**جامعة الموصل**
**كلية التربية للعلوم الصرفة**

# كفاءة مستخلص ثمرة نباتي النارنج والرمان في تحييد مقاومة بعض الأنواع البكتيرية المعزولة من التهاب المجاري البولية

**أَحمد عبد الرزاق إِبراهيم النعيمي**

رسالة ماجستير
علوم الحياة

**بإشراف**
**المدرس**
**الدكتورة نوار طلال حامد الصفاوي**

1443 هـ 2021 م

بسم الله الرحمن الرحيم

وَعِندَهُ مَفَاتِحُ الْغَيْبِ لَا يَعْلَمُهَا إِلَّا هُوَ وَيَعْلَمُ مَا فِي الْبَرِّ وَالْبَحْرِ وَمَا
تَسْقُطُ مِن وَرَقَةٍ إِلَّا يَعْلَمُهَا وَلَا حَبَّةٍ فِي ظُلُمَاتِ الْأَرْضِ وَلَا رَطْبٍ وَلَا
يَابِسٍ إِلَّا فِي كِتَابٍ مُّبِينٍ

الأَنعام (59)

# الشكر والتقدير

الحمد والشكر لله ربِّ العالمين الذي هداني وأَعانني ويسَّر لي القيام بهذا العمل والصلاة والسلام على سيِّدي ومعلمي رسول ربِّ العالمين محمد الصادق الأَمين وعلى آله وصحبه أَجمعين الطيبين الطاهرين.

يطيب لي أَن أَتقدَّم بجزيلِ شكري وامتناني إِلى أُستاذتي الفاضلة الدكتورة نوَّار طلال حامد الصفاوي لتفضِّلها علي باقتراحها موضوع البحث والإِشراف عليه ولتوجيهاتها النيرة وإِرشاداتها السديدة التي قدَّمتها طوال مدَّة البحث وكتابة الرسالة فكانت خير مثال يحتذى به في البحث العلمي ولا تكفي السطور لذكر ما قدمته لي طوال مدة البحث فجزاها الله عني خير الجزاء والشكر موصول الى عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة ولرئاسة قسم علوم الحياة لما قدموا من التسهيلات اللازمة لاكمال متطلبات هذه الرسالة.

كما أَتوجَّه بجزيل الشكر لجميع أَساتذتي الأَفاضل الذين أَناروا لي طريق العلم الذي سلكته منذ بدايته إِلى هذه المرحلة الَّتي وصلتُ إِليها بما أَبدوه من مساعدة وإِرشاد واهتمام فجازهم الله عنَّا خير الجزاء.

كما أَشكر كل من الدكتور عدنان موسى محمد والدكتورة رنا خالد احمد والدكتورة يسرى عبدالرزاق عبدالله وزميلاي الأُستاذ نزار محمد حسن والأُستاذ حامد حسان حامد على كل ما قدَّموه لي من مساعدة في مدَّة بحثي وأَخيرًا أَشكر جميع زملائي وزميلاتي من طلبة الدراسات العليا وفي مقدَّمتهم الغاليين العزيزين أَحمد علي محمد وبدر حسين خورشيد وكلِّ من ساعدني بكلمة أَو فعل مقصود أَو غير مقصود فجزاهم الله عنِّي جميعًا خير الجزاء.

## الخُلاصة:

جمعت 100 عينة ادرار من المرضى المصابين بالتهابات المسالك البولية، أعطت 89 عينة منها نمواً موجباً على وسط اكار الدم Blood agar أي بنسبة (89%) من المجموع الكلي للعينات، في حين (11) عينة وبنسبة (11%) لم تعط نموا على الوسط نفسه.

تم الحصول على 89 عزلة بكتيرية، توزعت بين *Staphylococcus aureus* 29 عزلة (32.58%)، *Escherichia coli* 32 عزلة (35.95%)، والكليبسيلا *Klebsiella pneumonia* 9 عزلة (10.1%)، والزوائف الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* 11 عزلة (12.35%)، والمتقلبات الرائعة *Proteus vulgaris* 4 عزلة (4.49%) ، *Proteus mirabilia* 4 عزلة (4.49%).

تم اختبار حساسية ومقاومة العزلات البكتيرية قيد الدراسة لـ 10 مضادات حيوية وهي Streptomycin وRefampicin وTrimethoprim وTetracycline وAmoxicillin وCiprofloxacin وGentamicin وNalidixic acid وAmpicillin وErythromycin

أظهرت نتائج اختبار الحساسية للمضادات الحيوية ان عزلات *Escherichia coli* كانت مقاومة بنسبة (100%) لكل من المضادين Ax و Am اما بكتريا *Staphylococcus aureus* فقد كانت مقاومة بنسبة( 100% ) للمضاد Nal اما بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* فقد كانت مقاوم للمضاد Ax و Nal بنسبة( 100% ) اما بكتريا *Klebsiella pneumonia* فقد كانت مقاومة للمضاد Am و Nal بنسبة( 100% ) اما بكتريا *Proteus mirabils* فقد كانت مقاومة للمضاد Ax و Am بنسبة( 100% ) بينما بكتريا *Proteus vulgaris* كانت مقاومة للمضاد Am و Ax وSm و Tri بنسبة( 25% ).

تم تحضير المستخلصات المائية والايثانولية لكل من ثمار النارنج *Citrus aurenyium* وثمار الرمان *Punica granatium* L.

تم التحري عن التأثير التثبيطي للنمو للمستخلصات النباتية على أنواع البكتريا قيد الدراسة باستخدام طريقة الانتشار بالحفر وطريقة قياس العكارة. أَظهرت المستخلصات المائية والايثانولية لثمار الرمان والنارنج فعَّالية مثبطة للنمو بشكل واضح قدرت بقياس منطقة التثبيط بالمليميتر حول البكتريا قيد الدراسة. وقد ظهر من خلال النتائج ان جميع العزلات البكتيرية كانت

حساسة لمستخلصات النارنج والرمان المائية والكحولية بنسبة 100% عند التركيز 200 ملغم / سم$^3$.

حدد التركيز المثبط الأدنى Minimum Inhibitory Concentration (MIC) للمستخلصات المائية والكحولية لثمار النارنج والرمان والتي كان لها فعالية مضادة ضد البكتريا قيد الدراسة باستخدام اختبار العكارة Turbidity test.

تم توصيف محتوى الحمض النووي البلازميدي Plasmid DNA للعزلات البكتيرية التي اختيرت للدراسة. أَظهرت النتائج وجود بلازميدات الَّتي ظهرت على هلام الآكاروز بعد إجراء عملية الترحيل الكهربائي ElectropHoresis.

استخدم التركيز تحت المثبط الأدنى Sub minimal inhibitory concentration (Sub-MIC) للمستخلصات المائية والايثانولية لثمار النارنج والرمان كعامل محيد لإزالة مقاومة المضادات الحيوية للأَنواع البكتيرية قيد الدراسة. تم الحصول على قيم متباينة لنسبة فقدان المقاومة للمضادات الحيوية كنتيجة لفعَّالية المستخلصات لكن لم تظهر بعض المستخلصات فعَّالية محيدة. دعمت نتائج تجارب التحييد من خلال توصيف الحمض النووي البلازميدي على هلام الآكاروز للعزلات المحيدة. الهجرة الكهربائية أَظهرت اختفاء لحزم الحمض النووي البلازميدي من هلام الآكاروز لأَغلب الجراثيم قيد الدراسة مقارنة مع العزلات غير المحيدة. كما تم تقدير التركيز ودرجة النقاوة للحمض النووي البلازميدي.

قائمة المحتويات


| الموضوع | الصفحة |
| --- | --- |
| الخلاصة | أ |
| قائمة المحتويات | ت |
| قائمة الجداول | ذ |
| قائمة الأَشكال | ر |
| قائمة الصور | ز |
| **الفصل الأول**<br>**المقدمة** | |
| المقدمة | 1 |
| **الفصل الثاني**<br>**استعراض المراجع** | |
| 2-1 التهاب المسالك البولية | 4 |
| 2-1-1 التهاب المسالك البولية السفلى | 5 |
| 2-1-2 التهاب المسالك البولية العليا | 5 |
| 2-1-3 التهاب المسالك البولية غير المعقد | 5 |
| 2-1-4 التهاب المسالك البولية المعقد | 6 |
| 2-1-5 وبائية التهاب المسالك البولية | 6 |
| 2-2 بكتريا *StapHylococcus aureus* | 7 |
| 2-2-1 التصنيف العلمي | 7 |
| 2-2-2 الوصف العام | 7 |
| 2-2-3 عوامل الضراوة | 8 |
| 2-2-4 الإمراضيَّة | 9 |
| 2-3 بكتريا *Escherichia coli* | 10 |
| 2-3-1 التصنيف العلمي | 10 |

| | |
|---|---|
| 2-3-2 الوصف العام | 11 |
| 3-3-2 عوامل الضراوة | 11 |
| 4-3-2 الإمراضيَّة | 12 |
| 4-2 بكتريا *Klebsiella pneumonia* | 13 |
| 1-4-2 التصنيف العلمي | 13 |
| 2-4-2 الوصف العام | 13 |
| 3-4-2 عوامل الضراوة | 14 |
| 4-4-2 الإمراضيَّة | 14 |
| 5-2 بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* | 15 |
| 1-5-2 التصنيف العلمي | 15 |
| 2-5-2 الوصف العام | 16 |
| 3-5-2 عوامل الضراوة | 17 |
| 4-5-2 الإمراضيَّة | 18 |
| 6-2 جنس *Proteus* spp. | 19 |
| 1-6-2 التصنيف العلمي | 19 |
| 2-6-2 الوصف العام | 20 |
| 3-6-2 عوامل الضراوة | 21 |
| 4-6-2 الإمراضيَّة | 22 |
| 7-2 مقاومة المضادات الحيوية | 23 |
| 8-2 العلاقة بين البلازميدات (Plasmids) ومقاومة المضادات الحيوية | 24 |
| 9-2 المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية | 26 |
| 10-2 النباتات الطبية | 26 |
| 1-10-2 نبات الرمان *Punica granatum L.* | 27 |
| 1-1-10-2 الموقع التصنيفي | 27 |
| 2-1-10-2 وصف عام للنبات | 27 |
| 3-1-10-2 الانتشار | 28 |

| | |
|---|---|
| 2-10-1-4 الأجزاء المستعملة طبياً | 28 |
| 2-10-1-5 المكونات الفعَّالة | 28 |
| 2-10-1-6 الاستعمالات الطبية | 29 |
| 2-10-2 النارنج *Citrus aurantium* | 30 |
| 2-10-2-1 الموقع التصنيفي | 30 |
| 2-10-2-2 الوصف العام | 30 |
| 2-10-2-3 الانتشار | 30 |
| 2-10-2-4 الأجزاء المستعملة طبيا | 30 |
| 2-10-2-5 المكونات الفعَّالة | 31 |
| 2-10-2-6 الاستعمالات الطبية | 32 |
| **الفصل الثالث<br>المواد وطرائق العمل** | |
| 3-1 مواد العمل | 34 |
| 3-1-1 جمع النباتات المستخدمة في الدراسة | 34 |
| 3-1-2 جمع العينات | 34 |
| 3-2 الأَوساط الزرعية | 34 |
| 3-2-1 الأَوساط الزرعية المحضرة | 34 |
| 3-2-1-1 وسط ماء الببتون | 34 |
| 3-2-1-2 وسط اختبار الحركة | 34 |
| 3-2-1-3 وسط ماء الببتون والكلوكوز والفوسفات | 35 |
| 3-2-1-4 وسط تخمر السكريات | 35 |
| 3-2-1-5 وسط المضادات الحيوية | 35 |
| 3-2-1-6 وسط (كنك ب) | 36 |
| 3-2-2 الأَوساط الزرعية الجاهزة | 36 |
| 3-3 الكواشف والصبغات والمحاليل | 37 |
| 3-3-1 كاشف الكتاليز | 37 |

| | |
|---|---|
| 3-3-2 كاشف الأَندول (كوفاكس) | 37 |
| 3-3-3 كاشف المثيل الأَحمر | 37 |
| 3-3-4 كاشف فوكس بروسكور | 37 |
| 3-3-5 صبغة كرام | 37 |
| 4.3 تشخيص البكتريا | 38 |
| 3-4-1 الصفات الزرعية والفحص المجهري | 38 |
| 3-4-2 الزرع على الأوساط الانتخابية | 38 |
| 3-4-3 الاختبارات الكيموحيوية | 39 |
| 3-4-3-1 اختبارات IMVIC | 39 |
| 3-4-3-1-B اختبار المثيل الأَحمر | 39 |
| 3-4-3-1-C اختبار فوكس بروسكور | 39 |
| 3-4-3-1-D اختبار استهلاك السترات | 39 |
| 3-4-3-2 اختبار إنتاج إنزيم اليوريز | 40 |
| 3-4-3-3 اختبار الكتاليز | 40 |
| 3-4-3-4 اختبار إنزيم التجلط | 40 |
| 3-4-3-5 اختبار إنزيم تحلل الحامض النووي الديوكسي رايبوز | 40 |
| 3-4-3-6 اختبار الحركة | 41 |
| 3-4-3-7 اختبار تميع الجيلاتين | 41 |
| 3-4-3-8 اختبار تحلل الدم | 41 |
| 3-4-3-9 اختبار تخمر السكريات | 41 |
| 3-4-3-10 اختبار النمو على وسط آكار ثلاثي السكر والحديد | 42 |
| 3-4-3-11 اختبارات النمو على الأَوساط الغذائية الانتخابية | 42 |
| 3-4-3-11-A اختبار النمو على وسط آكار الماكونكي | 42 |
| 3-4-3-11-B اختبار النمو على وسط آكار المانيتول الملحي | 43 |
| 3-4-3-11-C اختبار النمو على وسط الايوسين ازرق المثيلين | 43 |
| 3-5 حفظ العزلات البكتيرية | 43 |

| | |
|---|---|
| 3-5-1 الحفظ قصير المدى | 43 |
| 3-5-2 الحفظ طويل المدى | 43 |
| 3-6 اختبارات مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية | 44 |
| 3- 7 طرق تحضير المستخلصات النباتية | 44 |
| 3-7-1 طريقة تحضير المستخلصات الايثانولية | 44 |
| 3-7-2 طريقة تحضير المستخلصات المائية | 44 |
| 3-8 طرائق تخفيف وتعقيم المستخلصات النباتية بعد تحضيرها | 45 |
| 3-8-1 طريقة تخفيف وتعقيم المستخلصات الكحولية | 45 |
| 3-8-2 طريقة تخفيف وتعقيم المستخلصات المائية: | 45 |
| 3-9 طرق اختبار الفعَّالية التثبيطية للمستخلصات النباتية | 45 |
| 3-9-1 طريقة قياس العكارة | 45 |
| 3-9-2 طريقة قياس الحساسية (الانتشار بالحفر) | 46 |
| 3-10 تحديد التركيز المثبط الأدنى (MIC) للمستخلصات النباتية | 46 |
| 3-11 تحييد ال DNA البلازميدي باستخدام المستخلصات النباتية | 47 |
| 3-12 توصيف محتوى ال DNA البلازميدي باستخدام تقنية الترحيل الكهربائي | 47 |
| 3-12-1 استخلاص البلازميد من الخلايا البكتيرية باستخدام العدة الجاهزة المجهزة من قبل شركة Promega | 47 |
| 3-12-2 تقدير تركيز ودرجة نقاوة ال DNA البلازميدي | 48 |
| 3-12-3 تحضير هلام الآكاروز وعملية الترحيل الكهربائي لـ DNA البلازميدي | 48 |


**الفصل الرابع**

**النتائج والمناقشة**


| | |
|---|---|
| 4-1 عزل العينات البكتيرية وتشخيصها | 50 |
| 4-1-1 عزل العينات | 50 |
| 4-1-2 تشخيص الأَنواع البكتيرية قيد الدراسة | 51 |
| 4-1-2-1 الصفات الزرعية والفحص المجهري للأَنواع البكتيرية قيد الدراسة | 51 |
| 4-1-2-2 الاختبارات الكيموحيوية | 52 |

| | |
|---|---|
| 4-1-3 بعض الدراسات التي أُجريت في مجال عزل وتشخيص الأَنواع البكتيرية المسببة لالتهاب المسالك البولية | 56 |
| 4-2 اختبار الكشف عن مقاومة المضادات الحيوية | 56 |
| 4-3 الكشف عن الفعَّالية التثبيطية للمستخلصات المائية والكحولية لثمار الرمان والنارنج | 60 |
| 4-3-1 (طريقة الانتشار في الحفر) لأختبار حساسية البكتريا | 60 |
| 4-3-1-1 مستخلصات ثمار نبات الرمان | 60 |
| 4-3-1-2 مستخلصات ثمار نبات النارنج | 46 |
| 4-4 تقدير التركيز المثبط الأدنى | 69 |
| 4-4-1 المستخلصات المائية والكحولية لثمار الرمان | 69 |
| 4-4-2 المستخلصات المائية والكحولية لثمار النارنج | 70 |
| 4-5 التحري عن تأثير المستخلصات المائية والكحولية لنباتي الرمان والنارنج على المستوى الجزيئي في البكتيريا قيد الدراسة | 70 |
| 4-5-1 تحييد محتوى ال DNA البلازميدي للأَنواع البكتيرية المعزولة باستعمال المستخلصات المائية والكحولية لنباتي الرمان والنارنج | 70 |
| 4-5-1-1 التحييد عن طريق استعمال المستخلص المائي والكحولي لنبات الرمان | 71 |
| 4-5-1-2 التحييد باستعمال المستخلص المائي والكحولي لنبات النارنج | 75 |
| 4-5-2 قياس تركيز الحامض النووي DNA البلازميدي ودرجة النقاوة للأَنواع البكتيرية قيد الدراسة قبل وبعد إضافة المستخلصات النباتية | 82 |
| 4-6 تحديد تأثير المستخلصات المائية والكحولية لثمار الرمان والنارنج كعوامل محيدة على نمو الأَنواع البكتيرية قيد الدراسة | 85 |
| **الاستنتاجات والتوصيات** | |
| الاستنتاجات والتوصيات | 88 |
| المصادر | 89 |
| Abstract | A |

قائمة الجداول


| رقم الجدول | عنوان الجدول | الصفحة |
| --- | --- | --- |
| (3−1) | قيم التراكيز الخزينة والنهائية للمضادات الحيوية | 35 |
| (3−2) | الأوساط الزرعية الجاهزة | 36 |
| (4−1) | توزيع التهابات المسالك البولية على وفق الجنس والعمر والنسب المئوية | 50 |
| (4−2) | التشخيص المجهري والمظهري للأنواع البكتيرية قيد الدراسة | 51 |
| (4−3) | نتائج الاختبارت البايوكيميائية للأنواع البكتيرية السالبة والموجبة لكرام | 52 |
| (4−4) | عدد ونسب الأنواع البكتيرية المعزولة | 52 |
| (4−5) | أعداد ونسب الأنواع البكتيرية المقاومة للمضادات الحيوية | 57 |
| (4−6) | التأثير التثبيطي للمستخلصات المائية والكحولية لثمار الرمان بتراكيز مختلفة على الأنواع البكتيرية قيد الدراسة | 60 |
| (4−7) | التأثير التثبيطي للمستخلصات المائية والكحولية لثمار النارنج بتراكيز مختلفة على الأنواع البكتيرية قيد الدراسة | 64 |
| (4−8) | قيم التراكيز المثبطة الدنيا MIC لمستخلصات ثمار الرمان والنارنج في الأنواع البكتيرية قيد الدراسة | 69 |
| (4−9) | إزالة مقاومة المضادات الحيوية من الأنواع البكتيرية قيد الدراسة باستعمال المستخلص المائي للرمان | 71 |
| (4−10) | إزالة مقاومة المضادات الحيوية من الأنواع البكتيرية قيد الدراسة باستعمال المستخلص المائي والكحولي للنارنج | 75 |
| (4−11) | تركيز ال DNA البلازميدي ودرجة النقاوة للأنواع البكتيرية قيد الدراسة قبل وبعد إضافة المستخلصات المائية والكحولية لثمار الرمان والنارنج | 82 |
| (4−12) | نتائج قياس الكثافة الضوئية للمزارع الأنواع البكتيرية قيد الدراسة قبل وبعد المعاملة بالمستخلصات المائية والكحولية للنباتات قيد الدراسة | 86 |

## قائمة الأَشكال


| رقم الشكل | عنوان الشكل | الصفحة |
| --- | --- | --- |
| (1-4) | الترحيل الكهربائي لمحتوى الـ DNA البلازميدي للأَنواع البكتيرية قيد الدراسة قبل وبعد التحييد بالمستخلصات المائية والكحولية لنبات الرمان | 74 |
| (2-4) | الترحيل الكهربائي لمحتوى الـ DNA البلازميدي للأَنواع البكتيرية قيد الدراسة قبل وبعد التحييد بالمستخلصات المائية والكحولية لنبات النارنج | 79 |

قائمة الصور


| رقم الصورة | عنوان الصورة | الصفحة |
|---|---|---|
| (4-1) | تُبيِّن النتائج الموجبة والسالبة لبعض الاختبارات وصور لنمو مستعمرات بعض الأَنواع البكتيري على أَوساطها الانتخابية | 55 |
| (4-2) | تأثير المستخلص المائي لثمار الرمان وبتراكيز مختلفة على البكتريا قيد الدراسة | 61 |
| (4-3) | تأثير المستخلص الكحولي لثمار الرمان وبتراكيز مختلفة على البكتريا قيد الدراسة | 62 |
| (4-4) | تأثير المستخلص المائي لنبات النارنج وبتراكيز مختلفة على البكتريا قيد الدراسة | 65 |
| (4-5) | تأثير المستخلص الكحولي لنبات النارنج وبتراكيز مختلفة على البكتريا قيد الدراسة | 66 |
| (4-6) | تأثير المستخلص المائي والكحولي لثما الرمان ***Punica granatum L*** على البكتيريا المنمات على أَوساط المضادات الحيوية | 73 |
| (4-7) | تأثير المستخلص المائي والكحولي لثما النارنج ***Citrus aurantium*** على البكتيريا المُنمات على أَوساط المضادات الحيوية | 78 |

# الفصل الأَوَّل

# المقدمة

# Introduction

## المقدمة

تمثل التهابات المسالك البولية Urinary tract infection (UTI) أَكثر أَنواع الإصابات البكتيرية شيوعًا على مستوى العالم ويمكن تعريفها على انها تعرض المريض لواحد على الأَقل من أَعراض المسالك البولية التالية: حمى قد تصل إلِى اعلى من 38°م في المرضى الذين تكون أَعمارهم 65 او أَقل، آلام في أسفل العمود الفقري، كثرة التدرر، عسر الادرار أَو الاحتباس حصول آلام عند التدرر والادرار الدموي والحرقة عند التدرر والغثيان والقيء (Shaheen *et al.*, 2019). وهي تصيب كلا الجنسين وجميع الأَعمار، وتُعدُّ الإناث أَكثر عرضة للإصابة من الذكور بسبب الاختلافات التشريحية والفسيولوجية للجهاز البولي التناسلي بالإضافة الى الاختلاف في نمط الحياة، كما تزداد حالات الإصابة في كبار السن من الرجال. وعند حدوث الإصابة فان أجزاء مختلفة من الجهاز البولي قد تتاثر. تنتشر البكتريا بشكل كبير في مختلف البيئات اذ تتواجد في كل من، التربة،وفي المياه المالحة والعذبة، وعلى النباتات، والحيوانات، كما تصيب البشر، هذا الانتشار الواسع يدل على قدرتها العالية على التكيف للبيئات المختلفة، لذا تُعدُّ البكتريا من أَكثر الكائنات الحية انتشارًا وتعقيدًا وتعددًا من الناحية البيئية (Sah and Singh, 2016) ونتيجةً لظهور السلالات البكتيرية المقاومة للأَدوية المتعددة ازداد معدل الإصابة بالتهابات المسالك البولية بشكل كبير واصبح هذا المرض يشكل عبئاً اجتماعياً واقتصادياً كبيرًا على مستوى العالم (Shaheen *et al.*, 2019). وبحلول عام 2016، تشير التقديرات إلى حدوث 150 مليون حالة سنويًا في جميع أنحاء العالم (Kalal and Nagara, 2016).

ان الإصابة المايكروبية خاصةً بالأَنواع التالية *Ps. aeruginosa* و*Pr.vulgaris* و*Pr. mirabilis* و*Enterobacter cloaca* و*En. aerogenes* و*Sta.aureus* و*E. coli* و*K. pneumoniae* تُعدُّ من الأسباب الرئيسة للإصابة بالتهابات المسالك البولية وتُعتبر *E. coli* وحدها سبباً لأَكثر من 80٪ من جميع عدوى (UTI) غير المعقدة (Kang *et al.*, 2018). ونظرًا للمقاومة الكبيرة التي بدأت تُظهرها الميكروبات، بالإضافة الى العديد من الآثار الجانبية التي تظهر من جراء استخدام الجرعات العالية والمتكررة للمضادات الحيوية والإفراط في استخدام المضادات دون استشارة الطبيب المختص، بالإضافة الى التكلفة العالية والفعَّالية المنخفضة لهذه المضادات الحيوية، والتي أصبحت تهدد الحياة. ومن الضروري معرفة أسباب ظهور هذه المقاومة للمضادات الحيوية (Erdem *et al.*, 2018). إذ أن هناك طريقتين

رئيسيتين للبكتريا من أَجل اكتساب المقاومة للمضادات الحيوية: أولهما الطفرة الكروموسومية وثانيهما اكتساب عناصر وراثية متنقلة مثل البلازميدات وتكون البلازميدات شائعة بشكل كبير في البكتريا (Baker et al., 2015). يتمثل الجينوم البكتيري بكروموسوم واحد فقط الَّذي يتكون من جزيئة ال DNA والَّتي تحوي على جميع المعلومات الوراثية الهامة للبكتريا. اما البلازميدات فهي عبارة عن جزيئات DNA دائرية الشكل تستطيع ان تتكاثر بشكل مستقل عن الكروموسوم البكتيري وتكون قادرة على الانتقال أفقيًا بين البكتيريا عن طريق الاقتران. وهي تلعب دورًا هاماً في تطور المقاومة البكتيرية للمضادات الحيوية، وتعمل على نشر جينات المقاومة بين مسببات الأَمراض السريرية وهذا هو الأَكثر إثارة للقلق (Alekshun and Levy, 2007).

وتعتبر البلازميدات المقترنة من أهم العوامل التي تؤدي إلى انتشار المقاومة للمضادات الحيوية بين العائلات البكتيرية مثل Enterobacteriaceae وEnterococcaceae، والَّتي تضم بعضاً من أهم الأَنواع المسببة للأَمراض في المستشفيات. يلعب R-plasmid دورًا مهماً في انتشار المقاومة إذ يحمل الجينات الخاصة التي تمنح صفة المقاومة للمضادات الحيوية، إن قدرة هذا البلازميد على الانتقال ليس فقط بين خلية وأُخرى ضمن نفس النوع ولكن أَيضًا له القدرة على التنقل بين سلالات لأَنواع مختلفة مما يزيد من خطورته ( Rozwandowicz *et al.*, 2018). ومن الممكن إزالة البلازميدات بعملية خاصة تدعى التحييد Plasmid neutral والَّتي تعمل على تثبيط التضاعف للبلازميد من دون ان تؤثر على عملية التضاعف للكروموسوم البكتيري ويحصل التحييد بنسب مختلفة كما تحصل عملية التحييد اما ذاتياً او عن طريق استخدام بعض المركبات الكيميائية وبعض المضادات الحيوية كالريفامبيسين، وبعض الأَدوية النفسية، واستخدام درجات الحرارة (Forsyth *et al.*,2018). يُعدُّ استخدام العوامل الكيميائية للمعالجة البلازميدية غير ممكن للتطبيق العلاجي لذا بدأ الاهتمام باستخدام المستخلصات النباتية Plant extract والَّتي تكون ذات فعَّالية كبيرة على البكتريا وهي غير سامة وليس لها تأثيرات مُطفرة لذا تُعدُّ أَكثر الطرائق أَمانًا من أَجل العلاج البلازميدي (Soman *et al.*, 2015). للنباتات والأعشاب الطبية أهمية خاصة وذلك لاحتوائها على مجموعة متنوعة من المركبات التي لها فعَّاليات متعددة تدعى مركبات الأيض الثانوي Secondary metabolism سميت قديماً بطب الأعشاب لكونها ذات قيمة علاجية كبيرة. هذا بالإضافة الى القدرة التثبيطية العالية التي تمتلكها النباتات لأَنواع بكتيرية مختلفة حيث تسلك سلوك المضادات الحيوية من

حيث قدرتها على إحداث خلل أو ايقافها لبعض المسارات الأَيضيَّة والحيوية في الخلية البكتيرية وغيرها (Dev, 1996).

كل ذلك حفز الباحثين للبحث عن العلاجات الطبيعية لعلاج التهاب المسالك البولية. حيث تعد الأعشاب الطبيعية فعالة جداً في مكافحة المقاومة البكتيرية وبكفاءة عالية، كما انها متوفرة ورخيصة الثمن مع الحد الأدنى من الآثار الجانبية أو بدونها ولهذا جاءت **اهداف الدراسة** لتشمل التالي:-

1. اختبار مقاومة وحساسية العزلات البكتيرية لعدد من المضادات الحيوية.
2. دراسة التأثير المثبط لبعض المستخلصات النباتية على العزلات قيد الدراسة.
3. دراسة محتوى الـ DNA البلازميدي المتواجد في الأَنواع المختلفة من العزلات البكتيرية.
4. عزل الـ DNA البلازميدي وتوصيفه باستخدام تقنية الترحيل الكهربائي في هلام الآكاروز Gel ElectropHoresis وتقدير تركيزه ودرجة نقاوته قبل وبعد عملية التحييد.
5. تقدير تأثير المستخلصات النباتية على نمو البكتريا.

# الفصل الثاني

# استعراض المراجع

# literature review

## 1-2 التهاب المسالك البولية Urinary Tract Infection

يتركب الجهاز البولي Urinary Tract من المسالك البولية العليا (الحالبين والكليتين) ومن المسالك البولية السفلى (المثانة والاحليل)، إصابة المسالك البولية السفلى يطلق عليه بالتهاب الاحليل Urethritis بينما التهاب المثانة يدعى cystitis، تحصل هذه الإصابة لعدة أسباب منها، إصابة الجهاز البولي المرتبطة بالقسطرة Catheter Associated Urinary Tract Infection (Forsyth *et al.*,2018) ويكون هذا الجهاز معقمًا وبعيدًا عن الاستعمار الفطري والبكتيري والكائنات الحية المجهرية الأُخرى سواءً في الغشاء المخاطي للمثانة او الأجزاء الأُخرى. ويمكن تعريف التهاب المسالك البولية بأنَّه وجود البكتريا في الادرار ( Erdem *et al.*, 2018) من هنا قد تكون إصابة المسالك البولية مكتسبة من المستشفى أو من المجتمع عدوى المسالك البولية المكتسبة في المجتمع community acquired urinary tract infection (CA-UTI) يمكن تعريفها بأنَّها الإصابة التي قد تتاثر في داخل المجتمع تُعدُّ هذه الإصابات هي ثاني الإصابات الَّتي تشخص بشكل متكرر في المجتمعات (Caneiras *et al.*, 2019).

وعند حدوث الإصابة فإنَّ أجزاء مختلفة من الجهاز البولي قد تتاثر. ويمكن ان تصاب النساء الحوامل بالتهاب المسالك البولية بشكل متكرر وذلك بسبب التغيرات الهرمونية والفسيولوجية (Joanna *et al.*, 2015). ومن الاسباب التي يجب ان تؤخذ في عين الاعتبار في زيادة حصول الالتهاب هي الحالة المتدنية الاقتصادية والاجتماعية، أيضًا مرض السكري وفقر الدم المنجلي والتشوهات في الجهاز البولي (Olajide *et al.*, 2018).

إنَّ ظهور العزلات المقاومة للأَدوية المتعددة أدَّى إلى قلة فعَّالية المضادات الحيوية في علاج عدوى المسالك البولية وقلة الاحتمالات العلاجية، وبالتالي زيادة التكاليف العلاجية ومعدل الإصابة بالأَمراض والوفيات يُعدُّ المرضى في المستشفيات الذين يعانون من نقص المناعة والَّذين يعانون من أمراض مزمنة هم الأهداف الرئيسة للبكتيريا المسببة للأمراض ( El Bouamri *et al.*, 2015).

ومن العوامل التي زادت من حدوث الالتهابات قلة التعقيم وانتشار البكتريا بشكل كبير وتلويثها الأجهزة الطبية، مثل اجهزة التنفس، وأجهزة القسطرة البولية التي تستخدم في علاج مرضى المسالك البولية تعتبر هذه البيئة موقعًا مفضلًا لتطوير الأَغشية الحيوية للبكتريا، وخاصةً الانتهازية ومنها *K. pneumoniae* (Djeribi *et al.*, 2012). شخصت العديد من البكتيريا المختلفة باعتبارها عوامل مهمة في إصابة المسالك البولية، ومن أَهمها *P. aeruginosa* و *P.*

*E. coli* و *Sta. aureus* و *E. aerogenes* و *En. cloaca* و *P.mirabilis* و *vulgaris* و *K. pneumonia* ومن أكثرها شيوعًا في إصابة المسالك البولية هي *E. coli* و *K. pneumonia*، الَّتي أُشير اليها أيضًا في النظام العالمي لمراقبة مضادات الميكروبات Global Antimicrobial Surveillance System (GLASS) التابع لمنظمة الصحة العالمية (Chiu *et al*., 2017; Kajihara *et al*., 2020). تُعدُّ البكتيريا الموجبة لصبغة كرام من الأَسباب الشائعة لعدوى المسالك البولية (UTI) وبالأخص بين الحوامل والمسنين والَّذين لديهم عوامل خطرة أُخرى واكثر حالات الإصابة بالبكتريا الموجبة لصبغة كرام المعزولة من التهاب المسالك البولية هي: *StapHylococcus sapropHyticus*، Enterococcus (Erdem *et al*., 2018). يمكن ان يصنف التهاب المسالك البولية تبعاً لموقع الإصابة إلى:

### 2-1-1 التهاب المسالك البولية السفلى Lower Urinary Tract Infection

والَّذي يتكون من (المثانة والاحليل) ويدعى بالتهاب المثانة والاحليل ( cystitis and urethritis) حيث تبدأ الإصابة البكتيرية عادة من الاحليل والمثانة ويحصل تجرثم للادرار والَّذي يكون عادة من دون أَعراض ويدعى Asymptomatic bacteriuria وبعد فترة تظهر الأَعراض حيث يعاني المريض من مجموعة أَعراض تتضمن عسر التادرار وكثرة عدد مرات التادرار والم فوق منطقة العانة (Forsyth *et al*., 2018).

### 2-1-2 التهاب المسالك البولية العليا Upper Urinary Tract Infection

تنتقل البكتريا بعد اصابتها للمسالك الادرارية السفلى إلى المسالك البولية العليا فتسبب التهاب كل من الحالبين والكلى بالإضافة الى حويض الكلى PHyelonepH. يحصل نتيجة لهذه الإصابة بعض الأَعراض مثل الغثيان والحمى وأَلم في البطن والإسهال والقشعريرة والم الخاصرة والتقيؤ وأَكثر من نصف الأطفال المصابين بأخماج الكلية والحويض يعانون من تلف الأَنسجة الكلوية ومع ان التهاب المسالك البولية العليا أَقل حصولًا من التهاب المسالك البولية السفلى إلى أَنَّه يُعدُّ أَكثر خطراً (Forsyth *et al*., 2018;). كما يمكن ان يصنف التهاب المسالك البولية حسب التعقيد إلى:

### 2-1-3 التهاب المسالك البولية غير المعقد Uncomplicated UTI

تنتشر عدوى المسالك البولية غير المعقدة بين النساء الشابات وغير الحوامل، قبل انقطاع الطمث. وقد عزلت البكتيريا السالبة لصبغة كرام من 75 إلى 95٪ من هذه الإصابات

(Hooton, 2012). اما النسب المتبقية من عدوى المسالك البولية غير المعقدة فتحصل نتيجة للإصابة بمجموعة متنوعة من الكائنات الحية، منها البكتيريا الموجبة لصبغة كرام *Sta. sapropHyticus* و*E. faecalis* و*Str. agalactiae* بالاضافة للكائنات الحية المعزولة بشكل أَقل تردداً. عند كبار السن والنساء الحوامل، وقد عزلت البكتيريا الموجبة لصبغة كرام في كثير من الأَحيان كعوامل مسببة لالتهاب المسالك البولية. وتتشابه أَعراض التهاب المسالك البولية غير المعقدة التي تسببها البكتريا السالبة لصبغة كرام مع الأَعراض التي تسببها البكتريا الموجبة لكرام وهي تتضمن عسر الادرار وآلام فوق العانة والإلحاح الادراري، أَمَّا ظهور الحمى، وأَلم في الخاصرة، والغثيان، والقشعريرة، فهي تشير إِلى التهاب الكُلى (Kimberly and Amanda, 2016).

**2-1-4 التهاب المسالك البولية المعقد Complex Urinary Tract Infection**

يشير التهاب المسالك البولية المعقد إِلى التهاب المثانة أو التهاب الكلية وحويض الكلية وهذا يحصل عادة في الأَشخاص الذين يعانون من مشاكل تشريحية أو أَيضيَّة او وظيفية والَّذي يؤدي إِلى صعوبة علاج التهابات المسالك البولية. تحصل اصابات المسالك البولية المعقدة لدى الراقدين في المستشفيات ومؤسسات الرعاية الصحية عادة، كما تحصل في الأَشخاص الذين لديهم تشوهات وظيفية او تركيبية في المسالك البولية والَّذين يحتاجون للقسطرة، بالإضافة الى الأَشخاص الذين لديهم اضطرابات كلوية أو أَيضيَّة أو مناعية (Wagenlehner and Naber, 2006).

**2-1-5 وبائية التهاب المسالك البولية Urinary Tract Infection Epidemic**

عدوى المسالك البولية (UTI) تمثل حواي 20-49٪ من مجموع حالات العدوى في المستشفيات (Lamas e*t al*., 2017). يحتل مرض المسالك البولية المرتبة الثانية من حيث الإصابات حيث يأتي بعد الإصابة بالمسالك التنفسية العلوية إِلَّا إِنَّ نسبه الوفاة فيه تكون أَعلى حيث وجد ان أَكثر من ثلث المرضى الذين يتوفون بسبب الفشل الكلوي سنويا هم مصابون بالتهاب المسالك البولية وتؤدي التهابات المسالك البولية. إِلى التهاب حويض الكلية الحاد، وتجرثم الادرار، وحصوات الكلى (Norsworthy and Pearson, 2017). تشير التقديرات إِلى حدوث 150 مليون حالة سنويًا في جميع أَنحاء العالم وتؤدي إِلى إنفاق ما يزيد عن حوالي

6 مليار دولار سنوياً (Kalal and Nagaraj, 2016). من اهم الأَنواع البكتيرية التي تصيب الجهاز البولي هي:

## 2-2 بكتريا المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus*

### 1-2-2 التصنيف العلمي Scientific Classification

Kingdom: Bacteria
pHylum: Firmicutes
Class: Bacilli
Order: Bacillales
Family: Staphylococcaceae
Genus: Staphylococcus
Species: *aureus*

(Slonczewski and foster, 2014)

تكون هذه البكتريا متكيفة للعيش بصورة طفيلية وهي لا تتنافس مع الأَنواع الأُخرى الموجودة طبيعيا على سطح الجسم. ويُعدُّ الإنسان المصدر الرئيس لهذه البكتريا وتلعب الحيوانات دورًا مهما في نقل هذه البكتريا وتلويث البيئة بها أَكثر من 21% تقريبا من سكان العالم حاملين دائمين لهذه البكتريا حيث يمكن ان تتواجد بصورة طبيعية على سطح الجلد وفي الانف كما انها تعيش بصورة طبيعية في الجهاز التناسلي السفلي للنساء (Kwiecinska-Pirog *et al.*,2016).

### 2-2-2 الوصف العام General Characteristics

المكورات العنقودية الذهبية هي بكتيريا كروية موجبة لصبغة جرام غير مكونة للأبواغ وغير متحركة وموجبة لتخثر البلازما وهي بكتريا لاهوائية اختيارية لذلك يمكن أن تنمو تحت الظروف الهوائية واللاهوائية، ولكن يحدث النمو بمعدل أبطأ بكثير في ظل الظروف اللاهوائية. ويمكن ان تنمو في نطاق واسع من درجة الحرارة والحامضية، وهي تعيش بشكل طبيعي في الغشاء المخاطي للأنف والجلد (Wang *et al.*, 2017). يستطيع هذا النوع من البكتريا العيش في درجة حرارة تتراوح بين 7 – 45 مْ، الدرجة المثلى لهذه البكتريا هي 37 مْ. تستطيع المكورات العنقودية الذهبية مقاومة التجمد حيث تنمو بشكل جيد في الأطعمة المخزنة تحت -20 درجة مئوية، ومع ذلك تنخفض قدرتها عند درجات حرارة من 0 إلى -10 مْ. ومن الممكن قتل المكورات العنقودية الذهبية بسهولة أثناء البسترة أو الطهي. كما تستطيع هذه البكتريا النمو بدرجة حامضية تتراوح بين pH 10.0-4.0، لكن الدرجة المثلى لنموها هي pH 7-6 ( Stewart

2003). تمتلك هذه البكتريا مقاومة بشكل فريد للظروف المعاكسة مثل ارتفاع نسبة الملح والضغط الاسموزي. استجابةً للتركيز المنخفض، تتراكم العديد من المركبات في الخلية البكتيرية، مما يقلل من التركيز داخل الخلية البكتيرية لتتناسب مع المحيط الخارجي تظهر تحت المجهر بشكل مفرد او ازواج او عناقيد، وتبدو مستعمراتها بشكل دائري محدبة ملساء ولامعة، وتكون ذات لون كريمي او اصفر ذهبي، تغير لون وسط المانيتول عند تنميتها عليه من الوردي إلى الأصفر وتكون موجبة لاختبار التجلط ( Montville and Matthews 2008).

### 3-2-2 عوامل الضراوة Virulence Factors

تمتلك هذه البكتريا القدرة على إنتاج العديد من عوامل الضراوة، التي تساعد البكتيريا على التهرب من دفاعات العائل، وبالتالي السماح لها بالغزو والإصابة، وتشمل هذه العوامل المكونات الهيكلية (الكولاجين والفيبرينوجين وبروتينات الإيلاستين الرابطة والبروتين المرتبط بالبنسلين وحمض تيكويك والبروتين ألفا B- Lactamase وProtease والكبسولات) اما الإنزيمات فتشمل (coagulase وstaphylokinase وDNase وphospHatase وlipase وphospholipase وhyaluronidase). إضافة إلى امتلاكها آليات معينة مثل، القدرة على تكوين الأَغشية الحيوية، التي تسهل تمسكها بالخلايا الظهارية للمضيف وغزوه (Ana *et al.*, 2020).

الهيمولايسين، مثل السموم الفا وبيتا والَّتي تهاجم أغشية الخلايا وتسبب تلف الصفائح الدموية وتدمير الجسيمات الحالة والتنخر (Imanishi *et al.*, 2019). تُعدُّ Leukocidins أَيضًا سموم والَّتي تهاجم الخلايا المناعية على وجه التحديد ومن اهم عوامل الضراوة التي تمتلكها البكتريا هو بروتين A الموجود من ضمن مكونات الجدار للخلية البكتيرية ويعمل على تثبيط عملية البلعمة (Wang *et al.*, 2017) تنمو بكتريا *Sta. aureus* ضمن نطاق درجة حرارة 10−40 مْ، وكحد أقصى 45 مْ، يمكن أن تحدث عملية إنتاج السموم المعوية في كل من البيئات اللاهوائية والهوائية، إلَّا إنَّ الظروف الهوائية تُعدُّ الأمثل لتكوين هذا السم المعوي كما يمكن للسموم المعوية اختراق بطانة الأَمعاء وتحفيز الاستجابة المناعية للمضيف. وهذا يتسبب في إطلاق وسائل الدفاع، مثل الهيستامين. أَيضًا فإنَّ الاستجابة المناعية للمضيف تكون مسؤولة عن الأضرار التي تلحق بالجهاز الهضمي المرتبط بابتلاع هذه البكتريا، والَّذي يحدث اضراراً

في المعدة والجزء العلوي من الأَمعاء الدقيقة. ويمكن ان يسبب الإسهال الذي يثبط عملية امتصاص الماء والأَملاح في الأَمعاء الدقيقة (Stewart,2003 ).

### 4-2-2 الامراضية **Pathogenesis**

تُعدُّ المكورات العنقودية الذهبية من المسببات الرئيسية للإصابة البكتيرية لدى البشر في جميع أنحاء العالم وهي تشكل مشكلة صحية كبيرة في كل من المستشفيات والمجتمع (Diekema *et al*., 2001). وعادة ما تتواجد هذه البكتريا على أسطح الجلد للأفراد الأصحاء. عندما تحدث الإصابة فإنَّ أخطر أَنواع الإصابة هي التهاب الشغاف والتهاب العظم والنقي والالتهاب الرئوي الناخر والذي يحصل بعد انتشار البكتيريا في مجرى الدم (Lowy, 1998). على الرغم من أن جنس *Staphylococcus* يشمل 52 نوعًا و28 نوعًا فرعيًا فإنَّ *St. aureus* هي الأَكثر صلة بالإصابات السريرية إلى حد بعيد. تم العثور على بكتريا المكورة العنقودية ضمن الكائنات الحية الدقيقة المتعايشة في الغشاء المخاطي للأنف في 20–40 % من عامة الناس (Becker *et al*., 2017).

عند حصول خلل في الحواجز الجلدية والمخاطية كما هو الحال عند الإصابة بالأَمراض الجلدية المزمنة أو الجروح أو التداخل الجراحي، يمكن أن تتمكن المكورات العنقودية الذهبية من الوصول إلى الأَنسجة الداخلية أو مجرى الدم وتسبب الإصابة. الأَشخاص الذين يستخدمون الأجهزة الطبية الملوثة (مثل القسطرة الوريدية المحيطية والمركزية) أو الذين يعانون من ضعف الجهاز المناعي أَكثر عرضة للإصابة ببكتريا المكورة العنقودية (Lowy, 1998). في الحيوانات المنتجة للحليب، تعتبر هذه البكتريا المسبب الرئيس لالتهاب الغدد الثدية، والَّتي تسمى بالتهاب الضرع وبالتالي يسبب خسائر اقتصادية كبيرة في صناعة الالبان (Imanishi *et al*., 2019). أَشارت الدراسات التي تعود إلى ما لا يقل عن 50 عامًا أن هذه البكتريا قادرة على الغزو والبقاء حية داخل خلايا الثدييات، بما في ذلك الخلايا البلعمية المسؤولة عن الدفاع عن الجسم ضد المسببات المرضية بالوقت الذي يتم فيه قتل أَغلب الأَنواع البكتيرية بشكل فعَّال بواسطة هذه الخلايا، فإنَّ الإزالة غير الكاملة للمكورات العنقودية الذهبية داخل الخلايا البلعمية التي تتنقل في الدم يمكن ان تعمل كـ "أحصنة طروادة" لنشر البكتيريا بعيدًا عن الموقع الأولي للإصابة (Thwaites and Gant, 2011).

ان شدة العدوى ولا سيما الوفيات المرتبطة بتجرثم الدم تعزى إلى عدة عوامل مرتبطة بالعائل منها العمر ووجود الأمراض المزمنة تعتبر هذه البكتريا ملوثًا متكررًا للمواد الغذائية، وهي تمثل العامل الممرض الرئيس الذي ينتقل عن طريق الغذاء الَّذي يسبب مشاكل صحية لكل من الحيوانات والبشر على حد سواء (Recker *et al*., 2017). بإمكان المكورات العنقودية الذهبية التسبب بالعديد من المشكلات الصحية غير المتعلقة بالأغذية مثل التهابات الجلد والدمامل، وتعفن الجروح والتهابات الجهاز التنفسي (Montville and Matthews 2008).

كثيراً ما يتم عزل هذه البكتريا من عينات الادرار المأخوذة من المرضى الذين يعانون من امراض مزمنة. خطورة تجرثم الادرار بهذه البكتريا غير مؤكدة. وقد افترض أن المكورات العنقودية الذهبية هي أحد مسببات الأمراض البولية وأن الادرار المجرثم بهذه البكتريا يمكن أن يكون مصدرًا لعدوى المكورات العنقودية في المستقبل. تعتبر هذه البكتريا من المسببات الرئيسة لعدوى المسالك البولية بين مرضى قسطرة المسالك البولية. وقد وجد ان الغالبية العظمى من العزلات مقاومة للميثيسيلين. يمكن أن تؤدي بكتيريا *Sta. aureus* إلى عدوى متفشية لاحقة (Muder *et al*., 2006).

## 3-2 بكتريا الايشيريشيا القولونية *Escherichia coli*

### 1-3-2 التصنيف العلمي Scientific Classification

تُصنف بكتريا *E. coli* ضمن العائلة المعوية في مصنف العال Bergey’s manual كالاتي:

Kingdom: Bacteria
pHylum: Proteobacteria
Class: Gammaproteobacteria
Order: Enterobacteriales
Family: Enterobacteriaceae
Genus: Escherichia
Species: *coli* (Garrity *et al*., 2005).

لاحظ العالم الألماني Theodore Escherich عام (1885م) ولأول مرة بكتريا *E. coli* اثناء دراسته التي كان يجريها على البكتريا التي تتواجد طبيعياً في الأمعاء وفي براز الاطفال الرضع والَّتي تستوطن الأمعاء مباشرة بعد الولادة، كما لاحظ العالم Bray في عام (1945) ان أحد سلالات بكتريا *E. coli* كانت هي المسبب الرئيسي لإسهال الاطفال الرضع

في انكلترا حينها اطلق عليها اسم *Enteropathogenic E. coli* (EPEC) ويعتبر النوع *E. coli* الأَكثر اهمية وانتشارًا من ناحية الإمراضيَّة للإنسان (Bray, 1945).

**2-3-2 الوصف العام General Description**

بكتريا عصوية الشكل سالبة لصبغة كرام وغير مكونة للأبواغ لها القابلية على الحركة عن طريق اسواط محيطية peritrichous flagella تحيط بجسم البكتريا. المستعمرات التابعة لها تكون رطبة وناعمة وملساء وذات تحدب قليل كما انها غير مخاطية وتصبح مخاطية عند تكوينها للمحفظة capsule ،حافاتها كاملة وحادة ، تكون مستعمرات غامقة اللون ذات لمعان اخضر معدني sheen green metallic عند تنميتها على وسط آكار الأيوسين مثيلين الأزرق Eosin Methylene Blue Agar (EMB) بينما تكون مستعمرات ذات لون وردي لامع عند تنميتها على وسط آكار الماكونكي MacConkey Agar، كذلك فهي تكون عند تنميتها على وسط آكار الكروماجين اورينتيشنCromagar Orientation مستعمرات ذات لون وردي ، وهي غير محللة للجيلاتين Gelatin. حوالي 90% منها تكون مخمرة لسكر السوربتول Sorbitol، بينما 89% منها مخمرة لسكر رامينوز Ramenose، وتكون غير مخمرة لسكر السليلوبايوز cellulobios. لا تستطيع إنتاج كبريتيد الهيدروجين $H_2S$ عند تنميتها على وسط آكار ثلاثي السكر والحديدTriple Sugar iron agar (TSI) لها القابلية على النمو عند اس هيدروجيني يقع بين (9 – 44)، درجة الحرارة المثالية لتنميتها هي (37مْ) ( Wanger *et al*., 2017).

لا تستهلك السترات Citrate كمصدر وحيد للكاربون، وتكون موجبة لاختبار المثيل الأَحمر methyl red واختبار الكتاليز catalase واختبار الأَندول indole وهو أفضل اختبار يميزها عن بقية افراد العائلة المعوية. وهي من البكتريا السالبة لاختبار فوكس بروسكور Vogase – Proskauer واختبار الاوكسيديز Oxidase واليوريز Urease (Hemraj *et al*., 2013).

**3-3-2 عوامل الضراوة Virulence Factors**

لهذه البكتريا عوامل ضراوة متعددة وهذا ما يزيد من قابليتها على إحداث الإمراضيَّة لأَجزاء الجسم المختلفة وبالأخص إصابة الجهاز البولي التناسلي، بعض سلالاتها لها القابلية

على تحليل كريات الدم الحمراء لامتلاكها إنزيم (hemolysin) (Neamati *et al.*, 2015).
لهذه البكتريا أَيضًا القابلية على إنتاج المحفظة capsule المتعددة السكريات الحاوية على المستضد المحفظي (capsular antigen K) كما تمتلك البكتريا السموم الداخلية Endotoxins التي تتكون من (lipopolysaccharide (LPS كما انها تمتلك المستضد الجسمي (somatic antigen O)، بواسطة هذه المستضدات فإنَّ البكتريا تتمكن من التغلب على الجهاز المناعي للمضيف كما تمتلك هذه البكتريا تراكيب سطحية أُخرى وهي الأَسواط flagellaالَّتي تحتوي على المستضد السوطي (flagellar antigen H) التي تستعمل من أَجل الحركة في الأَنواع المتحركة (Terlizzi *et al.*, 2017). كما تمتلك هذه البكتريا الأَهلاب Pili الَّتي تُعدُّ وسيلة لالتصاق البكتريا بالخلايا الظهارية الادرارية ومن خلالها تقاوم البكتريا الحركة الميكانيكية لتدفق الادرار وافراغ المثانة وتمتلك هذه البكتريا ثلاث أَنواع من الأَهلاب ( -P Fimbrial, S- Fimbrial, F-Fimbrial) ومن اهم العوامل التي تساعد البكتريا على الالتصاق هو(Type1 Pilli)  كما يمنح البكتريا القدرة على إنتاج الغشاء الحيوي وهذا ما يجعلها أَكثر قدرة على مقاومة المضادات الحيوية (Spaulding *et al.*, 2017).

أَيضًا تمتلك البكتريوسين bacteriocin الَّذي يدعى colicin الذي يعمل على حماية البكتريا عن طريق القضاء على الاجناس البكتيرية الأُخرى، كما تفرز بكتريا Enteroaggregative *E. coli* (EAEC) أَيضًا السموم المشفرة بالبلازميد -Plasmid encoded toxin (Pet) وهي سامة لكل من كريات الدم الحمراء والخلايا المعوية، إضافة لامتلاكها للسموم الحويصلية (vacuolating autotransporter toxin (VAT ) Soltani *et al.*, 2018).

كما تمتلك هذه البكتريا المقاومة لمضادات aminoglycosides لامتلاكها إنزيمات pHospHotransferase وacetyltransferase والبيتالاكتاميزβ-lactamases  وتشمل كلا من cepHalosporines وpenicillins وهذه تجعل البكتريا مقاومة لمضادات البيتالاكتام - β lactam (Zowawi *et al.*, 2015).

**4-3-2 الإمراضيَّة Pathogenesis**

تعتبر هذه البكتريا أَكثر افراد العائلة المعوية أهمية وانتشارًا، وهي تتواجد كنبيت طبيعي normal flora داخل الجهاز الهضمي، وتُعدُّ بكتريا انتهازية ممرضة opportunistic

pathogen حيث تصيب المضيف بالإسهال diarrheal diseases ويطلق عليها Diarrheagenic *E. coli* (DEC) كما تتسبب بالعديد من الأَمراض من أَهمها تسمم الدم sepsis والتهاب السحايا للأطفال حديثي الولادة neonatal meningitis كما انها تصيب الجهاز البولي urinary tract infection وهي المسؤولة عن حوالي 80% من إصابات الجهاز البولي وهي تتنقل بسهولة من منطقة الشرج إلى منطقة المسالك البولية والمثانة وتسبب المرض وهذه الحالة شائعة في الإناث أَكثر من الذكور وذلك لقصر منطقة الاحليل في الإناث .(Levinson, 2017 )

## 4-2 بكتريا الكليبسيلا الرئوية *Klebsiella pneumonia*

### 1-4-2 التصنيف العلمي **Scientific Classification**

Kingdom: Bacteria
pHylum: Proteobacteria
Class: Gammaproteobacteria
Order: Enterobacteriales
Family: Enterobacteriaceae
Genus: Klebsiella
Species: *pneumoniae* (Garrity *et al*., 2005).

في عام 1834م اكتشفها العالم الألماني Edwan Klebs عندها سميت باسمه، بينما تم تشخيصها لأول مرة من قبل العالم Fried Landers في عام 1882 م وأطلق عليها عصيات Fried Landers Bacilli تنتمي بكتريا الكليبسيلا إلى العائلة المعوية Enterobacteriaceae. (Barone *et al*., 1997).

### 2-4-2 الوصف العام **General Characteristics**

عبارة عن عصيات سالبة لصبغة كرام وغير متحركة قد تكون مفردة او بشكل ثنائيات او سلاسل وهي بكتريا مخمرة لسكر اللاكتوز، ولها القابلية على النمو في درجة حرارة تتراوح بين 12-43 مْ وهي تموت بتعرضها لدرجة حرارة رطبة 55 مْ ولمدة 30 دقيقة ، عندما تكون الظروف البيئية مواتية فإنَّ هذه البكتريا لها القدرة على تكوين حافظة لزجة تتكون من عديد السكرايد وهذا ما يجعلها ذات قوام لزج، تظهر مستعمراتها بلون رمادي مبيض وكبيرة الحجم ولزجة القوام على وسط آكار الدم، أَمَّا على وسط الماكونكي آكار فإنَّ أَغلب أَنواعها تظهر بلون

وردي لزج بسبب قابليتها على تخمير اللاكتو، تكون سالبة لفحص الأَندول، لاتكون $H_2S$ عند تنميتها على وسط ثلاثي السكر والحديد (TSI) ، تكون مخمرة للاكتوز ومنتجة ل إنزيم اليوريز، تكون سالبة لكل من اختباري المثيل الأَحمر والاوكسديز كما انها تُعدُّ من البكتريا غير المحللة للدم ، وتكون موجبة لاختبار الكتاليز، وبإمكانها ان تستغل السترات كمصدر وحيد للطاقة (Podschun and Ullmann, 1998; Abbott, 2011).

## 2-4-3 عوامل الضراوة Virulence Factors

تمتلك هذه البكتريا مجموعة متنوعة من عوامل الضراوة أهمها الأهلاب، والكبسولة التي تحميها من البلعمة الَّتي تكون مكونة من عديد السكريات الدهني (Clegg and MurpHy, 2016). نمو هذه البكتريا في الجسم الحي يتطلب الحصول على الحديد واستعماله لعمليات التمثيل الغذائي الأساسية. وبما ان الحديد مطلوب أَيضًا من الخلايا المضيفة، من أَجل بقائها على قيد الحياة، تتنافس البكتيريا مع المضيف على الحديد المتاح. ويشمل أَيضًا المنافسة على المركبات المستقبلة والرابطة للحديد، مثل الترانسفيرين واللاكتوفيرين، طورت هذه البكتريا أنظمة ربط الحديد الخاصة بها للحصول على الحديد الضروري اللازم لبقائها. (Khimji and Miles, 1978). معظم الدراسات ركزت على دور الالتصاق في هذه البكتريا الذي يلعب دورًا في إصابة المسالك البولية ويعتمد على نوعين من أَنواع الأَهلاب، النوع 1 والنوع 3 واللذان ينتجان عن العديد من عزلات المسالك البولية من هذه البكتريا (Clegg S. and Murphy, 2016).

تُعدُّ عملية تكوين الأَغشية الحيوية Biofilms عملية معقدة وقد تم تقسيمها إِلى عدة مراحل وهي تتضمن التعلق، وإِنتاج المستعمرات الدقيقة، وتكوين الأَغشية الحيوية الناضجة، وإِطلاق البكتيريا الحية من الغشاء الحيوي. يُعتقد أن تكوين الأَغشية الحيوية هو وسيلة لتعزيز الثبات حيث يعتقد أَنَّ البكتيريا الموجودة داخل الأَغشية الحيوية تكون أَقل عرضة للقتل بواسطة آليات دفاع المضيف. كما أَنَّ هناك دليلًا على أَنَّ مستعمرات الأَغشية الحيوية أَكثر مقاومة لعمل العديد من المضادات الحيوية (Hennequin *et al*., 2012).

## 2-4-4 الإمراضيَّة Pathogenesis

خلال العقدين الماضيين، اصبحت هذه البكتريا من المسببات المرضية المرتبطة بالرعاية الصحية، اكتشف انها العامل المسبب لحوالي 14-20% من الإصابات المتعلقة بالمسالك البولية

والجهاز التنفسي والقناة الصفراوية السفلية والجروح الجراحية (De Rosa *et al*. 2015). تُعتبر *K. pneumoniae* سببًا رئيسًا لعدوى المسالك البولية المكتسبة من الأَمعاء، وغالبًا ما يكون سائدًا كعامل معدي للمرضى الذين يعانون من القسطرة البولية وازداد الوعي بدور هذه البكتريا كمسبب هام للأمراض الانتهازية في المسالك البولية لدى الأفراد الذين يعانون من نقص المناعة والأَمراض المزمنة في المستشفيات على مدى العقود الماضية. أَدَّى ظهور البكتيريا التي تظهر أنماطًا ظاهرية متعددة المقاومة للمضادات الحيوية إِلى صعوبة علاج عدوى المسالك البولية والسيطرة عليها (Won *et al*., 2011).

تُعدُّ هذه البكتريا من أبرز الأَحياء المجهرية الملوثة للماء والتربة وهي تسبب العديد من الأَمراض للإِنسان والحيوان وحتى النبات، كما أَنَّها تُعتبر من الممرضات الانتهازية حيث تتسبب بالعديد من الإِصابات منها إِصابة الرئة والجهاز البولي التناسلي وحالات تسمم الدم والعديد من الأَمراض الأُخرى (Lin *et al*., 2014).

توجد هذه البكتيريا بشكل طبيعي في الفم والجلد والأَمعاء وتم العثور على نوع جديد شديد الضراوة من هذه البكتريا، يؤدي إِلى إِصابات شديدة ومهددة للحياة، بما في ذلك خراجات الكبد القيحية والتهاب باطن المقلة والتهاب السحايا، وأصبح مصدر قلق للصحة العامة (Struve *et al.,* 2015). قد يكون المرضى الذين يعانون من مرض الكلى المزمن والفشل الكلوي معرضين لخطر كبير للإِصابة بالمضاعفات الخطرة للإِصابة بهذه البكتريا، على غرار المرضى الذين يعانون من عيوب أُخرى من نقص المناعة المكتسبة أو أولئك الذين عولجوا بالأَدوية المثبطة للمناعة (Mody and Juthani *et al*., 2014).

## 5-2 بكتريا الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa*

### 1-5-2 التصنيف العلمي **Scientific Classification**

Kingdom: Bacteria
PHylum: Proteobacteria
Class: Gamma Proteobacteria
Order: Pseudomonadales
Family: Pseudomonadaceae
Genus: Pseudomonas
Species: *aeruginosa*

(Slonczewski and foster, 2014)

اول من استطاع عزلها من الجروح الملتهبة هو الصيدلاني الفرنسي Carle Gessard ولكونها منتجة لصبغة البايوسيانين Pyocynain أطلق عليها اسم *Bactrium pyocyaneus* هكذا بقي هذا الاسم متداولاً حتى عام 1900 حينما أطلق عليها اسم *Pseudomonas pyocyaneas* ومن ثم أيضًا تم تغيير اسمها وسميت *Ps. aeruginosa* يتكون هذا الاسم اليوناني من مقطعين الأول *Pseudomonas* الَّذي يعني كاذب أمَّا الثاني فيعني زنجارية فتسمى الزائفة الزنجارية (Fetar, 2011).

جنس Pseudomonas الَّذي يضم الأَنواع الآتية (*Ps. pseudomallei*، *Ps. mallei*، *Ps. fluorescens*، *Ps. aeruginosa*) الَّتي وجدت اصاباتها في كل من الإِنسان والحيوان ينتمي إِلى عائلة Pseudomonadaceae (Patricia, 2012).

**2-5-2 الوصف العام General Characteristics**

تكون هذه البكتريا على شكل عصيات سالبة لصبغة كرام هوائية، وغير مكونة للسبورات non– spore forming، ومتحركة حيث تمتلك سوط قطبي واحد Polar flagella وقد تمتلك عدد من الأَسواط Several flagella ، تظهر بشكل مفرد او سلاسل، أبعادها تقع بين (0.8-0.5) X (3-1.5) مايكروميتر، تختلف عن بقية أَفراد العائلة المعوية وذلك بكونها هوائية اجبارية Obligate aerobes اذ تقوم بأكسدة المواد الكربوهيدراتية بوجود الاوكسجين وتحرير الطاقة منها وليس تخميرها، هذه البكتريا لا تخمر اللاكتوز ( Levinson, 2017 ).

ينتج هذا النوع البكتيري نوعين من الصبغات وهما البايوسيانين Pyocyanin، والبايوفردين Pyoverdin (Fluorescein)، الأولى تتميز بقدرتها على صبغ القيح المتكون من إصابات الحروق والجروح باللون الأزرق المخضر، أمَّا الثانية فتمتاز بلونها الأَصفر المخضر الَّذي يتوهج تحت الاشعة فوق البنفسجية Ultraviolet light، هاتان الصبغتان تعدَّان ذات أهمية كبيرة في تشخيص هذا النوع البكتيري، كما تمتاز هذه البكتريا بقدرتها على النمو في بعض المواد المطهرة والمنظفات والمواد الحاوية على محاليل الصابون مثل HexachloropHene،هذه القدرة على مقاومة المطهرات والمنظفات جعلتها من مسببات العدوى المكتسبة في المستشفيات Hospital-acquired infection ( Sudhaker *et al.*, 2015).

لهذه البكتريا القدرة على النمو على وسط الماكونكي آكار MacConkey agar إلَّا إنَّ مستعمراتها ليس لها القدرة على تخمير سكر اللاكتوز Non lactose fermentation لذلك تبدو بلون شاحب على هذا الوسط كما يفوح منها رائحة تشبه رائحة العنب المتعفن ، كما أَنَّ لهذه البكتريا القدرة على النمو في درجة حرارة 42 مْ تحلل الدم فيها يكون من نوع البيتا β– Hemolytic حيث يظهر حول مستعمراتها هالة شفافة وذلك عند تنميتها على وسط آكار الدم Blood agar لقدرتها على إنتاج إنزيم الهيمولايسين Haemolysine، وتكون مستعمراتها غامقة اللون على هذا الوسط (Brooks *et al*., 2013).

### 3-5-2 عوامل الضراوة Virulence Factors

لهذه البكتريا العديد من عوامل الضراوة الَّتي تزيد من امراضيتها منها عوامل خلوية وأُخرى خارج خلوية هذه العوامل تحميها من الوسائل الدفاعية للمضيف وتساعدها على غزو انسجة المضيف قد تبقى هذه العوامل على سطح البكتريا او تفرز إلى الخارج، وتشمل كلا من الأَهلاب Pili التي تساعد البكتريا على الالتصاق بالأَنسجة الظهارية للمضيف، والإنزيمات الخارجية Exoenzyme الَّتي تساعد البكتريا على إحداث تنخر في انسجة المضيف والدخول إلى الداخل كما تعمل على حمايتها من عملية البلعمة، كما تفرز البكتريا أَيضًا السم الخارجي Exotoxin A الذي يساعد البكتريا على نخر انسجة الكائنات حقيقية النواة وذلك بتثبيط عملية إنتاج البروتين، تكوين إنزيم Phospholipase الذي يعمل على التحلل المائي للدهون المفسفرة PHospHolipids ممَّا يساعد البكتريا على غزو واستيطان الأَنسجة المصابة، كما تنتج هذه البكتريا أَيضًا إنزيم Lecithinase، وتنتج أَيضًا نوع من السموم الخلوية Cytotoxins الذي يعمل على قتل كريات الدم البيض وهو Leukocidin من خلال إحداث خلل في الغشاء الحيوي للخلايا العدلة (Alhazmi,2015).

أَيضًا تقوم هذه البكتريا بإنتاج إنزيمات حالة للبروتين الَّتي تساعدها في نخر الأَنسجة كما تسبب أَيضًا نزيفا حادا منها ، أَيضًا البروتييز القاعدي Alkaline Protease الذي يعمل على هدم وتلف انسجة الرئة وذلك عن طريق تحطيم البروتينات الهيكلية مثل الكولاجين والببتيدوكلايكان الذي يقوم بدور مهم في إصابات الحروق, أَيضًا إنزيم الايلاستيز Elastase وإنزيم الكتاليز Catalase الَّذي يعمل على تحلل بيروكسيد الهيدروجين إلى ماء واوكسجين (Bai *et al*., 2011).

لهذه البكتريا عوامل ضراوة تسبب الإصابة المزمنة منها Siderophore التي تعمل على مساعدة البكتريا على النمو وتكوين المستعمرات ، كما تعمل طبقة الالجينيت على حماية البكتريا من خلايا البلعمية الدفاعية للمضيف (Pedersen *et al.*, 2018). كما تقوم هذه البكتريا بتكوين الغشاء الحيوي الذي يساعدها على مقاومة دفاعات المضيف ومقاومة الجهاز المناعي والمضادات الحيوية حيث يشترك كل من الأَهلاب وطبقة الالجينيت ومتعدد السكريات في تكوينه (Köse and Yapar, 2017).

**4-5-2 الإمراضيَّة Pathogenesis**

عدوى المسالك البولية (UTI) تمثل حوالي 20-49% من مجموع حالات العدوى في المستشفيات، تتسبب هذه البكتريا ب 7-10% من حالات العدوى هذه تحصل الإصابة بهذه البكتريا بدايةً عندما تلتصق هذه البكتريا بواسطة الأَهلاب Pili على خلايا المضيف ثم تقوم بعدها بإفراز إنزيمExoenzyme S الَّذي يعمل على نخر الأَنسجة ليسهل الاختراق ( Neamah, 2017). ومن ثم يبدأ حصول الالتهاب بفعل العديد من عوامل الضراوة التي تمتلكها هذه البكتريا حيث تفرز السم الخارجي Exotoxin A الَّذي يشابه سم الدفثيريا dipHtheria toxin وهو عبارة عن بروتين سام للخلايا البلعمية PHagocyte وذلك بتكوين معقد مع عامل الاستطالة Elongation factor 2 (EF2) يعمل على تأخر التئام الجروح بسبب تثبيطه لتخليق البروتينات وبالتالي حصول تنخر في الأَنسجة وقد يؤدي إلى الوفاة في حالة الإصابة بالحروق (Gellatly and Hancock, 2013).

أَمَّا تسببها بالحمى Fever فهو نتيجة لامتلاكها الذيفان الداخلي Endotoxine الَّذي يسبب الصدمة السمية نتيجة لتسمم الدم، كما ان تكوين المستعمرات وغزو الأَنسجة الموضعي يعتمد على تكوين هذه البكتريا للسموم الخارجية كما تساعد الإنزيمات على تحطيم دفاعات المضيف، للكبسولة دور مهم في حماية هذه البكتريا من البلعمة، وأَيضًا تحميها من المضادات الحيوية، تقوم هذه البكتريا أَيضًا بإفراز الصبغات الخضراء المزرقة عند الإصابة بالجروح (Alhazmi, 2015). وبعد دخول البكتريا تنتشر في أجهزة الجسم وتؤدي إلى إحداث إصابات مختلفة حيث تسبب التهابات في المسالك البولية (Urinary Tract Infection) ، والتهاب الأُذن الوسطى (Otitis media)، والتهاب الرئة (Pneumonia)، والتهاب شغاف القلب (Endocarditis)، والتهاب اغشية الدماغ (Meningitis)، والتهاب المفاصل والعظام ( Bone and joints infection)، والتهاب الجلد والأَغشية الرخوة (Skin and soft tissue )،

والتهاب الأَمعاء والمعدة (Gastrointestinal infection)، يُعدُّ الأَشخاص المصابين بالتليف الكيسي (Cystic fibrosis) أَكثر عرضة للإصابة بالتهاب الرئة ، الأَشخاص الذين يصابون بالحروق العميقة والمصابين بسرطان الدم والمصابين بنقص المناعة والقدم السكري يكونون عرضة للإصابة بالتسمم الدموي بهذه البكتريا كما أَنَّها قد تسبب خلل في الدورة الدموية الصغرى (Levinson, 2017).

## 6-2 جنس المتقلبات الرائعة *Proteus* spp.

### 1-6-2 التصنيف العلمي Scientific Classification

Kingdom: Bacteria
PHylum: Proteobacteria
Class: Gamma Proteobacteria
Order: Enterobacteriales
Family: Enterobacteriaceae
Genus: Proteus
Species: *hauseri, mirabilis, myxofaciens, penneri, vulgaris*
(Atlase and Snyder, 2006).

اكتشفت العزلات الأولى وتم تمييزها في أواخر القرن التاسع عشر عن طريق العالم Hauser الذي قام بعزلها لأول مرة من مياه المسالك والبراز والمواد العضوية المتحللة وأطلق عليها اسم Proteus وذلك نتيجة لامتلاكها ظاهرة تعدد الأَشكال Polyomorphism (Manos and Belas, 2006).

وفي عام 1951 استطاع العالم Henriksen التمييز بين جنسي Proteus وProvidencia عن طريق إجراء بعض الاختبارات الكيموحيوية ووجد قابلية إنتاجهما لإنزيم Deaminase الَّذي لا ينتج من بقية مجاميع العائلة المعوية كما أوضح ان جنس Proteus يستطيع إنتاج كلاً من إنزيم Lipase وGelatinase لكنه غير قادر على إنتاج الحامض عند تخميره السكريات المختلفة المانوز، والكاربينول وذلك على العكس من جنس Providen (Karlowsky *et al*.,2003).

يشمل هذا الجنس حاليًا الأَنواع الآتية *P. mirabilis* و *P. vulgaris* و *P. penneri* و *P. hauseri* و *P. terrae* و *P. cibarius* الأَنواع التي تستوطن الأَمعاء البشرية تشمل *P.*

*vulgaris* و *P. mirabilis* و *P. penneri*، ومع ذلك فهي تشكل أَقل من 0.05% من مايكروبات الأَمعاء للأَشخاص الأصحاء (Drzewiecka *et al.*, 2016).

## 2-6-2 الوصف العام Scientific Classification

تُعدُّ .Proteus spp بكتيريا سالبة لصبغة جرام تنتمي إِلى العائلة المعوية Enterobacteriaceae وهي من البكتريا الشائعة المتواجدة في الأَمعاء تكون أَنواع المتقلبات عبارة عن عصيات قصيرة ومستقيمة (1.5 إلى 2 مايكروميتر) تظهر تحت المجهر بشكل ازواج او سلاسل، كما هو الحال في أَنواع العائلة المعوية Enterobacteriaceae الأُخرى متحركة وغير مكونة للسبورات وهي بكتريا هوائية (Armbruster and Mobley, 2012).

تمتلك هذه البكتريا الأَهلاب والأَسواط كما تنتج إِنزيم اليوريز، وكذلك تنتج إِنزيم الجيلاتينيز لذا بإمكانَّها إماثة الجيلاتين، وتكون سالبة لفحص الاوكسديز، موجبة لفحص الستريت، كما تنتج كبريتيد الهيدروجين عند تنميتها على وسط آكار ثلاثي السكر والحديد ،تكون سالبة لاختبار فوكس – بروسكور ، موجبة لاختبار المثيل الأَحمر.تكون أَنواعها سالبة لفحص الأَندول ما عدا *P. vulgaris* التي تكون موجبة لهذا الاختبار ، موجبة لفحص الكتاليز، وهي غير مخمرة للاكتوز؛ لذا تظهر مستعمراتها شاحبة على وسط الماكونكي آكار، وتكون مخمرة للكالاكتوز والسكروز والكلوكوز(Greenwood *et al.*,2012).

تبدي بكتريا *P. mirabilis* ظاهرة تعرف باسم العج Swarmming، وقد وجد أن قدرتها على غزو المسالك البولية ترتبط مع حركة العج تظهر الخلايا سابحة في البيئات السائلة كخلايا مفردة قصيرة سابحة تدعى الخلايا المنثالية (Swimmer cell) تمتلك 4 إلى 10 أَسواط محيطية ينتج عن ظاهرة العج لأَنواع المتقلبة نمط عين الثور المميز على المزرعة البكتيرية الصلبة، كنتيجة لعملية دورية من مراحل التحضير للانقسام والانتشار ( Pearson *et al.*, 2010). بالإمكان حدوث ظاهرة العج في كل من الظروف الهوائية واللاهوائية. كما ويمكن أن تحدث ظاهرة العج بسبب تركيز الأحماض الأَمينية، وبالأخص الكلوتامين ( Armbruster *et al.*, 2013).

يتم التعرف على أَنواع البروتيس سريريًا وبشكل شائع كسبب لعدوى المسالك البولية. الأَنواع التابعة لهذه البكتريا تنتمي لعائلة البكتيريا المعوية. وبالرغم من أَنَّ Proteus spp. تعتبر عادةً مقاومة في الجهاز الهضمي، إلى أَنَّ تواجدها بالنسبة للمجتمع الميكروبي منخفض

جدًا (0.05٪) تُعدُّ *P. mirabilis* منتشرة بشكل واسع في البيئة وقد تم عزلها من أمعاء الإنسان والحيوانات الأُخرى (Rouger, 2017).

### 3-6-2 عوامل الضراوة Virulence Factors

لبكتريا *P. mirabilis* العديد من عوامل الضراوة الَّتي تمكن البكتريا من الحركة الفعَّالة ضد مجرى الادرار، والتخلص من نظام الجهاز المناعي للمضيف. وتُعدُّ fimbriae هي الأَكثر شيوعا، الَّتي تتوسط الارتباط بالخلايا الظهارية للمسالك البولية الَّتي تسمح للبكتيريا بالالتصاق بالخلايا المضيفة (Armbruster *et al*., 2018). كما تنتج هذه البكتريا أَيضًا الهيمولايسين السام للخلايا المضيفة وهو يساعد البكتريا على استيطان المسالك البولية تُعدُّ مستقبلات siderophores ذات أهمية كبيرة في اكتساب $Fe^{+3}$ من المضيف هذا بالاضافة الى تشكيل الأَغشية الحيوية، والسمية الخلوية، تُعدُّ عوامل مهمة أَيضًا في إحداث الإصابة كما تعمل *P. mirabilis* على تشفير العديد من جينات الضراوة المسببة للإصابة (Cestari *et al*., 2013).

يُعدُّ اليوريز انزيم ضراوة ذو أهمية كبيرة في إمراضية المتقلبة، يحفز هذا الإنزيم تكوين حصوات المثانة والكلى ويسد القسطرة الادرارية الساكنة (Armbruster *et al*., 2018). وذلك لمساهمته في التحلل المائي لليوريا وإطلاق الأَمونيا وثاني أوكسيد الكاربون، وتُعدُّ مصدرًا للنتروجين للبكتريا كما يؤدي إِلى زيادة درجة قاعدية الادرار، وبالتالي يؤدي إِلى ترسب مركبات الكالسيوم والمغنيسيوم (Armbruster and Mobley, 2012).

وترتبط الإمراضيَّة لسلالات *Pr. mirabilis* أَيضًا بقدرتها على التجمع على الاسطح الصلبة (Norsworthy and Pearson, 2017). تنتج *P. mirabilis* ومعظم سلالات *P. vulgaris* فقط hpmA، بينما معظم سلالات *P. penneri* تنتج hlyA، وعدد قليل من سلالات *P. vulgaris* المشخصة تنتج كلا من hpmA و hlyA اثبت قدرة hpmA على تحليل خلايا الدم الحمراء، والخلايا الظهارية في المثانة، وخلايا السرطان، والخلايا البائية للغدد الليمفاوية، والخلايا الأحادية، بينما يمكن لـ hlyA أن تحلل كريات الدم الحمراء والخلايا المولدة الليفية والعدلات (Cestari *et al*., 2013).

## 4-6-2 الإمراضيَّة Pathogenesis

تم تشخيصها سريريًا بشكل شائع كسبب رئيس لعدوى المسالك البولية. إلى أَنَّ التحديد الأخير لـ .*Proteus* spp كمسببات إمراضية محتملة في تكرار داء كرون بعد استئصال الأَمعاء يُعدُّ حافزاً لدراسة دورها المحتمل كمسببات لأمراض الأَمعاء. تتمثل إصابات الجهاز الهضمي التي لها علاقة بالبروتيس، التهاب المعدة والأَمعاء (الطبيعي والمنقول بالغذاء)، ومرض كرون، والتهاب الزائدة الدودية، واستعمار الأجهزة الطبية. تحتل *P. mirabilis* المرتبة الثالثة بين الأَنواع البكتيرية الأَكثر شيوعا من حيث إِصابة المسالك البولية بالتهابات معقدة اذ تأتي بعد *E. coli* و *K. pneumoniae*، خاصةً في مرضى القسطرة (Armbruster *et al*., 2018).

لذا اصبحت المتقلبة *P. mirabilis* إحدى أَكثر أَنواع البكتيريا السالبة لصبغة جرام انتشارًا التي يمكن أن تؤدي إلى التهابات المسالك البولية. التهاب الحويضة والكلية الحاد، وتجرثم الادرار، وانسداد القسطرة، وحصوات الكلى، إذ تسبب آلامًا شديدة للمرضى وتؤدي إلى صعوبة العلاج(Norsworthy and Pearson, 2017). كما تؤدي إلى الإِصابة بأمراض متنوعة في الجهاز التنفسي والأَنسجة الرخوة والتهابات الجلد (بما في ذلك الحروق والجروح بعد الجراحة وغيرها كما تم عزل .*Proteus* spp من براز الدجاج مع البكتيريا المعوية الأُخرى، مثل *Escherichia coli*، وهذا يدل على أَنَّها تمثل أحد الجراثيم التي تتواجد بصورة طبيعية في الأَمعاء وفي القناة الهضمية (Hamilton *et al*., 2018).

اثبت أن *P. mirabilis* يمكنها أَيضًا البقاء على قيد الحياة داخل الخلايا لمدة 20 ساعة دون التأثير على قابلية الخلايا المعوية كما اكتشف ان .*Proteus* spp يمكن أن تغزو على الأَقل الطبقة المخاطية الخارجية للأمعاء والطبقة الداخلية للنسيج الظهاري إذا كان هناك خلل في الجهاز المناعي (Okumura *et al*., 2016).

تم اثبات ان المرضى الذين يعانون من تليف الكبد لديهم نسبة عالية من أَنواع المتقلبة كما انه ومن المعروف أن الميكروبات المنتجة لليوريز مثل .*Proteus* spp في القناة الهضمية، فإنَّها تساهم في إحداث الاعتلال الدماغي الكبدي من خلال تكسير اليوريا إلى الأَمونيا وحمض الكربونيك وقد أَشارت الدراسات الحديثة إلى علاقة .*Proteus* spp في أمراض الأَمعاء الالتهابية (Bajaj *et al*., 2012).

تُعدُّ أَنواع المتقلبات، وخاصةً *Pr. mirabilis* و *Pr. vulgaris*، من الأسباب الشائعة للعدوى الانتهازية في المستشفيات كما يمكن أن تغزو أَنواع المتقلبات الأجهزة الطبية التي توضع

في الجهاز الهضم الدعامات الصفراوية والبنكرياس والأطراف الاصطناعية الصوتية للمريء كما اثبت أن البكتيريا المتقلبة تلوث مناظير المعدة والقولون بسبب التطهير غير الكافي (Vaishnavi *et al*., 2014).

## 7-2 مقاومة المضادات الحيوية Antibiotic Resistance

تُعتبر المضادات الحيوية نواتج أَيضيَّة ثانوية طبيعية او مصنعة، حيث تُعتبر كمواد ايض ثانوي تنتج من بعض الأَحياء المجهرية وبتراكيز معينة تعمل هذه المضادات على تثبيط نمو وتكاثر الأَحياء المجهرية الأُخرى من دون ان تؤثر في الخلايا التابعة لجسم المضيف (المرجاني، 2011; Ali *et al*.,2018).

ان مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية اصبحت من المشاكل الكبرى التي تهدد الصحة العامة، في السنوات الأخيرة الماضية، سجلت في جميع الدول الأوروبية تقريبًا إصابات ناجمة عن البكتيريا المعوية المقاومة للأَدوية المتعددة لعدة أسباب منها الاستعمال العشوائي والواسع للمضادات الحيوية في علاج الإِصابات الناتجة عن البكتريا والَّذي فاقم من الأَزمة حيث أَدَّى إِلى ظهور سلالات تتمتع بمقاومة متعددة لمعظم مجاميع المضادات الحيوية، هذه المشكلة تظهر بشكل واضح لدى المرضى الراقدين في المستشفيات حيث تتسبب بخسائر اقتصادية كبيرة في مراكز العناية الصحية حيث تزيد من نفقات العلاج بالإضافة الى زيادة مدة الإقامة والمعالجة وهذا ما أَدَّى إِلى قيام الباحثين بالبحث عن مضادات حيوية جديدة أَكثر فعَّالية من أَجل التغلب على السلالات البكتيرية المقاومة للمضادات (Yusuf *et al*., 2017).

لبعض المضادات طيفا واسعا broad spectrum antibiotics أَي إِنَّها فعَّالة ضد مجاميع متنوعة من الكائنات الدقيقة، بينما لبعضها الآخر طيفا محدودا narrow spectrum antibiotics حيث تعمل ضد نوع واحد او مجموعة معينة فقط من الكائنات الدقيقة ولا تؤثر في الأَنواع او المجاميع الأُخرى. قسم من هذه المضادات يعمل كمثبط للأَحياء الدقيقة bacteriostatic (Ali *et al*.,2018).

للبكتريا أَكثر من نوع من المقاومة، أولها المقاومة الذاتية Internisc resistance وتحصل نتيجة لامتلاك هذه البكتريا خصائص طبيعية تتميز بها عن غيرها مسؤولة عنها العوامل الوراثية التي تمتلكها ما يجعلها قليلة التأثر بالمضادات الحيوية منها، عدم نفاذية الجدار الخارجي لهذه البكتريا. أَمَّا النوع الآخر من المقاومة لهذه البكتريا فهي المقاومة المكتسبة

Acquired resistance تظهر كنتيجة لتعرض السلالات الحساسة لهذه البكتريا للمضادات الحيوية وتحولها لسلالات مقاومة كذلك الطفرات الكروموسومية Chromosomal mutations، والعوامل القافزة Transposone، واكتساب بلازميدات المقاومة Resist plasmid وغيرها من الطرائق الأُخرى (Ekizoğlu *et al.*, 2016).

كما أَنَّ هناك ارتباطًا قويًا بين مقاومة المضادات الحيوية وقدرة البكتريا على تكوين الأَغشية الحيوية (Vuotto *et al.*, 2017) تُعدُّ عملية انتقال المادة الوراثية من بكتريا إلى بكتريا أُخرى وبطرائق عديدة هي الأخطر في مقاومة المضادات، منها عملية الاقتران التي تقوم بها البكتريا conjugation حيث تنتقل المادة الوراثية من خلية بكتيرية إلى خلية بكتيرية أُخرى، وقد يتم اخذ الجينوم البكتيري الذي يتحرر من البكتريا الميتة وهذا ما يعرف بعملية التحول transformation، كما قد يحصل الانتقال للمعلومات الوراثية بواسطة العاثيات bacteriopHages وهذا ما يدعى بطريقة الحث transduction (Laird, 2016). ان وجود البلازميدات Plasmids التي تعمل كنوأَقل لجينات الضراوة كان سببًا في ظهور مقاومة المضادات وانتشارها بين الاجناس في إحدى الدراسات أُشير إلى وجود نقل افقي للبلازميد الذي يحمل عوامل المقاومة بين الإشريكية القولونية وبكتريا الكليبسيلا الموجودة في الجهاز الهضمي (Woodford *et al.*, 2011). فمثلًا كانت بكتريا *E. coli* في السابق مقاومة حدود 70% من الستربتومايسين streptomycin والسلفيزوكسازول sulfisoxazole والتتراسايكلين tetracycline، لكن حصول الطفرات أَدَّى إلى حصول زيادة في مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية، حيث أَنَّ انتقال بلازميدات المقاومة اليها أَدَّى إلى ظهور المقاومة لكل من الامبسلين ampicillin والكانامايسين kanamycin (Afzal, 2017).

## 8-2 العلاقة بين البلازميدات (Plasmids) ومقاومة المضادات الحيوية

البلازميدات عناصر من ال DNA لها القابلية على التضاعف بصورة مستقلة عن الكروموسوم البكتيري والبعض منها يرتبط تضاعفه بتضاعف الكروموسوم البكتيري وتقع خارج الكروموسوم وتكون بشكل تراكيب حلقية تنتشر في السايتوبلازم البكتيري ولها القابلية على الانتقال بين البكتريا عن طريق الاقتران وهي تلعب دورًا مهما في تطوير المقاومة البكتيرية للمضادات الحيوية عن طريق نشرها لجينات المقاومة بين البكتريا المسببة للأمراض الأَكثر خطرا و تحمل جينات تعطي للخلية صفات إضافية إِلَّا إِنَّها لا تُعدُّ ضرورية لحياة الخلية وغير

مؤثرة في حيويتها كما تختلف عن بعضها في عدد النسخ والحجم . في عام 1952 أطلق العالمJoshua Lederberg هذا المصطلح ولأول مرة. وقد اقترح مصطلح البلازميد كمصطلح عام يطلق على أي جزء وراثي يقع خارج الكروموسومات (Alekshun and Levy, 2007).

أَمَّا مصطلح Plasmidome فيطلق على مجموعة من البلازميدات من بيئة معينة أو مجتمع بكتيري وقدأَشارت العديد من الدراسات إِلى التطور المشترك بين البكتيريا والبلازميد (Papkou *et al*., 2019). كذلك إِلى العلاقة بين البلازميدات المقترنة وانتشار جينات المقاومة للمضادات في العديد من العائلات البكتيرية منها(Enterobacteriaceae) يمكن للبكتريا أَن تعزز من قدرتها على مقاومة المضادات الحيوية عن طريق الانتشار الأفقي للجينات المقاومة للمضادات الحيوية بين البكتيريا بواسطة البلازميدات العوامل التي أَدَّت لانتشار المقاومة للمضادات في العائلات البكتيرية (Rozwandowicz *et al*., 2018). واصبحت بعض ارتباطات البكتريا والبلازميد ناجحة بشكل كبير، الامر الذي أَدَّى إِلى ظهور "جراثيم خارقة" تنتشر بشكل كبير وغير مسيطر عليه في المؤسسات ان انتشار المقاومة للمضادات الحيوية وجينات الضراوة بواسطة البلازميدات تُعدُّ من المشاكل الكبيرة التي تهدد صحة الإِنسان، كما حصل في الانتشار العالمي الأخير لمقاومة المضاد الحيوي الكولستين (Simonsen, 2018)

تؤدِّي عملية تحييد البلازميد دورًا في تحويل الخلايا البكتيرية المقاومة للمضادات الحيوية إِلى خلايا حساسة فالتحييد هي العملية التي يتم عن طريقها إِزالة البلازميدات من المستعمرات البكتيرية. وهي تُعدُّ عملية مهمة للقضاء على مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية حيث تؤدي إِلى إِزالة الجينات المسؤولة عن مقاومة المضادات من البكتيريا بينما تبقى البكتريا المتواجدة طبيعيا دون ضرر (Maier *et al*., 2018). لذا فالتخلص من البلازميدات المقاومة يؤدي لجعل العلاج بالمضادات الحيوية أَكثر فاعلية. هنالك حاجة كبيرة من أَجل اكتشاف طرائق جديدة لايقاف عملية مقاومة المضادات الحيوية، وان عملية تحييد البلازميد يمكن ان تقلل من تكرار الجينات المقاومة للمضادات الحيوية وتحويل البكتريا إِلى بكتيريا حساسة ( Michelle *et al*.,2018). ومن عوامل التحييد بالبلازميد التي أُشير اليها في الدراسات العلمية هي كبريتات لوريل الصوديوم، وبروميد إيثيديوم، أكريدين البرتقالي وغيرها من العوامل ( Chopade *et al*., 1994). ولكن بات من المعلوم أن أصباغ الأكريدين وبروميد الإيثيديوم لا يمكن استخدامها في الجسم الحي بسبب الطفرات والتسرطن والتسبب في التشوهات لذا فليس من الممكن استخدام عوامل التحييد هذه للقضاء على انتشار مقاومة المضادات الحيوية في بيئة المستشفى. لذا

يستخدم حديثاً التحييد بالأدوية وعلاجات العاثيات والمنتجات الطبيعية (Lopatkin *et al.*, 2017).

## 9-2 المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية

نجد في الوقت الحاضر عدداً كبيراً من المضادات الحيوية والمستعملة في علاج الامراض والاصابات الجرثومية، إلا ان فعالية هذه المضادات في تناقص مستمر مع قدرة الجراثيم على تطوير وسائل الدفاع عن نفسها ومقاومة عمل المضادات بعدة طرائق جاعلة طرائقنا العلاجية غير ذات فائدة، والأسوأ من ذلك أن إمكانية المقاومة هذه تكون قابلة للانتقال من جنس جرثومي الى اخر كان سابقاً حساساً لمضاد معين وهذه المقاومة تنتشر بتناسب طردي مع الزيادة في استعمال المضادات الحيوية بشكل عشوائي (Maier *et al.* 2018).

## 10-2 النباتات الطبية Medical Plants

مُنذ فجر التاريخ عرفت حضارات العالم النباتات والأعشاب لعلاج مختلف الأمراض والوقاية منها (العبيدي،2000). يعد التداوي بالأعشاب من الظواهر العريقة في شبه الجزيرة العربية منذ قديم الزمان، وقد تدرجت معرفة هذا النوع من التداوي من سلالة إلى أخرى حتى كونت ما يسمى بالطب الشعبي في العالم العربي، وانتشرت أبحاث ومخطوطات مبنية على قواعد قوية أبان العصر الذهبي للطب الإسلامي. وقد وردت الكثير من الأحاديث الشريفة عن التداوي ومنها قول رسولنا الكريم ﷺ " الله انزل الداء والدواء وجعل لكل داء دواء تداووا ولا تداووا بحرام"رواه السجستاني( 275 هـ) وقال :"لكل داء دواء" فاذا أصيب دواء الداء برئ بإذن الله تعالى، رواه النيسابوري(261 هـ).

وازداد الوعي بأهمية الأعشاب في جميع انحاء العالم وقد ازداد مؤخرا التوجه نحو ما يعرف بالطب البديل Alternative medicine. كما ان استخدام الأعشاب لم يُعدُّ مقتصراً على استخدام البسطاء والشعبيين لعلاج حالاتهم المرضية وانما اصبحت مستحضرات الأعشاب تأخذ موقعا مميزاً في صيدلية الدول المتقدمة (خليفة، 2009). انتشر طب الأعشاب بعد ازدياد الوعي الصحي والتقدم العلمي، إذ إنَّ 25% من الوصفات الدوائية مشتقة من المستخلصات النباتية (الطائي، 2013).

تحتوي النباتات على العديد من المركبات التي لها فاعلية كبيرة ضد الأَحياء المجهرية الممرضة الَّتي تدعى المركبات الحيوية Biological compounds منها المعادن والفيتامينات والفينولات PHenols والتانينات Tannins والكلايكوسيدات Glycosides والقلويدات Alkaloids والزيوت الطيارة Volatile oils والصابونات Saponins (Oran and Raies, 2000).

تتميز عملية العلاج بالأعشاب عن العلاج بالأَدوية الكيميائية بحصول التداخل بين المكونات الفعَّالة وهذا ما يعزز الفعَّالية التثبيطية للممرضات المجهرية، وهذه التداخلات تكون تضادية او تأزرية بمعنى ان استخدام النبتة جميعها بدلاً من استعمال مكوناتها يحصل تفاعل بين الأقسام المختلفة مما يعطي تأثيرًا دوائياً أكبر من تأثير الجرعات المكافئة من المكونات الفعَّالة المفضلة في الأَدوية الكيميائية بصورة عامة (Barnes, 2001).

### 2-10-1 نبات الرمان *Punica granatum L.*

### 2-10-1-1 الموقع التصنيفي Taxonomic Position

Kingdom: Plantae
Division: MagnoliopHta
Class: Magnoliopsida
Order: Myrtales
Family: Lythraceae
Genus: Punica
Species: *granatum*
(Pharnazic, 2009)

### 2-10-1-2 وصف عام للنبات General Description of the Plant

الاسم الشائع له *Punica.granatum L* أطلق عليه المصريون القدماء اسم (ارهماني) فيما بعد اشتق منه الاسم القبطي (ارمن) ومن ثم اشتق منه الاسم العبري (رمون) وكما يظهر فإنَّ الاسم العربي اشتق منه وسمي بالرمان يُعدُّ من النباتات سريعة النمو وهو يعود إلى شعبة مغطاة البذور العائلة الرمانية Punicaceae (يوسف والنعيمي، 1980). فاكهة الرمان ذو شكل دائري تقريبًا، تحمل تاجا واضحاً. تمتاز بقشرة سميكة نوعا ما أَمَّا من الداخل فإِنَّ الثمرة تحتوي على ردهات متعددة الممرات مفصولة بجدران غشائية الجزء الصالح للأكل من ثمار الرمان يحوي على بذور وطبقة خاصة من الخلايا (خلايا العصير) للبذرة يقع لون الفاكهة الخارجي بين

الأصفر أو الأخضر أو الوردي إلى الأَحمر أو الأرجواني الغامق. ويختلف لون العصير من الأبيض إلى الأَحمر الداكن (Holland *et al.*, 2009).

تكون أَشجاره متوسطة الحجم يصل ارتفاعها إلى 8 أمتار وهي متساقطة الأَوراق تكون الأَوراق رمحية الشكل لونها اخضر داكن ذات عنق قصير أَمَّا الازهار فهي ثنائية الجنس حمراء او قرمزية اللون نادرا ما تستعمل البذور في اكثار الرمان إذ تُعدُّ طريقة شاقة وغير عملية والطريقة الأَكثر استعمالا وانتشارًا في مناطق زراعة الرمان هي العقل وهي طريقة جيدة من أَجل الحصول على كميات كبيرة من هذا النبات (Chidambara *et al.*, 2002).

## 2-10-1-3 الانتشار Spread

زرع الرمان (*Punica granatum L*) منذ العصور القديمة في بلدان مختلفة منها مناطق البحر الأبيض المتوسط والشرق الأوسط ، هذا ما أَدَّى إلى الكشف عن العديد من الأنماط الجينية المتميزة الَّتي انتجت محليًا عبر القرون ( Ferrara *et al.*, 2014). تُعتبر شجرة الرمان من أَشجار الفاكهة وفي وقتنا هذا تزرع في مجموعة واسعة من المناطق شبه الاستوائية ومواقع جغرافية استوائية منتشرة في جميع أنحاء العالم؛ تشمل هذه المواقع العديد من البلدان في أوروبا وآسيا وأمريكا الجنوبية والشمالية وأستراليا وأفريقيا (Holland *et al.*, 2009). يًعتبر الرمان من الفاكهة الصيفية ويعتقد ان الموطن الأصلي له هو إيران وشمال العراق ومن هذه المناطق انتشر إلى بلاد الشام والجزيرة العربية والشمال الغربي من الهند وبعدها انتشر في مناطق أُخرى من العالم مثل أمريكا واسبانيا وغيرها (الحامد واخرون.,2007).

## 2-10-1-4 الأجزاء المستعملة طبياً:

تستخدم جميع أجزاء الشجرة (الفاكهة والأَوراق والزهور والجذور) للأغراض الطبية (Lansky and Newman, 2007).

## 2-10-1-5 المكونات الفعَّالة Active Ingredients

يمتاز الجزء الذي يؤكل من ثمار الرمان، المسمى آريل باحتوائه على كميات كبيرة من السكريات والفيتامينات (A,B,C) كما يحتوي على البروتين والالياف والكاربوهيدرات والدهون والادراريفينول والأَملاح المعدنية (Al-Said *et al.,* 2009). حددت ستة أَنواع من الأنثوسيانين سابقًا في الرمان الَّتي تمثل غالبية صباغ القشر وهي (دلفيندين 3 جلوكوزيد و3،5 ديجلوكوزيد،

سيانيدين 3–لوكوزيد و3،5–ديجلوكوزيد وبيلارجونيدين 3–جلوكوزيد و3،5–ديجلوكوسيد).
(delpHinidin 3-glucoside and 3,5-diglucoside cyanidin 3-glucoside and 3,5-diglucoside and pelargonidin 3-glucoside and 3,5-diglucoside) مع وجود مركبات الفينول. تتكون ثمرة الرمان بشكل عام من 50% قشر و 40% اريل و 10% بذور (لكل وزن). يضمُّ اريل على 85% ماء، 10% سكريات، 1.5% نواتج أَيضيَّة ومركبات نشطة بيولوجيًا مثل الأحماض العضوية والفلافونويد والفينولات يحتوي الأريل (الإيلاجيتانيس، الفلافونويد، الأنثوسيانين)، البذور (الأحماض الدهنية، الدهون)، والجدران الغشائية (معظمها الإيلاجيتانين) تُعدُّ البذور مصدر غني للدهون. إذ يشكّل زيت بذور الرمان 12–20% من إجمالي وزن البذور (Tezcan *et al.,* 2009).

**6-1-10-2 الاستعمالات الطبية Medical Uses**

يُعدُّ الرمان ثمرة ثانوية وهو بعيد عن قمة قائمة الفواكه المستهلكة مثل التفاح والموز والعنب والحمضيات. ومع ذلك، فهي واحدة من أَكثر الفواكه إثارة للاهتمام من حيث الاستعمال العلاجي الحديث والتقليدي (Holland *et al*., 2009). استخدمت أجزاء مختلفة من ثمار الرمان تقليديا كعلاج لأمراض مختلفة منها الالتهابات البكتيرية وآلام المعدة ( Holland and Bar-Ya'akov, 2014). عززت هذه الاستعمالات من خلال الدراسات العلمية الحديثة التي ركزت على النواتج الأَيضيَّة المفيدة للصحة وآثارها العلاجية على صحة الإنسان والحيوان وآليات عملها. أُجريت مراجعة لهذه الدراسات بدقة في السنوات الأخيرة. تعود معظم التأثيرَات العلاجية لفاكهة الرمان إلى نواتج الايض الثانوية والأولية، مثل الادراريفينول، بما في ذلك مركبات الفلافونويد والأنثوسينين والتانينات القابلة للتحلل المائي والأحماض الدهنية والدهون ( Wu and Tian, 2017).

تُعدُّ الثمرة ذات فائدة كبيرة في علاج القرحة والزحار والإسهال لقشور الرمان استخدامات كثيرة حيث تستخدم في علاج الإسهال وطرد الديدان ومقوي للقلب وخافضة لحرارة الجسم ومدررة للادرار وتستخدم مستخلصات مختلف أجزاء الثمرة كمضادات للأحياء المجهرية ومنها المسببة لاصابات الجهاز الهضمي وتُعدُّ مركبات التانين المستخلصة من القشور ذات فعَّالية كبيرة ضد فايروس genetal herps (Zhang *et al*., 1995). وعادة ينصح بتناول ثمرة الرمان في فترة النقاهة بعد الإصابة بالإسهال كما تمتاز مستخلصات القشور بفعَّاليتها العالية كمضادات

للاكسدة ان الفوائد الصحية لتناول الرمان تعود إلى قدرة مضادات الأكسدة الكبيرة الَّتي ترتبط بشكل كبير بالتراكيز العالية والتركيب الكيميائي للمركبات الفينولية ( Chidambara *et al.*, 2002).

### 2-10-2 النارنج *Citrus aurantium*

### 2-10-2-1 الموقع التصنيفي Taxonomic Position

Kingdom: Plantae
Division: MagnoliopHta
Class: Magnoliopsida
Order: Sapindales
Family: Rutaceae
Genus: Citrus
Species: aurantium
(Pharnazic, 2009)

### 2-10-2-2 الوصف العام General Characteristics

ينتمي النارنج (Sour orange) إلى العائلة السذبية Rutaceae واسمه العلمي Citrus aurantium. كما يتبع جنس الحمضيات Citrusالذي يحوي اربع مجاميع مهمة اقتصادياً أَهمها مجموعة النارنج البرتقال يعرف أَيضًا باسم برتقال إشبيلية أو البرتقال الحامض أو البرتقال المر، شجرة النارنج صغيرة يبلغ ارتفاعها بحدود خمسة أمتار أزهارها بيضاء معطرة (Nicolosi *et al.*, 2000).

### 2-10-2-3 الانتشار Diffusion

نشأت فاكهة النارنج في شرق إفريقيا والجزيرة العربية وسوريا، ومزروعة في إسبانيا وإيطاليا وأمريكا الشمالية كما يُعتبر النارنج من النباتات الشائعة جدًا وهي متوافرة ورخيصة الثمن في محافظة ديإلى / العراق (Hassan *et al.*, 2016).

### 2-10-2-4 الأجزاء المستعملة طبيا:

تستعمل الأجزاء الآتية من النارنج للأغراض الطبية (الزهور والفاكهة والجذور والأوراق والزيوت الأساسية) (Kang *et al.*, 2016 ).

## 5-2-10-2 المكونات الفعَّالة Active Ingredients

يحتوي النارنج على العديد من المواد الكيميائية وهي مسؤلة عن التأثيرات المعززة للصحة. حيث يحتوي النارنج على الفيتامينات، المعادن والمركبات الفينولية والتربينويدات. من بين المكونات المتنوعة للنارنج هي مركبات الفلافونويد التي تنتمي إلى الفينولات وهي مركبات مهمة نظرًا لدورها الدوائي والفسيولوجي وفوائدها الصحية الهامة. تقسم مركبات الفلافونويد الموجودة في النارنج إلى أربع مجموعات رئيسة، تشمل الفلافون والفلافانون والفلافونول والأنثوسيانين. مركبات الفلافونويد تتواجد بشكل كبير في ثمار الحمضيات كمشتقات للجليكوزيل. كما توجد الجليكون بشكل أساسي في أجزاء معينة من فاكهة النارنج مثل القشور والبذور، بسبب طبيعتها المحبة للدهون وبالتالي فإنَّ قابليتها للذوبان في الماء تكون منخفضة. أمَّا أشكال الغليكوزيدات، فإنَّ O−glycosides و C−glycosides و rutinosides و glucosides و neohesperidosides هي الأكثر شيوعا (Marya *et al.,* 2018).

كما ان الفلافونات في شكل aglycon وglycosidic تُعتبر المجموعة الرئيسة الثانية من مركبات الفلافونويد في النارنج أكثر أنواع الفلافونات شيوعًا هي apigenin و luteolin وdiosmetin ويُعتبرO-Glycosides و C−glycosides الشكلان الرئيسيان لفلافون جليكوسيدات، وأكثر مكونات السكر المرتبطة شيوعا تشمل الجلوكوز والروتينوز والنيوهيسبريدوز (Lee *et al*., 2015). قد تكون الفلافونات في النارنج موجودة أيضًا بشكل methoxylated، حيث يتم تغطية كل الهيدروكسيل تقريبًا بواسطة الميثيل، مثل نوبيليتين وتانجريتين ( Lim *et al*., 2016). بالاضافة لذلك، قد يحتوي النارنج على كميات منخفضة من الفلافونول، مثل kaempferol وquercetin، بشكل رئيس على شكل glycosidic. المجموعة الثانية من النواتج الأَيضيَّة الثانوية الموجودة في النارنج هي imonoids كما اعتبر هذا الأخير triterpenoids مؤكسجة وذلك لاحتوائها على أعداد كبيرة نسبيًا من ذرات الأوكسجين ( Zhang *et al*., 2017).

يتواجد الليمونويد في كل من الشكلين الجلوكوزيد والجليكونيك. aglycones الليمونويد غير قابلة للذوبان في الماء. وتُعتبر المسؤولة عن الطعم المر للحمضيات، بينما الجلوكوزيدات الليمونية قابلة للذوبان في الماء ولا طعم لها. بينما الجلايكونات ليمونويد مثل الليمونين غير قابلة للذوبان في الماء وهي موجودة بشكل رئيس في البذور والقشور (Costa *et al*., 2013).

هنالك مجموعة أُخرى من المركبات الموجودة في النارنج هي قلويدات فينيل إيثيل أمين مع وجود p-synepHrine الأَكثر وفرة قشر النارنج يحتوي على الفلافونات والقلويدات مثل السينفرين والأوكتوبامين والكاروتينات ونميثيل تيرامين كذلك الزيوت الطيارة. يُعتبر المكون الرئيسي النشط في مستخلص النارنج هو فينيل إيثيل أمين بروتوالكالويد بي سينيفرين والَّذي يمثل حوالي 90% أو أَكثر من إجمالي الألكالويد (Rossato *et al*., 2011).

**6-2-10-2 الاستعمالات الطبية Medical Uses**

عادة ما يتم استعمال النارنج *Citrus aurantium* كعنصر توابل وفي إضفاء حموضة على الطعام إلى جانب الزيت العطري ومكوناته يتم استخدامه في الطعام والعطور والتطبيقات الطبية. تُستخدم الفاكهة والقشر والأَوراق والبذور والزيوت الأساسية كما يستخدم النارنج في العطور ومستحضرات التجميل وكذلك في صناعة المواد الغذائية والحلويات (Karabıyıklı *et al*., 2014). تستخدم المستخلصات المائية والكحولية للفاكهة غير الناضجة من الحمضيات بشكل واسع في المكملات الغذائية للتحكم في الشهية وإدارة الوزن والأداء الرياضي والطاقة، كما تستخدم منتجات النارنج على شكل طعام مثل العصائر ومربى النارنج يستخدم زيت النارنج، الذي يتم الحصول عليه من ضغط القشور الطازجة، على نطاق واسع في صناعة الأَغذية والمشروبات، وخاصةً المشروبات الكحولية (Stohs and Shara, 2013).

يعتقد ان النارنج يمتلك أنشطة حيوية منها، مضادات أكسدة. مضادات الالتهابات مضادات الميكروبات تلك الأنشطة الحيوية لنبات النارنج تكون بسبب وجود مركبات نشطة بيولوجيًا مثل الفينولات والفلافونويد والزيوت الأساسية والفيتامينات (Anwar *et al.,* 2016).

يمتلك النارنج *Citrus aurantium* إمكانيات علاجية متعددة. تشمل الفعَّاليات البيولوجية الفعَّالية المضادة للسرطان والقلق والسمنة وفعَّاليته ضد الجراثيم ويحوي على مضادات الأكسدة والفعَّالية المضادة لمرض السكر وسرطان الرئة والبروستات واضطرابات الجهاز الهضمي لوحظ أنَّ كلا من المستخلص والمركبات المعزولة من النارنج ليس لها آثار جانبية سلبية على الإنسان عند تناول جرعات علاجية لذلك يمكن بثقة استعمالها في تركيبات غذائية مختلفة (Suntar *et al*., 2018). يستخدم الزيت العطري والهيدروسول ومستخلص الإيثانول من ازهار النارنج في منتجات مختلفة مثل عامل النكهة ومكون للعديد من منتجات العناية

بالبشرة التقليدية المضادة. تتمتع أزهار النارنج بإمكانية كبيرة في صناعات الأَدوية والأَغذية كمواد حافظة طبيعية

كما أَنَّ النارنج يُعدُّ غني بفيتامين C الطبيعي ومضادات الأكسدة التي تزيد من نشاط جهاز المناعة (Değirmenci and Hatice, 2020). يستخدم النارنج تقليديا لعلاج الأَمعاء وبعض الاضطرابات (مثل الإمساك والتشنجات والإسهال والمغص) اختلاجات الجهاز التنفسي (مثل السعال والبرد والتهاب الشعب الهوائية والسل) واضطراب الدورة الشهرية وأمراض القلب والأوعية الدموية (الذبحة الصدرية وارتفاع ضغط الدم) (Favela *et al*., 2016).

# الفصل الثالث

# المواد وطرائق العمل

# Materials and Methods

## 1.3 جمع العينات Collection of Samples

### 1.1.3 جمع النباتات المستخدمة في الدراسة
### Collection of Plants Used in the Study

تم الحصول على ثمار الرمان وثمار النارنج من الأسواق المحلية لمدينة الموصل-العراق. وقد جرى تنظيفها والتأكد من عدم تعفنها.

### 2.1.3 جمع العينات المرضية Pathological specimen collection

تم جمع 100 عينة من المرضى المصابين بالتهابات المجاري البولية المراجعين لمختبرات المستشفيات الحكومية والأهلية في مدينة الموصل وبأعمار مختلفة ولكلا الجنسين ولفترة شهرين من 2020/8/1 الى 2020/9/1. جمعت عينات الادرار بحاويات معقمة مع مراعات أَخذ العينة الوسطية من الإدرار. وضعت العينات في جهاز الطرد المركزي لمدة 10 دقائق وبسرعة 200/دورة لدقيقة أُخذت قطرة من الراسب ووضعت على شريحة زجاجية نظيفة وفحصت تحت المجهر تحت القوة 40 من أَجل ملاحظة وجود البكتريا وخلايا الدم البيضاء التي تعطي مؤشراً على الإصابة وزرع راسب العينات على وسط اكار الدم (آل إسماعيل ، 2007).

## 2-3 الأَوساط الزرعية The culture media

### 1-2-3 الأَوساط الزرعية المحضرة The Agricultural Circles that Attended

#### 1-1-2-3 وسط ماء الببتون Pepton Water Medium

أُذيب 20غم من الببتون ومعه 5غم من كلوريد الصوديوم NaCl في 975 مل من الماء المقطر وضبط الاس الهيدروجيني عند (7.2) بعد ذلك تم تعقيم الوسط في المؤصدة Autoclave بدرجة حرارة 121°م وضغط 15 باوند /انج ولمدة 15 دقيقة (Collee *et al.*,1996).

#### 2-1-2-3 وسط اختبار الحركة Motility Test Medium

وسط شبه صلب Semi Solid حضر بإذابة 1.3 غم من المرق المغذي Nutrient Broth وأُضيف له 0.5غم من الآكار في 100 مل من الماء المقطر وضبط الأُس الهيدروجيني عند (7.2) بعد ذلك تم تعقيم الوسط في المؤصدة (Collee *et al.*,1996).

**3-2-1-3 وسط ماء الببتون والكلوكوز والفوسفات**

**Glucose PHospHate Pepton Water Medium**

أُذيب 5غم من الببتون بالإضافة الى 5غم من مادة فوسفات البوتاسيوم الهيدروجينية K2HPO4 في لتر من الماء المقطر وتم ضبط الأُس الهيدروجيني بدرجة (7.2) وعقم بالمؤصدة ومن ثم وبعد أَن يبرد لدرجة تتحملها اليد أُضيف له محلول الكلوكوز بتركيز نهائي 1% بطريقة الترشيح من أَجل تعقيمه (Collee et al.,1996).

**4-2-1-3 وسط تخمر السكريات** **Sugar Fermentation Medium**

حضر وسط PHenol red broth وذلك بإذابة 10 غم من الببتون 5 غم من كلوريد الصوديوم و0.018 غم من كاشف PHenol red في 980 مل من الماء المقطر ومن ثم ضُبطت الدالة الحامضية للوسط عند 7.4 (pH) ويعقم بالمؤصدة وبعد تبريده يضاف له 20 مل من محلول السكريات المراد اختبارها وبتركيز نهائي 1% (Atlas *et al.*, 1995).

**5-2-1-3 وسط المضادات الحيوية** **Antibiotics Medium**

حضر وسط الآكار المغذي وعقم بالمؤصدة وبرد إلى درجة حرارة مناسبة ثم أُضيف له المضاد الحيوي المناسب وبتركيز نهائي محدد كما مبين في الجدول (3-1) مساحيق المضادات جمعت من مصادر مختلفة من مصانع الأَدوية في سامراء وبعض الصيدليات المحلية وقد تم تحضير محاليل خزينة بحسب الطريقة التي استخدمها (Ahmed, 1989). إذ أُذيبت مقادير مناسبة من المضاد الحيوي المعين في المذيب المناسب وحفظت بدرجة 20 – °C بعد تعقيمها بالترشيح لحين الاستعمال وذلك حسب ما جاء في (Puhler and Timmis,1984).

**الجدول (3–1) يوضح قيم التراكيز الخزينة والنهائية للمضادات الحيوية**

| المضاد الحيوي | الرمز | التركيز الخزين Mg\ml | التركيز النهائي µg\ml | المذيب |
|---|---|---|---|---|
| Erythromycin | Ery | 10 | 15 | ايثانول مطلق |
| Ciprofloxicine | CF | 5 | 25 | ماء مقطر معقم |
| Ampicillin | Am | 5 | 50 | ايثانول 70% |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| ايثانول 70% | 50 | 5 | AX | Amoxicillin |
| ايثانول 70% | 15 | 5 | TE | Tetracycline |
| ماء مقطر معقم | 25 | 50 | Sm | Streptomycin |
| ميثانول مطلق | 50 | 5 | RA | Refampicin |
| ماء مقطر معقم | 25 | 40 | GN | Gentamicin |
| NaOH 0.1N | 30 | 50 | Nal | Nalidixic acid |
| ايثانول 70% | 10 | 5 | Tr | Trimethoprim |

**3-2-1-6 وسط (كنك ب) ( King B ) B- Medium**

أُذيب 20 غم من البيتون و10 مل كليسيرول و1.5 غم $K_2HPo_4$ و1.5 غم $MgSo_4$ $.7H_2O$ في لتر من الماء المقطر المعقم بعدها ضبطت الدالة الحامضية (PH) للوسط عند 7.3 وعقم بالموصدة (Cruickshank *et al.*,1975).

**3-2-2 الأَوساط الزرعية الجاهزة**

حسب تعليمات الشركة المجهزة أُجري تحضير هذه الأَوساط وتم ضبط الدالة الحامضية لها وتعقيمها.

**جدول (2–3): الأوساط الزرعية الجاهزة**

| ت | اسم الوسط | | اسم الشركة المجهزة |
|---|---|---|---|
| 1 | وسط آكار الدم | Blood Agar Medium | Himadia (India) |
| 2 | وسط المرق المغذي | Nutrient Broth Medium | Oxoi (England) |
| 3 | وسط الآكار المغذي | Nutrient Agar Medium | Oxoid (England) |
| 4 | وسط آكار الماكونكي | MacConkey Agar Medium | (Holland) |
| 5 | وسط آكار المانيتول الملحي | Mannitol Salt Agar Medium | (Holland) |
| 6 | وسط ايوسين مثيلين الأزرق | Eosin Methylene Blue Medium | Oxoid (England) |
| 7 | وسط آكار اليوريا | Urea Medium | Himedia (India) |
| 8 | وسط سيمون ستريت | Simmon Citrate Medium | Himadia (India) |
| 9 | وسط الجيلاتين | Gelatin Medium | Difco (USA) |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Oxoid (England) | DNAase Agar Medium | وسط تحلل الدنا | 10 |
| Himedia (India) | Triple Sugar Iron Agar (TSI) | وسط الحديد والسكريات الثلاثية | 11 |
| Oxoid (England) | Muller Henton Agar (Oxoid) | وسط اكار مولر هنتون | 12 |

**3-3 الكواشف والصبغات والمحاليل Reagents, Stains and solvents**

**1-3-3 كاشف الكتاليز Catalase Reagent**

عبارة عن بيروكسيد الهيدروجين $H_2O_2$ بتركيز (3%) ( Tadesse and Alem, 2006).

**2-3-3 كاشف الأَندول (كوفاك) Kovacs Reagent**

75 مل من الكحول الايسواميلي أُذيب فيه 5 غم من مادة P-Dimethyl amino benzaldehyde وأُضيف اليه 25 مل من حامض الهيدروكلوريك المركز تدريجيًا مع المزج (Baron *et al*.,1994).

**3-3-3 كاشف المثيل الأَحمر Methyl red Reagent**

300 مل من الكحول الاثيلي المطلق أُذيب فيه 0.1 غم من صبغة المثيل الأَحمر وأُضيف اليه 200 مل من الماء المقطر (Baron *et al*.,1994).

**4-3-3 كاشف فوكس بروسكور Voges- Proskaure Reagent**

يتكون من كاشف باريت Barrit Reagent الَّذي يتكون من:

محلول A: أُذيب 5 غم من الفانفثول واكمل الحجم الى 100 مل من الكحول الاثيلي المطلق.

محلول B: أُذيب 40 غم من هيدروكسيد البوتاسيوم واكمل الحجم الى 100 مل (Collee *et al*.,1996).

**5-3-3 صبغة كرام Gram stain وتضم المحاليل الآتية:**

1. محلول الكرستال البنفسجي Crystal Violet Solution

2. محلول الأيودين Grams Iodine Solution
3. محلول قاصر الألوان Decolorizer Solution
4. محلول السفرانين Safranin Solution

## 4.3 تشخيص البكتريا Bacterial Identification

### 3-4-1 الصفات الزرعية والفحص المجهري

### Cultivational traits and microscopic examination

جرى تشخيص اولي للانواع البكتيرية قيد الدراسة بملاحظة الصفات المظهرية للمستعمرات النامية على وسط اكار الدم من حيث شكلها ولونها وحجمها وشكل حافاتها وقوامها وافرازها لبعض الصبغات ونوع تحلل الدم ثم تم تحضير مسحات من البكتريا وصبغت بصبغة كرام وفحصت باستخدام المجهر الضوئي بالعدسة الزيتية وبقوة تكبير X100 لغرض التعرف على شكل وترتيب الخلايا وهل هي موجبة ام سالبة لصبغة كرام.

### 3-4-2 الزرع على الأوساط الانتخابية Planting in the electoral circles

زرعت العينات المأخوذة من المرضى على وسط آكار الدم Blood agar ووسط آكار الماكونكي MacConkey agar وبعد التحضين لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37 مْ استخدمت أَوساط انتخابية Selective media لتنقية الأَنواع المختلفة حيث نقلت العينات التي أعطت لون وردي على وسط آكار الماكونكي إِلى وسط آكار الأيوسين ازرق المثيلين (EMB) Eosin Methyline Blue Agar للتأكد من عزل بكتريا *Escherichia. coli*.

كما زرعت البكتريا التي أبدت تحلل للدم من نوع B-hemolysis على وسط آكار المانيتول الملحي للتأكد من عزل بكتريا *StapHylococcus aureus*. أَمَّا بكتريا الكليبسيلا *Klebsiella pneumonia* أُعيد زرعها على وسط آكار الماكونكي حيث كانت مخمرة للاكتوز وذات مستعمرات وردية مخاطية لزجة.

كما أُعيد زرع البكتريا التي ظهرت شاحبة على وسط آكار الماكونكي على وسط آكار الدم Blood Agar للتأكد من عزل البكتريا *Proteus* spp. من خلال ملاحظة ظاهرة العج. وللتأكد من عزل بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* التي تعطي اللون الأخضر المميز لهذه البكتريا وأُعيد زرعها على وسط (King B).

**3-4-3 الاختبارات الكيموحيوية Biochemical Test**

أُجريت الاختبارات بحسب ما جاء في ( Atlas *et al.*,1995; Hemraj *et al.*, 2013; Tille, 2017)

**3- 4 -3-1 اختبارات IMVIC**

**3-4-3-1-A اختبار الأَندول Indol Production Test**

لقح وسط ماء الببتون Peptone Water بمستعمرة نقية من البكتريا، وبعد التحضين لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37 مْ أُضيف بضع قطرات من كاشف كوفاكس Kovacs Reagent. تظهر النتيجة الموجبة من خلال ظهور الحلقة الحمراء في طبقة الكحول الايسواميلي العليا والَّتي يستدل من خلالها على قدرة البكتريا على إِنتاج الأَندول من خلال تحليلها الحامض الأَميني التربتوفان من خلال امتلاكها لانزيم التربتوفانيز.

**3-4-3-1-B اختبار المثيل الأَحمر Methyl Red Test**

لقح الوسط المتكون من الببتون والكلوكوز والفوسفيت بمستعمرات نقية من البكتريا وبعد التحضين لمدة 48 ساعة وبدرجة حرارة 37 مْ أُضيف 5 قطرات من كاشف المثيل الأَحمر ظهور اللون الأَحمر يدل على النتيجة الموجبة والَّذي يستدل من خلاله على قدرة البكتريا على تخمير الكلوكوز وإِنتاج الحامض الذي يسبب خفض الدالة الحامضية للوسط إِلى 4.5 او أَقل. بينما يدل بقاء لون الوسط كما هو على النتيجة السالبة للاختبار.

**3-4-3-1-C اختبار فوكس بروسكور Voges-Proskauer Test**

لقح وسط ماء الببتون والكلوكوز والفوسفيت بمستعمرة مفردة من البكتريا وبعد التحضين لمدة 48 ساعة بدرجة حرارة 37 مْ أُضيف 3 قطرات من محلول هيدروكسيد البوتاسيوم KOH بتركيز 40% و6 قطرات من محلول الفا- نفثول NapHthol بتركيز 5% مع الرج البطيء. وتترك الأَنابيب قبل أَخذ النتيجة لمدة 15 دقيقة.

**3-4-3-1-D اختبار استهلاك السترات Citrate Utilization**

لقح وسط سيمون ستريت المائل Simmons Citrate Slant بمستعمرة مفردة نقية من البكتريا وبعد التحضين لمدة 48 ساعة بدرجة حرارة 37 مْ لوحظت النتيجة حيث يدل تغير لون

الوسط من الأخضر إلى الأزرق على النتيجة الموجبة للاختبار بينما بقاء اللون الأخضر يدل على النتيجة السالبة للاختبار وتدل النتيجة الموجبة على قدرة البكتريا على استهلاك السترات كمصدر للكاربون والطاقة وأَملاح الالمنيوم كمصدر للنتروجين بالإضافة الى إِنتاج مركبات قاعدية في الوسط والَّذي يؤدي لرفع الدالة الحامضية وتحول الوسط إِلى القاعدية.

### 3-4-3-2 اختبار إنتاج إنزيم اليوريز Urease Test

لقح وسط آكار اليوريا بمستعمرة نقية من البكتريا وحضن بدرجة 37 مْ ولمدة 24 ساعة تكون النتيجة الموجبة بتحول لون الوسط من الأصفر إِلى الوردي الَّذي يدل على قدرة البكتريا على إِنتاج إِنزيم اليوريز الذي يعمل على تحلل اليوريا وإِنتاج الأَمونيا.

### 3-4-3-3 اختبار الكتاليز Catalase Teat

وضعت مستعمرة معزولة من البكتريا على شريحة زجاجية نظيفة ومن ثم أُضيف لها عدة قطرات من محلول بيروكسيد الهيدروجين تركيزه (3%) واستدل على النتيجة الموجبة من خلال ظهور فقاعات الغاز المتصاعدة الَّذي يدل على قدرة البكتريا على إِنتاج إِنزيم الكتاليز الذي يحفز على تحرير غاز الاوكسجين نتيجة تحلل المركب السام بيروكسيد الهيدروجين $H_2O_2$.

### 3-4-3-4 اختبار إنزيم التجلط Coagulase Test

أُضيف 0.5 مل من البلازما إِلى 0.5 مل من مزرعة بكتيرية سائلة حديثة بعمر 24 ساعة وحضنت بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة تقرا النتيجة كل ساعتين لملاحظة تخثر البلازما دليل على النتيجة الموجبة للاختبار.

### 3-4-3-5 اختبار إنزيم تحلل الحامض النووي الديوكسي رايبوز

**Deoxyribonuclease Test (DNAase Test)**

يستخدم للتحري عن قدرة البكتريا على إِنتاج إِنزيم DNAase حيث لقح وسط DNAase الَّذي أُضيف له صبغة التولوين الأزرق بنسبة 0.005% بمستعمرة بكتيرية نقية وبعد التحضين لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37 مْ غمر الطبق بحامض الهيدروكلوريك HCl واستدل

على النتيجة الموجبة من خلال ظهور هالة شفافة حول المستعمرة دلالة على قدرة البكتريا على تحليل المادة النووية DNA.

### 6-3-4-3 اختبار الحركة Motility Test

يستخدم للدلالة على قدرة البكتريا على الحركة أُجري الاختبار بتلقيح أَنابيب الاختبار الحاوية على وسط شبه الصلب بمستعمرات بكتيرية نقية وبطريقة الوخز بإبرة التلقيح وبعد التحضين لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37 مْ لوحظت النتيجة الموجبة من خلال انتشار النمو بعيدا عن خط الوخز في الوسط.

### 7-3-4-3 اختبار تميع الجيلاتين Gelatin Liquefcation Test

يستدل من خلاله على قدرة البكتريا على إنتاج إنزيم الجيلاتينيز. أُجري الاختبار بتلقيح الأَنابيب الحاوية على وسط الجيلاتين بمستعمرات بكتيرية فتية وبطريقة الوخز وتظهر النتيجة الموجبة بعد التحضين لمدة 48 ساعة وبدرجة حرارة الغرفة ومن ثم توضع العينات في الثلاجة بدرجة 4 مْ تلاحظ النتيجة بعد نصف ساعة بقاء الوسط متميعاً يدل على النتيجة الموجبة للاختبار والذي يدل على إنتاج البكتريا لهذا الإنزيم.

### 8-3-4-3 اختبار تحلل الدم Haemolysis Test

يُجرى هذا الاختبار للتحري عن قدرة البكتريا على تحليل الدم. حيث يلقح وسط آكار الدم بمستعمرة فتية وبعد التحضين لمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة 37 مْ يمكن ملاحظة النتيجة من خلال ملاحظة نوع تحلل الدم حول المستعمرة.

### 9-3-4-3 اختبار تخمر السكريات Sugar Fermentation Teat

أُجري الاختبار بتلقيح وسط تخمر السكريات بمستعمرة مفردة نقية من البكتريا وبعد التحضين ولمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37 مْ لوحظت النتيجة حيث يُعدُّ تغير لون الوسط إِلى اللون الأصفر نتيجة موجبة الَّتي تدل على انخفاض الدالة الحامضية نتيجةً لقدرة البكتريا على استهلاك السكر المراد اختباره وإِنتاج الحامض بينما بقاء اللون الأَحمر يدل على النتيجة السالبة للاختبار.

### 3-4-3-10 اختبار النمو على وسط آكار ثلاثي السكر والحديد

### Growth Test on Triple Sugar Iron Agar Medium (TSI)

لقح هذا الوسط الَّذي حضر بشكل مائل بمستعمرات فتية مفردة من البكتريا وبعد التحضين لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37 مْ لوحظت النتيجة لمعرفة قدرة البكتريا على تخمير (الكلوكوز، والسكروز، واللاكتوز) احدها او اثنان منها او جميعها وقدرتها على إنتاج الغاز وكذلك قدرتها على إنتاج كبريتيد الهيدروجين $H_2S$ وتظهر النتيجة من خلال تحول القعر But فقط إلى اللون الأصفر وهذا دليل على قدرة البكتريا على تحليل الكلوكوز فقط وإنتاج الحامض او تحول الوسط بأكمله إلى اللون الأصفر دلالة على قدرة البكتريا على تحليل اللاكتوز والسكروز اللذان يشكلان نسبة كبيرة مقارنة بالكلوكوز. بقاء لون الوسط يدل على عدم قدرة البكتريا على تخمير سكريات الوسط كما ان ظهور الفقاعات او تشقق الوسط يدل على قدرة البكتريا على إنتاج الغاز نتيجة تخمر السكريات كذلك فإنَّ ظهور اللون الأَسود بشكل راسب دلالة على قدرة البكتريا على إنتاج كبريتيد الهيدروجين $H_2S$.

### 3-4-3-11 اختبارات النمو على الأَوساط الغذائية الانتخابية

### Growth tests on Selective Media

#### 3-4-3-11-A اختبار النمو على وسط آكار الماكونكي

#### Growth test on MacConkey Agar Medium

لقح الوسط بمستعمرات مفردة من البكتريا وبطريقة التخطيط وبعدها حضنت الأَطباق لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37 مْ. يُعتبر هذا الوسط وسطاً انتخابياً وتفريقياً في الوقت نفسه حيث يحتوي على Crystal violet وأَملاح الصفراء Bile salt والَّتي تسمح للبكتريا السالبة لصبغة كرام بالنمو على هذا الوسط وتمنع البكتريا الموجبة لصبغة كرام بالنمو وهذا ما يجعله وسطا انتخابيا ويُعتبر وسطا تفريقا كون البكتريا المخمرة للاكتوز Lactose Fermentier تظهر بلون احمر ومنها *E. coli* وKlebsiella أَمَّا البكتريا غير المخمرة للاكتوز Non-lactose fermentier فتظهر شاحبة منها بكتريا *Proteus* و *Pseudomonas* (Atlas., 2005).

**B-11-3-4-3 اختبار النمو على وسط آكار المانيتول الملحي**

**Growth test on Mannitol Salt Agar**

لقح وسط المانيتول بمستعرات مفردة من البكتريا بطريقة التخطيط وبعدها حضنت لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37 مْ. يُعتبر هذا الوسط انتخابيا لكونه يسمح لبعض البكتريا الموجبة بالنمو ويمنع البكتريا السالبة من النمو لاحتوائه على NaCl عليه كما يُعدُّ وسطًا تفريقياً حيث عند تنمية بكتريا المكورات العنقودية عليه فإنَّ بكتريا *S. aureus* تمتاز بقدرتها على تحويل لون الوسط من اللون الوردي إلى اللون الأصفر نتيجة لقدرتها على تخمير سكر المانيتول (Koneman, *et al.*,2006).

**C-11-3-4-3 اختبار النمو على وسط الايوسين ازرق المثيلين**

**Growth Test on Eosin Methylene Blue Agar Medium (EMB)**

لقح الوسط بمستعمرة نقية مفردة من بكتريا *E. coli* بطريقة التخطيط حضنت لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37 مْ يُعدُّ هذا الوسط وسطاً انتخابياً إذ يميز بكتريا *E. coli* عن باقي أَنواع البكتريا غير المخمرة للاكتوز حيث تظهر فيه بلون غامق إلى أَسود مع بريق أَخضر معدني Green Metallic Sheen نتيجةً لترسب المثلين الأزرق وذلك بسبب الإنتاج الكبير للأَحماض الناتجة من تخمر سكر اللاكتوز (Atlase and Snyder, 2006).

**5-3 حفظ العزلات البكتيرية Preservation of Bacterial Isolates**

بحسب ما جاء في (Harly and Prescott; 2002; WHO, 2003).

**1-5-3 الحفظ قصير المدى Short-term Preservation**

أُجريت عملية حفظ العينات بعد عزلها على وسط الآكار المغذي المائل وبطريقة التخطيط وحُضنت لمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة 37 مْ ومن ثم جرى تجديدها شهرياً من أَجل الإدامة.

**2-5-3 الحفظ طويل المدى Long-term Preservation**

زرعت العينات في أَنابيب حاوية على وسط المرق المغذي والمضاف إِليه الكليسيرول بتركيز 15% بعدها حضنت لمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة 37 مْ، ثم حفظت بدرجة حرارة -20 مْ من أَجل استعمالها فيما بعد.

**3-6 اختبارات مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية**

**Antibiotics Resistance Tests**

لقحت أَوساط المضادات الحيوية المحضرة وفق الفقرة (3-2-1-5) وبالتراكيز النهائية المذكورة بالجدول (3-1) لتحديد مقاومة وحساسية البكتريا المعزولة للمضادات الحيوية بمستعمرات نقية من البكتريا وبعد التحضين لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37 مْ سجلت النتائج.

**3- 7 طرق تحضير المستخلصات النباتية**

**Preparation Methods of Plant Extracts**

**3-7-1 طريقة تحضير المستخلصات الايثانولية**

**Preparation Method of Alcoholic Extracts**

حضرت كما جاء في طريقة الباحث (Grand *et al.*,1988) والمحورة عن طريقة الباحث (Verpoorte *et al.*, 1982) أُذيب في 400 مل من الكحول الأَثيلي بتركيز 95% 40 غم من النموذج النباتي داخل حمام ثلجي، ثم رج المزيج جيدا وترك في الثلاجة بدرجة 4مْ لمدة 24 ساعة بعدها رُشح عن طريق قمع بخنر ثم وضع في جهاز المبخر الدوار Rotary Vaccume Evaporator المجهز من شركة Electrothermal يعمل هذا الجهاز على أساس التبخير تحت الضغط المخلخل وبدرجة حرارة بحدود 40 مْ. جمعت الطبقة المتكونة بعد التبخير من المستخلص الخام، بعد ذلك حفظت بالتجميد في قناني زجاجية معقمة ذات غطاء محكم لحين الاستخدام.

**3-7-2 طريقة تحضير المستخلصات المائية**

**Preparation Method of Aqueous Extracts**

حضرت بالاعتماد على طريقة (Riose *et al.*,1987). في 160 مل من الماء المقطر المعقم وضع 40 غم من النموذج النباتي أَي إنَّ النسبة هي (1:4). بعدها سحق النبات قيد الدراسة باستخدام جهاز السحق Blender المجهز من الشركة Grater3,Moleny في حمام ثلجي لمدة ساعة واحدة بعدها باستخدام المحرك الكهربائي المغناطيسي Stirrer حرك المزيج لمدة 60 دقيقة من أَجل تفجير جدران الخلايا النباتية لغرض النقع ترك المزيج في الثلاجة لمدة 24 ساعة ، استخدم عدة طبقات من الشاش لترشيح المزيج بعد ذلك رشح المزيج عن طريق استخدام قمع بخنر وباستعمال ورق ترشيح Whatmann No.1 مع التفريغ للتخلص من

الالياف والاجزاء الغير مسحوقة المتبقية وبالتبريد و تحت الضغط المخلخل وبواسطة جهاز التجفيف LyopHilizer المجهز من قبل شركة Edwards جفف المستخلص النباتي حفظت العينات بعد جفافها في قناني زجاجية محكمة الإغلاق وفي أجواء خالية من الرطوبة وحفظت العينات بالتجميد من أَجل استخدامها فيما بعد.

**8-3 طرائق تخفيف وتعقيم المستخلصات النباتية بعد تحضيرها**

**Methods of dilution and sterilization of plant extracts after preparation**

**1-8-3 طريقة تخفيف وتعقيم المستخلصات الكحولية**

في 5 مل من مادة Dimethylsulfoxide DMSO أُذيب 1 غم من المستخلص النباتي بعد ذلك عقم بطريقة البسترة حيث وضع بدرجة حرارة 62 مْ لمدة 10 دقائق ( Shareef , 1998).

**2-8-3 طريقة تخفيف وتعقيم المستخلصات المائية:**

في 5 مل من الماء المقطر المعقم أُذيب 1 غم من المستخلص النباتي المحضر، لتحضير التركيز 200 ملغم/مل كتركيز قياسي وعقم باستخدام المرشحات الغشائية Membrane filter 0.22M عقم المستخلص ومن هذا التركيز حضرت التخافيف اللازمة لاحقًا من أَجل الدراسة (Adomi,2006).

**9-3 طرق اختبار الفعَّالية التثبيطية للمستخلصات النباتية**

**1-9-3 طريقة قياس العكارة** **Turbidity Test Method**

اختبرت حساسية البكتريا للمستخلصات النباتية عن طريق قياس العكارة، وضع 9.8 مل من المرق المغذي المعقم في أَنابيب اختبار ثم أُضيف لها 0.1 مل من المستخلص النباتي بعد ذلك لقحت الأَنابيب ب 0.1 مل من المعلق البكتيري وبتركيز $10^8$ خلية/ مل وبثلاث مكررات. تم تحضين الأَنابيب لمدة 14-16 ساعة بدرجة حرارة 37 مْ بعدها تم قياس العكارة باستعمال جهاز المطياف الضوئي Visable Light SpectropHotometer نوع SERIESCECTL CE 1201, 1000S عند طول موجي 600 نانوميتر. ومن خلال المقارنة مع عينة السيطرة المكونة من 9.8 مل من المرق المغذي و0.1 مل من المذيب المستخدم لإذابة المستخلص

و0.1 مل من العالق البكتيري وبتركيز $10^8$ خلية / مل حدد تأثير المستخلصات النباتية في نمو البكتريا (Pessin, *et al*.,2003).

### 2-9-3 طريقة قياس الحساسية (الانتشار بالحفر)

**Agar Wells Diffusion Method**

حسب طريقة (Perez *et al*., 1990) تم اختبار الفعَّالية التثبيطية للمستخلصات الكحولية والمائية على نمو البكتريا قيد الدراسة حيث تم تلقيح وسط المرق المغذي بالبكتريا المراد اختبارها وبعد التحضين لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37 مْ تم تخفيف العالق باستخدام المحلول الملحي الفسلجي وعن طريق المقارنة مع أُنبوبة السيطرة القياسي لمحلول ماكفرلند الذي يعادل $10^8$ خلية / مل بعدها نشر 0.1 مل من العالق البكتيري على وسط الآكار المغذي باستخدام ماسحة قطنية ثم تركت الأَطباق مدة نصف ساعة وبدرجة حرارة 37 مْ من أَجل أَن تتشرب. باستخدام طريقة الحفر درس تأثير المستخلصات النباتية على البكتريا المراد دراستها حيث تم عمل ثقوب في الأَطباق الحاوية على وسط الآكار المغذي وذلك باستخدام Stainless steel borer قطره 6 ملم ثم وضع في كل حفرة 0.1 مل من كل تركيز من المستخلصات المائية والكحولية بعدها حضنت الأَطباق لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37 مْ ومن ثم قيست أَقطار مناطق التثبيط حول كل حفرة بالملمتر (Vandepitte *et al*., 1991).

### 3-10 تحديد التركيز المثبط الأدنى (MIC) للمستخلصات النباتية

**Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of Plant Extracts**

حسب ما جاء في (Ongsakul *et al*.,2009) فقد اتبعت طريقة التراكيز المتضاعفة بالآكار لحساب التركيز المثبط الأدنى (MIC) للمستخلصات المائية والكحولية لثمار نباتي الرمان والنارنج مع إجراء بعض التحويرات. حيث حُضِّرت تراكيز متضاعفة ومتسلسلة للمستخلصات النباتية تراوحت قيمتها ما بين (12.5-200) ملغم/ مل وقد أُضيفت نسب مختلفة من هذه المستخلصات إِلى وسط مولر هينتون آكار، لقحت الأَطباق بقطرة واحدة من المعلقات البكتيرية بعد تصلب الأَوساط ومن ثم حضنت الأَطباق لمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة 37°م. وبعد 24 ساعة قدر التركيز المثبط الأدنى الَّذي يمثل اقل تركيز يعمل على ثبيط نمو البكتريا،

كما تم تحديد التركيز تحت المثبط الأدنى (Sub-MIC) لإستخدامه في تجارب التحييد والَّذي يمثل التركيز تحت التركيز الأدنى المثبط MIC والَّذي لا تستطيع البكتريا النمو فيه.

**11-3 تحييد ال DNA البلازميدي باستخدام المستخلصات النباتية**

## Curing by Using Plant Extractes

أُتبعت طريقة (Ongsakul *et al*.,2009)، حضرت مزرعة من البكتريا المعزولة قيد الدراسة حيث جرى تنميتها بوجود المستخلص النباتي وبالتركيز تحت الادنى Sub-MIC المطلوب لمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة 37°م, بعدها حُضرت عدة تخافيف عشرية للمزرعة البكتيرية وأخذ 0.1 مل من التخافيف الثلاثة الاخيرة ونُشرت على أطباق الاكار المغذي وحضنت بدرجة حرارة 37°م ولمدة 24 ساعة. ولتحضير الطبق الرئيسي Master plate تم نقل 100 مستعمرة من المستعمرات المعاملة بالمادة المحيدة على وسط الاكار المغذي تحضن الاطباق بدرجة حرارة 37°م ولمدة 24 ساعة بعدها نُقلت المستعمرات على أوساط غذائية حاوية على المضادات الحيوية المستخدمة قيد الدراسة كلاً على حدة وحُضنت الاطباق بدرجة حرارة 37°م ولمدة 24 ساعة. المستعمرات التي تفشل في النمو على أوساط المضادات الحيوية تعد مستعمرات محيدة.

**12-3 توصيف محتوى ال DNA البلازميدي باستخدام تقنية الترحيل الكهربائي**

## Conducting a Description of the Content of Plasmid DNA Using the ElectropHoresis Technique

**وقد اشتملت هذه العملية على ما يأتي:**

**1-12-3 استخلاص البلازميد من الخلايا البكتيرية باستخدام العدة الجاهزة المجهزة من قبل شركة Promega**

1. استخلاص الخلايا البكتيرية من المزرعة البكتيرية المُنماة لمدة 24 ساعة إلى أُنبوب 1.5 مل ثم إجراء طرد مركزي بالسرعة القصوى لمدة دقيقة واحدة ويتخلص من الرائق بصورة كاملة.
2. يضاف 100 مايكرو ليتر من Solution I ويتم اعادة تعليق الراسب باستخدام جهاز المزج Vortex.

3. يضاف 200 مايكرو ليتر من Solution II ويمزج بقلب الأُنبوب بهدوء عدة مرات بدون استخدام جهاز المزج.
4. يضاف 150 مايكرو ليتر من Solution III ويمزج مباشرة عدة مرات كما في الخطوة السابقة.
5. إجراء الطرد المركزي لمدة 10 دقائق.
6. ينقل 400 مايكرو ليتر من الرائق إلى أُنبوب جديد 1.5 مل.
7. يضاف 0.8 مل من الايثانول 95 % ويمزج بقلب الأُنبوب ويترك بدرجة حرارة الغرفة لمد 5 دقائق.
8. إجراء طرد مركزي بالسرعة القصوى لمدة 10 دقائق ويتخلص من الرائق المتكون من الايثانول.
9. يغسل الراسب باستخدام 200 مايكرو ليتر من الايثانول 70% ويمزج بلطف، ثم إجراء طرد مركزي لمدة 5 دقائق ويتخلص من الايثانول.
10. يتم وضع الأُنبوب بشكل مقلوب على ورق نشاف للتخلص من بقايا الإيثانول إلى أنَّ يصبح الراسب جافًا تمامًا.
11. يذوب الراسب الذي يمثل البلازميدات باستخدام 50 مايكرو ليتر من محلول TE ويحفظ لحين الاستخدام.

### 2-12-3 تقدير تركيز ودرجة نقاوة ال DNA البلازميدي

### Determination of the Concentration and Purity of Plasmid DNA

قُدِّر تركيز ودرجة نقاوة الـ DNA البلازميدي المعزول عن طريق استخدام جهاز ال Bio drop تم وضع 1 مايكروليتر من الـ DNA البلازميدي المعزول على الجهاز ليظهر في الشاشة قيمة التركيز ودرجة النقاوة.

### 3-12-3 تحضير هلام الآكاروز وعملية الترحيل الكهربائي لـ DNA البلازميدي

لترحيل ال DNA البلازميدي والكشف عنه يتم تحضير هلام الآكاروز بتركيز 1% للحصول على هذا التركيز تتم إذابة 0.5 غم من مسحوق الآكاروز في (50) مل من X1 TBE واضافة 3 مايكروليتر من صبغة red safe يتم ذلك باستخدام مصدر حراري مع التحريك المستمر لحين الغليان ويترك ليبرد إلى درجة حرارة (50-60) °م.

ثم يصب محلول الهلام في الحوض الخاص Tray بجهاز الترحيل بعد أَن يتم تثبيت المشط الخاص لتكوين الحفر Wells عند أطراف الهلام مع مراعاة ان يكون الصب بهدوء لتجنب تكوين الفقاعات، وان تكونت يتم ازالتها باستخدام الماصة، ثم يترك الهلام حتى يتصلب. بعدها يوضع الـ Tray في حوض الترحيل الكهربائي الحاوي على كمية مناسبة من محلول X1 TBE بعدها يتم رفع المشط بهدوء.

يتم تحضير عينات الترحيل بمزج (5) مايكرو ليتر من عينة الـ DNA مع (3) مايكرو ليتر من محلول التحميل. بعد ذلك يتم تشغيل جهاز الترحيل بإمرار التيار الكهربائي بفرق جهد (70) فولت \ سم وتستغرق العملية (1.5-2) ساعة. بعد ذلك يتم تصوير الهلام تحت الأَشعة فوق البنفسجية 340 نانوميتر باستخدام جهاز تصوير الهلام Gel Documintation للتمكن من رؤية حزم الـ DNA.

# الفصل الرابع

# النتائج والمناقشة

# Results and Discussion

## 4-1 عزل وتشخيص العينات البكتيرية:

## Isolation and Identification of Bacterial Samples

### 4-1-1 عزل العينات Isolation Samples

جمعت 100 عينة ادرار من المرضى المصابين بالتهابات المجاري البولية (UTI)، أعطت (89) عينة منها نموًا موجباً على وسط آكار الدم Blood agar بينما استبعدت (11) عينة لم تعطِ نموًا على الوسط المذكور، وقد صنفت العينات على حسب نسبة الإصابة بين الإناث والذكور وكذلك حسب الفئات العمرية للمصابين كما مبين في الجدول (1–4).

**جدول (4-1): توزيع التهابات المسالك البولية على وفق الجنس والعمر والنسب المئوية**

| الجنس | المجاميع العمرية (سنوات) | أعداد المرضى | النسبة المئوية (%) |
|---|---|---|---|
| الإناث | <20 | 12 | 13.483 |
| | 20–40 | 34 | 38.202 |
| | >40 | 25 | 28.089 |
| الذكور | <20 | 4 | 4.494 |
| | 20–40 | 8 | 8.988 |
| | >40 | 6 | 6.741 |
| العدد الكلي | | 89 | 100 |

قد يعود السبب في عدم إعطاء بعض العينات نموًا على الأَوساط الزرعية بالرغم من وجود الخلايا القيحية هو كون المرضى قد تناولوا المضادات الحيوية قبل فترة وجيزة من اخذ العينات وقد تكون الأَحياء المجهرية لا تعزل بالطرائق الروتينية للعزل مثل بعض البكتيريا اللاهوائية وقد تكون إِصابة فايروسية (ال إسماعيل، 2007). نسب الإصابة بين الإناث أَعلى من نسب الإِصابة بين الذكور بحيث كانت 71 عينة تعود للإناث بنسبة (79.77%) بينما كانت 18 عينة تعود للذكور بنسبة (20.22%). وقد سجلت الفئة العمرية 20 – 40 عند الذكور والإناث أَعلى نسبة إِصابة بين الفئات العمرية بينما سجلت الفئة العمرية 20> بين الذكور والإِناث أَقل نسبة إِصابة بين الفئات العمرية المذكورة.

مرض التهاب المسالك البولية من الأَمراض التي تصيب كلا الجنسين وجميع الأَعمار، وتُعدُّ الإِناث أَكثر عرضة للإِصابة من الذكور بسبب الاختلافات التشريحية والفسيولوجية للجهاز

البولي التناسلي بالإضافة الى الاختلاف في نمط الحياة، وعند حدوث الإصابة فإنَّ أجزاء مختلفة من الجهاز البولي قد تتاثر.  ونتيجةً لظهور السلالات البكتيرية المقاومة للأدوية المتعددة ازداد معدل الإصابة بالتهابات المسالك البولية بشكل كبير واصبح هذا المرض يشكل عبئاً اجتماعياً واقتصادياً كبيرًا على مستوى العالم (Shaheen *et al.*, 2019). كما تزداد نسبة الإصابة بين النساء الحوامل بسبب التغيرات الهرمونية والَّتي قد تؤدي إِلى نتائج خطيرة تؤدي إِلى انتقال الإصابة إِلى الأطفال حديثي الولادة (Elgavish *et al*., 1994).

### 4-1-2 تشخيص الأنواع البكتيرية قيد الدراسة:

### Diagnostics of the Bacterial Species Under Study

#### 4-1-2-1 الصفات الزرعية والفحص المجهري للأنواع البكتيرية قيد الدراسة:

تم تشخيص العزلات البكتيرية اعتمادا على الفحص المجهري والصفات الزرعية كما هو موضح في الجدول (2-4).

**الجدول (2-4): التشخيص المجهري والمظهري للأنواع البكتيرية قيد الدراسة**

| الاختبارات / اجناس البكتريا | | | *Staphylococcs* | *E. coli* | *Klebsiella* | *Pseudomonas* | *Proteus* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| التشخيص المجهري | صبغة كرام | | + | − | − | − | − |
| | الشكل | Cocci | + | − | − | − | − |
| | | Bacilli | − | + | + | + | + |
| | ترتيب الخلايا | Clusterعناقيد | + | − | − | − | − |
| | | سلاسل Chains | − | − | + | − | − |
| | | مفرد Single | + | + | + | + | + |
| | | ازواج Pairs | + | − | + | − | − |
| | آكار الدم | α and β-Haemolysis | + | - | - | + | - |
| | اكار الماكونكي | تخمير سكر اللاكتوز | ND | + | + | - | - |
| | وسط الآكار المغذي | إنتاج الصبغة | V | - | - | + | - |
| | | اللزوجة | - | - | + | V | - |
| | | العج | - | - | - | V | + |

(-) نتيجة سالبة (+) نتيجة موجبة (ND) لم يجرِ الاختبار (V) متنوعة

### 2-2-1-4 الاختبارات الكيموحيوية Biochemical tests

جاءة نتائج الاحتبارات الكيموحيوية مطابقة لما ورد في أنظمة التشخيص المعتمدة وبحسب ما جاء في المصادر ( Atlas *et al.*,1995; Hemraj *et al.*, 2013; Tille, 2017) وكما موضح في الجدول (3-4):

**جدول (3-4): يوضح نتائج الاختبارت البايوكيميائية للأنواع البكتيرية السالبة والموجبة لكرام**

| الاختبارات / اجناس البكتريا | النمو على وسط المانيتول | اندول | مثيل احمر | فوكس بروسكور | سترتيت | إنزيم التجلط Coagulase | اليوريز | تحلل الجيلاتين | DNAase | الحركة | الكتاليز | TSI | | | | السكريات | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | | | | | | $H_2S$ | غاز | Slant | Bult | كلوكوز | لاكتوز | سكروز | مانيتول | ارابينوز | مالتوز |
| ***S. aureus*** | + | - | + | + | - | + | + | + | + | - | + | ND | ND | ND | ND | + | + | + | + | + | + |
| ***E. coli*** | ND | + | + | - | - | ND | - | - | ND | + | ND | - | + | A | A | + | + | + | + | + | + |
| ***K. pneumonia*** | ND | - | - | + | + | ND | + | - | ND | - | ND | - | + | A | A | + | + | + | + | + | + |
| ***Ps. aeruginosa*** | ND | - | - | - | + | ND | V | + | ND | + | ND | - | - | Alk | Alk | + | - | - | - | + | - |
| ***Pr. mirabilis*** | ND | - | + | - | + | ND | + | + | ND | + | ND | + | + | Alk | A | + | - | - | - | - | + |
| ***Pr. vulgaris*** | ND | + | + | - | + | ND | + | + | ND | + | ND | + | - | Alk | A | + | - | + | - | + | + |

(+): موجبة للاختبار (-) : سالبة للاختبار (ND): عدم إجراء الاختبار

(V): متغيرة (A): حامضي (Alk): قاعدي

**جدول (4-4): يوضح عدد ونسب الأَنواع البكتيرية المعزولة**

| البكتريا | عدد العزلات بعد التشخيص | نسبتها % |
|---|---|---|
| *Staphylococcus aureus* | 29 | 32.58 |
| *E. coli* | 32 | 35.95 |
| *Klebsiella. pneumonia* | 9 | 10.1 |
| *Ps. aeruginosa* | 11 | 12.35 |
| *Pr. vulgaris* | 4 | 4.49 |
| *Pr. mirabilis* | 4 | 4.49 |
| **المجموع** | 89 | 100% |

كما هو واضح من نتائج التشخيص في الجداول المذكورة اعلاه فقد حصلنا على (29) عزلة بنسبة (32.5%) تابعة لبكتيريا المكورات العنقودية *Sta. aureus* الَّتي ظهرت تحت المجهر بعد صبغها بصبغة كرام بشكل خلايا كروية مرتبة بشكل مفرد أَو أَزواج أَو عناقيد موجبة لصبغة كرام، وظهرت مستعمراتها بعد زرعها على وسط الآكار المغذي ووسط آكار الدم ملساء لامعة محدبة ودائرية الشكل. وبلون أَصفر ذهبي وأَعطت تحلل من نوع B- haemolysis على وسط آكار الدم وقد جرى تمييزها عن بقية الأَنواع عن طريق تنميتها على وسط آكار المانيتول الملحي حيث حولت لون الوسط من الوردي إِلى اللون الأصفر، كما أعطت نتيجة موجبة لاختبار انزيم التجلط Coagulase وهكذا حُفظ النوع *S. aureus* وأُهملت بقية الأَنواع التابعة للعنقوديات والتي أعطت نتيجة سالبة لهذا الاختبار. هذه المواصفات جاءت متوافقة مع ما جاء في( NOURI, 2019 ). تُعدُّ بكتيريا *Sta. aureus* أحد المسبِّبات المرضية الرئيسة بالنسبة للإِنسان بسبب كونها جزء من النبيت الطبيعي للإِنسان. اذ تُعدُّ المكورات العنقودية الذهبية من المسببات المرضية الشائعة. وتعود إمراضيتها إِلى امتلاكها لجينات الضراوة المسؤولة عن إِنتاج سمومًا مختلفة وظهور السلالات المقاومة للأَدوية وانتشارها على نطاق واسع أَدَّى إِلى تفاقم ازمة الإِصابة بهذه البكتريا (Recker *et al*., 2017).

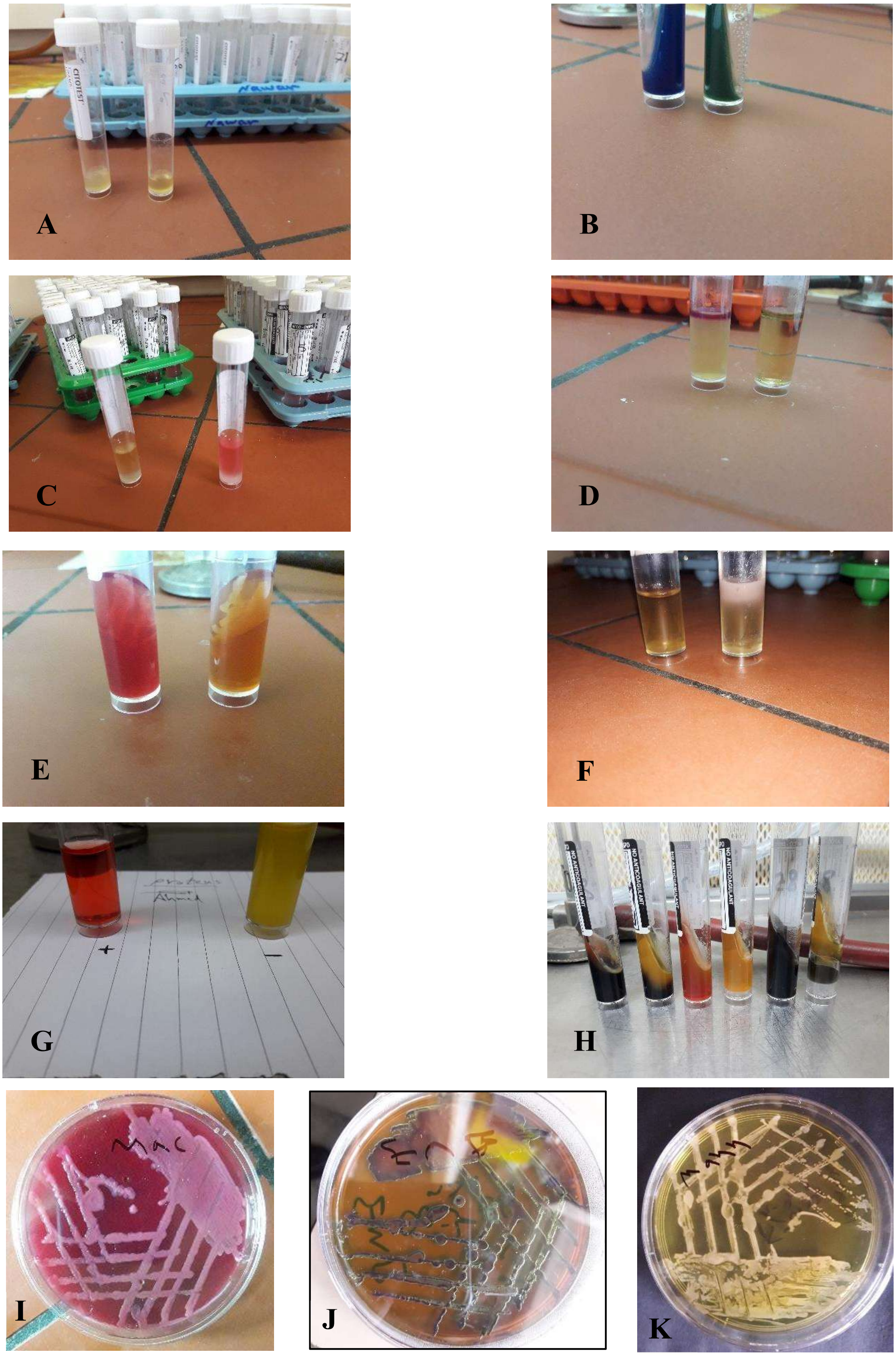
كذلك حصلنا على (32) عزلة بنسبة (35.9%) تابعة لبكتريا *E. coli*. التي عند صبغها بصبغة كرام ظهرت بشكل خلايا سالبة للصبغة وبشكل عصيات قصيرة غير مكونة للسبورات Non sporulating. وعند تنميتها على وسط آكار الماكونكي ظهرت مستعمراتها بلون وردي بسبب قدرتها على تخمير اللاكتوز الموجود ضمن مكونات هذا الوسط وكانت المستعمرات لماعة وناعمة على هذا الوسط. كما ظهرت المستعمرات التي نميت على والوسط التفريقي آكار ازرق المثيلين بلون اسود ذات بريق اخضر لماع وهذا ما يميزها عن بقية الأَنواع البكتيرية السالبة التي تنتمي للعائلة المعوية (Wanger *et al*., 2017). أَمَّا على وسط آكار الدم فإِنَّ مستعمراتها النامية غير محللة للدم. صغيرة ومحدبة وذات لون شاحب على وسط الآكار المغذي (Sharmin *et al*; 2010). بكتيريا *E. coli* تُعدُّ البكتيريا المسؤولة عن 80% من إصابات المسالك البولية على مستوى العالم ( Hadi *et al*., 2014).

كما حصلنا على (9) عزلات بنسبة (10%) تابعة لبكتريا *K. pneumonia* ظهرت تحت المجهر بشكل عصيات سالبة لصبغة كرام وبشكل مفرد أَو ثنائيات أَو سلاسل. تظهر مستعمراتها بلون رمادي مبيض وكبيرة الحجم ولزجة القوام على وسط آكار الدم ولكنها غير

محللة للدم. أمَّا عند تنميتها على وسط آكار الماكونكي فإِنَّ مستعمراتها ظهرت بلون احمر لقدرتها على تخمير سكر اللاكتوز كما تظهر مستعمراتها لزوجة عالية، وهي صفة مميزة لهذه البكتيريا؛ إذ تمتاز بقدرتها على تكوين المحفظة من مادة متعدد السكرايد Polysacarid عندما تكون الظروف مواتية وهذا مطابق للوصف الذي جاء به (التومي وآخرون، 2014). في وصف النوع البكتيري *K. pneumonia*. تُعتبر *K. pneumonia* سبب رئيسي لعدوى المسالك البولية المكتسبة من الأَمعاء، وغالبًا ما يكون سائدًا كعامل معدي للمرضى الذين يعانون من القسطرة الادرارية الساكنة (Stamm WE, 1991). كما عُزلِت (11) عزلة بنسبة (12.3%) تابعة لبكتريا *Ps. aeruginosa* حيث عند صبغها بصبغة كرام ظهرت تحت المجهر بشكل عصيات سالبة لصبغة كرام غير مكونة للسبورات (Puah *et al*., 2016).

وعند تنميتها على وسط آكار الماكونكي فإِنَّ مستعمراتها ظهرت شاحبة اللون بسبب عدم قدرتها على تخمير اللاكتوز Non lactose fermentation كما أعطت رائحة عفنة مميزة وهي تُعدُّ من الصفات المميزة لها لقدرتها على إِنتاج Amen aceto pHenome من الحامض الأَميني التربتوفان كذلك انتجت صبغة زنجارية مميزة على هذا الوسط (Forbes *et al*., 2007)

كذلك تم الحصول على (8) عزلات بنسبة (8.9%) من البكتيريا التابعة لجنس Proteus (4) تعود للنوع *Pr. mirbilis* و (4) تعود للنوع *Pr. vulgaris* الَّتي ظهرت تحت المجهر بعد صبغها بصبغة كرام كعصيات قصيرة مستقيمة سالبة لصبغة كرام غير مكونة للسبورات (Armbruster CE, 2012). وعند تنميتها على وسط آكار الدم تميزت بظاهرة العج إِذ ظهرت بشكل حلقات متحدة المركز وهذه الصفة تُعدُّ من أَكثر الصفات المميزة لهذا الجنس. تبدي بكتيريا *P. mirabilis* ظاهرة تعرف باسم العج، وقد وجد أَنَّ قدرتها على غزو المسالك البولية تتحدد مع حركة العج (Jiang *et al*., 2010). عند تنميتها على وسط الماكونكي ظهرت مستعمراتها بلون شاحب بسبب عدم قدرتها على تخمير سكر اللاكتوز الموجود في الوسط. تنتج هذه البكتريا إنزيم اليوريز الذي يسبب تكوين الحصى في المسالك البولية نتيجة لتحويل اليوريا الى امونيا $CO^2$ (Greenwood *et al*.,2012). تكون أَنواعها سالبة لفحص الأَندول ما عدا *P. vulgaris* التي تكون موجبة لهذا الاختبار وعن طريق هذا الاختبار يمكن تمييز هذا النوع عن الأَنواع الأُخرى (Holt *et al*., 1994).




الصورة (4-1): تبين النتائج الموجبة والسالبة لبعض الاختبارات وصور لنمو مستعمرات بعض الأَنواع البكتيري على أوساطها الانتخابية.

A- نتيجة اختبار التلازن.

B- نتيجة اختبار سيمون ستريت.

C- نتيجة اختبار المثيل الأحمر.

D- نتيجة اختبار الأندول.

E- نتيجة اختبار إنزيم اليوريز.

F- نتيجة اختبار فوكس بروسكور.

G- نتيجة اختبار السكريات.

H- نتيجة اختبار TSI.

I- نمو بكتريا *K. pneumonia* على وسط آكار الماكونكي.

J- نمو بكتريا *E. coli* على وسط EMB.

K- نمو بكتريا *S. aureus* على وسط آكار المانيتول الملحي.

**4-1-3 بعض الدراسات التي أُجريت في مجال عزل وتشخيص الأَنواع البكتيرية المسببة لالتهاب المسالك البولية:**

لوحظ من خلال الدراسات التي اجراها كل من (شويخ وفرح، 2016). و( Hammoudi, 2017). و (رزوقي وسجود، 2017). على مرضى المسالك البولية أَنَّ نسبة بكتريا *E. coli* هي الأَعلى من بين الأَنواع الأُخرى. كما لوحظ من الدراسات التي ذكرت آنفًا فإِنَّ نتائج دراستنا بالنسبة للأَنواع التي تم عزلها في دراستنا تتفق من ناحية أَنَّ هناك أَنواعًا بكتيرية مشتركة بشكل يتشابه مع الأَنواع التي عزلناها بسبب كونها من الأَنواع البكتيرية الأَكثر شيوعًا في إِصابة المسالك البولية. في حين أَنَّ هناك اختلافًا بين نتائجنا وبين نتائج البحوث المذكورة آنفًا من ناحية العدد والنسب المئوية فبعضها كان أَقل وبعضها أَكثر من حيث الأَعداد للأَنواع البكتيرية المعزولة.

## 4-2 اختبار الكشف عن مقاومة المضادات الحيوية

## Antibiotic Resistance Detection Test

اختبرت مقاومة البكتريا المعزولة لعشر مضادات حيوية وقد أَظهرت النتائج أَنَّ هناك تباينًا بين مقاومة البكتيريا المعزولة لهذه المضادات وقد جرى الاختبار بحسب ما جاء في فصل المواد وطرائق العمل الفقرة (3-2-1-5) ويبين الجدول (4-5) النتائج التي ظهرت في هذا الاختبار.

جدول (5-4): يوضح أعداد ونسب الأنواع البكتيرية المقاومة للمضادات الحيوية

| المضادات / البكتريا | عدد العزلات | AX (%) | Am (%) | Sm (%) | Ery (%) | GN (%) | RA (%) | Cf (%) | TE (%) | Tri (%) | Nal (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ***Sta. Aureus*** | 29 | 25 (86) | 24 (82) | 14 (48) | 24 (82) | 20 (68) | 14 (48) | 19 (65.5) | 15 (51.7) | 20 (68) | 29 (100) |
| ***E. coli*** | 32 | 32 (100) | 32 (100) | 17 (53) | 29 (90) | 13 (40) | 15 (46) | 21 (65) | 28 (87) | 27 (84) | 29 (90) |
| ***K. Pneumonia*** | 9 | 6 (66.6) | 9 (100) | 8 (88) | 9 (100) | 1 (11) | 1 (11) | (88) 8 | 6 (66.6) | 8 (88) | 9 (100) |
| ***Pr. Mirabilis*** | 4 | (100) 4 | 4 (100) | S | S | S | S | S | S | 2 (50) | S |
| ***Pr. Vulgaris*** | 4 | 1 (25) | 1 (25) | 1 (25) | S | S | S | S | S | 1 (25) | S |
| ***Ps. Aeruginosa*** | 11 | 11 (100) | 10 (90) | 8 (72) | 9 (81) | 5 (45) | 3 (27) | (27) 3 | (63) 7 | 10 (90) | 11 (100) |

S: Sensitive; AX: Amoxicillin; TE: Tetracycline; Tr: Trimethoprim; RA: Refampicin; Sm: Streptomycin; Ery: Erythromycin; Am: Ampicillin; Nal: Nalidixic acid; GN: Gentamicin; Cf: Ciprofloxacin

أظهرت النتائج المدرجة في الجدول (4-6%) ان بكتيريا *Sta. aureus* اعطت نسب مقاومة عالية لبعض المضادات الحيوية منها Nal حيث كانت نسبة المقاومة لهذا المضاد (100%) كذلك المقاومة لكل من المضادات التالية: (Ax, Am, Ery, GN, Tri) بالنسب التالية (68%، 68%، 82%، 82%، 86%) على التوالي بينما أظهرت مقاومة متوسطة لكل من المضادات التالية (TE, Cf) وبنسب (65%، 51%) على التوالي بينما أظهرت مقاومة ضعيفة لكل من المضادين (Sm, RA,) وبنسبة (48%) لكل منها.

أمَّا نتائج عزلات النوع البكتيري *E. coli* فقد أظهرت أيضًا تباينًا في مقاومة المضادات الحيوية؛ حيث أظهرت مقاومة عالية جدًا لبعض المضادات الحيوية منها (Ax, Am)؛ إذ كانت المقاومة لكليهما بنسبة (100%) كما أظهرت مقاومة عالية لكل من المضادات ( Nal, Ery, TE, Tri) وبنسبة (84%، 87%، 90%، 90%) على التوالي؛ وقد أظهرت مقاومة متوسطة

تجاه كل من المضادين (Cf, Sm) وبالنسب التالية (53%، 65%) على التوالي بينما أَظهرت مقاومة ضعيفة للمضادين الحيويين (GN,RA) وبنسبة (46% ,40%). عزلات بكتريا *Klebsiella* هي الأُخرى أَظهرت تباينا واضحا في مقاومة المضادات قيد الدراسة اذ أعطت مقاومة عالية جدا بنسبة (100%) للمضادات (Am ,Ery, Nal) بينما أَظهرت مقاومة بنسبة (88%) لكل من المضادات (Tri, Sm, Cf) وقد أعطت مقاومة متوسطة لكل من المضادين (TE, Ax) وبنسبة ( 66% ,66%) على التوالي وكانت نسبة المقاومة ضعيفة بالنسبة للمضادين (GN, RA) حيث بلغت النسبة 11% فقط.

أَعطى النوع البكتيري *Pr. mirabills* مقاومة عالية لكل من المضادين (Am, Ax) وبنسبة (100%) لكل منها كما اعطى مقاومة متوسطة للمضاد (Tri) وبنسبة (50%) بينما لم تعطِ مقاومة لباقي المضادات المستخدمة في الدراسة. كما ان النوع *Pr. vulgaris* أَعطى مقاومة ضعيفة بلغت نسبتها( 25% )لكل من المضادات التالية (Tri, Sm, Am, Ax). أَمَّا النوع البكتيري *Ps. aeruginosa* فقد أَظهرت نسب مقاومة عالية لبعض المضادات ومنها (Nal, Ax) حيث بلغت نسبة المقاومة لكل منهما (100%) في حين كانت المقاومة للمضادين الحيويين (Tri, Am) بنسبة (90%) أَمَّا المضاد الحيوي (Ery) فكانت النسبة (81%) بينما أَظهر هذا النوع مقاومة متوسطة لكل من (Sm, TE) وبنسب (63%، 72%) على التوالي وقد أَظهر مقاومة ضعيفة لكل من المضادات التالية وكما يلي حيث أَظهر نسبة مقاومة بلغت (45%) للمضاد (GN) بينما كانت المقاومة لكل من المضادين (Cf, RA) بنسبة (27%).

بعض المضادات تؤثر على الغشاء الحيوي للبكتيريا (الخفاجي، 2008). بعض المضادات تعمل على إفشال عملية تخليق البروتين في البكتيريا وذلك من خلال ارتباطها بالرايبوسوم البكتيري مما يتسبب بارتباط أَنواع خاطئة من الأَحماض الأَمينية وبذلك تتراكم بروتينات غير طبيعية داخل البكتيريا وهذا ما يتسبب بتوقف النمو (Heritag, 2003). قسم من أَنواع المضادات تؤثر على الحامض النووي DNA من خلال تاثير ها على DNA gyrase مما يؤثر على التفاف شريطي ال DNA (Hardy *et al*., 2000).

كما يعزى السبب في ظهور البكتيريا المقاومة للأَدوية المتعددة إلى الاستعمال العشوائي والواسع للمضادات الحيوية في علاج الإصابات الناتجة عن البكتريا والَّذي أَدَّى إلى تفاقم الأَزمة حيث أَدَّى إلى ظهور سلالات تتمتع بمقاومة متعددة لمعظم مجاميع المضادات الحيوية، وقد ظهرت هذه المشكلة بشكل كبير لدى المرضى الراقدين في المستشفيات اذ تتسبب بخسائر

اقتصادية كبيرة في مراكز العناية الصحية بسبب الزيادة في نفقات العلاج بالإضافة الى زيادة المدة وقد يعود سبب مقاومة الأَنواع البكتيرية للمضادات الحيوية إلى المقاومة الذاتية Internisc resistance التي تتمتع بها البكتيريا والَّتي تحصل نتيجة لامتلاك هذه البكتريا خصائص طبيعية تتميز بها عن غيرها مسؤولة عنها العوامل الوراثية التي تمتلكها ما يجعلها قليلة التأثر بالمضادات الحيوية منها، عدم نفاذية الجدار الخارجي للبكتيريا وقدرتها على لفظ المضادات إلى خارج الخلية عن طريق مضخات الدفق. وقد تعود مقاومة البكتريا إلى المقاومة المكتسبة Acquired resistance والَّتي تظهر كنتيجة لتعرض السلالات البكتيرية الحساسة للمضادات الحيوية وتحولها لسلالات مقاومة وبطرائق متنوعة منها، الطفرات الكروموسومية Chromosomal mutations، وغيرها من الطرائق الأُخرى (Ekizoğlu *et al*., 2016).

كما أَنَّ قسم من المضادات تكون broad spectrum antibiotics حيث تملك فعَّالية ذات طيف واسع ومتنوع من الكائنات الدقيقة، بينما بعضهم الآخر يمتلك طيفًا محدودًا narrow spectrum antibiotics اذ تكون فعَّالة ضد نوع واحد فقط او مجموعة محدودة من الكائنات الدقيقة وليس لها تأثير على الأَنواع الأُخرى وقد تعود مقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية بسبب انتقال المادة الوراثية من بكتريا إلى أُخرى وبعدة وسائل، منها عملية الاقتران التي تقوم بها البكتريا conjugation كما يحصل في انتقال البلازميدات Plasmids إذ تنتقل المادة الوراثية من خلية بكتيرية إلى خلية بكتيرية أُخرى بصورة مباشرة مثال آخر ما يحصل في الجينات القافزة transposons الَّتي أَيضًا يحصل فيها انتقال مباشر للمادة الوراثية، وقد يتم أُخذ الجينوم البكتيري الذي يتحرر من البكتريا الميتة وهذا ما يعرف بعملية التحول transformation ، كما قد يحصل الانتقال للمعلومات الوراثية بواسطة العاثيات bacteriopHages وهذا ما يدعى بطريقة الحث transduction (Laird, 2016 ).

ظهر من خلال نتائج الدراسات التي قام بها كل من (العبيدي والكناني, 2017). و (Hammoudi, 2017). التي أُجريت على مقاومة المضادات الحيوية للبكتيريا المعزولة من التهابات المسالك البولية. و(العزاوي والشويخ، 2018). التي أُجريت على مقاومة بكتيريا Psudomonas aeruginosa. لـ (10) مضادات حيوية انها تتفق مع مع ما جاء في النتائج التي حصلنا عليها في دراستنا بإظهار الأَنواع البكتيرية قيد الدراسة تباينا واضحا في مقاومتها وحساسيتها للمضادات الحيوية قيد الدراسة كذلك في ظهور مقاومة متعددة لعدة مضادات حيوية وقد اختلفت هذه الدراسة عن الدراسات المذكورة في نسب المقاومة والحساسية لكل مضاد

بالإضافة الى الأَنواع البكتيرية التي أبدت مقاومة لجميع المضادات وقد يكون السبب في هذا الاختلاف يعود للاختلاف في تراكيز المضادات المستخدمة في كل دراسة.

## 3-4 الكشف عن الفعَّالية التثبيطية للمستخلصات المائية والكحولية لثمار الرمان والنارنج:

## Detection of the Inhibitory Activity of Aqueous and Alcoholic Extracts of Citrus aurantium Pomegranate Fruits

### 1-3-4 (طريقة الانتشار في الحفر) (Agar Wells Diffusion Method)

أُجري هذا الاختبار كما ورد في فصل المواد وطرائق العمل في الفقرة (3-9-2) وقد ظهر تباينا في نتيجة هذا الاختبار الذي أُجري باستعمال المستخلصات المائية والكحولية للنباتات قيد الدراسة على البكتيريا وهذا يعود لنوع البكتيريا ونوع المستخلص ومكوناته الفعَّالة وتركيزه. وكانت النتائج كالاتي:

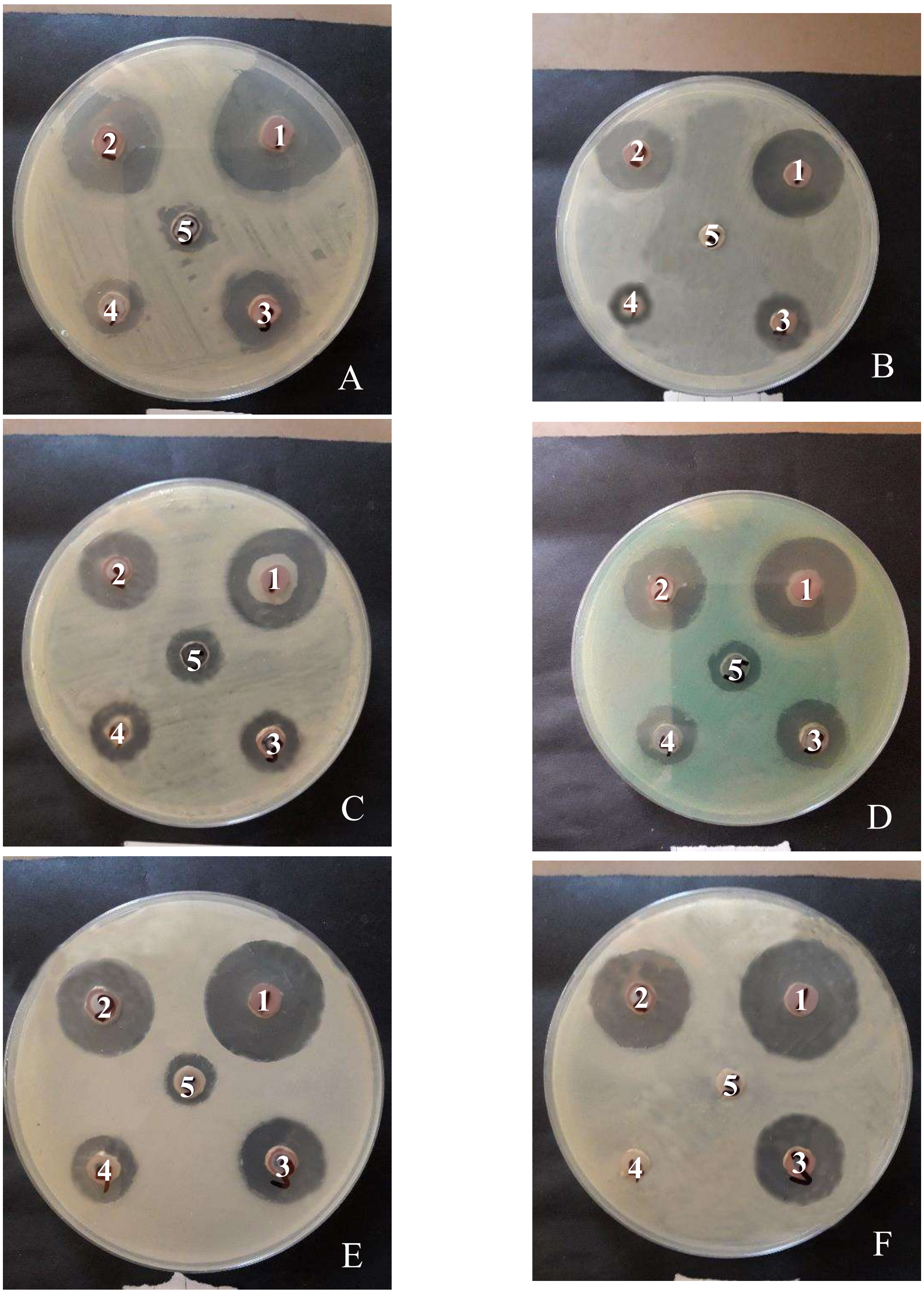
### 1-1-3-4 مستخلصات ثمار نبات الرمان *Punica granatum* L. Fruit Extracts

**جدول (6-4): التأثير التثبيطي للمستخلصات المائية والكحولية لثمار الرمان بتراكيز مختلفة على الأَنواع البكتيرية قيد الدراسة (قطر منطقة التثبيط، مقاسة بالملم)**

| البكتريا | نوع المعاملة | تركيز المستخلص (ملغم / سم$^3$) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 12.5 | 25 | 50 | 100 | 200 |
| *Sta. Aureus* | المستخلص المائي | 11 | 14 | 19 | 24 | 29 |
| | المستخلص الكحولي | 13 | 15 | 16 | 16 | 23 |
| *Escherichia coli* | المستخلص المائي | - | 9 | 11 | 21 | 26 |
| | المستخلص الكحولي | - | - | - | 16 | 21 |
| *Klebsiella pneumonia* | المستخلص المائي | 14 | 14 | 15 | 19 | 24 |
| | المستخلص الكحولي | 12 | 13 | 13 | 13 | 18 |
| *Pseudomonas aeruginosa* | المستخلص المائي | 13 | 16 | 18 | 23 | 26 |
| | المستخلص الكحولي | 13 | 16 | 18 | 19 | 23 |
| *Proteus mirabilis* | المستخلص المائي | - | - | 19 | 24 | 29 |
| | المستخلص الكحولي | 13 | 14 | 16 | 17 | 18 |
| *Proteus vulgaris* | المستخلص المائي | 11 | 16 | 19 | 23 | 27 |
| | المستخلص الكحولي | 11 | 13 | 18 | 19 | 23 |

(-) تعني عدم وجود فعَّالية تثبيط

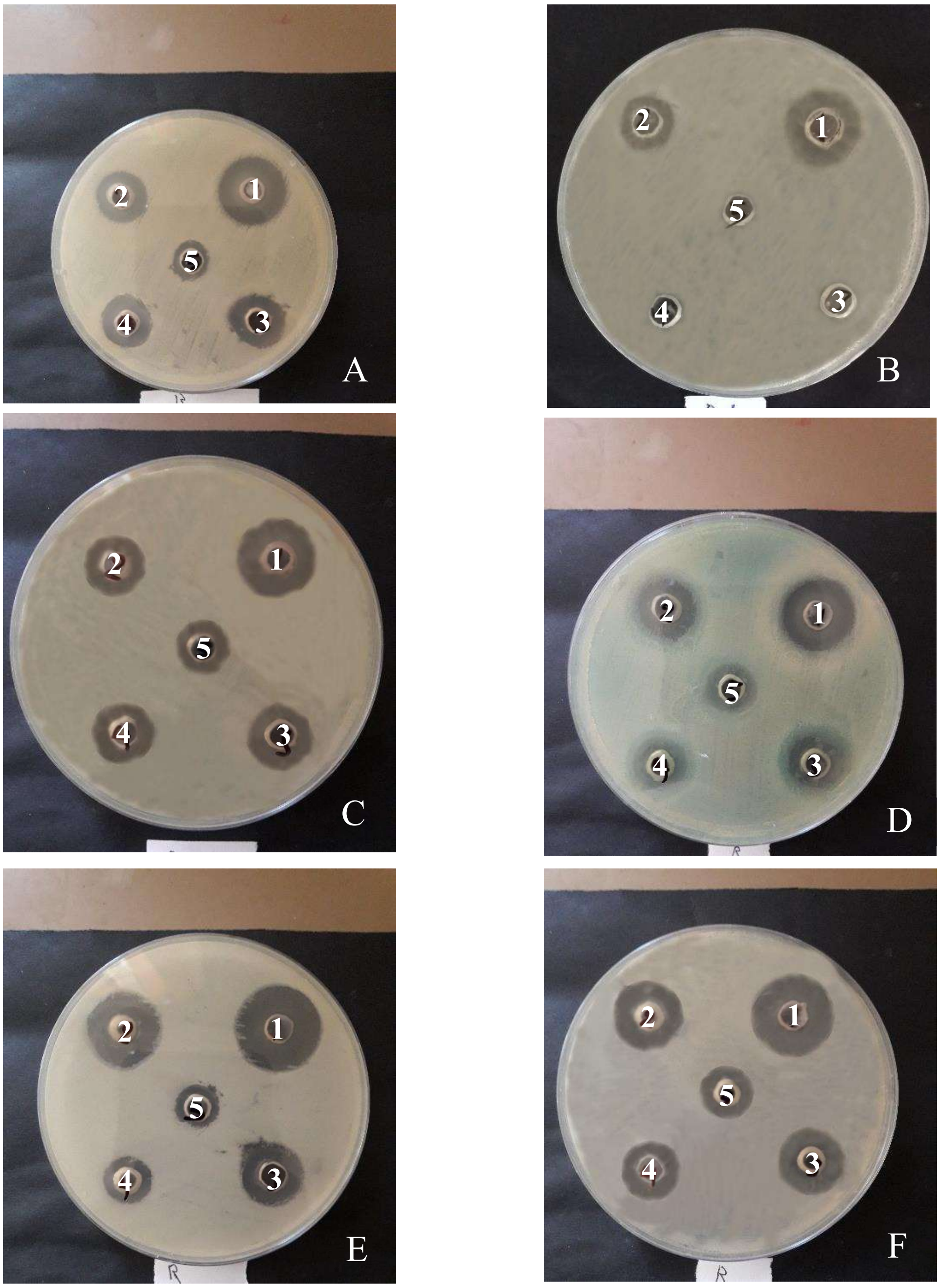
وكما هو موضح في الجدول (4-7) فإنَّ مستخلصات نبات الرمان المائية والكحولية أَظهرت تأثيرًا تثبيطياً كبيرًا ضد الأَنواع البكتيرية المعزولة في هذه الدراسة.




**الصورة (4-2) تأثير المستخلص المائي لثمار الرمان وبتراكيز مختلفة على البكتريا قيد الدراسة**

| | | |
|---|---|---|
| A. *Sta. aureus* | B. *E. coli* | C. *K. pneumonia* |
| D. *Ps. aeruginosa* | E. *pr. vulgaris* | F. *pr. mirabilis* |

التراكيز 1(200 ملغم/سم$^3$)، 2(100 ملغم/سم$^3$)، 3(50 ملغم/سم$^3$)، 4(25 ملغم/سم$^3$)، 5(12.5 ملغم/سم$^3$).




**الصورة (3-4) تأثير المستخلص الكحولي لثمار الرمان وبتراكيز مختلفة على البكتريا قيد الدراسة**

A. *Sta. aureus* B. *E. coli* C. *K. pneumonia*
D. *Ps. aeruginosa* E. *Pr. vulgaris* F. *pr. mirabilis*

التراكيز 1(200 ملغم/سم$^3$)، 2(100 ملغم/سم$^3$)، 3(50 ملغم/سم$^3$)، 4(25 ملغم/سم$^3$)، 5(12.5 ملغم/سم$^3$).

كما هو واضح من الجدول اعلاه فقد اعطى النوع البكتيري *Sta. aureus* اعلى استجابة للمستخلص المائي للرمان ثم المستخلص الكحولي للرمان اذ اعطى التركيز (200 ملغم /سم$^3$) أكبر قطر تثبيطي لهذه البكتيريا والذي بلغ (23,29) ملم لكل من المستخلص المائي والكحولي للرمان على التوالي وكما هو واضح في الصورة (2,3 –A4).

اما بكتيريا *E. coli* فقد أعطت استجابة عالية تجاه المستخلص المائي للرمان عند التركيز (200ملغم /سم$^3$) أكبر من الاستجابة التي ابدتها تجاه المستخلص الكحولي عند هذا التركيز وقد أخفق المستخلص الكحولي للرمان في تثبيط نمو *E. coli* عند كلا من التراكيز (12.5 و25 و50 ملغم /سم$^3$) بينما أخفق المستخلص المائي في التثبيط عند التركيز (12.5 ملغم /سم$^3$) وكما هو واضح في الصورة (2,3 -B4).

اظهر المستخلص المائي للرمان تأثيرا تثبيطياً اعلى من المستخلص الكحولي للرمان على النوع البكتيري *K. pneumonia* حيث بلغ قطر التثبيط 24 ملم عند التركيز (200 ملغم /سم$^3$) وكما موضح في الصورة (2,3 -C4). اعطى المستخلص المائي للرمان تأثيرا اعلى من المستخلص الكحولي على النوع البكتيري *Ps. aeruginosa* اذ بلغ قطر التثبيط للمستخلص المائي عند التركيز (200 ملغم /سم$^3$) 26 ملم وكما موضح في الصورة (2,3 -D4).

اما النوع البكتيري *Pr. mirabilis* فقد اعطى اعلى استجابة تجاه المستخلص المائي للرمان وكان اقل استجابة للمستخلص الكحولي اذ اعطى عند التركيز (200 ملغم /سم$^3$) للمستخلص المائي للرمان استجابة بلغت 29 ملم وكما في الصورة (2,3 -F4).أظهر النوع البكتيري *Pr. vulgaris* استجابة عالية تجاه المستخلص المائي للرمان بلغت 27 ملم عند التركيز (200 ملغم /سم$^3$) بينما بلغت الاستجابة تجاه المستخلص الكحولي 23 ملم عند التركيز نفسه وكما في الصورة (2,3 -E4).

أخيرا وكما هو واضح فان المستخلص المائي للرمان قد اعطى تثبيطا اعلى من المستخلص الكحولي على جميع الأنواع البكتيرية قيد الدراسة كما ان اعلى تثبيط لجميع الأنواع البكتيرية قيد الدراسة ولكلا المستخلصين المائي والكحولي كان عند اعلى تركيز وهو (200 ملغم /سم$^3$).

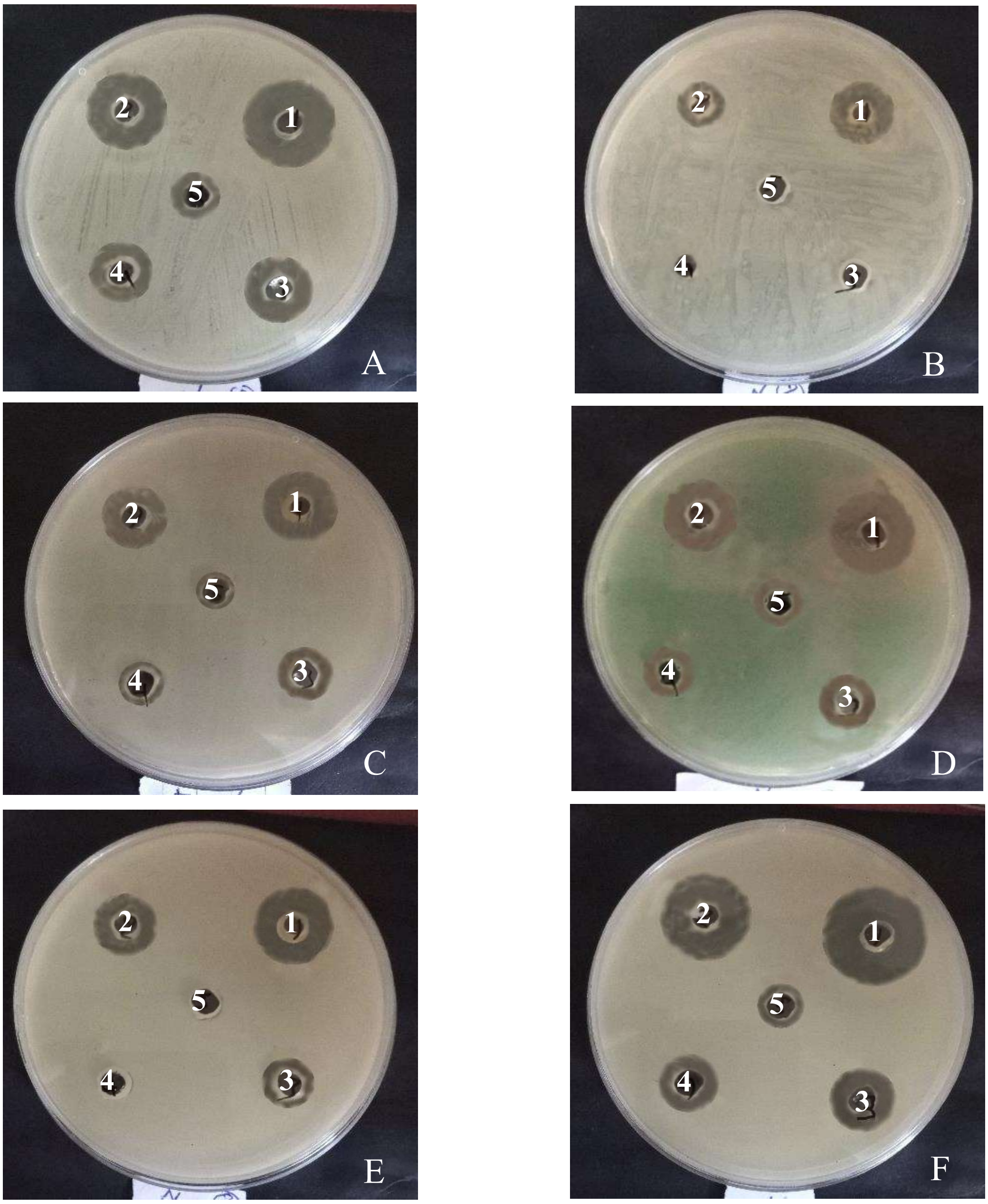
**2-1-3-4 مستخلصات ثمار نبات النارنج Citrus aurantium fruit extracts**

**الجدول (4-7): التأثير التثبيطي للمستخلصات المائية والكحولية لثمار النارنج بتراكيز مختلفة على الأَنواع البكتيرية قيد الدراسة (قطر منطقة التثبيط، مقاسة بالملم)**

| تركيز المستخلص ( ملغم / سم$^3$ ) | | | | | نوع المعاملة | البكتريا |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 200 | 100 | 50 | 25 | 12.5 | | |
| 23 | 20 | 19 | 17 | 15 | المستخلص المائي | *S. aureus* |
| 24 | 23 | 18 | 16 | 14 | المستخلص الكحولي | |
| 19 | 12 | - | - | - | المستخلص المائي | *E. coli* |
| 18 | 16 | 14 | 13 | 11 | المستخلص الكحولي | |
| 20 | 17 | 15 | 12 | 9 | المستخلص المائي | *K.pneumonia* |
| 18 | 14 | 12 | 11 | 9 | المستخلص الكحولي | |
| 23 | 17 | 12 | 11 | 10 | المستخلص المائي | *Ps. aeruginosa* |
| 26 | 24 | 23 | 19 | 13 | المستخلص الكحولي | |
| 24 | 19 | 17 | 15 | 10 | المستخلص المائي | *Pr. mirabilis* |
| 23 | 15 | 13 | 11 | 9 | المستخلص الكحولي | |
| 21 | 16 | 8 | - | - | المستخلص المائي | *Pr. vulgaris* |
| 23 | 18 | 14 | 12 | 9 | المستخلص الكحولي | |

(-) تعني عدم وجود فعَّالية تثبيطية

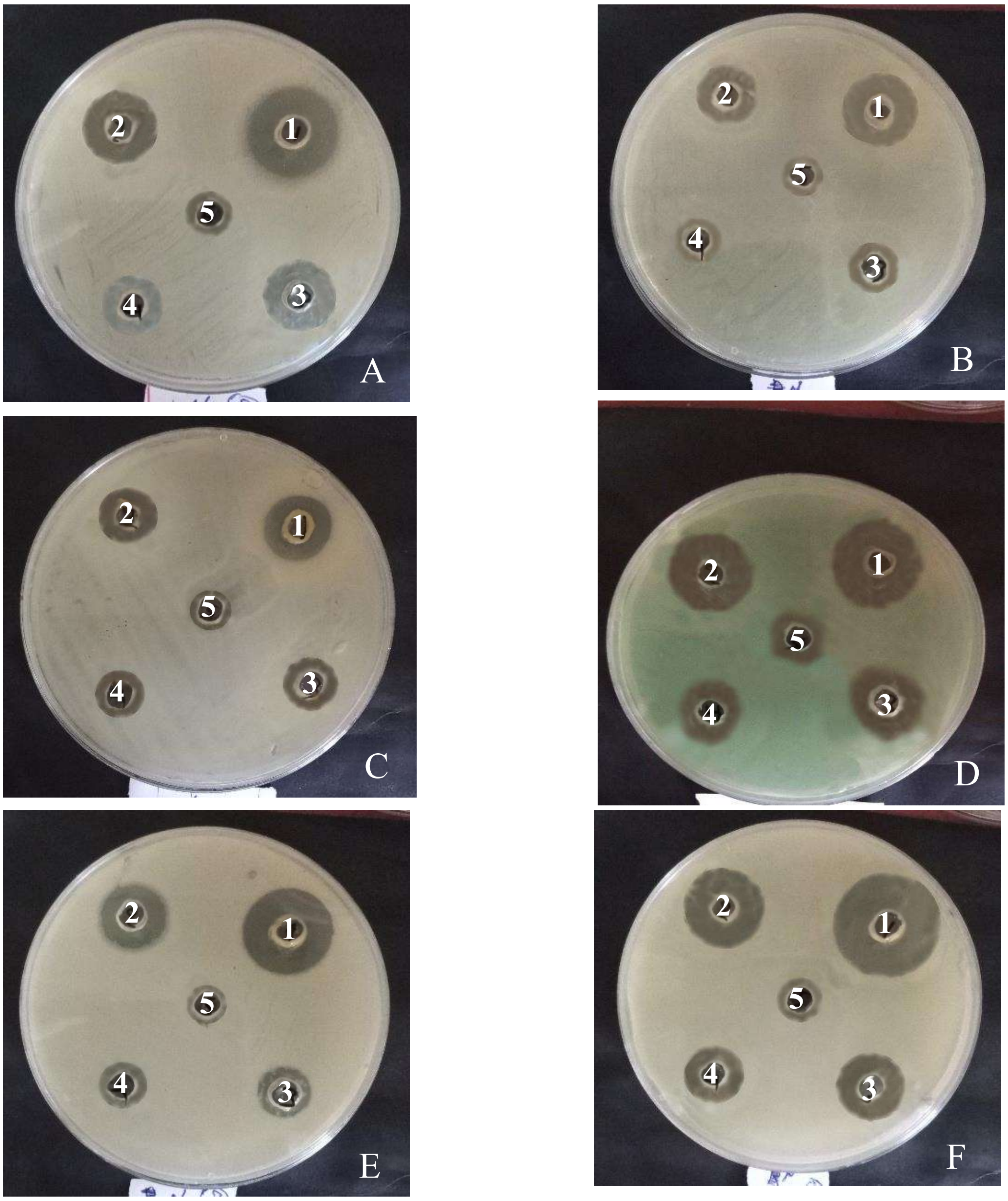
كما يظهر من الجدول (4-7) فإنَّ مستخلصات نبات النارنج المائية والكحولية أَظهرت تأثيرًا تثبيطياً واضحا على البكتيريا المعزولة في هذه الدراسة وقد لوحظ تفاوت في قطر دائرة التثبيط بين التثبيط العالي والتثبيط الضعيف.




**الصورة (4-4) تأثير المستخلص المائي لنبات النارنج وبتراكيز مختلفة على البكتريا قيد الدراسة**

A. *Sta. aureus*  B. *E. coli*  C. *K. pneumonia*
D. *Ps. aeruginosa*  E. *Pr. vulgaris*  F. *Pr. mirabilis*

التراكيز 1(200 ملغم/سم$^3$)، 2(100 ملغم/سم$^3$)، 3(50 ملغم/سم$^3$)، 4(25 ملغم/سم$^3$)، 5(12.5 ملغم/سم$^3$).




**الصورة (4-5) تأثير المستخلص الكحولي لنبات النارنج وبتراكيز مختلفة على البكتريا قيد الدراسة**

A. *Sta. aureus* B. *E. coli* C. *K. pneumonia*
D. *Ps. aeruginosa* E. *Pr. vulgaris* F. *Pr. mirabilis*

التراكيز 1(200 ملغم/سم$^3$)، 2(100 ملغم/سم$^3$)، 3(50 ملغم/سم$^3$)، 4(25 ملغم/سم$^3$)، 5(12.5 ملغم/سم$^3$).

وكما هو واضح من الصور والجدول المذكور اعلاه فقد أَظهرت بكتيريا *Sta. aureus* استجابة عالية للمستخلص الكحولي للنارنج ثم المستخلص المائي للنارنج؛ إذ أَعطى التركيز

(200 ملغم /سم$^3$) أكبر قطر تثبيطي لهذه البكتيريا الَّذي بلغ (24,23) ملم لكل من المستخلص المائي والكحولي للنارنج على التوالي. أمَّا بكتيريا *E. coli* فقد أعطت استجابة عالية تجاه المستخلص المائي للنارنج عند التركيز (200 ملغم /سم$^3$) أكبر مما أعطاه المستخلص الكحولي للنارنج عند هذا التركيز بينما أخفق المستخلص المائي للنارنج في التثبيط عند كلا من التراكيز 12.5 و25 و50 ملغم /سم$^3$ وكما في الصورة (B4- 4,5).

وأَظهر المستخلص المائي للنارنج تأثيرًا تثبيطياً أَعلى من المستخلص الكحولي للنارنج على النوع البكتيري *K. pneumonia* حيث كان قطر التثبيط 20 ملم عند التركيز 200 ملغم /سم$^3$ وكما في الصورة (C4- 4,5). وأَعطى المستخلص الكحولي للنارنج تأثيرًا أَعلى من المستخلص المائي على النوع البكتيري *Ps. aeruginosa* إذ بلغ قطر التثبيط لمستخلص الكحولي عند التركيز (200 ملغم /سم$^3$) 26 ملم وكما في الصورة (D4- 4,5).

أَمَّا النوع البكتيري *Pr. mirabilis* فقد أَعطى استجابة تجاه المستخلص المائي للنارنج أَعلى من استجابته للمستخلص الكحولي للنارنج اذ أَعطى عند التركيز (200 ملغم /سم$^3$) للمستخلص المائي للنارنج استجابة بلغت 24 ملم وكما في الصورة (F4- 4,5). وأَظهر النوع البكتيري *Pr. vulgaris* استجابة عالية تجاه المستخلص الكحولي للنارنج بلغت 23 ملم عند التركيز (200 ملغم /سم$^3$) بينما بلغت الاستجابة تجاه المستخلص المائي 21 ملم عند التركيز نفسه وكما في الصورة (E4- 4,5).

وأَخيرًا وكما هو واضح فإنَّ أَعلى تثبيط لجميع الأَنواع البكتيرية قيد الدراسة ولكلا المستخلصين المائي والكحولي كان عند أَعلى تركيز وهو (200 ملغم /سم$^3$). من أَجل مناقشة النتائج التي ظهرت في الجدولين (4-8,7)

**نبات الرمان** ***Punica granatum L.***

ربَّما تعود معظم التأثيرات العلاجية لفاكهة الرمان إلى نواتج الأَيض الثانوية والأولية، مثل الادراريفينول، بما في ذلك مركبات الفلافونويد والأنثوسينين القابلة للتحلل المائي والأحماض الدهنية والدهون (Tian; 2017). هذه المركبات لها فعَّالية كبيرة في تثبيط البكتيريا؛ إذ قد تعمل على منع تكوين الجدار الخلوي اوقد تقوم بتغيير وظائف اغشية الخلايا الحية كما تقوم بمنع التخليق الحيوي للعديد من البروتينات الأساسية في الخلية الحية وقد تقوم بتفتيت الحامض النووي منقوص الاوكسجين DNA كما قد تعود فعَّالية مستخلصات ثمار الرمان في التثبيط

لاحتوائها على الكثير من المضادات والمواد الفعَّالة المانعة للتأكسد (Viuda-Martos *et al.*, 2010).

قد تعود القابلية التثبيطية للمستخلص الكحولي والمائي للرمان إِلى القابلية على إذابة العديد من المركبات المتواجدة في الرمان منها PolypHenoles وAlkaloid وFlavonoid (Cowan, 1999).

وكما هو ملاحظ من الجدول (4-7) أَنَّ التراكيز العالية تكون أَكثر تأثيرًا في تثبيط البكتيريا؛ وبالتالي زيادة قطر التثبيط وقد يرجع السبب إِلى زيادة تراكيز المواد المثبطة.

توافقت نتائجنا مع ما جاء في (Voravuthikunchai *et al.*, 2004) الذي وجد أَنَّ المستخلص المائي والكحولي للرمان هما الاكفأ في تثبيط بكتيريا *E. coli*. كما توافقت مع ما جاء في (Pradeep *et al.*, 2008). الذي بين أَنَّ المستخلص الكحولي لثمار نبات الرمان كان أَكثر فعَّالية ضد عدة أَنواع بكتيرية منها *E. coli* و*Sta. aureus* و*Ps. aeruginosa* من المستخلص الخام والمستخلص الأسيتوني.

كما اتفقت نتائجنا أَيضًا مع ما جاء في (الحمندو، 2010). الَّتي أَشارت إِلى التباين في الفعَّالية التثبيطية لمستخلصات الرمان المائية والكحولية على عدد من الأَنواع البكتيرية منها *E. coli* و *S. aureus* و*Ps. aeruginosa*.

### نبات النارنج *Citrus aurentium*

تُعدُّ المستخلصات الكحولية لثمار النارنج أَكثر فعَّالية في تثبيط البكتيريا وذلك لان نسبة عالية من المواد الفعَّالة لها القابلة على الذوبان في المذيبات العضوية الَّتي لديها القدرة على تثبيط نمو الميكروبات من خلال اختراق الجدار الخلوي، أو من خلال تأثيرها على الأجزاء الحيوية للخلية مثل الرايبوسومات، السايتوبلازم، DNA وأجزاء أُخرى (Dulaimi, 2006). كما ان المستخلص الكحولي للنارنج يحتوي على الفلافونويد الذي يؤدِّي دورًا مهما في تثبيط الكائنات الحية الدقيقة من خلال قدرتها على تكوين معقد مع جدار الخلية البكتيرية وكذلك قدرتها على تمزيق الغشاء الحيوي (Al- Abdallah, 2016) وتأثيرها في العمليات الحيوية مثل قدرتها على انشاء روابط هيدروجينية مع البروتينات مما يتسبب بتدمير عملية بناء البروتين في الخلية البكتيرية الَّذي يؤثر بدوره على نمو وتكاثر البكتيريا من خلال التأثير على المادة الوراثية لهذه البكتيريا (Thabit, 2018).

توافقت نتائجنا مع ما أشار اليه (Tortora, 2016). في ان التراكيز الأَعلى سواءً للمستخلصات المائية او الكحولية تكون أَكثر فعَّالية في تثبيط نمو البكتيريا من التراكيز الأَقل تركيزًا اذ تنخفض القابلية على التثبيط تدريجيًا مع انخفاض التركيز. كما توافقت نتائجنا مع ما جاء في دراسة (Jassim and Hassan, 2019). من حيث اثباتها لتأثير المستخلصات المائية والكحولية لنبات النارنج على بعض الأَنواع البكتيرية منها *Sta. aureus* و *K. pneumonia* و *Streptococcus* spp..

### 4-4 تقدير التركيز المثبط الأدنى

### Estimation of Minimum Inhibitory Concentration

بحسب ما جاء في الفقرة (3-10) من فصل المواد وطرائق العمل قُدِّر التركيز المثبط الأدنى (MIC) للمستخلصات المائية والكحولية لنباتي النارنج والرمان اللذان أَظهرا تأثيرًا تثبيطيا على الأَنواع البكتيرية قيد الدراسة وكما هو موضح في الجدول (4-8).

**الجدول (4-8): يوضح قيم التراكيز المثبطة الدنيا MIC لمستخلصات ثمار الرمان والنارنج في الأَنواع البكتيرية قيد الدراسة مقدرا بـ (ملغم / سم$^3$)**

| نوع المستخلص | *S. aureus* | *E. coli* | *K. pneumonia* | *Pr. vulgaris* | *Pr. mirabilis* | *Ps. aeruginosa* |
|---|---|---|---|---|---|---|
| المستخلص المائي للرمان | 0.125 | 0.25 | 0.125 | 0.125 | 0.5 | 0.125 |
| المستخلص الكحولي للرمان | 0.125 | 1 | 0.125 | 0.125 | 0.125 | 0.125 |
| المستخلص المائي للنارنج | 0.125 | 1 | 0.125 | 0.5 | 0.125 | 0.125 |
| المستخلص الكحولي للنارنج | 0.125 | 0.125 | 0.125 | 0.125 | 0.125 | 0.125 |

وقد أَظهرت نتائج الجدول (4-8) ما يلي:

#### 1-4-4 المستخلصات المائية والكحولية لثمار الرمان

#### Aqueous and Alcoholic Extracts of *Punica granatum L.* Fruits

قيمة التركيز المثبط الأدنى للمستخلص المائي لثمار الرمان كانت في كل من بكتيريا *S. aureus* و *K. pneumonia* و *Pr. vulgaris* و *Ps. aeruginosa* مساوية لـ (0.125 ملغم / سم$^3$ ) اما في النوع البكتيري *E.coli* فقد كانت مساوية ل(0.25 ملغم / سم$^3$) بينما كانت قيمة التركيز المثبط الأدنى في النوع البكتيري *Pr. mirabilis* مساوية ل (0.5 ملغم / سم$^3$) .

اما بالنسبة لقيمة التركيز المثبط الأدنى للمستخلص الكحولي لثمار الرمان فقد كانت (0.125 ملغم / سم$^3$) في الأنواع البكتيرية *S. aureus* و *Pr. Vulgaris* و *Ps. aeruginosa* و *K. pneumonia* و *Pr. mirabilis* اما في النوع البكتيري *E.coli* فكانت مساوية ل (1 ملغم / سم$^3$).

**2-4-4 المستخلصات المائية والكحولية لثمار النارنج**

**Aqueous and Alcoholic Extracts of *Citrus aurantium***

قيمة التركيز المثبط الادنى للمستخلص المائي لثمار النارنج كانت في كل من بكتيريا S. aureus و *K. pneumonia* و *Ps. aeruginosa* و *Pr. Mirabilis* مساوية ل (0.125 ملغم / سم$^3$) أمّا في النوع البكتيري *E. coli* فقد كانت مساوية لـ (1 ملغم / سم$^3$) وفي النوع البكتيري *Pr. vulgaris* كانت مساوية لـ (0.5 ملغم / سم$^3$) أمّا بالنسبة لقيمة التركيز المثبط الأدنى للمستخلص الكحولي للنارنج فقد كانت (0.125 ملغم / سم$^3$) في جميع الأنواع البكتيرية قيد الدراسة.

## 5-4 التحري عن تأثير المستخلصات المائية والكحولية لنباتي الرمان والنارنج على المستوى الجزيئي في البكتيريا قيد الدراسة

## Investigation of the Effect of Aqueous and Alcoholic Extracts of *Punica granatum L.* and *Citrus aurantium* at the Molecular Level on the Bacterial Species Under Study

جرت دراسة هذا التأثير من عدة جوانب:

- التحييد الـ DNA البلازميدي للأنواع البكتيرية قيد الدراسة.
- قياس التركيز ودرجة النقاوة ل DNA البلازميدي للبكتيريا قيد الدراسة.

**1-5-4 تحييد محتوى ال DNA البلازميدي للأنواع البكتيرية المعزولة باستعمال المستخلصات المائية والكحولية لنباتي الرمان والنارنج**

**Neutralization of Plasmid DNA Content of Isolated Bacterial Species Using Aqueous and Alcoholic Extracts *Punica granatum L.* and *Citrus aurantium.***

بحسب ما جاء في الفقرة (3-11) في فصل المواد وطرائق العمل جرى عملية تحييد محتوى الـ DNA البلازميدي للأنواع البكتيرية قيد الدراسة و كما هو موضح في الجداول التالية.

### 4-5-1-1 التحييد عن طريق استخدام المستخلص المائي والكحولي لنبات الرمان

### Neutralization by Using Aqueous and Alcoholic Extract of the *Punica granatum L.* Plant

**الجدول (4-9): يوضح إزالة مقاومة المضادات الحيوية من الأَنواع البكتيرية قيد الدراسة باستخدام المستخلص المائي للرمان**

| المضادات الحيوية المضافة إلى الوسط (ميكروجرام / مل) | | | | | | | | | | البكتريا |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Nal 30** | **Tri 10** | **TE 15** | **Cf 25** | **RA 50** | **Gn 25** | **Ery 15** | **Sm 25** | **Am 50** | **AX 50** | |
| R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | ***StapH. aureus*** **عينة السيطرة** |
| S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | ***StapH. aureus*** **التحييد بالمستخلص المائي** |
| S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | ***StapH. aureus*** **التحييد بالمستخلص الكحولي** |
| R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | ***E. coli*** **عينة السيطرة** |
| S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | ***E. coli*** **التحييد بالمستخلص المائي** |
| R | S | R | R | S | S | S | S | S | R | ***E. coli*** **التحييد بالمستخلص الكحولي** |
| R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | ***Klebsiella. pneumonia*** **عينة السيطرة** |
| S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | ***Klebsiella. pneumonia*** **التحييد بالمستخلص المائي** |
| R | R | R | R | S | S | S | S | S | W | ***Klebsiella. pneumonia*** **التحييد بالمستخلص الكحولي** |
| S | R | S | S | S | S | S | S | R | R | ***P. mirabilis*** **عينة السيطرة** |
| --- | S | --- | --- | --- | --- | --- | --- | S | S | ***Proteus. mirabilis*** **التحييد بالمستخلص المائي** |
| --- | S | --- | --- | --- | --- | --- | S | S | S | ***Proteus. mirabilis*** **التحييد بالمستخلص الكحولي** |
| S | R | S | S | S | S | S | R | R | R | ***P. vulgaris*** **عينة السيطرة** |
| --- | R | --- | --- | --- | --- | --- | S | S | S | ***Proteus. vulgaris*** **التحييد بالمستخلص المائي** |

| | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| --- | S | --- | --- | --- | --- | --- | S | S | R | ***Proteus. vulgaris*** **التحييد بالمستخلص الكحولي** |
| R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | ***Ps. aeruginosa*** **عينة السيطرة** |
| S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | ***Ps. aeruginosa*** **التحييد بالمستخلص المائي** |
| w | R | R | S | S | S | S | R | R | R | ***Ps. aeruginosa*** **التحييد بالمستخلص الكحولي** |

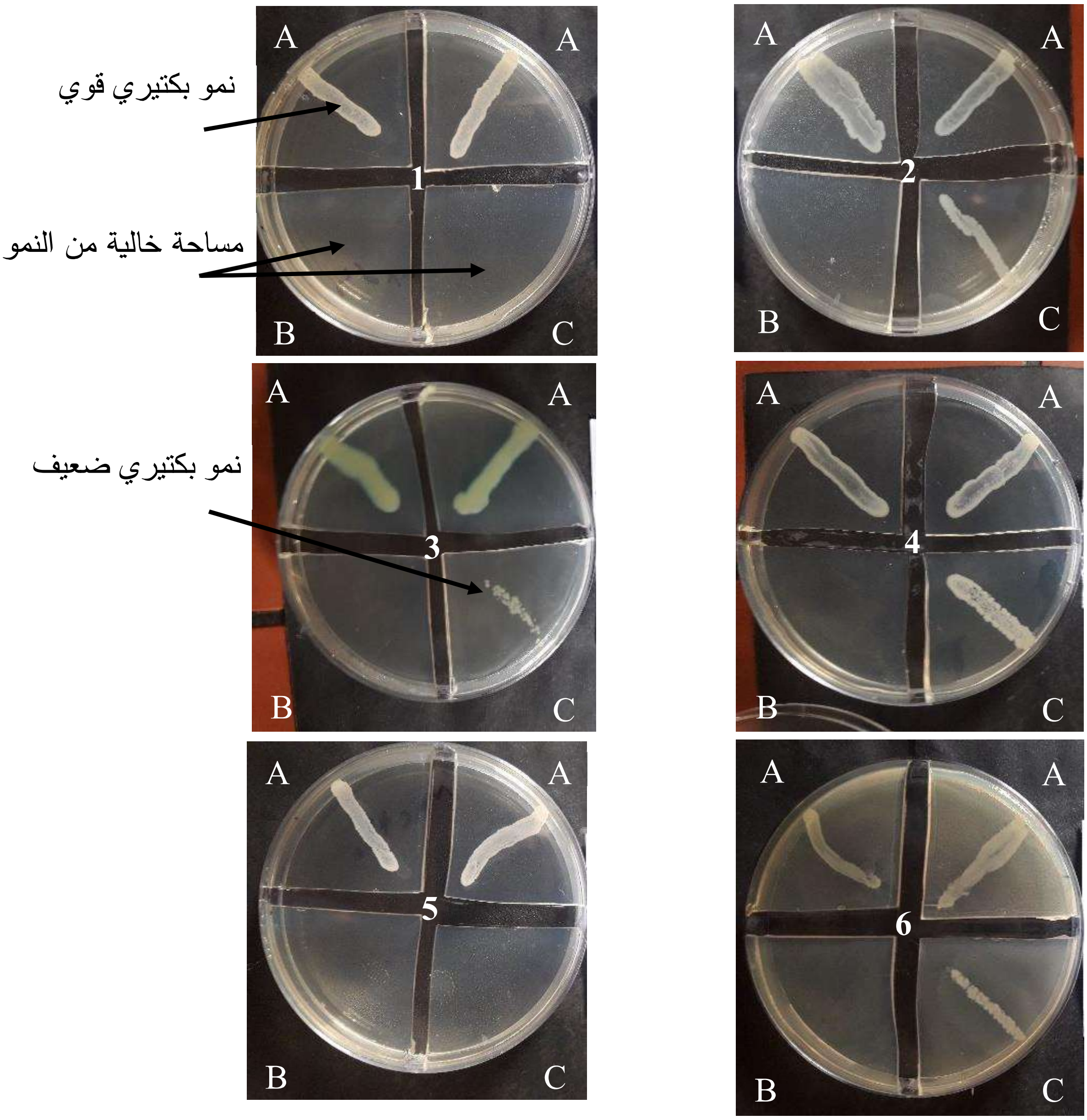
W: Weak ---: The test not done R: Resistance S: sensitive

أظهر النوع البكتيري *Sta. aureus* تفوقا هائلا في إزالة المقاومة عند معاملتها بالمستخلصين المائي والكحولي لثمار الرمان اذ ازيلت مقاومتها لجميع المضادات الحيوية اذ ان العزلة التابعة لهذا النوع والتي اجري عليها الاختبار كانت مقاومة لجميع المضادات قيد الدراسة. اما النوع البكتيري *E. coli* فقد اعطى استجابة عالية تجاه المستخلص المائي للرمان اذ نجح المستخلص في إزالة مقاومة هذا النوع البكتيري لجميع المضادات الحيوية بينما أعطت *E. coli* استجابة كبيرة للمستخلص الكحولي للرمان ولكن بشكل اقل مما أعطاه للمستخلص المائي اذ استطاع المستخلص الكحولي ان يزيل المقاومة لكل من المضادات ( Tri, RA, Sm, Ery, Am, GN) بينما لم ينجح في إزالة المقاومة للمضادات الحيوية (Ax, TE, Nal, Cf).

اعطى النوع البكتيري *K. pneumonia* أيضا استجابة كبيرة جدا للمستخلص المائي للرمان اذ استطاع المستخلص ازالة مقاومة هذه البكتريا لجميع المضادات الحيوية بعد ان كانت مقاومة لجميع المضادات بينما كانت استجابة هذا النوع البكتيري للمستخلص الكحولي للرمان عالية ولكن بشكل اقل مما أعطاه للمستخلص المائي اذ استطاع المستخلص الكحولي ان يزيل المقاومة لكل من المضادات (RA, Sm, Ery, Am, GN) واضعاف المقاومة للمضاد (Ax) بينما لم ينجح في إزالة المقاومة للمضادات الحيوية (Tri,TE, Nal, Cf).

أعطى النوع البكتيري *Pr. vulgaris* استجابة جيدة للمستخلص المائي للرمان اذ نجح المستخلص المائي في إزالة المقاومة للمضادات الحيوية (Am, Ax, Sm) بينما لم ينجح المستخلص المائي في إزالة المقاومة للمضاد (Tri) اما المستخلص الكحولي فقد نجح في إزالة المقاومة للمضادات (Am, Tri, Sm) ولم ينجح في إزالة المقاومة للمضاد الحيوي (Ax). اما النوع البكتيري *Pr. mirabilis* فقد نجح المستخلصان المائي والكحولي للرمان في إزالة مقاومة هذا النوع لكل من المضادات (Ax, Tri, Am). اعطى النوع البكتيري *Ps. aeruginosa* استجابة عالية تجاه المستخلص المائي للرمان حيث ازيلت مقاومة هذه البكتريا لجميع

المضادات بينما ابدى هذا النوع استجابة متوسطة تجاه المستخلص الكحولي للرمان اذ نجح المستخلص الكحولي في إزالة مقاومة هذا النوع لكل من المضادات (RA, Ery, Cf, GN) واضعاف المقاومة للمضاد (Nal) بينما لم ينجح في إزالة المقاومة لكل من المضادات (Ax, TE, Tri, Sm, Am).



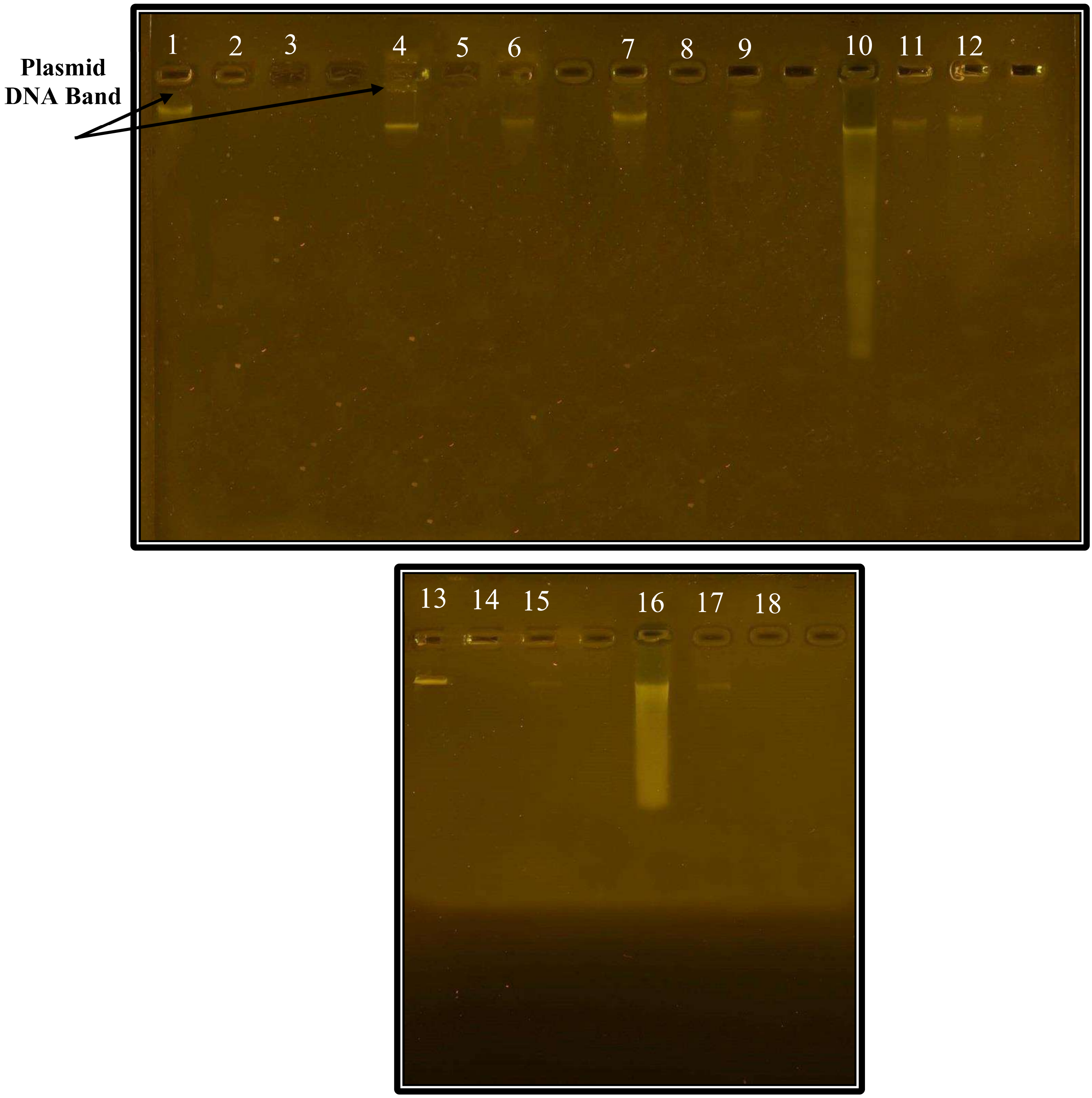

**الصورة (4-6) تأثير المستخلص المائي والكحولي لثمار الرمان *Punica granatum L* على البكتيريا المنمات على أوساط المضادات الحيوية.**

(A) قبل إضافة المستخلص لثمار الرمان.

(B) بعد إضافة المستخلص المائي الرمان.

(C) بعد إضافة المستخلص الكحولي الرمان.

1. *StapH. aureus* على Cf
2. *E. coli* على Cf
3. *Ps. aeruginosa* على Nal
4. *Kleb. pneumonia* على Cf
5. *StapH. aureus* على Tr
6. *Kleb. pneumonia* على Ax




**الشكل (1-4) الترحيل الكهربائي لمحتوى الـ DNA البلازميدي للأنواع البكتيرية قيد الدراسة قبل وبعد التحييد بالمستخلصات المائية والكحولية لنبات الرمان**

***Punica granatum* L of water and alcohol extracts**

1. بكتريا *S. aureus* قبل التحييد بمستخلصات ثمار الرمان.
2. بكتريا *S. aureus* بعد التحييد بالمستخلص المائي للرمان.
3. بكتريا *S. aureus* بعد التحييد بالمستخلص الكحولي للرمان.
4. بكتريا *E. coli* قبل التحييد بمستخلصات ثمار الرمان.
5. بكتريا *E. coli* بعد التحييد بالمستخلص المائي للرمان.
6. بكتريا *E. coli* بعد التحييد بالمستخلص الكحولي للرمان.
7. بكتريا *K. pneumonia* قبل التحييد بمستخلصات ثمار الرمان.
8. بكتريا *K. pneumonia* بعد التحييد بالمستخلص المائي للرمان.
9. بكتريا *K. pneumonia* بعد التحييد بالمستخلص الكحولي للرمان.
10. بكتريا *Ps. aeruginosa* قبل التحييد بمستخلصات ثمار الرمان.
11. بكتريا P*s. aeruginosa* بعد التحييد بالمستخلص المائي للرمان.
12. بكتريا *Ps. aeruginosa* بعد التحييد بالمستخلص الكحولي للرمان.
13. بكتريا *Pr. vulgaris* قبل التحييد بمستخلصات ثمار الرمان.
14. بكتريا *Pr. vulgaris* بعد التحييد بالمستخلص المائي للرمان.
15. بكتريا *Pr. vulgaris* بعد التحييد بالمستخلص الكحولي للرمان.
16. بكتريا *Pr. mirabilis* قبل التحييد بمستخلصات ثمار الرمان.
17. بكتريا *Pr. mirabilis* بعد التحييد بالمستخلص الكحولي للرمان.
18. بكتريا *Pr. mirabilis* بعد التحييد بالمستخلص المائي للرمان.

### 2-1-5-4 التحييد باستعمال المستخلص المائي والكحولي لنبات النارنج

### Neutralization with Aqueous and Alcoholic Extract of *Citrus aurantium*

**الجدول (4-10): يوضح إزالة مقاومة المضادات الحيوية من الأَنواع البكتيرية قيد الدراسة باستعمال المستخلص المائي والكحولي للنارنج**

| البكتريا | المضادات الحيوية المضافة إلى الوسط (ميكروجرام / مل) | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | AX 50 | Am 50 | Sm 25 | Ery 15 | Gn 25 | RA 50 | Cf 25 | TE 15 | Tri 10 | Nal 30 |
| ***StapH. aureus*** **عينة السيطرة** | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R |
| ***StapH. Aureus*** **التحييد بالمستخلص المائي** | R | S | S | R | S | R | R | R | R | R |

| | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | ***StapH. Aureus*** **التحييد بالمستخلص الكحولي** |
| R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | **عينة السيطرة *E. coli*** |
| R | R | R | R | S | R | w | W | R | R | ***E. coli*** **التحييد بالمستخلص المائي** |
| R | S | R | R | S | S | w | S | R | R | ***E. coli*** **التحييد بالمستخلص الكحولي** |
| R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | ***Klebsiella. pneumonia*** **عينة السيطرة** |
| R | R | R | R | S | S | R | S | R | R | ***Klebsiella. pneumonia*** **التحييد بالمستخلص المائي** |
| S | R | S | S | S | S | S | S | S | S | ***Klebsiella. pneumonia*** **التحييد بالمستخلص الكحولي** |
| S | R | S | S | S | S | S | S | R | R | **عينة السيطرة *P. mirabilis*** |
| --- | R | --- | --- | --- | --- | --- | --- | S | S | ***Proteus. mirabilis*** **التحييد بالمستخلص المائي** |
| --- | S | --- | --- | --- | --- | --- | S | S | S | ***Proteus. mirabilis*** **التحييد بالمستخلص الكحولي** |
| S | R | S | S | S | S | S | R | R | R | **عينة السيطرة *P. vulgaris*** |
| --- | R | --- | --- | --- | --- | --- | S | S | R | ***Proteus. vulgaris*** **التحييد بالمستخلص المائي** |
| --- | S | --- | --- | --- | --- | --- | S | S | S | ***Proteus. vulgaris*** **التحييد بالمستخلص الكحولي** |
| R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | **عينة السيطرة *Ps. aeruginosa*** |
| w | S | R | R | S | R | R | S | R | S | ***Ps. aeruginosa*** **التحييد بالمستخلص المائي** |
| w | S | S | w | S | S | S | S | S | S | ***Ps. aeruginosa*** **التحييد بالمستخلص الكحولي** |

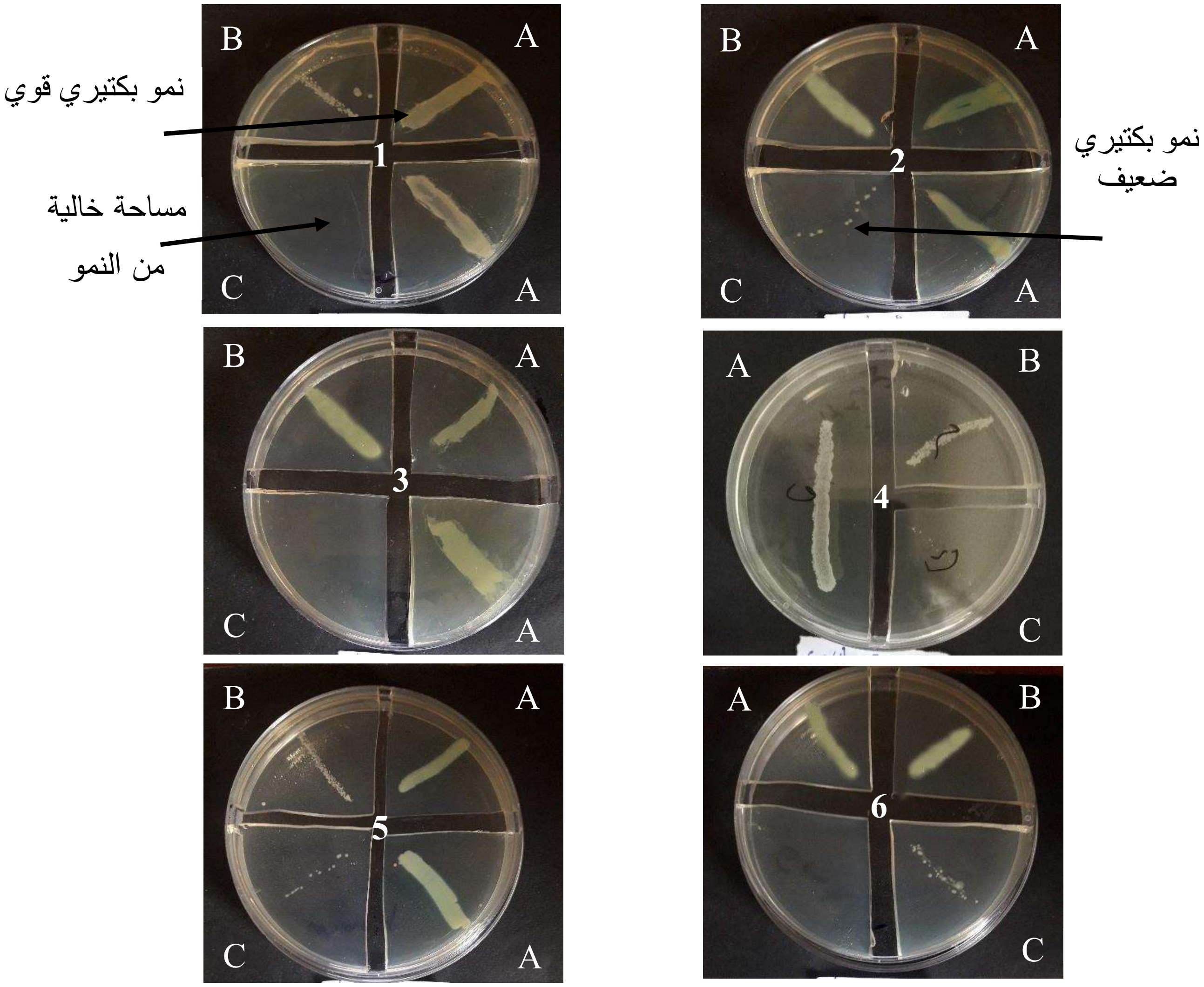
R: Resistance    S: sensitive    W: Weak    ---: The test not done

أَظهر النوع البكتيري *S. aureus* تفوقا هائلا في إزالة المقاومة عند معاملتها بالمستخلص الكحولي لثمار النارنج اذ ازيلت مقاومة هذه البكتريا لجميع المضادات بعد أَن كانت مقاومة لجميع المضادات قيد الدراسة بينما كان المستخلص المائي أَقل كفاءة في إزالة مقاومة هذه البكتريا للمضادات اذ نجح في إزالة مقاومة المضادات (Sm, Am, GN) ولم ينجح في إزالة مقاومة هذه البكتريا للمضادات (Ax, TE, Tr, RA, Ery, Nal, Cf).

أَمَّا النوع البكتيري *E.coli* فقد أَعطى استجابة متوسطة تجاه المستخلص الكحولي للنارنج اذ نجح المستخلص في إزالة مقاومة هذه البكتريا للمضادات ( Tri, RA, Sm, GN, ) واضعاف المقاومة للمضاد الحيوي (Ery) بينما لم ينجح المستخلص الكحولي في إزالة مقاومة البكتريا للمضادات ( Ax, TE, Am, Nal, Cf, ) كما أعطت *E.coli* استجابة ضعيفة للمستخلص المائي للنارنج اذ استطاع المستخلص المائي ان يزيل المقاومة للمضاد (RA) فقط كما اضعف المقاومة للمضادين ( Ery, Sm) بينما لم ينجح المستخلص المائي في إزالة المقاومة للمضادات ( Ax, TE, Tr, Am, Nal, GN, Cf ).

أَعطى النوع البكتيري *K. pneumonia* أَيضًا استجابة كبيرة جدا للمستخلص الكحولي للنارنج اذ استطاع المستخلص الكحولي إزالة مقاومة هذه البكتريا لجميع المضادات الحيوية عدا المضاد (Tri) بعد أَن كانت العزلة مقاومة لجميع المضادات بينما كانت استجابة هذا النوع البكتيري للمستخلص المائي للنارنج متوسطة اذ تمكن المستخلص المائي من إِزالة المقاومة لكل من المضادات (RA, Sm, GN) بينما لم ينجح في إزالة المقاومة للمضادات ( Tr, Ax, TE, Nal, Cf, Ery, Am,).

وأَعطى النوع البكتيري *Pr. vulgaris* استجابة عالية للمستخلص الكحولي للنارنج اذ نجح المستخلص الكحولي في إِزالة المقاومة للمضادات الحيوية (Am, Ax, Sm, Tri) أَمَّا المستخلص المائي فقد نجح في إِزالة مقاومة هذه البكتريا للمضادين (Am, Sm) ولم ينجح في إِزالة المقاومة للمضادين (Ax, Tri). أَمَّا النوع البكتيري *Pr. mirabilis* فقد نجح المستخلص الكحولي في إِزالة مقاومة هذه البكتريا لجميع المضادات التي كان مقاوما لها ,الَّتي تشمل ( Ax, Sm, Am, Tri) بينما استطاع المستخلص المائي أَن يزيل المقاومة للمضادين (Am, Ax) فقط. وأَعطى النوع البكتيري *Ps. aeruginosa* استجابة عالية تجاه المستخلص الكحولي للنارنج اذ استطاع المستخلص الكحولي إزالة مقاومة هذه البكتريا لجميع المضادات بشكل كامل باستثناء المضادين (Nal, Cf) اللذان ضعفت مقاومتهما وذلك بعد أَن كان هذا النوع مقاوما لجميع المضادات بينما ابدى هذا النوع استجابة متوسطة تجاه المستخلص المائي للنارنج اذ نجح المستخلص المائي في إِزالة المقاومة بشكل كامل لكل من المضادات (RA, Ax, Tri, Sm) بينما ضعفت مقاومة المضاد (Nal) ولم ينجح المستخلص المائي في إِزالة المقاومة لكل من المضادات (TE, Ery, Am, GN, Cf)



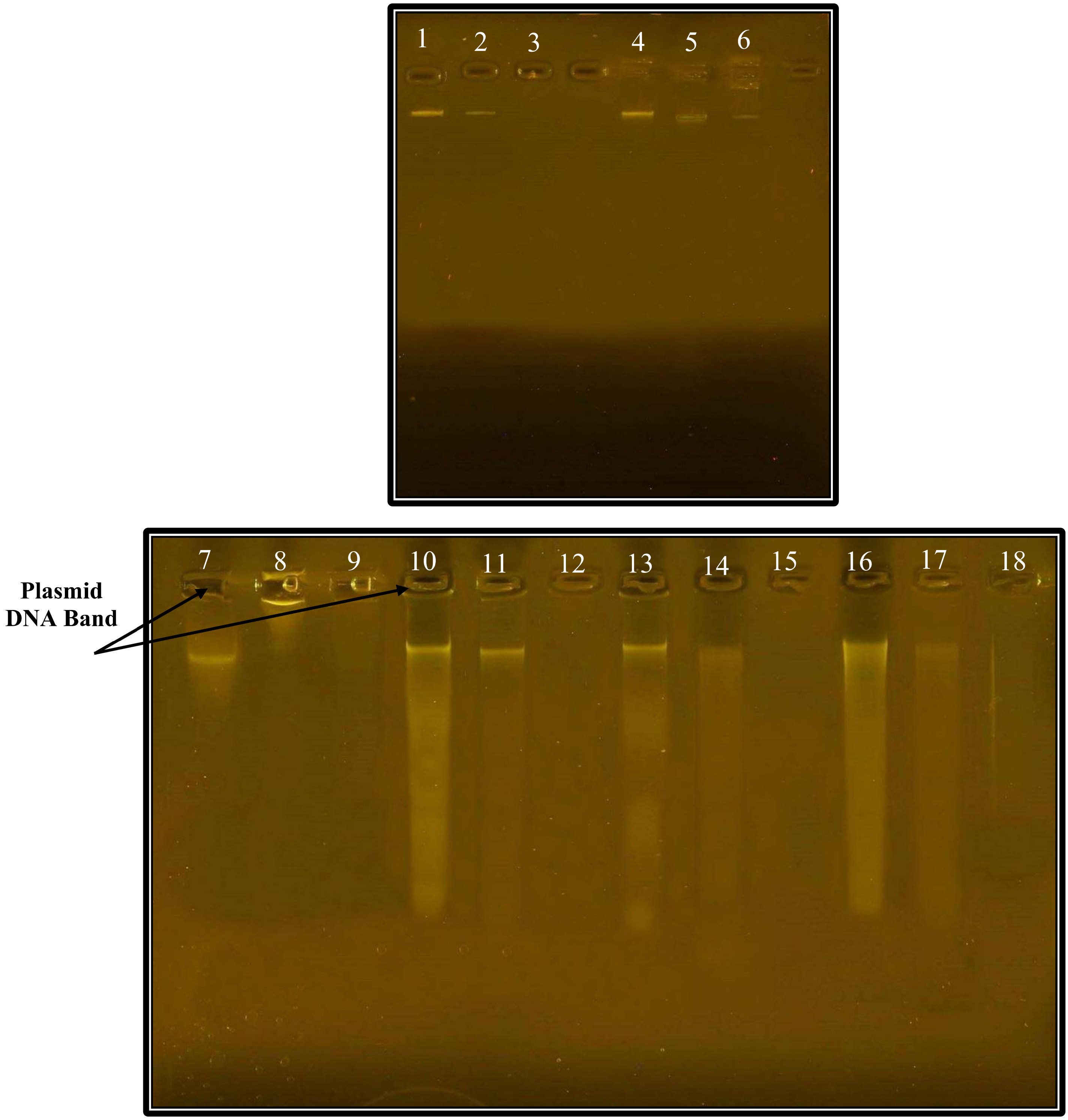

**الصورة (4-7) تأثير المستخلص المائي والكحولي لثمار النارنج *Citrus aurantium* على البكتيريا المُنمات على أَوساط المضادات الحيوية.**

(A) قبل إضافة المستخلص لثمار النارنج.

(B) بعد إضافة المستخلص المائي للنارنج.

(C) بعد إضافة المستخلص الكحولي للنارنج.

1. *E. coli* على Sm.
2. *Pseudo. aeruginosa* على Cf.
3. *Pseudo. aeruginosa* على TE.
4. *StapH. aureus* على Ery.
5. Pse*udo. Aeruginosa* على Nal.
6. *Kleb. pneumonia* على Ery.




**الشكل (4-2) الترحيل الكهربائي لمحتوى الـ DNA البلازميدي للأنواع البكتيرية قيد الدراسة قبل وبعد التحييد بالمستخلصات المائية والكحولية لنبات النارنج**

***Citrus aurantium* of water and alcohol extracts**

1. بكتريا *S.aureus* قبل التحييد بمستخلصات ثمار النارنج.
2. بكتريا *S.aureus* بعد التحييد بالمستخلص المائي للنارنج.

3. بكتريا *S.aureus* بعد التحييد بالمستخلص الكحولي للنارنج.
4. بكتريا *E.coli* قبل التحييد بمستخلصات ثمار النارنج.
5. بكتريا *E.coli* بعد التحييد بالمستخلص المائي للنارنج.
6. بكتريا *E.coli* بعد التحييد بالمستخلص الكحولي للنارنج.
7. بكتريا *K.pneumonia* قبل التحييد بمستخلصات ثمار النارنج.
8. بكتريا *K.pneumonia* بعد التحييد بالمستخلص المائي للنارنج.
9. بكتريا *K.pneumonia* بعد التحييد بالمستخلص الكحولي للنارنج.
10. بكتريا *Ps.aeruginosa* قبل التحييد بمستخلصات ثمار النارنج.
11. بكتريا *Ps.aeruginosa* بعد التحييد بالمستخلص المائي للنارنج.
12. بكتريا *Ps.aeruginosa* بعد التحييد بالمستخلص الكحولي للنارنج.
13. بكتريا *Pr.vulgaris* قبل التحييد بمستخلصات ثمار النارنج.
14. بكتريا *Pr.vulgaris* بعد التحييد بالمستخلص المائي للنارنج.
15. بكتريا *Pr.vulgaris* بعد التحييد بالمستخلص الكحولي للنارنج.
16. بكتريا *Pr.mirabilis* قبل التحييد بمستخلصات ثمار النارنج.
17. بكتريا *Pr.mirabilis* بعد التحييد بالمستخلص المائي للنارنج.
18. بكتريا *Pr.mirabilis* بعد التحييد بالمستخلص الكحولي للنارنج.

من خلال نتائج الجداول (4-9) (4-10) يمكن ملاحظة ان العديد من الأَنواع البكتيرية قيد الدراسة قد بقيت مقاومة لعدد من المضادات الحيوية منها (TE, Tri) بعد التحييد وقد يشير ذلك إلى أَنَّ الجين الذي له علاقة بمقاومة هذه المضادات يقع على الكروموسوم البكتيري ولم يتأثر بهذه العملية. أَمَّا التقارب الذي حصل من حيث إِزالة مقاومة الأَنواع البكتيرية لبعض المضادات الحيوية مثلا النوع البكتيري *S. aureus* فقد ازيلت مقاومته لكافة المضادات الحيوية التي استخدمت للدراسة بعد أَن كان مقاوماً لها جميعها وذلك عند استعمال المستخلص المائي للرمان وكذلك النوع البكتيري *Ps. aeruginosa* الذي ازيلت مقاومته لاغلب المضادات الحيوية بعد أَن كان مقاوما لجميعها وذلك عند استخدام المستخلص الكحولي للنارنج وغيرها ربما يعود إِلى كون جينات المقاومة تقع على نفس جزيئة البلازميد. أَو لأَنَّ البلازميد المسؤول عن حمل المقاومة للمضادات هو R-plasmid والَّذي يتكون من جزيئتين وعلى كل جزيئة مورثات مسؤولة عن مقاومة المضادات الحيوية.

بينت نتائج عملية التحييد أَنَّ الأَنواع البكتيرية *Sta. aureus* و *K. pneumonia* و *Ps. aeruginosa* كانت أَكثر الأَنواع البكتيرية قيد الدراسة تأثرًا باختبار التحييد لكل من المستخلصات المائية والكحولية للرمان والنارنج بينما كانت الأَنواع البكتيرية *E. coli* و *Pr. vulgaris* و *Pr. mirabilis* هي الأُخرى متأثرة بعملية التحييد باستعمال المستخلصات المائية والكحولية للرمان والنارنج ولكن بدرجة أَقل من تأثر الأَنواع البكتيرية *S. aureus* و *K. pneumonia* و *Ps. aeruginosa* وقد يكون لما تحتويه هذه المستخلصات من مواد فعَّالة منها الفينولات والقلويدات والفلافونيدات وغيرها الَّتي لها دور في عمليات التحييد التي حصلت.

من خلال الجدول (4-10) يمكن ملاحظة أَن عملية التحييد باستخدام المستخلصات النباتية هي عملية فعَّالة في إِزالة مقاومة المضادات الحيوية من البكتيريا. إِذ إِنَّ عملية تحييد البلازميد تؤدي لتحويل الخلايا البكتيرية المقاومة للمضادات الحيوية إِلى خلايا حساسة (Molnar,1988). لذا فالتخلص من البلازميدات المقاومة يؤدي لجعل العلاج بالمضادات الحيوية أَكثر فاعلية. وهنالك حاجة كبيرة من أَجل اكتشاف طرائق جديدة لإِيقاف عملية مقاومة المضادات الحيوية، وان عملية تحييد البلازميد باستخدام المستخلصات النباتية يمكن ان تقلل من تكرار الجينات المقاومة للمضادات الحيوية وتحويل البكتريا من مقاومة إِلى بكتيريا حساسة (Michelle *et al*.,2018). تعود قابلية النباتات في تحييد البلازميدات لقدرتها على إِنتاج مواد نشطة بيولوجيًا متنوعة ذات قيمة علاجية كيميائية. وقد يكون سبب التباين الذي ظهر في نتائج عملية التحييد باستخدام المستخلصات له علاقة بالخلية البكتيرية نفسها من حيث تركيب جدارها وقابلية غشائها الخلوي على انفاذ المستخلصات المائية والكحولية إِلى داخل الخلية كما أَنَّ هناك أَسبابًا بيئية قد يكون لها علاقة بحصول التباين في نتائج عملية التحييد بالمستخلصات المائية والكحولية كالدالة الحامضية ودرجة التحضين (Ahmad *et al*.,2000). كما ان نوع المستخلص بالإِضافة الى درجة تركيزه وعدد النسخ بالنسبة للبلازميد قد يكون له دور مؤثر في حصول التباين الذي ظهر في نتائج عملية التحييد باستخدام المستخلصات المائية والكحولية (الخفاجي، 2008).

وكما هو واضح فإِنَّ المستخلصات المائية والكحولية لثمار الرمان والنارنج قد أبدت فاعلية مضادة للبلازميدات مما يشير إِلى أَنَّه باستطاعة هذه النباتات تحييد الجينات المقاومة للمضادات الَّتي تقع على البلازميدات.

توافقت نتائج هذه الدراسة مع ما جاء في دراسة (Patwardhan *et al*., 2015). والَّتي استخدم فيها مستخلصات جذور نباتات الأُذن الرصاصية Plumbago auriculat ومع الدراسة التي قام بها (Soman *et al*.,2015). والَّتي استخدم فيما عدد من النباتات الطبية ضد عدة أَنواع بكتيرية سالبة لصبغة كرام ومع دراسة (Akrayi and abdullrahman, 2013) الذي استطاع أَن يجد من خلال دراسته التي أَجراها الَّتي استخدم فيها نبات السماق Rhus coviaria ان لنبات السماق القابلية على التحييد لجينات المقاومة للمضادات الواقعة على البلازميدات من حيث أَنَّ بعض النباتات لها القدرة على تحييد البلازميدات المسؤولة عن مقاومة المضادات على الرغم من الاختلافات الحاصلة في نسب التحييد والَّذي قد يكون بسبب تركيز المستخلصات النباتية المستخدمة والاختلاف في طبيعة المواد الكيميائية الفعَّالة في كل نبات مستخدم.

## 2-5-4 قياس تركيز الحامض النووي DNA البلازميدي ودرجة النقاوة للأَنواع البكتيرية قيد الدراسة قبل وبعد إضافة المستخلصات النباتية

**Measuring the Concentration of Plasmid DNA and the Degree of Purity of the Bacterial Species Under Study Before and after Adding the Plant Extracts.**

جرى هذا الاختبار بحسب ما جاء في الفقرة (2–12–3) من فصل المواد وطرائق العمل وقد ظهرت النتائج كما في الجدول(11–4):

**جدول (4-11): يوضح تركيز ال DNA البلازميدي ودرجة النقاوة للأَنواع البكتيرية قيد الدراسة قبل وبعد إضافة المستخلصات المائية والكحولية لثمار الرمان والنارنج مقدرا بال ng/µl**

| البكتريا | التركيز قبل التحييد | درجة النقاوة | التركيز بعد التحييد ونوع المعاملة ودرجة النقاوة مقدراً بال ng/µl | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | مستخلص مائي رمان | درجة النقاوة | مستخلص كحولي رمان | درجة النقاوة | مستخلص مائي نارنج | درجة النقاوة | مستخلص كحولي نارنج | درجة النقاوة |
| *S.aureus* | 168.5 | 1.6 | 162.7 | 1.7 | 161.7 | 1.6 | 58.28 | 1.6 | 115.9 | 1.6 |
| *E. coli* | 893.6 | 1.8 | 212.0 | 1.7 | 531.8 | 1.6 | 889.6 | 1.9 | 143.5 | 2.0 |
| *K. pneumonia* | 1347.1 | 1.8 | 689.5 | 1.8 | 406.7 | 1.7 | 333.8 | 2.1 | 309.8 | 1.6 |

| | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1.6 | 151.3 | 1.8 | 1100.3 | 1.8 | 771.1 | 1.8 | 1005.1 | 1.9 | 1103.2 | *Ps. aeruginosa* |
| 1.7 | 248.7 | 1.7 | 330.1 | 1.9 | 320.2 | 1.7 | 189.8 | 1.7 | 334.2 | *Pr. vulgaris* |
| 1.8 | 447.7 | 1.9 | 549.8 | 1.8 | 544.4 | 1.7 | 399.2 | 1.8 | 558.6 | *Pr. mirabilis* |

كما هو واضح في الجدول (12-4) فإنَّ هناك تبايناً واضحا في تراكيز الاحماض النووية للأنواع البكتيرية قيد الدراسة. فقد أَعطى النوع البكتيري *K. pneumonia* أعلى تركيز للـ DNA البلازميدي الَّذي بلغ 1347.1وبدرجة نقاوة 1.8 تلاها النوع البكتيري *Ps. aeruginosa* الَّذي أَعطى 1103.2 وبدرجة نقاوة 1.9 ومن ثم النوع البكتيري *E. coli* الَّذي أَعطى 893.6 وبدرجة نقاوة 1.8 أَمَّا النوع البكتيري *Pr. mirabilis* فقد أَعطى 558.6 وبدرجة نقاوة 1.8 وقد أَعطى النوع البكتيري *Pr. Vulgaris* 334.2 وبدرجة نقاوة 1.7 بينما أَعطى النوع البكتيري *S. aureus* أَقل تركيز إذ بلغ تركيز الـ DNA البلازميدي له 168.5 وبدرجة نقاوة 1.6.

كما يمكن أَن نلاحظ من خلال الجدول (12-4) أَنَّ هناك تبايناً واضحًا في تركيز ال DNA البلازميدي ذلك قبل وبعدَ التحييد بالمستخلصات المائية والكحولية لثمار الرمان والنارنج كما ظهر الاختلاف في التركيز بين كل نوع من المعاملة وأُخرى.

وظهر من خلال الجدول (12-4) أَنَّ هناك انخفاضاً واضحاً في تراكيز الـ DNA البلازميدي بعد إِجراء عملية التحييد. بالنسبة للنوع البكتيري *S. aureus* فقد كان التركيز للـ DNA البلازميدي 168.5 وبدرجة نقاوة 1.6 وقد انخفض هذا التركيز بمدى يقع (58.2-162.7) وبدرجة نقاوة تراوحت ما بين (1.6-1.7) بعد إِجراء عملية التحييد بالمستخلصات المائية والكحولية لثمار الرمان والنارنج اذ أَعطى المستخلص المائي للنارنج تأثيرًا كبيرًا على محتوى ال DNA البلازميدي لهذا النوع البكتيري، بينما أَعطى المستخلص المائي للرمان تأثيرًا ضعيفا على النوع البكتيري *S. aureus*

أَمَّا بالنسبة للنوع البكتيري *E. coli* فقد كان تركيز الـ DNA البلازميد لهذا النوع 893.6 وبدرجة نقاوة 1.8 وبعد إِجراء عملية التحييد بالمستخلصات المائية والكحولية لثمار الرمان والنارنج انخفض هذا التركيز بمدى تراوح بين (889.6-143.5) وبدرجة نقاوة تراوحت ما بين (1.6-2.0) اذ أَعطى المستخلص الكحولي للنارنج تأثيرًا كبيرًا على محتوى الـ DNA

البلازميدي لهذا النوع، بينما أَعطى المستخلص المائي للنارنج التأثير الأضعف على محتوى DNA البلازميدي لهذا النوع.

كان تركيز الـ DNA البلازميدي للنوع البكتيري *K. pneumonia* قبل التحييد 1347.1 وبدرجة نقاوة 1.8 وقد انخفض هذا التركيز بعد إجراء عملية التحييد بالمستخلصات المائية والكحولية لثمار الرمان والنارنج بمدى تراوح بين (309.8-689.5) وبدرجة نقاوة تراوحت ما بين (2.1-1.6) حيث أَعطى المستخلص الكحولي لثمار النارنج تأثيرًا كبيرًا على محتوى ال DNA البلازميدي لهذا النوع بينما أَعطى المستخلص المائي للرمان التأثير الأضعف على محتوى DNA البلازميدي لهذا النوع.

أَمَّا النوع البكتيري *Ps. aeruginosa* فقد كان تركيز محتوى الـ DNA البلازميدي قبل إجراء عملية التحييد 1103.2 وبدرجة نقاوة 1.9 وقد انخفض هذا التركيز بعد إجراء عملية التحييد بمدى تراوح بين (151.3-1100.3) وبدرجة نقاوة تراوحت ما بين (1.6-1.9) حيث كان المستخلص الكحولي للنارنج قد أَعطى التأثير الأكبر على محتوى الـ DNA البلازميدي لهذا النوع، بينما المستخلص المائي للنارنج كان قد أَعطى التأثير الأضعف على محتوى الـ DNA البلازميدي لهذا النوع.

النوع البكتيري *Pr. vulgaris* فقد كان تركيز الـ DNA البلازميدي له قبل إجراء عملية التحييد بالمستخلصات المائية والكحولية لثمار الرمان والنارنج 334.2 وبدرجة نقاوة 1.7 وبعد إجراء عملية التحييد انخفض هذا التركيز بمدى تراوح بين (189.8-330.1) وبدرجة نقاوة (1.7-1.9) لكل منهما حيث كان المستخلص المائي للرمان قد أَعطى التأثير الأكبر على محتوى الـ DNA البلازميدي لهذا النوع البكتيري في حين أَعطى المستخلص المائي للنارنج التأثير الأضعف.

قبل إجراء عملية التحييد على النوع البكتيري *Pr. mirabilis* كان تركيز الـ DNA 558.6 وبدرجة نقاوة 1.8 وقد انخفض هذا التركيز بمدى تراوح بين (399.2-549.8) وبدرجة نقاوة تراوحت ما بين (1.7-1.9) أَعطى المستخلص المائي للرمان أَعلى تأثير على محتوى الـ DNA البلازميدي لهذا النوع بينما أَعطى المستخلص المائي للنارنج التأثير الأضعف على تركيز الـ DNA البلازميدي لهذا النوع.

كما هو واضح من الجدول (4-11) فإنَّ استخدام المستخلصات المائية والكحولية لثمار الرمان والنارنج كان لها تأثيرًا واضحا على الـ DNA البلازميدي من الخلايا البكتيرية؛ حيث

انخفضت تراكيز الـ DNA البلازميد بشكل واضح عند إضافة المستخلصات على البكتيريا قيد الدراسة وهذ دليل على قدرة هذه المستخلصات على إزالة الـ DNA البلازميدي من البكتيريا المعاملة بهذه المستخلصات وبالتالي إزالة المقاومة للمضادات الحيوية.

وأَشار (Gilani *et al.*, 2007). في دراسته إلى أنَّ العديد من المركبات التي توجد في نبات *R. stricta* ومن ضمنها القلويدات قد تعمل كعامل حشر وتحدث تفاعلا مع الـ DNA البلازميدي كما قد تؤدي إلى إحداث تفاعلات حذف. كذلك فإنَّ الفلافونيدات قد يكون لها القدرة على تثبيط عملية تكوين الحامض النووي. وفي الدراسة التي أَجراها ( Mori *et al.*, 1987) بين فيها بأَنَّ مركبات الفلافونيد لها قابلية تثبيطية كبيرة لعملية تصنيع الـ DNA في النوع البكتيري *Pr. vulgaris* وقد أشار إلى أَنَّ حلقة B الموجودة في التركيب الكيميائي للفلافونيد قد تعمل كعامل حشر او قد تقوم بربط الهيدروجين مع القواعد الموجودة في الحامض النووي هذا ما قد يفسر الفعَّالية في تثبيط عملية تكوين الـ DNA.

وأَوضح (Alli *et al.*, 2011) من خلال دراسته حول تأثير مستخلصات نبات الثوم Garlic على كل من النوع البكتيري *S. aureus* و *Ps. aeruginosa* بأَنَّ مستخلص نبات الثوم يتداخل مع عملية تكوين الحامض النووي DNA والإنزيمات البكتيرية ويثبط نمو وحيوية البكتريا.

تتوافق النتائج التي توصلنا اليها في هذه الدراسة مع ما توصَّلت إليه نتائج الدراسات التي أشرنا اليها انفا من حيث قدرة النباتات الطبية على إحداث تأثير على الحوامض النووية للبكتريا على الرغم من اختلافنا من حيث نوع النباتات المستخدمة ومن حيث اقتصارنا في هذه الدراسة على دراسة قدرة المستخلصات المائية والكحولية لثمار الرمان والنارنج على إحداث التغيير في تركيز الـ DNA البلازميدي.

## 6-4 تحديد تأثير المستخلصات المائية والكحولية لثمار الرمان والنارنج كعوامل محيدة على نمو الأَنواع البكتيرية قيد الدراسة

## Determination of the Effect of Aqueous and Alcoholic Extracts of *Punica granatum L.* and *Citrus aurantium* as Neutralizing Factors on the Growth of the Bacterial Species Under Study.

استخدمت طريقة قياس العكارة التي ورد ذكرها في الفقرة (3-9-1) من المواد وطرائق العمل وقد ظهرت النتائج كما هو موضح في الجدول (4-12).

**جدول (4-12): نتائج قياس الكثافة الضوئية لمزارع الأنواع البكتيرية قيد الدراسة قبل وبعد المعاملة بالمستخلصات المائية والكحولية للنباتات قيد الدراسة وبتركيز 200 ملغم /مل**

| البكتريا | عينة السيطرة قبل إضافة المستخلص المائي | المستخلص المائي رمان | المستخلص المائي نارنج | عينة السيطرة قبل إضافة المستخلص الكحولي | المستخلص الكحولي رمان | المستخلص الكحولي نارنج |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *S. aureus* | 1.276 | 1.075 | 0.640 | 1.310 | 0.966 | 0.817 |
| *E. coli* | 1.524 | 1.020 | 0.722 | 1.074 | 0.890 | 0.817 |
| *K. pneumonia* | 2.590 | 1.586 | 1.006 | 1.434 | 1.002 | 0.750 |
| *Ps. aeruginosa* | 3.062 | 2.660 | 0.606 | 1.858 | 0.847 | 0.740 |
| *P. mirabilis* | 1.68 | 1.180 | 0.656 | 0.927 | 0.870 | 0.660 |
| *P. vulgaris* | 2.540 | 2.350 | 0.650 | 1.458 | 1.030 | 0.700 |

كما هو واضح من الجدول المذكور اعلاه فإنَّ (المستخلص المائي والمستخلص الكحولي لكل من ثمار الرمان والنارنج) عند اضافتها على البكتيريا قيد الدراسة أدت إلى حصول انخفاض للنمو في مقدار الكثافة الضوئية لمستعمرات الأنواع البكتيرية قيد الدراسة. بالنسبة للنوع البكتيري *S. aureus* فإنَّ أعلى انخفاض له ظهر عند إضافة المستخلص المائي للنارنج حيث كان مقدار الكثافة الضوئية قبل التحييد 1.276 بينما اصبح بعد إضافة المستخلص المائي للنارنج 0.640. أمَّا النوع البكتيري *E. coli* فقد كان مقدار الكثافة الضوئية له قبل الإضافة 1.524 وانخفض مقدار الكثافة الضوئية له بعد إضافة المستخلص المائي للنارنج إلى 0.722. أمَّا النوع البكتيري *K. pneumonia* فقد كان مقدار الكثافة الضوئية له قبل الإضافة 1.434 بينما انخفض مقدار الكثافة الضوئية له بعد إضافة المستخلص الكحولي للنارنج إلى 0.750. كان مقدار الكثافة الضوئية للنوع البكتيري *Ps. aeruginosa* 3.062 قبل إضافة المستخلص بينما انخفض مقدار الكثافة الضوئية له بعد إضافة المستخلص المائي للنارنج إلى 0.606. أمَّا النوع البكتيري *Pr. mirabilis* فقد كان مقدار الكثافة الضوئية له 1.68 قبل إضافة المستخلص بينما وبعد إضافة المستخلص المائي للنارنج اصبح مقدار الكثافة الضوئية له 0.656. مقدار الكثافة الضوئية للنوع البكتيري *Pr. vulgaris* قبل إضافة المستخلص هو 2.540 بينما صار بعد إضافة المستخلص المائي للنارنج 0.650.

يوجد العديد من العوامل التي لها تأثير كبير على أَعداد البكتيريا وحيويتها ومن هذه العوامل الأُس الهيدروجيني ودرجة الحرارة واللذان لهما تأثيرًا على الأَغشية الخلوية والفعَّالية الإِنزيمية وتكوين البروتينات في البكتيريا إِذ إِنَّ حصول أي تغيير في درجة الحرارة والاس الهيدروجيني يؤدي إِلى حدوث تغيير في أَعداد البكتيريا الحية ونموّها (Salyers and Whitt, 2001). كما أَنَّ المواد الفعَّالة المتواجدة في المستخلصات النباتية من خلال تأثيرها على أحد التراكيب الخلوية قد يكون لها تأثيرًا على أَعداد البكتريا ونموها وحيويتها (Henie *et al*., 2009).

# الاستنتاجات والتوصيات

# Conclusions and Recommendations

## الاستنتاجات Conclusions

1. أَظهرت العزلات البكتيرية تباينًا في مقاومتها للمضادات الحيوية وقد ظهرت مقاومة متعددة للبكتريا لأَكثر من مضاد حيوي بنسبة 100%. أظهرت المستخلصات النباتية قيد الدراسة بان لها تاثيرا تراوح بين الفعالية الجيدة والعالية في تثبيط البكتريا.
2. أَظهر توصيف محتوى الـ DNA البلازميدي امتلاك الأَنواع البكتيرية قيد الدراسة حزم بلازميدية.
3. اثبتت المستخلصات النباتية قدرتها على تحييد بلازميدات الأَنواع البكتيرية من خلال إزالة المقاومة للمضادات الحيوية بنسب متباينة.
4. أظهرت المستخلصات قيد الدراسة تأثيراً على الأَنواع البكتيرية من خلال انخفاض تراكيز الـ DNA البلازميدي.
5. اختزال في عدد الخلايا البكتيرية بعد التحييد بالمستخلصات قيد الدراسة من خلال تأثر نمو وحيوية البكتريا تجاه نوع المعاملة.

## التوصيات Recommendations

1. دراسة أَنواع أُخرى من النباتات الطبية من ناحية تأثيرها كعامل محيدًا على البكتريا.
2. دراسة التأثير الجزيئي للمستخلصات النباتية بوصفه كعامل محيد على أَجزاء الخلية البكتيرية الأُخرى كالإنزيمات والجدار والأَحماض الدهنية وإِنتاج الصبغات وإِنتاج الذيفانات في بعض الأَنواع البكتيرية وعوامل الضراوة.
3. فصل المكونات الفعَّالة للمستخلص النباتي لاختيار العامل الأكفأ في تثبيط البكتريا ودراسة الطبيعة الكيميائية لمكونات العامل المحيد.
4. التحري عن ميكانيكية تاثير المستخلص النباتي على عزلات البكتريا المرضية باستخدام المجهر الالكتروني الماسح.
5. دراسة التأثير التأزري بين المستخلص النباتي والمضاد الحيوي.
6. إضافة النباتات الطبية إِلى الأَدوية للحد من مشكلة مقاومة الممرضات للمضادات الحيوية، واستخدام النباتات التي تقائمة فعَّاليتها المضادة للبكتريا في علاج الأَمراض وانخفاض كلفتها اضافةً إِلى عدم تأثيرها على النظام البيئي.

# المصادر

# References

**المصادر العربية:**


العبيدي، مهند جميل (2000). النباتات الطبية بين الطب العشبي والبحث العلمي. **مجلة علوم**. 112: 26-29.

خليفة، حسن (2009). جنة الأعشاب ( الشامل للأعشاب المجرية). **دار الأسراء للنشر والتوزيع. الأردن.**

الطائي، الاء طه يونس (2013). التأثير البايولوجي لمستخلصات ثلاثة أَنواع نباتية في بعض أَنواع المكورات العنقودية. رسالة ماجستير، **كلية التربية، جامعة الموصل، العراق.**

يوسف حنا والنعيمي، جبار حسن (1980). **إنتاج الفاكهة النفضية** (1). وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، **جامعة البصرة.**

الحامد، فيصل وعماد لعيسى ومحمد بطحة (2007). إنتاج الفاكهة **منشورات جامعة دمشق، كلية الهندسة الزراعية.**

آل إسماعيل، وجيهة عبدالكريم محمد (2007). البكتريا المسببة لالتهابات المسالك البولية ولاسيَّما ايشيريشيا كولاي ونمط مقاومتها للمضادات الحيوية في المملكة العربية السعودية. رسالة ماجستير. كلية العلوم. **جامعة الملك سعود.**

التومي، عبدالرزاق سليمان والأَمَّام، محمد محمد وابوزويدة، عبدالباسط رمضان (2014). أَساسيات التشخيص المعملي والبكتريولوجي. الهيئة الليبية للبحث والعلوم والتكنولوجيا مركز بحوث التقنيات الحيوية. دار **الكتب الوطنية – بنغازي – ليبيا.**

الخفاجي، زهرة محمود ناصر ( 2008). التقنيات الحيوية المايكروبية (توجهات جزيئية). وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، **جامعة بغداد، العراق.**

العبيدي، نادية أَحمد هادي والكناني، زينب علي حسين (2017). عزل وتشخيص أَنواع البكتريا من المرضى المصابين بالتهاب المسالك البولية وتحديد مقاومتها للمضادات الحياتية. قسم علوم الحياة – **كلية التربية للعلوم الصرفة – جامعة ذي قار.**

العزاوي، شهلة نجم عبد والشويخ، رنا مجاهد عبدالله (2018). دراسة جزيئية لمقاومة بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من الجروح والحروق المعالجة بالمطهرات. كلية التربية للعلوم الصرفة، ابن الهيثم – جامعة بغداد، وهي جزء من متطلبات نيل درجة ماجستير **علوم في علوم الحياة– الأَحياء المجهرية.**

الحمندو، ميسون منذر وديمة نزار فرج ( 2010 ). تأثير المستخلصات المائية والكحولية لقشور الرمان على إنتاج الهيمولايسين لبعض الأَنواع البكتيرية. **مجلة بغداد للعلوم، بغداد، مجلد 7(1).**

## المصادر الأجنبية:


Abbott, S. L. (2011). **Klebsiella, enterobacter, citrobacter, serratia, plesiomonas, and Other Enterobacteriaceae. In Manual of Clinical Microbiology**, 10th Edition (pp. 639-657). **American Society of Microbiology.**

Adomi, P. O. (2006). Antibacterial activity of aqueous and ethanol extracts of the stem bark of Alstonia boonei and Morinda lucida. **Scientific research and essays**, 1(2), 050-053.

Afzal, M. A. M. S. (2017). Antibiotic Resistance Pattern of Escherichia coli and Klebsiella Species in Pakistan: A Brief Overview. **J Microb Biochem Technol**, 9, 277-279.

Ahmad, I., Mehmood, Z., Mohammad, F., & Ahmad, S. (2000). **Antimicrobial potency and synergistic activity of five traditionally used Indian medicinal plants. Antimicrobial potency and synergistic activity of five traditionally used Indian medicinal plants**., 22(4a), 173-176.

Ahmed,K.D.(1989). The positive control of ilvc expression in *E. Coli* k-12. PH. D. thesis , **University Durham**,England.

Akrayi, H. F. S., & Abdullrahman, Z. F. A. (2013). Screening in vitro and in vivo the antibacterial activity of Rhus coriaria extract against *S. aureus*. **IJRRAS**, 15(3), 390-397.

Al- Abdallah, A.H. (2016). Effect of Plant extracts on growth candidia albicans and staphylococcus aureus. **Afrecan J. Pharmacy and Pharmacology** , 10 (16) : 337-343.

Alekshun, M. N., & Levy, S. B. (2007). **Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance**. Cell, 128(6), 1037-1050.

Alhazmi, A. (2015). Pseudomonas aeruginosa-pathogenesis and pathogenic mechanisms. **International Journal of Biology**, 7(2), 44.

Ali, J., Rafiq, Q. A., & Ratcliffe, E. (2018). **Antimicrobial resistance mechanisms and potential synthetic treatments. Future science OA**, 4(4), FSO290.

Al-Said, F. A., Opara, L. A., & Al-Yahyai, R. A. (2009). PHysico-chemical and textural quality attributes of pomegranate cultivars (Punica granatum L.) grown in the Sultanate of Oman**. Journal of food engineering,** 90(1), 129-134.

Ana G. Abril; Tomás G. Villa; , Jorge Barros-Velázquez; Benito Cañas Angeles Sánchez-Pérez; Pilar Calo-Mata; and Mónica Carrera. (2020). *Staphylococcus aureus* Exotoxins and Their Detection in the Dairy Industry and Mastitis. **Toxins 2020**, 12, 537.

Anwar, S., Ahmed, N., Speciale, A., Cimino, F., & Saija, A. (2016). Bitter orange (*Citrus aurantium* L.) oils. In Essential Oils in Food Preservation, **Flavor and Safety** (pp. 259-268). Academic Press.

Armbruster, C. E., & Mobley, H. L. (2012). Merging mythology and morpHology: the multifaceted lifestyle of Proteus mirabilis. **Nature Reviews Microbiology**, 10(11), 743-754.

Armbruster, C. E., Hodges, S. A., & Mobley, H. L. (2013). Initiation of swarming motility by Proteus mirabilis occurs in response to specific cues present in urine and requires excess L-glutamine. **Journal of bacteriology**, 195(6), 1305-1319.

Armbruster, C. E., Mobley, H. L., & Pearson, M. M. (2018). Pathogenesis of Proteus mirabilis infection. **EcoSal Plus**, 8(1).

Atlas, R. M. (2005). **Handbook of media for environmental microbiology**. CRC press.

Atlas, R. M., & Snyder, J. W. (2006). **Handbook of media for clinical microbiology**. CRC Press.

Atlas, R. M., Brown, A. E., & Parks, L. C. (1995). **Laboratory manual of experimental microbiology**. Mosby.

Bai, F., Xu, H., Zhang, Q., Qi, X., Mou, R., Bai, G., & Qiao, M. (2011). Functional characterization of pfm in protein secretion and lung infection of Pseudomonas aeruginosa. **Canadian journal of microbiology**, 57(10), 829-837.

Bajaj, J. S., Hylemon, P. B., Ridlon, J. M., Heuman, D. M., Daita, K., White, M. B., ... & Gillevet, P. M. (2012). Colonic mucosal microbiome differs from stool microbiome in cirrhosis and hepatic encepHalopathy and is linked to cognition and inflammation. **American Journal of PHysiology-Gastrointestinal and Liver PHysiology**, 303(6), G675-G685.

Baker, K. S., Burnett, E., McGregor, H., Deheer-Graham, A., Boinett, C., Langridge, G. C., ... & Parkhill, J. (2015). The Murray collection of pre-antibiotic era Enterobacteriacae: a unique research resource. **Genome medicine**, 7(1), 1-7.

Barnes,J.(2001). An introduction to herbal medicinal products. **PHarmacol J.** 268:804-806.

Barone, E. J. ; Pezzlo,M.T. and Delamaza,L. M. (1997) . " **Color atlas of diagnostic microbiology**" Mosby. Year Book, U.S.A. pp: 25-92.

Becker, K., Schaumburg, F., Fegeler, C., Friedrich, A. W., & Köck, R. (2017). *StapHylococcus aureus* from the German general population is highly diverse. **International Journal of Medical Microbiology,** 307(1), 21-27.

Bray, J. (1945). Isolation of Antigenically Homogeneous Strains of Bact. coli neapolitanum from Summer Diarrhoea of Infants. **Journal of Pathology and Bacteriology**, 57(2), 239-47.

Brooks, G. F.; Carroll, K. C.; Butel, J. S.; Morse, S. A. and Mietzner, T. A. (2013). **Jawetz , melnick and adelbergs medical microbiology**. 26th ed . Mcgraw-Hill . United States.

Caneiras, C., Lito, L., Melo-Cristino, J., & Duarte, A. (2019). Community-and hospital-acquired Klebsiella pneumoniae urinary tract infections in Portugal: virulence and antibiotic resistance. **Microorganisms**, 7(5), 138.

Cestari, S. E., Ludovico, M. S., Martins, F. H., da Rocha, S. P. D., Elias, W. P., & Pelayo, J. S. (2013). Molecular detection of HpmA and HlyA hemolysin of uropathogenic Proteus mirabilis. **Current microbiology**, 67(6), 703-707.

Chidambara Murthy, K. N., Jayaprakasha, G. K., & Singh, R. P. (2002). Studies on antioxidant activity of pomegranate (Punica granatum) peel extract using in vivo models. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50(17), 4791-4795.

Chiu, C. C., Lin, T. C., Wu, R. X., Yang, Y. S., Hsiao, P. J., Lee, Y., ... & Chang, F. Y. (2017). Etiologies of community-onset urinary tract infections requiring hospitalization and antimicrobial susceptibilities of causative microorganisms. **Journal of Microbiology**, Immunology and infection, 50(6), 879-885.

Chopade, B. A., Patwardhan, R. B., Vaidya, V. C., Khairnar, S., DhakepHalkar, P. K., & Padhye, S. B. (1994). Curing of antibiotic and metal resistance plasmids in *Acinetobacter baumannii*. Tropical Diseases: **Molecular Biology and Control Strategies**, 695-703.

Clegg, S., & MurpHy, C. N. (2016). Epidemiology and virulence of *Klebsiella pneumoniae*. **Microbiology spectrum**, 4(1), 4-1.

Collee, J. G., Duguid, J. P., Fraser, A. G., Marmion, B. P., & Simmons, A. (1996). Laboratory strategy in the diagnosis of infective syndromes. **Mackie and McCartney practical medical microbiology**, 14, 53-94.

Costa, C. A., Cury, T. C., Cassettari, B. O., Takahira, R. K., Flório, J. C., & Costa, M. (2013). *Citrus aurantium* L. essential oil exhibits anxiolytic-like activity mediated by 5-HT 1A-receptors and reduces cholesterol after repeated oral treatment. **BMC complementary and alternative medicine**, 13(1), 1-10.

Cowan,M. M.(1999). **Plant products as antimicrobial agents clinical Microbiol** . Reviews, 12(4):564-582.

Cruickshank, R., Duguid, J. P., Marmion, B. P., & Swain, R. H. A. (1975): **Medical microbiology Vol. II. The practice of medical microbiology**. 12th Ed., Churchill Livingstone, Edinburgh, London.

De Rosa, F. G., Corcione, S., Cavallo, R., Di Perri, G., & Bassetti, M. (2015). Critical issues for Klebsiella pneumoniae KPC-carbapenemase producing K. pneumoniae infections: a critical agenda. **Future microbiology**, 10(2), 283-294.

Değirmenci, H., & Erkurt, H. (2020). Relationship between volatile components, antimicrobial and antioxidant properties of the essential oil, hydrosol and extracts of Citrus aurantium L. flowers. **Journal of infection and public health**, 13(1), 58-67.

Dev, S.(1996). **Ancient modern con accordance in ayurvediac plants**: Some examples Environ Health Prospect, 107: 783-789.

Diekema, D. J., Pfaller, M. A., Schmitz, F. J., Smayevsky, J., Bell, J., Jones, R. N., ... & SENTRY Participants Group. (2001). **Survey of infections due to StapHylococcus species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997–1999**. Clinical Infectious Diseases, 32 (Supplement_2), S114-S132.

Djeribi, R., Bouchloukh, W., Jouenne, T., & Menaa, B. (2012). Characterization of bacterial biofilms formed on urinary catheters. **American journal of infection control**, 40(9), 854-859.

Drzewiecka, D. (2016). Significance and roles of Proteus spp. bacteria in natural environments. **Microbial ecology**, 72(4), 741-758.

Dulaimi, Fatima, I.S. (2006). The inhibitory effect of extracts of some medicinal plants and the synergy between their active ingredients and antibiotics in *S. aureus* bacterium and TypHimurium Salmonella isolated from food poisoning, Master Thesis. Faculty of Education, **University of Mosul**.

Ekizoğlu, M., Sağiroğlu, M., Kilic, E., & Hasçelik, A. G. (2016). An investigation of the bactericidal activity of chlorhexidine digluconateagainst multidrug-resistant hospital isolates. **Turkish journal of medical sciences**, 46(3), 903-909.

Elgavish, A., Pattanaik, A. S. I. M. A., Lloyd, K. E. I. T. H., & Reed, R. E. B. E. C. C. A. (1994). Integrin-mediated adhesive properties of uroepithelial cells are inhibited by treatment with bacterial toxins. **American Journal of PHysiology-Cell PHysiology**, 266(6), C1552-C1559.

Erdem, I., Ali, R. K., Ardic, E., Omar, S. E., Mutlu, R., & Topkaya, A. E. (2018). Community-acquired lower urinary tract infections: Etiology, antimicrobial resistance, and treatment results in female patients. **Journal of global infectious diseases**, 10(3), 129.

Favela-Hernández, J. M. J., González-Santiago, O., Ramírez-Cabrera, M. A., Esquivel-Ferriño, P. C., & Camacho-Corona, M. D. R. (2016). **Chemistry and pHarmacology of Citrus sinensis. Molecules**, 21(2), 247.

Ferrara, G., Giancaspro, A., Mazzeo, A., Giove, S. L., Matarrese, A. M. S., Pacucci, C., ... & Gadaleta, A. (2014). Characterization of

pomegranate (Punica granatum L.) genotypes collected in Puglia region, Southeastern Italy. **Scientia Horticulturae**, 178, 70-78.

Fetar, H. (2011). **Characterization of the MexT Regulator of the mexEF-oprN Multidrug Efflux Operon of *Pseudomonas aeruginosa*** (Doctoral dissertation).

Forbes, B. A., Sahm, D. F., & Weissfeld, A. S. (2007). **Diagnostic microbiology**. St Louis: Mosby.

Forsyth, V. S., Armbruster, C. E., Smith, S. N., Pirani, A., Springman, A. C., Walters, M. S., ... & Mobley, H. L. (2018). Rapid growth of uropathogenic Escherichia coli during human urinary tract infection. **MBio**, 9(2), e00186-18.

Garrity, G. M.; Brenner, D. J.; Krieg, N. R.; Staley, J. T.; Chairman, J.; Boone, D. R.; Chairman, V.; Devos, P.; Goodfellow, M.; Rainey, F. A. and Schleifer, K-H. (2005). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Vol Two. Part B. 2nded. Springer. USA. PP 1106.

Gellatly, S. L., & Hancock, R. E. (2013). Pseudomonas aeruginosa: new insights into pathogenesis and host defenses. **Pathogens and disease**, 67(3), 159-173.

Gilani, S. A., Kikuchi, A., Shinwari, Z. K., Khattak, Z. I., & Watanabe, K. N. (2007). PHytochemical, pHarmacological and ethnobotanical studies of Rhazya stricta Decne. PHytotherapy Research: **An International Journal Devoted to PHarmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, 21(4), 301-307.

Grand, A. ; Woudergem,P.A. ; Verpoorte,R. and Pousset,J.L. (1988). Anti-infections pHytotherapies of tree-savannah sengal (west – Afriacl),II-Antimicrobial activity of 33 species. **J. EthnopHarmacol**.,22:25-31.

Greenwood, D., Slack, R. C., Barer, M. R., & Irving, W. L. (2012). **Medical Microbiology E-Book: A Guide to Microbial Infections: Pathogenesis, Immunity, Laboratory Diagnosis and Control**. With STUDENT CONSULT Online Access. Elsevier Health Sciences.

Hadi, O. M., Al-Maliki, A. H., Al-Zubaidy, M. S. M., & Nihmah, Y. K. (2014). Prevalence of Uropathogenic Escherichia coli in Al-Hashymia District of Babylon Province. **JUBPAS**., 9(22), 2479-2488.

Hamilton, A. L., Kamm, M. A., Ng, S. C., & Morrison, M. (2018). Proteus spp. as putative gastrointestinal pathogens. **Clinical microbiology reviews**, 31(3), e00085-17.

Hammoudi, A. A. (2017). Antibiotics Resistance of Isolated Bacteria from Patients with Urinary Tract Infection. **Diyala Journal for Pure Science**, 13(4 -part 1), 233.

Hardy, D., Amsterdam, D., Mandell, L. A., & Rotstein, C. (2000). Comparative in vitro activities of ciprofloxacin, gemifloxacin, grepafloxacin, moxifloxacin, ofloxacin, sparfloxacin, trovafloxacin, and other antimicrobial agents against bloodstream isolates of gram-positive cocci. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 44(3), 802-805.

Harly, J. P. and Prescott, L. M. (2002). **Laboratory Exercises in Microbiology**. 5thed. McGraw-Hill education , Inc . PP 466 .

Hassan, K. H., Khadom, A. A., & Kurshed, N. H. (2016). Citrus aurantium leaves extracts as a sustainable corrosion inhibitor of mild steel in sulfuric acid. **south african journal of chemical engineering**, 22, 1-5.

Hemraj, V., Diksha, S., & Avneet, G. (2013). A review on commonly used biochemical test for bacteria. **Innovare Journal of Life Science**, 1(1), 1-7.

Hemraj, V., Diksha, S., & Avneet, G. (2013). A review on commonly used biochemical test for bacteria. **Innovare Journal of Life Science**, 1(1), 1-7.

Henie, E.F.P.; Zaiton, H. and Suhaila,M. (2009). Bacterial membrane disruption in food pathogens by psidium guajava leaf extracts. **J. Interna**. Food Res.16:297-311.

Hennequin, C., Aumeran, C., Robin, F., Traore, O., & Forestier, C. (2012). Antibiotic resistance and plasmid transfer capacity in biofilm formed with a CTX-M-15-producing Klebsiella pneumoniae isolate. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 67(9), 2123-2130.

Heritage , J. (2003). **Antibiotics. University of Leeds**. England.

Holland, D., & Bar-Ya'akov, I. (2014). **Pomegranate: aspects concerning dynamics of health beneficial pHytochemicals and therapeutic properties with respect to the tree cultivar and the environment**. In Medicinal and aromatic plants of the Middle-East (pp. 225-239). Springer, Dordrecht.

Holland, D., Hatib, K., & Bar-Ya'akov, I. (2009). 2 **Pomegranate: botany, Horticulture, Breeding**. Horticultural reviews, 35(2), 127-191.

Holt, J., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., & Staley, J. T. (1994). **Bergey's manual of determinative bacteriology 9th Edition**, Williams and Wilkins. Baltimore, Maryland, USA.

Imanishi, I., Nicolas, A., Caetano, A. C. B., de Paula Castro, T. L., Tartaglia, N. R., Mariutti, R., ... & Le Loir, Y. (2019). Exfoliative

toxin E, a new StapHylococcus aureus virulence factor with host-specific activity. **Scientific reports**, 9(1), 1-12.

Jassim, N. N., & Hassan, R. H. (2019). The inhibitory activity of plant extracts (Mentha Citrato L. and Citrus aurantium L.) towards some bacteria strains isolated from inflamed gums. **Tikrit Journal of Pure Science**, 24(7), 40-44.

Jiang, S. S., Lin, T. Y., Wang, W. B., Liu, M. C., Hsueh, P. R., & Liaw, S. J. (2010). Characterization of UDP-glucose dehydrogenase and UDP-glucose pyropHospHorylase mutants of Proteus mirabilis: defectiveness in polymyxin B resistance, swarming, and virulence. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 54(5), 2000-2009.

Joanna MR; Jolanta M and Monika W. (2015). Urinary tract infections in pregnancy: old and new unresolved diagnostic and therapeutic problems. **Archief Medical Science**. ,2015;11(1): 67–77.

Kajihara, T., Yahara, K., Stelling, J., Eremin, S. R., Tornimbene, B., Thamlikitkul, V., ... & Shibayama, K. (2020). Comparison of de-duplication methods used by WHO Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS) and Japan Nosocomial Infections Surveillance (JANIS) in the surveillance of antimicrobial resistance. **PloS one**, 15(6), e0228234.

Kalal, B. S., & Nagaraj, S. (2016). Urinary tract infections: a retrospective, descriptive study of causative organisms and antimicrobial pattern of samples received for culture, from a tertiary care setting. **Germs**, 6(4), 132.

Kang, C. I., Kim, J., Park, D. W., Kim, B. N., Ha, U. S., Lee, S. J., ... & Wie, S. H. (2018). Clinical practice guidelines for the antibiotic treatment of community-acquired urinary tract infections. **Infection & chemotherapy**, 50(1), 67-100.

Kang, P., Ryu, K. H., Lee, J. M., Kim, H. K., and Seol, G. H. (2016). Endothelium-and smooth muscle-dependent vasodilator effects of Citrus aurantium L. var. amara: Focus on Ca2+ modulation. **Biomedicine & PHarmacotherapy**, 82, 467-471.

Karabıyıklı, Ş., Değirmenci, H., & Karapınar, M. (2014). Inhibitory effect of sour orange (Citrus aurantium) juice on Salmonella TypHimurium and Listeria monocytogenes. **LWT-Food Science and Technology**, 55(2), 421-425.

Karlowsky, J. A., Jones, M. E., Thornsberry, C., Friedland, I. R., & Sahm, D. F. (2003). Trends in antimicrobial susceptibilities among Enterobacteriaceae isolated from hospitalized patients in the United States from 1998 to 2001. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 47(5), 1672-1680.

Khimji, P. L., & Miles, A. A. (1978). Microbial iron-chelators and their action on Klebsiella infections in the skin of guinea-pigs. **British journal of experimental pathology**, 59(2), 137.

Kimberly A. Kline and Amanda L. Lewis. (2016). **Gram-Positive Uropathogens, Polymicrobial Urinary Tract Infection, and the Emerging Microbiota of the Urinary Tract**. Department of Molecular Microbiology, Campus Box 8230, Washington University School of Medicine, 660 S. Euclid Avenue, St. Louis, MO 63110, USA, PHone: 314-286-0016, Fax: 314-747-0264, ; Email: allewis@wustl.edu.

Koneman, E. W.; Winn, W.C. ;Allen, S.D.; Procop, G.W.; Schreckenberger, P. C.; Janda ,W.M. and Woods,G.L.(2006). **Koneman's color atlase and textbook of diagnostic Microbiology**.6th ed. Lippinocott Williams and Wilkins.USA.

Köse, H., & Yapar, N. (2017). The comparison of various disinfectants? efficacy on StapHylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa

biofilm layers. Turkish journal of medical sciences, 47(4), 1287-1294.

Kwiecinska-Pirog, J., Skowron, K., Bartczak, W., & Gospodarek-Komkowska, E. (2016). The ciprofloxacin impact on biofilm formation by Proteus mirabilis and P. vulgaris strains. **Jundishapur journal of microbiology**, 9(4).

Laird, E. D. (2016). **Characterization of antibiotic resistance profiles of surface water bacteria in an urbanizing watershed** (Doctoral dissertation).

Lamas Ferreiro, J. L., Álvarez Otero, J., González González, L., Novoa Lamazares, L., Arca Blanco, A., Bermúdez Sanjurjo, J. R., ... & de la Fuente Aguado, J. (2017). Pseudomonas aeruginosa urinary tract infections in hospitalized patients: Mortality and prognostic factors. **PloS one**, 12(5), e0178178.

Lansky, E. P., & Newman, R. A. (2007). Punica granatum (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. **Journal of ethnop Harmacology**, 109(2), 177-206.

Levinson, W. (2017). **Review of medical microbiology and immunology**.

Lim, S. W., Lee, D. R., Choi, B. K., Kim, H. S., Yang, S. H., Suh, J. W., & Kim, K. S. (2016). Protective effects of a polymethoxy flavonoids-rich Citrus aurantium peel extract on liver fibrosis induced by bile duct ligation in mice. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, 9(12), 1158-1164.

Lin, Y. T., Wang, F. D., Chan, Y. J., Fu, Y. C., & Fung, C. P. (2014). Clinical and microbiological characteristics of tigecycline non-susceptible Klebsiella pneumoniae bacteremia in Taiwan. **BMC infectious diseases**, 14(1), 1-8.

Lopatkin, A. J., Meredith, H. R., Srimani, J. K., Pfeiffer, C., Durrett, R., & You, L. (2017). Persistence and reversal of plasmid-mediated antibiotic resistance. **Nat Commun** 8: 1689.

Lowy, F. D. (1998). StapHylococcus aureus infections. **New England journal of medicine**, 339(8), 520-532.

Maier, L., Pruteanu, M., Kuhn, M., Zeller, G., Telzerow, A., Anderson, E. E., ... & Typas, A. (2018). **Extensive impact of non-antibiotic drugs on human gut bacteria. Nature**, 555(7698), 623-628.

Manos, J., & Belas, R. O. B. E. R. T. (2006). The genera proteus, providencia, and morganella. **Prokaryotes**, 6, 245-269.

Marya, H.; Khan, S. M.; Nabavi, and S. Habtemariam. (2018). "Anti-diabetic potential of peptides: future prospects as therapeutic agents," **Life Sciences**, vol. 193, pp. 153–158.

Michelle, M. C. B.; Maria, L. C. and Laura, J. V. P. (2018). Strategies to combat antimicrobial resistance: anti-plasmid and plasmid curing. **FEMS Microbiol**.

Mody, L., & Juthani-Mehta, M. (2014). Urinary tract infections in older women: a clinical review. **Jama**, 311(8), 844-854.

Molnar, J. (1988). **Antiplasmid activity of tricyclic compounds. Methods and findings in experimental and clinical pHarmacology**, 10(7), 467-474.

Montville, T. J., & Matthews, K. R. (2008). **Food microbiology: An introduction**, 2nd (edn).

Mori, A., Nishino, C., Enoki, N., & Tawata, S. (1987). Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *StapHylococcus aureus*. PHytochemistry, 26(8), 2231-2234.

Muder, R. R., Brennen, C., Rihs, J. D., Wagener, M. M., Obman, A., Obman, A., ... & Yu, V. L. (2006). Isolation of StapHylococcus

aureus from the urinary tract: association of isolation with symptomatic urinary tract infection and subsequent stapHylococcal bacteremia. **Clinical infectious diseases**, 42(1), 46-50.

Neamah, A. A. (2017). Molecular Detection of virulence factor genes in Pseudomonas aeruginosa isolated from human and animals in Diwaniya province. **Kufa J. Vet. Med. Sic**, 8, 218-230.

Neamati, F., Firoozeh, F., Saffari, M., & Zibaei, M. (2015). Virulence genes and antimicrobial resistance pattern in uropathogenic Escherichia coli isolated from hospitalized patients in Kashan, **Iran. Jundishapur journal of microbiology**, 8(2).

Nicolosi, E., Deng, Z. N., Gentile, A., La Malfa, S., Continella, G., & Tribulato, E. (2000). Citrus pHylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. **Theoretical and Applied Genetics**, 100(8), 1155-1166.

Norsworthy, A. N., & Pearson, M. M. (2017). From catheter to kidney stone: the uropathogenic lifestyle of Proteus mirabilis. **Trends in microbiology**, 25(4), 304-315.

NOURI, H. S. (2019). The Inhibitory Efficiency of Flavonoid Extract of Black Mustard Seeds (Brassica nigra) and cold aqueous extract of EupHorbia prostrata L. on growth of StapHylococcus aureusinvitro and invivo. **International Journal of PHarmaceutical Research**, 11(1).

Okumura, R., Kurakawa, T., Nakano, T., Kayama, H., Kinoshita, M., Motooka, D., ... & Takeda, K. (2016). **Lypd8 promotes the segregation of flagellated microbiota and colonic epithelia. Nature**, 532(7597), 117-121.

Olajide A Ajayi. (2018). **Urinary Tract Infection in Diabetics**. Open access peer-reviewed chapter., 2018;19th 2018 4.

Ongsakul, M.; Jindarat, A. and Rojanaworarit, C. (2009). Antibacterial effect of crude alcoholic and aqueous extracts of six medicinal plants against *StapHylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **J. Health Res**. 23(3): 153-156.

Oran, S. and Raies,A.(2000). Antimicrobial activity of Globular Arabica Jaub and spach *Globular alypum* L. (Globulariaceae) Dirasat. **Pure. Sci**., 27 (1).71-73.

Papkou, A., Guzella, T., Yang, W., Koepper, S., Pees, B., Schalkowski, R., ... & Schulenburg, H. (2019). The genomic basis of Red Queen dynamics during rapid reciprocal host–pathogen coevolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 116(3), 923-928.

Patricia, T. (2012). **Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology**. Mosby.

Patwardhan, R. B., Shinde, P. S., Chavan, K. R., & Devale, A. (2015). Reversal of plasmid encoded antibiotic resistance from nosocomial pathogens by using Plumbago auriculata root extracts. **Int J Curr Microbiol Appl Sci**, 2, 187-98.

Pedersen, S. S; Hoiby, N.; Espersen, F. and Koch, C.H. (2018). **Role of alginate in infection with Mucoid Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis**. 47: 6-13.

Perez, C.; Poaul,M. and Bazerque,P. (1990). An antibiotic assay by the agar well diffusion method. **Acta Biol. Med**. Exp.,15:113-115.

Pharmazie, M. (2009). **Diplomarbiet Javanese medical plants used in rural communities**. Universitat wien, Akademischer Grad.

Podschun, R., & Ullmann, U. (1998). *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clinical microbiology reviews**, 11(4), 589-603.

Pradeep, B. V., Manojbabu, M. K., & Palaniswamy, M. (2008). Antibacterial activity of Punica granatum L. against gastro intestinal tract infection causing organisms. **Ethnobotanical leaflets**, 2008 (1), 143.

Puah, S. M., Chua, K. H., & Tan, J. A. M. A. (2016). Virulence factors and antibiotic susceptibility of StapHylococcus aureus isolates in ready-to-eat foods: detection of S. aureus contamination and a high prevalence of virulence genes. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 13(2), 199.

Puhler,A. and Timmis, K.(1984). **Advanced in Molecular Genetics. springer verlag**, New York, U.S.A.

Recker, M., Laabei, M., Toleman, M. S., Reuter, S., Saunderson, R. B., Blane, B., ... & Massey, R. C. (2017). Clonal differences in *StapHylococcus aureus* bacteraemia-associated mortality. **Nat Microbiol** 2: 1381–1388.

Riose, J.L.; Recio, M.C. and Villar,A. (1987). Antimicrobial activity of selected plants employed in sponish Mediterranean area. **J. Ethnopharmacol**., 21:139-152.

Rossato, L. G., Costa, V. M., Limberger, R. P., de Lourdes Bastos, M., & Remião, F. (2011). SynepHrine: from trace concentrations to massive consumption in weight-loss. **Food and chemical toxicology**, 49(1), 8-16.

Rouger, A., Tresse, O., & Zagorec, M. (2017). Bacterial contaminants of poultry meat: sources, species, and dynamics. **Microorganisms**, 5(3), 50.

Rozwandowicz, M., Brouwer, M. S. M., Fischer, J., Wagenaar, J. A., Gonzalez-Zorn, B., Guerra, B., Hordijk, J. (2018). Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 73(5), 1121-1137.

Salyers, A.A. and Whitt, D.D. (2001). **Micobiology Diversity, Disease and the Environment. Fitzgerlad Science Press**, Inc., Bethesda, Maryland, U.S.A.

Shaheen, G., Akram, M., Jabeen, F., Ali Shah, S. M., Munir, N., Daniyal, M., ... & Khan, M. (2019). Therapeutic potential of medicinal plants for the management of urinary tract infection: A systematic review. **Clinical and Experimental PHarmacology and PHysiology**, 46(7), 613-624.

Shareef, A.Y. (1998). The molecular effect of some plant extract on the growth and metabolism of some gram positive and gram negative bacteria. PH, D. thesis, College of Science, **University of Mosul**, Iraq.

Sharmin, S., Alamgir, F., Begum, F., & Jaigirdar, M. Q. H. (2010). Use of chromogenic agar media for identification of uropathogen. **Bangladesh Journal of Medical Microbiology**, 4(1), 18-23.

Simonsen, G. S. (2018). Antimicrobial resistance surveillance in Europe and beyond. **Eurosurveillance**, 23(42), 1800560.

Slonczewski, J. L. and Foster, J.W. (2014). Microbiology an evolvlng science. 2nd ed. . **Norton and company**. Alabama . 1100 pp.

Soltani, S., Emamie, A. D., Dastranj, M., Farahani, A., Davoodabadi, A., & Mohajeri, P. (2018). Role of toxins of uropathogenic Escherichia coli in development of urinary tract infection. **Journal of PHarmaceutical Research International**, 1-11.

Soman, Y.P.; Mohite, J.A.; Thakre, S.M.; Raokhande, S.R. and Mujumdar, S.S. (2015). Plasmid curing activity by seed extracts of Cuminum cyminum, Coriandrum sativum and Myristica fragrans houtt and fruit peel extracts of orange banana and pineapple against

gram negative bacteria. **Int. J. Curr**. Microbiol. App. SCi., Spcial issue-2:302-316.

Spaulding, C. N., Klein, R. D., Ruer, S., Kau, A. L., Schreiber, H. L., Cusumano, Z. T., ... & Hultgren, S. J. (2017). **Selective depletion of uropathogenic *E. coli* from the gut by a FimH antagonist. Nature**, 546(7659), 528-532.

Stamm, W. E. (1991). Catheter-associated urinary tract infections: epidemiology, pathogenesis, and prevention. **The American journal of medicine**, 91(3), S65-S71.

Stewart, C. M. (2003). **StapHylococcus aureus and stapHylococcal enterotoxins. Ch 12 In: Hocking AD (ed) Foodborne microorganisms of public health significance**.

Stohs, S. J., & Shara, M. (2013). **Review of the safety and efficacy of bitter orange (*Citrus aurantium*) and its primary protoalkaloid**, p-synepHrine, in weight management.

Struve, C., Roe, C. C., Stegger, M., Stahlhut, S. G., Hansen, D. S., Engelthaler, D. M., ... & Krogfelt, K. A. (2015). Mapping the evolution of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. **MBio**, 6(4), e00630-15.

Sudhakar, T., Karpagam, S., & Premkumar, J. (2015). Biosynthesis, antibacterial activity of pyocyanin pigment produced by Pseudomonas aeruginosa SU1. **Journal of Chemical and PHarmaceutical Research**, 7(3), 921-924.

Suntar, I., Khan, H., Patel, S., Celano, R., & Rastrelli, L. (2018). An overview on Citrus aurantium L.: Its functions as food ingredient and therapeutic agent**. Oxidative medicine and cellular longevity**, 2018.

Tadesse, A., & Alem, M. (2006). **Medical Bacteriology**. University of Gondar.

Terlizzi, M. E., Gribaudo, G., & Maffei, M. E. (2017). UroPathogenic Escherichia coli (UPEC) infections: virulence factors, bladder responses, antibiotic, and non-antibiotic antimicrobial strategies. **Frontiers in microbiology**, 8, 1566.

Tezcan, F., Gültekin-Özgüven, M., Diken, T., Özçelik, B., & Erim, F. B. (2009). Antioxidant activity and total pHenolic, organic acid and sugar content in commercial pomegranate juices. **Food chemistry**, 115(3), 873-877.

Thabit, Z. A. (2018). Evaluation of some bioactive effect of pHenolic compounds in Costus speciosus rhizome extract. **Iraqi Journal of Science**, 59(1A), 38-43.

Thwaites, G. E., & Gant, V. (2011). Are bloodstream leukocytes Trojan Horses for the metastasis of *StapHylococcus aureus*. **Nature Reviews Microbiology**, 9(3), 215-222.

Tille, P.M. (2017). **Baily And Scott's Diagnostic Microbiology**. 41thed. Elsevier, Inc. China. 1115pp.

Tortora, G. J., Case, C. L., & Funke, B. R. (2016). **Microbiologia-12ª Edição**. Artmed Editora.

Vaishnavi, C., Kapoor, P., & Kochhar, R. (2014). Su1148 Bacterial Biofilms Produced in Stents Retrieved From Patients With Biliary and Pancreatic Diseases. **Gastroenterology**, 5(146), S-389.

Vandepitte, J.; Engback, K. ; Piot,P. and Heuk,C. (1991). Basic laboratory procedures in clinical bacteriology. **World Health Organization**, Geneva. Switzerland.

Verpoorte,R.;Tginastoni,A.;Vandoorn,H. and Svendsen,A.B. (1982). Medicinal plant of sevinam,1-antimicrobial activity of some medicinal plants. **J. EthnopHarmacol**.,5:221-226.

Voravuthikunchai; lortheeranuwat; A.Jeeju,S.and Supawita, T. (2004). Effective medicinal plants against enteroheamorrhagic for human

brest cancer. **Breast cancer research and treatment**. 71(3): 203 – 217.

Vuotto, C., Longo, F., Pascolini, C., Donelli, G., Balice, M. P., Libori, M. F., and Varaldo, P. E. (2017). Biofilm formation and antibiotic resistance in Klebsiella pneumoniae urinary strains. **Journal of applied microbiology**, 123(4), 1003-1018.

Wagenlehner, F. M. E., & Naber, K. G. (2006). Current challenges in the treatment of complicated urinary tract infections and prostatitis. **Clinical Microbiology and Infection**, 12, 67-80.

Wang, D., Zhang, L., Yong, C., Shen, M., Ali, T., Shahid, M., ... & Han, B. (2017). Relationships among superantigen toxin gene profiles, genotypes, and pathogenic characteristics of *StapHylococcus aureus* isolates from bovine mastitis. **Journal of dairy science**, 100(6), 4276-4286.

Wanger, A., Chavez, V., Huang, R., & Actor, J. K. (2017). **Microbiology and molecular diagnosis in pathology: a comprehensive review for board preparation, certification and clinical practice**.

WHO, World Health Organization. Basic Laboratory Procedures in Clinical Bacteriology. (2003). Geneva, Switzerland: **World Health Organization**, 37-50.

Won, S. Y., Munoz-Price, L. S., Lolans, K., Hota, B., Weinstein, R. A., Hayden, M. K., & Centers for Disease Control and Prevention Epicenter Program. (2011). Emergence and rapid regional spread of Klebsiella pneumoniae carbapenemase–producing Enterobacteriaceae. **Clinical infectious diseases**, 53(6), 532-540.

Woodford, N., Turton, J. F., & Livermore, D. M. (2011). Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. **FEMS microbiology reviews**, 35(5), 736-755.

Wu, S., & Tian, L. (2017). Diverse pHytochemicals and bioactivities in the ancient fruit and modern functional food pomegranate (*Punica granatum*). **Molecules**, 22(10), 1606.

Zhang, J., Zhan, B., Yao, X., Gao, Y., & Shong, J. (1995). Antiviral activity of tannin from the pericarp of Punica granatum L. against genital Herpes virus in vitro. Zhongguo Zhong yao za zhi= Zhongguo zhongyao zazhi. **China journal of Chinese materia medica**, 20(9), 556-8.

Zhang, X. L., Wen-Feng, X. U., Gang, C. H. E. N., Hai-Feng, W. A. N. G., & Yue-Hu, P. E. I. (2017). Two new pHenolic glycosides isolated from the fruits of Citrus aurantium. **Chinese journal of natural medicines**, 15(1), 41-44.

Zowawi, H. M., Harris, P. N., Roberts, M. J., Tambyah, P. A., Schembri, M. A., Pezzani, M. D., ... & Paterson, D. L. (2015). The emerging threat of multidrug-resistant Gram-negative bacteria in urology. **Nature Reviews Urology**, 12(10), 570-584.

## Abstract

100 urine samples were collected from patients with urinary tract infections, 89 samples gave a positive growth on blood agar media, i.e. (89%) of the total samples, while (11) samples (11%) did not give growth. on the same medium .

89 bacterial isolates were obtained, distributed among *Staphylococcus aureus* 29 isolates (32.58%), *Escherichia coli* 32 isolates (35.95%), *Klebsiella pneumonia* 9 isolates (10.1%), *Pseudomonas aeruginosa* 11 isolates 12.35%, and *Proteus vulgaris* 4 isolates (4.49%), *Proteus mirabilia* 4 isolates 4.49

The sensitivity and resistance of the bacterial isolates under study were tested for 10 antibiotics, namely Amoxicillin, Tetracycline, Trimethoprim, Refampicin, Streptomycin, Erythromycin, Ampicillin, Nalidixic acid, Gentamicin, CiprofloxacinThe results of the antibiotic susceptibility test The showed that *Escherichia coli* isolates were resistant (100%) to both Ax and Am, *Staphylococcus aureus* was (100%) resistant to Nal, and *Pseudomonas aeruginosa* was resistant to both Ax and Nal by 100. %) As for *Klebsiella pneumonia*, it was resistant to anti-Am and Nal by 100%) while *Proteus mirabils* was resistant to anti-Ax and Am at 100%), while *Proteus vulgaris* was resistant to anti-Am, Ax, Sm and Tri by 25% ) .

Aqueous and ethanolic extracts of *Citrus aurantium* and *Pomegranate fruits* (*Punica granatum* L.) were prepared.The growth-inhibiting effect of plant extracts on the types of bacteria under study was investigated using the etch diffusion method and turbidity measurement method The aqueous and ethanolic extracts of pomegranate fruits and *Citrus aurantium* showeda clear growth inhibitory activity, as well as the ability to measure the area of inhibition in millimeters around the bacteria under study.It was shown through the results that all bacterial isolates

were sensitive to extracts of aqueous and alcoholic *Citrus aurantium* and pomegranate by 100% at a concentration of 200 mg / cm.

The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of aqueous and alcoholic extracts of *Citrus aurantium* and pomegranate which have antibacterial activity against the bacteria under study, using a turbidity test. The plasmid DNA content of the bacterial isolates selected for the study was characterized. The results showed the presence of plasmids that appeared on the agarose gel after electrophoresis.

Sub-Minimum Inhibitory Concentration (Sub-MIC) of aqueous and ethanolic extracts of *Citrus aurantium* and pomegranate was used as a neutralizing agent to remove antibiotic resistance of the bacterial species under study. Different values of the percentage of antibiotic resistance loss were obtained as a result of the efficacy of the extracts, but some extracts did not show neutral efficacy. The results of the neutralization experiments were supported by the characterization of plasmid DNA on an agarose gel for the neutered isolates. Electro-migration showed the disappearance of plasmid DNA bundles from the agarose gel for most of the bacteria under study compared to the unpaired isolates. The concentration and purity of plasmid DNA were also estimated .

University of Mosul

College of Education

for Pure Science

# Efficiency of extract of *Citrus aurantium* and *Punica granatium* plant in neutralizing the resistance of some bacterial species isolated from urinary tract infection

**Ahmad Abdalrazaq Ebrahem Alnuimi**

M. Sc. Thesis

Biology

Supervised By

**Lec.**

**Dr. Nawar Talal Hamid Alsaffawi**

2021 A.D. 1443 A.H.