جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة كربلاء
كلية التربية للعلوم الصرفة
قسم علوم الحياة

تقيم فعالية بعض المستخلصات النباتية المضادة لبكتريا *pseudomonas aeruginosa* المنتجة للغشاء الحياتي والمعزولة من مرضى الحروق في محافظة كربلاء

رسالة مقدمة

إلى مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء
وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة / علم الحيوان

من قبل الطالبة
وسن رضا حسن الشكرچي

بإشراف

أ. م .د. هيام عبد الرضا العواد

1440 هـ **2019 م**

﴿وَفَوْقَ كُلِّ ذِي عِلْمٍ عَلِيمٌ﴾

صَدَقَ اللهُ العَلِيُّ العَظِيم

سورة يوسف ، 75

الأهداء

إلى خير مولود . . . . . وأحسن موجود

إلى النبي محمد صلّى الله عليه وآل بيته الأطهار

إلى من سهر الليالي وأفنى عمرة من أجلي . . . وحمل همي غير مبالٍ

إلى من تمنيت وجوده ومشاركة فرحتي قدوتي والدي الحبيب رحمهُ الله عليه

إلى من أثقلت الجفون سهرا . . . وجملت الفؤاد هما . . وجاهدت الأيام صبرا

وشغلت البال فكرا . . . ورفعت الأيادي دعاء . . . والدتي الغالية .

إلى الروح التي سكنت روحي . . .

إلى قلعتي الحصينة وسندي في الحياة . . . .

زوجي الحبيب

إلى ورود المحبة . . . . وينابيع الوفاء أبنائي و ثمرة فؤادي

أهدي ثمرة جهدي المتواضع هذا

الشكر والتقدير

أوجه بالشكر والتقدير إلى عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة ورئاسة قسم علوم الحياة لإتاحة الفرصة لإكمال دراستي .

الشكر والتقدير إلى الأستاذ المساعد الدكتورة هيام عبد الرضا العواد لإشرافها المباشر على العمل وكتابة البحث فضلا عن النصائح القيمة والجهد والدعم المتواصل الذي أثمر بإخراج هذا البحث .

ومن دواعي الوفاء أن أوجه شكري وتقديري إلى الدكتور نزار جبار متعب في مختبر الأحياء المجهرية في مدينة الإمام الحسين (ع) الطبية لتعاونه في تسهيل إنجاز بعض ما يتطلبه البحث وأخص بالشكر والتقدير الأستاذ عبد الخالق حميد عبد الكريم و الأستاذ صلاح فليح حسين . وللأستاذ رحيم موسى هاشم مسؤول قسم الحروق ولا يفوتني أن أتقدم بخالص امتناني إلى مختبر الأحياء المجهرية و قسم الحروق في مستشفى الإمام الحسين (ع) الطبية إدارة و منتسبين لحسن المعاملة و الأخلاق .

كما أتوجه بالشكر والامتنان إلى الأستاذ علي محمد سلمان والست أميره محمد جبر و الست رؤى حميد مكي والى إدارة ومنتسبي مختبر الصحة العام في محافظة كربلاء ولما أبدوه لي من مساعده ونصح وإرشاد في البحث .

ولا تفي كلمات الشكر والعرفان بحق من كان لي خير عون وسند لإتمام دراستي زوجي الحبيب

الخلاصـــــة Summery

أجريـــت هذه الدراســـة للتحـــري عـــن تـــأثير فعـــالية المستخلصـــات النباتية للشـــاي الأخضر *Camellia sinensis* والقرفة *Cinnamomum* والحناء *Lawsonia inermis* على بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* المنتجة للغشاء الحياتي Biofilm و المعزولة من مرضى الحروق الراقدين في مستشفى مدينة الإمام الحسين (ع) الطبية في محافظة كربلاء المقدسة و في المدة الزمنية من كانون الأول 2017 و لغاية شباط 2018 و تقييم الفعالية المثبطة للمستخلصات النباتية الشاي الأخضر والقرفـــة والحنـــاء و تحديـــد قيمـــة التركيـــز المثبط الأدنى (MIC) و قيمة التركيز القاتل الأدنى (MBC) . حيث تم جمع 118 مسحة من جلود مرضى الحروق وقد شخصت المستعمرات النامية في مختبر الأحياء المجهرية في نفس المستشفى بالاعتماد على عدد من الاختبارات الكيموحيوية إذ أمكن تشخيص 50 عزلة سريرية لبكتريا *Pseudomonas aeruginos* وأكد التشخيص باستخدام تقنية API 20 E في مختبر الصحة العامة في محافظة كربلاء وللحصول على نتائج أكثر دقة تم التشخيص واختبار حساسيتها للمضادات الحياتية باستخدام تقنية جهازVITEK – 2 COMPACT SYSTEM المطورة .

قد أظهرت نتائج التشخيص أنها بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* بنسبة 99%. وأظهرت نسبة 78% أي 39 عزلـــة من أصـــل 50 عزلـــة مقاومة عاليـــة لمضـــادات الحياتيـــة Trimethopim / Sulfamethoxazole , Minocycline, Pefloxacin , ciprofloxacin ,Tobramycin , Gentamicin , Amikacin ,Meropenem , Imipenem , Cefepime , Ceftazidime , Piperacillin ,Ticarcillin/Clavulanic Acid , Ticarcillin و نسبة 22% اي 11 عزلة من أصل 50 عزلة أظهرت حساسية تجاه المضاد الحياتي Colistin .

كمـــا وتـــم الكشف عـــن قـــابليـــة البكتريـــا في إنتـــاج الغشـــاء الحيـــاتي Biofilm بختبـــــــار Congo red agar (CRA) و كانت نسبة العزلات البكتيرية المنتجة للغشاء الحياتي القوي 66% أي 33 عزلة من أصل 50 في حين إن نسبة العزلات منتجة للغشاء الحياتي المتوسط 12% أي ستة عزلات من أصل 50 و نسبة العزلات المكونة للغشاء الحياتي الضعيف 22% أي 11 عزلة من أصل 50 ، و اظهرت إن 39عزلة المكونة للغشاء الحياتي تمتلك مقاومة عالية ضد المضادات الحياتية.

كمـــا تـــم الكشف عن قابلية البكتريـــا في تكوين الغشـــاء الحياتـــي بختبـــــار الصفائـــح المعـــــــــايرة Microtiter plate (MTP) وكانت نسبة إنتاج الغشاء الحياتي القوي 80% أي 40 عزلة من أصل 50 عزلة و نسبة إنتاج الغشاء الحياتي المتوسط 6% أي ثلاثة عزلات من أصل 50 عزلة و نسبة إنتاج الغشاء الحياتي الضعيف 14% أي سبعة عزلات من أصل 50 عزلة .

ثم تم تقيم الفعالية المثبطة للمستخلص المائي البارد والحار و مستخلص كحول الايثانول لنبات الشاي الأخضر والقرفة والحناء بالتراكيز (100 ، 75 ، 50 ، 25) ملغم/مل و أوضحت النتائج أن مستخلص الايثانول الكحولي كان الأفضل بشكل ملحوظ من المستخلص المائي حيث أن بكتريـا *P.aeruginosa* المعزولة من جلود مرضى الحروق لم تبدِ أي حساسية تذكر تجاه المستخلصات المائية بينما أبدت البكتريا حساسية اتجاه مستخلصات كحول الايثانول للشاي الأخضر والقرفة في التراكيز الأربعة .

أظهـر التركيز 100ملغم/مل أعلى قطـر تثبيط بلغ (16.21,11.85)ملم على التوالي لصالح القرفة بينما أظهرت البكتريـا حساسيتها اتجـاه مستخلص كحولي الايثانـول للحنـاء بتراكيز(100 ، 75) ملغم/مل فقط وقد أظهر التركيز 100 ملغم/مل أعلى قطر تثبيط بلغ (7.98)ملم لصالح القرفة و الشاي الأخضر.

كما تم تحديد قيمة MIC و MBC لمستخلصات كحول الايثانول للشاي الأخضر و القرفة و الحناء، لكل من العزلات البكتيرية التي تنتج الغشاء الحياتي القوي والغشاء الحياتي المتوسط و الغشاء الحيـاتي الضعيف و قد بلغت قيمة تراكيـز MIC (75،65،65) ملغم/مل ، (40،35،35) ملغم/مل ، (35،25،25) ملغم/مل و بلغت قيمة تراكيز MBC (85،75،75) ملغم/مل ، (50،45،45) ملغم/مل ، (45،35،35) ملغم/مل على التوالي.

وفي ضوء ما قدمته الدراسة الحالية نستنتج أن مستخلص كحول الايثانول لنبات الشاي الأخضر و القرفة و الحناء أفضل بكثير من المستخلص المائي البارد والحار لنفس النباتات و يمتلك فعالية تثبيط ضد بكتريا *p. aeruginosa* المكونة للغشاء الحياتي و المعزولة من جلود مرضى الحـــروق و أن مستخلص كحول الايثانول للقرفة أظهر فعالية أفضل من مستخلص كحول الايثانول للشاي الأخضر و مستخلص كحول الايثانول للشاي الأخضر أظهر فعالية أفضل من مستخلص كحول الايثانول للحناء في تثبيط نمو بكتريا *P.aeruginosa* كما أن فعالية المستخلصات تزداد بزيادة التركيز.

قائمة المحتويات

List of contents

ت	الموضوع	ص
1	الخلاصة	I
2	المحتويات	III
3	قائمة الجداول	VIII
4	قائمة الأشكال	IX
5	قائمة المختصرات	X
	الفصل الأول	
1	المقدمة	1
	الفصل الثاني	
2	استعراض المراجع	3
1-2	الحروق و أنواعها	3
1-1-2	الحروق من الدرجة الأولى	3
2-1-2	الحروق من الدرجة الثانية	3
3-1-2	الحروق من الدرجة الثالثة	4
4-1-2	الحروق من الدرجة الرابعة	4
2-2	أسباب الحروق	5
3-2	تلوث الحروق بالأنواع البكتيرية	6
4-2	بكتريا الزائفة الزنجارية *P.aeruginosa*	7
1-4-2	تصنيف بكتريا *P.aeruginosa*	9
2-4-2	أمراضية بكتريا *P.aeruginosa*	9
3-4-2	عوامل الضراوة لبكتريا *P.aeruginosa*	10
4-4-2	مقاومة البكتريا للمضادات الحياتية	16

5-2	نبات الشاي الأخضر	18
6-2	نبات القرفة	20
7-2	نبات الحناء	22
	الفصل الثالث	
3	المواد وطراق العمل	24
1-3	الأجهزة و الأدوات المستعملة في الدراسة	24
2-3	المواد الكيميائية المستعملة في الدراسة	26
3-3	الأوساط الزرعية المستعملة في الدراسة	27
4-3	تصميم الدراسة	28
5-3	طرائق العمل	29
1-5-3	جمع العينات	29
2-5-3	زرع العينات	29
3-5-3	الأوساط الزرعية الجاهزة	29
4-5-3	الأوساط الزرعية المحضرة	29
1-4-5-3	وسط أحمر الكونغو CRA	29
2-4-5-3	وسط تربتكيز الصويا كلوكوز 1%	30
3-4-5-3	وسط الحركة	30
5-5-3	المحاليل المستخدمة و الكواشف	30
1-5-5-3	محلول ثابت العكورة القياسي	30
2-5-5-3	محلول الملحي الفسيولوجي	30
3-5-5-3	محلول داري الفوسفات الملحي	30
4-5-5-3	محلول اليوريا	31
5-5-5-3	كاشف الكتاليز	31
6-5-5-3	كاشف الأوكسديز	31

7-5-5-3	كاشف كوفاكس	31
8-5-5-3	كاشف أحمر المثيل	31
9-5-5-3	كاشف فوكس بروسكاور	31
6-3	التعقيم	32
7-3	التشخيص	32
1-7-3	الصفات المظهرية	32
2-7-3	الفحص المجهري	32
3-7-3	الاختبارات الكيموحيوية	32
1-3-7-3	اختبار تحلل الدم	32
2-3-7-3	اختبار انزيم الكتاليز	33
3-3-7-3	اختبار الاوكسديز	33
4-3-7-3	اختبار الاندول	33
5-3-7-3	اختبار أحمر المثيل	33
6-3-7-3	اختبار الفوكس بروسكاور	33
7-3-7-3	اختبار استهلاك السترات	34
8-3-7-3	اختبار إنتاج انزيم اليوريز	34
9-3-7-3	اختبار الحركة و النمو عند درجة الحرارة 42م°	34
10-3-7-3	اختبار KilgleŕS Iron test وتكوين H_2S	34
11-3-7-3	اختبار الستريميد	35
12-3-7-3	التشخيص بتقنية API 20 E	36
13-3-7-3	التشخيص و اختبار حساسية المضادات الحياتية بتقنية جهاز فايتك VITEK-2	36
8-3	حفظ العزلات لمدة طويلة في الكليسيرول (Glycerol)	36
9-3	التحري عن قابلية البكريا *P.aeruginosa* لتكوين الغشاء الحياتي	36

1-9-3	طريقة أحمر الكونغو (CRA)	36
2-9-3	طريقة الصفائح المعايرة (MTP)	37
10-3	جمع العينات النباتية	38
11-3	تحضير المستخلصات النباتية	38
1-11-3	تحضير المستخلص المائي البارد و الحار للشاي الأخضر و القرفة و الحناء	38
2-11-3	تحضير مستخلص الايثانول الكحولي للشاي الأخضر و القرفة و الحناء	38
3-11-3	تحضير تراكيز المستخلصات النباتية المائي البارد والحار و الكحولي لنباتات الشاي الأخضر و القرفة والحناء	39
12-3	اختبار مدى حساسية بكتريا *P.aeruginosa* للمستخلص المائي البارد والحار و المستخلص الكحولي للشاي الأخضر و القرفة و الحناء	40
1-12-3	طريقة الانتشارمن الحفر	40
2-12-3	اختبار التركيز المثبط الأدنى (MIC) والتركيز القاتل الأدنى (MBC) لمستخلص الايثانول الكحولي للشاي الأخضر و القرفة والحناء	41
13-3	التحليل الاحصائي	42
	الفصل الرابع	
4	النتائج والمناقشة	43
1-4	العزل و التشخيص	43
2-4	الفحوصات المظهرية و الكيموحيوية	44
3-4	تشخيص بكتريا *P.aeruginosa* باستخدام تقنية نظام API 20 E	48
4-4	تشخيص البكتريا و اختبار حساسية العزلات البكترية للمضادات الحياتية باستخدام تقنية VITEK-2	49
5-4	قابلية البكتريا على إنتاج الغشاء الحياتي بختبار أحمرالكونغو(CRA)	51
6-4	قابلية البكتريا على إنتاج الغشاء الحياتي بختبار الصفائح المعايرة الدقيقة (MTP)	54

7-4	تقدير الفعالية التثبيطة للمستخلص المائي البارد والحار لنباتات الشاي الأخضر و القرفة و الحناء على نمو بكتريا *P. aeruginosa* بطريقة الانتشار من الحفر	**56**
8-4	تقدير الفعالية التثبيطة للمستخلص الكحولي لنباتات الشاي الأخضر و القرفة والحناء على نمو بكتريا *P. aeruginosa* بطريقة الانتشار من الحفر	**58**
9-4	تقيم التركيز المثبط الأدنى (MIC) و التركيز القاتل الأدنى (MBC) لمستخلص الايثانول الكحولي لنباتات الشاي الأخضر و القرفة و الحناء	**65**
	الفصل الخامس	
5	الأستنتاجات و التوصيات	**67**
	الأستنتاجات	**67**
	التوصيات	**68**
	الملاحق	**69**
	المصادر	**71**
	المصادر العربية	**71**
	المصادر الأجنبية	**73**

قائمة الجداول

List of Tables

ت	الموضوع	ص
1-3	الأجهزة المختبرية	24
2-3	الأدوات المختبرية	25
3-3	المواد الكيميائية و البيولوجية المستعملة	26
4-3	الأوساط الزرعية	27
1-4	نتائج الاختبارات الكيموحيوية لعزلات بكتريا *P.aeruginosa*	47
2-4	الفروقات في معدلات أقطار التثبيط و التركيز للمستخلصات الكحولية لنباتات الشاي الأخضر و القرفة و الحناء	60
3-4	الفروقات في معدلات أقطار التثبيط و التركيز للمستخلصات الكحولية لنباتات الشاي الأخضر و القرفة والحناء في حالة الغشاء الحياتي القوي	61
4-4	الفروقات في معدلات أقطار التثبيط و التركيز للمستخلصات الكحولية لنباتات الشاي الأخضر و القرفة و الحناء في حالة الغشاء الحياتي المتوسط	62
5-4	الفروقات في معدلات أقطار التثبيط و التركيز للمستخلصات الكحولية لنباتات الشاي الأخضر و القرفة و الحناء في حالة الغشاء الحياتي الضعيف	63

قائمة الاشكال

List of Figures

ت	الموضوع	ص
1-3	المحاور الرئيسية للبحث	28
2-3	مستعمرات بكتريا *p.aeruginosa* تظهرتوهج أخضر متألق على وسط الستريميد Cetrimide agar	35
1-4	مستعمرات بكتريا *P.aeruginosa* على وسط اكار الدم Blood agar	45
2-4	مستعمرات بكتريا *P.aeruginosa* على وسط اكار المغذي Nutrient agar	45
3-4	مستعمرات بكتريا *P.aeruginosa* على وسط اكار الماكونوكي MacConkey agar	46
4-4	اختبار Kligler´s Iron agar لبكتريا *P.aeruginosa*	46
5-4	تشخيص بكتريا *P.aeruginosa* بتقنية API 20 E	48
6-4	مستعمرات بكتريا *P.aeruginosa* المنتجة للغشاء الحياتي القوي بختبار (CRA)	52
7-4	مستعمرات بكتريا *P. aeruginosa* المنتجة للغشاء الحياتي المتوسط و الضعيف و القوي بختبار (CRA)	53
8-4	مستعمرات بكتريا *P.aeruginosa* الغير منتجة للغشاء الحياتي و المنتجة للغشاء الحياتي القوي بختبار (CRA)	53
9-4	بكتريا *P.aeruginosa* المنتجة للغشاء الحياتي بختبار (MTP)	55
10-4	عدم فعالية المستخلصات المائية ضد بكتريا *P.aeruginosa*	57
11-4	تأثير المستخلصات الكحولية لنباتات الشاي الأخضر و القرفة و الحناء حسب نوع المستخلص و تركيزه و معدلات اقطار التثبيط	64
12-4	أقطار تثبيط مستخلص كحول الايثانول للقرفة ضد بكتريا *P. aeruginosa*	66
13-4	التراكيز المحضرة لمستخلص الشاي الأخضر لإيجاد قيمة MIC MBC ضد بكتريا *P.aeruginosa*	66

قائمة المختصرات

List of Abbreviations

Terms المصطلح	Symbolالمختصر
Pseudomonas aeruginosa	***P.aeruginosa***
Staphylococcus aureus	***S.aureus***
Salmonella Typhi	***S.Typhi***
Escherichia coli	***E.coli***
Minimum Inhibitory Concentration	**MIC**
Minimum Bactericidal Concentration	**MBC**
Congo red agar method	**CRA**
Microtiter plate method	**MTP**
Analytical profile Index	**API**
Dimethyl Sulfoxide	**DMSO**
Carbone dioxide	**CO2**
Methyl red Vogaus proskaure	**MR-VR**
Normal Saline	**N.S**
Phosphate-Buffer Salin	**PBS**
Power of Hydrogen	**PH**
Epigallocatechin gallate	**EGCG**
Optical density	**OD**
Least significant difference	**LSD**
Centers for Disease Control and prevention	**CDC**
Volume: Weight	**V:W**

الفصـــل الأول

المقدمة

الفصـــل الأول

1- المقدمـة Introduction

تعــد بكتريــا *Pseudomonas aeruginosa* النــوع الأكثر شيـوعاً بين الأنواع التابعة لجنس الزوائف و تشكل النسبة الأعلى لإحداث الإصابة بين المرضى الراقــدين بالمستشـفيــات خصوصاً المرضى المصابين بنقص المـنـاعــة المكتسبــة (الأيدز) (Mahmoud *et al.*,2013) و مـرضى السرطــان و المــرضى الذيـن يعــانون مــن أخماج الجــروح و الحروق (Elmanama *et al* ., 2013) ، كما أن هذه البكتريا لها القدرة على غزو و استيطــان أنسجة الجســم و دخـــول جهاز الدوران مسببة تجرثــم الــدم (Sambyal *et al* ., 2017) .

كما تعد بكتريا *P. aeruginosa* من الأحياء المسببة للكثير من الأخماج ، ويمكن عزلها من البيئات الرطبة مثل : التربة ، الماء ، و قنوات تصريف المياه و تستطيع العيش و النموعلى الأنسجة النباتية و الأنسجة الحيوانية ، وقد تلاحظ نامية حتى في الماء المقطر مما يدل على احتياجاتها الغذائية المحدودة كمــا تعد من الفلورا الطبيعية حيث توجد في القناة الهضمية و الجزء العلوي للقناة التنفسية عند الإنسان (إبراهيم و أنور،2007) و تمتاز هذه الأحياء المجهرية بالمقاومة العالية للمضادات الحياتية و المواد المعقمة و المطهرات و العوامل الفيزيائية مثل : الرطوبة،الجفاف،الحرارة ،ولكون هذه البكتريا من الكائنات الانتهازية فهي تشكل خطراً حقيقياً لامتلاكها آليات أيضية عالية لمقاومة للمضادات الحياتية و التي تتمثل بقدرتها على انتاج الغشاء الحياتي (Sambyal *et al* ., 2017) من جهة و إنتاج انزيمات قادرة على كسر جزيئات المضادات الحياتية و تحويلها إلى مواد غير فعالة من جهة أخرى و غيرها من عوامل الضراوة التي تتسبب بعدم فاعلية المضادات الحياتية في علاج المسببات المرضية .(Barrios *et al*., 2014)

كما تعد هذه البكتريا السبب الرئيسي في زيادة الاعتلال و زيادة نسبة الوفيات بين مرضى الحروق (Armour *et al*.,2007) لما لها من قدرة فائقة على تطوير عوامل ضراوتها و ظهور السلالات المقاومة بسبب الاستعمال الخطأ للمضادات الحياتيــة (Belb *et al*.,2013) إذ اتضــح مــن الدراســات الســابقــة أن بكتريا *P.aeruginosa* السببُ الرئــيسُ لأخماج الحـــروق و التـــي أودت بحيـــاة الكثيـــر مــن مرضى الحــروق وتأتـــي بعـــدها بكتريـــا *Staphylococcus aureus* بـــالدرجـــة الثـــانيـــة فـــي أخمـــــــاج الحـــــروق (Abbasi *et al* .,2013) .

يعد الغشاء الحياتي Biofilm الذي تنتجه بكتريا الزوائف الزنجارية المعزولة من جلد مرضى الحروق أحد أهم عوامل الضراوة المقاومة للبكتريا حيــث يتكون مــن مستعمرات دقيقة محاطة بمتعدد سكريات تنتجه *P.aeruginosa* ويكــون هـــذا الغشـــاء محب للماء Hydrophilic فالمـــاء هو المكون السائد فيه، و يكون الدرع البكتيري الحصين لمقاومة الاستجابة المناعية للمضيف والمضادات الحياتية وغزو الأنسجة الرخوة و الجلد لذلك تعد

الأنسجة المصابة بالحروق بيئة مُثلى للاستيطـان و نمـو وتكاثـر البكتريـا مسببـةً لأخماج الحروق الخطيرة(Schwaber *et al* .,2004).وقـد يصل دور الغشـاء الحياتي إلى نسبة 65% مـن الإصابات البشرية و يكون من الصعب جداً القضاء عليها بالمضادات الحياتية الشائعة و المعقمات (Malone and Swanson 2017).

توجـد عـدة اختبـارات للكشف عـن وجـود الغشـاء الحيـاتي منها اختباروسط أحمر الكونغو Congo red agar (CRA)، (Hassan *et al*.,2011) و اختبار الصفائح المعايرة Microtiter plate method (MTP) (Rukayadi and Hwang , 2006).

تم اختيار هذا النوع من البكتريا للدراسة بسبب انتشارها الواسع و مسؤوليتها عن إصابات شديدة متنوعة بين المرضى الراقدين في المستشفيات بشكل عام و الراقدين في ردهة الحروق بشكل خاص لما تسببه من أخماج خطيرة قد تؤدي بحياة المريض (Hoban *et al* ., 2013).

استخدمت في الآونة الأخيرة النباتات الطبية Green medcin كونها منتجات طبيعية و مصدر جيد للعديـد من المضـادات الحياتيـة و امتلاكهـا فعاليـة حياتيـة ضـد الأحيـاء المجهريـة الدقيقـة و يعزى ذلك كـون هذه النباتـات غنيـة بعدة أنـواع من المـركبات مثل التانينـات Tannin، التربينـات Terpenoids ، الفلافونـات Flavonoids و القلويـدات Alkaloids و غيـرها و التـي تتميـز بخصائـص مضادة للأحيـاء المجهرية الدقيقـة و لقلـة إلاثـار الجانبيـة في استخدمها على عكـس المضـادات الحياتيـة التي قـد تؤثـر علـى الكَلية و الكبـد و تسبـب الحساسيـة او الاسهـال (Sadeghin *et al* ., 2011).

لذلك جاءت هذه الدراسة و التي تهدف الى ايجاد البدائل الأكثر فعالية ضد البكتريا و الأقل ضررعلى المرضى من خلال اختبار الحساسية التضادية لبكتريا *P.aeruginosa* المكونة للغشاء الحياتي و المعزولة من جلود مرضى الحروق للنباتات الشاي الأخضر و القرفة والحناء من خلال المحاور التالية :-

1- **عزل و تشخيص بكتريا *P.aeruginosa* من جلود المرضى الراقدين في ردهة الحروق.**
2- **اختبار حساسية البكتيريا لبعض المضادات الحياتية .**
3- **اختبار قابليتها على إنتاج الغشاء الحياتي Biofilm .**
4- **تقدير فعالية المستخلصات النباتية من الشاي الأخضر و القرفة و الحناء على بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* المكونة للغشاء الحياتي و المعزولة من جلود مرضى الحروق .**
5- **تقدير قيمة التركيز المثبط الأدنى MIC و التركيز القاتل الأدنى MBC من المستخلصات.**

الفصـــل الثانـي

استعراض المراجع

Literature Review

2- أستعراض المراجع Literature Review

2-1- الحروق و انواعها

تعــد الحــروق نــوع مــن الإصابــات التي تحدث في النسيج الجلدي أو العضلي و يكون المسبب إما الحرارة أو المواد الكيمائية أو الكهرباء أو الاحتكاك أو الإشعاع و ينجم عن كل عامل مسبب نتائج خاصة قد تتطلب قدر كبير من الوقت و الجهد و المستلزمات العلاجية في المستشفى (Neelam *et al* ., 2004). وتتجلى أولى الظواهر التي تهدد حياة المصاب في اضطراب المسلك الهوائــي إثـر استنشـاق الهواء الساخن و الدخان إضافـةً إلى الأخطار اللاحقة المهددة للحياة المتمثلة بخفض حجم الدم Hypovolaemic والإنتان وما يعقبها من تأثيرات مرضية فيزيولوجية معقدة بعد الإصابة . و تقترن إصابات الحروق بعدد وافر من المضاعفات طول فترة المرض و العلاج و تعدد العمليات الجراحية و كثرة الطلب على المعدات و المواد العلاجية كما تتطلب وقت عمل طويل وجهد من الأطباء و الممرضين(Chai *et al* ., 2000).

حيث تصنف أنواع الحروق إلى اربع درجات :-

2-1-1- الحروق من الدرجة الأولى والتي تحدث في الطبقة السطحية من الجلد وتسبب التهاباً سطحياً للجلد في الطبقة الخارجية Epidermis مع آلم و احمرار و تورم بسيط و يشعر المصاب بآلام عند لمس المنطقة المصابة ويحدث الشفاء خلال مدة تصل الى أسبوع لعدم وجود ضرر كبير أو تغير فسيولوجي للجلد في الغالب وتصنف حروق أشعة الشمس عادةً من الدرجة الأولى وفي هذه الحالة لا يحتاج المصاب لضمادات وينصح المريض بالابتعاد عن المسبب و وضع كمادات باردة (Lauphland . , *et al* 2005).

2-1-2- الحروق من الدرجة الثانية تكون أكثر عمق وتشمل الضرر في طبقتي البشرة Epidermis و الأدمة Dermis التي تحتوي على الكولاجين و الألياف المرنة حيث مستقر الخلايا العصبية و الأوعية الدموية والغدد العرقية وجذور الشعر و يظهر على جلد المصاب فقاعات أو بثور و حدوث التهابات مع آلام و احمرار بسبب حدوث تلف في أجزاء من نهايات الأعصاب وتتفاوت شدة آلالم حسب مساحة المنطقة المصابة ويحتاج فيها المريض إلى العلاج في المستشفى و خاصة إذا كانت تشمل الوجه والأطراف وهذا النوع من الحروق لا يحتاج إلى عمليات ترقيع و تعالج بمراهم ضد الالتهابات و قد تترك أثراً في جلد المصاب بعد أن تلتئم . (Hardwicke , 2012; Schwaber .,*et al* 2004)

2-1-3- الحروق من الدرجة الثالثة وهي أخطر وأشد الحروق حيث تكون الحروق عميقة جداً و دُمِرَت فيها جميع طبقات الجلد بما فيها بصيلات الشعر و الأعصاب و العضلات وأغلب غدد وخلايا الجلد وهي حروق مؤلمة للغاية وقد يفقد المريض إلاحساس بالألم نتيجة للتلف الحاصل في المستقبلات الحسية والنهايات العصبية و تحتاج هذه الدرجة من الحروق إلى عمليات ترقيع بعد أن يزال الجلد المتضرر (Neelam ., *et al*2004).

2-1-4- الحروق من الدرجة الرابعة تعد هذه الدرجة من الحروق الأصعب و الأخطر وقد تؤدى بحياة المصاب وتُحدث التلف الأكبر حيث تصل إلى العضلات و العظام وإلى جميع طبقات الجلد و تعالج هذه الدرجة من الحروق ببتر الأطراف المتضررة و عمليات تجميلية كبرى (Lauphland *et al* ., 2005)

وقد تتطور أنواع الحروق من درجة الى أخرى خلال عدة ساعات فتتحول حروق الدرجة الأولى إلى الدرجة الثانية كما هو الحال في الحروق الناتجة من التعرض إلى أشعة الشمس لفترات طويلة والتي ستكون بثرات في اليوم التالي من الإصابة ، وكذلك بالنسبة لحروق الدرجة الثانية قد تتحول إلى حروق من الدرجة الثالثة (Lauphland ., *et al* 2005)

وبما أن الجلد يعد الخط الدفاعي الأول للجسم ضد الميكروبات فهذا يعني أن الحروق بكافة أنواعها تمثل التهابات و تراكم السوائل بشكل فقاعات حول المنطقة المصابة بالحروق و داخلها يَزيد من احتمال الإصابة بعدوى من خلال المنطقة المصابة أو أي جزء آخر من الجسم.

ومن الجدير بالذكر أن البشرة تمتلك القدرة على التجدد والشفاء من الإصابة إذا كانت من الدرجة البسيطة ،أما إذا امتدت الحروق أعمق من ذلك فإن الإصابة الناتجة ستترك أثراً و مضاعفات ولا تسمح لعودة الجلد للوظيفة الطبيعية مرة أخرى.

من الضروري معرفة نسبة المنطقة المصابة من مساحة الجسم الكلية و تستخدم لهذا الغرض قاعدة تسمى قاعدة التسعة حيث إن هذه النسبة مبنية على أن كل جزء من أجزاء الجسم ممثلاً 9% من مساحة سطح جسم البالغ لتشكل في النهاية مجموع 100% فالرأس يمثل 9% الصدر 9% والبطن 9% الظهر و الأرداف تمثل 18% وكل ذراع و كف تمثل 9% العانة تمثل 1% وكل ساق تمثل 18% فعلى سبيل المثال إذا شملت الحروق كلتا الساقين و العانة و الصدر والبطن فإن هذا يمثل نسبة 55% من مساحة سطح الجسم ، وفي حالة كون نسبة المنطقة المصابة تزيد عن 15% إلى 20% من مساحة الجسم سيفقد الجسم كمية كبيرة من

السوائل تؤدي إلى حدوث صدمة في حالة عدم تعويض الجسم بكمٍّ كافٍ من السوائل عبر الأوردة (Neelam .,*et al* 2004).

2-2- أسباب الحروق

هـــناك أسبـــاب متعددة لحـدوث الحروق منهـــــا حـــراريـــة ، كيميائيـــة ، كهربائيـــــة ، إشعاعيـــة و الاحتكاك (Kowalski .,*et al* 2008) حيث أكدت بحوث أُجريت في الولايات المتحدة الأمريكية أن اكثر أسباب الحروق هي النار و اللهب بنسبة 44% أما أقلها هي حروق المواد الكيميائية بنسبة 3% (Forjuoh ., 2006) . اما بالنسبة للدراسات المحلية فقد سجلت اكثراسباب للاصابة بالحروق هي الكهرباء بنسبة 32% و اقلها هي حروق المواد الكيميائية بنسبة 1% (كريم ، 2007) .

وتتلخص أسباب الحروق فيما يلي

1. الحروق بسبب الحرارة حيث تحدث بسبب النيران ، البخار، الأجسام الساخنة أو السوائل الساخنة وتعد الحروق الناتجة عن السوائل الساخنة هي الأكثر شيوعاً خاصة بين الأطفال .
2. الحروق الكيمائية التي تحدث بسبب التعرض إلى المواد الكيمائية الصناعية سواء كانت على هيئة صلبة ، سائلة ، أو غازية.
3. الحروق الكهربائية و تنتج عن الاتصال بالمصدر الكهربائي أو عن طريق التعرض للصواعق و البرق و تصنف الإصابات الكهربائية بحروق الفولت العالي أكبر من أو يساوي 1000 فولت.
4. الحروق الاشعاعية وتحدث بسبب التعرض إلى أشعة الشمس القوية لفترات طويلة أو الأشعة السينية أو بسبب العلاج الإشعاعي لمرضى السرطان.
5. حـروق الاحتكـاك تحـدث بسبب الاحتكاك بالأسطح الصلبة مثل الطرقات ، السجاد اوأسطـح الأرضيـات الخشنـة و تكـون عـادةً عبـارة عـن كشط و حروق حرارية (Lloyd *et al* ., 2012).

2-3- تلوث الحروق بالأنواع البكتيرية

أصبح تلوث إصابات الحروق بالأنواع البكتيرية من المسائل الشائعة والمستعصية في ردهات الحروق وهي السبب لارتفاع نسبة الوفيات بين مرضى الحروق (Ali *et al* ., 2015) . فبعض الأحياء المجهرية لها القدرة على استعمار الخلايا الجلدية المتضررة من خلال ارتباطها بمواقع الارتباط بالبشرة مثل الإصابات الجلدية التي تحدث عند تحطم الآليات الدفاعية للجلد (Dale and Federman , 2003). حيث أن الحروق في البدء تكون غير ملوثة بالأحياء المجهرية ولكن تتطور فيما بعد إلى التهابات متعددة بعد ساعات قليلة (Kearns *et al .,* 2013) بسبب تلوث الحروق بالأنواع البكتيرية المختلفة خاصة البكتريا السالبة لصبغة كرام فهي السائدة وغالباً ما تكون بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* (Malik *et al . ,* 2003) .

قد تمتلك الأنواع البكتيرية الملوثة للحروق عوامل ضراوة تلعب دوراً خطيراً في زيادة إمراضيتها (Brooks *et al* . , 2001). إذ تمتلك معظمُ أفراد البكتريا السالبة لصبغة كرام وفي مقدمتها العائلة المعوية و الزوائف الزنجارية عوامل ضراوة متعددة تمكنها من غزو الانسجة المتضررة بالحروق وفي حالة عدم الالتصاق فإنها سوف تزال بواسطة المخاط و السوائل الأخرى التي تغسل سطح النسيج(Rook *etal.*,2010). في حالات الحروق الخطيرة قد تتمكن البكتريا الملوثة للحروق في الوصول إلى مجرى الدم دون ملاحظة أي إصابات موضعية وهذا ما يعرف بتجرثم الدم الابتدائي (primary bacteremia). وفي حالة وصول الأحياء المجهرية إلى مجرى الدم مع ملاحظة علامات سريرية فهذا يعرف بتجرثم الدم الثانوي (secondary bacteremia). أما إنتان الدم (septicemia) فيحدث عند الفشل العضوي المتعدد المرتبط بالالتهابات الجهازية (Dale and Federman ,2003). وقد أثبتت بعض البحوث السابقة أن أعلى نسبة لتلوث الحروق تعود لبكتريا *P. areuginosa* تليها بكتريا *Klebsiella spp*. العكيلي (2002) .أما مبارك و آخرون (2002) فقد أثبت أن أعلى نسبة مئوية ملوثة لحروق بكتريا *S.aureus* . بينما بينت بحوث اخرى ان اعلى نسبة لتلوث الحروق كانت بكيريا *Enterobacter spp.* ثم بكتيريا *P.aeruginosa* ثم بكتيريا *S.aureus* لامتلكها عوامل ضراوة لها دور في زيادة إمراضيتها من هذه العوامل إنتاجها العديد من الانزيمات ذات

الطبيعة البروتينيـــة و قدرتهـــا علـــى إنتـــاج الغشاء الحيوي العزاوي وآخرون (2007). أما Oncul و آخرون (2002)، فقد أثبت أن بكتيريا *P.aeruginosa* تأتي بالمرتبة الأولى لإحداث أعلى نسبة تلوث في الحروق خاصة حروق الدرجة الثانية و الدرجة الثالثة بسبب التلف الحاصل في طبقات الجلد أما بكتيريا *S.aureus* تأتي بالدرجة الثانية في إحداث تلوث الحروق كما اكدت دراسة محلية إن بكتريا *P. aeruginosa*هي السبب الرئيسي في اخماج الحروق ثم بكتريا *S. aureus* ممـا يـؤدي إلى تطورها إلـى أخمـاج خطيـرة قـد تـؤدي بحيـاة المريـــض (سوزان و ختام ، 2017).

2-4- بكتريـــا الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa*

تعد هذه البكتريا من الأحياء المجهرية الانتهازيـة فهي تمثل خـطر حقيقـي للمـرضى الراقـدين في المستشفيات و خاصة مرضى الحروق و المصابين بنقص المناعة المكتسبة و المثبطين مناعياً وذلك لانتشارها الواسع في البيئة فضلاً عن تـــعدد عـــوامل الضراوة التي تمتلكها (Cornelis *et al.*,2008). و تـعود هذه البكتريـا إلى جنـــس *Pseudomonas* ضمن العائلـة Pseudomonadaceae، التي تضم أجناس متعددة أخرى أهمها *Azomonas* ، *Azotolocter* ، *Cellvilorio*، *Mesophilobacter* ، *Rhizobacter* ، *Rugamonas* رتبت الأنواع التابعة لجنس *pseudomonas* في خمس مجاميع بكتيرية ويعـود النـوع *P.aeruginosa* إلـى المجموعـة الأولـى مـن نظـام التصنيـف الثنائـي والتـي تضـم اثنـي عشـر نوعـاً آخـرَ (Bergy and Holt. ،1994).

وهي بكتريا سالبـة لصبغة كـرام ، بشكل عصيـات متحـركة بواسطـة سوط منفـرد وحيد Unipolar flagellum أبعادها تتراوح بين (0.5 – 0.8) و (1.5 – 3) مايكرومتر ولا تكون سبورات ، درجة الحرارة المـــثلى لنموهـــا هي 37 مْ ، ولها القدرة على النمو عند درجة حرارة 42 مْ. و هذا ما يميزها عن بـــقية الأنـــواع الأخرى لنفس الجنس و تكون غير قادرة على النمو عند درجة حرارة 5 مْ . كما أنها تنمو في كافة الأوســـاط الزراعية بدون الحاجـة إلى متطلبات غذائية معقدة كما يمكنها العيـش بعـض الاحيـان فـي المـاء المقطر (Todar . , 2009) . و تشخص بصورة أولية من خلال رائحتها المميزة والمشابهة لرائحة العنب المتعفن وتظهر المستعمرات بلون أخضر مزرق على وسط الاكار المغذي الصلب و على الوســـــــط الزرعي اكار الدم ببريق معدني و بعض مستعمراتها تعمل على

تحلل الدم كاملاً من نوع بيتا β (Sherris *et al*. , 2010) . أما على وسط الماكونكي تظهر شاحبة اللون (Todar *et al* . ,2004) . حيث لها القدرة على انتاج صبغات ملونة ، بلون أخضر مزرق Pyocyanin و متألقة Fluoarescein أو بلون أخضر مصفر وبني محمر Pyorubin. و توصف معظم سلالاتها بأنها إجبارية هوائية Obligote aerobic و بعضها اختيارية لا هوائية Facultativa anaerobs بحيث تستطيع العيش عند حدوث انخفاض جزئي أو كلي للأوكسجين . كما أنها قادرة على النمو في ظروف لا هوائية في حالة توفر النترات NO_3 كمستقبل نهائي للإكترون في السلسلة التنفسية بدلاً من الاوكسجين (Cornelis , 2008). وأشار(Todar , 2004) أن هذه البكتريا تنتج ثلاثة أنواع من المستعمرات ،النوع الأول الطبيعية المعزولة من الماء والتربة تنتج مستعمرات صغيرة سطحها خشن. أما المعزولة سريرياً فتكون منتجة لنوعين الأولى كبيرة ملساء وذات حافات مستوية و مظهر مرتفع ، أما الثانية تكون ذات مظهر مخاطي وغالباً ما تعزل من المجاري البولية و التنفسية ، اما النوع الثالث فيظهر بصورة عامة عكوره من ترسبات ثقيلة في وسط المرق المغذي . ويكون الأس الهيدروجيني المثالي لنمو بكتريا (7.4- 7.6) وتعد هذه البكتريا مؤكسدة في التفاعلات الأيضية غير مخمرة للكاربوهيدات وقد تنتج الحامض في حالة الأكسدة هذه الصفة.قد تستعمل في تميز هذه الأحياء المجهرية عن البكتريا السالبة لصبغة كرام المخمرة في العائلة المعوية وتعمل هذه البكتريا على أكسدة الكلوكوز إلى α- keto glutamic acid و تحلل البروتين وتميع الجيلاتين ولا تنتج الاندول. و كذلك تختزل النترات Nitrate (NO_3) إلى النتريت Nitrites (NO_2)(Cornelis, 2008).

2-4-1 تصنيف بكتريا ***P.aeruginosa***

تم تصنيفها لأول مرة من قبل العالم الالماني Walter migul

(1894) وأحدث تصنيف لها كان من قبل Kahlon ، (2016) .

kingdom : Bacteria

phylum : proteobacteria

Class : Gamma proteobacteria

Order : Pseudomonadales

Family : pseudomonadaceae

Genus : *Pseudomonas*

Species : *aeruginosa*

2-4-2- إمراضية بكتريا ***P.aeruginosa***

تعد هذه البكتـــــــريا من الممرضـــــات الانتهـــــــازية وتفشي العـــــــدوى المكتسبـــة في المستشفيات و بصورة رئيسية في أخماج الجهاز التنفسي و البولي والجروح والحروق (Gawish *et al.*,2013). وكـــــذلك تعـــد مـــن مسببـــات خمـــج المستشفيـــات الحاد والمزمن (chronic and acute nosocomial infections) وخاصة في مرضى ضعف المناعة ، إذ تمتاز بقدرتها على الاستمرار بالحياة باختلاف الظروف البيئية فضلاً عن مقاومتها للعديد من المضادات الحياتية مما يدعمها على الاستيطان و التكاثر داخل النسيج المتضرر بكفـــاءة (Saleh , 2007).

كما أن هذه البكتريا غالباً ما تكون هي المسبب للأمراض الشائعة بين المرضى الراقدين في المستشفى لأكثر من أسبوع و خاصة مرضى الحروق (Fiorillo *et al* . , 2011) وهذا بدورة يؤدي الى حالات الإنتان الجهـــازي (systemic sepsis) والتـــي تســـبب مضاعفـــــات

لمـــرضى الحـــروق تؤدي بحياة المريـض (Cicek *et al* .,2013) حيث بينت دراسات أجريت في محافظة بغداد أن بكتريا *P.aeruginosa* هي المسبب الرئيسي لالتهاب الحروق حيث بلغت نسبة الاصابة بها (48.5 %) إذ وجد أن هذه الإصابة تنتقل عن طريق المستشفى أو الاشخاص العاملين فيها (المحمـــداوي ، خـــولـــة جبـــــر. 2006) واعتماداً على إحصائيات مركز السيطرة المرضية و الوقائية في الولايات المتحدة الأمريكيـــــة Centers for Disease Control and Prevention (CDC) مـــا بيـــن الأعوام (1990 - 1996) بينت بيانات جمعت في أمريكـــا أن بكتريـــا *P. aeruginosa* تأتي فـــي المـرتبة الرابعـــة لمسببـــات تلـــوث جـــروح العمليـــات الجـــراحية و الحـــروق(Fiorillo *et al*., 2011). وتحدث الإصابة بالبكتريا بعد تحطم الجلد المغلف للجسم بسبب الحروق ونضوح بلازمـا الدم لخـارج النسيـــج المتضـــرر و يصبـــح رطباً و يكـــون منبتـاً جيداً لنمـــو و تكاثـــر البكتريـــا ممـــا يؤدي إلى تلوث المنطقة و يؤدي إلى التهاب خلايـــا الأدمـــة و تـحت الأدمـــة و مـــن ثـــم انتشـــارها إلـــى مختلـف أنحـــاء الجسم (Davis *et al* .,2016).

وتعزى إمراضية بكتريا *P.aeruginosa* إلى مقدرتها لغزو أنسجة الجسم و التكاثر فيها إضافة الى إنتاج الذيفانات Toxincs و تتضمن مراحـــل الإصابة بهـذه البكتريـــا ثـــلاث خطوات (Todar ,2008)

A- الالتصاق والاستعمار البكتيري Bacterial attachment and colonization

B- الإصابة أو الغزو الموضعي Local invasion

C- الانتشار الجهازي للمرض Disseminated systemic disease

و تمتلك هذه البكتريا العديد من عوامل الضراوة التي تتداخل مع مراحل الإصابة و التي تمكنها من الاستيطان في جسم المضيف مسببةً له الإمراضية و مقاومة الوسائل الدفاعية الخلوية .

2-4-3- عوامل الضراوة لبكتريا *P.aeruginosa*

A- الغشاء الحياتي Biofilm

يتكون الغشاء الحياتي من مستعمرات دقيقـة محاطـة بمتعدد السكريـدات الخارجي تنتجه البكتريا وصفـه Wimpenny عام 2000 عبـارة عـن تجمعـات بكتريـا تتواجـد فـي

بيئات مختلفة مثل المغذيات الرطبة و السطوح الصلبة و علب حفظ الأغذية و أنابيب توزيع المياه. ويعد العالم Antony Van اول من وضع دلالة تاريخية عن وجود الغشاء الحياتي Biofilm في القرن السابع عشر حيث لاحظ وجود بقع على أسنانه فقام بقشعها و فحصها تحت المجهر فشاهد أحياء دقيقة متراصة بعضها مع البعض الآخر على السطح (Donlan , 2002 ; Kim , 2001) .

يعد الغشاء الحياتي تركيب مكون من مواد مشبعة بوليمير خارج خلوي وقد تتكون من نوع بكتيري واحد أو من انواع عدة وبالتالي تتكون بشكل تجمعات و تلتصق بالأسطح (Kolenbrander *et al* ., 2010 ; Davey *et al* ., 2000). ويكون هذا الغشاء محباً للماء Hydrophilic فالماء يعد المكون السائد فيه والخلايا البكتيرية تتوزع بصورة غير متجانسة في الغشاء الحياتي بسبب تكون المستعمرات الدقيقة .

إن 10- 20% من حجم الغشاء الحياتي خلايا بكتيرية فقط و البقية هو متعدد سكريدات (AL-Garaawy ., 2011) و عادةً ما تكون البكتريا المسببة للأخماج المزمنة لها القابلية على تكوين الغشاء الحياتي ويكون سمك هذا الغشاء متباين ما بين(13-60 ميكروميتر) وسمك الغشاء يعتمد على التوازن بين نمو الغشاء الحياتي و انفصال الكتلة الحية إلى البيئة (Brooks *et al* ., 2004) . كما أن البكتريا المنتجة لهذا الغشاء لها قدرة البقاء على قيد الحياة في ظل الظروف البيئية القاسية وتكون أكثر مقاومة للمضادات الحياتية مقارنةً بالبكتريا غير المنتجة لهذا الغشاء (Mah and Otoole , 2001) .

كما تتمكن البكتريا القادرة على تكوين الغشاء الحياتي Biofilm من تكوينه على جميع الأسطح الحية و غير الحية (Otoole *et al* . ,2000) مثل التربة و المواد الطبيعية بحيث تلتصق البكتريا بواسطة الأهلاب و الشعيرات و الأسواط و كذلك بواسطة Extra-polysccharridde وهو عبارة عن سكريات متعددة و دهون فسفورية و بروتينات وتصل فيها نسبةُ الماء إلى 97% وهو من المكونات الأساسية لطبقة الغشاء الحياتي (Sutherland , 2001).

هناك علاقة وثيقة بين البكتريا المنتجة للغشاء الحياتي واستعمار جسم المضيف و الإقامة فيه من خلال إنتاج بروتينات مرتبطة بالغشاء الحياتي Biofilm associated proteins مما

يساعد على بقاء البكتريـــا حيـــة داخـــل جســـم المـــريض و تحـــدث الاستجابة المناعية لهذا البروتينـــات (Cucarella *et al* . , 2004) .

وبذلك تكون مهمة الغشاء الحياتي هي زيادة قدرة البكتريا ضد المضادات الحياتية و التغيرات البيئية مثل تغيرات الحامضية PH ، درجة الحرارة ، CO_2 و O_2 ،الاشعة فوق البنفسجية و التجمد وكذلك التغير في كمية المواد الغذائية و عمليات الأيض عند التصاق البكتريا بسطح المضيف (Annous *et al* ., 2009, Donaln , 2002).

تحدث عملية تكوين الغشاء الحياتي في عدة مراحل :

- مرحلة التصاق الخلايا الحرة مع خلايا المضيف بواسطة الاهلاب و الشعيرات و الاسواط
- مرحلة التصاق الخلايا البكتيرية مع بعضها البعض و التكاثر و تكوين المستعمرات البكتيرية الدقيقة Microcolonies ثم افراز سكريات خارجية و بروتينات لتكوين الغشاء الحياتي
- مرحلة تمايز المستعمرات إلى تراكيب متمايزة إستمراراً بالتكاثر و تكوين مستعمرات كبيرة Macrocolony التي تتكون أمـا من نفـس نـوع البكتريـا او انواع مختلفة (Brooks *et al*.,2004).

بعدها يتم الانفصال المتمثل بتكوين الغشاء الحياتي الذي يصبح شكلة يشبه العرهون و يستشعر الخلايا البكتيرية بالظـروف غير مناسبة و وجود المضادات الحياتيـة واستعمار سطوح جديدة بشكل مستمر(Kahlon, 2016) و تظهر المستعمرات البكتيرية بمظهر مخاطي نتيجة لإفراز Alginate slim و يلعب الالجينت دوراً مهماً في حماية البكتريا من الحرارة والجفاف و غيرها من الظروف البيئية غير الملائمة إضافةً إلى زيادة الأيض لهذه البكتريا مما يساعد على مقاومة عملية البلعمة و كأنه كبسول او Slim layer (Todar , 2004).

B- الأهلاب pili

تـــراكيب خيطيـــة منـــتشرة علـــى سطـــح الخـــلايـــا لبكتريـــا ، تعمـــل على الإلتصـــاق بالأغشية المخاطيـة Mucous membranes إذ ترتبط بكتريا *P.aeruginosa* بالخلايا

الطلائية ، وان هذا الارتباط يظهر كاتصال بمستقبلات خاصة لـ Sialic acid أو Galactose أو Monnos على أسطح الخلايا الطلائية و توجد عدة انوع من الأهلاب :-

1. الأهلاب الاصقة Adhesion pili التي تستخدمها بعض السلالات البكتيرية لكي تلتصق و تثبيت نفسها بخلايا المضيف ليتسنى لها توفير المواد الغذائية مما يجهلها مسبباً للعدوى المرضية في الإنسان من خلال التصاقها بالخلايا المبطنة للجهازين الهضمي و التنفسي و هذا إلالتصاق يحد من إزاحة البكتريا بتيارات حركة السوئل .
2. الهلب الجنسي Sex pili عددها محدود يتراوح بين 5- 4 لكل خلية يساعد هذا النوع من الاهلاب على انتقال المواد الوراثية بين الخلايا البكتيرية بعملية تدعى إلاقتران Conjugation .
3. الهلب المستقبل Receptor pili هذا النوع معد لإستقبال عاثيات البكتريا Bacteriophage أي إن الأنواع التي تمتلك هذا النوع من الهلب ممكن اصابتها بالفايروس او العاثي (Kahlon, 2016) .

C- الأسواط Flagella

وهي عبارة عن تراكيب خيطية الشكل تبرز من جدار الخلية وهي المسؤولة عن حركة معظم البكتريا حيث إن لحركة البكتريا دوراً مهماً في إحداث الإصابة المرضية (Brooks *et al*., 2001) وقد لوحظ من خلال التجارب ان السلالات الفاقدة لقدرة الحركة اقل قدرة على إحداث الإصابات الخطيرة مقارنة بالسلالات المتحركة (Crnelis *et al* ., 2008).

D - الإنزيمات المفرزة خارج الخلية The extra celluler enzymes

تنتج بكتريا *P. aeruginosa* عدد من الإتزيمات وقد عدت بعض هذه الانزيمات عوامل إمراضيه بصورة أولية ، وذلك لوجودها في أغلب سلالات الزائفة الزنجارية والتي تكون أكثر ضراوة (Hauser and Sriram,2005) و أهم تلك الانزيمات

1- انزيم الكاتليز Catalase enzyme

يؤدي هذا الانزيم دوراً مهماً و حيوياً في حماية الخلية البكتيرية من التأثير السمي لبيروكسيد الهيدروجين إذ يتم تكسيره إلى أوكسجين و ماء بواسطة هذا الانزيم (Hauser and Sriram , 2005) .

2 - انزيم الحال للشحوم The lipase enzyme

يساعد هذا الانزيم البكتريا على غزو أنسجة المضيف وذلك بفصل الطبقة الشحمية الموجودة بين الأدمة Dermis وتحت الأدمة Epidermis ، حيث تقوم البكتريا بفرز كميات مضاعفة من انزيم Lipase مما يسمح لها باختراق الأنسجة الدهنية و خاصةً إذا كان متعرض إلى الحروق و الجروح(Schafer *et al.,*2005; Karadzic *et al*.,2006).

3- إنزيما ايلاستاز و بروتياز Elastase and protease enzyme

يقوم هذان الانزيمان بتحليل Elastin الموجود في جدران الأوعية الدموية وبالتالي يساعد على نضوح مكونات الدم السائل Plasma and Serum والذي تستفيد منه البكتريا كعامل مساعد لنمو و التكاثر و الانتشار في جميع أنحاء جسم المضيف ، وكذلك يعمل كل منها بمساعدة Exotoxin A والذي ينتج من قبل هذه البكتريا أيضاً على تلف الأنسجة و خاصة أنسجة الرئة من خلال تحطيم Collagen Elastin (Caballero *et al*., 2001).

4- انزيم الليسيثينيز The Lecithinase enzyme

يساعد هذا الانزيم على تكسير Lecithin الذي هو أحد مكونات الغشاء البلازمي Cell membarane و اتضح أن التركيب الكيميائي لهذا الانزيم هو phospholipase و يحرر الفسفور والكولين من اللسيثين ، ويساعد هذا الانزيم البكتريا على غزو أنسجة المضيف Invasiveness ويعمل هذا الانزيم أيضاً على تحلل الفوسفات الدهنية Phospholipids مثل سفينجيومابلين Sphingomypelin وفوسفاثيديل الأمين الاثيلي Phosphatidyl ethanamine السيفالين Cephalin والثرومبوبلاسين Thromboplastine،وقد وجد بعض الباحثين أن حقن مستخلص الفوسفات البكتيري في جلد الحيوانات يحدث خراجاً في وسط موقع الحقن محاطاً

باحمرار أما الحقن تحت الخلب Intraperitoneally فإنه يسبب تنخراً في الكبد و وخزاً في الرئة (Udo and Jacob, 2000).

E- الذيفانات Toxins

من أهم الذيفانات التي تنتجها بكتريا *P.aeruginosa* هي :-

A- الذيفانات الخارجية Exotoxins

1- الذيفانات القاتلة لكريات الدم البيضاء The leukocidin or cytotoxin وهي سموم قاتلة لكريات الدم البيضاء ، وهي بروتينات ذات وزن جزيئي (25 KD) وقد سميت أصلاً بـLeukocidin بسبب تأثيرها في خلايا Neutrophils إذ يساعد هذا الانزيم البكتريا على قتل خلايا الدم البلعمية المتعددة الانوية (Todar, 2011) .

2 – الذيفان الخارجي أ Exotoxin A

وهو عبارة عن مادة بروتينية متعددة الببتيد Polypeptide يختص بتثبيط عملية تخليق البروتين في الخلايا حقيقية النواة ، حيث يعمل السم A على تدعيم عملية تدمير الأنسجة الموجودة بجسم المضيف و يعمل على تفاقم الالتهابات في جسم المضيف (Williams *et al*.،2007)

وقد أثبتت البحوث امتلاكها للسمية الخلوية Cytotoxic لخلايا حقيقية النواة لأنه يعمل على نخر النسيج ، و عند تنقيته و حقنه في الحيوانات يؤدي إلى موتها (Owlia *et al* .,2001).

3- الذيفان الخارجي S The Exotoxin S

يعمل هذا الذيفان على تثبيط عملية تخليق البروتين في الخلايا حقيقية النواة و كذلك يعمل على تلف وظيفة الخلايا البلعمية في مجرى الدم و يدخل الأعضاء تمهيداً لعملية غزو

بكتريا *P.areuginosa* لأنسجة المضيف و يكشف عن وجود هذا الذيفان في الدم من خلال وجود البكتريا المنتجة له (Todar ,2004).

4- الذيفانات الحالة للدم Haemolysin – toxins

معظم سلالات الزوائف الزنجارية تفرز مواد لها القابلية على تحليل كريات الدم الحمراء و تسبب أضراراً جسيمةً عندما تحقن في جلد الحيوانات (Manafi *et al* ., 2009) .تنتج بكتريا *P.areuginosa* نوعين من Haemolysin ، أحدهما Phospholipase الذي يكون ثابت الحرارة والآخر Glycolipid الذي يكون متغير الحرارة ،تعمل هذه الذيفانات مشتركةً معاً على تحطيم الـ Lecithin , Lipids و كلاهما يسهم في غزو الأنسجة من خلال تأثيرها السمي (Todar ,2011).

B- الذيفانات الداخلية Endotoxins

السم المتعدد السكريد الشحمي Spelling المعقد و يعد الجزء Lipid A هو الجزء المسؤول عن السمية ، وهو أحد مكونات الغشاء الخلوي للبكتريا يتحرر من الخلية البكتيرية بعد تحللها كعامل مهم في الالتهابات و من تأثيرات هذه الذيفانات أنها تؤدي إلى الصدمة مع هبوط سريع في ضغط الدم وحمى، وتعد الصدمة السمية Endotoxin shock من الخصائص المميزة لأخماج قاسية بسبب البكتريا السالبة لصبغة كرام و خاصة في المرضى المسنين ، وكذلك له خصائص مضادة لعملية البلعمة (Todar , 2004) .

F - **المواد الخلوية الخارجية** Exocellular substances

1- البايوسين Pyocin

هي مواد تنتجها بكتريا الزائفة الزنجارية ذات طبيعة بروتينية ولها القدرة على تثبيط نمو سلالات اخرى من نفس النوع ويكون مفيدٌ في تميز السلالات المختلفة لهذا النوع وكذلك يكون مفيد في دراسة الوبائية (Line *et al* ., 2008).

2- البايوسيانين Pyocyanin

وهي صبغة بلون أخضرمزرق ذائبة في الماء و الكلوروفورم تطرح خارج الخلية ، تركيبها الكيميائي هو Phenaziane nuleus spelling و يعد البايوسيانين هو المسبب للضعف أو

التلف في الوظيفة الطبيعية للأهداب الأنفية في الإنسان وكذلك يسبب تشوه في الطبقة الطلائية للجهاز التنفسي كما أن له تأثيراً في الخلايا البلعمية (Todar , 2004)

2-4-4 - مقاومة البكتريا للمضادات الحياتية Resistance to antibiotic

تمتلك بكتريا *P.aeruginosa* مقاومة عالية جداً لعديد من المضادات الحيوية الشائعة الاستعمال ، وعلى الرغم من ذلك فإن بعض السلالات تكون حساسة خاصةً لمضادات (Gentamicin-Colistin-Tobramycin- Amikacin) قد يمزج المضادين Gentamicin وCarbenicillin لعلاج عدد من الاصابات الناجمة عن هذة البكتريا (Tambekar and Bhut , 2010). (Jawetz and Levinson,2002).أن استعمال Ticarcillinو Piperacillin مضاف إليه أحد مركبات Aminoglycoside مثل Gentamicin و Amikacin يكون ذا تأثير كبير لعلاج هذه البكتريا (Jawetz and Levinson,2002) ، تمتلك بكتريا الزوائف الزنجارية آليات مقاومة مختلفة تساعدها على مقاومة الكثير من المضادات الحياتية منها إنتاج إنزيمات لها القدرة على تحوير جزيئة المضاد الحيوي الى مادة غير فعالة،ومن هذه الإنزيمات انزيم Beta - Lactamase التي تعمل على تكسير حلقة البيتا-لاكتام الموجودة في التركيب الكيميائي في كل من البنسلينات كما توجد في السيفالوسبورينات (EHA. Consultin Group,2004) ومن الإنزيمات الأخرى Acetylase الذي يعمل على مجاميع الهيدروكسيل في المضاد الحيوي ، إضافةً إلى الإنزيمات العاملة على مجموعة Aminoglycosid (Todar , 2011). و قد بينت دراسة محلية أُجريتْ في محافظة القادسية أن بكتريا الزائفة الزنجارية المعزولة من مصادر مختلفة تمتلك مقاومة عالية ضد مضادات الامينوكلايكوسيدات و المتمثلة بـ(Gentamicin-Tobramycin-Amikacin) إذ كانت أعلى نسبة Gentamicin وأقل نسبة لـ Amikacin (العادلي ،2015) . وفي دراسة أُخرى أُجريت في جامعة بغداد اختبرت حساسية بكتريا *P.aeruginosa* المعزولة من التهابات الحروق ضد (10) مضادات حيوية وقد أظهرت النتائج

تبايناً واضحاً وبنسب مختلفة في مقاومتها للمضادات الحيوية. إذ كانت نسبة مقاومة البكتريا (100%) تجاه مضادات Ampicillin ، بينما بلغت نسبة المقاومة لمضادات البتا-لاكتام وهي Cefepime ، Ceftazidime (5.8%) ، (79%) على التوالي و بلغت نسبة المقاومة لمضادات Tobramcin ، Piperacillin ، Norfloxacin ، Ciprofloxacin على التوالي (41.6%)،(20.8%)،(20.8%) و(4%).في حين أظهرت جميع عزلات البكتريا حساسية عالية بنسبة (100%) تجاه مضادات البيتا- لاكتام التابعة للأجيال الجديدة ومنها Aztreonam ، Imipenem ، Cefepim (الشويخ ، 2009). إضافةً إلى دراسة أخرى بينت أن أعلى مقاومة لبكتريا الزوائف الزنجارية كانت لمضاد Ceftazidime إذ بلغت (79%) وكانت النتائج مقاربة للعديد من الدراسات (Kriengkauykiat *et al* ., 2005) . و توصل جرجيس (2006) إلى ان مقاومة بكتيريا *P. aeruginosa* للعديد من المضادات الحيوية يعود إلى امتلاكها حاجز النفاذية و المتمثل بطبقة الغشاء الحيوي ، ويعد من أهم عوامل الضراوة للبكتيريا تجاه المضادات الحيوية و قد تأتي المقاومة عن طريق تقليل نفاذية الغشاء الخارجي الذي بدوره قد يؤثر على معدل امتصاص هذه المضادات و ذلك بفضل وجود قنوات بروتينية (Porins) في الغشاء الخارجي للبكتيريا السالبة لصبغة كرام مما يعمل على منع مرور المواد ذات الوزن الجزيئي الأقل من 600 دالتون ، إذ إن أي تغير أو تحوير في عدد هذه القنوات يؤدي الى مقاومة هذه البكتيريا للعديد من المضادات (Lambert,2002 ; Livermore,2002) .

2-5- نبات الشاي الأخضر

الاسم العلمي : Camellia sinensis

الاسم الشائع : Green tea

العائلة : Theaceae

الجنس : *Camellia*

النوع : *Camellia sinensisr*

.(Baydar , 2007)

نبات الشاي الأخضر دغلة أو جنبة معمرة تعيش حتى (70) سنة جذعها ضخم و قصير تعلوا إلى نحو 2م و أوراقها خضراء داكنة اللون بيضاوية الشكل متطاولة (5 - 10 سم) ذات عنق قصير، حوافها مسننة يزداد عددها في أعلى الفروع ويقل في أسفلها قوام الورقة رخو وخشنة الملمس وتصبح جرداء ملساء ولامعة بعد جفافها ويختلف حجمها بحسب الأنواع أما أزهار الشاي الأخضر عنقودية (2-3 زهرات) عطرة الرائحة وثمرته ذات ثلاث فصوص تنضج بذورها الثلاث بعد مضي نحو 4 اشهر على موعد الإزهار وتبدأ جنبة الشاي الأخضر تنتج الورق الاقتصادي في عمر ما بين 3،7 سنوات بحسب الأصناف و الخدمات الزراعية ، و يباشر بالقطفة الأولى للأوراق بعد مضي 3 سنوات من موعد زراعته (Winkel-shirle , 2002) . أول من اكتشف الشاي الأخضر الصينيون قبل حوالي خمسة آلاف سنة و موطنه الأصلي هو الصين و بعدها انتشر إلى اليابان وآسيا ثم نقلهُ الألمان إلى أوربا من الصين ثم إلى أمريكا في سنة 1650 (Baydar,2007) و أوراقه نفس أوراق الشاي الأسود (ISO.,2005) إلا أن أوراق الشاي الأخضر لم تخمر فتبقى موادها كما هي فهو أنفع من الشاي الأسود (Roulier ,2004). و يدخل في تركيب أوراق الشاي الأخضرمن الوزن الرطب وحسب الأصناف ، ماء: 75- 77.5 %،مواد عفصية: 2- 4 % ، كافئين: 1 – 4.8 % ، زيوت عطرية: 0.02 % ، بروتين: 12- 20 % ، كاربوهيدرات: 3 - 4 % ، عناصر معدنية: 4 – 5 % و من الوزن الجاف منها (الألمنيوم ،المنغنيز ، المعنيزيوم ، الفسفور ، الكبريت ، الزنك ، النحاس ، الكالسيوم ، البوتاسيوم) و خمائر و فيتامينات : مجموعة B_1 , B_2 , B_6 (نحو 600 ملغ) و فيتامين C وغيرها من الفيتامينات (Sarni-Manchdo and Cheynier,2006). وبينت الدراسات الحديثة أنه يحتوي على مركبات الفينول المتعددة والتي تشمل الفلافونويدات و التانينات و الكاروتينات و أملاح الفينول و الحوامض الفينولية والتي توجد تقريباً في جميع الأجزاء النباتية مثل الأوراق و الأزهار والثمار و السيقان والجذور و اللحاء و البذور و هي نواتج أيضية ثانوية ، فإن المركبات الفينولية المتعددة تؤثر في الوقاية من أمراض عدة (Hong *et al*., 2009). يستخدم الشاي الأخضر من قبل بعض الصينين كعلاج للصداع النصفي لما له من تأثير عليهم كما أن له بعض الفوائد للأسنان لوجود مادة الفلوريد به و يساعد على احتراق الدهون بالجسم وينظم سكر الدم و معدل هرمون الأنسولين و ضبط وظائف الكلية و الشرايين و يقي من الإصابات القلبية الناتجة من ترسبات الدهون في الأوردة و من الشيخوخة المبكرة (Baydar ,2007) و يستخدم ايضاً في علاج الجيوب تحت العين بوضع أكياس الشاي

على الانتفاخ و يستخدمه بعضهم كحمام يرش فوق الجلد ليلطفه من حروق الشمس أو تلطيف لدغات الناموس و الحشرات ، و يؤثر في الحماية من الإصابة بسرطان الفم ويحد من الإصابة بسرطان الرئة و القولون ، كما أنه يعد مضاد للأكسدة و يمتلك قدرة عالية ضد الجذور الحرة و خاصة الهيدروكسيل و التي تسبب الكثير من الأمراض (Brusselmans,2005) كما أن الشاي الأخضر يرفع ضغط الدم بسبب وجود الكافئين و بيوفلافونويد مركبات EGCG و ثيوفيللين و تانين و زيت عطري فإن الإفراط في تناوله قد يسبب التوتر العصبي (Simonetti,2000). كما تعد الفلافونويد التي يوازي تأثيرها تأثير فيتامين C والتي تقاوم العديد من الفيروسات و البكتريا المسببة للالتهابات (Baydar,2007) وقد أظهرت دراسات عديدة التأثيـــرات المثبطة المهمة للشـــاي الأخضر تجـــاه العديد من الأحياء المجهرية مثـل *Yersinia* ، *Shigella dysenteriae* ، *S. Typhi* ، *Salmonella Typhimurium* *Campylobacter* ، *Vibrio cholerae* ، *S. aureus* ، *E. coli* ، *enterocolitica* *jejuni* وأنـــواع بكتيريـة أخـرى ، فضـــلا عـــن تـــأثيـر الشـــاي الأخضر علـى نـــمو *Acinetobacter* المعزولة مـن مرضى الحروق (Hosseini *et al* ., 2007). كما أجريت بحوث أخرى أظهرت أن الشايَ الأخضرَ فعالٌ تجاه كل البكتريا الموجبة لصبغة كرام وبعض أنواع البكتريا السالبة (عشي ، 2005) ، وأثبت باحثون آخرون أن بكتريا *S. aureus* هي الأكثر حساسية من بين الأحياء المجهرية الممرضة عند إضافة الشاي الأخضر إلى الوسط الزرعي (Michalczyk and Zawislak, 2008) بينما سجل باحثون آخرون حساسية كل من *S. aureus* و *S. pyogenes* لكل أصناف الشاي (Su *et al* ., 2008) كما أضاف الباحثون أنه عند زيادة تركيز خلاصة الشاي الأخضر فإن أعداد البكتيريا تنخفض بشكل كبيرو سجلت دراسة أخرى أنه لم تكن للشاي الأخضر فعالية تثبيطية قوية للبكتريا السالبة لصبغة كرام ماعدا بكتريا *Neisseria meningitids* التي سجلت أعلى قطر تثبيط يبلغ 15ملم ، و بكتريا *Escherichia. coli* و التي سجلت أقل قطر تثبيط يبلغ 8.5 ملم (Shahidi , 2004)

2- 6 - نبات القرفة Cinnamomum

للقرفة أنواع عديدة لكن أهم نوعين

هما القرفة السيلانية و المعروفة علمياً باسم Cinnamomum zeylanicum ، والنوع الثاني يعرف باسم Cinnamomum cassi أما الاسم الشائع لقلف القرفة هو الدارصين أو

الدارصين الصيني أو القرفة السيلانية ومن أسمائه أيضاً الشليخة ، ويتبع لعائلة Lauraceae (Mateos *et al* ., 2012) تعد القرفة أحد أهم التوابل في العالم ومن أقدم الأعشاب الطبية التي استخدمت في الهند و مصر القديمة و أوربا ، موطنها الأصلي سريلانكا و الهند وتزرع اليوم على نطاق واسع كتابل و دواء في جنوب شرق آسيا و أمريكا الجنوبية و الهند الغربية و القرفة هو لحاء شجرة دائمة الخضرة استوائية كثيفة يمكن أن يصل ارتفاعها من عشرة أمتار الى اربعين متراً، ساقها منتصبة تعلو 3 – 5 أمتار، الأوراق متعاقبة مركبة ، والأزهار صفراء صغيرة ، والثمرة صغيرة تشبه القرنفل ، يجفف قلف (لحاء) الأشجار الصغيرة على شكل عيدان لونها بني داكن و لها رائحة عطرية (McCann,2003). و تتكون القرفة من زيوت طيارة (الدهيد القرفة – يوجينول) و حوامض التنيك (بتركيز عالي) و كومارينات و لثأ و مكونات أخــرى تضم صمغاً ، راتنجيات، سكريات و فينولات 10.4% حيث يحتوي كل 100غم من القرفة بحسب وزارة الزراعة الأمريكية على سعرات حرارية: 247 ، دهون مشبعــة: 0.34 ، كــاربوهيــدرات: 80.59 ، الألــيــاف: 53.1 ، بــروتينــات: 3.99 و كــولسترول: 0 (McCann,2003).

أجريت دراسات متعددة عن تأثيرات القرفة و استعمالاتها الداخلية والخارجية ففي أمريكا قامت دراسة أثبتت أن القرفة المقشورة و الموجودة على هيئة أنابيب عندما أُعطيتْ للمرضى المصابين بالسكر وُجدَ أنها خفضت سكر الدم بدرجة تعادل الحلبة وبدأ النـاس يستخدمونها لتمتعها برائحة عطرية و طعم حريف مستساغ و اشارتْ البحوث العلمية الحديثة إلى ضرورة استخدام النباتات الطبية بما فيها القرفة لاحتوائها على المواد الفعالة و التي تعمل على تحسين أداء الجهاز المناعي كمضاد للفطريات والبكتريا و الفيروسات ذلك لاعتبارها مصدراً آمناً لإنتاج العقاقير و الأدوية (Tipu *et al* ., 2006) كما قام اليابانيون بدراسة تأثير المركب الرئيسي في زيت القرفة كمهدئ و مسكن بالإضافة إلى أنها تخفض ضغط الدم و الحمى ، كما أثبت الباحثون أن خلاصة القرفة لها تأثير ضد أنواع من البكتريا و الفطريات وعلى الرغم من الفوائد المتعددة للقرفة إلا أنه لا ينصح بتناولها في بعض الحــالات خاصــةً النســاء فتــرة الحمــل نظراً لخواصها المقبضة لعضلات الرحم (Bogo *et al* ., 2011) . أثبتت دراسة أخرى أهمية زيت القرفة كدهان لعلاج العديد من الأمراض الجلدية مثل الكلف و النمش يستخدم زيت القرفة بمعدل قطرة إلى قطرتين كمادة مطهرة للجلد و يستخدم ممزوجاً مع مواد أخرى مثل الخل لعلاج القروح والبثور الجلدية و يستخدم ممزوجاً مع التين على هيئة ضمادات لعلاج لسع الحشرات و العقرب كما ويستخدم ممزوجاً مع الملح و البصل بشكل حمام زيتي لعلاج

تساقط الشعر كما أنتجت مصانع الأدوية حديثاً مرهماً من مسحوق القرفة كعلاج لجروح،الطفح الجلدي الناجم عن بعض الأحياء المجهرية الممرضة كما يساعد على زيادة نظارة البشرة و تقليل التجاعيد الناجمة عن التقدم بالسن حيث إن القرفة تعزز إنتاج الكولاجين الذي يمنع بدوره تكوين التجاعيد والبثور و حب الشباب ومن الممكن استخدام مسحوق القرفة كغسول للوجه و مقشر للجلد كما أن لها خصائص مضادة ضد البكتيريا المسببة للروائح غير المرغوبة في الفم من خلال استعمال منقوع القرفة مع العسل كغرغرة (Laekemam,2011)

2 -7 - نبات الحناء *Lawsonia inermis*

يعود نبات الحناء إلى

الشعبة: Magnoliopsida

الرتبة: Myrtales

العائلة: Lythraceae

الجنس: *Lawsonia inermis*

(Ashnaga and Shiri , 2011)

شجرة الحناء من النباتات التي عرفها الانسان منذ فجر الحضارة الأولى شجرة معمرة دائمة الخضرة يصل ارتفاعها من 3 – 6 أمتار من حيث الهيكل العام تشبه إلى حد ما شجرة الرمان و أوراقها تشبه أوراق شجرة الياس و تزهر الحناء في شهر تموز\ آب و تنضج الثمرة في شهر آب\أيلول و تعد الأوراق هي الجزء المستعمل من النبات ولها أهمية طبية واقتصادية فضلا عن كونها من نباتات الزينة التي تعمر لمدة عشر سنوات أو أكثر(أبو زيد و الشحات ، 1999) إن للحناء مكانة هامة في المجتمع الإسلامي عندما استمع المسلمون إلى وصايا الرسول محمد (صلى الله عليه و اله و سلم) باستعمالاتها و تعاطيها ، وهي من نباتات المناطق الحارة وشبه الحارة و يعتقد أن موطنها الأصلي شمال أفريقيا و جنوب غرب آسيا وقد انتشرت زراعتها في مناطق أخرى من العالم منها حوض البحر الأبيض المتوسط و الهند و مصر و العراق و تونس و تتركز زراعتها في العراق في محافظة البصرة – منطقة الفاو و تم زراعتها ايضاً على نطاق ضيق في بعض المحافظات الوسطى من العراق حيث تتواجد في بعض البساتين و الحدائق المنزلية (الصراف ، 1989) يوجد منها أصناف كثيرة مثل البلدي ،

الشامي ، البغدادي و الشائكة (الحكيم ، 1989) . و تستعمل أوراقه بعد الطحن لصبغ الشعر والجلد و لأغراض أخرى إذ تحتوي على مادة ملونة تسمى لوزون (Lawsone) وهي من الصبغات النباتية الثابتة كما تحتوي على مواد دهنية و مواد راتنجية و تانينات (Muhammad & Muhammad , 2005) كما و تحتوي على تراكيز عالية من المركبات الفينولية ، الفلافونيدات ، الكاربوهيدرات ، البروتينات ، التانينات ، القلويدات و الأحماض الدهنية (Chaudhary *et al* ., 2010 ; Burd & Oleszek ,2001). وقد استعملت الحناء قديماً من قبل الفراعنة في تحنيط جثث موتاهم لأنها تمنع نمو البكتريا و الفطريات ، كما استعملوها لمعالجة الجرب الجلدي في الإنسان والحيوان(مصطفى ،2007) واستخدمت المادة المستخلصة (Decoction) كمادة مضادة للفطريات و مادة قابضة ولعلاج ألم المعدة و معالجة الأمراض الزهرية كما تستعمل كغرغرة في حالات تقرح الحنجرة و بحة الصوت ، وفي بلاد المغرب تستخدم الحناء كدواء شاف للجروح و لعلاج الجذام و الإصابات الجلدية و البثور و لعلاج الروماتزم كما تستخدم لعلاج الحروق و تستخدم عجينة الأوراق مع الزيت و وضعها على مقدمة الجبهة لعلاج الصداع (قطب ، 1989) وقد أصبح حديثاً الاتجاه للتداوي بالأعشاب الطبية صيحةً تطلقها منظمة الصحة العالميـــة و الـمعاهد العلمية في البلاد المتقدمة تجنباً من الاثار السمية المدمرة للكيميائيات الدوائية وقد أثبتت الأبحاث أن بعض النباتات تمتلك تأثير كبير ضد الميكروبات عند مقارنتها بالمضادات الحيوية مثل الكلورامفينكول و الستربتومايسين (مصطفى ، 2007). اكدتْ الدراسات السابقة المتعلقة باستخلاص مركبات الحناء (Uma *et al* ., 2010) أن مستخلص الأستيون لأوراق الحناء المزروعة في مدينة كوالالامبو/ ماليزيا قد تفوق في محتواه من المركبات الفينولية على مستخلصي الميثانول و الايثانول و له فعالية مضادة لبعض أنواع البكتيريا و الفطريات . وعند دراسة Hosein & Zinab ،(2007) لأوراق الحناء المزروعة في منطقة كرمان / إيران أوضحـــت أن المستخلص المـائـي يتفـوق فـي محتواه من المركبات الفينولية على مستخلص الميثانول إلا أن الفعالية المضادة للأكسدة و البكتريا للأخيرة تفوقت على الاول بسبب الاختلاف في طبيعة المركبات المستخلصة.وفي دراسة أخرى أثبتت أن مستخلص الميثـانـول لأوراق الحنـاء المزروعـة فـي الهنـد فعاليـة تثبيط جيدة تجاه بكتريـــا *Escherishia. Coli* ,

Klebsiella pneumonia , Proteus mirablis , Staphylococcus aureus , و

Pseudomonas aeruginosa (Arum *etal.,* 2010).

الفصـــل الثالث

المواد وطرائق العمل

Materials and methods

الفصل الثالث

3-المواد وطرائق العمل Materials and methods

3-1- الأجهزة والأدوات المستعملة في الدراسة

جدول (3-1) الأجهزة المختبرية

ت	اسم الجهاز	Name of Devices	الشركة المصنعة (المنشأ)
1	تقطير الماء	Distiller	Ogawa (Japan)
2	ثلاجة	Refrigerator	LG (korea)
3	حاضنة	Incubator	Binder (Germany)
4	حمام المائي	Water bath	Memmert (Germany)
5	فرن كهربائي	Oven	Memmert (Germany)
6	قارئ طبق المعايرة الدقيقة	ELISA	Biotek (USA)
7	كابينة معقمة	Class II cabinet	Mn120(Korea)
8	كاميرا المجهر الضوئي	Microscope camera	Olympus (Japan)
9	كاميرا رقمية	Digital camera	Canon (Japan)
10	مازج	Vortex	Dubuque (USA)
11	مجهر ضوئي	Microscope	OLYMPUS (Japan)
12	مصباح بنزن	Benzen Burner	Shndon (England)
13	موصدة	Autoclave	Labtech (Korea)
14	ميزان إلكتروني حساس	Electrical sensitive balance	Satorius (Germany)
15	النبذ المركزي	Centrifuge	Hettich (Germany
16	هزاز	Shaker	Bioteck (USA)

جدول (3-2) الأدوات المختبرية

ت	اسم الادوات	Name of Materials	الشركة المصنعة (المنشأ)
1	أطباق بتري	Petri dishes	Plastilab (Lebanon)
2	أنابيب إبندروف	Eppendorfs tubs	Qrenier (Germany)
3	أنابيب بلاستيكية مختلفة	Tubes	Afco-Dispo (Jorden)
4	أوراق ترشيح	Filter paper	China
5	تبات مختلفة الأحجام	Pipets tips	China
6	تقنية التشخيص	ApI 20 system	Biomerieus (france)
7	ثاقب فليني	Cork borer	ENGLAND
8	دورق مخروطي	Conical flasks	BBL (USA)
9	دورق مدرج	Flask	BBL (USA)
10	شرائح زجاجية وأغطية	Slides and coverslips	Meheco (china)
11	شريط شمعي لاصق	Paraflim	BDH (England)
12	صفائح المعايرة الدقيقة	Microtiter plate	Biohit (Finland)
13	صندوق لنقل العينات	Box	Syria
14	عروة ناقلة	Loop	Loop Rhndon (England)
15	ماصات دقيقة	Micropipettes	Germany
16	محاقن طبية مختلفة الأحجام	Syringes	Mecheco (china)
17	مرشحات دقيقة 0.22	Membrane filter	Difico (USA)
18	مسحات قطنية	Cotton swab	ATACO – (China)
19	مسحات قطنية ناقلة	Transport cotton swab with media	ATACO – (China)

3-2- المواد الكيميائية المستعملة في الدراسة

جدول (3-3) المواد الكيميائية والبيولوجية المستعملة

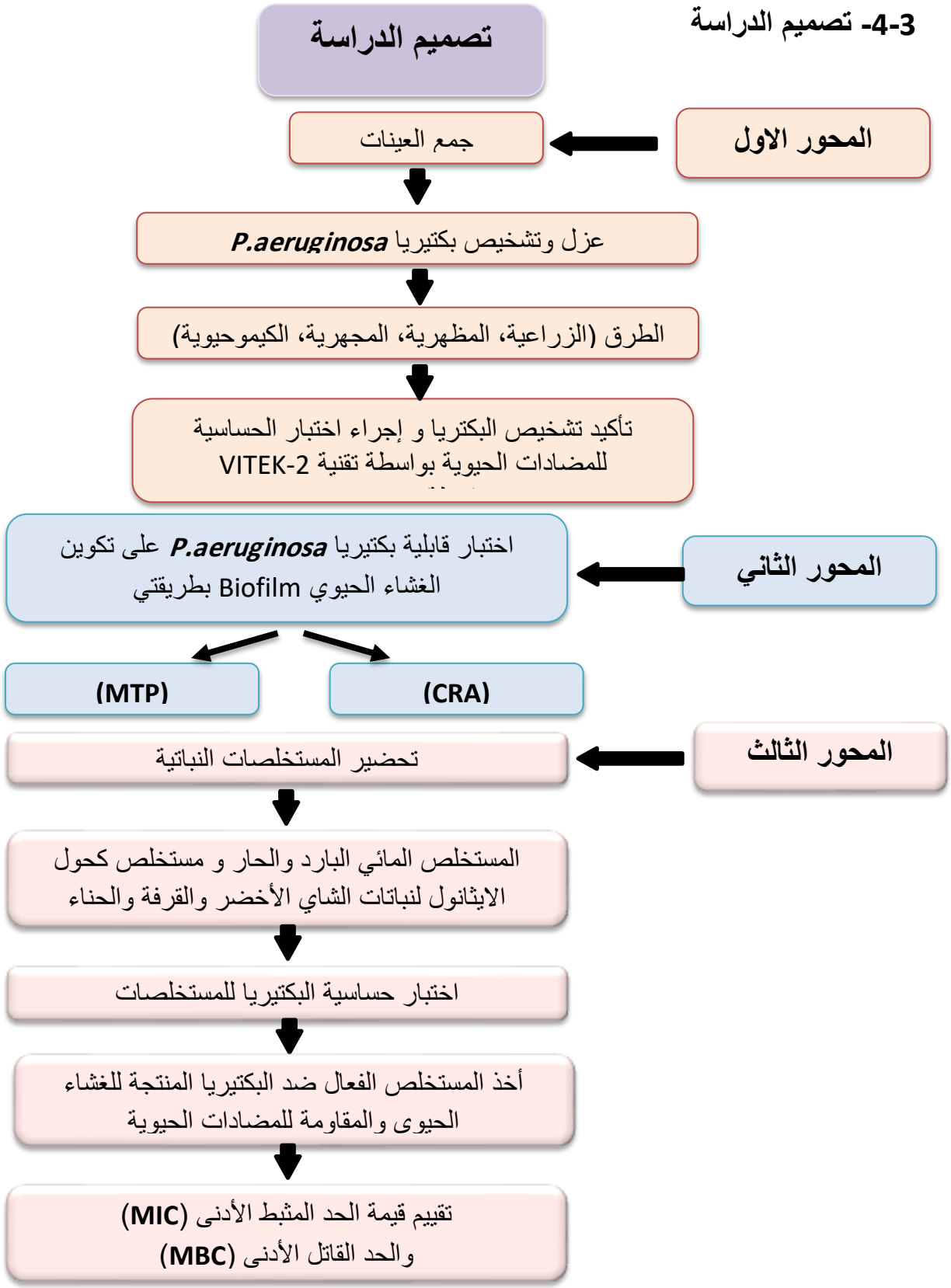
ت	اسم المادة	Name of Materials	الشركة المصنعة (المنشأ)
1	ازرق المثيلين	Methylene blue	BDH (England)
2	ببروكسيد الهيدروجين	Hydrogen peroxide H_2O_2	BDH chemical ltd (England)
3	حامض الكبريتيك المركز	H_2SO_4	BDH (England)
4	دم بشري	Human blood	مصرف الدم / كربلاء المقدسة
5	سكروز	Sucrose	UK BDH
6	صبغة احمر الكونغو	Congo – red	BDH (England)
7	صبغة احمر المثيل	Methyl red	Oxoid (England)
8	صبغة كرام	Gram stain	UK BDH
9	الفا نفثول	Alpha Naphthol	BDH (England)
10	كاشف كوفاكس	Koveac's Reagent	Oxoid (France)
11	كحول اثيلي 70%	Ethanol	Fluka (Switzerland)
12	كحول اثيلي مطلق	Absolute ethanol	BDH (England)
13	كحول مثيلي	Methanol	B.D.H.U.K
14	كلوريد الباريوم	BaI_2	BDH (England)
15	كلوكوز	Glucose	B.D.H (England)
16	كليسيرول	Glycreol	BDH (England)
17	ماء الببتون	Peptone water	HI-MEDIA INDIA
18	محلول فسلجي	Normal saline	BDH (England)
19	مسحوق الاكار الاكار	Ager – agar	Oxoid (France)
20	مسحوق اليوريا	Urea – CH4N2O	HI-MEDIA INDIA
21	معقم	Povidone iodine 10%	Iraq
22	المياه الخالية من الانيوكليز	Free nuclease water	Bioneer (Korea)
23	هيدروكسيد البوتاسيوم	KOH	Thomas baker

3-3- الأوساط الزرعية المستعملة والغرض من استعمالها

جدول (3-4) الأوساط الزرعية

	الأوساط الزرعية	الغاية من الوسط	الشركة المصنع (المنشأ)
1	أكار اليوريا الأساس Urea agar base	وسط تفريقي لتحري عن البكتيريا المنتجة لأنزيم اليوريز من الغير منتجة	Himedia (India)
2	أكار مولر هنتون Muller Hinton Agar	لأختبار حساسية العزلات البكتيرية	Himedia (India)
3	المرق المغذي Nutrient broth	لتنمية العزلات البكتيرية وتنشيطها لإجراء الاختبارات الكيموحيوية وتحضير العوالق البكتيرية المختلفة ، حفظ العينات لمدة من الزمن بدرجة حرارة- 20م	Himedia (India)
4	مرق نقيع القلب والدماغ Brain heart infusion broth	حفظ العزلات لمدة طويلة في درجة حرارة - 20م°	Himedia (India)
5	وسط أكار السترميد Cetrimiae Agar	وسط إنتقائي للتحري عن قابلية البكتريا على تكوين صبغات ملونة و متألقة	Himedia (India)
6	وسط أحمر الكونغو	Biofilmللكشف عن قدرة البكتريا على تكوين الغشاء الحيوي	حضر في المختبر
7	وسط أكار- الاكار Agar-Aga	لتشخيص قابلية البكتريا على الحركة	حضر في المختبر
8	وسط أكار الدم الأساس Blood agar base	عزل العصيات السالبة لصبغة غرام وهو وسط إغنائي لتنمية كل أنواع البكتيريا	Oxoid (England)
9	وسط أكار سترات سيمون Simmin citrate Agar	للتحري عن قابلية البكتيريا على استهلاك السترات كمصدر الكاربون	Himedia (India)
10	وسط أكار كليكلر Kligler Iron Agar	لتشخيص قدرة البكتيريا على تخمير السكريات وإنتاج الغاز من تخمير السكريات	USA
11	وسط أكار ماكونكي MacConKey Agar	عزل العصيات السالبة لصبغة غرام والتفريق بين العزلات المخمرة لسكر إلاكتوز عن غير المخمرة	Oxoid (England)
12	وسط الاكار المغذي Nutrient agar media	لزراعة و تنشيط العزلات البكتيرية النقية	Himedia (India)
13	وسط المثيل ألاحمر فوكس بروسكاور (Mr-Vp)	للتحري عن قابلية البكتيريا على تخمر الكلوكوزو تحرير الاسيتوين	Himedia (India)
14	وسط ماء الببتون Pepton water medium	للتحري عن قابلية البكتريا علي تحليل الحامض الإميني الترتوفان وإنتاج الأندول	Himedia (India)

3-4- تصميم الدراسة



شكل (3-1) يوضح المحاور الرئيسية للبحث

3-5- طرائق العمل Methods

3-5-1 جمع العينات Collection of samples

جمعت العينات من جلود المرضى الراقدين في قسم الحروق في مستشفى مدينة الإمام الحسين (ع) الطبية / محافظة كربلاء المقدسة و للمدة الزمنية من كانون الأول 2017 ولغاية شباط 2018 ، إذ شملت عينات الدراسة 118 مسحة جلدية للمرضى المصابين بالحروق من الدرجة الثانية و الدرجة الثالثة لكلا الجنسين و بأعمار تراوحت بين 2 - 45 سنة و أعدت استمارة خاصة لهذه الدراسة تضمنت جميع المعلومات مثل (العمر ، الجنس ، السكن) و نقلت العينات إلى مختبر الأحياء المجهرية في نفس المستشفى لغرض التشخيص.

3-5-2- زرع العينات Sample culturing

بعد جمع العينات من جلد مرضى الحروق و خلال مدة لا تتجاوز ساعة نقلت العينات إلى مختبر الأحياء المجهرية حيث تم تنميتها على أطباق بتري الحاوية على الأوساط الزرعية وسط اكار الدم Blood agar وسط الماكونكي MacConkey agar، وحضنت هوائياً بدرجة حرارة 37 م^{o} ولمدة 24 ساعة للتأكد من نقاوتها و الحصول على مستعمرات منفردة .

3-5-3- الأوساط الزرعية الجاهزة Ready-touse culture media

حضرت الأوساط الزراعية طبقا لتعليمات الشركات المصنعة لها و تم تعقيمها بالمؤصدة بدرجة 121 م^{o} و بضغط 15 باوند / انج^{2} لمدة 15 دقيقة و بعد صبها حضنت بالحاضنة لمدة 24 ساعة للتأكد من عدم تلوثها ، بعدها حفظت بالثلاجة بدرجة حرارة 4 م^{o} لحين الاستعمال (Roulier, 2004).

3-5-4- الأوساط الزرعية المحضرة Prepared culture media

3-5-4-1- وسط أحمرالكونغو (CRA)

استخدم هذا الوسط للكشف عن قدرة البكتريا *P. aeruginosa*على إنتاج الغشاء الحياتي و حضر الوسط بإذابة:-

- نقيع القلب والدماغ BHIB 37 غم
- سكروز Sucrose 50 غم
- أكار اكار Agar – Agar 10 غم
- صبغة أحمر الكونغو Red congo 2 غم
- ماء مقطر Distilled Water 900 مل

و تم تحضير صبغة أحمر الكونغو بشكل منفصل بإذابة 2غم من مسحوق الصبغة في 100مل من الماء المقطر و عقمت بصورة منفصلة عن الوسط بواسطة مرشحات غشائية (Arciola *et al* . , 2001).

3-5-4-2- وسط تربتكيز الصويا السائل كلوكوز1 % Trypticase soy broth

حضر الوسط حسب تعليمات الشركة المجهزة و عقم بالمؤصدة و ترك الوسط ليصل إلى درجة حرارة 45 مْ وأضيف اليه نسبة 1% من محلول سكر الكلوكوز بعد تعقيمه بمرشحات غشائية دقيقة (Mireles *et al* . , 2001) .

3-5-4-3- وسط الحركة Motility media

حضر بإضافة (4)غم من مسحوق الأكار الى (20)غم من مسحوق المرق المغذي (Nutrient broth) وأذيبت المحتويات في 1 لتر من الماء المقطر ، وتم تعقيمها بالمؤصدة تم حفظها بالثلاجة لحين الاستعمال (Mireles *et al* . , 2001) .

3-5-5-المحاليل المستخدمة و الكواشف Solutions and Indicators

3-5-5-1- محلول ثابت العكارة القياسي Macfarland Standard Solution

A – محلول كلوريد الباريوم $BaCl_2.2H_2O$

حضر بإذابة 1.175غم من كلوريد الباريوم المائي في 100مل من الماء المقطر

B - محلول حامض لكبريتيك المركز H_2SO_4 بتركيز 1%

حضر بإضافة1 مل من حامض الكبريتيك المركز إلى 99مل من الماء المقطرثم أضيف 0.5مل من المحلول A إلى 99.5مل من المحلول B ، مزج المحلول جيداً ، وزع بمقدار4 - 5مل في أنابيب زجاجية ذات غطاء محكم لمنع التبخر و حفظت بالظلام لحين الاستعمال ، و الغاية من تحضير هذا المحلول هو اعتباره محلول قياسي لمعايرة عدد الخلايا البكتيرية و الحصول على محلول عدد خلاياه (1.5×10^8) خلية / مل ، تم تحضيره وفقاً للطريقة الموصوفة من قبل المنظمة البريطانية للعلاج الكيميائي British Society.

3-5-5-2- محلول الملح الفسيولوجي Normal Saline

حضر المحلول الملحي الفسيولوجي(NS) وذلك بإذابة 0.85غم من كلوريد الصوديوم NaCL في 100مل من الماء المقطر و عقم بالمؤصدة و حفظ بدرجة حرارة 4 مْ لحين الاستعمال حيث استخدم هذا المحلول لغرض تحضير التخفيف اللازم في هذه الدراسة.

3-5-5-3- محلول دارى الفوسفات الملحي Phosphate – Buffer Saline(PBS)

تم تحضير هذا المحلول حسب التعليمات المجهزة من قبل الشركة المصنعة ثم عقم بالمؤصدة و حفظ في الثلاجة بدرجة حرارة 4 م° لحين الاستعمال .

3-5-5-4- محلول اليوريا Ureae solution

حضر بإذابة 20غم من اليوريا في 100مل من الماء المقطر و رشح بمرشحات دقيقه (0.22) Membrane filters (Macfaddin , 2000) .

3-5-5-5- كاشف الكتاليز Catalase reagent

استخدمت مادة بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 بتركيز 3% للتحري عن قابلية البكتريا لإنتاج انزيم الكاتليز (Tang and Stratton , 2006) .

3-5-5-6- كاشف الاوكسيديز Oxidase reagent

حضر الكاشف آنياً و ذلك بإذابة 1 غم من مادة رباعي مثيل بارافنيلين ثنائي آمين ثنائي هيدروكلورايد في 100مل ماء مقطر نحصل على سائل بلون بنفسجي يوضع في قنينة غامقة و معقمة (Tang and Stratton,2006).

3-5-5-7- كاشف كوفاكس Kovac's reagent

استخدم الكاشف الجاهزالمحضر من قبل الشركة المصنعة.

3-5-5-8- كاشف أحمر المثيل Methyl red reagent

حضر بإذابة 0.1غم من صبغة المثيل (methyl red) في 300مل من كحول الايثانول المطلق وأكمل الحجم إلى 500مل من الماء المقطر و حفظ في قنينة معتمة في الثلاجة لحين الاستعمال (Macfaddin ,2000) .

3-5-5-9- كاشف فوكس بروسكاور Voges Proskauer reagen

يتكون هذا الكاشف من :-

محلول (A)

الفانفثنول 5% Alpha Naphtho حضر بإذابة 5غم منه في 100مل من كحول الايثانول

محلول (B)

حضر بإذابة 40غم من هيدروكسيد البوتاسيوم في 100مل من الماء المقطر (Collins *et al* ., 2004) .

3-6- التعقيم Sterilization

تم تعقيم المحاليل و الأوساط الغذائية والتي تتحمل درجات الحرارة العالية باستخدام المؤصدة بدرجة 121م° و ضغط 15 باوند /انج^2 لمدة 15 دقيقة في حين عقمت باقي المواد مثل الصبغات والسكريات والمستخلصات النباتية التي لا تتحمل درجات الحرارة العالية بمرشحات دقيقة يبلغ قطرها 0.22 ميكروميتر ، أما الزجاجات و القناني والأدوات المستعملة في تحضير و خـــزن المستخلصات فقـــد تـــم تعقيمها بـــالفرن الكهربـــائي بدرجة حـــرارة 180م° لمدة ساعة.

3-7- التشخيص Identification

3-7-1- الصفات المظهرية Morphologiclal characteristics

عُدَّ هذا التشخيص اولياً إذ اعتمد على الصفات الزراعية للمستعمرات النامية على الأوساط الانتقائية و التفريقي إذ اعتمد على لون المستعمرات ، و حوافها ، و ارتفاعها ، و قوامها ، وقطرها و ظهور الصبغات على الوسط الغذائي .

3-7-2- الفحص المجهري Microscopic examination

تم استخدام صبغة كرام لتصبغ الخلايا البكتيريا و تتكون هذه الصبغة من

- صبغة الكرستال البنفسجة Crystal violete
- محلول الايودين Iodin Solutiuon
- محلول القصر Decolarizer
- صبغة السفرانين Safranin pigment

أُجريَ الفحص المجهري للخلايا البكتيرية من خلال تصبغها بصبغة كرام و تم فحصها تحت العدسة الزيتية للمجهر الضوئي ، كما لوحظت أشكال الخلايا بعد صبغها من خلال تداخل الخلايا مع الصبغة و ملاحظة تجمعها و أحجامها (Atlas *et al* . , 2010).

3-7-3- الاختبارات الكيموحيوية Biochemical test

3-7-3-1- اختبار تحلل الدم Hemolyssis

حضر وسط اكار الدم بإضافة 5% دم وحسب التعليمات المرفقة مع العبوة ثم لقح بالعزلة المراد اختبارها و حضنت بدرجة 37 م° لمدة 24 ساعة ثم لوحظ تكون هالة خضراء اللون حول المستعمرات البكتيرية التي تمثل دليلاً على قدرة هذه البكتريا على تحليل الدم الكامل (Aloush *et al* . , 2006) .

3-7-3-2- اختبار إنتاج انزيم الكتاليز Catalase test

أخذ جزء من أعلى مستعمرات النمو البكتيري من وسط المكانوكي ثم وضع على شريحة زجاجية وأضيف اليها قطرة من الكاشف بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 ، إن ظهور فقاعات دليل على ايجابية الاختبار و قدرة البكتيريا على إنتاج انزيم الكتاليز (Macfaddin , 2000) حيث يستعمل هذا الاختبار للتحري عن قدرة البكتيريا على إنتاج انزيم الكتاليز.

3-7-3-3- اختبار الاوكسيديز Oxidase test

نقلت بواسطة عيدان خشبية معقمة Stick أعدت لهذا الغرض مستعمرة نقية بعمر 18 – 24 ساعة إلى ورقة ترشيح نظيفة وجافة وضعت عليها آنياً قطرات من كاشف الاوكسيديز في حال تحول لون المستعمرة إلى اللون البنفسجي الغامق مباشرةً فهو دليلٌ على إيجابية الاختبار و قدرة البكتيريا على إنتاج انزيم الاوكسيديز (Macfaddin , 2000).

3-7-3-4- اختبار الاندول Indol test

لقحت الأنابيب الحاوية على وسط ماء الببتون بمستعمرات مفردة من العزلة المراد اختبارها في هذه الدراسة ثم حضنت الأنابيب بدرجة 37 م˚ لمدة 24 ساعة بعد انتهاء مدة الحضن نلاحظ وجود العكارة دليل على النمو البكتيري ثم أُضيفتْ قطرتان من كاشف Kovac's reagent في حال تكون حلقة حمراء يدل على إيجابية الاختبار ، و تدل على قدرة البكتيريا على تحليل الحامض الأميني التربتوفان (Tryptophane) و إنتاج الاندول (Macfaddin , 2000) .

3-7-3-5- اختبار احمر المثيل Methyl red test

لقحت الأنابيب الحاوية على 5 مل من وسط MR-VP (مرق الكلوكوز) بالعزلة فتية (24-18 ساعة) ثم حضنت الأنابيب بدرجة حرارة 37 م˚ لمدة 48 - 72 ساعة ، بعد انتهاء مدة الحضن أُضيفتْ بعض القطرات من كاشف أحمر المثيل (Methyl red) ، فتغير لون الوسط إلى الأحمر دليل على إيجابية الاختبار و دل على قابلية البكتريا في تخمر سكر الكلوكوز وإنتاج الحامض العضوي (Macfaddin , 2000) .

3-7-3-6- اختبار الفوكس بروسكاور Voges – proskauer test

لقحت الأنابيب الحاوية MR-VP (مرق الكلوكوز) ببكتيريا حديثة النمو بعمر 24 ساعة بالعزلة المراد اختبارها ، و حضنت الأنابيب لمدة 48 – 72 ساعة ثم أُضيفتْ بعدها 6 قطرات من كاشف الفا- نفثول (Alpha-naphthol) بتركيز 5% ، وقطرتان من هيدروكسيد البوتاسيوم KOH (VP1 ، VP2) وبعد مرور (10- 15) دقيقة و في حال تغير لون الوسط إلى الأحمر دليل على إيجابية الاختبار (Macfaddin ,2000) .

3-7-3-7- اختبار استهلاك السترات Citrate utilization test

لقحت الأنابيب الحاوية على وسط ستريت سايمون المائل ، بالطعن و التخطيط بالعزلة المراد اختبارها و حضنت بدرجة 37 مْ لمدة 24 ساعة ، فتحول لون الوسط من الأخضر الى الأزرق دليل على إيجابية الاختبار وقدرة العزلات على استهلاك السترات كمصدر كاربوني وحيد(Macfaddin ,2000) .

3-7-3-8- اختبار انتاج انزيم اليوريز Urease test

لقحت موائل اسطح الأنابيب الحاوية على وسط اكار اليوريا الأزرق بالعزلة المراد اختبارها بعمر 24 ساعة بطريقة الطعن و التخطيط ثم حضنت بدرجة 37مْ لمدة 24 ساعة قد تستمر القراءة لمدة 6 أيام، في حال تحول لون الوسط الأزرق إلى اللون الوردي دليل على إيجابية الاختبار،إذ تستطيع العزلات إنتاج انزيم اليوريز و تحليل اليوريا في الوسط الغذائي (Collins *et al* . , 2004) .

3-7-3-9- اختبار الحركة والنمو عند درجة الحرارة 42 مْ motility test and Growth

لقحت الأنابيب الحاوية على وسط الحركة (Motility medium) بلقاح البكتيريا المراد اختبارها بطريقة الطعن ثم حضنت الأنابيب بدرجة حرارة 37مْ لمدة 24 ساعة بوضع عامودي ، استعمل هذا الفحص للكشف عن قابلية البكتريا على الحركة إذ إن انتشار النمو البكتيري خارج حدود الطعنة دلالة على قابلية البكتريا على الحركة (Collins *et al* ., 2004).كما أظهرت البكتيريا قدرتها على الاستمرار بالعيش و النمو عند ارتفاع درجات الحرارة حتى 42 مْ.

3-7-3-10- اختبار Kliglerś Iron test و تكوين H_2S

استعمل وسط (KIA) للكشف قدرة العزلات على تخمر سكر اللاكتوز و الكلوكوز من خلال تغير لون الوسط بفعل كاشف الفينول الأحمر إلى اللون الأصفر أو عدم تغير اللون ، إذ لقحت موائل الوسط بالطعن إلى الأسفل الأنبوبة و التخطيط على السطح المائل للوسط ، وفي حال تغير لون القعر فقط دون تغير لون المائل دليل على تخمر سكر الكلوكوز فقط ، ومن خلال هذا الوسط يقيم الكشف عن قابلية العزلات على إنتاج غاز H_2S الذي يتفاعل مع أملاح الحديد في الوسط ليكون راسباً أسود من كبريتيد الحديدوز FeS (Macfaddin , 2000) .

3-7-3-11- اختبار الستريميد Cetrimide test

لقحت الأطباق الحاوية على اكار الستريميد بالعزلة المراد اختبارها بعمر 18 – 24 ساعة و حضنت بدرجة حرارة 37م° ولمدة 24 ساعة وبعد مدة الحضن في حال ظهور نمو بكتيري هذا دليل أن نتيجة الاختبار إيجابية وأن العزلات التي تم عزلها هي بكتريا *P. aeruginosa* ، إذ يعد وسط اكار الستريميد وسط انتقائي يستخدم لعزل بكتيريا الزائفة الزنجارية السالبة لصبغة كرام حيث يحتوي هذا الوسط على الستريميد والذي يعد عامل مثبط لنمو الأنواع البكتيرية الأخرى و كما يزيد الستريميد من إنتاج البكتيريا للصبغة الخارجية كالبايوسيانين و فلوريسين ، الذي تظهر بلون أخضر مزرق أو اصفر مخضر على التوالي كما في الصورة (3-2) كما و يستخدم هذا الاكار بشكل كبير في فحص الأدوية والعينات الطبية للكشف عن وجود بكتيريا *P. aeruginosa* (Jorgensen *et al* . , 2015).

صورة (3 - 2) مستعمرات بكتريا *P.aeruginosa* تظهر توهج أخضر متألق على وسط الستريميد

3-7-3-12- التشخيص بتقنية Identification - API system 20

شخصت 50 عزلة باستخدام تقنية API 20E كفحص تأكيدي لنوع وجنس بكتريا *P.aeruginosa* .

3-7-3-13- التشخيص و اختبار حساسية المضادات الحياتية بتقنية جهاز فايتك

VITEK- 2 Compact system –Identification and Sensitivity test

للحصول على تشخيص أكثر دقة و التعرف على الحساسية الدوائية لجميع العزلات التي تبلغ 50 عزلة لبكتيريا *P.aeruginosa* تم الانتقال إلى مستشفى الإمام الحجة (عج) الخيري في محافظة كربلاء المقدسة و تم إجراء اختبار التشخيص و الحساسية الدوائية للعزلات بتقنية جهاز فايتك المطورة الحديثة (Mondelli *et al* . , 2012) وفسرت نتائج التشخيص أن جميع العزلات التي خضعت لاختبار جهاز VITEK-2 هي بكتريا *P.aeruginosa* بنسبة 99% و اظهرت مقاومة عالية ضد المضادات الحياتية التالية Trimethopim / Sulfamethoxazole , Minocycline, Pefloxacin , ciprofloxacin ,Tobramycin , Gentamicin , Amikacin ,Meropenem , Imipenem , Cefepime , Ceftazidime , Piperacillin ,Ticarcillin/Clavulanic Acid , Ticarcillin .

3-8- حفظ العزلات لمدة طويلة في الكليسيرول (Glycerol %2)

حضر الوسط الخاص بحفظ العينات لمدة طويلة لحين الاستعمال و ذلك بإضافة 20مل من الكليسيرين (Glycerin) ألى 80مل من وسط المرق المغذي (Nutrient broth) و عقم بالمؤصدة بدرجة حرارة 121 مْ و تحت ضغط 15 باوند / انج^2 لمدة 15 دقيقة ثم ترك حتى يبرد ثم وزع في قناني صغيرة ذات غطاء محكم و معقمة ثم لقحت بمستعمرات نقية من العزلات المراد حفظها بعمر 24 ساعة ووضعت في جهاز الحاضنة بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة لملاحظة العكورة المتكونة نتيجة للنمو البكتيري وبعده تترك لمدة ساعة بدرجة حرارة الغرفة ثم يتم حفظ هذه القناني بدرجة حرارة – 20 مْ مع مراعاة تدوين المعلومات الخاصة بكل عينة و تاريخ الحفظ و تجديدها كل ثلاثة أشهر لضمان سلامة العينات من التلف و الموت (WHO , 2003).

3-9- التحري عن قابلية بكتريا *P.aeruginos* لتكوين الغشاء الحياتي Biofilm

3-9-1- اختبار أكار أحمر الكونغو Congo red agar (CRA)

نميت المستعمرات البكتيرية لغرض تنشيطها على الأوساط الزرعية الجاهز و حضنت بدرجة حرارة 37مْ لمدة 24 ساعة وبعد الحضن تم تنمية المستعمرات بعمر 24 ساعة على وسط أحمر الكونغو المحضر في فقرة (3-2-4-1) وحضنت هوائياً لمدة (24 – 48) ساعة و بدرجة حرارة 37 مْ و تعد النتيجة موجبة عندما يكون مظهر المستعمرات أسود اللون جاف او

بني غامق و تعد النتيجة سالبة عندما يكون مظهر المستعمرات وردية اللون أو حمراء (Mireles *et al* . , 2001).

3-9-2- اختبارالصفائح المعايرة Microtiter plate (MTP)

تم الكشف عن قدرة البكتيريا على انتاج الغشاء الحيوي و مدى قوته إن كان قوياً او متوسطاً او ضعيفاً بموجب الخطوات التالية (Shakibaie *et al* ., 2015)

1. تم زراعة العزلات المحفوظة بدرجة حرارة -20 م° بعد أن تحولت إلى سائل بدرجة حرارة المختبر على الأوساط الزراعية الجاهزة مثل وسط الأكار المغذي (Nutrient agar) وحضنت بدرجة حرارة 37م°و لمدة24 ساعة لغرض تنقية العزلات تحسباً لأي تلوث من مزروع بكتيري متطفل آخر وكذلك لتلافي التالف من العزلات المحفوظة، ثم تمت إعادة زراعة المستعمرة البكتيرية المنفردة بعمر 24 ساعة في وسط المرق (Nutrient broth) وبنفس الطريقة لغرض إعادة تنشيط العينات إضافةً إلى ضمان الحصول على عزلات نقية نشطة تظهر نتائج واضحة
2. تم تحضير العالق البكتيري من تخفيف العزلات بالمحلول الفسيولوجي للوصول إلى عكورة أنبوبة ماكفرلاند القياسية الموجودة بالمختبر البالغة (1.5×10^8) خلية / مل .
3. تم ملء حفر الصفيحة 175 ميكروميتر من وسط TSB ثم لقحت الحفر بكمية 25 ميكروميتر من العالق البكتيري المطابق لماكفرلاند 0.5 .
4. ملئت الحفر في الصف الأخير و بشكل أفقي بالوسط TSB المعقم دون لقاح بكتيري و استخدمت هذه الحفر كسيطرة (Control).
5. حركت الصفيحة بهدوء و غلفت بشريط شمعي لاصق (parafilm) و حضنت الصفيحة في الحاضنة بدرجة 37م° و لمدة 24 ساعة .
6. بعد انتهاء مدة الحضن أفرغت الصفيحة من المزروع البكتيري وغسلت الحفر بمحلول دارى الفوسفات الملحي Phosphate buffer saline (PBS) ثم تركت بدرجة حرارة الغرفة.
7. تم تصبيغ حفر الصفيحة 200 ميكروميتر من صبغة الكريستال البنفسجي 1 % Crystal violete و تركت لمدة 20 دقيقة ثم غسلت عدة مرات بماء مزال الايونات Deionized water و تركت بدرجة حرارة الغرفة حتى تجف.
8. أضيف 200 ميكروميتر من كحول الايثانول Ethanol بتركيز 95% ويفضل تكرار الحفر الحاوية لكل عينة ثلاث مرات على الأقل .
9. استخدم بعدها مباشرةً جهازقارئ الصفيحة المعايرة الدقيقة (ELISA) بطول موجي 492 - 750 نانوميتر لقراءة النتائج.
10. قرأت النتائج بجهاز (ELISA) لتقدير الكثافة الضوئية Optical density (OD) ثم قياس الكثافة الضوئية للغشاء الحياتي Biofilm حسب المعادلة التالية :-

Mean (OD) control – Mean (OD) test = (OD) biofilm

3-10- جمع العينات النباتية

تم الحصول على أوراق نبات الشاي الأخضر(*Camellia Sinensis*) و قلف نبات القرفة (*Cinnamomum zeylanicum*) من الأسـواق المحليـة فـي محافظة كربـلاء المقـدسـة منشـؤها العـراق / أربيـل ، وتـم الحصول على مسحوق أوراق نبات الحناء (*Lawsonia inermis*) الخالي من اي إضافات أخرى من الأسواق المحلية و منشؤها العراق / بصرة . طحنت الأوراق الجافة لشاي الأخضر و قلف للقرفة بعد تنقيتها من الشوائب بمطحنة كهربائية إلى أن تحول إلى مسحوق ناعم ثم نخلت مساحيق النباتات الثلاثة بمنخل ناعم لكل نبات على حدة للحصول على مسحوق ناعم جداً يشبه الباودر ثم حفظت في قناني نظيفة و معقمة في درجة حرارة الغرفة لحين الاستعمال (Talib *et al* . , 2012) .

3-11- تحضير المستخلصات النباتية

3-11-1- تحضير المستخلص المائي البارد و الحار للشاي الأخضر و القرفة و الحناء

حضر المستخلص المائي البارد و الحار للنبات الثلاثة في مختبر الصحة العامة في محافظة كربلاء و حسب ما ورد في دراسة Amra و جماعته (2006). وذلك بإذابة 50غم من المسحوق (Powder) الذي تم تحضيره في الفقرة السابقة (3-7) في 500مل من الماء المقطر (Distilled water) بنسبة (V:W – 10:1) وترك لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة الغرفة بعده رشح الخليط باستخدام عدة طبقات من الشاش الطبي للتخلص من الشوائب ثم صب المحلول في أنابيب نظيفة و معقمة و وضعت الأنابيب في جهاز الطرد المركزي (centrifuge) بسرعة 3000 دورة / دقيقة ، ثم رشح المستخلص باستخدام أوراق الترشيح (cm No.1) للحصول على محلول رائق ، جفف المستخلص باستعمال حاضنة هوائية لا تتجاوز درجة حرارتها 40 مْ ثم حفظت الخلاصات الجافة في قناني معتمة في الثلاجة لحين الاستعمال ، و حضر المستخلص المائي الحار للنباتات الثلاثة بنفس طريقة تحضير المستخلص المائي البارد مع استبدال الماء البارد بالماء المغلي .

3-11-2- تحضير مستخلص الايثانول الكحولي للشاي الأخضر و القرفة و الحناء

حضـر مستخلص الايثانول الكحولي بإذابـة 50غم مـن مسحوق البـاودر و الـذي تـم تحضيره بالفقرة (3-7) في 500مل من كحول الايثانول في قناني زجاجية نظيفة و معقمـة بالمؤصـدة لكـل نبـات علـى حـدة ، ثـم غلفـت القناني بورق معتم بعيدة عن الضوء لمدة 72 ساعـة ، ثـم رشحت باستخدام شاش طبي للتخلص مـن العوالـق ثم صب المحلول بالأنابيب معقمة و أجريتْ عملية الطرد المركزي بمعدل 3000 دورة / دقيقة ثم رشح المحلول بورق الترشيح (No.1cm) ، ثم جفف المحلول الرائق في حاضنة هوائية لا تتجاوز درجة حرارتها 40 مْ، للتخلص من المذيب العضوي و حفظت الخلاصات الجافة في درجة حرارة-20 مْ لحين الاستعمال (Lokhande *et al* . 2007 ; Huda *et al*. ,2009 ; , Nair *et al* . , 2005).

3-11-3- تحضير تراكيز المستخلصات النباتية المائي البارد والحار و الكحولي لنبات الشاي الأخضر و القرفة والحناء

لغرض تحضير المحلول الخزين (Stock solution) للمستخلص المائي البارد و الحار أُخذ (2)غم من الخلاصات النباتية الجافة لكل نبات على حدةٍ التي حضرت في فقرة (3-8-1) و اذيب في (10)مل من الماء المقطر المعقم فأصبح لدينا محلول خزين بتركيز 200ملغم/مل عقم المحلول بالترشيح باستخدام أوراق ترشيح (No.1cm) و مرشحات غشائية دقيقة (membrane Filter) 0.22 ميكروميتر للتخلص من الملوثات إن وجدت و للحصول على محلول خزين معقم ، استخدم هذا المحلول كمصدر لعمل التراكيز (100، 75، 05 ، 25)ملغم/مل لاختبار فعالية المستخلص المائي البارد والحار للشاي الأخضر والقرفة و الحناء تجاه بكتريا *P.aeruginosa* المكونة للغشاء الحيوي و المعزولة من جلود مرضى الحروق .

أما المستخلصات النباتية لكحول الايثانول فأخذ (2)غم من الخلاصة النباتية الجافة لكل نبات على حدةٍ التي حضرت في الفقرة (3-8-2) و أذيبت في 10مغم/مل من محلول (DMSO) Dimethyl sulfoxide بتركيز 5%(5 مل DMSO / 95 مل ماء مقطر) و عقم بالترشيح و المرشحات الغشائية فأصبح لدينا محلول خزين معقم بتركيز 200 ملغم/مل ، استخدم هذا المحلول كمصدر لعمل التراكيز (100، 75، 50 ، 25) ملغم/مل لاختبار فعالية المستخلص الكحولي تجــاه البكتيريــا .

3-12- اختبار مدى حساسية بكتيريا *P.aeruginosa* للمستخلص المائي البارد و الحار و المستخلص الكحولي للشاي الأخضر و القرفة و الحناء

3-12-1- طريقة الانتشار من الحفر Well diffusion method

استخدمت طريقة الانتشار بالحفر (Sengul *et al*. , 2009) للكشف عن فعالية التثبيط للمستخلصات المختارة في هذه الدراسة ضد بكتيريا *P.aeruginosa* المكونة للغشاء الحيوي و والمعزولة من مرضى الحروق بالخطوات الآتية :

1. خففت العزلات بالمحلول الفسيولوجي (NS) للحصول على عكورة تشابه عكورة أنبوبة ماكفرلاند القياسية (0.5) التي تعادل (1.5×10^8 CFU\ml)
2. تم تحضير وسط الأكار الجاهز Mueller Hinton Agar حسب التعليمات المرفقة مع العبوة لشركة المصنعة وبعد التعقيم بالمؤصدة صب الوسط بالأطباق و ترك حتى يبرد و يتصلب .
3. نشرت العزلات المخففة بمقدار (100 ميكرولين) لكل طبق بواسطة ماسحات قطنية معقمة و تركت لمدة 15 دقيقة ليتم امتصاص العالق البكتيري.
4. استخدم الثاقب الفليني لعمل أربعة ثقوب محيطية بلغ قطرها (6ملم) على سطح الاكار المزروع ثم ملئت كل حفرة بمقدار (50 ميكرولين) من كل تركيز من التراكيز الآتية (100 ، 75 ، 50 ، 25) ملغم /مل بمعدل حفرة لكل تركيز ولكل مستخلص نباتي على حدةٍ .
5. حضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 مْ و لمدة ما بين18-24 ساعة ثم قيست مناطق التثبيط حول كل حفرة لكل تركيز ولكل مستخلص و تم مقارنة التراكيز المتماثلة فيما بينها لكل تركيز على حدةٍ كما قورنتٍ المستخلصات حسب نوع النبات و حسب نوع المستخلص فيما إذا كان المستخلصُ مائياً بارداً أو مائياً حاراً أو كحولياً ثم قورنت مناطق التثبيط حسب نــوع الغشاء الحياتي الذي أنتجتهُ كل عزلــة اعتمــاداً على اختبار (CRA) و (MTP) فيما إذ كان قوياً أو متوسطاً أو ضعيفاً .

3-12-2- اختبار التركيز المثبط الأدنى (MIC) و التركيز القاتل الأدنى (MBC) لمستخلص الايثانول الكحولي للشاي الأخضر والقرفة والحناء

تم تحضير التراكيز اللازمة للكشف عن التركيز المثبط الأدنى و التركيز القاتل الأدنى لمستخلص الايثانول الكحولي للشاي الأخضر و القرفة والحناء ، حضر من المحلول الخزين لكل مستخلص على حدةٍ سلسلة من التراكيز اللازمة المتضاعفة اعتماداً على التراكيز التي ظهرت فيها حلقة التثبيط و عدم ظهور حلقة التثبيط وتم المقارنة بينها حسب نوع المستخلص النباتي و تركيزه و قوة الغشاء الحياتي الذي تنتجه كل عزلة و تم الحصول على التراكيز التالي(85 ، 80 ، 75 ، 70 ، 65 ، 60 ، 55 ، 50 ، 45 ، 40 ، 35 ، 30 ، 25)ملغم/مل (Mehta *et al* . , 2016; Archana *et al* . , 2011) . تم تحديد MBC , MIC كما في الخطوات التالية

1. حضر العالق البكتيري من مزج عدة مستعمرات من بكتريا *P.aeruginosa* مع (5)مل من المحلول الفسيولوجي و تم مقارنة عكورة العالق مع عكورة محلول المكفرلاند (0.5) القياسي الذي يعادل 1.5×10^8 CFU / ml .
2. من المحلول الخزين (Stock Solution) والذي حضر في فقرة (3-8-3) تم تحضر التركيز 100ملغم /مل بإضافة (1)مل من المحلول الخزين الى 10 من (DMSO) بتركيز 5% في أنبوبة نظيفة و معقمة .
3. حضرت من التركيز 100ملغم/مل سلسلة من التراكيز المضاعفة و المحصورة ما بين التركيزين (90 – 20)ملغم/مل.
4. استعملت من (1 - 13) أنابيب معقمة لكل مستخلص على حدةٍ و رقمت الأنابيب وأضيف إليها (5)مل من الوسط الزرعي Nutrient broth في كل أنبوبة ثم أضفيتْ التراكيز على التوالي وهكذا مع كل مستخلص على حدةٍ مع مراعاة تغير الماصة لكل مستخلص و لكل تركيز لتلافي حدوث أي تلوث بين المستخلصات .
5. بعدها لقحت الأنابيب بواسطة Loop full من العالق البكتيري المحضر في أول خطوة.
6. تم تحضير أنبوبتي سيطرة الأول يحوي مستخلص فقط دون عالق بكتيري و الثاني يحوي العالق البكتيري دون مستخلص .
7. كررت هذه الخطوات لجميع تراكيز المستخلصات التي أظهرت البكتيريا حساسية تجاهها .
8. حضنت الأنابيب بعد وضعها عمودياً في الحاضنة بدرجة حرارة 37م° لمدة 24 .
9. سجلت نتائج MIC وMBC على أساس ظهور العكورة (Turbidity) حيث إن الأنبوبة التي لم يلاحظ فيها النمو البكتيري بشكل مرئي و واضح في العين المجردة وظهر النمو البكتيري عند القيام بعميلة الزرع من عالق الأنبوبة على أطباق حاوية على وسط الأكار المغذي الصلب (Nutrient Agar) بعد الحضن بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة ، فالتركيز الذي أظهر نمواً بكتيرياً وان كان قليلاً جداً في أطباق الأكار المغذي شخص على أنه التركيز المثبط الأدنى (MIC) أما التركيز الذي لم يظهر أي نموٍ

بكتيريٍ في أطباق الأكار المغذي شخص على أنه التركيز القاتل الأدنى (MBC) و القاضي على البكتيريا نهائياً
(Islam *et al* ., 2016 ; CLSI , 2015 ;Tariq & Reyaz , 2013)

3-13- التحليل الإحصائي Statistical analysis

أُخضعتْ جميع نتائج الدراسة الحالية للتحليل الإحصائي الحياتي و استخدم لهذا الغرض البرنامج الإحصائي الجاهزSPSS إذ أجرى تطبيق التحليل العاملي لثلاثة عوامل بتفاعل ، مع حساب أقل فرق معنوي LSD عند مستوى الاحتمالية أقل من $P \geq 0.05$.

الفصـــل الرابع

النتائج والمناقشة

Results and discussion

الفصل الرابع

4- النتائج و المناقشة Results and Discussion

4-1- العزل و التشخيص Isolation and identification

جمعت خلال مدة الدراسة 118 عينة من جلد المرضى المصابين بالحروق من الدرجة الثانية و الثالثة بنسبة تراوحت بين 20 – 55% من مساحة سطح الجسم من مستشفى مدينة الإمام الحسين (ع) الطبية / محافظة كربلاء المقدسة / قسم الحروق و تم الحصول على 50 عزلة من بكتريا *P. aeruginosa* للمدة الزمنية (كانون الأول/ 2017 – شباط / 2018) .و كانت نسبة الإصابة 42.4% تراوحت أعمارهم بين 2 – 55 سنة .و تعد هذه النسبة مقاربة للنتائج التي سجلها الباحثون (Jain and Singh , 2007) إذ ذكر أن 45.8% من الأشخاص المصابين بالحروق لديهم بكتريا *P.aeruginos* . وفي دراسة أخرى سجل الباحثون نسبة 27% من بكتريا *P. aeruginosa* عن باقي الأحياء المجهرية الأخرى التي عزلت من جلود الاشخاص المصابين في الحروق و الراقدين في المستشفى مدة تراوحت بين (7- 15 يوماً)

(Mansour and Enayat, 2004) . ويعود السبب في ذلك إما لممرضات داخلية المنشأ (endogenous) والمتمثلة بالنبيت الطبيعي (Normal flora) الموجودة على الجلد وفي الأمعاء والجهاز التنفسي للأشخاص الراقدين في المستشفى أو خارجية المنشأ Exogenous كانتقالها من الكادر الطبي أو الزائرين أو الأدوات الجراحية و الهواء و الماء و الأرضيات.

وأيضاً لكثرة الاستعمال العشوائي لأغلب المضادات و بضمنها مضادات البيتا-لاكتام في المستشفيات و المجتمعات كان السبب في ظهور مشاكل السلالات المقاومة و عدم كفاءة العلاج و ظهور سلالات تميزت أنها ذات مقاومة متعددة لأنواع عدة من المضادات الحياتية في الوقت نفسه ، و تعد هذه مشكلة من الناحية الطبية في صعوبة السيطرة على الأمراض نتيجة عدم انتقاء العلاج الصحيح إضافةً إلى وسائل المقاومة المتعددة التي تمتلكها البكتريا فضلاً عن امتلاكها للغشاء الحيوي(Kolenbrander *et al* .,2010; Davey *et al*.,2000).

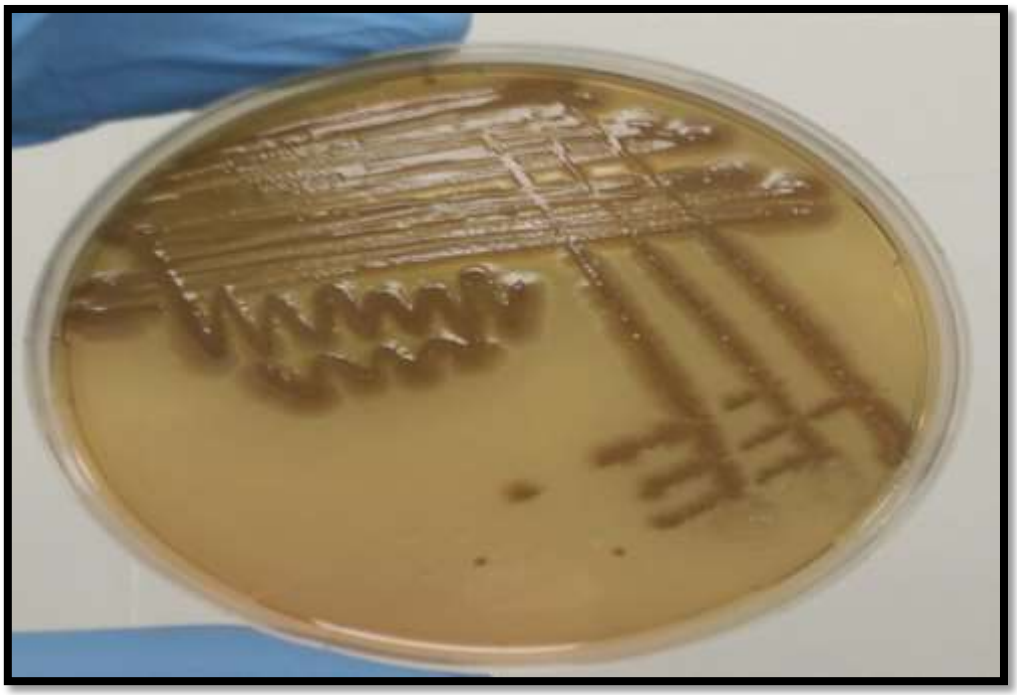
4-2- الفحوصات المظهرية و الكيموحيوية Morphological and biochemical tests

بعد جمع و عزل العزلات من خلال إجراء الفحوصات المظهرية و الكيموحيوية تبين أن جميع عزلات التي تم جمعها و عزلها هي بكتريا *P.aeruginosa* ظهرت تحت المجهر بشكل خلايا عصوية سالبة لصبغة كرام غير مخمرة للاكتوز. و تعد هذه البكتريا مؤكسدة في التفاعلات الأيضية غير مخمرة للكاربوهيدرات الشائعة ولكن قد تنتج الحامض في حالة الأكسدة إن هذه الصفة قد تستعمل في تمييز هذه البكتريا عن بقية أنواع البكتريا السالبة لصبغة كرام المخمرة في العائلة المعوية ، و متحركة وتنمو على أبسط وسط زرعي (Alhazmi,2015).

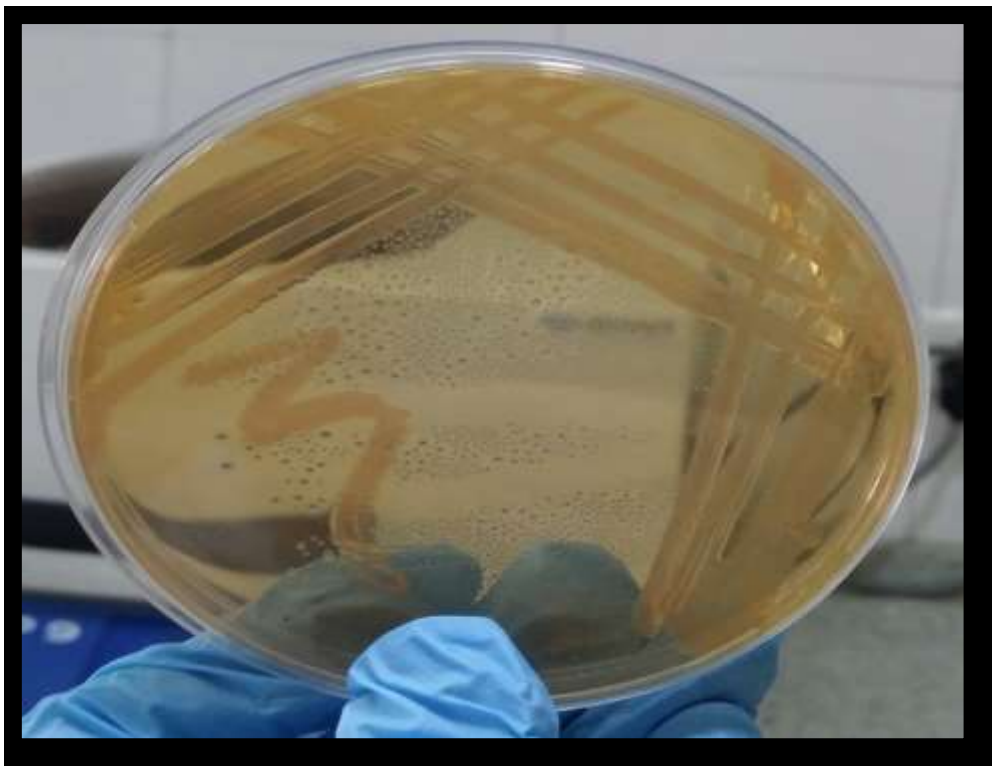
يمكن تشخيصها بصورة أولية من خلال رائحة مستعمراتها النامية على الوسط الزرعي اكار الدم (Blood agar) والتي تشبه رائحة العنب المتعفن .كما أظهرت تحللاً كاملاً للدم كما في الصورة (4-1) ، ظهرت مستعمراتها على وسط (Nutrient agar) كبيرة ولها مظهر محدب وحافات مسطحة كما في الشكل (4-2) ، وتظهر المستعمرات توهجاً اخضرَ من المزروع البكتيري على وسط (MacConkey agar)كما في الشكل(4-3) وتعد هذه علامة للكشف عن إنتاج صبغة Pyocyanin من قبل هذه البكتريا (Cornelis , 2008).

كما أنها متحركة على وسط الحركة وتنتج هذه العصيات البكتيرية على معظم الأوساط الزراعية صبغات مثل pyocyanin ، fluoarescein ، pyorubin (Todar *et al* ., 2011). و بينت نتيجة الاختبارات الكيموحيوية وكما موضح في الجدول (4-1) أن جميع العزلات كانت سالبة لفحص الاندول و المثيل الأحمر و فوكس بروسكور و موجبة لاختبار السترات ، بينما كانت النتيجة سالبة على وسط Kligler iron agar و عدم ظهور راسب أسود ولا تطلق غازاً كما في الشكل (4-4) ، وكانت النتيجة موجبة لاختبار الاوكسديز و الكاتليز و اليوريز كما كانت النتيجة موجبة لاختبار الحركة والنمو بدرجة حرارة تزيد عن 37م° حيث تمتلك البكتريا القدرة على النمو في درجة حرارة 42 م°.

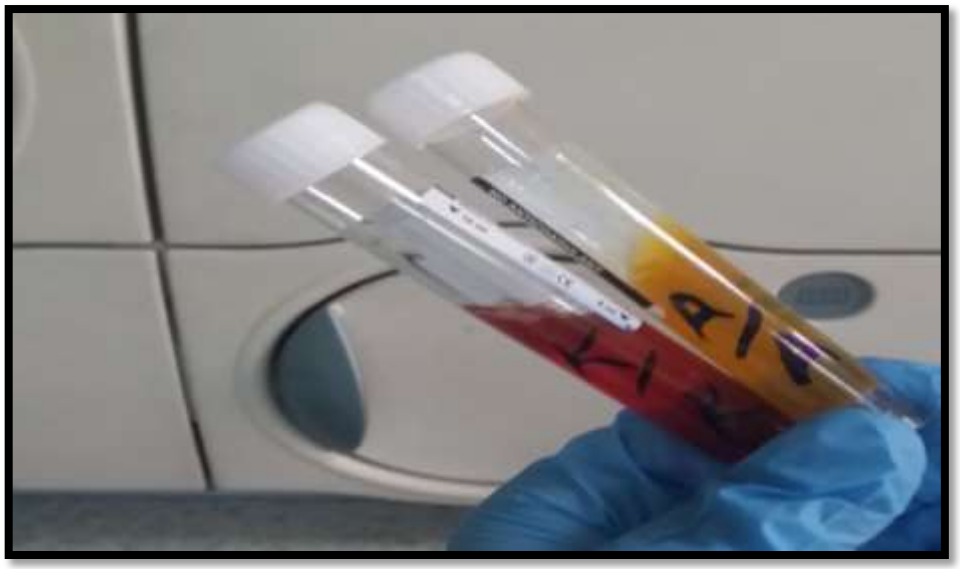
صورة (4-1) مستعمرات بكتريا *P.aeruginosa* على وسط اكار الدم



صورة (4-2) مستعمرات بكتريا *P.aeruginosa* على وسط اكار Nutrient



صورة(4-3) مستعمرات بكتريا *P.aeruginosa* على وسط المكانوكي



صورة (4-4) لأختبار Kligler´s Iron agar لبكتريا *P.aeruginosa*

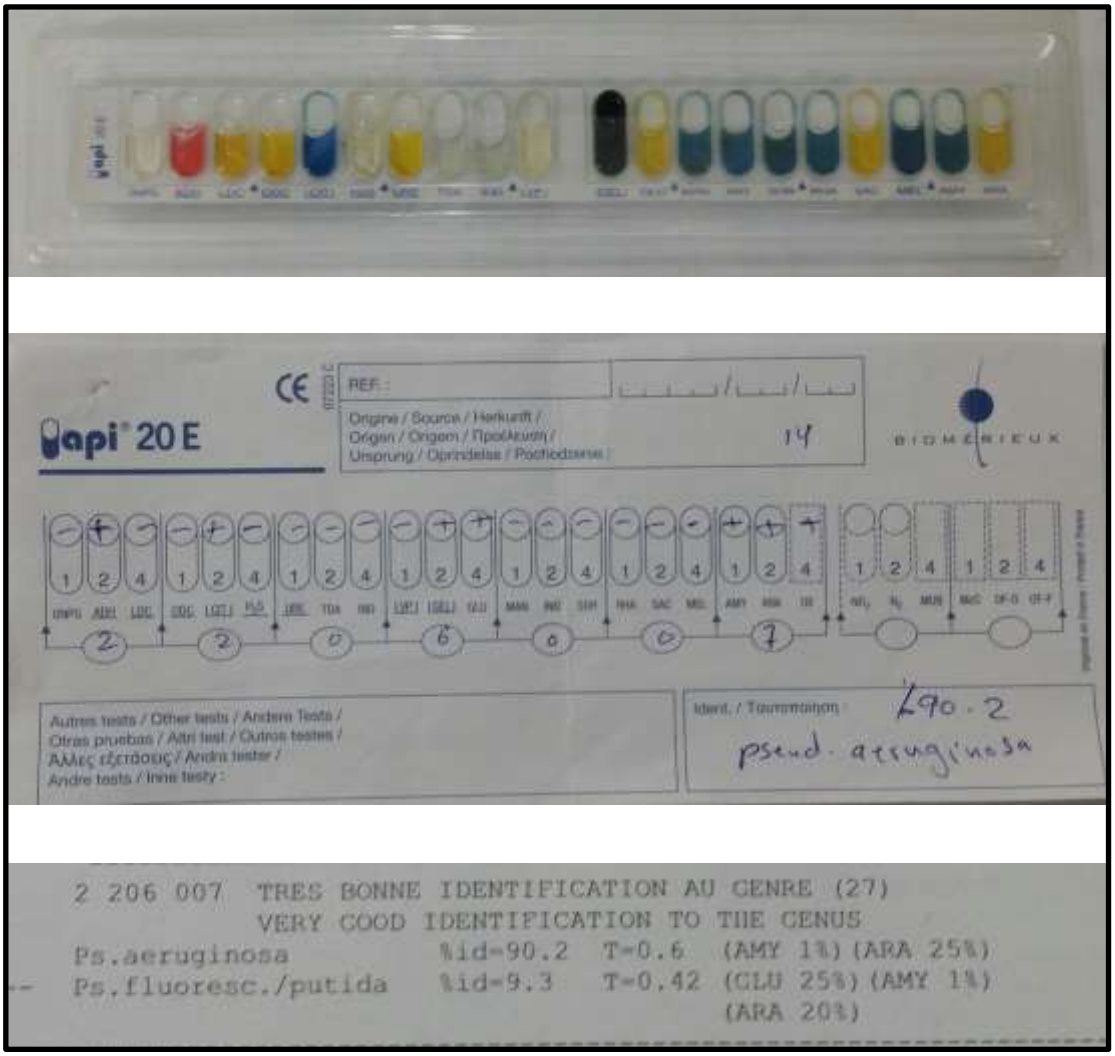
جدول (4-1) نتائج الاختبارات الكيموحيوية لعزلات بكتريا *P.aeruginosa*

ت	الاختبارات	النتيجة
1	Blood Agar	+ (β- hemolysis)
2	Cetrimide Agar Base	+
3	Oxidase Test	+
4	Catalase Tests	+
5	Urea Test	+
6	Motility Test	+
7	Growth at 42 C^{o}	+
8	Simmon's Citrate	+
9	Voges – Proskauer	–
10	Gram stained Test	–
11	Methyl – red	–
12	Kligler´s iron Agar	K/K/- gas/ - H2S -
13	Indole Test	–

+ : positive test ، - : negative test

3-4 - تشخيص بكتريا *P.aeruginosa* باستخدام تقنية API 20E

لغرض التأكد من تبعية العزلات للنوع *P.aeruginosa* استخدم تقنية API 20E System المبين في الصورة (4-5) المجهز من شركة Biomerieux الفرنسية و تستخدم هذه التقنية لتشخيص البكتريا السالبة لصبغة كرام وفقاً لتعليمات الشركة المصنعة ، إذ يحتوي على 21 اختباراً تعطي نتائج هذا الفحص رقماً سباعي البصمة يمكن تعين النتائج بناءً على جدول قياسي مرفق مع API 20E .



صورة (4-5) تشخيص بكتريا *P.aeruginosa* بتقنية API-20 E

4-4- تشخيص البكتريا و اختبار حساسية العزلات البكتيرية للمضادات الحياتية باستخدام VITEK - 2 COMPACT SYSTEM

للحصول على تشخيص أكثر دقة لكل العزلات البكتيرية و التعرف على حساسية بكتريا *P.aeruginosa* للمضادات الحياتية تم إجراء اختبار التشخيص و الحساسية للعزلات البالغ عددها 50 عزلة بكتيرية باستخدام تقنية جهاز VITEK-2 المطورة . و يعد من أفضل الأجهزة للتعرف على أنواع الأحياء المجهرية خلال مدة قصيرة وبشكل دقيق جاد و يعد الجهاز من تطوير شركة Biomerieux الفرنسية. يقوم بتحديد نوع البكتريا بشكل آلي في الجهاز عن طريق إجراء الاختبارات Biochemical tests 64 دون الحاجة لإجراء أي فحوصات أخرى و يتعرف على البكتريا السالبة و الموجبة لصبغة كرام و الخميرة و الفيروسات بالإضافة لفحص الحساسية للمضادات الحيوية. وأهم ما يميزه أنه يتعرف على الخلايا الحية فقط باستخدام كارت التعريف حيث يتم تحديد مستوى تشخيص الكائن من خلال خارطة اختباراته و تقارن بالصفات التصنيفية للجهاز فيعطي للكائن نسبة احتمالية و مستوى الثقـــة . فمثلا إذا كانت نسبـــة الاحتماليـة 96-99% فهي عند مستوى الثقة ممتاز، لذلك يكون من أكثر الأجهزة المعتمدة حديثاً في المختبر وقد اتفق ذلك مع دراسة (Mondelli *et al.,* 2012) التي أثبتت أن تقنية جهازVITEK-2 Biomerieux system هي تقنية سريعة و دقيقة يجب العمل بها في التشخيص المختبري للأحياء المجهرية فـي كل المختبرات ، وأما دراسة Ligozzi و جماعته (2002) التي أثبتت تطوير هذه التقنية بحيث يمكنها تشخيص المضاد الحيوي المناسب لكل كائن مجهري ممرض بواسطة كارت الحساسية و كانت نتيجة التشخيص في جهاز VITEK-2 أن جميع العزلات تعود الى بكتريا *P.eruginosa* بتشخيص ممتاز. أما بالنسبة لاختبار الحساسية الدوائية و قياس أقل تركيز مثبط MIC للبكتيريا اعتماداً على برتوكول Protocol (CLSI) الجهاز أظهرت نسبة 78% أي 39 عزلة من أصل 50 عزلة من بكتريا *P.aeruginosa* المعزولة من الحروق و المقاومة (R) للمضادات التالية , Ticarcillin Ticarcillin/Clavulanic Acid , Piperacillin , Ceftazidime , Cefepime , Imipenem , Meropenem , Amikacin , Gentamicin , Tobramycin , Ciprofloxacin , Pefloxacin , Minocycline ,Trimethopim/Sulfamethoxazole

و نسبة 22% أي 11 عزلة بكتيريا فقط من أصل 50 عزلة أظهر حساسية(S) تجاه Colistin بأقل تركيز مثبط MIC ≤ 0.5 أما العزلات التي أظهرت مقاومة (R) تجاه المضادات الحياتية فكانت نتائج أقل تركيز مثبط هو MIC ≥ 128 تجاه كل من Ticarcillin/Clavulanic , Piperacillin , Tricacillin و أظهـــرت MIC ≥ 64 لكل من Amikacin, Cefepime, Ceftazidime بينما أظهرت MIC ≥ 16 تجاه Imipenem , Meropenem , Gentamicin , Tobramycin , Pefloxacin و mic ≥ 4 تجاه Ciprofloxacin و MIC ≥8 تجاه Minocycline بينما أظهرت نتيجة MIC ≥ 320 للمضاد Trimethoprim/Sulfamethoxazole وكما موضح في الملاحق (1) ، (2) وهذا يتفق مع ما اوردهُ Tam وآخرون (2009) عن تفشي المقاومة . و تعد المقاومة التي تمتلكها بكتريا *P.aeruginosa* من أخطر أنواع المقاومة تجاه المضادات و المطهرات و عدها بعض الباحثين أخطر من المقاومة الانزيمية بسبب عدم نفاذية غشاء البكتريا لمضاد حياتي معين فتصبح أحياناً غير قابلة لنفاذ معظم المضادات الحياتية (Khameneh *et al* ., 2016) . كما يمكن أن يعود أساس إظهار العزلات لصفة المقاومة المتعددة إلى امتلاك البكتريا حاجزاً ذاتياً الممثل بطبقة الغشاء الحياتي Biofilm و هذا ما اتفق مع الباحثين (Gellatly and Hancock,2013) وبالنتيجة لا يمكن التغلب على هذه المقاومة حتى بالجرع الكبيرة أو القوية نسبياً من هذه المضادات ،قد يكون من الممكن التغلب على مقاومة هذه البكتريا بالجرعة الأعلى من المضاد أي عن طريق خلط مثبطات تشابه في تركيبها لمضادات البكتريا مثل مضادات البيتا -لاكتام أو البنسلينات واسعة الطيف فتكون فعالة ضد بكتريا *P. aeruginosa* وهذا ما اتفق عليه الباحثيون (Kadar *et al* ., 2010).

4-5- قابلية البكتريا على إنتاج الغشاء الحياتي بختبار أحمر الكونغو(CRA)

Ability of pathogenic bacteria to producing biofilm by Congo-red agar method

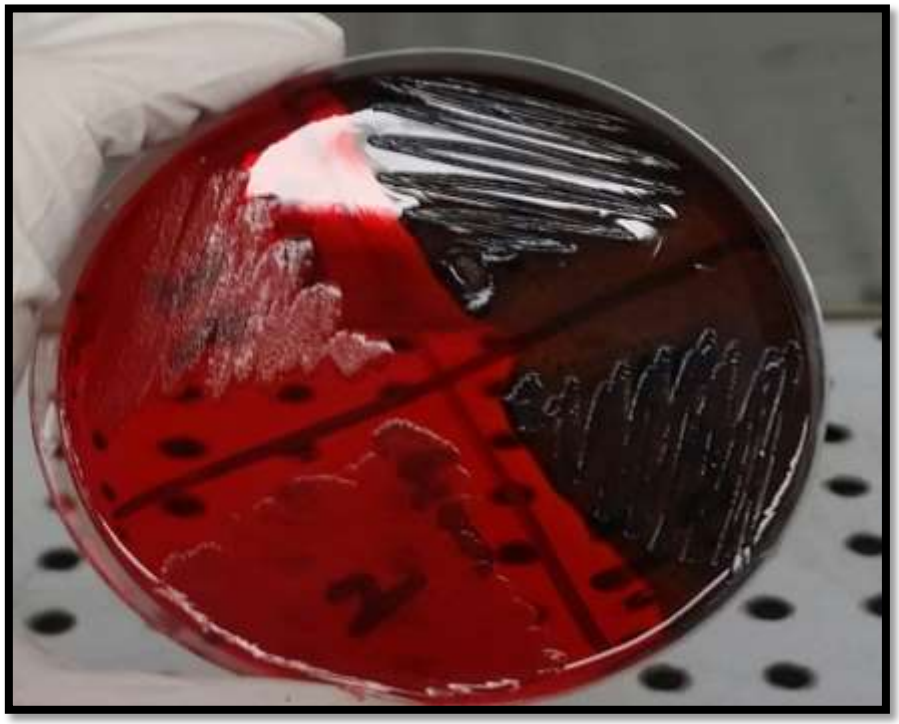
خلال هذه الدراسة اختبرت قدرة العزلات البكتيرية على تكوين الغشاء الحياتي باستخدام طريقة CRA ، حيث أعطت العزلات نتائج إيجابية بنسبة 66% أي 33 عزلة بكتيرية من أصل 50 في تكوين المستعمرات ذات اللون الأسود Black color على وسط اكار أحمر الكونغو Congo red agar وهي تمثل العزلات البكتيرية المكونة للغشاء الحياتي القـــوي Strong biofilm كما في الصورة (4-7)، أما العزلات التي أعطت نسبة 12% أي 6 عزلة بكتيرية من أصل 50 وكونت المستعمرات ذات اللون البني الداكن Dark brown colorعلى وسط اكار أحمر الكونغو وهي تمثل العزلات البكتيريـة المكونـة للغشـاء الحياتي المتوسط Moderate biofilm كما في الصورة (4-8)، بينما أعطت العزلات نتائج سلبية بنسبة 22% أي 11 عزلة بكتيريا من أصل 50 في تكوين المستعمرات ذات اللون الوردي أو الأحمر Red or pink color على وسط اكار أحمر الكونغو والتي تمثل العزلات البكتيرية غير المكونة للغشاء الحياتي و المكونة للغشاء الحياتي الضعيف Weak biofilm كما في الصورة (4-9) ، وهذه النتائج جاءت مطابقة لما ذكرهُ العديد من الباحثين عن عزلات الأحياء المجهرية المكونة للغشاء الحياتي والتي تظهر بمظهر اسود جاف أو براق بينما وصفت الاحياء المجهرية غير مكونة للغشاء الحياتي تظهر بلون وردي أو أحمر باستخدام نفس طريقة الفحص CRA (Gellatly and Hancock.,2013).
حيث إن التغير في اللون بطريقة اكار أحمـر الكونغو يحدث في المراحل الأخيرة من عمليـة الحضن نتيجة وجـود نـواتج أيضية ، و تـعد إضـافة السكروز أو الكـلوكوز بنسبة 5% عاملاً اساسياً لتحديد إنتاج السكريات الخارجية (Oliveria and Cunha,2010) حيث إن صبغة أحمر الكونغو تساعد على تكوين معقدات ملونة لارتباطها المباشر بمتعدد السكريات (Hassan *et al* ., 2011).

كما أشار العديد من الباحثين إلى أن استخدام طريقة أحمر الكونغو في الكشف عن الغشاء الحياتي من أسرع الطرق و أسهلها التي تستخدم للكشف و ذلك لجوانبها الإيجابية أهمها هو بقاء العزلة البكتيرية في وسط الاكار حية و لا تتأثر بكثافة المزروع البكتيري بسبب استعمالها

لصبغة أحمر الكونغو التي تتفاعل مع السكريات وتعمل على تصبغ السكريد مكون معقدات ملونة(Sharrari & Chitra,2012).من خلال هذه الدراسة أظهرت بكتريا *P.aeruginosa* المعزولة من الحروق مقاومتها المطلقة لأغلب أنواع المضادات الحياتية بسبب قدرتها على تكوين الغشاء الحياتي و هذه النتائج تتفق مع الدراسة التي أجراها الباحثون (Toole *et al* .,2000) . ان بكتريا *P. aeruginosa* المعزولة من مرضى الحروق تكون ذات مقاومة عالية للعديد من المضادات الحياتية و تصل نسبة المقاومة إلى 100% لمضادات البيتا-لاكتام و قد يعود السبب إلى حاجز النفاذية المتمثل بطبقة الغشاء الخارجي و تعد من أهم أنواع المقاومة التي تمتلكها البكتريا تجاه المضادات والمطهرات أو قد تأتي المقاومة عن طريق تقليل النفاذية للغشاء الخارجي الذي بدورهِ قد يؤثر على معدل امتصاص المضادات الحياتي .(Ekrami and Kalantar.,2007)

صورة (4-6) مستعمرات بكتريا *P.aeruginosa* المنتجة للغشاء الحياتي القوي بطريقة Congo red agar (CRA)

صورة (4-7)مستعمرات بكتريا *P.aeruginosa* المنتجة للغشاء الحياتي المتوسط والضعيف والقوي بطريقة CRA



صورة (4-8)مستعمرات بكتريا *P.aeruginosa* الغير منتجة للغشاء الحياتي والمنتجه للغشاء الحيوي القوي بطريقة CRA

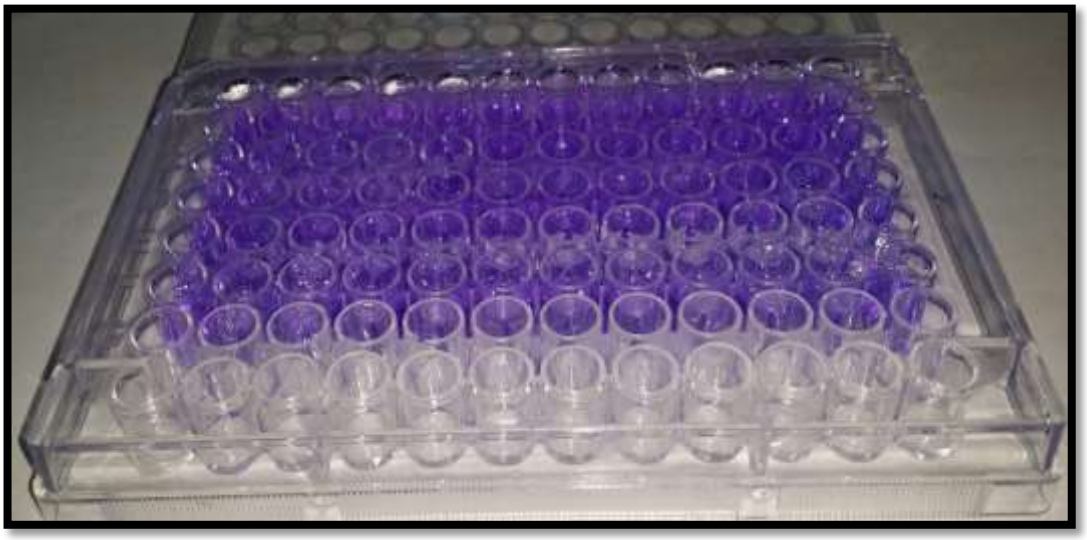
4-6- قابلية البكتريا على إنتاج الغشاء الحياتي بختبار الصفائح المعايرة الدقيقة Ability of pathogenic bacteria to producing biofilm by microtitter plates

بعداختبار قابلية العزلات البكتيرية المكونة للغشاء الحياتي biofilm بواسطة الاختبار الكمي لصفائح المعايرة الدقيقة microtitre plates وتم تقسيم العزلات البكتيرية وفقاً لقابليتها على إنتاج الغشاء الحياتي كما أشار إليها (Bose *et al* ., 2009) من خلال استخدام جهاز الاليزا ELISA و الذي يعتمد على OD density الكثافة وعلى الطول الموجي بين 492- 750 نانوميتر، وحسب المعادلة التالية Mean OD(control) - Mean OD(test)=OD biofilm

علما أن متوسط السيطرة يساوي 0.02 وعلى النحو التالي أكبر أو يساوي 0.240 منتج قوي للغشاء الحياتي و بين (0.120 - 0.240) منتج للغشاء الحياتي المتوسط ، وأصغر أو يساوي 0.120 منتج للغشاء الحياتي الضعيف أو غير منتجة للغشاء الحياتي كما في الصورة (4 - 10). أظهرت النتائج من خلال هذه الدراسة في اختبار الكشف عن الغشاء الحياتي باستخدام طريقة الصفائح المعايرة MTP كانت مقاربة لنتائج اختبار أحمر الكونغو CRA بنسبة 80% أي 40 عزلة بكتيريا من أصل 50 عزلة تنتج الغشاء الحياتي القوي ، و نسبة 6% أي ثلاثة عزلات بكتيريا من أصل 50 عزلة تنتج الغشاء الحياتي المتوسط ، و نسبة 14% أي سبعة عزلات بكتيريا من أصل 50 عزلة تنتج الغشاء الحياتية الضعيف وكانت أغلب العزلات المنتجة للغشاء الحياتي القوي و المتوسط مقاومة لمعظم المضادات الحياتية حسب نتائج اختبار جهاز VITEK - 2 للحساسية الدوائية و اتفقت نتائج هذه الدراسة مع نتائج Hadi وجماعته (2007) و هي ان بكتريا *P. aeruginosa* المنتجة للغشاء الحياتي تسبب الإخماج بين المرضى الراقدين في المستشفيات و مقاومة للعديد من المضادات الحياتية . وفي دراسات أخرى أوضح فيها الباحثون أن وجود المضادات الحياتية تعمل على تقليل الالتصاق البكتيريا و يعتمد هذا على نوع البكتريا و قابليتها على إنتاج الغشاء الحياتي و إمكانية العلاج باستخدام المضادات الحياتية الأكثر فعالية في علاج الالتهابات الحادة و تضعيف مقاومة البكتريا الموجودة داخل الغشاء الحياتي (Himburg *et al* ., 2007)

كما يمكن أن تصل طياتُ الغشاء الحياتي لأكثر من 100 طية لمقاومة المضادات الحياتية و تكون هي السبب في حدوث التهابات مزمنة لعديد من الأمراض والتي لا تعالج بسهولة بالمضادات الحياتية التقليدية (Silverstein *et al* ., 2010) و الاستخدام العشوائي للمضادات الحياتية حفز البكتريا على مقاومة العديد منها مما أدى إلى زيادة معدل الوفيات السنوي بسبب تجرثم الدم الناجم عن بكتريا *P.aeruginosa* (Horino *et al*., 2012).

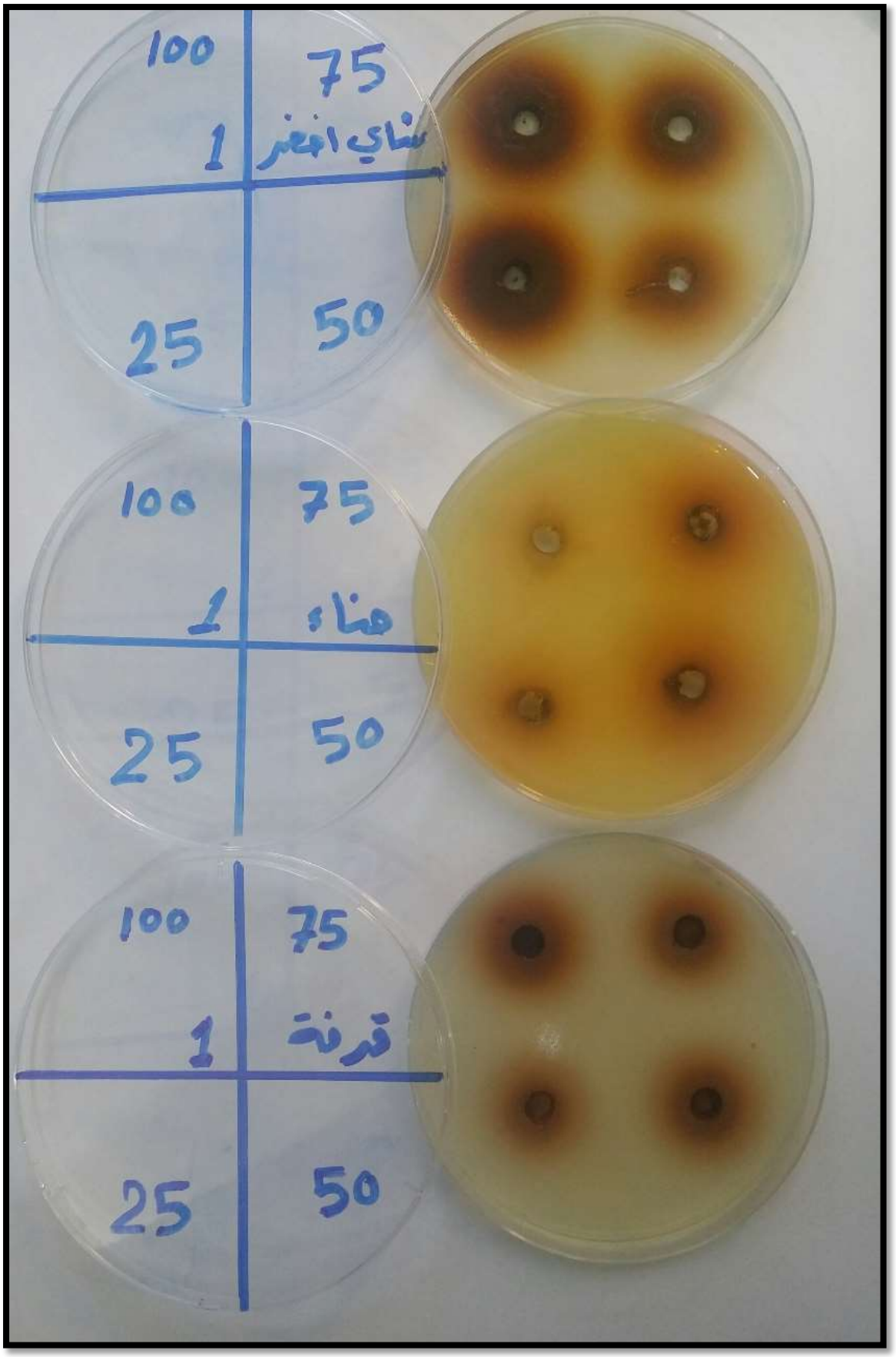
وأشارت دراسة أخرى إلى أن عصيات القيح الأزرق أو الزائفة الزنجارية المعزولة من عينات أخرى مثل الجروح و الدم والإدرار و البراز أظهرت مقاومة لمعظم المضادات تقريباً فقد أبدت العديد من المضادات الحيوية المعروفة عجزها في إحداث التأثير ضد هذه البكتريا عدا Amikacin. قد تبين أن البكتريا أبدت حساسية تجاهه هذا جاء متفق مع هذه الدراسة الحالية إلا أنها لم تتفق على حساسيتها للمضاد الحياتي Amikacin حيث أن العزلات التي جمعت في هذه الدراسة أبدت مقاومتها ضد Amikacin أيضاً و أظهر بعضُها تحسساً مختبرياً ضئيلاً للمضادين Colistin و Ciprofloxacin وقد يعود السبب إلى تطوير الأحياء المجهرية الممرضة لمقاومة متزايدة تجاه العديد من المضادات الحيوية و ظهور سلالات تميزت أنها ذات مقاومة متعددة Multiresistant (Nam *et al* ., 2010) .وقد يكون بسبب أن أغلب العزلات البكتيرية في هذه الدراسة لم تكن عشوائية فجميعها عزلت من جلود مرضى الحروق من الدرجة الثانية و الثالثة و الراقدين في المستشفى و المقاومة للمضادات الحياتية والتي تنتج الغشاء الحياتي أما القوي أو المتوسط أو الضعيف.



صورة (4-9) بكتريا *p.aeruginosa* المنتجة للغشاء الحياتي بختبار Microtiter plates (MTP)

4-7- تقدير الفعالية التثبيطية للمستخلص المائي البارد والحار لنباتات الشاي الأخضر و القرفة و الحناء على نمو بكتريا *P.aeruginos* بطريقة الانتشار من الحفر Agar well diffusion

أظهرت نتائج المستخلصات المائي البارد والمائي الحار لكل من القرفة و الشاي الأخضر و الحناء بطريقة الانتشار(Agar well diffution) لـ 50 عزلة من بكتريا *P.aeruginosa* المعزولة من الحروق و المكونة للغشاء الحياتي أنها لم تظهر أيّة فعالية ضد النمو البكتيري حتى عند تركيز200 ملغم/ مل كما في الصورة (4-11) وتوافق هذا مع دراسة التأثير المضاد للبكتريا لنباتات أخرى بعدة خلاصات لمجموعة من البكتريا السالبة لصبغة كرام فأكد أن الخلاصة المائية ليس لها فعالية بعكس الخلاصات الأخرى (Malu *et al* ., 2009) كما ذكر Yoda و جماعته (2004) أن البكتريا الموجبة لصبغة كرام هي أكثر حساسية للمستخلص المائي ، وقد يكون السبب اختلاف الأنواع البكتيرية وقدرتها على إنتاج الغشاء الحياتي و قابلية الغشاء الحياتي على نفاذية للمستخلصات النباتية بالإضافة إلى صنف النبات و اختلاف المركبات البايلوجية الفعالة فيها و اختلاف تراكيزها و طريقة تحضير المستخلص كما أشار Taguri و جماعته (2006) إلى أن قوة متعدد الفينولات المضادة للأحياء المجهرية تعتمد على نوع البكتريا وليس لها علاقة بتفاعلها مع صبغة كرام ، كما تم الإشارة في بحوث عديدة استخلص فيها الباحثون مركبات من النباتات أذيبت في المذيبات العضوية المنخفضة القطبية وأظهرت فعالية ضد الأحياء المجهرية أفضل من إذابتها بالماء المعقم البارد أو الحار(Dulger *et al* . , 2004).



صورة (4-10) عدم فعالية المستخلصات المائية ضد بكتريا *P.aeruginosa*

4-8- تقدير الفعالية التثبيطية للمستخلص الكحولي لنباتات الشاي الأخضر و القرفة و الحناء على نمو بكتريا *P.aeruginosa* بطريقة الانتشارمن الحفر Agar well diffusion

أظهرت نتائج الدراسة الحالية وجود تأثيرات متباينة لمستخلص الايثانول الكحولي للشاي الأخضر و القرفة و الحناء في نمو بكتريا *P.aeruginosa* و يتبين من الجدول (4 - 2) وجود فروقات دالة إحصائياً بمستوى احتمالية $P \geq 0.05$ بين الشاي الأخضر و القرفة لصالح القرفة و كذلك بين القرفة والحناء لصالح القرفة وبين الشاي الأخضر والحناء لصالح الشاي الأخضر في أقطار التثبيط إذ بلـــغ المعدل لمتوسط أقطار التثبيط للتراكـيز الأربعـــة (25 ، 50 ، 75 ، 100) ملغم/مل لكل مستخلص على حدةٍ للشاي الأخضر و القرفة و الحناء (6.16 ، 8.24 ، 3.42) ملم على التوالي كما في الشكل البياني (4-12)، و تطابقت هذه النتائج مع ما أشار إليه Anita و جماعته (2014) عن فعالية مستخلص الشاي الأخضر ضد العديد من الأحياء المجهرية و قدرته على تثبيطها لاحتوائه على فلافونويد و مادة الكامتشين التي تقاوم الفيروسات و الالتهابات التي تحدثها الأحياء المجهرية ، كما اشارتْ دراسة أخرى إلى أهمية القرفة وعدتها من النباتات الطبية التي تمتاز بفعاليتها المشابهة لعمل الانسولين ومن الناحية العلاجية تحتوي في تركيبها على مركب يوجينول و حامض القرفة الذي يعرف Cinnamic acid و مركبات تربينية ثنائية ومواد عفصية وهلامية أظهرت أن القرفة مضاد جيد للعديد من البكتيريا و الفطريات إضافةً إلى فعاليتها كمضاد أكسدة (Anderson ,2008) ، وفي دراسة أخرى أكد فيها Arafa (2003) أن التأثير المضاد لمستخلص نبات الحناء ضد البكتيريا و الفطريات و الفيروسات يعود لاحتوائها على مركبات فعالة أهمها الفينولات و الراتنجات و الصابونيات والدباغيات و الكومارين التي تعد مركبات سامة للأحياء المجهرية كما ذكر James & Duke (2002) أن مستخلص نبات الحناء الكحولي أظهر فعالية أفضل من المستخلص المائي كما يمتلك تأثيراً مضاداً للأحياء المجهرية و الفطريـات. أظهـرت هذه الدراســة أن الفعاليــة كـانت في أفضل حالاتها عند تركيز 100 ملغم/ مل و أظهرت نفس النتائج عند زيادة التركيز عن 100مغلم/مل للمستخلصات الثلاثة الشاي الأخضر والقرفة والحناء إذ بلغ متوسط أقطار التثبيط على التوالي (11.85 , 16.21 , 7.98)ملـم لكـــل مستخلص إذ أظهــر التركيـــز 100ملغم/مل

تفوق القرفة كما في الصورة (4-13)على الشاي الأخضر و الحناء و أظهر الشاي الأخضر تفوقه على الحناء واتفقت هذه النتائج مع دراسة أشارت إلى أن فعالية المستخلص الكحولي للنباتات الطبية أفضل من المستخلص المائي و تزداد فعاليته بزيادة التركيز لحد العتبة (Arulpriya and Lalitha , 2012). وعند التركيز 75ملغم/مل بلغ متوسط أقطار التثبيط للشاي الأخضر و القرفة والحناء (8.84 , 12.12 , 4.38)ملم على التوالي و أظهرت أيضاً تفوق القرفة على الشاي الأخضر والحناء و تفوق الشاي ألأخضر على الحناء عند هذا التركيز وعند التركيز 50 ملغم/مـل بلـغ متوسط أقطار التثبيط للشـاي الأخضر والقرفـة والحناء (3.45 , 3.60 , 1.25)ملم على التوالي حيث لم تسجل فروقات ذات دلالة إحصائية بين المستخلصين الشاي الأخضر و القرفة في حين سجل كلا التركيزين فروقات ذات دلالة إحصائية عند مقارنتها بالحناء التي سجلت انخفاض واضح في متوسط أقطار التثبيط عن باقي المستخلصات ، أما بالنسبة لتركيز 25ملغم/مل فبلغ متوسط أقطار التثبيط للشاي الأخضر و القرفة و الحناء (0.50 , 1.02 , 0.08)ملم على التوالي ، وقد وجد أن التركيز 25ملغم/مل لمستخلصات الشـاي الأخضر و القرفـة أحدث اقـل تأثيرعلى النمـو البكتيريا في حال أن التركيز 50ملغم/مل لكل من الشاي الأخضر و القرفة كانت مؤثرة على النمو البكتيريا أما الحناء لم تكن مؤثرة على النمو البكتيري في كلا التركيزين(25 ، 50)ملغم/مل .

كما يبين الجدول وجود فروقات ذات دلالة إحصائيةٍ بين معدل متوسط أقطار التثبيط عند التراكيز الأربعة (25 , 50 , 75 , 100)ملغم/مل لكل تركيز على حدةٍ وأظهر تفوق التركيز 100ملغم/مل على بقية التركيز ثم 75ملغم/مل ثم التركيز 50ملغم/مل ثم التركيز 25 ملغم/مل إذ بلغ معدل متوسط أقطار التثبيط (0.53 , 2.77 , 8.45 , 12.01)ملم على التوالي لكل تركيز ويلاحظ من الجدول أن المستخلص الأكثر تأثيراً على بكتريا *P. aeruginosa* كان لصالح نبات القرفة بالدرجة الأولى ثم الشاي الأخضر ثم الحناء و التأثير كان واضحاً أيضاً عند التراكيز الواطئة .

جدول (4 -2) الفروقات في معدلات أقطار التثبيط والتركيز للمستخلصات الكحولية لنباتات الشاي الأخضر والقرفة والحناء

المستخلص النباتي	التركيز ملغم/مل	العدد	المتوسط ± الانحراف المعياري	الفرق المعنوي
شاي أخضر	25 mg/ml lsd= 0.53	50	0.50 ±1.06	2.07
	50 mg/ml lsd=1.8	50	3.45 ±5.42	
	75 mg/ml lsd= 2.28	50	8.84 ±6.59	
	100 mg/ml lsd= 2.06	50	11.85 ±6.10	
	Total	200	6.16 ±6.87	1.29
قرفة	25 mg/ml	50	1.02 ±2.03	2.10
	50 mg/ml	50	3.60 ±5.50	
	75 mg/ml	50	12.12 ±6.45	
	100 mg/ml	50	16.21 ±6.20	
	Total	200	8.24 ±8.15	1.29
حناء	25 mg/ml	50	0.08 ±0.20	1.03
	50 mg/ml	50	1.25 ±1.93	
	75 mg/ml	50	4.38 ±4.08	
	100 mg/ml	50	7.98 ±2.73	
	Total	200	3.42 ±4.04	1.29
Total	25 mg/ml	150	0.53 ±1.37	1.17
	50 mg/ml	150	2.77 ±4.69	
	75 mg/ml	150	8.45 ±6.60	
	100 mg/ml	150	12.01 ±6.22	

يبين الجدول (4 - 3) من خلال هذه الدراسة وجود فروقات ذات دلالة إحصائية بمستوى احتمالية $P \geq 0.05$ في متوسط أقطار التثبيط تبعاً لنوع المستخلص و تركيزه في حال كون Biofilm قوياً و أظهرت النتائج فروقاً لصالح التركيز 100 ملغم/مل للشاي الأخضر و القرفة والحناء حيث بلغ متوسط أقطار التثبيط للشاي الأخضر و القرفة و الحناء عند هذا التراكيز(8.46 , 11.99 , 6.26)ملم على التوالي وعند التركيز75ملغم/مل بلغ متوسط أقطار التثبيط (5.09 ، 7.75 ، 1.67)ملم على التوالي أما بالنسبة للتركيز 50ملغم/مل و 25ملغم/مل يلاحظ عدم وجود فروقات ذات دلالة إحصائية و لم يسجل أي مستوى في تثبيط النمو لبكتريا *P.aeruginosa* أي أن هذين التركيزين غير كافيين لإحداث التأثير المطلوب و قد يرجع السبب لانخفاض تركيز المواد الفعالة في هذه التراكيز وعدم قدرتها على اختراق Biofilm القوي الذي تنتجه البكتريا إذ وجد أن حساسية البكتريا تزداد بزيادة التركيز. لوحظ أنه بترك الأطباق في الحاضنة لمدة تزيد عن 24 ساعة لا يحدث أي تغير.

جدول (4 - 3) الفروقات في متوسطات اقطار التثبيط و التركيز للمستخلصات الكحولية لنباتات الشاي الأخضر و القرفة والحناء في حالة الغشاء الحياتي القوي

المستخلص	التركيز	العدد	المتوسط	الانحراف المعياري	LSD
شاي أخضر	25 mg/ml	33	0.00	0.00	0.42
	50 mg/ml	33	0.00	0.00	
	75 mg/ml	33	5.09	1.49	
	100 mg/ml	33	8.46	0.93	
	Total	132	3.39	3.71	0.54
قرفة	25 mg/ml	33	0.00	0.00	0.56
	50 mg/ml	33	0.00	0.00	
	75 mg/ml	33	7.75	1.59	
	100 mg/ml	33	11.99	1.72	
	Total	132	4.93	5.30	0.54
حناء	25 mg/ml	33	0.00	0.00	0.28
	50 mg/ml	33	0.00	0.00	
	75 mg/ml	33	1.67	0.69	
	100 mg/ml	33	6.26	0.91	
	Total	132	1.98	2.63	0.54
Total	25 mg/ml	99	0.00	0.00	0.54
	50 mg/ml	99	0.00	0.00	
	75 mg/ml	99	4.84	2.82	
	100 mg/ml	99	8.90	2.67	
	Total	396	3.44	4.20	0.74

يبين الجدول (4 - 4) وجود فروقات ذات دلالة إحصائية بمستوى احتمالية P≥0.05 في متوسط أقطار التثبيط تبعاً لنوع المستخلص و تركيزه في حال Biofilm المتوسط في التراكيز(25 , 50 , 75 , 100)ملغم/مل إذ بلغ متوسط أقطار التثبيط للشاي الأخضر و القرفة والحناء في التركيز 100ملغم/مل على التوالي (9.98 , 23.72 , 9.30) ملغم/مل و بلغ متوسط أقطار للتثبيط عند التركيز 75ملغم/مل على التوالي (7.93 , 17.58 , 7.43)ملم وقد بلغ متوسط أقطار التثبيط عند التركيز 50ملغم/مل على التوالي (5.18 , 5.82 , 4.62)ملم . و لوحظ عند التركيز 25ملغم/مل عدم وجود فروقات ذات دلالة إحصائية بين المستخلصات أي أن المستخلصات عند هذا التركيز لم تظهر أي فعالية ، و لوحظ من خلال معدل متوسط أقطار التثبيط للتراكيز الأربعة أن الفعالية كانت أفضل عند التركيز 100ملغم/مل لمستخلص القرفة ثم الشاي الأخضر ثم الحناء و كذلك الحال بالنسبة لتركيز 75ملغم/مل ثم التركيز50ملغم/مل.

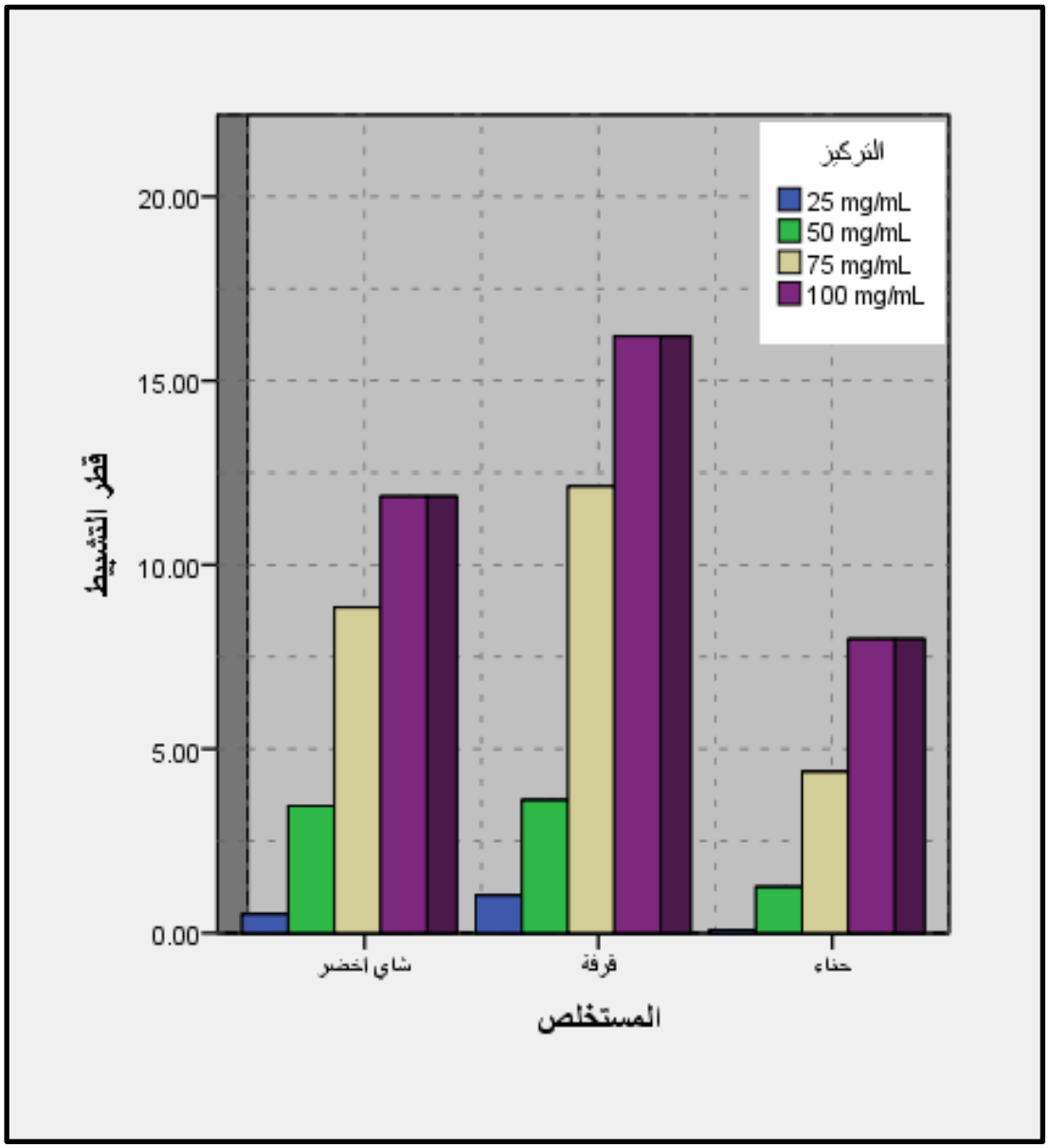
جدول (4 - 4)الفروقات في متوسطات أقطار التثبيط و التركيز للمستخلصات الكحولية لنباتات الشاي الأخضر و القرفة و الحناء في حالة الغشاء الحياتي المتوسط

المستخلص	التركيز	العدد	المتوسط	الانحراف المعياري	LSD
شاي أخضر	25 mg/ml	6	0.00	0.00	1.19
	50 mg/m	6	5.18	0.98	
	75 mg/ml	6	7.93	1.31	
	100 mg/ml	6	9.98	1.33	
	Total	24	5.78	3.95	2.82
قرفة	25 mg/ml	6	0.00	0.00	1.70
	50 mg/ml	6	5.82	0.76	
	75 mg/ml	6	17.58	0.81	
	100 mg/ml	6	23.72	2.78	
	Total	24	11.78	9.66	2.82
حناء	25 mg/ml	6	0.00	0.00	0.73
	50 mg/ml	6	4.62	0.81	
	75 mg/ml	6	7.43	0.48	
	100 mg/ml	6	9.30	0.87	
	Total	24	5.34	3.63	2.82
Total	25 mg/ml	18	0.00	0.00	2.82
	50 mg/ml	18	5.21	0.95	
	75 mg/ml	18	10.98	4.89	
	100 mg/ml	18	14.33	7.05	
	Total	72	7.63	6.95	0.74

يبين الجدول(4 - 5) وجود فروقات ذات دلالة إحصائية بمستوى احتمالية 0.05 ≥P في متوسط أقطار التثبيط تبعاً لنوع المستخلص و تركيزه في حال Biofilm الضعيف في التراكيز (25 ، 50 ، 75 ، 100)ملغم/مل إذ بلغ متوسط أقطار التثبيط للشاي الأخضر و القرفة والحناء في التركيز 100ملغم/مل على التوالي (23.04 ، 24.76 ،12.41)ملم ويليه التركيز 75ملغم/مل إذ بلغ متوسط أقطار التثبيط (20.56 ، 22.28 ، 10.82)ملم ويليه التركيز 50ملغم/مل إذ بلغ متوسط أقطار التثبيط (12.87 ، 13.21 ،3.15)ملم و يليه التركيز 25 ملغم/مل إذ بلغ متوسط أقطار التثبيط (2.29 ، 4.62 ، 0.38)ملم من خلال هذا الجدول لوحظ و جود فروقات ذات دلالة إحصائية في معدل متوسط أقطار التثبيط لكل تركيز على حدةٍ أثبت تفوق التركيز 100 ملغم/مل ثم 75ملغم/مل ثم 50ملغم/مل ثم 25ملغم/مل كما أظهر مستخلص القرفة التفوق في جميع التراكيز عن بقية المستخلصات المستخدمة في الدراسة وثم الشاي الأخضر ثم الحناء من حيث الفعالية

جدول (4 - 5) الفروقات في متوسط أقطار التثبيط و التركيز للمستخلصات الكحولية لنباتات الشاي الأخضر و القرفة والحناء في حالة الغشاء الحياتي الضعيف

المستخلص	التركيز	العدد	المتوسط	الانحراف المعياري	LSD
شاي أخضر	25 mg/ml	11	2.29	0.99	1.55
	50 mg/ml	11	12.87	2.13	
	75 mg/ml	11	20.56	2.65	
	100 mg/ml	11	23.04	1.11	
	Total	44	14.69	8.37	2.30
قرفة	25 mg/ml	11	4.62	1.38	0.92
	50 mg/ml	11	13.21	0.86	
	75 mg/ml	11	22.28	0.84	
	100 mg/ml	11	24.76	1.43	
	Total	44	16.22	8.13	2.30
حناء	25 mg/ml	11	0.38	0.26	1.15
	50 mg/ml	11	3.15	1.39	
	75 mg/ml	11	10.82	2.14	
	100 mg/ml	11	12.41	1.02	
	Total	44	6.69	5.28	2.30
Total	25 mg/ml	33	2.43	2.00	2.30
	50 mg/ml	33	9.74	4.97	
	75 mg/ml	33	17.89	5.49	
	100 mg/ml	33	20.07	5.67	
	Total	132	12.53	8.45	0.74



شكل (4 -11) تأثير المستخلصات الكحولية لنباتات الشاي الأخضر و القرفة و الحناء حسب نوع المستخلص والتركيز و معدلات اقطار التثبيط

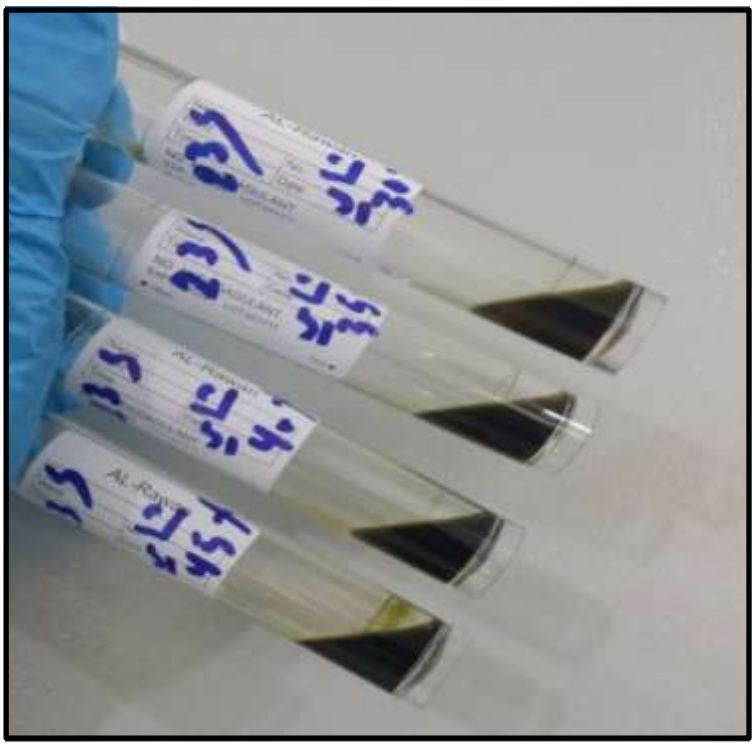
4-9- تقيم التركيز المثبط الأدنى (MIC) و التركيز القاتل الأدنى لمستخلص الايثانول الكحولي لنباتات الشاي الأخضر و القرفة و الحناء

أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن قيمة التركيز المثبط الأدنى (MIC) و التركيز القاتل الأنى (MBC) تتفاوت اعتماداً على نوع المستخلص . فقد وجد أن قيمة التركيز المثبط الأدنى و قيمة التركيز القاتل الأدنى للمستخلص الكحولي للشاي الأخضر و القرفة في حال العزلات المنتجة للغشاء الحياتي القوي و عددها 33 عزلة من 50 عزلة أي بنسبة 66%من نسبة 100% كانت قيمة (MIC) التركيز 65 ملغم/مل و قيمة (MBC) التركيز75 ملغم/مل ، أما قيمة (MIC) لمستخلص الحناء هو التركيز75 ملغم/مل وقيمة (MBC)هوالتركيز85ملغم/مل .

أما في حالة العزلات المنتجة للغشاء الحياتي المتوسط وعددها ستة عزلات من 50 عزلة أي بنسبة 12% من نسبة 100% كانت قيمة (MIC) التركيز 35 ملغم/مل و قيمة (MBC) التركيز 45 ملغم/مل كما في الصورة (4-14) ،أما بالنسبة لمستخلص الحناء كانت قيمة (MIC) التركيز 40 ملغم/مل و قيمة (MBC) التركيز 50ملغم/مل .

أما في حال العزلات المنتجة للغشاء الحياتي الضعيف والتي عددها 11عزلة من 50 عزلة أي نسبة 22% من نسبة 100% لمستخلص الشاي الأخضر و القرفة فقد كانت قيمة (MIC) هو التركيز 25ملغم/مل وقيمة (MBC) هو التركيز35ملغم/مل أما بالنسبة لمستخلص الحناء كانت قيمة (MIC) التركيز 35ملغم/مل و قيمة (MBC) التركيز45 ملغم/مل .

صورة (4-12) أقطار تثبيط مستخلص كحول الايثانول للقرفة ضد بكتيريا *P.aeruginosa*



صورة(4-13) التراكيز المحضرة لمستخلص الشاي الأخضر لإيجاد قيمة MIC وMBC ضد بكتريا *P.aeruginosa*

الفصـــل الخامس

الاستنتاجات والتوصيات

Conclusions and Recommendations

الاستنتاجات و التوصيات Conclusion and Recommendation

الاستنتاجات Conclusion

نستنتج من الدراسة الحالية

1. تميزت جميع العزلات بكتريا *P.aeruginosa* المعزولة من جلود مرضى الحروق بحساسيتها العالية للمستخلصات الكحولية لنبات القرفة بالدرجة الأولى ثم الشاي الأخضر ثم الحناء و لم تظهر أي تحسس تجاه المستخلصات المائية بنوعيها الحار والبارد .

2. أظهرت العزلات المكونة للغشاء الحياتي القوي و المتوسط مقاومة عالية بنسبة 100% تجاه معظم المضادات الحياتية الشائعة الاستعمال بينما اظهرت العزلات المكونة للغشاء الحياتي الضعيف حساسية تجاه مضاد Colistin .

3. وجود فروق في قيم MIC و MBC لمستخلص كحول الأيثانول للشاي الأخضر و القرفة و الحناء حسب قوة الغشاء الحياتي الذي تنتجه كل عزلة و حسب نوع المستخلص النباتي .

التوصيـــــــــات Recommendation

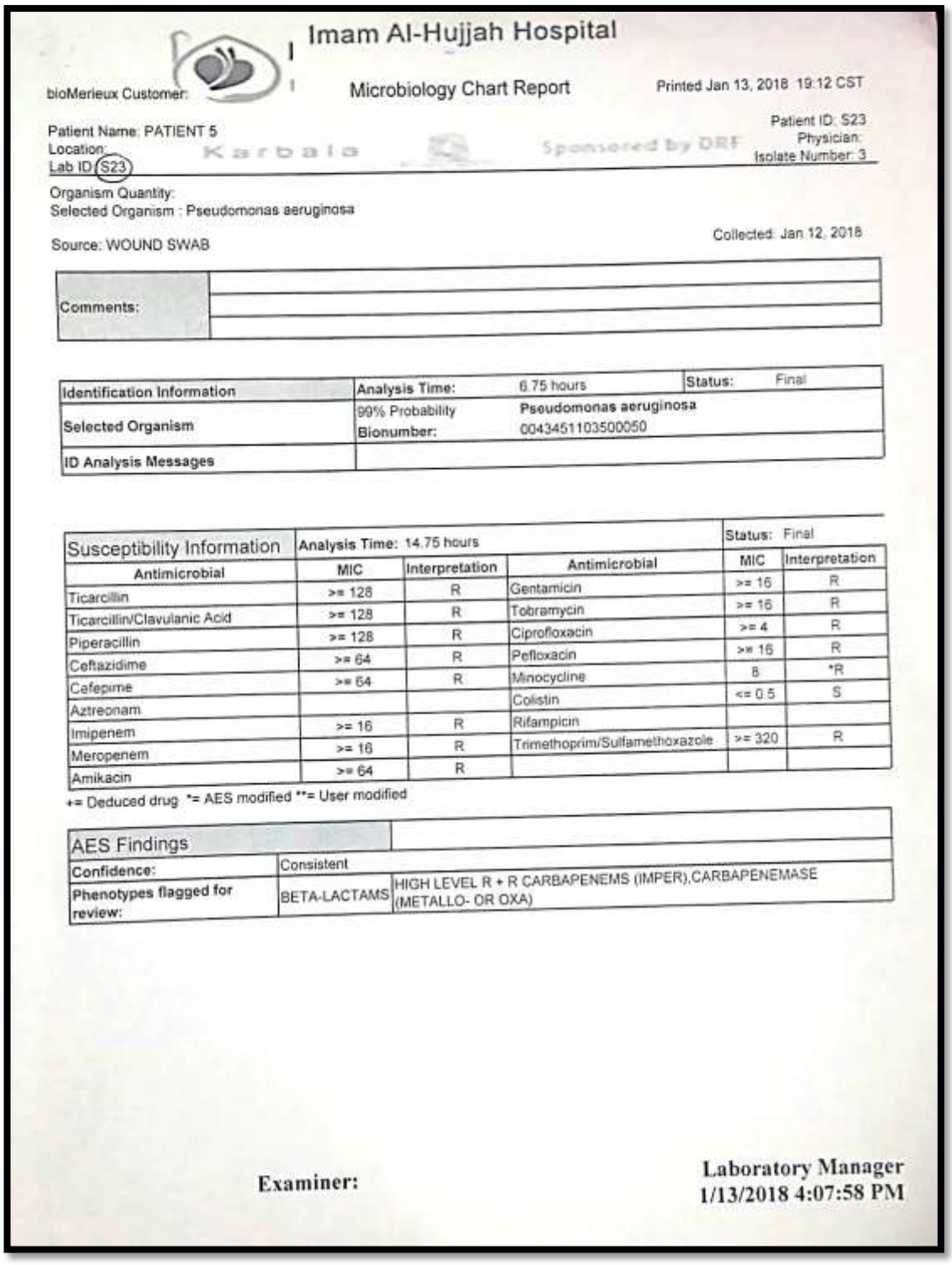
1. تـشخيص و عزل المـركبـات الـفعـالـــة مـن نباتـات الشـاي الأخضــر و القـرفـة والحنــاء وادخالها في تصنيع المعقمات و المراهم كعلاج لمرضى الحروق .

2. البحث عن إمكانية دمج الشاي الأخضر و القرفة و الحناء محاولةً للحصول على فعالية مضاعفة .

3. اختبار فعالية مستخلصات الشاي الأخضر و القرفة و الحناء على الجسم البشري الحي المتعرض للحروق .

الملاحق

Appendices



Imam Al-Hujjah Hospital

bioMerieux Customer:

Microbiology Chart Report

Printed Jan 13, 2018 19:12 CST

Patient Name: PATIENT 5
Location:
Lab ID: S23

Patient ID: S23
Physician:
Isolate Number: 3

Karbala

Sponsored by DRF

Organism Quantity:
Selected Organism : Pseudomonas aeruginosa

Source: WOUND SWAB

Collected: Jan 12, 2018

Comments:	

Identification Information	Analysis Time:	6.75 hours	Status:	Final
Selected Organism	99% Probability Bionumber:	Pseudomonas aeruginosa 0043451103500050		
ID Analysis Messages				

Susceptibility Information	Analysis Time: 14.75 hours			Status: Final	
Antimicrobial	MIC	Interpretation	Antimicrobial	MIC	Interpretation
Ticarcillin	>= 128	R	Gentamicin	>= 16	R
Ticarcillin/Clavulanic Acid	>= 128	R	Tobramycin	>= 16	R
Piperacillin	>= 128	R	Ciprofloxacin	>= 4	R
Ceftazidime	>= 64	R	Pefloxacin	>= 16	R
Cefepime	>= 64	R	Minocycline	8	*R
Aztreonam			Colistin	<= 0.5	S
Imipenem	>= 16	R	Rifampicin		
Meropenem	>= 16	R	Trimethoprim/Sulfamethoxazole	>= 320	R
Amikacin	>= 64	R			

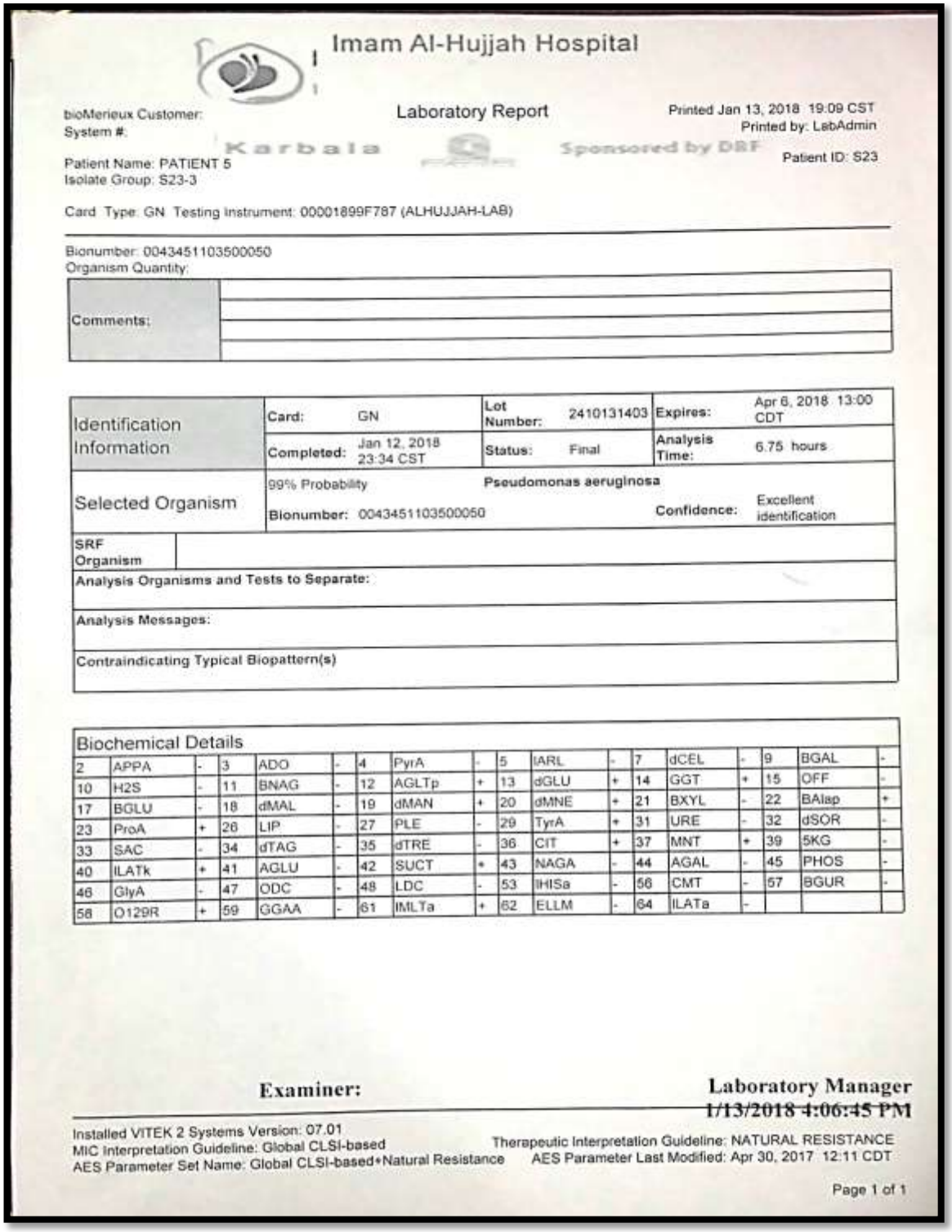
+= Deduced drug *= AES modified **= User modified

AES Findings		
Confidence:	Consistent	
Phenotypes flagged for review:	BETA-LACTAMS	HIGH LEVEL R + R CARBAPENEMS (IMPER),CARBAPENEMASE (METALLO- OR OXA)

Examiner:

Laboratory Manager
1/13/2018 4:07:58 PM

ملحق (1) نتائج اختبار حساسية بكتريا *p. aeruginosa* للمضادات الحياتية بتقنية جهاز VITEK - 2



Imam Al-Hujjah Hospital

bioMerieux Customer:
System #:

Laboratory Report

Printed Jan 13, 2018 19:09 CST
Printed by: LabAdmin

Karbala Sponsored by DBF

Patient Name: PATIENT 5
Isolate Group: S23-3

Patient ID: S23

Card Type: GN Testing Instrument: 00001899F787 (ALHUJJAH-LAB)

Bionumber: 0043451103500050
Organism Quantity:

Comments:	

Identification Information	Card: GN	Lot Number: 2410131403	Expires: Apr 6, 2018 13:00 CDT
	Completed: Jan 12, 2018 23:34 CST	Status: Final	Analysis Time: 6.75 hours
Selected Organism	99% Probability	Pseudomonas aeruginosa	
	Bionumber: 0043451103500050		Confidence: Excellent identification
SRF Organism			
Analysis Organisms and Tests to Separate:			
Analysis Messages:			
Contraindicating Typical Biopattern(s)			

Biochemical Details

2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	tARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	-
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	+	13	dGLU	+	14	GGT	+	15	OFF	-
17	BGLU	-	18	dMAL	-	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAlap	+
23	ProA	+	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	-
33	SAC	-	34	dTAG	-	35	dTRE	-	36	CIT	+	37	MNT	+	39	5KG	-
40	ILATk	+	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	-	44	AGAL	-	45	PHOS	-
46	GlyA	-	47	ODC	-	48	LDC	-	53	IHISa	-	56	CMT	-	57	BGUR	-
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	IMLTa	+	62	ELLM	-	64	ILATa	-			

Examiner:

Laboratory Manager
1/13/2018 4:06:45 PM

Installed VITEK 2 Systems Version: 07.01
MIC Interpretation Guideline: Global CLSI-based
AES Parameter Set Name: Global CLSI-based+Natural Resistance

Therapeutic Interpretation Guideline: NATURAL RESISTANCE
AES Parameter Last Modified: Apr 30, 2017 12:11 CDT

Page 1 of 1

ملحق (2) نتائج تشخيص بكتريا *P. areginosa* بتقنية جهاز VITEK-2

المصادر

References

References

المصادر العربية

- إبراهيم الرفاعي، أنور العمر .(2007). علم الأحياء الدقيقة الخاص. جامعة البعث ،كلية الطب البيطري. 106-107.
- أبو زيد، نصر الشحات. (1999). النباتات العطرية ومنتجاتها الزراعية والدوائية. الدار العربية للنشر والتوزيع ، مصر، القاهرة ، المركز القومي للبحوث.
- الإمام ، محمد محمد طاهر. (2007) . تصميم وتحليل التجارب ، دار المريخ ، السعودية.
- جرجيس ، خانزاد خضر .(2006). دراسة مقاومة أنواع من البكتيريا المعزولة من المرضى لبعض المضادات الحياتية و المركبات الكيمياوية الجديدة رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، الجامعة المستنصرية.
- الحكيم، لميعة مهدي . (1989). الأعشاب وصحة المجتمع. دار الكتب والوثائق . مطبعة شفيق . بغداد . العراق.
- الشويخ ، رنا مجاهد عبد الله. (2006). إنتاج وتوصيف protease من بكتيريا *Psudomonas aeruginosa* المعزولة من بعض الحالات السريرية وعلاقته ببعض المضادات الحيوية . أطروحة دكتوراه ، كلية العلوم ، الجامعة المستنصرية .
- الصراف، عبد المحسن محمد جواد. (1989) الحناء زراعتها واستعمالاتها. الهيئة العامة للتعاون والتدريب والإرشاد الزراعي. وزارة الزراعة والري، مجلة الزراعة العراقية . العدد (3) ص 26- 36 .
- العادلي ، زينب فالح. (2015) .مقاومة بعض أنواع المضادات الحياتية لعزلات *Pseudomonas aeruginosa* في مستشفيات مدينة الديوانية ، أطروحة دكتوراه ، كلية العلوم ، جامعة القادسية .
- العزاوي ، سندس عادل ناجي . (2007) . دراسة بعض عوامل الضراوة في البكتيريا الملوثة للحروق ، رسالة ماجستير ، كلية التربية جامعة ديالى .
- سوزان سعدي ، ختام علي .(2017) . دراسة تأثير بعض المضادات الحيوية على بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* و *Staphylococcus aureus* المعزولة من اخماج الحروق و لجروح ، رسالة ماجستير ،الجامعة المستنصرية ، كلية العلوم .

- عشي، ناهد عبد العزيز عباس. (2005) . التأثير المثبط لمستخلصات بعض النباتات على سلالات من المكورات العنقودية الذهبية المعزولة من عينات مرضية. رسالة ماجستير، جامعة الملك عبد العزيز، كلية العلوم.
- الحسني ، كريم عباس . (2007) . دراسة فطرية لإصابات الحروق في مرضى محافظة القادسية . رسالة ماجستير ، جامعة القادسية ، كلية التربية .
- العكيلي ، عدنان حنون عباس. (2002). دراسة تاثير حامض الخليك وبعض المستخلصات النباتية في نمو بكتريا إصابات الحروق ، رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، الجامعة المستنصرية .
- قطب ، الثقافة الصحية . (1989) . النباتات الطبية وزراعتها ومكوناتها. دار المريخ للنشر ، الرياض. العدد 56 .
- مبارك ،كريم إبراهيم ،عبد الأمير ، نادية عبد الهادي ، أحمد ، دنيا نجم الدين ،عبدالجبار و سهير.(2002).دراسة بكتريولوجية لخمجات الحروق في المستشفى. مجلةالفتح ،العدد (15) ص 290 - 294 .
- المحمداوي ، خولة جبر خلف . (2006). دراسة كيموحيوية وجزئية للبروتين المنتج من العزلة المحلية لبكتيريا *pseudomonas aeruginosa* أطروحة دكتوراه . كلية العلوم ، الجامعة المستنصرية .
- مصطفى ، محمد ، عبد المنعم . (2007) . المعالجة بالأعشاب الطبية . مجلة الإعجاز العلمي . العدد 24.

English references

- Abbasi- Montazar,E. ; Khosravi,A.D. ; Feizabadi,M.M. ; Goodarzi,H. ; Khoramrooz,S.S. ; Mirzaii, M. ; Mirzaii,M. ; Kalantar,E. and Darban-Sarokhalil,D. (2013). the prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates with high-level mupirocin resistance from patients and personnel in a burn center. Burns: *J. Int. Soci. Burn Injuries.* 39: 650-654.
- AL-Garaawy,H.H.A. (2011). study of antibacterial activity of Combination of some antibiotics with Probiotic Against some pathogenic Bacteria. M. Sci. thesis of Medical Microbiology College of Medicine Babylon Univ:24-25.
- Alhazmi,A. (2015). *Pseudomonas aeruginoso* pathogenesis and pathogenesis Mechanisms. *Int. J. Biol*. ,7:44-67.
- Ali, Z. ; Mumtaz, N. ; Naz, S.A. ; Jabeen, N. and Shafique, M.(2015). Mult–drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* a threat of nosocomial infections in tertiary care hospitals *J. park Med. Assoc.*, 65 :12-16.
- Aloush, V. ; Navon-Venezia, S. ; Seigman-Igra, Y. ; Cabili, S. and Carmeli, Y. (2006). Multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* : Risk factors and clinical impact. Antimicrobial Agents Chemother., 50 (1) : 43-8.
- Amra, P.U. ; Mojca, S. and Sabine, G.(2006). “Extraction of active ingredients from green tea *Camellia sinensis*” food chem., 960597-605.
- Anderson, R.A. (2008). Chromium and polyphenols from cinnamon improve insulin sensitivity. Proc. Nutr. Soc., 67(1): 48-53.

- Annous,B. ; Fratamic,P. and Smith.J.L. (2009). Quroum sensing in biofilms :why bacteria behave the way The do.*J. food sci*., 74(1): 24 -37 .
- Antia, P. ; Sivasamy, S. ; Madan Kumar, ; P.D. Balan, I.N. and Ethiraj,S.(2014). *In vitro* antibacterial activity of *Camellia sinensis* extract against cariogenic microorganisms. *J. Basic Clin. Pharm.*, 6(1): 35-9.
- Arafa, H. (2003). Prophetic medicine: An old prescription for a new era. U.S.A.
- Archana,S. and Abraham,J.(2011). Comparative Analysis of antimicrobial activity of leaf extracts from fresh green tea, commercial green tea and black tea on pathogens *J. App. Pharma. Sci.*, 1(08): 149-152.
- Arciola, C.R. ; Baldassarri, L. and Montanaro, L.(2001). Presence of icaA and icaD genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter associated infections. *J. clin.microbiol*.,39(6) : 2151- 2156.
- Armour, A. ; Shankowsky, H. ; Swanson, T. ; Lee, J. and Tredget, E.(2007). The impact of nosocomially – acquired resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection in a burn unit. *J. Trauma.* 63(1): 164-171.
- Arts, I.C. and Hollman, P.C.(2005). polyphenols and disease risk in epidemiologic studies *Amer.J.clin.nutrition*., 81; 317-325.
- Arulpriya, P. and Lalitha, P. (2012). Assessment of the antioxidant activity of acetone ethylalcohol and aqueousextracts of the aerial roots of Pothosaurea (Lindenex Andre) climbed over *Lawsonia inermis* and Areca catechu. *J. chem.* and *pharmaceutical Research.*, 4(2): 1042-1047.

- Arun, P. ; Purushotham, K.G. ; Johnsy, J. and Kumari,V.(2001). *In vitro* antibacterial activity and flavonoid contents of *Lawsonia inermis* (Henna). Int. Pharm Tech. Res., 2(2): 1178-1181.
- Ashnagarl, A. and Shiri, A.(2011). Isolation and characterization of 2 –hydroxy- 1,4 naphthoquinone (lawsone) from the powdered leaves of henna plant marketed in Ahwaz city of Iran. *Int. J. Chem. Tech. Research*., 3(4): 1941-1944.
- Atlas, R. M. (2010). Hanbook of Microbiological Media. CRC; 4th ed. United State of America.
- Baydar,N.G. ; Ozkan, G. and Yasar, S.(2007).Evaluation of the antiradical and antioxidant potential of grape extracts . Food Control. , 18(9): 1131 – 1136 .
- Barrios,C.C. ; Ciancotti,O.L. ; Bautista,R.D. ; Adan,T.C. and Zanon,V.V.(2014).New Treatment Choice against Multidrug Resistant *Pseudomonas aeruginosa*.Doripenem J. Bacteriol Parasitol.5:199.
- Belba,M.K ; Petrela,E.Y. and Belba,A.G. (2013). Epidemiology of infections in a Burn Unit, Albania. Burns. 39: 1456-1467.
- Bergey, N.R. and Holt, H .G. (1994). Bergey's manual of systematic bacteriology 9th ed. Williams & wilkins Baltimore.
- Boga,M. ; Hacibekirogiu, I. and Kolak, U.(2011). Antioxidant and anticholinesterase activities of eleven edible plants. Pharm Biol.,49:290-295.
- Bose, S.; Khodke, M. ; Basak, S. and Mallick, S.K.(2009). Detection od biofilm production Staphylococcus .Need of the Hour. *J. Clin. L. and Diag. Res*. 3(6):1915-1920.

- Brooks, G.F.; Butel, J.S. and Morse, S.A. (2004). jawets melnick and Aldel bergs Medical Microbiology 23th ed. Large Medical Brooks ,Mc. Graw-Hill: 215 – 270.
- Brooks,G.F.; Butel, J.S. and Morse, S.A. (2001). Jawetz Melnik and Adel bergs Medical Microbiology 22nd ed medical east ed application large.; 229-213.
- Brusselmans, K.;Vrolix,R.; Verhoeven G. and Swinnen J.V.(2005).induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibited fatty acid synthase activity.*J.Biolog chem*., 280(7):5636-5645.
- Burda, S. and Oleszek, W. (2001). Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J.Agricul.* and *food Chemistry*. 49: 2774-2779.
- Caballero, A.R. ; Moreau, J.M. ; Engel, L.S. ; Marquart, M.E. ; Hill, J.M. and O´Callaghan, R.j. (2001). *Pseudomonas aeruginosa* protease IV enzyme assays and comparison to other pseudomonas proteases. Analyt. biochem .290:330-337.
- Chai, J.; Sheng,Z.; Yang, H. ; Diao, L. and Li. L. (2000).Sussessful treatment of invasive burn wound infection with sepsis in patients with major burns. *chin. Med. J.(Engl. Ed.).* 113;1142-1146.
- Chaudhary, G. ; Goyal, S. and Poonia, P.(2010). *Lawsoniainermis Linnaeus:* A phytopharmacological Review. *Int. J. Pharma. Sci.* and Drug Research; 2(2): 91-98.

- Cicek, A.C. ; saral, A. ; Duzgum, A.O.; Cizmeci,Z. ; Kayman,T. ; Balci, P.O. ; Dal, T. ; Firat, M. ; Yazici,Y. ; Sancaktar, M. ; Osman Birol Ozgymus, O.B. and Sandalli,C. (2013). Screening of class 1 and class2 integrons in clinical isolates of *pseudomonas aeruginosa* collected from seven Hospitals in Turkey: A Multicenter study. *J. Med. Microb.,* 3: 227 -233.
- CLSI.(2015).Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for bacteria that grow Aerobically; Approved Standard-Tenth Edition. CLSI document M07-A10. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Collins, C.H. ; Lyne, J.M.G. and Falkinhan, J.O. (2004). Microbiological Methods Eighth Edition. Arnold. London.
- Cornelis, P. (2008). pseudomonas : Genomics and Molecular Biology, 1st ed.,Caister Academic press USA.
- Cucarella,C. ; Torma,M.A. ; Ubed,C. ; Trotonda,M.P. ; Monzon,M. ; Peris ,C. ; Amoerena,B. ; Lasa,L. and Penades,J.R. (2004). Role of Biofilm association protein Bap in pathogenesis of Bovine *staphylococcus aureus* Infect.Immum., 72(4):2177-2158.
- Dale , D.C. and federman,D.D. (2003). Scientific American Medicine. 2the united states of America.
- Davey, M. E. and Toole, G. O. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *J. Microbial. Mol. Biol. Revs*.64(4): 847-867.
- Davis, R. and Brown, P.D.(2016). multiple antibiotic resistance index , fitness and virulence potential in respiratory *pseudomonas aeruginosa* from jamaica *J.med. microbial.* doi : 10 .1099/jmm 0.000229 (PubMed 26860081).

- De-Macedo, J.L. and Santos, J.B.(2005). Bacterial and Fungal colonization of burn wounds. Mem Inst Oswaldo Cruz .,(5); 100:535-539.
- Donlan, R.M. (2002). Biofilms microbial life on surface emerging infectious diseases. 8 (9): 881 -890 .
- Dulger, B.A.; Gonuz, A.(2004). Antimicrobial activity of certain plants used in Turk traditional medicine. Asian. *J.plant sci*.,3: 104-107 .
- Ekrami, A. and Kalantar, E. (2007). Bacterial infections in burn patients at a burn hospital in Iran., Indian: *J. Med. Res*. (126):541-544.
- Elmanama, A.A. ; Laham, N.A. and Tayh, G.A. (2013). Antimicrobial susceptibility of bacterial isolates from burn units in Gaza. Burns: *J. Int. Soci.Burn Injuries*.39: 1616-1618.
- Fiorillo, L. ; Zucker,M. and Sawyer, D. (2011). the pseudomans hot-foot syndrome. *N. engl. J. Med.*, 2;345(5):335-8.
- Forjoh,S.N.(2006).Burns in low-and middle-income countries: a review of available literature on descriptive *Burn: J. Int. Soci.* epidemiology, risk factors, treatment , and prevention. Burn lnjuries.32(5):529-37.
- Gawish, A. ; Mohammed, N. ; ELshennawy, G. and Moahmmed, H. (2013). An investigation of type 3 secretion toxins encoding -genes of *pseudomans aeruginosa* isolates in a university hospital in *Egypt.J. Microbio.* and *Infec. Dise.* 3 (3) 116-122.
- Gellatly, S.L. and Hancock, R.E.(2013). *Pseudomonas aeruginosa*. new insights into pathogenesis and host defenses. Pathog. Dis. 159-173.

- Hadi, U. ; Chaar, M. ; Jaafar, R.F. and Matar, G.M.(2007). Comparative analysis of hospital acquired and community acquired *Pseudomonas aeruginosa* strains in teriary care medical center. *J. Appl. Res.*,7:233-7.
- Hardwicke, J. (2012). " chemical burns - an historical comparison and review of the literature". "burns: *j. int. soci. burn injuries*. 38(3): 7-383.
- Hassan, A. ; Usman, J. ; Kaleem, F. ; Omair, M. ; Khalid, A. and Iqbal, M. (2011). Evaluation of different detection methods of biofilm formation in clinic isolates. Braz. *J. Infect. Dis.* 15(4):305-311.
- Hauser,L.R.and Sriram, P.(2005).severe *Pseudomonas aeruginosa* infections postgraduate medicine., 117 (1) : 41-8.
- Himburg, H.A.; Dowed, S.E. and Friedman, M.H. (2007). Frequency dependent response of the vascular endothelium to pulsatile shear stress. *J. Physiol. Heart*.; 293H.645-H653.
- Hoban, A.M. ; Chifiriuc, M.C. ; Cotar, A.I. ; Bleotu, C. Grumezescu, A.M. ; Banu, O. and Lazar, V. (2013). Virulence markers in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from hospital acquired infections occurred in patients with underlying cardiovascular disease. Rom. Biotech. Lett. 18(6): 8843-8854.
- Hongyao , Binwu , Yiyucheng and Haibinqu. (2009). High throughput chemil uninescence platform for evaluating antioxydative activity of total flavonoid glycosides from plant extracts. Food chemistry. 115: 380-386.

- Horino, T. ; Chiba, A. ; Kawano, S. ; Kato, T. ; Sato, F. and Maruyama, Y.(2012). Clinical characteristics and risk factors for mortality in patients with bacteremia caused by *pseudomonas aeruginosa* Int. Med., 51:59-64.
- Hosein, M. and Zinab, D. (2007). Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Henna Leaves Extracts (*Lawsonia inermis*). W. J. Dai. and Food Sciences., 2(1):38- 41.
- Hosseini Jazani, N. ; Shahabi, Sh. ; Abdi Ali, A. and Zartoshti, M. (2007). Antibacterial effects of water soluble green tea extracts on multi-antibiotic resistant isolatesn of Acinetobacter sp. Pakistan *J.Biol.Sci.*, 10(9):1477-1480.
- Huda- Faujan, N. ; Noriham, A. ; Norrakiah, A. S. and Babji, A.S. (2009). Antioxidant activity of plants methanolic extracts containing phenolic compounds: *Afr. J. Biotechnol.*, 8: 484-489.
- Islam, M.A. ; Alam, M.M. ; Choudhury, M.E. ; Kobayashi, N. and Ahmed, M.U.(2008). Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of Cloxacillin for selected isolates of Methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) with their antibiogram. *Bangl. J. Vet. Med*.,6(1): 121-126.
- ISO., (2005). Determination of substances characteristic of green and black tea , Part 1: Content of total polyphenols in tea, Colorimetric method using Folinciocalteu reagent .14502 – 1
- Jain, A. and Singh, K. (2007). Recent advances in the management of nosocomial infections. *J.K. Sci.* (9)1:3-8.
- James, A. and Duke, P.D. (2002). Mothernature Library Online, the Green Pharmacy.

- Jawetz , E. and levinson , W. (2002). Examination and Broad Review of Medical Microbiology and Immunology. 7th ed. Lange Medical Book McGraw –Hill comp.,:120 – 132.
- Jorgensen, J. H. ; Pfaller, M. A. ; Carroll, K.C. ; Funke, G. ; Landry, M. L. ; Richter, S.S. and Warnock, D.W. (2015). Manual of Clinical Microbiology, 11th edition. 1.
- Kadar, B. ; Szasz, M. ; Kristof, K ; Pesti, N. ; Krizsan, G. and Szentandrassy, J.(2010). *In vitro* activity of clarithromycin in combination with other antimicrobial agents against biofilm-forming *pseudomonas aeruginosa* strains. Acta microbiologica et immunologica Hungarica., 57(3):235-45.
- Kahlan, R.S. (2016). EBOOK Pseudomonas Molecular and Applied Biology-1th ed. the registered company is springer int. publ. AG. Switz. 528 .
- Karadzic, I. ; masui, A.L. ; Zivkovic, I. and fujiwara N. (2006) purification and characterization of an alkaline lipase from *pseudomomas aeruginosa* isolated from putrid mioneral cutting oil as component of metalworking fluid. *J. Biosci biosci.,* 102:82-89.
- Karadzic,I.; Masui, A.L. Zivkovic,I. and Fujiwara, N. (2006). purification and characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas aeruginosa* isolated from putrid mineral cutting oil as component of metalworking fluid.*J. Biosci .Bioeng*.,102:82-89.
- Kearns, R.D. ; Cairns, C.B. ; Holmes, J.H. ; Rich, P.B. and cairns, B.A. (2013)." thermal burn care : a review of best practices. what should prehospital providers do for these patients." EMS. world., 42(1) : 43 – 51.

- Khameneh, B. ; Diab, R. ; Ghazvini, K. and Fazly Bazzaz B.S.(2016).Breajthroughs in bacterial resistance mechanisms and the potential ways to combat them. Microb. Pathog.; 95:32-42.
- Kim, L.(2001). Riddle of biofilm resistance. Antimicrobial agents and chemotherapy., 45(4):999-1007.
- Kolenbrander, P.E. ; Palmer, R.J. ; Periasamy, S. and Jakubovics, N.S. (2010). Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance Nat. Rev. microbial.; 8 :471 – 408 .
- kowalski, C.B.R and. Mary, T. (2008). Text Book of basic nursing (9^{th}) Philadelphia : lippincott williams & wilkins. P. 1109 .
- Kriengkauyiat, J. ; porter, E. ; lomovskaya, O. and wongberinger, A. (2005). Use of an efflux pump inhibitor to determine the prevalence of efflux pump medicated fluoroq uinolone resistance and multidrug resistance in *pseudomonas aeruginosa* antimicrob agents Chemother. 49 (2) : 565 – 570 .
- Laekeman G.(2011).Assessment report on *Cinnamomum verum*, J.S. Pres, cortex and corticisaetheroleum. (London, UK: Eueopean Medicines Agency).
- Lambert, P.A.(2002).Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J.R.Soc. Med.*,95(41):22-26.
- lauphland, K.,B. ; Parkins, M.D. ; Church, D.L. ; Gregson,D.B. ; Louie,T.J. ; Conly, J.M. ; Elsayed,S. and pitout, J.D.(2005). population – based epidemiological study of infections caused by carbaoenem – resistant *pseudomona aeruginosa* in the Calgary health region : important of metallo- betalactamase (MBL) – producing strains. *J. infect. Dis.* 129 : 1606 – 1612.

- Ligozzi, M. ; Bernini, C. ; Bonora, G.M. ; DeFatima, M. ; Zulliani, J. and Roberta, F.(2012). Evaluation of the vitek 2 system for identification and antimicrobial susceptibility testing of medical relevant Gram – Positive Cocci. American society for Microbiology. *J. Clinical Micro.*; 1681-1686.
- Line, J. E. ; Svetoch, E.A. ; Eruslanov, B. V, ; Perelygin, V.V, ; Mitsevich, E. V. and Mitsevich, I.P. (2008). isolation and purification of enterocin E-760 with board antimicrobial activity against gram-positive and gram negative bacteria Antimicrob. Agents Chemother., 52 : 1094 – 1100 .
- Livermore,D.M.(2002).Multiple Mechanisms of antimicrobial resistance in *pseudomonas aeruginosa* :our worst Nightmare. Clinical Infections Diseases.,34:634-640.
- Lloyd, E.C. (2012). "outpatient burns: prevention and care". American family physician., 85 (1) : 25 – 32.
- Lokhande, P.D. ; Gawai, K. R. ; Kodam, K. M. and Kuchekar, B. S.(2007). Antibacterial Activity of Isolates constituents and Extract of Roots of Inula racemose. Research *J. med.Plant*., 1(1): 7-12.
- MacFaddin, J. F. (2000). Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria 3rd ed. Lippincott Williams and Wilkins, USA.
- Mahmoud,A.B. ; Zahran,W.A. ; Hindawi,G.R. ; Labib , A.Z. and Galal,R. (2013).Prevalence of multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* in patients with Nosocomial Infections at a University Hospital in Egypt, with Special Reference to Typing Methods.J.Virol Microbiol.,290047.
- Mah, T.F.C. and Otoole, G. A. (2001). Mechanism of biofilim resistance to antimicrobial agents .Trends . Microbiol., 9:34-39.

- Malik, A, ; Hassani, S.E.; Shahid, M. ; Khan, H.M. and Ahmed, A.J. (2003). Nosocomial klebsiella infection in neonates in a tertiary care hospital : protein profile by SDS page and Klebocin typing as epidemiological markers. Indian *j. med. microbiol.*, 21(2):82-86.
- Malone, M. and Swanson, T.(2017). Biofilm-based wound care: the importance of debridement in biofilm treatment strategies. *Br. J. Commun. Nurs.*22(Sup6):S20-5.doi:10.12968/bjcn. 22.Sup6.S20.
- Malu, S.P. ; Obochi, G.O. ; Tawo, E.N. and Nyong, B. E.(2009). Antibacterial activity and medicinal properties of Ginger (Zingiber Officnale). Global *J. pure* and *appli sci.*, 15(3): 365- 368.
- Manafi, A. ; Jamshid, k. ; Davood, M. ; Aziz, J.; Masoud, A. ; Mohsen, N. ; Ahmed,H. and Nazanin,K. (2009). Active immunization using exotoxin a confers protection against *Pseudomonsa aeruginosa* infection in a mucous burn model. BMC microbiology., 10: 9-23.
- Mansour, A. and Enayat, K. (2004). Bacteriological Monitoring of hospital borne septicemia in burn patients in Ahvaz, Iran. *J. Burns* and *Sury Wound Care*. 11: 42-51.
- Mateos-Martin, M.L. ; Perez-Jimenez, J. ; Fuguet, E. and Torres, J.L.(2012).Profile of urinary and fecal proanthocyanidin metabolites from common cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum L.*) in rats. Mol. Nutr. Food Res., 56:671-675.
- Math, T.F.C. and Otoole, G.A (2001) mechanism of biofilm resistance to antimicrobial agents trends microbial.; 9:34-39.
- McCann, J. (2003). Herbal medicine hand book 2nd ed. Philadelphia: lippin cott.

- Mehta, A. ; Saxena, G. and Mani, A.(2016). Comparative Analysis of Antibacterial Activity of Aqueous, Ethanolic, Methanolic and Acetone Extracts of Commercial Green Tea and Black Tea against Standard Bacterial strains. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.,* 5(11): 145-152.
- Michalczyk, M. and Zawislak, A. (2008). The effect of tea infusions on the proliferation of selected bacteria important for the human intestinal tract. Acta. Sci. pol., Technol. Aliment., 7(1): 59-65.
- Mondelli, A.L.; Niero- Melo, L.; Bagagli, E.; Camargo, C.H.; Bruder- Nascimento, A.; Sugizaki, M.F.; Carniero, M.V. and Villas, B.P.(2012). *Candida spp.*:manual identification (reference method) and automated identification (vitek system platform). The *J.venomous animals* and *toxins including tropical diseases*. ISSN 1678-9199. 18.335-339.
- Muhammad, H. S. and Muhammad, S. (2005). The use of *Lawsonia inermis linn*. (henna) in the management of burn wound infections. *Afr. J. Biotechnol.*, 4(9): 934-937.
- Nair, R. ; Kalariya, T. and Chanda, S.(2005). Antibacterial Activity of some selected Indian medicinal Flora. Turk. *J. Biol.* 29: 41-47.
- Nam, H.M. ; Lim, S,K. and Kim, J.m.(2010). *In Vitro* activities of antimicrobials against six important species of gram –negative bacteria isolated from raw milk samples in Korea. Food borne Pathog. Dis. ,7(2):221-4.
- Neelam, T. ; Rekha, E. ; Chari, P.S. and Merra, S. (2004). prospective study of hospital – acquired infections in burn patients at a tertiary care referral center in North India. Burn 30 : 660 – 669 .

- Oliveria, A and. Gunha, M.L.R. (2010). Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase- negative Staphylococci. BMC. *J. Res.*, 3:260.
- Oncul,O. ; Yuksel, F. ; Altunay,H. ; Acikel,C. ; Celikoz,B. and Cavuslu,S.(2002).The evaluatin of nosocomial infection during 1-year-period in the burn unit of training hospital in Istanbul, Turkey. Burns . 28:738-744.
- Otoole, G. ; Kaplan, H.B. and kolter, R. (2000). Bioflim formation as microbial development Annu. Rev.microbiol. ; 54:49-79.
- Owlia , p. ; Behzadiyan –Nejad. Q.; Souri, E. & Saderi, H. (2001). Microscopc Study of the effects of sub – inhibitory concentrations of gentamcim on capsule production of *pseudomonas aeruginosa*. Arch. Irn. Med., 4 : 18 – 20.
- Pellegrino, F.P.C. ; Teixeir, L.M. ; Carvallo, M.G.S ; Nouer, S.A. ; Oliveire, M.P ; Sampaio, J.L.M. ; Freitas,A.D.;Ferreira,A.L.P. ; Amorim, E.L.T. ; Riley, L.W. and Moreira, B.M. (2002). Occurrence of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospitals in Rio de janeiro, Brazil. *J. Clin Microb.*, 40(7):2420:2424.
- Rastegar, L.A.R. ; Alagnenbandan, R. and Akhlaghi, L. (2005). Burn wound infections and antimicrobial resistance in tehran, Iran: an increasing problem. Annals of Burns and Fire Disasters. XVIII(2): 1-9.
- Rook, A. ; wil kinson, D.S. and Ebling, F.J.G. (2010). Text Book of Dermatology.,3(1): ed. Great Britain , spottis woode ballantyne. Ltd.
- Roulier, G. (2004). Extrait du vie "La methode naturelle anti –age". Edition Dangles.

- Rukayadi, Y. and Hwang, J.K. (2006). *In vitro* activity of Xanthorrhizal against *Streptococcus mutans* biofilms, letters Appl. MicrobioL. 42(4) : 400-404.
- Sadeghian, A.; Ghorbani,A.;Mohamadi-Nejad, A. and Bakhsandeh, H.(2011). Antimicrobial activity of aqueous and methanolic extracts of pomegranate fruit skin. Avicenna *J. phytomed*. 1(2): 67-73.
- Saleh, R.H. (2007). A study of efficacy of disinfectant and bacterial contamination in AL- Hilla Teaching Hospital.
- Sambyal, S.S. ; Sharma,P. and Shrivastava, O. (2017). Anti-biofilm Activity of selected plant Essential oils against *Pseudomonas aeruginosa* and *staphylococcus aureus*. *Int. J. Curr. Microbial. App. Sci.* 6(3): 444-450.
- Sarni-Manchado, P. and cheynier,V.(2006).Les polyphenols en agroalimentaire, Lavoisier, Editions Tec and Doc.,398.
- Schafer, T. ; Kirk, O. ; Borchert, T.V. ; Fuglsang, C.C.; Pederson, S.; Salmon, S. ; Olsen, H.S. ; Deinhammer, R. and Lund, H. (2005). Enzymes for Tech. Appl. Wiley., 13 : 337-437.
- Schwaber, M.J. ; Cosprove, S.E. ; Gold, H.S. ; Kaye, S and. Carmeli,Y. (2004) .Fluoroquinolones protective against cephalosporin resistance in gram-negative noso comial pathogens centers for Disease Control and prevention., 10(1):1-10.
- Sengul, M. ; Yildiz, H. ; Gungor, N. ; Bulent, C. ; Eser, Z. and Ercisli, S. (2009). Total phenolic content antioxidant and antimicrobial activities of some medicinal plants. *Pak. J. Pharm. Sci.*, 22(1): 102 - 106.
- Shahidi Bonjar, G.H. (2004). Screening for antibacterial properties of some Iranian plants against two strains of *Escherichia*.

- Shakibaie, M. ; Forootanfar, H. ; Golkari, Y. ; Mohammadi-Khorsand, T. and Shakibaie, M.R.(2015). Anti-biofilm activity of biogenic selenium nanoparticles and selenium dioxide against clinical isolates of *staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* , and *Proteus mirabilis*. *J. Trace Elem. Med. and Biol*. ,29: 235-41.
- Sharrari, S.A. and Chitra, P.G. (2012). Evaluation of different detection methods of biofilm formation in clinical isolates Staphylococcus. *Int. J. pharm*. *Bio. Sci.*, 3(4): 724-733.
- Sherris, J.C. ; Ryan, K.J. and Ray, C.G. (2010). Medical Microbiology 5th Lange Medical Books McGraw –Hill Co.inc. U.S.A .
- Silverstein, R.L. ; Li, W. ; Park , Y. M. and Rahaman, S.O. (2010). Mechanisms of cell signaling by signaling by the scavenger receptor CD36: implication in atherosclerosis and thrombosis. Trans. Am. Clin. Climatol Assoc., 121:206-220.
- Simonetti, G. ; Simonetti, N. and Villa, A.(2000). "Increased microbicidal activity of green tea (*camellia sinensis*) in combination with butylated hydroxyanisole" *J. Chem.,* 16 (2): 122-127.
- Su, P.; Henriksson, A. ; Nilsson, C. and Mitchell, H. (2008). Synergistic effect of green tea extract and probiotics on the pathogenic bacteria, *Staphylococcus aureus* and *streptococcus pyogenes.* World *J. Microbiol. Biotechnol.*, 24: 1837- 1842.
- Sutherland, I.W. (2001). Biofilm exopolysaccharide : astrong and sticky framework.*J.Microbol*., 197:3-9.

- Taguri, T.; Tanaka, T. and Kouno, I. (2006). Antibacterial spectrum of plant polyphenols and extracts depending upon hydroxyphenyl structure. Biol. Pharm. Bull., 29: 2226-2235.
- Talib, H.W. ; Zarga, H.M. and Mahasneh, M.A.(2012). Antiproliferative, Antimicrobial and Apoptosis Inducing effects of Compounds Isolated from Inula viscose molecules., 17: 3291-3303.
- Tam, V.H. ; Chang, K.T. ; Schilling, A.N. ; La-Rocco, M.T. ; Genty, L.O. and Garey, K.W.(2009). Impact of AmpC overexpression on outcomes of patients with *seudomonasp aeruginosa* bacteremia. Diagn Microbial Infect Dis.; 63:279-85.
- Tambekar, D.H. & Bhutada, S.A.(2010). the *int. J. Microbiol.* , 8, 1-6.
- Tang, Y.W. and Stratton, C.W. (2006). Advanced techniques in diagnostic microbiology. Springer Sci. Business media. *Spring Street. USA.*
- Tariq, A.L. and Reyaz, A.L.(2013). *Camellias inensis* leaves a new treatment against Urinary Tract Infection caused by Pseudomonas Fluorescens and *Serratia sp*. *Int. J. Pharm. Sci. Res.*,4(3): 1546-50.
- Tipu, L.A. ; Pasha, T.N. and AIL, Z. (2006). Comparative efficacy of salinomycin sodium and Neeni fruit (*Aadii' acht indica*) as feed additive anticoccidials in broilers. *Int. J. Poult. Sd*., 1(4): 91-93.
- Todar, K.(2004). TextBook of bacteriology university of wisconson - Madison department of Bacteriology U.S.A.
- Todar,K. (2008). *pseudomonas aeruginosa* . Todar's Online Tex tBoob of Bacteriology Net.
- Todar,K. (2009). Todar's Text Book of Bacteriology Microbial world.

- Todar,K.(2011). *Psendomonas* , Sci . 415 :1801– 1803.
- Toole, G.o. ; Kaplan, H.B. and Kolter. R.(2000) Biofilm formation as microbial development. Annual review of microbiology., 54:49-79.
- Udo, E.E and Jacob, L.E. (2000).characterization of methicillin resistant *staphylococcus aureus* from Kuwait hospital with high level fusidic acid resisrance. *J.Med. Microbiol.,* 49(5):419-26.
- Uma, D.B. ; Ho, C.W. and Aida, W. M. (2010). Optimization of Extraction Parameters of Total Phenolic Compounds from Henna (*Lawsonia inermis*) Leaves. Sains Malaysiana., 39(1): 119- 128.
- Vandepitte, J.; Verhaegen, J.; Engback, K.; Rohner, R. and Heuck, CL. (2002). Basic laboratory procedure in clinical bacteriology 2nd ed. World health organization. Geneva.
- WHO.(2003).Basic laboratory Procedures in Clinical Bacteeiology. 2_{nd} ed. Geneva.
- Williams, H.D. ; Zlosnik , J.E. and Ryall, B. (2007). oxygen cyanide and energy generation in the cystic fibrosis pathogen *Psendomonas aeruginosa*. Adv. Microb. Physiol., 52: 1-71.
- Wimpenny, J. (2000). Anoverview of biofilm as functiona communities in : community structure and cooperation in biofilm Allsion,D.G.; Gibert, P.; Lappin Scott, H.M & Wilson ,M. (eds). The society for general micribiol. London UK., 1-19 Y.
- Winkel-Shirley, B. (2002).Biosynthesis of flavonoids and effects of stress Plant Biology . ; 5: 218 -223.
- Yoda, Y. ; Hu, Z.Q. and Zhao, W.H. (2004). Different susceptibilities of Staphylococcus and Gram-negative rods to epigallocatechin gallate. *J. Infect. Chemotherapy.* 10: 55-58.

Sammary

This study was conducted to identify the effects of plant extracts *Camellia Sinensis*, *Cinnamon cinnamoum* ands *Lawsonia inermis* on *Pseudomonas aeruginosa* producing biofilm and isolated from burn patients in the Imam. Al-Hussein in the Burns department in Kerbala For the period of December 2017 to February 2018 a total of 118 sample and evalvating the minimum inhibitory Concentration(MIC) and minimum Bactericidal Concentration(MBC),province(50) isolation of the *P.aeruginosa* bacteria forming the biofilm can be diagnosed and developed by relying on a number of biochemical tests as well as the technique Vitek-2 developed the results show that the diagnosed bacteria are bacteria 99% *P.aeruginosa* and has high resistance against most commonly used antibiotics 100%,This study was investigated the ability of bacteria to formation of biofilm by method congo red agar (C.R.A.) There was 66% of isolated bacteria formation of biofilm strong while there was 12% of isolated biofilm medium and 22% formation weak biofilm Anther method has been detected the ability of bacteria to formation of biofilm was microtiter plate (M.T.P.)in which there were 80%with strong , medium 6% and weak 14%. and showed that the aqueous extract of the three plants did not show any activity against the bacteria *p.aeruginosa* producing the biofilm even at high concentration while showing The alcoholic extract of all the plants used in the study is the opposite as it showed an anti-bacterial activity as the extract of ethanol alcohol for the *Cinnamon cinnamoum* with a concentration of 100% higher inhibition diameter of 16.21 (mm) and record green tea 6.16 (mm) while *Lawsonia inermis* recorded less diameter inhibition Reached 7.98 (mm), as well as the results showed that the value of the Minim

inhibition concentration and the Minim inhibition killed concentration rate for green tea extract and cinnamon and *Lawsonia inermis* against the bacteria producing strong , medium and weak biofilm are the (65,65,75)(mg/ml) , (35,35,40)(mg/ml) , (25,25,35)(mg/ml) for concentration respectively while the (MBC) (75,75,85)mg/ml,(45,45,50)mg/ml,(35,35,45)mg/ml concentrations respectively Conclusion of the study is that the effect plant extract is green tea , cinnamum and henna for ethanol alcohol is better than cold and hot water extractagainst bacteria *p.aeruginosa* formation biofilm and isolated from burn patients , is the Cinnamon extract is better than green tea extract and henna extract , is the green tea extract is better than henna extract to Inhibition of bacteria *P.aeruginosa* .

Republic of Iraq
Ministry of Higher Education
and Scientific Research
University of Kerbala
College of Education for Pure Sciences
Department of Biology

Evalvating the effectiveness of some plant extracts against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm-producing isolated from burns patients in Kerbala province

By

Wassan Ridha Hassan Al-shakarjy

A Thesis submitted to the College of Education Pure Science of Karbala University as a partial fulfillment of the requirements for master of Philosophy in Biology-Zoology

Assist Professor Dr.Hyiam Abdalridha Al-awad

Supervised By

1440 A.H **2019.A.D**