دراسة التأثير المضاد للجراثيم للعديد من النباتات في جراثيم الزائفة الزنجارية التي أبدت مقاومة للعديد من الصادات الحيوية

فردوس الفاضل* **شذى اللحام****

الملخص

خلفية البحث وهدفه: إن تطوير الجراثيم الممرضة لمقاومة متزايدة تجاه العديد من الصادات الحيوية يعدُّ مشكلة حقيقية للإنسان، ولاسيَّما أن هذه الجراثيم قد تنتقل إلى الإنسان عبر العديد من الطرق كالماء والغذاء والهواء، مما يتسبب بإمكانية الإصابة بالعديد من الأمراض الخطيرة.

هدف هذا البحث إلى التحري عن فعالية مستخلصات محضرة من أجزاء مختلفة من نباتات الزيتون من الفصيلة الزيتونية، والأس من الفصيلة الزنبقية، والمردكوش من الفصيلة الشفوية، والزنجبيل من الفصيلة الزنجبيلية والقيصوم من الفصيلة النجمية ضد جراثيم الزائفة الزنجارية.

مواد البحث وطرائقه: جرى العمل وفق أربع مراحل، أولاً: تقصينا عن جراثيم الزائفة الزنجارية Pseudomonas Aeruginosa في 667 عينة حليب، وذلك باستخدام منبت الأغار الدموي، ومنبت انتقائي لجراثيم الزائفة الزنجارية، وطريقة الاختبارات الكيميائية الحيوية، وهي عبارة عن منظومة (API20e) . ثانياً: استخلصنا النباتات السابقة بالماء والكحول المطلق والايتر باستخدام جهاز سوكسلية وجهاز مبخر التخلية الدوار. ثالثاً: أجرينا اختبار تحسس جراثيم الزائفة الزنجارية Pseudomonas Aeruginosa للصادات الحيوية باستخدام طريقة الانتشار من الأقراص الورقية (منبت مولر هينتون). رابعاً: أجرينا اختبار تحسس جراثيم الزائفة الزنجارية Pseudomonas Aeruginosa للخلاصات النباتية باستخدام طريقة الانتشار من الأقراص الورقية.

النتائج: أظهرت هذه الدراسة وجود فعالية متفاوتة مضادة لجراثيم الزائفة الزنجارية Pseudomonas Aeruginosa للمستخلصات المحضرة من الأجزاء المختلفة للنباتات السابقة، حيث كان لمستخلص نبات القيصوم الفعالية الأقوى كمضاد لهذه الجراثيم، في حين كان لمستخلص الزنجبيل التأثير الأضعف كمضاد لهذه الجراثيم، ومن الجدير بالذكر أن الصادات الحيوية المدروسة لم تُبدِ أي تأثير مضاد لهذه الجراثيم ماعدا الأميكاسين الذي أبدى فعالية مقبولة كمضاد لهذه الجراثيم.

الاستنتاج: أظهرت المستخلصات الكحولية لأجزاء النباتات المدروسة فعالية في التأثير الصاد لجراثيم الزائفة الزنجارية Pseudomonas Aeruginosa، وانطلاقاً مما سبق نوصي بدراسة تأثير هذه النباتات في الأنواع الجرثومية الأخرى، ولاسيّما تلك التي تبدي مقاومة للصادات الحيوية.

الكلمات المفتاحية: الزيتون، القيصوم، المردكوش، الزائفة الزنجارية.

* كلية الصيدلة – جامعة دمشق.

** مدرسة- كلية الصيدلة – جامعة دمشق.

Study of the Anti Bacterial Effectivness of Many Plants on Pseudomonas Aeruginosa Which Reveal Resistance Toward Many Antibiotics

Frdoos Al Fadel* **SHaza AL Laham****

Abstract

Background & Objective: Pathogenic germs have developed an increasing resistance toward many antibiotics which form a true problem for human being ,because these germs can transport to him by many ways such as water ,food and air that may cause many dangerous diseases to human being.

The aim of this study is to investigate the effectiveness of extractions prepared from different parts of the flowing plants: Olea europea Linn(Oleaceae) , Myrtus communis Linn(Liliaceae) ,Majorana syriacus Linn (Laminaceae), *Zingiber officinale* Linn(Zingiberaceae),and Achillea falcata Linn(Asteraceae), against Pseudomonas Aeruginosa.

Methods & Materials: We achieved this work in four stages: First of all, we investigated the presence of Pseudomonas Aeruginosa in 667 Samples of milk by using blood agar,selective agar for growing of Pseudomonas Aeruginosa, and Analytical Profile Index(API20e).Secondly, we extracted the previous plants with water, absolute alcohol, ether by using soxhlet apparatus and rotary vaccum evaporator. Thirdly, we determined the antibacterial activity of many antibiotics by using disc diffusion method(Muller-Hinton agar). fourthly, we determined the antibacterial activity of the extractions by using disc diffusion method.

Results: This study has shown the presence of different antibacterial effectiveness of the extracts prepared from different parts of those plants. The extraction of Achillea falcata has the strongest effectiveness against Pseudomonas Aeruginosa whereas the extraction of *Zingiber officinale* has the weakest effectiveness against Pseudomonas Aeruginosa.The studied antibiotics could not show any antibacterial effectiveness against these germs except Amikacin which has an acceptable effectiveness against those germs.

Conclusion: Since the alcoholic extractions of the studied plants have an antibacterial effectiveness ,we recommend to investigate the probable antibacterial effectiveness of those plants against another germs specially which have shown resistance toward antibiotics.

Key words: Olea europea, Achillea falcate,Majorana syriacus, Pseudomonas Aeruginosa

* Faculty of Pharmacy – Damascus University.
** Faculty of Pharmacy – Damascus University.

مقدمة:

ينتمي نبات الزيتون إلى الفصيلة الزيتونية وهو عبارة عن شجرة دائمة الخضرة يعود أصله إلى سورية[1]، ومن الجدير بالذكر أن العديد من الدراسات أثبتت فعاليته كمضاد للجراثيم[2].

أوراق الزيتون OLEA EUROPEA

ينتمي نبات الأس إلى الفصيلة الزنبقية وهو عبارة عن شجيرات صغيرة دائمة الخضرة، كما أن العديد من الدراسات أثبتت فعاليته كمضاد للجراثيم[3،4].

أوراق الآس Myrtus

ينتمي نبات المردكوش إلى الفصيلة الشفوية وهو عبارة عن نبات عشبي معمر يصل ارتفاعه إلى قرابة 50 سم، أوراقه صغيرة بيضاوية وأزهاره بيضاء، تميل إلى اللون القرنفلي، للنبات رائحة عطرية، الموطن الأصلي لهذا النبات بلدان حوض البحر الأبيض المتوسط، كما أن العديد من الدراسات أيضاً أشارت إلى تأثيره المضاد للجراثيم[5].

أوراق المردكوش Majorana syriaca

ينتمي نبات الزنجبيل إلى الفصيلة الزنجبيلية وهو عبارة عن نبات عشبي معمر ينمو في المنطقة الإستوائية ،و الجذر عبارة عن ساق تنمو تحت سطح الأرض منتفخة ، والسيقان فوق سطح التربة تحمل أوراقاً رمحية الشكل **و الأزهار صفراء اللون**. وقد أثبتت العديد من الدراسات تأثيره المضاد للجراثيم[6، 7، 8].

وأخيراً يعود نبات القيصوم *Achillea falcata Linn* إلى الفصيلة النجمية (Asteraceae)، وهو عبارة عن عشبة معمرة يراوح ارتفاعها بين 20 إلى 70 سم وفي بعض الأحيان تصل إلى أكثر من ذلك، الساق رفيعة مكسوة بشعيرات ذات رائحة عطرية، كما أن الأوراق خضراء فاتحة صغيرة مطاولة ومسننة، كل ساق تنتهي بنورات من الأزهار صفراء اللون، وهو ينمو في البادية السورية، وبعض الدراسات أشارت إلى تأثيره المضاد للجراثيم [9].

أزهار القيصوم Achillea falcate

أمَّا بالنسبة إلى جراثيم الزائفة الزنجارية *Pseudomonas Aeruginosa* فتوجد في الطبيعة وهي لا تحتاج إلى مواد غذائية معينة فهي تعيش على القليل القليل من الغذاء، لا بل أكثر من ذلك فهي تعدُّ من الفلورا الطبيعية حيث توجد في القناة الهضمية والجزء العلوي للقناة التنفسية عند الإنسان[11]، وتعدُّ من الجراثيم الانتهازية ، فقد تتحول إلى جراثيم ممرضة بحيث تتجلى بعض أعراضها الإمراضية

عند الدواجن بضيق في التنفس وحالة من الإسهال، والأهم من ذلك أنها قد تسبب موت الأجنة داخل البيض [10، 12]، أمَّا عند الخراف فقد تسبب التهاباً في نقي العظام [13]، وعند الإنسان تسبب التهابات رئوية أو بولية أو تناسلية، والأكثر من ذلك قد تؤدي إلى حدوث إنتان دم أو التهاب شغاف القلب[11].

أهمية البحث وأهدافه:

إن البحث عن بدائل علاجية ضد هذه الجراثيم وخاصة تلك المعندة على الصادات الحيوية، واختيار المستخلص النباتي الذي يمتلك التأثير الأقوى في هذه الجراثيم، من بين المستخلصات التي أثبتت الدراسات العالمية امتلاكها للفعالية المضادة للجراثيم، يعدُّ أمراً مهماً للإنسان على العديد من الأصعدة كالصعيد الغذائي والصعيد الصحي، إذ قد يكون هذا البحث نقطة انطلاق لبحوث مستقبلية تبحث في إمكانية استخدام هذه النباتات الطبيعية في العلاج بوصفها تشكل مصدراً للصادات الحيوية الطبيعية، كما أن الجديد في بحثنا هذا هو دراسة تأثير نبات القيصوم والمردكوش في جراثيم الزائفة الزنجارية.

مكان الدراسة وزمانها:

بالنسبة إلى زمان الدراسة أجريت الدراسة في المدة الواقعة من شهر كانون الثاني من عام 2010 حتى شهر نيسان من عام 2011، أمَّا مكان الدراسة حُضرت المستخلصات النباتية في مخابر كلية الزراعة وكلية الصيدلة – جامعة دمشق، وأجريت الاختبارات الجرثومية في المخبر البيطري المركزي في دمشق.

المواد والأجهزة والطرائق:

1. **المواد والأجهزة اللازمة لتعرّف على الجراثيم**:

مصباح لهب، سلك بلاتيني ذو عروة، ملقط معدني معد للتعقيم باللهب، أقراص لاختبار الأوكسيداز oxidase، ماء أكسجيني لاختبار الكاتالاز catalase، كاشف كوفاك kovac لاختبار الأندول indole، منبت أغار دموي Blood agar، منبت خاص بنمو الزائفة الزنجارية *Pseudomonas Aeruginosa* Isolation agar من شركة (HiMedia-India) الذي يتألف من: أغار agar، والبيبتون peptone الذي يعدُّ مصدراً للكربون والآزوت اللازمين للنمو الجرثومي، وكلور المغنزيوم وكبريتات البوتاسيوم اللذين يحرضان إفراز الصباغ الخاص بالزائفة الزنجارية، وIrgasan (الصاد الحيوي الذي يثبط نمو الجراثيم الأخرى سواء أكانت موجبة أو سالبة الغرام)، والغليسيرول glycerolالذي يُعدُّ كمصدر للطاقة، كما أنه يحض على إفراز الصباغ الخاص بالزائفة الزنجارية.

مجموعة الاختبارات الكيميائية الحيوية:

اختيرت منظومة Analytical Profile Index(API20e) صنع شركة bio Merieux فرنسا التي تختبر 23 صفة كيميائية حيوية تفريقية وهي:

- التحري عن فعالية إنزيمات: الغالاكتوبيرانوزيداز 2-nitrophenyl-βD- galactopyranoside، الأرجنين ثنائي الهيدرولاز L-Arginine، الأكسيداز oxidase.
- تفاعلات نزع زمرة الكربوكسيل من الأحماض الأمينية: الليزين L-lysine، الأوميثين L-omithine .
- تفاعل نزع زمرة الأمين من الحمض الأميني التربتوفان L-tryptophan.
- تفاعلات تخمير السكاكر الآتية: الغلوكوز D-glucose، المانيتول D-mannitol، الإينوزيتول Inositol، السوربيتولD-sorbitol، الرامنوز L- rhamnose، السُكْروز D- sucrose، المليبيوزD-melibiose، الأميغدالين Amygdaline، الأرابينوز Arabinose
- تفاعلات إنتاج: الإندول Indole الأسيتوئين Asitoen.
- تفاعلات إنتاج غازات: كبريت الهيدروجين، الآزوت، أوكسيد الأزوت nitrose oxide

• تفاعلات دراسة صفات: تميّع الهلام gelatin، استعمال السيترات citrate، حلمهة اليوريا urea (اليورياز urease). مجهر ضوئي، زيت الأرز، صفائح وسواتر زجاجية، مكونات صبغة غرام، حاضنة Incubator، صاد موصد.

2. **المواد و الأجهزة المطلوبة لتحضير المستخلصات النباتية**:

أوراق الزيتون، أوراق الأس، أوراق المردكوش، جذور الزنجبيل وأزهار القيصوم، هاون معدني، إيتانول مطلق، إيتر البترول، جهاز سوكسلية soxhlet apparatus ، جهاز مبخر التخلية الدوار rotary vaccum evaporator ، مجفدة.

3. **المواد المطلوبة لإجراء اختبار التحسس**:

منبت مولر هنتون Muller-Hinton agar، أقراص تحسس فارغة بقطر5 ملم، مراشح غشائية membrane filters صنع شركة (whatman,U.K.) ذات قطر 0.45 مكرومتراً [14]، أقراص معيارية تحوي تراكيز معينة للعديد من الصادات الحيوية (شركة Bioanalyse) بقطر 5 ملم.

الطرائق:

1) طريقة الاعتيان:

جرى التقصي عن جراثيم الزائفة الزنجارية *Pseudomonas Aeruginosa* في العينات الواردة إلى المخبر المركزي البيطري بشكل يومي وهي عبارة عن 667 عينة حليب أبقار مصابة بالتهاب الضرع، حيث وضعت العينات في أنابيب معقمة مزودة بشريط إغلاق، كما ألصق عليها بطاقة تعريف تتضمن رقم واسم العينة ومكان الجمع وتاريخه، ونقلت هذه الأكياس بطريقة مبردة إلى المخبر (بحرارة 2-4 ْم) بالسرعة القصوى .

2) **طريقة جمع المواد النباتية**:

جمعت أوراق كل من الزيتون والأس والمردكوش وأزهار القيصوم في ساعات الصباح الباكر في المدة من شهر حزيران إلى شهر آب من عام2010 من منطقة ريف دمشق، أمَّا جذور الزنجبيل الجافة فقد جرى شراؤها من أحد الأسواق في مدينة دمشق. وقد قام المصنف النباتي الأستاذ الدكتور أنور الخطيب بتعرّف على العينات النباتية. غسلت العينات النباتية بالماء البارد ثم بالماء المقطر، جففت العينات النباتية بتيار من الهواء الساخن وبدرجة حرارة لا تزيد على 60 درجة مئوية في الظل، ثم سحقت بالهاون المعدني بشكل مناسب حتى حصلنا على مسحوق ناعم ومتجانس، وجرى الاحتفاظ بها في مغلفات ورقية وفي ظروف خالية من الرطوبة إلى حين تحضير الخلاصة[14].

3) طريقة الاستخلاص وتحضير العينات النباتية:

استخلصت الأجزاء النباتية كل على حدة بجهاز الاستخلاص المستمر (سوكسلية soxhlet)، حيث اعتمدت الطريقة المذكورة في المرجع[15] في تحضير الخلاصات النباتية بالمذيبات العضوية. وضع 50 غ من النموذج المسحوق، بواسطة هاون كهربائي، داخل الثمبل thumble في جهاز الاستخلاص المستمر soxhlet، واستخدم 500 مل من كل مذيب عضوي (بنسبة 1 10: وزن: حجم). وجرى انتقاء ثلاثة مذيبات متفاوتة القطبية في استخلاص مكونات النباتات، وهي على الترتيب: إيتر البترول، الايتانول المطلق، الماء، وجرى الاستخلاص بمعدل 4 ساعات، إذ استمرت عملية الاستخلاص إلى أن أصبح المذيب المستخدم الذي يخرج من الثمبل عديم اللون. وبعدها رُكزت الخلاصات الايترية والايتانولية بالاستخراج بالتَّخْلِيَة باستخدام مبخر التخلية الدوار rotary vaccum evaporator بدرجة حرارة لا تزيد على 40 ْم، وعند تبخير المذيب المستخدم في الاستخلاص جميعه، لوحظ تشكل طبقة ثخينة من الخلاصة، أمَّا المستخلص المائي فجفف في المجفدة ، أُخذت هذه الطبقة ووضعت في زجاجات معقمة محكمة الإغلاق وحفظت في الثلاجة،

إلى حين استخدامها، وهكذا حصلنا على المستخلصات الجافة [16].

4) طريقة زرع العينة المرضيّة:

سُجل على أسفل الأطباق المعلومات الآتية: رقم العينة واسمها ومكان الجمع وتاريخه، ثم استخدم السلك البلاتيني ذو العروة بعد تعقيمه باللهب، حيث غرس في العينة (الحليب)، ومرر على الأغار الدموي، ووضع المنبت في الحاضنة بدرجة 35-37 مئوية ومدة 20- 24 ساعة، ومن الجدير بالذكر أن العينات كلّها زُرعت خلال ساعتين من زمن أخذ العينة.

5) طريقة تعرف على هوية الجراثيم:

انتقيت جراثيم الزائفة الزنجارية *Pseudomonas Aeruginosa* بعد إجراء الخطوات الآتية:

1. إجراء الفحص المجهري:

أجري الفحص المجهري بعد مرور24 ساعة على حضن العينة المزروعة على الأغار الدموي باستخدام مكونات صبغة غرام والمجهر الضوئي باستخدام زيت الأرز بالتكبير X100

2. إجراء الزرع على الأوساط الانتقائية:

استخدم السلك البلاتيني ذو العروة بعد تعقيمه باللهب، ثم أُخذت مستعمرة نامية على منبت الأغار الدموي، وزرعت على المستنبت الانتقائي لنمو جراثيم الزائفة الزنجارية P.*Aeruginosa* السابقة الذكر، ثم وضع في الحاضنة بدرجة 35-37 مئوية ومدة 24 ساعة[11].

3. إجراء بعض الاختبارات الكيميائية الحيوية:

أجريت كل من الاختبارات الآتية: الأوكسيداز oxidase، الكاتالاز catalase، الأندول indol

4. إجراء تقنية (API20e) Analytical Profile Index :

أجريت هذه التقنية بناءً على المعطيات الواردة في المرجع المرافق من الشركة المصنعة إِذْ:

- حُلت المستعمرات الجرثومية في المحلول الملحي 0.85%.
- مُلئت حفر قاعدة صفيحة الاختبار بالماء المقطر.
- وزع المحلول الملحي الحاوي على الجراثيم في حفر صفيحة الاختبار(بعض الحفر تملأ تماماً، وبعضها يملأ جزئياً، وبعضها الآخر يضاف إليه زيت البارافين).
- غُطيت صفيحة الاختبار بالغطاء الخاص بها، ووضعت في الحاضنة مدة 24 ساعة عند درجة حرارة 37 مْ.
- بعد انتهاء مدة التحضين، وضعت الكواشف المناسبة وقُرئت موجودات الصفيحة بالعودة إلى المراجع المرافقة من قبل الشركة المصنعة.

6) إجراء اختبار تثبيط النمو الجرثومي للصادات الحيوية بطريقة الانتشار من القرص:

أُجريت اختبارات التحسس للصادات الحيوية على الجراثيم المعزولة بشكل نقي بطريقة الانتشار من القرص Kirrby-Baue method، كما وصفت من قبل الهيئة العالمية لمعايير المخابر الطبية (NCCLS200) 18، واستخدمت أقراص معيارية تحوي على الصادات الحيوية الآتية صنع شركة (Bioanalyse).

الجدول رقم(1) : الصادات الحيوية المستخدمة في هذا البحث و تركيزها.

التركيز (مكغ/القرص)	الصاد الحيوي
30	Oxytetracycline(T)
25	Amoxicillin(AX)
1	Oxacillin(OX)
30	Cefadroxil(CER)

Pefloxacin(PEF)	5
Amikacin(AK)	30
Tetracyclin(TE)	30
Ciprofloxacin(CIP)	5
Norfloxacin(NOR)	10
Gentamycin(CN)	10
Chloramphenicol(C)	30
Enrofloxacin(ENR)	5
Doxycyclin(DO)	30
Cephalexin(CL)	30
Cephalotin(KF)	30
Clindamycin(DA)	2
Ampicillin(AM)	10
Erythromycin(E)	15

7) إجراء اختبار تثبيط النمو الجرثومي للخلاصات النباتية بالانتشار من القرص:

حضرت أقراص تحسس تحوي تركيزاً محدداً ومتماثلاً من ممدد المستخلصات في الايتانول- الماء- الإيتر، حيث حُمل كل قرص بـــ 5 ميكرولتر من ممدد 66 ملغ/مل، فكان تركيز الخلاصة في القرص(0,33 ملغ/قرص)، كما حضرت أقراص تحتوي على الشاهد (الايتانول- الماء- الايتر). زرعت الأقراص في علب بتري الحاوية على منبت مولر هنتون Muller-Hinton agar وحضنت مدة 17 ساعة بدرجة37 درجة مئوية. ثم قرئت النتائج بتحديد قطر دائرة عدم النمو الجرثومي المحدثة من قبل القرص مقارنة بكلٍّ من الشواهد والأقراص المعيارية [19]. ومن الجدير بالذكر أننا عقمنا ممدد المستخلصات من خلال تمريرها عبر مراشح غشائية membrane filters صنع شركة (whatman,U.K.) ذات قطر 0.45 مكرومتراً [14] .

بعد الانتهاء من العمل يجري التخلص من المنابت باستعمال الصاد الموصد.

النتائج:

1. نتائج تعرّف على هوية الجراثيم:

تم اختيار عينات الجراثيم التي أعطتنا النتائج الآتية:

- **الفحص المجهري:** عصيات سلبية الغرام، مستقيمة أطرافها مستديرة، غير متبوغة وليس لها محفظة، وهذه النتيجة تتفق مع ما ورد في المرجع [11، 17].
- **الزرع على المنابت الجرثومية :**
- **لنمو على الآغار الدموي: مستعمرات كبيرة ذات حافات غير منتظمة، محللة للدم وذات رائحة عطرية تشبه رائحة أزهار المشمش، وهذه النتيجة تتفق مع ما ورد في المرجع11، 17.**
- **النمو على المنبت الخاص بجراثيم الزائفة الزنجارية *Pseudomonas Aeruginosa* Isolation agar: نمو مستعمرات رمادية اللون، وهذه النتيجة تتفق مع الملحق المرفق من الشركة المصنعة.**
- **نتائج الاختبارات الكيميائية الحيوية:**

اختبار الأوكسيداز oxidase: ظهور لون بنفسجي، وهذه النتيجة تتفق مع ما ورد في المرجع[11].

اختبار الكاتالاز catalase: ظهور فقاعات وهذه النتيجة تتفق مع ما ورد في المرجع[11] .

اختبار الأندول indol : عدم ظهور حلقة وردية، وهذه النتيجة تتفق مع ما ورد في المرجع[11،17]

الجدول رقم(2) : يوضح نتائج الاختبارات الكيميائية الحيوية

الاختبار	نتيجة الاختبار
اختبار الأوكسيداز oxidase	+
اختبار الكاتالاز catalase	+
اختبار الأندول indol	-

- **نتائج الاختبار الكيميائي الحيوي** (API20e) :

قُرئت نتائج التحليل الكيميائي الحيوي (API20e) وذلك بعد انتهاء مدة التحضين، بحسب الأسلوب المتبع في الدليل المرافق للاختبار، فكانت نتيجة القراءة: 2216000،

ونتيجة هذه القراءة تنطبق على جراثيم الزائفة الزنجارية *Pseudomonas Aeruginosa*.

وبذلك نكون حصلنا على عينات جراثيم الزائفة الزنجارية *Pseudomonas Aeruginosa* وقد كانت بنسبة (13.35%) 89 من العدد الكلي للعينات التي قمنا بدراستها.

2. **نتائج تحسس جراثيم الزائفة الزنجارية *Pseudomonas Aeruginosa* للصادات الحيوية**:

وجدنا أن جراثيم الزائفة الزنجارية *Pseudomonas Aeruginosa* كانت مقاومة للصادات الحيوية المدروسة ماعدا الأميكاسين الذي أعطى دائرة عدم نمو جرثومي بقطر راوح بين 19-21 ملم. إذْ عُدَّت جراثيم الزائفة الزنجارية *Pseudomonas Aeruginosa* حساسة أو مقاومة للصادات الحيوية بالاستناد إلى معايير NCCLS2000 [18]، وإلى معايير النشرة المرفقة مع أقراص الصادات الحيوية من الشركة المنتجة.

الجدول رقم (3) :أقطار دوائر تثبيط النمو الجرثومي باستخدام الصادات الحيوية.

الصاد الحيوي	قطر دائرة عدم النمو(ملم)	نتيجة تحسس الجراثيم للصادات
Oxytetracycline(T)	8-6	مقاومة
Amoxicillin(AX)	9-6	مقاومة
Oxacillin(OX)	10-7	مقاومة
Cefadroxil(CER)	8-6	مقاومة
Pefloxacin(PEF)	9 -7	مقاومة
Amikacin(AK)	21-19	متحسسة
Tetracyclin(TE)	7-5	مقاومة
Ciprofloxacin(CIP)	10 -7	مقاومة
Norfloxacin(NOR)	8-5	مقاومة
Gentamycin(CN)	8-6	مقاومة
Chloramphenicol(C)	8-6	مقاومة
Enrofloxacin(ENR)	9 -7	مقاومة
Doxycyclin(DO)	9-6	مقاومة
Cephalexin(CL)	9-6	مقاومة
Cephalotin(KF)	7-5	مقاومة
Clindamycin(DA)	9-7	مقاومة
Ampicillin(AM)	8-6	مقاومة
Erythromycin(E)	9-5	مقاومة

3. **نتائج تحسس جراثيم الزائفة الزنجارية *Pseudomonas Aeruginosa* للمستخلصات النباتية**:

لم تبدِ المستخلصات المائية والإيترية للنباتات المدروسة أي تأثير صاد لهذه المستعمرات الجرثومية (قطر دائرة عدم النمو الجرثومي صفر). أمَّا المستخلص الايتانولي للنباتات المدروسة فقد كان لها تأثير صاد لهذه المستعمرات الجرثومية، كما يوضح الجدول الآتي:

الجدول رقم (4): يوضح الفعالية المضادة لجراثيم الزائفة الزنجارية التي تبديها المستخلصات الايتانولية و الايترية و المائية للنباتات من خلال قياس أقطار دوائر عدم النمو الجرثومي

النبات	قطر التثبيط (ملم) للخلاصات النباتية بتركيز 5 ميكرولتر من ممدد 66 ملغ/ مل(0.33 ملغ/قرص)		
	الخلاصة المائية	الخلاصة الايترية	الخلاصة الايتانولية
الشاهد /5 ميكرولتر	0	0	0
أزهار القيصوم	0	0	24-21
أوراق الأس	0	0	17-13
أوراق الزيتون	0	0	13-10
أوراق المردكوش	0	0	10-8
جذور الزنجبيل	0	0	9-6

4. **نتائج الدراسة الإحصائية:** قمنا بدراسة إحصائية والانحراف المعياري σ لكل من المواد الآتية: للنتائج التي حصلنا عليها، لحساب المتوسط الحسابي μ

(1) الأميكاسين

الفئات	مركز الفئة x_i	تكرار الفئة f_i	$f_i . x_i$	$(m - x_i)^2$	$f_i (m - x_i)^2$
19 -	**19.5**	**35**	**682.5**	**2(0.61)**	**13.02**
20 - 21	**20.5**	**54**	**1107**	**(-0.39)2**	**8.21**
المجموع		**89**	**1789.5**		**21.23**

المتوسط الحسابي $m = 20.11$ الانحراف المعياري $s = 0.49$

(2) أزهار القيصوم

الفئات	مركز الفئة x_i	تكرار الفئة f_i	$f_i . x_i$	$(m - x_i)^2$	$f_i (m - x_i)^2$
21 -	21.5	18	387	2)12(1.	22.58
22 -	22.5	42	945	(0.12)2	0.60
23 - 24	23.5	92	.5681	2(-0.88)	22.46
المجموع		89	3.5120		45.64

المتوسط الحسابي $m = 22.62$ الانحراف المعياري $s = 0.72$

(3) أوراق الآس

الفئات	مركز الفئة x_i	تكرار الفئة f_i	$f_i . x_i$	$(m - x_i)^2$	$f_i (m - x_i)^2$
13 -	13.5	12	162	2(1.80)	38.88
14 -	14.5	20	290	(0.80)2	12.80
15 -	15.5	31	480.5	2(-0.20)	1.24
16 - 17	16.5	26	429	2(-1.20)	37.44
المجموع		89	1361.5		90.36

المتوسط الحسابي $m = 15.30$ الانحراف المعياري $s = 1$

(4) أوراق الزيتون

الفئات	مركز الفئة x_i	تكرار الفئة f_i	$f_i . x_i$	$(m - x_i)^2$	$f_i (m - x_i)^2$
10 -	10.5	17	178.5	2(1.17)	23.27
11 -	11.5	40	460	(0.17)2	1.16
12 - 13	12.5	32	400	2(-0.83)	22.04
المجموع		89	1038.5		46.47

المتوسط الحسابي $m = 11.67$ الانحراف المعياري $s = 0.72$

(5) أوراق المرديكوش

الفئات	مركز الفئة x_i	تكرار الفئة f_i	$f_i . x_i$	$(m - x_i)^2$	$f_i (m - x_i)^2$
8 -	8.5	41	348.5	(0.54)2	11.96
9 - 10	9.5	48	456	2)46(-0.	10.16
المجموع		89	804.5		22.12

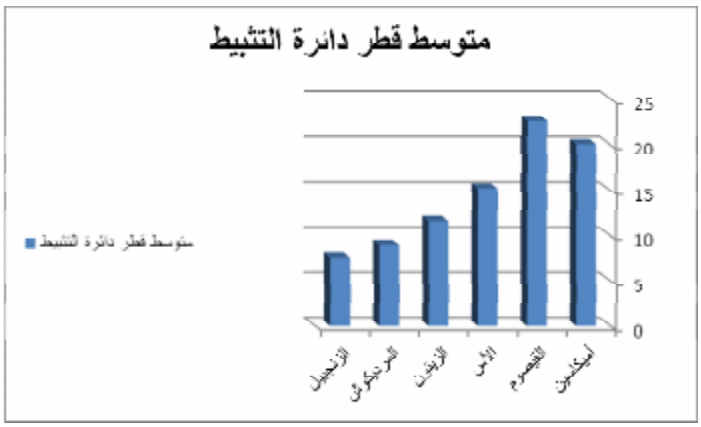
المتوسط الحسابي $m = 9.04$ الانحراف المعياري $s = 0.50$

(6) جذور الزنجبيل

الفئات	مركز الفئة x_i	تكرار الفئة f_i	$f_i . x_i$	$(m - x_i)^2$	$f_i (m - x_i)^2$
6 -	6.5	21	136.5	2(1.12)	26.34
7 -	7.5	36	270	(0.12)2	0.52
8 - 9	8.5	32	272	2(-0.88)	24.78
المجموع		89	678.5		51.64

المتوسط الحسابي $m = 7.62$ الانحراف المعياري $s = 0.76$

المادة	أميكاسين	القيصوم	الآس	الزيتون	المرديكوش	الزنجبيل
متوسط قطر دائرة التثبيط	20.11	22.62	15.3	11.67	9.04	7.62



المناقشة:

أظهرت الدراسة أن نسبة جراثيم الزائفة الزنجارية *Pseudomonas Aeruginosa* في عينات حليب البقر المصاب بالتهاب الضرع هي (667/89، 13.12%)، وهذا توافق مع دراسة أجريت في كوريا على عينات الحليب المجرثمة حيث كانت (225/45 ، 20%)[20] . و في دراسة مصرية أجريت على مجموعة من الحيوانات كانت النسبة (20.3%) [21] .

تعدُّ عصيات القيح الأزرق أو الزائفة الزنجارية *Pseudomonas Aeruginosa* من الجراثيم المقاومة لمعظم الصادات تقريباً، فقد أبدى العديد من الصادات الحيوية المعروفة عجزهم في إحداث التأثير الصاد المعتبر ضد هذه الجراثيم عدا الأميكاسين amikacin . فقد تبيّن بعد عرض النتائج السابقة في الجدول الثالث أن جراثيم الزائفة الزنجارية أبدت مقاومة للصادات الحيوية المدروسة، حيث كانت أقطار دوائر عدم النمو الجرثومي لهذه الصادات أقل من أقطار دوائر عدم النمو الجرثومي المعتمدة في معايير NCCLS2000 [18]، وهذا يتفق مع الدراسة الكورية على عينات حليب لضرع ذي التهاب حيث أبدت الزائفة الزنجارية *Pseudomonas Aeruginosa* أعلى معدل مقاومة [86.6%][20]، كما تطابقت مع دراسة قديمة على 141 جرثوماً عزل من حليب مجرثم، فكانت الزائفة الزنجارية مقاومة شديدة لكل الصادات المدروسة [22]. ولكن الأميكاسين الذي استثنى القاعدة أبدى دائرة عدم نمو جرثومي ذات قطر راوح من 19 إلى 21 ملم، وعند العودة إلى معايير NCCLS2000 نجد أن قطر دائرة عدم النمو الجرثومي كان أكبر من 14 ملم، ومن ثَمَّ فإن جراثيم الزائفة الزنجارية*Pseudomonas Aeruginosa*

كانت حساسة على الأميكاسين بشكل كامل 100%، أمَّا الدراسة المصرية أظهرت مقاومة شديدة 100% على الأموكسيسيللين amoxycillin والتوبرامايسين tobramycinفي حين أنها كانت متنوعة في تحسسها على الصادات الأخرى[21]. في حين أظهرت الدراسة الكورية عدم فعالية الأمبيسيللين ampicillin والسيفالوزين cefazolin والريفامبيسين refampin والسيفالوتين cephalothin على الزائفة الزنجارية، والعكس مع الاميكاسين amikacin والجنتامايسين gentamicinوالبيبراسيللين piperacillin التي أبدت فعالية قوية ضد هذه الجراثيم[20].

أبدت جراثيم الزائفة الزنجارية *Pseudomonas Aeruginosa* مقاومة على المستخلصات المائية والايترية المحضرة من أوراق الزيتون و الأس والمردكوش وجذور الزنجبيل وأزهار القيصوم. وتوافق هذا مع دراسة التأثير المضاد للجراثيم لنبات الزنجبيل بعدة خلاصات في مجموعة من الجراثيم، فأكدت أن الخلاصة المائية ليس لها فعالية بعكس الخلاصات الأخرى [23].

بينما المستخلصات الكحولية أظهرت فعالية في التأثير الصاد لجراثيم الزائفة الزنجارية *Pseudomonas Aeruginosa*، وعند مقارنة قطر دائرة عدم النمو الجرثومي للمستخلصات الكحولية النباتية الموضحة في الجدول الرابع بقطر دائرة عدم النمو الجرثومي للأميكاسين (19 إلى 21 ملم)، كان للمستخلص الايتانولي لأزهار القيصوم التأثير الأقوى في تثبيط نمو جراثيم الزائفة الزنجارية *Pseudomonas Aeruginosa* الذي تجلى بدائرة عدم نمو جرثومي ذات قطر راوح من 21 إلى 24 ملم. وهذا يتوافق مع الدراسة التي أظهرت التأثير المضاد للجراثيم من خلاصات أزهار أنواع مختلفة من نبات القيصوم في عدة جراثيم منها الزائفة الزنجارية [24,25,9].

أمَّا التأثير المثبط للجرثوم في المستخلص الايتانولي لأوراق الأس فكانت بقطر راوح من 13 إلى17 ملم، وتوافق هذا مع دراسة على الطعام الملوث بالجراثيم بأن الخلاصة الايتانولية لنبات الأس كانت ذات فعالية قوية مضادة للجراثيم [26]. كما أيدتها الدراسة الايرانية على مجموعة من النباتات التي أظهرت فعالية الزيوت الأساسية لأوراق نبات الأس على الزائفة الزنجارية المأخوذة من سلالة عيارية [27] .

وبدراسة المستخلص الايتانولي لأوراق الزيتون ظهرت دائرة عدم نمو جرثومي بقطر راوح من 10 إلى 13 ملم. وهناك العديد من الدراسات التي تظهر التأثير المضاد للجراثيم لأوراق الزيتون، وقد عزي هذا التأثير المضاد للمركبات الفينولينية وأهمها oleupropein ومشتقه hydroxytyrosol [28,29,30] ويعتقد أن هذا التأثير يعود إلى تخريبها غشاء الجراثيم[31].

وكانت دائرة عدم نمو المستخلص الإيتانولي للمردكوش بقطر راوح من8 إلى 10 ملم، وفي دراسة هندية على نبات Origanum majorana L. (Sweet marjoram) أكدت التأثير المضاد للجراثيم في الزائفة الزنجارية [32].

وأخيراً كان للمستخلص الإيتانولي للزنجبيل دائرة عدم نمو ذات قطر راوح من 6-9 ملم. كما لوحظ هذا في دراستي Keskin , Konning حيث كانت قطر دائرة التثبيط 7 ملم [33,34]. وفي دراسة مقارنة بين خلاصة الزنجبيل وثلاثة مضادات حيوية حيث كانت فعالية جذر الزنجبيل أقوى من الصادات على جراثيم العنقودية staphylococcus والعقدية streptococcus [35].

من هذا نستنتج أن جراثيم الزائفة الزنجارية *Pseudomonas Aeruginosa* كانت حساسة للمستخلصات الكحولية لكل من الآس والزيتون والمردكوش والزنجبيل بشكل أفضل من الأميكاسين.

وعند مقارنة تأثيرات المستخلصات الايتانولية النباتية الموضحة في الجدول الرابع لم تكن فعاليتها الصادة لجراثيم الزائفة الزنجارية *Pseudomonas Aeruginosa* فيما بينها متماثلة، رغم أننا استخدمنا أقراص التحسس بتراكيز متساوية من ممدد المستخلصات (0.33 ملغ/القرص). فقد كان للمستخلص الايتانولي لأزهار القيصوم التأثير الأعظم في منع جراثيم الزائفة الزنجارية *Pseudomonas Aeruginosa* من النمو، في حين احتل المستخلص الايتانولي لأوراق الأس المرتبة الثانية ، و احتل المرتبة الثالثة المستخلص الايتانولي لأوراق الزيتون، أمَّا بالنسبة إلى المستخلص الإيتانولي للمردكوش فقد احتل المرتبة الرابعة، وكان للمستخلص الإيتانولي للزنجبيل التأثير الأضعف.

الاستنتاج:

أظهرت المستخلصات الكحولية لأجزاء النباتات المدروسة من أوراق الزيتون من الفصيلة الزيتونية، وأوراق الأس من الفصيلة الزنبقية، وأوراق المردكوش من الفصيلة الشفوية، وجذور الزنجبيل من الفصيلة الزنجبيلية، وأزهار القيصوم من الفصيلة النجمية، فعالية في التأثير الصاد لجراثيم الزائفة الزنجارية *Pseudomonas Aeruginosa* المقاومة للعديد من الصادات الحيوية.

المقترحات و التوصيات:

نوصي بدراسة التأثير المحتمل لهذه النباتات في الأنواع الجرثومية الأخرى وبشكل خاص تلك المقاومة للعديد من الصادات الحيوية. كما نطمح بالتحري عن المكونات الفعالة التي تملك التأثير الصاد في الجراثيم وتحديد تركيزها كمحاولة لإيجاد البدائل المناسبة والفعالة في علاج الأمراض الجرثومية. ونأمل بإجراء دراسة تتضمن مشاركة هذه المستخلصات مع الصادات الحيوية التقليدية للإسهام في التخفيف من آثارها الجانبية غير المرغوب فيها، فضلاً عن تقليل جرعتها وتحسين فعاليتها. وأخيراً نتمنى إجراء دراسة تتضمن اختبار القدرة الصادة للجراثيم لهذه النباتات على الكائنات الحية المصابة بجراثيم الزائفة الزنجارية.

References

1. ميشيل بطرس. شجرة الزيتون. منشورات وزارة الزراعة(النشرة رقم 246)، مديرية الارشاد الزراعي، قسم الأعلام.
2. Aytul K K.Antimicrobial and antioxidant activities of olive leaf extract and its food applications .a thesis submitted to the graduate school of engineering and sciences of izmir institute of technology.2010
3. Khder A K.Effect of allium sativum and myrtus communis on the elimination of antibiotic resistance and swarming of proteus mirabilis. jordan journal of biological sciences. Vol.1, No.3. 2008.p.124 -128.
4. Al-Anbori, Dalia K.A, Al-Nimer, Marwan S.M., Al-Weheb, Athraa M. Antibacterial activity of ethanolic extract of myrtus communis. l leaves against salivary mutans streptococci.saudi dental journal:2008. 20(3); 82-87.
5. Hussain A I. The characterization and biological activities of essential oils of some species of lamiaceae.University of Agriculture, Pakistan.2009.
6. Akoachere Jf, Ndip Rn, Chenwi Eb, Ndip Lm, Njock Te, Anong Dn. Antibacterial effect of Zingiber Officinale and Garcinia Kola on respiratory tract pathogens. East Afr Med J. 2002.79(11):588-592.
7. Philip K, Abd Malek S N, Sani W: Antimicrobial activity of some medicinal plants from malaysia. American Journal Of Applied Sciences.2009.6 (8):1713-1717.
8. A. Sebiomo, A. D. Awofodu, A. O. Awosanya: Comparative studies of antibacterial effect of someantibiotics and Ginger (Zingiber Officinale) on two pathogenic bacteria. Journal of Microbiology and Antimicrobials. 2011.vol.3(1), pp. 18-22.
9. Karaalp C, Yurtman A N,N. Yavasoglu U K. Evaluation of antimicrobial properties of Achillea L.Flower head extracts. Pharmaceutical Biology, 2009; 47(1): 86–91.
10. يوسف شاهين: أهم أمراض الدواجن.منشورات وزارة الزراعة(النشرة رقم421) ، مديرية الإرشاد الزراعي، قسم الاعلام.1979.

11. ابراهيم الرفاعي، أنور العمر.علم الأحياء الدقيقة الخاص .جامعة البعث – كلية الطب البيطري.2007.106-107.
12. Hebat – Allah A M. Some Studies on Pseudomonas species in chicken embryos and broilers in assiut governorate . Ass. Univ. Bull. Environ. Res. 2004. Vol.7 No.1.
13. Benito-Peña A, Dvm, Peris B, Dvm, Aduriz G, Dvm: Purulent Nasomaxillary and mandibular osteomyelitis in sheep caused by Pseudomonas aeruginosa. Veterinary record 2010;176:115-117 .
14. Radulovic N,Jovanovic V,Stojanovic G.Screening of in vitro anti microbial and anti oxidant activity of nine hypericum species from te Balkan.Food Chimistry.2007.130:15-21.
15. شندالة محمد،محمد بشار،الدباغ سمية.التأثيرات المضادة للفطريات في المختبر لخلاصة نبات العرن.المجلة العربية للعلوم الصيدلية.57-62.5(4).2011.
16. آغا محمد عصام حسن:الفعالية المضادة لنبات الزيزفون من الفصيلة الزيزفونية الذي ينمو في سورية.مجلة جامعة دمشق –المجلد 24 – العدد 1. 243 –253.2008.
17. ميخائيل عبيد :علم الجراثيم.الطبعة الرابعة.منشورات جامعة دمشق.120-122-2000.
18. National Committee For Clinical Laboratory Standards.Performance Standards for antimicrobial disk Susceptibility test approved standard.M2-M7 M100-S10.Wayne,PA.NCCLs 2000.
19. Pradeep B.V, Manojbabu M.K, Palaniswam M. Antibacterial activity of Punica Granatum L. against gastro intestinal tract infection causing organisms. Ethnobotanical Leaflets 12: 1085-89. 2008.
20. Nam Hm, Lim Sk, Kim Jm. In Vitro activities of antimicrobials against six important species of gram-negative bacteria isolated from raw milk samples in Korea. Foodborne Pathog Dis. 2010;7(2):221-4.
21. Kamel G M,Ezz eldeen N.A,El-Mishad M Y,Ezzat R.Susceptibility Pattern of Pseudomonas aeruginosa Against Antimicrobial Agents and Some Plant Extracts with Focus on its Prevalence in Different Sources. Global Veterinaria 6 (1): 61-72, 2011
22. Swartz R, Jooste PJ, Novello JC.Antibiotic susceptibility patterns of mastitis pathogens isolated from Bloemfontein dairy herds. J S Afr Vet Assoc. 1984 Dec;55(4):187-93.
23. Malu S P, Obochi G O, Tawo E N, Nyong B E. Antibacterial activity and medicinal properties of Ginger (Zingiber Officinale). Global Journal of pure and applied Sciences.Vol 15, No. 3, 2009: 365-368
24. Aburjai T,Hudaib M. Antiplatelet, antibacterial, and antifungal activities of Achillea falcate extracts and evaluation of volatile oil composition. Pharmacognocy Magazine 2(7):191-198. 2006.
25. Khalil A , Dababneh B F, Al-Gabbiesh A H. Antimicrobial activity against pathogenic microorganisms by extracts from herbal Jordanian plants .Journal of Food, Agriculture & Environment Vol.7 (2) : 103-106. 2009
26. Amensour M,Bouhdid S,Fernández-López J.Antibacterial activity of extracts of myrtus communis against food-borne pathogenic and spoilage bacteria. International Journal of Food Properties, 13:1215–1224, 2010.
27. Owlia P ,Saderih, Rasooli I,Sefidkon F.Antimicrobial characteristics of some herbal oils on pseudomonas aeruginosa with special reference to their chemical compositions. Iranian Journal of Pharmaceutical Research (2009), 8 (2): 107-114
28. Bisignano G, Tomaino A, Lo Cascio R. On the In-Vitro Antimicrobial Activity of Oleuropein and Hydroxytyrosol. J. Pharm. Pharmacol. 1999; 51: 971-74.
29. Tafesh A, Najami N, Jadoun J.Synergistic antibacterial effects of polyphenolic compounds from olive mill wastewater. Evid Based Complement Alternat Med. 2011;2011:431021. Epub 2011 May 2.
30. Tafesh A,Najami N,Jadoun J.Synergistic Antibacterial Effects of Polyphenolic Compounds from Olive Mill Wastewater.Evid Based Complement Alternat Med. 2011; 2011: 431021.
31. Omar S H.Oleuropein in Olive and its Pharmacological Effects. Sci Pharm. 2010 June 30; 78(2): 133–154.
32. Leeja L, Thoppil G.E.Antimicrobial activity of methanol extract of Origanum majorana L. (Sweet marjoram). January 2007, 28(1) 145-146 (2007)
33. Keskin D, Toroglu S.Studies on antimicrobial activities of solvent extracts of different spices. J. Environ. Biol.32, 251-256 (2011)
34. Konning G H, Agyare C, Ennison B. Antimicrobial activity of some medicinal plants from Ghana . Volume 75, Issue 1, January 2004, Pages 65-67
35. Sebiomo A, Awofodu A D, Awosanya A O, Awotona F E, Ajayi A J.
Comparative studies of antibacterial effect of some antibiotics and ginger (Zingiber officinale) on two pathogenic bacteria. Journal of Microbiology and Antimicrobials Vol. 3(1), pp. 18-22, 2011.

تاريخ ورود البحث إلى مجلة جامعة دمشق 2011/5/23.
تاريخ قبوله للنشر 2011/9/14.