جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة القادسية

كلية: العلوم - قسم علوم الحياة

الفعالية التثبيطية للقرنفل (cloves) في نمو بكتريا Pantoea Spp داخل وخارج الجسم

اعداد الطالبة

حوراء باسم كريم

بأشراف

أ.م.د سيوف خومان

2019- م 1440- هـ

بسم الله الرحمن الرحيم

(هو الذي انزل من السماء ماءً لكم منه شراب ومنه شجر فيه
تسيمون ۝ ينبت لكم به الزرع والزيتون والنخيل والاعناب ومن
كل الثمرات ان في ذلك لأيةً لقوم يتفكرون)

صدق الله العلي العظيم

سورة النحل

الآية (10-11)

الاهداء

الى من غرسا الايمان والحق وحب الخير في اعماق نفسي

يامن تعجز عن وصفهم الكلمات وكل الكلمات

الى امي و ابي حبا وتقديراً والى اخوتي محبة واعتزاز .الى

كل من قدم لي النصح والعون

عرفانا واحتراماً

كلمة شكر

الحمد والشكر لله رب العالمين على النعم الكثيرة التي منَّ بها علي والصلاة والسلام على

سيدنا محمد وعلى اله واصحابه ومن دعا بدعوته الى يوم الدين .

يسرني ان اتقدم بالشكر والتقدير الاستاذة المشرفة

(سيوف خومان) لتفضلها بالأشراف على البحث ومتابعتها المستمرة التي ساعدت

بإخراجه بشكله الحالي ولا يفوتني ان اتقدم بالشكر الى اساتذتي في كلية العلوم/قسم علوم

الحياة لما قدموه من معرفة علمية واخيرا شكري وتقديري الى جميع من ساعدني في اعداد

هذا البحث وفاتني ذكر اسمه

المحتويات

الموضوع	الصفحة
العنوان- الآية- الإهداء- شكر وامتنان- المحتويات	5-1
الخلاصة	6
المقدمة	7
مكونات البحث جمع العينات- عزل البكتيريا	8
تشخيص البكتيريا	9
المواد وطرق العمل	11-9
النتائج والمناقشة	14-12
المصادر	16-15

الخلاصة:-

تضمن البحث الفعالية التثبيطية لمستخلص القرنفل في نمو بكتريا Pantoea Spp. وأظهرت البكتريا حساسيتها بزيادة التركيز كما حددت قيمة ال MIC حيث كانت (40) ملغم/مل التركيز المثبط الأدنى لنمو البكتريا وان قيمة (LD50) عند التركيز (800) ملغم/كغم. وأكدت هذه النتائج كفاءة المستخلص في توفير حماية للحيوانات المعاملة وعلى مدار سبعة أيام من خلال المحافظة على معايير الدم الفسلجية وعدم وجود تغييرات غير طبيعية في أنسجة الكبد والكلية مع وجود تغيير في معايير الدم الفسلجية وتغييرات نسجية في الأعضاء المدروسة للحيوانات المعاملة ببكتريا Pantoea Spp.

اختبرت جميع عزلات بكتريا Pantoea Spp. للتحري عن انتشار جينات الضراوة بينها باستعمال تقنية سلسلة تفاعل انزيم البلمرة PCR (Monoplex) اذ سجلت اعلى نسبة تواجد للجين Hrpg فقد كانت عدد العزلات الحاوية عليه 19 عزلة وبنسبة (16،97%) يليه جين Hrc بنسبة (83،70%) بواقع 17 عزلة اما عدد عزلات هذه البكتيريا الحاوية على الجين Avrexace2 فقد بلغ عزلة بنسبة (16،54%) اما بالنسبة لتواجد جين RCSA فقد سجل نسبة (42،68%) بواقع 13 عزلة. في حين لم تسجل الدراسة الحالية اي نسب لتواجد جينات الضراوة (Avrxace1, Rcsb, Hpaa, Acrab) بين عزلات بكتريا Pantoea Spp.

المقدمة:-

القرنفل هو براعم الإزهار المجففة لشجرة القرنفل وهو من أقدم التوابل مكوناته الرئيسية زيت القرنفل الطيار مضاد قوي للجراثيم، الاوجينول (Eugenol) نسبته (85،79%) اكبر واهم مركبات الزيت الطيار وهو مخدر قوي ومطهر، لذلك فهو مفيد في تسكين ألم الأسنان أما الاستيل اوجينول الموجود في الزيت الطيار أيضا فقد تبين انه مضاد قوي لتشنج العظلات (Barnes,ET AL., 2002) يستعمل القرنفل كذلك لتخفيف السعال ولتنبيه الجهاز الهضمي ويستعمل بكثرة في طب الأسنان كمسكن موضعي يدخل في تحضير المضمضة المستعملة في علاج جروح وقروح اللثة ويمكن استعماله كعلاج لقروح الجلد ورمل العين (الجنجل) كما يستعمل بصورة واسعة كغسول أو تعقيم للفم من الميكروبات والمادة الفعالة فيه هي Phenol Ether (Bisset, 1994) .

كذلك أثبتت الادراسة التي أجراها Lee وجماعته (2000) بأن المواد الفعالة في القرنفل تمتلك فعالية ضد الأكسدة مما يؤدي الى احتفاظ الجسم بمستويات عالية من الأحماض الدهنية ويعد من المواد الآمنة الاستخدام وذو تأثيرات جانبية نادرة.

جمع العينات:- **Collection Of Samples**

جُمعت 483 عينة من الحالات السريرية و 140 من العينات البيئية من مستشفيات الديوانية التي تضمنت مستشفى الديوانية التعليمي العام ومستشفى النسائية والأطفال التعليمي ومركز الحروق التخصصي والاستشارية الصدرية ومختبر الصحة العامة للمدة من تشرين الاول 2017 الى حزيران 2018 من المرضى الراقدين والوافدين الى المستشفيات المذكورة وبأعمار مختلفة لكلا الجنسين، حيث أُخذت مسحات (Swabs) من عينات سريرية مختلفة شملت الادرار (82) عينة ومسحات بلعوم (23) عينة والاذن (49) عينة ومرضى غسيل الكلى (83) عينة والبراز (عينات اسهال وغائط صاب) (27) عينة والقيح (31) عينة والجروح (44) عينة والحروق (70) عينة والقشع (74)عينة، اما العينات البيئية فقد شُملت الأرضية (30) عينة والأدوات الطبية (40) عينة والأجهزة (20) عينة والجدران (30) عينة والاسرة (20) عينة استعملت المسحات القطنية الطبية الحاوية على وسط ناقل Transport Media Swabs في جمع العينات لضمان حيوية العزلات، وبعدها اجريت الاختبارات اللازمة الزرعية والكيموحيوية في مختبر كلية العلوم/ جامعة القادسية للحصول على بكتريا Pantoea Spp .

عزل البكتيريا:- **Isolation Of Bacteria**

لقحت الاوساط الزرعية اگار الماكونكي Macconkey و اگار الدم Blood Agar بمسحات العينات بطريقة التخطيط وبعدها حُضنت بدرجة

حـرارة 37م لمـدة 18-24 سـاعة وحُضـنت الاطبـاق التـي لـم يظهـر فيهـا نمـو خلال 24 ساعة لمدة 24 ساعة اخرى قبل ان تعد نتيجة سالبة.

تشخيص البكتريا:-

شُخصـت المسـتعمرات البكتيريـة اعتمـادا علـى الشـكل واللـون والحـواف والقـوام وسـطح المسـتعمرات وتمييـز الـروائح المميـزة لهـا والنمـو أو عـدم النمـوعلى الأوسـاط التفريقيـة (Differential Media) والانتقائيـة (Slective Media) وكـذلكنمط التحلـل الـدموي علـى وسـط اگـار الـدم، وتخمـر اللاكتـوز علـى وسـط المـاكونكي، كمـا فحصـت العينـات مجهريـا مـن خـلال اخـذ مسـحة مباشـرة مـن المسـتعمرات الناميـة علـى الاوسـاط الزرعيـة ولوحظـت الصـفات المظهريـة للخلايـا التـي شـملت شـكل الخليـة البكتيريـة، انتظـام وترتيـب الخلايـا البكتيريـة مـع يعضـها وطبيعـة تفاعلهـا مـع صـبغة گـرام (موجبـة أو سـالبة) .Winn,G.W. كمـا اجريـت الفحوصـات الكيموحيويـة التـي تضـمنت اختبـار الكـاتليز، اختبـار الاوكسـيدز, اختبـار انتـاج غـاز كبريتيـد الهيـروجين، اختبـار قابليـة الحركـة، اختبـار تخمـر الكربوهيـدرات، مجموعـة اختبارات (Macfaddin, G.F) و (Brown, A2007).

المواد وطرق العمل:-

1 -تحضـير المسـتخلص الكحـولي:- تـم تحضـير المسـتخلص الكحـولي للقرنفـل حسـب الطريقـة الـواردة فـي (Harbone, 1984) وذلـك بإضـافة 100مـل مـن الكحـولالأثيلي تركيـز 70% الـى 10غـم مـن مسـحوق القرنفـل فـي وعـاء محكـم وبعـد الإذابـة رشـح المحلـول ثـم ركـز

باستخدام جهاز المبخر الدوار وحضرت التراكيز اللازمة (5%، 10%، 15%، 20%، 25%، 30%) لحين الاستعمال.

2 -تحضير المزروع البكتيري:- شخصت بكتيريا الاختبار أوليا في المستشفى التعليمي في الديوانية وأجريت الفحوصات البايوكيميائية لـ Pantoea Spp استناداً الى (Collee, Etal., 1996; Macfaddin, 1979) للتأكد من عزلة الاختبار. ثم لقحت أنابيب زجاجية ومعقمة حاوية على الوسط الزرعي Brain-Hert Infusion Broth بـ 0.1مل من العالق البكتيري وحضنت بدرجة حرارة 37مْ ولمدة 24 ساعة. بعدها عدل التركيز المعلق بواسطة Normal Slaine للحصول على عكارة مساوية لأنبوب ماكفرلاند رقم 0.5 المستخدمة في قياس الكثافة البكتيريا والتي تساوي 1.5 $Cfu10^{8x}$ (Collee, Et Al., 1996).

3 -اختبار حساسية بكتريا Pantoea Spp لمستخلص القرنفل:-

أ - طريقة الانتشار بالاكار:- اتبعت طريقة الانتشار بالاكار في الحفر (Wells) (Egroove, 1985) في هذا الاختبار وذلك من خلال تهيئة أطباق حاوية على وسط Muller Hinton Agar لقحت أولا بعالق بكتريا Pantoea Spp وبمعدل 0.1مل/ طبق ونشرت على سطح الوسط، بعد ذلك عملت حفر بقطر 5ملم في كل طبق ثم أضيف 0.2مل من المستخلص وبواقع ثلاث مكررات إضافة الى السيطرة ثم تركت في الثلاجة مدة 30 دقيقة لانتشار محاليل المستخلص ثم حضنت بدرجة 37مْ لمدة 24ساعة. قرئت النتيجة على أساس قياس قطر التثبيط Inhibition Zone بواسطة المسطرة (saxena, et al., 1995) .

ب تحديد قيمة MIC:- لتحديد قيمة Mic لمستخلص القرنفل الكحولي اتبعت طريقة العكارة وذلك بمزج 2غم من مسحوق القرنفل الى 10مل من وسط Brain Heart Infusion Broth المعقم، ثم حضرت التخافيف اللازمة(5,160.80.40.20.10)ملغم/مل بالإضافة الى وسط السيطرة لقحت الأنابيب جميعا بـ 0.1مل من العالق البكتيري المقارن بأنبوبة ماكفرلاند وحضنت بدرجة حرارة 37مْ لمدة 24 ساعة، تقرأ النتيجة على أساس وجود أو عدم وجود نمو في الأنابيب لتحديد قيمة Mic (Ncci, 1984).

النتائج والمناقشة :-

1 -تـم إجـراء الفحوصـات التأكيديـة علـى بكتريـا الاختبـار والتـي تضـمنت أشـكال الخلايـا البكتيريـة ومظهـر المسـتعمرات ومـن خـلال إجـراء الفحوصـات البايوكيميائيـة (جـدول رقـم 1) بالمقارنـة بالنتـائج القياسـية المـذكورة مـن قبـل(Collee Et Al., 1996) وجـد بأنهـا بكتريـا Pantoea Spp.

(جدول رقم 1)

ت	الاختبار	النتيجة
1	صبغة كرام	-
2	إنتاج الاندول	-
3	فحص فوكس بروسكاور	-
4	انتاج إنزيم الكاتليز Catalase	+
5	انتاج إنزيم تحلل اليوريا Urease	-
6	انتاج إنزيم الاوكسيديز Oxidase	+
7	الحركة	+
8	تخمر سكر الكلوكوز	+

9	تخمر سكر السكروز	-
10	تخمر سكر اللاكتوز	-
11	تخمر سكر المالتوز	+
12	تخمر سكر الفركتوز	+
13	تخمر سكر المانيتول	-
14	انتاج Lecithinase	+
15	استهلاك السترات	+
16	تكوين السبور	_

2 -**اختبار حساسية بكتريا Pantoea Spp لتراكيز مختلفة من مستخلص القرنفل**:- يتضح من (الجدول رقم 2) بأن البكتريا Pantoea Spp أبدت حساسية لمستخلص القرنفل بالتركيز 10% حيث بلغ قطر التثبيط 4.1ملم وازداد هذا القطر بزيادة التركيز فعند التركيز 30% أصبح قطر التثبيط 30ملم وهذا يتفق مع ما أشار اليه (Taylor, Et Al., 1996) بأنه كلما يزداد التركيز تزداد نسبة التثبيط ويعزى ذلك الى ازدياد المواد الفعالة بزيادة تركيز المستخلص.

(جدول رقم 2)

تركيز المستخلص الكحولي	%5	%10	%15	%20	%25	%30
Test (العالق البكتيري)	0	4،1	8،1	10	19	30

Control (السيطرة)	-	-	-	-	-	-

-يدل على عدم وجود تثبيط

3- تحديد قيمة Mic للمستخلص الكحولي للقرنفل:- في جدول رقم 3 تم تحديد قيمة Minimum Ihibition Concentration (Mic) لمستخلص القرنفل الكحولي لنمو البكتريا إذ بلغ 40ملغم/مل، كذلك إن قيمة Mic تزداد مع زيادة تركيز المستخلص حيث أبدت البكتريا مقاومة للتراكيز الواطئة (العمار،2001).

(جدول رقم 3)

قيم الـ Mic لمستخلص القرنفل الكحولي لنمو بكتريا Pantoea Spp

تركيز المستخلص الكحولي	5ملغم/مل	10ملغم/مل	20ملغم/مل	40ملغم/مل	80ملغم/مل	160ملغم/مل
Test (العالق البكتيري)	+ev	+ev	+ev	-ev	-ev	-ev
Control (السيطرة)	+	+	+	+	+	+

المصادر:-

1 -الـراوي، خاشـع وعبـد العزيـز خلـف الله (1980)، تصـميم وتحليـل التجارب الزراعية، دار الكتب للطباعة والنشر- جامعة الموصل.

2 -الصـراف، عبـاس محمـد جـواد، (1981). دراسـة بعـض الصـفات الكيميائية الدوائية لبصلة الثوم، كلية الطب البيطري- جامعة بغداد.

3 -العمـار، مهـدي حسـين، (2001). تـأثير مسـتخلص البـر وبـولس فـي نمو الجراثيم الممرضة، رسالة ماجستير كلية العلوم- جامعة الكوفة.

4 -سـود، رمنيـك (1992). تقنيـة المختبـر الطبـي: طرائـق وتفسـيرات ترجمـة: د.صـالح خمـيس، د.عبـدالرزاق جبـار، د.بـاقر عبـيس، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. بغداد، العراق.

5 - Barnes, J. Anderson. J. A. Phillipson. J.D.;Herb. J. Medicenes Agude For Healthe Are Proffissionals. Second Edition. London. Phamaceutical Press-2002.

6 - Bisset, N.G.Ed. Harbal Drugs And Phytopharmaccutical Translated From Second Edition Boca Roron Crc Press 1994.

Brown, B.A.(1976). Hematology: Principles And Procedures.2nd., Lea And Febiger, Philadelphia. - 7

Brown, A. (2007). Bensons Microbiological Application Laboratory Manual In General Microbiology. Mcgraw- Hill Co. Inc. Usa. P: 102-263. - 8

Collee, J.G., Fraser, A. G., Marmion, B.P. And Simmons, A. (1996). Practical Medical Microbiology. 14th Ed. Churchill Livingstone, Usa. - 9

Egroove N. S. (1985). Antibiotics Ascintific Approach. Mirpublishers, Moscow. - 10

Harbone, J.B. (1984). Phytochemical Method. Aguids To Modern Techniques Of Plants Analysis. 2ed. Ed. London, Newyrk, Chapman And Hall. - 11

Macfaddin, J.F. (2000). Biochemical Tests For Identification Of Medical Bacteria 3rd Ed. Lippincott Williams And Wilkins, Usa. - 12

Saxena, G; Farmer, S.; Hancock, R.E.W. And Towers, G.H.N. (1995). Antimicrobial Compounds From Abnus Rubra. Int. J. Of Pharm. Co. Gnosy, 33 (1): 33-36. - 13

Taylor, R.S.L.; Manandhar, N. P.; Hudson, J.B. And Towers, G.H.N. (1996). Antiviral - 14

Activity Of Nepales Medicinal Plants. J. Of Ethnal Pharmacology 52:156-163.

Winn, J.W.; Allen, S.; Janda, Koneman, E,; Procop, G., Schreckenberger, P. And Wood, G. (2006). Koneman`S Color Atlas And Textbook Of Diagnostic Microbiology, 6th Ed., Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia, Pp: 239-270. Usa. - 15