جمهوريـــــــــــة العـــــراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعــــــــة القادســــــــية
كليـــــــــة العلـــــــوم
قسم علـــــــــوم الحيـــاة

تقييم فعالية المستخلص المائي لقشور الرمان تجاه بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* المسببة لخمج المسالك البولية

بحث تخرُّج تقدَّم به الطالب

رسول عبد الحسين خروع

الى كلية العلوم قسم علوم الحياة – جامعة القادسية
كجزء من متطلبات نيل شهادة البكالوريوس في علوم الحياة

اشراف الاستاذ :

م.م. عباس ميار حزام

١٤٤٠هـ ٢٠١٩م

بسم الله الرحمن الرحيم

(قَالَ رَبِّ اشْرَحْ لِي صَدْرِي * وَيَسِّرْ لِي
أَمْرِي * وَاحْلُلْ عُقْدَةً مِّن لِّسَانِي يَفْقَهُوا
قَوْلِي) (طه/٢٥-٢٨)

صدق الله العلي العظيم

الاهداء

الى تلك الشيبة المضيئة الى تلك اليد الواحدة، الى ذلك الوجه الباسم والدي العزيز (حفظه الله) الى ذلك الوجه الذي تجعد حرمانا لكي اعيش سعيداً الى تلك الاكف السمر اللائي دفعن بي نحو تحقيق طموحي في هذه الحياة المزدحمة والدتي الجليلة (اطال عمرها وحفظها لي خيمة في جمع شملي) الى من كان له الفضل الكبير في سلامة هذا البحث استاذي الفاضل الاستاذ عباس ميار.

الخلاصة Abstract

أجريت الدراسة الحالية لبيان فعالية المستخلص المائي لقشور الرمان ضد بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من اخماج المسالك البولية للمرضى الراقدين والمراجعين لمستشفى الديوانية التعليمي ، كان الهدف من الدراسة هو إمكانية استخدام المستخلصات النباتية كبديل للمضادات الحياتية في علاج التهاب المسالك البولية . تم عزل وتشخيص البكتريا بالاختبارات الزرعية والكيموحيوية

من جهة أخرى تم استخلاص المركبات الفعالة في قشور الرمان وتحضير مجموعة تراكيز منها (١٠٠،٧٥،٥٠،٢٥) ملغم/مل بعدها تم تقييم فعالية المستخلص المائي لقشور الرمان ضد نمو العزلات قيد الدراسة عند التراكيز (١٠٠،٧٥،٥٠،٢٥) ملغم/مل باستخدام طريقة الانتشار بحفر الاكار Agar well diffusion method ، أظهرت النتائج حساسية بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* لجميع التراكيز المستخدمة حيث سجلت النتائج تباين في التأثير التثبيطي باختلاف التركيز المستخدم ،إذ كانت البكتريا أكثر حساسية للتركيز ١٠٠ ملغم /مل واقل حساسية للتركيز ٢٥ ملغم/مل ظهر ذلك من خلال قياس أقطار مناطق تثبيط النمو inhibition zone الذي أبدته البكتريا للتراكيز المختلفة من المستخلص المائي لقشور الرمان ، إذ كان اكبر قطر تثبيط عند التركيز ١٠٠ملغم/مل حيث بلغ بلغ ٣٧ ملم في حين ظهر التركيز ٢٥ ملغم/مل اقل قطر تثبيط حيث بلغ ١٥ ملم

ومن خلال نتائج الدراسة نستنتج إن لمستخلصات قشور الرمان فعالية تثبيطية تجاه بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* وتزداد هذه الفعالية بزيادة التركيز المستخدم.

Abstract

The present study was conducted to demonstrate the effectiveness of the pomegranate peel extract against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from UTIs in Diwaniyah Teaching Hospital, the aim of the study was to use plant extracts as an alternative to antibiotics in the treatment of urinary tract infection. *Pseudomonas aeruginosa* was isolated and diagnosed with biochemical tests.

On the other hand, active compounds were extracted from pomegranate peel and a concentration of 25,50,75,100 mg/ml was prepared. The effectiveness of the pomegranate extract was then evaluated against the growth of the isolates under study (25,50,75,100) mg/ml using Agar well diffusion method, the results showed a sensitivity of Pseudomonas aeruginosa to all concentrations. The results showed a difference in the inhibitory effect according to the concentration used. The bacteria were more sensitive to the concentration of 100 mg/ml and less sensitive to the concentration of 25 mg/ml by measuring the diameters of the bacterial inhibition zones of the different concentrations of pomegranate peel extract, the largest diameter inhibition was 37 mm at 100 mg/ml, while the 25 mg/ml concentration showed the lowest diameter was 15 mm.

The results of the study suggest that pomegranate peel extracts have an inhibitory effect on Pseudomonas aeruginosa and increase this activity by increasing the concentration used.

المحتويات

العنوان	رقم الفقرة
المقدمة	١
استعراض المراجع	٢
الصفات العامة لبكتريا	٢-١
أمراضية بكتيريا *P. aeruginosa*	٢-٢
انزيمات البروتيز	٢-٢-١
الانزيم الحال للشحوم	٢-٢-٢
انزيم الكتاليز	٢-٢-٣
الأمراض المتسببة عن بكتيريا *P. aeruginosa*	٢-٣
الرمان	٢-٤
المواد وطرائق العمل	٣
الأجهــزة والصبغات والأدوات والمواد الكيميائية	٣-١
تحضير الأوساط الزرعية	٣-٢
التعقيم **Sterilization**	٣-٣
جمع العينات **Samples collection**	٣-٤
تشخيص البكتريا المعزولة	٣-٥
الفحص المظهري والمجهري	٣-٥-١
الفحوصات الكيموحيوية	٣-٥-٢
حفظ العزلات البكتيرية	٣-٦
تحضير المستخلص المائي لقشور الرمان	٣-٧
تحضير التراكيز المختلفة لمستخلص قشور الرمان	٣-٨
الفعالية التثبيطية لقشور الرمان تجاه بكتريا *Pseudomonas aeruginosa*	٣-٩
النتائج والمناقشة	٤
العزل والتشخيص	٤-١
الفعالية التثبيطية للمستخلص المائي لقشور الرمان ضد بكتريا *P. aeruginosa*	٤-٢
الاستنتاجات والتوصيات	
المصادر	

1- المقدمة Introduction

تعد بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* واحدة من أهم الأنواع البكتيرية السالبة لصبغة گرام المسببة لتفشي العدوى المكتسبة من المستشفيات (Gawish *et al*., 2013) ، إذ لوحظ في كثير من الأحيان صعوبة علاج الإصابات الناتجة عن هذه البكتيريا لكونها تمتلك صفة المقاومة الطبيعية بالإضافة إلى قدرتها على اكتساب المقاومة تجاه العديد من المضادات الحيوية مثل الامينوكلايكوسيدات و الفلوروكينولينات ومضادات البيتالاكتام (Cicek *et al*., 2013).

توجه الاهتمام حاليا إلى استخدام الأعشاب والنباتات (الطب البديل) في علاج الإمراض الناتجة عن الجراثيم منها التهاب المجاري البولية لضمان فعاليتها من جهة ولرخص ثمنها من جهة أخرى (المياحي ،٢٠٠١). ومن بين هذه النباتات الرمان *Punica granatum* الذي يعود إلى العائلة الرمانية Pinnicaceae (البراهيم ،2008) حيث تستخدم قشور الرمان في الكثير من العلاجات كعلاج حالات الإسهال والتهاب المسالك البولية لأنها تعمل على تغيير طبيعة بروتينات الأمعاء كما تقلل من ارتشاح السوائل وتقتل الجراثيم وتمتص السموم الجرثومية (السعدي وآخرون ،١٩٨٨).

إن استعمال النباتات والإعشاب الطبية في مجال الوقاية الصحية لايسبب اثأرا جانبيه إذ ما التزم المريض بشروط تناولها، ونظرا لارتفاع أسعار المواد الكيمائية وما يصاحبها من مضاعفات مستقبليه سلبيه على الجسم ازداد التداول والتعامل بالبدائل الطبيعية والتي تكون بمتناول الجميع(vanisree *et al*.,2004).

نظرا للأهمية العلاجية والطبية لمستخلصات قشور الرمان وبسبب ارتفاع نسبة مقاومة بكتيريا *P. aeruginosa* لمعظم المضادات الحيوية المستخدمة في الوقت الحاضر أجريت هذه الدراسة للكشف عن تأثير التثبيطي لمستخلصات قشور الرمان في نمو جرثومة *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من التهابات المسالك البولية.

٢ - استعراض المراجع Literatures review

١.٢: الصفات العامة لبكتريا *Pseudomonas. aeruginosa*

تضم مجموعة من البكتيريا الهوائية الاجبارية وعصوية الشكل وسالبة لصبغة گرام ومستقيمة او منحنية . تظهر بشكل مفردة او ثنائية او على شكل سلاسل قصيرة و تتحرك بواسطة سوط قطبي (Ryan and Ray, 2004) . تظهر مستعمرات بكتيريا *P.aeruginosa* شاحبة اللون على وسط أگار الماكونكي لعدم قابليتها على تخمير سكر اللاكتوز ، كما تمتاز معظم انواع جنس الزوائف الزنجارية بأفرازها صبغة البايوفردين الخضراء المصفرة والتي تذوب بالماء والكلورفورم (Lau *et al.* , 2004) ، والقليل من السلالات المحددة والعائدة لهذه البكتيريا لها القابلية على افراز بعض الصبغات مثل صبغة البايروبين الحمراء ، وصبغة البايوميلانين السوداء او البنية (Jawetz *et al.* , 2008) . تتصف بكتيريا *P.aeruginosa* بايجابيتها لأختبار الأوكسديز والكتاليز، وتميع الجيلاتين، اما بالنسبة لمجموعة إختبارات IMViC والتي شملت اختبارات : (الأندول ، احمر المثيل ، فوكس بروسكاور، واستهلاك السترات) ، فكانت موجبة في اختبار استهلاك السترات فقط ، وسالبة لأختبارات الأندول ، والمثيل الأحمر ، و فوكس بروسكاور (Itah and Essien , 2005) .

2.2: أمراضية بكتيريا *P. aeruginosa*

تعدّ بكتيريا *P. aeruginosa* من المسببات المرضية الانتهازية وخاصة في المناطق التي تخلو من الدفاعات الطبيعية لآمتلاكها العديد من عوامل الضراوة منها عوامل خلوية كالاسواط والأهلاب والشعيرات التي تساعد على الحركة والالتصاق بخلايا المضيف وعوامل افرازية كصبغة البايوسيانين و وصبغة البايوفردين وذيفانات Exotoxine Aالتي تكون قاتلة عند حقنها بشكل نقي في الحيوانات المختبرية وذيفانات Exotoxine Sالتي وظيفتها الالتصاق ومنع عملية البلعمة في الانسجة المصابة Jawetz *et al.*, 2010) .

ومن عوامل الضراوة الاخرى في بكتيريا *P. aeruginosa* الغشاء الحيوي Biofilm والمادة اللزجة المخاطية (Todar, 2008)، التي تفرز من قبل بعض سلالات بكتيريا*P.aeruginosa* وتظهر مستعمراتها بمظهر مخاطي، اذ يكثر انتاجها في حالات الخمج المزمن للرئة وخاصة في حالة التليف الكيسي ولها دور في تقليل نفاذية التراكيز القاتلة لعدد من المضادات الحيوية والمعقمات ومنعها من الوصول الى الموقع الهدف في الخلية البكتيرية فضلاً عن دورها في زيادة مقاومة البكتيريا لعملية البلعمة (Jawetz *et al* ., 2010) .

ان غزو البكتيريا لخلايا المضيف يتطلب اختراقاً او تحطيماً للغلاف الخلوي الخارجي ويحدث ذلك عن طريق اساليب فيزيائية او وسائل انزيمية او الاثنين معاً (Musk and Hergenrothe , 2008) ، وتؤدي العوامل الانزيمية دوراً اساسياً في تحطيم او تحليل الوحدات التركيبية في الغشاء الخلوي للمضيف والمتمثلة بالدهون المفسفرة و البروتينات اثناء غزو خلايا المضيف ومن هذه الانزيمات :

١.٢.٢:انزيمات البروتيز

تلعب هذه الانزيمات دوراً مهماً في اختراق الانسجة وامراضية البكتيريا، اذ توجد عدة انواع من انزيمات البروتيز ومنها انزيم الايلاستيز و انزيم البروتيز اللذان يعملان على تحليل الايلاستين (Elastin) الموجود في جدران الاوعية الدموية مما يؤدي الى نضوح مكونات الدم السائلة كالمصل والبلازما والتي تستغلها البكتيريا في النمو والتكاثر مما يساعد على انتشارها داخل الجسم، كذلك تعمل هذه الانزيمات على تلف انسجة الرئة من خلال تحطيم مادتي الايلاستين والكولاجين بمساعدة ذيفانات Exotoxine A المنتجة من قبل بكتيريا*P. aeruginosa* (Jawetz *et al*., 2008) .

٢.٢.٢:الانزيم الحال للشحوم

يستهدف هذا الانزيم الطبقة الشحمية الموجودة بين الادمة وتحت الادمة وبذلك يسمح للبكتيريا باختراق انسجة الجسم ويصاحب هذه الاصابة تكوين الخراجات، كما يعمل هذا الانزيم على تحطيم طبقة الدهون الموجودة في الجدار الخلوي للمضيف مما يساعد البكتيريا على الانتشار داخل جسم الكائن الحي (George *et al*., 2005).

٣.٢.٣:انزيم الكتاليز

لهذا الانزيم دورٌ مهمٌ في حماية الخلية البكتيرية من التاثير السمي لبيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 الناتج من الفعاليات الايضية للبكتيريا ، اذ يقوم هذا الانزيم بتكسير بيروكسيد الهيدروجين الى ماء واوكسجين (Suh *et al* ., 1999).

٣.٢: الأمراض المتسببة عن بكتيريا *P. aeruginosa*

تتميز بكتيريا *P. aeruginosa* بقدرتها على إحداث أنواع مختلفة من الاصابات في مواقع متعددة من الجسم ولا سيما بعد العمليات الجراحية وإصابات الحروق ثم تنتشر الإصابة وتسبب حالات تجرثم الدم، اذ تخترق بكتيريا *P. aeruginosa* الحروق الشديدة بسبب ضعف مقاومة الانسجة الجلدية المُعرضة للحرق وتلفها بالاضافة الى تواجد هذه البكتيريا بكثرة في البيئة المحيطة بالمريض في وحدة الحروق أو كادر التمريض في المستشفيات (Sheridan, 2005) إنّ الإصابات الشديدة ببكتيريا *P.aeruginosa* تكون بسبب قدرتها على استعمار مواقع تشريحية مختلفة بسبب إمتلاكها (آليات التصاق فعالة ومتطلبات تغذية قليلة ومقاومة للمضادات الحيوية) ولها قدرة على غزو أنسجة المضيف وتحطيمها وإحداث الأمراض الجهازية (Zeng , 2004).

تعد بكتيريا *P.aeruginosa* سبباً مهماً في أخماج الجهاز التنفسي المزمن المرتبطة بالتليف الكيسي والذي يسبب أخماج الصدر في البالغين والأطفال ، ويصاحب المرض إفراز مخاط لزج لايمكن ازالته من الرئة مما يؤدي الى عسر في وظيفة الجهاز التنفسي ، كما تسبب العديد من الأخماج االاخرى منها أخماج الاذن وأخماج العين وأخماج القناة البولية واخماج الجلد، وتزداد نسبة الاصابة بهذه البكتيريا في حالات الأورام السرطانية و نقص المناعة وبعد عمليات نقل الاعضاء (Willenbrock and Ussery , 2007) .

٤.٢ :الرمان

الرمان هو ثمار الشجرة *Punica granatum* ويسمى Pomegranate يعود إلى العائلة الرمانية Pinnicaceae موطنه الأصلي جنوب غرب آسيا ويزرع في معظم المناطق العربية خصوصاً في حوض البحر الابيض المتوسط والعراق والشام (الشكري ،1988) شجيرات الرمان كثيرة التفرع ثمارها على درجه عالية من التنوع كثيره منها الحلو والحامض والمعتدل . ذكر الرمان عند الفراعنه واستخدم لعلاج ديدان الأمعاء وذكر الرازي ان قشور الرمان المدقوقه تستعمل لعلاج قروح المعده واستعملها الانطاكي لعلاج الاسهال المزمن.

تحوي قشور الرمان على مواد عفصيه Taninns على هيئة galctose ومن اهم مركبات العفص بيونيكالين وجراناتين وترجع القيمه الدوائيه لقشورالرمان للاحتوائيه على التانين والقلويدات الطياره وعلى المواد المضاده للأكسده كالمركبات الفينوليه مثل النتوسانين التي تعيق عمليات تاكسد البروتينات الشحميه قليله الكثافه الحامله للكولسترول اضافه الى تواجد الاحماض الامينيه كما ان قشور الرمان تحتوي على أربعة أنواع من القلويدات هي ال Pelletierine والذي يسمى Punicine وال Isopelletrine وال Ethyl pelletierine وقلويد ال Pseudo pelletierine والذي يسمى Methylgrantanine (وصفي،٢٠٠٢).

٣. المواد وطرائق العمل Materials and method

١.٣: الأجهــزة والصبغات والأدوات والمواد الكيميائية

جدول(١) الأجهزة والمعدات المختبرية والصبغات والمواد الكيميائية

ت	أســـــــم الجـــهاز	
١	المثيل الأحمر	**Methylred ($C_{15}H_{15}N_3O_2$)**
٢	الاكار	**Agar- Agar**
٣	كاشف كوفاكس	**Kovac' s reagent**
٤	صبغة گرام	**Gram stain**
٥	مجهر ضوئي	**light microscope**
٦	مسخن حراري	**Hot plate**
٧	حمام مائي	**Water bath**
٨	مؤصده	**Autoclave**
٩	ميزان حساس	**Sensitive balance**
١٠	جهاز تقطير	**Distiller**
١١	منبذة عالية السرعة	**High speed centrifuge**
١٢	حاضنة	**Incubator**
١٣	مازج	**Vortex mixer**
١٤	كابينة الزرع المجهري	**Laminar flow cabinet**
١٥	ثلاجة	**Refrigerator**
١٦	الناقل الزرعي القياسي	**Standard wire loop (1µ)**
١٧	دورق مخروطي	**Conical flasks**
١٨	اطباق بتري بلاستكية	**Disposable Petri dishes**
١٩	شرائح زجاجيه وغطاء شريحة	**Slides and cover slides**
٢٠	أنابيب إختبار	**Test tube**
٢١	كليسيرول	**Glycerol**

٢.٣ : تحضير الأوساط الزرعية Preparation of culture media

حُضِّرت الأوساط الزرعية الجاهزة حسب تعليمات الشركة المُصنِّعة كما موضح في الجدول(٢)

جدول (٢):الأوساط الزرعية الجاهزة والتركيبية

ت	الوسط الزرعي	الغرض منه
.١	Muller-Hinton agar	استخدم لاختبار حساسية العزلات تجاة المستخلص المائي لقشور الرمان
.٢	MacConkey agar	استعمل بوصفه وسطا انتخابيا للبكتريا السالبة لصبغة غرام وللتفريق بين المستعمرات المخمرة وغير المخمرة لسكر اللاكتوز
.٣	Kligler’s iron agar	استخدم هذا الوسط للتحري عن قدرة البكتريا على انتاج غاز كبريتيد الهيدروجين H_2S وكذلك قابليتها على تخمير سكريات الكلوكوز واللاكتوز
.٤	Blood agar	معرفة نوع التحلل الدموي
.٥	Nutrient agar	وسط تنمية عام
.٦	Nutrient broth	استعمل لتنشيط وادامة العزلات
.٧	Pepton water	استعمل للكشف عن حلقة الاندول
.٨	M.R.V.P Medium	استخدم الوسط للكشف عن التحليل الكامل أو الجزئي للسكريات وانتاج الحامض أو الاستيل مثيل كاربون
.٩	Simmons citrate agar	استعمل للكشف عن البكتريا المخمرة للسترات بوصفه مصدراً وحيداً للكاربون

٣.٣: التعقيم Sterilization

عقمت الزجاجيات بالفرن الكهربائي عند درجة حرارة ١٦٨ مْ لمدة ساعتين ، اما الأوساط الزرعية الجاهزة، والتركيبية، وأغلب المحاليل المستخدمة التي لاتتأثر بالحرارة فقد عقمت بجهاز الموصدة عند درجة حرارة ١٢١ م٥ وتحت ضغط ١٥ باوند / انج٢ لمدة ١٥ دقيقة، المحاليل التي تتأثر بالحرارة فقد عقمت بالترشيح (MacFaddin, 2000).

٤.٣: جمع العينات Samples collection

عينات الرمان : جمعت من الأسواق المحلية في مدينة الديوانية ، عزلت القشور ثم جففت بدرجة حرارة الغرفة لمده ١٠ أيام ثم سحقت وجمعت لحين الاستخدام.

عينات البكتريا : جُمعت ٤٠ عينة سريرية من المرضى الذين يعانون من التهاب المسالك البولية المراجعين والراقدين لمستشفى الديوانية التعليمي للمدة من تشرين الثاني ٢٠١٨ ولغاية شباط ٢٠١٩ شملت العينات المأخوذة عينات الادرار ،اذ حرص اثناء جمع العينات ان تهمل القطرات الاولى من الادرار وتؤخذ الكمية الوسطى منه وتحفظ في انابيب جمع خاصة معقمة ، وبعدها نقلت عينات الادرار الى المختبر لغرض زرعها وتشخيصها ، اذ زرعت على وسط الماكونكي وكذلك على وسط اكار الدم الصلب بطريقة التخطيط وحضنت الاطباق بدرجة حرارة٣٧ م ولمدة ١٨- ٢٤ ساعة لغرض تشخيص البكتريا النامية على الأوساط (MacFaddin, 2004).

٥.٣ : تشخيص البكتريا المعزولة

١.٥.٣ :الفحص المظهري والمجهري

درست الصفات المظهرية لكل من المستعمرات والخلايا البكتيرية النامية على الأوساط الزرعية المختلفة، شملت دراسة المستعمرات البكتيرية من حيث اللون والشكل و القوام والحواف والنمو أو عدم النمو على الأوساط التفريقية Differential media والانتقائية Selective media. كذلك تم عمل مسحات مباشرة من الأوساط الزرعية ثم صبغت بصبغة كرام لدراسة الخصائص المجهرية للأنواع البكتيرية المعزولة التي شملت شكل الخلية البكتيرية، وانتظام الخلايا البكتيرية مع بعضها ، وطبيعة تفاعلها مع صبغة كرام (Winn *et al* ., 2006).

٢.٥.٣ :الفحوصات الكيموحيوية Biochemical tests

أجريت الاختبارات الكيموحيوية وفقا لطريقة (MacFaddin, 2000) ومن أهمها

الكشف عن إنزيم الكاتيليز Catalase test

تم إجراء الاختبار بنقل كمية قليلة من النمو على الوسط الزرعي بواسطة عيدان خشبية إلى سطح شريحة زجاجية نظيفة وجافة ثم أضيف لها قطرة من ٣% بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) المحضر في الفقرة، إن ظهور الفقاعات الغازية يدل على النتيجة الموجبة .

الكشف عن انزيم الاوكسيدز Oxidase test

تم إجراء الفحص بنقل كمية من النمو البكتيري بواسطة العيدان الخشبية معقمة الى ورقة ترشيح مشبعة بالكاشف المحضر آنياً، تلون المستعمرات البكتيرية باللون البنفسجي يدل على النتيجة الموجبة للكشف.

إختبار انتاج الهيمولايسين Hemolysin production test

استُخدم في هذا الإختبار وسط أگار الدم؛ إذ تم تلقيح الوسط بجزء من المستعمرة البكتيرية النقية المراد إختبارها ، وحُضنت الأطباق بدرجة حرارة37°م لمدة 18–24 ساعة. لوحظت النتيجة الموجبة عند حدوث تحلل دموي حول المستعمرة ، اذ كان التحلل من نوع التحلل الكامل β hemolysis .

الكشف عن انتاج ألا ندول Indol test

تم تلقيح الأنابيب الحاوية على الوسط الزرعي بالمزروع البكتيري ،حضنت بدرجة حرارة ٣٧مْ لمدة ١٨ – ٢٤ ساعة، ثم أضيفت بضع قطرات من كاشف كوفاكس إلى كل أنبوبة مع الرج الجيد، ظهور حلقة حمراء في أعلى الوسط يدل على النتيجة الموجبة .

اختبار احمر المثيل Methyl red test

اجري الفحص بتلقيح الأنابيب الحاوية على الوسط الزرعي M.R.V.P Medium بالمزروع البكتيري وحضنت بدرجة حرارة ٣٧مْ لمدة ٢٤ – ٤٨ ساعة عندها تم اضافة ٥ قطرات من كاشف احمر المثيل مع رج الانبوبة ان ظهور اللون الاحمر في الأنبوبة يدل على التحلل الكامل للسكريات وانتاج الحامض .

اختبار الفوكس بروسكور Voges pros-kauer test

اجري الفحص بتلقيح الوسط الزرعي MR-VP Medium بالمزروع البكتيري، وحضن بدرجة حرارة ٣٧مْ لمدة ٢٤ – ٤٨ ساعة بعد ذلك تم إضافة ١ ملي ليتر من الكاشف إلى كل أنبوبة مع الرج، ان ظهور اللون الوردي خلال ٢ –٥ دقيقة والذي يصبح كرزي غامق خلال ٣٠ دقيقة مع الرج المتواصل يعبر عن النتيجة الموجبة .

اختبار استهلاك السترات Citrate utllization test

اجري الفحص بتلقيح وسط السترات المائل بالمزروع البكتيري المراد فحصه وحضن بدرجة حرارة ٣٧مْ لمدة ٢٤ – ٤٨ ساعة. ان تحول لون الوسط الاخضر الى الازرق وظهور النمو على خطوط الزرع يدل على النتيجة الموجبة .

إختبار تخمرالسكريات وانتاج الغاز Sugar fermentation&gas production test

لقحت الأنابيب الحاوية على وسط (Kliger's Iron Agar (KIA بطريقة الطعن والتخطيط على السطح المائل بالمزروع البكتيري . وحُضنت الأنابيب بدرجة حرارة 37°م لمدة 24 ساعة

ان تغير لون الوسط من الأحمر إلى الأصفر دليل على قدرة البكتيريا على تخمر سكري الكلوكوز و اللاكتوز، بينما يكون إنتاج غازكبريتيد الهيدروجين على شكل راسب اسود اسفل الوسط الصلب .

٦.٣: حفظ العزلات البكتيرية

استخدم وسط الحفظ طويل الأمد ، اذ حضر بإضافة ١٥% من الكليسيرول إلى المرق المغذي ، وعقم بالمؤصدة، وترك ليبرد في درجة حرارة ٥٦ مْ ، ووزع في أنابيب اختبار معقمة وذات سدادات محكمة وحفظ في ٤ مْ لحين الاستعمال. استعمل هذا الوسط لحفظ البكتريا المعزولة والمشخصة لعدة أشهر في درجة حرارة - ٢٠ مْ (Forbes *et al.*, 2007) .

٧.٣: تحضير المستخلص المائي لقشور الرمان

أتبعت طريقة Harborne (1984) لتحضير المستخلص المائي، إذ أخذ 20 غم من كل عينة جافة للأجزاء النباتية المختلفة ووضعت في دورق مخروطي حجم 500 مل وأضيف إليها كمية معينة من الماء المقطر بدرجة حرارة 20-25 مْ وأكمل الحجم إلى 200 مل، ووضعت بجهاز الهزاز الأفقي Horizontal Shaker لمدة نصف ساعة وعلى سرعة متوسطة. تركت العينات لتستقر لمدة ساعة ثم رشحت بثلاث طبقات من قماش الشاش لفصل العوالق الصلبة ثم أجري الترسيب باستعمال جهاز الطرد المركزي وبسرعة 3000 rpm لمدة 15 دقيقة لفصل العوالق الصغيرة، ركز الراشح بالمبخر الدوار وجفف بالفرن عند درجة حرارة 45مْ. واستعملت المادة الجافة في تحضير التراكيز المختلفة للمستخلصات.

٨.٣: تحضير التراكيز المختلفة لمستخلص قشور الرمان

حضرت التراكيز قيد الدراسة بإذابة ١غم من مسحوق قشور الرمان في ١٠ مل من الماء المقطر للحصول على تركيز ١٠٠ ملغم /مل ثم حضرت منه بقية التراكيز وهي ٢٥،٥٠،٧٥ ملغم /مل .

٩.٣: اختبار الفعالية التثبيطية لقشور الرمان تجاه بكتريا *Pseudomonas aeruginosa*

استخدمت طريقة الانتشار حول الحفر Agar well diffusion method لقياس الفعالية التثبيطية لمستخلص قشور الرمان تجاه بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* من خلال عمل حفر باستخدام الثاقب الفليني (بقطر ٤ ملم) في وسط مولر هنتون Muller-Hinton agar المزروع بالبكتريا ثم يتم إضافة التراكيز المختلفة (٢٠٠مليكروليتر) من المستخلص قشور الرمان التي تم تحضيرها مسبقا في الحفر ، بعد ذلك حضنت الإطباق بدرجة ٣٧ م لمدة ٢٤-٤٨ ساعة ، سجلت النتائج من خلال قياس منطقة التثبيط inhibition zone حول الحفر بالمليمتر (المحنة ،٢٠٠٢).

٤. النتائج والمناقشة

١.٤: العزل والتشخيص Isolation and Identification

شملت الدراسة الحالية جمع ٣٢ عينة من مرضى التهاب المسالك البولية الراقدين والمراجعين لمستشفى الديوانية التعليمي خلال المدة من شهر تشرين الثاني ٢٠١٨ ولغاية شهر شباط ٢٠١٩ كان الهدف الاساس من جمع العينات هو عزل بكتيريا *P. aeruginosa* ، أذ بلغ عدد عزلات بكتيريا *P. aeruginosa* ٨ عزلات وبنسبة تواجد بلغت ٢٥ % وشُخصت العزلات اعتماداً على الصفات المظهرية للمستعمرات النامية إذ ظهرت على وسط أگار الماكونكي شاحبة عديمة اللون لعدم قدرتها على تخمير سكر اللاكتوز الموجود في الوسط الزرعي ولها رائحة شبيهة برائحة العنب المتخمر بينما ظهرت مستعمراتها بلون غامق وأغلبها محاطة بهالة شفافة على وسط أگار الدم مما يدل على قدرتها على تحلل الدم .

أظهرت نتائج الفحص المجهري الخلايا البكتيرية المعزولة عصوية الشكل مفردة أو ثنائية الترتيب سالبة لصبغة گرام .

بينت نتائج الفحوصات الكيموحيوية نتائج موجبة لإختبار الأوكسيديز واختبار الكتاليز في جميع العزلات وذلك لقدرة البكتيريا على انتاج انزيمي الأوكسيديز والكتاليز . اما بالنسبة لمجموعة إختبارات IMViC والتي شملت اختبارات : (الأندول ، احمر المثيل ، فوكس بروسكاور، واستهلاك السترات) ، كانت النتيجة موجبة في اختبار استهلاك السترات فقط ، اتصفت جميع العزلات بعدم قدرتها على انتاج غاز كبريتيد الهيدروجين H_2S وانزيم اليوريز و أنها غير مخمرة للسكروز واللاكتوز كما موضح في الجدول (١)

جدول (١) الاختبارات الكيموحيوية لجميع العزلات البكتيرية

الاختبارات	النتيجة
الكتاليز	+
الاوكسديز	+
الاندول	-
احمر المثيل	-
استهلاك سترات	+
الكلكوز	
اللاكتوز	-
انتاج H_2s	-
Hemolysin test	+
Vogesproskauer	-

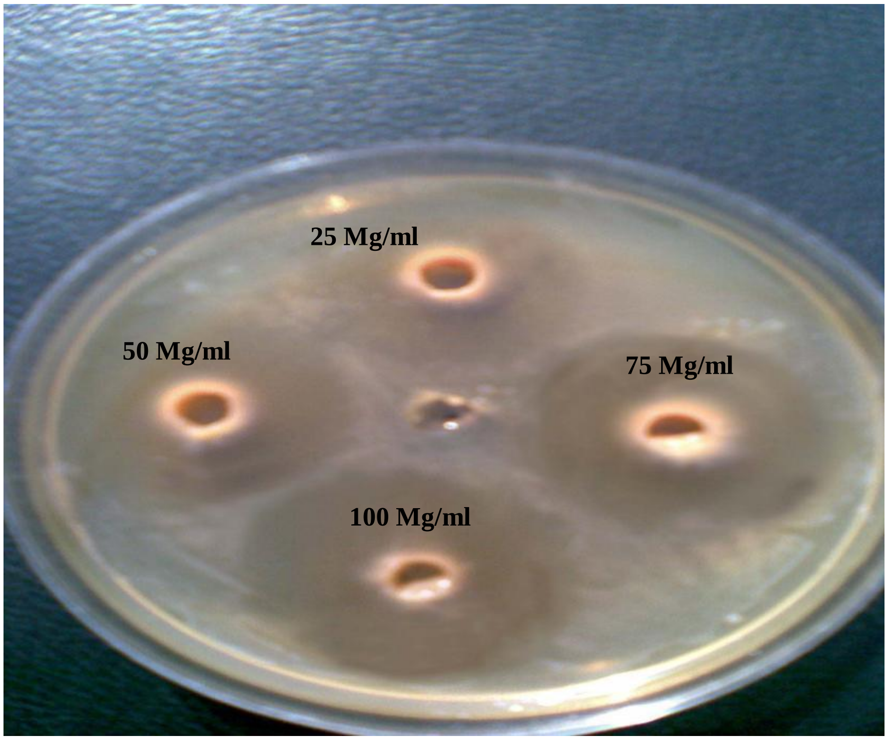
٢.٤ : الفعالية التثبيطية للمستخلص المائي لقشور الرمان ضد بكتريا *P. aeruginosa*

اذ تبين من نتائج الدراسة الحالية إن لمستخلصات قشور الرمان فعالية تثبيطية على نمو بكتريا *P. aeruginosa* المعزولة من اخماج المسالك البولية والمزروعة على وسط مولر هنتون ،إذ لوحظ وجود تباين في حساسية البكتريا للمستخلص المائي لقشور الرمان باختلاف التركيز المستخدم .حيث تزداد مناطق التثبيط بزيادة التركيز المستخدم .

يوضح جدول رقم (٢) والشكل رقم (١) أقطار مناطق التثبيط نمو لبكتريا *P. aeruginosa* المعاملة بالتراكيز الأربعة من المستخلص المائي لقشور الرمان ، إذ أظهرت التراكيز (١٠٠،٧٥،٥٠،٢٥ ملغم /مل) مناطق تثبيط مقدارها (٣٧،٢٨،٢٢،١٥ ملم) على التوالي .

جدول رقم (٢) اقطار مناطق تثبيط نمو بكتريا *P. aeruginosa* المعاملة بتراكيز مختلفة من المستخلص المائي لقشور الرمان .

التركيز المستخدم (ملغم /مل)	**قطار مناطق تثبيط inhibition zone البكتريا (ملم)**
Control	٠
٢٥%	١٥
٥٠%	٢٢
٧٥%	٢٨
١٠٠%	٣٧



الشكل رقم (١) اقطار تثبيط نمو بكتريا *P. aeruginosa* المعاملة بتراكيز مختلفة من المستخلص المائي لقشور الرمان .

توكد نتائج الدراسة الحالية ماتوصلت إلية نتائج الدراسات السابقة حيث أكدت على فعالية قشور الرمان ضد الإحياء المهجرية الممرضة منها دراسة Hussein وجماعته (١٩٩٧) و ما أشار إليه Saeed and Tariq(2006)

اتفقت عدد من الدراسات على إن مادة Tannine الموجودة في قشور الرمان هي المادة الفعالة ضد المايكروبات الممرضة ,إذ أن تواجد المواد العفصية مثل Tannine بنسبة عالية في قشور الرمان يؤثر على طبيعة البروتينات في الجراثيم مما يؤدي إلى قتلها أو ربما يؤثر على الغشاء البلازمي مغيراً بذلك خواصه الوظيفية مما يؤدي إلى تثبيط نمو الجراثيم(Sumner *et al*.,2005) كذلك تواجد البولي فينول Polyphenolوالفلافونويدات flavonoids والتربينات إضافة إلى احتوائهما على مواد دباغيه وبروتينات وحامض الكلوتانيك وراتنجيات في المستخلصات المائية للنبات والتي لها تأثير قاتل ضد الجراثيمSeeram) *et al* .,2005).

إن لمركب القلويد تماس مباشر مع غشاء البلازما للكائن المجهري وما يحويه من بروتينات ودهون أو يتداخل في سلسلة التفاعلات الأيضية للكائن ألمجهري والضرورية للنمو وإنتاج الأبواغ (Nor-Azah et al. ,2002).

وبالتالي فأن الفعالية التثبيطية للمستخلص المائي لقشور الرمان تعود للعمل التأزري للمركبات المذكورة اعلاة (Rani and Murty,2006) هذا يوكد مابينته نتائج دراستنا إن الفعل المثبط لمستخلص قشور الرمان ضد الميكروبات يزداد بزيادة التركيز المستخدم

الاستنتاجات والتوصيات

١. الاستنتاجات

إن للمستخلص المـائي لقشـور الرمـان فعاليـة تثبيطيـة تجـاه بكتريـا *Pseudomonas aeruginosa* وتزداد هذه الفعالية بزيادة التركيز المستخدم.

٢. التوصيات

استخدام الطب البديل (النباتات الطبية) في علاج الإمراض المختلفة ولاسيما التهاب المسالك البولية.

المصادر

البراهيم , جهان بنت سعود بنت راشد. (٢٠٠٨) . تأثير عصير الرمان ضد البكتريا المسببة لالتهابات الجروح. ASS.Univ.Bull.Environ.Res.Vol.11 No2 .

السعدي ، شكري إبراهيم ،عبد الله ، صالح عبد الكريم (١٩٨٨). النباتات الطبية والعطرية والسامة في الوطن العربي.جامعة الدول العربية والمنظمة العربية للتنمية الزراعية ، الخرطوم ،٥٩-٦١ص.

الشكري، سعدي ابراهيم والقاضي ، عبد الله. (1988). النباتات الطبية والعطرية السامة في الوطن العربي. جامعة الدول العربية . المنطقة العربية للتنمية الزراعية. الخرطوم. السودان.

المحنه، ايناس كريم هادي .(2002). تأثير مستخلصات بعض النباتات العراقيه على الاحياء المجهريه المعزوله من مناطق جسميه مختلفه.رساله ماجستير، كليه العلوم، الجامعه المستنصريه.

المياحي ، عبد الرضا اكبر علوان (٢٠٠١) .النباتات الطبية والتداوي بالاعشاب .ط١، مركز عبادي للدراسات والنشر ،صنعاء ،٢٩١ص.

وصفي، عادل سعيدزجانيت، توفيق قصير(٢٠٠٢) . كيمياء النواتج الطبيعيه .كليه العلوم /جامعه بغداد،ص 314.

Cicek, A.C.; Saral, A.; Duzgun, A.O.; Cizmeci, Z.; Kayman, T.; Balci, P.O.; Dal, T.; Firat, M.; Yazici, Y.; Sancaktar, M.; , Osman Birol Ozgumus, O.B. and Sandalli, C. (2013). Screening of class 1 and class 2 integrons in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* collected from seven Hospitals in Turkey: A Multicenter Study. J. Med. Microb., 3:227-233.

Forbes , B. A. ; Sahm, D. F. and Weissfeld, A. S. (2007). Diagnostic Microbiology 12th ed. Bailey and Scotts'. Mosby Elsevier. China., pp: 93-247.

Gawish, A.; Mohammed, N.; El-Shennawy, G. and Mohammed, H. (2013). An investigation of type 3 secretion toxins encoding-genes of *Pseudomonas*

aeruginosa isolates in a university hospital in Egypt. J. of Microbio. and Infec. Dise, 3 (3): 116-122.

George, A.; Krivoshein, Y.D.; and Pichon, N. (2005). Identification of Pseudomonas aeruginosa in the clinical Libratory. J. of medical Microbiol., 2:9-16.

Harborne,J.B.(1984). Phytochemical methods. 2nd (ed),Chapaman and Hall.

Hussein, S. A.; Barakat, H. H.; Merfort, I. and Nawwar, M. A.(1997). Tannins from the leaves of p. granatum. Phytochemistry. 45: 819-823.

Itah, A.Y. and Essien , J.P. (2005). Growth profile and Hydrocarbono clastic potential of Microorganisms Isolated from Tarballs in the Bight of Bonny , Nigeria , World J. of Microbiol Biotechnol., V. 21: 6-7.

Jawetz, E. J.; Melnick, J. L.; Adelberg, E. A.; Brooks, G. F.; Butel, J. S. and Morse, S. A. (2010). Medical Microbiology. 23rd ed. Appelton and Longe New York Connctical.PP. 45-60 .

Jawetz, E., Melnik, J.L. ; Adelberg , E.A.; Brook, G.F.; Butel, J.S. and Morse , S.A. (2008). Medical Microbiology 26th. ed. Appleten and Lang New York. Connctical. PP.45-60.

Lau, G.W.; Hassett, D.J.; Ran, H. and Kong, F. (2004). The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. Trends in Molecular Medicine, 10(12):599-606.

MacFaddin, J. F. (2000). Biochemical tests for identification of medical bacteria. 3rd ed. Lippincott Williams and Wilkins, USA.

Musk, A. and Hergenrothe, M. (2008). Microbiological study on the importance of *Pseudomonas* in nosocomially infected ICU patients, with special reference to metallo-beta lactamase production. Indian J. Pathol. Microbiol. 49:44-48.

Nor Azah, M.A. Mastura, M. Mawardi ,R., Abdul Munaf ,A. and Khoziran ,S. (2002).The essential oil and antimicrobial properties of some *Cinnamomum* species.

Rani,S.A. and Murty, S. U.(2006). Antifungal potential of flower head extract of *Spilanthes acmella* linn.

Ryan, K. J. and Ray, C.G.(2004). Introduction to Infectious Diseases : Sherris Medical Microbiology.(4th ed.) Mc Graw- Hill , New York.

Saeed sabahat and tariq perween . (2006). Effect of some seas and vegetable and fruits on the growth of bacteria .pakis.j.Biolog . scien . 9(8) : 1547-1551**.**

Seeram , N. P „ L . S . Adams , S . M . Henning , y . N iu , y. Zharg ,M .G. Nair ,and D . Herber . (2005) . Invitro antiproliferation , apoptotic and antioxidant activites of punicalagin , ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enh anced in combination with other polphenols as found in pomegranate juice . J . Nutr. Bioche . 16 (6) : 360-367 .

Sheridan , R.L. (2005) . Sepsis in pediatric burn patients predisposition to sepsis . Pediatr. Critical Care Med., 6(3):5112-5119.

Suh, J.; Liegmann, K. and Peter, J.B. (1999). Rpid detection of gram negative bacteria. J. Clin. Microbiol., 39:51-52.

Sumner,M.D.,M.Flliott.eller,G.Weidner,J.J.Daubenmier,M.H.chew,R.Marlin, C . J .Raisin and D.Ornish.(2005) . Effect of pomegranate juice consumption my ocardial per Fusion in patients with coronary heart disease . Am J.cardio .96:810-814 .

Todar, K. (2008) .Text Book of Bacteriology Written and Edited by Kneth Todar university Todar online text book of Bacteriology.

Vanisree , M.; Lee , C.Y.; Lo , S.F.; Nalawade , S.M.; Lin , C. and Tsay ,H.S. (2004). Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue culture . Bot. Bull. Acad. Sin. 45:1-22.

Willenbrock, H. and Ussery, D.W. (2007). Prediction of highly expressed genes in microbes based on chromatian accessibility . BMC, Mol., Biol., 8: 11.

Winn, J. W.; Allen, S.; Janda, W.; Koneman, E.; Procop, G.; Schreckenberger, P. and Woods, G. (2006). Koneman’s Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 6th ed., Lippincott–raven Publishers. Philadelphia, PP: 239–270. USA.

Zeng, L. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* Pathogenicity And Antibiotic Resistance. Doctor Of Philosophy University Of Florida.