عزل المسببات البكتيرية من الحليب ودراسة حساسية هذه المسببات للمضادات الحيوية والمستخلصات النباتية

ميسون صباح عباس
كلية الطب البيطري/ جامعة بغداد

الخلاصة

هدفت الدراسة عزل المسببات البكتيرية من الحليب ودراسة حساسيتها للمضادات الحيوية والمستخلصات النباتية اذ تم جمع 100 عينة حليب من منطقة ابو غريب في مدينة بغداد وزرعت النماذج على اوساط زرعية مختلفة للتحري عن وجود المسببات البكتيرية في عينات الحليب واظهرت نتائج العزل الجرثومي نسبة 31% لل *Staphylococcus aureus* و73% لل *Streptococcus* group D و 31% لل *Escherichia coli* و 13% لل SPP *Klebsiella* و4% لل Pasteurella spp و3% لل Salmonella spp وتم دراسة حساسية البكتريا لـ 8 أنواع من المضادات الحيوية : Tobramycin (TOB) و Ceftazidime (CAZ) و Vancomycin (VA) و Ampicillin (SAM) و Sulbactam و Cloxacillin (CX) و Cefalothin (KF) و Colistin (CL) و Amoxacillin Clavulanic acid(AMC) واظهرت نتائج معدلات اقطار التثبيط للمضادات الحيوية في هذه الدراسة ان جرثومة S. aureus و Streptcoccus كانت اكثر حساسية للمضاد الحيوي (KF) واظهرت جرثومة E.coli اكثر حساسية للمضاد الحيوي (CL)وكانت جرثومة *Klebsiella* و Salmonella اكثر حساسية للمضاد الحيوي (CAZ) واظهرت جرثومة Pasteurella اكثر حساسية للمضاد الحيوي (TOB) . وتم دراسة حساسية البكتريا للمستخلصات النباتية حيث حظرت المستخلصات الكحولية للنباتات للفلفل الأسود (*Piper nigrum*) و الكبابة (*Piper cubeba*) والكافور (*Cinnamomum camphora*) والمر (*Commiphora mol mol*) وبذور الحلبة (*Trigonella foenum-graecum*) وبذور الحبة الحمراء (*Lepidium sativum*) . حيث استخدمت المستخلصات الكحولية لهذه النباتات بتركيز 200 ملغم / مل وقد بينت النتائج بان البكتريا المعزولة في الدراسة كانت اكثر حساسية للمستخلص الكحولي للكبابة والكافور ولم تظهر تاثرآ بالمستخلصات الاخرى .

المقدمة

يعد الحليب الخام من الاغذية الضرورية التي يستهلكها جميع الناس من مختلف البلدان وكما يعد احد المجموعات الغذائية الرئيسية التي تحتوي على البروتينات والدهون والكاربوهيدرات والفيتامينات والاملاح (1) .وتعد الابقار المنتج الرئيسي للحليب من بين حيوانات المزرعة في العالم اذ تسهم بحوالي 90% من الانتاج الكلي للحليب (2) . ويعتبر الحليب من المواد الغذائية الغنية بقيمتها الغذائية مما يجعله وسط مثالياً لنمو وتكاثر الجراثيم بصورة عامة مما يشكل مصدرآ مهماً من مصادر التسمم الغذائي ونقل الامراض المختلفة للانسان (3) .هناك حاجة ماسة ومستمرة للكشف عن مضادات ميكروبية جديدة ذات تراكيب كيميائية متنوعة واليات عمل قيمة لأن هناك زيادة في حدوث أمراض معدية متكررة وجديدة والسبب الكبير الآخر هو تطور المقاومة للمضادات الحيوية المستعملة بصورة مستمرة. وفي الوقت الحالي لجأ العلماء إلى إجراء أبحاث جديدة للنباتات للتغلب على مقاومة الميكروبات للمضادات الحيوية والحصول على علاجات طبيعية لتقوية المناعة، ان النباتات لها القدرة على تصنيع مركبات كنواتج ايضية ثانوية تتواجد في البذور والاوراق أو في الجذور. ومن هذه المركبات ما يكون لها دور من الناحية الطبية، فمثلا الفلفل الأسود والكبابة استعملا بصورة شائعة في وجبات الطعام والطب الشعبي كونها تضيف نكهة ورائحة للأطعمة اضافة الى كونها مواد حافظة وذات قيمة طبية (5,4). يحتوي الفلفل الأسود على مركب Catecol pyrolgallolوهو مركب سام للمكروبات (6)، حيث أن المستخلص المائي والكحولي للفلفل الأسود ذو فعالية مضادة للمكروبات وللسرطان (7)، والمستخلص المثيلي للفلفل الأسود والكبابة ذو فعالية للأكسدة لأحتوائهما على مركبات Isoflavones, Flavones, Flafonoid, Coumarin anthocycinin كمضادات أكسدة والتي تستخدم لعلاج أمراض معقدة كداء السكر والالزهايمر والسرطان (8). تعد الكبابة مضاد لفطري *Aspergillus fumigatus* و A. niger (9)، لذا أستخدمت الزيوت الطيارة Citral للكبابة في حفظ الأغذية (10)، كما تحتوي الكبابة على مركب O- benzylcubeben الذي له فعالية تثبيطية وقاتلة لفطر *Candida albicans* (11).سجل المسلمون الأوائل العديد من الاستعمالات الطبية ل Oleo- gum resin المستخرج من نبات المر فقد أستعمل لعلاج الجروح واضطرابات الأمعاء والاسهال والسعال فضلا عن علاج التهاب اللثة وعلاج الديدان الكبدية (Fascioliasis)، ومن فوائده أيضا علاج الطفيليات المعوية ومنها البلهارزيا وتقوية الاسنان وعلاج لسعة الأفعى وأيضا لمنع انتشار الموات (Gangrene) في الأجزاء المصابة من الجسم (13,12). أظهر التحليل الكيميائي Phytochemical للمستخلصات المثيلية (Methanolic extract) لنبات المر العائد لعائلة Lauraceae وجود المركبات الفينولية (Phenols) ،و القلويات، والصابونين (Saponines)، ووجدت بدرجة أقل في المستخلصات الكحولية الاثيلية (Ethyl acetate) ومستخلصات الايثر (14).يوجد نبات الحلبة في الطبيعة وهو نبات طبي معروف بخصائصه فهو يقلل نسبة السكر بالدم ومضاد ميكروبي ومضاد للالتهاب ومضاد للتقيؤ

ومضاد جرثومي وتعود الحلبة إلى عائلة Papilionaceae، فهي تحتوي على اللسثين Lecithin و الكولين Choline الذي يساعد في إذابة الكولسترول والمواد الدهنية، ويحوي معادن وفيتامين ب المركب (B-complex)، وحديد، وفوسفات، و PABA (Para Amino Benzoic Acid) ، وفيتامين A و D ، ويحوي أيضا نيورين Neurin ، و بايوتين Biotin ، و Trimethylamine الذي يحفز الشهية(15). تحتوي بذور الحبة الحمراء العائدة لعائلة Brassicaceae على مركبات كيميائية عدة منها الفاتوكوفيرول (α- tocopherol) وحامض الاسكوربك (Ascorbic acid)، و Benzyl-isothiocyanate ،و بيتاستوستيرول (β-sitosterol)، واليود، ونياسين، وحامض لينولك (Linoleic acid) والفلافونويدات والكومارين وكلايكوسيدات الكبريت والتربينات الثلاثية وستيرول (17,16). وتستخدم الحبة الحمراء لعلاج ارتفاع ضغط الدم وأمراض الكلى (18)، وأشار (19) أن المستخلص المائي والكحولي له تأثير مدر في الجرذان. ينتمي الكافور الى العئلة الفلفلية، يستخدم في مجال الطب البيطري كمسكن ومطهر، أما في الانسان يستخدم في علاج الروماتيزم والامراض التنفسية وهبوط الدورة الدموية، الا أن الجرع العالية تكون قاتلة وتنتقل عبر المشيمة مما يسبب تسمم الجنين (20)، ويحتوي على مركب Cinnamaldehyd وهو مركب قوي يستخدم كمطهر وغسول فموي (21).من كل ما تقدم تهدف الدراسة الحالية إلى إيجاد بدائل للمضادات الحيوية من المستخلصات النباتية والتي يمكن استعمالها في العلاجات والتقليل من مقاومة الانسان للمضادات الحيوية والناتجة عن متبقيات هذه المضادات في الحليب التي يمكن استعمالها كمواد مثبطة للبكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام وبالتالي إيجاد علاجات بديلة أمينة ورخيصة وكفوءة بالوقت نفسه.

المواد وطرائق العمل

اولا: جمع العينات

تم جمع العينات في قناني زجاجية نظيفة ومعقمة وتم جلبها من المختبر بصورة مبردة وتم التعامل مع العينات بشكل الاتي: تم ترسيب عينة الحليب في جهاز الطرد المركزي 5000 دورة / دقيقة ولمدة 15 دقيقة تم التخلص من الطافي والحصول على الراسب المتبقي حيث تم الزرع على الاوساط الزرعية من الراسب الناتج حيث زرعت النماذج على اوساط زرعية مختلفة مثل Manitol salt Agar و Kanamycin Agar و Mac – conkey Agar و Salmonella – Shigella Agar و Eosin methelne blue . وبعد ظهور النموالبكتيري تم عمل الفحوص الكيموحيوية والفحص المجهري المباشر لغرض تتشخيص البكتريا المعزولة (22) .

ثانيآ : المضادات الحيوية :

تم استعمال المضادات الحيوية في هذه الدراسة 8 أنوع هي كما يلي :

Tobramycin (TOB 10 µg), Ceftazidime (CAZ 30 µg), Vancomycin (VA 30 µg), Sulbactam Ampicillin (SAM 10 µg), Colistin (CL 10 µg), Cloxacillin (CX 1 µg), Cefalothin (KF 30 µg), Amoxacillin clavulanic acid (AMC 30 µg).

ثالثآ: النباتات المستخدمة :

اختبرت حساسية الأنواع البكتيرية لستة مستخلصات نباتية للفلفل الأسود والكبابة والكافور والمر والحلبة والحبة الحمراء . إذ جرى الحصول على تلك النباتات من الأسواق المحلية لمنطقة الحرية في مدينة بغداد وتم تصنيفها في الهيئة العامة لفحص وتصديق البذور قسم النبات والمصادر الوراثية – بنك الجينات .

رابعآ : تحضير المستخلصات النباتية:

حضرت المستخلصات النباتية حسب طريقة (23) كآلاتي:-

جرى طحن البذور كل على حدة بصورة ناعمة ووضعت في قنان زجاجية نظيفة، وبعد ذلك أخذ 100غم من المسحوق النباتي الجاف وتم وضعه في دورق مخروطي سعة 1000 مل، وأضيف له 500مل كحول أثيلي بتركيز 70% وترك منقوعا لمدة 24ساعة بدرجة حرارة الغرفة، بعد ذلك رسب المزيج باستخدام جهاز الطرد المركزي 3000دورة/ دقيقة لمدة 15دقيقة ورشح باستخدام ورق الترشيح Whatman No.1، وبخر المحلول بجهاز المبخر الدوار Rotary vacuum evaporator بدرجة حرارة 40°م لحين الحصول على شكل كثيف إذ جفف في الحاضنة بدرجة 37°م خلال 3-4 يوما وحفظ المسحوق الناتج في الثلاجة لحين الاستعمال، وحضر محلول خزين (Stock solution) من المستخلص النباتي بإذابة كل 1غم في 5مل ماء مقطر معقم بتركيز 200ملغم/ مل وجرى قياس الأس الهيدروجيني له، ورشح المحلول باستعمال ورق Whatman membrane filter قياس 4.5µm ، جرى تشبع أقراص من ورق الترشيح بالمستخلص الكحولي للنباتات المختلفة.

خامساً : إجراء فحص الحساسية:

أتبعت طريقة Disk Diffusion Method (24). أخذت 4- 5 مستعمرات مفردة نقية من سطح أكار الدم بواسطة ناقل جرثومي loop معقم ووضعت في أنبوب اختبار يحوي 4 مل من وسط المرق المغذي (Nutrient broth) ورج جيدا بحيث يكون عتمة مقاربة لأنبوب ماكفرلند (MacFarland tube) رقم 0.5 الذي يحوي 1×10^8 CFU/ ml (أستخدم هذا العدد لجميع العزلات المدروسة).جرى بعد مرور 1-2 ساعة زرع أطباق بتري تحوي وسط Mueller Hinton agar بالعالق البكتيري الذي حضر ، زرع سطح الأكار بواسطة مسحة قطنية (Cotton swab) معقمة بعد أن جرى التخلص من الكميات الزائدة من العالق البكتيري بضغط المسحة القطنية بقوة بجدران

أنبوب الاختبار من الداخل، وبعدها جرى تخطيط الأكار من جميع الجهات لكي تتوزع الكمية بالتساوي، وأستخدم طبقان لكل عترة جرثومية وتركت الأطباق لتجف لمدة 15- 30 دقيقة. بعد ذلك وضعت أقراص المضادات الحيوية بواسطة ملقط معقم على سطح الأكار المزروع. أستخدم 4 أقراص لكل طبق بينها مسافات متباعدة متساوية بين القرص والآخر وحضنت الأطباق في الحاضنة بدرجة 37 °م لمدة 18- 24 ساعة.اتبعت الطريقة نفسها للمستخلصات النباتية، اذ أستخدمت أوراق ترشيح قصت بحجم 5 ملم وشبعت بالمستخلصات النباتية المختلفة بتركيز 200 مايكروغرام/ مل. جرى قياس قطر منطقة التثبيط حول أقراص المضادات الحيوية وأقراص المستخلصات النباتية بالمليمتر بواسطة المسطرة الاعتيادية.

النتائج

يبين الجدول (1) معدلات أقطار تثبيط نمو البكتريا بالمستخلصات النباتية، حيث أظهرت جميع العزلات المدروسة حساسيتها تجاه مستخلص الكبابة بمعدلات تراوحت بين 9.7 – 12.2 ملم بالمقارنة مع المستخلصات الأخرى. كما اظهرت العزلات المدروسة حساسيتها اتجاه مستخلص الكافور بمعدلات تراوحت بين 9 – 11.1 وكانت المستخلصات الاخرى دون تاثير تثبيطي يذكر .

الجدول (1): معدلات أقطار تثبيط المستخلصات النباتية بالملم تجاه البكتريا

	معدلات أقطار تثبيط المستخلصات (بالملم)					
البكتريا	الفلفل الأسود	الكبابة	الكافور	المر	الحلبة	الحبة الحمراء
Staphylococcus aureus	± 0.0 c 5	9.7 ± 1 b	± 0.4 a 11.1	5 ± 0.0c	5 ± 0.0 c	5 ± 0.0 c
Streptococcus group D	± 0.2 b 5	11.2 ± 0.6 a	±0.4 a 11.04	± 0.2 b 5.1	± 0.5 b 5.6	±0.0 b 5.1
Escherichia coli	± 0.0 c 5	11 ± 0.9 a	9 ±0.6 b	± 0.1 c 5.4	± 0.2 c 5.4	± 0.3 c 5.6
Klebsiella SPP	± 0.0 b 5	± 1.3 a 10.1	9.7 ± 1 a	± 0.0 b 5	± 0.0 b 5	± 0.0 b 5
Pasteurella spp	± 0.0 c 5	± 0.0 a 12.2	10 ±0.0 b	± 0.0 c 5	5 ± 0.0 c	± 0.0 c 5
Salmonella spp	± 0.0 b 5	± 2.8 a 10	9.7 ± 1 a	± 0.0 b 5	± 0.0 b 5	± 0.0 b 5

الحروف الصغيرة المختلفة تدل على وجود اختلافات معنوية بين المستخلصات النباتية (الأعمدة) على مستوى احتمال ($P \leq 0.05$) .

يبين الجدول (2) معدلات أقطار تثبيط 8 من المضادات الحيوية لنمو ستة أنواع بكتيرية، اذ كان المضاد الحيوي KF اكثر فعالية بالنسبة *Staphylococcus aureus* و *Sterptococcus group D* اما المضاد الحيوي CL كان اكثر فعالية تجاه *Escherichia coli* واظهر المضادالحيوي CAZ اكثر فعالية بالنسبة *Klebsiella* SPP و Salmonella sppوكان المضاد الحيوي TOB ذو فعالية عالية بالنسبة Pasteurella spp .

الجدول (2): معدلات أقطار تثبيط المضادات الحيوية بالملم تجاه البكتريا

	MEAN ZONES OF INHIBITION OF ANTIBIOTICS (MM)					
Antibiotic	*Staphylococcus aureus*	*Streptococcus* group D	*Escherichia coli*	*Klebsiella* SPP	Pasteurella spp	Salmonella spp
TOB	± 1.3 c 13.1	10.1 ± o.8 d	± 1.8 a 15.1	± 0.5 c 13	14.2 ± 0.0 b	± 1.3 bc 13.6
CAZ	± 0.2 b 7.3	8.1 ± 0.9 b	7.8 ± 0.6 b	± 1.3 a 13.7	7.5 ± 0.0 b	14.5 ± 0.4 a
VA	8.8 ± 0.9 b	± 0.6 ab 9.3	10 ± 0.8 a	6.5 ± 1.4 c	6.5 ± 0.0 c	5 ± 0.0 c
AMC	±1.5 a 12.7	± 0.5 a 12.01	± 1.5 a 12.6	± 0.9 b 11.8	8.8 ± 2.3 d	10 ± 2.8 c
CX	± 0.5 b 6.4	6.8 ± 0.8 ab	7.5 ± 0.9 a	± 0.0 c 5.4	5 ± 0.0 c	5 ± 0.0 c
KF	± 1.1 a 13.4	12.8 ± 0.8 a	± 1.8 a 13.6	± 1.3 b 10.8	7 ± 0.0 c	10 ± 2.8 b
CL	± 1.1b 12.8	± 0.8 c 11.9	± 1.6 a 15.9	± 0.8 c 11.7	10 ± 0.0 d	8.3 ± 3.3 c
SAM	± 1.1b 10.8	8.7 ± 0.8 c	± 0.0 b 10.4	± 0.5 b 10.7	6.5 ± 0.0 d	12 ± 1.15 a

الحروف الصغيرة المختلفة تدل على وجود اختلافات معنوية بين المضادات الحيوية (الأعمدة) على مستوى احتمال ($P \leq 0.05$) .

المناقشة

اظهرت النتائج ان نسبة العزل الجرثومي لل *Staphylococcus aureus* كانت (31%) ونسبة العزل الجرثومي *Streptococcus* group D كانت (73%) في حين كانت نسبة العزل الجرثومي *Escherichia coli* (31%) ونسبة العزل الجرثومي *Klebsiella* SPP كانت (13%) ونسبة العزل الجرثومي لل Pasteurella spp كانت(4%) ونسبة العزل الجرثومي لل Salmonella spp كانت(3%) . وقد كانت نتائجنا مقاربة لنتائج (25) حيث تمكن من عزل 31 عزلة من *Staphylococcus aureus* من مجموع 124 عينة حليب ابقار . وكانت نتائج دراستنا تفوق نتائج دراسة (26) الى عزل جرثومة *Strept agalactiae* حيث شخصت 50 عزلة من هذه الجرثومة من مجموع 400 عينة حليب ابقار . وكانت نتائجنا تفوق نتائج الباحث (27) حيث تمكن من عزل جرثومة *Escherichia coli* بمقدار 13 عزلة من مجموع 60 عينة حليب ابقار. وتمكنت (28) من عزل جرثومة *Escherichia coli* من حليب الابقار وبنسبة 72 وسجل (29) عزل 72 عزلة من Salmonella spp في حليب من مناطق عديدة من محافظة نينوى وتمكنت (30) من تسخيص 30 عزلة من الساموئيلا Salmonella spp من مجموعة 600 عينة حليب خام . اعطت بذور الكبابة ثاثيراً تثبيطياً واضحاً للجراثيم المستخدمة في الدراسة إذ تراوحت أقطار التثبيط بين 9.7- 12.2 ملم و كانت نتائجنا أفضل من تلك التي حصل عليها(31) الذي استخدم ثلاثة أنواع من المستخلصات هي: كحول الميثانول، و الهكسان (n- hexane)، و dichloromethane (DCM) لدراسة الكفاية التثبيطية للكبابة تجاه *Bacillus subtilis*، و *B. cereus*، و *E. coli*، والاشيريكيا القولونية المقاومة للأمبسلين (Ampicillin resistant *E. coli*) ، والزوائف الزنجارية و المكورات العنقودية الذهبية و *Salmonella* Typhi ، لم تظهر المستخلصات أي فاعلية تثبيطية لنمو كل من *B. subtilis* و *E. coli* وتلك المقاومة للأمبسلين، بينما ثبط مستخلص الهكسان و DCM نمو كل من *B. cereus* و *P. aeruginosa* و *S. aureus* بأقطار تثبيط 12 و 10 و 17 ملم على التوالي للمستخلص الأول ، وأقطار تثبيط 23 و 8 و 16 ملم بالترتيب للمستخلص الثاني. بينما المستخلص الكحولي المثيلي كان كفوءا تجاه *B. cereus*(11 ملم) و *P. aeruginosa* (8 ملم).أشار (32) إلى أن المستخلص المائي والكحولي المثيلي لبذور الحبة الحمراء لم تظهر أي نتيجة تذكر عند اختبار فاعليتها تجاه *E. coli* و *K. pneumoniae* و جراثيم أخرى وهذا يتفق مع دراستنا ومع ما ذكره (16) إذ لم يعط المستخلص المثيلي للحبة الحمراء أي نتيجة في الجراثيم المدروسة وهي *S. aureus* و *S. epidermidis* وقد علل الباحث أعلاه النتائج السلبية بأن المركبات الفعالة قد تكون موجودة بكميات غير كافية في المستخلصات الخام لإعطاء فعالية بالجرع

المستخدمة، وحتى إذا كانت المادة الفعالة موجودة بكميات عالية فربما تكون هناك مكونات أخرى تظهر تأثيرات مضادة (antagonistic) للتأثير الايجابي للعوامل الفعالة بيولوجيا، أو قد تكون المستخلصات فعالة ضد أنواع جرثومية أخرى غير مستخدمة بالدراسة الحالية.واظهرت نتائج مستخلص الكافور معدلات اقطار تراوحت (9 – 11.1) في دراستنا أشار (33) الى أن زيت الكافور له فعالية مثبطة لنمو الفطريات ويلعب دورا مهما بامتلاكه تأثير معاكس للتهيج (counter irritant) وقد سجل قطر تثبيط 19 ملم تجاه المكورات العنقودية الذهبية وهو أعلى مما سجلناه، بينما لم يسجل أي نتيجة تذكر تجاه كل من *E. coli* و *P. aeruginosa* و .*Klebsiella* spp. بينما كانت النتائج جيدة في دراستنا اتجاه *Klebsiella* spp و*E. coli* وذكر (34) عند دراسته حساسية *E. coli* المعزولة من الأغذية تجاه المستخلصات النباتية، وجد أن الكافور لم يعط أي فاعلية تذكر عند استخدامه بتراكيز مختلفةعلى العكس في دراستنا . أشار(35) في دراسته إلى أن زيت الكافور سجل معدل تثبيط 8.5 ملم تجاه *K. pneumoniae* وهو اقل منما في دراستنا ومعدلات تثبيط 8.8 ملم و 10 ملم تجاه *E. coli* و *P. aeruginosa* على التوالي وهي اقل مما سجلناه ، في حين لم يسجل أي قطر تثبيط تجاه *S. aureus* على النقيض من دراستنا حيث سجلنا في دراستنا معدل قطر 9.7 ملم . استخدمت التربينات المستخلصة من نبات المر كمثبط لنمو *S. aureus* (36). وجد حديثا أن المر يمتلك فعاليات مضادة تجاه بعض عتر *S. aureus* و *S. enterica* و *K. pneumoniae* وكانت نتائج(14) للمستخلص المثيلي للمر اعلى من نتائج الاثيلي في دراسته .وبسبب الاستعمال الواسع لبذور الفلفل الأسود في معالجة أمراض مختلفة فقد درست فعاليته في أبحاث عدة ومنها أن له دور مضاد للجراثيم المسببة لفساد اللحوم، وأن مادة الببرين هي المركب الفعال المضاد للبكتريا الموجودة في الفلفل الأسود (37). أن المستخلص الكحولي والمائي للفلفل الأسود له فعالية تثبيطية ضد بكتريا الـ *S. aureus* المقاومة للبنسلين G (38)، كما سجل (39) ان المستخلص المائي للفلفل الأسود له تأثير قوي ضد جراثيم الـ *S. aureus* وبقطر تثبيطي 23 ملم، اما في الدراسة التي أجراها (40) وجد فعالية مستخلصاته تجاه *S. aureus* و *E. coli* و *P. aeruginosa* و *S. Typhi* ، فعند استعمال مستخلص كحولي 100% للفلفل الأسود لم يسجل قطر تثبيط في *S. aureus* وكذلك الحال في *E. coli* ذكر (41) أن *Piper guineense* الذي يشار إليه بصورة واسعة بالفلفل الأسود الأفريقي أو Ashanti pepper هو يشبه كثيرا الفلفل الأسود *P. nigrum* الذي يعد الفلفل الحقيقي والذي يحضر منه الفلفل الأسود والأبيض. سجل المستخلص الكحولي الاثيلي لـ *P. guineense* تاثير تثبيطي اتجاه *E. coli* واجرى (نان) دراسة حول تاثير الفلفل الاسود والابيض في 20 نوع من السامونيلا و 5 انواع من البكتريا المعوية ولكنه لم يسجل نتيجة تذكر وهذا يشابه نتائج دراستنا .أشار (42) إلى أن المستخلص الكحولي المثيلي لبذور الحلبة كان فعالا بقطر تثبيط 18 ملم تجاه عترة واحدة فقط (PTCC No.1330) لجرثومة *E. coli* ، لكنه لم يسجل نتيجة تجاه عترة (PTCC No. 1338) للجرثومة نفسها وهذا يفوق نتائج دراستنا . ذكر (43) أن المستخلص المثيلي لبذور الحلبة أعطى قطر تثبيط 9 ملم تجاه كل من *K. pneumoniae* (PTCC No. 1053 و *Bordetella bronchiseptica* (PTCC No. 1025) ولم يعط نتائج ايجابية تجاه كل من *M. luteus* و *Serratia marcescens* . أشار (44) إلى أن زيت الحلبة أظهر تثبيطا قويا تجاه *S. aureus* و *P. aeruginosa* وفطر *A. niger* و *A. fumigatus* ، فبذور الحلبة غنية بالمركبات الكيميائية فهي تحتوي على لايسين وبروتينات غنية بالحامض الاميني التربتوفان وألياف Mucilaginous ومكونات كيميائية أخرى مثل الصابونين والكومارين و Fenugreekine وحامض النيكوتين (Nicotinic acid) و Sapogenine و Phytic acid و Scopoletin و Trigonelline التي يعتقد أنها السبب في العديد من تأثيراته العلاجية، إذ أن الفينولات معروف أن لها خصائص مضادة للبكتريا من خلال إعاقة قوة حركة البروتون Proton Motive Force (PMF) مسببة بذلك تسرب المكونات داخل الخلوية وتثبيط الأنزيمات ونقل الإلكترون وعملية Oxidative phosphorylation وتجلط المكونات السايتوبلازمية (45). وأشار الباحث نفسه أن خلاصة الحلبة أظهرت فعالية عالية مضادة لجرثومة *Helicobacter pylori* وان هذه الفعالية قد تكون بسبب وجود Scopoletin وهو عبارة عن فينول، والكومارين المشتق من حامض Coumaric acid . مما تقدم ومن خلال وجود اختلاف وتوافق مع نتائج أخرى ومن الصعوبة المقارنة هناك عوامل عدة تؤثر على النتيجة منها العوامل البيئية التي نمى بها النبات ونوع المستخلص والطريقة المثالية للأستخلاص وطريقة الاختبار المستخدمة لتقييم المستخلص (46).عند مقارنة المستخلصات النباتية المختلفة مع المضادات الحيوية القياسية، وجدنا عند دراسة حساسية الـ *S. aureus*لبذور الكبابة كان معدل قطر تثبيط 9.7 ملم وهو اعلى من معدل قطر المضادات الحيوية (CX) و (CAZ) و (VA) وكانت حساسية الـ *S. aureus* للكافور 11.1 ملم وهو اعلى من حساسيتها للمضادات الحيوية (CX) و (CAZ) و (VA) و(SAM) اما بالنسبة لحساسية جرثومة الـ *S. aureus* لمستخلصات المر والحلبة والحبة الحمراء والفلفل الاسود فقد كانت 5 ملم وهي اقل من نتائج الحساسية للمضادات الحيوية اما بالنسبة لجرثومة الـ *Streptcoccus group D* فقد كانت حساسيتها للكبابة والكافور (11.2 ملم و 11.04 ملم) حيث كانت النتائج تفوق نتائج الحساسية للمضادات الحيوية (CX) و (CAZ) و (VA) و (SAM) اما بالنسبة لجرثومة الـ *E. coli* فقد كانت معدل قطر تاثير

الكبابة 11 ملم وهو اعلى من حساسيتها الى المضاد الحيوي(CX) و (CAZ) و (VA) و (SAM) وبالنسبة للكافور كان معدل قطر 9 ملم وهو اعلى من المضادات الحيوية (CX) و (CAZ) اما بالنسبة لجرثومة *Klebsiella* spp فقد كان معدل قطر الكبابة 10.1 ملم وهو معدل يقارب حساسيتها للمضاد الحيوي (KF) و (SAM) ويفوق معدل حساسيتها (CX) و (VA) وكان معدل قطر حساسيتها للكافور 9.7 ملم وهو يفوق (CX) و (VA) اما بالنسبة لجرثومة الـ *Salmonella spp* فكان معدل قطر الكبابة 10 ملم وهو يقارب معل قطر حساسيتها (KF) و (AMC) ويفوق (CX) و (VA) اما بالنسبة لمعدل قطر الكافور كانت 9 ملم وهو يقارب حساسيتها للمضاد الحيوي (CL) ويفوق(CX) و (VA) اما بالنسبة لجرثومة الـ *Pasteurella spp* فقد كان معدل قطر الكبابة 12.2 ملم وهو معدل يفوق حساسيتها للمضادات الحيوية (CX) و (CAZ) و (VA) و (SAM) و (CL) و(KF) و (AMC) بينما كان معدل قطر حساسيتها للمضاد الحيوي (TOB) يفوق حساسيتها للكبابة اما بالنسبة للكافور فقد كان معدل قطر 10 ملم وهو يقارب حساسيتها للمضاد الحيوي (CL) ويفوق (CX) و (CAZ) و (VA) و (SAM) و(KF) و (AMC) ومعل قطرها اقل من المضاد الحيوي (TOB) . وقد كانت معدلات اقطار حساسية الجراثيم المستخدمة في الدراسة بالنسبة للمستخلصات المر والحلبة والحبة الحمراء والفلفل الاسود بمقدار 5 ملم – 5.6 ملم وهي نتيجة تقارب بعض المضادات الحيوي مثل (CX) و(VA) في بعض منها . مما تقدم تبين لنا أن المستخلصات النباتية كانت فعالة تجاه العديد من أنواع البكتريا المدروسة لذا ننصح بإجراء دراسات موسعة حول النباتات الطبية ومحاولة استخلاصها بأكثر من نوع من المستخلصات ومقارنة المستخلص المائي والكحولي الاثيلي والمثيلي وغيرها من المستخلصات لكل منها لغرض استعمالها كعلاجات بديلة للمضادات الحيوية.

المصادر

1. Eck,A and Gillis J. (2001) . Chees Making 2 nd . Ed. Lavoisier Publishing . ISBNUK .
2. سعيد ، حيدر هادي . (2008) .اهمية فحص الخلايا الجسمية لتشخيص حالات التهاب الضرع وبعض العوامل المؤثرة عليها . دراسة دبلوم عالي .صحة عامة . كلية الطب البيطري جامعة بغداد .
3. المفتي ، مؤيد منير ظاهر . (2007) . التسمم الغذائي المتسبب من تناول الحليب الملوث بجراثيم *Salmonella typhimurium* دراسة دبلوم عالي .صحة عامة . كلية الطب البيطري جامعة بغداد .
4. DeSouza, E.L.; Stamford, T.L. and Lima, E.O. (2005). Antimicrobial effectiveness of spices: an approach for use in food conservation system. Braz. Arch. Biol. Technol. 48(4): 1516-8913.
5. عجينة، صبا جعفر؛ هندي، مازن جميل؛ و إبراهيم، عبد الغني (2007). تأثير مستخلصات الزيوت العطرية لبعض النباتات في نمو الأعفان . وقائع المؤتمر العلمي الثاني لعلوم الطب البيطري. كلية الطب البيطري- جامعة بغداد للمدة من 21- 20 تشرين الثاني 2007.
6. Cowan, M.M. (1999). Plant products as Antimicrobial Agents. Clin. Microbiol. Rev. 564-582.
7. Aqil, F., Ahmed, I.; Mehmood, Z. (2006). Antioxidant & free radical scavenging properties of twelve traditionally used Indian medicinal plants. Turk. J. Biol. 30: 177-183.
8. Khalaf , N.A. ; Shakya , A. K .; AL-Othman , A. ; EL- Agbar , Z. and Farah , H. (2008) . Antioxidant activity of some commen plants. Turk. J. Biol. 32: 51-55.
9. Balacs, T. Research reports (Fungal inhibition). (1991). Int. J. Aromatherapy. 3:30.
10. Balacs, T. Research reports (Fungal inhibition). (1992). Int. J. Aromatherapy. 4:31.
11. Silva, M.L.; Coimbra, H.S.; Pereira ALima, T.C. (2007). Evaluation of piper cubeba extract, (-)-cubebin & its semi-synthetic derivatives against oral pathogens. PTR. Phtotherapy research. 21: 420-422.
12. Khan, A. (2006). Aloe and Myrrh: modern day analysis of two ancient herbs. Tariq Magazine. 11(2): 36-37.
13. Sarah, M. (2004). Myrrh: magi, medicine & mortality. Pharmaceutical. J. 273: 919-921.
14. Abdallah, E. M.; Khalid, A. S. and Ibrahim, N. (2009). Antibacterial activity of oleo - gum resins of *Commiphora molmol* and *Boswellia papyrifera* against methicillin resistant

Staphylococcus aureus (MRSA). Scientific Research and Essays. 4(4): 351- 356.

15. Khan, F.U.; Durrani, F.R.; Sultan, A.; Khan, R.U. and Naz, S. (2009). Effect of Fenugreek (*Trigonella foenum- graecum*) seed extract on visceral organs of broiler chicks. ARPN. J. Agricultural and Biological Science, vol. 4, No.1.
16. Parekh, J. and Chanda, S. (2008). Antibacterial activity of aqueous and alcoholic extracts of 34 Indian medicinal plants against some *Staphylococcus* spp. Turk. J. Biol. 32: 63- 71.
17. Radwan, H.M.; El –Missiry, M.M.; Al-Said, W.M. and Ismail, A.S. (2007). Investigation of the glucosinolates of *Lepidium sativum* growing in Egypt and their biological activity. Res. Medicine & Med. Sci. 2(2): 127-132.
18. Jouad, H.; Haloui, M. and Elhilaly, J.(2001). Ethobotanical Survy of medicinal plants used for the treatment of diabetes, cariac and renal diseases in the North center region of Morocco (EeZ-Boulemane). J. Ethopharmacol. 77: 175- 182.
19. Patel, U.; Kulkarni, M.; Undal, V. and Bhosale, A. (2009). Evaluation of Diuretic activity of aqueous and methanol extracts of *Lepidium sativum* garden cress (Cruciferae) in Rats Trop. J. Pharmaceutical Res. 8: 215- 219.
20. Committee For Veterinary Medicinal Products, Camphora (use in veterinary homeopathy). 1999.
21. Wallace, J.R. (2004). Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. Pro. Nutr. Soc. 63: 621- 629.
22. Quinn P . J .Carter . M . Markey . B and Carter . G . R (1994) . Bact . Clini .Vet . Microb . London .
23. Anessiny, G. and Perez, C. (1993). Screening of plants used a green line. Folk medicine for antimicrobial activity. J. Ethnopharmacol. 39: 119-128.
24. Harley, J. P. and Prescott, L. M. (2002). Laboratory Exercises in Microbiology. 5 th ed. The Mc Grow- Hill Companies. USA.
25. AL- Aani , M . M , M . (2009) Immunopathologycal study of *S. aureus* isolated from Bovin mastitis Athesis of MSC . in Vet . Med . Pub . Health . Zoonotic .Disease .
26. علي ، رقية مصطفى . (2001) عزل وتشخيص Streptcoccus agalactiae من التهاب الضرع والمهبل في الابقار والتهاب المهبل في النساء الحوامل ودراسة العلاقة بينهما دراسة ماجستير علوم احياء مجهرية - كلية الطب البيطري / جامعة بغداد .
27. العابدي ، سالم رهيف عريان (2008) . دراسة وبائية لجرثومة ايشريشا القولون المعوية النزفية (E . coli . O157: H 7) . في بعض مناطق محافظة واسط . دراسة ماجستير صحة عامة - كلية الطب البيطري / جامعة بغداد .
28. العزاوي ، زينة صائب خضير (2006) . تواجد جرثومة ايشريشا القولون المعوية النزفية . (E coli . O157: H 7) . في الحليب ومصادر تلوثه . دراسة ماجستير صحة عامة - كلية الطب البيطري / جامعة بغداد .
29. الخزعلي ، هيفاء حسين (1990) انماط الساموئيلا المعزولة من الحليب ومشتقاته وحساسيتها للمضادات الحيوية . دراسة ماجستير صحة عامة - كلية الطب البيطري / جامعة الموصل .
30. 30- العكيلي ، خلود خضير نزال (1999) . المقاومة الحيوية والمحتوى البلازميدي في الانماط المصلية لجراثيم الساموئيلا المعزولة من الحليب دراسة ماجستير صحة عامة - كلية الطب البيطري / جامعة بغداد .
31. Chitnis, R.; Abichandani, M.; Nigam, P.; Nahar, L. and Sarker, S.D. (2007). Antioxidant and antibacterial activity of the extracts of *Piper cubeba* (*Piperaceae*). Ars. Pharm. 48 (4): 343 - 350.
32. Parekh, J. and Chanda, S. (2007). In vitro screening of antibacterial activity of aqueous and alcoholic extracts of various Indian plant species against selected pathogens from

Enterobacteriaceae. African J. Microbiol. Res.1 (6): 92- 99.

33. Vidya, T. J. and Vidya, P. (2000). Antimicrobial activity of Scavon Vet. Cream. The Veterinarian. (2000): (24), August, 16.
34. Lee, J.; Lee, J.; Lim, J.; Sim, S. and Park, D. (2008). Antibacterial effects of S-(-)-tulipalin B isolated from *Spiraea thunbergii* Sieb on *Escherichia coli* , a major food borne pathogenic microorganism . J. Medicinal plants Research .2 (3): 59- 65.
35. Prabuseenivasan, S.; Jayakumar, M. and Ignacimuthu, S. (2006). In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. BMC Comlementary and alternative medicine. 6: 39.
36. Rahman, M. M.; Garvey, M. and Gibson, S. (2008).Antibacterial terpenes from the Oleo-resin of Commiphora molmol. Phytotherapy Research. Aug.11.
37. Outara, B.; Simard, R.E. and Holley, R. A. (1997). Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilge organisms. Int. J. food. Microbiol. 37: 155- 162.
38. Perez, C. and Anesini, C. (1994). Antibacterial activity of alimentary plants against *Staphylococcus aureus* growth. Am.J. Chin. Med.22: 169- 174.
39. Masood, N.; Chaudhry, A. and Tariq, P. (2006). Bactericidal activity of Black pepper, Bay leaf, Aniseed and Coriander against oral isolates. Pak. J. Pharm. Sci. 19(3): 214- 218.
40. Abdel Gadir, W.S.; Mohamed, F. and Bakhiet, A.O. (2007). Antibacterial activity of *Tamarindus indica* fruit and *Piper nigrum* seeds. Res. J. Microbiol. 2(11): 824- 830.
41. Nwinyi, O.C.; Chinedu, N.S.; Ajani, O.O.; Ikpo, C.O. and Ogunniran, K.O. (2009). Antibacterial effects of extracts of *Ocium gratissimum* and *Piper guineese* on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. African J. Food Science. 3(3): 77- 81.
42. Bonjar, G. H. S. (2004 b). Screening for antibacterial properties of some Indian plants against two strains of *Escherichia coli* . Asian J. Sciences. 3(3): 310 – 314.
43. Bonjar, G.H.S. (2004a). Evaluation of antibacterial properties of Iranian medicinal plants against *Micrococcus luteus, Serratia marcescens, Klebsiella pneumoniae* and *Bordetella bronchiseptica* . Asian J. Plant Sciences, 3 (1): 82- 86.
44. Wagh , P. ; Rai , M. ; Deshmukh , S.K. and Durate , M.C.T. (2007) .Bio-activity of oils of *Trigonella foenum - graecum* and *Pongamia pinnata.* African J. Biotechnol. 6(13): 1592- 1596.
45. Randhir, R.; Lin, Y.T. and Shetty, K. (2004). Phenolics, their antioxidant and antibacterial activity in dark germinated fenugreek sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors .Asia Pac. J. Clin. Nutr. 13 (3): 295- 307.
46. Nostro, A.; Germano, M.P. and Marino, A. (2000). Plant antimicrobial activity. Lett. Microbiol. 30(1): 379- 384.

Isolation of bacteria from milk and study the senestivity of bacterial isolates to antibiotic and medical plants

M. S. Abbas
Coll. of Vet. Med./ Unive. of Baghdad.

Abstract

This study was carried out to Isolation of bacteria from milk & study the senestivity of bacterial isolates to antibiotic & medical plants 100 milk samples.Were collected from Abu – Graib city in Baghdad samples culturing on different Media the result revealed that isolation rate was *Staphylococcus aureus*, (%31) *, Streptococcus* group D (%73) , *Escherichia coli* (%31) *Klebsiella* SPP(%13) Pasteurella spp(%4) Salmonella spp(%3) . studying the senestivity of bacteria isolates to 8 types of antibiotic : (TOB) Tobramycin , Ceftazidime (CAZ) , Vancomycin (VA) , (SAM) Sulbactam Ampicillin , Cloxacillin (CX) , Cefalothin (KF) , Colistin (CL) , Amoxacillin Clavulanic acid(AMC) the result revealed that *S. aureus & Streptococcus* group D more sensitive to (KF) , E . coli more sensitive to (CL) , *Klebsiella* & Salmonella more sensitive to (CAZ) , Pasteurella more sensitive to (TOB) . studying sensivity of bacterial isolates to alcoholic extracts of these plants: (*Piper nigrum*), cubeb seeds (*Piper cubeba*), (*Cinnamomuum camphora*), (*Commiphora mol mol*), seeds (*Trigonella foenum- graecum*) and seeds of *Lepidium sativum*. the result revealed that the bacterial isolates in this study more sensitive to alcoholic extracts of (*Piper cubeba*) & (*Cinnamomuum camphora*) . the other of alcoholic extracts had no inhibition effect on the bacteria isolated in this study