

## تأثير تراكيز مختلفة من مستخلصي الزنجبيل (المائي والكحولي) في تثبيط جرثومة *Salmonella typhimurium* المعزولة من بعض حالات الإسهال في العجول مختبريا

إسراء فاضل حسين

كلية الزراعة/ جامعة بغداد

### الخلاصة

هدفت هذه الدراسة الى معرفة تأثير كل من مستخلصي جذور نبات الزنجبيل المطحونة (المائي والكحولي) وبثلاث تراكيز مختلفة لكل منهما في تثبيط نمو جرثومة *Salmonella typhimurium* مختبريا والمعزولة من بعض حالات الإسهال في العجول، ولتحقيق هذا الهدف فقد تضمنت هذه الدراسة محورين هما: المحور الأول: عزل وتشخيص بكتريا *Salmonella typhimurium* من حالات إسهال في العجول. إذ تم لهذا الغرض جمع خمس عينات براز إسهالي من عجول مصابة بالإسهال من الحقل الحيواني التابع لكلية الزراعة جامعة بغداد. إذ زرعت هذه العينات على أوساط انتخابية شملت وسط السالمونيلا- شيكلا الصلب ووسط الزايلوز لايسين ديوكسي كولايت الصلب XLD ووسط الماكونكي الصلب ثم حضنت الأطباق على درجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة واعتمادا على الصفات الزرعوية والفحوصات المجهرية للخلايا المصبغة بصبغة كرام وبعد اجراء عدد من الفحوصات الكيموحيوية أمكن عزل وتشخيص عزلة واحدة تعود لبكتريا *Salmonella typhimurium* من حالات الإسهال في العجول. المحور الثاني: تضمن دراسة الفعالية التثبيطية لمستخلصي جذور نبات الزنجبيل (المائي والكحولي) وبثلاث تراكيز مختلفة لكل منهما (0.25، 0.5، 1 غم/مل)، إذ اظهرت النتائج تفوق مستخلص جذور نبات الزنجبيل الكحولي وبتراكيزه الثلاث في قدرته التثبيطية حيث وصل فيه قطر التثبيط الى (4-10-12) ملم على التوالي، في حين لم يظهر المستخلص المائي وبتراكيزه الثلاث أي قدرة تثبيطية تجاه جرثومة *Salmonella typhimurium*.

## Effect of different concentrations of different extracts of Ginger (Aqueous and Alcoholic) in the inhibition of *Salmonella typhimurium* isolated from some cases of diarrhea in calves *in vitro*

E. F. Hussein

College of Agriculture\ University of Baghdad

### Absterict

This study was carried out to investigate the effect of both extracts of ginger (aqueous and alcoholic) in three different concentrations in the inhibition of *Salmonella typhimurium* isolated from some cases of diarrhea in calves *in vitro*. To achieve this aim this study included two main aspects as follow: (1. Isolation and identification of *Salmonella typhimurium* from diarrhea infection of calves. For this purpose, 5 samples of faeces from infected calves were collected from animal field of Agriculture College, University of Baghdad. These faecal samples were inoculated on aselected media including solid salmonella-shigella medium, xylose lysine deoxy cholate XLD medium and solid MacConkey medium then incubated at 37c for 24 h. According to the growth features and the microscopical examination of gram stained cells and some biochemical tests only one isolate of *Salmonella typhimurium* from the diarrhea cases of calves was isolated. (2. The inhibitory effects of both extracts of ginger (aqueous and alcoholic) in three different concentrations for each (0.25, 0.5 and 1.0 g/ml) against *Salmonella typhimurium* bacteria. Results showed that the three different concentratins of alcoholic ginger extract have strong inhibitory effect on growth of *Salmonella typhimurium* bacteria the dimeter of inhibited zone was (4-10-12) mm respectively, while the three concentrations of aqueous extract didn't showed any inhibitory effect against this bacteria.

### المقدمة

الزنجبيل *Zingiben officinale* نبات يعود للعائلة الزنجبالية وهو أصلا من نباتات المناطق الحارة. يحتوي الزنجبيل على زيت طيار له رائحة نفاذة وطعم لاذع، يكثر في بلاد الهند الشرقية والفلبين والصين وسيريلانكا والمكسيك (1). يمتلك الزنجبيل تأثيرات جيدة ضد البكتريا وبعض الطفيليات حيث إن الدراسات أظهرت إن مكوناته النشطة (وهي مجموعة Gingerols) والتي تحتوي على مركب gingenol وهو المركب الذي يعزى إليه الطعم الحار بالإضافة إلى مجموعة Shogaols والتي من أهم مركباتها shogaol إضافة إلى العديد من المكونات الأخرى تقوم بتنشيط تكاثر ونمو أنواع من البكتريا منها *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* وغيرها (2). فضلا عن إن المستخلص الكحولي لجذور الزنجبيل أظهر قدرة على تنشيط بعض أنواع الفطريات ومنها *Aspergillus*، كما استخدم المستخلص الكحولي ضد الطفيليات ومنها الاسكارس التي تصيب الإنسان (3). يعد مرض Salmonellosis من الأمراض المهمة صحيا واقتصاديا وهو من الأمراض المشتركة التي يصاب بها الإنسان والحيوان، حيث يصيب هذا المرض فصائل الحيوانات كافة مثل الأبقار والأغنام والخنزير والكلاب والقطط كما عزلت الجرثومة من الحيوانات البرية والداجنة والطيور (4). تكمن أهمية المرض في الإنسان من حيث المشاكل الصحية التي يسببها المرض إذ تشير التقارير الى وجود 120 مليون حالة إصابة في العالم منها 707 مليون حالة في آسيا. أما في الحيوانات فتكمن الأهمية الاقتصادية له من حيث الخسائر الكبيرة الناجمة عن ارتفاع الهلاكات في الحيوانات المخمجة وانخفاض إنتاجها من الحليب والبيض فضلا عن إجهاض الحوامل (5). تعتمد شدة الإصابة بهذا المرض على جرعة الجرثيم المأخوذة وضراوتها فضلا عن الحالة المناعية للكائن الحي التي تؤدي دورا مهما في تحديد درجة الإصابة، كما تلعب عوامل الإجهاد دورا مهما في حدوث حالات الإصابة بالسالمونيلا وتعد الحيوانات الحاملة للجرثيم مصدر رئيس في نشر الإصابة ونقل هذه الجرثيم عن طريق الحليب والبراز، كما تلعب الطيور والمضائف الخازنة الأخرى دورا مهما في انتقال الإصابة بين الحيوانات المختلفة (6). يأخذ المرض في العجول ثلاثة أشكال وهي:

- الشكل السمومي: يحدث هذا الشكل عندما تولد العجول من أمهات لم تصب سابقا أو عندما لا تأخذ العجول كمية كافية من اللبا ويتميز هذا الشكل بالخمول وحمى وعلامات عصبية (7).
- الشكل المعوي الحاد: يحدث في العجول بعمر أكثر من أسبوع ويتصف بالحمى والإسهال المائي الذي يحتوي على قطع ليفية أو مخاط (8).
- الشكل المعوي المزمن: ويتصف بفقدان الشهية وقلّة الوزن وإسهال متقطع يحوي على مخاط والحمى متقطعة (7).

### المواد وطرائق العمل

- أولا: تحضير مستخلصي الزنجبيل (المائي والكحولي). حسب ما ورد عن (2)
- يوزن 10 غم من مطحون جذور الزنجبيل (عبارة عن جذور الزنجبيل مغسولة ومقشرة ثم قطعت وجففت هوائيا ثم طحنت).
  - لتحضير المستخلص الكحولي نستخلص 5 غم من المطحون في 200 مل إيثانول بتركيز 80%.
  - لتحضير المستخلص المائي نستخلص 5 غم من المطحون في 200 مل ماء مقطر.
  - يترك المحلولان لمدة 24 ساعة مع التحريك بين فترة وأخرى.
  - يتم ترشيح المحلولان باستعمال ورق الترشيح (whatman No.1).

- يهمل الراسب وناخذ السائل المصفى ويوضع في حمام مائي لغرض التخلص من الماء والكحول.
- نزن المطحون الناتج بعد الاستخلاص.
- تحضير ثلاث تراكيز مختلفة من كل مستخلص وكما يلي:  
تراكيز المستخلص المائي وتحضر باذابة:  
1 غم من المستخلص في مل ماء مقطر.  
0.5 غم من المستخلص في مل ماء مقطر.  
0.25 غم من المستخلص في مل ماء مقطر.
- تراكيز المستخلص الكحولي وتحضر باذابة:  
1 غم من المستخلص في 1 مل من مادة Dimethyl Sulphoxide.  
0.5 غم من المستخلص في 1 مل من مادة Dimethyl Sulphoxide.  
0.25 غم من المستخلص في 1 مل من مادة Dimethyl sulphoxide.

#### ثانيا: عزل وتشخيص بكتريا *Salmonella typhimurium*:

- جمع العينات: تم جمع 5 عينات براز من عجول مصابة بالاسهال من الحقل الحيواني التابع لكلية الزراعة جمعة بغداد باستخدام مسحات قطنية معقمة حيث نقلت العينات مباشرة الى المختبر لغرض العزل والتشخيص.
- عزل البكتريا: زرعت العينات مباشرة في وسط مرق السلينايت وحضنت بدرجة حرارة 37م لمدة 24 ساعة، وبعدها زرع من وسط السلينايت السائل بطريقة التخطيط على وسط السالمونيلا - شيكلا ووسط XLD ووسط الماكونكي وحضنت بالظروف اعلاه.
- تشخيص بكتريا *Salmonella typhimurium*: تم تشخيص البكتريا مبدئيا اعتمادا على الصفات المظهرية التي تشمل حجم المستعمرة ولونها وشكلها على الاوساط الزرعية الصلبة وهي وسط السالمونيلا - شيكلا ووسط XLD ووسط الماكونكي. فضلا عن الفحص المجهرى بعد صبغها بصبغة كرام وفحصها باستخدام العدسة الزيتية. بالاضافة الى اجراء عدد من الفحوصات الكيموحيوية الاتية حسب ماورد في (9).
- 1. **فحص انتاج انزيم اليوريز Urease Production Test**: زرع وسط اليوريا الصلب المائل بالمزارع البكتيرية بطريقة الطعن والتخطيط على السطح المائل، وحضنت بدرجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة فتغير لون الوسط من الاصفر الى الوردي والذي يعد دليلا على ايجابية الفحص.
- 2. **فحص استهلاك السترات Citrate Utilization Test**: زرعت العزلات البكتيرية على وسط سترات سايمون الصلب المائل بطريقة التخطيط. وحضنت بدرجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة عدت النتيجة موجبة بتغير لون الوسط من الاخضر الى الازرق.
- 3. **فحص انتاج الاندول Indole Production Test**: لقت انابيب حاوية على وسط ماء البيبتون بالمزارع البكتيرية وحضنت بدرجة حرارة 37م لمدة 24 ساعة، اضيف بعدها عدة قطرات من كاشف كوفاكس، يعد ظهور حلقة حمراء دليلا على ايجابية الفحص.
- 4. **فحص الحركة وتخمر سكر المانيتول Motility and Mannitol Fermentation Test**: زرعت العزلات البكتيرية على وسط المانيتول شبه الصلب بطريقة الطعن والتخطيط وحضنت بدرجة حرارة 37م لمدة 24 ساعة، يعد تغير لون الوسط الى اللون الاصفر وانتشار النمو على جانبي منطقة الطعن نتيجة موجبة للفحص.

ثالثاً: الفعالية التثبيطية لمستخلصي جذور نبات الزنجبيل المطحونة (المائي والكحولي) وبثلاث تراكيز مختلفة لكل منهما ضد جرثومة *Salmonella typhimurium*.

حضر العالق الجرثومي بنقل 2-3 مستعمرة نقية لجرثومة *Salmonella typhimurium* الى انابيب اختبار معقمة حاوية على 5 مل من المرق المغذي وحضنت بدرجة حرارة 37 م لمدة 3-5 ساعة، حيث غمست مسحة قطنية معقمة بالمرق المغذي المزروع وازيل الفائض بضغط المسحة القطنية على الجدار الداخلي للانبوبة ثم نشرت على وسط الاكار المغذي الصلب بثلاثة اتجاهات للحصول على نمو متجانس، وترك الطبقة ليثبت لمدة 15 دقيقة(10). استخدمت طريقة الانتشار في الحفر التي وصفها (11) للكشف عن الفعالية التثبيطية لمستخلصي جذور نبات الزنجبيل (المائي والكحولي)، حيث استخدم ثاقب الفلين لعمل ثقب قطرها 5 ملم على سطح الاكار المغذي الصلب المزروع اعلاه، ثم ملئت كل حفرة 50 مايكروليتر من كل تركيز من التراكيز الثلاثة للمستخلصين (كل تركيز في حفرة)، حضنت بعدها الاطباق بدرجة حرارة 37م لمدة 24 ساعة. تم قياس مناطق التثبيط حول الحفر وقورنت مع معاملة السيطرة الحاوية على ماء مقطر (مستخلص مائي)، اما معاملة السيطرة للمستخلص الكحولي احتوت على مادة Dimethyl Sulphoxide.

### النتائج والمناقشة

اولاً: عزل وتشخيص بكتريا *Salmonella typhimurium*.

تم الحصول على عزلة واحدة تحمل صفات بكتريا *Salmonella typhimurium* من مجموع 5 عينات من براز عجول مصابة بالاسهال. وقد تم التشخيص اعتماداً على الصفات الزرعية على الاوساط الزراعية الخاصة بها وكذلك على الفحص المجهرى للخلايا البكتيرية، ومن ثم تشخيصها حتى الجنس والنوع باتباع بعض الفحوصات الكيموحيوية. وكانت النتائج كما يأتي:

- **الصفات الزرعية:** ظهرت مستعمرات بكتريا *Salmonella typhimurium* على وسط الماكونكي الصلب بشكل مستعمرات دائرية كبيرة الحجم ذات لون اصفر شاحب بسبب عدم قدرتها على تخمير سكر اللاكتوز في حين كانت مستعمراتها على وسط XLD كبيرة الحجم حمراء اللون ذات مراكز سوداء. اما على وسط السالمونيلا- شيكلا فقد كانت مستعمراتها كبيرة الحجم دائرية شفافة اللون مع تكون اسوداد في مراكزها وذلك بسبب قدرتها على انتاج غاز كبريتيد الهيدروجين.
- **الصفات المجهرية:** اظهر الفحص المجهرى لخلايا البكتريا المعزولة بانها سالبة لصبغة كرام وعصوية الشكل.
- **الفحوصات الكيموحيوية:** يبين جدول (1) نتائج الفحوصات الكيموحيوية حيث اظهرت هذه العزلة البكتيرية عند زراعتها على وسط سايمون سترات قدرتها على استهلاك السترات كما اعطت نتيجة موجبة لاختبار الاندول والحركة فضلاً عن قدرتها على تخمير سكر المانيتول في حين اعطت نتيجة سالبة لانتاج انزيم اليوريز.

جدول (1) يوضح نتائج بعض الفحوصات الكيموحيوية لبكتريا *Salmonella typhimurium*

نوع العزلة	استهلاك السترات	انزيم اليوريز	فحص الاندول	فحص الحركة وتخمير سكر المانيتول
<i>Salmonella typhimurium</i>	+	-	+	+

+ نتيجة موجبة - نتيجة سالبة

بالنسبة للعزل الجرثومي من حالات الاسهال في العجول فمن بين 5 عينات براز اسهالي تم الحصول على عزلة واحدة تحمل صفات بكتريا *Salmonella typhimurium*، ويعد هذا النوع من اهم الانواع والاكثر شيوعا من ناحية العزل في العجول، اذ تحصل الإصابة بهذه الجرثومة عن طريق الفم وتتطور العلامات السريرية بعد مرور 12-24 ساعة وتتمثل بالاسهال والحرارة وقد تتطور الحالة الى حدوث (bactermia)(9). اما نتائج التشخيص فقد جاءت مطابقة لما اكده (12).

ثانيا: الفعالية التثبيطية لمستخلصي جذور نبات الزنجبيل المطحونة (المائي والكحولي) وبثلاث تراكيز مختلفة لكل منهما ضد جرثومة *Salmonella typhimurium*

يبين جدول (2) نتائج الفعالية التثبيطية للمستخلص الكحولي لجذور نبات الزنجبيل حيث اظهرت النتائج ان المستخلص الكحولي لجذور نبات الزنجبيل المطحونة وبتراكيزه الثلاث (0.25، 0.5، 1.0 غم/مل) قد اعطى قدرة تثبيطية عالية حيث كانت اقطار التثبيط (4-10-12) ملم على التوالي، في حين لم يظهر المستخلص المائي لجذور نبات الزنجبيل المطحونة وبتراكيزه الثلاث اي قدرة تثبيطية تجاه جرثومة *typhimurium Salmonella*.

جدول (2) يوضح نتائج اختبار الفعالية التثبيطية لمستخلص جذور نبات الزنجبيل الكحولي تجاه بكتريا

#### *Salmonella typhimurium*

التركيز (g/ml)	قطرمنطقة التثبيط (mm)
0.25	4
0.5	10
1.0	12
Control	0

Mm ملي مايكرون

وتتفق هذه النتائج مع نتائج دراسة (2) عندما وجدو ان المستخلص الكحولي لجذور نبات الزنجبيل المطحونة يمتلك فعالية تثبيطية عالية تجاه جرثومة *Salmonella typhi* و *Escherichia coli*، في حين كان المستخلص المائي اقل قدرة تثبيطية تجاه تلك الجراثيم ويعود السبب في ذلك الى ان استخدام الكحول في استخلاص مكونات الزنجبيل يساعد في استخلاص اغلب مكونات الزنجبيل التي تمتلك فعالية تثبيطية تجاه الجراثيم. واهم هذه المركبات هما gingerol و shogol اللذان يعطيان الطعم اللاذع للزنجبيل ويعتقد انهما المسؤولان عن الفعالية التثبيطية للزنجبيل تجاه الجراثيم المختلفة. حيث ان gingerol وهو احد المركبات الفينولية لزيت الزنجبيل والذي له تاثير في خفض الشد السطحي لجدار الخلية البكتيرية (13). لذلك فان gingerol والمركبات الفينولية الاخرى تمزق الجدار الخارجي للخلية البكتيرية وكنتيجة لذلك يحدث فقدان للخاصية التناظيرية للغشاء وبالتالي ينتج عنه فقدان السيطرة على التنافذ وبالتالي تسرب محتويات السايوبلازم بما في ذلك الاحماض النووية ونواتج الايض والايونات(13). اما التفسير الثاني يعتمد على فعالية مركبات مستخلص الزنجبيل والتي تحتوي على مواد محبة للدهون الذائبة في الايثانول والتي تمتلك صفة الدهون الاساسية. معظم المركبات الكبيرة والصغيرة للزيوت الاساسية اسنادا الى (13) هي Acetoxychavicol acetate(ACA), pcoumaryl diacetate, palmiticacid, acetoxyeugenolacetate, eugenol, B-bisabolene, B-farnesene and sesquiphelaandrene .

حيث مثلت مركبات فينولية واسترات لاحماض ضعيفة واحماض دهنية وتربينات ومركبات اخرى. فقد ذكر (13) ان eugenol, B-bisabolene, B-farnesene and sesquiphelaandrene، هما المركبات

الاساسية للتربينات في زيت الزنجبيل ولها ميكانكية مشابهة للتربينات الاخرى والمركبات الفينولية حيث هي المسؤولة عن تمزيق الغشاء البلازمي وتلف محتويات الخلية. اما التأثير الثالث استنادا الى (14) هو ان المركبات الفينولية والانزيمات المحللة للبروتينات تعمل على ترسيب بروتينات الغشاء الخارجي وتمزيق جدار الخلية وترسيب وفقدان لمحتويات الخلية. اما التأثير الرابع فقد شرح (13) تاثير حامض الخليك في الاس الهيدروجيني للخلية حيث ان حالة الحامض غير المتأينة هي المسؤولة عن الفعالية التثبيطية للزنجبيل. وذلك من خلال خفض الاس الهيدروجيني داخل الخلية مما يسبب تحلل البروتينات وفقدان الطاقة وترسيب محتويات الخلية. كما تتماثل هذه النتائج مع ما توصل اليه (15) عندما اشار الى ان المستخلص الكحولي لجذور نبات الزنجبيل المطحونة تمتلك فعالية تثبيطية عالية تجاه *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, and *Streptococcus agalactiae*.

### المصادر

1. Tyler, V. E. 1988. Pharmacogony 9<sup>th</sup> (ed.) Lea And Febiger, Philadelphia, PP. 113-150.
2. Ekwenye, U. N. & Elegalam, N. N. 2005. Antibacterial Activity of Ginger (*Zingiber officinale* roscoe and Garlic (*Allium sativum* L.) extracts on *Escherichia coli* and *Salmonella typhi*. Department of Microbiology, Michael Okpara University of Agriculture, Umudike. P.M.B7262 Umuahia State Nigeria.
3. Kalesaraj, R. 1975. Screening of some indigenous plant for anthelminthic action against human *Ascaris Lumbricoides*. Part Ii Indian J. Physiol. Pharmacol., 19:47-49.
4. Dargatz, D. A.; Wells, S. J. & Akkina, J. 1998. The veterinarians role in diagnosis, treatment and prevention of Multi drug resistance *Salmonella typhimurium* Dt104. J. Bovine Practitioner.
5. Pelzer, K. D. 1989. Salmonellosis. J. Am. Vet. Med. Asso., 195:456-463.
6. Wessi, H. S.; Blasser, M. J.; Paleologo, E. P.; Black, R.; Mcwhrter, A. C.; Asbury, M. A.; Carter, G. P.; Feldman, R. A. & Brenner, D. J. 1986. Occurrence and distribution of serotypes of *arizonae* Subgroup *Salmonella* strain in the US from,1967-1976. J. Clin. Microb., 23:1036-1064.
7. Susan, M. 1998. The Merck Veterinary Manual. Philadelphia. USA.
8. Evans, S. J. & Davies, R. 1996. Case control study of multiple resistant *Salmonella typhimurium* Dt104 infection of cattle in Great Britian. Vet. Rec., 139:557-558.
9. Brooks, G. F.; Janet, S.; Stephen, B. & Gawetz, A. M. 2004. Melnik and adelberges Microbiology. Twenty thrid Edition International Edition, PP. 256-260.
10. Bauer, A. W.; Kirby, W. M.; Sherris, I. & Turk, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. Am. J. Clin. Path., 45:493-496.
11. Gupta, U.; Radramma Rati, E. R. & Joseph, R. 1998. Nutritional quality of lactic acid fermented Bitter Gourd and Fenugreek leaves. Int. J. Food Sci. Nut., 49(2): 101-108.
12. Holt, J. G. M. E. S.; Nicholas S. M. & Peter, H. A. S. 1986. Bergeys manual of systematic bacteriology (Volume 2), Williams and Wilkins Baltimor. London, Los Angels. Sudney.
13. Oonmetta-Aree, J.; Tomoko, S.; Piyawan, G. & Griangsak, E. 2006. Antimicrobial properties and action of Galangal (*Alpinia Galanga* Linn) on *Staphylococcus aureus*. LWT-Food Sci. Technol., 39:1214-1220.
14. Volk, W. A. & Wheeler, M. F. 1988. The basic microbiology. Erlangga. Jakarta, 1:218.
15. Masniari poeloengan. 2011. The effect of red Ginger (*Zingiber officinale* roscoe) extract on the growth of mastitis causing bacterial isolates. Indonesian research center for Veterinary Science Ji. R. E. Martadinata No30, P.O.Box151, Bogor, West Java.