جامعة كربلاء

كلية التربية للعلوم الصرفة

قسم علوم الحياة

دراسة حساسية بكتيريا الزائفة الزنجارية المعزولة من المصابين بالحروق لبعض المستخلصات النباتية وقابليتها للانتقال عبر الحشرات في مدينة كربلاء

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

كتبت بواسطة:

نوال هادي محسن الكعبي

بإشراف

أ.د رافد عباس العيسى

الاشراف الثاني

أ.م.د قيصر عبد السجاد

تموز ٢٠٢٢م ذي الحجة ١٤٤٣هـ

بِسْــــــمِ اللّٰهِ الرَّحْمَــنِ الــرَّحِيـمِ

وَعَلَّمَكَ مَا لَمْ تَكُنْ تَعْلَمُ

صدق الله العلي العظيم

سورة النساء (١١٣)

إقرار المشرف على الرسالة

أشهد أن إعداد هذه الرسالة الموسومة : **(دراسة حساسية بكتيريا الزائفة الزنجارية المعزولة من المصابين بالحروق لبعض المستخلصات النباتية وقابليتها للانتقال عبر الحشرات في مدينة كربلاء)** قد جرى تحت إشرافي في قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء وهي جزءٌ من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة /علم الحيوان.

التوقيع:

الاسم : د. رافد عباس العيسى

المرتبة العلمية: استاذ

مكان العمل: كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة كربلاء

التاريخ : / / 2022

التوقيع:

الاسم: د.قيصر عبد السجاد محمد

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

مكان العمل : كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة كربلاء

التاريخ : / / 2022

توصية رئيس قسم علوم الحياة

إشارة إلى التوصية أعلاه من قبل الأستاذ المشرف، أحيل هذه الرسالة إلى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها .

التوقيع:

الاسم : د. نصير مرزا حمزة

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

مكان العمل : كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة كربلاء .

التاريخ : / / 2022

إقرار المقوم اللغـوي

أشهد أن هذه الرسالة الموسومة بـ **(دراسة حساسية بكتيريا الزائفة الزنجارية المعزولة من المصابين بالحروق لبعض المستخلصات النباتية وقابليتها للانتقال عبر الحشرات في مدينة كربلاء)** تمت مراجعتها من الناحية اللغوية وتصحيح ما ورد فيها من أخطاء لغوية وتعبيرية وبذلك أصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة بقدر تعلق الأمر بسلامة الأسلوب وصحة التعبير.

التوقيع:

الاسم : د. مسلم مالك الاسدي

المرتبة العلمية: أستاذ دكتور

مكان العمل : جامعة كربلاء / كلية العلوم الإسلامية

التأريخ : / / 2022

إقـــــــرار لجنة المناقشة

نحن أعضاء لجنة المناقشة الموقعين أدناه نشهد بأننا قد أطلعنا على الرسالة الموسومة (**دراسة حساسية بكتيريا الزائفة الزنجارية المعزولة من المصابين بالحروق لبعض المستخلصات النباتية وقابليتها للانتقال عبر الحشرات في مدينة كربلاء**) المقدمة من قبل الطالبة (**نوال هادي محسن**) كجزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير/علم الحيوان/علم الاحياء المجهرية ، وبعد إجراء المناقشة العلمية وجد إنها مستوفية لمتطلبات الشهادة وعليه نوصي بقبول الرسالة بتقدير (امتياز).

رئيس لجنة المناقشة

التوقيع:
الاسم: د. سيف جبار ياسر
المرتبة العلمية: استاذ
مكان العمل: جامعة الكوفة / كلية الطب
التاريخ: / / 2022

عضو اللجنة

التوقيع:
الاسم : د. علاء عبد الحسين كريم
المرتبة العلمية: أستاذ مساعد
مكان العمل: كلية التربية للعلوم الصرفة ـ جامعة كربلاء
التاريخ: 22 / 9 / 2022

عضو اللجنة

التوقيع:
الاسم: د. منى إبراهيم جاسم
المرتبة العلمية: مدرس
مكان العمل: كلية التربية للعلوم الصرفة ـ جامعة كربلاء
التاريخ: / / 2022

عضواً ومشرفا

التوقيع:
الاسم : د. رافد عباس العيسى
المرتبة العلمية: استاذ
مكان العمل :كلية التربية للعلوم الصرفة ـ جامعة كربلاء
التاريخ : / / 2022

عضواً ومشرفا

التوقيع:
الاسم : د. قيصر عبد السجاد محمد
المرتبة العلمية: أستاذ مساعد
مكان العمل :كلية التربية للعلوم الصرفة ـ جامعة كربلاء
التاريخ : / / 2022

مصادقة عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة

التوقيع :
الاسم : د. حميدة عيدان سلمان
المرتبة العلمية: استاذ
التاريخ : 9 / 10 / 2022

الإهـــــــــــداء

ابي بوجودك الدائم لن تنقطع سبل الرجاء وأنا للآن أرزح بفيء روحك . .ايها الامل المنشود . .

امي . . ياملاذاً آمناً يمد ايامي بوهجٍ من دفئه الحاني ،سلامٌ لروحك الحاضرة وهي تحلّق في سماوات وجودنا

اخويَّ الغائبان لطالما زرعتما بذار محبتكما في دروب أيامنا فنمت مترعرعة لا تخبو ابداً

يا بارقة الضياء لكما الرحمة والخلود، فأنتما حاضران بروحكما الندية وان غيّبكما الدهر

اخي . .اخواتي . . وانتم تقفون دائماً عند تخوم القلب والوجدان

شكراً لفيض مودتكم وجميل سؤالكم . . أسأل الله تعالى أن يمنَّ عليكم بفضله ورضاه

زوجي . .اليك . .ياشريك القلق والهواجس والسنوات شكراً لك . .ياخيمةً نأوي الى ظلها

الى ابنائي . . فلذات قلبي . . فهذه نسائمكم الصادقة تأخذ بأشرعة حياتي الى حيث الأمان والطمأنينة . .انعم بوجودكم . . واكرم بما جاد الرحمن من عطايا

اهديكم هذا الجهد المتواضع

نـــــــوال

شكـــر وعرفـــــــان

أتقدم بالشكر الجزيل والثناء لرئاسة جامعة كربلاء وعمادة كلية التربية للعلوم الصرفة ورئاسة قسم علوم الحياة لاتاحتهم الفرصة لي لاكمال دراستي وشكري الخاص لرئيس القسم المحترم **الاستاذ المساعد الدكتور نصير ميرزا**

والى اساتيذي في قسم علوم الحياة لما جادوا به من عطاء كبير ويتجلى الشكر بتاج العرفان الى الاستاذين القديرين اللذين اشرفا على رسالة الماجستير **الأستاذ الدكتور رافد عباس العيسى** و**الأستاذ المساعد الدكتور قيصر عبد السجاد** اللذان لم يألا جهدا في تقديم العون المعرفيّ ، ولم يدّخرا وسعاً في اظهار هذه الرسالة بحلّتها النهائية شكر الله تعالى سعيهما ومعروفهما واكرمهما بفضله وعنايته.

ويطيب لي أن اسجل وافر العرفان مقروناً بالتقدير والاحترام الى العتبة العباسية المقدسة واخص بالثناء سماحة المتولي **الشرعي السيد أحمد الصافي (دام عزه)** و**الأستاذ الدكتور عباس الدده** مما يستوجب الشكر الجزيل والثناء الجميل .

كما أتقدم بالشكر الى **الدكتورة سكينة عباس عليوي** /جامعة بغداد /كلية العلوم /قسم علوم الحياة و**الدكتور حيدر نعيم** جامعة كربلاء/ كلية التربية للعلوم الصرفة/ قسم علوم الحياة

الشكر والامتنان لكل من اسدى اليَّ حرفاً اواعانني في مصدر او ملحوظة

واسأل الله تعالى ان يبارك لي مشوار البحث والدراسة في الحقل المعرفي وان يمد باسبابهما وان لايجعله اخر العهد مني والحمد لله والصلاة والسلام على نبي الرحمة والهدى واهل بيته الطيبين الطاهرين.

نـــــــوال

الخلاصة

أجريت هذه الدراسة للتحري عن حساسية بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من المصابين بالحروق في مستشفى مدينة الامام الحسين الطبية في محافظة كربلاء للمستخلصات النباتية لنبات (الزعتر وقشور الرمان وأوراق التيكوما والشيح) خلال الفترة من شهر كانون الأول ٢٠٢١ لغاية شهر أيار ٢٠٢٢ اذ تم جمع ١٠٠ مسحة من المرضى الراقدين في ردهة الحروق والكشف عن مدى حساسيتها لـ ١٠من المضادات الحيوية. تم استخدام مستخلصات نباتية بتراكيز مختلفة واختبار نشاطها ضد تلك العزلات والتي تشمل مستخلص نبات الزعتر مستخلص قشورنبات الرمان ومستخلص أوراق نبات التيكوما ومستخلص نبات الشيح. كما تم دراسة التركيب الكيميائي لتلك المستخلصات في محاولة لتعزيز مفعولها. تم مقارنة نتائج المستخلصات التي تم الحصول عليها مع بعضها البعض لتحديد المركب عالي الفعالية.

بلغ العدد الإجمالي لعزلات *P.aeruginosa* ٤٠ عينة من ١٠٠ عينة سريرية ، وتوزيع هذه العزلات كان: ٥٧ ذكورا و٤٣ اناثا ، تم التعرف على العزلات البكتيرية من خلال الاختبارات التشخيصية الروتينية والتي تضمنت الخصائص الزرعية و الكيميائية الحيوية. تم الكشف عن فعالية ١٠ مضادات حيوية بطريقة الانتشار القرصي وأظهرت النتائج درجة عالية من المقاومة لمعظم المضادات الحيوية ممثلة ب Gentamicin, Penicillin , Cephalosporin , Cefatoxime , Erythromycin ,Streptomycin, Amoxicillin , Levofloxacin, Oxacillin وفقًا لذلك ، كانت النتائج متسقة مع ما يسمى *P.aeruginosa* المقاوم للأدوية المتعددة (MDRPA) ماعدا المضاد الحيوي Imipemeim فقد سجلت البكتريا حساسية اتجاهه.

أظهرت نتائج هذه الدراسة أن الجنس والعمر والمكوث في المستشفى لفترة طويلة واستخدام المضادات الحيوية لفترات طويلة كان له تأثير حيث زادت عوامل الخطر من فرصة الإصابة. تم الكشف عن قابلية بكتيريا *P.aeruginosa* على انتاج الغشاء الحيوي بإختبار الصفائح المعايرة (MTP) فقد اظهرت النتائج ان (٣٧)عزلة بكتيرية وبنسبة ٩٢.٥% كانت منتجة للغشاء الحيوي في حين كانت بقية العزلات بمجموع (٣) وبنسبة ٧.٥% غيرمنتجة اوضعيفة الانتاج. تم استعمال التراكيز(١٠٠،٧٥،٥٠،٢٥) ملغم / مل لتقييم الفعالية التثبيطية للمستخلصات النباتية ،اظهرت المستخلصات المائية والكحولية لنبات الزعتروقشور الرمان وأوراق التيكوما ونبات الشيح فعالية تثبيطية اتجاه بكتيريا *P.aeruginosa* وزيادة هذه الفعالية مرتبط مع زيادة التركيز. وأظهر المستخلص المائي لأوراق نبات التيكوما بتركيز ١٠٠ ملغم / مل أعلى قطر تثبيط اذ بلغ ٣٢.٣٠± ١.٤٣ ملم.

اظهرت نتائج الدراسة ان قيمة التركيز المثبط الأدنى MIC والتركيز القاتل الأدنى MBC تتفاوت اعتمادا على نوع المستخلص وقوة الغشاء الحيوي إذ بلغت قيمة MIC للمستخلص المائي لنبات الزعتر(٣٢،٣٢،٦٤) ملغم/ مل وكانت قيمة MBC (١٢٨،١٢٨،٢٥٦) ملغم/ مل ضد البكتيريا المنتجة للغشاء الحيوي القوي والمتوسط والضعيف على التوالي ، في حين كانت قيمة MIC وMBC للمستخلص الكحولي (١٦،٣٢،٣٢) ملغم/ مل و(١٢٨،١٢٨،٢٥٦) ملغم/ مل ضد البكتيريا المنتجة للغشاء الحيوي القوي والمتوسط والضعيف على التوالي . كما أظهرت الدراسة أن قيمة MIC وMBC للمستخلص المائي لقشور نبات الرمان (١٦،٣٢،٣٢) ملغم/ مل (١٢٨،١٢٨،١٢٨) ملغم/ مل ضد البكتيريا المنتجة للغشاء الحيوي القوي والمتوسط والضعيف على التوالي، وكانت قيمة MIC و MBC للمستخلص الكحولي لقشور نبات الرمان (١٦،١٦،٦٤) ملغم /مل و (١٢٨،١٢٨،١٢٨) ملغم /مل ضد البكتيريا المنتجة للغشاء الحيوي القوي والمتوسط والضعيف على التوالي.في حين ان قيمة MIC و MBC لمستخلص أوراق نبات التيكوما ضد البكتيريا المنتجة للغشاء الحيوي القوي(١٢٨،٣٢) ملغم /مل و(١٢٨،٦٤) ملغم /مل للمستخلصين المائي والكحولي على التوالي بينما بلغت قيمة MIC وMBC للبكتيريا المنتجة للغشاء الحيوي المتوسط (١٢٨،١٦) ملغم /مل (١٢٨،٣٢) ملغم/مل للمستخلصين المائي والكحولي على التوالي وكانت قيمة MIC و MBC لمستخلص أوراق التيكوما (١٢٨،٤) ملغم / مل و(١٢٨،٨) ملغم/مل للمستخلصين المائي والكحولي على التوالي للبكتيريا المنتجة للغشاء الحيوي الضعيف .اظهرت الدراسة ان قيمة MIC و MBC للمستخلص المائي لنبات الشيح بلغ (٣٢،٦٤،٦٤) ملغم/ مل و(٢٥٦،٢٥٦،٥١٢) ملغم /مل ضد البكتيريا المنتجة للغشاء الحيوي القوي والمتوسط والضعيف على التوالي بينما كانت قيمة MIC وMBC للمستخلص الكحولي (٦٤،٦٤،٦٤) ملغم/ مل و(٢٥٦،٢٥٦،٥١٢) ملغم /مل ضد البكتيريا المنتجة للغشاء الحيوي القوي والمتوسط والضعيف على التوالي .

تم الكشف عن المركبات الكيميائية الفعالة الموجودة في المستخلصات النباتية بواسطة جهاز التحليل الكروموتوكرافي السائل ذو القدرة الفائقة HPLC و مقارنة نتائج المستخلصات التي تم الحصول عليها مع بعضها البعض لتحديد المركب عالي الفعالية.

أظهرت نتائج الدراسة ان بعض الحشرات (الصرصر الألماني *Blattella germanica* والذباب المنزلي *Musca domestica* والنمل *Camponotus xerxes*) لها القدرة على نقل بكتيريا *P.aeruginosa* وكانت حشرة الصرصر الألماني الأكثر كفاءة في النقل تليها الذباب المنزلي فيما كانت حشرة النمل الأقل نقلا للبكتيريا.

قائمة المحتويات

التسلسل	الموضوع	رقم الصفحة
	الخلاصة باللغة العربية	III
	قائمة المحتويات	V
	قائمة الجداول	XI
	قائمة الصور والاشكال	XIII
	قائمة الملاحق	XV
	قائمة المختصرات	XVI
الفصل الاول : المقدمة		
1-1	المقدمة	1
2-1	الهدف من الدراسة	2
الفصل الثاني : استعراض المراجع Literature review		
1-2	الحرق Burn	3
2-2	تصنيف الحروق Burns classification	3
1-2-2	الحروق من الدرجة الاولى First degree burns	3
2-2-2	الحروق من الدرجة الثانية Second degree burns	4
3-2-2	الحروق من الدرجة الثالثة Third degree burns	4
4-2-2	الحروق من الدرجة الرابعة Fourth degree burns	5
3-2	تقدير نسبة الحروق Burn rate estimation	5
4-2	انواع الحروق Types of burns	7
5-2	البكتيريا المرافقة للحروق Bacteria associated with burns	8
6-2	الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa*	8
1-6-2	تصنيف البكتيريا Classification of Bacteria	9

10	Pathogenicity الامراضية	**2-6-2**
10	Virulence factors عوامل الضراوة	**3-6-2**
14	الية مقاومة بكتيريا *P. aeruginosa* للمضادات الحيوية	**4-6-2**
14	Low Permeability of Outer Membrane تقليل نفاذية الغشاء الخارجي	**1-4-6-2**
15	Efflux-Pump مضخات الدفق	**2-4-6-2**
16	تقليل استهداف البروتينات الرابطة للبنسيلين	**3-4-6-2**
16	التحلـــــــل المـــــــائي للمضـــــــادات الحيويـــــة بواســــــطة إنزيمــــــات البيتالاكتاميز Antibiotic Hydrolyses by ß-Lactamases	**4-4-6-2**
17	استعمال النباتات للعلاج من الامراض	**7-2**
17	نبات الزعتر *Thymus vulgaris L.*	**1-7-2**
19	نبات الرمـــــــان *Punica granatum*	**2-7-2**
21	نبات التيكوما *Tecoma stans*	**3-7-2**
23	نبات الشيح *Artemisia Judaica L.*	**4-7-2**
24	الحشرات الناقلة للمسببات المرضية	**8-2**
25	الصرصر الالماني: *Blattella germanica*	**1-8-2**
26	النمـــل *Camponotus xerxes*	**2-8-2**
27	الذباب المنزلي *Musca domestica*	**3-8-2**
الفصل الثالث: المواد وطرائق العمل Materials and Methods		
28	الأجهزة والادوات والمواد المستخدمة في أجراء التجارب	**1-3**
28	الأدوات والمعدات المستخدمة في الدراسة الحالية في الجدول (3-1)	**1-1-3**
29	المـواد البيولوجيـة والكيميائيـة والاوسـاط الزرعيـة Biological, Chemical Materials and culture media	**2-1-3**

30	Study design تصميم الدراســــــة	2-3
31	Methods طرائق العمل	3-3
31	Collection of samples جمع العينات	1-3-3
31	microscopic examination for الفحـص المجهـري لعينـات البكتيريـا bacteria	2-3-3
31	Sample culturing زرع العينات	3-3-3
31	Proration of culture media تحضير الاوساط الزرعية	4-3-3
31	Nutrition agar وسط الاكار المغذي	1-4-3-3
32	MacConkey agar وسط اكار الماكونكي	2-4-3-3
32	Mueller Hinton Agar وسط مولر هنتون	3-4-3-3
32	(King A agar) وسط انتاج صبغة البايوسيانين	4-4-3-3
32	(Urea agar) اكار اليوريا	5-4-3-3
32	Blood Agar Media تحضير وسط اكار الدم	6-4-3-3
33	Congo red agar وسط احمر الكونغو	7-4-3-3
33	Motility Test وسط اختبار الحركة	8-4-3-3
33	Starch test اختبار النشا	9-4-3-3
33	تحضير المحاليل و الكواشف	5-3-3
33	محلول ثابت العكورة القياسي (محلول ماكفرلاند 0.5)	1-5-3-3
34	Gram stain التصبيغ بصبغة كرام	2-5-3-3
34	Voges–Proskauer test كاشف فوكس بروسكاور	3-5-3-3
34	Catalase reagent كاشف الكتاليز	4-5-3-3
34	Oxidase reagent كاشف الاوكسيديز	5-5-3-3

34	اختبار السترات Citrate utilization	**6-5-3-3**
35	القدرة على تخمير الكلوكوز O/F of glucose	**7-5-3-3**
35	كاشف احمر المثيل Methyl red reagent	**8-5-3-3**
35	النمو في درجة حرارة 4 مئوية	**9-5-3-3**
35	النمو في درجة حرارة 42 مئوية	**10-5-3-3**
35	اختبار الحساسية للمضادات الحيوية	**11-5-3-3**
36	التشخيص واختبار الحساسية بواسطة جهاز الفايتك VITEK- 2 compact system –Identification and Sensitivity test	**12-5-3-3**
36	الكشف النوعي عن قدرة البكتيريا على تكوين الغشاء الحيوي بواسطة الصفائح المعايرة (MTP): Qualitative Detection of the ability of bacteria to form the biofilm by Microtiter plate	**13-5-3-3**
37	تحضير المستخلصات النباتية	**6-3-3**
38	عمل تراكيز المستخلصات النباتية المائية والكحولية	**7-3-3**
38	الكشف عن المواد الفعالة (المواد الفينولية و الفلافينويدات) بواسطه جهاز التحليل الكروماتوغرافي (HPLC) (التحليل الكروموتوغرافي –السائل ذو القدرة الفائقة) (High-performance liquid chromatography)	**8-3-3**
39	اختبار مدى حساسية بكتيريا الزوائف الزنجارية (*pseudomonas aeruginosa*) للمستخلص المائي و الكحولي لـ (الزعتر و قشور الرمان و الشيح و التيكوما)	**9-3-3**
39	اختبار التركيزٌ المثبط الأدنى MIC لمستخلص الزعتر و قشر الرمان و الشيح و التيكوما	**10-3-3**
40	دراسة كفاءة بعض الحشرات في نقل بكتيريا *P.aeuroginosa*	**11-3-3**
41	التحليل الاحصائي	**4-3**

الفصل الرابع :النتائج والمناقشة		
1-4	عزل وتشخيص بكتيريا ب *P.aeruginosa*	42
1-1-4	النسبة المئوية لعينات الزوائف الزنجارية *P.aeruginosa* المعزولة من مسحات الحروق في الدراسة	42
2-1-4	الاختبارات الكيموحيوية على الزوائف الزنجارية *P.aeruginosa* المعزولة من مسحات الحروق في الدراسة	42
2-4	تأثير الجنس والعمر في معدل الإصابة بـ *P.aeruginosa* وتأثير عامل الخطورة	44
3-4	تأثير اختلاف اماكن العزل من الجسم على معدل الاصابة ب *P.aeruginosa*	45
4-4	التشخيص المختبري لبكتيريا الزوائف الزنجارية *P.aeruginosa*	47
1-4-4	انتاج صبغة البايوسيانين Pyocyanin pigment production	47
2-4-4	حساسية البكتيريا المعزولة قيد الدراسة تجاه المضادات الحيوية المستعملة باستخدام طريقة الانتشار على الاطباق	48
5-4	حساسية البكتيريا المعزولة قيد الدراسة تجاه المضادات الحيوية المستعملة باستخدام جهاز (VITEK-2)	49
6-4	تقدير قابلية العزلات البكتيرية على إنتاج الغشاء الحيوي Estimation the ability of bacteria to biofilm production	52
7-4	قابلية بكتريا الزوائف الزنجارية على إنتاج الغشاء الحيوي بإختبار أحمر الكونغو (Congo red agar)	54
8-4	تقييم فعالية مستخلصات المذيبات العضوية	55
1-8-4	تقييم فعالية مستخلص الزعتر Thyme Extract المائي والكحولي	55
2-8-4	تقييم الفعالية التثبيطية لمستخلص قشورنبات الرمان *Punica granatum* المائي والكحولي	59
3-8-4	تقييم الفعالية التثبيطية لمستخلص أوراق نبات التيكوما *Tecoma stans* المائي والكحولي	63

4-8-4	تقييم الفعالية التثبيطية لمستخلص نبات الشيح *Artemisia judaica* المائي و الكحولي	66
5-8-4	تأثير المستخلصات المائية والكحولية لنباتات(الزعتر قشور الرمان أوراق التيكوما الشيح)على بكتيريا *P.aeruginosa*	69
1-5-8-4	تأثير المستخلصات المائية والكحولية لنباتات (الزعتر، قشور الرمان ، أوراق التيكوما، الشيح)على بكتيريا *P.aeruginosa* المنتجة للغشاء الحيوي القوي	71
2-5-8-4	تأثير المستخلصات المائية والكحولية لنباتات (الزعتر، قشور الرمان ،أوراق التيكوما ،الشيح)على بكتيريا *P.aeruginosa* المنتجة للغشاء الحيوي المتوسط	72
3-5-8-4	تأثير المستخلصات المائية والكحولية لنباتات (الزعتر، قشور الرمان ،أوراق التيكوما ،الشيح)على بكتيريا *P.aeruginosa* المنتجة للغشاء الحيوي الضعيف	73
9-4	تقييم التركيز المثبط الادنى (MIC) والقاتل الادنى (MBC) لمستخلص المائي والكحولي لنبات الرمان والزعتر والشيح والتيكوما ضد الزوائف الزنجارية	75
10-4	نتائج تشخيص الحشرات	78
11-4	كفاءة بعض الحشرات في نقل البكتيريا	78
5	**الاستنتاجات والتوصيات**	**80-81**
1-5	الاستنتاجات	80
2-5	التوصيات	81
6	**المصادر**	**82-111**
1-6	المصادر العربية	82
2-6	المصادر الأجنبية	83
7	**الملاحق**	**112-118**
8	**Summary**	**I-III**

قائمة الجداول

رقم الجدول	الموضوع	رقم الصفحة
(1-3)	المعدات والأدوات المستعملة في الدراسة الحالية	28
(2-3)	المواد البيولوجية والكيميائية والاوساط الزرعية	29
(1-4)	الاختبارات الكيموحيوية التابعة الى الزوائف الزنجارية بـ *P.aeruginosa*	43
(2-4)	تأثير الجنس والعمر في معدل الإصابة ببكتيريا *P.aeruginosa*	45
(3-4)	اماكن عزل الزوائف الزنجارية في مختلف مناطق الجسم	47
(4-4)	الامتصاصية لبكتريا *P.aeruginosa* باستخدام جهاز فحص المقايسة المناعية المرتبط بالانزايم وطول موجي 530 نانوميتر.	53
(5-4)	المركبات الفعالة و زمن الاحتجار(دقيقة) ومساحة الذروة والتركيز لمادة الزعتر المائي باستخدام تقنية HPLC	58
(6-4)	المركبات الكيميائية الفعالة و زمن الاحتجار(دقيقة) ومساحة الذروة والتركيز لمستخلص الزعتر الكحولي باستخدام تقنية HPLC	59
(7-4)	المركبات الفعالة و زمن الاحتجار(دقيقة) ومساحة الذروة والتركيز لمواد المستخلص الرمان المائي باستخدام تقنية HPLC	62
(8-4)	المركبات الفعالةو زمن الاحتجار(دقيقة) ومساحة الذروة والتركيز لمواد مستخلص الرمان الكحولي باستخدام تقنية HPLC	62
(9-4)	المركبات الفعالة و زمن الاحتجار(دقيقة) ومساحة الذروة والتركيز لمواد المستخلص التيكوما المائي باستخدام تقنية HPLC	65
(10-4)	المركبات الفعالة و زمن الاحتجار(دقيقة) ومساحة الذروة والتركيز لمواد المستخلص التيكوما الكحولي باستخدام تقنية HPLC	66
(11-4)	المركبات الفعالة و زمن الاحتجار(دقيقة) ومساحة الذروة والتركيز لمواد المستخلص الشيح المائي باستخدام تقنية HPLC	68

(12-4)	المركبات الفعالة وزمن الاحتجار (دقيقة) ومساحة الذروة والتركيز لمواد المستخلص الشيخ الكحولي باستخدام تقنية HPLC	69
(13-4)	تأثير المستخلصات المائية والكحولية لنباتات (الزعتر، قشور الرمان، أوراق التيكوما ،الشيح)على بكتيريا *P.aeruginosa*	70
(14-4)	معدل اقطار التثبيط والانحراف القياسي للمستخلصات النباتية المائية والكحولية للزعتر وقشور الرمان والتيكوما و الشيح ضد بكتريا P.aeruginosa المنتجة للغشاء الحيوي القوي	72
(15-4)	معدل اقطار التثبيط والانحراف القياسي للمستخلصات النباتية المائية والكحولية للزعتر وقشور الرمان والشيح ضد بكتريا *P.aeruginosa* المنتجة للغشاء الحيوي المتوسط	73
(16-4)	معدل اقطار التثبيط والانحراف القياسي للمستخلصات النباتية المائية والكحولية للزعتر وقشور الرمان والشيح ضد بكتريا الزوائف الزنجارية المنتجة للغشاء الحيوي الضعيف	74
(17-4)	التركيز المثبط الأدنى MIC والتركيز القاتل الأدنى MBC للمستخلصات النباتية المائية والكحولية المستعملة في الدراسة على بكتيريا *P. aeruginosa* المنتجة للغشاء الحيوي القوي	77
(18-4)	التركيز المثبط الأدنى MIC والتركيز القاتل الأدنى MBC للمستخلصات النباتية المائية والكحولية المستعملة في الدراسة على بكتيريا *P. aeruginosa* المنتجة للغشاء الحيوي المتوسط	77
(19-4)	التركيز المثبط الأدنى MIC والتركيز القاتل الأدنى MBC للمستخلصات النباتية المائية والكحولية المستعملة في الدراسة على بكتيريا *P. aeruginosa* المنتجة للغشاء الحيوي الضعيف	78
(20-4)	عدد مستعمرات P.aeruginosa المنقولة بواسطة الحشرات المستعملة في الدراسة	79

قائمة الاشكال والصور

رقم الشكل	عنوان الشكل	رقم الصفحة
1-2	حرق من الدرجة الاولى	3
2-2	حرق من الدرجة الثانية	4
3-2	الفرق بين انواع الحروق	5
4-2	مخطط التسع لوالس لقياس نسبة الحرق في الجسم	6
5-2	مخطط لاوند- براند لتقدير الحروق في الاطفال	7
6-2	مخطط لبكتيريا الزوائف الزنجارية مع عوامل ضراوتها	9
7-2	مراحل تكون الغشاء الحيوي biofilm في بكتيريا *P.aeruginosa*	11
8-2	نبات الزعتر في الطبيعة	18
9-2	نبات الرمان	20
10-2	نبات التيكوما	22
11-2	نبات الشيح	23
1-4	النسبة المئوية لجرثومة الزوائف الزنجارية	42
2-4	مستعمرات الزوائف الزنجارية على وسط King agar	48
3-4	مقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية	48
4-4	بكتريا *P.aeruginosa* المنتجة للغشاء الحيوي في الصحيفة المعيارية (Microtiter plate)	54
5-4	مستعمرات الزوائف الزنجارية (A) يمثل مستعمرات ذات لون وردي فاتح غيرمنتجة للغشاء الحيوي او منتجة للغشاء الحيوي الضعيف والمنتجة للغشاء الحيوي، (B) مستعمرات ذات لون اسود على وسط اكار الاحمر الكونغو المنتجة للغشاء الحيوي القوي .	55

6-4	الفعالية التثبيطية لمستخلص المائي (A) والكحولي (B) للزعتر ضد بكتريا الزوائف الزنجارية المعزولة من مرضى الحروق	56
7-4	الفعالية التثبيطية للمستخلص المائي (A) والكحولي (B) لقشور الرمان ضد بكتريا *P.aeruginosa* المعزولة من مرضى الحروق	60
8-4	الفعالية التثبيطية لمستخلص المائي (A) والكحولي (B) لنبات التيكوما ضد بكتريا الزوائف الزنجارية المعزولة من مرضى الحروق	65
9-4	الفعالية التثبيطية لمستخلص المائي (A) والكحولي (B) لنبات الشيح ضد بكتريا الزوائف الزنجارية المعزولة من مرضى الحروق	67

قائمة الملاحق

رقم الملحق	عنوان الملحق	رقم الصفحة
1	تشخيص بكتيريا *P. aeruginosa* بجهاز الفايتك VITEK	112
2	اختبار حساسية بكتيريا *P. aeruginosa* بواسطة جهاز الفايتك VITEK	113
3	المركبات الكيميائية الفعالة و زمن الاحتجاز (دقيقة) ومساحة الذروة والتركيز لمستخلص نبات الزعتر	114
4	المركبات الفعالة وزمن الاحتجاز ومساحة الذروة والتركيز لمستخلص قشور الرمان بتقنية HPLC	115
5	المركبات الفعالة وزمن الاحتجاز ومساحة الذروة والتركيز لمستخلص أوراق التيكوما بتقنية HPLC	116
6	المركبات الفعالة وزمن الاحتجاز ومساحة الذروة والتركيز لمستخلص نبات الشيح بتقنية HPLC	117
7	تشخيص النباتات (*Thymus vulgaris* L. –*Tecom stans*- *Artemisia judaica* L.-*Punica granatum* L.)	118

قائمة المختصرات

المختصر	المصطلح
B. subtilis	Bacillus subtilis
B.cereus	Bacillus cereus
C. perfringens	Clostridium perfringens
CRA	Congo red agar method
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
E. faecalis	Enterococcus faecalis
E. faecium	Enterococcus faecium
EGCG	Epigallocatechin gallate
E. coli	Escherichia coli
HPLC	High-prformans liquid chromatography
β-lactamases	Beta lactamases
L. monocytogenes	Listeria monocytogenes
MTP	Microtiter plate method
MBC	Minimum Bactericidal Concentration
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
OD	Optical density
PH	Power of Hydrogen
P.aeruginosa	Pseudomonas aeruginosa
P. fluorescens	Pseudomonas fluorescens
S. enterica	Salmonella enterica
S. typhi	Salmonella typhi
S.flexneri	Shigella flexneri
S.sonnei	Shigella sonnei

الفصل الأول

المقـــــدمة

Introduction

1-1 المقدمة Introduction

يعد الحرق إصابة في الجلد أو الأنسجة الأخرى ناتجة بشكل أساسي عن الحرارة أو بسبب الإشعاع أو النشاط الإشعاعي أو الكهرباء أو الاحتكاك أو التلامس مع المواد الكيميائية (Gray *et al.*,2016).

ان حالات الحروق من الامور الخطيرة على حياة المريض وذلك لأنها تتسبب بزوال طبقات الجلد و بذلك يفقد المريض الحاجز الدفاعي الاول والذي يحميه من الظروف الخارجية و يكون اكثر عرضة للبكتيريا المختلفة التي تستغل الظروف وتنمو في المنطقة محدثة حالات التهابات قد تؤدي الى صعوبة في الشفاء وتلف في المنطقة المحروقة (Alzubaidi & Gabbard ,2015).

تعد بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* هي الأكثر شيوعًا بين أنواع *Pseudomonas* وتمثل أعلى نسبة من العدوى بين المرضى في المستشفيات ، وخاصة المصابين بنقص المناعة المكتسبة ومرضى السرطان والمرضى الذين يعانون من الجروح والحروق (Bodey *et al.*,1983) .

تمتلك *Pseudomonas aeruginosa* القدرة على غزو أنسجة الجسم المختلفة وتعيش أيضًا في الدم (Sadikot *et al.*,2005)، مما يتسبب في تسمم الدم. يمكن عزل البكتيريا من البيئات المختلفة الرطبة مثل التربة والماء ومختلف الاوساط وتستطيع العيش والنمو على الانسجة النباتية والحيوانية وأيضا لها القابلية على النمو في الماء المقطر ما يدل احتياجاتها القليلة في التغذية وتلاحظ بصوره طبيعية كـ (Normal flora) في المجرى التنفسي والهضمي للإنسان(ابراهيم و انور 2007).

تم اختيار بكتيريا *P.aeruginosa* لانها منتشرة بصورة كبيرة و لها قابلية شديدة على اصابة مرضى الحروق ومقاومتها للمضادات الحيوية لذلك كانت اكثر الأنواع المعزولة من ردهات الحروق مما يسبب بإصابة المريض والذي من الممكن ان يؤدي باسوء الحالات الى فقدان حياته (Safaei *et al.*,2017).

بكتيريا الزائفة الزنجارية لها العديد من اليات الحماية والتي تمكنها من مقاومة مناعة الجسم وكذلك مقاومة المضادات الحيوية المختلفة ومن هذه الاليات هو الغشاء الحيوي Biofilm والذي يشكل الدرع البكتيري لمقاومة الجهاز المناعي للمضيف ومقاومه المضادات الحياتية و مقاومة المطهرات المختلفة ولذلك يساعد على تكوين بيئة افضل للبكتيريا (Moradali, *et al.*,2017).

استعملت النباتات الطبية لكونها منتجات طبيعية ومصدر جيد للعديد من المضادات الحياتية ويمكن التأكد من ذلك من خلال التحقق من فعاليتها حيث تحتوي هذه النباتات على مركبات مثل التانينات tannins ، التربينات terpenes ، الفلافونات flavonoids ، القلويدات alkaloids ، وايضا النباتات تكون خالية من الاثار الجانبية التي تتواجد في المضادات الحياتية والتي تسبب اثار جانبية وتؤثر علي الكلية والكبد واعضاء الجسم المختلفة (Anand *et al*.,2019) .

تعد الحشرات من النواقل الميكانيكية للبكتيريا المختلفة و لذلك فان وجدت بالقرب من الشخص المصاب فانها سوف تزيد من نسبة انتقال البكتيريا الملوثة للشخص المصاب (Foil, & Gorham,2004).

2-1 اهداف الدراسة Aim of study

1) عزل وتشخيص بكتريا *P. aeruginosa* من المرضى المصابين بالحروق.

2) الكشف عن قدرة البكتيريا على انتاج الغشاء الحيوي Biofilm.

3) دراسة حساسية بكتيريا *P.aeruginosa* المعزولة من مواقع مختلفة من مرضى الحروق للمستخلص المائي والكحولي لنبات الزعتر وقشور الرمان واوراق التيكوما والشيح .

4) الكشف عن المجاميع الكيميائية الفعالة في المستخلصات النباتية المستعملة .

5) دراسة قابلية البكتيريا للانتقال عن طريق حشرة الصرصر الألماني *Blattella germanica* والذباب *Musca domestica* والنمل المنزلي *Camponotus xerxes* .

الفصل الثاني

استعــراض المراجــع

Literature Review

2 - استعـراض المراجــع Literatures Review

1-2 الحرق Burn

الحرق عبارة عن إصابة في الجلد أو الأنسجة الأخرى ناتجة بشكل أساسي عن الحرارة أو بسبب الإشعاع أو النشاط الإشعاعي أو الكهربـاء أو الاحتكـاك أو التلامس مع المواد الكيميائيـة (Rosdahl & Kowalski.,2008) . حيث تعد الحروق موقعًا مناسبًا لتكـاثر البكتيريـا وهـي أكثـر مصـادر العدوى من الجروح الجراحية ، ويرجع ذلك أساسًا إلى ان منطقة الاصابة تكون اكبر والى كون المدة التـي يبقـى بهـا المريض في المستشفى تكون اكثر (Agnihotri *et al*., 2004) .

2-2 تصنيف الحروق Burns classification

تصنف الحروق على حسب شدتها و عدد الطبقات التي تأثرت من الجلد الى اربع انواع :

1-2-2 الحروق من الدرجة الاولى First degree burns

تؤثر فقط على طبقات الجلد السطحية Epidermis وتظهر علـى شكل منـاطق حمراء دون ظهور بثـور و يستمر الألم عـادة حـوالي ثلاثـة أيـام ، ويمكـن عـلاج الحـرق بواسـطة الغسل بمـاء فـاتر و وضـع كمادات باردة واستعمال ادوية لتخفيف الالم الناتج عن الحرق (Granger *et al*.,2009).

صورة 2-1 حرق من الدرجة الاولى (Kuan, *et al*.,2017)

2-2-2 الحروق من الدرجة الثانية Second degree burns

تصنف الحروق الى الدرجة الثانية عند تعرض كل من طبقة البشرة Epidermis وطبقة الادمة Dermis الى الحرق، حيث يسبب هذا النوع من الحرق تلف في الاوعية الدموية و الاعصاب و كذلك في بصيلات الشعر التي تغذي المنطقة ، ويكون هذا النوع اكثر الما من النوع الاول و يتميز باحمرار المنطقة و ظهور بثور بالوان تتراوح من الابيض الى الاحمر ، وقد يسبب هذا النوع من الحروق ندب عند الشفاء ،ويحتاج المصاب الى عناية في المراكز الصحية و يتم العلاج بواسطة استخدام مضادات حيوية للتخفيف من الاصابات المعدية التي تنتج في المنطقة (Rice & Orgill, 2021).

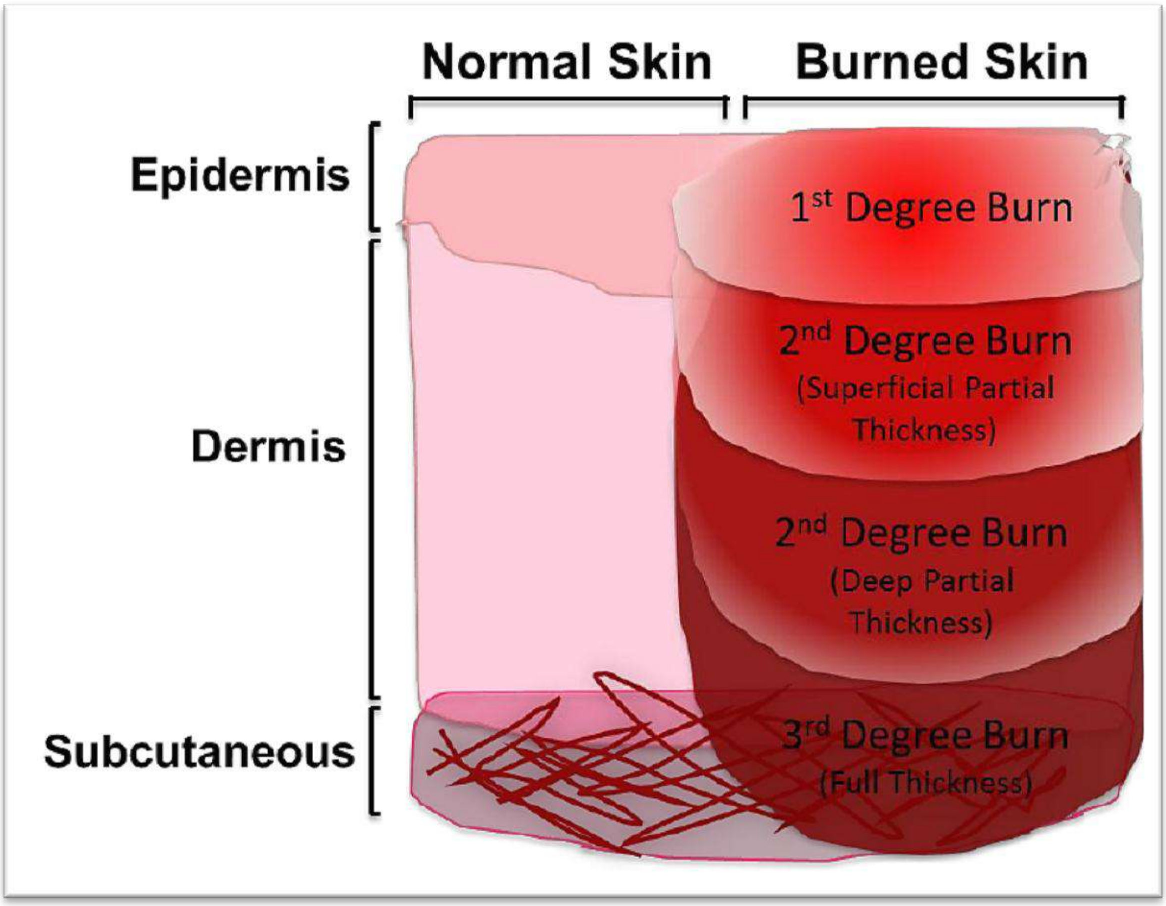
شكل 2-2 حرق من الدرجة الثانية (Kuan *et al*.,2017)

3-2-2 الحروق من الدرجة الثالثة Third degree burns

يمكن اعتبار الحرق من الدرجة الثالثة عندما تتلف جميع اجزاء الجلد بما فيه من اوعية واعصاب وغدد عرقية وبصيلات الشعر وحيث يمكن ان يصاب المريض بفقدان الشعور نتيجة لفقدان الاعصاب في المنطقة وقد يتطلب هذا النوع من الحرق تدخلا جراحيا وترقيعا للمنطقة المصابة بعد ازالة المناطق التالفة نتيجة الحرق (Durdu *et al* .,2012) .

4-2-2 الحروق من الدرجة الرابعة Fourth degree burns

تعد من اخطر انواع الحروق التي تصيب الجسم حيث تصيب جميع طبقات الجلد و تمتد الى الانسجة الداخلية كالعضلات و العظام و المفاصل و تؤدي الى تفحم المناطق المصابة مما يتوجب بترها ،وتعد من اصعب الانواع و ذات نسب وفيات عالية (Serrano *et al*., 2005).



شكل 2-3 الفرق بين انواع الحروق (Kuan, *et al*.,2017)

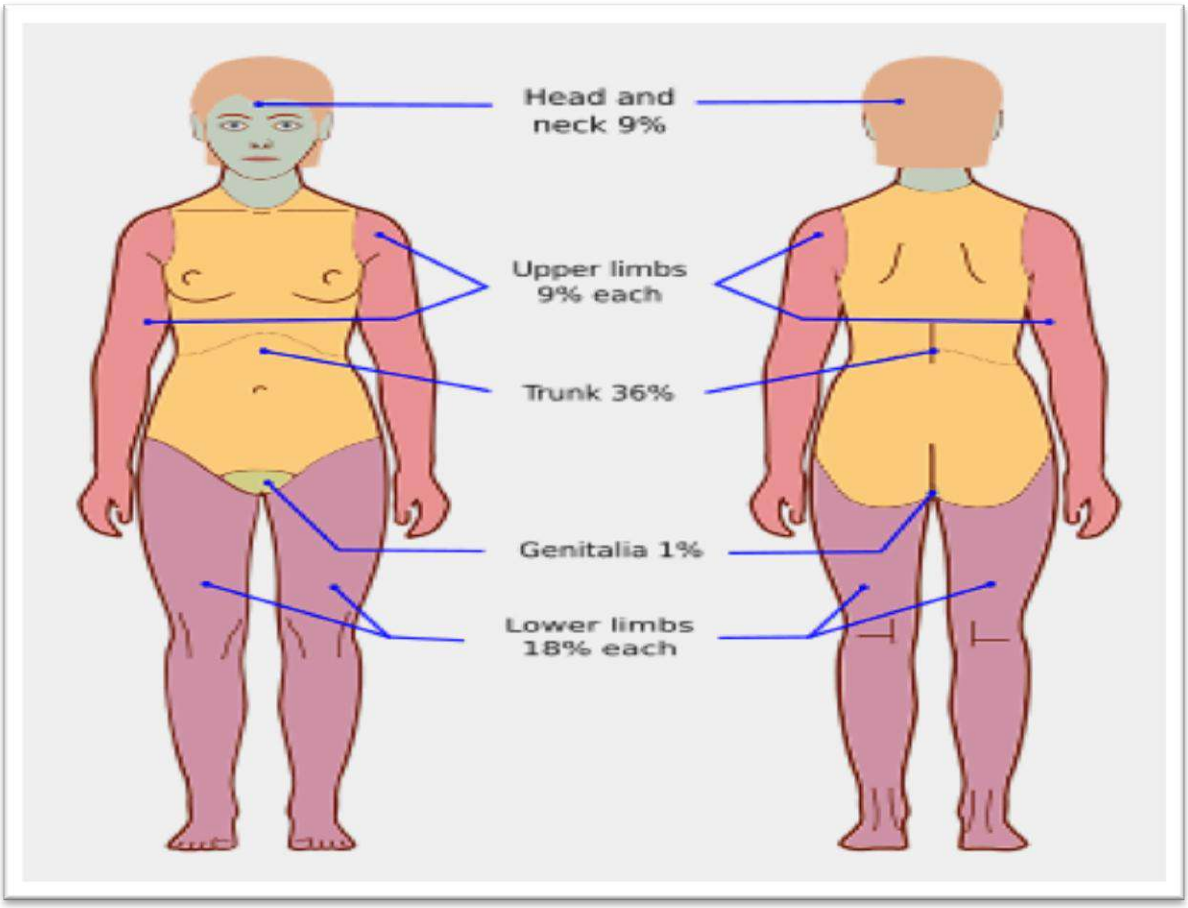
3-2 تقدير نسبة الحروق Burn rate estimation

ان الجلد يعد مصدر الدفاع الاول ضد الميكروبات و الجراثيم و لذلك عند تلف الجلد بواسطة الحروق يصبح بيئة مناسبة لنموها مما يؤدي الى مشاكل صحية و كذلك تأخر في نمو المنطقة المحروقة نتيجة لمخلفات و سموم الخلايا الجرثومية، لذلك من الضروري للغاية معرفة مساحة المنطقة المحروقة وكذلك تفيد في تقدير نسبة السوائل المفقودة عن طريق الجلد المحروق و ذلك لغرض تعويضها (Montagna, 2012).

يمكن تقدير نسبة حروق الجسم بعدة طرق:

أ- استخدام قاعدة التسع(Rule of Nines)(قانون التسعة لوالس):

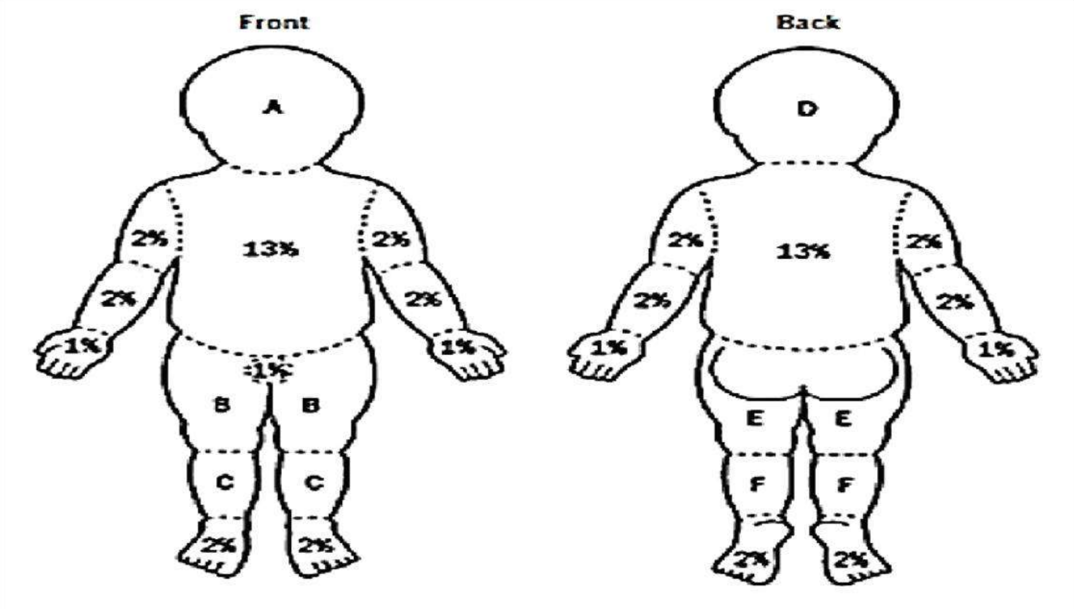
تستخدم هذه الطريقة لقياس مساحة السطح المتضرر من الجسم المحروق حيث يمثل الراس 9% وكل ذراع تمثل 9% و كل قدم تمثل 18% و الجذع الامامي و الخلفي 18% و منطقة العانه 1% (Wachtel *et al*, 2000).



شكل 2-4 مخطط التسع لوالس لقياس نسبة الحرق في الجسم (Hettiaratchy, & Papini., 2004)

ب- مخطط لوند و براودر (Lund and Browder chart)

تعد هذه الطريقة مناسبة للاطفال اكثر من البالغين وذلك لكون الاطفال لهم مساحات سطحية مختلفة عن البالغين، حيث الاطفال يتميزون باياد اطول من اطرافهم السفلية و كذلك تستخدم هذه الطريقة عندما يكون الحرق في سطح الجسم بصورة غير منتظمة (Woodson *et al*.,2018).



	By age in years			
Area	0	1	5	10
Head (A/D)	10%	9%	7%	6%
Thigh (B/E)	3%	3%	4%	5%
Leg (C/F)	2%	3%	3%	3%

شكل (2-5) مخطط لاوند- براند لتقدير الحروق في الاطفال (Laohapitakworn *et al*., 2021)

جـ- طريقة الكف :

حيث تبلغ مساحة كف الشخص المحروق حوالي 1٪ من الجسم. استخدم راحة يد الشخص لقياس مساحة سطح الجسم المحروقة، قد يكون من الصعب تقدير حجم الحرق بهذه الطريقة (Nagel & Schunk., 1997).

2-4 انواع الحروق Types of burns

تختلف انواع الحروق اعتماداً على نوع المسبب مثل الحرارة أو البرودة أو الكهرباء أو المواد الكيميائية أو الاحتكاك أو الأشعة (مثل حروق الشمس) (Herndon ,2012).

أ-الحروق الحرارية : هو نوع من الحروق الناتجة عن التلامس مع الأشياء الساخنة، مثل النار، الاجسام الساخنة، الماء المغلي، بخار الماء المغلي، الزيت الساخن.

ب- الحروق الكيمائية : تحدث الحروق الكيماوية بسبب مواد عديدة مثل الأحماض و القواعد القوية والمواد الكيمائية المختلفة .

جـ- الحروق الكهربائية :التي تنتج عند التعرض للتيار الكهربائي او اصابات البرق .

د- حروق الاشعاع : وتحدث بسبب التعرض إلى أشعة الشمسٌ لفترات طويلة أو الأشعة السينِّية أو بسبب العلاج الإشعاعي لمرضى السرطان.

هـ- حروق الاحتكاك : هو شكل من أشكال الحروق الناتجة عن احتكاك الجلد بسطحٍ ما قد يشار أيضًا إلى حرق الاحتكاك بالسلخ أو الاهتراء وقد يسمى نسبة إلى السطح يولد هذا الاحتكاك الحرارة لذلك قد تؤدي حالات الاحتكاك الشديدة إلى حرق حقيقي للطبقات الخارجية من الجلد.

5-2 البكتيريا المرافقة للحروق Bacteria associated with burns

يعد تلوث الحروق بأنواع البكتيريا المختلفة من المشاكل الخطيرة التي تصيب المريض و التي تودي الى ارتفاع نسب الوفيات لمرضى الحروق ، اذ ان الحرق يؤدي الى تلف الجلد و الذي يعد الخط الدفاعي الاول ضد الجراثيم المختلفة و بذلك يصبح لها القابلية على النمو وانشاء مستعمرات كما ان لبعض الانواع القدرة على افراز سموم مما يؤدي الى تدهور الحالة الصحية للمريض و بطئ في علاج المنطقة المصابة (McVay *et al* .,2007).

وتعد البكتيريا السالبة لصبغة جرام من المسببات في أشد حالات الالتهاب في مرضى الحروق من بين هذه الكائنات الدقيقة ، وان الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* هي المصدر الأكثر شيوعًا لعدوى الجروح المزمنة أو الحادة (Branski *et al*.,2009).

كما ان للبكتيريا القابلية على العيش و التكاثر في المجرى الدموي اذ تسبب في حالات تجرثم الدم الاولي (primary bacteremia)،كما ممكن ان تسبب تجرثم الدم الثانوي عند ظهور اعراض الاصابة (secondary bacteremia) ، وانها تسبب انتان الدم septicemia عندما يحصل فشل جهازي في اعضاء الجسم الداخلية نتيجة لسموم البكتيريا (Micek *et al*.,2005).

6-2 الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa*

الزائفة الزنجارية هي بكتيريا عصوية سالبة لصبغة كرام يتراوح طولها من 1.5-3.0 وعرضها من 0.5 الى 0.8 ماكروميتر(Todar,2004)، تكون الزوائف الزنجارية غير مكونة للسبورات و تكون متحركة اما بولاسطة سوط او بواسطة الشعيرات البكتيرية و التي تتواجد بالعادة على احد اطراف البكتيريا(Collee *et al*.,1996) . يمكن ان تتواجد البكتيريا بشكل مفردة او على شكل ازواج كما لها القابلية على تكوين مستعمرات بكتيرية، تكون المستعمرات البكتيرية مسطحة ملونة بالاخضر و غير منتظمة الحواف وتنتشر مع الوقت على سطح الوسط الزرعي ،كما ان لأغلبها القابلية على انتاج صبغة خضراء مزرقة (Pyocyanin) تظهر بوضوح عند الزراعة باوساط الزراعة البعض الاخر يستطيع افراز صبغات حمراء (pyorubin) او خضراء (pyoverdin) ونادراً ما تفرز صبغات سوداء وعند

نمو الزوائف الزنجارية فانها تعطي رائحة مميزة تشبه رائحة الفاكهة المتعفنة وذلك لانتاجها امينواستون من التافرون(Carroll *et al*.,2015) .

يمكن ان تنمو الزوائف الزنجارية بأقل تغذية ممكنة حيث لوحظ أن لها القابلية على النمو حتى في الماء المقطر و الذي يحتوي على مواد تغذية بسيطة ولذلك هي تنمو بسهولة على اي وسط زرعي كما ان لبعض الانواع القدرة على النمو في وسط الدم و لها القدرة على تحليله ، وللبكتريا القابلية على تحمل الظروف البيئية المختلفة من ارتفاع و انخفاض في درجات الحرارة حيث أنها يمكن ان تعيش في ظروف من (4 الى 42) درجة سليزية ولكنها تفضل 37 درجة كما انها تحب الاوساط ذات الحامضية المعتدلة (7.7-7.4) (Todar, 2004).

1-6-2 تصنيف البكتيريا Classification of Bacteria

يكون تصنيف البكتيريا بالشكل التالي حسب (Kahlon,2016) .

kingdom : Bacteria

phylum : proteobacteria

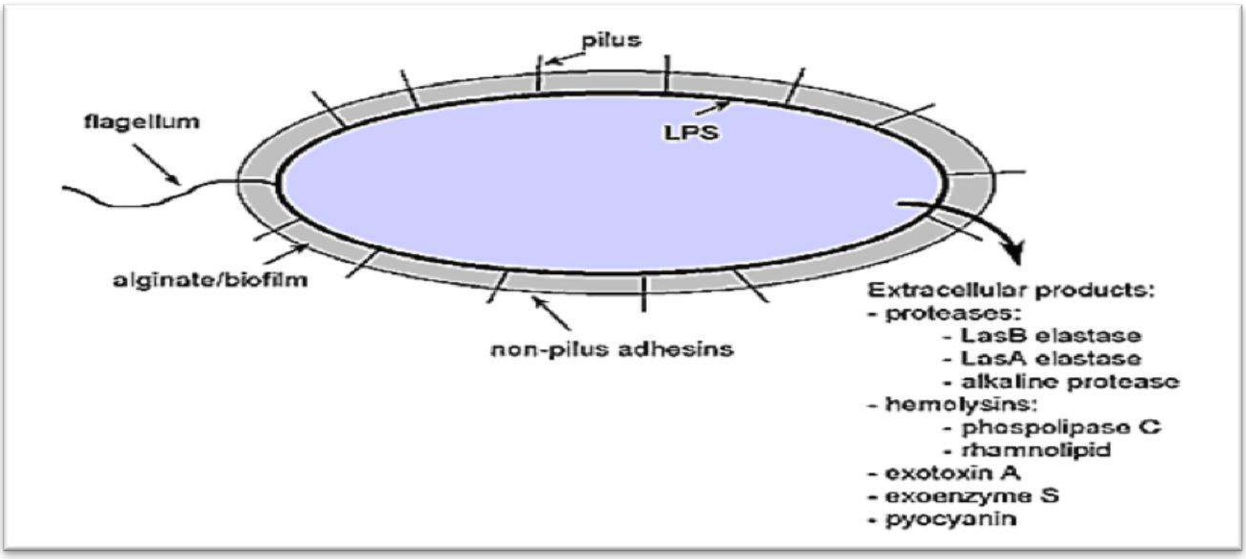
Class : Gamma proteobacteria

Order : Pseudomonadales

Family : pseudomonadaceae

Genus : Pseudomonas

Species: aeruginosa



شكل 2-6 تركيب بكتيريا الزوائف الزنجارية مع عوامل ضراوتها (Van Delden & Iglewski, 1998)

2-6-2 الامراضية Pathogenicity

تكون الزوائف الزنجارية *P.aeruginosa* ذات طبيعة انتهازية حيث انها نادراً ما تصيب الاشخاص السليمين ،وفي معظم حالات الاصابة يكون هناك فقدان للطبقة الواقية (الجلد او الطبقة المخاطية من النسيج) أو نتيجة لإصابة الاشخاص بأمراض تسبب نقصان المناعة، حيث أنها تصيب بالعادة الجهاز التنفسي و البولي و مصابي الحروق (Mena& Gerba,2009) كما ان قابليتها على العيش في الظروف المختلفة و تحملها للعديد من المضادات الحيوية ساعدها على الاستيطان في الجروح المختلفة و خاصة بعد العمليات الجراحية و ممكن ان يؤدي الى الوفاة عن طريق الاصابة بالانتان الجهازي Systemic sepsis (Hashimoto *et al*.,2009).

3-6-2 عوامل الضراوة Virulence factors

تمتلك الـ *Pseudomonas aeruginosa* العديد من عوامل الضراوة والذي يجعلها تستوطن في جسم المضيف مسببة الحالة المرضية وهذه العوامل تشمل الغشاء الحيوي Biofilm والاهلاب Pili والانزيمات Enzyme المحللة لكل من البروتين Protease والدهون Lipase والليفين Fibrin و اللسثين Lecithin و DNA ase بالاضافة الى انزيم الفوسفتيز Phosphatase .

أ- الغشاء الحيوي Biofilm :

يتكون الغشاء الحيوي من اتحاد بين خلايا الكائنات الحية الدقيقة تلتصق فيه الخلايا ببعضها البعض وغالبًا ما يحدث على السطح المختلفة (López *et al*.,2010) ويتراوح سمك الغشاء من 13- 6 ماكروميتر ويعتمد تكوين هذا السمك على قابلية الغشاء على الانفصال والتجديد وتحدث عملية تكوين الغشاء على عدة مراحل :

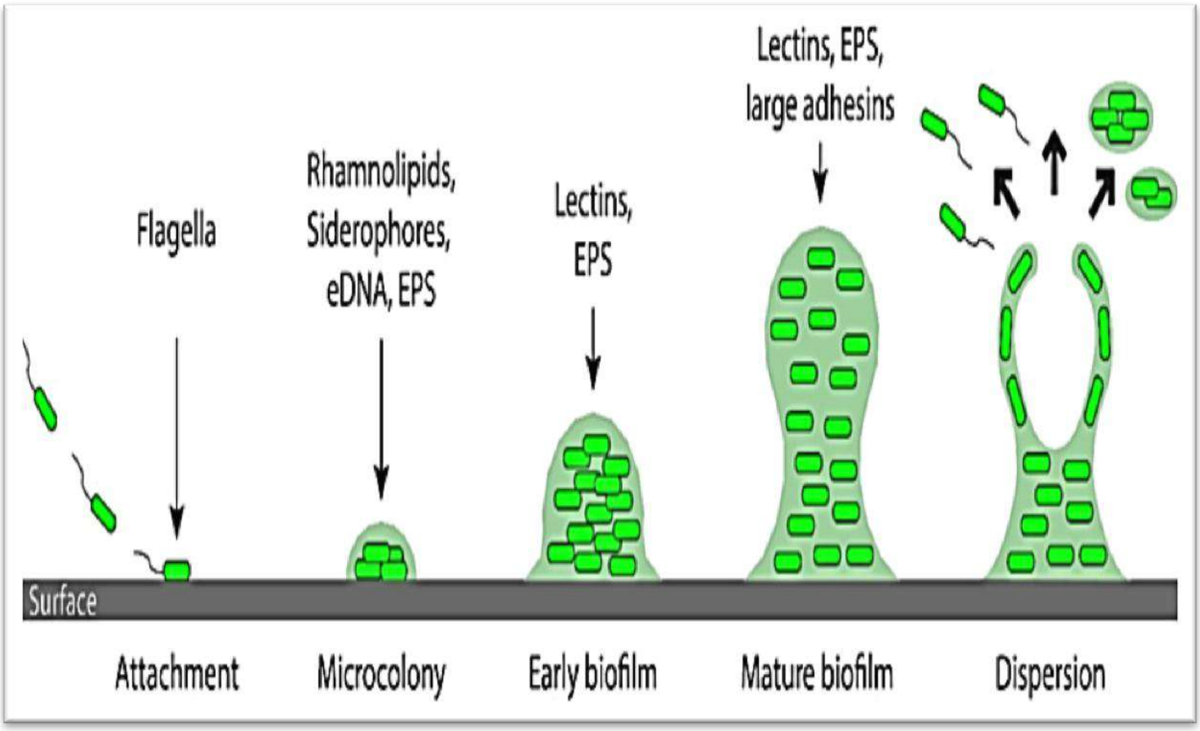
1- مرحلة التصاق الخلايا البكترية على الاسطح (الالتصاق العكسي reversible attachment) والتي تتم بواسطة الاسواط flagella وبعض العوامل الكيميائية.
2- مرحلة ثبات الخلايا وتقليل استطالتها ويعرف بالالتصاق غير العكسي irreversible attachment ويتم بواسطة الاهلاب Pili .
3- مرحلة تجمع والتصاق الخلايا على الاسطح وفيها يتم تكوين المادة خارج الخلوية External matrix اذ يتم انتاج السكريات المتعددة التي تساعد في التصاق الخلايا وتتكون هذه المادة من السيليلوز cellulose ومتعدد الكلوكوز الاميني Polyglucosamine اضافة الى الاحماض النووية والبروتينات.

4- تكوين مستعمرات بكتيرية داخل المغذيات والماء والنواتج الايضية.

5- مرحلة نضج الغشاء الحيوي maturation وانفصاله deattachment ليبدأ العملية مرة اخرى (Ryder *et al*.,2007).

تشكل الخلايا البكتيرية بما نسبته 10-20 % من حجم الغشاء الحيوي اما الباقي فيتكون من طبقات من متعددة السكريات ، ويكون الغشاء الحياتي محبا للماء حيث يعمل الماء على اسناده حيث توجد قناة او شبكة من الاقنية مملوءة بالماء ويتم نقل المواد المغذية الى الخلايا عن طريق الانتشار الجزئي في الوسط المائي (Greenman *et al*.,2021).

يتكون الغشاء الحيوي من البوليمر و الذي يحيط بالخلايا البكتيرية و الذي يعمل على حمايتها من الظروف الخارجية كما يمكن ان يتكون من نوع واحد او عدة انواع من الخلايا البكتيرية ، اذ ان لهذا الغشاء القدرة على حماية الخلايا من الجفاف ودرجات الحرارة ، واختلاف الـ pHويجعلها مقاومة للمضادات الحيوية ويقيها من البلعمة بواسطة الخلايا المناعية ، ويكون الغشاء الحيوي الذي تنتجه الزوائف الزنجارية مسبباً لامراض مزمنة مثل التهاب الاقنية البولية المزمن والتليف الكيسي cystic fibrosis (Limoli *et al*., 2015).



شكل 2-7 مراحل تكون الغشاء الحيوي biofilm في بكتيريا *P.aeruginosa* (Silva *et al*., 2017)

ب – الاهلاب Pili :

وهي عباره عن تراكيب خيطية حلزونية تكون منتشرة على سطح البكتريا و تكون من بوليمر متجانس البناء و تتكون من بروتين البلين piline و تساعد هذه الاهلاب على الالتصاق بالطبقة الطلائية للمضيف ، كما يتواجد على سطح الخلية البكتيرية الاهلاب الجنسية و التي تكون وظيفتها نقل المادة الوراثية من خلية بكتيرية الى اخرى خلال عملية الاقتران (Kahlon.,2016).

جـ- الاسواط Flagella :

وهي عبارة عن تركيب سوطي يتواجد عند حافة الخلايا وتكون مسؤولة عن الحركة في البكتيريا (Crnelis.,2008).

د- الانزيمات المفرزة خارج الخلية The extra celluler enzymes

وهي عبارة عن انزيمات متعددة تفرز بواسطة الخلية البكترية لاغراض مختلفة كتحليل البروتينات والدهون.

1- **إنزيم الكاتاليز Catalase** : يفرز من الخلايا البكتيرية حيث يعمل على تحليل بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 وذلك لغرض تقليل تأثيره الضار على الخلايا البكتيرية (Su *et al*.,2014).
2- **إنزيما الإلاستيز والبروتيز Elastase and protease enzymes :** يعمل هذان الانزيمان بشكل مباشر على الاوعية الدموية التي تكون قريبة على مناطق الاصابة البكتيرية حيث يعملان على زيادة نضوحية الاوعية الدموية وزيادة التغذية للمنطقة وذلك لغرض زيادة تغذية البكتريا (Camberlein, 2022).
3- **الإنزيم المحطم للدهون The lipase enzyme:** ينتج من الخلايا البكترية و يعمل على تحطيم الدهون المتواجدة في منطقة الاصابة و يساهم هذا الانزيم في تآكل الطبقات الخلوية للمنطقة المتأثرة حيث يعمل على اختراقها وخصوصا في حالات الحروق والتهابات الجلد (Mohebrad *et al*.,2022) .
4- **انزيم اللاسثنيز The Lecithinase enzyme**: يعمل هذا الانزيم على تحطيم الغلاف الخلوي حيث ان التركيب الكيمائي لهذا الانزيم يتكون من فوسفولبد ويعمل على تحرير الفسفور والكولين من خلايا المضيف ، وبهذا يساعد هذا الانزيم على تحطيم الخلايا و يزيد من الاذى الناتج في المنطقة المصابة (Rabelo *et al* .,2021).

هـ - السموم الخارجية Exotoxin

1- السموم الخارجية أ Exotoxin A:

يوجد هذا الإنزيم في أغلب بكتيريا الزائفة الزنجارية والتي تسبب إصابات مرضية ، حيث يعمل هذا السم على إختزال ADP-ribosylation وتثبيط عامل الاطالة elongation factor 2 ، مما يؤدي الى تثبيط عملية صنع البروتين و موت الخلايا ، ثم بعد ان تموت خلايا المنطقة تعمل البكتيريا على احتلالها ، كما وجد ان هذا النوع من السموم يعد من اهم عوامل الضراوة لبكتيريا الـ *P. aeruginosa* (Van *et al*.,1998). كما انها قابلة للتحلل بالحرارة و أيضا لا تؤثر على البكتيريا من نفس النوع (Anwer & Husien, 2007).

2- السموم الخارجية س Exoenzyme S:

يتم إنتاج Exoenzyme S بواسطة البكتيريا التي تنمو في الأنسجة المحترقة ويمكن إكتشاف هذا السم في الدم قبل وصول البكتيريا اليه ، تم اكتشاف أن Exoenzyme S يعمل على إضعاف وظيفة الخلايا البلعمية في مجرى الدم والأعضاء الداخلية و ذلك لغرض التحضير لغزو *P. aeruginosa* (Rocha *et al*.,2003).

3- السموم المحللة لكريات الدم البيض leukocidin :

تنتج بعض سلالات *P.aeruginosa* بروتينًا قاتلاً لكريات الدم البيض leukocidin ، والذي يحلل الكريات البيض من العديد من الأنواع بما في ذلك الانسان ولكنه لا يحلل كريات الدم الحمراء ، يضر هذا leukocidin الخلايا البلعمية والخلايا الدفاعية للانسجة المختلفة وهو شديد السمية للفئران (Diggle & Whiteley, 2020).

4- السموم المحللة لخلايا الدم الحمر Haemolysin – Toxins:

تكون فعالية تحطيم الدم في خلايا الزائفة الزنجارية تعتمد على عاملين هما phospholipase C و rhamnolipid ، و اللذان ينتجان بواسطة البكتيريا حيث يعملان على تحطم الدهون و اللكتين الذي يتكون منه غلاف الخلايا الدموية مما يسبب في تلفها (Savić-Radovanović *et al*.,2021).

و – السموم الداخلية Endotoxin:

وتكون هذه السموم احدى مركبات الغلاف الخلوي للخلية البكتيرية و التي تنتج بعد موتها و تحلل الغلاف الخلوي و يتكون من السكريات الدهنية المتعددة lipopolyscride وتؤدي خروج هذه السموم الى انخفاض شديد بضغط الدم و ارتفاع في درجة الحرارة كما انها تؤثر على عملية البلعمة للخلايا البكتيرية الاخرى (Jesus *et al*.,2021).السموم الداخلية اكثر مقاومة للحرارة من السموم الخارجية حيث تقاوم درجات الحرارة العالية (Soltani *et al*.,2018).

ي-العوامل الخلوية الخارجية :

البايوسيانين Pyocyanin : وهو عبارة عن بروتين ينتج من الزوائف الزنجارية و له القابلية على التقليل من نمو الانواع الاخرى من البكتيريا و لذلك يكون مفيد في دراسة السلالات المختلفة (Diggle & Whiteley, 2020) ، والبايوسيانين صبغة بلون أخضر مزرق و يعتقد بأنها المسؤولة عن التأثير بالخلايا البلعمية (Todar,2015).

2-6-4 الية مقاومة بكتيريا *P. aeruginosa* للمضادات الحيوية:

تمتلك بكتيريا الزوائف الزنجارية العديد من الآليات لتقليل تأثير المضادات الحيوية ، منها إفراز إنزيمات محللة للمضادات الحيوية مثل: إنزيمات β-lactamases أو بطرق غير إنزيمية مثل آلية الدفق الخارجي متعددة العقاقير (Multi Drug Efflux Pump) أو آلية نفاذية الغشاء الخارجي للبكتيريا(Munita, & Arias, 2016)

2-6-4-1-تقليل نفاذية الغشاء الخارجي Low Permeability of Outer Membrane

يحاط السطح الخارجي لبكتيريا *P.aeruginosa* بغلاف سالب لصبغة غرام ويحتوي هذا الغشاء على ثقوب بروتينية تعرف باسم الـ Porins والتي تكون وظيفتها نقل المواد لإحتوائها قنوات مملوءة بالماء متخصصة في التبادل غير الفعال للأيونات والجزيئات المحبة للماء . تكون هذه الثقوب البروتينية في الزائفة الزنجارية من نوع OprM والذي يكون عبارة عن بروتين دهني الذي يتولى تكوين مسار انتشار المركبات المختلفة خلال الغشاء الخارجي ، وإنّ فرط التعبير عن هذا البروتين أو حدوث تغيير في مواقع هذه الفتحات يرتبط مع المقاومة للمضادات الحيوية مثل Tetracycline،Chloramphenicol، Quinolones (Wang *et al*., 2007; Ziha *et al*., 1999). كما تمتاز *P.aeruginosa* بامتلاكها غشاءاً خارجياً ذو نفاذية أوطأ (10-100) مرة من بقية أنواع البكتريا السالبة لصبغة غرام الأخرى مثل

E.coli، وهذه الميزة الفريدة في غشاء هذه البكتيريا تبطيء انتشار المضادات الحيوية من خلاله وبدرجة كبيرة جداً (Carsenti-Etesse *et al.*, 2002) .

2-4-6-2 مضخات الدفق Efflux-Pump

تكون الزوائف الزنجارية ذات مقاومة متعددة لمضادات الحياة تعود غالباً لنفاذية غشائها المنخفضة، ولوظيفة مضخات الدفق الخارجي متعددة العقاقير(Multi Drugs Efflux Pumps) تعرف مضخات الدفق بأنها معقدات بروتينية توجد في الاغشية السايتوبلازمية للخلايا البكتيرية وتؤدي في دفق المواد الضارة من داخل الخلية الى خارجها، ونظراً لاختلاف اشكالها وتراكيبها وتخصصها الوظيفي تكون المضخات ذات انتقائية عالية للمواد التي تطرحها للخارج فمثلا يختص بعضها بضخ مضاداً حيوياً واحداً دون غيره من المضادات الحيوية، وهذا يفسر مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية (Webber, 2002) ، إذ تمتلك هذه البكتريا أربعة عناقيد Operons تشفر لنواقل مضخات متعددة العقاقير (Strateva and Yordanov, 2009) (MexA MexB OPrM) (MexX MexY- OPrM) وهذه الآليات تعمل سوية مع عدة عوامل تنظيمية مهمة مثل MexR, NalB, NfxB, NfxC, MexT, MexZ وذلك للسيطرة على مستوى تعبيرهذه الجينات (Picao *et al.*, 2009) . تقسم مضخات الدفق الى خمسة عوائل تبعاً لتسلسل احماضها الامينية ومصدر الطاقة وصفاتها التركيبية Pool (2007) وهي:

a. Resistance Nodulation Cell Division Family (RND).

b. Major Facilitator Super Family (MFS).

c. Small Multidrug Resistance Family (SMR). d. Multidrug and Toxic Efflux Family(MATE).

e. ATP-Binding Cassete Family (ABC).

تعتمد مضخات الدفق الاربعة الاولى على القوة الدافعة للبروتونات كمصدر للطاقة اما العائلة الاخيرة فتعتمد على التحلل المائي لجزيئة ATP ،ومن انظمة الدفق التي تمتلكها بكتيريا*P.aeruginosa* التي تعمل على مقاومة مضادات البيتالاكتام β- lactams و الكينولونات Quinolones و التتراسيكلينات Tetracyclineو الماكروليدات Macrolides و الترايميثوبريم Trimethoprim من خلال ضخها خارج الخلية بينما (oprM-XY Mex) (Mex AB-oprM) (Kiser *et al.*, 2010) هو المسؤول عن مقاومة بكتيريا *P.aeruginosa* لمضادات الامينوكلايكوسيدات Aminoglycosides ، إذ اشارت الدراسات أن التعرض المستمر للبكتيريا لهذه المجموعة من المضادات يحفز لديها المقاومة عن طريق هذا النظام (Morita *et al.*,2014) تتمثل مقاومة بكتيريا *P.aeruginosa* لمضادات الكينولونات من خلال حدوث طفرات كروموسومية في إنزيم

(Morita *et al*., 2014) Topoisomerase/ DNA gyrase إنّ أنظمة الضخ هذه تمتلك تخصص لأنواع مختلفة من المادة الأساس ، وقد تم عزل الكثير من مضخات الدفق من العينات السريرية، إذ إنّ وجود هذه المضخات إمّا أن يكون جوهرياً أصيلاً أو بالإنتاج الفائق المتسبب عن الطفرات الوراثية .(Wang *et al*., 2007)

3-4-6-2 تقليل استهداف البروتينات الرابطة للبنسيلين

إنّ مكونات جدار الخلية البكتيرية تمثل أهدافاً إنتقائية ممتازة لمضادات البيتالاكتام ، ولكنّ ظهور طفرات وراثية في إنتاج إنزيمات PBPs ممكن أن ينتج عنه تقليل الإلفة تجاه المضاد الحيوي ، إضافة إلى أنّ آلية المقاومة هذه تكون مرتفعة في أعداد مهمة سريرياً من البكتريا السالبة والموجبة لصبغة غرام (Fisher *et al*., 2016).اذ مكّنت هذه الآلية البكتريا من تطوير مقاومتها لعدة أنواع من مضادات الحياة ، إذ إنّ حدوث طفرة جينية مفردة يمكن أن يؤدي إلى تغيير موقع الهدف بصورة كاملة ، ومن ثم تنخفض إلفة المضاد لهذا الموقع، فعلى سبيل المثال تقوم بقية أدنين مفردة (Single adenine residue) في موقع على رايبوسوم البكتيريا بخفض إلفة جميع العقاقير التي تقع ضمن صنف الأرثرومايسين تجاه الهدف في الخلية البكتيرية (Munita, & Arias., 2016). إنّ التغير الكبير في سلالات . *P. aeruginosa* الطافرة والناتج عن حصول خلل أوعيب في جين معين، تكون نسبته أعلى 100 مرة من التغير التلقائي، وهذا يؤدي إلى سهولة توليد نسخ بمستويات متزايدة من المقاومة لمختلف المضادات الحيوية، وهذه التغيرات ممكن أن تعطل عدداً كبيراً من الجينات التنظيمية المسيطرة على وظيفة نفاذية الغشاء ومضخات الدفق (Pang *et al*.,2019).

4-4-6-2 التحلل المائي للمضادات الحيوية بواسطة إنزيمات البيتالاكتاميز

Antibiotic Hydrolyses by ß-Lactamases

تمتلك الكثير من المضادات الحيوية أواصر كيمياوية حساسة لها قابلية على التحلل المائي، مثل أواصر الإستر والأمايد وقد عرف الكثير من الإنزيمات التي لها القابلية على استهداف وكسر هذه الأواصر، ومنها إنزيمات β-lactamases التي صُنفت إلى مجموعات إعتماداً على الركيزة التي تعمل عليها، أو مواقع جيناتها التي قد تحمل على DNA البلازميدي أو DNA الكروموسومي ، إذ تعمل هذه الإنزيمات على مجموعة مضادات β-lactam ، وهناك نوع آخر من الإنزيمات المسماة Cephalosporinases التي تحمل صفاتها على الكروموسوم ، تنتج هذه الإنزيمات من أنواع البكتريا السالبة والموجبة لصبغة غرام (Picao et al., 2009) وقد أمكن إنزيمات β-lactamases من تتبع الأثر الوبائي لبكتريا *P. aeruginosa* كما تم تحسين العلاج بالعقار من خلال إضافة حامض الكلافيولينك مع مضاد

السيفالوسبورين لتثبيط عمل إنزيمات β-lactamases وتُعدّ هذه الآلية من آليات المقاومة المهمة لدى سلالات *P. aeruginosa* إذ تم اكتشاف وجود هذه الإنزيمات وبشكل متزايد يوماً بعد آخر (Bellés *et al* .,2017).

7-2 إستعمال النباتات للعلاج من الامراض:

سخر الانسان النباتات منذ قديم الزمان لفائدته حيث اعتمدت ثمار النباتات كمصدر للطاقة كما أن هناك العديد من النباتات على مر التاريخ استعملت كدواء لعلاج العديد من الامراض المختلفة وذلك لاحتوائها على المضادات الحياتية ومضادات الاكسدة المختلفة (Upadhyay *et al* .,2014).

تُستعمل المواد النباتية بشكل شائع في الطب التقليدي (طب الاعشاب) حيث تكون متاحة لعلاج العدوى المختلفة في العديد من السكان في العالم النامي ، كما هو الحال في بعض البلدان في آسيا وأفريقيا ،حيث يعتمد 80٪ من السكان على طب الاعشاب التقليدي (Schwikkard & van Heerden., 2002).

1-7-2 نبات الزعتر *Thymus vulgaris L.*

هو جنس من حوالي 350 نوعًا من النباتات العشبية المعمرة العطرية والشجيرات الفرعية التي يصل ارتفاعها إلى 40 سم ، موطنها أوروبا وشمال إفريقيا وآسيا عدد من الأنواع لها أنماط كيميائية مختلفة تميل السيقان إلى أن تكون ضيقة أو حتى سلكية ، الأوراق دائمة الخضرة في معظم الأنواع ، مرتبة في أزواج متقابلة ، بيضاوية ، كاملة ، وصغيرة ، بطول يتراوح من أربعة إلى 20 ملم ، تميل الأوراق إلى الالتفاف إلى الداخل ،والزهور الصغيرة في نهاية رؤوس النبات ويكون ذا نهاية كثيفة (Yousef & El-Khai, 2014)

1-1-7-2 تصنيف نبات الزعتر

Family : labiatae

Genus : Thymus

Species:vulgaris L.

(Rota *et al*.. 2008).

2-7-1-2 الأهمية الطبية لنبات الزعتر

تستعمل أنواع الزعتر المختلفة في الطهي والطب والزينة ويشتهر الزعتر بأنه عشب يستخدم لمجموعة متنوعة من أطباق اللحوم والدواجن والأسماك والحساء والصلصات والخضروات يستخدم الزيت العطري ، الذي له خصائص مطهرة ومخدرة ، لعدد من الأغراض الطبية ، كما يضاف إلى العطور ومعجون الأسنان (Gonçalve *et al.*,2017).

صورة 2-8 نبات الزعتر في الطبيعة (Fleming,1998)

يُزرع الزعتر في فصل الربيع، وينمو بعد ذلك على أنه نبات معمرو يمكن بذره عن طريق البذور أو عن طريق الاقلام أو تقسيم أجزاء الجذور للنبات كما يمكن للنبات ان يتحمل ظروف الجفاف بطريقة جيدة (Fleming,1998) . يحتوي الزعتر على الفيتامينات المختلفة مثل فيتامين A و فيتامين C و فيتامين B وفيتامين K والفوليك اسد (Folic acid) ولذلك فهو يلعب دورا مهما في مقاومة الجسم للأمراض وزيادة مناعة الجسم (Dauqan & Abdullah,2017) ، للزعتر تاريخ طويل من استخدامه في الطب لعلاج أمراض مختلفة على سبيل المثال لعلاج أمراض الجهاز التنفسي (السعال الديكي والتهاب الشعب الهوائية والربو) حيث يستخدم على شكل شاي شراب أو عن طريق استنشاق البخار (Javed *et al.*,2013). كما أنه يستخدم لمنع تصلب الشرايين وعلاج وجع الأسنان والتهاب المسالك البولية وعسر الهضم (Hashim & Gamil, 1988).

كما أن للزعتر القابلية على طرد الفطريات من المعدة والأمعاء وله القدرة على زيادة الشهية لما له من عنصر هام وهو الثيمول الذي له القدرة على قتل البكتيريا والطفيليات، كما يعمل الزعتر على زيادة

النشاط في حالة القلق مما جعلها علاجًا للضعف الجسدي والعقلي بالإضافة إلى تقليل الأرق ، كما له العديد من التأثيرات الاخرى ، مثل مضادات التشنج ومبيدات الجراثيم والمطهرات ومضادات الأكسدة وخصائص طاردة للديدان وقد أوصي به مؤخرًا كبديل لعامل الوقاية من السرطان (Dauqan & Abdullah.,2017).

2-7-1-3 المركبات الفعالة في نبات الزعتر

إن أهم المواد الفعالة الموجودة في الزعتر هي مادة الثايمول ($C_{10}H_{14}O$) حيث تم تاكيد فعاليتها ضد البكتيريا المعوية و بكتيريا الكوكسيد، كما تم إثبات أن الثايمول يحسن من وظائف الكبد و يحفز الشهية و يعالج التهاب المفاصل و التهابات الحنجرة و المجاري التنفسية و المجاري البولية و التهاب القصبات ، وعند وضع مستخلص الزعتر على الجلد فانه يقلل من آلآم قرص الحشرات و الحكة و يعالج التهابات الجلد (Prasanth Reddy *et al* .,2014). يكون الزعتر غني بمواد مثل الثايمول ، الكارفيكول ، النيول ، البورونول مما يجعل منه مادة فعالة ضد الأحياء المكونة للأغشية الحيوية لبعض مسببات الأمراض التي تنتقل عن طريق الأغذية والكائنات الدقيقة و التي تسبب تلف الأغذية عن طريق تعطيل غشاء الخلية الميكروبية ومنها *Bacillus cereus, B. subtilis* *Clostridium perfringens, Enterococcus faecalis, E. faecium, E. coli, L. monocytogenes, P. aeruginosa*, P. *fluorescens, Salmonella enterica, S. typhi, Shigella flexneri, S. sonnei, S. aureus, S. epidermidis*, mycotoxin-producing moulds (*Aspergillus flavus, A. versicolor*) Martins *et al*., 2015; Ulbin-Figlewicz *et al*., 2013).

2-7-2 نبات الرمان *Punica granatum*

يصنف الرمان ضمن العائلة الخثرية Lythraceae وهذه العائلة تحوي جنسا واحدا هو *Punica* L. الذي يضم نوعين: *Punica protopunica* و *Punica granatum* (Lawrence,1951) وعلى هذا الأساس يكون

2-7-2-1 تصنيف نبات الرمان

Family :Lythraceae

Genus *:punica*

Species *:Punica granatum* L.

والنوع السائد في العراق هو *Punica granatum* , يتراوح إرتفاع أشجار الرمان بين (6-10) أمتار ، أوراقها كاملة رمحيـــة متقابلة على الأفرع وذات حافات مستويـــة (Lawrence,1951) صورة (2-9) يعتقد أن الموطن الاصلي هو بلاد فارس ومنه إنتقل إلى البلدان العربية وشمال أفريقيا وشمال غرب الهند ونقله العرب إلى أسبانيا ومنه إلى المكسيك وبصورة عامة يزرع الرمان بشكل واسع في المناطق الاستوائية وشبه الاستوائية من العالم ، إذ تنتشر زراعته الآن على نطاق واسع في كل من اسبانيا وايطاليا وقبرص والمملكة العربية السعودية والعراق وسوريا ولبنان ومصر وبعض الولايات الجنوبية في أمريكا (النعيمي وحنا،1980) ،يزرع الرمان في العراق في المناطق الشمالية والمناطق السهلية كما يزرع في محافظات كربلاء وديالى وبغداد والبصرة.

صورة 2-9 نبات الرمان (Desai *et al*.,2020)

2-2-7-2 الأهمية الطبية لنبات الرمان

تستعمل ثمار الرمان للأغراض الصيدلانية وفي الطب والدباغة (Chakravarty, 1976) وقد ثبت بأن قشوره تحتوي على مادة قابضة تستعمل في حالات الإسهال وتنفع عصارة حبه في معالجة قروح الفم ووجع الأذن والمعدة ومن قشوره فصلت بعض القلويدات المهمة التي تستعمل في علاج الديدان الشريطية (حسين ،1979).

ذكر زمزم (1985) بأن للرمان فائدة كبيرة للمعدة إذ يلين المعدة ويسكن السعال ويقوي القلب ويسكن العطش ويدر البول ،وأشار قدامه (1988) بأن قشور الرمان إذا نقعت بالماء وشربت يوميا طردت الدودة الشريطية الوحيدة .

2-7-2-3 المركبات الفعالة في نبات الرمان

تحتوي جميع أجزاء شجرة الرمان على التانين Tannin والتي تستعمل كمادة قابضة Astringent ، فضلا عن المواد البروتينية والمواد السكرية والمعادن والفسفور والحديد والكبريت والبوتاسيوم (زمزم ،1985) . كما أن قلف السيقان والجذور غنية بالقلويدات منها Isopelletierine والذي له فائدة في علاج الديدان الشريطية (Heinrich *et al*.,1992) . تمكن باقر (1997) من تحديد وحساب كمية التانينات والمواد الكاربوهيدراتية والمواد البروتينية والمواد الدهنية في مستخلص قشور ثمار الرمان ، وتبين أن هذه القشور تحتوي على نسبة عالية من المواد الكاربوهيدراتية (47%) كما أنها تحتوي على نسبة معقولة من الدهون والتانينات (3.6%،2.66%) على التوالي وكانت نسبة البروتينات الموجوده هي(1.2%) واتضح أن الماء المقطر البارد هو أنسب المذيبات لاستخلاص التانينات وأن قشور ثمار الرمان تحتوي على التانينات القابلة للتحول وعلى التانينات المكثفة وعلى الفلافونيدات ومجاميع الكاتيول والبايروكالوول

وأثبت باقر (1997) أن مستخلص قشور الرمان المائي له فعالية عالية في تثبيط البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام والمتمثلة ببكتريا *Staphylococcus aureus* فضلا عن تأثيره الفعال ضد بعض أنواع الفطريات الجلدية . بالاضافة لذلك فقد اثبت ان قشور الرمان وعصيره بالإضافة الى شمعه الداخلي يحتوي على العديد من من مضادات الاكسدة و التي تساعد الجسم في طرح السموم التخلص من المواد المؤكسدة التي تتواجد في الجسم (Ahmed,2012). يعد الرمان احد الفواكه الي استخدمت منذ زمن بعيد في الطب إذ استخدم لعلاج الامراض المختلفة (Abdel MAE & Dkhil,2011)،اذ يحتوي الرمان على خصائص قوية مضادة للأكسدة ومضادة للالتهابات ، وقد أظهرت الدراسات الحديثة نشاطه المضاد للسرطان في العديد من السرطانات البشرية (Adhami &Mukhtar,2007) .

2-7-3 نبات التيكوما *Tecoma stans* :

وهي شجيرة دائمة الخضرة مزهرة متوسطة الحجم. يبلغ طول النبات 1.5-7.5 متر وعرضه من 1 إلى 2.6 متر. السيقان القاعدية لها لحاء أملس ذو لون الرمادي الفاتح ، ويتحول إلى أخاديد مع تقدم العمر. الأوراق الخضراء مركبة وذات أسنان شبيهة بالمنشار(Anand & Basavaraju.,2021) كما في صورة (2-10)

2-7-3-1 تصنيف نبات التيكوما

Family : Bignoniaceae

Genus : Tecoma

Species :stans

صورة 2-10 نبات التيكوما (Sowjanya & Srivinasa,2017)

2-7-3-2 الأهمية الطبية لنبات التيكوما

تحتوي التايكوما في تركيبها على الفلافونايد والذي يستخدم بشكل واسع كمضادات حيوية و مضادات سرطانية (cook & samman,1996) ن وجود مواد مثل فيتوستيرول ، ترايتيربين ، جليكوسيدات ، فينولات ، فلافونويد ، صابونين ، وتانينات إما بشكل فردي أو مجتمعة معًا تأثيرًا تآزريًا في التئام الجروح (Das *et al*.,2010)

2-7-3-3 المركبات الفعالة في نبات التيكوما

تحتوي التيكوما على حوالي 120 مركباً تم عزلها من النبات تشتمل بعض المركبات الرئيسية على قلويدات المونوتربين ، والأحماض الفينولية ، والفلافونويد ، والكاروتينات ، والتربينويدات ، والجليكوسيدات ، والفيتوستيرول ، والزيوت الطيارة ، والأحماض الدهنية غير المشبعة حيث تعمل هذه المواد كمضادات أكسدة و مضادات بكتيرية و فطرية (Alade *et al*., 2019;Sadananda *et*

(*al*.,2011. أظهر المستخلص المائي و الكحولي للتايكوما فعالية كمضاد للجراثيم حيث تم تثبيط بكتيريا *E. coli* و *B. subtilis* عند مستويات مختلفة التراكيز(Al-Azzawi, 2012).

4-7-2 نبات الشيح *Artemisia Judaica L.*

وهو شبه شجيرة صغيرة عطرية ذات أوراق مركبة والوريقات صغيرة والنورات صغيرة شبه كروية جالسة ذات لون اصفر (المنظمة العربية للتنمية الزراعية، 1988) كما انه نبات حولي أو معمر يصل ارتفاعه إلى حوالي 40 سم له فروع كثيرة قائمة تنتهي برؤوس زهرية خضر مصفرة (حسين، 1979) (الشكل2-11)، ينمو عادة في الصحراء الكبرى لشمال أفريقيا وينتشر في بلاد الشام وشبه الجزيرة العربية على شكل تجمعات نباتية كبيرة، أما جزء النبات المستخدم للأغراض الطبية فهو القمم الزهرية والأزهار الناضجة غير المتفتحة، وكذلك الأوراق والسيقان الدقيقة (الزبيدي وجماعته، 1996) وتعتمد الفعالية الطبية لنبات الشيح على طبيعة المكونات الموجودة في هذا النبات.

1-4-7-2 تصنيف نبات الشيح

Family: Asteraceae

Genus : *Artemisia*

Species *Judaica L.*

(Subramoniam *et. al*.,1996)

صورة (2-11) نبات الشيح (El-Amier *et al*., 2019)

2-4-7-2 الاهميــة الطبية لنبات الشيح:

استعملت نباتات الشيح في الطب الشعبي منذ العصور القديمة، وقد استخدمت هذه الأنواع كمسكن، ومضاد للجراثيم، مضاد للتشنج، والتخثر (Abou El-Hamd *et al.*, 2010).كما يستعمل سكان بعض دول الشرق الأوسط نبات الشيح كمضادة لداء السكري (Iriadam *et al.*,2006)، فضلاًعن استخدامه كمنشط ومقوي ومنعش للقلب ومدر للطمث (سامي ، 1988). كما إن بعض الأنواع من الشيح أظهرت فعالية المضادة للملاريا ومضاد للجراثيم ومضاد الحشرات (Kshirsagar & Rao ,2021).

واظهر النبات فعالية مضادة للسرطان اذ اجريت دراسة لغرض تقييم الفعالية السمية الخلوية للمستخلص المائي والكحولي لعشبة الشيح كمادة مضادة للسرطان، اذ استخدمت هذه المستخلصات ضد نوعين من خطوط الخلايا السرطانية، ودلت النتائج على وجود فعالية عالية للمستخلص المائي في تقليل حجم الورم (Moacă *et al.*,2019).

كما ذكر(2007),.Abid *et al* ان نبات الشيح يمتلك فعالية مضادة للأكسدة اذ يزيد من مضادات الاكسدة الكلية وانزيم glutathione peroxidase والنحاس والخارصين والحديد والدهون فضلا عن دوره الكبير كمضاد للسكري ، اذ ان الشيح معروف جيدا في الطب الشعبي بفعاليته في علاج مرض السكري وقد أجريت دراسات عديدة في هذا المجال منها أجريت على 15 مريضا مصاب بالسكري عولجوا بمستخلص الشيح أظهرت النتائج انخفاضاً معنوياً في مستوى سكر الدم (Al-Waili, 1986).

3-4-7-2 المكونات الفعالة لنبات الشيح:

يمتاز نبات الشيح باحتوائه على العديد من المواد والمركبات الفعالة فهو يحتوي على الزيوت الطيارة والقلويدات والفلافونويدات والكلايكوسيدات والصابونينات والتانينات والكومارينات , وتحتوي أغلب أنواع الشيح على مادة (Artemisinin) وهي المكون الأساسي في النبات وتختلف كميتها باختلاف نوع الشيح، ومكان زراعته ووقت الجمع (Ekiert *et al.*, 2020).

8-2 الحشرات الناقلة للمسببات المرضية

الحشرات هي كائنات لا فقارية في شعبة مفصليات الأرجل، وتعد الحشرات الصنف الأكثر انتشاراً والأوسع في شعبة مفصليات الأرجل. تشكل الحشرات المجموعة الأكثر تنوعا من الكائنات الحية على سطح الأرض فهي تحوي ما يزيد على مليون نوع تم وصفها (Chapman,2006). يُعد الكثير من فصائل الحشرات طفيليّا مزعجا بالنسبة للبشر، والحشرات الناقلة غالبا ما تكون تلك الطفيليّة كالبعوض و الذباب والقمل وبق الفراش(ناقلة الأمراض) ، النمل الأبيض (مدمّرة للمحاصيل الزراعية) ،

الجراد والسوس ، ويختص العديد من علماء الحشرات بدراسة طرق مختلفة للسيطرة على أعداد الحشرات ، حيث يلجأون غالبا لإستعمال المبيدات الحشريّة (Dmitriev *et al*.,2008). للحشرات القدرة على نشر انواع مختلفة من الامراض وذلك بوساطة اللعاب الذي يكون خازن لبعض انواع الفيروسات او بوساطة ان الحشرات التي تتغذى على الدم لها القابلية على الاحتفاظ بالطفيليات ونقلها الى دم الشخص السليم الذي تقوم بامتصاص الدم منه ، كما أن الحشرات لها القابلية على نقل الانواع المختلفة من البكتيريا بوساطة الشعيرات التي تتواجد على السطح الخارجي للاطراف (Nicoletti,2020).

1-8-2 الصرصر الالماني: *Blattella germanica*

هو نوع من الحشرات الصغيرة ، يبلغ طوله عادة حوالي 1.1 إلى 1.6 سم و يكون لون الطبقة الخارجية بلون البني المائل الى اللون الاسود و يتمتع بشريطَين أسودَين يمتدان بشكل متوازٍ من رأسه حتى قاعدة جناحيه.

يتواجد الصرصر الألماني في العديد من المناطق و بشكل واسع في المباني البشرية ،ويمكن ايجاده كذلك بالمطاعم ومرافق تجهيز الأغذية والفنادق والمؤسسات مثل دور رعاية المسنين والمستشفيات (Menasria *et al*., 2014).

1-1-8-2 تصنيف الصرصر الألماني (Picker, 2012)

Kingdom: Animalia

Phylum: Arthropoda

Class: Insecta

Superorder: Dictyoptera

Order: Blattodea

Family: Ectobiidae

Genus: *Blattella*

Species: *B. germanica*

2-1-8-2 الأهمية الطبية لحشرة الصرصر الالماني

تعد الصراصر الالمانية بشكل عام احد مصادر انتقال البكتيريا حيث ثبت أنها تحمل العديد من البكتيرية المرضية وغير المرضية ، والديدان الطفيلية الممرضة ، والفطريات ، والفيروسات (Bennett,2008). تم الإبلاغ عن أن 98 ٪ من الصراصير الموجودة في المرافق الطبية يمكن أن تحمل مسببات الأمراض على هيكلها أو الجهاز الهضمي ومن هذا البكتيريا هي *E.coli* ، *Entrobacter cloacae* ، *Staphylococcus aureus* ، *Klebsiella* ، *P.aeruginosa* ، *Salmonella spp* (Salehzadeh *et al*.,2007).

2-8-2 النمل *Camponotus xerxes* :

يعد النمل احد انواع الحشرات التي تتواجد في البيئة بكثرة اذ تتواجد في الغابات و المدن و المعامل و المخازن كما ممكن ان تتواجد في المستشفيات (Van *et al.*, 2013).

1-2-8-2 تصنيف النمل المنزلي

Kingdom: Animalia
Phylum: Arthropoda
Class: Insecta
Order: Hymenoptera
Family: Formicidae
Subfamily: Formicinae
Tribe: Camponotini
Genus: *Camponotus*
Species: *C. xerxes*

2-2-8-2 الأهمية الطبية لحشرة النمل

لفترة طويلة، لم يكن النمل مرتبط بإنتقال الأمراض أبداً أو البكتريا المسببة للأمراض، غير أنّه يمكن أن ينقل مصادر أمراض على أجسامهم وأرجلهم ونقل الأمر عينه إلى الأسطح التي يتواصلون بها في المنزل من المرجح أنّ ينقل النمل الإلتهابات البكتيرية والجراثيم إلى الأسطح، البشرة، الأكل المكشوف والجروح (Simothy *et al*.,2018).

2-8-3 الذباب المنزلي *Musca domestica*

تكون الحشرات البالغة من هذا النوع لونها رمادي ضارب للسواد تتخلله أربعة خطوط داكنة طولية على صدر الحشرة، وهي ذات جسم مُشعِر بعض الشيء ولها زوج وحيد من الأجنحة الغشائية (جناحان اثنان فقط). ولها أيضاً عينان حمروان، وتتباعد العينان قليلاً في الأناث عن الذكور وتكون الأناث ذات حجم أكبر قليلاً من الذكور.

2-8-3-1 تصنيف حشرة الذباب المنزلي

Kingdom: Animalia
Phylum: Arthropoda
Class: Insecta
Order: Diptera
Family: Muscidae
Genus: *Musca*
Species: *M. domestica*

2-8-3-2 الأهمية الطبية لحشرة الذباب المنزلي

يعد الذباب المنزلي من الحشرات المُمرِضة أو مسببة للمرض و التي لها القابلية على نقل انواع البكتيريا المختلفة علي أجسادها وفي برازها ويمكنها أن تلوث المواد الغذائية و الجروح وأن تساهم في نقل الأمراض المنقولة عن طريق الغذاء، ولهذه الأسباب فهي تعتبر من الآفات الخطرة نظرا لقابليتها على نقل الامراض المختلفة (Geden *et al.*,2021).

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل

Materials and Methods

3 - المواد وطرائق العمل Materials and Methods

1-3 الأجهزة والادوات والمواد المستعملة في أجراء التجارب

1-1-3 الأدوات والمعدات المستعملة في الدراسة الحالية في الجدول (1-3)

جدول (1-3) المعدات والأدوات المستعملة في الدراسة الحالية

ت	الأجهزة و المعدات	الشركة المصنعة	المنشأ
1	المؤصدة Autoclave	Labtech	Korea
2	كاميرا Digital camera	Sony	Japan
3	انابيب Tubes	Sigma	England)
4	جهاز الفايتك VITEK2	Bio merieux	France
5	ورق الترشيح Filter paper	Afco-dipo	Gordan)
6	حاضنة Incubator	Binder	Germany
7	مجهر ضوئي Light microscope	Genix	U.S.A
8	عروة ناقلة Loop	Loop Rhandon	England
9	مازج مغناطيسي Magnetic stirrer	Labtech	Korea
10	فرن Oven	Memmert	Germany
11	اطباق بتري Petridishs	Afco-dipo	Gordan
12	ثلاجة Refrigerator	LG	Korea
13	ميزان حساس Sensitive balance	Denver	Germany
14	مسحة قطنية معقمة Sterilized cotton swabs	Afco-dipo	Gordan)
15	ابر معقمة Sterilized needles	Afco-dipo	Gordan
16	انابيب حجم 10 مل Tubes of 10 ml	Afco-dipo	Gordan
17	مطحنة Vortex	ROMA	Italy
18	حمام مائي Water bath	Tafesa	Germany
	شريط شمعي	Paraflim	England

2-1-3 المواد البيولوجية والكيميائية والاوساط الزرعية

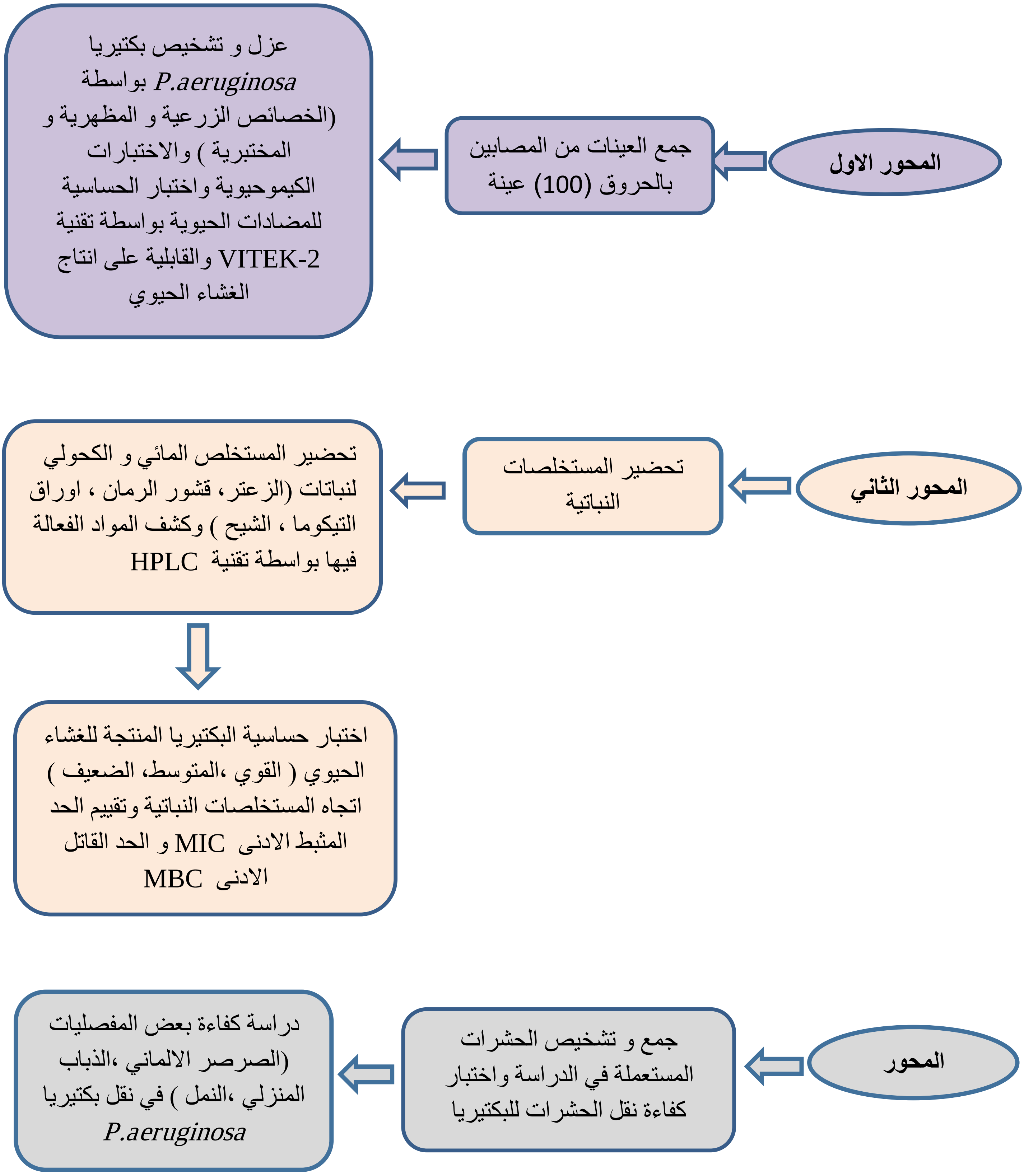
Biological, Chemical Materials and culture media

المواد الكيميائية والمواد البيولوجية المستعملة في هذه الدراسة مع منشأها في الجدول (3-2)

جدول :(3-2) المواد البيولوجية والكيميائية والاوساط الزرعية

ت	اسم المواد	الشركة المصنعة	المنشأ
1	Blood agar	Oxoid	United kingdom
2	Blood agar base	Oxoid	England
3	Brain-Heart Infusion agar	Mast	United kingdom
4	Deionized water	Bionear	Korea
5	Ethanol 96%	BDH	England
6	Gongo red stain	BDH	United kingdom
7	Gram Stain	VSI	Iraq
8	Hydrogen peroxide(H2O2)	VIS	Iraq
9	king A agar	HI-MEDIA	India
10	Koveac's Reagent	Oxoid	France
11	MacConkey's agar	Mast	United kingdom
12	Mueller-Hinton agar	Difco	USA
13	Normal saline	BDH	United kingdom
14	Nutrient agar	Mast	United kingdom
15	Nutrient broth	Mast	United kingdom
18	وسط ماء الببتون Peptone water	HI-MEDIA	INDIA
19	Simmon's citrate agar	Oxoid	United kingdom

2-3 تصميم الدراســـــة Study design



3-3 طرائق العمل Methods

1-3-3 جمع العينات Collection of samples

تم جمع العينات عدد 100 بواقع 57 عينة للذكور و43 عينة للإناث من مناطق الجلد المحترقة في ردهة الحروق في قسم الحروق في مستشفى مدينة الإمام الحسين (ع) الطبية / محافظة كربلاء المقدسة وذلك باستخدام المسحات المعقمة الجاهزة و للمدة الزمنية من شهر كانون الاول 2021 الى شهر حزيران 2022 حيث اخذت العينات بصورة عشوائية من مختلف مناطق الجسم للمصابين من الرأس و الاطراف العليا و السفلى و الجذع ونقلت المسحات بعد جمعها الى الوسط المغذي (Nutritient broth) وذلك لحفظ العينات لحين الوصول للمختبر لغرض زراعتها في وسط زراعي مغذي (Nutritient agar) لغرض الزرع و التشخيص الاولي لبكتيريا *P.auroginosa* باعتماد الطرق المختلفة .

2-3-3 الفحص المجهري لعينات البكتيريا Microscopic examination for bacteria

تم تحضير الشرائح من المستعمرات النقية وتم تصبيغها بصبغة غرام لدراسة خصائص الخلايا البكتيرية تحت المجهر الضوئي من خلال ملاحظة شكل الخلايا وترتيبها ولونها (Forbes *et al.*,2007).

3-3-3 زرع العينات Samples culturing

تم زرع العينات على وسط مغذي Nutritient agar وذلك لغرض تحفيز نمو المستعمرات البكتيرية.

4-3-3 تحضير الاوساط الزرعية Preparation of culture media

تم تحضير الاوساط الزرعية وفقا لتعليمات الشركة المصنعة و تم تعقيمها و تجهيزها للزراعة باستخدام الموصدة autoclave بدرجة حرارة 121°م تحت ضغط 15 باوند / انج ^{2} ولمدة 15 دقيقة.

1-4-3-3 وسط الاكار المغذي Nutritient agar

حضر وفقاً لتعليمات الشركة المجهزة ، حيث حضر الوسط الزراعي وعقم بالمؤصدة ، وترك ليبرد الى درجة حرارة 50 °م ، بعدها صب في أطباق زراعية (Petri Dish) نظيفة ومعقمة ، استعمل هذا الوسط لتنمية العزلة البكتيرية ، ودراسة خصائصها المظهرية .

3-3-4-2 وسط اكار الماكونكي MacConkey agar

وفقاً لتعليمات الشركة المجهزة ، حضر الوسط وعقم بالمؤصدة ، وترك ليبرد الى درجة حرارة 50°م وصب في أطباق بتري نظيفة ومعقمة ، استعمل هذا الوسط لاختبار القابلية على تخمير سكر اللاكتوز.

3-3-4-3 وسط مولر هنتون Mueller Hinton Agar

تم تحضير الاكار من خلال التعليمات المرفقة من الشركة ووضع في المؤصدة لغرض التعقيم و ترك ليبرد قليلا ثم صب في طبق بتري نظيف و معقم ويعد مستنبت للاحياء المجهرية وكذلك يستعمل كوسط لفحص حساسية البكتيريا للمضادات الحيوية.

3-3-4-4 وسط انتاج صبغة البايوسيانين (King A agar)

وفقاً لتعليمات الشركة المجهزة اذيب 46.64 جرام في 1000 مل من الماء المقطر /المحتوي على 10 مل من الجلسرين وتم تسخينها حتى الغليان لتذوب و عقمت بواسطة المؤصدة 15 باوند (121 درجة مئوية) لمدة 15 دقيقة و تركت لتبرد لتوصل الى درجة حرارة 45-50 درجة مئوية و صبت في اطباق معقمة و جهزت للزراعة ويشير ظهور اللون الاخضر المزرق الى قابلية البكتيريا على انتاج صبغة البايوسيانين pyocyanin المميزة لبكتيريا *P.aeuroginosa* . .

3-3-4-5 اكار اليوريا (Urea agar)

حضر وفقاً لتعليمات الشركة المجهزة ، تم تحضير 950 مليلتر وسط غراء اليوريا الأساسي (Urea agar base) ، ثم عقم بالمؤصدة و ترك ليبرد الى درجة حرارة 45 مْ ، ثم تم إضافة 50 مليلتر من محلول اليوريا (40%) المعقم بالترشيح ، بعدها تم صب الوسط في أنابيب زجاجية نظيفة ومعقمة وبواقع 5 مليلتر لكل أنبوبة وتركت أنابيب بصورة مائلة للتصلب ، تم استعمال الوسط للكشف عن قدرة العزلة البكتيرية على افراز أنزيم اليوريز Urease الذي يحلل اليوريا الى أمونيا و ثاني أوكسيد الكاربون عند تحول لون الوسط الازرق الى اللون الوردي تعتبر نتيجة ايجابية .

3-3-4-6 تحضير وسط اكار الدم Blood Agar Media

تم تحضير وسط أجار الدم وفقًا لتعليمات الشركة الصانعة تم مزج 28 جرام من الوسط في لتر واحد من الماء المقطر ويرج الخليط ليذوب بعد ذلك تم غليان الوسط حتى تذوب تمامًا وتتجانس تم تعقيم الوسط بالمؤصدة لمدة 15 دقيقة وعلى درجة حرارة 121درجة مئوية ، ثم ترك لخفض درجة حرارته إلى 45-50 درجة مئوية، بعد ذلك تمت إضافة 5٪ من الدم البشري إلى الوسط وتجانسه جيدًا وسكب في أطباق بتري و استخدم لاختبار قابلية البكتيريا على تحليل الدم عند تحول لون الاكار الاحمر الى اللون الاخضر يعد دليلا على قدرة البكتيريا على تحليل الدم بصورة كاملة (Coban *et al.*, 2006).

3-3-4-7 وسط احمر الكونغو Congo red agar

حضر الوسط بخلط 37غم/لتر من مرق نقيع القلب والدماغ مع 50 غم/لتر من الكلوكوز و10غم/لتر من الاكار و2غم من صبغة الكونغو الحمراء واضافة 900 مل من الماء المقطر واضيف المسحوق للوسط المعقم بعد تركه يبرد لدرجة 45 درجة مئوية ومزج الخليط جيداً وصب في اطباق معقمة ، استعمل هذا الوسط للكشف عن قدرة البكتيريا على تكوين الغشاء الحيوي وقوة الغشاء الحيوي الذي تمتلكه البكتيريا قيد الدراسة حيث تعد النتيجة موجبة بظهور المستعمرات باللون الأسود الداكن والذي يدل على انتاج الغشاء الحيوي القوي وعند ظهور المستعمرات البكتيرية باللون الأسود الباهت دلالة على انتاج الغشاء الحيوي المتوسط في حين يدل اللون الأحمر على انتاج الغشاء الحيوي الضعيف وتعد النتيجة سالبة عند ظهور اللون الوردي (Freeman *et al* .,1989) .

3-3-4-8 وسط اختبار الحركة Motility Test

تم وضع عينات البكتيرية عن طريق الطعن بوسط شبه صلب وحضانته عند 37 درجة مئوية ،وتم تحديد قابلية البكتيريا على الحركة بتواجدها بمسافة بعيدًا تمامًا عن خط الطعن أو أي مظهر غائم آخر في الوسط والذي يعتبر نتيجة ايجابية (Mahon & Manuseelis,2018).

3-2-4-9 اختبار النشا Starch test

تم تحضير وسط النشا حسب تعليمات الشركة المصنعة (الاس الهيدروجيني 7.2) وعقم ثم صب في أطباق معقمة و تم زرع البكتريا في الوسط حضنت الأطباق بدرجة 35 م لمدة (18-24) ساعة وفيما بعد اضيف قطرات من كاشف لوكال النتيجة الموجبة لهذا الاختبار تلون المستعمرات باللون الأزرق الغامق مع ظهور هالة شفافة حول المستعمرات.

3-3-5 تحضير المحاليل والكواشف :

3-3-5-1 محلول ثابت العكورة القياسي (محلول ماكفرلاند 0.5)

حضر هذا المحلول وفقا لما جاء في Baron و Finegold (1990) وكالاتي:-

1. تم إذابة 1.175 غم من مادة كلوريد الباريوم ($BaCl_2H_2O$) في لتر واحد من الماء المقطر المعقم.
2. حضر 1 % من حامض الكبريتيك المركز (H_2SO_4) باضافة 1 مليلتر من الحامض الى 90 مليلتر من الماء المقطر المعقم ثم أكمل الحجم إلى 100 مليلتر.
3. مزج 0.5 مليلتر من مادة كلوريد الباريوم مع 99.5 مليلتر من حامض الكبريتيك المركز في أنابيب زجاجية ذات سداد محكم لمنع التبخر، حفظت هذه الأنابيب في الظلام بدرجة حرارة الغرفة.

3-3-5-2 التصبيغ بصبغة كرام Gram stain

استخدمت هذه الصبغة لدراسة الخصائص المظهرية للبكتيريا المعزولة ، وتتكون من:

- صبغة الكريستال البنفسجي Crystal violet
- محلول اليود Iodine Solution
- مزيل اللون (الكحول) Alcohol
- صبغة سفرانين Safranin stain

تم إخضاع عزلات البكتيريا للفحص المجهري باستخدام صبغة جرام وتم فحصها بالعدسة الزيتية للمجهر الضوئي للتعرف على شكل البكتيريا وكذلك حجمها وترتيبها .

3-2-5-3 كاشف فوكس بروسكاور Voges–Proskauer test

حضر الكاشف بإضافة 3 مليمترات من محلـول هيدروكسيـد البوتاسيـوم مع 1 مليلتر من محلول α-naphthol تم إضافة الكاشف المحضر الى الانابيب الحاوية على العزلات البكتيرية ان ظهور اللون الأحمر مؤشر على إيجابية الاختبار وقدرة البكتيريا على تخمير الكلوكوزوانتاج الاستوين Acetion (Collee *et al*., 1996).

3-3-5-4 كاشف الكتاليز Catalase reagent

استخدمت مادة بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 بتركيز 3% للتحري عن قابليـة البكتريـا لإنتاج انزيم الكاتليز ويعد ظهور فقاعات من المستعمرة البكتيرية دليلا ايجابيا على قدرة البكتيريا على انتاج انزيم الكاتاليز (Tang & Stratton , 2013).

3-3-5-5 كاشف الاوكسيديز Oxidase reagent

حضر الكاشف بإذابة 1 غم من مادة رباعي مثيل بارافنيلين ثنائي آمين ثنائي هيدروكلورايد في 100مل ماء مقطر يوضع وحفظ في قنينة غامقة و معقمة لحين الاستعمال ويعتبر تحول المستعمرة البكتيرية الى اللون البنفسجي دليلا على ان البكتيريا قادرة على انتاج انزيم الاوكسيديز (Tang & Stratton,2006).

3-3-5-6 اختبار السترات Citrate utilization

وفقاً لتعليمات الشركة المجهزة ، حضر الوسط و وزع في أنابيب زجاجية نظيفة وبواقع 5 مليلتر للأنبوبة الواحدة ، وعقم بالمؤصدة وتركت الأنابيب بعدها لتبرد بصورة مائلة ، استعمل الوسط للكشف

عن قابلية العزلة البكتيرية على استخدام السترات كمصدر وحيد للكاربون ، إن تحول لون الوسط من الأخضر الى الأزرق يدل على ايجابية الفحص (Forbes *et al*.,2007).

3-3-5-7 القدرة على تخمير الكلوكوز O/F of glucose

حضر الوسط بإذابة (10, 5 ,0.08)غم من الببتـون (Difco) وكلوريد الصوديوم Nacl وأحمر الفنيول (BDH) على التوالي في كمية من الماء المقطر، بعدها تم أكمال الحجم الى 500 مليلتر بالماء المقطر بعد ضبط الرقم الهيدروجيني الى 7.2 ووزع الوسط في أنابيب زجاجية بواقع 5 ملليتر لكل أنبوبة مع وضع أنبوبة درهم (Derhum tube) مقلوبة ، ثم عقمت الأنابيب بالمؤصدة وبعد ذلك تركت لتبرد واضيفت لها السكريات المعقمة وبتركيز 1% (Macfaddin,2000) .

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

حضر بإذابة 0.1 غرام من صبغة المثيل الاحمر في 300 ملم من كحول الايثانول المركز واكمل الحجم الى 500 ملم بواسطة الماء المقطر اذ لقحت انابيب وسط احمر المثيل بمستعمرات بكتيرية وحضنت في درجة حرارة 37 درجة مئوية لمدة 24 ساعة مع إضافة 5 قطرات من كاشف احمر المثيل الى كل انبوبة مع الرج ،ان تغير اللون الى الأحمر دلالة على إيجابية الاختبار وقدرة البكتيريا على تخمير سكر الكلوكوز وإنتاج الحوامض (Macfaden,2000) .

3-3-5-9 النمو في درجة حرارة 4 مئوية

تم وضع عينات المستعمرات البكتيرية التي نمت على وسط الاكار المغذي Nutritient agar في الثلاجة طوال الليل ثم تم تفقدها في اليوم التالي و لوحظ استمرار نموها .

3-3-5-10 النمو في درجة حرارة 42 مئوية

وضع عينات المستعمرات البكتيرية في الاجار مغذي ، ثم حضنت الأطباق عند 42 درجة مئوية لمدة 24 ساعة. تم ملاحظة مظهر النمو لإيجابية الفحص (Munazza & Fauzia,2012).

3-3-5-11 اختبار الحساسية للمضادات الحيوية

1- اختبار انتشار الاقراص Disk diffusion test

استخدم الوسط الزرعي مولر – هنتون لإجراء اختبار الحساسية للمضادات الحيوية باستخدام أقراص المضادات الحيوية، اذ تم زرع البكتريا بطريقة النشر بعد ان قورنت عكورة النمو المتكونة مع محلول ثابت العكرة القياسي الذي يقارب تركيز 10^8 خلية/ مليلتر ثم تركت الأطباق في الحاضنة لمدة (10-15)

دقيقة ثم وزعت بعدها أقراص المضادات الحيوية على سطح الطبق وضعت الاطباق بعد ذلك في الحاضنة بدرجة 35م° لمدة 24 ساعة لملاحظة حساسية هذه العزلات وقياس مناطق التثبيط المتكونة حول القرص(Baron & Finegold، 1994).

3-3-5-12 التشخيص واختبار الحساسية بواسطة جهازالفايتك VITEK2

VITEK- 2 Compact system –Identification and Sensitivity test

تم استخدام جهاز VITEK2 المجهز من قبل شركة Bio Merieux في مستشفى الإمام الحجة (عج) لإجراء الاختبارات البيوكيميائية للعزلات البكتيرية يشتمل جهاز VITEK2 على 48 نوعًا من الاختبارات البيوكيميائية التي تُستخدم لتشخيص البكتيريا، تصل الدقة التشخيصية لهذا الجهاز إلى ما يقرب من 99٪ (Pincus, 2006) . اذ دلت النتائج ان جميع العزلات والتي تم اخضاعها للفحص بالجهاز هي بكتيريا *P.aurruginosa* وبنسبة تقرب من 99% .

كذلك تم اختبار حساسية البكتيريا للمضادات الحيوية بتقنية الفايتك VITEK-2Compact system sensitivity test من أجل الحصول على تشخيص أكثر دقة وتحديد حساسية العزلات الدوائية ، تم إجراء اختبار الحساسية التشخيصي والدوائي لـ 10 عزلات بكتيرية تم اختيارها وفقًا لأعلى نسبة تشخيص في جهاز VITEK اذ أظهرت العزلات البكتيرية مقاومة عالية تجاه المضادات الحيوية مثل/ Trimethopim,Ticarcillin ,Ticarcillin / Clavulanic Acid, Piperacillin, Cefepime, Imipenem, Meropenem, Amikacin, Gentamicin, Tobramycin . Ciprofloxacin and

3-3-5-13 الكشف النوعي عن قدرة البكتيريا على تكوين الغشاء الحيوي بواسطة الصفائح المعايرة

Qualitative Detection of the ability of bacteria to form the biofilm :(MTP) by Microtiter plate

تم الكشف عن قدرة البكتيريا على انتاج الغشاء الحيوي ومعرفة قوة الغشاء بواسطة هذا الاختبار تم تحضير العالق البكتيري بتخفيف العزلات المنماة في وسط المرق المغذي Nutrient agar بالمحلول الفسيولوجي اذ خففت العزلات بمقارنتها بالمحلول القياسي ماكفرلاند McFarland ملات الحفر ب200 مايكروليتر من وسط TSB ثم لقحت كل حفرة ب25 مايكروليتر من العالق البكتيري وتم ملأ الحفر في الصف الاخير وبصورة عمودية بالوسط TSBدون لقاح بكتيري واستعملت كسيطرة Control تم تغطية طبق المعايرة والحضن في درجة حرارة 37 لمدة 24 ساعة ثم غسل الطبق ثلاث مرات بمحلول دارئ الفوسفات الملحي PBS ثم تترك لتجف لمدة 15 دقيقة في درجة حرارة الغرفة ثبتت الخلايا الملتصقة

بإضافة 200 مايكروليتر من الميثانول المطلق لكل حفرة وترك لمدة 15 دقيقة ثم تم التخلص من الميثانول وترك الطبق ليجف ثم اضيف للطبق 200 مايكروليتر من صبغة البنفسج البلوري المحضرة بتركيز 0.01 لكل حفرة وتركت لمدة 15 دقيقة ثم غسلت الحفر عدة مرات بماء منزوع منه الايونات Deionized water ثلاث مرات للتخلص من الصبغات غير المرتبطة وتركت لتجف في حرارة الغرفة بعد ذلك تم إضافة 200 مايكروليتر من الايثانول المطلق للخلايا الملتصقة المصبغة ثم استخدم بعدها جهاز فحص الامتصاص المناعي المرتبط بالانزيم (ELISA) بطول موجي570 (Shakibaie *et al.*,2015).

تم بعد ذلك قراءة النتائج بجهاز(ELISA) لتقدير الكثافة الضوئية ثم قياس الكثافة الضوئية للغشاء الحيوي حسب المعادلة:

$$\text{Mean (OD) control} - \text{Mean (OD) test} = \text{(OD) biofilm}$$

6-3-3 تحضير المستخلصات النباتية

اولاً : المستخلص المائي Aqueous extract

حضر المستخلص المائي للنباتات في المختبرحسب طريقة وذلك بإذابة 50غم من مسحوق النبات Powder في 500 مل من الماء المقطر Distilled water وترك لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة الغرفة ثم تم ترشيح الخليط باستخدام طبقات من الشاش الطبي للتخلص من الشوائب ثم صب المحلول في الانابيب المعقمة التي وضعت بعدها في جهاز الطرد المركزي بسرعة 3000 دورة / دقيقة ، ثم رشح المستخلص باستخدام أوراق الترشيح ، تم تجفيف المستخلص باستعمال حاضنة هوائية لا تتجاوز درجة حرارتها 40 م° ثم حفظت المستخلصات في الثلاجة لحين الاستعمال (Arma *et al.*, 2006).

ثانياً : المستخلص الكحولي Alcoholic extract

تم اضافة 50 غم من باودر النبات المراد استخلاصه الى 500 مل من n hexan بتركيز 99.8% وبمدة 24 ساعة و بعدها اضيف 500 مل اخر من n hexan للخليط وترك لمده 24 ساعة تم تكرار الخطوة لحين وصول حجم ال n hexan الى 2 لتر ، و تم تصفية المستخلص و ترك النبات المترسب ليجف بدرجة حرارة الغرفة لمدة 6 ساعات و كانت الخطوة التالية اضافة 500 مل من الايثانول بتركيز 80% للمستخلص النباتي و كررت هذه الخطوة 5 مرات حتى اصبح المستخلص الكحولي عديم اللون وتم ترشيح المستخلص و تم تبخيره بواسطة المبخر الدوار بدرجة حرارة 40 م وبسرعة 4 دورات

بالدقيقة الى ان تبقى 300مل من المستخلص ، و كانت الخطوة التالية هي التجزئة و ذلك باضافة اثيل استيت وتم تحقيق هذه الخطوة باضافة 20 مل من الماء المقطر لمستخلص الايثانول ،تم اضافة الاثيل استيت في قمع فصل و تم تكرار هذه الخطوة 3 مرات تم اضافة Sodium disulphat وتم ترشيح المستخلص و ترك ليجف (Huda *et al.* ,2009).

7-3-3 عمل تراكيز المستخلصات النباتية المائية والكحولية

لغرض تحضير المحلول الخزين للمستخلص المائي ،تم وزن 2غم من المستخلصات النباتية الجافة لكل نبات واذيبت في 10 مل من الماء المقطر بعد ذلك عقم المحلول بمرشحات غشائية دقيقة للتخلص من الملوثات واستخدم المحلول لتحضير التراكيز (100،75،50،25) ملغم /مل وللحصول على المحلول الخزين Stock solution.

اما المستخلصات الكحولية فتم اخذ 2غم من كل مستخلص جاف وتم اذابتها في 10 ملغم /ملم من محلول Dimethyl sulfoxide (DMSO) بتركيز 5% وعقم بالترشيح والمرشحات الغشائية ليصبح كمحلول خزين بتركيز 200 ملغم/مل تم استخدامه لعمل تراكيز المستخلصات النباتية الكحولية (100،75،50،25).

8-3-3 الكشف عن المواد الفعالة (المواد الفينولية و الفلافينويدات) بواسطه جهاز التحليل الكروماتوغرافي(HPLC) (التحليل الكروموتوغرافي –السائل ذو القدرة الفائقة)

(High-performance liquid chromatography)

تم ذلك في وزارة العلوم و التكنلوجيا – قسم المختبرات اذ اخذ 1 غم من كل مستخلص جاف وتم طحنه ثم اذيب ب 200 مل كحول مكون من الايثانول و الماء المقطر بنسبة (80-20) حجم/حجم و تم رج المحلول وتم الاستخلاص و تقدير المواد (المواد الفينولية و الفلافينويدات) بواسطة جهاز – ultra sonication شركة Branson sonifier USA عند60% (duty cycle) لمدة 25 دقيقة عند درجة حرارة 25 مئوية و بعدها تم استخدام المرشح الدوار Center fuge عند 7500 دورة ولمدة 15 دقيقة وبعدها تم تنقية المستحلب للتخلص من الصبغات و بعدها تم التخفيف تحت ضغط مخفف عبر المبخر الدوار Rotary evaporator.

وبعد ذلك تم اعادة تكوين معلق من كل نموذج جاف في 1 مل من الايثانول و بعد الترشيح و الخزن تحت درجة حرارة 4 م لاعدادها للتحليل الكروموتوغرافي وقد تم حقن 20 ماكروليتر من كل نموذج في جهاز HPLC وفق ظروف الفصل المناسبة .

3-3-9 اختبار مدى حساسية بكتيريا الزوائف الزنجارية (*P.aeruginosa*) للمستخلص المائي و الكحولي للـ (الزعتر و قشور الرمان و أوراق التيكوما والشيح):

استخدمت طريقه الانتشار بالحفر Well diffusion method الكشفي عن فعالية تثبيط المستخلصات للنباتات المختارة ضد بكتيريا الزوائف الزنجارية (*P. aeruginosa*) المكونة للغشاء الحيوي التي تم عزلها من المصابين بالحروق.

تم الحصول على العينات المطلوبة من البكتيريا وذلك بتخفيف البكتيريا بالمحلول الفسلجي ومقارنته مع أنبوب ماكفرلاند القياسية والتي تعادل (1.5×10^8 CFU\ml).

نشرت البكتيريا المخففة على اطباق مولرهينتون بمقدار(100 مايكروليتر) لكل طبق بواسطة مسحات قطنية معقمة و تركت لمده 15 دقيقة ليتم امتصاص البكتيريا، و بواسطة استخدام الثاقب الفليني تم عمل اربع ثقوب محيطية يبلغ قطر الواحد 6 ملم على سطح الاكار المزروع و كل حفرة ملئت بمقدار(50 ميكرولين) من كل تركيز من التراكيز الأتية (100,75,50,25) ملغم/مل ولكل مستخلص من النباتات على حدة، ثم حضنت الاطباق بدرجة حرارة 37 مئوية لمدة 24 ساعة وذلك للسماح بنمو البكتيريا ثم قيست أقطار مناطق التثبيط Inhibition zone حول كل حفرة لكل تركيز ولكل مستخلص ولكل نبات اعتماداً على نوع المستخلص (المائي او الكحولي) لمعرفة اذا ما كان التثبيط قوياً او متوسطاً او ضعيفاً.

3-3-10 اختبار التركيزٌ المثبط الأدنى MIC لمستخلص الزعتر و قشر الرمان و الشيح و التيكوما

تم تحضير التراكيز اللازمة للكشف عن التركيز المثبط الادنى للمستخلص المائي و الكحولي للنباتات(الزعتر، قشر الرمان ، أوراق التيكوما ،الشيح) وتم ذلك من خلال تحضير سلسلة من التراكيز التصاعدية اللازمة واعتماداً على التركيز الذي لا يظهر به حلقة التثبيط نستنتج انه كان هو التركيز الادنى ، و تم تحضير التراكيز على النحو الاتي (0، 2 ، 4 ، 8 ، 16 ، 32 ، 64 ، 128 ، 256 ، 512) ملغم/مل (Mehta *et al*., 2016) في الدراسة الحالية ، تم اختبار اربع أنواع من المستخلصات النباتية ضد بعض عزلات الزوائف الزنجارية من مصادر الحروق تم اختيارها لإنتاجها الغشاء الحيوي القوي والغشاء الحيوي المتوسط والغشاء الحيوي الضعيف والتي تشمل المستخلص المائي والكحولي لنبات الزعتر والمستخلص المائي والكحولي لقشور نبات الرمان والمستخلص المائي والكحولي لأوراق نبات

التيكوما والمستخلص المائي والكحولي لنبات الشيح واستخدمت من اجل معرفة التركيز المثبط الادنى والتركيز المثبط الاعلى للزوائف الزنجارية اتجاه تلك المستخلصات النباتية.

تم الحصول على العينات المطلوبة من البكتيريا وذلك بتخفيف البكتيريا بالمحلول الفسلجي ومقارنته مع انبوبة ماكفرلاند القياسية والتي تعادل (1.5×10^8 CFU\ml)، حضر من المحلول المستخلص المخزون (100) ملغم/مل سلسلة من التراكيز التصاعدية التي تم ذكرها سابقاً ملغم/ مل ، حيث وضع كل تركيز في انبوبة اختبار تحتوي على وسط زرعي Nutrient broth ثم اضيفت التراكيز اليها و بعدها نقلت البكتيريا من المعلق البكتيري المحضر الى الانابيب التي تحتوي على تراكيز المستخلص النباتي مع تحضير انبوبتين سيطرة احداهما تحتوي على مستخلص بدون زرع بكتيريا و الاخرى تحتوي على بكتيريا فقط ، وكررت هذه الخطوة لجميع المستخلصات النباتية ، ثم نقلت جميع الانابيب الى الحاضنة بدرجة حرارة 37م و لمدة 24 ساعة ، فأدنى تركيز يظهر به نمو للبكتيريا يعد هو التركيز المثبط الادنى (Islam *et al* ., 2016).

3-3-11 دراسة كفاءة بعض الحشرات في نقل بكتيريا *P.aeuroginosa*

1- الجمع والتشخيص

لوحظ وجود حشرات الصرصر الالماني والذباب المنزلي والنمل كونها اكثر المفصليات تواجداً في مدينة الامام الحسين الطبية في مدينة كربلاء،جمعت بالغات الصرصر الألماني كما ورد في(عبد علي 2006،) اما الذباب المنزلي فقد تم جمعه عن طريق تصميم قفص مكعب بأبعاد 30*30*30سم مغلف بالسلك المشبك من جوانبه والقاعدة من الخشب وفي احدى الجوانب تم تصميم بوابة من القماش،وضع داخل القفص اطباق تحوي مواد سكرية والبعض الاخر يحوي على قطن مشبع بالماء،أخذت نماذج من هذه الحشرات لغرض التشخيص وقد تم استخدام المفتاح التصنيفي (Sharaf,*et al* 2013) في تشخيص الصرصر الالماني ومفتاح التشخيص (الصفار ،2003) لتشخيص الذباب المنزلي و(أبو الحب،1982) لتشخيص النمل ،وبمساعدة الدكتور حيدر نعيم في قسم علوم الحياة/كلية التربية للعلوم الصرفة/جامعة كربلاء

2- دراسة كفاءة النقـــــــــل :

كل حشره من التي تم ذكرها في (1) تم اجراء التالي وذلك لغرض دراسة كفاءه الحشرة في النقل الميكانيكي لبكتيريا *P.aeuruginosa*.

تم تجهيز اقفاص بحجم 30 × 30 × 30 سم (طول ×عرض× ارتفاع) وتكون القاعدة من الخشب، واحد الاضلاع يحتوي على قماش ململ يعمل كبوابة من خلالها يتم وضع الحشرات والاطباق في القفص لكل مكرر ولكل نوع من الحشرات الواردة الذكر اعلاه.

تم وضع وسط بيتري يحتوي على وسط زراعي معقم وبعد ذلك تطلق في القفص عشر حشرات من النوع المراد دراسته وبعد ساعة يرفع الطبق الى الحاضنة و استبدل بطبق اخر يحتوي على مزرعة من بكتيريا *P.aeruginosa* بعد ذلك استبدل الطبق بطبق اخر يحتوي على وسط زرعي وبعد ساعة تم نقله الى الحاضنة ، يتم ملاحظة المزارع البكتيرية المتكونة في الطبق الاول (قبل اجراء التلوث) والطبق الثالث (بعد اجراء التلوث) ومن خلال ذلك يتم الحكم على كفاءة الحشرة في نقل البكتيريا لكل حشرة من الحشرات الواردة ذكرها اعلاه وتم عمل ثلاث مكررات.

في الوسط تم وضع ماده جاذبة للحشرات لكل وسط حسب نوع الحشرة اذ تم وضع البسكويت عند اجراء تجربه الصراصير و قطعه من السكر عند اجراء تجربه الذباب والنمل

4-3 التحليل الاحصائي Statistical analysis

أخضعت جميع نتائج الدراسة الحالية للتحليل الاحصائي و استخدم لهذا الغرض البرنامج الاحصائي الجاهز SPSS إذ أجرى تطبيق التحليل العاملي ، مع حساب أقل فرق معنوي LSD عند مستوى احتمالية $P \leq 0.05$.

الفصل الرابع

النتائــج والمناقشة

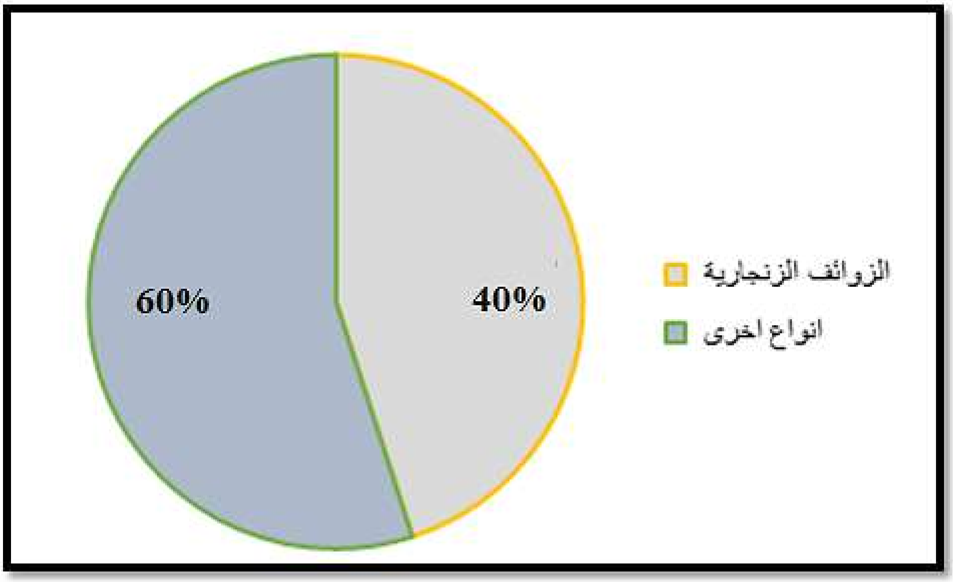
Results & Discussion

4 - النتائج والمناقشة

1-4 عزل وتشخيص بكتيريا بـ *P.aeruginosa*

1-1-4 النسبة المئوية لعينات الزوائف الزنجارية *P.aeruginosa* المعزولة من مسحات الحروق في الدراسة

من أصل مائة عينة مأخوذة من الحروق ظهرت فقط 40 مسحة نمو جرثومي لبكتيريا الزوائف الزنجارية أي إن نسبتها بلغت 40% وكما في الشكل (4-1)



شكل (4-1) النسبة المئوية لجرثومة الزوائف الزنجارية

2-1-4 الاختبارات الكيموحيوية على الزوائف الزنجارية *P.aeruginosa* المعزولة من مسحات الحروق في الدراسة

أظهر التشخيص الزرعي الأولي للعزلات البكتيرية أن جميع العزلات تتميز بمستعمرات خشنة دائرية ذات حجم كبير نسبيًا ومسننة، أنتجت جميع العزلات التي تم تحديدها الأصباغ التشخيصية القابلة للانتشارعلى أجار المغذيات ، على الرغم من اختلاف الصبغات وفقًا للعزلات ما بين المزرق والأخضر وجميع هذه العزلات أنتجت رائحة مثل العنب الحلو والتي تم التعرف عليها بسهولة حسب Brooks *et al*.,(2001) و Morrison and Wenze1,(1984).

نمت جميع العزلات على 10% أجار دم بشري اظهر تحليل الدم من النوع بيتا للدم والباقي لم ينحل الدم ، نمت كل هذه العزلات على أجار MacConkey ، لكنها لم تخمر سكر اللاكتوز (Baron *et al*.,

1994) وتحت المجهر ظهرت الخلايا البكتيرية على شكل عصيات قصيرة مرتبة في سلسلة مفردة أو قصيرة ، سلبية بالنسبة لـ تفاعل صبغة غرام ، متحرك ، غير بوغي وبدون كبسولة (Collee ، وآخرون ، 1996). أجريت في هذه الدراسة بعض الاختبارات البيوكيميائية جدول (3-1) وتمت مقارنة النتائج مع النتائج القياسية الموثقة من قبل (Baron *et al*., 1994; Collee *et al*., 1996 and Macfaddin, 2000). وبناءً على ذلك ، أظهرت النتائج أن الصفة التي ترتبط ارتباطاً وثيقاً ببكتيريا *P.aeruginosa* تتوافق مع النتائج المرجعية.

تم تحديد العزلات الموجودة على أجار الدم في الجدول (4-1) التي أظهرت التشكل والرائحة الاستعمارية المميزة ، والتي ادت الى إنحلال الدم والفحص الإيجابي لإنزيم أوكسيديز (Baron & Finegold,1994) نظرًا لأنه لا توجد بكتيريا أخرى تنتج أصباغًا قابلة للذوبان في الماء أو قابلة للانتشار في الوسائط ، مثل الزوائف الزنجارية. علاوة على ذلك ، فإن جميع الأصباغ المنتجة لـ (PPPA) pigments producing *P.aeruginosa* قادرة على النمو عند (41 درجة مئوية) ، وهي القدرة التي تعتبر صفة تأكيدية لـ(*P.aeruginosa*) (Baron & Finegold,1994).

جدول (4-1) الاختبارات الكيموحيوية التابعة الى الزوائف الزنجارية بـ *P.aeruginosa*

ت	نوع الاختبار	نتيجة الاختبار
1	Gram stain	-
2	shape	rods
3	Motility	+
4	O/F of glucose	o
5	catalase production	+
6	oxidase production	+
7	Hemolysis	+
8	Voges–Proskauer test	ND
9	Citrate utilization	+
10	Growth in 4C	+
11	Growth in 41C	+
12	Starch hydrolyze	-

2-4 تأثير الجنس والعمر في معدل الإصابة بـ *P.aeruginosa* وتأثير عامل الخطورة

يوضـح الجـدول (2-4) تـأثير بعـض عوامـل الخطرالمرتبطـة بعـدوى سـلالات *P.aeruginosa*. أظهـرت نتـائج الدراسـة الحاليـة فرق معنـوي (P <0.05) بـين الـذكور والإنـاث ، أذ بلـغ عـدد الـذكور المصـابين 28 (70٪) مقابـل 12 (30٪) مـن الإنـاث المصـابات أذ تطابقت نتـائج الدراسـة الحاليـة مـع (Suman,*et al.*,2005) ، كما ذكر Nihad وزملاؤه (2002) أنـه لا يوجد تـأثير واضـح للجنس علـى توزيع بكتريـا الزائفة إلا فـي اصـابة المسالك البوليـة ،أذ وجد أن 26 (78.78٪) من العزلات كانت من انـاث مصـابة بينمـا 7 فقط (21.21٪) كانـت مـن ذكـور مصـابين ، وقـد تعـزى الفـروق إلـى الاختلافـات الاجتماعية والتشريحية بين الذكور والإناث، تشير هذه النتائج إلى أسباب تتعلق بالمرضى الذكور في هذه الدراسة مثل التدخين وكذلك قلة الرعاية من قبل المستشفى والاستشفاء لفترات طويلة (Herfindal and Gourley, 2000).

فيما يتعلـق بعامـل العمـر ، فقـد أظهـرت النتـائج وجـود فـرق معنـوي (P <0.05) فـي الاصـابة بــ *P.aeruginosa* وبمـا أن الفئـة العمريـة (16-30) سـنة و (31-45) سـنة كانـت أكثـر عرضـة للإصـابة بالعـدوى ، فقـد بلغـت النسـبتين (32.5) و (47.5٪) علـى التـوالي حيث اختلفت الدراسـة مـع مـا ذكـره Herfindal and Gourley (2000) أن الأطفـال والمرضـى الأكبـر سـنًا هـم أكثـر عرضـة للإصـابة بالعدوى مقارنة بالفئات العمرية الأخرى لأن بعض الاضطرابات مثل نقص المناعة وسوء التغذية وكذلك الظروف الصحية السيئة قد تزيد من فرصة الإصابة بالعدوى الزائفة (Hauser & Sriram ,2005).

كما أشارت نتائج الدراسة الحالية إلى أن الإصابات بين المرضى الذين يعانون من ضعف المناعة بلغـت4 (100٪) مـن عـدد المرضـى الـذين يعـانون مـن العـوز المنـاعي (Immunocompromised states) ، وأشـار Owlia وزمـلاؤه (2001) إلـى أن مرضـى السـرطان الـذين يعـانون مـن قلـة العـدلات الناتجة عن العلاج الكيميائي أو الأورام الخبيثـة الدمويـة كـانوا أكثـر عرضـة للإصـابة . تعد هذه البكتيريـا واحدة من مسببات الأمـراض البشـرية الانتهازيـة الرئيسـية التـي تسـبب عـدوى خطيـرة ومميتـة فـي بعـض الأحيـان فـي المضـيفين الـذين يعـانون مـن نقـص المناعـة، تشـمل الأمثلـة علـى الحـالات المهـددة الحـواجز الفسلجية المعطلة أمام الغزو البكتيري (مثل إصابات الحروق ، والقسطرة البولية ، وقسطرة غسيل الكلـى ، والأنابيب داخل القصبة الهوائية) والآليات المناعية المختلة ، مثل تلك التي تحدث عند حديثي الولادة ، والتليف الكيسي (CF) ، ومرض نقص المناعة المكتسبة ، ونقص العدلات ، نقص عامل المتمم ، نقص السكر في الدم ، والكبت المنـاعي (Herfindal & Gourley,2000).

يبدو أن الاستعمال المطول لمضادات الميكروبات كعلاج للمريض هو عامل خطر آخر للإصابة ببكتيريا *P.aeruginosa* خاصة المقاومة للأدوية المتعددة (MDRPA) *P.aeruginosa*، وهذا ما أكد عليه الباحث (Raman *et al*.,2018) وفقًا لهذه النتائج، أذ تم الكشف عن معظم العزلات في نسبة (80٪) من المرضى الذين سبق لهم تلقي دورات علاج للمضادات الحيوية، أن *P.aeruginosa* تتطور بسرعة ضد المضادات الحيوية ، إما التكيف الجسدي أو التحمل أو ممثلة وراثيًا بالمقاومة الذاتية (Pang *et al*., 2019 ; Behzadi *et al*., 2021) ، من ناحية أخرى ذكر Jurado وزملاؤه (2021) أنه المرضى في المستشفى الذين تعرضوا للعديد من العوامل المضادة للميكروبات ، فإن المقاومة الذاتية والمكتسبة تمكن الكائن الحي من البقاء على قيد الحياة ، وبالتالي تزداد فرصة الإصابة وكذلك انتشار الكائن الحي حول البيئة وخاصة زيادة بيئة المستشفى قد يؤدي الاستعمال غير السليم للمضادات الحيوية إلى تحفيز الزائفة لمقاومة المضادات الحيوية (Azam, & Khan, 2019).

جدول (4-2): تأثير الجنس والعمر في معدل الإصابة ببكتيريا *P.aeruginosa*

عامل الخطورة		الاصابة ببكتريا الزوائف الزنجارية العدد (%)
الجنس	الذكور	28 (70%)
	الاناث	12 (30%)
التحليل الاحصائي		X^2 Cal.=6.4 P< 0.05
العمر	(1-15)	3 (7.5%)
	(16-30)	13 (32.5%)
	(31-45)	19 (47.5%)
	(46-60)	5 (12.5%)
التحليل الاحصائي		X^2 Cal.=16.4 P< 0.05
حالات نقص المناعة		4 (100%)
استخدام مضادات الميكروبات لفترات طويلة		8 (80%)

4-3 تأثير اختلاف اماكن العزل من الجسم على معدل الاصابة بـ *P.aeruginosa*

اظهرت نتائج معدل توزيع الإصابة لمسحات جرثومية الزوائف الزنجارية المعزولة من الحروق وحسب مناطق الجسم حيث وجد أن أعلى نسبة لتواجد البكتيريا في منطقة الظهر حيث بلغت النسبة 66% بينما كانت اقل نسبة هي 35% في منطقة الوجه، تسبب الزائفة الزنجارية مجموعة واسعة من الالتهابات التي ترتبط بالجهاز البولي والجهاز التنفسي والجهاز الهضمي والحروق والجروح ، وكذلك مع

المواقع الأخرى (Herfindal & Gourley,2000)، أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن الحروق في منطقة الظهرهي أكثر المواقع التي يمكن الوصول إليها بواسطة *P.aeruginosa* بنسبة 66.6٪. قد يعزى ذلك إلى الانتشار الكبير لهذا الكائن الحي حول بيئة المستشفى كما ذكرنا سابقًا والتعرض لجروح الحروق لتلك البيئة، كانت النتائج متوافقة مع تلك النتائج التي تم الحصول عليها من خلال دراسات أخرى مماثلة (Kolmos *et al*.,1993; Xu *et al*.,2002).

ذكر (Pruitt *et al*., 1998) في سلسلة كبيرة من حالات العدوى المؤكدة في مركز الحروق التابع للجيش الأمريكي ، كانت 57 حالة موثقة من عدوى الجرح التي حدثت في مرضى الحروق وعولجت خلال الفترة 1986-1995 ، حيث سجلت 26 حالة من تجرثم الدم الثانوي بسبب الزائفة الزنجارية في مركز الحروق العسكري للولايات المتحدة الامريكية.

أشار (Kolmos *et al*.,1993) إلى أن الزائفة عامل ممرض مهم في مرضى الحروق ، 25-29٪ من مرضى الحروق يصبحون معرضين للعدوى خلال مسار مرضهم ، وربع المرضى المستعمرين يصابون بعدوى غازية (Invasive infection) يرتبط تسمم الدم بزيادة معدل الوفيات بنسبة 28٪ ، لأن هذه البكتيريا لها عوامل ضراوة معقدة تشمل الإنزيمات والسموم خارج الخلية والمركبات الخلوية مثل عديدات السكاريد الدهنية بالإضافة إلى القدرة على الحركة، من ناحية أخرى ، تشمل العوامل المرتبطة بالمضيف والتي تفضل الإصابة بالزائفة الزنجارية عمق الحروق ومدى انتشارها، والشيخوخة ،والإقامة الطويلة في المستشفى، والعلاج الجهازي (Broad spectrum) أو الموضعي بمضادات الميكروبات واسعة الطيف ، في السنوات الأخيرة كان هناك انخفاض في عدوى *Pseudomonas* الشديدة ، والتي تُعزى إلى الإزالة الجراحية الأسرع لجميع الأنسجة الميتة ، تليها التطعيم الفوري ، وإدخال مركبات الفضة الموضعية (Shariati *et al*., 2019).

من المحتمل أن تكون العدوى ناتجة عن فشل العاملين في تطهير أيديهم هي الطريق الرئيسي لانتشار الزائفة ، في وحدات الحروق تم تحديد معدات الحمام والمراتب الملوثة كمصادر للعدوى ، ولكن هناك القليل من الأدلة بشكل عام على إصابة المرضى بعدوى الزائفة الزنجارية، من مصادر غير حية ، على الرغم من حقيقة أن البكتيريا توجد بشكل متكرر في بيئة وحدة الحرق (Hauser & Sriram, 2005).

جدول (4-3): اماكن عزل الزوائف الزنجارية في مختلف مناطق الجسم

ت	منطقة العزل في الجسم	العدد	عدد العزلات	النسبة المئوية
1	الظهر	15	10	%66.6
2	البطن	30	12	%40
3	الاطراف العليا	15	6	%40
4	الاطراف السفلى	20	7	%35
5	الوجه	20	5	%25

4-4 التشخيص المختبري لبكتيريا الزوائف الزنجارية *P.aeruginosa*

4-4-1 انتاج صبغة البايوسيانين Pyocyanin pigment production

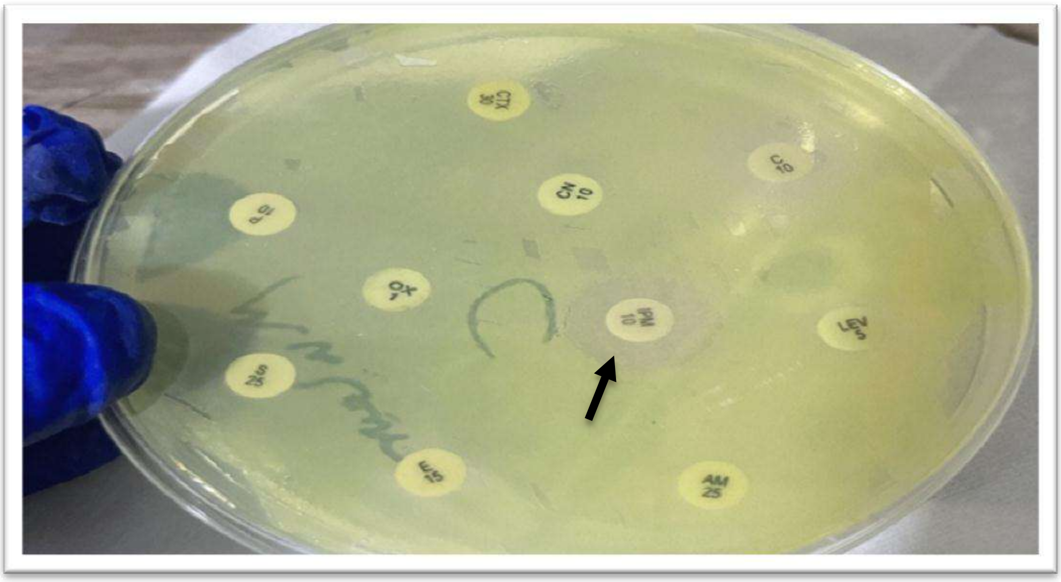
تم التحري عن انتاج صبغه البايوسيانين من 40 عزلة من بكتيريا الزوائف الزنجارية إذ أن 35 عزلة منها لها القابلية على انتاج صبغة البايوسيانين الخضراء المزرقة اي بنسبة 87.5 % وانه 5 فقط لم تنتج هذه الصبغة وهذا يتفق مع ما اشار إليه Abdulla ، (2016) من ان 92% من عزلات الزوائف الزنجارية تكون منتجة للصبغة البايوسين وتتشابه عزلات البكتيريا المدروسة في قابليتها الانتاجية (شكل4-2) ويعزى ذلك الى الاختلاف الاختيارات التغذية و موقع الخمج ، اذ ان وجود الكلوكوز بتركيز واطئ مع الكليسرول في الوسط الزراعي يحفز من انتاج صبغة البايوسيانين (Lau *et al*., 2004)، ومن جهة اخرى يتأثر الانتاج بعده عوامل بيئية منها الاس الهيدروجيني والتهوية ودرجة حرارة الحضن (Elbargisy, 2021). وتعد هذه الصبغة كمضاد حيوي لبكتيريا الزوائف الزنجارية في الطبيعة او موطنها البيئي كما اعتمدت هذه الصبغة لتشخيص بكتيريا الزوائف الزنجارية (El-Fouly *et al*., 2015).

تنتج بعض الانواع صبغات مضيئة florescent pigment تحت الاشعة فوق البنفسجية ونوع الزوائف الزنجارية pyocyanin الصبغة الخضراء و يتم تمييزها عن نوع *P.fluorescens* والتي تنتج صبغه مضيئة ايضاً، استنبت العزلات في وسط الاجار المغذي وحضنت بدرجة حرارة (4,41) درجة مئوية اذ ان الزوائف الزنجارية لا تنمو في درجة حرارة الادنى بينما الاخرى على العكس من ذلك (Ran *et al*.,2003)

شكل (2-4) مستعمرات الزوائف الزنجارية على وسط King A agar

2-4-4 حساسية البكتيريا المعزولة قيد الدراسة تجاه المضادات الحيويـة المستخدمة باستخدام طريقة الانتشار على الاطباق :

اظهرت الدراسة الحالية على بكتيريا الزوائف الزنجارية *P.aeruginosa* وجود مقاومـة لجميع انواع المضـادات الحيويـة التـي استخدمت فـي التجربـة ما عدا مضـاد Imipenem و الـذي اظهر قطر تثبيطي للبكتيريا بمقدار 8 ملم و ان المضادات الحيوية التـي استخدمت فـي التجربـة هـي Cefatoxime, Gentamicin،Cephalosporin، Penicillin، Oxacillin، Streptomycin، Erythromycin، Amoxicillin، Levofloxacin



شكل(3-4) مقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية

اظهـرت جـراثيم الزوائـف الزنجاريـة مقاومـة بنسـبة 100% لمضـادات الامبسـلين Ampicillin والاموكســـلين Amoxicillin و لنيمكومايســـين Lincomycin و التتراســـايكلين Tetracycline والارثرومايسين Erythromycin ، بينما اظهرت حساسيتها المطلقة اتجاه المضاد الحياتي Imipenem تظهر النتائج الموضحة في الشكل (4-3) زيادة ملحوظة في المقاومة الزائفة *P.aeruginosa* للمضادات الحيوية بيتا لاكتام ممثلة بالبنسلين والأمبيسلين والكاربنسلين والسيفيكسيم والسيفوتاكسيم والسيفتيزوكسيم والتيكارسيللين والبيبراسيلين والسيفيبيم ، حيث أن مستوى المقاومة يمثل الأول في أربعة مضادات حيوية (٪100) Ticarcillin ، Ceftizoxime ، Pipracillin ، Cefepime علـى التـوالي، أصـبحت مقاومـة Ampicillin وCephalosporin من الأمـور المهمـة فـي معظـم المستشفيات التـي وصـل فيهـا معدل المقاومة إلى مستويات عالية ، كانت هذه النتائج متوافقة مع تلك النتـائج التـي تم الحصـول عليهـاعن طريق دراسة أخرى لـ Hoffman *et al*., (2005) .

أن إنزيمـات بيتـا لاكتـاميز تحلـل جميـع العوامـل المضـادة للخلايـا الدهنيـة وعـلاوة علـى ذلـك يمكـن لبكتيريـا *P.aeruginosa* خاصـة فـي المرضـى الـذين يعـانون مـن الالتهابـات المزمنـة، أن تطـور غشـاء حيـويBiofilm أذ تـنغمس الخلايـا البكتيريـة فـي الـدهون المتعـددة السـكريات الخارجيـة المخاطيـة Lipopolysacarride لتصبح أكثر مقاومة لبيتا لاكتام وتقلل نفاذية الغشاء الخارجي التي تمكن البكتيريا مـن اكتسـاب المقاومـة (Del Barrio *et al*., 2019) تكمـن المشـكلة فـي أن حساسـية *Pseudomonas* يرتبط بتطور المقاومة أثناء العلاج (Winstanley *et al*.,2005). بيتا لاكتامازات بوساطة البلازميدات يمكن أن تؤدي إلى مقاومة العديد من البنسلينات والسيفالوسبورينات (Graig & Ebert, 1994).

5-4 حساسية البكتيريا المعزولة قيد الدراسة تجاه المضادات الحيوية المستخدمة باستخدام جهاز (VITEK-2)

باستعمال تقنية VITEK-2 المطورة حديثًا ، تم إجراء اختبار تشخيصي وحساسية لـ 10من العزلات البكتيرية من أجل الحصول على تشخيص أكثر دقة لجميع العزلات البكتيرية ولتحديد المضـادات الحيويـة التي تكون *P. aeruginosa* حساسة لها.

اظهرت نتائج الدراسة الحالية بانه جميع العزلات الـ 10 تنتمي الى عائلة الزوائف الزنجارية (ملحق (1))، أما بالنسبة للدراسة التي أجراها Ligozzi وفريقه عام (2002) والتـي أظهـرت تطـور هـذه التقنيـة بحيث يمكن تشخيص المضاد الحيوي المناسب لكل كائن حـي دقيـق ممـرض عن طريق بطاقة الحساسـية ،ونتيجة التشخيص في جهاز 2- VITEK اظهـرت جميـع العـزلات العشـرة انهـا تنتمـي إلـى بكتيريـا .P

aeruginosa بتشخيص ممتاز ويمكن القول أن هذه التقنية كانت ناجحة أما بالنسبة لاختبار حساسية الدواء وقياس أقل تركيز مثبط MIC للبكتيريا حسب البروتوكول (CLSI) ، فقد أظهر الجهاز 80 % عزلة من 10 عزلات من بكتريا *P. aeruginosa* تم عزلها من الحروق كانت مقاومة (R) للمضادات الحيويـة التاليـة: Ticarcillin و Ticarcillin / Clavulanic Acid و Piperacillin وCeftazidime وCefepime وImipenem و Meropenem و Amikacin و Gentamicin وTobramycin و Ciprofloxacin و Pefloxacin و Minocycline و Trimethopibi / Sulfamethoxazole وأظهرت 20% فقط من عزلات البكتيريا إجمالي 10 عزلة حساسية (S) للكوليستين بتركيزات أقل من نصف الحد الأدنى للتركيز المثبط (MIC). بالنسبة للعزلات التي أظهرت مقاومة (R) للمضادات الحيوية ، كانت نتائج أقل تركيز مثبط 128 MIC تجاه كل من Ticarcillin Clavulanic و Piperacillin و Tricavulin وأظهرت 64 MIC لكل من Ceftazidime وCefepime و Amikacin. فضلاً عن ذلك لوحظ وجود 16 MIC بالنسبة لـ Imipenem وMeropenem و Gentamicin و Tobramycin كما هو موضح في الملحق (2) ، وهذا يتفق مع ما ذكره Tam وآخرون. (2009) حول انتشار مقاومة الدواء. يعده بعض الباحثين أنه أكثر خطورة من المقاومة الأنزيمية بسبب عدم نفاذ غشاء البكتيريا لمضاد حيوي معين ، مما يجعله أحيانًا غير منفذ لمعظم المضادات الحيوية (Ciofu *et al*.,2019). تعتبر مقاومة المضادات الحيوية التي تمتلكها بكتيريا *P. aeruginosa* من أخطر أنواع المقاومة للمضادات الحيوية والمطهرات. توجد بكتيريا *P. aeruginosa* في مجموعة متنوعة من البيئات ، بما في ذلك الماء والتربة ، ووفقًا للباحثين ، يمكن تفسير حقيقة أن بعض العزلات أظهرت مقاومة متعددة من خلال حقيقة أن البكتيريا تمتلك حاجزًا ذاتيًا في شكل طبقة الغشاء الحيوي (Biofilm formation)، كان هذا أيضًا الاستنتاج الذي توصل إليه الباحثون(Pang *et al*., 2019). نتيجة لذلك ، لا يمكن التغلب على هذه المقاومة حتى عن طريق إعطاء جرعات عالية نسبيًا من هذه المضادات الحيوية بكميات كبيرة. من الممكن التغلب على مقاومة هذه البكتيريا عن طريق إعطاء جرعة أعلى من المضاد للبكتيريا ، أي عن طريق خلط مثبطات مماثلة في تركيبها لمضادات الجراثيم مثل المضادات الحيوية بيتا لاكتام أو البنسلينات واسعة الطيف ، حتى تكون فعالة ضد بكتيريا *P. aeruginosa* ، وهذا ما اتفق عليه الباحثون (Kadar *et al*.,2010).

لوحظ في السنوات الأخيرة زيادة في مقاومة الاحياء المجهرية للمضادات الحيوية نتيجة الاستخدام المتزايد لهذه العوامل العلاجية وخصوصا في الامراض المزمنة كما ورد في Omar *et al*.,(2000) وهذا يفسر توجه العديد من الباحثين لإيجاد بدائل للعديد من الحالات التي تحدث فيها مقاومة فالمكونات

الجديدة والتي تكون مختلفة في تأثيرها قد تكون هي الحل لمشكلة مقاومة العقاقير (drug resistance problem) ، وافضل هذه المصادر هي النباتات الطبيعية او الطبية لتواجدها في الطبيعة ،

لذا عمدت الدراسة الحالية لاختيار مجموعة من النباتات المحلية و المعروفة باستعمالاتها الطبية لاختبارفعاليتها و كفاءتها ،اذ ان جميع العزلات الجرثومية أظهرت مقاومة المضادات الحيوية، إذ اعتمدت الحروق بوصفها مصدراً للحصول على هذه العزلات الجرثومية نظراً لكون هذه الحروق اذا ما تلوثت فان نسبة عالية من الزوائف الزنجارية تبدأ بالنمو و تكون مقاومة للمضادات الحياتية بسبب تعرضها المستمر لمختلف انواع المطهرات المستخدمة في التعقيم و معالجة هذه الجروح و الحروق،كما ان هذه البكتيريا من المسببات للاصابات المكتسبة في المستشفيات (Hospital acquired injuries) والتي تمتاز بمقاومتها العالية للمضادات الحيوية (Tredget *et al*., 2004)، وهذا ما يفسر حدوث التهاب في العمليات و الجروح والحروق رغم العناية التي يتلقاها المصاب قبل و بعد العمليات.

كما نلاحظ ان جميع عزلات الجرثومة المعزولة خلال الدراسة كانت مقاومة لمضادات اللينمونايسين و البنسلين والامبسلسن والاموكسلين نتيجة كثرة استخدام هذه المضادات في العلاج حالات الاصابات الجرثومية فتولدت لدى هذه الجراثيم وسلالاتها مقاومة اتجاه هذه المضادات، كما تقود المقاومة بعض انواع الجراثيم لبعض أنواع المضادات الحيوية (Romão *et al*., 2005).

واحيانا تكون المقاومة بسبب حدوث طفرة وراثية في الخلية الجرثومية والتي تحدث بفعل الاشعاع او الاشارات الكيمائية (Romão *et al*., 2005) او بسبب انتاج بعض الجراثيم مواد مثبطة للمضادات الحيوية . ذكر (Gellatly& Hancock,2013) ان هذه البكتيريا تلعب دوراً في الحروق الناتجة عن الاصابات المكتسبة في المستشفيات وكذلك اهمية هذه في الاصابات المتكررة التي تحصل في المجاري البولية ويعد سبب كثرة هذه البكتيريا وقابليتها على النمو والتكاثر في الجلد هو امتلاكها بعض عوامل الضراوة وقدرتها على غزو انسجة المضيف وذلك عن طريق إنتاج انزيمات خارج الخلية وسموم تعمل على تعطيل الحواجز الفيزيائية وتحطيم خلايا المضيف ومقاومتها لعملية البلعمة وامتلاكها سوط قطبي الذي يساعدها على الحركة باتجاه الخلية المبطنة والمخاطية للجلد عند الحرق والالتصاق بها ومن ثم اختراق الخلايا المخاطية مما يؤدي إلى زيادة مقاومتها لأنواع عديدة من المضادات الحيوية.

6-4 تقدير قابلية العزلات البكتيرية على إنتاج الغشاء الحيوي

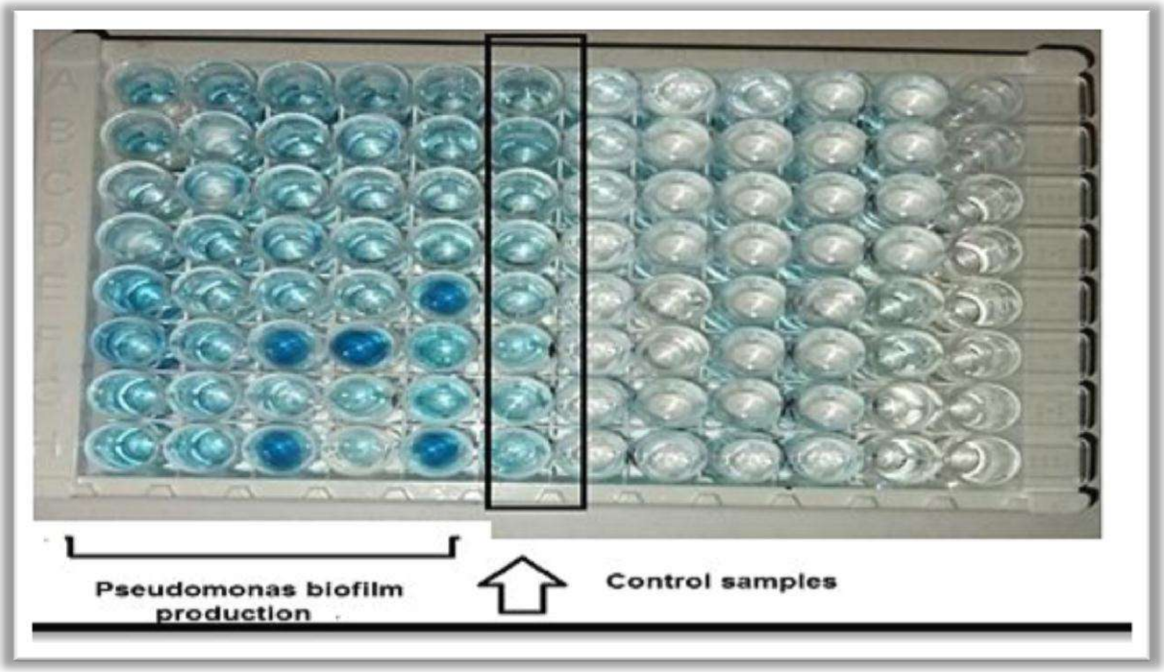
Estimation the ability of bacteria to biofilm production

اظهرت نتائج الدراسة ان (37)عزله بكترية وبنسبة 92.5% كانت منتجة للغشاء الحيوي في حين كانت بقية العزلات بمجموع (3) وبنسبة 7.5% غيرمنتجة أوضعيفة الانتاج وكما موضح في الجدول (4-4) والشكل (4-4) هذه النتائج تتفق مع الدراسة التي أجراها الباحثون(O'Toole *et al*., 2000). كان عدد البكتريا المنتجة للغشاء الحيوي المتوسط (32) وبنسبة 80% والمنتجة للغشاء الحيوي القوي 5 عزلات بكتيريا وبنسبة 12.5%. وأظهرت نتائج صفيحة المعايرة الدقيقة أنه عندما تزرع بكتريا *P.aeruginosa* الأغشية الحيوية في الصفيحة ذات عيار دقيق لأكثر من 12 ساعة ، لوحظ أن الأغشية الحيوية تزرع في الحفر الصفيحة إذ كانت أكثر سمكًا (مع امتصاص أعلى لصبغة البنفسجي البلوري عند 630 نانومتر) اذ انها ترتبط بشكل غير محدد بجزيئات السطح سالبة الشحنة مثل الدهون المتعددة السكريات LPS و eDNA خارج الخلية لأنها تربط الخلايا وكذلك مكونات الصحيفة (Knezevic & Petrovic,2008).

تحدث الاصابة المرتبطة بالأغشية الحيوية بشكل متكرر في المستشفيات وتتطلب تحديدًا تشخيصيًا سريعًا لأنها مقاومة للعلاج بالمضادات الحيوية وتتطلب العلاج بطرق بديلة و خاصة و يعد اختبار البنفسج البلوري أحد الاختبارات الميكروبيولوجية القياسية في المختبرات حيث يحدد بشكل غير مباشر كمية الغشاء الحيوي عن طريق قياس الكثافة الضوئية (OD) لمصفوفة وخلايا الأغشية الحيوية البلورية المصبوغة باللون البنفسجي (Ebert *et al*., 2021). إن بكتريا *P. aeruginosa* المعزولة من مرضى الحروق تكون ذات مقاومة عالية للعديد من المضادات االحيوية 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 بدورِهِ قد يؤثر على معدل امتصاص المضادات الحيوية Ekrami & Kalantar,2007).

جدول (4-4) الامتصاصية لبكتيريا *P.aeruginosa* باستعمال جهاز فحص المقايسة المناعية المرتبط بالانزيم وطول موجي 530 نانوميتر.

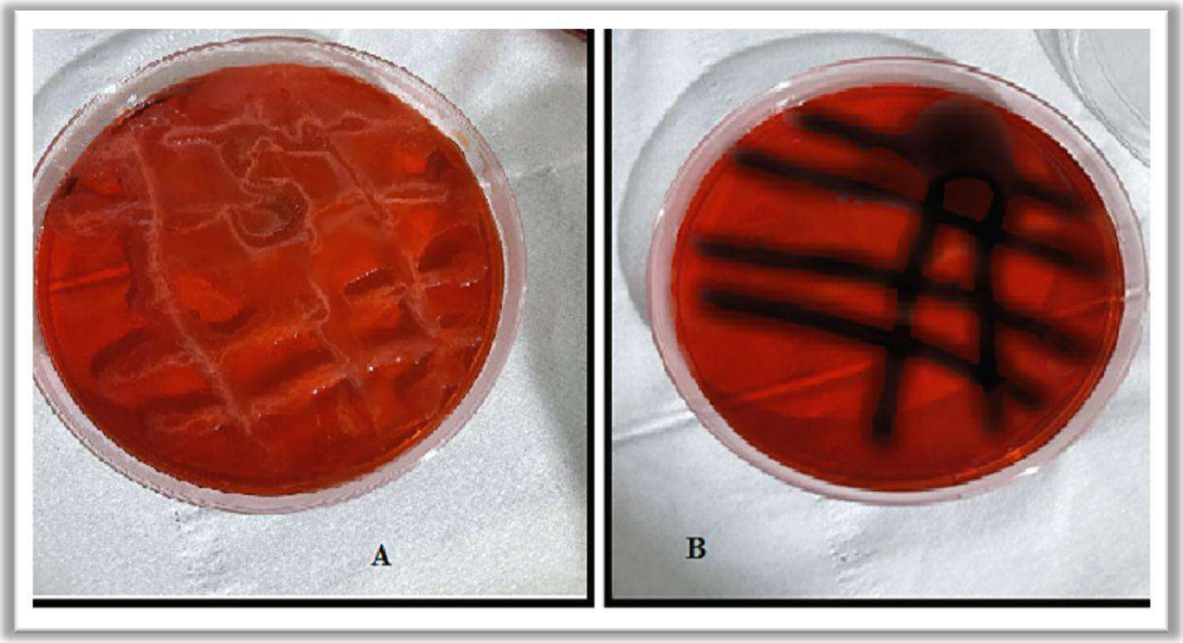
	1	2	3	4	5	6
A	0.171	0.17	0.183	0.173	0.197	0.0191
B	0.166	0.121	0.199	0.14	0.149	0.0235
C	0.201	0.125	0.189	0.199	0.236	0.0849
D	0.114	0.251	0.221	0.117	0.119	0.0259
E	0.192	0.22	0.143	0.146	0.255	0.0263
F	0.17	0.178	0.267	0.248	0.233	0.0185
G	0.169	0.158	0.135	0.199	0.127	0.0222
H	0.22	0.198	0.242	0.238	0.25	0.0173
	1	2	3	4	5	6
A	متوسط	متوسط	متوسط	متوسط	متوسط	سيطرة
B	متوسط	ضعيف	متوسط	متوسط	متوسط	سيطرة
C	متوسط	ضعيف	متوسط	متوسط	متوسط	سيطرة
D	ضعيف	متوسط	متوسط	متوسط	متوسط	سيطرة
E	متوسط	متوسط	متوسط	متوسط	قوي	سيطرة
F	متوسط	متوسط	قوي	قوي	متوسط	سيطرة
G	متوسط	متوسط	متوسط	متوسط	متوسط	سيطرة
H	متوسط	متوسط	قوي	متوسط	قوي	سيطرة



شكل (4-4) بكتريا *P.aeruginosa* المنتجة للغشاء الحيوي في الصحيفة المعيارية (Microtiter plate).

7-4 قابلية بكتريا الزوائف الزنجارية على إنتاج الغشاء الحيوي بإختبار أحمر الكونغو (Congo red agar):

اثبتت الدراسة الحالية قابلية البكتيريا علي انشاء مستعمرات والذي تكون باللون الاسود الغامق على الوسط الذي يحتوي على صبغه الكونغو الحمراء اجري اختبار أجار الكونغو الأحمر لتقييم قدرة *P. aeruginosa* على إنتاج كبسولة (المحفظة) كاختبار افتراضي لتشكيل الأغشية الحيوية باستعمال طريقة أجار الكونغو الأحمر باتباع البروتوكول الموصوف في عام 1989 (Freeman *et al*., 1989). في هذا الاختبار ، تم استخدام صبغة الكونغو الحمراء يستخدم كمؤشر لـلأس الهيدروجيني ، يظهر اللون الأسود عند درجة الحموضة (PH range) بين 3.0 و 5.2. تم زرع البكتريا على الأطباق التي تحتوي على وسط أجار أحمر الكونغو واحتضانها في بيئة هوائية لمدة 24 إلى 48 ساعة عند 37 درجة مئوية. بعد هذه الفترة ، تم اعتبار المستعمرات ذات اللون الأحمر الداكن أو الأسود ، ذات الاتساق الجاف أو البلوري ، منتجة للأغشية الحيوية القوية (Strong biofilm) . المستعمرات الحمراء ذات المظهر الفاتح في الوسط تعتبر غير منتجة للغشاء الحيوي (Weak or none produce biofilm) شكل(4-5)



شكل (4-5) مستعمرات الزوائف الزنجارية (A) يمثل مستعمرات ذات لون وردي فاتح غيرمنتجة للغشاء الحيوي او منتجة للغشاء الحيوي الضعيف (B) مستعمرات ذات لون اسود على وسط اكار الاحمر الكونغو المنتجة للغشاء الحيوي القوي

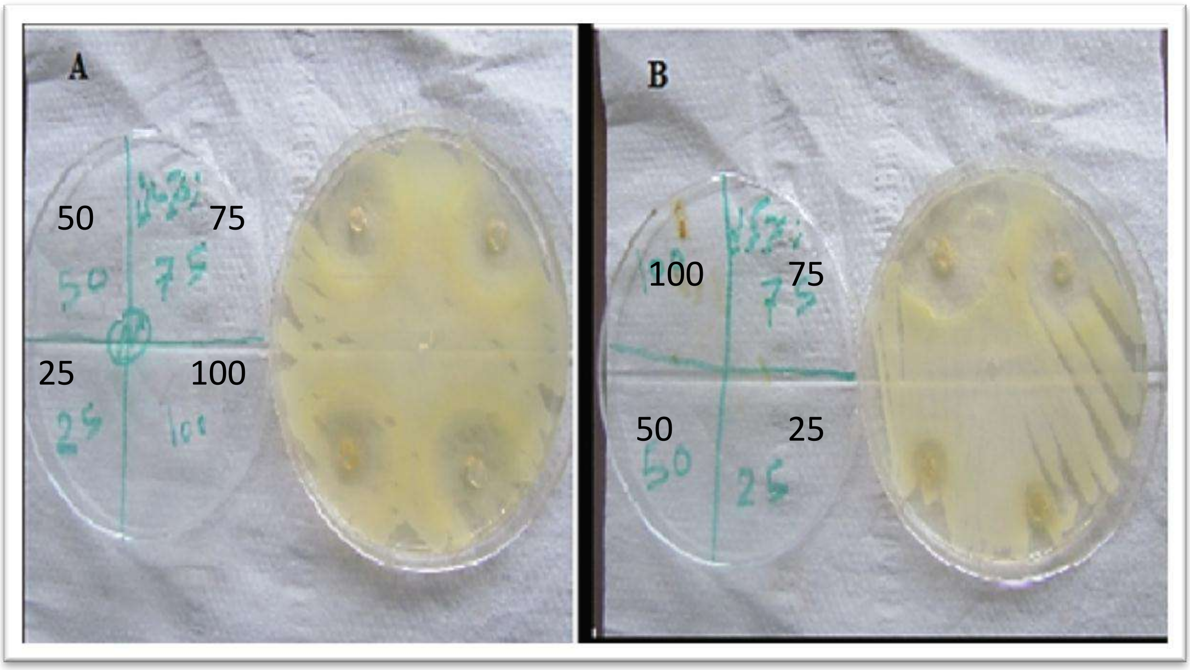
4-8 تقييم فعالية مستخلصات المذيبات العضوية

4-8-1 تقييم فعالية مستخلص الزعتر(Thyme Extract) المائي والكحولي

تمّ التحري عن التركيز المثبط الأدنى لمستخلص الزعتر المائي والكحولي ، وقد كان إختيار هذه المستخلصات بمقدار الزيادة الحاصلة في المقاومة التي تبديها عزلات *P. aeruginosa* لمضادات البيتالاكتام واسعة الطيف بصورة عامة، إذ إنّ المضادات الحيوية ، كانت ومازالت تمثل الخيار العلاجي الأمثل للعلاج ضد أصابات العصيات السالبة لصبغة غرام، وخصوصا *P. aeruginosa* ، ولكن ونتيجة للإستعمال المفرط والمتكرر وغير المدروس لهذه المضادات محليا و عالمياً - لوحظ تزايد مقاومة البكتريا لها (Livermor, *et. al*, 2007). تم إختبار جميع عزلات *P. aeruginosa* والبالغ عددها 40 والمشخصة بطريقة إنتشار القرص لكيربي- باور (Bawer *et al*., 1966)، وتم تحديد مستويات التركيز المثبط الأدنى لنمو عزلات *P. aeruginosa* من قبل المستخلص المذكور أعلاه وبالاعتماد على (Yang *et al*., 2019).

اظهر المستخلصان المائي والكحولي لنبات الزعتر فعالية تثبيطية اتجاه بكتريا *P.aeruginosa* وزيادة هذه الفعالية مرتبط مع زيادة التركيز اذ بلغت اقطار التثبيط عند تركيز 25ملغم/مل للمستخلصين

المائي والكحولي (8.5±0.89 و10.12 ±1.17) ملم على التوالي وعند تركيز 50ملغم/مل بلغت (15.30±2.17 و17.20±0.75) ملم على التوالي وكانت الفعالية بأحسن حالها عند تركيزين 75و100ملغم/مل اذ بلغت اقطار التثبيط (20.40± 1.48و22.10±2.00) ملم و(24.60±1.60 و26.40± 1.33) ملم على التوالي للمستخلصين المائي والكحولي لنبات الزعتر كما موضح في الشكل (4-6) والجدول (4-13).



شكل (4-6) الفعالية التثبيطية للمستخلص المائي (A) والمستخلص الكحولي (B) للزعتر ضد بكتريا *P.aeruginosa* المعزولة من مرضى الحروق.

وكان واضحا بان المستخلص الكحولي لنبات الزعتر هو الأكثر في الفعالية التثبيطية مقارنة بالمستخلص المائي وتطابق هذه النتائج مع ما ذكره Nzeako *et al*., (2006) عندما استخدم مستخلص الزعتر مع بكتريا الزوائف الزنجارية .

اظهرت الزيوت الأساسية فعالية واضحة ضد البكتريا مثل الزعتر والأوريجانو والنعناع والقرفة والكمون والقرنفل والأوكالبتوس حيث تمتلك أقوى الخصائص المضادة للميكروبات، كما و أن لديها مجموعة من المواد الكيميائية الفعالة ، يمكن اعتبار الزيوت الأساسية كمستخلصات نباتية تظهر نشاطًا مضادًا للميكروبات ، ولها أيضًا خصائص مضادة للأكسدة ، مكونات صحية لمنتجات اللحوم (Boskovic *et al*., 2015). إذا تم استخدامها في منتجات اللحوم ، فإن هذه السوائل الزيتية العطرية التي يتم الحصول عليها من مجموعة متنوعة من المواد النباتية يمكن أن تقلل من حدوث الأمراض التي تنقلها الأغذية و يؤخر أكسدة الدهون كذلك. Ozogul وجماعته (2020) اوضح بانه من الممكن استخدام

بعض المستخلصات النباتية من أجل تحديد مضادات الميكروبات لنشاط العديد من الزيوت الأساسية ، والزيوت العطرية من الزعتر والأوريجانو وهي تلك التي تظهر تأثيرات كبيرة و واسعة من نشاط المضادات الحيوية ضد الجراثيم التي تثير الالتهابات المكتسبة من المستشفيات. من خلال نشاط واسع للزيوت الأساسية ، وكذلك النشاط التآزري ، يمكن أن تجعلهم علاجا ذا قيمة ضد السلالات البكتيرية المقاومة للأدوية المتعددة (Sakkas & Papadopoulou, 2017).

يعد الزعتر من النباتات التي تقدم مجموعة متنوعة من الفوائد وذلك لوجود العديد من المواد الكيميائية والمكونات بما في ذلك ما يلي: يحتوي الزيت العطري الذي يحتوي على تركيز 0.5 في المائة على ما يصل إلى 15 % من الثيمول. الثيمول عبارة عن مواد كيميائية فينولية عديمة الرائحة مسؤولة عن الرائحة المميزة للزعتر. كلاهما موجودان Origanene و carvacrol. الكالسيوم والحديد والمنغنيز كلها أمثلة على المعادن والفيتامينات ، بما في ذلك فيتامين أ ، وفيتامين ب 6 ، وفيتامين ج ، من بين فيتامينات أخرى (Sadeq *et al*., 2019).

يرجع عمل (Catechin) مبيد الجراثيم إلى توليد بيروكسيد الهيدروجين يرجع أعلى نشاط مضاد للميكروبات إلى وجود مادة البوليفينول بمضادات الاكسدة التي تضر بغشاء الخلية البكتيرية. فيما يتعلق بحساسية مضادات الميكروبات ، فقد ثبت أن EGC و EGCG يظهران أعلى تأثير مضاد للميكروبات (Gopal *et al*., 2016).

بالنسبة الى مركب (Naringenin) هو فلافونويد مشتق من النبات وله خصائص مضادة للبكتيريا فقد اوضح الباحث (Tiza *et al*., 2015)، بانه تأثير توليفات من Naringenin مقارنة مع أربعة مضادات حيوية كانت ذا تاثير معنوي وواضح ضد سلالتين من Staphylococcus aureus عن طريق تحديد الحد الأدنى من التركيزات المثبطة باستخدام اختبارات انتشار القرص ومقايسات التخفيف الجزئي للمرق في فحص انتشار القرص، كما اشار (Celiz *et al*., 2011) أنه من الممكن الحصول على مشتقات Naringenin ذات النشاط المضاد للميكروبات ، خاصة ضد البكتيريا المسببة للأمراض إيجابية الجرام عن طريق دراسة حول التعديلات الهيكلية في الجزيئات النانوية المحملة لتعزيز النشاط المضاد للميكروبات الجرثومية. اوضحت نتائج التحليل الكيميائي للعناصر الفعالة الموجودة في مستخلص الزعتر المائي بان فعاليته التثبيطية يرجح انها تعود لوجود المركب الكيميائي (Catechin) والمركب (Naringin) كما في الجدولين (4-5)،(4-6)

جدول (4-5) المركبات الفعالة و زمن الاحتجار(دقيقة) ومسـاحة الذروة والتركيز لمـادة الزعتر المـائي باستخدام تقنية HPLC

ت	المركبات الفعالة	زمن الاحتجار Rt (دقيقة)	مساحة الذروة Area%	التركيز مايكروغرام/مل
1	Gallate epicatechin	1.977	34537	4.6862
2	catechin	2.892	53067	7.2005
3	Rutin	4.217	52099	7.0691
4	Naringin	5.175	105787	14.3539
5	Quercetin	6.31	116652	15.8281
6	Luteolin	7.058	98967	12.343
7	Hespertin	8.147	125825	17.0727
8	Apigenin	9.22	57211	7.7628
9	Tyrosol	10.072	49578	6.7264

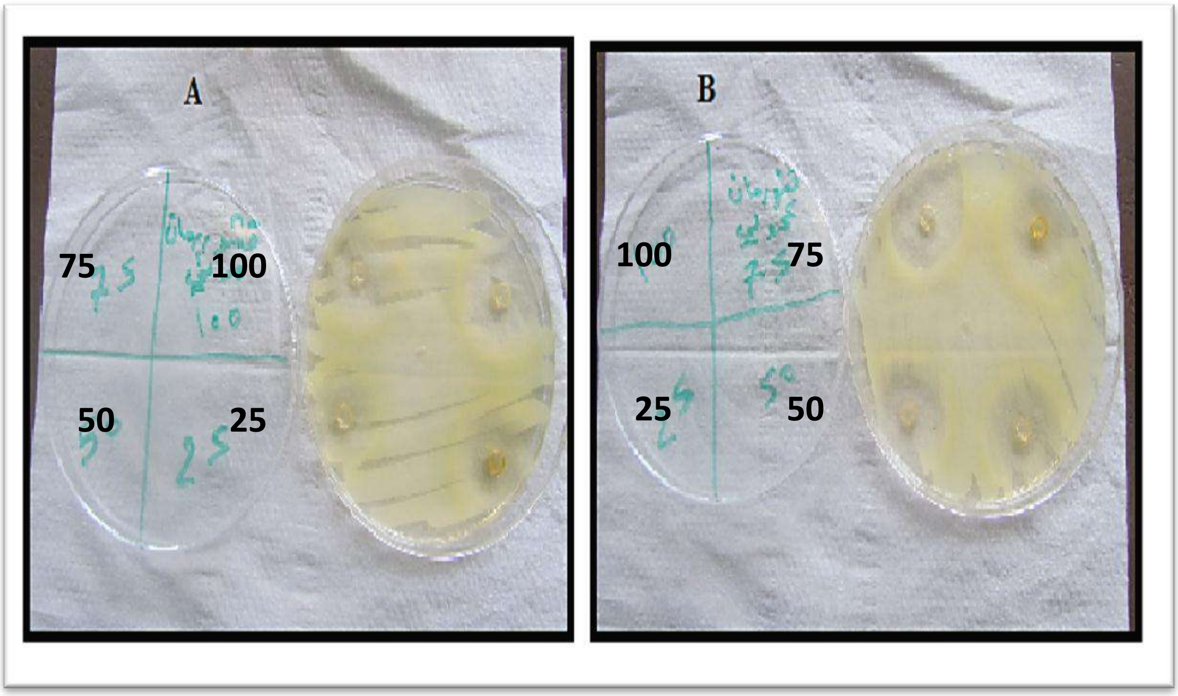
جدول (4-6) المركبات الكيميائية الفعالة و زمن الاحتجار(دقيقة) ومساحة الذروة والتركيز لمستخلص الزعتر الكحولي باستخدام تقنية HPLC

ت	المركبات الفعالة	زمن الاحتجار Rt (دقيقة)	مساحة الذروة Area%	التركيز مايكروغرام/مل
1	Gallate epicatechin	1.963	44985	5.3281
2	catechin	2.878	60804	7.2017
3	Rutin	4.195	52680	6.2394
4	Naringin	5.14	106575	12.6228
5	Quercetin	6.297	132827	15.732
6	Luteolin	7.062	105783	12.529
7	Hespertin	8.137	154341	18.2807
8	Apigenin	9.202	58282	6.903
9	Tyrosol	10.063	53836	6.3764

4-8-2 تقييم الفعالية التثبيطية لمستخلص قشور الرمان *Punica granatum* المائي والكحولي

تم إختبار جميع عزلات *P.aeruginosa* والبالغ عددها 40 والمشخصة بطريقة انتشار القرص لكيربي- باو، وتم تحديد مستويات التركيز المثبط لنمو عزلات *P. aeruginosa* من قبل المستخلص المذكور أعلاه، وبالاعتماد على Karthikeyan, & Vidya, (2019) .

اظهرت المستخلصات المائية والكحولية لقشور الرمان فعاليته التثبيطية اتجاه بكتريا *P.aeruginosa* وزيادة هذه الفعالية مرتبط مع زيادة التركيز اذ بلغت اقطار التثبيط عند تركيز 25ملغم/مل للمستخلصين المائي والكحولي (8.00±1.00 و11.70± 1.03) ملم على التوالي وعند تركيز 50ملغم/مل بلغت (11.30±1.44 و16.50±0.85) ملم على التوالي وكانت الفعالية بأحسن حالها عند تركيزين (75 و100)ملغم/مل اذ بلغت اقطار التثبيط (18.30± 0.68 و23.10± 1.11) ملم و(23.50± 1.68 و27.60± 1.14) ملم على التوالي للمستخلصين المائي والكحولي لقشور الرمان على التوالي .



شكل (4-7) الفعالية التثبيطية للمستخلص المائي (A) والمستخلص الكحولي (B) لقشور الرمان ضد بكتريا *P.aeruginosa* المعزولة من مرضى الحروق.

وكان واضحا بان المستخلص الكحولي لقشور نبات الرمان هو الأكثر تثبيطاً في الفعالية على المستخلص المائي وتطابق هذه النتائج مع ما ذكره (Devatkal *et al*., 2013).عندما استعمل مستخلص قشور الرمان مع بكتريا الزوائف الزنجارية *P. aeruginosa* ، حيث لاحظ بانه النشاط المضاد للبكتيريا لمستخلص قشور الرمان من خلال منطقة التثبيط الواضحة في الوسط الغذائي بالمستخلص. كان قطر مناطق التثبيط أعلى معنوياً (P <0.05) في مستخلص قشور الرمان مقارنة بأقراص المضادات الحيوية القياسية التتراسيكلين ، الفانكومايسين والستربتومايسين ، كما أظهرت نتائجه باستخدام اختبار الانابيب (Microdilution) أيضًا أن مستخلص قشور الرمان عند 1٪ و 5٪ و 10٪ كانت فعالة في تثبيط نمو البكتيريا في صفيحة الاختبار. علاوة على ذلك ، لوحظ أيضًا انخفاض تدريجي في نمو الخلايا البكتيرية عندما نمت في المزرعة البكتيرية بتراكيز مختلفة من جنبًا إلى جنب مع مجموعة السيطرة (Control).

قام (Al-Zoreky, 2009) بتقييم النشاط المضاد للميكروبات ضد بعض مسببات الأمراض التي تنتقل عن طريق الغذاء من خلال مستخلصات مختلفة من قشور فاكهة الرمان باستخدام الطرق المختبرية (انتشار الأجار). كان المستخلص الميثانولي بنسبة 80٪ من القشور مثبطًا قويًا (*L. monocytogenes* ، *S. aureus* ، *E.coli* حيث كان أدنى تركيز مثبط (MIC) لـ مستخلص الرمان عنده ضد *Salmonella enteritidis* هو الأعلى (4 مجم / مل).

يتم تفسير فعالية التانين (Tannic acid) المضادة للبكتيريا عن طريق قدرتها على المرور عبر جدار الخلية البكتيرية حتى الغشاء الداخلي ، والتداخل مع عملية التمثيل الغذائي للخلية ، ونتيجة لذلك ، تدميرها في البكتيريا موجبة والسالبة لصبغة الجرام (Kaczmarek , 2020)، كما اشار الباحث Lou *et al*.,(2011) . بأنه من أهم مركبات المستخلص المائي والكحولي للرمان هو مركب (Naringenin) وهو فلافونويد مشتق من النبات وله خصائص مضادة للبكتيريا فقد اوضح الباحث (Tiza *et al*., 2015)، بأنه تأثير توليفات من Naringenin مقارنة مع أربعة مضادات حيوية كانت ذا تاثير معنوي وواضح ضد سلالتين من *Staphylococcus aureus* عن طريق تحديد الحد الأدنى من التراكيز المثبطة باستخدام اختبارات انتشار القرص ومقاسات التخفيف الجزئي للاكار في فحص انتشار القرص، كما اشار (Celiz *et al*., 2011). أنه من الممكن الحصول على مشتقات Naringenin ذات النشاط المضاد للميكروبات ،خاصة ضد البكتيريا المسببة للأمراض إيجابية الجرام عن طريق دراسة حول التعديلات الهيكلية في الجزيئات النانوية المحملة لتعزيز النشاط المضاد للميكروبات الجرثومية.

أظهرت البيانات من قيم التركيز المثبط الأدنى (MIC) أن وجود المركب الفعال chlorogenic acid منع بشكل فعال نمو جميع مسببات الأمراض البكتيرية المختبرة ، وكانت قيم MIC تتراوح من 20 إلى 80 ميكروغرام / مل كما أشار التحقيق في طريقة عمل حمض chlorogenic acid ضد العامل الممرض إلى أن حمض chlorogenic acid زاد بشكل كبير من نفاذية الغشاء الخارجي والبلازما ، مما أدى إلى فقدان وظيفة الحاجز ، حتى التسبب في تسرب طفيف للنيوكليوتيدات.

اوضحت نتائج التحليل الكيمائي للعناصر الفعالة الموجودة في مستخلص الرمان المائي ان فعاليته على تثبيط بكتيريا *P.aeruginosa* قد تعود إلى وجود المركب الكيميائي (Tannic acid) والمركب (Chlorogenic acid) كما موجود في جدول (4-7) (4-8) حيث سجل التركيزين معا 7.3229 و21.7742 مايكروغرام/مل في مستخلص قشور الرمان المائي على التوالي و 9.8014 و 10.8182 لكلا التركيزين في مستخلص الرمان الكحولي على التوالي.

جـدول (4-7) المركبـات الفعالـة و زمـن الاحتجار(دقيقـة) ومسـاحة الـذروة والتركيـز لمـواد مسـتخلص الرمان المائي باستخدام تقنية HPLC

التركيز مايكروغرام/مل	مساحة الذروة Area%	زمن الاحتجار Rt (دقيقة)	المركبات الفعالة	ت
7.3229	65985	1.023	Tannic acid	1
21.7742	196203	1.893	Chlorogenic acid	2
19.4221	175008	3.11	Pyrogalol	3
9.7554	87904	4.093	Chlorogenic acid	4
5.9921	53994	4.913	catechin	5
6.0252	54292	5.665	rutin	6
8.1726	73642	6.503	P-coumarin	7
6.0344	54374	7.395	Acacetin	8
11.9045	107269	8.440	Kaempferol	9

جدول (4-8) المركبات الفعالة وزمن الاحتجار(دقيقة) ومساحة الذروة والتركيز لمواد مستخلص الرمان الكحولي باستخدام تقنية HPLC

التركيز مايكروغرام/مل	مساحة الذروة Area%	زمن الاحتجار Rt (دقيقة)	المركبات الفعالة	ت
9.8014	115355	1.027	Tannic acid	1
10.8182	127345	1.853	Chlorogenic acid	2
9.8592	116055	3.10	Pyrogalol	3
10.9326	128691	4.105	Chlorogenic acid	4
13.639	168549	4.925	catechin	5
10.7156	126137	5.683	rutin	6
12.239	144069	6.525	P-coumarin	7
11.235	132250	7.428	Acacetin	8
10.7681	1266660	8.417	Kaempferol	9

3-8-4 تقييم الفعالية التثبيطية لمستخلص أوراق نبات التيكوما *Tecoma stans* المائي والكحولي

تم إختبار جميع عزلات *P. aeruginosa* والبالغ عددها 40 والمشخصة بطريقة إنتشار القرص لكيربي- باو، وتم تحديد مستويات التركيز المثبط لنمو عزلات *P. aeruginosa* من قبل المستخلص المذكور أعلاه، وبالاعتماد على (Soliman *et al*., 2022).

إذ بينت النتائج أن المستخلص المائي لنبات التيكوما يمتلك فعالية تثبيطية عالية تجاه بكتريا الزوائف الزنجارية *P.aeruginos* وزيادة فعاليته المضاد للمستخلص مرتبط مع زيادة التركيز اذ بلغت اقطار التثبيط عند تركيز 25ملغم/مل للمستخلص المائي(12.70 ±0.96) ملم على وعند تركيز 50ملغم/مل بلغت (18.50±1.40) وكانت الفعالية باحسن حالها عند تركيزين 75ملغم/مل و100ملغم/مل اذ بلغت اقطار التثبيط (26.00±1.62) ملم و(32.30±1.43) ملم على التوالي ، وهذا يتفق مع (Bakr *et al*.,2019) إذ أظهرمستخلص نبات التيكوما *T. stans* نشاطًا جيدًا في مضادات الميكروبات في المختبر ، خاصةً ضد المكورات العقدية *Streptococcal pyogenes* .

إن إمكانات المبيدات الحيوية لبعض الأنواع من جنس التيكوما معروفة جيدًا، وان من اهم فوائدها هي تعمل في تغيرات قوية في بنية جدار الخلية للبكتيريا المختلفة إيجابية الجرام (Al-Azzawi *et al*., 2012).كما أظهرنبات التيكوما *T. stans* في المذيبات المختلفة نشاطًا مضادًا للميكروبات ، ويرجع ذلك على الأرجح إلى وجود مركبات الفلافونويد والتربين (Anand *et al*., 2021). ومن المثير للاهتمام أن المستخلصات المائية لنبات التيكوما *T. stans* أنتجت أفضل تأثيرات مضادات الميكروبات ، حيث أظهرت نشاطًا متوسطًا لمضادات الميكروبات ضد *Staphylococcus aureus* و *Staphylococcus epidermidis* و *Serratia marcescens* و *Proteus vulgaris* (Bakr *et al*.,2019).

اظهرت التجارب العملية على المستخلص الكحولي لنبات التيكوما *T. stans* فعاليته التثبيطية لبكتيريا الزوائف الزنجارية والبالغ عددها 40 والمشخصة بطريقة إنتشار القرص لكيربي- باوز اظهرت النتائج ان المستخلص الكحولي لنبات التيكوما يمكتلك فعالية ضد بكتريا الزوائف الزنجارية وان قابليته على مقاومة البكتيريا تزداد بزيادة التركيز المستخلص من النبات اذ بلغت اقطار التثبيط عند تركيز 25ملغم/مل للمستخلصين الكحولي (10.40 ±1.04) ملم وعند تركيز 50ملغم/مل بلغت (15.5±0.89) ملم فقط في المستخلص الكحولي وكانت الفعالية باحسن حالها عند تركيزين 75 ملغم/مل و100ملغم/مل اذ بلغت اقطار التثبيط (23.60 ±1.38) للتركيز 75ملغم/مل و(30.10±1.5) على التوالي للمستخلصين

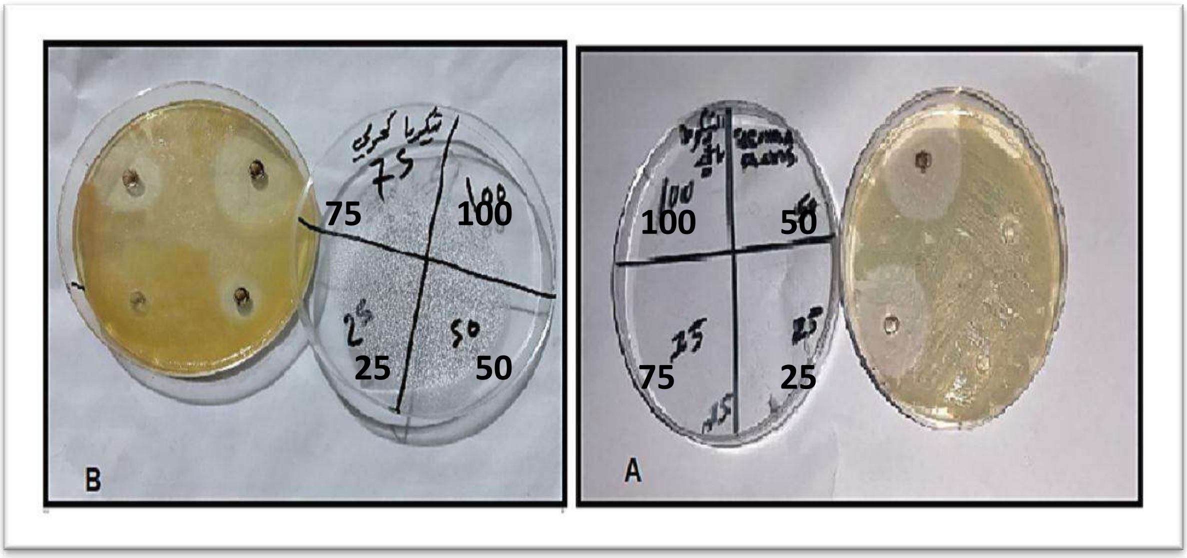
الكحولي لنبات التيكوما وهذا يتفق مع(Mohamed *et al*.,2013) كما في شكل (4-8) وجدول(4-13).

يحتوي نبات التيكوما على مركبات ال الفلافونويد والتربين و الالكنويد وهذه المركبات لها القابلية على مكافحة انواع مختلفة من الاحياء الدقيقة كما ان هذه المركبات تكون لها القابلية على الذوبان في المستخلصات الكحولية بصورة كاملة مما يؤدي الى زيادة فعالية المستخلص الكحولي و زياده كفاءته في مكافحة البكتيريا المختلفة سواء كانت موجبة او سالبة لصبغة كرام (Savitri *et al*., 2019).

يعود تركيز المواد الفعالة الموجودة في مستخلص النباتي للتيكوما المائي والكحولي على الارجح الى وجود مادة (Quercetin-3-methylether) ذات تركيز (23.9087) مايكروغرام لكل مل و(25.2099) مايكروغرام لكل مل على التوالي إذ أن لديها قابلية تثبيط واضحة ضد البكتريا الموجبة والسالبة وهذا ما أوضحه (Ibewuike *et al*., 1997) حيث تم تنقية المركب من أوراق *Piliostigma thonningii* ، وتم اختبار قدرتها على تثبيط تخليق البروستاجلاندين في المختبر والنشاط المضاد للبكتيريا ضد العنقودية الذهبية في تأثير مجموعة 3 B و 4 diol على نشاط C.

ان قدرة methylflavonols في تثبيط تخليق البروستاغلاندين Prostglandin ناتجة عن تأثير مجموعة مركبات الفلافونويد اذ انه يعكس النشاط المضاد للبكتيريا في سلسلة نشاط مركبات الفلافونويد المضادة للميكروبات.

تُظهر مشتقات الفلافونويد المختلفة بما في ذلك مركبات الفلافون الميثوكسيلية أنشطة بيولوجية ملحوظة اذ ان فلافون ميثوكسيل ذو أهمية علمية كبيرة بسبب أنشطته الواعدة المضادة للميكروبات ضد البكتيريا سالبة الجرام وإيجابية الجرام. ولذلك فإن الإنتاج المستدام لمثل هذه المركبات له أهمية واضحة لخبراء التكنولوجيا الحيوية في الصناعات الدوائية والصناعات الغذائية (Bashyal *et al*., 2019).



شكل (4-8) الفعالية التثبيطية للمستخلص المائي (A) والمستخلص الكحولي (B) لنبـات التيكومـا ضـد بكتريا *P.aeruginosa* المعزولة من مرضى الحروق.

اوضحت نتائج التحليل الكيمائي للعناصر الفعالة الموجودة في مستخلص نبات التيكوما المائي بأنه من المرجح ان فعاليته التثبيطية ضد بكتيريا الزوائف الزنجارية *P.aeruginosa* تعود لوجود المركب الكيميائي (Quercetin-3- methyl ether) ومركب (Chrysoriol) كما موجود في جدول (4-9) (4-10) إذ سجل التركيزين معا(23.9087 و 15.4588) مايكروغرام /مل لكل مركب في المستخلص المائي للتيكوما على التوالي و(25.2099 و 13.6502) لكلا المركبين في مستخلص التيكوما الكحولي على التوالي.

جـدول (4-9) المركبـات الفعالـة وزمـن الاحتجار(دقيقـة) ومسـاحة الـذروة والتركيز لمـواد المسـتخلص التيكوما المائي باستخدام تقنية HPLC

ت	المركبات الفعالة	زمن الاحتجار Rt (دقيقة)	مساحة الذروة Area%	التركيز مايكروغرام/مل
1	Chrysoriol	2.705	72371	15.4588
2	Luteolin	3.713	109798	23.4533
3	3-methylluteolin	4.795	59040	12.6112
4	Quercetin-3- methyl ether	5.878	111930	23.9087
5	Apigenin	7.052	59711	12.7545

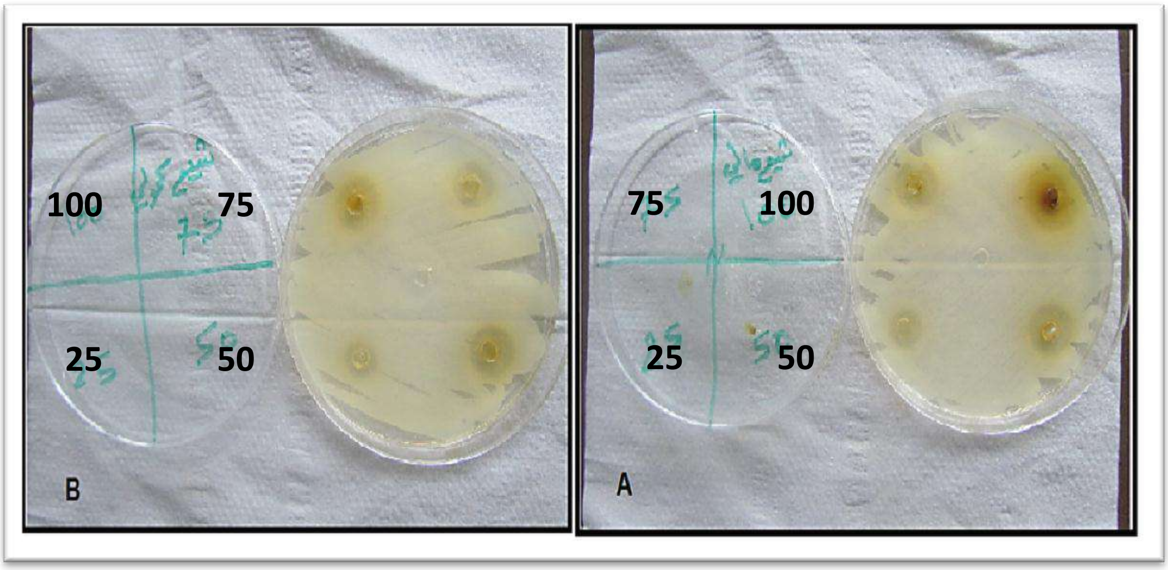
جـدول (4-10) يوضـح المركبـات الفعالـة وزمـن الاحتجار(دقيقـة) ومسـاحة الـذروة والتركيـز لمـواد المستخلص التيكوما الكحولي باستخدام تقنية HPLC

ت	المركبات الفعالة	زمن الاحتجار Rt (دقيقة)	مساحة الذروة Area%	التركيز مايكروغرام/مل
1	Chrysoriol	2.693	77128	13.6502
2	Luteolin	3.7	1248.52	22.0965
3	3-methylluteolin	4.787	74538	13.1919
4	Quercetin-3- methyl ether	5.883	142444	25.2099
5	Apigenin	7.053	73742	13.051

4-8-4 تقييم الفعالية التثبيطية لمستخلص نبات الشيح *Artemisia judaica* المائي والكحولي:

تم اختبار جميع العزلات لبكتيريا الزوائف الزنجارية والمشخصة بطريقة إنتشار القرص لكيربي-باو وقابلية نبات الشيح على تثبيطها اذ تبين ان المستخلص المائي لنبات الشيح Artemisia له القدرة على تثبيط بكتيريا الزوائف الزنجارية و هذه القدرة تزداد بازدياد التركيز المستخدم حيث اظهرت التجربة ان اقطار التثبيط عند تركيز 25ملغم/مل للمستخلصين المائي و الكحولي بلغت (1.08±9.50 و0.55±8.30) ملم على التوالي وعند تركيز 50ملغم/مل بلغت(11.60 ± 1.10 و10.50 ± 0.41) ملم على التوالي وكانت الفعالية باقوى حالها عند تركيزين 75ملغم/مل و100ملغم/مل اذ بلغت اقطار التثبيط (13.90 ± 1.24 و12.80 ± 1.63) ملم و(16.70 ± 1.57 و15.30 ± 1.57) ملم على التوالي للمستخلصين المائي والكحولي لنبات الشيح كما موضح في (الشكل 4-9) و (الجدول 4-13) وهذا يتفق مع (2013) Stefancin; ,(Haile, & Jiru., 2022) . من المعروف ان نبات الشيح يحتوي على العديد من المكونات الفعالة مثل الفلافينويد والالكلويد والتي تكون لها الفعالية ضد مختلف انواع البكتيريا بنوعيها الموجبة والسالبة لصبغة غرام حيث استخدمت كمضاد حيوي طبيعي من قديم الزمن (Ferreira *et al*.,2010) Rolta *et al*., 2021).

قد يعود فعالية التثبيط لنبات الشيح الى وجود بعض المركبات الكيميائية الموجودة في مستخلص الشيح لكلا النوعين المائي والكحولي كما في الجدول(4-11و4-12) اذ ان وجود الحامض الأرتيميسينيك (Artemisinic acid) فهو سلائف جينية حيوية للأرتيميسينين ، وهو مضاد مهم للملاريا ينتجه عشب Artemisia annua. إذ تم فحص هذا المركب بحثًا عن نشاط مضاد للميكروبات ضد مجموعة من الكائنات الحية، ان هذا المركب نشط ضد البكتيريا المختلفة وأنواع معينة من الفطريات (Dhingra *et al*., 2000).



شكل (4-9) الفعالية التثبيطية لمستخلص المائي (A) و المستخلص الكحولي (B) لنبات الشيح ضد بكتريا *P.aeruginosa* المعزولة من مرضى الحروق.

يحتوي حمض الأرتيميسينيك الموجود في الشيح على مجموعة متنوعة من الأنشطة الدوائية ، مثل النشاط المضاد للملاريا ، والنشاط المضاد للأورم ، وتأثير خافض للحرارة ، والنشاط المضاد للبكتيريا ، وتأثير allelopathy وتأثير مضاد لتكوين الشحوم. أدى هذا التطور إلى زيادة الطلب على حمض الأرتيميسينيك بشكل كبير في جميع أنحاء العالم. على الرغم من العديد من الأساليب ، وهي استخراج حمض الأرتيميسينيك من *A.annua L* ، في إنتاج حمض الأرتيميسينيك في المختبر عن طريق زراعة الخلايا والأنسجة ، يمكن أن يؤدي التوليف الكيميائي الكلي وإنتاج التخمير باستخدام تقنية البيولوجيا التركيبية إلى تحسين إنتاج حمض الأرتيميسينيك (Kong *et al*., 2013).

كذلك بالنسبة الى المركب الكيميائي (Kaempferol) الموجود في الشيح لكلا النوعين المائي والكحولي، اذ عد هذا المركب على انه مضادات الأكسدة مهمة في الحفاظ على صحة جيدة للانسان

وهناك اهتمام متزايد بالتحقيق في نشاط مضادات الأكسدة للأيضات الثانوية من النباتات الطبية للمركبات ذات الفاعلية العالية والسمية الأقل لمركب (Kaempferol) تقدم النباتات مجموعة واسعة من مضادات الأكسدة الطبيعية نظرًا للتنوع الهيكلي في مستقلباتها الثانوية. تم التعرف الآن على العديد من النباتات الطبية كمصادر لمركبات مضادات الأكسدة الطبيعية والتي هي أساسًا مركبات فينولية (Teffo *et al.*, 2010).

جدول (4-11) المركبات الفعالة وزمن الاحتجار (دقيقة) ومساحة الذروة والتركيز لمواد المستخلص الشيح المائي باستخدام تقنية HPLC

ت	المركبات الفعالة	زمن الاحتجار Rt (دقيقة)	مساحة الذروة Area%	التركيز مايكروغرام/مل
1	Quercetagetageten ,3,6- dimethly ether	1.558	53574	8.635
2	Quercetagetageten ,3,6,7- trimethly ether	2.69	100940	16.2694
3	Quercetagetageten ,3,6,7,4- tetramethly ether	3.608	55872	9.0054
4	Artemisinic acid	4.615	147319	23.7446
5	OH-kaempferol	5.683	35796	5.7695
6	Quercetagetin3,6,7,3,4 pentamethyl ether	6.530	60557	9.7604
7	Kaempferol 3,7,dimethyl ether	7.533	57804	9.3168

جدول (4-12) المركبات الفعالة وزمن الاحتجار (دقيقة) ومساحة الذروة والتركيز لمواد المستخلص الشيخ الكحولي باستخدام تقنية HPLC

ت	المركبات الفعالة	زمن الاحتجار(دقيقة) Rt	مساحة الذروة Area%	التركيز مايكروغرام/مل
1	Quercetagetageten ,3,6- dimethly ether	1.550	50050	7.2394
2	Quercetagetageten ,3,6,7- trimethly ether	2.713	146905	21.2487
3	Quercetagetageten ,3,6,7,4- tetramethly ether	3.632	72041	10.4202
4	Artemisinic acid	4.652	146157	21.1406
5	OH-kaempferol	5.725	38011	5.498
6	Quercetagetin3,6,7,3,4 pentamethyl ether	6.560	94251	13.6328
7	Kaempferol 3,7,dimethyl ether	7.593	47492	6.8694

4-8-5 تأثير المستخلصات المائية والكحولية لنباتات (الزعتر، قشور الرمان، أوراق التيكوما الشيخ،)على بكتيريا *P.aeruginosa*

عن طريق النتائج الواردة في الجدول(4-13) يتضح تأثير المستخلص المائي والكحولي لنباتات الزعتر واوراق التيكوما وقشور الرمان ونبات الشيح في تثبيط نمو بكتيريا *P. aeruginosa* . وبشكل عام يلاحظ ان هناك علاقة طردية بين التراكيز المستعملة ومعدل التثبيط فبزيادة التركيز يزداد معدل التثبيط في المستخلصات النباتية كافة ، من ناحية أخرى يلاحظ ان هناك اختلافات معنوية إحصائية سواءاً بالاعتماد على نوع المستخلص او التركيز المستعمل وقد لوحظ ذلك باختلاف (تفوق) نتائج مستخلص أوراق التيكوما المائي على بقية المستخلصات وعدم وجود اختلافات معنوية عند مقارنته مع المستخلص الكحولي لقشور الرمان عند التركيز 25 ملغم/ مل وكذلك الحال عند استعمال بقية التراكيز 50،75،100

ملغم/مل فقد تفوق المستخلص المائي لأوراق التيكوما بالمقارنة مع باقي المستخلصات النباتية المستعملة ،فعند التركيز 100 ملغم/مل بلغ قطر التثبيط 32.30.

من ناحية أخرى يمكن ملاحظة ان المستخلصات المائية (بصورة عامة) كانت اكثر تأثيراً في تثبيط نمو البكتيريا بالمقارنة مع المستخلصات الكحولية للنبات ذاته اذ بلغ معدل التثبيط عند التركيز 100 ملغم/مل (16.70،32.30،23.50،24.60) ملم للمستخلصات المائية لنباتات الزعتر وقشور الرمان واوراق التيكوما والشيح على التوالي بالمقارنة مع (13.50،30.10،27.60،26.40) ملم عند استعمال المستخلصات الكحولية للنباتات ذاتها وللتركيز ذاته (عدا مستخلص الرمان)، مما تقدم واعتمادا على نتائج التحليل الاحصائي يمكن الاستنتاج ان استعمال المستخلصات المائية لأوراق نبات التيكوما كان الأكثر تأثيراً في تثبيط نمو البكتيريا بالمقارنة مع بقية المستخلصات للنباتات المختلفة ،ان جميع المستخلصات النباتية اثرت في نمو البكتيريا وان استعمالها أدى الى تثبيط نموها ولكن بدرجات متفاوتة اعتماداً على نوع النبات والتركيز المستعمل ونوع المستخلص

جدول (4-13) تأثير المستخلصات المائية والكحولية لنباتات(الزعتر قشور الرمان أوراق التيكوما الشيح)على بكتيريا *P.aeruginosa*

التركيز ملغم/مل	معدل التثبيط ± الخطأ القياسي							
	نبات الزعتر		قشور الرمان		أوراق التيكوما		الشيح	
	المستخلص المائي	المستخلص الكحولي	المستخلص المائي	المستخلص الكحولي	المستخلص المائي	المستخلص الكحولي	المستخلص المائي	المستخلص الكحولي
25	±8.50 0.89	10.12 1.17 ±	± 8.00 1.00	11.70 1.03 ±	12.70 0.96 ±	10.40 1.04 ±	± 9.50 1.08	± 8.30 0.55
50	±15.30 2.17	17.20 0.75 ±	11.30 1.44 ±	16.50 0.85 ±	18.50 1.40 ±	15.50 0.89 ±	11.60 1.10 ±	10.50 0.41 ±
75	20.40 1.48 ±	22.10 2.00 ±	18.30 0.68 ±	23.10 1.11 ±	26.00 1.62 ±	23.60 1.38 ±	13.90 1.24 ±	12.80 1.63 ±
100	24.60 1.60 ±	26.40 1.33 ±	23.50 1.68 ±	27.60 1.14 ±	32.30 1.43 ±	30.10 1.50 ±	16.70 1.57 ±	15.30 1.57 ±

L.S.D	المستخلص	التركيز
	3.6558	1.2925

1-5-8-4 تـأثير المستخلصـات المائيـة والكحوليـة لنباتـات (الزعتـر قشـور الرمـان أوراق التيكومـا الشيح)على بكتيريا *P.aeruginosa* المنتجة للغشاء الحيوي القوي

اظهرت نتائج الدراسة الحالية عند استعمال المستخلصات النباتية قيد الدراسة مع الزوائف الزنجارية المنتجة للغشاء الحيوي القوي بان مستخلص أوراق التيكوما المائي والكحولي ذو تركيز 75 و100ملغم/مل اعطى افضل نتائج ضد الزوائف الزنجارية الخمسة المعزولة من مرضى الحروق اذ كان معدل التثبيط والانحراف القياسي هو(23.00±1.15 و29.00±1.43) للتركيزين على التوالي للمستخلص المائي واعطى معدل وانحراف قياسي تثبيطي(19.60±0.17 و26.20±0.43) ملم للتركيزين على التوالي للمستخلص الكحولي. على عكس المستخلص المائي للشيح حيث اعطى اقل معدل تثبيط للمستخلصين معاً ضد الزوائف الزنجارية . من خلال النتائج الواردة في الجدول (4-14) يتضح ان معدل اقطار تثبيط نمو بكتيريا الزوائف الزنجارية المنتجة الغشاء الحيوي القوي عند استعمال المستخلص المائي يختلف باختلاف نوع المستخلص المستعمل وتركيزه والمادة المستعملة في الاستخلاص ، وبصورة عامة يمكن ملاحظة ان قطر التثبيط يتناسب طرديا مع التركيز المستعمل للمستخلصات النباتية ، فعند استعمال مستخلص نبات التيكوما فإن قطرتثبيط بكتيريا الزوائف الزنجارية المنتجة للغشاء الحيوي القوي بلغ 7.90±0.57 عند تركيز 25 ملغم/ مل بينما بلغ قطر التثبيط 29.00 ±1.43 ملم عند التركيز 100ملغم/مل في نفس النبات. اما عند استعمال نبات الشيح فإن قطر التثبيط بلغ (6.10±0.05 ، 9.30±0.17) ملم عند تركيز 25، 100ملغم/ مل على التوالي . يمكن القول ان تاثير مستخلص نبات التيكوما المائي في التركيز العالي أكثر من ثلاثة أضعاف بالمقارنة مع مستخلص نبات الشيح.أما عند استخدام المستخلص الكحولي فقد اختلفت النتائج نوعا ما بالمقارنة مع المستخلص المائي، اذ تبين ان بعض المستخلصات النباتية الكحولية (الزعتر، قشور الرمان، التيكوما ،الشيح) اعطت نتائج أكثر تأثيرا مقارنة مع المستخلصات المائية اذا بلغ معدل اقطار التثبيط في الزعتر (7.20±0.55، 21.20±0.57) ملم للتركيزين 25، 100 ملغم/مل على التوالي وعند استعمال مستخلص قشور الرمان تراوح معدل قطر التثبيط في المستخلص الكحولي (6.70±0.57،22.70±0.57) بالمقارنة مع (6.20±0.11 ، 20.50±0.55) للمستخلص المائي عنده استعمال التركيزين 25 و 100 ملغم /مل على التوالي..

اما في مستخلص اوراق التيكوما ونبات الشيح فإن معدل أقطار التثبيط في المستخلص الكحولي على العموم كانت أقل من مثيلاتها في المستخلص المائي اذ بلغ أقطار التثبيط (6.70 ± 0.57 ،26.20 ± 0.43) ملم في المستخلص الكحولي بينما كان (7.90 ± 0.57، 29.00 ± 1.43) ملم في المستخلص المائي عند التركيزين 25، 100 ملغم/مل على التوالي. عند استعمال نبات الشيح لم يلاحظ وجود تثبيط

عند استعمال المستخلص الكحولي بتركيز25 و 50 ملغم /مل على التوالي ، وعند زياده التركيز الى 100ملغم/مل فان قطر التثبيط بلغ 7.20 ± 0.57 بالمقارنة مع(9.30 ± 0.17) عند استعمال المستخلص المائي لنفس النبات .اوضح الباحث (Bakr *et al.*, 2019) تأثير التيكوما على مجموعة من البكتريا المرضية مقارنة مع مضادات البيتالاكتام واوضح بانه تأثير كبير مضاد للجراثيم ضد جميع الكائنات الحية الدقيقة المختبرة مع تركيز مثبط أدنى مشابه (MIC) للأمبيسيلين والجنتاميسين مع قيم MIC تتراوح بين 0.98 و 1.95 ميكروغرام / مل ، بالإضافة إلى تأثير مضاد للفطريات واعد عند مقارنته بالأمفوتريسين بقيم 3.9 MIC و 15.63 ميكروغرام / مل لـ *Aspergillus flavus* و *Candida albicans* على التوالي.

جدول (4-14): معدل اقطار التثبيط والانحراف القياسي للمستخلصات النباتية المائية والكحولية للزعتر وقشور الرمان والتيكوما و الشيح ضد بكتريا *P.aeruginosa* المنتجة للغشاء الحيوي القوي

التركيز / المستخلص	قطر التثبيط ± الخطأ القياسي المستخلص المائي				معدل المستخلص	قطر التثبيط ± الخطأ القياسي المستخلص الكحولي				معدل المستخلص
	25	50	75	100		25	50	75	100	
مستخلص الزعتر	6.40 ± 0.57	10.70 ± 0.10	14.90 ± 0.05	17.80 ± 0.57	12.45 ± 1.31	7.20 ± 0.55	12.60 ± 0.11	17.40 ± 0.12	21.20 ± 0.57	14.60 ± 1.59
مستخلص قشور الرمان	6.20 ± 0.11	9.70 ± 0.05	16.80 ± 1.15	20.50 ± 0.55	13.05 ± 1.80	6.70 ± 0.57	12.30 ± 0.55	18.10 ± 0.05	22.70 ± 0.57	14.95 ± 1.82
مستخلص التيكوما	7.90 ± 0.57	11.20 ± 1.11	23.00 ± 1.15	29.00 ± 1.43	17.77 ± 2.60	6.70 ± 0.57	10.00 ± 1.57	19.60 ± 0.17	26.20 ± 0.43	15.37 ± 2.42
مستخلص الشيح	6.10 ± 0.05	6.10 ± 0.05	7.40 ± 0.57	9.30 ± 0.17	6.70 ± 1.05	6.00 ± 0.0	6.10 ± 0.05	6.60 ± 0.05	7.20 ± 0.57	3.45 ± 1.00
Lsd	1.3446	0.2491	2.997	1.6549		1.3456	1.3444	0.9918	1.8828	
معدل التركيز	4.87 ± 0.91	9.42 ± 0.60	15.52 ± 1.72	19.15 ± 2.13		4.90 ± 0.88	8.72 ± 1.55	15.42 ± 1.56	19.32 ± 2.19	
L.S.D	المستخلص		التركيز		التداخل	المستخلص	التركيز		التداخل	
	0.8105		0.8105		1.621	0.6302	0.6302		1.2605	

4-8-5-2 تأثير المستخلصات المائية والكحولية لنباتات (الزعتر، قشور الرمان ،أوراق التيكوما ،الشيح)على بكتيريا *P.aeruginosa* المنتجة للغشاء الحيوي المتوسط

في ما يخص تأثير المستخلصات النباتية على بكتيريا الزوائف الزنجارية المنتجه للغشاء الحيوي المتوسط لوحظ ان التأثير يختلف باختلاف نوع المستخلص المستعمل وتركيزه والمادة المستعملة في الاستخلاص كما في الجدول (4-15) الذي يتضح منه ان التأثير ذا علاقه طردية ويختلف باختلاف نوع المستخلص ونوع المذيب المستعمل في الاستخلاص. اذ تبين ان المستخلص المائي اكثر تأثيرا

من المستخلص الكحولي عند استعمال نباتي اوراق التيكوما و نبات الشيح في حين المستخلص الكحولي اكثر تأثيرا من المائي في نباتي الزعتر وقشور الرمان وان اقل قطر للتثبيط في المستخلص المائي بلغ 6.00 ± 0.0 . عند استعمال تركيز 25 ملغم/ملم في نبات الشيح وان اعلى قطر للتثبيط بلغ 31.00 ± 1.89 باستعمال 100 ملغم/مل من المستخلص المائي التيكوما ، اما عند استعمال المستخلصات الكحولية فان اقل قطر في التثبيط 6.00 ± 0.0 ملم في نبات الشيح بتركيز 25 ملغم/مل وأعلى قطر تثبيط بلغ 29.20 ± 0.43 ملم للمستخلص الكحولي لاوراق نبات التيكوما بتركيز 100ملغم/مل.

جدول (4-15) معدل اقطار التثبيط والانحراف القياسي للمستخلصات النباتية المائية والكحولية للزعتر وقشور الرمان والشيح ضد بكتريا *P.aeruginosa* المنتجة للغشاء الحيوي المتوسط

التركيز / المستخلص	قطر التثبيط ± الخطأ القياسي المستخلص المائي 25	50	75	100	معدل المستخلص	قطر التثبيط ± الخطأ القياسي المستخلص الكحولي 25	50	75	100	معدل المستخلص
مستخلص الزعتر	7.30 ± 0.57	12.50 ± 0.28	17.30 ± 0.57	21.60 ± 0.57	14.67 ± 1.62	9.30 ± 0.17	11.80 ± 0.57	19.30 ± 0.17	22.50 ± 0.30	15.72 ± 1.70
مستخلص قشور الرمان	6.50 ± 0.55	10.20 ± 0.11	18.60 ± 0.34	22.30 ± 0.17	14.40 ± 1.91	8.40 ± 0.57	13.40 ± 0.55	19.20 ± 0.57	29.40 ± 0.23	17.60 ± 2.36
مستخلص التيكوما	9.06 ± 0.17	14.00 ± 0.11	24.90 ± 1.03	31.00 ± 1.89	19.74 ± 2.62	9.20 ± 0.43	11.80 ± 1.02	20.00 ± 0.17	29.20 ± 0.43	17.55 ± 2.73
مستخلص الشيح	6.00 ± 0.0	9.00 ± 0.03	10.10 ± 0.45	11.20 ± 0.11	9.07 ± 0.62	6.00 ± 0.0	6.80 ± 0.33	9.70 ± 0.35	10.60 ± 0.98	6.77 ± 1.26
Lsd	1.8836	1.4246	1.7275	1.374		1.361	1.6414	2.3232	1.4615	
معدل التركيز	7.21 ± 0.42	11.42 ± 0.61	17.72 ± 1.60	21.52 ± 2.12		6.72 ± 0.75	10.59 ± 0.77	17.05 ± 1.31	22.92 ± 2.31	

L.S.D	المستخلص	التركيز	التداخل	المستخلص	التركيز	التداخل
	0.7136	0.7136	1.4273	0.7675	0.7675	1.535

3-5-8-4 تـأثير المستخلصـات المائيـة والكحوليـة لنباتـات (الزعتـر ،قشـور الرمـان، أوراق التيكومـا ،الشيح)على بكتيريا *P.aeruginosa* المنتجة للغشاء الحيوي الضعيف

عنده اختبار تأثير المستخلصات النباتية في بكتيريا الزوائف الزنجارية المنتجة للغشاء الحيوي الضعيف لوحظ ان اقطار التثبيط كانت اعلى مقارنة مع البكتيريا المنتجة للغشاء الحيوي القوي والمتوسط وللتراكيز المستعملة كافة كما لوحظ سابقا ان تأثير نباتي الزعتر وقشور نبات الرمان في

المستخلص الكحولي كان اكثر مقارنة مع المستخلص المائي وعلى النقيض من ذلك فان المستخلص المائي لأوراق نبات التيكوما والشيح اكثر تثبيط للبكتيريا مقارنة بالمستخلص الكحولي فقد تبين ان قطر التثبيط للمستخلص المائي لنبات الشيح بلغ 8.90 ± 0.05 ملم عند تركيز 25 ملغم/مل مقارنة مع (6.00 ± 0.0، 6.00 ± 0.0) للبكتيريا المنتجة للغشاء الحيوي المتوسط والقوي على التوالي

وان اعلى تأثير وجد عند استعمال المستخلص المائي الاوراق نبات التيكوما اذا بلغ قطر التثبيط (35.50 ± 1.89) ملم بالمقارنة مع (31.00 ± 1.89، 29.00 ± 1.43) ملم عند اجراء التجربة مع البكتيريا المنتجة للغشاء الحيوي المتوسط والقوي على التوالي باستعمال تركيز 100 ملغم / مل اما عند استعمال المستخلص الكحولي فان اقل تثبيط بلغ (7.10±0.15) ملم عند استعمال نبات الشيح بتركيز 25 ملغم/مل ، وجدير بالذكر ان استعمال التركيز ذاته في اجراء التجربة على البكتيريا ذات الغشاء الحيوي المتوسط والقوي فان قطر التثبيط بلغ (6.00 ± 0.0، 6.00 ± 0.0) ملم على التوالي. اما اعلى نسبة تثبيط فقد وجدت في مستخلص اوراق نبات التيكوما اذ بلغت (35.50 ± 1.89) ملم عند استعمال تركيز 100ملغم/مل .

جدول (4-16) معدل اقطار التثبيط والانحراف القياسي للمستخلصات النباتية المائية والكحولية للزعتر وقشور الرمان والشيح ضد بكتريا الزوائف الزنجارية المنتجة للغشاء الحيوي الضعيف

التركيز / المستخلص	قطر التثبيط ± الخطأ القياسي المستخلص المائي				معدل المستخلص	قطر التثبيط ± الخطأ القياسي المستخلص الكحولي				معدل المستخلص
	25	50	75	100		25	50	75	100	
مستخلص الزعتر	8.20 ± 0.57	15.60 ± 0.33	19.30 ± 0.25	24.70 ± 1.02	16.95 ± 1.82	10.50 ± 0.28	16.30 ± 0.35	20.90 ± 0.17	25.00 ± 1.30	18.17 ± 1.64
مستخلص قشور الرمان	8.60 ± 0.58	10.30 ± 0.05	20.70 ± 0.98	24.80 ± 1.01	16.10 ± 2.07	10.20 ± 0.57	17.20 ± 0.55	21.20 ± 0.29	26.20 ± 0.87	18.70 ± 1.79
مستخلص التيكوما	12.50 ± 0.44	20.70 ± 0.11	28.96 ± 1.03	35.50 ± 1.89	24.41 ± 2.67	10.50 ± 0.20	18.70 ± 1.02	29.20 ± 0.19	30.60 ± 0.77	22.25 ± 2.47
مستخلص الشيح	8.90 ± 0.05	11.20 ± 0.11	14.20 ± 0.45	16.40 ± 0.66	12.67 ± 0.91	7.10 ± 0.15	9.90 ± 0.35	13.20 ± 0.35	15.80 ± 0.85	11.50 ± 1.01
Lsd	2.3536	2.3222	3.5204	1.3868		1.0734	1.8826	4.0752	2.3742	
معدل التركيز	9.55 ± 0.60	14.45 ± 1.28	20.79 ± 1.70	25.35 ± 2.05		9.57 ± 0.45	15.52 ± 1.04	21.12 ± 1.71	24.40 ± 1.65	

L.S.D	المستخلص	التركيز	التداخل	المستخلص	التركيز	التداخل
	1.2789	1.2789	2.5578	0.7971	0.7971	1.5942

9-4 تقييم التركيز المثبط الادنى (MIC) والقاتل الادنى (MBC) لمستخلص المائي والكحولي لنبات الرمان والزعتر والشيح والتيكوما ضد الزوائف الزنجارية.

اظهرت نتائج الدراسة ان قيمة المثبط الادنى والتركيز القاتل الادنى تتفاوت اعتمادا على نوع المستخلص فقد وجد التركيزين للمستخلص الزعترالمائي في حال العزلات المنتجة للغشاء الحيوي القوي والبالغ عددها 5 عزلات كانت كمعدل 64 ملغم/مل للتركيز المثبط الادنى MIC وكانت 256 ملغم/مل للتركيز القاتل الادنى MBC بينما كانت 32 ملغم/مل و 256 ملغم/مل للمستخلص الكحولي لكلا التركيزين المثبط الادنى والقاتل الادنى على التوالي جدول(4-17)

اما في حالة العزلات المنتجة للغشاء الحيوي المتوسط والبالغ عددها 32 عزلة كانت قيمة التركيز المثبط الادنى 32 ملغم/مل وقيمة القاتل الادنى 128 ملغم/مل للمستخلصين المائي والكحولي لكلا التركيزين المثبط الادنى والقاتل الادنى على التوالي ، من جانب اخر سجلت العزلات غير منتجة للغشاء الحيوي او الضعيفة والبالغ عددها 3 قيمة 32 و 128 ملغم/مل للتركيز المثبط الادنى والتركيز القاتل الادنى للمستخلص المائي بينما كانت 16 ملغم/مل و 128 ملغم/مل للمستخلص الكحولي لكلا التركيزين المثبط الادنى والقاتل الادنى على التوالي كما في الجدول(4-18) و(4-19)

اظهرت نتائج الدراسة ان قيمة المثبط الادنى والتركيز القاتل الادنى تتفاوت اعتمادا على نوع مستخلص قشور الرمان قيد الدراسة فقد وجد التركيزين لمستخلص الرمان المائي في حال العزلات المنتجة للغشاء الحيوي القوي والبالغ عددها 5 عزلات كانت كمعدل 32 ملغم/مل للتركيز المثبط الادنى MIC وكانت 128 ملغم/مل للتركيز القاتل الادنى MBC للمستخلص المائي بينما كانت 64 ملغم/مل و 128 ملغم/مل للمستخلص الكحولي لكلا التركيزين المثبط الادنى والقاتل الادنى على التوالي جدول (4-17)

اما في حالة العزلات المنتجة للغشاء الحيوي المتوسط والبالغ عددها 32 عزلة كانت قيمة التركيز المثبط الادنى 32 ملغم/مل وقيمة التركيز القاتل الادنى 128 ملغم/مل للمستخلص قشور الرمان المائي وايضا كانت 16 ملغم/مل و 128 ملغم/مل للمستخلص الكحولي لكلا التركيزين المثبط الادنى والقاتل الادنى على التوالي ، من جانب اخر سجلت العزلات غير منتجة للغشاء الحيوي او الضعيفة والبالغ عددها 3 قيمة 16 و 128 ملغم/مل للتركيز المثبط الادنى والتركيز القاتل الادنى للمستخلص المائي وايضاً كانت 16 ملغم/مل و 128 ملغم/مل للمستخلص الكحولي لكلا التركيزين المثبط الادنى والقاتل الادنى على التوالي جدول (4-18) و(4-19)

اظهرت نتائج الدراسة ان قيمة المثبط الادنى والتركيز القاتل الادنى تتفاوت اعتمادا على نوع المستخلص التيكوما قيد الدراسة فقد وجد التركيزين للمستخلص التيكوما المائي في حال العزلات المنتجة للغشاء الحيوي القوي والبالغ عددها 5 عزلات كانت كمعدل 32 ملغم/مل للتركيز المثبط الادنى MIC وكانت 128ملغم/مل للتركيز القاتل الادنى MBC للمستخلص المائي بينما كانت 64 ملغم/مل و 128 ملغم/مل للمستخلص الكحولي لكلا التركيزين المثبط الادنى والقاتل الادنى على التوالي كما في الجدول (4-17)

اما في حالة العزلات المنتجة للغشاء الحيوي المتوسط والبالغ عددها 32 عزلة كانت قيمة التركيز المثبط الادنى 16 ملغم/مل وقيمة القاتل الادنى 128 ملغم/مل للمستخلص التيكوما المائي وايضا كانت 32 ملغم/مل و 128ملغم/مل للمستخلص الكحولي لكلا التركيزين المثبط الادنى والقاتل الادنى على التوالي ، من جانب اخر سجلت العزلات غير منتجة للغشاء الحيوي او الضعيفة والبالغ عددها 3 قيمة 4 و 128 ملغم/مل للتركيز المثبط الادنى والتركيز القاتل الادنى للمستخلص المائي بينما كانت 8 ملغم/مل و 128 ملغم/مل للمستخلص الكحولي لكلا التركيزين المثبط الادنى والقاتل الادنى على التوالي كما في الجدول(4-18) و(4-19)

اظهرت نتائج الدراسة ان قيمة المثبط الادنى والتركيز القاتل الادنى تتفاوت اعتمادا على نوع مستخلص الشيح قيد الدراسة فقد وجد التركيزين للمستخلص الشيح المائي في حال العزلات المنتجة للغشاء الحيوي القوي والبالغ عددها 5 عزلات كانت كمعدل 64 ملغم/مل للتركيز المثبط الادنى MIC وكانت 512 ملغم/مل للتركيز القاتل الادنى MBC للمستخلص المائي وأيضاً كانت 64 ملغم/مل و 512 ملغم/مل للمستخلص الكحولي لكلا التركيزين المثبط الادنى والقاتل الادنى على التوالي. كما يتضح في الجدول (4-17)

اما في حالة العزلات المنتجة للغشاء الحيوي المتوسط والبالغ عددها 32 عزلة كانت قيمة التركيز المثبط الادنى 64 ملغم/مل وقيمة القاتل الادنى 256 ملغم/مل للمستخلص الشيح المائي وايضا كانت 64 ملغم/مل و 256 ملغم/مل للمستخلص الشيح الكحولي لكلا التركيزين المثبط الادنى والقاتل الادنى على التوالي ، من جانب اخر سجلت العزلات غير منتجة للغشاء الحيوي او الضعيفة والبالغ عددها 3 قيمة 32 و 256 ملغم/مل للتركيز المثبط الادنى والتركيز القاتل الادنى للمستخلص االشيح المائي بينما كانت 64 ملغم/مل و 256 ملغم/مل للمستخلص الشيح الكحولي لكلا التركيزين المثبط الادنى والقاتل الادنى على التوالي كما في الجدول (4-18) و(4-19)

جدول(4-17) التركيز المثبط الأدنى MIC والتركيز القاتل الأدنى MBC للمستخلصات النباتية المائية والكحولية المستعملة في الدراسة على بكتيريا *P. aeruginosa* المنتجة للغشاء الحيوي القوي

اسم المستخلص	المستخلص المائي		المستخلص الكحولي	
	MIC ملغم / مل	MBC ملغم / مل	MIC ملغم / مل	MBC ملغم / مل
الزعتر	64	256	32	256
قشور الرمان	32	128	64	128
أوراق التيكوما	32	128	64	128
الشيح	64	512	64	512

جدول(4-18) التركيز المثبط الأدنى MIC والتركيز القاتل الأدنى MBC للمستخلصات النباتية المائية والكحولية المستعملة في الدراسة على بكتيريا *P. aeruginosa* المنتجة للغشاء الحيوي المتوسط

اسم المستخلص	المستخلص المائي		المستخلص الكحولي	
	MIC ملغم / مل	MBC ملغم / مل	MIC ملغم / مل	MBC ملغم / مل
الزعتر	32	128	32	128
قشور الرمان	32	128	16	128
أوراق التيكوما	16	128	32	128
الشيح	64	256	64	256

جدول(4-19) التركيز المثبط الأدنى MIC والتركيز القاتل الأدنى MBC للمستخلصات النباتية المائية والكحولية المستعملة في الدراسة على بكتيريا *P. aeruginosa* المنتجة للغشاء الحيوي الضعيف

اسم المستخلص	المستخلص المائي		المستخلص الكحولي	
	MIC ملغم / مل	MBC ملغم / مل	MIC ملغم / مل	MBC ملغم / مل
الزعتر	32	128	16	128
قشور الرمان	16	128	16	128
أوراق التيكوما	4	128	8	128
الشيح	32	256	64	256

4-10 نتائج تشخيص الحشرات

اشارت نتائج تشخيص الحشرات الى الاتي:

1- **الصرصر الالماني** *Blattella germanica*
2- **الذباب المنزلي** *Musca domestica*
3- **النمل** *Camponotus xerxes*

4-11 كفاءة بعض الحشرات في نقل البكتيريا

من خلال البحث اتضح ان للحشرات دور مهم في نقل بكتيريا *P.aeruginosa* وقد اختلفت كفاءة النقل باختلاف الحشرات ، إذ تبين ان الصرصر الألماني *Blattella germanica* أكثر الحشرات كفاءة في نقل البكتيريا من بين الحشرات المستعملة في الدراسة و تقاربت النتائج نوعاً ما مع ما تم ملاحظته من كفاءة الذباب المنزلي في النقل اذ كان له دور مهم ولكن بنسبة اقل نوعاً ما بالمقارنة مع الصرصر الالماني وفي ما يخص حشرة النمل *Camponotus xerxes* لوحظ ان دورها كان قليلاً بالمقارنة مع ما تم ملاحظته في الصرصر الالماني والذباب المنزلي وجدير بالذكر فانه لوحظ من التجربة ان نسبة انجذاب حشرة النمل للاطباق الزراعية الحاوية على المستعمرات البكتيرية كان قليلا لا يتجاوز 20% ولمده زمنية لا تتجاوز 30 ثانية بالمقارنة مع الذباب المنزلي *Musca domestica* والصرصر الالماني *Blattella germanica* اذ كانت نسبه الانجذاب عالية 100% وبقاءهما على المستعمرة لمدة تقدر بثلاث دقائق للصرصر الألماني *Blattella germanica* ونحو ثمان دقائق فيما يتعلق

بانجـذاب الـذباب المنزلـي الـى الاطبـاق الزرعيـة، قـد يكـون التـاثير العـالي للصرصـر الألمـاني *Blattella germanica* نـاتج مـن كبـر حجمـه وبالتـالي كميـة البكتيريـا المنقولـة تكـون كبيـرة بالمقارنـة مـع الـذباب المنزلـي *Musca domestica* والنمـل *Camponotus xerxes* وهـذا يتفق مـع مـا ذكـره (Guzman & Vilcinskas 2020) مـن ان الصرصـر يمكنـه حمـل بكتيريـا اكثـر بسـبب كبـر حجمـه ، كـذلك وجـدت الدراسـات السـابقة أن النمـل يحمـل مركبـات تشـبه المضـادات الحيويـة فـي تراكيـب متخصصـة علـى الجانـب السـفلي مـن أجسـامها (Samuels *et al*,.2013) وقـد يفسـر ذلـك قلـة نقـل النمـل للبكتيريـا فـي الدراسـة الحاليـة. أمـا بالنسـبة للـذباب فقـد ذكـرت الدراسـات أن الـذباب لـه القابليـة علـى حمـل البكتيريـا اكثـر مـرتين مـن الصراصـر (Dehghani&kassiri,.2020). وهـذا لا يتفـق مـع نتـائج الدراسـة الحاليـة التـي توصـلت الـى أن الصراصـر اكثـر نقـلا للبكتيريـا مـن الـذباب وربمـا يعـود سـبب ذلـك لقصـر المسـافة التـي تقطعهـا الصراصـر فـي الدراسـة الحاليـة ممـا يتسـبب فـي احتفـاظ الصرصـر الألمـاني بعـدد كبيـر مـن البكتيريـا علـى الاطـراف. اذ بلـغ متوسـط عـدد المسـتعمرات المنقولـة بواسـطة الصرصـر الألمـاني *Blattella germanica* (6) مسـتعمرات بينمـا بلـغ متوسـط مانقلتـه حشـرة الـذباب المنزلـي (3) مسـتعمرات اما النمـل فقـد كـان نقلـه للبكتيريـا الأقـل بـين الحشـرات المسـتعملة اذ بلـغ متوسـط عـدد المستعمرات المنقولة (1) مستعمرة كما في الجدول (4-20)

جـدول (4-20) عـدد مسـتعمرات *P.aeruginosa* المنقولـة بواسـطة الحشـرات المسـتعملة فـي الدراسـة

اسم الحشرة	الاسم العلمي	متوسط اعداد المستعمرات المنقولة
الصرصر الالماني	*Blattella germanica*	6
الذباب المنزلي	*Musca domestica*	3
النمـــل	*Camponotus xerxes*	1

التحليل الاحصائي

حللت البيانات باستخدام برنامج SAS وقورنت النتائج باستخدام قيمة اقل فرق معنوي (LSD) على مستوى احتمالية 0.05

المصدر :-

- **SAS 2012. Statistical Analysis System, User's Guide. Statistical. Version 9.1th ed. SAS. Institute Incorporated Cary. N.C. USA**

الفصل الخامس

الاستنتاجات والتوصيات

Conclusions and Recommendations

1-5الاستنتاجات Conclusion

1- أظهرت عزلات بكتيريا *P.aeruginosa* مقاومتها العالية للمضادات الحيوية عدا المضاد الحيوي Imipeneim فقد سجلت البكتيريا حساسية اتجاهه.
2- تمتلك بكتيريا *P.aeruginosa* غشاءاً حيويا اما قوياً او متوسطاً او ضعيفاً واثرت المستخلصات النباتية المستعملة في الدراسة بنسب متفاوتة اعتمادا على قوة الغشاء الحيوي.
3- كان للمستخلصات النباتية المائية والكحولية لنبات الزعتر وقشور نبات الرمان واوراق نبات التيكوما ونبات الشيح فعالية تثبيطية واضحة ضد بكتيريا *P. aeruginosa*.
4- اظهر مستخلص أوراق نبات التيكوما المائي والكحولي فعالية تثبيطية واضحة وأعطى المستخلص المائي للنبات اعلى معدلات تثبيط ضد بكتيريا الزوائف الزنجارية.
5- ان المستخلص المائي لاوراق نبات التيكوما ولنبات الشيح اعطى معدلات اقطار تثبيط اعلى مقارنة بالمستخلص الكحولي لنفس النباتين بينما اعطى المستخلص الكحولي لنبات الزعتر و قشور نبات الرمان فعالية تثبيطية اعلى من المستخلص المائي لنفس النباتين.
6- أظهرت الدراسة الحالية ان لبعض الحشرات (الصرصر الألماني والذباب المنزلي والنمل) القدرة على نقل بكتيريا *P.aeruginosa* وكانت حشرة الصرصر الألماني الأكثر كفاءة في النقل تليها الذباب المنزلي فيما كانت حشرة النمل الأقل نقلاً للبكتيريا.

2-5 التوصيات Recommendation

1- توسعة تطبيق استخدام المستخلصات النباتية واجراء التجارب عليها خاصة مع البكتيريا المقاومة للمضادات الحيوية.

2- اجراء دراسات على المستخلصات النباتية المستعملة في الدراسة وتطبيقها على أنواع أخرى من البكتيريا السالبة والموجبة لصبغة كرام.

3- عزل المركبات الفعالة الداخلة في تركيب المستخلصات لتحديد المركب الفعال الذي احدث تأثيراً مثبطاً لنمو البكتيريا.

4- التحري عن الحشرات الناقلة للبكتيريا والمستخلصات النباتية الطاردة لهذه الحشرات.

المصـــــادر

References

6- المصـــــادر References

6-1 المصادر العربية Arabic References

ابراهيم الرفاعي و انور العمر (2007) علم الاحياء الدقيقة الخاص جامعة البعث كلية الطب البيطري 106-107.

أبو الحب ، جليل (1978) الحشرات الناقلة للامراض، المجلس الوطني للثقافة والفنون والاداب – الكويت.

باقر ، ميعاد غالب (1997) . تأثير قشور الرمان وبعض النباتات الطبية المضادة للجراثيم والفطريات المرضي ة ، رسالة ماجستير ، كلية التربية ، جامعة البصرة.

حسين، فوزي طه قطب (1979) النباتات الطبية: زراعتها و مكوناتها. الدار البيضاء للكتاب، تونس، 357 صفحة.

الذهيباوي، مكي حمد عبد علي .(2006). دراسات سلوكية وفسلجية على الصرصر الالماني *Blattella germanica* (L.) والصرصر ذو الاحزمة البنية *Supella supellectilium* (S.) وبعض طرق مكافحتهماً ، اطروحة دكتوراه، كلية الزراعة ، جامعة بغداد.

الزبيدي، زهير نجيب وبابان هدى عبد الكريم وفليح، فارس كاظم (1996) دليل العلاج بالأعشاب الطبية العراقية، وزارة الصحة، منظمة الصحة العالمية.

زمزم ، حمدي (1985) . عجائب الطب الشعبي في التغذية . دار الهجرة للطباعة والنشر والتوزيع ، دار الايمان ، بيروت .

الصفار، هناء هاني عبد الحسين .(2003). دراسة تصنيفية لعائلة الذباب المنزلية في وسط العراق ، رسالة ماجستير، كلية العلوم ، جامعة بغداد.

قدامه ، احمد (1988) . قاموس الغذاء والتداوي بالنباتات ، دار النعاش ، بيروت .

مجيد، سامي هاشم ومحمود.(1988).النباتات والاعشاب العراقية بين الطب الشعبي والبحث العلمي- الطبعة الاولى. مطابع دار الثورة، بغداد - العراق.

المنظمة العربية للتنمية الزراعية (1988) النباتات العطرية و السامة في الوطن العربي، جامعة الدول العربية. الخرطوم 497 صفحة.

النعيمي، جبار حسن ، يوسف حنا، إنتاج الفاكهة النفضية، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، جامعة البصرة، مطبعة جامعة البصرة، 1980.

Foreign References المصادر الاجنبية 2-6

Abdel MAE, Dkhil MA, Al-Quraishy S (2011). Studies on the effect of pomegranate (Punica granatum) juice and peel on liver and kidney in adult male rats. JMPR. In Press

Abdullah, b. (2016). determination the biological effectiveness pyocyanin dye produced from bacteria *Pseudomonas aeruginosa*. Assiut Veterinary Medical Journal, 62(149), 1-13.

Abdul-Sahib, I. M., and Abdul-Sahib, E. M. (2009). A new record of the freshwater clam, *Anodonta vescoiana* Bourguignat, 1857 (Mollusca: Bivalvia) from Al-Ezz River, Iraqi Marshes. Mesopotamian Journal of Marine Science, 24(1).

Abid, Z. B., Feki, M., Hédhili, A., & Hamdaoui, M. H. (2007). Artemisia herba-alba Asso (Asteraceae) has equivalent effects to green and black tea decoctions on antioxidant processes and some metabolic parameters in rats. Annals of nutrition and metabolism, 51(3), 216-222.

Abou El Hamd, H. M., El-Sayed, M. A., Hegazy, M. E., Helaly, S. E., Esmail, A. M., & Mohamed, N. S. (2010). Chemical constituents and biological activities of Artemisia herba-alba. Records of Natural Products, 4(1), 1-25.

Adhami VM, Mukhtar H (2007). Anti-oxidants from green tea and pomegranate for chemoprevention of prostate cancer. Mol. Biotechnol., 37: 52-57.

Agnihotri, N., Gupta, V., & Joshi, R. M. (2004). Aerobic bacterial isolates from burn wound infections and their antibiograms—a five-year study. Burns, 30(3), 241-243.

Ahameethunisa, A. R., & Hopper, W. (2010). Antibacterial activity of Artemisia nilagirica leaf extracts against clinical and phytopathogenic bacteria. BMC complementary and alternative medicine, 10(1), 1-6.

Ahmed, E. A. M. (2012). Antioxidant activities of Punica granatum (pomegranate) peel extract on brain of rats. Journal of Medicinal Plants Research, 6(2), 195-199.

Alade, A., Ekundayo, O., Aboaba, S., & Flamini, G. (2019). Chemical characterization of Tecoma stans (L.) Juss. ex Kunth volatile oils. American Journal of Essential Oils and Natural Products, 7(3), 11-16.

Al-Azzawi, A. M., Al-Khateeb, E., Al-Sameraei, K., & Al-Juboori, A. G. (2012). Antibacterial activity and the histopathological study of crude extracts and isolated tecomine from Tecoma stans Bignoniaceae in Iraq. Pharmacognosy Research, 4(1), 37.

Ali, E., Islam, M. S., Hossen, M. I., Khatun, M. M., & Islam, M. A. (2021). Extract of neem (Azadirachta indica) leaf exhibits bactericidal effect against multidrug resistant pathogenic bacteria of poultry. Veterinary medicine and science, 7(5), 1921-1927.

Al-Waili, N. S. (1986). Treatment of diabetes mellitus by Artemisia herba-alba extract: preliminary study. Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology, 13(7), 569-573.

Al-Zoreky, N. S. (2009). Antimicrobial activity of pomegranate (Punica granatum L.) fruit peels. International journal of food microbiology, 134(3), 244-248.

Al-Zoreky, N. S. (2009). Antimicrobial activity of pomegranate (Punica granatum L.) fruit peels. International journal of food microbiology, 134(3), 244-248.

Alzubaidi, M., & Gabbard, S. (2015). GERD: Diagnosing and treating the burn. Cleve Clin J Med, 82(10), 685-92.

Anand, M., & Basavaraju, R. (2021). A review on phytochemistry and pharmacological uses of Tecoma stans (L.) Juss. ex Kunth. Journal of Ethnopharmacology, 265, 113270.

Anand, U., Jacobo-Herrera, N., Altemimi, A., & Lakhssassi, N. (2019). A comprehensive review on medicinal plants as antimicrobial therapeutics: potential avenues of biocompatible drug discovery. Metabolites, 9(11), 258.

Anwer, A. G., & Husien, A. S. (2007). Combination Effect of Laser, Antibiotics and Different Temperature on Locally Isolated Pseudomonas aeruginosa. Iraqi Journal of Laser, 6(B), 21-30.

Ashigar, M. A., & Ab Majid, A. H. (2020). Diversity, Abundance, and Foraging Behavior of Ants (Hymenoptera: Formicidae) Scavenging on American Cockroach in Various Habitats of Nasarawa State, Nigeria. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, *43*(4).

Azam, M. W., & Khan, A. U. (2019). Updates on the pathogenicity status of Pseudomonas aeruginosa. Drug discovery today, 24(1), 350-359.

Bakr, R. O., Fayed, M. A. A., Salem, M. A., & Hussein, A. S. (2019). Tecoma stans: Alkaloid profile and antimicrobial activity. Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences, 11(4), 341.

Baron, E. J., Peterson, L. R., & Finegold, S. M. (1994). Mycobacteria. Baily and Scott's Diagnostic Microbiology. 9th ed. St. Luis: The CV Mosby Company, 590-633.

Baron,Et. Peterson,L.R. and Finegold,S.M. (1994). Bailey and Scoffs Diagnostic Microbiology . 9th ed., the C. V. Mosby, Co.,USA. p. 386 – 403 .

Bashyal, P., Parajuli, P., Pandey, R. P., & Sohng, J. K. (2019). Microbial biosynthesis of antibacterial chrysoeriol in recombinant Escherichia coli and bioactivity assessment. Catalysts, 9(2), 112.

Bauer, A. W. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. Am J clin pathol, 45, 149-158.

Beara, I. N., Lesjak, M. M., Orčić, D. Z., Simin, N. Đ., Četojević-Simin, D. D., Božin, B. N., & Mimica-Dukić, N. M. (2012). Comparative analysis of phenolic profile, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic activity of two closely-related Plantain species: Plantago altissima L. and Plantago lanceolata L. LWT-Food Science and Technology, 47(1), 64-70.

Behzadi, P., Baráth, Z., & Gajdács, M. (2021). It's not easy being green: a narrative review on the microbiology, virulence and therapeutic prospects of multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa. Antibiotics, 10(1), 42.

Bellés Bellés, A., Seral García, C. P., & Castillo García, F. J. (2017). Epidemiología y caracterización de mecanismos de resistencia a carbapenems en Pseudomonas aeruginosa de muestras clínicas y de portadores fecales (Doctoral dissertation, Tesis doctoral) Universidad de Zaragoza, España.

Bennett, ga, w.(2008). integrated pest management (ipm) strategies for the german cockroach and its allergens

Biology, 1st ed.,Caister Academic press USA.

Bodey, G. P., Bolivar, R., Fainstein, V., & Jadeja, L. (1983). Infections caused by Pseudomonas aeruginosa. Reviews of infectious diseases, 5(2), 279-313.

Boskovic, M., Zdravkovic, N., Ivanovic, J., Janjic, J., Djordjevic, J., Starcevic, M., & Baltic, M. Z. (2015). Antimicrobial activity of thyme (Tymus vulgaris) and oregano (Origanum vulgare) essential oils against some food-borne microorganisms. Procedia Food Science, 5, 18-21.

Branski, L. K., Al-Mousawi, A., Rivero, H., Jeschke, M. G., Sanford, A. P., & Herndon, D. N. (2009). Emerging infections in burns. Surgical infections, 10(5), 389-397 .

Brooks,G.F. ;Butel,J.S. and Morse,S.A. (2001). Jawetz, Melnik and Adel berg's. Medical Microbiology. 22nd ed . p. 229–231. Medical East ed ; Appleton Large .

Camberlein, V. (2022). Target-guided synthesis of metalloenzyme ligands with therapeutical potential.

Carroll, K. C., Butel, J., & Morse, S. (2015). Jawetz melnick and adelbergs medical microbiology 27 E. McGraw-Hill Education.

Carsenti-Etesse, H., Cavallo, J. D., Roger, P. M., Ziha-Zarifi, I., Plesiat, P., Garrabe, E., & Dellamonica, P. (2002). Effect of beta-lactam antibiotics on the in vitro development of resistance in Pseudomonas aeruginosa. Chirurgia (Bucharest, Romania: 1990), 97(2), 151-159.

Celiz, G., Daz, M., & Audisio, M. C. (2011). Antibacterial activity of naringin derivatives against pathogenic strains. Journal of applied microbiology, 111(3), 731-738.

ÇETİN, B., ÇAKMAKÇI, S., & Cakmakci, R. (2011). The investigation of antimicrobial activity of thyme and oregano essential oils. Turkish Journal of Agriculture and forestry, 35(2), 145-154.

Chakravarty, H.L.,(1976). Plant wealth of Iraq, vol. I, Ministry of Agriculture and Agrarian Reform, Baghdad , 505PP.

Chapman, A. D. (2006). Numbers of Living Species in Australia and the World: Report for the Department of the Environment and Heritage Canberra, Australia. Department of the Environment and Heritage.

Ciofu, O., & Tolker-Nielsen, T. (2019). Tolerance and resistance of Pseudomonas aeruginosa biofilms to antimicrobial agents—how P. aeruginosa can escape antibiotics. Frontiers in microbiology, 913.

Coban, A. Y., Cihan, C. C., Bilgin, K., Uzun, M., Akgunes, A., Cetinkaya, E. M. R. A. H., & Durupinar, B. (2006). Blood agar for susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis against first-line drugs. The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, 10(4), 450-453.

Collee, J. G., Fraser, A. G., Marmino, B. P., & Simons, A. (1996). Mackin and McCartney Practical Medical Microbiology. The Churchill Livingstone. Inc. USA.

Collee, J. G., Mackie, T. J., & McCartney, J. E. (1996). Mackie & McCartney practical medical microbiology. Harcourt Health Sciences.

Collee, J.G .; Fraser,A.G. ; Marmion,B.P. and Simmons,A. (1996). Mackie and Mecartney . Practical Medical Microbiology. 14th ed .,Churchill Living stone, USA. p.413 – 424 .

Cook, N. C., & Samman, S. (1996). Flavonoids—chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. The Journal of nutritional biochemistry, 7(2), 66-76.

Cornelis, P. (2008). pseudomonas : Genomics and Molecular

Das, C., Mohanty, A., Sahoo, D. C., & Dash, S. (2010). Wound healing potential of methanolic extract of Tecoma stans Linn, Leaf. Drug Invention Today, 2(8).

Dauqan, E. M., & Abdullah, A. (2017). Medicinal and functional values of thyme (Thymus vulgaris L.) herb. Journal of applied biology and biotechnology, 5(2), 0-2.

Dauqan, E. M., & Abdullah, A. (2017). Medicinal and functional values of thyme (Thymus vulgaris L.) herb. Journal of applied biology and biotechnology, 5(2), 0-2.

Dehghani, R., & Kassiri, H. (2020). A brief review on the possible role of houseflies and cockroaches in the mechanical transmission of coronavirus disease 2019 (COVID-19). Archives of Clinical I

Del Barrio-Tofiño, E., Zamorano, L., Cortes-Lara, S., López-Causapé, C., Sánchez-Diener, I., Cabot, G., ... & Oliver, A. (2019). Spanish nationwide survey on Pseudomonas aeruginosa antimicrobial resistance mechanisms and epidemiology. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 74(7), 1825-1835.

Desai, A., Desai, C., Desai, H., Mansuri, A., & Desai, J. (2020). Possible role of medicinal plants in COVID-19-a brief review. International Journal of Scientific Development and Research, 5(4), 205-209 nfectious Diseases, 15(COVID-19).

Devatkal, S. K., Jaiswal, P., Jha, S. N., Bharadwaj, R., & Viswas, K. N. (2013). Antibacterial activity of aqueous extract of pomegranate peel against Pseudomonas stutzeri isolated from poultry meat. Journal of food science and technology, 50(3), 555-560.

Dewangan, N. I. H. A. R. I. K. A., Satpathy, S., Shrivastava, A. K., & Shrivastava, R. A. N. J. A. N. A. (2017). In vitro evaluation of antimicrobial activity of Tecoma stans and Vitex negundo. Indian Journal of Scientific Research, 13(2), 248-253.

Dhingra, V., Pakki, S. R., & Narasu, M. L. (2000). Antimicrobial activity of artemisinin and its precursors. Current Science, 709-713.

Diggle, S. P., & Whiteley, M. (2020). Microbe Profile: Pseudomonas aeruginosa: opportunistic pathogen and lab rat. Microbiology, 166(1), 30.

Dmitriev, J. G., Guagnini, A., Levere, T., Miller, D., Newman, W., North, J. D., ... & Warwick, A. (2008). SAO/NASA ADS (null) Abstract Service. SCIENCE, 46.

Durdu, T., Erdem, A. B., ÇELİKEL, E., Selahattin, G. Ü. R. Ü., & ŞENER, A.(2012). Patients with third degree burns in an emergency department. Archives of Current Medical Research, 3(1), 36-42.

Ebert, C., Tuchscherr, L., Unger, N., Pöllath, C., Gladigau, F., Popp, J., ... & Neugebauer, U. (2021). Correlation of crystal violet biofilm test results of Staphylococcus aureus clinical isolates with Raman spectroscopic read-out. Journal of Raman Spectroscopy, 52(12), 2660-2670.

Ekiert, H., Pajor, J., Klin, P., Rzepiela, A., Ślesak, H., & Szopa, A. (2020). Significance of Artemisia vulgaris L.(Common Mugwort) in the history of medicine and its possible contemporary applications substantiated by phytochemical and pharmacological studies. Molecules, 25(19), 4415.

Ekrami, A., & Kalantar, E. (2007). Bacterial infections in burn patients at a burn hospital in Iran. Indian Journal of Medical Research, 126(6), 541.

El-Amier, Y. A., Al Borki, A. E. N. S., & Elagami, S. A. (2019). Potential of wild plant Artemisia judaica L. as sustainable source of antioxidant and antimicrobial compounds. J. Exp. Sci, 10, 4-8

Elbargisy, R. M. (2021). Optimization of nutritional and environmental conditions for pyocyanin production by urine isolates of Pseudomonas aeruginosa. Saudi Journal of Biological Sciences, 28(1), 993-1000.

El-Fouly, M. Z., Sharaf, A. M., Shahin, A. A. M., El-Bialy, H. A., & Omara, A. M. A. (2015). Biosynthesis of pyocyanin pigment by Pseudomonas aeruginosa. Journal of Radiation Research and Applied Sciences, 8(1), 36-48.

Ferreira, J. F., Luthria, D. L., Sasaki, T., & Heyerick, A. (2010). Flavonoids from Artemisia annua L. as antioxidants and their potential synergism with artemisinin against malaria and cancer. Molecules, 15(5), 3135-3170.

Fisher, J. F., & Mobashery, S. (2016). β-Lactam resistance mechanisms: Gram-positive bacteria and Mycobacterium tuberculosis. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 6(5), a025221.

Fleming, T. (1998). PDR for herbal medicines. Montvale, NJ: Medical economics company.

Foil, L. D., & Gorham, J. R. (2004). Mechanical transmission of disease agents by arthropods. In Medical entomology (pp. 461-514). Springer, Dordrecht.

Forbes, B.A., D.F. Sahm and A.S. Weissfeld, (2007). Baily and Scott's Diagnostic Microbiology. 12th Edn., Elsevier, Mosby, pp: 323-350.

Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT (1989). New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. J. Clin. Pathol.42: 872-874.

Ganter, M. T., Roux, J., Su, G., Lynch, S. V., Deutschman, C. S., Weiss, Y. G., ... & Pittet, J. F. (2009). Role of small GTPases and αvβ5 integrin in Pseudomonas aeruginosa–induced increase in lung endothelial permeability. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 40(1), 108-118.

Garbe, J., Wesche, A., Bunk, B., Kazmierczak, M., Selezska, K., Rohde, C., ... & Schobert, M. (2010). Characterization of JG024, a Pseudomonas aeruginosa PB1-like broad host range phage under simulated infection conditions. BMC microbiology, 10(1), 1-10.

Geden, C. J., Nayduch, D., Scott, J. G., Burgess IV, E. R., Gerry, A. C., Kaufman, P. E., ... & Machtinger, E. T. (2021). House fly (Diptera: Muscidae): Biology, pest status, current management prospects, and research needs. Journal of Integrated Pest Management, 12(1), 39.

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

Gonçalves, N. D., de Lima Pena, F., Sartoratto, A., Derlamelina, C., Duarte, M. C. T., Antunes, A. E. C., & Prata, A. S. (2017). Encapsulated thyme

(Thymus vulgaris) essential oil used as a natural preservative in bakery product. Food Research International, 96, 154-160.

Gopal, J., Muthu, M., Paul, D., Kim, D. H., & Chun, S. (2016). Bactericidal activity of green tea extracts: the importance of catechin containing nano particles. Scientific Reports, 6(1), 1-14.

Graig,W.A. and Ebert,S.C. (1994) . Antimicrobial Therapy in P.aeruginosa Infections in Batch, A.L.; Smith, R.P. (eds) P.aeruginosa infections and Treatment . New York, Marcel Decker , p .441 – 518.

Granger, J., Estrada, C. M., Abramo, T. J., Grant, V. J., & Tothy, A. (2009). An evidence-based approach to pediatric burns. Pediatric Emergency Medicine Practice, 6(1), 1-17.

Gray, J. R., Grove, S. K., & Sutherland, S. (2016). Burns and grove's the practice of nursing research-E-book: Appraisal, synthesis, and generation of evidence. Elsevier Health Sciences.

Greenman, J., Gajda, I., You, J., Mendis, B. A., Obata, O., Pasternak, G., & Ieropoulos, I. (2021). Microbial fuel cells and their electrified biofilms. Biofilm, 3, 100057.

Guzman, J., & Vilcinskas, A. (2020). Bacteria associated with cockroaches: health risk or biotechnological opportunity?. Applied microbiology and biotechnology, 104(24), 10369-10387.

Haile, A. B., & Jiru, T. M. (2022). Antibacterial Effects of Artemisia afra Leaf Crude Extract Against Some Selected Multi-Antibiotic Resistant Clinical Pathogens. Ethiopian Journal of Health Sciences, 32(3.(

Hashim, S., & Gamil, M. (1988). Plants and herbs between the Iraqi folk medicine and scientific research. Baghdad, Dar revolution of Press and Publication.

Hashimoto, M., Sugawara, Y., Tamura, S., Kaneko, J., Matsui, Y., Kokudo, N., & Makuuchi, M. (2009). Pseudomonas aeruginosa infection after living-donor liver transplantation in adults. Transplant Infectious Disease, 11(1), 11-19.

Hauser, A. R., & Sriram, P. (2005). Severe Pseudomonas aeruginosa infections: tackling the conundrum of drug resistance. Postgraduate medicine, 117(1), 41-48.

Haynes, R. K. (2006). From artemisinin to new artemisinin antimalarials: biosynthesis, extraction, old and new derivatives, stereochemistry and medicinal chemistry requirements. Current topics in medicinal chemistry, 6(5), 509-537.

Heinrich, M.;Rimpler, H. and Antoni Barrera, N.,(1992). Indigenous, phytotherapy of gastrointestinal disorders in alow 1 and , mix community coaxaca, Mexico: Ethnopharmacologic ., Evaluation. J. Ethnopharmacol., 36: 63 – 80.

Herfindal, E.T. and Gourley,D.R. (2000) . Textbook of Therapeutics ,Drug and Disease Management 7th ed . Lippincott Williams & Wilkins, A Wolters Kluwer Co., USA.p.1049-1054.

Herndon, D. (2012). Chapter 4: Prevention of burn injuries. Total burn care (4th ed.). Edinburgh: Saunders, 46.

Hettiaratchy, S., & Papini, R. (2004). Initial management of a major burn: II—assessment and resuscitation. Bmj, 329(7457), 101-103.

Hoffman, L. R., D'Argenio, D. A., MacCoss, M. J., Zhang, Z., Jones, R. A., & Miller, S. I. (2005). Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. Nature, 436(7054), 1171-1175.

Huda-Faujan, N., Noriham, A., Norrakiah, A. S., & Babji, A. S. (2009). Antioxidant activity of plants methanolic extracts containing phenolic compounds. *African Journal of Biotechnology*, *8*(3).

Ibewuike, J. C., Ogungbamila, F. O., Ogundaini, A. O., Okeke, I. N., & Bohlin, L. (1997). Antiinflammatory and antibacterial activities of C-methylflavonols from Piliostigma thonningii. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Medical and Scientific Research on Plants and Plant Products, 11(4), 281-284.

Iriadam, M., Musa, D., Gumushan, H., & Baba, F. (2006). Effects of two Turkish medicinal plants Artemisia herba-alba and Teucrium polium on blood glucose levels and other biochemical parameters in rabbits. J Cell Mol Biol, 5(1), 19-24.

Javed, H., Erum, S., Tabassum, S., & Ameen, F. (2013). An overview on medicinal importance of Thymus vulgaris. Journal of Asian Scientific Research, 3(10), 974-982.

Jesus, P. R. D., Ferreira, J. A. B., Carmo, J. D. S., Albertino, S. R. G., Vicentini Neto, S. A., Santos, L. M. G. D., & Zamith, H. P. D. S. (2021). Monitoramento da qualidade da água utilizada nos serviços de diálise móvel em unidades de tratamento intensivo no município do Rio de Janeiro. Brazilian Journal of Nephrology, 44, 32-41.

Jurado-Martín, I., Sainz-Mejías, M., & McClean, S. (2021). Pseudomonas aeruginosa: An audacious pathogen with an adaptable arsenal of virulence factors. International Journal of Molecular Sciences, 22(6), 3128.

Jurado-Martín, I., Sainz-Mejías, M., & McClean, S. (2021). Pseudomonas aeruginosa: An audacious pathogen with an adaptable arsenal of virulence factors. International Journal of Molecular Sciences, 22(6), 3128.

Kaczmarek, B. (2020). Tannic acid with antiviral and antibacterial activity as a promising component of biomaterials—A minireview. Materials, 13(14), 3224.

Kaczmarek, B. (2020). Tannic acid with antiviral and antibacterial activity as a promising component of biomaterials—A minireview. Materials, 13(14), 3224.

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

Kahlon, R. S. (Ed.). (2016). Pseudomonas: molecular and applied biology. Basel, Switzerland: Springer International Publishing.

Karakaş, F. P., Yildirim, A., & Türker, A. (2012). Biological screening of various medicinal plant extracts for antibacterial and antitumor activities. Turkish journal of biology, 36(6), 641-652.

Karthikeyan, G., & Vidya, A. K. (2019). Phytochemical analysis, antioxidant and antibacterial activity of pomegranate peel. Research Journal of Life Science, Bioinformatics, Pharmaceutical and Chemical Science, 5(1.(

Kim, M. H., Seo, J. Y., Liu, K. H., & Kim, J. S. (2014). Protective effect of Artemisia annua L. extract against galactose-induced oxidative stress in mice. PloS one, 9(7), e101486.

Kiser, T. Obritisch, M. D. Jung, R. MaClaren, R. and Fish, D. (2010). Efflux pump contribution to multidrug resistance in clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa. Pharmacotherapy. 30(7):632-8. obiology. 4:1–8.

Knezevic, P., & Petrovic, O. (2008). A colorimetric microtiter plate method for assessment of phage effect on Pseudomonas aeruginosa biofilm. Journal of Microbiological methods, 74(2-3), 114-118.

Kolmos,H.J.;Thuesen,B. ; Nielsen,S.V.; Lohmann,M.; Kristoffersen,K. and Rosdahi,V.T. (1993). Outbreak of Infection in Burns Unit due to P.aeruginosa Originating from Contaminated Tubing Used for Irrigation of Patients .J. of Hospital Infection. 24 : 11-21.

Kong, J., Yang, Y., Wang, W., Cheng, K., & Zhu, P. (2013). Artemisinic acid: A promising molecule potentially suitable for the semi-synthesis of artemisinin. RSC advances, 3(21), 7622-7641.

Kshirsagar, S. G., & Rao, R. V. (2021). Antiviral and immunomodulation effects of Artemisia. Medicina, 57(3), 217.

Kuan, P. N., Chua, S., Safawi, E. B., Wang, H. H., & Tiong, W. (2017). A comparative study of the classification of skin burn depth in human. Journal of Telecommunication, Electronic and Computer Engineering (JTEC), 9(2-10), 15-23.

Laohapitakworn, S., Kusakunniran, W., & Chatdokmaiprai, C. (2021). Grabcut Algorithm: A New Assessment of Burn Wound Area from Digital Images. JOURNAL OF THE MEDICAL ASSOCIATION OF THAILAND, 104(12), 21-26.

Lau, G. W., Hassett, D. J., Ran, H., & Kong, F. (2004). The role of pyocyanin in Pseudomonas aeruginosa infection. Trends in molecular medicine, 10(12), 599-606.

Lawrence, G. H. M. (1951). Taxonomy of vascular plants New York.

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.

Ligozzi, M., Bernini, C., Bonora, M. G., De Fatima, M., Zuliani, J., & Fontana, R. (2002). Evaluation of the VITEK 2 system for identification and antimicrobial susceptibility testing of medically relevant gram-positive cocci. Journal of clinical microbiology, 40(5), 1681-1686.

Limoli, D. H., Jones, C. J., & Wozniak, D. J. (2015). Bacterial extracellular polysaccharides in biofilm formation and function. Microbiology spectrum, 3(3), 3-3.

Livermore, D. M. (2002). Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in Pseudomonas aeruginosa: our worst nightmare?. Clinical infectious diseases, 34(5), 634-640.

López, D., Vlamakis, H., & Kolter, R. (2010). Biofilms. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2(7), a000398.

Lou, Z., Wang, H., Zhu, S., Ma, C., & Wang, Z. (2011). Antibacterial activity and mechanism of action of chlorogenic acid. Journal of food science, 76(6), M398-M403.

MacFaddin, J. F. (2000). Biochemical tests for identification of medical bacteria, williams and wilkins. Philadelphia, PA, 113.

Macfaddin,J.F. (2000) . Biochemical tests for Identification of Medical Bacteria 3rd ed .p. 689 – 691 .The Williams & Wilkins Co.,USA.

Mah, T. F., Pitts, B., Pellock, B., Walker, G. C., Stewart, P. S., & O'Toole, G. A. (2003). A genetic basis for Pseudomonas aeruginosa biofilm antibiotic resistance. Nature, 426(6964), 306-310.

Mahboubi, M., Heidarytabar, R., Mahdizadeh, E., & Hosseini, H. (2017). Antimicrobial activity and chemical composition of Thymus species and Zataria multiflora essential oils. Agriculture and natural resources, 51(5), 395-401.

Mahon, C. R., Lehman, D. C., & Manuselis, G. (2018). Textbook of diagnostic microbiology-e-book. Elsevier Health Sciences.

Martins, N., Barros, L., Santos-Buelga, C., Silva, S., Henriques, M., & Ferreira, I. C. (2015). Decoction, infusion and hydroalcoholic extract of cultivated thyme: Antioxidant and antibacterial activities, and phenolic characterisation. Food chemistry, 167, 131-137.

McVay, C. S., Velásquez, M., & Fralick, J. A. (2007). Phage therapy of Pseudomonas aeruginosa infection in a mouse burn wound model. Antimicrobial agents and chemotherapy, 51(6), 1934-1938.

Mehta, L. S., Beckie, T. M., DeVon, H. A., Grines, C. L., Krumholz, H. M., Johnson, M. N., ... & Wenger, N. K. (2016). Acute myocardial infarction in women: a scientific statement from the American Heart Association. Circulation, 133(9), 916-947.

Mena, K. D., & Gerba, C. P. (2009). Risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in water. *Reviews of environmental contamination and toxicology Vol 201*, 71-115.

Menasria, T., Moussa, F., El-Hamza, S., Tine, S., Megri, R., & Chenchouni, H. (2014). Bacterial load of German cockroach (Blattella germanica) found in hospital environment. Pathogens and global health, 108(3), 141-147.

Micek, S. T., Lloyd, A. E., Ritchie, D. J., Reichley, R. M., Fraser, V. J., & Kollef, M. H. (2005). Pseudomonas aeruginosa bloodstream infection: importance of appropriate initial antimicrobial treatment. Antimicrobial agents and chemotherapy, 49(4), 1306-1311.

Mighri, H., Hajlaoui, H., Akrout, A., Najjaa, H., & Neffati, M. (2010). Antimicrobial and antioxidant activities of Artemisia herba-alba essential oil cultivated in Tunisian arid zone. Comptes Rendus Chimie, 13(3), 380-386.

Moacă, E. A., Pavel, I. Z., Danciu, C., Crăiniceanu, Z., Minda, D., Ardelean, F., ... & Dehelean, C. A. (2019). Romanian wormwood (Artemisia absinthium L.): Physicochemical and nutraceutical screening. Molecules, 24(17), 3087.

Mohamed, Z. S., Yousry, M. G., LM, C., Nader, A. E. S., & AZM, S. (2013). Antioxidant and antibacterial activities of leaves and branches extracts of Tecoma stans (L.) Juss. ex Kunth against nine species of pathogenic bacteria. African Journal of Microbiology Research, 7(5), 418-426

Mohebrad, B., Ghods, G., & Rezaee, A. (2022). Dairy wastewater treatment using immobilized bacteria on calcium alginate in a microbial electrochemical system. Journal of Water Process Engineering, 46, 102609.

Montagna, W. (2012). The structure and function of skin. Elsevier.

Moradali, M. F., Ghods, S., & Rehm, B. H. (2017). Pseudomonas aeruginosa lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence. Frontiers in cellular and infection microbiology, 7, 39.

Morita, Y.; Tomidal, J. and Kawamura, Y. (2014). Responses of Pseudomonas aeruginosa to antimicrobials. Frontiers in Micr

Morrison,A.J. and Wenzel,R.P. (1984). Epidemiology of Infections Due to Pseudomonas aeruginosa .Rev.Infect.Dis. 6 (3) : 5627-5642.

Munazza, G., & Fauzia, Y. H. (2012). Characterization of siderophore producing bacterial strain Pseudomonas fluorescens Mst 8.2 as plant growth promoting and biocontrol agent in wheat. African Journal of Microbiology Research, 6(33), 6308-6318.

Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of antibiotic resistance. Microbiology spectrum, 4(2), 4-2.

Nagel, T. R., & Schunk, J. E. (1997). Using the hand to estimate the surface area of a burn in children. Pediatric emergency care, 13(4), 254-255.

Nicoletti, M. (2020). Three scenarios in insect-borne diseases. Insect-Borne Diseases in the 21st Century, 99.

Nihad ,A.; Wa'ad,M. and Sheelan,A. (2002). Prevalence and Antibiogram Profile of P.aeruginosa Isolated from Patients Attending STH At Tikrit city . The Medical Journal of Tikrit University. 8 : 61 – 67.

Noorbakhsh, S. I., Bonar, E. M., Polinski, R., & Amin, M. S. (2021). Educational Case: Burn Injury—Pathophysiology, Classification, and Treatment. Academic pathology, 8, 23742895211057239.

Nostro, A., Germano, M. P., D'angelo, V., Marino, A., & Cannatelli, M. A. (2000). Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal

plant antimicrobial activity. Letters in applied microbiology, 30(5), 379-384.

Nzeako, B. C., Al-Kharousi, Z. S., & Al-Mahrooqui, Z. (2006). Antimicrobial activities of clove and thyme extracts. Sultan Qaboos University Medical Journal, 6(1), 33.

O'Toole, G., Kaplan, H. B., & Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. Annual review of microbiology, 54, 49.

Owlia, P., Saderi, H., Behzadiannezhad, Q., & Souri, E. (2001). Microscopic study of the effects of sub-inhibitory concentrations of gentamicin on capsule production of Pseudomonas aeruginosa. Archives of Iranian Medicine, 1(4).

Ozogul, Y., Boğa, E. K., Akyol, I., Durmus, M., Ucar, Y., Regenstein, J. M., & Köşker, A. R. (2020). Antimicrobial activity of thyme essential oil nanoemulsions on spoilage bacteria of fish and food-borne pathogens. Food Bioscience, 36, 100635.

Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T. J., & Cheng, Z. (2019). Antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa: mechanisms and alternative therapeutic strategies. Biotechnology advances, 37(1), 177-192.

Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T. J., & Cheng, Z. (2019). Antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa: mechanisms and alternative therapeutic strategies. Biotechnology advances, 37(1), 177-192

Picao, R. C., Poirel, L., Gales, A. C., & Nordmann, P. (2009). Diversity of β-lactamases produced by ceftazidime-resistant Pseudomonas aeruginosa isolates causing bloodstream infections in Brazil. Antimicrobial agents and chemotherapy, 53(9), 3908-3913.

Pool, K. (2007). Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. Ann Med. 39:162-76

Prasanth Reddy, V., Ravi Vital, K., Varsha, P. V., & Satyam, S. (2014). Review on Thymus vulgaris traditional uses and pharmacological properties. Med Aromat Plants, 3(164), 2167-0412.

Pruitt BA, Jr., McManus AT, Kim SH, Goodwin CW.(1998). Burn wound infections: current status. World J Surg, 22:135–45.

Rabelo, C. A., Ricardo, M., Porfirio, J. A., Pimentel, T. C., Nascimento, J. D. S., & COSTA, L. E. D. O. (2021). Psychrotrophic bacteria in Brazilian organic dairy products: identification, production of deteriorating enzymes and biofilm formation. Food Science and Technology, 41, 799-806.

Raman, G., Avendano, E. E., Chan, J., Merchant, S., & Puzniak, L. (2018). Risk factors for hospitalized patients with resistant or multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa infections: a systematic review and meta-analysis. Antimicrobial Resistance & Infection Control, 7(1), 1-14.

Ran, H., Hassett, D. J., & Lau, G. W. (2003). Human targets of Pseudomonas aeruginosa pyocyanin. Proceedings of the National Academy of Sciences, 100(24), 14315-14320.

Rice, P. L., & Orgill, D. (2021). Assessment and classification of burn injury. UpToDate,[Internet.[

Rocha, C. L., Coburn, J., Rucks, E. A., & Olson, J. C. (2003). Characterization of Pseudomonas aeruginosa exoenzyme S as a bifunctional enzyme in J774A. 1 macrophages. Infection and immunity, 71(9), 5296-5305.

Rolta, R., Sharma, A., Sourirajan, A., Mallikarjunan, P. K., & Dev, K. (2021). Combination between antibacterial and antifungal antibiotics with phytocompounds of Artemisia annua L: a strategy to control drug resistance pathogens. Journal of Ethnopharmacology, 266, 113420.

Romão, C. M. C. P. A., Faria, Y. N. D., Pereira, L. R., & Asensi, M. D. (2005). Susceptibility of clinical isolates of multiresistant Pseudomonas aeruginosa to a hospital disinfectant and molecular typing. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, *100*, 541-548.

Rosdahl, C. B., & Kowalski, M. T. (Eds.). (2008). Textbook of basic nursing. Lippincott Williams & Wilkins.

Rota, M. C., Herrera, A., Martínez, R. M., Sotomayor, J. A., & Jordán, M. J. (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of Thymus vulgaris, Thymus zygis and Thymus hyemalis essential oils. Food control, 19(7), 681-687

Ryder, C., Byrd, M., & Wozniak, D. J. (2007). Role of polysaccharides in Pseudomonas aeruginosa biofilm development. Current opinion in microbiology, 10(6), 644-648.

Sadananda, T. S., Jeevitha, M. K., Pooja, K. S., & Raghavendra, V. B. (2011). Antimicrobial, Antioxidant Activity and Phytochemical Screening of Tecoma stans (L.) Juss. ex Kunth. Journal of Phytology, 3(3.(

Sadeq, T. W., Kamel, F. H., & Qader, K. O. (2019). A novel preparation of thyme cream as superficial antimicrobial treatment. J. Int. Pharm. Res, 46, 373-381.

Sadikot, R. T., Blackwell, T. S., Christman, J. W., & Prince, A. S. (2005). Pathogen–host interactions in Pseudomonas aeruginosa pneumonia.

American journal of respiratory and critical care medicine, 171(11), 1209-1223.

Safaei, H. G., Moghim, S., Isfahani, B. N., Fazeli, H., Poursina, F., Yadegari, S., ... & Nodoushan, S. A. H. (2017). Distribution of the strains of multidrug-resistant, extensively drug-resistant, and pandrug-resistant Pseudomonas aeruginosa isolates from burn patients. Advanced biomedical research, 6.

Sakkas, H., & Papadopoulou, C. (2017). Antimicrobial activity of basil, oregano, and thyme essential oils. Journal of microbiology and biotechnology, 27(3), 429-438.

Salehzadeh, A., Tavacol, P., & Mahjub, H. (2007). Bacterial, fungal and parasitic contamination of cockroaches in public hospitals of Hamadan, Iran. Journal of vector borne diseases, 44(2), 105.

Samuels, R. I., Mattoso, T. C., & Moreira, D. D. (2013). Chemical warfare: Leaf-cutting ants defend themselves and their gardens against parasite attack by deploying antibiotic secreting bacteria. Communicative & integrative biology, 6(2), e23095.

Savić-Radovanović, R., Rajić-Savić, N., & Gajić, I. (2021). Characteristics of Pseudomonas spp. isolated from food of animal origin. In 2nd International UNIfood Conference (p. 124). University of Belgrade.

Savitri, E. S., Holil, K., Resmisari, R. S., Syarifah, U., & Munawaroh, S. (2019). Effect of extraction solvent on total phenol, total flavonoid content and antioxidant activities of extract plants Punica granatum, Vitis vinifera L, Ficus carica L. and Olea europea. In AIP Conference Proceedings (Vol. 2120, No. 1, p. 030034). AIP Publishing LLC.

Schwikkard, S., & van Heerden, F. R. (2002). Antimalarial activity of plant metabolites. Natural Product Reports, 19(6), 675-692.

Serrano, C., Acha, B., Gómez-Cía, T., Acha, J. I., & Roa, L. M. (2005). A computer assisted diagnosis tool for the classification of burns by depth of injury. Burns, 31(3), 275-281.

Shakibaie, M., Forootanfar, H., Golkari, Y., Mohammadi-Khorsand, T., & 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. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 29, 235-241.

Sharaf ,M. R., Abdel-Dayem ,M.S.,Al Dhafer, H.M., and Aldawood ,A.S. (2013). The ants (Hymenoptera: Formicidae) of raw hat Khorim Nature Preserve ,Saudi Arabia, with description of tanew species of the genus Tetramorium mayr.zootaxa,3709(6),565-580.

Shariati, A., Asadian, E., Fallah, F., Azimi, T., Hashemi, A., Sharahi, J. Y., & Moghadam, M. T. (2019). Evaluation of Nano-curcumin effects on expression levels of virulence genes and biofilm production of multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa isolated from burn wound infection in Tehran, Iran. Infection and Drug Resistance, 12, 2223.

Sharifa, A. A., Neoh, Y. L., Iswadi, M. I., Khairul, O., Abdul Halim, M., Jamaludin, M., ... & Hing, H. L. (2008). Effects of methanol, ethanol and aqueous extract of Plantago major on gram positive bacteria, gram negative bacteria and yeast. Ann Microsc, 8, 42-44.

Silva, D. P.; Schofield, M. C.; Parsek, M. R. and Tseng, B. S. (2017). An Update on the Sociomicrobiology of Quorum Sensing in Gram-Negative Biofilm Development. Pathogens. 6(51): 1-9

Simothy, L., Mahomoodally, F., & Neetoo, H. (2018). A study on the potential of ants to act as vectors of foodborne pathogens. AIMS microbiology, 4(2), 319.

Sivropoulou, A., Papanikolaou, E., Nikolaou, C., Kokkini, S., Lanaras, T., & Arsenakis, M. (1996). Antimicrobial and cytotoxic activities of Origanum essential oils. Journal of agricultural and Food Chemistry, 44(5), 1202-1205.

Smullen, J., Koutsou, G. A., Foster, H. A., Zumbé, A., & Storey, D. M. (2007). The antibacterial activity of plant extracts containing polyphenols against Streptococcus mutans. Caries research, 41(5), 342-349.

Soliman, M. A., Galal, T. M., Naeim, M. A., & Khalafallah, A. A. (2022). Seasonal Variation in the Secondary Metabolites and Antimicrobial Activity of Plantago major L. from Egyptian Heterogenic Habitats. Egyptian Journal of Botany, 62(1), 255-273.

Soltani, B., Heidari, H., Ebrahim-Saraie, H. S., Hadi, N., Mardaneh, J., & Motamedifar, M. (2018). Molecular characteristics of multiple and extensive drug-resistant Acinetobacter baumannii isolates obtained from hospitalized patients in Southwestern Iran. *Le infezioni in medicina: rivista periodica di eziologia, epidemiologia, diagnostica, clinica e terapia delle patologie infettive*, *26*(1), 67-76.

Sowjanya, P., & Srivinasa, B. (2017). Phytochemical investigation and antimicrobial properties of crude flower extract of Tecoma stans (L.) Juss. ex Kunth. Der Pharmacia Lettre, 9(7), 140-149

Stefancin, C. V. (2013). Antimicrobial effect of Artemisia species on Pseudomonas aeruginosa.

Strateva, T., & Yordanov, D. (2009). Pseudomonas aeruginosa–a phenomenon of bacterial resistance. Journal of medical microbiology, 58(9), 1133-1148.

Su, S., Panmanee, W., Wilson, J. J., Mahtani, H. K., Li, Q., VanderWielen, B. D., & Hassett, D. J. (2014). Catalase (KatA) plays a role in protection against anaerobic nitric oxide in Pseudomonas aeruginosa. PLoS One, 9(3), e91813.

Subramoniam, A., Pushpangadan, P., Rajasekharan, S., Evans, D. A., Latha, P. G., & Valsaraj, R. (1996). Effects of Artemisia pallens Wall. on blood glucose levels in normal and alloxan-induced diabetic rats. Journal of Ethnopharmacology, 50(1), 13-17.

Suman,E.; Varghese,S. and Jose,J. (2005) . Gentamicin resistance in Biofilm producing infections .Indian J.Med.Sci. 59 :214 -216.

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.

Tang, Y. W., Stratton, C. W., & Tang, Y. W. (2013). Advanced techniques in diagnostic microbiology. New York: Springer.

Teffo, L. S., Aderogba, M. A., & Eloff, J. N. (2010). Antibacterial and antioxidant activities of four kaempferol methyl ethers isolated from Dodonaea viscosa Jacq. var. angustifolia leaf extracts. South African Journal of Botany, 76(1), 25-29.

Tiede, Y., Schlautmann, J., Donoso, D. A., Wallis, C. I., Bendix, J., Brandl, R., & Farwig, N. (2017). Ants as indicators of environmental change and ecosystem processes. Ecological Indicators, 83, 527-537.

Tiza, N. U., Thato, M., Raymond, D., Jeremy, K., & Burtram, C. F. (2015). Additive antibacterial activity of naringenin and antibiotic combinations against multidrug resistant Staphylococcus aureus. African Journal of Microbiology Research, 9(23), 1513-1518.

Todar, K. (2004). Todar's online textbook of bacteriology: Pseudomonas aeruginosa. Department of Bacteriology, University of Wisconsin, Madison.

Todar, K. (2015). Textbook of bacteriology.

Tredget, E. E., Rennie, R., Burrell, R. E., & Logsetty, S. (2009). Infections in the thermally injured patient. Evidence-Based Infectious Diseases, 280.

Tredget, E. E., Shankowsky, H. A., Rennie, R., Burrell, R. E., & Logsetty, S. (2004). Pseudomonas infections in the thermally injured patient. Burns, 30(1), 3-26.

Ulbin-Figlewicz, N., Zimoch, A., & Jarmoluk, A. (2013). Plant extracts as components of edible antimicrobial protective coatings. Czech Journal of Food Sciences, 31(6), 596-600.

Upadhyay, A., Upadhyaya, I., Kollanoor-Johny, A., & Venkitanarayanan, K. (2014). Combating pathogenic microorganisms using plant-derived antimicrobials: a minireview of the mechanistic basis. BioMed research international, 2014.

Van Delden, C., & Iglewski, B. H. (1998). Cell-to-cell signaling and Pseudomonas aeruginosa infections. Emerging infectious diseases, 4(4), 551.

Van Delden, C., & Iglewski, B. H. (1998). Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerging infectious diseases*, *4*(4), 551.

Van Huis, A., Van Itterbeeck, J., Klunder, H., Mertens, E., Halloran, A., Muir, G., & Vantomme, P. (2013). Edible insects: future prospects for food and feed security (No. 171). Food and agriculture organization of the United Nations. 43(2), 287-291 .

Wachtel, T. L., Berry, C. C., Wachtel, E. E., & Frank, H. A. (2000). The inter-rater reliability of estimating the size of burns from various burn area chart drawings. Burns, 26(2), 156-170.

Wang, J., Kodali, S., Lee, S. H., Galgoci, A., Painter, R., Dorso, K., ... & Singh, S. B. (2007). Discovery of platencin, a dual FabF and FabH inhibitor with in vivo antibiotic properties. Proceedings of the National Academy of Sciences, 104(18), 7612-7616.

Webber, M. A. (2002). The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. J Antimicrob Chemoth. 51:9-11 .

Winstanley, C., Kaye, S. B., Neal, T. J., Chilton, H. J., Miksch, S., & Hart, C. A. (2005). Genotypic and phenotypic characteristics of Pseudomonas aeruginosa isolates associated with ulcerative keratitis. Journal of medical microbiology, 54(6), 519-526.

Woodson, L. C., Sherwood, E. R., Kinsky, M. P., Talon, M., Martinello, C., & Woodson, S. M. (2018). Anesthesia for burned patients. In Total burn care (pp. 131-157). Elsevier.

Xu, Y. ; Li,T. ; Qi,S.; Shen,R. ;Shen,R. ;Chen,D. ; X.Ben and Zou,Y. (2002). An investigation of bacterial epidemiology and an analysis of

bacterial resistance to antibiotics in a burn unit from 1993-1999 .Zhonghua – shao-shang Za-Zhi .18 (3) :159- 62.

Yang, X., Wang, D., Zhou, Q., Nie, F., Du, H., Pang, X., & Xu, Y. (2019). Antimicrobial susceptibility testing of Enterobacteriaceae: determination of disk content and Kirby-Bauer breakpoint for ceftazidime/avibactam. BMC microbiology, 19(1), 1-7.

Yang, Y., Shen, W., Zhong, Q., Chen, Q., He, X., Baker, J. L., ... & Le, S. (2020). Development of a bacteriophage cocktail to constrain the emergence of phage-resistant Pseudomonas aeruginosa. Frontiers in microbiology, 11, 327.

Yassin, M. T., Mostafa, A. A. F., & Al Askar, A. A. (2021). In Vitro Evaluation of Biological Activities and Phytochemical Analysis of Different Solvent Extracts of Punica granatum L.(Pomegranate) Peels. Plants, 10(12), 2742.

Yousef, R., & El-Khai, A. (2014). Inhibitory Effects of Essential oils of Some Wild Medicinal Plant Species on Activity of Some Pathogenic Fungi. Journal of Productivity and Development, 19(3), 413-427.

Ziha-Zarifi, I., Llanes, C., Köhler, T., Pechere, J. C., & Plesiat, P. (1999). In vivo emergence of multidrug-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* overexpressing the active efflux system MexA-MexB-OprM. Antimicrobial Agents and Chemotherapy.

الملاحق

Appendixes

الملحق رقم (1) تشخيص بكتيريا *P. aeruginosa* بجهاز الفايتك VITEK

bioMérieux Customer:

Microbiology Chart Report

Printed January 11, 2022 1:21:43 PM CST

Patient Name: NWAL , HADE
Location:
Lab ID: D2616576

Patient ID: YUIIIIIIIIIIIII
Physician:
Isolate Number: 1

Organism Quantity:
Selected Organism : Pseudomonas aeruginosa

Source: SWAB

Collected:

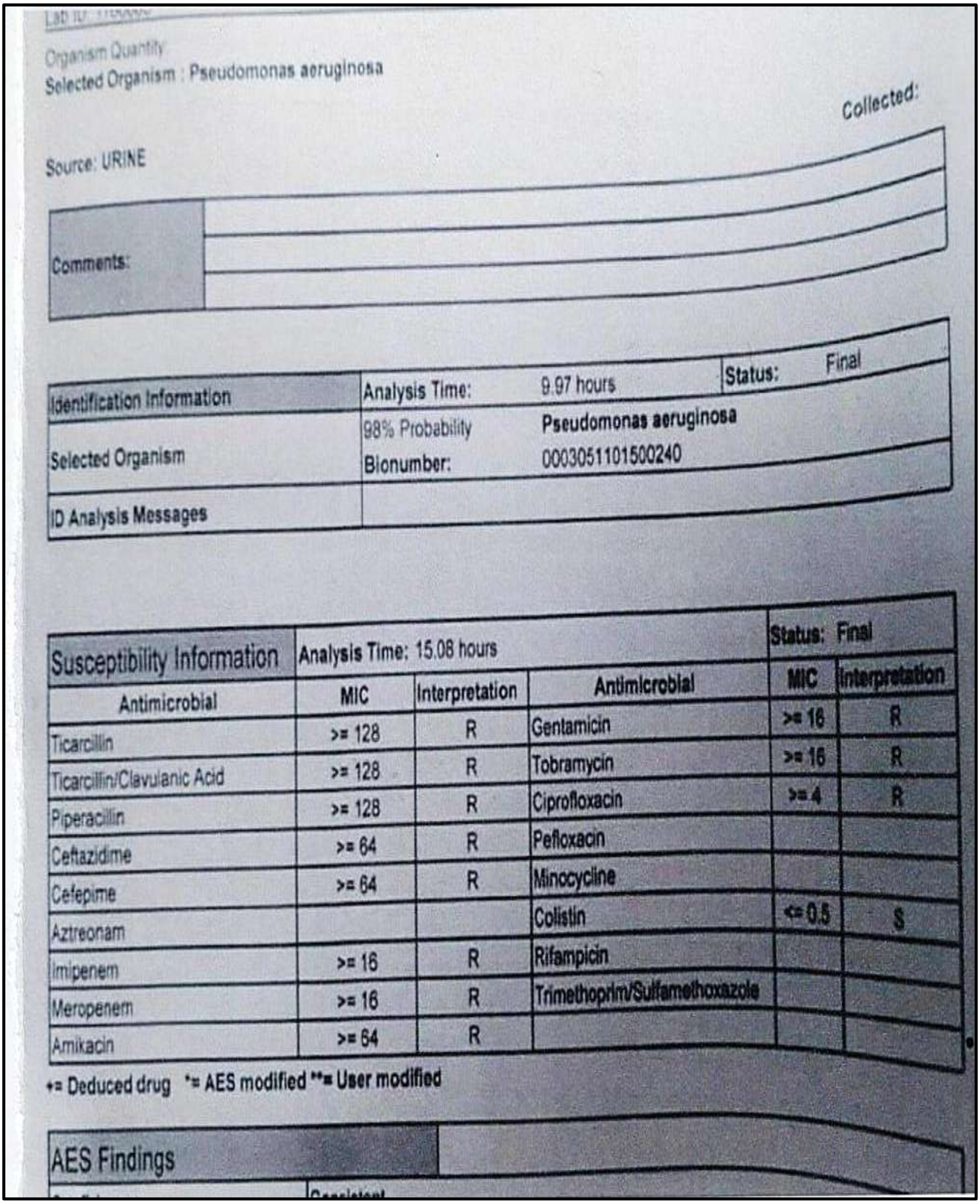
Comments:

Identification Information	**Analysis Time:**	5.85 hours	**Status:** Final
Selected Organism	99% Probability	**Pseudomonas aeruginosa**	
	Bionumber:	0003053001500000	
ID Analysis Messages			

Biochemical Details

2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	lARL	-	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	lLATk	+	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	-	44	AGAL	-	45	PHOS	-
46	GlyA	-	47	ODC	-	48	LDC	-	53	lHISa	-	56	CMT	-	57	BGUR	-
58	O129R	-	59	GGAA	-	61	lMLTa	-	62	ELLM	-	64	lLATa	-			

الملحق رقم (2) اختبار حساسية بكتيريا *P. aeruginosa* بواسطة جهاز الفايتك VITEK



Organism Quantity
Selected Organism : Pseudomonas aeruginosa

Source: URINE

Collected:

Comments:

Identification Information	Analysis Time:	9.97 hours	Status: Final
Selected Organism	98% Probability	Pseudomonas aeruginosa	
	Bionumber:	0003051101500240	
ID Analysis Messages			

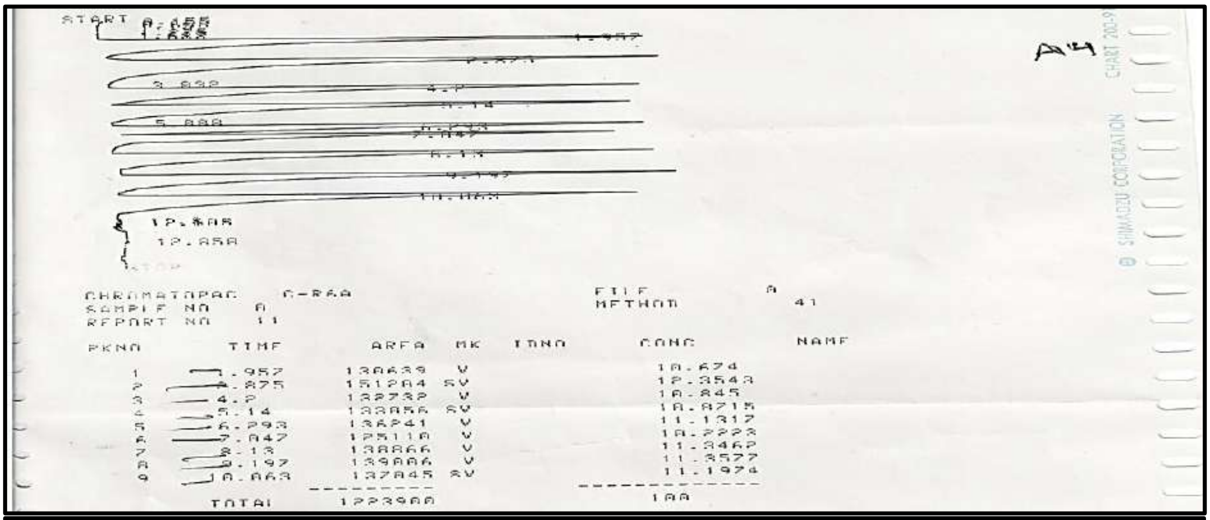
Susceptibility Information — Analysis Time: 15.08 hours — Status: Final

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		
Cefepime	>= 64	R	Minocycline		
Aztreonam			Colistin	<= 0.5	S
Imipenem	>= 16	R	Rifampicin		
Meropenem	>= 16	R	Trimethoprim/Sulfamethoxazole		
Amikacin	>= 64	R			

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

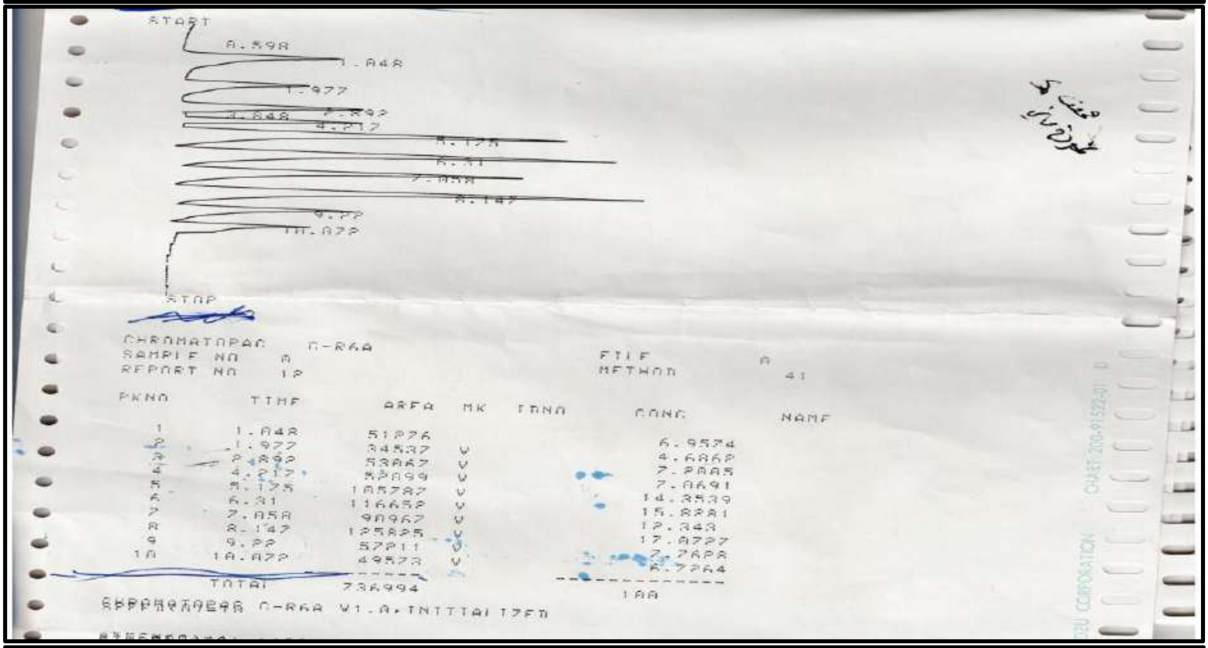
AES Findings

الملحق رقم (3) المركبات الكيميائية الفعالة و زمن الاحتجاز (دقيقة) ومساحة الذروة والتركيز لمستخلص نبات الزعتر



CHROMATOPAC C-R6A
SAMPLE NO 0
REPORT NO 11
FILE 0
METHOD 41

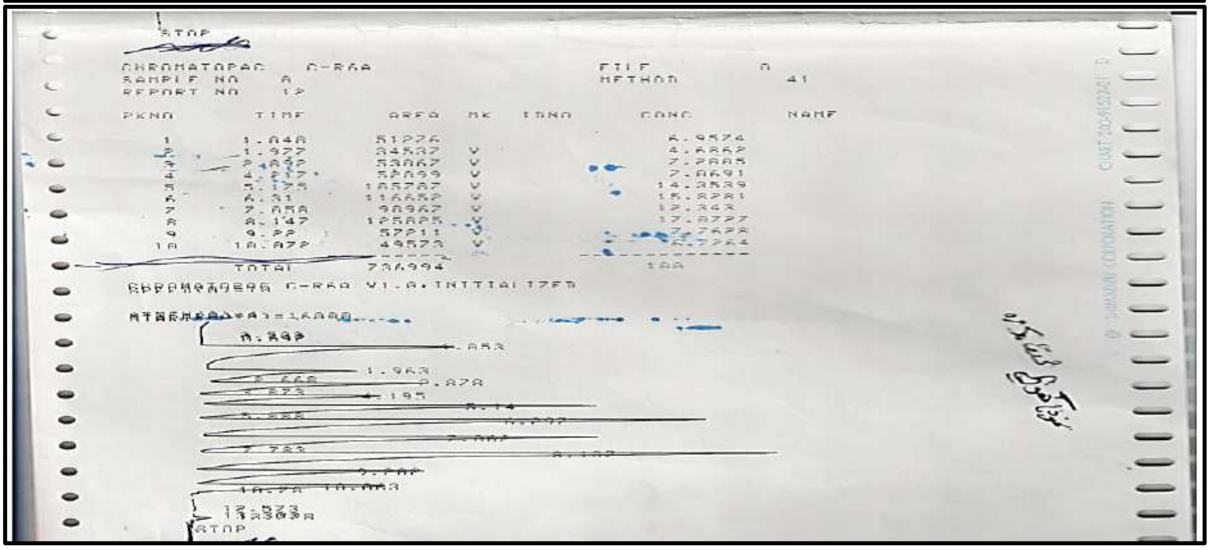
PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1.957	130639	V		10.674	
2	2.875	151204	SV		12.3543	
3	4.2	132732	V		10.845	
4	5.14	133056	SV		10.8715	
5	6.293	136241	V		11.1317	
6	7.047	125110	V		10.2223	
7	8.13	138866	V		11.3462	
8	9.197	139006	V		11.3577	
9	10.063	137045	SV		11.1974	
TOTAL		1223900			100	



CHROMATOPAC C-R6A
SAMPLE NO 0
REPORT NO 12
FILE 0
METHOD 41

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1.048	51276			6.9574	
2	1.977	34537	V		4.6862	
3	2.892	53067	V		7.2005	
4	4.217	52099	V		7.0691	
5	5.175	105787	V		14.3539	
6	6.31	116652	V		15.8281	
7	7.058	90967	V		12.343	
8	8.147	125825	V		17.0727	
9	9.22	57211	V		7.7628	
10	10.072	49573	V		6.7264	
TOTAL		736994			100	

CHROMATOPAC C-R6A V1.0 INITIALIZED

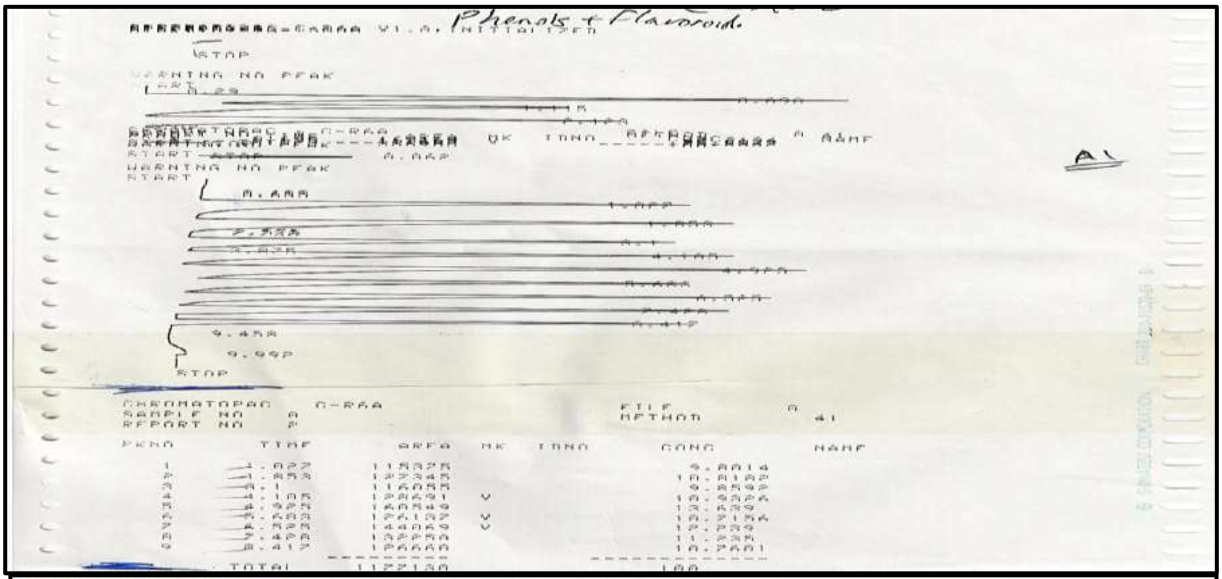


CHROMATOPAC C-R6A
SAMPLE NO 0
REPORT NO 12
FILE 0
METHOD 41

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1.048	51276			6.9574	
2	1.977	34537	V		4.6862	
3	2.892	53067	V		7.2005	
4	4.217	52099	V		7.0691	
5	5.175	105787	V		14.3539	
6	6.31	116652	V		15.8281	
7	7.058	90967	V		12.343	
8	8.147	125825	V		17.0727	
9	9.22	57211	V		7.7628	
10	10.072	49573	V		6.7264	
TOTAL		736994			100	

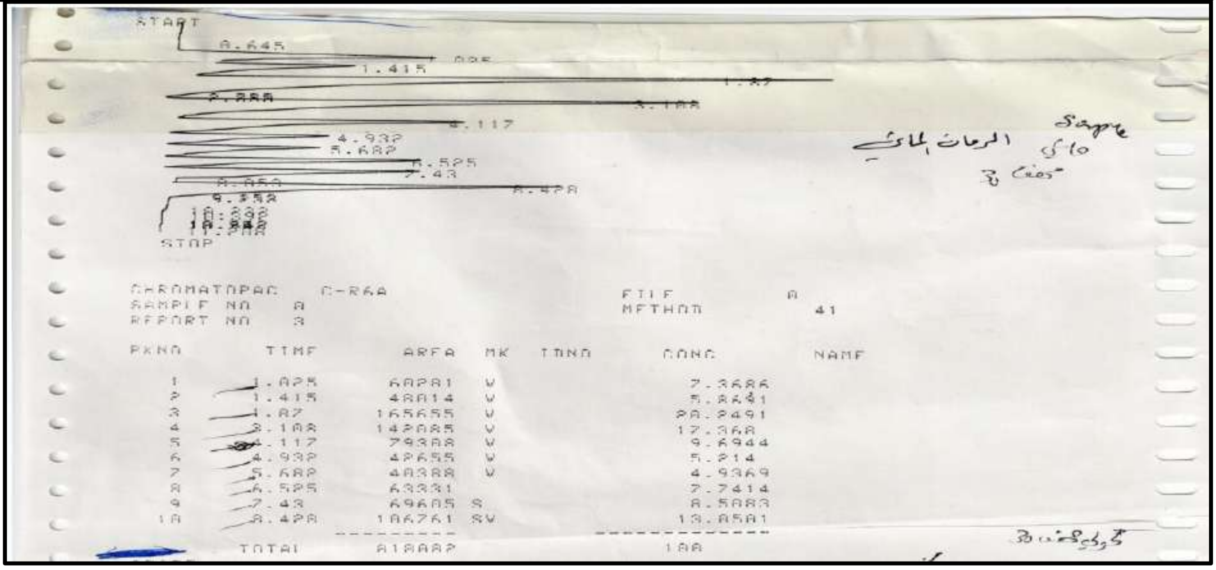
CHROMATOPAC C-R6A V1.0 INITIALIZED

الملحق رقم (4) المركبات الفعالة وزمن الاحتجاز ومساحة الذروة والتركيز لمستخلص قشور الرمان بتقنية HPLC



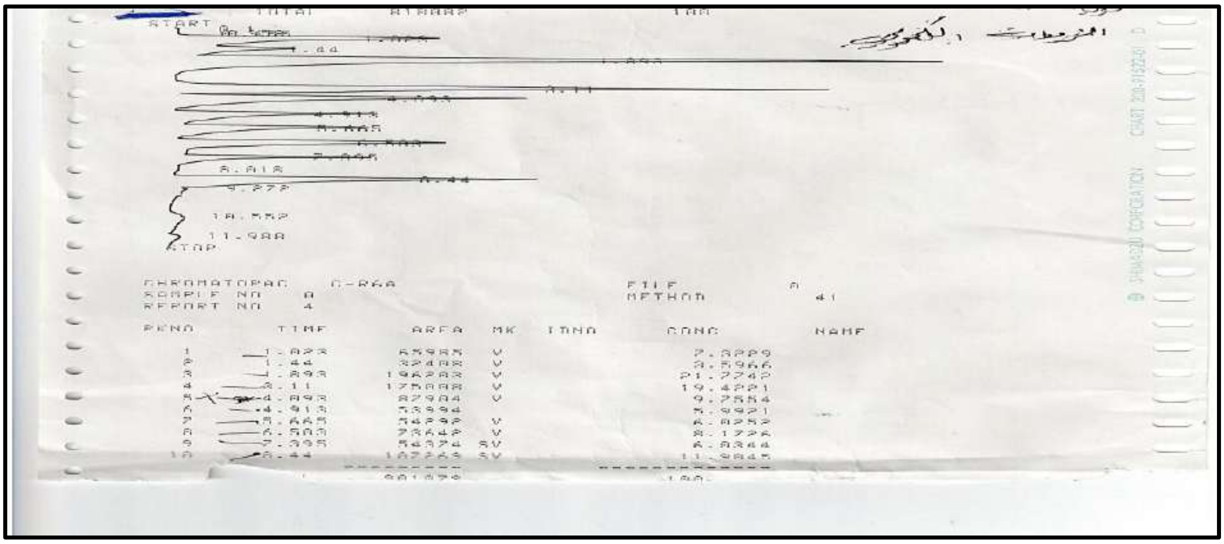
CHROMATOPAC C-R6A FILE 0
SAMPLE NO 0 METHOD 41
REPORT NO 2

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1.022	115825			9.0014	
2	1.853	122345			10.0102	
3	3.1	116055			9.8592	
4	4.105	120691	V		10.9526	
5	4.925	100549			13.839	
6	5.680	126137	V		10.7156	
7	6.525	144069	V		12.239	
8	7.420	132250			11.235	
9	8.417	126660			10.2601	
	TOTAL	1122130			100	



CHROMATOPAC C-R6A FILE 0
SAMPLE NO 0 METHOD 41
REPORT NO 3

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1.025	60281	V		7.3686	
2	1.415	48014	V		5.8641	
3	1.87	165655	V		20.2491	
4	3.108	142085	V		17.368	
5	4.117	79308	V		9.6944	
6	4.932	42655	V		5.214	
7	5.682	40388	V		4.9369	
8	6.525	63331			7.7414	
9	7.43	69605	S		8.5083	
10	8.428	106761	SV		13.0501	
	TOTAL	818082			100	

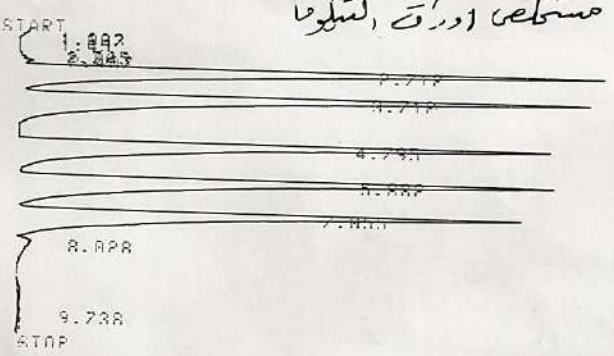


CHROMATOPAC C-R6A FILE 0
SAMPLE NO 0 METHOD 41
REPORT NO 4

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1.023	65985	V		7.3229	
2	1.44	32408	V		3.5966	
3	1.893	196203	V		21.7742	
4	3.11	175008	V		19.4221	
5	4.093	87904	V		9.7554	
6	4.913	53994			5.9921	
7	5.665	54292	V		6.0252	
8	6.503	73642	V		8.1726	
9	7.395	54374	SV		6.0344	
10	8.44	107263	SV		11.9045	
		901073			100	

الملحق رقم (5) المركبات الفعالة وزمن الاحتجاز ومساحة الذروة والتركيز لمستخلص أوراق التيكوما بتقنية HPLC

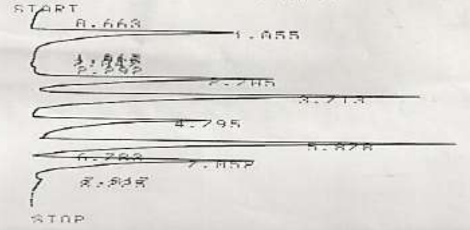
مستخلص أوراق التيكوما



CHROMATOPAC C-R6A FILE 0
SAMPLE NO 0 METHOD 41
REPORT NO 5

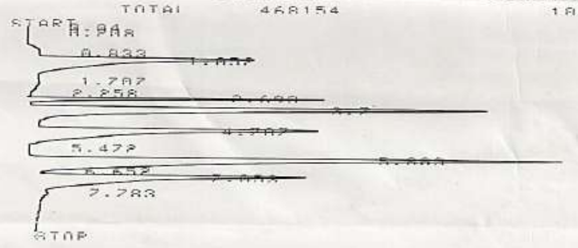
PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	2.712	151870	V		20.4327	
2	3.712	150805	V		20.2894	
3	4.795	146181			19.6673	
4	5.882	141271	V		19.0066	
5	7.055	136841	V		18.4107	
6	8.028	16302	V		2.1933	
	TOTAL	743271			100	

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	2.712	151870	V		20.4327	
2	3.712	150805	V		20.2894	
3	4.795	146181			19.6673	
4	5.882	141271	V		19.0066	
5	7.055	136841	V		18.4107	
6	8.028	16302	V		2.1933	
	TOTAL	743271			100	



CHROMATOPAC C-R6A FILE 0
SAMPLE NO 0 METHOD 41
REPORT NO 6

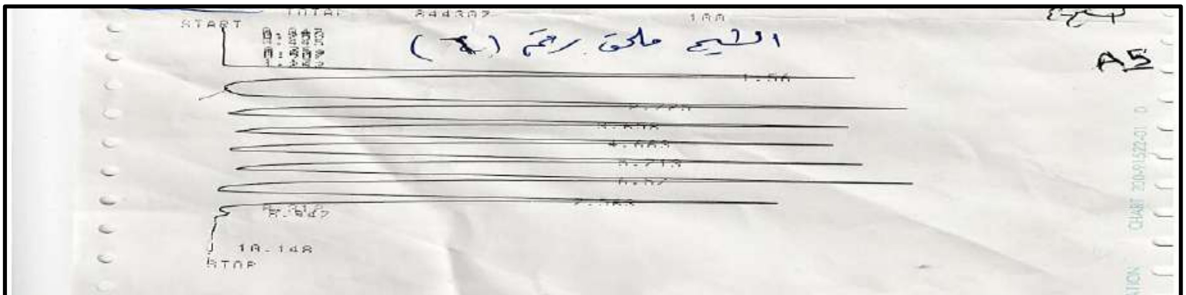
PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1.055	55305	S		11.8135	
2	2.705	72371	V		15.4588	
3	3.713	109790	V		23.4533	
4	4.795	59040	V		12.6112	
5	5.878	111930	SV		23.9007	
6	7.052	59711	V		12.7545	
	TOTAL	468154			100	



CHROMATOPAC C-R6A FILE 0
SAMPLE NO 0 METHOD 41
REPORT NO 7

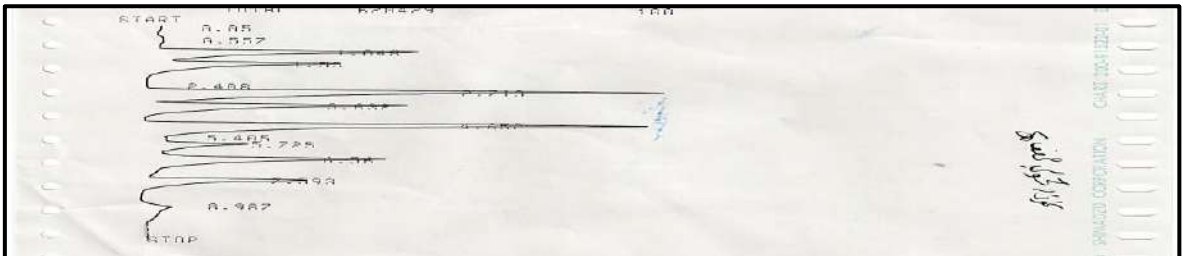
PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME

الملحق رقم (6) المركبات الفعالة وزمن الاحتجاز ومساحة الذروة والتركيز لمستخلص نبات الشيح بتقنية HPLC



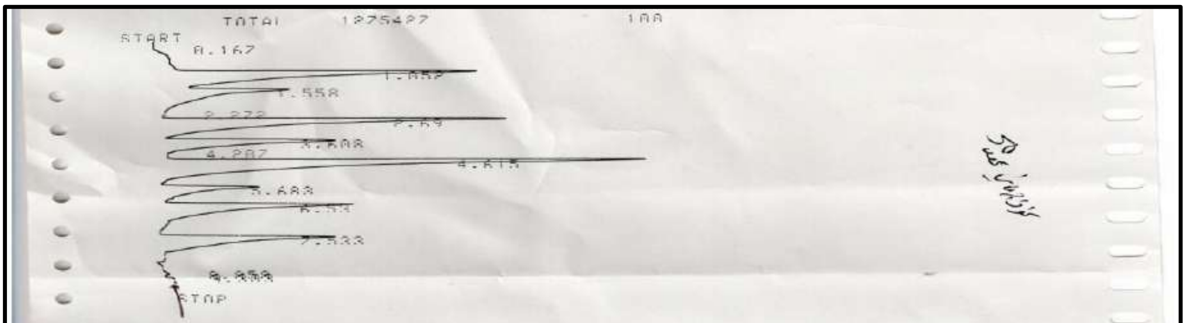
CHROMATOPAC C-R6A — SAMPLE NO 0 — REPORT NO 2 — FILE 0 — METHOD 41

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1.56	168182	V		13.1863	
2	2.725	196124	V		15.3771	
3	3.658	181355	V		14.2192	
4	4.663	179115	V		14.0435	
5	5.713	183724	V		14.4049	
6	6.57	193519	V		15.1729	
7	7.563	173408	SV		13.5961	
	TOTAL	1275427			100	



CHROMATOPAC C-R6A — SAMPLE NO 0 — REPORT NO 4 — FILE 0 — METHOD 41

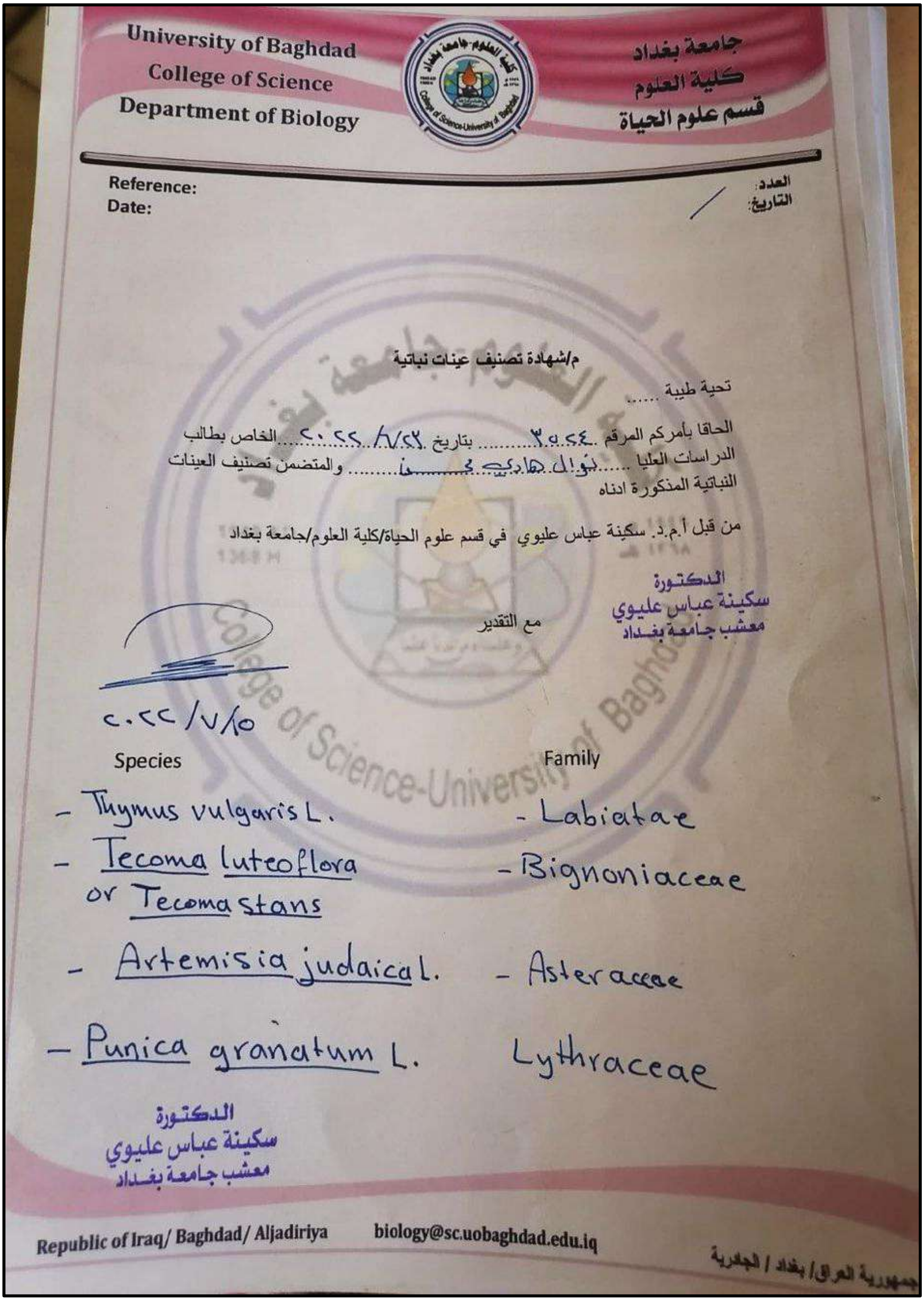
PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1.048	69310	V		10.0251	
2	1.55	50050	V		7.2394	
3	2.713	146905	V		21.2487	
4	3.632	72041	V		10.4202	
5	4.652	146157	S		21.1406	
6	5.725	38011	V		5.498	
7	6.56	94251	V		13.6328	
8	7.593	47492	V		6.8694	
9	8.987	27142			3.9259	
	TOTAL	691358			100	



CHROMATOPAC C-R6A — SAMPLE NO 0 — REPORT NO 3 — FILE 0 — METHOD 41

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1.052	108568	V		17.4988	
2	1.558	53574	SV		8.635	
3	2.69	100940	V		16.2694	
4	3.608	55872	SV		9.0054	
5	4.615	147319	V		23.7446	
6	5.683	35796	V		5.7695	
7	6.53	60557	V		9.7604	
8	7.533	57804	V		9.3168	
	TOTAL	620429			100	

الملحق رقم (7) تشخيص النباتات (*Thymus vulgaris* L. –*Tecom stans*- *Artemisia judaica* L.-*Punica granatum* L.)



University of Baghdad
College of Science
Department of Biology

جامعة بغداد
كلية العلوم
قسم علوم الحياة

Reference: العدد:
Date: التاريخ:

م/شهادة تصنيف عينات نباتية

تحية طيبة ......

الحاقا بأمركم المرقم ٣٠٥٤٤ بتاريخ ٢٠٢٢/٧/٢٤ الخاص بطالب الدراسات العليا نوال هادي [illegible] والمتضمن تصنيف العينات النباتية المذكورة ادناه

من قبل أ.م.د. سكينة عباس عليوي في قسم علوم الحياة/كلية العلوم/جامعة بغداد

مع التقدير

الدكتورة
سكينة عباس عليوي
معشب جامعة بغداد

٢٠٢٢/٧/٥

Species	Family
- Thymus vulgaris L.	- Labiatae
- Tecoma luteoflora or Tecoma stans	- Bignoniaceae
- Artemisia judaica L.	- Asteraceae
- Punica granatum L.	Lythraceae

الدكتورة
سكينة عباس عليوي
معشب جامعة بغداد

Republic of Iraq/ Baghdad/ Aljadiriya biology@sc.uobaghdad.edu.iq جمهورية العراق/ بغداد/ الجادرية

Summary

This study was conducted to investigate the sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients in Imam Hussein Medical City Hospital in Karbala Governorate to plant extracts of (*Thymus vulgaris*, *Punica granatum* peel, *Tecoma stans* leaves and *Artemisia judaica*) during the period from December 2021 to May 2022, as 100 swabs were collected from patients Those lying in the burn hall and their sensitivity to 10 antibiotics. Plant extracts with different concentrations were used and their activity tested against those isolates, which include thyme extract, pomegranate peel extract, tecuma leaf extract and wormwood extract. The chemical composition of these extracts was also studied in an attempt to enhance its effect. The results of the obtained extracts were compared with each other to identify the highly potent compound.

The total number of *P. aeruginosa* isolates was 40 samples out of 100 clinical samples, and the distribution of these isolates was: 57 males and 43 females. The bacterial isolates were identified through routine diagnostic tests, which included culturing and biochemical characteristics. The effectiveness of 10 antibiotics was detected by disc diffusion method, and the results showed a high degree of resistance to most antibiotics represented by Gentamicin, Penicillin, Cephalosporin, Cefatoxime, Erythromycin, Streptomycin, Amoxicillin, Levofloxacin, Oxacillin. Accordingly, the results were consistent with the so-called P.aeruginosa. Multidrug-resistant (MDRPA) except for the antibiotic Imipemeim, for which bacteria have been reported sensitive .

Conclusion

The results of this study showed that gender, age, prolonged hospital stay, and prolonged use of antibiotics had an effect as risk factors increased the chance of infection. The ability of P. aeruginosa to produce biofilm was detected by a calibrated platelet test (MTP). The results showed that (37) bacterial isolates with a percentage of 92.5% were biofilm-producing, while the rest of the isolates with a total of (3) and a rate of 7.5% were non-productive and weak. Concentrations (25,50,75,100) mg/ml were used to evaluate the inhibitory activity of plant extracts. The aqueous and alcoholic extracts of thyme, pomegranate peel, tecuma leaves and wormwood showed an inhibitory activity against P. aeruginosa bacteria, and the increase of this activity correlated with the increase in concentration. The aqueous extract of Tecoma

leaves at a concentration of 100 mg/ml showed the highest inhibition diameter, which was 32.30 ± 1.43 mm.

The results of the study showed that the value of the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum killer concentration (MBC) vary depending on the type of extract and the strength of the biofilm. ml against strong, medium and weak biofilm producing bacteria, respectively, while the MIC and MBC values for alcoholic extract were (16,32,32) mg/ml and (128, 128,256) mg/ml against strong, medium and weak biofilm producing bacteria, respectively. Straight . The study also showed that the MIC and MBC value of the aqueous extract of pomegranate peels (16, 32, 32) mg / ml (128, 128, 128) mg / ml against strong, medium and weak biofilm-producing bacteria, respectively, and the MIC and MBC value of the alcoholic extract of the peels were Pomegranate plant (16,16,64) mg/ml and (128,128,128) mg/ml against strong, medium and weak biofilm-producing bacteria, respectively. While the MIC and MBC value of tecuma leaf extract against biofilm-producing bacteria, respectively. Strong (128,32) mg/ml and (128,64) mg/ml for the aqueous and alcoholic extracts, respectively, while the MIC and MBC value of the medium biofilm producing bacteria was (128,16) mg/ml (128,32) mg/ml for the aqueous extracts. And the MIC and MBC value of the*Tecoma stans* leaf extract were (128.4) mg/ml and (128.8) mg/ml for the aqueous and alcoholic extracts, respectively, for the bacteria producing weak biofilm.

The study showed that the MIC and MBC value of the aqueous extract of the *Artemisia judaica* plant It was (32,64,64) mg/ml and (256,256,512) mg/ml against strong, medium and weak biofilm-producing bacteria, respectively between What was the MIC and MBC value of the alcoholic extract (64,64,64) mg/ml and (256,256,512) mg/ml against strong, medium and weak biofilm producing bacteria, respectively.

The active chemical compounds present in the plant extracts were detected by HPLC liquid chromatography apparatus and the results of the obtained extracts were compared with each other to determine the highly effective compound.The results of the study showed that some insects (*Blattella germanica*, *Musca domestica* and *Camponotus xerxes*) had the ability to transmit *P.aeruginosa* bacteria, and the German cockroach was the most efficient in transmitting, followed by the house flies, while the ants were the least transmitting bacteria.

University of Karbala

College of Education for Pure Sciences

Department of Biology

Study of sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa* bacteria isolated from burn injuries to some plant extracts and their ability to transmission through insect in Karbala city

A Thesis Submitted to the Council of College of Education for Pure Science / University of Karbala in partial fulfillment of the requirements for the degree of master in Biology-Zoology

Written By

Nawal Hadi Mohsen Al-kabi

Supervised By

P.Dr.

Rafid Abbas Al-Essa

Assist.P.Dr.

Kiaser Abdulsajjad M.Hussain

July, 2022.A.D.

The alheja,1443 A.H.