دراسة التأثير المضاد لقشر ضروب مختلفة لنبات الرمان في جراثيم الإشريكية القولونية النمط الحيوي (1) التي أبدت مقاومة للعديد من الصادات الحيوية

فردوس الفاضل*

شذى اللحام** **أنطون اللحام*****

الملخص

خلفية البحث وهدفه: البحث عن صادات حيوية حديثة هي مشكلة الجراثيم المقاومة للصادات الحيوية.

هدف هذا البحث إلى التحري عن الفعالية المضادة للجراثيم التي تبديها المستخلصات المحضرة من قشر ضروب مختلفة لنبات الرمان (من الفصيلة الرمانية) التي تنمو في سورية ضد جراثيم الإشريكية القولونية E.coli النمط الحيوي (1) والتي أبدت مقاومة للصادات الحيوية المدروسة.

مواد البحث وطرائقه: بدأ العمل بالتقصي عن جراثيم الإيشريكية القولونية E.coli في 843 عينة حليب، وذلك باستخدام منبت الآغار الدموي، ماكونكي آغار، سالمونيلا – شيغيلا آغار، وطريقة الاختبارات الكيميائية الحيوية وهي عبارة عن منظومة API 20 E (الخاصة بعائلة الإمعائيات). ثم استخلص قشر الرمان الحامض، وقشر الرمان الحلو، قشر الرمان اللفان بالماء والكحول المطلق والايتر باستخدام جهاز سوكسلية وجهاز مبخر التخلية الدوار. أجري اختبار تحسس جراثيم الإيشريكية القولونية E.coli للصادات الحيوية باستخدام طريقة الانتشار من الأقراص الورقية. ثم أُجري اختبار تحسس جراثيم الإيشريكية القولونية E.coli للخلاصات باستخدام طريقة الانتشار من الأقراص الورقية.

النتائج: كانت نسبة جراثيم الإشريشيا القولونية النمط الأول (1) 33.35% من عدد العينات الكلي. كما أظهرت هذه الدراسة وجود فعالية للمستخلصات المحضرة من قشر ضروب مختلفة لنبات الرمان ضد جراثيم الإشريكية القولونية E.coli النمط الحيوي (1)، في حين لم تبدِ الصادات الحيوية المدروسة أي تأثير مضاد لهذه الجراثيم.

الاستنتاج: مما سبق نوصي بدراسة تأثير هذه الأنواع من الرمان في الأنماط الجرثومية الأخرى، ولاسيَّما التي تبدي مقاومة للصادات الحيوية، كما نوصي بدراسة المكونات الفعالة التي تملك التأثير الصاد للجراثيم وتحديد تركيزها لنتمكن من إيجاد البدائل المناسبة والفعالة في علاج الأمراض الخمجية.

كلمات مفتاحية: الرمان، الإشريكية القولونية النمط الأول، الفصيلة الرمانية، الجراثيم المقاومة.

* قسم العقاقير والنباتات الطبية - كلية الصيدلة- جامعة دمشق.

** قسم العقاقير والنباتات الطبية - كلية الصيدلة- جامعة دمشق

*** قسم العقاقير والنباتات الطبية- كلية الصيدلة- جامعة دمشق.

Study of the Anti Bacterial Effect of the Pericarps of Many Varieties of Punica Granatum on E.Coli Biotype (1) Which Reveal Resistance Toward Many Antibiotics

AL Fadel F*

AL Laham Sh** **Al Laham A.*****

Abstract

Background & Objective: The Search for new antibiotics is the problem of resistance's bacteria to antibiotics.

This research aims to investigate the effectiveness of anti-bacteria shown by the extracts prepared from per carps of different types of Punica granatum (L) (from the family Punicaceae), which grow in Syria against Escherichia coli (E.coli) biotype (1), which were resistant to studied antibiotics.

Material& methods: Investigation began for E.coli in 843 milk samples, using blood agar, MacConkey agar, salmonella - shigella agar, and biochemical testing method [API 20 E = identification system for Enterobacteriaceae]. Then per carps of different types of Punica granatum were extracted by water, absolute alcohol, and eter using soxhlet device and rotary vacuum evaporator. Antibiotic susceptibility testing for E.coli by Kirby-Bauer disk diffusion method were conducted .then extracts susceptibility testing for E.coli were studied.

Results: Escherichia coli Type (1) was 33.35% of the total number of samples. This study also has shown the presence of antibacterial effectiveness of the extracts prepared from per carps of different types of Punica granatum against E.coli biotype (1), whereas the studied antibiotics have shown any antibacterial effectiveness.

Conclusion: From the above we recommend to study the impact of Punica granatum all types of other microbial, which have resistant to antibiotics, also we recommend to study the active ingredients which have the antibiotic effect ,and determine their concentrations to be able to find suitable alternatives and effective in the treatment of infectious diseases.

Key words

Punica granatum, Escherichia coli Type I, Punicaceae, resistance's bacteria

* Faculty of Pharmacy, Damascus University.

** Faculty of Pharmacy, Damascus University.

*** Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Damascus University.

مقدمة:

ينتمي نبات الرمان Punica granatum إلى الفصيلة الرمانية Punicaceae ويعود أصله إلى منطقتنا العربية، وهو عبارة عن شجيرة متساقطة الأوراق تنتج سرطانات كثيرة من الجذع. الأفرع أسطوانية ملساء ضاربة إلى السمرة ومرنة، أمَّا الأوراق فهي كاملة رمحية الشكل، ذات سطح علوي لامع، متقابلة على الفرع، وبالنسبة إلى الأزهار فهي كبيرة حمراء. وعند الحديث عن أصناف الرمان في سورية يمكن أن نذكر الرمان الوردي، والمليسي، والمنفلوطي، والحلو، والحامض، واللفان[1]. وفيما يتعلق بالاستخدامات العلاجية الشعبية للرمان فقد عرف عنه استخداماته مضاداً للإسهال، مخلصاً من الطفيليات التي تصيب الأمعاء، مدراً ومضاداً للجراثيم[2].

أمَّا بالنسبة إلى الجراثيم الإشريكية القولونية E.coli فتوجد بشكل طبيعي في الجهاز الهضمي للطيور والحيوانات والإنسان، ولكن قد تصبح ممرضة بحيث تتجلى أعراضها عند الدواجن بالتهاب الأمعاء، وارتفاع حرارة، وصعوبة في التنفس وحالةٌ من الإسهال الشديدة[3]، أمَّا عند الأبقار فقد تسبب التهاب الضرع.[4] وبالنسبة إلى الإنسان تسبّب الإسهال، والتهاب الأمعاء، والحمى، وآلاماً في البطن والتهاباً في المجاري البولية[5].

ومن الجدير بالذكر أن هذه الجراثيم قد تبدي مقاومة للعديد من الصادات الحيوية[5] رغم أن العديد من الدراسات قد تطرقت إلى دراسة التأثير المضاد للجراثيم لنبات الرمان[2،7،8،6]، إلا أنها لم تتطرق وبشكل كافٍ إلى دراسة تأثيره في الجراثيم المقاومة، كما أنها لم تزكي نوع الرمان الذي يملك التأثير الأقوى الصاد للجراثيم، وانطلاقاً مما سبق فإن محاولة التقصي عن إمكانية امتلاك قشر الأنواع المختلفة للرمان تأثيراً مضاداً للإشريكية القولونية ولاسيَّما المقاومة للصادات الحيوية، وتحديد قشر أي نوع من هذه الضروب يتصدى بفعالية أكبر لهذه الجراثيم يعد ذا فائدة معتبرة للإنسان على العديد من الأصعدة كالصعيد الغذائي والصعيد الصحي (لأنَّ منتجات الدواجن والأبقار تشكل مصدراً غذائياً قد ينقل العدوى للإنسان في حالة وجودها في هذا المصدر الغذائي) وعلى المستوى الاقتصادي الوطني (لأن الإصابة بهذه الجراثيم تؤدي إلى حدوث حالة من النفوق الشديدة في حظائر الأبقار والدواجن).

هدف البحث:

التهاب الضرع هو المرض الأكثر انتشاراً في قطعان البقر ، والسبب الشائع لحدوث التهاب الضرع في الأبقار هو العدوى البكتيرية. وأهم الجراثيم التي تسبب التهاب الضرع هو العنقودية Streptococcus والايشيريكية القولونية E.coli والكليبسيلا Klebsiella sp والزائفة الزنجارية Pseudomonas sp. لذلك تعدُّ مضادات الجراثيم الأداة المهمة في برامج مكافحة التهاب الضرع، وترصّد المقاومة لمضادات الجراثيم أمر مهم لضمان تحقيق نتائج أفضل في استخدام مضادات الجراثيم، وتقليل مخاطر الاختيار وانتشار المقاومة لمضادات الجراثيم . ولهذا أهمية في ايجاد البديل العلاجي الطبيعي الأقل تكلفة في مكافحة هذه الظاهرة لحماية المستهلك الأساسي للحليب، وهو الانسان.

المواد والأجهزة اللازمة لتعرّف الجراثيم

مصباح لهب، وقضيب بلاتيني ذو عروة، وملقط معدني معد للتعقيم باللهب، ومستنبت آغار- آغار Aga- Agar، مستنبت الآغار دموي Blood agar، ومستنبت ماكونكي آغارMcConky agar، ومستنبت كسيلوز ليزين ديزوكسي كولات آغارXLD agar، ومستنبت سالمونيلا – شيغيلا

آغار Salmonella – shigella agar، وبزموت سلفات آغار bisimuth sulfate agar، ومسنبت السترات citrate، ومسنبت سيانور البوتاسيوم potassium cianor

وأقراص لاختبار الأوكسيداز oxidase، وماء أكسجيني لاختبار الكاتالاز catalase، وكاشف كوفاك kovac لاختبار الأندول indole.

مجموعة الاختبارات الكيميائية الحيوية:

اختيــرت منظومــة Analytical Profile Index(API20e) (الخاصة بعائلة الإمعائيــات) صــنع شــركة Biomyrix فرنسا التي تختبر 23 صفة كيميائية حيوية تفريقية وهي:

- التحري عن فعالية إنزيمات: الغالاكتوبيرانوزيــداز 2-nitrophenyl-βD- galactopyranoside، الأرجنــــين ثنائي الهيدرولاز L-Arginine، الأكسيداز oxidase.
- تفاعلات نزع زمرة الكربوكــسيل مــن الأحمــاض الأمينية:

الليزين L-lysine، الأوميثين L-omithine

- تفاعل نزع زمرة الأمــين مــن الحمــض الأمينـــي التربتوفان L-tryptophan.
- تفاعلات تخمير السكاكر الآتية: الغلوكوز D-glucose، المــــانيتول D-mannitol، الإينوزيتــــول Inositol، الــسوربيتول D-sorbitol، الرامنــوز L- rhamnose، الــــسُّكْروز D- sucrose، المليبيـــوز D-melibiose، الأميغدالين Amygdaline، الأرابينوز Arabinose.
- تفاعلات إنتاج: الإندول Indole، الأسيتوئين Asitoen.
- تفاعلات إنتاج غازات: كبريــت الهيــدروجين H2S، أوكسيد الآزوت nitrose oxide NO2، الآزوت N2
- تفاعلات دراسة صفات: تميّع الهلام gelatin، استعمال الـــــسيترات citrate، حلمهـــــة اليوريــــا urea (اليورياز urease).

مجهر ضوئي، زيت الأرز، صفائح وسواتر زجاجية، مكونات صبغة غرام، حاضنة Incubator، صاد موصد.

المواد والأجهزة المطلوبة لتحضير المستخلصات النباتية

قشر الرمان الحامض، وقشر الرمان الحلو، قشر الرمان اللفان، وهاون معدني، وإيتانول مطلق، وإيتر البترول، وجهاز سوكسلية soxhlet apparatus، وجهاز مبخر التخلية الدوار rotary vaccum evaporator ، مجفدة.

المواد المطلوبة لإجراء اختبار التحسس

مستنبت وآغار- آغار، أقراص تحسس فارغة بقطر5 ملم، مراشح غشائية membrane filters صنع شركة whatman)، (U.K.) ذات قطر 0.45 مكرومتراً [9]، أقراص معيارية تحوي تراكيز معينة للعديد من الصادات الحيوية (شركة Bioanalyse) بقطر 5 ملم، مسطرة مدرجة

الطرائق:

طريقة الاعتيان:

حلّلتِ العينات الواردة إلى المخبر المركزي البيطري بشكل يومي، وهي عبارة عن 843 عينة حليب أبقار مصابات بالتهاب الضرع (بحسب تشخيص الأطباء البيطريين) حيث وضعت العينات في أنابيب معقمة ومزودة بشريط إغلاق، كما ألصق عليها بطاقة تعريف تتضمن رقم العينة واسمها ومكان الجمع وتاريخه، ونقلت هذه الأكياس بطريقة مبردة إلى المخبر(بحرارة 2- 4ْ م).

جمع المواد النباتية:

جمعت الثمار الكاملة الناضجة للرمان الحامض في المدة من شهر تموز إلى شهر أيلول من ريف دمشق (منطقة دوما)، كما جمعت الثمار الكاملة الناضجة للرمان الحلو في المدة من شهر أيلول إلى شهر تشرين الثاني من ريف دمشق (منطقة الربوة)، وأخيراً جمعت الثمار الكاملة الناضجة للرمان اللفان في المدة من شهر آب إلى شهر

تشرين الأول من ريف دمشق (منطقة حرستا)، ومن الجدير بالذكر أن المصنف النباتي الدكتور أنور الخطيب قد قام بالتعرف إلى النباتات.

فصلت القشور عن الثمار ثم غسلت بالماء البارد ثم بالماء المقطر، ثم جففت العينات النباتية بتيار من الهواء الساخن وبدرجة حرارة لا تزيد على 60 درجة مئوية في الظل، وسحقت بالهاون المعدني بشكل مناسب لمسحوق ناعم ومتجانس، وجرى الاحتفاظ بها في مغلفات ورقية وفي ظروف خالية من الرطوبة إلى حين تحضير الخلاصة[9].

طريقة الاستخلاص وتحضير العينات النباتية:

استخلصت الأجزاء النباتية كل على حدة بجهاز الاستخلاص المستمر(سوكسلية soxhlet)، حيث اعتمدت الطريقة المذكورة في المرجع[10] في تحضير الخلاصات النباتية بالمذيبات العضوية. ووضع 50 غ من النموذج المسحوق، بواسطة هاون كهربائي، داخل الثمبل thumble في جهاز الاستخلاص المستمر soxhle ، واستخدم 500 مل من كل مذيب عضوي (بنسبة 10:1 وزن: حجم). وقد جرى انتقاء ثلاثة مذيبات متفاوتة القطبية في استخلاص مكونات النباتات، وهي على الترتيب: إيتر البترول، الايتانول المطلق، الماء، جرى الاستخلاص بمعدل4 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 فجَفُفَّ في المجفدة، أُخذت هذه الطبقة ووضعت في زجاجات معقمة محكمة الإغلاق وحفظت في الثلاجة، إلى حين استخدامها، وهكذا حصلنا على المستخلصات الجافة[11].

تعقيم العينة النباتية قبل إجراء اختبار التحسس

عقمت العينات النباتية بتمريرها عبر مراشح غشائية membrane filters صنع شركة (whatman,U.K.) ذات قطر0.45 مكرومتراً[9].

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)، ومرّر على الآغار 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.

تعرّف على هوية الجراثيم:

انتقيت جراثيم الإيشريكية القولونية Escherichia coli بعد إجراء الخطوات الآتية:

A. **إجراء الفحص المجهري**:

أجري الفحص المجهري بعد مرور 24 ساعة على حضن العينة المزروعة على الآغار الدموي باستخدام مكونات صبغة غرام، والمجهر الضوئي باستخدام زيت الأرز بالتكبير X100

B. إجراء الزرع على الأوساط الانتقائية:

- استخدم السلك البلاتيني ذو العروة بعد تعقيمه باللهب، ثم أُخذت مستعمرة نامية على منبت الآغار الدموي ووزرعت على مستنبت ماكونكي آغارMcConky agar، مستنبت كسيلوز ليزين ديزوكسي كولات XLD agar، ومستنبت سالمونيلا شيغيلا آغار Salmonella – shigella agar، بزموت سلفات آغار bisimuth sulfate agar، مسنبت السترات citrate، مسنبت سيانور البوتاسيوم

potassium cianor لنمو جراثيم الإيشريكية القولونية E.coli لسابقة الذكر، ثم وضعت المنابت في الحاضنة بدرجة 35-37 مئوية ومدة 40- 48 ساعة [14].

C. إجراء بعض الاختبارات الكيميائية الحيوية:

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

D. إجراء تقنية (API20e) Analytical Profile Index

أجريت هذه التقنية بناءً على المعطيات الواردة في المرجع المرافق حيث:

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

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

انتقيت جراثيم الإيشريكية القولونية Escherichia coli بعد تحديد هويتها(المنمطة) وأُجريت عليها 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) [13]، واستخدمت أقراص معيارية تحوي على الصادات الحيوية الآتية صنع شركة (Bioanalyse).

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

الصاد الحيوي	التركيز (مكغ/القرص)
Oxytetracycline(T)	30
Amoxicillin(AX)	25
Oxacillin(OX)	1
Cefadroxil(CER)	30
Pefloxacin(PEF)	5
Amikacin(AK)	30
Tetracyclin(TE)	30
Ciprofloxacin(CIP)	5
Norfloxacin(NOR)	10
Gentamycin(CN)	10
Pefloxacin(PEF)	5
Chloramphenicol(C)	30
Enrofloxacin(ENR)	5
Doxycyclin(DO)	30
Cephalexin(CL)	30
Cephalotin(KF)	30
Clindamycin(DA)	2
Ampicillin(AM)	10
Erythromycin(E)	15

إجراء اختبار تثبيط النمو الجرثومي للخلاصات النباتية بالانتشار من القرص:

قسمت عينات الحليب إلى 3 أقسام بناء على دراسة تحسسها على الصادات إلى [مقاومة – متوسط الحساسية – حساسة] بناء على أقطار التثبيط. واستبعدت الجراثيم المتحسسة ومتوسطة الحساسية للصادات المدروسة، وجرى العمل على عينات الحليب للمجموعة المقاومة للصادات كلّها.

ثم تحرينا فعالية المستخلصات المائية والإيترية والايتانولية لقشر كل من الرمان الحلو والحامض واللفان على جراثيم الايشيركية القولونية النمط (1) المقاومة التي بلغ عددها 110 من عدد العينات الكلي.

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 حُضِّرت أقراص تحتوي على الشاهد (الايتانول- الماء- الايتر). زرعت الأقراص في علب بتري وحضنت مدة 16 ساعة بدرجة 37 درجة مئوية. ثم قرئت النتائج بتحديد قطر دائرة هالة التثبيط للنمو الجرثومي المحدثة من قبل القرص مقارنة بكلّ من الشواهد والأقراص المعيارية[2]. بعد الانتهاء من العمل يجري التخلص من المنابت باستعمال الصاد الموصد.

النتائج:

1. نتائج تعّرف على هوية الجراثيم:

اختيرت عينات الجراثيم التي أعطتنا النتائج الآتية:

A. **الفحص المجهري:** عصيات سالبة الغرام، مستقيمة أطرافها مستديرة، غير متبوغة وليس لها محفظة، وهذه النتيجة تتفق مع ما ورد في المرجع[12,14].

B. **الزرع على المنابت الجرثومية :**

- النمو على الآغار الدموي: مستعمرات مدورة، بيضاء، ملساء مع وجود رائحة برازية [14].
- النمو على الماكونكي آغار McCoonky agar: نمو مستعمرات حمراء اللون، وهذه النتيجة تتفق مع ما ورد في المرجع[13].
- النمو على السالمونيلا – شيغيلا آغار – Salmonella shigella agar : مستعمرات حمراء قرمزية، وهذه النتيجة تتفق مع ما ورد في المرجع 14.
- النمو على بزموت سلفات آغار bisimuth sulfate agar (BIS) :مستعمرات بنية14
- النمو على منبت السترات citrate : لم تَنْمُ 14
- النمو على منبت سيانور البوتاسيوم potassium cianor : لم تَنْمُ 14

وقد كانت نسبة الإصابة بالإيشريكية القولونية 528 (62.6 %) من عدد العينات الكلي.

C. **نتائج الاختبارات الكيميائية الحيوية:**

اختبار الأوكسيداز oxidase: لم يظهر لون بنفسجي، وهذه النتيجة تتفق مع ما ورد في المرجع[14] .

اختبار الكاتالاز catalase: ظهور فقاعات، وهذه النتيجة تتفق مع ما ورد في المرجع [14].

اختبار الأندول indole : ظهور حلقة وردية، وهذه النتيجة تتفق مع ما ورد في المرجع[14].

الجدول رقم(2) : يوضح نتائج الاختبارات الكيميائية الحيوية

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

D. 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 : 5144512 و نتيجة هذه القراءة على جراثيم الإيشريكية القولونية E.coli النمط الأول (1)

وبذلك نكون حصلنا على جراثيم الإيشريكية القولونية E.coli النمط الأول (1)، وقد كانت 281 عينة بنسبة 33.35% من عدد العينات الكلي.

الجدول رقم(3) : يوضح عدد العينات المصابة و نسبتها المئوية

عدد العينات الكلي	العينات المصابة بالإيشريكية القولونية من عدد العينات الكلي	العينات المصابة بالإيشريكية القولونية النمط (1) من عدد العينات الكلي
843		
عدد العينات المصابة	528	281
نسبة العينات المصابة	% 62.6	% 33.35

2. نتائج تحسس جراثيم الإيشريكية القولونية E.coli للصادات الحيوية

درس 18 صاداً حيوياً على العينات المصابة بالإيشريكية القولونية بعد تنميطها، و قد أبدت المستعمرات الجرثومية مقاومة للصادات الحيوية حيث كان قطر التثبيط الصادات الحيوية المختارة جميعها صفراً، عدا الأميكاسين فقد كان قطر التثبيط 24 ملم. وذلك بالاستناد إلى معايير NCCLS2000 [13]، وإلى معايير النشرة المرفقة مع أقراص الصادات الحيوية من الشركة المنتجة إذْ عُدّتْ حسساسة أو مقاومة للصادات الحيوية. فكانت نسبة المستعمرات الجرثومية التي أبدت مقاومة للصادات الحيوية 110 (13.12%) من عدد العينات الكلي. وقد اختيرت هذه المستعمرات الجرثومية لاختبار المستخلصات النباتية عليها.

الجدول رقم (4) : النسبة المئوية للعينات الحساسة و المتوسطة الحساسية و المقاومة للصاد الحيوي اعتماداً على قطر دائرة التثبيط

الصاد الحيوي	نسبة العينات الحساسة	نسبة العينات متوسطة الحساسية	نسبة العينات المقاومة
Oxytetracycline(T)	%14	%21	%65
Amoxicillin(AX)	%25	%34	%32
Oxacillin(OX)	%12	%13	%75
Cefadroxil(CER)	%35	%24	%41
Pefloxacin(PEF)	%57	%20	%23
Amikacin(AK)	%100	0	0
Tetracyclin(TE)	%46	%22	%32
Ciprofloxacin(CIP)	%61	%14	%25
Norfloxacin(NOR)	%20	%9	%71
Gentamycin(CN)	%59	%8	%33
Chloramphenicol(C)	%24	%9	%65
Enrofloxacin(ENR)	%41	%23	%36
Doxycyclin(DO)	%16	%30	%45
Cephalexin(CL)	%13	%24	%63
Cephalotin(KF)	%10	%5	%85
Clindamycin(DA)	%54	%10	%36
Ampicillin(AM)	%9	%22	%69
Erythromycin(E)	%26	%13	%43

الجدول رقم(5) : يوضح عدد العينات المقاومة للصادات الحيوية

	العينات المصابة بالإيشريكية القولونية النمط (1) من عدد العينات الكلي	العينات المصابة بالإيشريكية القولونية النمط (1) المقاومة للصادات الحيوية من عدد العينات الكلي
عدد العينات	281	110
النسبة المئوية للعينات	% 33.35	% 13.12

3. نتائج تحسس جراثيم الإيشريكية القولونية E.coli للمستخلصات النباتية:

لم تبدِ المستخلصات المائية والإيترية للنباتات المدروسة أي تأثير صاد لهذه المستعمرات الجرثومية (قطر دائرة عدم النمو الجرثومي صفر).

أمَّا الخلاصة الايتانولية لقشر كل من الرمان الحلو والحامض واللفان فقد كان لها تأثير صاد لهذه المستعمرات الجرثومية كما يوضح الجدول الآتي:

الجدول رقم (6) : الفعالية المضادة التي تبديها الخلاصات الإيتيرية والمائية والايتانولية لقشور كل من الرمان الحلو والحامض واللفان على جراثيم الإيشريكية القولونية E.coli من خلال قياس أقطار دوائر تثبيط 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 الكحولية
الشاهد /5 ميكرولتر	0	0	0
قشر الرمان الحامض	0	0	24-28
قشر الرمان اللفان	0	0	10 - 14
قشر الرمان الحلو	0	0	8 - 12

نتائج الدراسة الإحصائية:

قمنا بدراسة إحصائية للنتائج التي حصلنا عليها، لحساب المتوسط الحسابي μ والانحراف المعياري σ لكل من المـــواد الآتية:

(1) الأميكاسين

الفئات	مركز الفئة x_i	تكرار الفئة f_i	$f_i . x_i$	$(m-x_i)^2$	$f_i (m-x_i)^2$
-81	18.5	37	684.5	$^2(1.83)$	123.91
19 -	19.5	62	1209	$(0.83)^2$	42.71
20 -	20.5	95	1947.5	$^2(-0.17)$	2.75
21 - 22	21.5	87	1870.5	$(-1.17)^2$	119.09
المجموع		281	5711.5		288.46

المتوسط الحسابي $m = 20.33$ **الانحراف المعياري** $s = 1.01$

(2) قشر الرمان الحامض

الفئات	مركز الفئة x_i	تكرار الفئة f_i	$f_i . x_i$	$(m-x_i)^2$	$f_i (m-x_i)^2$
4 -2	24.5	35	857.5	$^2)82(1.$	115.94
5 -2	25.5	58	1479	$^2(0.82)$	39
26 -	26.5	111	2941.5	$(-0.18)^2$	3.60
27 - 28	27.5	77	2117.5	$^2(-1.18)$	107.21
المجموع		281	7395.5		265.75

المتوسط الحسابي $m = 26.32$ **الانحراف المعياري** $s = 0.97$

(3) قشر الرمان الحلو

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	83	323	$^2(1.88)$	134.31
-9	9.5	74	446.5	$^2(0.88)$	36.40
-01	10.5	108	1134	$(-0.12)^2$	1.56
2 - 111	11.5	88	1012	$^2(-1.12)$	110.39
المجموع		281	2915.5		251.35

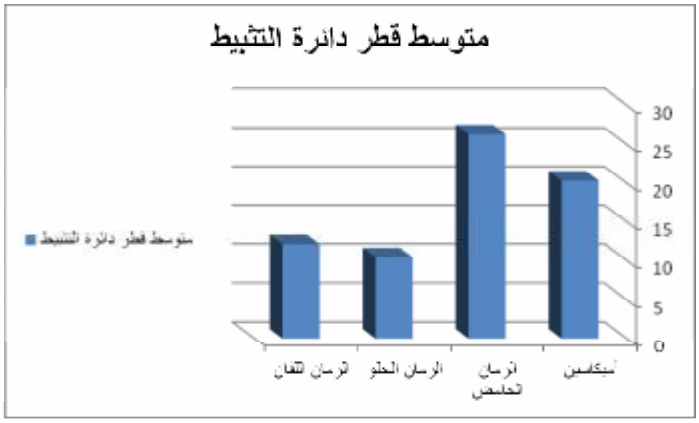
المتوسط الحسابي $m = 10.38$ **الانحراف المعياري** $s = 0.95$

(4) قشر الرمان اللفان

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	54	472.5	$^2(1.61)$	116.64
-11	11.5	79	908.5	$^2(0.61)$	29.40
12 -	12.5	97	1212.5	$(-0.39)^2$	14.75
13 - 14	13.5	60	810	$^2(-1.39)$	115.93
المجموع		281	3403.5		276.72

المتوسط الحسابي $m = 12.11$ الانحراف المعياري $s = 0.99$

المادة	أميكاسين	الرمان الحامض	الرمان الحلو	الرمان اللفان
متوسط قطر دائرة التثبيط	20.33	26.32	10.38	12.11



المناقشة:

أظهرت العديد من التقارير أن ثاني أحد أهم الجراثيم المحدثة لالتهاب الضرع عند الأبقار بعد جراثيم *Staphylococcus aureus* هي جراثيم الإيشريكية القولونية E.coli [15]. وبالنسبة إلى دراستنا كانت نسبة جراثيم الإيشريكية القولونية 62.5% من عدد العينات الكلي، وهذا ما ظهر في دراسة Mukherjee حيث كانت النسبة 87% [16]. بينما في دراسة سويدية على حليب البقر المصاب كانت نسبة الجراثيم 2.9% [17]، و 19.8% في الدراسة الانكليزية [18]، و16% في الفرنسية [19]، وفي Uruguay كانت 12.5% [20].

وبعد تنميط الإيشريكية القولونية حصلنا على الإيشريكية القولونية النمط (1) (33.35%,281/528). وفي دراسة **Wenz** حصل على أنماط متعددة من الإيشريكية القولونية بنسبة 58%(123/72) [21].

وعند دراسة اختبار التحسس على الصادات أبدت جراثيم الإيشريكية القولونية E.coli النمط (1) مقاومة تامة تقريباً للصادات الحيوية المدروسة كلّها، إذ كانت أقطار دوائر تثبيط النمو الجرثومي لهذه الصادات صفراً، وذلك اعتماداً

على أقطار دوائر تثبيط النمو الجرثومي المعتمدة في معايير NCCLS2000 [13]، في حين استطاع الأميكاسين amikacin إحداث تثبيط بقطر دائرة 24 ملم، و بالعودة لمعايير NCCLS2000 نجد أن قطر دائرة تثبيط النمو الجرثومي كان أكبر من 14 ملم، ومن ثَمَّ فإن جراثيم الإيشريكية القولونية E.coli النمط (1) كانت حساسة على الأميكاسين فقط بنسبة 13.12%. وهذا توافق مع الدراسة البرازيلية على حليب البقر المصاب بالتهاب الضرع مقاومة سلالات E.coli على الصادات الحيوية بنسب مختلفة tetracycline (92.2%),streptomycin (90.4%), nalidixic acid (88.3%), amikacin (86.5%) , cephalothin (84.8%),ceftriaxon(17.7%) [22] كما أظهرت دراسة على جراثيم E.coli بأنماط متعددة معزولة من التهاب الضرع أبدت مقاومة على الصادات الآتية neomycin , ampicillin, cloxacillin, colistin, furazolidone, و تحسساً على الصادات , Ciprofloxacin Gentamicin ,Enrofloxacin Chloramphenicol [15]. وتوافقت أيضاً مع دراسة على جراثيم E.coli بأنماط متنوعة ممرضة للجهاز البولي إذْ كان 92% منها حساسة على الصادين amikacin و nitrofurantion ، ومقاومة على الصادات الحيوية الروتينية المستخدمة للعلاج [23]. وفي دراسة على جراثيم E.coli في طعام الماشية عزلت عدة أنماط من الجرثوم و درس تأثير الصادات الحيوية فيها فشوهدت مقاومة متعددة للصادات multiresistant to ampicillin, chloramphenicol, kanamycin, streptomycin, and sulfisoxazole [24] .

تبيّن بعد عرض النتائج السابقة أنَّ قشور كل من الرمان الحلو والحامض واللفان قد تصدت بنجاح لجراثيم الإيشريكية القولونية النمط الحيوي (1) المعزولة من حليب الأبقار المصابات بالتهاب الضرع التي عجزت الصادات الحيوية المدروسة والمذكورة في متن هذا البحث في القضاء عليها. فقد أبدت جراثيم الإيشريكية القولونية E.coli النمط الحيوي (1) مقاومة على المستخلصات المائية والإيترية المحضرة من قشور كل من الرمان الحلو والحامض واللفان. وهذا تعارض مع دراسة Orak وزملائه التي أكدت أن الخلاصة المائية لعدة أنواع من قشور الرمان تملك فعالية قوية في التأثير المضاد للجراثيم المأخوذة من عدوى الجهاز الهضمي البشري [25,26].و الدراسة التايلندية أكدت الفعالية القوية للخلاصة المائية على جراثيم *Escherichia coli O175:H7* التي تحدث نزفاً معدياً عند البشر [27].

في حين حدث العكس مع المستخلصات الكحولية عندما أظهرت فعالية في التأثير الصاد لجراثيم الإيشريكية القولونية E.coli النمط الحيوي (1)، و عند مقارنة تاثير المستخلصات الكحولية النباتية بدلالة قطر دائرة عدم النمو الجرثومي للأميكاسين الصاد الوحيد الذي أبدى تأثيراً مضاداً الصاد الحيوي الوحيد الذي أبدى تأثيراً مضاداً للجرثوم والذي تجلى بدائرة ذات قطر تثبيط (20 ملم) ، لوحظ أن الخلاصة الإيتانولية لقشر الرمان الحامض كان لها التأثير الأقوى في تثبيط نمو جراثيم الايشركية القولونية نمط (1). وتوافقت دراستنا مع الدراسة التركية لخلاصة الغلاف الخارجي لستة أصناف من الرمان في عدة جراثيم ، وكان لها التأثير الأقوى على جراثيم E.coli [28]. كما توافقت مع الدراسة التايلندية التي أظهرت تثبيط الخلاصة الإيتانولية لعدة أنماط من E.coli [26].

ومع أن تأثير هذه القشور لم يكن متماثلاً في شدته، فقد كان للخلاصة الأيتانولية لقشر الرمان الحامض التأثير الأعظم في إحداث التأثير المضاد للجراثيم مقارنة بالأميكاسين amikacin بدلالة قطر التثبيط (26 ملم). في حين احتلت قشور الرمان اللفان المرتبة الثانية من حيث التأثير والفعالية بدائرة ذات قطر تثبيط (12 ملم). أمَّا

بالنسبة إلى قشور الرمان الحلو فقد كان لها المرتبة الثالثة بدائرة ذات قطر تثبيط (10 ملم).

ومن ثَمَّ نستنتج أن جراثيم الإيشريكية القولونية E.coli النمط (1) كانت حساسة للمستخلصات الكحولية بشكل أفضل من الأميكاسين.

الاستنتاج:

نجحت المستخلصات الإيتانولية لقشور الضروب المختلفة من نبات الرمان في إحداث التأثير الصاد والفعال في القضاء على جراثيم الإيشريكية القولونية النمط الحيوي (1) التي سببت حالة التهاب الضرع عند الأبقار، في حين أخفقت العديد من الصادات الحيوية المعروفة في القضاء على هذه الجراثيم. وانطلاقاً مما سبق نوصي : بإجراء بحوث مشابهة لتقصي تأثير نبات الرمان بضروبه المختلفة في الأنواع الجرثومية الأخرى ولاسيَّما التي تبدي مقاومة للصادات الحيوية.

كما نفضل إجراء بحوث علمية تكشف عن المكونات الفعَّالة الموجودة في الرمان الحامض التي أبدت هذا التأثير الفعال والتي ميّزته عن أنواع الرمان الأخرى، وتحديد تركيزها لنتمكن من إيجاد الحلول العلاجية المناسبة والفعالة في علاج الأمراض الجرثومية التي قد تعجز الصادات الحيوية عن معالجتها. وأخيراً نأمل أن يتحقق طموحنا في إمكانية تطبيق نتائج هذه الدراسة للإسهام في علاج الدواجن والأبقار في حال تشخيص إصابتها بهذا النمط من الجراثيم للارتقاء بمستوى الصحة العامة وللحفاظ عل الثروة الحيوانية التي تشكل رافداً مهماً من روافد الاقتصاد في بلدنا.

شكر: نشكر العاملين في المخبر المركزي البيطري لتعاونهم ومساعدتهم.

References

1. عبد الصمد عطية. الرمان، منشورات وزارة الزراعة(النشرة رقم199)، مديرية الإرشاد الزراعي، قسم الإعلام.

2. 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.

3. شاهين يوسف. أهم أمراض الدواجن،. منشورات وزارة الزراعة(النشرة رقم421)

4. مديرية الإرشاد الزراعي، قسم الإعلام.1979.

5. خالد خالد.أمراض لأبقار والوقاية منها.منشورات وزارة الزراعة(النشرة رقم234)،مديرية الارشاد الزراعي،قسم الاعلام1979.

6. البني تيسير.ذراري الإشريكية القولونية المقاومة للعديد من المضادات المعزولة من إنتانات السبيل البولي لدى مرضى العيادات الطبية.مجلة التشخيص المخبري.المجلد 5 ، العدد 5 ، شوال 1430 - تشرين الأول (أكتوبر) 2009

7. Nair R ، Chanda S .Antibacterial Activity Of Punica Granatum In Different Solvents. Indian Journal of Pharmaceutical science. Vol.67(2) ، 239-243، 2005

8. Ahmet D, Ozgen M, Kenan S.Antimicrobial Activity of Six Pomegranate (Punica granatum L.) Varieties and Their Relation to Some of Their Pomological and Phytonutrient Characteristics. Molecules 2009، 14(5)، 1808-1817

9. Jang-Gi Choi، Ok-Hwa Kang، Young-Seob Lee، In Vitro and In Vivo Antibacterial Activity of Punica granatum Peel Ethanol Extract against Salmonella. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.Vol.8. 2011

10.Radulovic N ،Jovanovic V،Stojanovic G.Screening of in vitro anti microbial and anti oxidant activity of nine hypericum species from the Balkan Food Chimistry،130:15-21،2007

11. شندالة محمد، محمد بشار،الدباغ سمية.التأثيرات المضادة للفطريات في المختبر لخلاصة نبات العرن.المجلة العربية للعلوم الصيدلية.المجلد 4 .العدد5 .57-62.2011.

12. آغا محمد عصام حسن.الفعالية المضادة لنبات الزيزفون من الفصيلة الزيزفونية الذي ينمو في سورية.مجلة جامعة دمشق –المجلد الرابع و العشرون – العدد الأول 243 –2008.253

13. ميخائيل عبيد :علم الجراثيم.الطبعة الرابعة.منشورات جامعة دمشق120-122-2000.

14. National Committee For Clinical Laboratory Standarads. Performance Standards For Antimicrobial Disk Susceptibility testing.ed4,NCCLS,Villanova,PA,USA,1991.

15. الرفاعي ابراهيم، العمر أنور.علم الأحياء الدقيقة الخـــاص .جامعـــة البعـــث – كليـــة الطـــب البيطـــري .106-2007.107.

16. Sumathi B.R, Amitha R. Gomes and G. Krishnappa.Antibiogram profile based dendrogram analysis of Escherichia coli serotypes isolated from bovine mastitis. Veterinary World, Vol.1(2): 37-39.

17.Mukherjee S, Chaki S, Das S, Sen S, Dutta SK, Dastidar SG.
Distinct synergistic action of piperacillin and methylglyoxal against Pseudomonas aeruginosa.Indian J Exp Biol. 2011;49(7):547-51.

18.Persson Y, Nyman AK, Grönlund-Andersson U. Etiology and antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of subclinical mastitis in dairy cows in Sweden. Acta Veterinaria Scandinavica 2011, 53:36

19.Bradley AJ, Leach KA, Breen JE, Green LE, Green MJ.Survey of the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in England and Wales. Vet Rec. 2007 Feb 24;160(8):253-7.

20.Botrel M A, Haenni M, Morignat E. Distribution and Antimicrobial Resistance of Clinical and Subclinical Mastitis Pathogens in Dairy Cows in Rhône-Alpes, France. Foodborne Pathogens and Disease. 2010, 7(5): 479-487

21.Gianneechini R,Concha C,Rivero R.Occurrence of Clinical and Sub-Clinical Mastitis in Dairy Herds in the West Littoral Region in Uruguay. Acta Veterinaria Scandinavica 2002, 43:221-230

22.Wenz J. R,Barrington G. M,Garry F. B.Escherichia coli Isolates' Serotypes, Genotypes, and Virulence Genes and Clinical Coliform Mastitis Severity. J. Dairy Sci. 89:3408–3412. 2006

23.Rangel P, Marin J M.Analysis of Escherichia coli isolated from bovine mastitic milk. Pesq. Vet. Bras. vol.29 no.5 Rio de Janeiro May 2009

24.Kausar1 Y,Chunchanur S K, Nadagir S D.Virulence factors, Serotypes and Antimicrobial Suspectibility Pattern of Escherichia coli in Urinary Tract Infections. Al Ame en J Med S c i (2 00 9)2 (1) :4 7 -5 1

25.Diarra MS, Giguère K, Malouin F.Genotype, serotype, and antibiotic resistance of sorbitol-negative Escherichia coli isolates from feedlot cattle. J Food Prot. 2009 Jan;72(1):28-36.

26.Orak H.H, Demirci.A.S,Gümüşt.Antibacterial and antifungal activity of pomegranate (punica granatum l.cv.) peel. ejeafche, 10 (3), 2011.p1958-1969.

27.Voravuthikunchai S.P. Sririrak T.Limsuwn S. Inhibitory effects of active compounds from punica granatum pericarp on verocytotoxine production by enterohemorrhagic Escherichia coli O175:H7. Journal of health science,51(5) 2005.p590-596.

28.Voravuthikunchai S,Lortheeranuwat A,Jeeju A. Effective medicinal plants against enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7. Journal of Ethnopharmacology 94 .2004. 49–54.

29.Duman A.D, Ozgen M, Dayisoylu K.S. Antimicrobial Activity of Six Pomegranate (Punica granatum L.) Varieties and Their Relation to Some of Their Pomological and Phytonutrient Characteristics. Molecules 2009, 14, 1808-1817.

تاريخ ورود البحث إلى مجلة جامعة دمشق 2011/6/19.

تاريخ قبوله للنشر 2011/9/14.