Effect of *Amaranthus caudatus* and *Pimpinella anisum* extracts on the bacteria isolated from liver of chicken

دراسة تأثير مستخلص دم العاشق والينسون على البكتريا المعزولة من أكباد فروج اللحم لحالات حقلية

حيدر طعمه ألكعبي
جامعة الكوفة / كلية الطب البيطري

نبراس يحيى عبد الله
جامعة الكوفة / كلية العلوم

عهود عقيد راضي
جامعة الكوفة / كلية التمريض

الخلاصة

أستخدم في الدراسة المحلية 20 نموذج من اكباد دجاج فروج اللحم المصاب حقليا وباعمار مختلفة من حقول محافظة النجف الاشرف خلال الفترة الممتدة بين شهر نيسان الى شهر تموز 2010و قد تم عزل البكتريا التالية :

التالية وبالنسب *E.coli*, *Staphylococcus aureus* ,*Klebsiella pneumonia*,*Proteus mirabilis* 45% ,25%, 20% ,10% على التوالي . تم اختيار بكتريا *E.coli*و*Klebsiella pneumonia* كنموذجين للبكتريا السالبة لدراسة تاثير مستخلص نبات دم العاشق وبذور نبات الينسون على البكتريا .

أظهرت نتائج الدراسة أن المركبات القلوانية لنبات دم العاشق كانت أفضل تأثيراً من المركبات الأخرى (الفينولية والقلويدات الرباعية والمستخلص الخام) في تثبيط نمو البكتريا إذ لم تعطي هذه المركبات أي تأثير مضاد في نمو البكتريا باستثناء المركبات القلوانية , كما أظهرت نتائج الدراسة أن المركبات القلوانية والفينولية والقلويدات الرباعية والمستخلص الخام لنبات الينسون لم تعطي أي منها فعالية تضادية لنمو البكتريا , كما أظهرت نتائج الدراسة أن بكتريا *E.coli* كانت أكثر تحسساً للمركبات القلوانية من بكتريا *Klebsiella pneumonia* ,كما ظهر من خلال الدراسة أن قيمة أقل تركيز مثبط لنمو البكتريا هو 25 ملغم /مل لبكتريا *E.coli* .

Abstract

Used in the current study , 20(samples of liers broiler) models of chicken livers chicken meat infected untreated control of different ages , from the fields the province of najaf during the period between April to July 2010 was to isolate bacteria *E.coli , Staph.aureus, Klebsiella pneumonia* &*Proteus mirabilis* in the following proportions 45%, 25%, 20% and 10% respectively. Were selected bacteria *Klebsiella pneumonia & E.coli* bacteria as models to study the negative impact of plant extract blood adoring and anise seed on the bacteria.

The study showed that the vehicles Algulwanip to plant blood lover more effective than the phenolic compounds and alkaloids Quartet and extract crude inhibit the growth of bacteria with the exception of vehicles Algulwanip, while vehicles Algulwanip and phenolic and the alkaloidal Quartet and extract the raw seeds of star anise did not give any antagonistic effective for the growth of bacteria . The study also showed that the *E.coli* bacteria were more sensitive to compounds Algulwanip of bacteria *Klebsiella Pneumonia* where the summit was the lowest concentration that lowest concentration that inhibits the growth of bacteria was 25mg\mlofthebacteriaE.coli.

المقدمة

يعد الكبد من أكثر الأهداف عرضة للإصابة البكترية سواء كانت السالبة او الموجبة لصبغة كرام اذ تسبب التهاب الكبد وتعد أجناس العائلة المعوية من أكثر العزلات شيوعا في الإصابات البكتيرية ومن ضمنها بكتريا *E.coli* و*Klebsiella* أذ تسبب التهاب الكبد الذي يؤدي إلى تضخم حجم الكبد إلى حد كبير واحتقانه (1)

بكتريا *E.coli* هي بكتريا سالبة لصبغة الجرام و هي موجودة بصورة طبيعية في الأمعاء عند الطيور و بقية الحيوانات الأخرى . و رغم أن معظم عترات هذه البكتريا غير ممرضة داخل الجسم إلا انه يوجد عدد محدد خارج الأمعاء قد يؤدي إلى إحداث إصابة و معظم العترات الممرضة هي عترات مصلية (serotype)01 و ال 02 و 078 و تكمن خطورة هذه البكتريا في انها تقاوم عمليات البلعمة phagocytosisو تستنزف الحديد في أجهزة الجسم و تفرز سموم تعرف بسم Colicins ، و هو يلتصق بالغشاء المخاطي للجهاز التنفسي . الأعداد الكبيرة والممرضة من البكتريا تتواجد في الحظائر الموبئة و تنتقل العدوى عن طريق الفضلات أو في المفاقس عن طريق البيوض المصابة وتسبب بكتريا *E.coli* عدد من الاصابات لاكباد الدواجن مثل التليف الصلي لالتهاب الكبد الاولي الناشيء عن تعفن الدم ببكتريا *E.coli* كذلك احتقان الكبد والذي يكون المظهر الاولي لتعفن الدم ببكتريا *E.coli* (2)

أن ظهور وانتشار المقاومة للمضادات الحيوية بين الجراثيم الموجبة والسالبة لصبغة كرام دفع الباحثين المهتمين بمجال العلاج إلى اكتشاف بدائل علاجية للمضادت الحيوية ومن هذه البدائل النباتات الطبية وما تحتويها من مكونات فعاله مضادة للجراثيم مثل الفينولات phenols والقلويدات Alkaloids والفلافونويدات Flavonoids والزيوت الأساسية Essential oils والراتنجات والعفصيات وغيرها من المواد الطبيعية التي أكدت جدارتها في علاج الأخماج الجرثومية فضلا عن أنه لا توجد بحوث تؤكد أمكانية الجراثيم على اكتساب صفة المقاومة لمثل هذه المكونات الفعالة (3). اتجهت الدراسات في السنوات الأخيرة إلى التحري عن التأثير الحياتي للنباتات الطبية في الجراثيم المرضية لاسيما السلالات ذات المقاومة المتعددة Multiple drugs resistance مثل جرثومة *Klebsiella* , وفي هذه الدراسة أستخدم نبات الينسون ودم العاشق لما يمتلكانه من خواص علاجية يستعمل نبات الينسون في معالجة نزلات البرد والزكام والحمى والسعال وكمضاد للتشنجات كما يقضي على التهاب الفم والبلعوم لذلك يستعمل زيت الينسون في غسول ومعاجين الأسنان , ويمتاز الينسون بقدرته على قتل المكروبات وتعود هذه الفعالية إلى احتوائه على مادة Anetol (4) . كما يتميز الينسون بعدم ملاحظة أي أعراض جانبية عند استخدامه (5),اما بالنسبة لنبات دم العاشق فانه يمتلك فعالية مضادة لنمو المكروبات وتعود الخصائص المضادة لنمو الكروبات الى قدرته على تخليق مجموعة من المركبات الكيميائية والتي تعد نواتج ايضية ثانوية والتي تشتمل على Tannins,Phlobatanins, alkakoid, Coumarins, Cardicglycosides,Phenylpropanes, Flavonoids, Isoflavonoids (6و7) ,ويسيتعمل نبات دم العاشق في علاج حالات الاسهال الدموي وكذلك في حالات الحيض المفرط او الزائد (8) .

وهدفت الدراسة إلى تشخيص البكتريا المعزولة من أكباد فروج اللحم لإصابات حقلية مختلفة ,كما هدفت الدراسة الى فصل المركبات القلوانية والفينولية والقلويدات الرباعية من المستخلص الخام وكذلك دراسة تاثير المركبات القلوانية والفينولية والقلويدات الرباعية والمستخلص الخام لنباتي دم العاشق والينسون في نمو بكتريا *E.coli* و *Klebsiella pneumonia*. وتحديد قيمة التركيز المثبط الأدنى MIC (Minimum inhibition concentration)والتركيز القاتل الأدنى MBC (Minimum bactericidal concentration)للمستخلصات التي أعطت فعالية تضادية.

طرائق العمل :-

عزل وتشخيص البكتريا:

تم عزل البكتريا من الكبد عن طريق تعقيم سطح الكبد باستخدام spatula المسخنة على اللهب بعدها تم اخذ عينة من الكبد من المكان المعقم باستخدام swab معقم ومن ثم زراعتها على وسط اكار الدم blood agar و وسط الماكونكي اكار MacConckey agar وبعد عملية التحضين بحرارة 37 م^{0} تم اجراء الفحوصات الكيميائية الحيوية لتشخيص البكتريا حسب طريقة (9).

جمع العينات النباتية :-

تم جمع عينات نبات دم العاشق (الجزء الخضري) من الحدائق المنزلية ثم غسلت بالماء للتخلص من الأتربة العالقة بها بعد ذلك تركت لتجف بدرجة حرارة الغرفة ثم طحنت باستخدام المطحنة الكهربائية وحفظ المسحوق في اكيس نظيفة في الثلاجة إلى وقت الاستعمال .إما عينات نبات الينسون تم جلبها من الأسواق المحلية ثم طحنت وحفظت في اكياس نظيفة في الثلاجة.

استخلاص المركبات الفعالة

تم اخذ 10 غم من المسحوق ووضعت في كشتبان ورقيThumble ثم وضعت في جهاز الاستخلاص saxholate وأضيف إليها 100 مل أيثانول 80% لمدة 24 ساعة بعدها تم تركيز المستخلص بالمبخر الدوار rotary evaporator وتركت لتجف بأجواء المختبر وقد كانت كمية المستخلص الناتج في كل عملية استخلاص 1,5 -2 غرام (10).

فصل المركبات الفعالة القلوانية والفينولية

اخذ 5غم من المستخلص الجاف وأضيف إليه 30 مل من حامض الكبريتيك H_2So_4 تركيز 2% ووضع في قمع الفصل واستخلص باستخدام الكلوروفورم (بقدر حجم المستخلص +الحامض) حيث فصل إلى طبقتين ثم أخذت الطبقة السفلى التي تحتوي على الفينولات وجففت ,ثم أضيفO Hهيدروكسيد الامونيوم NH_4 إلى المستخلص الباقي إلى إن أصبح الاس الهيدروجينيpH يساوي 10 وأعيد إلى قمع الفصل واستخلص بالكلوروفورم وأيضا أخذت الطبقة السفلى التي تحتوي على المركبات القلوانية وتركت لتجف إما الطبقة المائية العليا فقد أضيف إليها الميثانول90% لاستخلاص المركبات القلوانية الرباعية و N-oxides (11).

الكشف عن المركبات الفينولية والقلوانية :-

تم الكشف عن المركبات الفينولية باستخدام كلوريد الحديديك $Fecl_3$ أما المركبات القلوانية فكشف عنها باستخدام كاشف مايرMayer reagent ودراجندروف Dragen-Droff وكاشف واكنر Wagner – reagent (11 و12).

تحضير المحاليل القياسية للمستخلصات النباتية :

تم تحضير المحلول الأساسي Stock solution للمستخلص الفينولي وذلك بإذابة 1 غم من التمالة الجافة في 10 مل ماء مقطر ليصبح تركيز المحاليل القياسية 100 ملغم /مل (13).

دراسة تأثير المستخلصات النباتية المدروسة في نمو البكتريا بطريقة الانتشار بالأكار

تم إتباع طريقة الانتشار بالأكار بواسطة الحفر well (14) في اختبار حساسية البكتريا للمستخلص النباتي , حيث تم عمل خمس حفر بأقطار متساوية في وسط مولر هنتون الصلب وبقطر 6 ملم بواسطة الثاقب الفليني وأضيف 0.1 من المستخلص لكل حفرة سبقها نشر 0.1 مل من العالق البكتيري على الوسط ومن ثم تركت الأطباق مدة من الزمن لانتشار محاليل النباتات في الوسط ألزرعي ثم حضنت بحرارة 37 م^o لمدة 24 ساعة بعدها قرئت النتيجة بقياس قطر منطقة التثبيط (Inhibition zone) بواسطة المسطرة .

تحديد قيمة التركيز المثبط الأدنى MIC والتركيز القاتل الأدنى MBC :

تم تحضير سلسلة من التراكيزوهي (3.1 , 6.25 , 12.5 , 25, 50 , 100) ملغم / مل للمستخلصات ذات الفعالية المضادة في نمو البكتريا وذلك بإضافة 2 غم من التمالة الجافة للمستخلصات والتي أعطت فعالية تثبيطية إلى 10 مل من الماء المقطر ثم اخذ 0.5 مل من هذا المحلول وأضيف إلى أنبوبة معقمة حاوية على 5 مل من الوسط ألزرعي السائل Nutrient broth ونقل 2.5 مل من المزيج (الوسط ألزرعي +المستخلص) إلى أنبوبة أخرى حاوية على 2.5 مل من المرق المغذي وهكذا إلى الأنبوب السادس على التوالي . بعدها لقحت الأنابيب بواسطة loop full من العالق البكتيري لبكتريا *E.coli* و *Klebsiella pneumonia*. المقارن بأنبوبة ماكفرلاند 0.5 مل وفضلا عن ذلك تم تحضير أنبوبتي سيطرة الأول مشتمل على مستخلص فقط بدون عالق بكتيري والأخر يحوي العالق البكتيري بدون مستخلص , وكررت هذه العملية للمستخلصات التي لها تأثير مضاد في نمو بكتيريا الاختبار. بعدها حضنت انابيب الاختبار لمدة 24 ساعة بحرارة 37 م^o وتم تسجيل نتائج قيمة التركيز المثبط الادنى **MIC** على أساس ظهور العكرة Turbidity نظرياً وعمليا وذلك بزرع من كل الأنابيب التي لم تظهر فيها عكرة (نمو بكتيري) على أطباق معقمة حاوية على الوسط المغذي Nutrient agar الصلب وحضنت بحرارة 37 م^o لمدة 24 ساعة للتأكد من التركيز الذي لم يحدث فيه نمو بكتيري وعد التركيز الذي يقضي على البكتيريا نهائياً هو **MBC** (15).

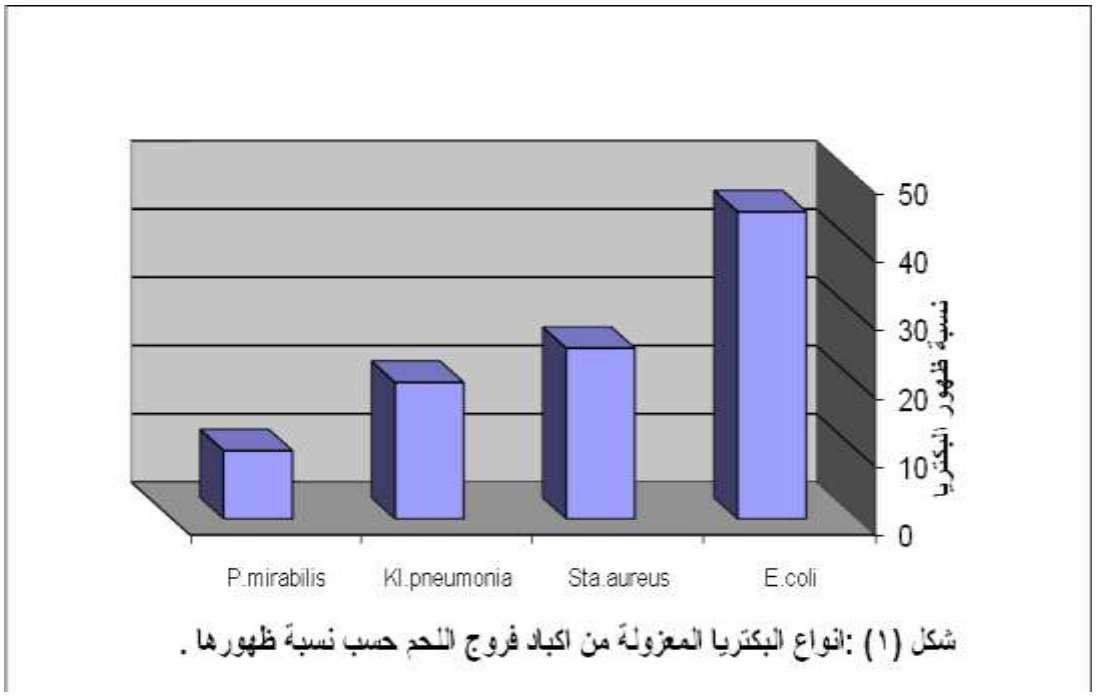
النتائج والمناقشة

أظهرت نتائج الدراسة ان البكتريا المعزولة من اكباد فروج اللحم هي *E.coli* و *Staph.aureu* *Klebsiella pneumonia,* و *Proteus mirabilis* بالنسب التالية 45%, 25%, 20%, 10% على التوالي كما في شكل -1- . ان ظهور بكتريا E.coli بالدرجة الاولى بالنسب المعزولة يعود الى تواجد الاعداد الكبيرة من البكتريا في الحظائر الموبئة والتي تنقل العدوى عن طريق الفضلات او في المفاقس عن طريق البيوض المصابة(2).

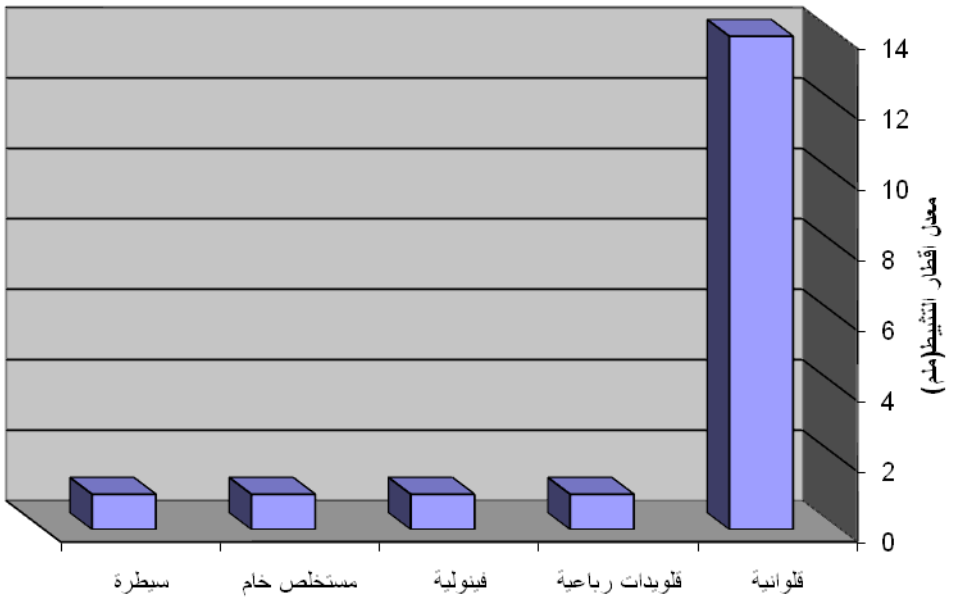
كما تبين من خلال الدراسة ان المركبات الفعالة لنبات الينسون والمستخلصه بالايثانول(الفينولية والقلويدات الرباعية وحتى المستخلص الخام) لم تعطي أي فعالية مضادة لنمو البكتريا وهذا يتفق مع ما اشار اليه (16و17) في كون المستخلصات المائيه والمركبات الفعالة والمستخلصة بالميثانول والاسيتون لنبات الينسون فقط تعطي فعاليه تثبيطيه لنمو البكتريا كذلك يتفق مع ما اشار اليه (18) في كون المستخلص الميثانولي والزيت الاساس تعطي فعالية في تثبيط نمو البكتريا وخصوصا عند مزجها مع بعضها تعطي حالة تازر واضحة اما بقية المستخلصات الاخرى فلا تعطي أي فعالية مضادة لنمو البكتريا ,ويتضح من شكل (2) ان

المركبات القلوانية لنبات دم العاشق فقط أعطت تأثيراً مثبطاً لنمو البكتريا اذ بلغ معدل قطر التثبيط البكتيري 14 ملم حيث تعمل القلويدات الى التداخل مع التفاعلات الأيضية اللازمة لنمو البكتريا في حين لم تعطي باقي المركبات الفينولية والقلويدات الرباعية والمستخلص الخام أي فعالية مضادة لنمو البكتريا وهذا يتفق مع ما اشار اليه (19) في كون المركبات الفعاله لنبات دم العاشق تمتلك تاثير كبير في تثبيط نمو الفطريات اكثر من البكتريا كذلك بالنسبه للبكتريا فان تاثيرها على البكتريا الموجبه لصبغة كرام افضل من تاثيرها على البكتريا السالبه اذ ان تاثيرها على البكتريا السالبه يكون ضعيف ومحدود ,كما يتفق مع ما اشار اليه (20) في كون المركبات المستخلصة بالمذيبات العضوية كالهكسان والميثانول وخلات الاثل اكثر فاعلية من مستخلص الايثانول في تثبيط نمو البكتريا. أما في شكل (3) فقد تبين ان بكتريا *E.coli* *كانت اكثر تحسساً* من بكتريا *Klebsiella* *اذ بلغ معدل* قطر التثبيط 17 ملم وللثانية 11 ملم.

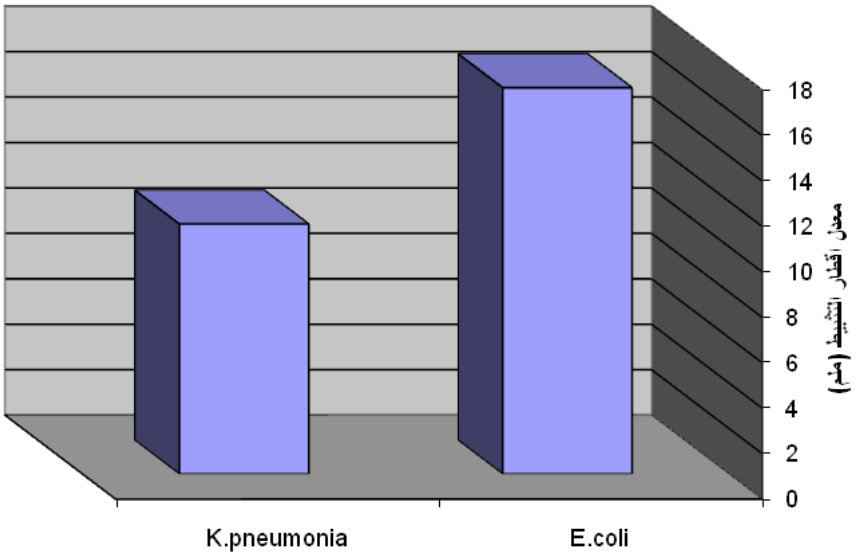
وقد تبين من خلال الدراسة الحالية أن اقل تركيز مثبط لنمو البكتريا **MIC** يعتمد على نوع البكتريا حيث كان التركيز المثبط لنمو بكتريا *E.coli* هو 25 ملغم / مل وقيمة التركيز القاتل الادنى هي 50 ملغم/ مل اما بالنسبة لبكتريا *Klebsiella* فقد كان التركيز المثبط للنمو 50 ملغم/ مل, بينما التركيز القاتل الادنى هو 100ملغم / مل كما موضح في جدول رقم (1) .



شكل (١) :انواع البكتريا المعزولة من اكباد فروج اللحم حسب نسبة ظهورها .



شكل(٢): تاثير المركبات الفعالة لنبات دم العاشق في نمو البكتريا .



شكل(٣): تاثير المركبات القلوانية في نمو البكتريا.

جدول (1) : قيمة التركيز المثبط الادنى MIC و التركيز القاتل الادنى MBC للمركبات القلوانية لنبات دم العاشق

التركيز (ملغم/مل) / نوع البكتريا	3.10	6.25	12.5	25	50	100
E.coli	+	+	+	-	-	-
Klebsiella pneumonia	+	+	+	+	-	-

+ : وجود نمو

- : عدم وجود نمو

المصادر:

1--Robert,E.S.;Drury,R.R. and David,N.P. (2003). Pathology of pet and aviary birds p:74-76.

2--Ivan,D.(2010).Histopathology and Cytology of Poultry Diseases p:5-6.

3-Essawi,T. and Srour,M.(2000).Screening of some Palestinian medicinal plants for Antibacterial activity.J.Ethnopharmacol..70:343-349.

4- حسين , فوزي طه (1981) . النباتات الطبية زراعتها ومكوناتها . دار المريخ للنشر , الرياض.

5-- ozbek, H.; Mustafa, o. ;Abdurrahman o. and Ebubekir.(2004). Determination of lethal dose volatial and fixed oil of several plants. Austrian J. of Med. 1:4 -6.

6-Matasyoh ,J.C.; Maiyo, Z.C.; Ngure, R.M.and Chepkorir, R. (2009). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of*Coriandrum sativum*. J. Food Chem. 113:526-529.

7-Evarando, L.S.; Oliveira, L.E.; Freire, L.K.R.and Sousa, P.C. (2005). Inhibitory action of some essential oils and phytochemicals on growth of various moulds isolated from foods. Braz. Arch. Biol. Technol. 48: 234-241.

8-He, H.P.; Corke, H.and Cai, J.G. (2003). Supercritical carbon dioxide extraction of oil and squalene from *Amaranthus* Grain. J. Agric. Food Chem. 51: 7921-7925.

9-MacFaddin,J.F.(2000).Biochemical test for identification of Medical Bacteria. 2nd ed. William and Wilkins. Comp. Baltimore,p.490.

10-Ladd,T.L.;Jacobson,M.and Buriff ,C.R.(1978).J.Econ Entorol.71:810-813.

11- Harborne, J.B.(1984). Photochemical Methods. Chapman and Hall, London, p.6.

12-Antherden,L.M.(1969). Bentley and Drivers .Text book of Pharmaceutical Chemistry .8th ed .Oxford .London .Oxford Univ. Press.

13-Gennaro,A.R.(2001).Remington :The Science and Pharmacology Practice. 20thed. A Walters, Kluwer, Co .Philadelphia USA.Ch.87:1501-1555.

14- Egorove , N.S.(1985). Antibiotics Scientific Approach. Mir publishers. Moscow

15- Working party the British society for antimicrobial chemotherapy (1991).A guide to antibiotic sensitivity testing. J. Ant.l Chemothe. **27**, (suppl.D): 1 – 50.

16-Kthar,A.A. ;Deshmukh,A.A. and Bhonsle,A.V.(2010). InVitro Antibacterial Activity of *Pimpinlla anisum* fruit Extracts Against Some Pathogenic Bacteria. Veterinary World, 9:272-274.

17-Anjana,S.;Virendra,K.;Sapna,R.;Padmini,R. andRani,V.(2010) International J. of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.Issue 3:123-127.

18-Firas,A.A.(2007). Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. J .of Ethnopharmacology .Issue 3: 403-406.

19-Brink ,M. and Belay ,G. (2006). Plant Resources of Tropical Africa.Cereals and Pulses .p. 18

20-Maiyo,Z.C.;Ngure,R.M.;Matasyoh,J.C.and Chep,K.(2010). Phytochemical constituents and antimicrobial activity of leaf extracts of three *Amaranthus* plant species . African J. of Biotechnology. 21: p. 3178-3182.