الفعالية التثبيطية للقرنفل (cloves) في نمو البكتريا *Pseudomonas aeruginosa* داخل وخارج الجسم

بسعاد عبد زيد ، عدنان وحيد وسعاد محمد

كلية الطب، جامعة القادسية.كلية العلوم، جامعة الكوفة .كلية العلوم، جامعةالكوفة

الخلاصة

تضمن البحث اختبار الفعالية التثبيطية لمستخلص القرنفل في نمو بكتريا ***Pseudomonas aeruginosa*** وأظهرت البكتريا حساسيتها بزيادة التركيز كما حددت قيمة الـ MIC حيث كانت (40) ملغم /مل التركيز المثبط الأدنى لنمو البكتريا وان قيمة LD50 في داخل جسم الكائن الحي قد حددت اعتمادا على قيمة الـ MIC إذ كانت 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 ***P.aeruginosa***.

المقدمة

القرنفل هو براعم الإزهار المجففة لشجرة القرنفل وهو من أقدم التوابل مكوناته الرئيسية :زيت القرنفل الطيار مضاد قوي للجراثيم ،الاوجينول(Eugenol) نسبته 79-85% اكبر واهم مركبات الزيت الطيار وهو مخدر قوي ومطهر ،لذلك فهو مفيد في تسكين الم الأسنان أما الاستيل اوجينول الموجود في الزيت الطيار أيضا فقد تبين انه مضاد قوي للتشنج العضلات .(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 الدراسة التي أجراها Lee وجماعته (2000) بان المواد الفعالة في القرنفل تمتلك فعالية ضد الأكسدة مما يؤدي إلى احتفاظ الجسم بمستويات عالية من الأحماض الدهنية ويعد من المواد الآمنة الاستخدام وذو تأثيرات جانبية نادرة.

المواد وطرائق العمل

1 - تحضير المستخلص الكحولي

تم تحضير المستخلص الكحولي للقرنفل حسب الطريقة الواردة في (Harbone,1984) وذلك بإضافة 100 مل من الكحول الاثيلي تركيز 70% إلى 10 غم من مسحوق القرنفل في وعاء محكم وبعد الإذابة رشح المحلول ثم ركز باستخدام جهاز المبخر الدوار وحضرت التراكيز اللازمة (5%، 10%، 15%، 20% ،25%،30%) لحين الاستعمال.

2 - تحضير المزروع البكتيري

شخصت بكتريا الاختبار أوليا في المستشفى التعليمي في النجف الاشرف وأجريت الفحوصات البايوكيميائية لـ *P.aeruginosa* استنادا إلى (Collee,*etal*.,1996;Macfaddin,1979)، للتأكد من عزلة الاختبار. ثم لقحت أنابيب زجاجية ومعقمة حاوية على الوسط ألزرعي Brain-Heart Infusion Broth بـ 0.1 مل 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 البكتريا والتي تساوي 1.5 $\times 10^8$ cfu (Collee ,*et al*.,1996).

3 - اختبار حساسية بكتريا P.aeruginosa لمستخلص القرنفل

أ –طريقة الانتشار بالاكار

اتبعت طريقة الانتشار بالا كا ر في الحفر (wells) (Egroove,1985) في هذا الاختبار وذلك من خلال تهيئة أطباق حاوية على وسط Muller Hinton Agar لقحت أولا بعالق بكتريا *P.aeruginosa* وبمعدل 0.1 مل /طبق ونشرت على سطح الوسط، بعد ذلك عملت حفر بقطر 5 ملم في كل طبق ثم أضيف 0.2 مل من المستخلص وبواقع ثلاث مكررات إضافة إلى السيطرة ثم تركت في الثلاجة مدة 30 دقيقة لانتشار محاليل المستخلص ثم حضنت بدرجة 37م° لمدة 24 ساعة .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 2 غم من مسحوق القرنفل إلى 10 مل من وسط Brain Heart Infusion Broth المعقم ،ثم حضرت التخافيف اللازمة (5 , 160,80,40,20,10) ملغم /مل بالإضافة إلى وسط السيطرة لقحت الأنابيب جميعا بـ 0.1 مل من العالق البكتيري المقارن بأنبوبة ماكفرلاند وحضنت بدرجة حرارة 37م° لمدة 24 ساعة، تقرأ النتيجة على أساس وجود أو عدم وجود نمو في الأنابيب لتحديد قيمة NCCl,1984)MIC).

ج تحديد الجرعة النصف قاتلة LD50

استخدمت في التجربة مجموعة من الحيوانات المختبرية بوزن (200–300) غم بواقع 8 مجاميع تحتوي كل منها على 3 جرذ من ضمنها مجموعة السيطرة، حقنت الحيوانات تحت البريتون بالجرع (3200,1600,800,400,200,100,50) ملغم /كغم، سجلت النتائج بعد مرور 24 ساعة من الحقن ثم حسبت قيمة LD50 حسب طريقة (Barnes 2002).

4 –اختبار كفاءة المستخلص في توفير حماية من التأثيرات المرضية لبكتريا P.aeruginosa داخل الجسم الحي.

تم تهيئة (12) حيوان قسمت إلى أربع مجاميع وبواقع ثلاث حيوانات لكل مجموعة عوملت كالأتي:

1. المجموعة الأولى عوملت بـ 1 مل/حيوان من عالق البكتريا كل 48 ساعة*P.aeruginosa* لمدة أسبوع.
2. المجموعة الثانية عوملت بـ 1 مل /حيوان من المستخلص الكحولي للقرنفل كل 48 ساعة لمدة أسبوع.
3. تم حقن المجموعة الثالثة تحت الصفاق بعالق البكتريا *P.aeruginosa* وبمعدل 1 مل لكل حيوان Collee وجماعته (1996)، وتركت لمدة 24 ساعة بعد ذلك حقنت تحت الصفاق بـ 1 مل من مستخلص القرنفل كل 48 ساعة لمدة أسبوع.
4. المجموعة الرابعة حقنت بالمحلول الملحي وبواقع 1 مل/ حيوان لغرض المقارنة.

وتم متابعة الحيوانات لمدة أسبوعين ثم ضحى بالحيوانات بعد إن خدرت باستعمال الكلوروفورم وشرحت، واستأصل كل من الكبد والكلية لكل حيوان ثم غسلت جيدا بالمحلول الملحي الفسلج ي بعدها ثبتت بالفورمالين 10% لحين إجراء الفحوصات الفسلجيةِ والنسيجية.

الاختبارات الفسلجية للدم

أ – معدل ترسيب كريات الدم الحمر (E.S.R) حسب طريقة Brown(1976).

ب –معدل التعداد الكلي لخلايا الدم البيض(W.B.Cs) حسب طريقة Brown(1976).

ج –مكداس الدم (P.C.V) حسب طريقة Brown (1976).

د –تركيز الهيموكلوبين (Hb).اعتمدت طريقة سود (1992).

الفحص النسيجي

حضرت المقاطع النسيجية للأعضاء المستأصل ة (كلية والكبد) وقد اتبعت طريقة Bancroft و Stevens (1982).

التحليل الاحصائي

نفذت التجارب باستخدام التصميم العشوائي (C.R.D) باستخدام اقل فرق معنوي (L.S.D) وتحت مستوى احتمال (0.05) (الراوي وخلف الله،1980).

النتائج والمناقشة

1- تم إجراء الفحوصات التأكيدية على بكتريا الاختبار والتي تضمنت أشكال الخلايا البكتيرية ومظهر المستعمرات ومن خلال إجراء الفحوصات البايوكيميائية (جدول 1) بالمقارنة بالنتائج القياسية المذكورة من قبل (Collee ,*et al*.,1996) وجد بأنها بكتريا *P.aeruginosa*.

جدول (1)

الاختبارات التشخيصية للبكتريا *P.aeruginosa*.

ت	الاختبار	النتيجة
1	صبغة كرام	–
2	إنتاج الاندول	–
3	فحص فوكس بروسكاور	–
4	أنتاج إنزيم الكاتليز Catalase	+
5	أنتاج إنزيم تحلل اليوريا urease	–
6	أنتاج إنزيم الاوكسيدين oxidase	+
7	الحركة	+
8	تخمر سكرالكلوكوز	+
9	تخمر سكرالسكروز	–
10	تخمر سكراللاكتوز	–
11	تخمر سكرالمالتوز	+
12	تخمر سكرالفركتوز	+
13	تخمر سكرالمانيتول	–
14	أنتاج Lecithinase	+
15	استهلاك السترات	+
16	تكوين السبور	–

2- اختبار حساسية بكتريا P.aeruginosa لتراكيز مختلفة من مستخلص القرنفل:

يتضح من الجدول (2) بان البكتريا *P.aeruginosa* أبدت حساسية لمستخلص القرنفل بالتركيز 10% حيث بلغ قطر التثبيط 4.1 ملم وازداد هذا القطر بزياد ة التركيز فعند التركيز 30% أصبح قطر التثبيط 30 ملم وهذا يتفق مع مااشار أليه (Taylor,*et al*.,1996) بأنه كلما يزداد التركيز تزداد نسبة التثبيط ويعزى ذلك إلى ازدياد المواد الفعالة بزيادة تركيز المستخلص.

جدول (2)

معدل أقطار التثبيط لنمو بكتريا*P.aeruginosa* مقدارا بـ ملم.

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

جدول (3)

قيم الـ MIC لمستخلص القرنفل الكحولي لنمو بكتريا *P.aeruginosa*.

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

ev+ يدل على وجود نمو ev- يدل على عدم وجود نمو

4- تحديد قيمة LD50 للمستخلص الكحولي للقرنفل:

تم تحديد الجرع المستخدمة اعتمادا على قيمة MIC حيث كانت الجرعة القاتلة للحيوانات 3200 ملغم /كغم من وزن الجسم حيث نفقت الحيوانات جميعها خلال 24 ساعة ويوضح الجدول (4) الجرع المستخدمة في الحقن ومن العلامات السريرية الواضحة على الحيوانات هو الخمول والدوران خلال الليل وهذه يزداد مع زيادة الجرعة ومن خلال المعادلة تم تحديد قيمة LD50 حيث كانت 800 ملغم /كغم من وزن الحيوان وهذه النتائج جاءت مقاربة مع ماشار إليه (الصراف، 1981; العمار، 2001) .

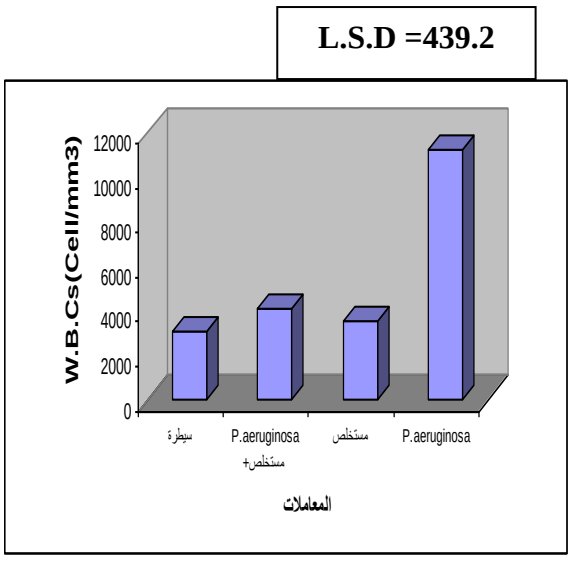
جدول (4)

قيمة LD50 للمستخلص الكحولي للقرنفل للجرذان.

المجموعة	الجرعة ملغم/كغم	النفوق	المعدل	النتيجة
1	50	0	% 0	0
2	100	0	% 0	0
3	200	0	% 0	0
4	400	0	% 0	0
5	800	2	% 66.6	2000
6	1600	2	% 66.6	2000
7	3200	3	% 100	3000
المجموع				7000

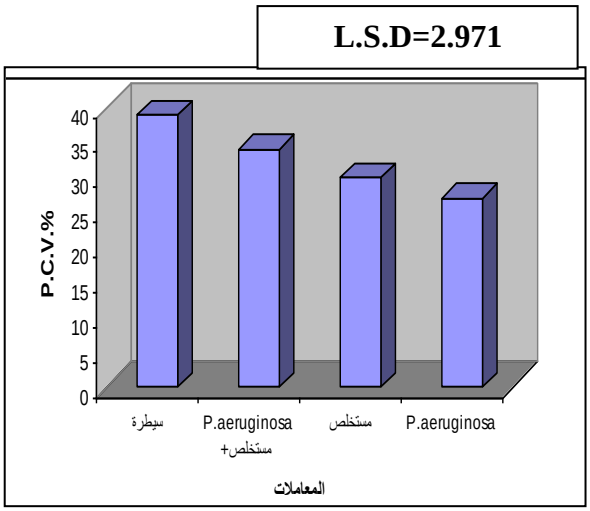
التأثيرات الفسلجية لدى الحيوانات المصابة ببكتريا *P.aeruginosa* والمعاملة بمستخلص القرنفل.

أشارت النتائج شكل (1) إلى ارتفاع معنوي (0.05 >P) في التعداد الكلي لخلايا الدم البيض عند الجرذان المعاملة بعالق البكتريا *P.aeruginosa*(11200) خلية/ملم ^{3} بالمقارنة مع السيطرة (3100) خلية/ملم ^{3}، وهذا يشير إلى وجود التهابات بكتيرية شديدة في أنسجة الجسم المختلفة نتيجة لإفراز البكتريا السموم المختلفة والتي تؤثر في خلايا نسيج الدم والأعضاء الأخرى لإفرازها السموم المؤثرة في كريات الدم البيض أو عملت البكتريا على التقليل من الفعالية الالتهامية للخلايا العدلة حيث تمتاز بكتريا *P.aeruginosa* بتكوينها الطبقة المخاطية التي تساهم في حماية البكتريا من الجفاف والحرارة ومقاومة الخلايا البلعمية، وعلى الالتصاق بسطوح الخلايا الطلائية (Baron 1986 ,).أما بالنسبة للمجاميع الثانية والثالثة فقد كانت هناك فروق معنوية (P< 0.05) فيما بينهما (3500و4100) خلية/ملم ^{3} على التوالي مقارنة مع معاملة السيطرة اماالمجموعة الرابعة السيطرة فكانت (3100) خلية/ملم^3 وهي واقعة ضمن المدى الطبيعي لمعدل التعداد الكلي لخلايا الدم البيض، ويؤكد هذه النتيجة هو عدم حصول حالة تجرثم الدم أو أي تأثيرات مرضية في الأعضاء والأنسجة للحيوانات المعاملة.



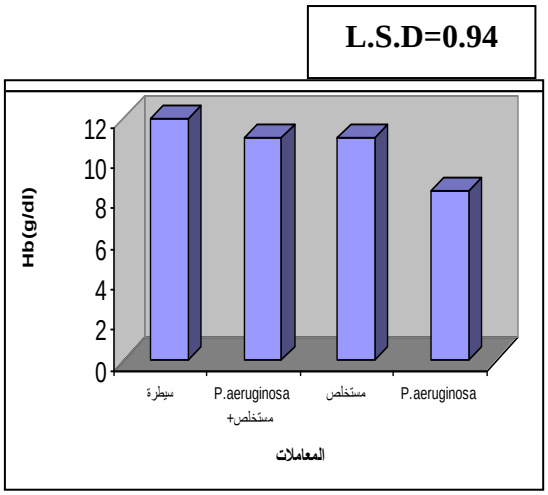
شكل (1): تأثير المعاملات الأربعة في معدل الكلي لخلايا الدم البيض (W.B.Cs(Cell/mm3.

أوضحت النتائج شكل (2) وجود فروق معنوية (0.05 >P) بين المجموعة(1) المعاملة بالبكتريا *P.aeruginosa* ومجموعة السيطرة (4) في قيم مكداس الدم (P.C.V) حيث كانت (39,27) على التوالي بسبب السموم والإنزيمات التي تفرزها البكتريا *P.aeruginosa* التي قد عملت على تحليل خلية الدم أو أنها أثرت في مجموعة الأنزيمات المهمة في تكوين سلسلة الهيموكلوبين ومن أهم تلك الإنزيمات Hemeoxygenase وان توقف عمل هذا الإنزيم يعمل على تحطيم خلايا الدم وتحويلها إلى مادة Bilirubin وهذا يشير إلى حدوث حالة فقر الدم لدى الحيوانات المعاملة بالبكتريا المرضية فقط (Nowak و Handford، 2004).أما المجموعة الثانية والثالثة فقد أظهرت فرقا معنويا بينها والمجموعة الأولى مقارنة بمجموعة السيطرة (4)(34,30) وهما ضمن المدى الطبيعي مقارنة مع المجموعة (1) ومجموعة السيطرة (4) وهذا يدل على إن مستخلص القرنفل قلل من التأثيرات المرضية للبكتريا *P.aeruginosa* .



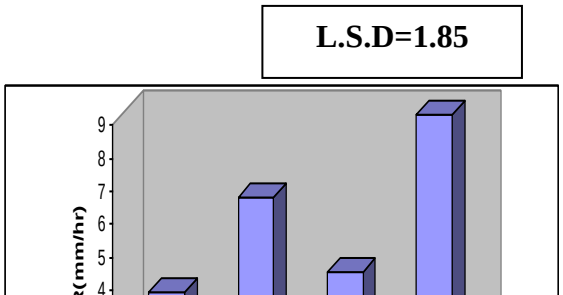
شكل (2): تأثير المعاملات الأربعة في معدل مكداس الدم P.C.V% للحيوانات المعاملة.

أشارت النتائج في الشكل (3) إلى وجود فرق معنوي (P< 0.05) بالنسبة للحيوانات المعاملة بعالق البكتريا *P.aeruginosa* ومجموعة السيطرة في تركيز الهيموكلوبين الكلي للدم (Hb) حيث كانت (8.4) g/dl، حيث إن البكتريا *P.aeruginosa* تعمل على إفراز إنزيمات وسموم تسبب تحطيم غشاء كرية الدم أو تغير النفاذية وبالتالي أثرت في تكوين خلايا الدم الحمر من خلال التأثير في انقسام أمهات خلايا الدم الحمر المتواجدة في نخاع العظم (Nowak و Handford، 2004).ولم يلاحظ وجود فرق معنوي (0.05 >P) في معدل قيم الهيموكلوبين لدى الحيوانات المعاملة بمستخلص القرنفل فقط مقارنة مع مجموعة السيطرة.



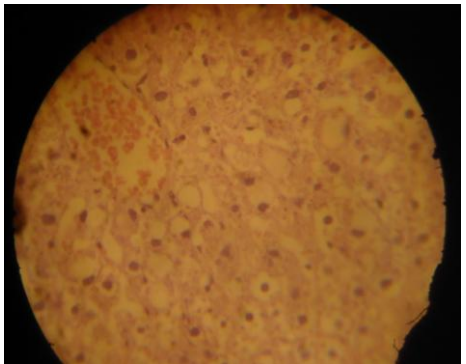
شكل (3): تأثير المعاملات الأربعة في معدل الهيموكلوبين Hb (g/dl) للحيوانات المعاملة.

برهنت النتائج شكل (4) وجود فرق معنوي في معدل ترسيب كريات الدم (E.S.R) لدى الحيوانات المعاملة بعالق البكتريا *P.aeruginosa* إذ بلغت (9) hr/mm مقارنة مع معاملة السيطرة (3.6)hr/mm وذلك بسبب قدرة البكتريا *P.aeruginosa* على إنتاج سموم أو إنزيمات أثرت على خلايا الدم مسببة ارتفاع قيمة (E.S.R) أو أنها عملت على التقليل من لزوجة سائل الدم أو من خلال طرحها السم الخارجي الذي يعمل على تثبيط عملية تخليق البروتينات .أما نتيجة المجموعة المعاملة بمستخلص القرنفل فقط فكانت (4.2)hr/mm وهي ضمن الحدود الطبيعية.



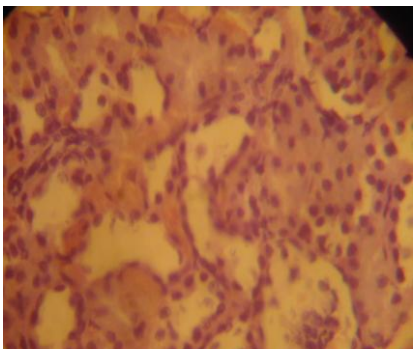
شكل (4): تأثير المعاملات الأربعة في معدل ترسيب كريات الدم الحمر E.S.R(mm/hr) .

أظهرت نتائج الفحوصات النسيجية لأعضاء الكبد والكلية للحيوانات المعاملة بالبكتريا *P.aeruginosa* وجود تغيرات نسيجية ففي الكبد لوحظت وجود تجمع لخلايا لمفية بين الخلايا الكبدية كذلك حصول تحلل في سايتوبلازم الخلايا الكبدية إضافة إلى حدوث احتقان في الأوعية الدموية شكل (A-1).أما في الكلية فقد لوحظ وجود احتقان في الأوعية الدموية إضافة إلى حصول انكماش أو ضمور في تركيب بعض الكبيبات شكل (A- 2) ولم يلاحظ وجود تغيرات نسيجية في الكبد والكلية لحيوانات المجموعتين (3,2) وكذالك مجموعة السيطرة (4) شكل (D-C-B-1) وشكل (D-C- 2 -B).ويمكن تفسير عدم تأثر أنسجة أعضاء الحيوانات المعاملة بالبكتريا المرضية ومستخلص القرنفل هو قدرة مستخلص القرنفل على توفير حماية للحيوانات المعاملة بالإضافة إلى عدم قدرته على إحداث تأثيرات ضارة داخل الجسم حيث إن لبعض الزيوت الأساسية الموجودة في القرنفل كفاءة تثبيطية ضد البكتريا *P.aeruginosa* وذلك من خلال إتلافها لغشاء الخلايا البكتيرية وتحرر المحتويات الداخلية للخلية البكتيرية إلى الوسط الذي تعيش فيه هذه البكتريا أو أنها تخترق الجدار الخلوي للبكتريا لتصل إلى الأجزاء الداخلية بسبب قابليتها المحبة للدهون وقد يكون تأثير هذه الزيوت على البكتريا من خلال إتلافها للنظام الأنزيمي للبكتريا (Helander وآخرون ،1998).



A

شكل (1): صورة فوتوغرافية لقطع في نسيج الكبد لجرذ ابيض تم حقنه بـ(A) بكتريا P.aeruginosa حصول تحلل في سايتوبلازم الخلايا الكبدية.(B) مستخلص القرنفل(C) مستخلص القرنفل +P.aeruginosa (D) معاملة السيطرة .(قوة التكبير X400).



A

شكل (2): صورة فوتوغرافية لقطع في نسيج الكلية لجرذ ابيض تم حقنه بـ(A) بكتريا P.aeruginosa وجود احتقان في الأوعية الدموية.(B) مستخلص القرنفل (C) مستخلص القرنفل +P.aeruginosa (D) معاملة السيطرة.(قوة التكبير X400).

المصادر

[1] **الراوي** ، خاشع وعبد العزيز خلف الله (1980).تصميم وتحليل التجارب الزراعية، دار الكتب للطباعة والنشر– جامعة الموصل.

[2] **الصراف** ، عباس محمد جواد، (1981). دراسة بعض الصفات الكيميائية الدوائية لبصلة الثوم، كلية الطب البيطري – جامعة بغداد.

[3] **العمار** ، مهدي حسين، (2001). تأثير مستخلص البر وبولس في نمو الجراثيم الممرضة، رسالة ماجستير كلية العلوم–جامعة الكوفة.

[4] **سود** ، رمنيك (1992). تقنية المختبر الطبي: طرائق وتفسيرات ترجمة د.صالح خميس، د.عبد الرزاق جبار، د.باقر عبيس وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . بغداد . العراق.

[5] Bancroft, J. D. and Stevens, A. (1982). Theory and practicice of histological techniques. Churchill Living stone, New York. 117.

[6] Barnes ,J.; Anderson. J. A. Phillipson. J.D. ;Herb. J. Medicenes Agude for healthe are proffissionals. Second Edition. London. Phamaceutical Press-2002.

[7] Baron, S.(1986).Medical Microbiology .2nd.ed Addison-Wesley publishing Company. Califrnia. USA.

[8] Bisset, N. G. ed. Harbal Drugs and phytopharmaccutical Translated from second Edition Boca Roron CRC press 1994.

[9] Brown, B. A. (1976). Hematology: Principles and procedures.2nd.ed., Lea and Febiger, Philadelphia.

[10] Collee, J. G., Fraser, A. G., Marmion, B.P. and Simmons, A. (1996).Practical Medical Microbiology .14th ed. Churchill Livingstone, USA.

[11] Egroove N. S. (1985). Antibiotics ascintific approach. Mirpublishers, Moscow.

[12] Harbone, J. B. (1984).Phytochemical method. Aguids to modern techniques of plants analysis. 2ed .ed. London, Newyrk, chapman and hall.

[13] Helander ,I. M. ,H.L .Alakomi ,K.Latva-Kala, T. Mattila –Sandholm , I. pol, e.j. Smid, L. G. M. Gorris and A. Von Wright , 1998.Characterization of the action of selected essential oil components Gram-

negative bacteria. J .Agri .food chem., 46:3590-3595.

[14] Lee, K. W.; Everts ,H.and Beynen, A.C.(2004).Essential Oils in Broiler Nutrition. Department of Nutrition, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University.

[15] Macfaddin, J. F. (2000). Biochemical tests for Identification of medical bacteria . Third edition. Williams and willkins compony .U.S.A. :a12.

[16] National Committee for Clinical Laboratory Stundards (1984).performance standars for antimicrobial disc susceptibility testing, 3rd ed ,Approach standard M2-A3.

[17] Nowak, T. J. and Hand ford, A.G. (2004).Textbook of Pathophysiology. 3rd. ed. McGraw-Hill. USA.

[18] 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.

[19] Taylor, R. S. L.; Manandhar, N. P.; Hudson, J. B. and Towers, G.H.N. (1996).Antiviral activity of Nepales medicinal plants. J. of Ethnol pharmacology 52:156-163.

Abstract

This study tested the inhibition activity of the cloves extract on the *P.aeruginosa* growth and the bacteria was sensitive to the extract with concentration 20% and percentage of the inhibition increase with the increased of concentration also the study included MIC value determination and the minimal inhibition concentration of bacteria growth was 16 mg/ml and LD50 value in vivo was determinated according to MIC value and it was about 2000 mg/kg. The results justified the ability of extract to confer a protection for the Lab animal when given for seven days by its ability to keep the hematological parameters within the acceptable physiological limits on the histology of liver and kidney .These parameters of blood and the internal organs were highly affected, with wide deviates from the normal ones, when the animal were treated by *P. aeruginosa* alone.