة والمدة الزمنية للتقطير ، حيث تم تشخيص مركبات وحددت بنسبة مئوية وهي : -bisabolol

A oxide (20−30%) و B bisabolol-oxide (8−12%) و a-bisabolol (8−14%) اضافة الى chamazule (7.5%).

يكون لون الزيت الحديث الاستخلاص ازرق غامق كثيف وقوي الرائحة ويرجع السبب في لونه الازرق الى وجود مادة كامازولين ، وتبلغ نسبة مادة الازولين قرابة (5%) من الزيت الطيار ويحتوي ايضاً على (120) مركباً تم تشخيصها حديثاً ومنها ماتريكارين (Pino *etal* , 2002).

يمتاز الزيت العطري للبابونج بأنه يتبخر ويتطاير عند تعرضه للهواء وله رائحة عطرية قوية ويذوب في الايثر (المذيبات العضوية) وتوجد الزيوت العطرية الطيارة في قرابة ستين (60) عائلة نباتية متحدة مع مواد اخرى مثل الاصماغ والراتنجات (السامرائي ، 2003).

تحتوي ازهار البابونج على flavonol glycoside و Rutin وكذلك على hydroxyl coumarin واهم مركباتها Herniarin ومواد هلامية بنسبة 10% (Svehlikova *et al.*, 2004).

10-2 النباتات الطبية الاخرى واثرها في تخثر الدم

1- الشاي الاخضر : Green tea (*Camellia sinensis*)

تحتوي اوراق الشاي الاخضر على فيتامين K وهذه تؤثر في coumadin وتسبب انخفاض تأثير الكومادين ومن ثم انخفاض زمن التخثر (Mukhtar and Ahmad , 1999).

2- الزنجبيل : Ginger (*Zingiber officiale*)

يستعمل للامراض الجلدية والتهاب المفاصل اذ يمنع الصفائح الدموية من التجمع ويثبط انزيم Thrombxan synthetase (Backon , 1986).

3- الثوم : Garlic (*Allium sativum*)

يمنع الثوم تجمع الصفائح الدموية ايضاً ويزيد من النزف الـ Bleeding وترجع هذه الفعالية الى وجود مادة allicin (Rose *et al*., 1990).

وقد اجريت عدة تجارب لمعرفة تأثير الثوم في حل الليفيين في مصل الدم ، ودرست على ثلاث مجاميع الاولى اشخاص اصحاء ، والثانية مرضى باحتشاء القلب المزمن ، والمجموعة الثالثة باحتشاء عضلة القلب الحاد ، وقد عولجت هذه المجاميع بالثوم حيث سبب زيادة في حل الليفيين بنسبة 30% في المجموعة الاولى و 83% في المجموعة الثانية من خلال ثلاثة اشهر وفي المجموعة الثالثة 63% .

4- فول الصويا Soybean (*Glycine max*)

وجد(2005) Han and lee ان مستخلص فول الصويا يحتوي على مضاد للثرومبوبلاستين.

5- الطرطيع Suwad (*Schanginia tribracteata*)

يؤثر الطرطيع في اطالة زمن النزف والتخثر في الزجاج (*in vitro*) وفي الجسم الحي (*in vivo*) (الصراف ، 1996).

6- التين : Ficus (*Ficus carica* L.)

وجد الصراف وأخرون (2005) بأن المستخلص الكحولي لاوراق التين له تأثير مضاد لتخثر الدم.

واشار Amy *etal* (2000) ان هناك اعشاب مثل جذور عرق السوس ، والقرنفل ، البصل والكرفس لها تأثيرات مضادة ايضاً لتخثر الدم.

ان اعتبار الاعشاب الطبية مستحضرات آمنة لانها طبيعية هو مفهوم خاطىء لانها قد تحتوي على مواد فعالة قد يكون لها تأثير جانبي Side effect اذا اخذت مع بعض الادوية ، لذا يجب استشارة الطبيب المختص قبل تناول الأعشاب وخصوصاً في حالة الحمل والرضاعة او بعض الامراض (جنيدي ، 2005).

2-11 تخثر الدم : **(Blood coagulation)**

تخثر الدم هو رد فعل هام ضد النزف حيث يتجنب الجسم فقدان كميات كبيرة من الدم عندما يتمزق الوعاء الدموي مسبباً اندفاع الدم بغزارة ، لذا تحدث ثلاث عمليات مهمة هدفها التقليل من كمية الدم الذي يفقده الجسم (Ramd and hurray , 1999)(Murray and Balah , 2003).

العملية الأولى :

تبدأ بتقلص الوعاء المصاب ويليه تعرض الكولاجين تحت البطاني والتصاق الصفيحات وتكدسها على سطح الوعاء المتأذي فتشكل سدادة ، تتم هذه المرحلة خلال (3–7) دقائق وتحرير المواد القابضة التي تزيد من شدة التكدس (Bachmann , 1980).

العملية الثانية :

تشكيل خثرة الفبرين fibrin في الموضع المصاب ، حيث ان سطح الصفيحات يحفز (Catalyzes) تشكيل الثرومبين من معقد Prothrombinase بوجود الكالسيوم Ca^{++} اللذين تحررا بعد تنشيط الصفيحات (Roberts and Escobar , 2002)

العملية الثالثة :

تقلص الخثرة الثابتة التي تتألف من تجمع شبكة الصفيحات الدموية الهشة وخيوط الفبرين fibrin والكريات الحمراء ، حيث ان تقلص صفيحات دم المريض في هذه الحالة ، يتطلب بروتين العضلات الملساء والثرمبوستين Thrombostenin لضغط الخثرة (Columan etal., 1987).

12-2 عوامل تخثر الدم : Factors of blood coagulation

الاسم	الرقم	الوظيفة
Fibrinogen	I	خثرة (الليفيين)
Prothrombin	II	الفعال (IIa) ينشط العوامل I و V و VIL و XII وبروتين C والصفائح الدموية
Tissue – factor	III	عامل مساعد لعامل VIIa موجود في اغشية الخلايا
Calcium	IV	متطلبات عوامل التخثر لربط مع

Phosphor lipid		
عوامل مساعدة لعامل x ينشط بواسطة Thrombin	V	Proaccelering Labile factor
يسمى قديماً بالعامل Va	VI	
تنشيط العوامل IX و X	VII	Stable factor
موجود في البلازما يرتبط مع العامل (VWF) من عوامل مساعدة لعامل IX ينشط بواسطة الثرومبين	VIII	Anti-hemophilic factor
ينشط العامل X ويكون معقد مع العامل VIII	IX	Christmas factor
ينشط العامل II ويكون معقد من Prothrombinase مع العامل V	X	Stuart – power factor
ينشط العوامل XII و Prelalli Kerin و IX	XI	Plasma thromboplasim antecedent
ينشط Prellalli Kerin وانزيم Fibrinolysis	XII	Hageman factor
يرتبط مع الفيبرين Fibrin	XIII	Fibrin – stabilizing factor

13-2 انحلال الفبرين او تحلل الخثرة (Clot resolution)

هي المرحلة الاخيرة من احداث التخثر تبدأ بفعل الثرومبين وتفعيل البروتين C وتحريض مفعلات البلاسمينوجين (Plasminogen) على التحرر من جدار الوعاء الدموي والبروتين C بالتعاون مع البروتين S المحرض بحد ذاته ، يثبط الفاعلية المخثرة للعاملين VIIIa و Va ومفعلات البلاسمينوجين (Plasminogen) بشطر الزايموجين (Zymogen) والبلازمينوجين (Plasminogen) الى البلازمين (Plasmin) الذي يهضم بدوره الفبرين (Fibrin) (Giangrande , 2003). يقوم الثرومبين بعدة اعمال مختلفة فضلا عن ما يقوم به من تشطير الفايبرينوجين الى فبرين وهي :

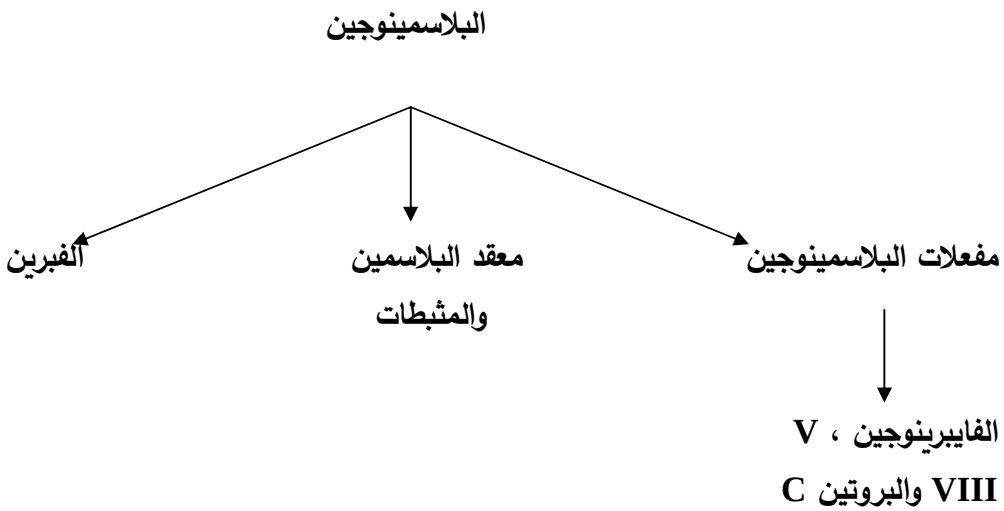
أ- يفصل الصفيحات باظهار فاعلية عواملها للتخثر.

ب- يشطر العامل VIIIa والعامل الخامس المفعل Va ويعزز التجلط.

ج- يعمل على البطانة بارتباطه على سطح البروتين الثرمبومودلين حتى يفصل البروتين C العامل الفعال للعاملين Va و VIII اللذان يشيران تحلل الفبرين .

د- يسبب تقلص الاوعية الدموية (Adcock *et al*., 2002).

كما في الشكل (1):



الشكل (1) انحلال الفبرين (Grangrande , 2003)

14-2 أنواع الخثر الدموية : **Types of clots**

تعد الخثرة الوريدية اكثر شيوعاً من الخثار الشرياني حينما يكون جريان الدم (Blood – flow) ضعيفاً او متوقفاً ونادراً ما تكون التغيرات في بطانة الاوعية الدموية هي السبب في حدوث الخثار (Adcock , *et al*., 2002).

ويتكون الخثار الوريدي من كتلة صغيرة في الصفيحات مع ليفين Fibrin وعدد من كريات الدم الحمر ويشبه الخثرة المتكونة داخل الوريد مظهرياً وبشكل عام خثرة الدم المتكونة في انبوبة الاختبار في الزجاج (Clora *et al*., 2003). يسبب الخثار الوريدي انسداداً كاملاً في مجرى الاوعية الدموية الكبيرة كالوريد باطن

الركبة Popliteal vein والوريد الفخذي Femoral vein والوريد الحرقفي Goxa vein . وقد يسبب الخثار النسيجي Tissue infraction (Hyers *et al*., 2001 ; Hirsh *et al*., 2003).

اما الخثار الشرياني فيتكون حول فتحات تفرعات الشرايين ويحدث بسبب جرح بطانة الوعاء الدموي وبذلك تتكدس الصفيحات ويلتصق هذا التكدس Aggregation موضعياً ويزداد حجمه بالتصاق عدد من الصفيحات الاخرى ويحدث انسداداً موضعياً في عمل تكون الخثار الشرياني وترتبط دائماً بامراض بطانة الشريان (Intimal disease) (Hirsh ,2001 ، Michael , 2002).

ان زيادة مستوى الكوليسترول للبلازما (Plasma cholesterol) وثلاثي الكليسيريد Tri glycerides تؤدي الى تغيير في شرايين كل من الحيوانات المختبرية والانسان فضلاً عن التغيرات التي تحدث في الجريان ، كل هذا يؤدي الى التصاق الصفيحات الدموية وبدء تكوين الخثرة (Smith *etal* , 1990). يزداد حدوث الخثار الشرياني لدى النساء اللواتي يتناولن موانع الحمل الفموية (Oral contraceptive) ، ويعزى ذلك الى وجود مركبات هرمون الاستروجين في هذه المستحضرات (Poller *etal* , 1968).يعد ضغط الدم العالي هو من العوامل الخطيرة المسببة للتصلب العصيدي واثبتت البحوث بوجود تخثرات دموية ضعيفة في الاوعية الدموية المخية لمرضى ارتفاع ضغط الدم (Berglund ، 1976). ومن العوامل الخطيرة ايضاً هو التدخين الذي يساعد على زيادة تكدس الصفيحات الدموية وان نسبة الاصابة بمرض التصلب العصيدي (Atherosclerosis) وتثخن جدران الشرايين يكون اكثر حدوثاً لدى المدخنين ويكون التدخين من العوامل الخطرة لحدوث تصلب الشرايين (A therosclerosis obiterans) والالتهاب الوعائي الخثاري Thromboangitis obliterans (Schweain , 1997 ؛ Schtwartz , 1977).

15-2 : مضادات التخثر من الاصل الحيواني

1- الهيرودين : **Hirudin**

ان الهيرودين هو مانع للثرومبين ومانع ايضاً للثرومبوبلاستين وهو الموجود في الغدد العنقية للعلق الطبي ويؤثر في فعالية كل من العاملين الثامن (XIII) والتاسع (IX) (Davies , *et al*., 1969).

2- الهيبارين : **Heparin**

يتركز الهيبارين في الكبد والرئتين ، تحتوي خلايا الدم البيض بداخلها مادة الهيبارين التي تحررها البلازما ونظراً لقلة عدد هذه الخلايا في الدم ، لذا فانها لا تعد مصدراً مهماً للهيبارين (عبدالفتاح ، 1988). ويترسب بوساطة الكحول والاسيتون ويذوب في الماء (Fisher and Chmitz , 1933) وهو يحافظ على سيولة الدم وقد استخدم في داخل الجسم الحي كعلاج لجلطة الدم.

(Triplett , 2002 ؛ Toilefsem , 1981).

بين(2001) Hirsh *etal* بأنه يبطل الخطوتين المهمتين وهما تكوين الثرومبين وتكوين الفبرين (Cole *etal* , 1984). واوضح(Feinstein 1982) و (Fenton , 1991) ان المعالجة بالهيبارين في الوريد لمرضى الجلطة تزيد من زمن الثرومبوبلاستين بمقدار (1.5 – 2.0) مرة اكثر من الطبيعي.

3- سموم الافاعي :

ان معظم سموم الافاعي هي مخثرات للدم ويشذ عن هذه السموم (سم الكوبرا) فهو مضاد لتخثر الدم بمنعه تكوين الثرومبين وكذلك يؤثر في عمل الثرومبوبلاستين والاقراص الدموية .

(Dam and Kruse , 1950)

16-2 مضادات التخثر ذات الاصل النباتي

1- الوارفارين : **Warfarin**

يعمل الوارفارين كمضاد للتخثر بتثبيطه العوامل (II و VII و IX و X) وبروتين C بواسطة الانزيم كاربوكسيليز Carboxylase من خلايا الكبد ويعمل على اكسدة فيتامين K وتعطيل عمله . وهو يطيل من زمن Prothrombin وزمن الـ Thromplastein (Hoffbrand and Pettit , 1995).

وجد ان اعطاء جرعة فعالة من الوارفارين لمرضى التجلط يختزل الفعالية التخثرية للدم الى حوالي 50% بعد (12) ساعة من عملية التجريع بالوارفارين (Hirsh , 2003). ونتيجة للعلاقة الوثيقة بين الفعالية التخثرية

لعامل التخثر بالبروكونفرين وخطر الاصابة بامراض تجلط الاوعية الدموية القلبية (Francis and Berlcowitz , 2002).

لوحظ ان اعطاء الوارفارين عن طريق الفم من شأنه ان يمنع او يثبط عملية ايقاف اضافة الكاربوكسيل مما ينتج عنه عدم ارتباط عوامل التخثر (II و VII و IX و X) مع الدهون المفسفرة للصفيحات الدموية (Guyton and Hall , 1996). وهذا يؤدي الى انتاج وتحرير عدد من الجزيئات غير الفعالة الى البلازما التي تدعى (بالبروتينات المحثة) بغياب فيتامين K (PIVKA) (Protein induced by vitamin K-absence) ومن ثم تثبيط عملية تخثر الدم (Tivadar *et al*., 2002).

17-2 آلية تخثر الدم : **The blood clothing mechanism**

تبين ان هناك مسلكان لتخثر الدم هما :

1- المسلك الخارجي لتخثر الدم : **Extrinsic pathway**

يبدأ هذا المسلك من عامل النسيج Thromboplastin الذي يتحرر من النسيج المصاب فينفعل العامل السابع (VII) ويفعل بدوره العامل (X) غير الفعال ويحوله الى شكله الفعال (Xa) بوجود ايونات الكالسيوم. فضلاً عن ذلك فان المعقد (عامل النسيج + العامل VIII + Ca^{+2}) يمكن ان يفعل العامل التاسع (IX) (Baumann and Heuck , 1991). حيث ان تجمع معقد Prothrombinase البلازما على سطح الصفيحات يحسن من كفاءة تفعيل Prothrombin العامل (II) ويحوله الى Thrombin بوجود العامل الخامس (V) والثرومبين الناتج بشطر الفايبرينوجين الذي هو بروتين ذائب غير متناظر ، كبير الحجم يتألف من ثلاثة ازواج من سلاسل متعدد الببتيد هي Cc و Aa و Bb (Vancott *et al*., 2001).

2- المسلك الداخلي لتخثر الدم : **Intrinsic pathway**

يبدأ هذا المسلك من تفعيل العامل (XII) من على السطح الوعائي ، او يبدأ من تماسه بسطح آخر سالب الشحنة كالزجاج . ان محرضات تفعيل العامل (XI) تشمل البريكاليكرين Perekallikrein الذي يتركب من Kininogen ذي الوزن الجزيئي الكبير (HMWK) (High Molecular Weight Kininogen) والعامل (XI) . ان المعقد السطحي الذي يتشكل يفعل بكفاية فعالية العامل (XIL) ، ويحوله الى شكله الفعال (XIIa) فيحول هذا بدوره العامل (XI) غير الفعال الى شكله الفعال (XIa) كما يحول

البريكاليكرين الى شكله الفعال Killakrein الذي يشطر (HMWK) فينتج Brady kinin شكل رقم (1) ، بعد ذلك يأتي دور العامل (XIa) ويفعل العامل (IX) وربما يفعل ايضاً العامل (VII) الموجود في المسلك الخارجي للتخثر ، ويشطر البلاسمينوجين Plasminogen ويحوله الى بلاسمين Plasmin وهنا تبدأ آلية انحلال الفبرين(Fibrinolysis) كما بدأت الية التخثر(Guyton and Hall, 1996؛ Adcok,2002).

ان العامل (XIa) الحادي عشر الفعال يتطلب وجود ايونات الكالسيوم ++Ca حتى يفعل العامل التاسع (IX) الذي يرتبط بعامل (VIII) ، وان العامل التاسع الفعال (IXa) بفعل العامل (X) اللافعال ويحوله الى عامل فعال (Xa) بوجود الكالسيوم ++Ca والشحم الفسفوري (Phospholipid) يتم هذا التفعيل على الغشاء البلازمي للصفيحات الدموية الممرضة(cohn *etal* , 1997).

18-2 أسباب زيادة تخثر الدم

هناك مسببين رئيسيين لزيادة تخثر الدم وقد يجتمع السببان في الشخص نفسه ، او قد يحدث احدهما بشكل منفصل عن الاخر (Awidi *etal* ,1999).

الأسباب المكتسبة

1- العمليات الجراحية التي تحتاج لتخدير عام تطول مدته عن النصف ساعة.

2- الجلوس لفترات طويلة دون حراك.

3- تعاطي الادوية مثل موانع الحمل (Awidi *et al*., 1999).

4- السمنة المفرطة.

الاسباب الوراثية :

1- خلل في عمل البروثرومبين (Tuddenham and Cooper , 1994).

2- نقص في المقاومة لمادة الثرومبين (Thrombin deficiency) ، ويعد ابطال مفعول هذه المادة من العوامل المهمة التي تمنع تخثر الدم (Ruddock and Meade , 1994).

3- مقاومة عمل بروتين C (Protein C resistance) وقد يسمى هذا العامل بعامل خمسة لايدن (Leiden V factor) وذلك نسبة لمدينة (لايدن) الهولندية التي اكتشف فيها ويورث هذا العامل بشكل سائد (Awidi , 1999).

4- اسباب وراثية اخرى وهي نادرة ومنها خلل في مادة بلاسمينوجين (Michael , 2002).

2-19 مضادات التخثر في الزجاج

1- EDTA (Ethylene Diamine Acetic Acid) :

وهو مفيد بشكل خاص لدراسة الصفيحات الدموية وتظهر فعاليته باتحاده مع ايون الكالسيوم (Ca^{++}) (Proesche ، 1951).

2- اوكزالات الصوديوم او البوتاسيوم:

هذه المادة ترسب ايونات الكالسيوم Ca^{++} الموجودة في الدم بصورة طبيعية وهو العامل الرابع (IV) حيث يكون له دور مهم في تحويل عامل التخثر البروثرومبين الى ثرومبين لذا فأن اضافة هذه المادة الى الدم يفتت قدرته على التجلط ويطلق على الدم الذي منع تجلطه باضافة اوكزالات الصوديوم او البوتاسيوم بالدم المؤكسل (Oxalated blood) (Gottfried and Rachi , 1977).

3- صبغات ازو (Azo dyes):

يظهر تأثير هذه الصبغة بمبادلتها للثرومبوبلاستين وذلك لاحتوائها على الاسترات ومنها استر حامض الكبريتيك وهي مضادة لتخثر الدم ويشابه عملها عمل الهيبارين.(Ouick , 1942)

4- **سترات الصوديوم :**

وهي من المواد الشائعة الاستخدام في مختبرات جمع ونقل الدم والمانعة لتخثر الدم وذلك باتحادها مع الكالسيوم.

2-20 الاسبرين وتخثر الدم :

تظهر الفعالية المباشرة للاسبرين بتأثيره على العضلات الملساء في جدران الاوعية الدموية وكذلك اطالة مدة النزف (Bleeding – time) لذلك يمنع المرضى المصابون بالنزف الدموي (Hacmophilia) ونقص فيتامين K من تناوله (Brown , 2002). يعمل الاسبرين ايضاً على منع فعالية انزيم (Fatty acid cyclo

oxygenase) لكل من الاقراص الدموية من قبل الخلايا البطانية ، لذلك يستعمل للوقاية من الجلطات التي تؤدي الى ازمات قلبية او جلطات دماغية وخاصة بعد سن الاربعين .

وقد يستعمل الاسبرين كمانعاً للالتهابات (Antiflammantory) وخافض للحرارة (Analgesic) وذلك بتأثيره على تثبيط انزيمات انتاج مادة البروستاكلاندين (Prostaglandin) وهي السبب الرئيس للاحساس بالالام عن طريق تأثيره في مركز الالم والحرارة في المخيخ (Vane, 1971; Smith and Willis , 1971). ويمنع استخدام الاسبرين للمرأة الحامل لانه يؤدي الى تأثير ضار على الجنين (Tivadar, 2002 ؛ Vane, 1971).

21-2 الايض الثانوي في النباتات : **Secondary metabolism in plants**

يعرف الايض الثانوي في النبات بأنه مجموعة من التفاعلات الكيميائية المسيطر عليها انزيمياً والتي تنتج طاقة بهيئة ATP مصاحبة لمركبات قد يحتاجها النبات للنمو والتطور ، وان انتاج المركبات الثانوية قد يختلف باختلاف الظروف البيئية للنبات وكذلك على نوع العناصر الغذائية وكمياتها المتوافرة وغالباً ما يكون لها دور دفاعي ضد الآفات والمسببات الممرضة . وقد توفر الحماية للنبات ضد التعرض للاشعة فوق البنفسجية والاجهادات ، وقد تكون بهيئة زيوت طيارة او صفات لجذب الملقحات (Pollinators) (Hermann and Weaver , 1999).

وتعد المركبات الثانوية المصدر الرئيس للعقاقير الطبية والمواد الفعالة التي تدخل في تحضير الادوية او تستعمل بوصفها مواد خام لانتاج عدد من المركبات الكيميائية التي تدخل في تصنيع عدد من الادوية المهمة (قطب ، 1980 ؛ Avallone , 2000).

صنف (Hopkins, 2008 ؛ Szake, 2004 ؛ Peter, 2003) مركبات الايض الثانوي في النبات اعتماداً على تركيبها الكيميائي الى :

1- المركبات الفينولية : (Phenolics compounds)

تحتوي جميع المركبات الفينولية على حلقة بنزين مرتبطة بمجموعة الهيدروكسيل (OH) ، وهي ذائبة بالماء وتتضمن مجموعة الكومارين (Coumarin) المضادة للتجلط وهي من ابسط المركبات الفينولية .

وتتكون من Orthohydroxy cinnamic acid ، ذات طعم مر وتذوب بالكحول ، ومجموعة الفلافونات Flavonoids الذي يعطي اللون للنبات المعروف Chromone وهي ذائبة بالماء موجودة في الفجوات او الكروموبلاست . اما مجموعة التانينات Tannins فتتواجد في النبات بشكل خليط من المواد الفينولية يصعب فصلها ، تذوب في الماء والكحول وهي مادة قابضة (Harborn , 1984).

2- المركبات القلويدية : (Alkaloids)

مركبات ثانوية عضوية تحتوي على عنصر النتروجين (قطب ، 1980).

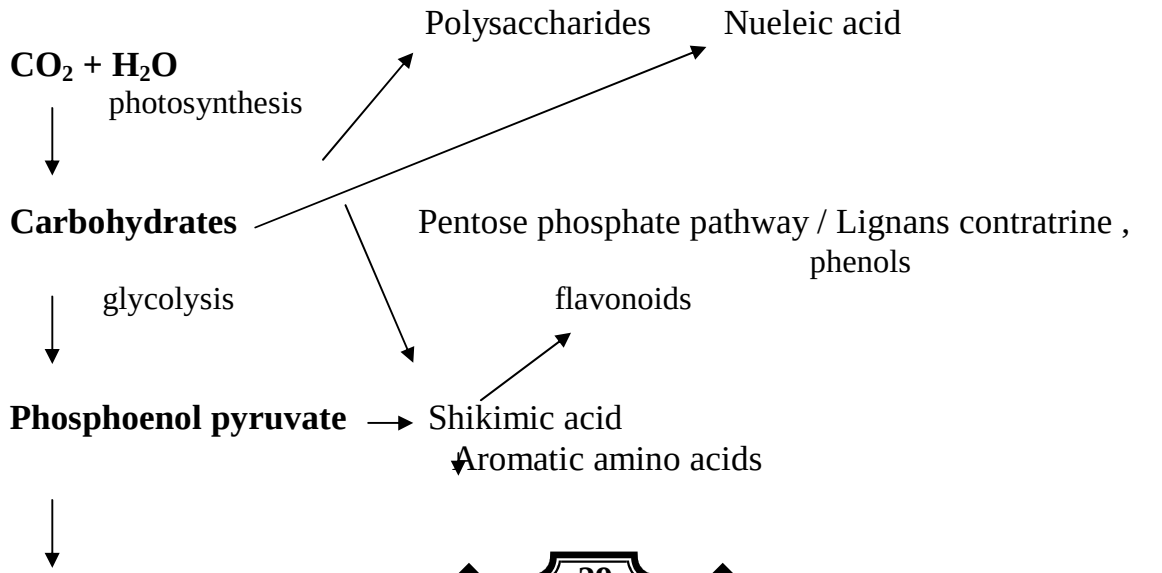
3- المركبات التربينية : (Terpinoids)

مركبات ذائبة في الدهون وتتكون من وحدات Isoprene وتشمل :

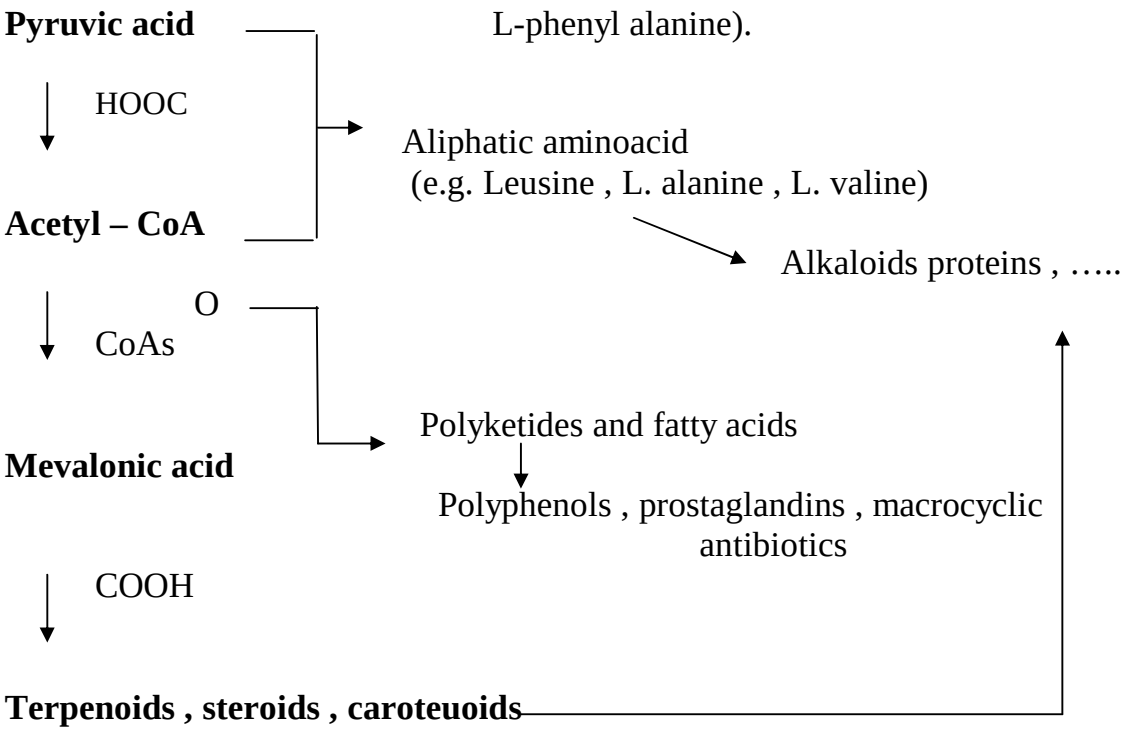
A- الزيوت الاساسية : (Essential oils) : تتجمع في غدد خاصة في النبات ، عديمة اللون ، قليلة الذوبان في الماء ، ذات رائحة عطرية ، تتبخر بسرعة في درجة حرارة الغرفة (Tyler *et al.*, 1988).

B- الصابونينات : (Saponins) : وهي مركبات معقدة التركيب تشبه الكلايكوسيدات لارتباطها بجزيئة سكر (Basu and Rastogi ,R.P.(1967)..

C- الكلايكوسيدات : (Glycosides) : مركبات عضوية تتحلل بسرعة وينتج من تحللها مواد سكرية Glycon ومواد غير سكرية Aglycon (Harborn, 1984).



(e.g. L-tryptophan , L-tyrosine ,



الشكل (2) مسار الحمض الثانوي في النباتات (Tolenon , 2003)

الفصل الثالث
المواد وطرائق العمل
Chapter Three
Materials & Methods

3- المواد وطرائق العمل : Materials and Methods

3-1 المواد الكيميائية المستعملة في الدراسة :

ت	المواد	الشركة المصنعة	المنشأ
1-	كحول اثيلي Ethanol	Fluzerlandka , AG , Buchs.	Switzerland
2-	كحول مثيلي Methanol	Fluzerlandka , AG , Buchs.	Switzerland
3-	الفرسنيت Disodium ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA)	Bioneer	U.S.A
4-	كلوريد الحديديك	BDH chem..... Ltd.	England
5-	خلات الرصاص	BDH chem..... Ltd. Pool	England
6-	هيدروكسيد البوتاسيوم	BDH chem..... Ltd. Pool	England
7-	كلوريد الزئبق	BDH chem..... Ltd. Pool	England
8-	نترات البزموث	Fluzerlandka , AG Buchs.	Switzerland
9-	كبريتات الصوديوم	BDH chem..... Ltd. Pool	England
10-	كلوريد الكالسيوم	BDH chem..... Ltd. Pool	England
11-	كلوريد الصوديوم	Fluzerlandka , AG Buchs.	Switzerland
12-	حامض الخليك الثلجي	BDH chem..... Ltd. Pool	England
13-	كبريتات الصوديوم	BDH chem..... Ltd. Pool	England
14-	سترات الصوديوم الثلاثية	BDH chem..... Ltd. Pool	England
15-	اوكزالات الامونيوم	BDH chem..... Ltd. Pool	England
16-	اوكسيد الزئبق	Fluzerlandka , AG Buchs.	Switzerland

17-	ثنائي اثيل ايثر	BDH chem..... Ltd. Pool	England
18-	حامض البكريك المائي المشبع	Merk , Darmstadt.	Germany
19-	جليسيرول	BDH chem..... Ltd. Pool	England
20-	زايلين	BDH chem..... Ltd. Pool	England
21-	شمع البرافين	BDH chem..... Ltd. Pool	England
22-	صبغة الايوسين	Riedle . de – Hean	Germany
23-	صبغة جنش البنفسجية	Fluka , AG , Buchs.	Switzerland
24-	صبغة لشمان	Fluka , AG , Buchs.	Switzerland
25-	فينول	BDH chem..... Ltd. Pool	England
26-	كندا بلسم	Merk , Darmatad.	Germany
27-	كاشف الكالسيوم Ca – Reagent	BDH chem..... Ltd. Pool	England
28-	كاشف خضاب الدم Hb – Reagent	BDH chem..... Ltd. Pool	England
29-	كاشف البروثرومبين Prothrombin - Reagent	Diamed AG , 1785 , Cresler	Switzerland
30-	كاربونات الكالسيوم	معمل بغداد	Iraq
31-	اسيتون 80%	BDH	Iraq

2-3 الاوساط الزرعية المستعملة في الدراسة الحالية

ت	الوسط	الشركة المصنعة	المنشأ
1-	وسط الاكار المغذي	Himedia	India
2-	وسط المرق المغذي	Himedia	India
3-	وسط اساس الدم	Himedia	India

3-3 العُدّد والاجهزة المستعملة في الدراسة : Instruments

استعملت العديد من العُدد والاجهزة وشملت ما يأتي :

ت	المواد	الشركة المصنعة	المنشأ
1-	اطباق بتري Petridish	Unisonic , LTD.	England
2-	دوارق Flasks	Unisonic , LTD.	England
3-	حاضنة Incubators	Labteeh	Chory
4-	خلاط كهربائي Blender	National	Japan
5-	طاحونة Grinder	National	Japan
6-	فرن كهربائي Electric - oven	Heracus	German
7-	موصدة Autoclave	Allamerican	U.S.A
8-	ميزان حساس Sensitive – balance	Sartorins AG , Gottingen.	Germany
9-	ميزان طبي	Sartorins	Germany

Germany	Sartorins AG , Gottingen.	حوض الفصل بكروموتوغرافيا الطبقة الرقيقة Thin Layer Chromotography	10-
Germany	Aesculap – Werke , Tuttingen	جهاز الاستخلاص Soxhlet	11-
U.S.K.	UVP , IN	U.V. Transilluminator	12-
Germany	Memmerr – GMbH, Schwedach , FRG.	حمام مائي Water bath	13-
Japan	Olympus	المجهر	14-
Japan	Oska	داد كريات الدم الحمر	15-
U.S.A.	Concord	ثلاجة	16-
England	Geraticules , Ltd.	المقياس الدقيق العيني والمقياس الدقيق المسرحي	17-
Japan	Shimadzu.	المطياف الضوئي	18-
Germany	Unisonics	شريحة العد Haemocytometer	19-

3-4 تحضير لقاح البكتيريا

3-4-1 تحضير لقاح بكتيريا *Bacillus subtilis*

تم الحصول على نزلات بكتيريا الـ *B. subtilis* بصورة مسحوق جاف من قسم التحليلات المرضية كلية العلوم الطبية التطبيقية / جامعة كربلاء.

أجريت سلسلة من التخافيف العشرية للمستحضر الحيوي الجاف وبواقع (10^{-1} – 10^{-11}) تحت ظروف التعقيم التام مع استعمال ماصة نظيفة ومعقمة لكل تخفيف الى انفراد ، نقل (1) مل من كل من التخافيف الثلاثة وهي (10^{-9} – 10^{-10} – 10^{-11}) الى اطباق زجاجية معقمة قطرها (9) سم حاوية على وسط المرق المغذي Nutrient – agar (N.B) وبمعدل ثلاث اطباق لكل تخفيف ثم حضنت الاطباق بدرجة حرارة (37 ± 1)° م ولمدة (24) ساعة (حميد ، 2001 ؛ العاشور ، 2005).

اختيرت الاطباق الحاوية على مستعمرات تتراوح من 30 و 300 مستعمرة بكتيرية ثم حُسب التركيز النهائي للبكتيريا في 1 مل حسب ما ورد في (Clark , 1965).

3-4-2 تحضير لقاح بكتيريا **Pseudomonas fluorescens**

تم الحصول على نزلة البكتيريا (Ps) من مختبر السموم / كلية الزراعة / جامعة بغداد. وتم اكثار العزلة على الوسط السائل King's Medium Broth (K.B) المكون من (20 غم ببتون ، 10 غم كليسرول ، 1.5 غم K_2HPO_4 ، 1.5 غم من $MgSO_4.7H_2O$) مذابة في لتر ماء مقطر (Cowan, 1977). كررت عملية الاكثار كلما دعت الحاجة ، عقم الوسط بجهاز التعقيم البخاري Autoclave في دوارق زجاجية سعة كل منها 250 مل ولقح كل دورق بالبكتيريا ووضعت في هزاز كهربائي مدة (10) دقائق بعدها حضنت على درجة حرارة 23 ± 1° م مدة 48 ساعة (Leben *etal*., 1987).

سحب 1 مل من الوسط السائل (K.B) الحاوي على البكتيريا بواسطة ماصة معقمة واضيفت الى انبوبة اختبار حاوية على (9 مل) ماء مقطر معقم ، وحضرت منه سلسلة من التخافيف (10^{-1} – 10^{-8}) في انابيب اختبار كل منها يحوي على (9 مل) ماء مقطر معقم ، حضرت خمسة اطباق محتوية على وسط (K.B)

الصلب ولقحت بمعلق البكتيريا بمعدل (0.1 مل) لكل طبق ، حضنت بدرجة حرارة 23 ± 1 م مدة 48 ساة، حسبت بعدها دد المستعمرات في كل طبق واستخرج المعدل وضرب في مقلوب التخفيف (Clark, 1965).

3-4-3 مزج نوعي البكتيريا ***B. subtilis*** و ***P. fluorescens***

تم تحضير (50ml) وسط المغذي السائل Nutrient broth في دوارق زجاجية حجم (250) مل بعد التعقيم بجهاز المؤصدة (Autoclave) بدرجة حرارة (121) م وضغط (15) باوند / انج^2 لمدة (20) دقيقة وبعد تبريدها لقحت بالاحياء المجهرية وكالاتي :

1- دورق (1) من لقاح البكتيريا *B. subtilis* و *P. fluorescens* وذلك باضافة (1) مل من لقاح كل نوع البكتيريا.

2- دورق (2) من لقاح البكتيريا *B. subtilis* بمفردها وذلك باضافة (1) مل من اللقاح.

3- دورق (3) من لقاح البكتيريا *P. fluorescens* بمفردها وذلك باضافة (1) مل من اللقاح.

حضنت الدوارق بدرجة حرارة (30) م لمدة (48) ساة (العنسي ، 1999) بعدها تم تحضير الوسط الصلب Nutrient agar وبعد تعقيمه وتبريده تم صبه في اطباق ، وتمت اضافة (0.1 مل) مل من لقاح كل معاملة الى الاطباق ثم حضنت بدرجة حرارة (30) م لمدة (48) ساة ، ثم حسبت دد المستعمرات الكلية والمفردة حسب طريقة العد بالاطباق (Clark, 1965).

3-5 زراعة نبات البابونج الـ Chamomile لغرض الدراسة :

تم الحصول لى ازهار البابونج من محلات لبيع الاشاب في بغداد / الكاظمية (صورة رقم 1) ، تم تشخيص النبات من قبل د. بدالكريم البيرماني / المعشب/ كلية العلوم للبنات / جامعة بابل لى انه البابونج المحلي (الالماني) *Matricaria chamomile* .

3-5-1 تعقيم النورات الزهرية

قمت النورات الزهرية (صورة رقم 2) الحاوية الى البذور سطحيا بمادة هايبوكلورات الصوديوم (NaOCL) خفف الى 1% لمدة (10) دقائق ثم غسلت ثلاث مرات متتالية بالماء المقطر المعقم لمدة (5) دقائق في كل مرة لازالة اثار المادة المعقمة .

(Ramawat, 2004 والمجدلاوي ، 2008 و Aasim, 2010 وحمد وجاسم ، 2011).

حساب نسبة انبات البذور المعقمة

وضع (0.5) غم من البذور المعقمة في طبق زجاجي وبثلاث مكررات ، اضيف اليها قطرات من الماء ، حضنت البذور الى درجة حرارة (25 ± 1) م واضاءة 1000 لوكس لمدة (16) ساعة يومياً ، سجلت نسبة الانبات بعد (7) ايام ، وطبقت المعادلة الاتية لحساب النسبة المئوية للانبات:

$$\% \text{ للانبات} = \frac{\text{عدد البذور النابتة}}{\text{العدد الكلي للبذور}} \times 100$$

وتم حساب عدد البادرات البازغة لحين وصول نسبة الانبات الى ما يقارب 100% .

3-5-2 تلقيح البذور بلقاح B. subtilis and Ps. Fluorescens ومزيج اللقاحين معاً :

بعد حساب نسبة الانبات لبذور البابونج اجريت عملية التلقيح بنوعي البكتيريا والمزيج معاً وذلك بترطيب سطح البذور بمحلول مائي من الصمغ العربي تركيز 40% (وزن : حجم) ، قلبت عدة مرات وتركت لتجف لمدة (1) ساعة.

المعاملات المستخدمة في الدراسة :

A- بذور بابونج منقوعة بماء معقم لمدة (5-10) دقائق.

B- بذور بابونج منقوعة بالمعلق البكتيري *B. subtilis* لمدة (5-10) دقائق.

C- بذور بابونج منقوعة بالمعلق البكتيري *Ps. Fluorescens* لمدة (5-10) دقائق.

D- بذور بابونج منقولة بمزيج من لقاحي نولي البكتيريا *B. subtilis* و *P. fluorescens* ولمدة (5-10) دقائق .

زراعة البذور :

زرلت البذور المعقمة والملوثة بنولي البكتيريا والمزيج معاً باحواض بلاستيكية بابعاد (35 × 80) سم تحتوي لى تربة مزيجة/ رملية تم تعقيمها باقراص التعقيم المحببة (Garanular Basmid) وبمعدل (30) غرام / م^2 ولى لمق (20-25) سم تم خلطه جيداً مع التربة وسقيها ، تم بعد ذلك التأكد من زوال الغازات السامة لن طريق اجراء فحص الانبات (Germination test) بزرلة بذور الرشاد *Lepidium sativum* L. وحساب نسبة الانبات.

كما واجري تحليل كيميائي شامل للتربة المعقمة والمعدة للزرلة (جدول 1). وبعد مرور (7-10) ايام من الشتل وملت بلقاح نولي البكتيريا كلاً لى حدة والمزيج ايضاً وحسبت التراكيز التي حددت لكل من *B. subtilis* و *P. fluorescens* وبواقع (4 × 10) وحدة تكوين مستعمرة / مل لكل من *B. subtilis* و *P. fluorescens* وبحجم 50 مل / شتلة في منطقة المهاد (Seed bead) من المعلق البكتيري.

6-3 الزراعة في تربة غير معقمة في الحقل

تحضير واعداد ارض التجربة

نفذت التجربة في حقل النباتات الطبية التابع لكلية الصيدلة ، جامعة كربلاء بتاريخ 2014/2/20 . وبشكل خطوط والمسافة بين كل خط واخر (30كم) ، واجريت العمليات الزراعية لغرض تهيئة التربة بدءاً من ملية الحراثة وتنعيم التربة ، بعدها تم تقسيم الحقل الى ثلاث قطلات وبواقع ثلاث مكررات لكل معاملة اضافة الى معاملة السيطرة (Control) وبإبعاد 1 × 1 م ، وتم اجراء كافة العمليات الزراعية للتخلص من الادغال المنافسة للنبات حتى نهاية نضج النبات وجمع الازهار ، حيث تم اضافة سماد حيواني (مصدره الماشية) مخمر وبواقع 3 كغم / لوح قبل الزرلة.

الشكل رقم (1) ازهار نبات البابونج *M. chamomile*

الشكل رقم (2) النورات الزهرية لأزهار نبات البابونج المستخدمة في المستخلصات

الجدول (1) بعض الصفات الكيميائية والفيزيائية لتربة الحقل

الصفة	الوحدة	تربة معقمة
pH	-	7.9
E.C	ديسيسمنز .م$^{-1}$	4.7
Na	جزء بالمليون (ppm)	223.1
K	جزء بالمليون (ppm)	38
P	جزء بالمليون (ppm)	182
Mg	جزء بالمليون (ppm)	352
Cl	جزء بالمليون (ppm)	216
SO_4	جزء بالمليون (ppm)	256.7
HCO_3	جزء بالمليون (ppm)	550
NO_3	جزء بالمليون (ppm)	7.0
الرمل Sand	غم. كغم$^{-1}$	550
الغرين Silt	غم. كغم$^{-1}$	290
الطين Clay	غم. كغم$^{-1}$	160
نسجة التربة Texture		مزيجة رملية Sandy loam

- **تم تحليل عينات التربة المعقمة في مختبرات قسم التربة والمياه – كلية الزراعة – جامعة بغداد .**

3-7 دراسة مؤشرات النمو :

3-7-1 دراسة مؤشرات النمو المورفولوجية والفسلجية قبل التزهير

مؤشرات النمو قبل التزهير شملت :

1- ارتفاع النبات (سم) : تم قياس ارتفاع النبات من سطح الارض ولغاية الى نقطة في الفرع الرئيسي بالمسطرة.

2- دد الافرع الخضرية، ودد البرام الخضرية.

3- تقدير محتوى العناصر المعدنية قبل التزهير وذلك باختيار مجموة شوائية من الاوراق من كل نبات ولكل معاملة لى انفراد ، ثم غسلت بالماء وتركت لتجف وذلك بوضعها بأكياس ورقية في فرن كهربائي لى درجة حرارة (50 م) ولمدة 48 سا ة ، بعدها طحنت العينات بواسطة هاون خزفي ثم وزن من كل ينة مطحونة (0.2) غم هضمت باستعمال حامض الكبريتيك والبركلوريك المركزين وفقاً لطريقة ( ) (Ibrahim and Majeed , 2001) قدرت تراكيز ناصر النتروجين (N) والفسفور (P) والبوتاسيوم (K) والحديد (Fe). في مختبرات الدراسات العليا / كلية الزرا ة / جامعة بغداد ولى النحو الاتي :

أ- النتروجين : باستعمال جهاز Microkjeldahl

ب- الفسفور : بالطريقة الطيفية

ج- البوتاسيوم : باستعمال جهاز Flame photometer

د- الحديد والزنك والنحاس والكالسيوم والمغنيسيوم والمنغنيز والصوديوم بواسطة جهاز مطياف الامتصاص الذري (Atomic Absorption spectrophotometer).

3-7-2 تقدير محتوى الكلوروفيل

استعملت طريقة Harborne (1973) مع بعض التحويرات لتقدير كميتي الكلوروفيل A و B وكالاتي :

حصدت دة اوراق من كل نبات ومن كل معاملة بصورة شوائية ومن مناطق مختلفة وبعمر اربعة اشهر قبل التزهير، ثم قطعت الى قطع صغيرة بسكين حاد ومعقم ، بعدها وزن 0.05 غم من قطع الاوراق

ووضعت في هاون خزفي مع اضافة كمية قليلة من كاربونات الكالسيوم $CaCO_3$ لتسهيل عملية الاستخلاص ، بعدها اضيف 20 مل اسيتون وبتركيز 80% واستمرت عملية السحق لمدة 10 دقائق .

رشح بعدها الخليط بواسطة قطعة من الشاش ، احتفظ بالمستخلص والراسب الى الهاون الخزفي اضيف 10 مل اسيتون 80% . كررت الخطوات الانفة نفسها ثلاث مرات بعدها جمع المستخلص ورشح بواسطة ورق ترشيح نوع Whatman No. 1 في قمع زجاجي مثبت على دورق زجاجي واكمل حجم الراشح بعد انتهاء عملية الترشيح الى 100 مل اسيتون 80% .

استعمل جهاز المطياف الضوئية Spectrophotometer ، بعد تعيير الجهاز بواسطة الاسيتون ثم قدر الكلوروفيل بنوعيه A و B وعلى الطول الموجي 663 و 646 نانوميتر بالتتابع وكالاتي :

Chl. A gm / L = 12.12 (AB663) – 2.81 (AB646)

Chl. B gm / L = 20.13 (AB646) – 5.03 (AB663)

ثم حسبت كمية الكلوروفيل لكل 100 غم من النسيج النباتي اعتمادا على المعادلة الاتية :

$$mg / 100\ g = \frac{g / L}{1000\ ml} \times \frac{100\ g}{sample\ w.g}$$

3-7-3 تقدير النسبة المئوية للزيت الطيار

تم وزن 30 غم من ازهار البابونج الطرية ولكل معاملة بصورة عشوائية ، وضعت في دوارق واضيف لها 300 مل من الماء المقطر وضعت على مصدر حراري ، وتم استخلاص الزيت الطيار (Volatile oil) لكل معاملة بواسطة طريقة التقطير بالبخار (Steam distillation) اذ استعمل جهاز Clavenger لاستخلاص الزيت الطيار واستمرت عملية الاستخلاص لمدة 3 ساعات لكل عينة لحين الحصول على اعلى كمية من الزيت ولكل معاملة . حفظت نماذج الزيت المستخلص في زجاجات صغيرة ملونة محكمة (British Herbal Pharmacopia) .

4-7-3 تقدير الوزن الجاف لازهار نبات البابونج : Dry Weight

حصدت جمع ازهار نبات البابونج لكل معاملة من معاملات التسميد الحيوي قيد الدراسة الى انفراد ، تم وزن الازهار الجافة بعد التجفيف الطبيعي لمدة (14) يوما لحين ثبوت الوزن باستعمال الميزان الحساس (ابو زيد ، 2000).

3-7-5 تقدير الكثافة الكلية لبكتيريا **B. subtilis** و **Ps. fluorescens** ومزيج نوعي البكتيريا في المنطقة المتأثرة بالجذور لنبات البابونج المعامل به

تم قلع ثلاثة نباتات من كل معاملة من معاملات البكتيريا ومعاملة المقارنة ، اخذت الجذور التي تم قلعها ، غسلت جيداً بالماء مع المحافظة الى وجود كمية قليلة من التربة الى سطوح الجذور ، بعد ذلك غسلت بالماء المعقم . وزن 1 غم من الجذور ، سحقت جيداً باستعمال هاون خزفي معقم ، بعدها اضيف 9 مل ماء مقطر / غم جذور ثم رشح المزيج وسحب الراشح واجريت منه سلسلة من التخافيف لغاية (10^{-6}) بحسب طريقة (Baldani and Dobereiner , 1980 ؛ Baldani *et al*., 1986).

بعد ذلك زرع العالق البكتيري المخفف من اخر تخفيفين (10^{-5} ، 10^{-6}) في اطباق بتري معقمة وحاوية الى الوسط الصلب (Nutrient agar) المعقم وبثلاثة مكررات ثم حضنت الاطباق بدرجة حرارة 30 م لمدة 72 ساعة (Leben *et al*., 1987). بعد ذلك حسبت العدد المستعمرات الكلية النامية في الاطباق وقدرت الكثافة الكلية لكل نوع من نوعي البكتيريا والمزيج (Clark , 1965).

3-8 تحضير مستخلصات ازهار نبات البابونج وللمعاملات المدروسة

تم تحضير المستخلصات الكحولية (الكحول الاثيلي 90%) بعد جمع الازهار لنبات البابونج ولكافة المعاملات كلاً الى انفراد . ثم نظفت النورات الزهرية وطحنت وهي جافة للحصول الى مسحوق ناعم بواسطة الطاحونة الكهربائية وحفظت مساحيق الازهار ولكل معاملة في اكياس نايلون في الثلاجة لحين الاستعمال.

تم تحضير المستخلص الكحولي بحسب طريقة (Ladd , *etal* 1978) ، اذ وزن مقدار 10 غرامات من مسحوق المادة الجافة ولكل معاملة من المعاملات ووضعت بجهاز الاستخلاص (Soxhlet) بدرجة حرارة 40–45 م واضيف لها 200 مل من الكحول الاثيلي 90% واستمر استخلاص العينة لمدة 24 ساعة ، بعد

ذلك تم تجفيف المستخلص بالفرن الكهربائي بحرارة 40 م وكان وزن المادة المستخلصة 2.3 غم لمعاملة (*B. subtilis* و *Ps. flourescens*) و 1.3 غم لمعاملة *Ps. flourescens* و 1.2 غم لمعاملة *B. subtilis* . كررت عملية الاستخلاص عدة مرات للحصول على كمية كافية من المستخلصات لاستعمالها في الدراسات اللاحقة والدراسات الفسلجية.

3-8-1 الكشف عن المركبات الفعالة للمستخلص الكحولي لازهار نبات البابونج ولكل معاملة من المعاملات المدروسة

تم الكشف عن المركبات الفعالة للمستخلص الكحولي لنبات البابونج والمستخلص لعينات السيطرة ومستخلص النبات المعامل بـ *B. subtilis* ومستخلص النبات المعامل بـ *P. flourescens* واخيراً مستخلص النبات المعامل بـ *Ps. fluorescens* و *B. subtilis* باستخدام تقنية صفائح الكروماتوغرافي الطبقة الرقيقة Thin layer chromatography (T.L.C) بابعاد 20 × 20 سم اذ نشطت الصفائح لمدة ساعة واحدة قبل استعمالها بالفرن الكهربائي بدرجة حرارة 120 م (الجميلي ، 1996) حيث استخدم نظام الفصل (75% ميثانول : 25% ايثانول) في حوض الفصل.

تم عمل خط مستقيم خفيف على لوح T.L.C يبعد مسافة 1.5 ملم من القاعدة العليا والسفلى و 2 سم من الجوانب . سحب 10 مايكروليتر بواسطة انبوبة شعرية من المستخلص الكحولي ووضع على الخط وبمسافة متساوية بين كل بقعة واخرى ، ثم وضعت في حوض الفصل الـ Tank الحاوي على نظام الفصل (75% ميثانول : 25% ايثانول) حجم / حجم . وتمت مراقبتها لحين وصول الاطوار المتحركة الى مسافة تقرب 1.5 سم من الحافة العليا للوح الزجاجي ، اخرجت الصفائح وجففت ثم فحصت تحت الاشعة فوق البنفسجية وبطول موجي 360 نانوميتر.

3-8-2 فصل وتنقية المركبات الفعالة :

بعد استخلاص المركبات الفعالة من المستخلصات الكحولية لكل معاملة كلاً على انفراد ، تم ترحيل العينات المستخلصة من معاملة (B + Ps) على صفائح T.L.C وبطريقة الخط الافقي (Horizontal

stripe) للحصول على اكبر كمية من المركبات الفعالة وذلك بوضع (15) مايكروليتر من المستخلص بواسطة انابيب شعرية والى بعد 1.5 سم من الحافة السفلية ومن ثم رحلت بنفس نظام الفصل وتم تحديد المركبات وقياس R.f. (Relative flow) ولون تألقه تحت الاشعة فوق البنفسجية (U.V) الى طول موجي (365) نانوميتر ، بعدها تم قشط السليكا الحاوي الى المركبات الفعالة المحددة بواسطة شفرة معقمة وجمعه في انابيب اختبار نظيفة ومعقمة اضيف لها 10 مل من الكلوروفورم ثم نبذت بالطرد المركزي لمدة 15 دقيقة بعدها سحب الراشح واهمل الراسب ، نقل الراشح الى دورق صغير ذي حجم 20 ml في الفرن الكهربائي بدرجة حرارة 50° م لحين جفاف العينة . كررت العملية عدة مرات للحصول على كمية كافية تقدر بـ 10.000 مايكروغرام (العبيدي ، 2011). تم اذابته بمقدار 10 مل من المذيب (DMSO) (Dimethyl sulfo oxide) . حضن المزيج بعد ذلك في الحاضنة بدرجة حرارة 35° م لمدة 24 ساعة ، تم ترشيح المزيج بالترشيح الفائق عبر اوراق ترشيح دقيقة Millipore (0.22) مايكرون .

9-3 الكشف عن المجاميع الفعالة في المستخلص الكحولي لازهار نبات البابونج

تم الكشف عن المكونات الطبية بحسب طريقة لـ Shihata (1951) ولمستخلص معاملة *B. subtilis* و *Ps. fluorescens* والتي اعطت اعلى وزن عند الاستخلاص اذ تم الكشف عن اهم مجموعة من المكونات الفعالة الطبية وهي المركبات الفينولية و القلويدية والكلايكوسيدات وكالاتي :

اولاً – الكشف الفينولات البسيطة

1– الكشف عن الكومارين (Coumarins)

تم اضافة كمية من المستخلص الكحولي الى 5 سم^3 من المحلول الكحولي في انبوبة اختبار ، ثم بعد ذلك غطيت بورقة ترشيح مرطبة بهيدروكسيد الصوديوم المخفف ، وضعت بعد ذلك بحمام مائي لعدة دقائق ، ثم عرضت ورقة الترشيح الى Ultra-violet (UV) باستخدام جهاز (UV lamp) . وظهور اللون اللماع دلالة على وجود الكومارين (Geissman , 1962).

2– كاشف كلوريد الحديديك (1%)

يفيد هذا الكاشف للكشف عن الفينولات البسيطة (Harborne ، 1984) وهو محلول مائي ، اضيفت كمية منه الى كمية مساوية له من المستخلص الكحولي لحين ظهور راسب ذو لون اخضر مزرق (المختار ، 1994).

3- كاشف هيدروكسيد البوتاسيوم (1%)

استخدم للكشف عن الفلافونيدات والفيورانوكومارينات (Furano coumarins) (Harborne, 1984). وذلك باضافة 15% من المحلول الكحولي لهيدروكسيد البوتاسيوم الى كمية مساوية لها من المستخلص الكحولي (البابونج) لحين ظهور لون اصفر او اصفر مخضر.

4- كاشف خلات الرصاص (1%)

اضيفت كمية مساوية من الكاشف الى كمية مساوية لها من المستخلص ، لحين ظهر راسب هلامي القوام (السلامي ، 1988).

ثانياً – الكشف عن المركبات القلويدية : Alkaloids reagents

1- كاشف ماير

يفيد في الكشف عن موم القلويدات ، حضر باذابة 13.5 غم من كلوريد الزئبقيك و 5 غم من ايوديد البوتاسيوم في لتر من الماء المقطر ثم اضيف 2.1 مل منه الى 5 غم من المستخلص الكحولي لازهار البابونج ، ظهور راسب ابيض الى اسمر دلالة على وجود القلويدات (Harborne , 1984).

2- كاشف حامض التانيك :

يستعمل الحامض لترسيب القلويدات والذي حضر من (1%) حامض التانيك ثم أضيف (2مل) منه الى (5مل) من المستخلص الكحولي يظهر تعكر ابيض مسمر (Harborne, 1984)

ثالثاً : الكشف عن الراتنجات : Resins reagents

مزجت (50سم^3) من الكحول الأثيلي (95%) مع (5غرامات) من أزهار البابونج ووضعت في حمام مائي لمدة (20) دقيقة) ومن ثم رشح المحلول واضيف الى الراشح (100مل) من الماء المقطر ، فاذا ظهر راسب او تعكر فذلك يدل على وجود المواد الراتنجية . (Harborne , 1984)

رابعاً : الكشف عن الكلايكوسيدات Glycosides Reagents

1- مزجت كمية من كاشف فهلنك مع كمية مساوية لها في مستخلص ازهار البابونج في انبوبة زجاجية ، وضع المزيج في حمام مائي مغلي لمدة (15) دقيقة ، عند ظهور راسب احمر يستدل على وجود السكريات الحرة . (Harborne , 1984)

2- مزج (1 مل) من المستخلص لازهار البابونج مع (5 مل) من كاشف بندكت ، ظهور الراسب الاحمر دلالة على وجود السكريات .

10-3 تحضير مستخلص المركبات الفينولية الخام لازهار البابونج ولمعاملة التسميد الحيوي ببكتريا (**B. subtilis + Ps. fluorescens**)

وزن (10 غم) من مسحوق ازهار البابونج ووضعت في دورق سعة (1000) مل ، اضيف اليه (400) مل من حامض الخليك 2% ، تم الاستخلاص بواسطة المكثف العاكس Reflex condenser في حمام مائي بدرجة (70)°م ولمدة (8) ساعات ، ثم ترك المزيج ليبرد ورشح المزيج الراشح في قمع الفصل Separating funnel ، اضيف للراشح الحجم نفسه من N-propanol وبعدها اضيف كلوريد الصوديوم اذ رج الى ان وصل حد الاشباع وتكونت طبقتان ، ازلت الطبقة العليا (العضوية) الحاوية على المركبات الفينولية . تم تركيز هذه الطبقة بالمبخر الدوار ، ثم جففت ووضعت في علبة زجاجية محكمة الغلق في الثلاجة لحين الاستعمال.

تحضير التراكير لمستخلص المركبات الفينولية الخام

تم اذابة (1) غم من المستخلص الفينولي الخام الجاف لازهار نبات البابونج في (3) مل كحول اثيلي (96%) واكمل الحجم الى (100) مل بالماء المقطر فأصبح تركيز محلول الاساس (Stock solution) (1%) او ما يعادل (10) ملغم / مل ومنه حضرت التراكيز (2.5 و 5 و 7.5 و 10) ملغم / مل ، اما معاملة السيطرة فكانت (3) مل كحول اثيلي واكمل الحجم الى (100) مل بالماء المقطر Ribereau – Gayon (1972).

عزل المركبات الفعالة من مستخلص المركبات الفينولية الخام لزهار نبات البابونج ولمعاملة التسميد الحيوي بـ (*B. subtilis + Ps. fluorescens*)

لزلت المركبات الكيميائية الفعالة من مستخلص المركبات الفينولية لازهار نبات البابونج لمعاملة البكتيريا (*B. subtilis + Ps. fluorescens*) باستخدام طريقة (T.L.C) اذ استخدمت الواح السليكا الزجاجية بابعاد (20 × 20) سم ، اذيب (2) غم من المادة الجافة للمستخلص في (5) مل من الكلوروفورم، ووضع (5) مايكروليتر من المحلول المشبع للمستخلص لى هيئة بقع (Spots) بواسطة انبوبة شعرية دقيقة بابعاد متساوية لى مسافة (2) سم من بداية الصفيحة الزجاجية . وضعت الواح السليكا الزجاجية في جهاز الفصل الحاوي لى المذيب (25% ايثانول : 75% ميثانول) ، احكم غلق الخزان (Tank) وبعد وصول المذيب الى ما قبل النهاية للحافة العليا للوح ، رفعت من الخزان وحددت نهاية المسافة التي وصلها المذيب ، ثم تركت لتجف في ظروف المختبر حددت بعدها مواقع البقع والوانها بالعين المجردة ومصباح الاشعة فوق البنفسجية (U.V) وبطول موجي (420) نانوميتر وحددت قيم التحرك النسبي Relative flow (R.f) لها وفق المعادلة الاتية لـ (Harborne , 1984).

$$\text{قيمة السريان النسبي R.f} = \frac{\text{المسافة التي قطعها المركب (البقعة)}}{\text{المسافة التي قطعها المذيب}}$$

بعد اختيار المذيب (methauol 75 + 25 اثيانون) الذي اعطى افضل فصل استخدم للترحيل وذلك بوضع (2) مل من المستخلص الفينولي الخام الى هيئة شريط يبعد (2) سم من نهاية الصفيحة الزجاجية ووضعت في حوض الفصل وبعد وصول المذيب الى ما يقارب نهاية الصفيحة حددت مسافة تحرك نظام المذيب ، ثم جففت الصفيحة بدرجة حرارة المختبر وحددت المسافات التي وصلتها الحزم للمركبات الفينولية بواسطة العين المجردة والاشعة فوق البنفسجية ، قشطت الحزم الرئيسية بواسطة شفرة حادة واذيبت بالمذيب نفسه المستعمل للترحيل وحضرت منه التراكيز قيد الدراسة.

11-3 تهيئة الحيوانات المختبرية : Preparation of the laboratory animals

تم تنفيذ الدراسة في البيت الحيواني التابع الى كلية الصيدلة / جامعة كربلاء بعد ان تم الحصول على الجرذان الذكور من سلالة Sprague – Dawley من مركز السيطرة الدوائية / بغداد وبعمر ثلاثة اشهر وضعت في اقفاص بلاستيكية مغطاة بأغطية معدنية مشبكة محكمة بعد ان تم فرشها بنشارة الخشب وخضعت الحيوانات في مراحل الدراسة الى ظروف مختبرية متماثلة من حيث التغذية والتهوية والاضاءة ودرجة الحرارة.

12-3 تعيين الجرعة القاتلة $\mathbf{LD_{50}}$ بطريقة الحقن تحت الجلد

Determination of Lethal Dose by Subcutaneous Injection

استخدمت في هذه الدراسة (112) فأراً قسمت الى سبع مجاميع كل مجموعة تحتوي على (8) فئراً وحقنت تحت الجلد باحدى الجرع الاتية من مستخلص معاملة بكتريا *B. subtilis* ومستخلص معاملة بكتريا *Ps.* ومستخلص معاملة (*B. + Ps.*) الذي حضر من اذابة كمية من المستخلص في محلول الملح الفسلجي (Normal saline) لجرع 5000 و 6000 و 7000 و 8000 و 9000 و 10000 و 11000 ملغم / كغم من وزن الجسم.

تركت الحيوانات المعاملة تحت المراقبة وسجلت اعداد الحيوانات النافقة خلال 24 ساعة ، ثم حسبت بعد ذلك LD_{50} (Behrens and Karber, 1953)، والتي من خلالها تم تحديد جرع المستخلصات وهي 750 و 1000 و 1250 ملغم / كغم من وزن الجسم.

13-3 تحضير جرع مستخلصات ازهار نبات البابونج لمعاملات التسميد الحيوي ببكتيريا B. وبكتريا Ps. وبكتيريا (B. + Ps.) قيد الدراسة

وزن (15) غرام من المستخلص الكحولي الاثيلي الجاف لازهار نبات البابونج ولكافة المعاملات قيد الدراسة اضيف له (3) مل كحول اثيلي واكمل الحجم الى (100) مل Normal saline فأصبح المحلول بجرعة (150) ملغم / كغم من وزن جسم الجرذ ومنه حضرت باقي الجرع. اما معاملات السيطرة فقد اضيف (3) مل واكمل الحجم الى (100) مل محلول ملحي فسلجي.

14-3 المعاملة بالمستخلص الكحولي الايثانولي لازهار نبات البابونج المعاملة بالتسميد الحيوي قيد الدراسة :

استعملت في هذه التجربة (16) جرذاً لتشمل اربع مجاميع وملت بالمستخلص الكحولي الاثيلي وبجرع (750 و 1000 و 1250) ملغم / كغم من وزن الجسم ، حقنت تحت الجلد ولمدة (1) اسبوع ، اما حيوانات معاملة السيطرة فقد حقنت بالمحلول الملحي الفسلجي مضافاً اليه (3) مل من الكحول الاثيلي .

15-3 تحضير محاليل دراسة الدم:

1- محلول درابكن (Drabkin's solution)

حضر باذابة (10) غم من بيكاربونات الصوديوم و (0.5) غم من سيانيد البوتاسيوم الحديديكي في لتر من الماء المقطر ، استعمل في حساب نسبة الهيموكلوبين (Dacie and Lewis , 1984).

2- محلول هايم Hayem's solution

حضر بمزج (0.5) غم من كلوريد الزئبق مع (5) غم من سلفات الصوديوم و (1) غم من كلوريد الصوديوم مع (200) مل ماء مقطر ، استعمل في حساب عدد كريات الدم الحمر (فرهاد وقنبر ، 1986 ؛ سود ، 1992).

3- سائل التخفيف لعد الصفائح الدموية

مزج (1%) من اوكزالات الامونيوم في (100) مل ماء مقطر.

4- المحلول الملحي الفسلجي (Normal saline solution)

حضر باذابة (8.4) غم في كمية من الماء المقطر واكمل الحجم الى (1) لتر واستعمل في حقن حيوانات السيطرة.

16-3 دراسة صفات تخثر الدم : (**Study of blood coagulation properties**)

1- زمن النزف (Bleeding time)

تم بوضع شريحة زجاجية خلف شحمة اذن الحيوان بوخزة قوية ، ثم رفعت الشريحة وتوقيت الساعة وترك الدم ينضح على ورقة الترشيح لحين توقف النزف ، ثم الضغط على ساعة التوقيت ونسجل زمن النزف (سود ، 1992). بعد ذلك تم سحب الدم من القلب بطريقة طعنة القلب.

2- زمن التخثر : (Clotting time)

تم حساب زمن التخثر حسب طريقة الانبوب الشعري لرايت (Capillary tube method of Wright) اذ جمع الدم بواسطة الانابيب الشعرية وكسرت الانابيب الشعرية قبل (30) ثانية الى حين ملاحظة الجلطة بين النهايتين المكسورتين وسجل الوقت المستغرق (سود ، 1992).

3- زمن البروثرومبين (Prothrombin time)

تم قياس زمن البروثرومبين بعد سحب الدم حالاً واخذ البلازما وتم اضافة (1.8) مل من الدم الى انبوب يحتوي (0.2) مل من سترات الصوديوم (3.8%) وضعت في المنبذة بسرعة (3000) دورة في الدقيقة لمدة (10) دقائق ثم سحب الراشح (البلازما) وترك الراسب ، سحب (0.1) مل من البلازما ووضعت في انبوبة اختبار داخل حمام مائي بدرجة حرارة (37)°م ، بعد (15) دقيقة اضيف (0.1) مل من محلول جاهز (Kit) وبدأ التوقيت مباشرة بعد الاضافة . وبعد كل (5) دقائق تمت مراقبة ظهور الخثرة الدموية وحال ظهورها اوقف التوقبت وسجل الوقت المستغرق (Renek *et al*., 1998).

4- زمن الثرومبوبلاستين الجزئي (Partial thromboplastin time)

اضيف (0.1) مل من البلازما التي يراد اختبارها في انبوب اختبار ووضع في حمام مائي بدرجة حرارة (37)°م لمدة (15) دقيقة واضيف الى الانبوب بالتعاقب السريع (0.1) مل من معلق الثرومبوبلاستين الجزئي

(Kit) و (0.1) مل من محلول كلوريد الكالسيوم ، بدأت عملية التوقيت بعد الاضافة مباشرة وتم مراقبة ظهور الخثرة الدموية بعد كل (5) ثواني وأوقف التوقيت حال ظهور الخثرة الدموية وسجل الوقت (McGlasson *et al.*, 1999).

3-17 دراسة الصفات الوظيفية للدم : **(Study of blood function properties)**

تم سحب (3) مل من الدم في انبوبة حاوية على مانع التخثر (EDTA) لدراسة الصفات الاتية :

1- مكداس الدم Packed Corpuscular Volume (P.C.V)

جمعت كمية من الدم في الانبوب الشعري عن طريق الخاصية الشعرية Capillarity مع ترك (15) ملم تقريباً من الانبوبة فارغاً ثم اغلقت احدى النهايتين بالطين الصناعي ووضعت داخل المنبذة (Centerfuge) بسرعة 11000 دورة / دقيقة لمكداس الدم لمدت (5) دقائق وحسبت (P.C.V%) بواسطة المسطرة المدرجة Haematocrit reader (فرهارد وقنبر ، 1986).

2- معدل ترسيب كريات الدم الحمر : ((E.S.R) Erythrocytes Sedimentation Rate)

تم حساب E.S.R باستعمال كاشف معدل ترسيب كريات الدم الحمر (Erythrocytes sedimentation rate reagent) وهو عبارة عن (0.105) محلول مولاري لسترات الصوديوم مضافاً الى لتر واحد من الماء المقطر في قنينة زجاجية معتمة وهذا المحلول يرشح ويحفظ من دون اضافة مادة حافظة اذ يتم سحب (0.4) مل من محلول سترات الصوديوم بواسطة ماصة مدرجة ومن ثم اضافة المحلول الى انبوبة اختبار سعة (5) مل مضافاً لها (1.6) من الدم المسحوب.

بعدها رجت الانبوبة بالماء منعاً لتكسر كريات الدم الحمر المتبقية ، سحب المزيج بواسطة ماصة ويسترجرين (Westergrens piptte) الى العلامة (0) ثم لقت الماصة على حامل خاص لهذا الغرض مدة ساعة كاملة وتم قراءة معدل ترسيب كريات الدم الحمر (Lewis and Dacie , 1984).

3- تقدير تركيز خضاب الدم

استعمل محلول درابكن (Drabkin's solution) كاشف الهيموغلوبين (Haemoglobin reagent) حيث وضع (5) مل في انبوبة اختبار معقمة وجافة ثم اضيف اليها (0.02) مل من الدم المسحوب باستعمال

ماصة سالي (Salli's pipette) ثم تركت الانبوبة مدة (10) دقائق بدرجة حرارة الغرفة بعدها تم حساب تركيز الهيموغلوبين لكل عينة من العينات باستعمال جهاز المطياف وبطول موجي مقداره (540) نانوميتر. (Lewis and Dacie , 1984).

4- العدد الكلي لخلايا الدم البيض (Total Leucocyte Count)

تم سحب الدم بواسطة الماصة الخاصة ذات الحرزة البيضاء الى العلامة (0.5) ثم سحب سائل لتخفيف بالماصة نفسها الى العلامة (11) بعدها رجت الماصة رجاً خفيفاً لضمان تجانس عملية التخفيف ، بعد ذلك تم التخلص من بعض القطرات بانزالها على ورقة ترشيح لتجنب الاخطاء والسماح لقطرة من المزيج بالانتشار بين شريحة العد الخاصة بالخلايا الدموية وغطاء الشريحة ، بعد مرور (5) دقائق استقرت خلايا الدم البيض داخل المربعات الاربعة الكبيرة ، وتم الفحص تحت القوة (x 10) وحسب عدد الخلايا داخل اربعة مربعات كبيرة ، (64) مربعاً صغيراً تم بعد ذلك حساب عدد خلايا الدم البيضاء في ملم^3 الواحد وفقاً للمعادلة :

Total No. of White blood cells in mm^3 = N x 4/10 x 20

اذ ان :

N = تمثل عدد خلايا الدم البيض في (64) مربعاً صغيراً.

4/10 = حجم مربعات رأسية

20 = مقدار التخفيف (سود ، 1992).

5- حساب اعداد كريات الدم الحمر : (Red blood corpuscular counting)

تم سحب الدم بواسطة الماصة ذات الخرزة الحمراء الخاصة الى العلامة (0.5) ثم سحب سائل التخفيف كما في طريقة عد اعداد كريات الدم البيض ولكن الى العلامة (101) وبعد ذلك اغلقت نهايتي الماصة بالسبابة والابهام لرج المزيج وبعد التخلص من بضع قطرات من الدم المخفف تم السماح لقطرة من الدم المخفف بالانتشار بين شريحة عد الخلايا الدموية وغطائها ثم تركت الشريحة لكي تستقر وتتوزع الكريات الدموية الحمر وتتوزع داخل المربعات المتوسطة الركنية الاربعة والمربع المتوسط الوسطي (80) مربعاً صغيراً ، بعد ذلك تم

فحص الشريحة بالعدسة تحت القوة (x 10) وبعدها تم عد كريات الدم الحمر داخل (80 مربعاً تحت قوة التكبير (x 40) وفقاً للمعادلة الاتية :

Total No. of red blood capsules in mm^3 = N x 4000/80 x 200

اذ ان :

N = تمثل عدد كريات الدم الحمر في خمسة مربعات متوسطة.

4000 = حجم السائل فوق كل مربع صغير (ملم^3)

80 = عدد المربعات الصغيرة التي عدت فيها كريات الدم الحمر.

200 = مقدار التخفيف . (فرهاد وقنبر ، 1986 وسود ، 1992)

6- حساب اعداد الصفيحات الدموية : (Calculation of blood platelet numbers)

تم استخدام الماصة ذات الخرزة الحمراء ، وسحب الدم الى العلامة (0.5) ثم سحب سائل التخفيف الى العلامة (101) ثم اغلقت نهايتي الماصة بالسبابة والابهام ورجت رجاً خفيفاً لمنع تكسر الصفيحات الدموية ، ثم اهملت القطرات الاولى من الدم المخفف وتم السماح لقطرة من الدم المخفف بالانتشار بين شريحة عد الخلايا الدموية والغطاء الزجاجي بعد ذلك فحصت الشريحة بالعدسة ذات القوة (x 10) ، عدت الصفيحات الدموية في مربعات عد كريات الدم الحمر نفسها شملت اربعة مربعات متوسطة ركنية ومربع متوسط وسطي باستعمال قوة تكبير (x 40) ، ثم استخرج عدد الصفيحات الدموية في ملم^3 الواحد وفقاً للمعادلة الاتية :

Total No. of blood platelets in mm^3 = N x 200 x 5

اذ ان :

N = عدد الصفيحات الدموية في (5) مربعات متوسطة (80 مربعاً صغيراً).

200 = مقدار التخفيف.

5 = لحساب الصفيحات الدموية في حجم واحد ملم^3. (فرهاد وقنبر ، 1986).

3-18 محاليل التحضيرات النسيجية : (Solutions for histological preparations)

1- صبغة الايوسين الكحولية : Alcoholic – Eosin Stain

حضرت الصبغة من اذابة 0.5 غم من صبغة الايوسين في 100 مل من الكحول الاثيلي 50% (Humason, 1972).

2- صبغة هيماتوكسلين – الم هاريس : Harris Alum - Haematoxylin

حضرت الصبغة من مزج 20 غم من شب البوتاسيوم او الالمنيوم مع 1 غم من صبغة الهيماتوكسلين و 5 غم من اوكسيد الزئبق ، ثم اذيبت في 2000 مل من الماء المقطر ، بعدها اضيف الى المزيج 10 مل من الكحول الاثيلي المطلق (Humason , 1972).

3- مثبت بوين : Bouin's Fixative

حضر بمزج 75 مل من حامض البكريك المائي المشبع مع 25 مل من الفورمالين 40% مع اضافة 15 مل من حامض الخليك الثلجي (Humason , 1972) .

4- لصق ماير : Mayer's Albumin

حضر بمزج 50 مل من مح البيض مع 50 مل من الكليسيرول واضافة 1 غرام من بلورات الثايمول لمنع نمو الفطريات (Humason, 1972).

3-19 الدراسات النسيجية : **(The Histological studies)**

بعد تشريح حيوانات التجربة تم نقل الاعضاء (الكبد ، الكلى ، الطحال) من مثبت بوين الى الكحول الاثيلي (70%) غسلت عدة مرات للتخلص من لون المثبت ، اجريت عملية الانكاز (dehydration) للمقاطع ، وذلك بتمريرها بسلسلة من التراكيز المتصاعدة للكحول الاثيلي (70 و 80 و 90 و 95% وكحول مطلق) ولمدة نصف ساعة للتوضيح ، بعد ذلك تم التشريب (Infiltration) والطمر (Embedding) بشمع البرافين بدرجة انصهار تراوحت بين (56 – 58 م°) ، وذلك بتحضير قوالب من شمع البرافين للطمر ، وتركت لتجف ثم حضرت مقاطع مستعرضة متسلسلة للاعضاء المختلفة بسمك (6) مايكرون بواسطة جهاز المشراح الدائري (Rotary microtome) . ثبتت المقاطع النسيجية على شرائح زجاجية باستعمال لاصق البومين ماير (Mayers albumin) ، مررت النماذج المقطعة في سلسلة تنازلية من تراكيز الكحول بعد امرارها في الزايلين لازالة الشمع ولمدة (2) دقيقة في كل مرة وعند التركيز (70%) ، ثم صبغت النماذج بصبغة الهيماتوكسلين لمدة (5) دقيقة. ثم غسلت بماء الحنفية لمدة (5) دقائق ، اضيف بعد ذلك كحول محمض حتى اصبح لون المقطع احمر ثم يغسل بماء الحنفية ثم بالماء المقطر ، مررت بعد ذلك بتراكيز من الكحولات (35 ، 50 ، 70%) لمدة (3) دقائق لكل منها ، غمرت بعد ذلك بالايوسين ثم غسلت بالماء ، بعد ذلك مررت بسلسلة

تراكيز من الكحولات (90 ، 95 ، 100%) ولمدة (3) دقائق لكل منها. بعد ذلك تم تمرير المقاطع بالزايلين لغرض زيادة وضوح الشريحة ، حملت الشرائح (Mounting) ن طريق تغطيتها باغطية زجاجية ووضعت مادة كندا بلسم يها لتصبح جاهزة للفحص تحت المجهر لمعرفة التغيرات النسيجية (Bankroft and Stevens , 1982).

3-20 اختبار التأثير المضاد للتخثر لمستخلصات ازهار نبات البابونج المعاملة بالتسميد الحيوي **ببكتريا *B. subtilis* وبكتيريا *Ps. fluorescens* و *B. subtilis + Ps. fluorescens* خارج** الجسم الحي:

1- جمع الدم

تم جمع الدم من ذكور الفئران غير المعاملة لغرض سحب الدم بطريقة طعنة القلب.

3-21 تحديد التركيز الادنى من مستخلصات ازهار البابونج المعاملة بالتسميد الحيوي لمنع تخثر الدم :

تم سحب (30) نموذجاً من الدم سحبت من ذكور الفئران لاستخدامها في دراسة تخثر الدم لكل مستخلص من المستخلصات المعاملة بالتسميد الحيوي قيد الدراسة ، يحتوي كل نموذج (2) سم^3 من الدم وضعت في انابيب اختبار وقسمت الى مجاميع كل مجموعة (5) نماذج اضيف لها تراكيز المستخلصات لمعاملات التسميد الحيوي بـ (*B.*) و (*Ps.*) و (*B + Ps.*) وهي (25 و 50 و 75) ملغم / مل من الدم لى التوالي ولملت المجموعة الاخرى بمحلول سترات الصوديوم الثلاثية (3.8%) بنسبة (1 : 9) من الدم كمجموعة قياسية.

دراسة التغايرات الفسلجية للدم

تم سحب ينة الدم المعاملة بالتركيز الادنى المانع لتخثر الدم واجريت يها فحوصات التغيرات الخلوية والشكلية لكريات الدم ومنها دد خلايا W.B.C ، R.B.C ، تركيز الهيموكلوبين ، PCV ولد الصفائح الدموية Platelets .

3-22 آلية عمل مستخلصات ازهار البابونج المعاملة ببكتريا *B.* و *Ps.* و (*B. + Ps.*) بوصفها مضادات لتخثر الدم

حضر (30) نموذجاً من الدم من قلب الجرذان ووضعت في انابيب اختبار بمعدل (2) مل من الدم ، قسمت الى ثلاثة مجاميع متساوية . اضيف الى كل نموذج من المجموعة الاولى (25) ملغم / مل من الدم من مستخلص ازهار البابونج المعامل ببكتيريا *B.* و *Ps.* و (*B. + Ps.*) واضيف الهيبارين بتركيز (0.2) ملغم / مل من الدم الى المجموعة الثانية . اما المجموعة الثالثة فقد اضيف لها سترات الصوديوم الثلاثية (3.8%) 1–9 من الدم. وضعت جميع النماذج في جهاز الطرد المركزي واستحصل منها على البلازما ثم اجري لكل انموذج اختبار (زمن البروثرومبين) باستعمال (0.1) مل من كاشف البروثرومبين (سائل الثرومبوبلاستين والكالسيوم) و (0.1) مل من البلازما ، ثم فحصت النماذج لملاحظة تكوين الجلطة من البلازما لكل من نماذج السترات والهيبارين والمستخلص الكحولي لمعاملات التسميد الحيوي (الصراف ، 1996).

3-23 آلية عمل المركبات (1 ، 2 ، 3) المعزولة من المستخلص الفينولي الخام لازهار نبات البابونج ***M. Chamomile*** وتراكيزها بصفتها مضادة لتخثر الدم

حضر (30) نموذجا من الدم من قلب ذكور الجرذان قيد البحث ، ووضعت في انابيب اختبار بمعدل (2) مل من الدم ، قسمت الى ثلاثة مجاميع متساوية ، اضيف الى كل نموذج من المجموعة الاولى (2.5) ملغم / مل و (5) ملغم / مل و (7.5) ملغم / مل و (10) ملغم / مل من المركب (1) واضيف الهيبارين بتركيز (0.2) ملغم / مل من الدم الى المجموعة الثانية ، اما المجموعة الثالثة فقد اضيف لها محلول سترات الصوديوم الثلاثية (3.8%) 9–1 من الدم . وضعت جميع النماذج في جهاز الطرد المركزي واستحصل منها على البلازما . اجري لكل مجموعة اختبار زمن البروثرومبين (Prothrombin – Time) باستعمال (0.1) مل من كاشف البروثرومبين (سائل الثرومبوبلاستين والكالسيوم) و (0.1) مل من البلازما ، فحصت النماذج

لملاحظة تكوين الخثرة الدموية من البلازما لكل النماذج وهكذا بالنسبة للمركبات (2) و (3) ولنفس التراكيز اللاه (الصراف ، 1996).

3-24 مدة ثبات فعالية المستخلص الكحولي لمعاملة ***(B. + Ps.)*** المضادة لتخثر الدم

تم اختبار الفعالية المضادة لتخثر الدم لمستخلص ازهار البابونج المعاملة بالتسميد الحيوي ببكتريا (*B. + ps.*) في اوقات متعاقبة ، اذ تم حفظ المستخلص بعد تحضيره في الثلاجة بدرجة حرارة (4)ْ م لمدة سنة كاملة ليتم اختبار فعاليته وثباته في التأثير المضاد لتخثر الدم.

3-25 التصميم التجريبي والتحليل الاحصائي(**Experimental design and statistical analysis**)

صممت التجارب وفق تصميم القطاات العشوائية الكاملة R.C.B.D (Randomized Complet Block Design) وحللت النتائج وفق التصميم المتبع وقورنت المتوسطات بين المعاملات باستخدام أقل فرق معنوي L.S.D. Least Significant Differences اند مستوى احتمالية ($P < 0.05$) لبيان معنوية النتائج (الراوي وخلف الله ، 1980).

الفصل الرابع
النتائج والمناقشة
Chapter Four
Results and Disussion

4- النتائج والمناقشة Results & Discussion

4-1 كثافة نوعي البكتيريا *B. subtilis* و *Ps. fluorescens* في وسط زرعي واحد

اظهرت نتائج هذا الاختبار المبينة في جدول (2) قدرة كلا نوعي البكتيريا على النمو في وسط زرعي واحد اذ بلغت الكثافة الكلية للبكتيريا (2.4×10^8 C.F.U)، هذه النسبة تتقارب مع نسبة نمو كل من .B و Ps. كلاً على انفراد عند تنميتهما على الوسط الزرعي اذ بلغت كثافة البكتيريا *B. subtilis* و *Ps. fluorescens* (2.04×10^8) و (2.2×10^8 C.F.U) على التوالي . اما عند مزج نوعي البكتيريا فقد انخفضت كثافتهما وذلك لتنافس كلا نوعي البكتيريا على المتطلبات التغذوية ولكن كثافتهما تبقى ضمن الحدود الفعالة بايولوجياً ، اذ اشار كلا من (حميد ، 2001) و (كاظم ، 2002) بأن الكثافة الفعالة (active density) *Ps. fluorescens* بحدود (10^5 C.F.U) وكذلك الحال ينطبق على *B. subtilis* ومن هذا نستنتج ان كلا نوعي البكتيريا قادرة على التعايش معاً.

الجدول (2): كثافة بكتيريا *B. subtilis* و *Ps. fluorescens* عند زرعهما في وسط زرعي واحد

نوع البكتيريا	كثافة البكتيريا C.F.U
مزيج *B. subtilis* و *Ps. fluorescens*	2.4×10^8
بكتيريا *B. subtilis* في المزيج	1.03×10^8
بكتيريا *Ps. flourescens* في المزيج	1.07×10^8
بكتيريا *B. subtilis* بصورة مفردة	2.04×10^8
بكتيريا *Ps. Flourescens* بصورة مفردة	2.2×10^8
L.S.D 0.05 = 0.1038	

2-4 جاهزية العناصر الكبرى والصغرى

A- العناصر الكبرى

1- النتروجين :

تشير النتائج في جدول (3) بأن معاملة التسميد الحيوي ببكتيريا (*B. + Ps.*) ذات كفاءة معنوية في زيادة محتوى اوراق نبات البابونج من تركيز عنصر النتروجين اذ اعطت اعلى نسبة تركيز مئوية بلغت 1.83% في حين بلغت 1.05 ولمعاملة *B.* و 1.09% لمعاملة *Ps.* وتفوقت جميعاً على معاملة السيطرة والتي بلغت 0.65%.

وتتماثل هذه النتائج مع ما توصلت اليه المعموري (2009) اذ بينت ان معاملة نباتات الطماطة بالمبيد الحيوي الباسليس المتكون من لقاح *B. cerens* سببت زيادة نسبة النتروجين في الاوراق (2.46%) وبفارق معنوي عن معاملة السيطرة التي بلغت (1.96%).

الجدول (3) : تركيز العناصر الكبرى لاوراق نباتات البابونج لمعاملات التسميد الحيوي ببكتيريا *B. subtilis* و *Ps. fluorescens* ومعاملة (*Ps. flourescens + B. subtilis*)

المعاملات	N (%)	P (%)	K (%)	Ca (%)	Mg (%)
Control	0.65	0.30	1.23	0.36	0.23
B.	1.05	0.35	1.40	0.63	0.49
Ps.	1.09	0.46	1.50	0.70	0.54
B. + Ps	1.83	0.55	3.00	1.11	0.55
L.S.D $_{0.05}$	0.111	0.121	0.191	0.213	0.10

كما واوضح العاشور (2009) كفاءة المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. subtilis* في زيادة محتوى اوراق نبات الحنطة من عنصر النتروجين اذ اعطى التركيز 15 غم / كغم اعلى نسبة مئوية لعنصر النتروجين بلغت (1.39%) متفوقة على معاملة السيطرة والتي بلغت (0.60%) .

كما وتوصل الرواشدة (2002) بأن المستحضر الحيوي لبكتيريا *Ps. fluorescens* وبتركيز 100 غم / كغم ادى الى زيادة في مؤشرات النمو الفسلجية والمورفولوجية ومنها نسبة الانبات اذ بلغت (98.33%) متفوقة على معاملة السيطرة والتي بلغت (71.66%) . ويرجع ذلك الى مقدرة بكتيريا *Ps. flourescens* لانتاج مركبات *Pseudobactin* و *Fluorescent siderophores* وهي مركبات لها القابلية على الانتشار وترتبط بالحديد وتزيد من جاهزية النتروجين وعناصر كبرى اخرى.

وقد يفسر قابلية المستحضر الحيوي للبكتيريا *B. subtilis* والمستحضر الحيوي للبكتيريا *Ps. flourescens* في زيادة جاهزية النتروجين من خلال تثبيت النتروجين الجوي مباشرة (Mcspadden-Gardener,2004). او الى زيادة جاهزية عنصر النتروجين للنباتات من خلال تشجيعها لنمو الكثير من الاحياء المجهرية في التربة كالبكتيريا المثبتة للنتروجين Rhizobia والفطريات المرافقة للجذور (Carbaye, 1994).

كما يعمل المستحضران معاً على حماية جذور النباتات من الاضرار الناجمة من المسببات المرضية والمتمثلة بقتل وتحليل كلي او جزئي للمجموع الجذري للنبات ومن ثم تنمو الجذور بصورة طبيعية في التربة مما يزيد من فعاليتها في امتصاص العناصر الغذائية كالنتروجين والفسفور والبوتاسيوم .

يؤثر النتروجين تأثيراً هاماً في النبات وذلك من خلال زيادة النموات الخضرية كما انه يؤدي الكثير من الوظائف الفسلجية المهمة للنبات اذ انه يدخل في تكوين البروتين والاحماض النووية والكلوروفيل والانزيمات والفيتامينات والهرمونات النباتية كما انه يدخل في تكوين الاغشية الخلوية ومركبات الطاقة والاميدات (ابو ضاحي ، 1991).

2- الفسفور :

أثر المستحضر الحيوي لبكتيريا (*Ps. + B.*) بشكل معنوي في زيادة النسبة المئوية لعنصر الفسفور لاوراق نباتات البابونج المعاملة بالمستحضرات الحيوية قيد البحث اذ بلغت 0.55% لمعاملة *B.* و 0.46% لمعاملة الـ *Ps.* مقارنة مع معاملة المقارنة والتي بلغت 0.30% .

تتقارب هذه النتائج مع نتائج الخفاف (2006) التي اشارت الى كفاءة المستحضر الحيوي للبكتيريا *B. cereus* في زيادة جاهزية عنصر الفسفور في اوراق نبات الخيار اذ بلغت النسبة المئوية للفسفور في معاملة

المستحضر الحيوي 0.42% متفوقة وبفارق معنوي عن معاملة المقارنة التي بلغت 0.18%. وقد تعود الزيادة الحاصلة في نسبة الفسفور لاوراق النباتات المعاملة بالمستحضر الحيوي لقدرة البكتيريا *B. subtilis* مع بكتيريا *Ps. flourescens* على زيادة جاهزية عنصر الفسفور عن طريق قدرتها على تحليل الصخور الغنية بالفسفور (Glick ، 1995). او عن طريق تركيز بعض الايونات على سطح الجذور نتيجة تواجد انواع بكتيريا P.G.P.R المشجعة للنمو ومنها *Ps. flourescens* مما يزيد من امتصاص العناصر المغذية ومنها الفسفور (Bertr *et al*., 2000).

يشكل الفسفور حوالي 0.25% من الوزن الجاف للنبات ويشترك في تكوين الاحماض النووية والبروتينات النووية وفي مرافقات الانزيمات. وللفسفور اهمية في انبات البذور بسبب احتياج النبات للطاقة كما انه يخزن في الاعضاء الثمرية في البذور على هيئة الفايتين (Phytin) وهو ملح الكالسيوم والمغنيسيوم لحامض الفايتك Phytic acid (ابو ضاحي ، 1991).

3- البوتاسيوم :

اظهرت نتائج التحليل كفاءة التسميد الحيوي لمعاملة (*Ps.* + *B.*) في زيادة جاهزية عنصر البوتاسيوم معنوياً عن باقي المعاملات قيد الدراسة اذ بلغت 3.00% فيما بلغت 1.40% لمعاملة الـ *B.* و 1.50% لمعاملة الـ *Ps.* في حين بلغت 1.23% لمعاملة السيطرة.

تتشابه هذه النتائج مع ما توصل اليه العاشور (2009) في زيادة جاهزية عنصر البوتاسيوم اذ بلغت 2.07% لاوراق نباتات الحنطة المعاملة بالمستحضر الحيوي لبكتيريا *B. subtilis* . وتتوافق هذه النتائج مع Broadbent وآخرون (1977) من كفاءة عالية للمستحضر الحيوي لبكتيريا *Ps. flourescens* وبكتيريا *B. subtilis* في زيادة جاهزية عنصر البوتاسيوم في اوراق نبات الطماطة المعاملة بالمستحضر الحيوي اذ بلغت قيمة هذا العنصر في تلك المعاملة 0.14 ملغم / نبات بينما بلغت قيمته في معاملة المقارنة 0.04 ملغم / نبات . يكون البوتاسيوم 1% من الوزن الجاف للنبات وله اثر كبير في الفعاليات الحيوية كتنظيم الجهد الازموزي لخلايا النبات ، كما انه يتحكم في عملية فتح وغلق الثغور وتنظيم المحتوى المائي وكذلك لانتقال نواتج التمثيل الغذائي فضلاً عن تنشيطه عدد من الانزيمات (ابو ضاحي ، 1991).

4- الكالسيوم :

تشير النتائج في الجدول (2) الى زيادة جاهزية عنصر الكالسيوم في اوراق نبات البابونج في معاملة (Ps. B.) اذ بلغت 1.11% وتفوقت معنوياً عن باقي المعاملات قيد الدراسة وهي C ومعاملة B ومعاملة الـ Ps. وبنسب تراوحت 0.36 و 0.68 و 0.70% على التوالي.

تتماثل هذه النتائج مع ما توصل اليه Lee (2005) من كفاءة المستحضر الحيوي *Ps. flourescens* في زيادة جاهزية عنصر الكالسيوم في اوراق نبات فول الصويا اذ بلغت قيمته (16) ملغم / نبات متفوقة على معاملة السيطرة التي بلغت (14) ملغم / نبات.

تتفق هذه النتائج ايضاً مع ما توصل اليه El-Daly و Haikel (2006) بوجود فروق معنوية في قيمة عنصر الكالسيوم في اوراق نبات الذرة الصفراء والمعامل بالمستحضر الحيوي B. subtilis والتي بلغت قيمته (20.42) ملغم / نبات في حين بلغت قيمته في معاملة السيطرة (18.68) ملغم / نبات.

يدخل الكالسيوم في تركيب الصفيحة الوسطى بشكل بكتات الكالسيوم والذي يعمل على رص الخلايا المتجاورة كما ويشترك في نقل الكربوهيدرات وتنظيم الجهد الازموزي ونفاذية الاغشية الخلوية ويكون حوالي 0.25 – 0.5% من الوزن الجاف للنبات (محمد واليونس ، 1991).

5- المغنيسيوم (Mg):

بينت نتائج التحليل لاوراق نبات البابونج ولمعاملة المستحضر الحيوي (*Ps. + B*) كفاءة زيادة جاهزية عنصر المغنيسيوم اذ بلغت لهذا العنصر (0.55) في حين بلغت جاهزية هذا العنصر في المعاملات قيد البحث : معاملة السيطرة ، معاملة بكتيريا *B.* ومعاملة بكتيريا *Ps.* بـ (0.23) و (0.49) و (0.54)% على التوالي.

يلاحظ من النتائج اعلاه تماثل نسبة المغنيسيوم لكل من معاملتي *Ps.* ومعاملة الـ *B.* وتتماثل مع ما اشارت اليه المعموري (2009) من كفاءة المستحضر الحيوي البكتيريا *B. cereus* في زيادة تركيز هذا العنصر في اوراق نبات الطماطة وبوجود الفطر الممرض *P. aphanideomatum* التي بلغت تركيز العنصر في معاملة المستحضر الحيوي للبكتيريا (0.43%) متفوقة على تركيز العنصر في معاملة المقارنة والتي بلغت (0.31%)

وتتقارب ايضاً مع ما توصل اليه Broadbent (1977) من كفاءة المستحضر الحيوي لبكتيريا الـ *B.* وبكتيريا الـ *Ps.* في زيادة تركيز عنصر المغنيسيوم في اوراق نبات الطماطة اذ بلغت قيمته في تلك المعاملة (0.80%) متفوقة على معاملة السيطرة التي بلغت (0.64%) . وتتماثل مع ما بينه كل من Haikel و Atef (2008) من كفاءة المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. subtilis* في زيادة تركيز المغنيسيوم في اوراق نبات الخيار والتي بلغت (18.85) ملغم / كغم متفوقة على معاملة المقارنة التي بلغت (9.34) ملغم / غم.

B- العناصر الصغرى

1- الحديد (Fe) :

يلاحظ من الجدول (4) بأن معاملة (*Ps.* + *B*) تفوقت معنوياً عن باقي المعاملات قيد البحث اذ بلغت 160.61 جزء بالمليون في حين بلغت في معاملة السيطرة ومعاملة *B.* ومعاملة *Ps.* 90.00 ، 140.00 و 150.00 جزء بالمليون على التوالي.

الجدول (4):تركيز العناصر الصغرى في اوراق نباتات البابونج/ ppm لمعاملات التسميد الحيوي ببكتيريا *B. subtilis* و *Ps. fluorescens* ومعاملة (*Ps. flourescens + B. subtilis*)

المعاملات	Fe	Mn	Cu	Zn	Na
Control	90.00	10.33	3.00	33.11	0.26
B.	140.00	13.22	7.55	50.13	0.18
Ps.	15.00	17.00	8.11	55.71	0.14
B. + Ps	160.61	19.21	10.11	70.63	0.07
L.S.D $_{0.05}$	10.81	1.91	0.88	10.99	0.075

تتفق هذه النتائج مع ما توصل اليه *Haikel and El-Daly*(2006) التي بينت كفاءة كل من بكتيريا *B.* وبكتيريا *Ps.* في زيادة معدلات قيم عنصر الحديد في اوراق نبات الذرة اذ بلغت قيمته في معاملة المستحضر الحيوي لبذور نبات الذرة (168) متفوقاً وبفارق معنوي عن معاملة السيطرة التي تراجع فيها معدل عنصر الحديد الى (158) وتتشابه ايضاً مع ما توصل اليه الخفاف (2006) التي اشارت الى كفاءة البكتيريا *B. cereus* في زيادة جاهزية عنصر الحديد في اوراق نبات الخيار المعامل بالمستحضر الحيوي للبكتيريا وبلغت قيمته (31.62) والتي تفوقت وبفارق كبير عن معاملة السيطرة التي تراجع فيها عنصر الحديد الى (20.15).

للحديد دور مهم في تركيب (Cytochromes) المهمة في عمليتي التنفس والبناء الضوئي ، اضافة الى اهميته في بناء الكلوروفيل وتثبيت النتروجين حيوياً واختزال النترات الى امونيا كما انه يدخل في تكوين الاحماض الدهنية المشبعة وغير المشبعة.

2- المنغنيز (Mn)

اظهرت معاملة المستحضر الحيوي تفوقاً معنوياً عن باقي المعاملات قيد البحث والتي بلغت 19.21 ppm في حين بلغت القيم في معاملات السيطرة ومعاملة بكتيريا *B. subtilis* ومعاملة بكتيريا *Ps. fluorescens* ومعاملة (*Ps. fluorescens + B. subtilis*) (10.33) و (13.22) و (17.00) و (19.21) على التوالي.

تتفق هذه النتائج مع ما اشار اليه Broadbent وآخرون (1977) من زيادة تركيز عنصر المنغنيز في نبات الطماطة المعامل بالمستحضر الحيوي لبكتيريا *B. subtilis* و *Ps. fluorescens* اذ بلغت تركيز عنصر المنغنيز (111) متفوقة على معاملة المقارنة التي بلغت (98). وتتفق مع ما توصل اليه Atef و Haikel (2008) التي اوضحت كفاءة المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. subtilis* في زيادة تركيز عنصر المنغنيز في اوراق نبات الخيار بوجود الفطر الممرض *Pythium ultimum* اذ ارتفعت قيمته في معاملة المستحضر الحيوي للبكتيريا الى (228.4) ppm مقارنة بمعاملة السيطرة والتي بلغت فيه هذا العنصر (168.03).

يؤخذ المنغنيز بشكل ايونات في التربة وله تأثير كبير في اظهار صبغة الكلوروفيل ويوازن بين نسبة الحديدوز الى الحديديك في النبات ويدخل كذلك في انزيمات التنفس وتفاعلات الضوء والتركيب الضوئي (محمد واليونس ، 1991).

3- الصوديوم(Na) :

ادت معاملة المستحضر الحيوي (*Ps.* + *B.*) الى انخفاض غير معنوي في قيمة عنصر الصوديوم Na اذ بلغت في اوراق نبات البابونج للمعاملة اعلاه (0.07)ppm في حين بلغت للمعاملات C و *B* و *Ps* الى (0.26 ،0.18 ، 0.14)ppm على التوالي. تتفق هذه النتائج مع ما توصل اليه(2004) Woitke *etal* حول كفاءة المستحضرات الحيوية لبكتيريا *B. subtilis* والـ *Ps. flourescens* في خفض قيمة Na في اوراق نبات الطماطة وتحت اجهاد ملحي اذ انخفض الى (0.12)ppm في معاملة المستحضر الحيوي ، في حين كانت قيمته في معاملة المقارنة 0.14ppm %.كما وتتماثل ايضاً مع نتائج(2008) Haikel and Atef من كفاءة المستحضر الحيوي *B. subtilis* الباسلين Bacillin في خفض قيمة عنصر Na في اوراق نبات الخيار والتي بلغت (0.77)ppm في حين بلغت قيمته في معاملة السيطرة (0.90)ppm .

4- الزنك (Zn) :

تفوقت معاملة المستحضر الحيوي لبكتيريا (*Ps.* + *B.*) معنوياً على باقي المعاملات قيد البحث اذ بلغت (70.63) في حين بلغت النسب في معاملة السيطرة ومعاملة بكتيريا الـ *B.* ومعاملة بكتيريا الـ *Ps.* بـ (11.33) و (50.13) و (55.71) ppm على التوالي.

تتماثل هذه النتائج مع ما اوضحه (Brodbent *etal,* 1977) حول كفاءة المستحضر الحيوي لبكتيريا B. وبكتيريا Ps. في زيادة تركيز عنصر الزنك في اوراق نبات الطماطة المعامل بالمستحضر الحيوي اذ بلغت قيمته (1.1) في حين كانت قيمة العنصر في معاملة المقارنة (66)ppm .

تتفق هذه النتائج ايضاً مع ما توصل اليه العاشور (2009) حول كفاءة المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. subtilis* في زيادة تركيز عنصر الزنك في اوراق نبات الباميا اذ بلغت اعلى قيمة لعنصر الزنك في معاملة المستحضر الحيوي (73.16)ppm متفوقة وبفارق معنوي على سائر تأثير المعاملات 15 و 10 و 0 غم / كغم التي بلغت قيمة عنصر الزنك فيها(66.5 و 59.56 و 47.03)ppm في حين بلغت قيمته في معاملة

السيطرة (32.5) ppm . يمتص الزنك بشكل ايونات ويساعد في تكوين IAA و GA3 C.k ويحفز التفاعلات الانزيمية التي تسيطر عليها انزيم Alcohol dehydrogenase (محمد واليونس ، 1991).

5- النحاس (Cu) :

تفوقت معاملة (*Ps.* + *B.*) معنوياً على باقي المعاملات قيد البحث اذ بلغت (10.11) ppm في حين بلغت في معاملة السيطرة ومعاملة بكتيريا *B.* وبكتيريا *Ps.* بـ (3.00) ، (7.55) ، و (8.11) ppm على التوالي.

تتماثل هذه النتائج مع ما توصل اليه العاشور (2009) حول ازدياد تركز عنصر النحاس وبشكل معنوي في اوراق نبات الباميا والحنطة المعامل بالمستحضر الحيوي لبكتيريا *B. subtilis* التي بلغت (9.10) ppm في حين بلغ تركيز النحاس لمعاملة المقارنة (3.1) ppm .

تتقارب هذه النتائج مع ما اوضحه(Broadbent *etaL*,1977) من كفاءة المستحضر الحيوي لبكتيريا *B.* وبكتيريا *Ps.* في زيادة تركز عنصر النحاس في اوراق نبات الطماطة والتي بلغت (15) ppm متفوقة على معاملة السيطرة التي بلغ فيها قيمة هذا العنصر (13) ppm .

ترجع الزيادة في كفاءة المستحضرات الحيوية البكتيرية في رفع قيمة عنصر النحاس الى كفاءة بكتيريا *B. subtilis* وبكتيريا *Ps. Fluorescens* في خفض المجتمع الميكروبي المتواجد على اسطح جذور النباتات ومنطقة المحيط الجذري Rhizosphere بفضل الاليات التضادية لنوعي البكتيريا (Panlitz *et al*., 2001 ؛ Kloepper *et al*., 2004).

لعنصر النحاس دور كبير في عمليات الاكسدة والاختزال وعملية التنفس والانزيمات التأكسدية مثل Ascorbate oxidase وانزيم Phenol oxidase وفي عملية البناء الضوئي (محمد واليونس ، 1991) وتبلغ نسبة النحاس من الوزن الجاف (5.10) ppm .

3-4 الوزن الجاف لأزهار نبات البابونج :

تبين النتائج في الجدول (5) بأن لنوع الكائن الحي تأثيرات واضحة في التسميد الحيوي تأثيرات واضحة في صفة الوزن الجاف لأزهار نباتات البابونج ، اذ ان هناك زيادة في الوزن الجاف لكل المعاملات قيد البحث ولكن هذه الزيادة تكون معنوية او غير عند مستوى احتمال 0.05 ، وكانت معاملة التسميد الحيوي ببكتيريا (*B. + Ps.*) هي الافضل اذ بلغت 1.553 غم / نبات ومتفوقة على معاملات C ومعاملة *B.* ومعاملة *Ps.* والتي بلغت (0.031) غم /نبات و (0.087) غم / نبات و (0.060) غم/نبات على التوالي.

الجدول (5):الوزن الجاف لازهار/ نباتات البابونج المعاملة بالتسميد الحيوي ببكتيريا *B. subtilis* و *P.fluorescens* ومعاملة (*P. flourescens + B. subtilis*)

المعاملات	الوزن الجاف للازهار / غم
	المعدل
السيطرة	0,031
التسميد ببكتيريا *B.*	0,087
التسميد ببكتيريا *P.*	0,060
التسميد ببكتيريا *B. + P.*	1,553
$L.S.D_{0.05}$	0.003

ويعزى تأثير التسميد الحيوي ببكتيريا (*B. + Ps.*) الى زيادة النمو من خلال زيادة المحتوى الكلوروفيلي ومن ثم كفاءة البناء الضوئي وزيادة في الفعاليات الحيوية وبذلك يعمل على زيادة كمية الكربوهيدرات وزيادة كمية الكلايكوسيدات التي يدخل في تركيبها المواد السكرية وهذا مرتبط ايجابياً بزيادة انتاج منظمات النمو والتي ادت الى زيادة عدد الافرع الخضرية والافرع المزهرة وعدد النورات الزهرية في معاملة الـ (*B. + Ps.*) والذي ادى بدوره الى زيادة في الوزن الجاف للازهار . وهذا يتفق مع ما توصلت اليه . (باشي , رهف 2004).

4-4 تأثير التسميد الحيوي في كثافة البكتريا بجذور نبات البابونج :

اظهرت النتائج في جدول (6) تفوق معاملة التسميد الحيوي بـ (*B. + Ps.*) معنويا على بقية المعاملات من حيث الزيادة في كثافة البكتيريا الكلية اذ بلغت (1.02×10^9) وحدة تكوين مستعمرة / غم جذور في الوقت

الذي تراجعت فيه كثافة البكتيريا في معاملات C و *B.* و *Ps.* الى (1.16×10^8) ، (1.61×10^8) و (6.01×10^8) وحدة تكوين مستعمرة / غم جذور على التوالي.

الجدول (6) : تأثير التسميد الحيوي ببكتيريا *B. subtilis* و *Ps. fluorescens* ومعاملة (*Ps. fluorescens* + *B. subtilis*) في المنطقة المتأثرة بالجذور لنباتات البابونج المعامل به

المعاملات	معدل كثافة البكتيريا في وحدة تكوين مستعمرة / غم
Control	1.16×10^8
التسميد بـ *B.*	1.61×10^8
التسميد بـ *Ps.*	6.01×10^8
التسميد بـ (*B.* + *Ps*)	1.02×10^9
L.S.D $_{0.05}$	0.026

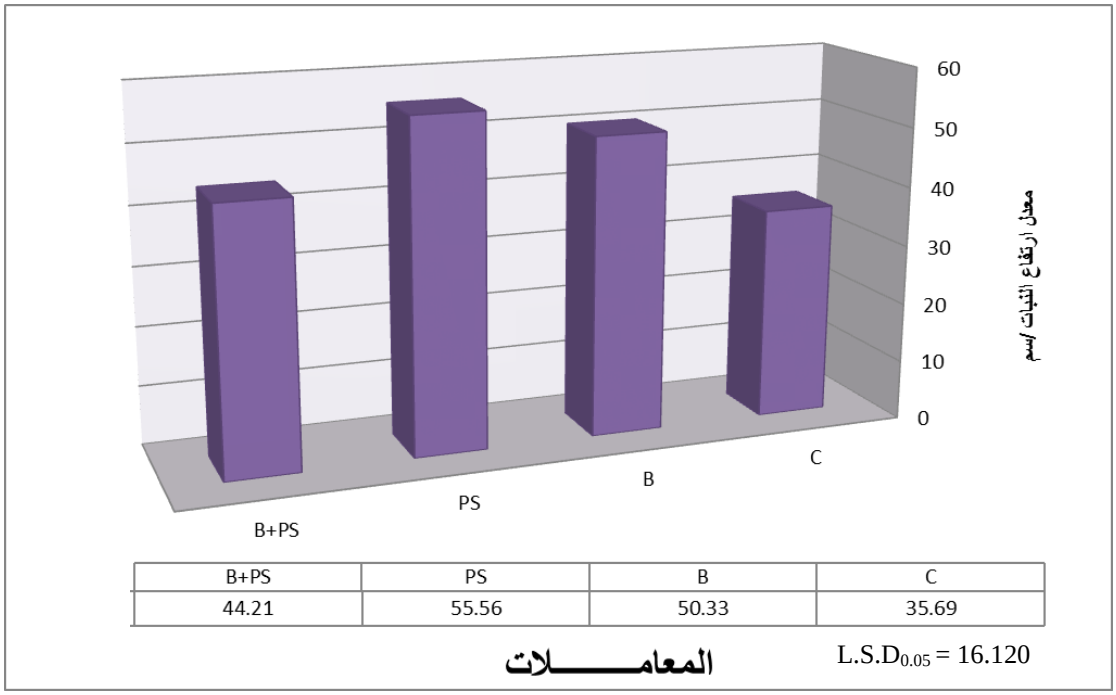
وكانت هناك اختلافات معنوية في كثافة البكتيريا بين هذه المعاملات وهذا يدل على ان نوع البكتريا المستخدم في التسميد الحيوي له تأثير في زيادة كثافة البكتيريا ، وان هذه الاختلافات المعنوية في كثافة البكتيريا في منطقة Rhizosphere لكل معاملة من معاملات البحث ادت الى زيادة التأثيرات الايجابية من حيث زيادة مساحة المجموع الجذري وبالتالي زيادة في النمو الخضري وعدد الافرع الخضرية ، والافرع الزهرية ، والنورات الزهرية ، كما وادى ايضا الى زيادة في المحتوى الكلوروفيلي A و B في الاوراق وبالاخص في معاملة التسميد الحيوي (*B.* + *Ps.*) ، اضافة الى مساهمة نوعي البكتيريا معا في حماية جذور نبات البابونج *M. chamomile* من التأثيرات السلبية للاصابات الفطرية والبكتيرية المسببة لتعفن الجذور وانعكاسها بالتالي سلبا على النبات من خلال انتاجها المضادات الحيوية (Antibiotic) التي تؤدي الى التقليل من الاصابات الفطرية ومن ثم زيادة وتحسين نمو النبات اذ تشير العديد من الدراسات الى ان هناك علاقة طردية بين كثافة البكتيريا في المنطقة المتأثرة بالجذور Rhizosphere وزيادة التأثيرات الايجابية في حماية النباتات من المسببات المرضية وزيادة النمو ، ففي دراسة اجراها العنسي (1999) وجد علاقة عكسية بين كثافة البكتيريا *Ps. putida* ومعدلات النسبة المئوية للاصابة بالفطرين *Fusarium oxysporium* و *Fusarium*

lycopersici اذ كلما زادت كثافة البكتيريا قلت معدلات الاصابة بالمرض وزاد النمو والانتاج لمحصول الطماطة .

وفي دراسة اخرى وجد جاسم (1999) والعاشور (2009) ان زيادة كثافة البكتيريا في منطقة المحيط الجذري لمحصول الحنطة والباميا ادت الى خفض معدلات الاصابة بالفطر *F. graminearum* وزيادة معدلات النمو والانتاج. اضافة الى قابلية بكتيريا *Ps.* لانتاج Fluorescent siderophores pseudo pectin وهي مركبات قابلة للانتشار ولها القابلية العالية على الارتباط مع الحديد (Fe^{+3}) مكونة مركبا مخلبيا Iron – chelating siderophores مما يعمل على اختزال ايونات الحديد Fe^{+3} الذائبة فيقلل من جاهزيته للاحياء الممرضة التي تحتاجه في النمو والتطور مؤدية بدورها الى حماية النبات ايضا من الاصابات الممرضة. كما ان لبكتيريا *Ps.* قابلية على منع الاحياء المجهرية الممرضة من انتاج Ethylene (EDDA) Diamins Dioxygens Hydroxy Phenyl Acetic Acid الذي يقلل من نموها وتطورها وهذا يتفق مع ما توصل اليه (Leban,1987).

5-4 تأثير التسميد الحيوي في ارتفاع نبات البابونج :

تشير النتائج المبينة في الشكل (3) الى وجود فروق معنوية في ارتفاع نباتات البابونج لمعاملة التسميد الحيوي ببكتيريا *P. fluorescens* اذ بلغ معدل ارتفاع النباتات المعاملة بهذه البكتيريا (55.56) سم وكذلك ازداد معدل ارتفاع النباتات المعاملة ببكتيريا *B. subtilis* اذ بلغت (51.33) سم في حين بلغ ارتفاع نباتات معاملة (*B. subtilis + Ps. fluorescens*) الى (44.21) سم ، وبلغ معدل ارتفاع نباتات معاملة السيطرة الى (30.42) سم.



الشكل (3) تأثير معاملات التسميد الحيوي ببكتيريا الـ *B.* و *Ps.* والـ (*B.* + *Ps.*) في ارتفاع نباتات البابونج *M. chamomile*

تتفق هذه النتائج مع ما ذكره Tariq *etal* (2007) اذ اشاروا الى ان معاملة بذور نبات الباميا ببكتيريا *B. subtilis* ادى الى زيادة ارتفاع ساق نبات الباميا الى (20.27) سم في حين بلغ طول الساق في معاملة السيطرة (15.45) سم.

اشار (كاظم ، 2002) الى كفاءة بكتيريا *Ps. fluorescens* بتثبيط كافة التأثيرات السلبية وبآليات مختلفة الامر الذي يؤدي الى نمو النباتات بصورة متفوقة لانتماءها الى مجموعة Plant Growth Promoting Rhizobacteria (P.G.P.R) ، اضافة الى انتاجها وتنظيم افراز منظمات النمو مثل الاوكسينات (IAA) والجبرلينات (GA) والسايتوكاينينات (Ck) التي لها دور بارز في زيادة نمو وارتفاع النبات.

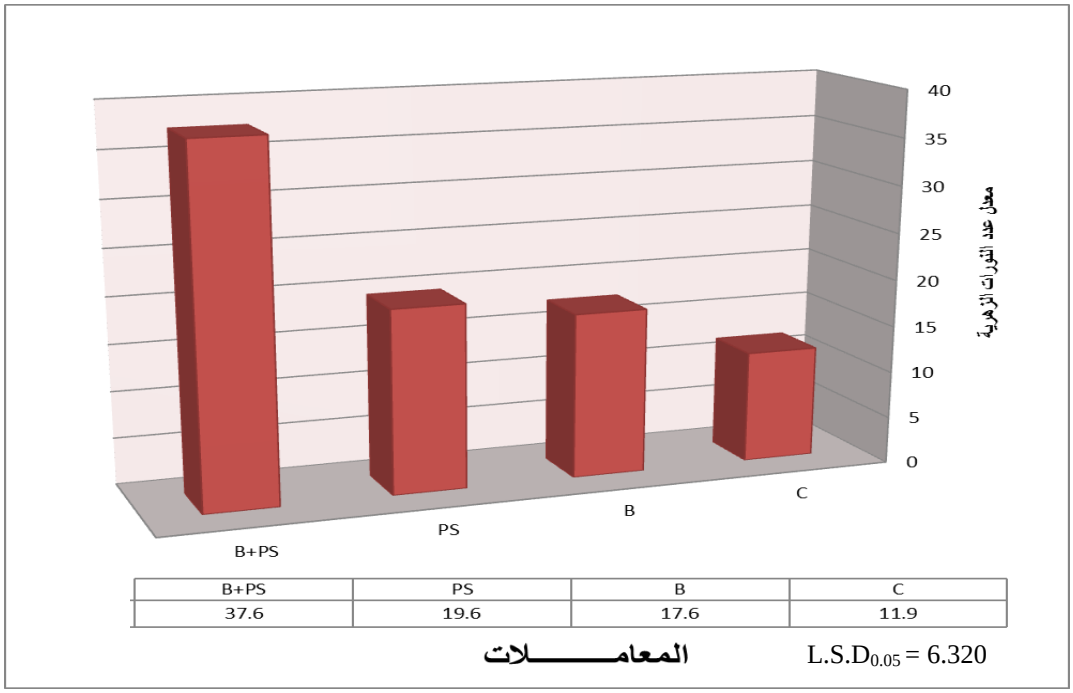
تتفق هذه النتائج مع ما توصل اليه العاشور (2009) حول كفاءة بكتيريا *Bacillus* في زيادة ارتفاع نباتات الباميا المعاملة بالمستحضر الحيوي البكتيري *B.* اذ بلغ معدل ارتفاع النباتات المعاملة (14.28) سم في حين بلغ معدل ارتفاع نباتات معاملة السيطرة (9.29) سم.

تتفق ايضاً مع ما اشار اليه Abd El-Khair, *etal* (2007) من اثر واضح لبكتيريا *B.* في زيادة معدلات الارتفاع في سيقان نبات البطاطا اذ بلغ معدل الارتفاع في سيقان النباتات المعاملة بالبكتيريا اعلاه (59.7) سم متفوقاً على معدل الارتفاع في سيقان نباتات معاملة السيطرة اذ توقف معدل الارتفاع فيها عند (50.3) سم . وتعزى هذه الزيادة الى مقدرة البكتيريا في زيادة انتاج انزيم الـ Phytase الذي يؤدي بدوره الى زيادة الكتلة الحيوية للبكتيريا في منطقة المحيط الجذري وكذلك في زيادة جاهزية الفسفور للنبات (Idriss, *etal* ,2002).

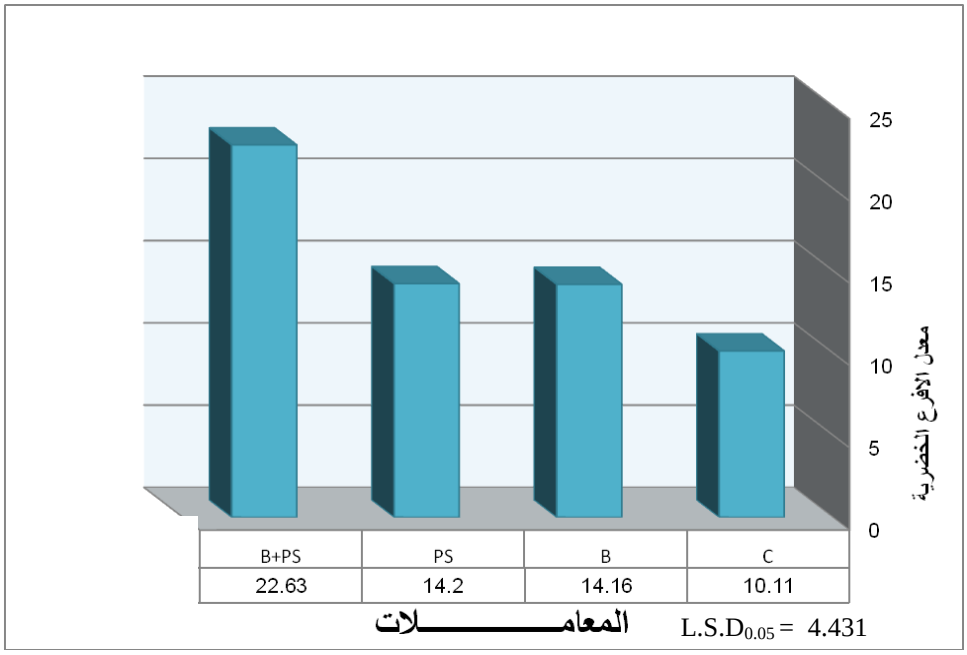
اما بالنسبة لتراجع معدل ارتفاعات نباتات البابونج لمعاملة (*B.* + *Ps.*) والتي بلغت (44.21) سم فيعزى الى توزع ايجابيات كل من بكتيريا *B.* وبكتيريا *Ps.* والتي ادت الى زيادة في عدد الافرع الخضرية والنورات الزهرية والتي ادت بدورها الى زيادة نسبة الزيت والوزن الجاف للأزهار.

6-4 تأثير التسميد الحيوي في معدلات عدد الافرع الخضرية والنورات الزهرية لنبات البابونج :

اظهرت نتائج التحليل الاحصائي في الشكلين (4 و 5) زيادة في معدل عدد الافرع الخضرية وعدد النورات الزهرية لنبات البابونج ولكافة معاملات التسميد الحيوي قيد الدراسة ، اذ لوحظ زيادة في معدل عدد النورات الزهرية ولاسيما في معاملة التسميد الحيوي ببكتيريا (*B.* + *Ps.*) والتي ارتفع فيها معدل النورات الزهرية الى (37.6) نورة زهرية متفوقة على باقي المعاملات وهي C ومعاملة بكتيريا *B.* . ومعاملة بكتيريا *Ps.* والتي بلغ معدل عدد النورات الزهرية الى (11.9) , (17.6) , (19.6) نورة زهرية على التوالي . ولوحظ ايضاً زيادة في معدل عدد الافرع الخضرية ولاسيما في معاملة (*B.* + *P.*) والتي بلغ فيها المعدل (22.51) متفوقة على باقي معاملات C و *B.* و *Ps.* والتي بلغت (10.11) , (14.16) , (15.22) على التوالي.



الشكل (4) تأثير معاملات التسميد الحيوي ببكتيريا *B.* و *Ps.* و (*B. + Ps.*) في زيادة معدلات اعداد النورات الزهرية لنبات البابونج *M. chamomile*



الشكل (5) تأثير معاملات التسميد الحيوي ببكتيريا *B.* و *Ps.* و (*B. + Ps.*) في زيادة معدلات اعداد الافرع الخضرية لنبات البابونج *M. chamomile*

تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما توصل اليه كل من(2005) Thind and Babu حول كفاءة المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. subtilis* في زيادة عدد الاشطاء (Tillers) للرز ، اذ بلغ معدل عدد الاشطاء (18.27) شطا / نبات متفوقة على معاملة المقارنة والتي بلغ فيها المعدل (11.53) شطا / نبات في حين اعطت معاملة الرش الورقي بالمستحضر الحيوي للبكتيريا اعلاه مع تعفير البذور بالمستحضر البكتيري 20.93 شطا / نبات.

تماثل هذه النتائج مع ما توصل اليه العاشور (2009) من كفاءة بكتيريا *B. circulans* في زيادة معدل الاشطاء في نبات الحنطة عند تعفير حبوب الحنطة بالمستحضر الحيوي للبكتيريا اعلاه اذ بلغ معدل الاشطاء (4.67) شطا / نبات متفوقة على معاملة السيطرة والتي بلغ فيها (3.22) شطا / نبات . ويعود السبب في زيادة معدل الاشطاء لنبات الحنطة الى كفاءة المستحضر البكتيري بانتاجها للمركبات الشبيهة بالهرمونات النباتية متمثلة بالاوكسين IAA والجبرلين GA_3 والتي يعود لهما السبب في زيادة معدلات انقسام الخلايا واستطالتها وتطور النمو في الافرع الجانبية (Swain *et al*., 2007 ؛ Idriss *et al*., 2007).

واشار العاشور (2009) ايضاً الى زيادة في معدلات افرع نباتي الحنطة والباميا والتي بلغت (5.33) شطا / نبات لمعاملة المستحضر الحيوي البكتيري *B.* متفوقة على معاملة السيطرة والتي بلغت (2.33) شطا / نبات.

اما بالنسبة لبكتيريا *Ps. fluorescens* وكما اشير انفاً فتعزى الى مجموعة (P.G.P.R) والعلاقة بين نمو النباتات وبكتيريا *B.* وبكتيريا *Ps.* علاقة طردية اذ ادى تعاونهما معاً الى زيادة مؤشرات النمو ولاسيما الافرع الخضرية يتبعه زيادة في عدد البراعم الزهرية والنورات الزهرية (العنسي ، 1999).

واثبتت البحوث والدراسات بأن لهرموني IAA و GA_3 اثرهما الكبير في نمو النبات خلال مراحل نموة المختلفة فالاول يؤثر باتجاه نمو الجذور وكذلك نمو الجذور الجانبية واعداد الشعيرات الجذرية ومن ثم زيادة كتلة الجذور مما يعمل على زيادة انتشار الجذور ونموها في حجم اكبر من التربة مما يزيد من السعة الامتصاصية للنظام الجذري للعناصر الغذائية وهذا ما لاحظه Abd EL-Khair, *etal*(2007) من زيادة نمو جذور الرز النامية في الاصص بعد اضافتها لكثير من المستحضرات الاحيائية الحاوية على احد انواع البكتيريا من جنس *Bacillus* ومنها النوع *B. circulans* .

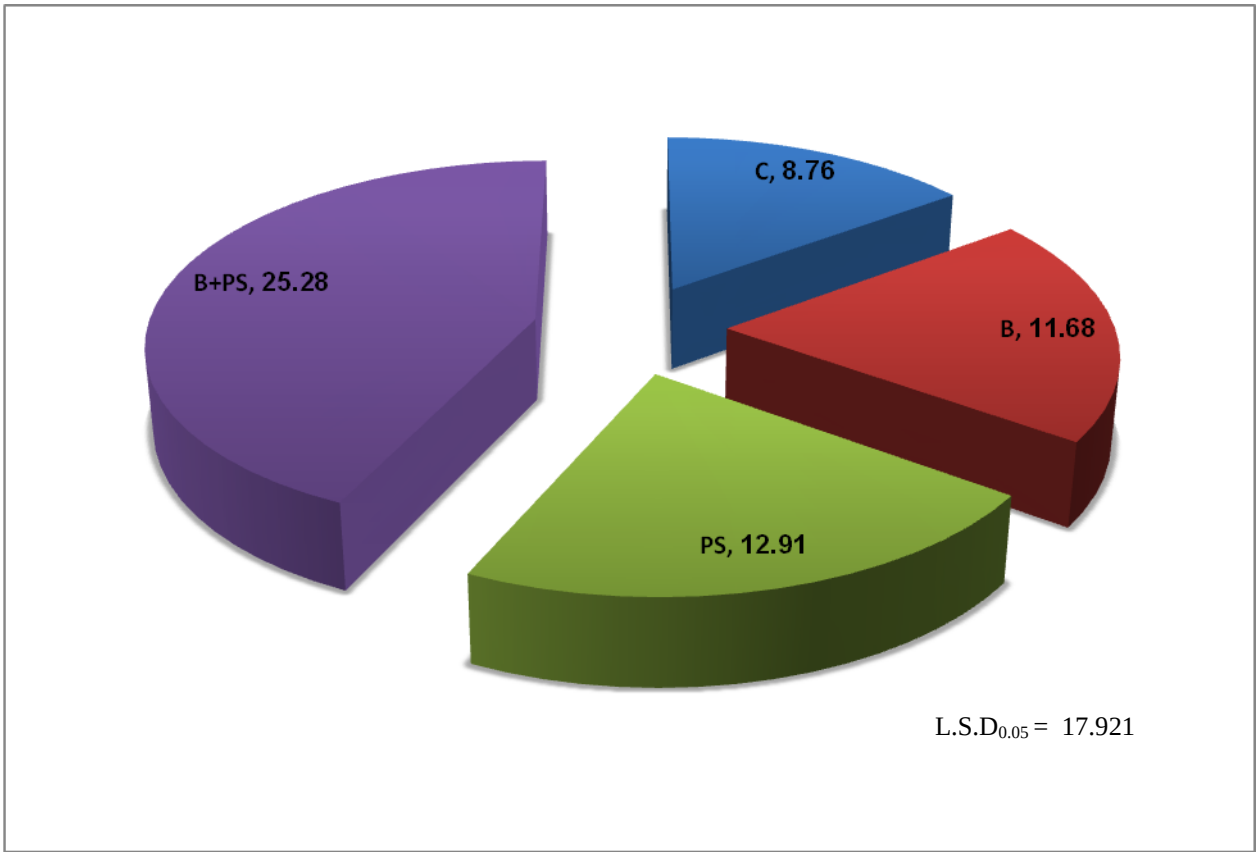
اما الجبرلين فكان له اثر اساسي في زيادة ارتفاع النبات عن طريق زيادة استطالة الساق بفعل اثره في اتساع الخلايا النباتية (Davies , 1995). ودلت الابحاث بأن بكتيريا *B.* و *Ps.* داخلية تستعمر سطوح وانسجة النبات (Endophytic bacteria) التي امكن عزلها من جذور وسيقان الحنطة والرز والذرة التي تتضاعف اولاً وتتجمع حول نهايات الجذور يتبعه دخولها الى خلايا القشرة في الجذر وحتى التغلغل الى الانسجة الوعائية للجذر (Tilak and Reddy, 2006).

ان زيادة نمو الجذور والساق بفعل بكتيريا (*Ps.* + *B.*) يؤدي الى تكوين نباتات قوية وسليمة تمكنها من السيادة في منطقة المحيط الجذري ويعطي لنوعي البكتيريا السيادة في التواجد بسبب سرعة التكاثر وسعة في انتاج المضادات الحياتية (Pleban *etal*., 1995).

7-4 تأثير التسميد الحيوي في النسبة المئوية للزيت الطيار في ازهار نبات البابونج :

تبين نتائج الشكل (6) تفاوت النسبة المئوية في الزيت المستخلص من معاملات التسميد الحيوي للبابونج قيد الدراسة اذ اعطت معاملة (*B.* + *Ps.*) اعلى نسبة مئوية للزيت الطيار والتي بلغت 25.28% مقارنة مع معاملة المقارنة ومعاملة *B.* ومعاملة *Ps.* والتي بلغت 8.76 و 11.68 و 12.91% على التوالي.

ويشير التحليل الاحصائي بأن هذه الزيادات كانت معنوية وقد يرجع السبب لتفوق معاملة (*B.* + *Ps.*) لكون نوعي البكتيريا معاً ادى الى زيادة الافرع الخضرية وزيادة عدد البراعم والنورات الزهرية اضافة الى كون نمو نبات البابونج غير محدود اذ يستمر بالنمو الى نهاية الموسم ، وان الزيادة في النمو تنعكس على صفة عدد الازهار في الافرع الزهرية مما يؤدي ايجابياً الى زيادة نسبة الزيت بسبب اعادة توزيع المواد الغذائية في النبات والذي بدوره يؤدي الى زيادة عملية التزهير .



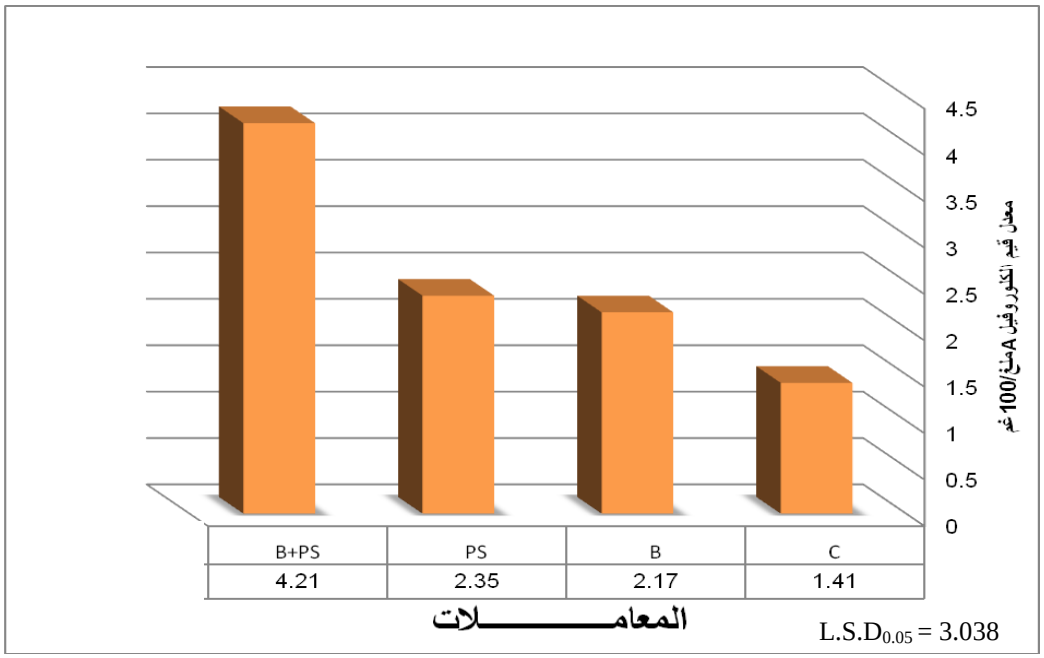
الشكل (6) تأثير معاملات التسميد الحيوي ببكتيريا الـ *B.* و *Ps.* والـ (*B.* + *Ps.*) في نسبة الزيت المئوية لأزهار نبات البابونج *M. chamomile*

تتفق هذه النتائج مع ما توصلت اليه رهف (2004) على نبات البابونج والذي اعطى نتائج في النمو الخضري وافرع زهرية ونورات زهرية ومن ثم زيادة نسبة الزيت استجابة لمنظم النمو GA_3 وهذا يثبت بأن نباتات البابونج المعاملة (*B.* + *Ps.*) اكثر نقاوة وراثياً وهي الافضل في استخلاص المواد الفعالة والزيت.

وتتفق هذه النتائج ايضاً مع ما توصل اليه ابو زيد (2000) عند دراسته لتأثيرات تراكيز مختلفة من الجبرلين في النسبة المئوية للزيت الطيار لنبات حشيشة الليمون (Lemon grass) ، اذ وجد ان التركيز 100 جزء من المليون هو الافضل في اعطاء قيم جيدة مقارنة مع التراكيز الاخرى.

8-4 تأثير التسميد الحيوي في معدلات كلوروفيل A ، B لاوراق نبات البابونج

بينت نتائج التحليل الاحصائي في الشكلين (7) و (8) تفوق معاملة المستحضر الحيوي (*B.* + *Ps.*) معنوياً في زيادة معدلات الكلوروفيل A و B على جميع معاملات التسميد الحيوي قيد البحث ، اذ بلغ اعلى معدل لقيمة الكلوروفيل A (4.21) ملغم / 100 غم متفوقة على سائر معاملات السيطرة ومعاملة الـ *B.* ومعاملة *Ps.* اذ بلغت قيمهم الكلوروفيل (1.41 و 2.17 و 2.35) ملغم / 100 غم على التوالي.



الشكل (7) تأثير معاملات التسميد الحيوي ببكتيريا الـ *B.* و *Ps.* والـ (*B.* + *Ps.*) في تركيز الكلوروفيل (A) لاوراق نبات البابونج *M. chamomile*

كما وازدادت قيم الكلوروفيل B (الشكل 8) في معاملة التسميد الحيوي (*B.* + *Ps.*) اذ وصلت اعلى قيمة لمعدله (3.78) ملغم / 100 غم متفوقة على باقي معاملات السيطرة ومعاملة *B.* ومعاملة *Ps.* اذ بلغت (1.45 و 2.01 و 2.25) ملغم / 100 غم على التوالي.

تتماثل هذه النتائج مع ما اوضحه العاشور (2009) حول كفاءة المستحضرات الحيوية في زيادة معدلات الكلوروفيل A و B معنوياً معنوياً في نباتات الحنطة والباميا اذ بلغ اعلى معدل للكلوروفيل A (2.7) ملغم / 100 غم متفوقة على معاملة السيطرة والتي بلغت (1.75) ملغم / 100 غم.

كما وتتقارب هذه النتائج ايضاً مع ما بينه El-Daly (2006) حول كفاءة نوعي البكتيريا قيد البحث في زيادة معدلات الكلوروفيل A في نبات الذرة اذ بلغ معدله (11.31) ملغم / 100 غم متفوقاً على معاملة السيطرة التي بلغت من دون الفطر وبوجود الفطر *Rhizoctonia solani* (6.5) ملغم / 100 غم.

الشكل (8) تأثير معاملات التسميد الحيوي ببكتيريا *B.* و *Ps.* و (*B.* + *Ps.*) لقيمة الكلوروفيل (B) لاوراق نبات البابونج *M. chamomile*

وتتفق هذه النتائج مع ما توصلت اليه المعموري (2009) حول كفاءة المستحضر الحيوي لبكتيريا *B. cereus* في زيادة قيمة الكلوروفيل A و B في اوراق نبات الطماطة التي عوملت بذوره بالمستحضر الحيوي وكانت الفروق معنوية في النباتات المعاملة عن غير المعاملة.

يعزى سبب كفاءة المستحضرات الحيوية المعاملة ببكتيريا (*B.* + *Ps.*) في زيادة معدلات الكلوروفيل A و B الى كفاءة كل من نوعي البكتيريا في خفض مستوى استهلاك الكلوكوز في اوراق نبات البابونج المعاملة بالمستحضرات الحيوية للبكتيريا قيد الدراسة ومن ثم زيادة معدل التمثيل والبناء الضوئي في الاوراق نتيجة لانعكاس مسار الطاقة ، ففي دراسة اجريت على نبات *Arabidopsis thaliana* اظهرت مقدرة كل من نوعي البكتيريا *B. subtilis* و *Ps. fluorescens* وبفعالية كبيرة في خفض معدل استهلاك الكلوكوز وتقليل Abscisic acid ومن ثم زيادة فعالية البناء الضوئي وتقليل نسب الشيخوخة في اوراق النباتات اعلاه (Zhang *et al.*, 2008).

يمكن ان تعزى الزيادة الحاصلة في كمية الكلوروفيل A و B في اوراق نبات البابونج والمعاملة بالمستحضرات الحيوية ببكتيريا الـ *B.* وبكتيريا *Ps.* وبالاخص معاملة (*B.* + *Ps.*) الى مقدرة نوعي البكتيريا بتوفير كميات اضافية من العناصر المعدنية المختلفة ، والتي ينعكس تأثيرها ايجابياً على كمية الكلوروفيل ، فزيادة نسبة النتروجين N يزيد من تصنيع الكلوروفيل ، اذ ان 70% من نتروجين الورقة يدخل في تركيب الصبغة وان البلاستيدات الخضراء تحتوي على اكثر من نصف المحتوى الكلي للنتروجين (الصحاف ، 1989).

ولعنصر الحديد (Fe) دوراً فعالاً في زيادة محتوى الكلوروفيل من خلال تأثيره في زيادة اعداد واحجام البلاستيدات الخضراء اضافة الى ان الحديد يشترك كعامل مساعد في تكوين الكلوروفيل لاشتراكه في تكوين مركبات Cytochromes ومركب Ferrdoxin المهم في عملية البناء الضوئي واختزال النترات (Nitrate reduction) (الصحاف ، 1989).

4-9 الكشف الكيميائي التمهيدي الاستدلالي عن المجاميع الفعالة لمستخلصات نبات البابونج :

تبين النتائج في جدول (7) ان مستخلصات ازهار البابونج تحتوي على المركبات الفينولية بالدرجة الاولى والمتمثلة بالكومارين (Comarin) والتانينات (Tannins) ومن ثم الكلايكوسيدات (Glycosides). تتفق هذه النتائج مع ما توصلت اليه الطرفي (2006) من احتواء مستخلصات ازهار البابونج على الكومارين والتانينات والفينولات . استخدمت طريقة Karber and Behrem (1953) لتحديد الجرعة القاتلة لنصف حيوانات التجربة LD_{50} للمستخلص الكحولي لازهار البابونج ، حيث بينت النتائج المبينة في جدول (8) ان الجرعة 9000 ملغم / كغم تسببت في نفوق حيوان واحد في حين ماتت الحيوانات المعاملة بالجرعة 11000 ملغم / كغم وباستعمال الطريقة نفسها حددت الجرعة LD_{50} بمقدار (9875) ملغم / كغم، وهذا يشجع امكانية استعمال مستخلصات ازهار البابونج في العلاجات الطبية .

الجدول (7): الكشف الكيميائي الاستدلالي (الترسيبي) للكشف عن المجاميع الفعالة لمستخلصات ازهار البابونج المعاملة بالتسميد الحيوي ببكتيريا *B. subtilis* و *Ps. fluorescens* و(*Ps. Fluorescens + B. subtilis*)

كواشف الفينولات		
اسم الكاشف	**نوع المستخلص**	**نوعية التفاعل**
خلات الرصاص 1%	كحول ايثانولي	+
كلوريد الحديديك 1%	كحول ايثانولي	+
هيدروكسيد البوتاسيوم	كحول ايثانولي	+
الكومارين	كحول ايثانولي	++
كواشف القلويدات		
كاشف ماير	كحول ايثانولي	+
دراكندروف	كحول ايثانولي	++
حامض التانينيك	كحول ايثانولي	+
كواشف التربينات		
الرغوة	كحول ايثانولي	+
كلوريد الزئبقيك	كحول ايثانولي	–
كواشف الكلايكوسيدات		
فهلنك	كحول ايثانولي	+
بندكت	كحول ايثانولي	+
حامض HCL	كحول ايثانولي	–

(+) متوسط التفاعل (++) شديد التفاعل (–) لا يوجد تفاعل

الجدول (8) :تعيين الجرعة القاتلة للنصف (LD_{50}) Lethal dose 50% للمستخلص الكحولي لازهار البابونج

الجرعة ملغم / كغم	عدد الحيوانات	عدد الحيوانات الميتة	a	b	ab
5000	8	–			
6000	8	–	1000		
7000	8	–	1000		
8000	8	–	1000		
9000	8	1	1000	0	**500**
10000	8	4	1000	2.5	**2500**
11000	8	8	1000	6.0	**6000**

LD_{50} = Biggest dose - (a x b) / n LD_{50} = 11000 – 9000 / 8

LD_{50} = 9875 mg / kg

اذ ان :

a = الاختلافات بين الجرع b = معدل عدد الحيوانات الميتة بين المجموعة الاولى والثانية n = معدل عدد الحيوانات لكل مجموعة .

تتفق هذه النتائج مع ما توصلت اليه الطرفي (2006) والتي حصلت على نتائج مشابهة عند استعمالها للمستخلص الكحولي لازهار البابونج ، وتتفق مع ما جاء به Graham (1998) عند الحقن تحت الجلد لحيوان الجرذ بالمستخلص الكحولي لازهار نبات البابونج بتركيز 5 غم / كغم من وزن الجسم ولم يظهر عليه أي اعراض سمية.

4-10 تأثير كفاءة مستخلصات ازهار البابونج المعاملة بالتسميد الحيوي في بعض صفات تخثر الدم

تشير نتائج الجدول (9) بأن جميع مستخلصات ازهار البابونج المعاملة بالتسميد الحيوي قيد البحث اثرت في صفات تخثر الدم اذ تفوق مستخلص معاملة التسميد الحيوي ببكتيريا (*B. + Ps.*) على باقي المعاملات وبفارق معنوي اذ ازداد زمن النزف والتخثر والبروثرومبين والثرومبوبلاستين الى 7.01 دقيقة و 6.89 دقيقة و 19.31 ثانية و 34.88 ثانية على التوالي ، اما مستخلص معاملة التسميد الحيوي ببكتيريا *B. subtilis* فكان الاقل في صفات تخثر الدم اعلاه اذ بلغت 4.42 دقيقة و 3.30 دقيقة و 15.65 ثانية و 31.55 ثانية على التوالي.

الجدول (9):تأثير مستخلصات ازهار البابونج لمعاملات التسميد الحيوي ببكتريا *B. subtilis* وبكتيريا *Ps. fluorescens* و (*B. subtilis + Ps. fluorescens*) في بعض صفات تخثر الدم لحيوانات التجربة

المعاملات	زمن النزف (دقيقة)	زمن التخثر (دقيقة)	زمن البروثرومبين (ثانية)	زمن الثرومبوبلاستين (ثانية)
السيطرة	2.98 ± 0.118	2.66 ± 0.064	11.31 ± 0.078	23.74 ± 0.787
B. subtilis	4.42 ± 0.301	3.30 ± 0.162	15.65 ± 0.614	31.55 ± 8.723
Ps. fluorescens	5.81 ± 0.241	5.20 ± 0.177	16.21 ± 1.77	33.19 ± 8.118
B. subtilis + *Ps. fluorescens*	7.01 ± 0.311	6.89 ± 2.511	19.31 ± 5.771	34.88 ± 8.990
L.S.D $_{0.05}$	0.228	0.199	0.146	1.601

القيم تمثل المتوسط ± الخطأ القياسي

كما ويلاحظ من النتائج المعروضة في جدول (10) ان الجرعة 1250 ملغم / كغم اعطت اطول مدة زمنية لنزف الدم وتخثر الدم وزمن البروثرومبين وزمن الثرومبوبلاستين والبالغة 9.01 دقيقة و 8.99 دقيقة و 23.09 ثانية و 43.63 ثانية على التوالي وبفارق معنوي عن جميع الجرعات في حين انخفضت في معاملة 750 ملغم / كغم في زمن النزف والتخثر والبروثروبين والثرومبوبلاستين اذ بلغت 4.67 و 4.11 و 15.90 و 23.67 على التوالي والتي لم تختلف معنوياً عن معاملة السيطرة.

الجدول (10) : تأثير جرع مستخلصات ازهار البابونج لمعاملات التسميد الحيوي ببكتريا *B. subtilis* وبكتيريا *Ps. fluorescens* و (*B. subtilis + Ps. fluorescens*) في بعض صفات تخثر الدم

الجرعة / ملغم / كغم	زمن النزف (دقيقة)	زمن التخثر (دقيقة)	زمن البروثرومبين (ثانية)	زمن الثرومبوبلاستين (ثانية)
السيطرة	2.98 ± 0.118	2.66 ± 0.064	11.31 ± 0.078	20.73 ± 0.699
750	4.67 ± 0.401	4.11 ± 0.100	15.90 ± 0.615	23.67 ± 0.761
1000	7.39 ± 0.246	7.00 ± 0.154	20.87 ± 1.50	37.05 ± 2.221
1250	9.01 ± 0.498	8.99 ± 0.546	23.09 ± 3.502	43.63 ± 4.001
L.S.D $_{0.05}$	0.305	0.200	1.033	2.320

القيم تمثل المتوسط ± الخطأ القياسي

اوضحت النتائج في الجداول (9 , 10 , 11) ان جميع مستخلصات ازهار البابونج المعاملة بالتسميد الحيوي ببكتيريا الـ (*B.*) و (*Ps.*) و (*B. + Ps.*) قيد الدراسة ذات تأثير فعال في التأثير المضاد لتخثر الدم لذكور الجرذان. وقد لوحظ ان مستخلص ازهار البابونج لمعاملة (*B. + Ps.*) له تأثير اكبر وفعال في اطالة زمن النزف والتخثر وزمن البروثرومبين وزمن الثرومبويلاستين ، وقد يعزى سبب ذلك الى احتواء مستخلصات ازهار البابونج في المعاملة الـ (*B. + P.*) على اكبر كمية من المركبات الفينولية الخام والمتمثلة بوجود الكومارين والذي سبب انخفاضاً في كمية البروثرومبين في الدم لدرجة يستحيل عندها تجلطه ، وذلك لتأثيره

الفعال على عمل فيتامين +K الضروري والاساسي لتكوين البروثرومبين في الكبد والذي يؤدي بدوره الى نقص في عوامل التخثر وهي II و IIV و IX و XI (Couto , 2003 ؛ Hirsh, 2001).

الجدول (11) : تأثير التداخل بين نوع المستخلص لازهار البابونج المعاملة بالتسميد الحيوي لبكتيريا *B. subtilis* وبكتيريا *Ps. fluorescens* و (*B. subtilis + Ps. fluorescens*) وجرع المستخلصات في بعض صفات تخثر الدم

الجرعة / ملغم / كغم	نوع المستخلص	زمن النزف (دقيقة)	زمن التخثر (دقيقة)	زمن البروثرومبين (ثانية)	زمن الثرومبوبلاستين (ثانية)
السيطرة	*B. subtilis*	2.99 ± 0.221	3.00 ± 0.265	13.99 ± 0.906	20.66 ± 1.632
	Ps. Fluorescens	3.11 ± 0.613	3.12 ± 0.104	11.78 ± 0.817	21.73 ± 1.721
	B. subtilis + *Ps. Fluorescens*	3.45 ± 0.215	3.33 ± 0.177	14.56 ± 0.911	23.66 ± 1.063
750	*B. subtilis*	4.11 ± 0.131	3.50 ± 0.163	13.61 ± 0.666	25.99 ± 0.873
	Ps. Fluorescens	3.65 ± 0.359	3.60 ± 0.003	14.32 ± 0.561	25.62 ± 0.930
	B. subtilis + *Ps. Fluorescens*	4.49 ± 0.403	4.00 ± 0.302	15.33 ± 0.762	27.52 ± 0.817
1000	*B. subtilis*	7.00 ± 0.012	6.88 ± 0.127	18.43 ± 0.819	36.64 ± 0.916
	Ps. Fluorescens	7.11 ± 0.017	7.30 ± 0.347	21.52 ± 1.940	37.10 ± 1.753
	B. subtilis + *Ps. Fluorescens*	7.20 ± 0.118	7.88 ± 0.345	22.53 ± 1.941	38.77 ± 1.827
1250	*B. subtilis*	7.91 ± 0.341	7.90 ± 0.315	25.67 ± 0.890	39.13 ± 0.816
	Ps. Fluorescens	8.88 ± 0.355	8.60 ± 0.331	26.94 ± 2.447	42.50 ± 3.121
	B. subtilis + *Ps. Fluorescens*	9.00 ± 0.356	8.77 ± 0.365	28.11 ± 2.221	45.62 ± 3.190
L.S.D $_{0.05}$		0.061	0.151	0.255	0.395

القيم تمثل المتوسط ± الخطأ القياسي

بينت النتائج في الجداول نفسها ان الجرعات العالية من مستخلصات ازهار البابونج كانت ذات تأثير فعال في اطالة زمن النزف وزمن البروثرومبين وزمن الثرومبوبلاستين وبالجرعات الثلاث (750 ، 1000 و 1250) ملغم / كغم.

كما قد تعود فعالية مستخلصات ازهار البابونج كعوامل مضادة للتخثر الى قدرتها على خفض الكوليسترول والذي بدوره ينعكس سلباً على فعالية (VII) نتيجة انخفاض التأثير المحفز لجزيئات البروتينات الدهنية الغنية بالكليسريدات الثلاثية مما يؤدي الى خفض فعالية العامل (XII) الذي يعمل على تثبيط فعالية العامل (VII) ومن ثم زيادة زمن التخثر ، وقد ادى التسميد الحيوي ببكتيريا *B. subtilis* و *Ps. fuorescens* والاثنين معاً الى زيادة مكونات المواد الفعالة التي تعمل على الاسراع في تحطيم العامل (Xa) وزيادة تحطيمه ، وان مضاد الثرومبين (III) (Anti-thrombin) هو احد العوامل المساعدة ، وبوجود مضاد الثرومبين فأن مكونات المستخلصات لازهار نبات البابونج ولاسيما معاملة الـ (*B. + Ps.*) والثرومبين يكونان مركباً مرتبطاً عكسياً والذي يكون فيه الثرومبين غير فعال (Hougie , 1982 ؛ Kelleher , 1990).

وقد ادى التسميد الحيوي بالبكتيريا الى زيادة كمية المواد الفعالة والزيت في مستخلصات ازهار البابونج المعاملة والتي ادت الى ارتخاء عضلات الاوعية وتوسعها ولاسيما الاوعية الدموية الشعرية والتي ادت الى زيادة زمن النزف والتي تحتاج الى عدد كبير في الصفيحات الدموية كي تسد فتحة النزف (Viola *et al.*, 1995 ؛ Drachman , 2002).

يعد الازولين (Azulene) الذي هو احد مكونات المستخلص ولاسيما الزيت الذي ازدادت كميته في معاملة (*B. + Ps.*) والتي لها الامكانية على احداث احتقان والتهابات في الامعاء مما يعرقل من عملية تكوين الدهون في الامعاء والذي انعكس سلباً على كمية فيتامين K الذي ينتمي الى مجموعة الفيتامينات القابلة للذوبان في الدهون ومن ثم نقص في كمية البروثرومبين (II) والعوامل (IX و X) المساعدة على التجلط مما يؤدي الى طول زمن النزف (عبدالفتاح ، 1988).

ومن المحتمل ان المستخلصات عملت على عرقلة عمل العوامل V و X و XI والعامل VIII وذلك بتحويل فايبرينوجين الى الليفين فيؤدي الى زيادة في زمن التخثر (Poort , 1996).

11-4 تأثير التسميد الحيوي لمستخلصات ازهار البابونج في المعايير الفسلجية لدم الحيوانات المختبرية

تشير النتائج الواردة في الجدول (12) بأن جميع مستخلصات أزهار البابونج المعاملة بالتسميد الحيوي قيد الدراسة اثرت وبشكل معنوي في بعض معايير الدم الفسلجية وكانت معاملة التسميد الحيوي (*B. + Ps.*) الاكثر

انخفاضاً في P.C.V% اذ بلغت 30.73% في حين بلغت في معاملة السيطرة ومعاملة *B.* ومعاملة *Ps.* 40.10 و 30.8 و 33.91% على التوالي.

اما بالنسبة لقيم مكداس الدم فبلغت 10.83 غم / ديسيليتر لمعاملة التسميد الحيوي (*B.* + *Ps.*) في حين بلغت في معاملة السيطرة ومعاملة *B.* ومعاملة . *Ps.* نحو 11.88 و 9.99 و 9.60 غم / ديسيليتر على التوالي. كما وسببت مستخلصات ازهار البابونج المعاملة بالتسميد الحيوي زيادة معنوية في قيم الـ E.S.R (قيم معدلات ترسيب الدم ملم^3 / ساعة) اذ بلغت في معاملة (*B.* + *Ps.*) 2.03 ملم^3 / ساعة في حين وصلت في معاملة السيطرة ومعاملة *B.* ومعاملة *Ps.* الى (1.72 و 2.55 و 2.72) ملم^3 / ساعة على التوالي.

اما اعداد كريات الدم الحمراء فقد احدثت المستخلصات قيد البحث زيادة معنوية في اعدادها اذ بلغت في معاملة السيطرة ومعاملة *B.* ومعاملة *Ps.* ومعاملة (*B.* + *Ps.*) ، (7.88 و 5.341 و 5.300 و 6.200) ملم^3 / 10^6 على التوالي. كما حصل ارتفاع معنوي في العدد الكلي لخلايا الدم البيضاء اذ بلغت في معاملة السيطرة ومعاملة *B.* ومعاملة *Ps.* ومعاملة (*B.* + *Ps.*) ، (5609.63 و 7256.12 و 7400.39 و 6500.30) ملم^3 / 10^3 على التوالي.

الجدول (12): تأثير التسميد الحيوي لمستخلصات ازهار البابونج المعاملة ببكتريا *B. subtilis* وبكتيريا *Ps. fluorescens* و (*B. subtilis* + *Ps. fluorescens*) في المعايير الفسلجية لدم ذكور الفئران قيد الدراسة

المعاملات / التسميد	%P.C.V	E.S.R ملم^3/ساعة	مكداس الدم غم /	اعداد كريات الدم	اعداد الصفائح	العدد الكلي لخلايا الدم

الحيوي			ديسيليتر	الحمر 10^6/ملم^3	الدموية 10^3/ملم^3	البيض 10^3/ملم^3
السيطرة	40.10 ± 0.452	1.72 ± 0.132	11.88 ± 0.140	7.88 ± 0.013	633.77 ± 34.125	5609.63 ± 218.10
B. subtilis	33.81 ± 5.623	2.55 ± 0.821	9.99 ± 1.551	5.341 ± 1.853	511.73 ± 30.091	7256.12 ± 1931.85
Ps. fluorescens	33.91 ± 7.504	2.72 ± 1.111	9.60 ± 1.559	5.300 ± 1.871	500.68 ± 30.00	7400.39 ± 2031.23
B. subtilis + *Ps. Fluorescens*	30.73 ± 5.570	2.03 ± 1.114	10.83 ± 1.426	6.200 ± 1.823	480.70 ± 30.11	6500.30 ± 1290.21
$L.S.D_{0.05}$	0.813	0.193	0.350	0.100	28.660	312.040

القيم تمثل المتوسط ± الخطأ القياسي

تبين النتائج في جدول (13) تأثير جرع مستخلصات ازهار البابونج المعاملة بالتسميد الحيوي ببكتيريا *B.* وبكتيريا *Ps.* وبكتيريا (*B.* + *Ps.*) معنوياً في معايير الدم الفسلجية ، اذ انخفضت نسب الـ P.C.V% عند الجرعة 1250 ملغم / كغم وبلغت 30.43% مقارنة مع جرعة السيطرة وللجرعتين 750 و 1000 ملغم / كغم والتي وصلت الى (40.10 و 36.23 و 30.50)% على التوالي. وتبين هذه النسب الانخفاض عكسياً في قيم P.C.V% بزيادة جرع مستخلصات التسميد الحيوي لازهار البابونج قيد الدراسة.

من جانب اخر حدثت زيادة معنوية في نسبة E.S.R عند معاملة الفئران بالجرعة 1000 ، 1250 ملغم / كغم اذ وصلت الى (3.19 و 3.21) ملم^3 / ساعة في حين تساوت تقريباً عند جرعة السيطرة و 750 ملغم / كغم اذ بلغت 1.72 و 1.83 ملم^3 / ساعة.

اما بالنسبة لكريات الدم الحمراء فقد حصل انخفاض عند الجرعتين (1000 و 1250) ملغم / كغم فقد بلغت (3.821 و 3.200) ملم^3 / 10^6 في حين وصلت عند جرعة السيطرة و 750 ملغم / كغم الى (7.880 و 6.564) ملم^3 / 10^6.

اما اعداد الصفائح الدموية فقد انخفضت عند الجرعتين (1000 و 1250) ملغم / كغم اذ بلغتا (391.76 و 300.96) ملم^3 / 10^3 في حين بلغت 633.77 ملم^3 / 103 في معاملة السيطرة و 620.31 ملم^3 / 10^3 عند الجرعة 750 ملغم / كغم .

واوضحت النتائج زيادة في اعداد كريات الدم البيضاء عند الجرعتين 1000 و 1250 ملغم / كغم اذ بلغتا (7000.15 و 1050.52) ملم^3 / 10^3 مقارنة مع معاملة السيطرة وجرعة 750 ملغم / كغم اذ بلغتا (5609.63 و 5727.63) ملم^3 / 10^3.

12-4 تأثير جرع مستخلصات ازهار البابونج في المعايير الفسلجية لدم الحيوانات المختبرية

تشير النتائج الواردة في الجدولين (13 و 14) بأن مستخلصات ازهار البابونج والمعاملة بالتسميد الحيوي ببكتيريا *B.* وبكتيريا *Ps.* وبكتيريا (*B. + Ps.*) وعند التراكيز العالية ادت الى حدوث اسهال دموي وفقر دم حاد لحيوانات التجربة نتيجة لتخدش الاغشية المخاطية المبطنة للامعاء والمعدة والذي ادى بدوره الى نقص في مخزون الحديد مما حفز نخاع العظم على انتاج كميات كبيرة من كريات الدم الحمراء صغيرة الحجم وبسرعة ادت الى ما يسمى Microcytic hypochronic anemia (الطرفي ، 2006).

وقد يعزى السبب ايضاً الى احتواء المستخلصات ولاسيما عند التراكيز المعاملة ببكتيريا (*B. + Ps.*) على التانينات ذات التأثير القابض لمنع الاسهال الدموي وتكوينها معقدات مع البروتينات يصعب تحللها او تأثيرها في الانزيمات الهاضمة ويثبط عملها التي خدشت جدرانها بفعل التأثيرات المخدشة للتراكيز العالية من الازولين التي ازدادت تراكيزها عند معاملة (*B. + Ps.*) ، لا تجدي نفعاً في موازنة التأثيرات الوظيفية السلبية للازولين بل ان الفعالية البايولوجية للازولين تفوقها بكثير ، ومن ثم عدم مقدرة التانينات على التقليل من حجم الحاصل في اعداد كريات الدم الحمراء وكذلك محتواها من خضاب الدم (Mann and Staba , 1992).

الجدول (13) : تأثير جرع مستخلصات ازهار البابونج المعاملة بالتسميد الحيوي ببكتريا الـ *B. subtilis* وبكتيريا *Ps. fluorescens* و (*B. subtilis + Ps. fluorescens*) في المعايير الفسلجية لدم ذكور الفئران قيد الدراسة

الجرعة / ملغم / كغم	%P.C.V	E.S.R ملم^3/ساعة	مكداس الدم غم / ديسليز	اعداد كريات الدم الحمر ملم^3/10^6	اعداد الصفائح الدموية ملم^3/10^3	العدد الكلي لخلايا الدم البيض ملم^3/10^3
السيطرة	40.10 ± 0.452	1.72 ± 0.132	11.88 ± 0.140	7.880 ± 0.013	633.77 ± 34.125	5609.63 ± 218.10
750	36.23 ± 1.200	1.83 ± 0.155	11.93 ± 0.213	6.564 ± 0.136	620.31 ± 48.623	5727.63 ± 215.32
1000	30.50 ± 0.411	3.19 ± 0.312	10.18 ± 0.200	3.821 ± 0.156	391.76 ± 15.223	7000.15 ± 712.24
1250	30.43 ± 2.119	3.21 ± 0.290	9.33 ± 0.350	3.200 ± 0.127	300.96 ± 19.57	1050.52 ± 999.21
$L.S.D_{0.05}$	0.900	0.260	0.400	0.301	29.910	400.19

القيم تمثل المتوسط ± الخطأ القياسي

ازداد محتوى المستخلصات قيد الدراسة من مادة الصابونينات التي لها دور كبير في زيادة هشاشية اغشية كريات الدم الحمراء وخروج الهيموكلوبين مما يسبب في عملية التحلل (Heamolysis) وكلما ازداد تحللها ازداد معدل انتاجها من قبل نقي العظم وبسرعة تفوق عن الحد الطبيعي مما يسبب نقص عددها في مجرى الدم (عبدالفتاح ، 1980).

الجدول (14) : تأثير التداخل بين انواع مستخلصات ازهار البابونج المعاملة بالتسميد الحيوي ببكتريا الـ *B. subtilis* وبكتيريا *Ps. fluorescens* و (*B. subtilis* + *Ps. fluorescens*) في معايير الدم الفسلجية لذكور الفئران قيد الدراسة

الجرعة / ملغم / كغم	المعاملات	%P.C.V معدل مكداس الدم	E.S.R ملم^3/ساعة معدل ترسيب كريات الدم	تركيز خضاب الدم غرام / ديسليز
C	*B. subtilis*	40.20 ± 0.726	1.70 ± 0.537	11.78 ± 0.658
	Ps. fluorescens	40.78 ± 0.726	1.70 ± 0.557	11.78 ± 0.658
	B. subtilis + *Ps. fluorescens*	41.18 ± 0.372	1.50 ± 0.521	13.00 ± 0.722
750	*B. subtilis*	31. 10 ± 1.310	2.12 ± 0.610	10.16 ± 0.600
	Ps. Fluorescens	36.23 ± 1.410	2.00 ± 0.500	10.24 ± 0.637
	B. subtilis + *Ps. fluorescens*	39.80 ± 0.817	1.69 ± 0.311	10.60 ± 0.731
1000	*B. subtilis*	36.06 ± 1.361	2.91 ± 0.631	10.00 ± 0.813
	Ps. Fluorescens	36.61 ± 1.321	2.87 ± 0.312	10.03 ± 0.799
	B. subtilis + *Ps. fluorescens*	34.59 ± 0.737	3.00 ± 0.300	9.91 ± 0.315
1250	*B. subtilis*	26.23 ± 1.036	5.00 ± 0.421	2.90 ± 0.771
	Ps. Fluorescens	27.33 ± 1.911	4.33 ± 0.311	8.41 ± 0.773
	B. subtilis + *Ps. fluorescens*	26.00 ± 1.011	6.01 ± 0.323	8.00 ± 0.315
L.S.D $_{0.05}$		0.100	0.211	0.032

القيم تمثل المتوسط ± الخطأ القياسي

تكملة الجدول (14)

الجرعة / ملغم / كغم	المعاملات	اعداد كريات الدم الحمراء ملم^3/10^6	اعداد الصفائح الدموية ملم^3 / 10^3	العدد الكلي لخلايا الدم البيضاء ملم^3/10^3

5901.21 ± 400.13	666.15 ± 55.818	8.23 ± 0.541	*B. subtilis*	**C**
5901.21 ± 400.13	666.15 ± 41.667	8.23 ± 0.541	*Ps. fluorescens*	
5331.50 ± 599.24	659.16 ± 34.076	8.00 ± 0.511	*B. subtilis* + *Ps. fluorescens*	
5661.22 ± 611.71	598.62 ± 66.321	7.99 ± 0.031	*B. subtilis*	**750**
5021.99 ± 725.11	567.51 ± 62.713	7.88 ± 0.055	*Ps. Fluorescens*	
5000.45 ± 816.92	529.61 ± 56.301	7.20 ± 0.057	*B. subtilis* + *Ps. Fluorescens*	
9023.56 ± 921.53	409.31 ± 30.10	4.53 ± 0.311	*B. subtilis*	**1000**
8033.11 ± 834.56	386.27 ± 37.41	3.39 ± 0.336	*Ps. Fluorescens*	
8000.53 ± 615.00	286.88 ± 34.75	3.11 ± 0.453	*B. subtilis* + *Ps. fluorescens*	
9781.06 ± 530.22	260.89 ± 30.751	2.76 ± 0.391	*B. subtilis*	**1250**
7800.37 ± 344.11	299.00 ± 32.177	2.66 ± 0.818	*Ps. Fluorescens*	
7000.10 ± 313.41	301.01 ± 35550	2.99 ± 0.721	*B. subtilis* + *Ps. Fluorescens*	
-	-	-	L.S.D $_{0.05}$	

القيم تمثل المتوسط ± الخطأ القياسي

وقد يعزى الانخفاض ايضاً في اعداد كريات الدم الحمراء وخضاب الدم للحيوانات المعاملة قيد الدراسة ، ولاسيما عند التراكيز العالية ولكافة المعاملات الى التأثيرات السلبية والمرضية للتراكيز العالية والتي تحدث احتقاناً وتوسعاً في الاوعية الدموية لانسجة (الكبد ، الكلى والطحال) والذي ادى الى نزفاً دموياً حاداً نتج عنه انخفاض معنوي في كريات الدم الحمراء وخضاب الدم عند معاملة (*B.* + *Ps.*) وعند التركيز 1250 ملغم / كغم.

ان زيادة نزف الدم بفعل مستخلصات التسميد الحيوي لازهار البابونج ادى الى ارتفاع قيم E.S.R عند الجرعة 1250 ملغم / كغم ولمعاملة (*B.* + *Ps.*) بسبب انخفاض اعداد كريات الدم الحمراء وهذا الانخفاض يسرع في معدلات ترسيب الدم (Brown 2002) . كما سببت الجرعات العالية ايضاً ولكافة المعاملات قيد الدراسة زيادة معنوية في العدد الكلي لخلايا الدم البيضاء ولاسيما عند ازدياد النزف والذي يؤثر ايجابياً في نقي العظم لزيادة انتاجها من خلايا الدم البيضاء ، واطلق على هذا العامل المحفز (LIF) – Lenocytosis

Indncing Factor اضافة الى زيادة تحفيز الخلايا على تحرير الهيستامين ذو التأثير المحفز في ازدياد انتاج خلايا الدم البيضاء في مجرى الدم (Blumenthal, 2000).

ان ازدياد E.S.R بزيادة جرع المستخلصات المسمدة حيوياً بالحقن تحت الجلد لحيوانات الدراسة له تأثيرات سلبية على تخديش الجلد وحصول التهابات ومن ثم زيادة عدد خلايا الدم البيضاء (Molochko وجماعته ، 1990). وربما تعمل المستخلصات المسمدة حيوياً على تحفيز الكبد لصنع المزيد من الكلوبيولينات المناعية (Ig) في الدم وهذا بدوره يشجع التصاق كريات الدم الحمراء مع بعضها مكونة سلسلة متواصلة ومتصلبة مما يجعل عملية ترسيبها سهلة ومن ثم ارتفاع معدل الترسيب ، كما وان الكلوبيولينات لها دور في زيادة لزوجة الدم ومن ثم زيادة معدل ترسيب كريات الدم الحمراء (Avallone *et al*., 2000).

ويعزى انخفاض اعداد الصفائح الدموية عند التراكيز العالية ولمعاملة (*B.* + *Ps.*) الى ارتباط مكونات المستخلص ولاسيما مادة (الازولين) بمواقع بروتين سكري على اغشية الصفائح الدموية وهذه المواقع مهمة للارتباط مع العامل فون وليبراند (VWF) فيؤدي الى خلل في الارتباط ونقص الصفائح الدموية لانه يؤدي الى انخفاض تحفيز المضاد (Ristocetin) الذي له دور كبير في تجميع الصفائح الدموية ، وان احتقان وتوسع الاوعية الدموية ثم النزف الدموي سبب انخفاضاً في اعداد الصفائح الدموية في المجرى الدموي وفي انسجة الجسم عند التراكيز العالية لمستخلصات التسميد الحيوي لازهار البابونج ولاسيما عند المعاملة (*B.* + *Ps.*).

الجدول (15) : المركبات المعزولة وقيم التحرك النسبي والوان الحزم المفصولة من مستخلص المركبات الفينولية لازهار نبات البابونج *M. chamomile* باستخدام تقنية (T.L.C)

المركبات	معدل الترحيل R.f	اللون تحت الضوء المرئي	اللون تحت اشعة U.V

1	0.283	بني	اصفر غامق
2	0.391	اخضر	بني غامق
3	0.666	بني محمر	بني غامق

13-4 تأثير حزم المركبات المعزولة من المستخلص الفينولي على بعض صفات تخثر الدم :

تشير النتائج في الجدول (16) بأن جميع المركبات اثرت وبشكل معنوي في صفات تخثر الدم ، واختلف التأثير باختلاف المركبات المعزولة وتفوق المركب (2) على بقية المركبات 1 و 3 اذ ازداد زمن النزف وزمن التخثر وزمن البروثرومبين وزمن الثرومبوبلاستين اذ بلغت 6.11 دقيقة و 6.00 دقيقة و 20.19 ثانية و 34.67 ثانية على التوالي مقارنة مع السيطرة والتي بلغت 3.11 دقيقة ، 3.00 دقيقة و 12.91 ثانية و 21.55 ثانية على التوالي.

جدول (16) : تأثير حزم المركبات المعزولة من مستخلص المركبات الفينولية الخام لازهار نبات البابونج *M. chamomile* في بعض صفات تخثر الدم لذكور الجرذان قيد الدراسة

رقم المركبات	زمن النزف (دقيقة)	زمن التخثر (دقيقة)	زمن البروثرومبين (ثانية)	زمن الثرومبوبلاستين (ثانية)
Control	3.11 ± 0.110	3.00 ± 0.072	12.91 ± 0.830	21.55 ± 0.743
1	5.53 ± 2.013	5.39 ± 2.371	17.81 ± 3.001	30.45 ± 8.113
2	6.11 ± 2.932	6.00 ± 2.713	20.19 ± 5.99	34.67 ± 9.99
3	5.22 ± 2.471	5.11 ± 2.331	15.31 ± 3.01	27.15 ± 8.152
$L.S.D_{0.05}$	0.257	0.203	1.092	1.621

14-4 تأثير تراكيز المركب (2) في بعض صفات تخثر الدم :

توضح النتائج الواردة في الجدول (17) الى حدوث زيادة في زمن النزف وزمن التخثر والبروثرومبين والثرومبوبلاستين بزيادة تراكيز المركب (2) ، اذ اعطى التركيز 10 ملغم / مل اطول فترة زمنية لنزف الدم وتخثره

وزمن البروثرومبين والثرومبوبلاستين والتي بلغت 10.35 دقيقة و 10.21 دقيقة و 22.92 ثانية و 35.71 ثانية على التوالي . في حين اعطى التركيزين 2.5 ملغم / مل و 5 ملغم / مل نتائج متقاربة تقريبا. وهذه النتائج لم تختلف معنويا عن التركيز 7.5 ملغم / مل والتي بلغ فيها زمن التخثر 6.95 دقيقة وزمن التخثر 6.00 دقيقة وزمن البروثرومبين 18.73 ثانية وزمن الثرومبوبلاستين 30.09 ثانية على التوالي.

الجدول (17) : تأثير تراكيز المركب (2) في بعض صفات تخثر الدم لذكور الجرذان قيد الدراسة .

التراكيز / ملغم / مل	زمن النزف (دقيقة)	زمن التخثر (دقيقة)	زمن البروثرومبين (ثانية)	زمن الثرومبوبلاستين (ثانية)
2.5	4.52 ± 0.118	4.13 ± 0.762	15.24 ± 0.911	20.20 ± 0.831
5	4.65 ± 0.121	4.22 ± 0.712	15.60 ± 3.911	22.13 ± 0.741
7.5	6.95 ± 2.711	6.00 ± 2.101	18.73 ± 5.831	30.09 ± 8.151
10	10.35 ± 0.932	10.21 ± 0.891	22.92 ± 6.351	35.71 ± 9.914
$L.S.D_{0.05}$	0.236	0.225	1.067	1.222

15-4 الدراسات النسيجية (**Histological studies**)

اظهرت الدراسة حصول تغيرات نسيجية واضحة لاعضاء الكبد ، الطحال ، الكلية المعاملة بالجرع المختلفة لمستخلصات ازهار البابونج المعاملة بالتسميد الحيوي ببكتيريا *B. subtilis* و *Ps. fluorescens* و (*B. subtilis + Ps. fluorescens*) ، اذ ظهر اثناء الفحص النسيجي لكبد مجموعة ذكور الجرذان المعاملة بالمستخلص الكحولي لمعاملة (*B. + Ps*) وبالجرعة 1250 ملغم / كغم وجود احتقان في الاوعية الدموية ونزف في الوريد المركزي مع تنخر تجلطي في خلايا الكبد (صورة رقم 2 و 4).

اما عند المعاملة بالجرعة 1000 ملغم / كغم فقد ظهر تورم بالخلايا Cellular swelling صورة (3). اما عند الجرعة 750 ملغم / كغم فلم تظهر تغيرات نسيجية واضحة في الكبد عدا احتقان بسيط في الاوعية الدموية ،

اما عند المعاملة بمستخلص بكتيريا *B.* ومستخلص بكتيريا الـ *Ps.* وبالجرع المختلفة فقد لوحظ تنكس الخلايا الغيمي مع ملاحظة تورم الخلايا (صورة 5).

وعند دراسة المقاطع النسيجية للطحال لوحظ احتقان شديد لخلايا الطحال في الجرعة 1250 ملغم / كغم وللمستخلص الكحولي لمعاملة (*B. + Ps.*) مع زيادة في النسيج اللمفي في منطقة اللب الاحمر ، ولوحظ ايضاً تفجي هيولي في نسيج الطحال (صورة 13). اما عند الجرعتين 750 ملغم / كغم و 1000 ملغم / كغم لمعاملة التسميد الحيوي ببكتيريا *B.* ومعاملة *Ps.* فلم يحدثا أي تغيرات نسيجية واضحة.

اما الفحص النسيجي لمقاطع الكلية وعند التراكيز العالية 1250 ملغم / كغم للمستخلص الكحولي ولمعاملة (*B. + Ps.*) فقد وجد ارتشاح للخلايا اللمفاوية للنبيبات الكلوية (صورة 7) واحتقان شديد في الاوعية الدموية لنسيج الكلية (صورة 8 و 9).

اما عند الجرعتين 750 ملغم / كغم و 1000 ملغم / كغم فظهر احتقان شديد في الاوعية الدموية وزيادة في حجم النبيبات الكلوية (صورة 8). اما مستخلصات التسميد الحيوي ببكتيريا *B.* و *Ps.* وللتراكيز المختلفة فلم تلاحظ تغيرات في المقاطع النسيجية للكلية.

أدت المعاملة بمستخلصات ازهار البابونج المعاملة بالتسميد الحيوي ببكتيريا *B.* وبكتيريا *Ps.* وبكتيريا (*B. + Ps.*) تغيرات نسيجية وقد ازدادت حدة هذه التغيرات بازدياد الجرع ولاسيما عند الجرعتين 1000 ملغم / كغم و 1250 ملغم / كغم ومن هذه التغيرات النسيجية :

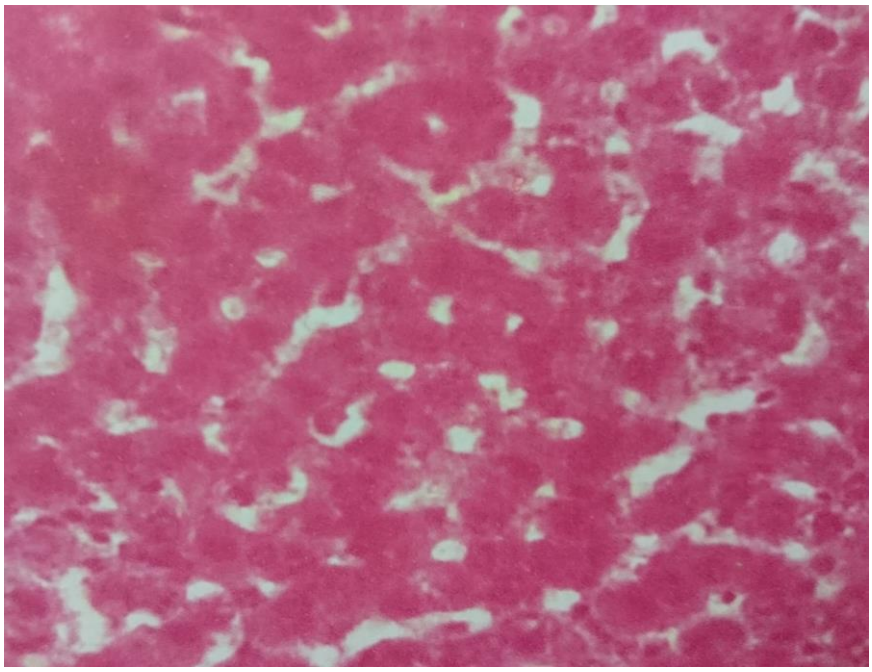
تنكس الخلايا Cellular degeneration : وهي تورم الخلايا بسبب تراكم قطيرات مائية من الخلية مما أدى الى حدوث عتامة (Opacity) ناتجة من تراكم حبيبات بروتينية وذلك بسبب زيادة مكونات المواد الفعالة في مستخلصات ازهار البابونج المعاملة بالتسميد الحيوي والتي اثرت بدورها في عرقلة نفاذية اغشية الخلية (More and Lackie , 1992) ، او قد يكون تأثيرها في الفسفرة التأكسدية ونقص في انتاج Adenine Tri Phosphaste او العمليتين معاً فينتج اضطراب في تبادل الايونات والماء بين الخلية ومحيطها وذلك بسبب خروج كميات كبيرة من ايونات البوتاسيوم الى خارج الخلية واستبدالها بأيونات الصوديوم من خارج الخلية وتسحب معها الماء مؤدية الى ظهور قطرات الماء في الخلية ، اما تراكم الحبيبات البروتينية فناجم من فقدان الطاقة الضرورية للايض مما يسبب اضطرابات في ايض البروتين. (Lackie and More , 1992).

اما الاحتقان Congestion : فهو ازدياد في حجم الاوردة الشعرية بسبب عرقلة النضح الوريدي Venous drainage ، وقد تكون حركة بطيئة للدم مع امتلاء الاوردة الشعرية (Lindop *et al.*, 1992) . كما وتؤدي الالتهابات والحساسية الى توسع الاوعية الدموية التي تحفز الجهاز العصبي مؤدية الى زيادة النبضات العصبية الموسعة للاوعية الدموية .

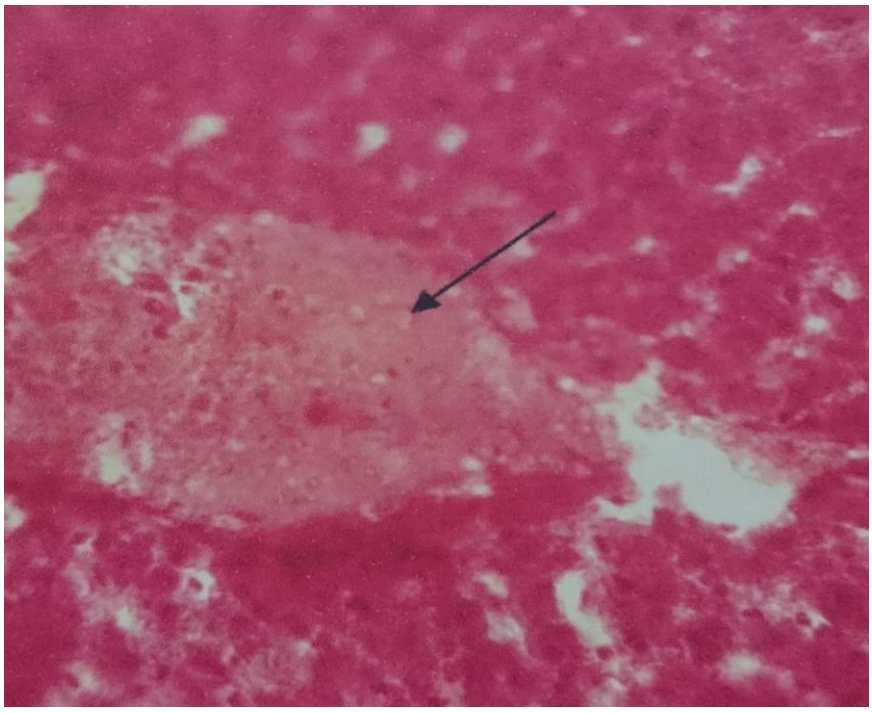
التأثير المشابه للهيستامين (Histamine) : التي تتكون في موضع الالتهابات مؤدية الى زيادة جريان الدم وامتلاء الاوعية والشعيرات الدموية واحتقانها (Whaley and Burt , 1992).

اما الارتشاح فهو وسيلة دفاعية من كريات الدم البيضاء ولاسيما الخلايا اللمفاوية والتي تشكل 40–60% من المجموع الكلي للكريات البيضاء في الدم ، وتظهر هذه الخلايا في المراحل المتأخرة من الالتهابات للاسهام في الاستجابة المناعية وهذه الخلايا ليست لها القدرة على البلعمة اذ تمتلك قابلية محدودة على الحركة الاميبية فقط خارج الوعاء الدموي او بالقرب منه والتي تسبب الارتشاح (Whaley , 1992).

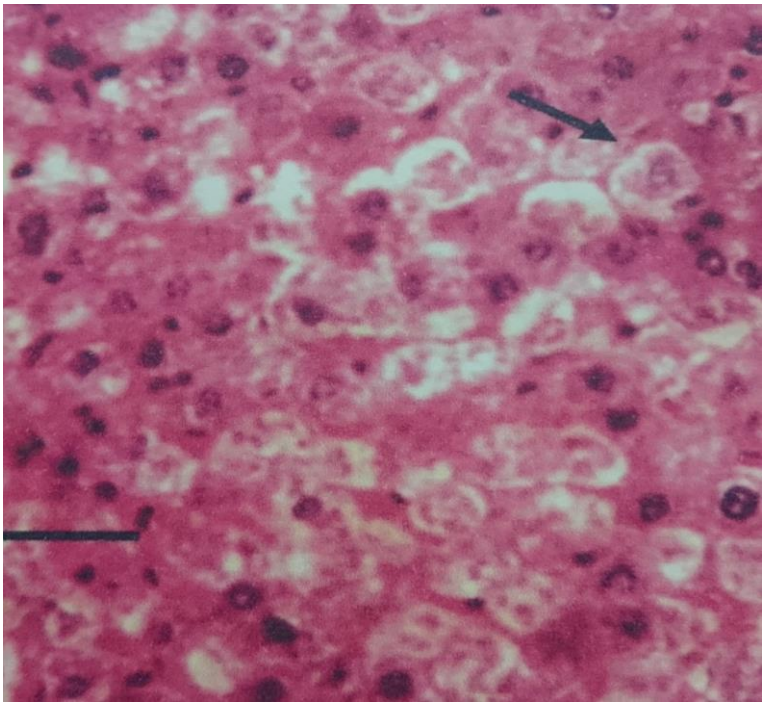
التنخر Necrosis : هو موت للخلايا الموضعي بحيث تفقد هذه الخلايا وبصورة دائمية قابليتها على اداء وظيفتها وقد يعلل التنخر بسبب تأثير المواد الفعالة ولاسيما المركبات الفينولية والمركبات القطبية والتي ازدادت بتأثير التسميد الحيوي ببكتيريا *B.* و *Ps.* و *B.* + *Ps.* في المستخلصات الكحولية لازهار البابونج والتي اثرت بدورها في مكونات اغشية الخلية او تأثيرها في انتاج الطاقة في الخلية ومن ثم نفاذية الخلية ومن ثم تؤثر سلباً في تجهيز الدم للخلايا بسبب الالتهابات الناتجة من تفاعل مناعي اذ تكون مكونات المستخلصات ولاسيما المستخلص الكحولي لمعاملة (*B.* + *Ps.*) مصدراً للمستضد الذي يبدأ منه التفاعل وفيه تسير مركبات الضد والمستضد ومعهما المتممة Complement بشكل جزيئات محمولة في الدم فيترشح بعضها خلال جدران الاوعية الدموية الشعرية بالإضافة الى حدوث فرط في الحساسية (Hypersensitivity) التي تؤدي الى تفاعلات مناعية قوية تنتهي بموت الخلايا المجاورة .(Whaley and Burt , 1992 ؛ Subiza *et al.*, 1989).



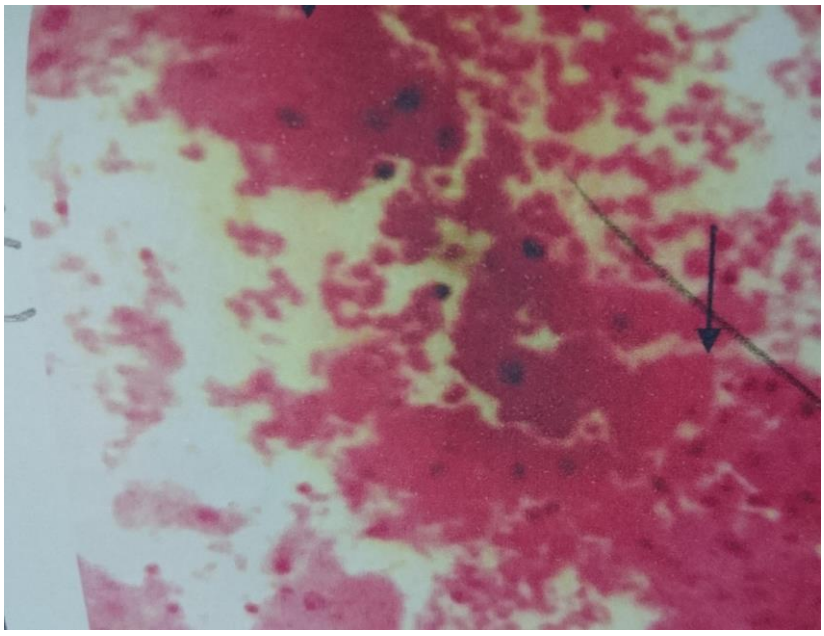
الصورة (1) مقطع في نسيج طبيعي لكبد حيوانات التجربة غير المعاملة



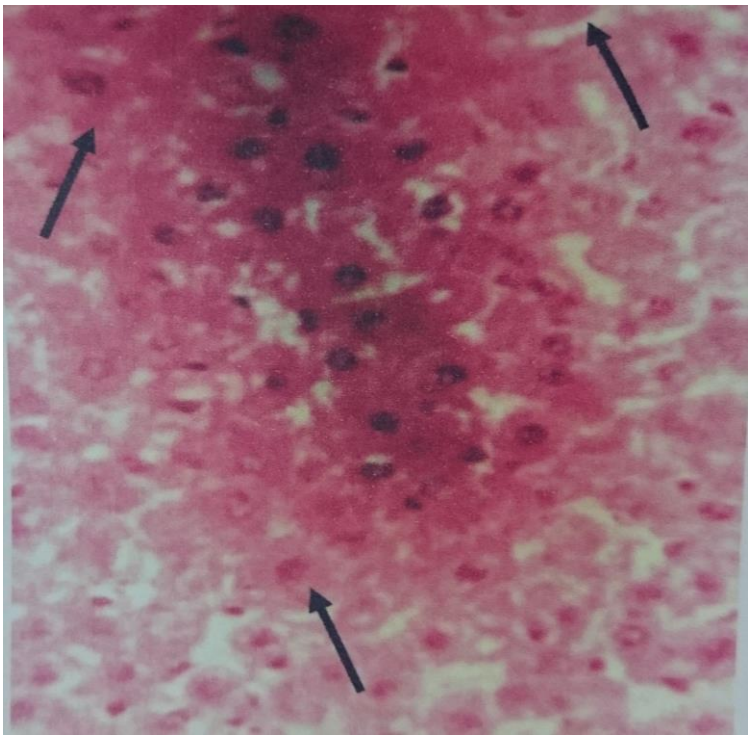
الصورة (2) احتقان شديد في الاوعية الدموية في نسيج الكبد عند المعاملة بالمستخلص الكحولي لازهار نبات البابونج بتركيز 1250 ملغم / كغم باستخدام صبغة الهيماتوكسلين – ايوسين (X400)



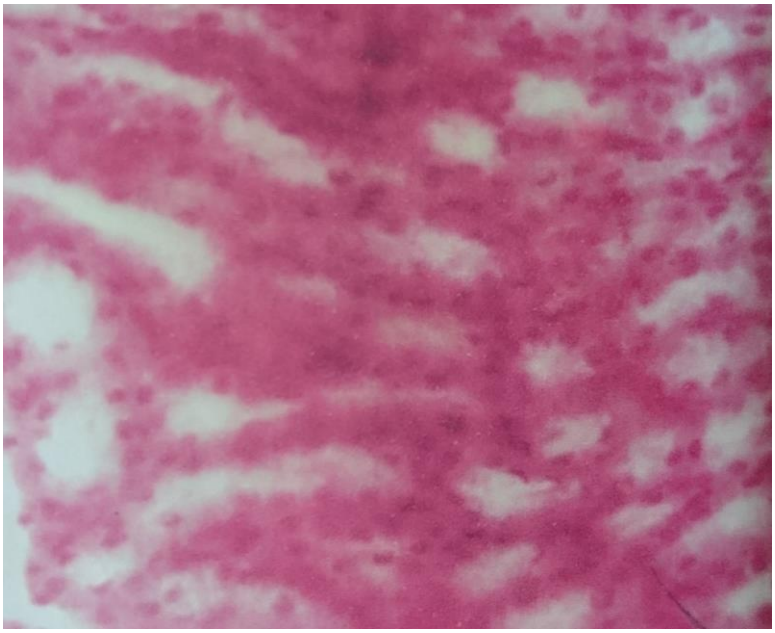
الصورة (3) تورم الخلايا الكبدية في نسيج الكبد لذكور الفئران عند المعاملة بتركيز 1000 ملغم / كغم من المستخلص الكحولي لازهار نبات البابونج باستخدام صبغة الهيماتوكسلين – ايوسين (X400)



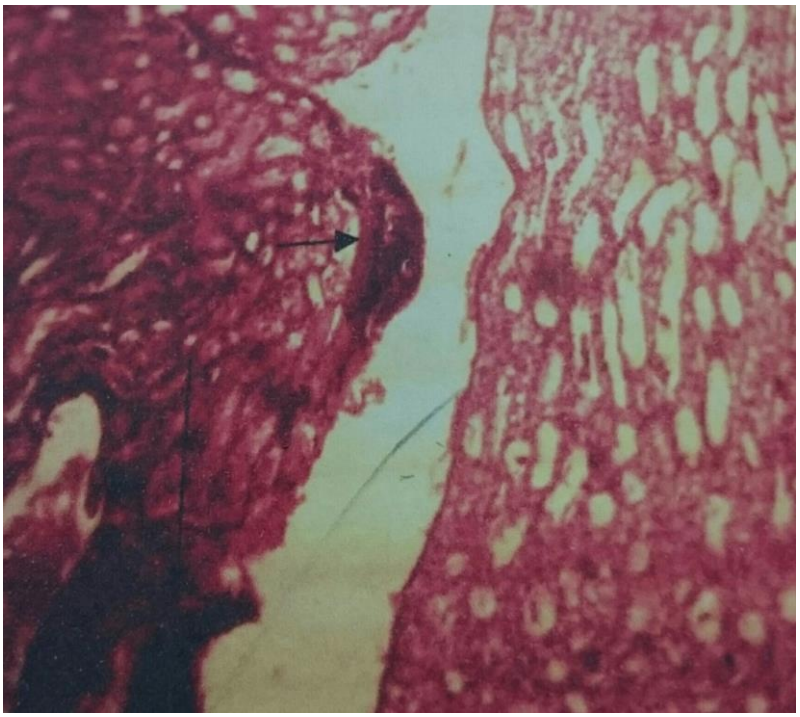
الصورة (4) نزف في الوريد المركزي للكبد عند المعاملة بتركيز 1250 ملغم / كغم في المستخلص الكحولي لازهار نبات البابونج باستخدام صبغة الهيماتوكسلين – ايوسين (X400)



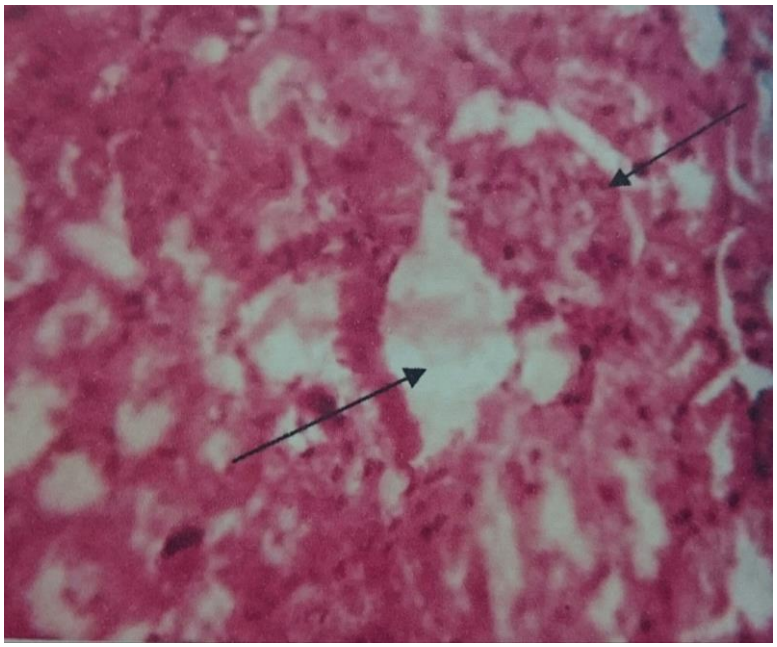
الصورة رقم (5) تنكس غيمي مع تورم في خلايا الكبد مع تفجي الهيولي عند المعاملة بالمستخلص الكحولي لازهار نبات البابونج تركيز 1250 ملغم / كغم باستخدام صبغة الهيماتوكسلين – ايوسين (X400)



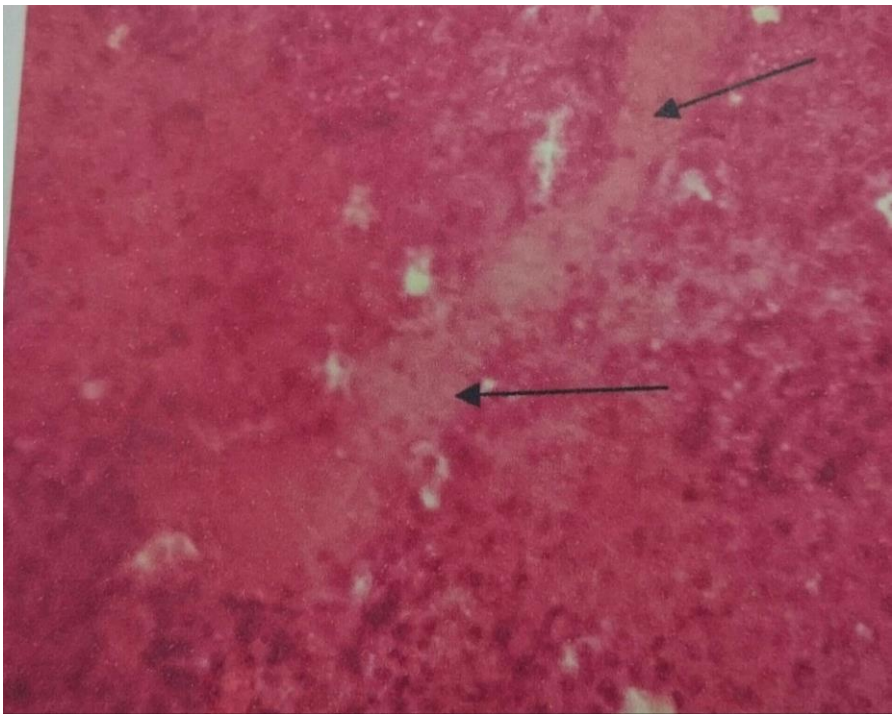
الصورة (6) مقطع في نسيج طبيعي لكلية حيوانات التجربة غير معامله



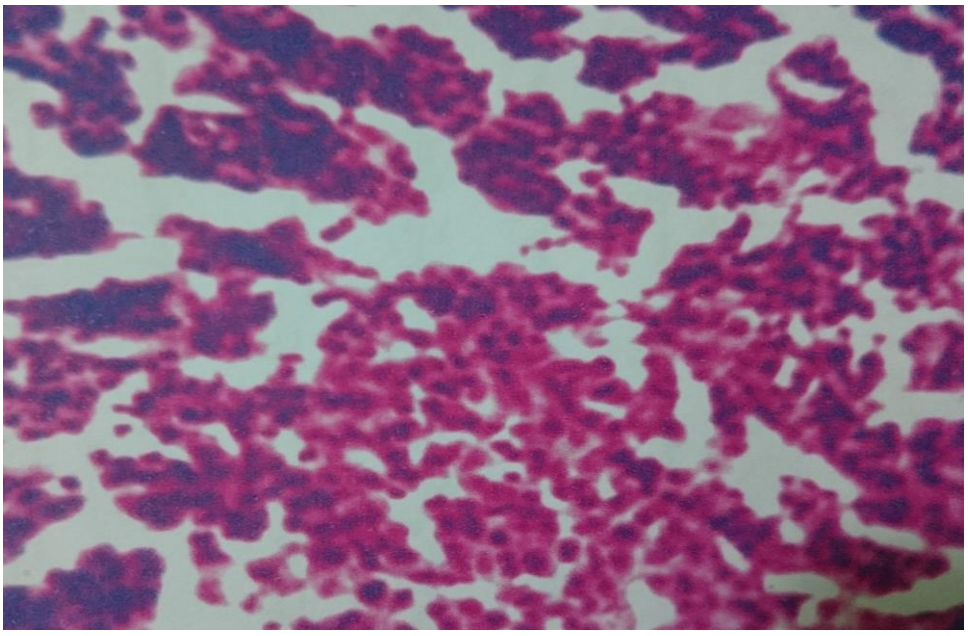
الصورة (7) احتقان شديد في الاوعية الدموية لنسيج الكلية لذكور لفئران ند المعاملة بالمستخلص الكحولي لازهار نبات البابونج تركيز 1250 ملغم / كغم باستخدام صبغة الهيماتوكسلين – ايوسين (X400)



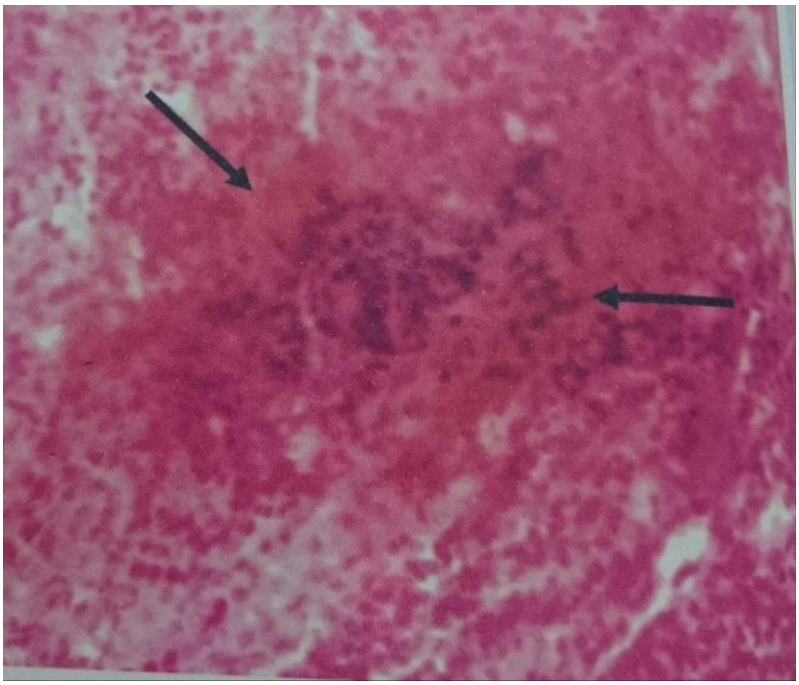
الصورة (8) زيادة حجم الكبيبات الكلوية عند المعاملة بالمستخلص الكحولي لازهار نبات البابونج تركيز 1000 ملغم / كغم باستخدام صبغة الهيماتوكسلين – ايوسين (X400)



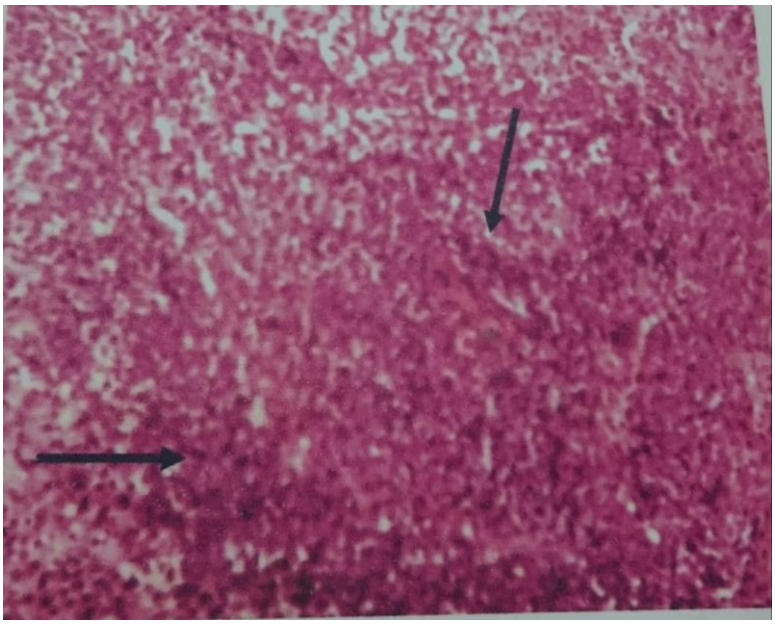
الصورة (9) احتقان في الاوعية الدموية لنسيج الكلية لذكور الفئران عند المعاملة بالمستخلص الكحولي لازهار نبات البابونج تركيز 1000 ملغم / كغم باستخدام صبغة الهيماتوكسلين – ايوسين (X400)



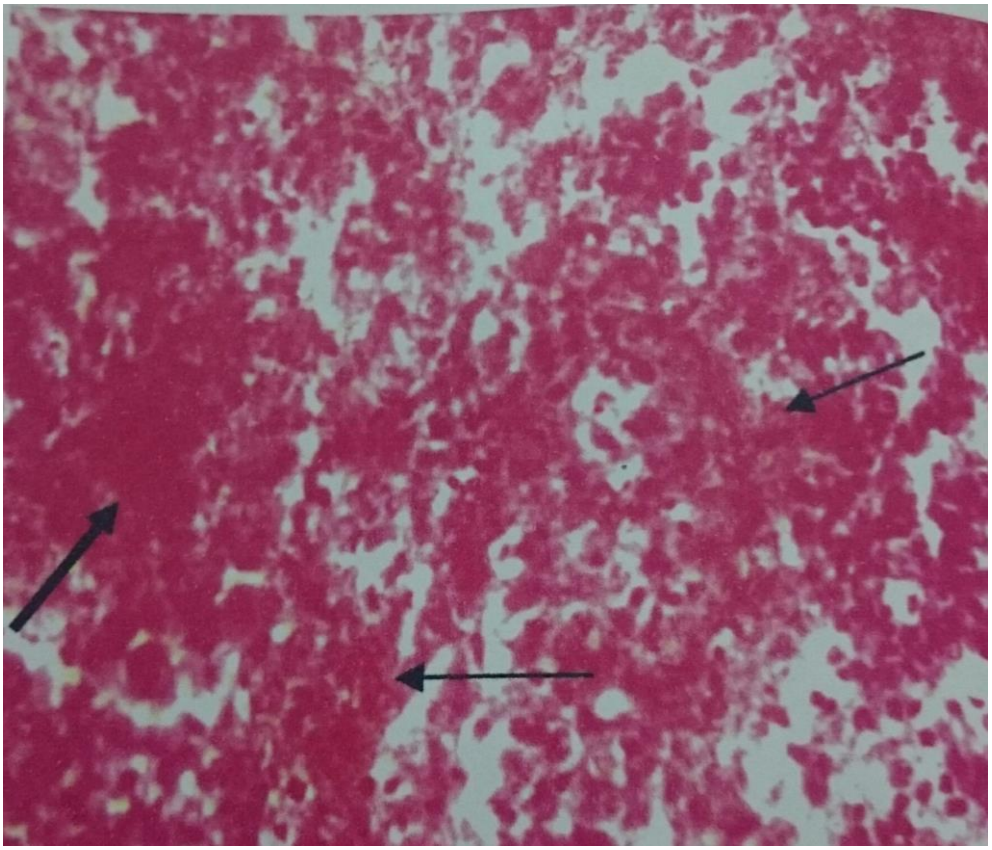
الصورة (10) مقطع في نسيج طبيعي لطحال حيوانات التجربة غير معاملة



الصورة (11) احتقان شديد في الجيوب الوريدية لنسيج الطحال عند المعاملة بالمستخلص الكحولي بتركيز 1250 ملغم / كغم باستخدام صبغة الهيماتوكسلين – ايوسين (X400)



الصورة (12) زيادة في النسيج اللمفي لنسيج الطحال عند المعاملة بالمستخلص الكحولي بتركيز 1000 ملغم / كغم باستخدام صبغة الهيماتوكسلين – ايوسين (X400)



الصورة (13) تفجي الهيولي لنسيج الطحال لذكور الفئران عند المعاملة بالمستخلص الكحولي لازهار نبات البابونج باستخدام صبغة الهيماتوكسلين – ايوسين (X400)

16-4 تحديد التركيز الادنى من مستخلصات ازهار البابونج المعاملة بالتسميد الحيوي ببكتيريا *B.* و *Ps.* و *B. + Ps.* لمنع تخثر الدم

بينت نتائج هذا الاختبار ان اقل تركيز مضاد لتخثر الدم هو 25 ملغم / سم^3 من الدم لمستخلص (*B. + Ps.*) وقد اظهرت مسحات الدم المختبرة عدم تأثر مكونات الدم الاساسية بالمستخلصات المضافة اليها.

17-4 آلية عمل مستخلصات ازهار البابونج المعاملة بالتسميد الحيوي ببكتيريا .B و Ps. و B. + Ps. بصفته مضاداً لتخثر الدم

اثبتت نتائج فحص نماذج الدم المضاف اليها سترات الصوديوم تكون خثرة واضحة في بلازما الدم في حين لم تتكون مثل هذه الخثرة في بلازما النماذج المضاف اليها الهيبارين والمستخلص الكحولي لـ (*B. + Ps.*) كلاً على انفراد, ومن خلال هذه النتائج يمكن القول بأن عمل المستخلص الكحولي للمعاملة (*B. + Ps.*) لازهار البابونج مشابه لعمل الهيبارين في منع تخثر الدم.

18-4 مدة ثبات الفعالية لمستخلص ازهار البابونج لمعاملة التسميد الحيوي ببكتيريا (B. + Ps.) بصفته مضاداً لتخثر الدم

برهن اختبار فعالية المستخلص الكحولي لازهار البابونج ولمعاملة التسميد الحيوي ببكتيريا (*B. + Ps.*) كمضاد لتخثر الدم بعد مرور سنة كاملة من الخزن في الثلاجة تحت درجة 5مْ احتفظ المستخلص بفعاليته المضادة للتخثر ولم يتاثر بمدة الخزن .

19-4 آلية عمل المركبات (1 ، 2 ، 3) المعزولة من المستخلص الفينولي الخام لازهار نبات البابونج M. chamomile وتراكيزها بضفتها مضادة لتخثر الدم

اثبتت نتائج الفحص لنماذج الدم المضاف اليها سترات الصوديوم تكون خثرة في البلازما في حين لم تتكون خثرة للمركب رقم (2) بالتركيز 2.5 ملغم / مل وتكونها بالمركبات (1) و (3) وللتراكيز (5 و 7.5 و 10) ملغم / مل ، في حين لم تتكون في بلازما النماذج المضاف اليها الهيبارين كلاً على انفراد . ومن خلال هذه النتائج يمكن القول بأن عمل المركب (2) وبالتركيز (2.5) ملغم / مل مشابه لعمل الهيبارين في منع تكوين خثرة دموية.

الفصل الخامس
الاستنتاجات والتوصيات
Chapter Five
Conclusion & Recommendations

الاستنتاجات والتوصيات : (Conclusions and Recommendations)

1- الاستنتاجات :-

في ضوء النتائج التي اظهرتها الدراسة الحالية امكن التوصل الى الاستنتاجات الاتية :

1- كفاءة التسميد الحيوي Biofertilization ببكتيريا (*B. subtilis*) و (*Ps. fluorescens*) و (*B. subtilis + Ps. fluorescens*) في تحسين بعض الصفات المورفولوجية والصفات الفسلجية لنبات البابونج .

2- زيادة كمية الزيت في ازهار نبات البابونج *M. chamomile* المسمد حيويا ببكتيريا (*B. subtilis + Ps. fluorescens*) ، ادت الى زيادة في المكونات الطبية الفعالة وتأثيرها في منع تخثر الدم داخل وخارج الجسم الحي.

3- كفاءة المستخلص الكحولي لازهار البابونج المعاملة (*B. + Ps.*) في تأثيراتة المشابهه لعمل الهيبارين في منع تخثر الدم .

4- عزل ثلاثة مركبات من المستخلص الفينولي الخام لازهار نبات البابونج مع تحديد لون وقيم R.f لكل مركب على حدة .

5- كفاءة التراكيز (5-2) ملغم / مل للمركب رقم (2) في تأثيرات مشابه لعمل الهيبارين وليس لسترات الصوديم .

6- زيادة التركيز العالية من مستخلصات التسميد الحيوي ولكل المعاملات ادى الى تأثيرات سلبية في انسجة الكبد والكلى والطحال.

2- التوصيات :

1- تصنيع مستحضرات حيوية من بكتيريا (*B. + Ps.*) لاستخدامها في التسميد الحيوي للنبات الطبي *M. chamomile* واختبارها على نباتات طبية اخرى.

2- تحديد التركيب الكيميائي للمركب رقم (2) المعزول من المركبات الفينولية الخام وتنقيته ليتسنى دراسته تفصيليا ودراسة تأثيره في الصفات البايوكيميائية والنسيجية لاعضاء الكبد والكلى والطحال.

3- دراسة تأثير استعمال مستخلص ازهار البابونج في الجهاز المناعي للجسم وبشكل خاص في الخلايا اللمفاوية T. cells و B. cells التي لها دوراً في التفاعلات المناعية.

4- اجراء دراسات تقويمية خلوية للوقوف على اهم التأثيرات البايولوجية لمستخلص ازهار البابونج *M. chamomile* في مستوى نواة الخلية.

5- تحديد الموقع الجيني لعوامل تخثر الدم في كروموسومات نواة الخلية وعلى المستوى الجزيئي ان توفرت الامكانيات اللازمة.

المصادر
References

المصادر : References

المصادر العربية

ابو زيد ، الشحات ناصر . (2000). الزيوت الطيارة ، الدار العربية للنشر والتوزيع . القاهرة . جمهورية مصر العربية . الطبعة الاولى .

ابو زيد ، الشحات ناصر. (2001). النباتات والاعشاب الطبية. الدار العربية للنشر والتوزيع . القاهرة. جمهورية مصر العربية.

ابو ضاحي ، يوسف محمد. (1991). تغذية النبات. مطبعة التعليم العالي والبحث العلمي ، جامعة الموصل ، جمهورية العراق. ص 228.

ابو عرقوب ، محمود موسى. (2000). المقارنة الحيوية لامراض النبات. المكتبة الاكاديمية ، جمهورية مصر العربية ، ص 684 .

الاسدي ، دعاء نايف. (2013). دراسة امكانية توظيف بكتيريا *Bacillus* spp. في السيطرة على اصابة حبوب بعض المحاصيل الاقتصادية بالفطر *Aspergillus* spp. والتلوث بسمومها في المخزن. جامعة كربلاء. كلية العلوم . رسالة ماجستير. كلية العلوم ، جامعة كربلاء ، جمهورية العراق.

باشي ، رهف. (2004). تأثير مواعيد الزراعة وتراكيز منظمات النمو على نمو وكمية المواد الفعالة لنبات البابونج *Matricaria chamomile* .

جاسم ، ناجي سالم. (1999). المقاومة الحيوية والكيميائية للفطر *Fusarium graminearum* المسبب لمرض لفحة الفيوزاريوم في الحنطة . رسالة ماجستير ، كلية الزراعة ، جامعة البصرة. جمهورية العراق.

الجميلي ، سامي عبدالرضا علي وضياء سالم الوائلي. (2000). دراسة كفاءة سلالة البكتيريا PF-5 *Pseudomonas fluorescens* في مقاومة الفطر *Fusarium graminearum* و *Rhizoctonia solani* وزيادة النمو في محصول الحنطة . مجلة البصرة للعلوم الزراعية. 2 (13). 43-51 .

الجميلي ، سامي عبدالرضا. (1996). المقاومة المتكاملة ضد الاصابة بالفطر *Aspergillus flavus* والتلوث بسم الافلاتوكسين B1 في حاصل فستق الحقل. اطروحة دكتوراه. كلية الزراعة. جامعة بغداد. ص 87. جمهورية العراق.

جنيدي ، محسن علي. (2005). التداخلات الدوائية بين الدواء والاعشاب. القروانية ، الكويت.

حميد ، محمد شهاب ، نوراء جبر قاسم. (2011). تأثير مكونات الوسط الغذائي والجزء النباتي في استحثاث الكالس لنبات البلادونا خارج الجسم الحي ، مجلة العلوم الزراعية العراقية ، المجلد 42 ، العدد 3 ، ص 59-70.

حميد ، سميرة كاظم. (2001). تقنية مستحدثة في انتاج مبيد حيوي من لقاح سلالة البكتيريا CHAO *Pseudomonas fluorescens* . رسالة ماجستير. قسم علوم الحياة. كلية الزراعة. جامعة الكوفة. جمهورية العراق.

حمد ، محمد شهاب ونوار جبر جاسم (2011) . تأثير مكونات الوسط الغذائي والجزء النباتي في أستحثاث الكالس لنبات البلادونا خارج الجسم الحي ، مجلة العلوم الزراعية العراقية ، المجلد 42 ، العدد 3 ، ص59-70 .

الخفاجي ، فراس جبار والمزين ، قحطان وعبدالرزاق ، حسام علاء الدين . (2002). تأثير الثوم على البروتينات لمصل الدم ومؤيضاتها في الارانب المصابة تجريبياً بداء السكري . مجلة القادسية لعلوم الطب البيطري. العدد الاول (المجلد الاول) : 1-8.

الخفاف ، الاء عبد علي. (2006). مقاومة مرض موت بادرات الخيار المتسبب عن الفطر *Pythium aphanidermatum* بالمبيدين الحيويين فلورامبل والباسلين والمبيد الكيمياوي بلتانول ودورها في تحسين صفات النمو والانتاج . اطروحة دكتوراه. قسم علوم الحياة – كلية التربية للبنات. جامعة الكوفة. جمهورية العراق.

الدرويش ، مصطفى. (1983). موجز في علم العقاقير الطبية. الهيئة العامة للتعليم والتدريس . وزارة الصحة. الطبعة الثانية. ص 180.

الراوي ، خاشع محمود وعبدالعزيز خلف الله. (1980). تصميم وتحليل التجارب الزراعية. دار الكتب للطباعة والنشر. جامعة الموصل. جمهورية العراق.

الرواشدة ، معاوية محمد محمود. (2002). امكانية انتاج مبيد وسماد حيوي من *Pseudomonas fluorescens* و *Azospirillum irakense* لمكافحة الفطر *Fusarium oxysporium* وتحسين النمو لمحصول الطماطة. رسالة ماجستير. كلية العلوم. جامعة الكوفة. جمهورية العراق.

الزبيدي ، زهير نجيب ، بابان ، هدى عبدالكريم ، فليح ، فارس كاظم. (1996). دليل العلاج في الاعشاب الطبية العراقية.

السامرائي ، رنا هاشم علوش. (2003). تأثير مواد الزراعة والمسافة بين الخطوط في حاصل البذور وكمية الزيت الثابت والطيار في نبات الحبة السوداء

Nigella sativa L. . رسالة ماجستير. كلية الزراعة. جامعة تكريت. جمهورية العراق.

السلامي ، وجيه مظهر. (1988). تأثير مستخلصات نباتي المديد *Convolvulus arvensis* والهندال *Ipomea carica* في الاداء الحيوي لحشرة من الحنطة *Schizaphis graminum* . اطروحة دكتوراه. كلية العلوم. جامعة بابل. جمهورية العراق.

سود ، رمنك. (1992). تقنية المختبر الطبي (طرائق وتفسيرات). ترجمة : حيدر صالح خميس ؛ سلطان باقر عيسى ؛ عبدالحسين ، عبدالرزاق جبار. دار الكتب للطباعة والنشر. جامعة الموصل. جمهورية العراق. ص 191–318.

الشحات ، محمد رمضان طه. (2007). الاسمدة الحيوية والزراعة العضوية. دار الفكر العربي. القاهرة. جمهورية مصر العربية.

الصحاف ، فاضل حسين. (1989). انظمة الزراعة بدون استخدام تربة . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. جامعة بغداد. جمهورية العراق.

الصراف ، عباس محمد جواد. (1996). تأثير المستخلص الكحولي لاوراق نبات الطرطيع Forsk *Suacda fruticosa* في تجلط الدم. اطروحة دكتوراه. كلية الطب البيطري. جامعة بغداد. جمهورية العراق.

الصراف ، عباس محمد جواد. (1996). تأثير المستخلص الكحولي لاوراق نبات الطرطيع .Forsk *Suaeda fruticosa* في تجلط الدم. اطروحة دكتوراه. كلية الطب البيطري . جامعة بغداد.

الطبال ، احمد . (2000). معجم النباتات الشافية. الدار الثقافية للنشر. بيروت.

الطرفي ، زينب شنيور. (2006). تأثير المستخلصات المائية والعضوية لازهار نبات البابونج *Matricaria chamomik* في عملية تخثر الدم لذكور الجرذان. اطروحة دكتوراه ، كلية التربية للبنات . جامعة الكوفة . جمهورية العراق.

العاشور ، علي جابر. (2009). كفاءة بعض العزلات المحلية التابعة للجنس *Bacillus* في السيطرة على بعض الفطريات الممرضة لنباتي الحنطة والباميا. اطروحة دكتوراه. كلية العلوم . جامعة الكوفة. جمهورية العراق.

عبدالفتاح ، رشدي فتوح. (1988). اساسيات عامة في علم الفسيولوجيا. ذات السلاسل للطباعة والنشر والتوزيع. الطبعة الثانية. القاهرة. جمهورية مصر العربية.

العبيدي ، اثير باسل عباس. (2011). تصنيع مستحضر من البكتيريا *Bacillus licheniformis* لمكافحة بعض الفطريات المنتجة لسموم الافلاتوكسين في

علائق الدجاج ، اطروحة دكتوراه ، قسم علوم الحياة ، كلية العلوم ، جامعة الكوفة. جمهورية العراق.

العنسي ، عادل عبدالغني لطيف . (1999). المقاومة المتكاملة لمرض الذبول الفيوزارمي لنبات الطماطة المتسبب عن الفطر *Fusarium oxysporium* و *Fusarium lycopersici* . رسالة ماجستير ، كلية الزراعة ، جامعة البصرة. جمهورية العراق.

فرهاد ، اكرم داوود وقنبر ، سروري علي. (1986). التقنية الطبية. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. مؤسسة المعاهد الفنية. دار التقني للطباعة والنشر ، ص 45-66.

قطب ، فوزي طه. (1981). النباتات الطبية ، زراعتها ومكوناتها. دار المريخ . القاهرة. جمهورية مصر العربية.

كاظم ، سعاد وحيد . (2002). انتاج سماد حيوي من لقاح سلالة البكتيريا *Azospirillum irakense* . رسالة ماجستير. كلية العلوم. جامعة الكوفة. جمهورية العراق. ص 72.

كامل ، مختار محمد ومها مختار كامل. (2000). النباتات الطبية والعطرية. الدار العربية للنشر والدعاية والطباعة. القاهرة. جمهورية مصر العربية.

الكرخي ، عناء داود خماس. (2001). تأثير بعض العوامل الفيزيائية والكيميائية والحياتية على نمو سلالة *Pseudomonas fluorescens* وكفاءتها التثبيطية للفطر *Rhizoctonia solani* المسبب لموت بادرات الطماطة. رسالة ماجستير. كلية الزراعة. جامعة البصرة. جمهورية العراق. ص68.

المجدلاوي ، سعدة عبدالفتاح سعيد . (2008). اكثار نبات الخلة البلدي *Ammi visnaga* نسيجياً وتقدير بعض مركبات الايض الثانوي فيه. رسالة ماجستير . كلية العلوم . الجامعة المستنصرية . جمهورية العراق. ص 36.

محمد ، عبدالعظيم كاظم ومؤيد احمد اليونس. (1991). اساسيات فسيولوجيا النبات . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . جامعة بغداد. جمهورية العراق. ص 461.

محمود ، مهند جميل وساري هاشم مجيد. (1988). النباتات والاعشاب العراقية بين الطب الشعبي والبحث العالي. مجلس البحث العلمي. مركز بحوث علوم الحياة ، قسم العقاقير وتقييم الادوية ، مطبعة دار الثورة ، بغداد ، الطبعة الاولى. جمهورية العراق.

المجلة العراقية لعلوم التربة (2010) ، الجمعية العراقية لعلوم التربة ، المجلد (10) ، العدد (1)

المختار ، انتصار جواد عبد. (1994). دراسة بعض الخصائص الدوائية لبعض النباتات الطبية في بعض الديدان الطفيلية في الفئران المختبرية. رسالة ماجستير. كلية العلوم. جامعة بغداد. جمهورية العراق. ص 65.

المصلح ، رشيد محجوب ونظام كاظم عبدالامير الحيدري . (1989). الاحياء المجهرية الصناعية. مطابع التعليم العالي في الموصل. جمهورية العراق. ص688.

المعاميري ، علي عباس. (2012). التداخل بين البكتيريا المثبتة للنتروجين وبعض الفطريات المفيدة وبعض البكتيريا المرضية. اطروحة دكتوراه. كلية الزراعة . جامعة بغداد. جمهورية العراق.

المعموري ، كوثر فاضل علوان. (2009). تكامل المبيد الحيوي الباسلين مع المبيد الكيمياوي الريدوميل وسماد الفسفور في السيطرة على مرض سقوط بادرات الطماطة المتسبب عن الفطر *Pythium aphanidermatum* . رسالة ماجستير. الكلية التقنية – المسيب . هيئة التعليم التقني. جمهورية العراق.

مقبول ، مقبول احمد ومنيب الساكت. (1990). كيمياء النباتات الطبية. الدار العربية للنشر. القاهرة. جمهورية مصر العربية.

المياح ، عبدالرضا علوان. (2001). النباتات الطبية والتداوي بالاعشاب . جامعة البصرة. مركز عبادي للدراسات والنشر. صنعاء ، اليمن. الطبعة الاولى. ص 231–232.

الهيتي ، اياد عبدالواحد ، محمد عامر فياض وعلي سالم الغالبي . (1996). تطبيق تقنية التلقيح البكتيري بالـ *Pseudomonas fluorescens* على نبات الرز وتأثيرها على القدرة الانتاجية ، مجلة اباء للابحاث الزراعية. المجلد (6) ، العدد (11). ص 71.

المصادر الاجنبية :

Aasim , M. ; Hussain , N. ; Muhammed , U.E. ; Zubair , M. ; Bilal , S.H. ; Saeed , S. ; Rafique , T.S. and Sancak , C. (2010). *In vitro* shoot regencration of fenugreek (*Trigonella foenum , graecum* L.) using different cytokinins. AFR, J. Biotechnol. 9 (42) . 7174-7179.

Abd El-Khair , H. and Karima , H.E. Haggag. (2007). Application of some Bactericides and Bio agents for controlling the soft root disease in potato. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences , 3 (5) : 463-473.

Adcock , D.M. ; Jensen , R. ; Johns , C.S. and Macy , P.A. (2002). Soagulation Hand Book. Austin , Texas : Esoterix Coagulation Academic Pub., Hungaria , pp. 246-254.

Ali , E. (2009). *In vivo* and *in vitro* Antimicrobial Activity of flower and callus extracts of *Matricaria shamomilla* L. in the treatment of experimentally induced skin infections in Mice. B.Sc. Biotechnology , College of Science , Al-Nahrain University .

Al-Rawi , A. (1990). Medicinal Plants of IraqBaghdad universty.pp. 45.

Amy , M. ; Heck – Beth , A. ; Dewitt , N. and Anita , L. (2000). Potential interaction between alternative therapies and coumadin , Am. J. Health Sci., Pharm., 57 (13) : 1221-1227.

Anne , O. ; Tiiu , K. and Kaire , I. (2001). Volatile constituents of *Matricaria recutita* L. Estonia , Proc. Estonian Acad. Sci. Chem., 50 (1) : 39-45.

Anon . (2001). Chaomilla , Research of Pharmatical , College Baghdad University.

Anonymous . (1991). Chamomile , inibombcks Lawrence Review of Neutral product st Louis : Fact – Sand Comparisons.

Atef , M. Nagwa and N. Haikel. (2008). Efficacy of seed treatment with microbial agents and / or waste for the control of cucumber damping – off Botany Dept, Faculty of Science , Cairo University , Egypt.

Avallone , K. ; Zenoli , P. ; Pula , G. ; Kleinschnitz , M. ; Schreier , P. and Barastdi , M. (2000). Pharma cological profill of a pigenin , afavonoid isolated from *Matricaria chamomilla*. Biochem. Pharmaco, 13 (11) : 1387-1394.

Avallone , R. ; Puia , G. and Zanoli , P. (2000). Pharmacol. Profile of apigenim , a flavonoid isolated from *Matricaria chamomilla*. Biochem. Pharmacol., 59 (11) : 1387-1394.

Awidi , A. (1999). Thrombosis. Haemost , 81 : 582-584.

Babu , A.G. C. and Thind , B.S. (2005). Potential use of combinations of *Pantoea agglomervaus* , *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* as biocontrol agents for control of bacterial blight of rice annual of Srilanka Dept. of Agriculture. (7) : 23-37.

Bachmann , F. (1980). Diagnostic approach to mild bleeding disorders. Semin Hematol, 17 : 292-297.

Backon , J. (1986). Ginger inhibition of thromboxane synthetase and stimulation of prostacyclin : Relevance for medicine and Psychiatry. Med. Hypotheses , 20 : 271-278.

Bakker , P.A. H. M. ; Ran , L. X. ; Pieterse , C. M. J. and VanLoon , L.C. (2003). Understanding the involvement of Rhizobacteria mediated induction of systemic resistance in biocontrol of plant disease , Can. J. Plant Pathol., 25 : 5-9.

Baldani , V.L. D. ; and Dobereiner , J. (1980). Host plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. Soil Biol. Biochem. 12 : 433-439.

Baldani , V.L.D., M.A., DEB , Baldani , J.I. and Dobereiner , J. (1986). Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. In the Rhizosphers and root of field grown wheat and sorghum plant and soil. 90 : 35-46.

Bankroft , J.D. and Stevens ,. A. (1982). Theory and practice of histological techniques. Churchil. Livingstone , Edinburgh, London P : 662.

Berglund , G. (1976). Prevalance of primary and secondary by pretension. Br. Med. J. 2 : 554-562.

Bertr , H. ; Plassard , C. ; Pinochet , X. ; Toraine , B. ; Normand , P. and Cleyet – Morcael , J.C. (2000). Simulation of the ionic transport system in *Brssica napus* by plant grown promoting rizobacterium (Achromobacter sp.) Can. J. Microbiol., 68 : 3328-3338.

Bhaskar , V. ; Raj , T.R. ; Kandasamy , S.K. ; Vijaykumar , P. and Achary , A. (2008). Optimization of production of subtilisn in solid substate fermentation using response surface methodology. African Journal of Biotechnology. 7 : 13 : 2286-2291.

Blumenthal , M. (2000). Herbal medicine , expanded commission E inonographs 1 st ed. Austin American Botanical council.

Bradlely , P.R. (1992). British Herbal Compendium. A hand book of scientific information on widely used plant drug published by the British herbal medicine a ssociation and produced by its scientific committee. Bournemonth Dorset.

Brinker , F. (2001). Herb contraindicotions and Drug Interactions , 3rd ed. Sandy – Oregon : Eciectic Medical Publications , 6 : 534-539.

Broadbent , P., Baker , K.F., Franks , N., and Holland , J. (1977). Effect of *Bacillus* spp. on increased growth of seedlings in steamed and nontreated soil. Phytopathology 67 : 1027-1031.

Brown , U. (2002). Protein complex found to regulate first step (1) blood clotting. General Medical Science of National Institute of Health. Pp : 1-9.

Bruncton , J. (1995). Pharmacognosy , phytochemistry of medicinal plants. Lavoisier publishing. Paris.

Burr , T.J. ; M.N. Schroth and T. Suslow. (1978). Increased potaro yields by treatment of seed species with specific strain of *P. f.* and *P. outide* phytopathology , 68 : 1377-1383.

Carbaye , J. (1994). Helper bacteria : A new dimension to the mycorrhizal symbiosis. New Phytologist, 129 : 197-210.

Carle , R. ; Fleisdhauer , I. ; and Fesher , D. (1987). Qualitats beurtheilung von kamillenolen. Deusche Apotheker Zeitung , 127 : 2451-2457.

Chen , X. H. ; Koumonstsi , a. ; Scholz , R. and Eisenreich , A. (2007). Comparative analysis of plant growth promoting bacterium *Bacillus* spp. amylolique faciens FZB42 , Nature Biotechnology . 25 : No. 9 : 139-146.

Cinco , M. (1983). A microbiological survey on the activity of hydroalcoholic extract of chamomile , International J. of Crude drug research, 2 : 145-151.

Clark , F.E. (1965). Agar – plants method for total microbial (C. F. Black , 1965 methods of soil analysis. Part 2. Publisher Madison , Wisconsin , USA. Pp: 1572.

Clora , P.W. ; Klerk , M.D. ; Susanne , M. ; Smorenburg , M.D. ; Harry , R. and Buller , M.D. (2003). Thrombosis prophylaxis in patient population with a central venous catheter . Arch. Intern Med., 163 : 1913-1921.

Cole , E. ; Hall , E.R. ; and Wu , K.K. (1984). Principles of Antithrombotic and Thrombotic Disorders. PSC Publishing Company Inc. Littlecon. Pp: 91-96.

Columan , R.W.; Hirsh , J. and Marder , V. (1987). Hemostasis and Thrombosis – Basic principles and clinical practice. 2nd ed. Philadephia , J. 13 . Lippin Cott. Co., pp: 3-11.

Couto , C.G. (2003). Disorders of homeostasis. Small animal internal medicine , 3rd ed. pp : 3-11.

Dacie , J.V. and Lewis , S.M. (1984). Practical heamatology Churchill. 6th ed. Edinburgh.

Daniel , W.W. (1983). Biostatistics : A foundation for analysis in the health science. John Wiley and Sons, New York.

Davies , E.W. ; Hougie , G. and Lunblad , R.L. (1969). Recent advances in blood coagulation , pp: 17, Churchill , London.

Davies , P.J. (1995). Plant hormones. Kluwer Academic Publishers .

Dclla loggia , R. (1990). Anti inflammatory activity of some *Ginkgo biloba* constitments and of their phospholipids complexes. Fitoterapia., 63 (3) : 2574 – 2580.

De Boor , Marjan ; Lenstsevander sluis ; Leendert , G. ; Van Loon and Peter , A. H.M. Bakker . (1999). Combining fluorescent *Pseudomonas* strain to enhance suppression of Fusarium wilt. European Jour. Of Plant Pathology. 105 : 201-210.

Doll , B. ; Carle , R. and Mullar, W. (1985). Flavonoid bestimmung in kamullen extract preparation. Deutsche Apo theker Zeitung , 125 (Suppl. 1) : 14-19.

Dowling , D.N. and F.O. Gava. (1994). Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. Trends Biotech. 12 : 133-141.

Drachman , M.D. (2002). Low platelet disorders. Puget sound blood center. Winter , No. 4. http : //www. A plastic . org.

Duffy , K., Brion ; Andrew Simon and David , M. Weller. (1996). Combination of *Trichoderma kuningii* with fluorescent *Pseudomonas* for control of Take-all on wheal phyto , 86 (2) : 188-193.

El-Daly , Faten, and Haikel , Nahed. (2006). Role of biological control on some physiological aspects of *Zea mays*. Infected by *Rhizoctonia solani*. Journal of Applied Sciences 6 (13) : 2794-2798.

El-Hamshary , O.I.M. and Khattab , A.A. (2008). Evaluation of antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus* and their fusants against *Fusarium solani*. Research Journal of Cell and molecular biology , 2 (2) : 24-29.

Fall , R. ; Kinsinger , R.F. and Wheeler , K.A. (2003). A simple method to isolate Biofilm forming *Bacillus subtilis* and related species from plant roots , systemic. Appl. Microbio. 27 (3) : 372-379.

Feinstein , D. I. (1982). Diagnosis and management of disseminated intravascular coagulatin : The role of heparin therapy. Blood , 60 : 284-291.

Felske , A.D.M. ; Heyrman , J. ; Balcaen , A. and Vos , P. (2003). Multiplex PCR screening of soil isolates for novel *Bacillus* related lineages. J. Microbial, Methods , 55 : 447-458.

Fenton , J.W. ; Villanueva , G. B. ; Ofosu , F.A. and Maraganore , J.M. (1991). Thrombin inhibition by hirudin : How hirudin inhibits thrombin . Haemostasis , 21 (Suppl. 1) : 27-31.

Fisher , A. Chumitz , A. (1933). Uber die chemische nature des heparin II die reindarstellung III tinsigie under – suchungen zur constitution des heparin hoppe-sculers zeitschrift for physiologische chemie ., 216 , 264 : 275. Cited by Biggs . (1972).

Foster , S. (2000). Chamomile, Internet.

Francis , G.W. and Berkowitz , S.D. (2002). Antithrombotic and thrombolytic agents. In : Kitchens C., S., Alving B. M., Kessler , C.M., (eds). Consultutive haemostasis and thrombosis. Philadelphia , Pa : W. 13. Saunders., 375-391.

Frannfelder , F.W. (2004). Ocular side effects from herbal medicines and nutritional supplements . Amer. J. Ophthalmol., 138 : 639-647.

Franz , C. H. ; S. Muller , E. ; Pelzmann , H. and Ceylan , A. (1986). Influence of ecological factors on yield , essential oil of chamomile *Chamomilla recutita* Rauschert syn *Matricaria chamomile* L. Acta Hort. 188 : 157-166.

Garbera , P. ; Van Veen , J.a. and Elsas , J.S. (2003). Predominant *Bacills* spp. In Agricultural soil under different management regimes detected via PCR – DGGE, Microbial . Ecol., 45 : 302-316.

Geissman , T.A. (1962). Chemistry of flavonoid compound , MacMillan and Sons Co. New York.

Giangrande , P.L. (2003). The history of nomeuclature of coagulation factor. Br. J. Haematol., 121 : 703-712.

Gilbert , D.N., Moellering , R.C. and Eliopoulos , G.M. (2007). The Sanford Guide to Antimicrobial Therapy , 37th ed. Sperryville , V.A. , Antimicrobial Therapy , Inc., P. 170.

Glick , B.R. (1995). The enhancement of plant grown by free – living bacteria . Canadian Journal of Microbiology, 41 : 109-117.

Graham ,W. (1998). Potential Health Effect . Tiro Industries , Inc. , 1 (20) : 1-9.

Guyton , A.C. and Hall, J.E. (1996). Text Book of Medical Physiology , W. 13. Saunders Company , Philadelphia , Rev., 33 : 111-113.

Gyllenhaal , C. ; Merritt , S.L. ; Peterson , S.D. ; Block , K.I. ; Gochenour , T. (2000). Efficasy and safety of herbal

stimulant and sedatives in sheep disorders. Sleep in Medicine Review ., 4 (3) : 229-251.

Hackner , S.G. (1995). Approach to the diagnosis of bleeding disorders. Compendium on the continuing education of the practicing veterinarian , 17 (3) : 331-349.

Han , H.S. and Lee , K.D.(2005). Physiological response of soybean inoculation of *Bradyrhizobium japonicum* with PGPR in saline soil conditions. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences. 1 (3) : 216-221.

Harborne , J.B. (1973). Phytochemical Methods. Chapman and Hall (London). Pp. 278.

Harborne , J.B. (1984). Phytochemical Methods ; Aguide to Modern techniques of plant analysis. Chapman and Hall. London , UK pp.335-338

Heck , A. M. ; Dewitt , B.A ; And Lukes , A.L. (2000). Potential interactions between alternative therapies and warfarin . Americ. J. Health Syst. Pharm., 57 (13) : 1221-1230.

Hermann , K.M. , and Weaver , L.M. (1999) . The shikimate pathway . Ann. Rev. Plant Physiology. Plant Mol. Biol. 50 : 473-503.

Hirsh , J. ; Dalen , J. ; Auderson , D.R. and others. (2001). Oral anticoagulants : Mechanism of action clinical effectiveness and optimal therapeutic range chest. Jan, 119 (Suppl, I) : 84-21.

Hirsh , J. ; Fuster , V. ; Anscll , J. and other.(2003). American Heart Association American College of Cardiology foundation guide to warfarin therapy. Circulation. Apr. 1 : 107 (12) : 1692-1711.

Hoffbrand , A.V. and Pettit , J.E. (1995). Essential Heamatology , 3rd ed. Blackwell Science.

Hopkins , W.G. and Huner , N.P.A. (2008). Introduction to plant physiology . 4th ed. Printed in the United State of America, P. 459.

Hougie , C. (1982). The biochemistry of blood coagulation . In Triplett , D.A. Laboratory evaluation of coagulation , American Society of Clinical Pathologists Press, pp. 2. Chicago.

Humason , G.L. (1972). Animal Tissue Technique. W.H. Freedmad Company , Sanfrancisco.

Hyers , T.M. ; Agnell, G. ; Hull , R.D., Morris , T.A. samama , M. and others . (2001). Autithrombotic therapy for venous thromboembolic disease. Chest , 119 (Suppl. 1) : 176-193.

Idriss , E.E. ; Iglesias , D.J. ; Talon , M. ; and Borris , R. (2007). Tryptophan dependent production of indole -3- acetic acid (IBA) Affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* F71324. The American Phytopathology, Vol. 20 : 6 , 619-626.

Idriss, E.E. Borris,. R. ; Bochow , H. (2004). Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent , VI. Phytohormone – like action of culture filtrates prepared from plant growth promoting *Bacillus amyloliquefaciens* , FZB24 , FZB42 , FZB45 and *Bacillus subtilis* FZB37 . Journal of Plant Disease and Protection , 111 (6) : 583-597.

Juras, L.E. ; Johnson , R. (2004). Scentless chamomile . Saskatchewan Agriculture , Food and Rural Revitalization , Sarkatchewan , Canada , pp. 432-456.

Karber , J. and Behrens. (1953). Review of Veterinary Microbiology Blackwell Scientific Publications , Inc. Boston , Oxford , London , Edinburgh , pp: 130-132.

Kelleher , C.C. (1990). Clinical aspects of the relationship between oral contraceptives of cardiovascular disease. Am. J. Obstel. Gyncol., 163 : 392-395.

Kerovuo , J. ; Rouvinen , J. and Hatzack , F. (2000). Analysis of Myoinositol hexakis phosphate hydrolysis by *Bacillus* phytase indication of a novel reaction mechanism. Biochem. Journal. 352 : 623-628.

Kessman , H., T. Stanb, C. Hofman , T. Mactzke , J. Herzog , E. ward , s. Uknes , and J. Ryals. (1994). Induction of systemic acquired resistance in plants by chemicals Ann. Rev. Phytopathology. 32 : 439-459.

Kinsinger , R.F. ; Shirk , M.C. ; and Fall , R. (2003). Rapid surface motility in *Bacillus subtilis* is dependent on extracellular surfactin and potassium ion. Jour. Bacteriology , 185 : 5627-5631.

Kloepper , J.W. ; Ryu , C.M. and Zhang , S. (1980). Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. Phytopathology , 94 :1259-1266.

Kloepper , J.W. ; Schroth , M.N. and Miller , T.D. (1988).Effect of Rhizosphere colonization by plant growth promoting Rhizobacteria on potato plant development and yield phytopathogy , 70 : 1078-1082.

Kloepper , J.W. ; Tuzun , S. and Kuc, J. (1992). Proposed definitions relate to induced disease resistance . Biocontrol Science and Technology . 2 : 347-349.

Krivenko , V.V. ; Potebnia , G.P. and Loiko , V.V. (1989). Experience in treating digestive organ disease with medicin plants , Vrach Delo , (3) : 76-78.

Kruse , I. and Dam. (1950). Inactivation of thromboplasin by cobra venom. Biochimical Biophysica acta 5 , 268.

Lackie , J.M. and More , I.A.R. (1992). Cells and Tissues in health and disease . In : Macsween , R.N. and Whaley , K. (ed). Muirs Textbook of Pathology , 13th ed. pp : 1-34. London.

Ladd , J.L. ; Jacobson , M. and Buroff, M.C.R. (1978). Japanes beetles extracts from neem tree as feeding deteints , J.E. Con. Entomol., 71 : 810-813.

Leben , S.D. ; Wadi , J.A. and Easton , G.D. (1987). Effects of *Pseudomonas fluorescens* CHAO on potato plant growth and control of *Verticillium dahliae.* Phytopathology , 77 : 1592-1595.

Lee , K.D. ; Bai , Y. ; Smith , D. ; Han , H.S. and Supanjan , J.I. (2005). Isolation of plant growth promoting Endophytic bacteria from bean nodules . Research Journal of Agriculture and Biological Sciences 1 (3) : 232-236.

Lindop , G.B.M. ; Peroy – Robb, I.w. and Walker , I.D. (1992). Disturbances of body fluids, Haemastasis and the flow of blood. In : Mac sween , R.N. and Whaley , K. (ed). Muirs Textbook of Pathology 13th ed. pp : 73-111. London.

Maddocks – Jennings, W. (2004). Citical incident idiosyncratic allergic reactions to essential oils. Complement Ther Nurs Midwifery., 10 : 58-60.

Mann , C. and Staba , J. (1986). The chemistry , pharmacology and commercial formulation of chamomile. In : Craker L, e., Simon , J.E. , (eds). Herbs , Spices , and medicinal plant. Recent advances in botany , horticulture and pharmacology , 1 : 233-280.

Mathiyazhagan , S. ; Kavitha , K., Nakkeeran , S., Chandrasekar , G., Manian , K., Renukadevi , P. Krishnamoorthy , A. S., and Fernando , W.G.D. (2004). PGPR mediated management of stem blight of *Phyllanthus amarus* (Schum and Thonn) caused by *Corynespora cassiicola* (Berk and Curt) Wei. Arch. Phytopathol. Plant Protect. 33 : 183-199.

Mazokopakis , E.E. ; Vrentzos , G.E. ; Papadakis , J.A. ; Babalis , D.E. and Ganotakis , E.S. (2005). Wild chamomile (*Matricaria chamomile*) mouth washes in methotrexate – induced oral mucositis phytomedicine , 12 : 25-27.

McGlasson , D.L. ; More , L. ; Best , H.A. and Others . (1999). Drawing specimens for Coagulation testing : in a second tube necessary. Clin. Lab. Sci., 12 (3) : 137-139.

Mespadden – Gardener , B.B. (2004). Ecology of Bacillus and Paenibacillus spp. In Agricultural Systems . The American Phytopathological Society , 94 : 1252-1258.

Meyer , B.E. (1999). Tee Rezepturen – Ein Handbuch for apotheker und frzte Stuttgart : Deutscher Apothekey Verlag.

Michael , M.D. (2002). Cholesteral Medical . Education at the academy . J. Anti Aging Research . California , pp: 1-4.

Mill , S.Y. (1991). Out of the earth , the essential book of herbal medicine , London , Viking Press. 448-4511.

Muis , A. ; and Quimio , J. (2006). Biological control of banded leaf and sheath blight disease *Rhizoctonia solani* (Kuhn) in corn with formulated *Bacillus subtilis* BE23. Indonesian Journal of Agricultural Science , 7 (1) : 1-7.

Mukhtar , H. and Ahmad , N. (1999). Green tea in chemoprevention of cancer . Toxicol Sci., 52 : 111-117.

Nemecz , G. (2000). Herbal pharmacy : chamomile . [http: // 152. 38. 18.3 / nemecz / George home / references / chamomile. Html].

Newall , G.A. ; Anderson , L.A. and Philipson , J.D. (1996). Herbal medicines : A guide for health care professionals. London.

Newman , D.J. ; Gragg , G.M. and Snader , K.M. (2003). Natural products as sources of new drug. J. of Natural Products, 66 : 1022-1037.

Nicholson , W.L. (2002). Roles of *Bacillus endospores* in the environment , Cell Mole. Life , Sci., 59 : 410-416.

Pappas , P.G. (2006). Invasive candidiasis , Infect. Dis. Clin. North amer., 20 (3) : 485-506.

Panlitz , T.C. and Bellanger , R.R. (2001). Biological control in green house systems. Annu. Rev. Phytopathol. 39 : 103-133.

Peter , V. (2003). The secondary metabolism of plants : Secondary Defense Compounds. Springer Verlag , New York , P. 1-10.

Peteropoulos , G.A. (2002). Fenugreek the genus *Trigonella* , pp. 1-127. 1st ed. Taylor and Trancis Group , London and New York.

Pichersky , E. and Gang , D.R. (2000). Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants : an evolutionary perspective plant science , Vol. 5 (4) : 439-445.

Pino , J.A. ; Marbort , R. and Agnero , J. (2002). Essential oil of chamomile (*Chamomilla recutita* (L.) Ranschert) Iran Journal of essential oil research ., 14 (6) : 407-408.

Pleban , S. ; Ingle , F. and Chet , I. (1995). Control of *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* in green house using endophytic *Bacillus* spp. Eur. J. Plant Pathology. 101 : 665-672.

Poller , L. ; Tablowo , A. and Thrompson , J.M. (1968). Effect of low dose of oral contraceptives on blood congulation. Brit. Med., J. 16 : 102-218.

Poort , S.R. ; Rosendall , F.R. ; Reitsma , P.H. and Bertina , R. M. (1996). A common genetic variation in the 3 untrau slated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. Blood , 88 : 3698-3703.

Presser , A. (2000). Pharmacists Guide to Medical Herbs . Petaluma , California : smart Publications , P. 783.

Proesch , F. (1951). Anticoagulant properties of ethylene bi amino diacetic acid (ethylene diamine tetra acetic acid). Proceedings of the society for experimental biology and medicine , 76 : 619.

Quick , A.J. (1942). Haemorr hagie diseases and the physiology of hemostasis. Charles thromas, Spring Field , I.

Raaijmarkers , Jos, M., Marcel Leemah., Mark , M.P. Van Oorschot ; Lentse Vonder , Luis ; Bob schippers and Peter a.H.M. Bakker . (1995). Dose response relationships in biological control of *Fusarium* wilt of Radish by *Pseudomonas* spp. Phytopathology, 85 . (10) : 1075-1081.

Radell , G. ; Formentini , L. and Santaniello , E. (1981). Reversed phase high performance liquid chromatography analysis of apigenin and its glucosides in flowers of *Matricaria chamomile* and chamomile extract. Planta medica, 42 : 288-292.

Rajendran , L. and Samiyappan , R. (2008). Endophytic *Bacillus* species confer increased resistance in cotton against damping off disease caused by *Rhizoctonia solani*. Plant Pathology , 7 . (1) : 1-12.

Ramawat , K. G. (2004). Plant biotechnology. S. Chand and Company LTD , Ram Nagar , New Delhi , P. 35.

Rauschert , S. (1990). Nomen klatorische probleme inder *Gattung Matricaria* L. *Foliageobataica phytotaxonomica*. 9 : 249-260.

Rekha , P.D. ; Lai , W.A. ; Arun , A.B. and Young , C.C. (2006). Effect of free and encapsulated *Pseudomonas putida* CC-FR2-4 and *Bacillus subtilis* CC-PG104 on plant growth under genotobiotic conditions. Bioresource Technology , 98 : 447-451.

Reneke , J. ; Etzell , J. ; Les , I.E.S. and Others. (1998). Prolonged prothrombin time and activated partial thrombololaslin time due to underfilled specimen tubes with 109 mmol / L (3.2%) citrate anticoagulant. Am. J. Clin. Pathol. 109 (6) : 754-757.

Repcak , M. and Senior , V.O. (1993). A pigenin glucosides in tetraploid bisabolol variety of chamomile . Acta Horticulturae , 330 : 213-218.

Repolles , G. ; Herro – Martinez , J.M. and Rafols , G. (2006). Analysis of prominent flavonoid glycones by high – performance liquid chromatography using amonolytic type column. J. of Chromatog. A., (1131) : 51-57.

Richmond , W., (1973). Serum cholesterol as aprongostic factor after myocardial in fraction the Framingham study. Clin. Chemo , 19 : 1350-1356.

Roberts , H.R. and Escobar , M.A. (2002). Less common congenital disorders of hemostasis. In Kitchens C.S., Alving , B.M. , and Kessler , C.M., (eds). Consultative hemostasis and thrombosis , Philadephia , 12 : 57-71.

Robinson , D.S. and French , J.E. (1953). The role of albumin in the interaction of chyle and plasma in the rat . Quaterly Journal of Experimental Physiology, 38 : 233-239 .

Rosales , A.M., L. Thomashow , R.J. Cook , and T.W. (1995). Isolation and identification of a antifungal metabolites produced by rice. Associated antagonistic *Pseudomonas* spp. Phytopathology. 85 : 1028-1032.

Rose , K.D. ; Groissant , P. D. ; Parliament , C.F. and others . (1990). Spontaneous spinal epidural hematoma with associated platelet dysfunction from excessive garlic ingestin : A case report , Neurosurgery , 26 : 880-882.

Rovira , A.B. and D.C. Sands . (1971). Fluorescent *Pseudomonas* a sesidual component in the soil microflora . J. Appl. Bacteriol. 34 : 252-259.

Ruddock , V. and Meade , T.W. (1994). Factor VII activity and ischaemic heart disease fatal and non fatal events. Q.T., 87 : 403-406.

Ryn , C.M. ; Forag , M.A. ; Hu , C.H. ; Reddy , M.S. ; Wei , H. X. ; Pare , P.w. and Kloepper , J.W. (2004). Bacterial volatiles promote grown in Arabidopsis. Proc. Natl. Acad. Sci., 100 : 4927-4932 , USA.

Safiyazov , J.S., Mananov , R.N. and Sattarova , R.K. 1995. The use of bacterial antagonists for control of cotton disease. Field Crops Research. 43 : 51-54.

Salah , A. (2010). Homostatis clot blood , www. Moh. Gov. sa.

Salamon , I. (1992). Chamomile , A medicicnal plant the herb , Spice and Medicinal Plant Digest, 10 : 1-4.

Schilcher , H. (1997). Phytotherapy in pediatrics : Handbook for Physicians and pharmacists with reference to commission emonographs of the federal department of health . Germany Stuttgart. Med. Pharm. Sci. Pub., pp. 181.

Schtwartz , Z.J.L. (1977). Smoking cures : Ways to kick and unhealthy habit. NIDA Research monographs ; 17 : 308-339.

Schweain , S.L. (1997). Facts and comparison. The Lawrence review of natural products , Gingko Am .J. plant physiol., vol.6(2),pp:50:71.

Seiverd , C.E. (1983). Haematology for medical technology . 5th ed. Lea and Febiger. Philadelphia .

Shihata , I.M. (1951). Apharmacological study of *Anagallis arvensis* . M.D. Vet. Thesis , Cairo University , Egypt.

Shivahanda , B. ; Sivachandra , S. ; Raju , A.V. and Chalapathi , R. (2007). Wound healing activity of *Matricaria recutita* L. extract. J. of Wound Care , 16 (7) : 298-302.

Smith , J.C. and Willis , A.L. (1971). Aspirin selectivity inhibits prostaglandin production in human platelets. Nature , 321 : 235-237.

Smith , P. ; Arneson , H. and Holme , I. (1990). The effect of warfarin on mortality and reinfarction after myocardial infraction. N. Engh. J., 323 : 147-152.

Smith , S.D. (2006). Eye candy. Natural Health , 36 (8) : 112-113.

Subiza , J. ; Subiza , J.L. ; Hinojosa , M. ; Garcia, R. ; Kerez , M. ; Valdivies , R.S. (1989). Anaphlylactic reaction after the ingestion of chamomile tea : of cross – reactivity with other composite pollens .

Suchorsca , K. and Jedraszko , B. (1988). Effect of temperature and day length on the synthesis of biologically active substances of some essential plant.

Svehlikova , V. ; Bennett , R. N. ; Mellon , F.A. ; Needs , P.W. ; Piacente , S. ; Kroon, P.A. and Bao , Y. (2004). Isolation , identification and stability of acylated derivatives of apigenin glucoside from chamomile (*Chamomilla recutita* L. Rauschert) , Phytochemistry , 65 (16) : 2323-2332.

Swain , M.R. ; Naskar , K.S. and Ramesh , C.R. (2007). Indole -3-acetic acid production and effect on sprouting of Yam *Dioscorea rotundala* L. minisetts by *Bacillus subtilis* isolated from culturable cow dung micro flora. Polish Journal of microbiology, 56 . (2) : 103-110.

Szake , E. ; Maday , E. ; Tyihak , E. ; Kuzovkina , I.N. and Lemberkovrce , e. (2004). Terpenoid in cultivated and wild chamomile (in vivo and in vitro) . J. Chromatog . Analyt. Technol. Biomedcile Sci., 800 (1-2) : 231-238.

Tariq , Marium ; Dawar , Shahnaz ; Mehdi ; Fatima , S., and Zaki , M. Javedi . (2007). Antagonistic activity of bacterial inoculum root infecting fungi on mash bean and okra . Pak. J. Bot, 39 (6) : 2159-2165.

Tilak , K.N.B.R. and Reddy , B.S. (2006). *Bacillus cereus* and *B. circulans* – novel inoculants for crops. Curr. Sci., 90 (5) : 642-644.

Titeiz , W.N. 1982. Fundamental of clinical chemistry , W.S. Saunder Comp. U.S.A. pp : 245-247.

Tivadar , F. ; Ingrid , J. and Job , H. (2002). Influence of Lepirudin ; agratroban and melagatxan on prothrombin time and additional effect of oral anticoagulating. Clinical chemistry , 48 (10) : 1791-1795.

Todar , K. (2003). Todars on line textbook of bacteriology : The genus *Bacillus* , University of Wisconsin – Madison , Department of Bacteriology.

Toilefsen , M.D. and Blank , M.K. (1981). Detection of a new heparin – dependent inhibitor of thrombin in human plasma. J. Clin. Invest., 7 : 589 – 596.

Tolenon , A. (2003). Analysis of secondary metabolites in plant and cell culture of *Hypericum perforatum* L. and *Rhodiola rosca* L. M. Sc. Thesis , Dept. of Chemistry . Oulu University , pp. 1-65.

Ton , J. ; Vanpelt , J.A. ; Vanloon , L.C. and Picterse , C.M.J. (2002). Differential effectiveness of salicylate dependent and Jasmonate , Ethylene – dependent induced resistance

in Arabidopsis. Mol. Plant Microbe interact., 15 : 27-34. Train 96. 578. J. Appl. Microbiol. , 89 : 992-1001.

Triplett , D.A. (2002). Coagulation abnormalities. In : McGlatechey , K. D. (ed). Clinical laboratory medicine . 2nd ed. Philadephia : Lippincott Williams and Wilkins : 1033-1049.

Tuddenham , E. G. D. and Cooper , D.N. (1994). The molecular genetics of haemostasis and its inherited disorders. Oxford monographs on medical genetics.25 : 145-149.

Tyler , C.E., (1994). Herbs of choice of choice , the therapentic use of phytomedicinals. Binghamton , New York , Pharmacentical Products Press.

Tyler , V.E. ; Brady , L.R. and Robbers , J.E. (1988). Pharmacognosy Phildelphia, 9th ed.

Vancott, E.M. ; Laposata , M. ; Jacobs , D.S. ; Demott , W.R. and Oxley , D.K. (2001). Laboratory test , Handbook . t5h ed. Hudson Ohio : Lexi – co. pp : 327-358.

Vane , J.R. (1971). Inhibition of prostaglandin drugs. Nature , 231 : 232-235.

Vanketel , W.G. (1987). Allergy to *Matricaria chamomilla*. Contact dermalitis. 16 (1) : 50-51.

Viola , H. ; Wasowski , G. ; Levi , D.M. and others . (1995). Apigenine a component of *M. recutitia* flowers , as a central benzodiazepine receptors ligaud with anxiolytic effects. Planta medica , 61 (3) : 213-216.

Wang , Y. ; Tang , H. ; Nicholson , J. and Others. (2005). Ameltabonomic strategy for the detection of the metabolic effects of chamomile (*Matricaria recutitia* L.) Ingestion. J. Agric. Food Chem. , 53 : 191-196.

West , J.B. (1985). Physiological basis of medical practice. 11th ed. Williams and Wilkins , Baltimore , pp. 418-425.

Whaley , K. (1992). Disease of the Immune system. In : MacSween , R.N. and Whaley , K. (ed.) Muirs Textbook of Pathology , 13th ed. London .

Whaley , K. and Burt , A.D. (1992). Inflammation , Healing and Repair . In : MacSween , R.N. and Whaley , K. (ed). Muirs Textbook of Pathology , 13th ed. pp : 112-154. London . pp : 204-223.

WHO (World Health Organization) . (1999). Monographs on selected medicinal plants "flos Chamomillae" , 1 ; WHO , Geneva , 00. 86-96.

Wichtl , M. and Bisset , N.G. (1994). Herbal drug and phytophamaccuticals. Stuttgartmed. Pharm. Gm 13 H. Scientific Publisher.

Woitke , M. ; Junge , H. ; and Schnitzler , H. (2004). *Bacillus subtilis* as growth promoter in hydroponically grown tomatoes under saline conditions. Acta Horti. P. 659.

Xiang , S.Y.E., S.A. Avdiushko and J. Kuc. (1995). Protein phosphorylation in tobacco plants with systemic resistance induced by tobacco mosaic virus , physiol. And Mol. PI . Pathol. 47 : 269-283.

Yamada , K. ; Minra , T. ; Mimake , Y. and Sashida , Y. (1996). Effect of inhalation of chamomile oil vapour on plasma ACTH level in ovarictomized rat under restriction stress. Biological and pharmaceutical Bullchu , 14 (9) : 1244-1246.

Yuming , B. ; Xiaomin , Z. and Donald , L.S. (2003). Enhanced soybean plant growth resulting from co inoculation of Bacillus strain with *Bradyhizobium japonicum* . J. Crop Sci. Quchee , Canada , 43 : 2-13.

Zeilmann , G.A. ; Dole , E.J. ; Skipper , McCab , M. ; Dog , T.L. and Rhyne , R.L. (2003). Use of herbal medicine by elderly. Hispanic and non Hispanic white patient pharmacotherapy , 23 (4) : 526-532.

Zhang , H. ; Xie , X. ; Kim , M.S. Kornyeyev , D.A. ; Holaday , S. and Pare , P.W. (2008). Soil bacteria augment Arabidopsis photosynthesis by decreasing glucose sensing and abscisic acid levels in planta. The plant Journal . 56 : 264-273.

Zhang , S. ; Moyne , A.L. ; Reddy , M.S. and Kloepper , J.W. (2002). The role of salicylic acid in induced systemic resistance . Elicited by plant growth promoting Rhizobacteria against blue mold of tobacco. Biol. Control, 25 : 288-296.

Basu and Rastogi ,R.P.(1967). Triterpenoid saponins and sapogens . phytochem , 6: 1249-1270.)

Quick , A.J. (1942) Haemorrhagie and the physiology of . charles huromas , hemostasis spriug field .

Summary

This study was conducted at the medical plants farm , and the animal house of the Collage of Pharmacy / Kerbala University . The aim was to investigate effects of biofertilization with (*Bacillus subtilis*) , (*Pseudomonas fluorescens*) , (*Bacillus subtilis* + *Pseudomonas fluorescens*) on the growth of *Matricaria chamomile* and its composition of anti coagulant using *M. chamomile* alcoholic flower extracts. It is also aimed to asses the effects on some physiological and biochemical blood parameters of male rats that treated with these extracts . In addition , isolation of active compounds in alcohol crude extracts of *M. chamomile*.

Results showed that there was a highly significant increase in number of plant branches reached , 11.9 , 17.6 , 19.6 , 37.6 in the control treatment , *B.* treatment , *Ps.* Treatment and *B.* + *Ps.* Treatment respectively . The results also showed increasing flowers number compared to control reached to (14.6) for *B.* treatment , (14.2) for *Ps.* Treatment , (22.63) to (*B.* + *Ps.*) treatment and (10.11) in the control treatment , while plants hights of *M. chamomile* for all treatments C., *B.*, *Ps.*, *B* + *Ps*. Reached to 35.69 , 50.33 , 55.56 , 44.21 cm respectively .

The effects of biofertilization on the physiological parameters showed that a highly significant increase in the volatile oil percentage in (*B.* + *Ps.*) treatment reached to 25.28% compared to the C., *B.* treatment , *Ps.* Treatment which reached to 8.76 , 11.68 , and 12.19% respectively.

Results also revealed increasing the avialbility of N, P, K, Ca and Na and some micro elements such as Fe , Mn, Cu , Zn and Mg in dried leaves of *M. chamomile* compared to control. On the other hand , the chlorophyll (A) and (B) increased in the flower dry weight in (*B.* + *Ps.*) treatment compared to control.

The preliminary diagnostic results revealed that *M. chamomile* flower alcohol extracts after all biofertilization treatments contained phenols ,

alkaloids , terpens , and glycosides . The Lethal dose 50% (LD_{50}) of alcohol extract was 9875 mg/kg after subcutaneous injection . Results showed a highly significant increase in the blood clotting of the treatment (*B.* + *Ps.*) at the dose 1250 mg/kg which increased bleeding time , clotting time , prothrombine time , and thromboplastine time recording 9.01 minutes , 8.99 minutes , 23.09 seconds and 43.63 seconds , compared to control groups. Theses values were (2.89) minutes , (2.66) minutes , (11.31) seconds , (20.73) seconds for the above parameters respectively. A significant change in the blood physiological features accurred. The interaction between the dose 1250 mg/kg and *B.* treatment led to a decrease in the mean value of haemglobin concentration (2.90) g/dieil., compared to control (11.78) gm/dicil. when the same concentration was interacted with (*B.* + *Ps.*) treatment caused a significant increase in the mean of (E.S.R) Erythrocytes Sedimentation Rates , (6.01) mm^3/hr. and the total Lencocytes count at the dose 1000 mg/kg for all treatments recording (9023.56 , 8033.11 and 8033.11) $mm^3/10^3$ compared to control treatment (5901.21 , 4901.21 and 5331.50) $mm^3/10^3$ respectively . The above interaction revealed a decline effect in the (P.C.V) Packed Cell Volume (2.99×10^6) cell / mm^3 and blood platelets (301.01×10^3) cell / mm^3 for (*B.* + *Ps.*) extract compared to control recording (8.23×10^6) cell / mm^3 , (666.15×10^3) cell / mm^3 respectively .

The high concentration of *M. chamomile* flower extracts at all biofertilization treatments (1000 , 1250) mg/kg, caused dilation and congestion of blood vessel and haemorrhage with vacuolated cytoplasm and swollen cells. These caused symptoms of cellular degeneration accompanied with Lymphocytes infiltration in the congestion region in the stomatic organs , kidney and liver sections .

The present study indicated that the lowest dose of the blood anticoagulant of alcohol extracts after (*B.* + *Ps.*) treatment was 25 mg/kg of the blood. The principle blood components were not affected when the blood was treated by the extract. The study showed that alcohol extract at the treatment above worked similarly to heparin not as sodium citrate. Three compounds were isolated from crude phenolic extract with visible colour and under U.V Ultra Violet. Relative Flow (R.F.) values for all compounds in the blood experimrnts showed that compound number (2) with (2.5) mg/ml concentration was worked similary to heparin.

Ministry of Higher Education & Scientific Research
University of Karbala / College of Education for Pure Science – Department of Biology

Effects of biofertization with the bacteria *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* on the some growth paramters Matricaria Chamomile and using its alcoholic extract in Inhibtion blood clotting

A Thesis
Submitted to the council of the Education for Pure Sciences , University of Karbala as a partial fulfillment of the requirements for the Ph. D Degree in Biology - Plant – (Biotechnology)

By

Nageha M. Barry Ahmad

Supervised By
Prof. Dr. Kadhim M. Ibrahim

1437 AH **2015 AD**