Efficiency effect of the chamomile extracts *Matricaria chamomile* which biofertized with the *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* of mice blood clotting properties

تأثير كفاءة مستخلصات ازهار البابونج *Matricaria chamomile* المعاملة بالتسميد الحيوي ببكتيريا *Bacillus subtilis* و *Pseudomonas flurescens* في بعض صفات تخثر الدم لذكور الجرذان المختبرية

ناجحة محمد باري احمد
كلية التربية للعلوم الصرفة
جامعة كربلاء

كاظم محمد ابراهيم
كلية التقنيات الحيوية
جامعة النهرين

بحث مستل من اطروحة دكتوراه للباحث الاول

المستخلص

اجريت الدراسة في حقل النباتات الطبية والبيت الحيواني التابع الى كلية الصيدلة / جامعة كربلاء بهدف معرفة تأثير التسميد الحيوي Biofertilization ببكتيريا *Bacillus subtilis* و *Pseudomonas flurescens* ومزيج نوعي البكتيريا معاً على كمية المواد الفعالة للمستخلصات الكحولية لازهار البابونج، بصفتها مواد مانعة لتخثر الدم (Anti-Coagulant) داخل الجسم الحي (In – vivo) ومعرفة تأثيراتها في بعض صفات الدم في ذكور الجرذان (Sprague dawley) المعاملة بهذه المستخلصات.

اوضحت نتائج الكشف الاستدلالي (الترسيبي) للمستخلصات الكحولية لازهار نبات البابونج باحتوائه على المركبات الفينولية ، والقلويدية والتربينية اضافة الى الكلايكوسيدات . بلغت قيمة الجرعة القاتلة للنصف LD50 للمستخلص الايثانولي لازهار نبات البابونج ولكافة معاملات التسميد الحيوي 9875 ملغم / كغم من وزن الجسم وبطريقة الحقن تحت الجلد ، كما ولوحظ ارتفاعاً معنوياً في زمن النزف وزمن التخثر وزمن البروثرومبين وزمن الثرومبوبلاستين ، اذ اظهرت معاملة المستخلص الكحولي لمعاملة *B. + Ps.* وعند الجرعة 1250 ملغم / كغم زيادة واضحة في زمن النزف وزمن التخثر اللذان بلغا 9.01 و 8.99 دقيقة على الترتيب مقارنة مع معاملة السيطرة والتي بلغت معدلاتهما 2.89 و 2.66 دقيقة. كما ولوحظت زيادة معنوية في البروثرومبين والثرومبوبلاستين اذ بلغ معدلهما 23.69 و 43.69 ثانية مقارنة مع معاملة السيطرة والتي بلغت معدلاتهما 11.31 و 20.73 ثانية. ادت التراكيز العالية (1000 و 1250) ملغم / كغم من المستخلصات ولمعاملات التسميد الحيوي ببكتيريا *B.* و *Ps.* و *B. + Ps.* توسعاً في الاوعية الدموية واحتقانها مع نزف وتورم الخلايا مع ارتشاح في الخلايا اللمفاوية لكل من اعضاء الكبد ، الكلى ، الطحال . كما بينت الدراسة ان اقل تركيز مضاد لتخثر الدم لمستخلص *B. + Ps.* بلغ 23 ملغم / سم^3 من الدم ولم تتأثر مكونات الدم الاساسية عند معاملة الدم بالمستخلص والتركيز اعلاه وان مستخلص *B. + Ps.* يعمل عمل الهيبارين (Heparin) وان مدة الخزن لم تؤثر في الفعالية البايولوجية للمستخلص.

Abstract

This study was conducted at the medical plants farm , and the animal house of the College of Pharmacy / Kerbala University . The aim was to investigate effects of biofertilization with *Bacillus subtilis* , *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* + *Pseudomonas fluorescens* on the composition of active ingredient (Anti-coagulant) using Matricaria chamomile alcoholic flower extracts , it is also aimed to asses the effects of the extrast on some blood clotting features.

The primary diagnostic results revealed that *M. chamomile* flower alcoholic extracts for all biofertilization treatments contain phenols , alkaloids , terpens , and glycosides.

The Lethal dose fifty (LD50) of alchol extract was 9875 mg / kg by subcutaneous injection. Results showed that there was a highly significant increasing in the clotting of blood. The interaction between (*B. + Ps.*) alcoholic extract and dose 1250 mg / kg produced an increase in bleeding time , clotting time prothrombine time , and thromboplastin time as (9.01) minutes , (8.99) minutes , (23.09) second and (43.63) second , compared to control groups . These values were (2.89) minutes , (2.66) minutes , (11.31) second , (20.73) second for all above parameter

respectively. The high concentration of *M. chamomile* (1000 , 1250) mg / kg caused and infiltration in the congestion region in the orgaus , kidney , and liver section. The present study appeared that the lowest dose of the blood anticoagulant to alcoholic extracts for (B. Ps.) treatment was 25 mg/kg of the blood , and it works a similarly to heparin.

المقدمة :

يعد نبات البابونج *Matricaria chamomile* من النباتات الطبية المهمة التي عرفها الانسان منذ القدم لكثير من الامراض ، حيث عزلت العديد من المركبات الفعالة طبياً كالمركبات الفينولية المتمثلة بالفلافونيدات ، والمركبات التربينية المتمثلة بالزيوت اضافة الى الكلايكوسيدات ، فضلاً عن قيمتها الغذائية العالية في مكوناتها الاساسية الاخرى ، كالسكريات والدهون والعديد من الفيتامينات والعناصر المعدنية والروائح العطرية وصبغة الازولين الصفراء. [1]

تعد مستخلصات ازهار البابونج *M. chamomile* من العقاقير المهمة التي شاع استعمالها كعلاج في كثير من الامراض[2]. واثبتت الدراسات ان البابونج يعمل مضاداً للاكسدة ويفيد في مرض سرطان الجلد وان المستخلص الكحولي لازهاره له تأثير في نمو الفايروس Poliovirus و Herpsvirus وذلك بتثبيط الخلايا التي تكون RNA الفايروسي[3] .

ووجدت في البحوث الحديثة ان مستخلص البابونج يحتوي على Coumarin لذلك فهو يشابه فعل Warfarin في منع تخثر الدم وذلك بارتباطه مع فيتامين K ويقلل من هذا الفيتامين الذي يعد عاملاً مهماً في تخثر الدم [4] .

ومن التقنيات الاحيائية المتطورة هي استخدام الاسمدة الحيوية التي تساهم في تجهيز النباتات بقدر كبير من المغذيات كالعناصر المعدنية ، والهرمونات لغرض تحسين كمية ونوعية الانتاج الزراعي[5]. وفي هذا المجال تحتل البكتيريا *Bacillus subtilis* و *Pseudomonas fluorescens* مركز الصدارة لامتلاكها الكثير من مواصفات العامل الحيوي في مجالات تصنيع الاسمدة الحيوية[6]. ونتيجة للزيادة الكبيرة في عدد سكان العالم وارتقاء الوعي الصحي لدى الشعوب ، ازداد الطلب على العقاقير الطبية المصنعة ، لكون الادوية التي يتناولها المريض تعمل في اغلب الاحيان على شفاء المرضى ظاهرياً لكن تبقى مسبباته كافية لتتحول الى حالة مرضية مزمنة ، وقد تؤثر في مناعة ومقاومة الجسم للامراض[7].

وظفت كل من بكتيريا *B. subtilis* و *P. fluorescens* كأسمدة حيوية لمعرفة مدى تأثيراتها في مستخلصات ازهار البابونج *M. chamomile* كمواد مانعة لتخثر الدم داخل الجسم الحي.

الهدف من الدراسة :

وبالنظر لقلة الدراسات في العراق في مجال التسميد الحيوي للنباتات الطبية وتأثير محتوياتها في معالجة امراض الدم وخصوصاً تخثر الدم تم تطبيق ذلك على ذكور الجرذان المختبرية وعلى ضوء ما سبق هدفت الدراسة الحالية الى : بيان مدى كفاءة المستخلصات الكحولية لنبات البابونج والمعاملة بالتسميد الحيوي بكتيريا *B. subtilis* و *P. fluorescens* وتأثيرهما في بعض صفات تخثر الدم للذكور الجرذان المختبرية .

المواد وطرائق العمل : Materials and Methods

*** تحضير مستخلصات ازهار نبات البابونج وللمعاملات المدروسة**

تم تحضير المستخلص الكحولي بحسب طريقة [8] اذ وزن مقدار 10 غم من مسحوق المادة الجافة ولكل معاملة من المعاملات ووضعت بجهاز الاستخلاص (Soxhlet) بدرجة حرارة 40-45ْم واضيف لها 200 مل من الكحول الاثيلي 90% واستمر استخلاص العينات لمدة 24 ساعة ، بعد ذلك تم تجفيف المستخلصات .

*** الكشف عن المركبات الفعالة للمستخلص الكحولي لازهار نبات البابونج :**

تم الكشف عن المركبات الفعالة للمستخلص الكحولي باستخدام تقنية صفائح الكروماتوغرافي الرقيقة (T.L.C) حيث استخدم نظام الفصل (75% ميثانول : 25% ايثانول) في حوض الفصل Tank [9] . تم عمل خط مستقيم خفيف على لوح T.L.C. سحب 10 مايكروليتر بواسطة انبوبة شعرية من المستخلص الكحولي ووضعت على الخط وبمسافة متساوية بين كل بقعة واخرى ، ثم وضعت في حوض الفصل. وتمت مراقبتها لحين وصول الاطوار المتحركة الى مسافة تقرب 1.5 سم من الحافة العليا ، اخرجت الصفائح وجففت ثم فحصت تحت الاشعة فوق البنفسجية وبطول موجي 360 نانوميتر.

*** فصل وتنقية المركبات الفعالة :**

تم ترحيل العينات المستخلصة من المستخلصات الكحولية على صفائح T.L.C وبطريقة الخط الافقي (Horizontal stripe) للحصول على اكبر كمية من المركبات الفعالة ومن ثم رحلت بنفس نظام الفصل وتم تحديد المركبات وقياس R.F. (Reflection factor) ، بعدها تم قشط السليكا الحاوي على المركبات الفعالة المحددة وجمعت في انابيب اختبار اضيف لها 10 مل من الكلوروفورم ثم نبذت بالطرد المركزي لمدة 15 دقيقة بعدها سحب الراشح واهمل الراسب ، نقل الراشح الى دورق صغير وجفف في الفرن الكهربائي لحين جفاف العينة . كررت العملية عدة مرات للحصول على كمية كافية تقدر بـ 10.000 مايكروغرام [10] . تم اذابته في مادة (Dimethyl sulfo oxide) (DMSO) . حضن المزيج تم بعد ذلك ترشيح المزيج بالترشيح الفائق عبر اوراق ترشيح (0.22) مايكرون .

*** تهيئة الحيوانات المختبرية : Preparation of the laboratory animals**

تم الحصول على الجرذان الذكور من سلالة Sprague – Dawley من مركز السيطرة الدوائية / بغداد وخضعت الحيوانات في مراحل الدراسة الى ظروف مختبرية متماثلة من حيث التغذية والتهوية والاضاءة ودرجة الحرارة.

*** تعيين الجرعة القاتلة LD_{50} بطريقة الحقن تحت الجلد**

Determination of Lethal Dose by Subcutaneous Injection

استخدمت في هذه الدراسة 16 جرذاً قسمت الى اربعة مجاميع ، حقنت تحت الجلد باحدى الجرع الاتية من مستخلصات التسميد الحيوي قيد الدراسة الذي حضر من اذابة كمية من المستخلص في محلول الملح الفسلجي (Normal saline) ولجرع 5000 و 6000 و 7000 و 8000 و 9000 و 10000 و 11000 ملغم / كغم من وزن الجسم ثم حسبت بعد ذلك LD_{50} [11] .

*** 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 تم توقيت الساعة وترك الدم ينضح على ورقة الترشيح لحين توقف النزف ، وسجل زمن النزف [12] .

2- زمن التخثر : (Clotting time)

تم حساب زمن التخثر حسب طريقة الانبوب الشعري لرايت اذ جمع الدم بواسطة الانابيب الشعرية وكسرت الانابيب الشعرية قبل 30 ثانية الى حين ملاحظة الجلطة بين النهايتين المكسورتين وسجل الوقت [12].

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) ثم وضعت داخل حمام مائي بدرجة حرارة 37ْم لمدة 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[13].

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 37ْم 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 وسجل الوقت[14].

*** تحديد التركيز الادنى من مستخلصات ازهار البابونج المعاملة بالتسميد الحيوي لمنع التخثر**

تم سحب 30 نموذجاً من الدم سحبت من ذكور الجرذان لكل مستخلص من المستخلصات ، يحتوي كل انموذج 2 $سم^3$ من الدم ووضعت في انابيب اختبار وقسمت الى مجاميع ، اضيف لها تراكيز المستخلصات وهي (25 و 50 و 75) ملغم / مل من الدم على التوالي وعوملت المجموعة الاخرى بمحلول سترات الصوديوم الثلاثية (3.8%) بنسبة (1 : 9) من الدم كمجموعة قياسية.

*** التصميم التجريبي التحليل الاحصائي Experimental design and statistical analysis**

صممت التجارب وفق تصميم القطاعات العشوائية الكاملة(R..S B..D) صممت التجارب وفق التجارب العاملية تام التعشية (Randomized Complet Blosk Design) . وحللت جميع النتائج وفق التصميم المتبع وقورنت متوسطات المعاملات باستعمال أقل فرق معنوي (L.S.D) وعلى مستوى أحتمالية ($P < 0.05$) لبيان معنوية النتائج [15] .

النتائج والمناقشة : Results and Discussion

تبين النتائج في جدول 1 ان مستخلصات ازهار البابونج تحتوي على المركبات الفينولية بالدرجة الاولى والمتمثلة بالكومارين (Comurin) والتانينات (Tannins) ومن ثم الكلايكوسيدات (Glycosides). تتفق هذه النتائج مع [16] .

جدول (1) . 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	استجابة التفاعل
خلات الرصاص 1%	كحول ايثانولي	+
كلوريد الحديديك 1%	كحول ايثانولي	+
هيدروكسيد البوتاسيوم	كحول ايثانولي	+
الكومارين	كحول ايثانولي	++
كواشف القلويدات		
كاشف ماير	كحول ايثانولي	+
دراكندوف	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

استخدمت طريقة [16] لتحديد الجرعة القاتلة لنصف حيوانات التجربة LD_{50} للمستخلص الكحولي لازهار البابونج ، حيث بينت النتائج المبينة في جدول 2 ان الجرعة 9000 ملغم / كغم تسببت في تفوق حيوان واحد في حين نفقت 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 .

جدول (2) تعيين الجرعة القاتلة للنصف (Lethal dose 50% (LD_{50}) للمستخلص الكحولي لازهار البابونج ولكافة المعاملات قيد الدراسة

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 [16] والتي حصلت على نتائج مشابهة عند استعمالها للمستخلص الكحولي لازهار البابونج.

*** تأثير كفاءة مستخلصات ازهار البابونج المعاملة بالتسميد الحيوي**

تشير نتائج الجدول 3 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 الترتيب ، 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 الترتيب.

جدول (3) تأثير كفاءة مستخلصات ازهار البابونج لمعاملات التسميد الحيوي ببكتريا *B. subtilis* وبكتيريا *Ps. fluorescens* و (*B. subtilis + Ps. fluorescens*) في بعض صفات تخثر الدم لحيوانات التجربة المعاملة قيد الدراسة

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 4 ان الجرعة 1250 ملغم / كغم اعطت اطول مدة زمنية لنزف الدم وتخثر الدم وزمن البروثرومبين وزن الثرومبوبلاستين والبالغة 9.01 دقيقة و 8.99 دقيقة و 23.09 ثانية و 43.63 ثانية على الترتيب 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 الترتيب والتي لم تختلف معنوياً عن معاملة السيطرة.

جدول (4) تأثير جرع مستخلصات ازهار البابونج لمعاملات التسميد الحيوي ببكتريا الـ *B. subtilis* وبكتيريا *Ps. fluorescens* و (*B. subtilis + Ps. fluorescens*) في بعض صفات تخثر الدم لحيوانات التجربة قيد الدراسة.

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 (3 و 4 و 5) 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 ووزن البروثرومبين وزمن الثرومبويلاستين ، وقد يعزى سبب ذلك الى احتواء مستخلصات ازهار البابونج في المعاملة الـ (*B. + Ps.*) 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 . [17]

جدول (5) تأثير التداخل بين نوع المستخلص لازهار البابونج المعاملة بالتسميد الحيوي لبكتيريـــا *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. sutilis* و *Ps. fuorescens* والاثنين معاً الى زيادة مكونات المواد الفعالة التي تعمل على الاسراع في تحطيم العامل (Xa) وزيادة كمية 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 [18].

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 النـزف [19].

يعتبر الازولين (Azulene) الذي هو احد مكونات المستخلص ولاسيما الزيت الذي ازدادت كميته في معاملة (*B. + Ps.*) والتي لها القدرة 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 [20]. ومن المحتمل ان المستخلصات عملت على عرقلة عمل العوامل V و X و XI والعامل VIII وذلك بتحويل فايبرينوجين الى الليفيين فيؤدي الى زيادة في زمن التخثر [21].

نستنتج من هذه الدراسة ان التسميد الحيوي ببكتيريا *B. subtilis* و *P. flurescens* والاثنين معاً ادى الى زيادة في المكونات الفعالة طبياً والتي اثرت بدورها في منع تخثر الدم داخل الجسم الحي وان المستخلص الكحولي لازهار البابونج ولمعاملة (*B. + Ps.*) تأثير مشابه لعمل الهيبارين وليس لسترات الصوديوم. كما وان التراكيز العالية من المستخلصات الكحولية لازهار البابونج ادت الى تأثيرات سلبية كالنزف واحتقان الاوعية الدموية والتي اثرت بدورها على النزف.

ملحق (1)عوامل تخثر الدم : Factors of blood coagulation

الرقم	الاسم	الوظيفة
I	Fibrinogen	خثرة (الليفيين)
II	Prothrombin	الفعال (IIa) ينشط العوامل I و V و VII و XII وبروتين C والصفائح الدموية
III	Tissue – factor	عامل مساعد لعامل VIIa موجود في اغشية الخلايا
IV	Calcium	متطلبات عوامل التخثر لربط مع Phosphor Lipid
V	Proaccelering Labile Factor	عوامل مساعدة لعامل X ينشط بواسطة Thrombin
VI		يسمى قديماً بالعامل Va
VII	Stable Factor	تنشيط العوامل IX و X
VIII	Anti-hemophilic factor	موجود في البلازما يرتبط مع العامل (VWF) من عوامل مساعدة لعامل IX ينشط بواسطة الثرومبين
IX	Christmas factor	ينشط العامل X وتكون معقد مع العامل VIII
X	Stuart – power factor	ينشط العامل II ويكون معقد من Prothrombinase مع العامل V
XI	Plasma thromboplasim antecedent	ينشط العوامل XII و Prelalli kerin و IX
XII	Hageman factor	ينشط Prellallikerin وانزيم Fibrinolysis
XIII	Fibrin – stabilizing factor	يرتبط مع الفبرين Fibrin

المصادر :

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

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

[3] Bringo , L., F. and Sener , B. (1995). A Review of terrestrial plants and marins organisms having anti-inflammatory action , Int. J. Pharmacognos , 33 : 81-97.

[4] 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.

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

[6] 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.

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

[8] 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.

[9] 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.

[10] 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.

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

[12] 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.

[13] 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.

[14] 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.

[15] الراوي ، خاشع محمود وعبدالعزيز خلف الله. (1980). تصميم وتحليل التجارب الزراعية. دار الكتب للطباعة والنشر. جامعة الموصل. 488 صفحة. جمهورية العراق.

[16] 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.

[17] 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.

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

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

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

[21] 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.