مجلة الأنبار للعلوم البيطرية، العدد (1)، المجلد (1)، 2008 ISSN:1999-6527

الفاعلية المضادة لجرثومة *Listeria monocytogenes* للخلاصة الكحولية لمادة البروبولس المحلي

علي محمد غازي المحنة، أسامة صالح مهدي الزبيدي و هدى عبد الهادي علي
كلية الطب البيطري/ جامعة القادسية

الخلاصة

البروبولس مادة راتينية لزجة تجمع من قبل عاملات نحل العسل من البراعم و أجزاء النبات الأخرى وتمتلك خواص حيوية متنوعة منها خواصها المضادة للالتهاب و الخواص المضادة للمايكروبات والفعل المخدر و التحفيز المناعي. توخت الدراسة الحالية تحديد الفاعلية ضد الجرثومية لخلاصة مادة البروبولس الكحولي الايثانولي ضد نمو جرثومة اللستريا في المختبر وقد لوحظ من نتائج الدراسة حساسية جرثومة اللسترية لتراكيز الخلاصة المختلفة المستخدمة قيد الدراسة (200,150,100,50 مغ\مل) وان فاعلية الخلاصة تزداد بزيادة التركيز المستخدم اذ تبين بإستخدام طريقة حفر الاكار أ ن اكبر قطر من تثبيط نمو الجرثومة كان 25 ± 0.8 ملم عند التركيز 200 مغ \مل في حين اظهر التركيز 50 مغ \مل اقل قطر من تثبيط النمو 19 ± 0.4 ملم. كما تبين من خلال التحليل الاحصائي وجود تفوق معنوي وعند مستوى احتمال 0.05 للتركيزين 150 مغ/ مل و 200 مغ \مل على كل من المضاد الحيوي الامبيسيلين والكلوكساسلين و التتراسكلين في حين لم يظهر ا وجود فرق معنوي احصائي مع كل من المضاد الحيوي الجنتاميسين والاموكسسلين.

سجل التركيز (4) مغ \مل كأدنى تركيز مثبط للخلاصة الايثانولية للبروبولس المحلي على نمو جرثومة اللسترية في حين سجل التركيز (10) مغ \مل كأقل تركيز قاتل لها في انابيب الاختبار.

Antibacterial activity of alcoholic extract of local proplis against *Listeria monocytogens*

A. M. Al- Mohana, O. S. Mahdi and H. A. Ali
College of Veterinary Medicine/Al-Qadisiya University

Abstract

Propolis is a sticky resinous material collected by honey bee workers from buds and other parts of the plants, it have various biological activities as anti-inflammatory, antimicrobials, anesthetics effect and immunostimulant properties. The study aimed to determine the antimicrobial activity of local propolis extract against *Listeria monocytogenes* in vitro ,the result showed sensitivity of Listeria to different concentrates of extract that used in this study (50,100,150,200 mg\ml),the activity of extract increased with the increasing the concentration of the extract .By using the agar well diffusion method, the highest diameter of bacterial growth inhibition for the ethanolic extract of propolis was 25.4±0.8 mm by using 200mg\ml and the lowest diameter was 19.5±0.4 mm for the concentrate 50 mg\ml.

Statically analysis showed present a significant increase under 0.05 for 200mg\ml on each Ampcillin, cloxacilln, tetracycllin, while no significant changes was record for each Gentamicine and amoxicillin.

The result indicate that the MIC and MBC of the ethanolic extract of propolis on *Listeria monocytogens* was 4 mg\ml and 10 mg\ml respectively.

المقدمة

يعد مرض Listeriosis من الأمراض الهمة صحياً واقتصادياً وهو من الأمراض المشتركة شديدة الخطورة وينتقل المرض بشكل أساسي عن طريق الغذاء إلى الإنسان والحيوان. العامل المسبب لهذا المرض هو جرثومة *Listeria monocytogenes* التي تسبب إصابات موضعية وعامة في الإنسان ومدى واسع من الحيوانات الحقلية والبرية والطيور(1). جرثومة *L.monocytogenes* عصيات موجبة لصبغة كرام، لا هوائية اختيارية طولها 1-1،5مايكرون وقطرها 0.4- 0.5 مايكرون غير مكونة للابواغ، لا تحتوي على محفظة متحركة بدرجة حرارة 10- 25° م (2) وتعد هذه الجراثيم من المشاكل المهمة في مجال الصناعات الغذائية لما تسببه من حالات التسمم الغذائي حيث أن هذه الجراثيم واسعة الانتشار في الطبيعة ولها القدرة على العيش والتكاثر في مدى واسع من الدرجات الحرارية (1-45 °م) وكذلك تحت أس هيدروجيني وضغط ازموزي مختلف (3).

البروبولس كلمة من اصل إغريقي (pro) تعني قبل و(polis) تعني المدينة وهي مادة راتينية طبيعية غير سامة تجمعها عاملات نحل العسل من قلف الاشجار وبراعم بعض النباتات (4)وذكر المختصون ان البروبولس الخام مزيج من نضح النباتات وشمع النحل و حبوب الطلع و إفرازا ت الغدد اللعابية للنحل (5)يستعمل البروبولس من قبل النحل لاغراض عدة منها استخدامه في لصق الاطارات وسد الشقوق التي يدخل منها الضوء وتضييق مدخل الخلية في فصل الشتاء كمايستعملها في تحنيط بعض القوارض والحشرات كبيرة الحجم التي يقتلها داخل خليته ويصعب عليه اخراجها لكبر حجمها فيقدم على تغليفها بالكامل لمنع تحللها(6). يتنوع التركيب الكيميائي للبروبولس اعتماداً على تنوع النباتات الموجودة ضمن الرقعة الجغرافية التي تتواجد فيها خلايا النحل(7).

وذكر (8) ان هناك أكثر من 67 نوعا من النباتات التي يزورها النحل ويجمع منها مادتها الصمغية منها اشجار الصفصاف (Willows) أشجار الكستناء (Chestnut) أشجار القضبان (Birches) أشجار الدردار(Ash) أشجار الحور (Poplars) وأشجار جار الماء (Alders)وعلى العموم البروبولس الخام يتركب من 50%راتينات وبلسم و30% شمع و10% زيوت أساسية وعطرية و5% حبوب طلع و5% مواد أخرى(9). استخدم البروبولس من قبل المصريين القدماء في تحنيط موتاهم تبعا لتقنيات اختصوا بها دون سواهم وفي العصور الوسطى استخدم لتعقيم الحبال السرية للمواليد الجدد (6)حالياً يستخدم في مجال الطب الشعبي وتحضير المستحضرات التجميلية (4)ونظرا للأهمية الطبية والعلاجية التي يتمتع بها البروبولس وأشارت الدراسات السابقة في كفاءته في علاج العديد من الحالات المرضية لذا ركزت الدراسة الحالية على تقييم كفاءته المضادة لجرثومة اللسترية في الإطباق الزرعية و الأنابيب.

المواد وطرائق العمل

العترة الجرثومية Bacterial Strain: تم الحصول عليها من وحدة الأمراض المشتركة/ كلية الطب البيطري – جامعة بغداد وجرى التأكد من خواصها الزرعية والصفات الكيموحيوية حسب ما جاء به(10) وحفظت في اكار مائلمن وسط نقيع القلب و الدماغ (المجهز من شركة oxoid) بدرجة حرارة الثلاجة لحين الاستخدام.

جمع مادة البروبولس واعدادها لغرض الدراسة: تمجمع كمية من مادة البروبولس الخام من عدد من مناحل مدينة الديوانية والنجف خلال شهر ي نيسان وأيار تم تنظيفها من الاتربة وقطع الخشب العالقة بها ثم وضعت في المجمدة عدة ساعات للتخلص من لزوجة المادة بعدها طحنت بأستعمال المطحنة الكهربائية حتى اصبحت على هيئة مسحوق ناعم، حفظت النماذج المطحونة في عبوات نظيفة معتمة و محكمة الغلق في درجة حرارة الغرفة لحين الاستعمال.

تحضير الخلاصة الايثانولية للبروبولس: حضرت الخلاصة الايثانولية لمادة البروبولس وذلك بمزج 50 غم من مسحوق المادة المحضر في الفقرة السابقة مع 450 مل من الكحول الاثيلي بتركيز 70% في دورق حجمي سعة 1000 مل بعدها وضع الدورق في سخان معدني مغناطيسي بدرجة حرارة 50 ^{o}م وترك ليمتزج جيداً بوساطة المازج المغناطيسي بعدها حفظ المزيج مدة اسبوع وكان يرج يوميا لبضع دقائق، رشح المزيج باستعمال ورق ترشيح وبخر باستعمال الفرن الكهربائي الحراري بدرجة حرارة 45 ^{o}م وبعد الحصول على الخلاصة حضر منه (4) تراكيز متدرجة باستعمال مادة الاثيلين كلايكول هي 200,150,100,50 مغ /مل.

تحضير العالق الجرثومي: حضر العالق الجرثومي بنقل الجرثومة المستعملة في التجربة من الخزين الاصلي وزرعت بطريقة التخطيط على سطح مائل للوسط المغذي (المجهز من شركة oxoid) ووضعت بالحاضنة بدرجة حرارة 37 ^{o}م مدة 24 ساعة ثم غسل النمو الجرثومي على السطح المائل بمقدار 10 مل من المرق المغذي ثم رج العالق بعدها عين العدد الجرثومي الكلي وذلك بمقارنة النمو بالمرق المحضر مع محلول ماكفرلند القياسي الذ ي يعتمد على درجة تعكر العالق في حساب عدد الخلايا الجرثومية المتوقعة في 1 مل من العالق إذ تم عد الخلايا الجرثوميةمقارنةً مع الأنبوب رقم (2) الحاوي على 3×10^{8} خلية / مل.

اختبار حساسية الجرثومة للخلاصة الايثانولية للبروبولس: اختيرت طريقة حفر الاكار لغرض فحص فاعلية الخلاصة الايثانولية للبروبولس المحلي اذ تم تحضير وسط المولر هنتون (المجهز من شركة Difco) بعد تعقيمه بالمؤصدة وتركه ليبرد الى درجة 48^{o}م بمساعدة حمام مائي ثم اضيف اليه 0.1 مل من العالق الجرثومي المحضر في الفقرة السابقة بوساطة محقنة اوتوماتيكية معقمة، ثم أضيف اليه 20 مل من الوسط الزرعي الحاوي على الجراثيم لكل طبق من اطباق بتري المعقمة ثم وضعت في الثلاجة للمساعدة على تصلب الوسط بعدها عملت 5 حفر بقطر 6 ملم في كل طبق اضيف اليها تراكيز الخلاصة المختلفة وبمقدار 0.1 مل لكل حفرة وحضنت بدرجة حرارة 37^{o}م مدة 24 ساعة وقرئت النتائج بقياس قطر تثبيط النمو محسوباً بالملم.

اختبار تحديد قيمة MIC وMBC: حدد اقل تركيز مثبط MIC واقل تركيز قاتل MBC للخلاصة الايثانولية للبروبولس وذلك بتحضير سلسلة من التراكيز المتدرجة له بأستخدام المرق المغذي وكالاتي 24,22,20,1816,14,12,10,8,6,4,2 مغ /مل أضيف لكل أنبوب ما مقداره 0.1 مل من العالق الجرثومي الحاوي على 3×10^{8} خلية /مل إضافة إلى أنبوبة سيطرة حاوية على المرق المغذي فقط ثم حضنت الأنابيب بدرجة حرارة 37 ^{o}م مدة 48 ساعة وسجلت النتائج على أساس ظهور العكورة من عدمهإذ حدد التركيز المثبط الادنى بأنه اقل تركيز من الخلاصه يمنع نمو واضح للجرثومة فيما حدد التركيز القاتل الادنى على انه اقل تركيز من الخلاصة يمنع نمو الجرثومة بنسبة 99,9%.

النتائج

تشير النتائج الى ان للخلاصة الكحولية الايثانولية لمادة البروبولس المحلي تأثيراً مضاداً لنمو وتكاثر جرثومة اللستريا في الأطباق الزرعية مع اختلاف هذا التاثير اعتماداً على التركيز المستخدم.

يوضح جدول (1) معدلات أقطار تثبيط النمو لستة مكررات مع الخطأ القياسي لتراكيز الخلاصة الايثانولية لمادة البروبولس المحلي وبعض المضادات الحيوية المهمة في تثبيط نمو جرثومة اللسترية في الاطباق الزرعية إذ تبين أ ذ اكبر قطر من تثبيط النمو كان 25.4 ± 0.8 ملم أظهره التركيز 200 مغ/ مل في حين اظهر التركيز 50 مغ/مل اقل قطر من تثبيط النمو 19.5± 0.4 ملم في حين اظهر التركيزين 100،150 مغ /مل أقطاراً من تثبيط النمو مقدارها 21.3 ± 0.9 و23.7 ± 0.9 ملم على التوالي في حين لم يظهر الاثيلين كلايكول المستخدم كمادة مخففة اي تاثير يذكر في هذا الصدد صورة (1).

بين التحليل الإحصائي باستخدام تحليل التباين وLSD وجود تفوق معنوي وعند مستوى احتمالية 0.05 للتركيزين 150 مغ/ مل و200 مغ/ مل على المضادات الحيوية الامبيسيلين، الكلوكساسلين والتتراسكلين في حين لم يظهر ا وجود فرق معنوي احصائي مع كل من المضاد الحيوي الجنتاميسين والاموكسسلين.

سجل التركيز 4 مغ/مل كادنى تركيز مثبط MIC للخلاصة الايثانولية للبروبولس المحلي على نمو جرثومة اللسترية في حين سجل التركيز 10 مغ/مل كاقل تركيز قاتل MBC لها عند اختبارها في انابيب الاختبار (جدول 2).

جدول (1) تأثير الخلاصة الايثانولية لمادة البروبولس المحلي في تثبيط نمو جرثومة اللسترية في الاطباق الزرعية

التركيز (مغ/مل)	قطر تثبيط النمو لجرثومة اللسترية مقاساً بالملم	الخطأ القياسي
50	19.4	0.4
100	21.3	0.9
150	23.7	0.9
200	25.4	0.8
الجنتاميسين(10 مكغ)	24.1	0.3
الامبيسيلين(30 مكغ)	20	0.5
الكلوكساسلين (5 مكغ)	11	0.7
التتراسكلين (30 مكغ)	13	0.4
الاموكسسلين (25 مكغ)	25.1	0.9
الاثيلين كلايكول	–	–

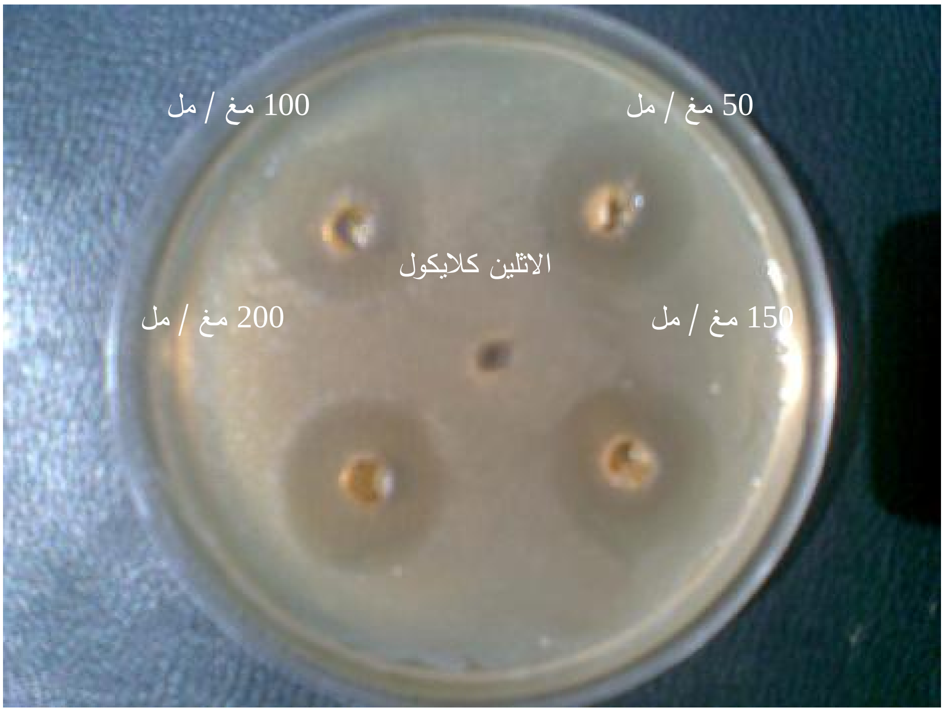
_ تعني لا يوجد قطر تثبيط

جدول (2) تأثير الخلاصة الايثانولية لمادة البروبولس المحلي في تثبيط نمو جرثومة اللسترية في انابيب الاختبار

التركيز (مغ/ مل)	نوع الفعل
2	–
4	+

+	6
+	8
++	10
++	12
++	14
++	16
++	18
++	20
++	22
++	24

– تعني فعل غير مؤثر + تعني فعل مثبط للجرثومة ++ تعني فعل قاتل للجرثومة



صورة (1) تأثير التراكيز المختلفة للخلاصة الايثانولية لمادة البروبولس المحلي ضد نمو جرثومة اللسترية في الأطباق الزرعية

المناقشة

تبين من نتائج الدراسة الحالية ان للخلاصة الايثانولية لمادة البروبولس المحلي تأثيراً ملحوضاً على نمو جرثومة اللستريا في جميع تراكيزه المستخدمة قيد الدراسة مع تباين هذا التأثير حسب التركيز المستخدم وهذه النتائج عززت دراسات سابقة بهذا الصدد قام بها باحثون على مادة البروبولس الذي تم جمعه من مناحل واقعة في بلدان عدة ضد نمو جملة من الجراثيم الموجبة لصبغة كرام من غير جرثومة اللسترية التي لم تتناولها الدراسات السابقة اذ اشارت تلك الدراسات الى فاعلية مادة البروبولس المضادة للجراثيم خصوصا الجراثيم الموجبة لصبغة كرام اذ ذكر (11) ا نلمادة البروبولس المغربي المنشأ وخلاصاته فاعلية مثبطة ضد نطاق واسع من المكورات و العصيات الموجبة لصبغة كرام وفاعلية محدودة ضد نمو العصيات السالبة لصبغة كرام و في دراسة قام بها(12) على عينتين من البروبولس التركي المنشأ وعينة من البروبولس البلغاري المنشأ و درس فاعليتها ضد جرثومتي

Staphylococcus aureus و *Escherichia coli* بطريقة الانتشار بالحفر اظهرت جميع العينات فاعلية عالية ضد جرثومة *S. aureus* وفاعلية محدودة ضد جرثومة *E. coli* كما درس(13) الفاعلية المضادة للجراثيم لمادتي العسل والبروبولس تجاه جرثومة *S. aureus* في الزجاج وسجل كفاءة البروبولس تجاه جرثومة الاختبار مقارنةً بالعسل.ومن الشواهد على القدرة المضادة للجراثيم لمادة البروبولس استخدام الاخير من قبل الفراعنة المصريين في تحنيط جثث موتاهم للمحافظة عليها من التحلل بفعل الميكروبات كما وجد المختصون في تربية النحل ان عاملات النحل تستخدم البروبولس الذي يعرف بأسم البالم في صقل وتطهير العيون السداسية المعدة لوضع البيض وهذا يدل على ان لهذه المادة تأثيراً مبيدا على الجراثيم والفطريات،وفي المجال الطبي الشعبي استخدم البروبولس من قبل الاطباء الانكليز اثناء الحرب العالمية الثانيةوأثناء الحروب التي خاضوها ضد مستعمراتهم في تنظيف وتعقيم الجروح بعد مزجه بالفازلين(14) ومنذ القرن الثاني عشر وصف الاوربيون الخواص الطبية والعلاجية للبروبولس واستخدموه في علاج اصابات الفم والبلعوم والأسنان(15).

إ ن الفعل المؤثر الذي ابدته الخلاصة الايثانولية لمادةالبروبولس المحلي ضد جرثومة اللسترية تعود إلى احتواء الأخير على عدد من المركبات الفاعلة خصوصا الفلافونويدات والفينولات والتربيات التي اثبتت دراسات سابقة احتواء خلاصة البروبولس الكحولي عليها(16). كما ذكر(17) إلى إ ن لمركبات cinammic acid والفلافونويدات الدور المهم والرئيسي في الفعل المضاد للاحياء المجهرية لخلاصات البروبولس في حين أشار(18) إلىان للمركبات الفلافونويدية واسترات الاحماض الفينولية الموجودة في البروبولس تاثيراً معروفاً ضد الجراثيم.

ان ميكانيكية عمل خلاصات مادة البروبولس ضد الأحياء المجهرية بصورة عامة غير معروفة على وجه الدقة فقد ذكر(19) إلى ان مادة البروبولس تؤثر على الغشاء البلازمي للجراثيم كما انها تثبط الفاعلية الانزيمية وحركة الجراثيم في حين لاحظ كل من (20) في دراستهم على البروبولس وبمساعدة المجهر الالكتروني ان عملية الانقسام الخلوي للميكروبات تتوقف بوجود خلاصة البروبولس واقترحا ان لمادة البروبولس القدرة على ايقاف عملية الانقسام الخلوي وذلك من خلال تثبيط عملية انقسام مادة DNA للجرثومة. عموما ولكون البروبولس يحتوي على عدد غير قليل من المركبات الفاعلة ضد الجراثيم فمن المحتمل ان تكون كفاءته في تثبيط نمو الجراثيم متاءتية من اكثر من ميكانيكية وكما ذكرت سابقا.

لوحظ أيضا من نتائج الدراسة الحالية ان قطر تثبيط نمو جرثومة اللسترية في الأطباق الزرعية يزداد بزيادة التركيز المستخدم اي ان هناك علاقة طردية بين قطر التثبيط وتركيز الخلاصة المستخدم والذي يعزى في الغالب الى زيادة المادة او المواد المثبطة لنمو الجرثومة بزيادة التركيز المستخدم.

المصادر

1. Weis, J. & Seeliger, H. P. R. (1976). Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature. Appl. Microbial., 30: 29-32.
2. Buchanan, R. E. & Gibbons, N. E. (1974). In Beergey's manual of determinative bacteriology, 8th ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
3. Buchanan Farber, J. M.; Peterkin, P. I.; Carter, A. O.; Varughese, P. V.; Ashton, F.E. & Ewan, E. P. (1991). Neonatal listeriosis due to cross-infection confirmed by isoenzyme typing and DNA finger printing. J. Infect. D., 163:927-928.
4. Burdock, G. A.(1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. Food chem. Toxicol.,36:341-363.

5. Lin, S.; Chung, C.; Chiang, C. & Hsu, S.(1999).The influence of propolis ethanol extract on liver microsomal enzymes and glutathione after chronic alcohol administration. Am. J. Chin. Med.,27:83-93.

6. Hegazi, A. G. (1997). Propolis an overview. Int. Symp. Apithera. Cairo.

7. Boyanova, L.; Derejian, S.; Koumanova, R.; Katsarov, N.; Mitov, I.; Nikolov, R. & Kristev, Z. (2003).Inhibition of *Helicobacter pylori* growth in vitro by Bulgarian propolis. J. Med. Microbial., 52:417-419.

8. Crane, E.(1997). Bees and beekeeping: Science Practice and World Resources. Cornstock puib. USA. PP.593.

9. Monti, M.; Berti, E.; Carminati, G. & Cusini, M.(1983). Occupational and cosmetic dermatitis from propolis. Contact dermatitis. 9:163-164.

10. Quinn, P. J.; Carter, M. E.; Markey, B. K. & Carter, G. R. (1998). Clinical Veterinary Microbiology. Mosby, London.

11. Rhajaouri, M.; Oumzil, H.; Faid, M.; Lyagubi, M.; Elyachioui, H. & Benjouad, A. (2001). Antibacterial activity of Amroccan propolis extracts. Sci. Letters. 3:121-126.

12. Velikova, M.; Bankova, V.; Sorkun, K.; Popov, S. & Kujumglev, A.(2001). Chemical composition and biological activity of propolis from Turkish and bulgarian origin. Mellifera. 1:57-59.

13. Miorin, P. L.; Junior, N. C.; Custodia, A. R.; Bretz, W. A. & Marcucci, M. C. (2002). Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against S.aureus. J. Appl. Microbial., 95:112-114.

14. حمزة، عارف سالم. (1998). البروبولس الشافي الطبيعي تركيبه، جمعه، طرق العلاج. دار علاء الدين– دمشق، سوريا.

15. Krell, R. (1996). Value-Added products from Beekeeping. Agricultural services bulletin. PP.124.

16. Al-Mohana, A. M. (2004) .A study of activity of local alcoholic propolis extract in the treatment of the external wounds that experimentally infected with some pathogenic bacteria and fungi in mice. A thesis. College of vet. Medicine. Baghdad university.

17. Cafarchia, C.; Milillo, M.; Losacco, V. & Puccini, V.(1999). Antifungal activity of propolis on different species of candida. Mycoses.44:375-378.

18. Kujumgiev, A.; Tsvetkova, I.; Sevkedjieva, Y.; Bandova, V.; Chiristov, R. & Popov, S. (1999). Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. J. Ethnopharmacol.64:235-240.

19. Mirzoeva, O. K.; Grishanin, R. N. & Colder, P. C.(1997). Antimicrobial action of propolis and some of its components: The effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. Microbial. Res.,152:239- 246.

20. Takaisi-Kikuni, N. B. & Schilcher, H. (1994). Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of adefined propolis provenance. Planta. Med., 60: 222-227.