وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة القادسية
كلية العلوم المسائية
قسم علوم الحياة

دراسة التأثير التأزري لبعض المضادات الحيوية والمستخلص المائي لنبات الكركديه ضد بكتريا *Salmonella typhi*

بحث مقدم الى

مجلس قسم علوم الحياة - كلية العلوم - جامعة القادسية

وهي جزء من متطلبات نيل درجة بكالوريوس علوم في علوم الحياة

من قبل الطالبة

(سميرة شنان دنيف حمزة)

وبإشراف

أ.م.د. غيداء جهادي محمد

1440 هـ　　　　2019م

قال تعالى:

بسم الله الرحمن الرحيم

(أقرأ بأسم ربك الذي خلق{1} خلق الإنسان من علق{2}
أقرأ وربك الأكرم {3} الذي علم بالقلم{4} علم الإنسان
مالم يعلم{5}

صدق الله العظيم

سورةالعلق {5}.

الاهداء

بكل الحب.....

إلى الشمعتين اللتين أنارتا لي درب نجاحي....

أبي الذي لم يبخل علي يوماً بشئ.....

أمي التي علمتني وعانت الصعاب لأصل لما أنا فيه....

والى أخوتي وأسرتي جميعاً...

..شكروتقدير..

الحمدلله رب العالمين والصلاة والسلام على أشرف الأنبياء والمرسلين سيدنا محمد(ص) وعلى آله وصحبه ومن تبعهم بأحسانا ليوم الدين..... أمابعد

فأني اشكر الله تعالى على فضله حيث أتاح لي انجاز هذه العمل بفضله فلهُ الحمد أولاً وأخراً......

ثم اشكر أولئك الأخيار الذين مدو لي يد المساعدة والعون خلال هذه الفترة... وفي مقدمتهم أستاذتي المشرفة على البحث فضيلة الأستاذ مساعد الدكتور غيداء جهادي فلها مني كل الشكر والتقدير ولها من الله الأجر والتوفيق ومتعها بالصحة والعافية..

الخلاصة :-

أدت المشكلة المتزايدة للسلالات البكتيرية المقاومة للعقاقير إلى فشل نظم العلاج الحالية لبكتريا *Salmonella typhi*. في الآونة الأخيرة ، تم تطوير إستراتيجية علاج جديدة للتغلب على المشكلة عن طريق استخدام المنتجات الطبيعية مع المضادات الحيوية لتعزيز فعالية العلاج ،.لذا هدفت هذه الدراسة لاختبار الفعالية التثبيطية لمستخلص أزهار نبات الكركدية *Hibiscus sabdariffa* المائي ضد بكتريا *Salmonella typhi* بدون ومع المضادات الحيوية التالية (Ciprofloxacin، Azithromycin ، Chloramphaincol ، Ampicillin، Amoxicillin ، Trimethoprim ، Coftriaxon، Norfloxacin) .حيث أختبرت بطريقة الانتشار من الحفر Well diffusion Method وطريقة الانتشار من الأقراص على التوالي بأستخدام وسط مولر هونتون أكار Muller Hinton agar . تم أخذ كؤوس الكركديه (٥٠ غم) ووضعت في 250 مل من الماء المغلي لمدة 30 دقيقة ، ثم تم عمل سلسلة من التراكيز للمستخلص المائي بواسطة طريقة التخفيف (٥٠،١٠٠،١٥٠،٢٥٠،٥٠٠,) ملغم/مل. أظهرت النتائج أن مستخلص نبات الكركديه أمتلك فعالية تثبيطية تجاه البكتريا المدروسة عند كل من التراكيز (150،250،500) ملغم/ مل وكانت أقطار مناطق التثبيط (18،27،25) ملم على التوالي وبعدها تم إجراء اختبار حساسية البكتريا تجاه المضادات الحيوية حيث أظهرت كلاً من المضادات التالية (Ciprofloxacin, Norfloxacin, Ceftriaxon) مناطق تثبيط بأقطار (25-31-32)ملم على التوالي.

ثم اجري اختبار التأثير التآزري بخلط المستخلص المائي لنبات الكركدية مع المضادات الحيوية حيث أظهرت النتائج زيادة في أقطار مناطق التثبيط مقارنة بأقطار التثبيط عند استخدام كل منهم على حدة وسجلت أعلى منطقة تثبيط بتركيز (150ملغم/مل) من المستخلص مع مضاد Ciprofloxacin, وأقل منطقة تثبيط كانت بتركيز(100ملغم/ مل) مع مضاد Chlormaphincol. أيضا تم تحديد التركيز المثبط الأدنى والذي كان (250 ملغم/مل) والتركيز القاتل الأدنى والذي كان (500 ملغم/مل).

Chapter One الفصل الأول

Introduction المقدمة

الفصل الأول

1.المقدمة

يوجد حوالي 1500 نوعا من *Salmonella* تم اكتشافها لحد الآن وسببت هذه البكتريا الكثيرمن حالات الخوف لدى المجتمعات في السنوات الأخيرة لما لها من مخاطر على حياتهم ويمكن تقسيم جراثيم السالمونيلا إلى مجموعتين احدهما تسبب حمى التيفوئيد أما المجموعة الأخرى تسبب التسممات الغذائية وتتصف بكتريا السالمونيلا بإنها عصويه سالبه لصبغة كرام ولاتكون سبورات ولبكتريا السالمونيلا 1400 نوع مصلي بعضها يسبب أمراضا للإنسان وتكون ذات أهميه طبية *S.typhi* و *S.paratyphi* والتي تسبب الحمى المعوية Enteric fever، تنمو وتتكاثر السالمونيلا في الماء إي أنها تستطيع العيش في الحليب ومشتقاتها وفي المسابح المائية لهذا السبب تنتشر الحمى في فصل الصيف وليس له علاقة بالشمس كما هو مشاع عنها بل هو عبارة عن تلوث المياه بالبكتريا (Barker *et al*.,2012).

وفي اغلب الأحيان تنتقل البكتريا عبر أشخاص حاملين لها في أجسامهم وخاصة الذين يعملون في المطاعم وتصنيع المواد الغذائية ويعزي السبب الرئيسي في انتشار الحمى إلى انخفاض مستوى النظافة الشخصية والعامة وسوء الخدمات والحمامات الصحية (Charlest *et al*.,2012).

تسبب بكتريا السالمونيلا ما يقارب 16مليون حاله أصابه من الحمى سنوياً في العالم ووفاة 6% من الأشخاص المصابين سنويا على مستوى العالم (Beyene *et al*., 2008 and Gizachew,2011).

الأعراض السريرية لحمى التيفوئيد تمر بعدة مراحل ففي الأسبوع الأول تبدأ الأعراض وعلامات المرض تتمثل بالنحول والآم المفاصل وصداع وفقدان الشهية وتبدأ الحرارة بالارتفاع تدريجياً حيث تصل إلى 40 مْ مع نهاية الأسبوع الأول وكذلك الآم في البطن، أما في الأسبوع الثاني فأن درجة الحرارة تستمر بالزيادة وتباطؤ ضربات القلب ويعاني المريض من زيادة مظاهر التعب ومن الممكن ظهور طفح جلدي وكذلك تضخم الكبد والطحال وفي الأسبوع الثالث وعند ترك المريض دون أي علاج تبدأ حالته بالزيادة وتسوء حيث يعاني المريض من جفاف وازرقاق وفقدان الشهية وفقدان الوعي والغيبوبة أحيانا ويصبح المريض يعاني من إسهال وفي بعض الحالات نزيف معدي حاد وتقرحات في الأمعاء(Hohman, 2011).

إن التطور في العلاج الطبي والدوائي عبر وصف المضادات الحيوية المناسبة من حيث الجرعة العلاجية وفترة التداوي لمدة 10-14 يوم تعطي نتائج جيدة في الشفاء ومنع عودة المرض مجدداً أيضا خلال إعطاء لقاحات في المناطق المتوطنة مثل العراق. أول لقاح اكتشف في عام 1897 من قبل رايب إدوارد وتمكن من تطويره و أطلق عليه اللقاح الحي الذي يؤخذ عن طريق الفم، أما التشخيص المؤكد لهذه الإصابة فيجب أن يؤخذ عزلة من بكتريا من نماذج الدم أو إدرار وزرعها على أوساط زرعيه خاصة للتأكد من وجود البكتريا(Nsuteb *et al*.,2003).أما طريقة اختبار ويدال هو الأقدم في تشخيص البكتريا سالمونيلا (Ley *et al*.,2010).

يعود سبب استعمال الإنسان للنباتات الطبية في الوقاية والتداوي والعلاج من الأمراض منذ بداية الحضارات الإنسانية ومنذ الآف السنين للحاجة الماسة للكشف عن مضادات ميكروبيه جديدة ذات تراكيب كيميائية متنوعة وآليات عمل قيمة لأن هناك حالات زيادة في حدوث الأمراض المتكررة والمتنوعة والجديدة والسبب الكبير الآخر هو زيادة المقاومة للمضادات الحيوية المستعملة بصورة مستمرة وللحصول على علاجات طبيعية لتقوية المناعة لذا لجأ العلماء إلى إجراء بحوثا جديدة للتغلب على مقاومة الميكروبات للمضادات (Nasciment *et al*.,2000).

إن النباتات التي لها القدرة على تصنيع مركبات كنواتج الأيض الثانوي التي تتواجد في أجزاء مختلفة من النبات وهذه المركبات يكون لها دور من الناحية الطبية مثل نبات الكركدية *Hibiscus Sabdariffa* التي لها خصائص علاجية ويستخدم في المجتمعات المحلية وأجزاء أخرى من العالم في الأطعمة والمشروبات وقد أظهر العرض الكيميائي لنبات الكركدية وجود مركبات ومواد عضوية مثل حامض الماليك وحامض الستريكوسابونين والقلويدات وفيتامين C وجليكوسيدات وحلقات ستروید (Jaroni *et al*.,2012).وهذه المركبات تعتبر مواد ذات فعالية جيدة إلى إيجاد مضادات ناتجة من مستخلصات نباتيه تكون طبيعية وتستخدم كبديل للمضادات الحيوية الكيميائية وبالتالي إيجاد علاجات بديلة وأمينة ورخيصة وكفوءة بنفس الوقت(Tasi *et al*.,2002).

الهدف من هذه الدراسة Aim of this study

هو لدراسة التأثير التأزري لبعض المضادات الحيوية والمستخلص المائي لأزهار نبات الكركديه *Hibiscus Sabdraffa* تجاه بكتريا *Salmonella typhi* .

Chapter Two الفصل الثاني

Materials and Methods المواد وطرق العمل

الفصل الثاني

2.المواد وطرق العمل

1.2. المواد Materials

أ-الأجهزة والمعدات المستخدمة Equipments and Instruments

استخدمت الأجهزة والمعدات التالية الموضحة في جدول(2-1).

جدول(2-1) الأجهزة والمعدات المختبرية المستخدمة

ت	اسم الجهاز	الشركة المصنعة (المنشأ)
1	Autoclave	Gallen kaapm (England)
2	Laminar flow cabiinet	South korea(Labtech)
3	Distiller	Fisous (Japan)
4	Electric oven	Eriotti(Italy)
5	Incubator	Gallen Kaapm (England)
6	Sensitive electronic balance	Gallen Kaapm(England)
7	Standard wire Loop	John Bolten (England)
8	Test tubes	Superestar(India)
9	Disposable petri dishes	Al-Hani (USA)
10	Conical flasks	BBL/(USA)
11	Cork Borer	Sigma-Aldrich(Germany)

ب-الأوساط الزراعية: تم استخدام الأوساط الزراعية الآتية في عزل وتشخيص البكتريا:-

جدول (2-2) الأوساط الزرعية

ج-المضادات الحياتية Antibiotics

تم استعمال 8 أنواع من المضادات الحياتية وهي :-

Amoxicillin ، Ampicillin ، Chlorampheincol ، Azithromycin ،Ciprofloxacin Norfloxacin، oftriaxon ،Trimethoprim.

2-2- طريقة العمل

1.2.2. تحضير الأوساط الغذائية الزراعية

حضرت الأوساط الزراعية Muller Hinton agar ,Nutrient agar,MacConkey agar, بالاعتماد على التعليمات المثبتة على العبوة من قبل الشركة المصنعة وضبط الأس الهيدروجين PH=7 ولأجل تعقيم هذه الأوساط وضعت في الموصدة Autoclave بضغط 1باوند/ انج ودرجة حرارة 121مْ لمدة 15 دقيقة ثم صبت في الأطباق وتركت حتى تتصلب ليتم العمل عليها بعد ذلك.

2.2.2. التعقيم Sterilization

1- التعقيم الرطب Autoclaving: تم تعقيم الأوساط الغذائية كافة والمحاليل بالموصدة عند درجة حرارة 121مْ ولمدة (10-15) دقيقة.

2- التعقيم الجاف Dry sterilization: استخدم الفرن الكهربائي لتعقيم الزجاجات عند درجة حرارة 180مْ لمدة ساعتين.

3.2.2. جمع العزلات البكتيرية Collection of Bacterial Samples

اسم الوسط الزرعي	الغرض من الاستعمال
MacConkey Agar-١	لعزل معظم البكتريا السالبة لصبغه كرام وتميز المخمرة للاكتوز من غيرالمخمرة
Nutrient Broth-٢	لتنمية وحفظ العزلات البكتيرية.
Muller Hinton agar -٣	لتنمية العزلات البكتيرية وتستخدم بشكل خاص لأختبار حساسية المضادات والمستخلص المائي لأزهار نبات الكركديه

لقد تم جمع العزلات البكتيرية العائدة لبكتريا *Salmonella typhi* من مختبر البكتيريولوجي في مستشفى الديوانية التعليمي خلال الفترة من تشرين الثاني 2018 ولغاية شباط 2019 بعد عزلها من حالات

مرضية مختلفة وتشخيصها من قبل المختصين في المختبر.حيث تم جلب العزلات إلى المختبر في قسم علوم الحياة/ كلية العلوم/ جامعة القادسية وفي ظروف قياسية وزرعت على الأوساط الزراعية المناسبة.

4.2.2. تنشيط العزلات Cultivation of Isolates

لقد تم زرع العزلات على وسط MacConkey agar اذ قمنا بتخطيط العينة المأخوذة على الوسط الزر عي بالقرب من نار مصباح بنزن وبعد ذلك تم حضن الطبق الملقح بالعينة في الحاضنة لمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة 37مْ بشكل مقلوب ويراقب النمو (Collee *et al*., 1996).

5.2.2. تشخيص العزلات البكتيرية: Identification of bacterial isolates

تم تشخيص العزلات من خلال ما يأتي:-

1- خصائص المستعمرات المظهرية والمزرعية: Morphological and cultural characteristic

لوحظت الصفات المظهرية للمستعمرات النامية كأشكالها ولونها - سطح المستعمرة - قوامها-شفافيتها وتخمرها.

6.2.2. حفظ العزلات البكتيرية Preservation of Bacterial Isolates

حفظت العزلات البكتيرية على وسط Nutrient broth المدعمة بـ 15% كليسيرول بدرجة (20-) م° لحين الاستخدام (Collee *et al*.,1996).

7.2.2. جمع عينات أزهار نبات الكركديه *Hibiscus sabdariffa*

تم شراء أزهار نبات الكركديه *Hibiscus sabdariffa* المجففة من السوق المحلي ومن ثم اخذ 50 غم من الأوراق المجففة وطحنت بالخلاط الكهربائي حتى الحصول على مسحوق باودر.

8.2.2 . تحضير المستخلص المائي لأزهار نبات الكركديه

بعد الحصول على مسحوق باودر من الأجزاء النباتية المستخدمة . تم اخذ 50 غم منه وأضيف إلى 500 مل من الماء المقطر الساخن في دورق زجاجي وتركت بشكل نقيع لمده 24ساعه وبدرجه حرارة الغرفة ثم رشح النقيع باستخدام ورق الترشيح وللحصول على المستخلص الجاف ثم تعريضه إلى حرارة الفرن الكهربائي بدرجه حرارة 45 م° لحين الحصول على سائل كثيف وبعدها جفف بالحاضنة بدرجه 37 م°.

9.2.2. اختبار فحص الحساسية للمضادات الحيوية

أتبعت طريقة Bauer- Kirby القياسية ،لاختبار حساسية البكتيريا للمضادات الحيوية التالية (C , CPR ,TM, AMP, AMX, AZM, NOR , CIP). حيث أخذت أنبوبة تحتوي على 5 مل من وسط المرق المغذي (Nutrient broth) ثم أضيف لهذه الأنبوبة 5 مستعمرات معزولة من مزرعة نقية من بكتريا مشخصة مسبقاً نامية على وسط MacConkey agar وحضنت بدرجة 37 م° لمدة 24 ساعة.ثم أخذ جزء من الوسط السائل (N.B) بواسطة مسحة معقمة قطنية ووزعت بشكل متساوي بطريقة التخطيط على وسط Muller Hinton agar ثم بواسطة ملقط معدني معقم وضعت أقراص المضادات الحيوية مع ترك مسافات بين الأقراص وحضنت بدرجة 37م° لمدة 24 ساعة ثم تم ملاحظة منطقة التثبيط حول الأقراص وتم قياس قطر منطقة التثبيط باستخدام المسطرة لتحديد مقاومة أو حساسية البكتريا للمضادات الحياتية (MacFaddin,2000).

10.2.2.اختبار الفعالية التثبيطية لمستخلص أزهار نبات الكركديه المائي ضد البكتريا

أختبرت الفعالية التثبيطية **لمستخلص أزهار نبات الكركديه المائي** تجاه بكتريا *Salmonella typhi* بأستخدام طريقة الأنتشار من الحفر Well Diffusion Method (Vandepitte *et al*.,1991) حيث تم أتباع الخطوات التالية:

1- حضرت أطباق بتري تحتوي على وسط Muller Hinton agar.

2- حضر عالق المزرعة البكتيرية النقية الحديثة العمر حيث أخذ من المزرعة ووضع في أنبوبة تحتوي على 5 مل ماء مقطر معقم وترج الأنبوبة للحصول على تركيز مكافئ لمقياس أنبوبة ما كفرلاند القياسية Macfarland(10^8 CFU/ ML).

3- لقح سطح الطبق من العالق البكتيري السابق بواسطة مسحة قطنية معقمة Cotton Swab وترك لمدة 10-15دقيقة.

4- تم عمل خمس حفر بقطر (6 ملم) في وسط مولر هونتون بواسطة ثاقب فليني على أبعاد متساوية.

5- باستخدام المايكروبابييت نقل 50-100 ما يكروليتر من كل تركيز من تراكيز المستخلص المائي لنبات الكركديه المحضرة باستخدام الماء المقطر المعقم الخالي من الأيونات (500,250,150,100,50)ملغم/مل إلى الحفر الموجودة في الوسط.

6-تركت الأطباق لمدة 10 دقائق للسماح بانتشار تركيز المستخلص في الوسط ثم حضنت في الحاضنة عند درجة 37 مْ لمدة 24 ساعة.

7- بعدها لوحظ النمو، فيما إذا كان هناك منطقة تثبيط حول الحفر حيث تم قياس قطر منطقة التثبيط حول الحفر بالمسطرة بال (ملم) .

8-حدد التركيز المثبط الأدنى(MIC) بعد حضن بكتريا *Salmonella typhi* في وسط Nutrient broth المضاف له تراكيز مختلفة من المستخلص المائي لمدة 24 ساعه بدرجه 37 مْ والذي يمثل أقل تركيز من المستخلص يلاحظ فيه تثبيط النمو البكتيري.

7- وتم تحديد التركيز القاتل الأدنى (MBC) حيث تم التخطيط على وسط نيوترنت أكار جديد Nutrient agar (لا يحتوي على أي تركيز من تراكيز المستخلص المائي لنبات الكركديه) من أنبوبة التركيز الذي لم يظهر فيه نمو وحضنت لمدة 24 ساعة بدرجة 37 مْ .حيث أن عدم ظهور نمو بكتيري على سطح الوسط بعد فترة الحضن يدل على أن هذا التركيز هو التركيز القاتل الأدنى MBC.

11.2.2. أختبار التأثيرالتآزري The synergistic effect للمضادات الحياتية والمستخلص المائي لنبات الكركديه تجاه بكتيريا *S. typhi*

لقح وسط مولر هونتون(MHA) بعالق بكتريا *S .typli* بعد ضبط النمو ومقارنته بأنبوبة ماكفرلاند القياسية(Macfarland(10^8 CFU/ ML بأستخدام طريقة التخطيط ثم تركت الأطباق بدرجة حرارة الغرفة لمدة 5 دقائق وبعدها تم وضع أقراص المضادات الحيوية وثبتت على الوسط عن طريق الضغط القليل عليها ثم أضيف لكل قرص من أقراص المضادات الحيوية 25 مايكروليتر من التراكيز الخمسة المحضرة(250,150,100,50 & 500)ملغم /مل للمستخلص المائي لأزهار نبات الكركديه ثم حضنت الأطباق بدرجه 37 مْ لمده 24 ساعة وبعد فتره الحضانة تم قياس أقطار مناطق التثبيط حول الأقراص.

Chapter Three الفصل الثالث

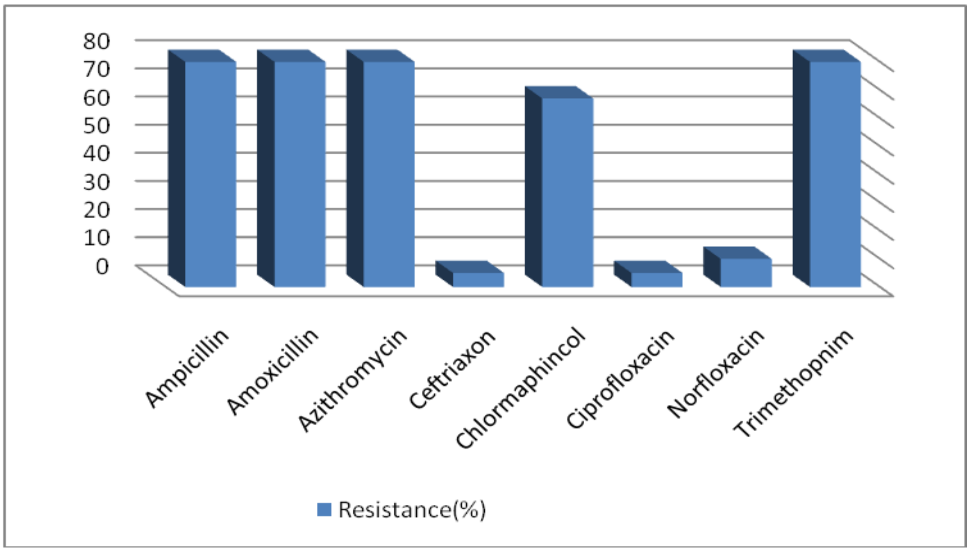
Results &Disscusion النتائج والمناقشة

الفصل الثالث

3.النتائج والمناقشة

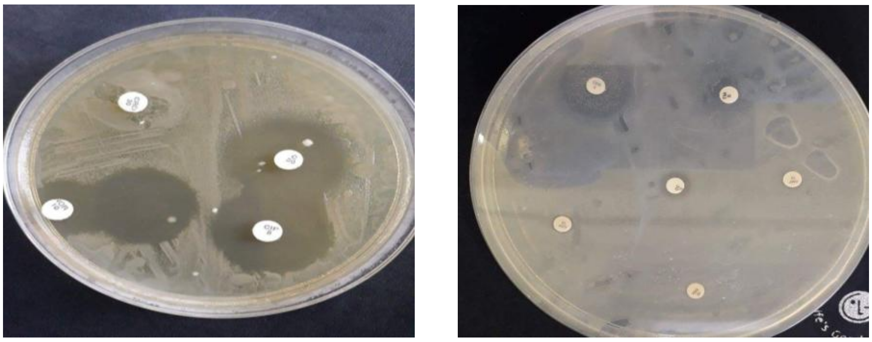
1.3. نتائج اختبار حساسية المضادات الحيويه تجاه بكتريا *Salmonella typhi*

أظهرت نتائج اختبار حساسية المضادات الحيوية تجاه بكتريا *S. typhi* مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية التالية (AMP, AZM, AMX, TM) حيث بلغت نسبة المقاومة 80%،أما المضاد (C) فبلغت نسبة المقاومة له 67% ، أما المضادات (NOR,CIP,CPR) فقد كانت البكتريا حساسة لها بنسبة 90-95% وهذه النتائج موضحة بشكل أكثر في شكل (3-1).



شكل(3-1):مقاومة المضادات الحياتية من قبل *S. typhi*

أما أقطار مناطق التثبيط لنمو بكتريا *S.typhi* فقد كانت 32 ملم لمضاد Ciprofloxacin و31 ملم لمضاد Norfloxacin و25 ملم لمضاد Ceftriaxon وكما موضح في شكل (3-2) وجدول (3-1).



شكل (3-2)مناطق التثبيط للمضادات الحياتية

جدول(3-1) أقطار مناطق التثبيط للمضادات الحيوية المستخدمة لبكتريا *S. typhi*

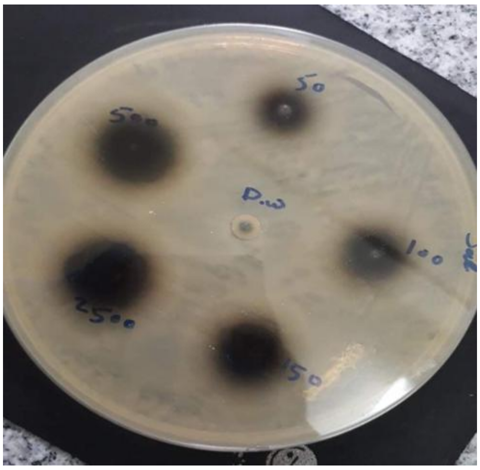
المضاد الحيوي	قطر منطقة التثبيط(ملم)
Amoxicillin	R
Ampicillin	R
Azithromycin	R
Chlormaphincol	R
Ciprofloxacin	32 mm.
Trimethopnim	R

31 mm	Norfloxacin
25 mm.	Ceftriaxon

إن مقاومة البكتريا لهذه المضادات الحيوية قد يعود بسبب الاستعمال الخاطئ والعشوائي لهذه المضادات ضد إصابات الحمى ونزلات البرد التي كانت تستعمل في الماضي كمضادات الخط الأول ضد أنواع مختلفة من الإصابات البكتيرية مما أدى إلى اكتساب بكتريا *Salmonella typhi* المقاومة المتعددة لهذه المضادات والتي ربما تعود أيضا لوجود أو أكتساب بلازميدات المقاومة R-Plasmid التي تلعب دوراً مهما في منح صفة المقاومة للعديد من المضادات الحياتية.

2.3.نتائج اختبار الفعالية التثبيطية للمستخلص المائي لأزهار نبات الكركدي *Hibiscus sabdariffa* تجاه بكتريا *S. typhi*

أظهرت نتائج اختبار الفعالية التثبيطية للمستخلص المائي لأزهار نبات الكركديه *H. sabdariffa* كفاءة المستخلص في تثبيط نمو بكتريا *S.typhi* في تركيز(150،250,500)ملغم/مل من المستخلص (شكل 3-3) وكانت أقطار مناطق التثبيط المسجلة (18,27,25)ملم على التوالي وكما مبين في جدول (3-2).



شكل (3-3)مناطق التثبيط لتراكيز المستخلص المائي لنبات الكركديه

جدول(3-2) أقطار مناطق التثبيط لتراكيز مستخلص نبات الكركديه

تركيز مستخلص نبات الكركديه(ملغم/مل)	قطرالتثبيط ب(ملم)
50	R
100	R
150	18
250	27
500	25

3.3.نتائج اختبار التأثير التآزري للمضادات الحيوية والمستخلص المائي لنبات الكركديه تجاه بكتريا *S. typhi*

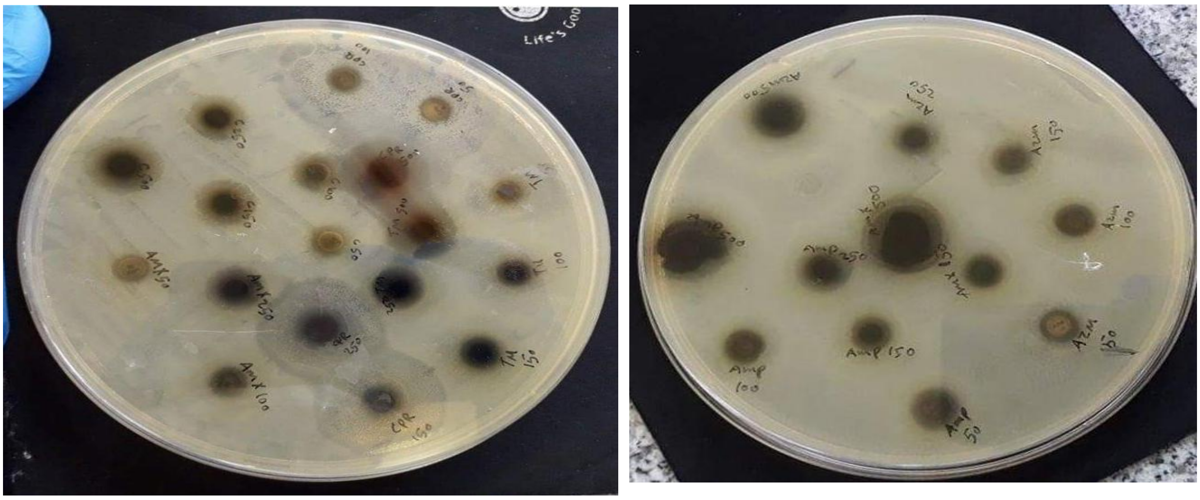
جدول (3-3) وشكل (3-4) يوضحان نتائج اختبار التأثير التآزري للمضادات الحيوية والتراكيز المستخدمة من المستخلص المائي لنبات الكركديه حيث يتضح زيادة أقطار مناطق التثبيط للمضادات الحيوية المضاف لها التراكيز المختلفة من المستخلص حيث ازدادت فعالية بعض أنواع المضادات الحيوية عند خلطها مع تراكيز مختلفة من المستخلص و التي كانت البكتريا مقاومة لها عند استخدامها على حدة.

جدول (3-3)أقطار التثبيط للمضادات الحيوية المضاف لها تراكيز مختلفة

من المستخلص المائي لنبات الكركديه

المضاد الحيوي	تراكيز المستخلص المائي لنبات الكركديه(ملغم/مل)				
	50	100	150	250	500
	قطر التثبيط ب(سم)				

30	35	40	39	31	Ciprofloxacin
18	13	R	R	R	Trimethoprim
30	22	27	25	R	Ampicillin
30	23	R	R	R	Amoxicilin
28	32	16	13	R	Azithromycin
20	16	14	12	R	Chloramphenicol

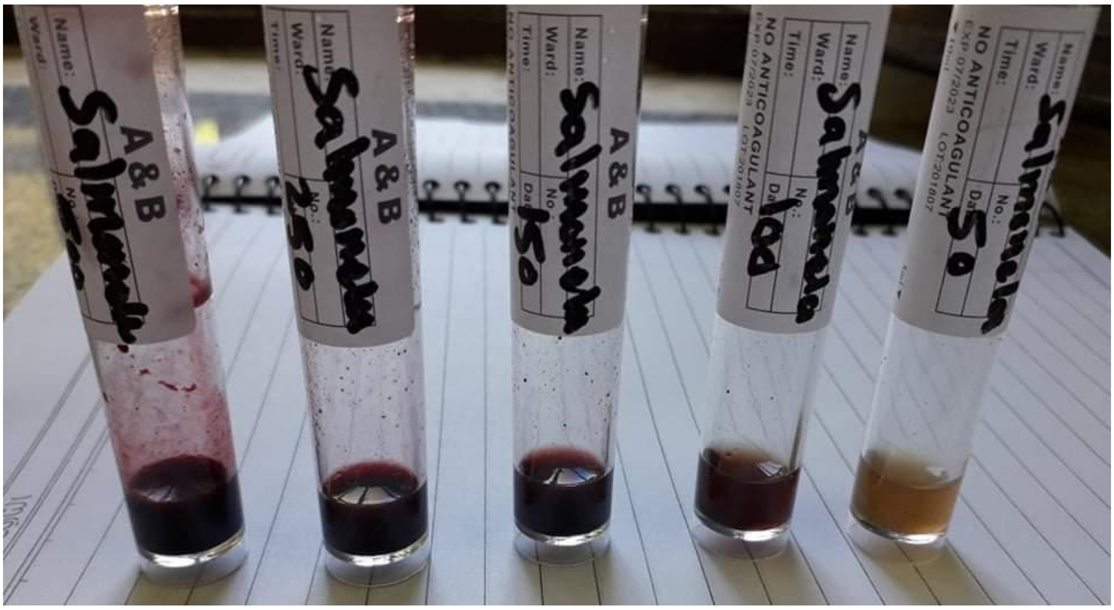


شكل (3-4)مناطق التثبيط للمضادات الحيوية المضاف لها تراكيز المستخلص المائي لنبات الكركديه

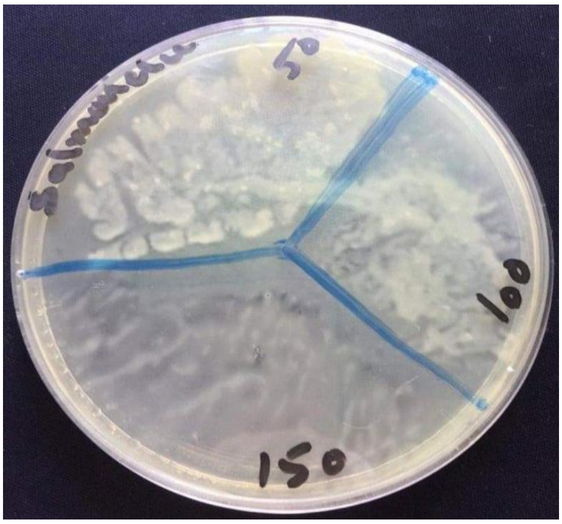
4.3.نتائج اختبار التركيز المثبط الأدنى MIC والتركيز القاتل الأدنى MBC للمستخلص المائي

لقياس التركيز المثبط الأدنى تم زراعة البكتريا في أنابيب حاوية على وسط نيوترنت بروث Nutrient Broth مع التراكيز المختلفة للمستخلص المائي لأزهار نبات الكركديه (150,100,50, 250 ,500)ملغم/مل ولوحظ النمو بعد فترة الحضانة بالتراكيز الخمسة. حيث تم ملاحظة وجود نمو

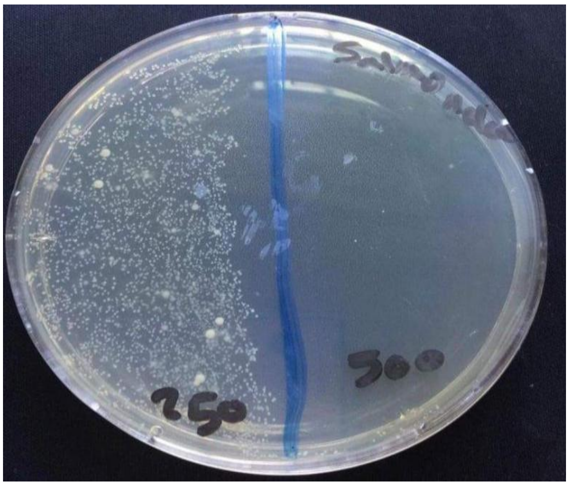
(عكورة شديدة) في الأنبوبة الحاوية على تركيز (150’100,50) ملغم/مل من المستخلص وهذا يدل على مقاومة البكتريا لتلك التراكيز وأكدت بإعادة الزراعة من هذه الأنابيب على وسط نيوترنت أكار Nutrient agar وهذه النتائج موضحة في شكل(3-5) و(3-6) على التوالي ،أما في تركيز (250 ملغم /مل) كان هناك نمو قليل جدا مقارنة بالتراكيز السابقة (شكل 3-5 وشكل 3-7) وهذا يدل على أنه التركيز المثبط الأدنى MIC، في حين الأنبوبة الحاوية على تركيز 500 ملغم/مل لم يظهر فيها أي نمو(شكل 3-5) وعند الزراعة من هذا التركيز على وسط نيوترنت أكار وبعد فترة حضانة (24)ساعة لم يظهر أي نمو بكتيري على سطح الوسط مما يدل على أنه يمثل التركيز القاتل الأدنى MBC (شكل 3-7).



شكل (3-5) نمو بكتريا *S. typhi* في وسط نيوترنت بروث حاوي على تراكيز (500,250,150,100,50) ملغم /مل من المستخلص المائي لنبات الكركديه



شكل (3-6) نمو *S.typhi* على وسط نيوترنت أكار بعد أخذ لاقحة من النمو بتركيز (50,100,150) ملغم /مل من المستخلص المائي لنبات الكركديه



شكل (3-7) نمو *S.typhi* على وسط نيوترنت أكار بعد أخذ لاقحة من النمو بتركيز (250& 500) ملغم /مل من المستخلص المائي لنبات الكركديه

نبات الكركديه *Hibiscus sabdariffa* المستهلك من قبل الناس في جميع أنحاء العالم على شكل مستخلص الشاي ، يمتلك مدى واسع من الفعاليات المضادة للميكروبات (Rukayadi *et al*., 2008 and Jung *et al*., 2013). بالإضافة إلى ذلك ، أشارت دراسة من قبل (Hassan *et al*.,2016) إلى أن المستخلص المائي لنبات الكركديه يمكن أن يكون عامل مفيد عندما يخلط مع المضادات الحيوية لتعزيز فعالية العلاج ضد عدوى *Helicobacter pylori*.

ذكرت العديد من الدراسات أن المركبات الموجودة في المستخلص المائي لنبات الكركديه مثل الفلافونويد flavonoids والانثوسيانين anthocyanins هي المسؤولة عن امتلاكه الخصائص المضادة للميكروبات (Yin and Chao,2008; Alarco´n-Alonso *et al*., 2012 and Camelo-Me´ndez *et al*.,2013).

الفعالية التثبيطية للمستخلص المائي لنبات الكركديه ضد بكتريا *S.typhi* قد يعود لقدرتها على تثبيط تخليق البروتين البكتيري (Higginbotham *et al*., 2014).

طريقة خلط المضادات الحيوية مع المستخلصات النباتية له تأثير كبير من الناحية المالية المترتبة من إعادة تكوين الأدوية الموجودة حيث أن عملية أعادة التركيب أو الخلط تكون الخيار الأكثر قابلية للتطبيق ، بدلا من تطوير دواء جديد والذي يتطلب التجارب السريرية واسعة النطاق لإثبات فعاليتها.

في هذه الدراسة ، أثبتت حساسية بكتريا *Salmonella typhi* إلى المستخلص المائي لنبات الكركديه بالاشتراك مع المضادات الحيوية (AMP, AZM, AMX, C, CIP, TM) وهذا ربما يعود إلى الخصائص الكيميائية للفلافونويد flavonoids والانثوسيانين Anthocyanin التي تم تحديدها في المستخلص المائي لنبات الكركديه. حيث أظهرت النتائج أن المستخلص يمكن أن يعزز النشاط المثبط للنمو للمضادات الحيوية ضد البكتريا المختبرة.علاوة على ذلك ، لم يلاحظ أي تفاعلات معادية Antagonistic interactions عند خلط المضادات الحيوية مع المستخلص .

على الرغم من أثبات التأثير التآزري للمستخلص المائي لنبات الكركديه مع المضادات الحيوية ضد بكتريا *S. typhi* المختبرة . ينبغي إجراء المزيد من الدراسات لتأكيد هذه الأنشطة وكذلك آليات العمل في الجسم الحي وفي التجارب السريرية.

References المصادر

1- Alarcon-Alonso, J.; Zamilpa, A.; Aguilar, F.A.; Herrera-Ruiz, M.; Tortoriello, J. and Jimenez-Ferrer, E. (2012). Pharmacological characterization of the diuretic effect of *Hibiscus sabdariffa* Linn (Malvaceae) extract. J Ethnopharmacol. 139:751–756.

2-Bakers,S. ;Favorov, M.O. and Dougan, G.(2012).Searching for the elusive typhoid diagnostic . BMC Infect. Dis.,10:45.

3-Beyene,G.; Asrat, D.; Mengistuy, Asrat, D.; Beyene, G. and Dev.Ctries, 2(6):448-453. 3-Charles, A.M .; Adam, M.T.I. ; God, El Rabm, M.O.; Morshed, M.G . and Shakoor, Z. (2012). Detection of *Salmonella typhi* agglutinations in sera of patients with other febrile illnesses and healthy individuals. J. Afr. Med., 10 (1): 41-44.

4-Camelo-Me´ndez, G.A.; Ragazzo-Sa´nchez, J.A.; Jime´nez-Aparicio, A.R.; Vanegas-Espinoza, P.E.; Paredes-Lo´ pez, O. and Del VillarMartı´nez, A.A. (2013). Comparative study of anthocyanin and volatile compounds content of four varieties of Mexican roselle (*Hibiscus sabdariffa*) by multivariable analysis. Plant Foods Hum Nutr. 68:229–234.

5-Collee, J. G. ;Fraser, A. G. ; Marmino, B. P. and Simons, A. (1996). Mackin and McCartney Practical Medical Microbiology.14th ed., The Churchill Livingstone, Inc. U. S. A.

6-Gizachew, A.(2011) . A comparativ study of blood culture and diagnosis of typhoid fever in febrile patients. Widal test in the Depatment of Microbiology, Immunology and Parasitology, J. Med. Microbiol., 1(1):9-22.

7-Hassan, T. S.S.; Hassan, K.; Berchová, M. M.; Marie, P. and Emil, Š. (2016). In vitro synergistic effect of *Hibiscus sabdariffa* aqueous extract in

combination with standard antibiotics against *Helicobacter pylori* clinical isolates, Pharmaceutical Biology, DOI: 10.3109/13880209.2015.1126618.

8-Higginbotham, K.L.; Burris, K.P.; Zivanovic, S.; Davidson, P.M. and Stewart, C.N. J. (2014). Antimicrobial activity of *Hibiscus sabbariffa* aqueous extracts against *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* in a microbiological medium and milk of various fat concentrations. J Food Prot. 77:262–268.

9-Hohman,E.I.(2011). Approach to patient with non-typhoid *Salmonella* in a stool culture. Accessed 03-02-2013.

10- Jaroni, D. and Ravishankar, S.(2012).Bactericidal effects of Roselle (*H. Sabbariffa*) against food borne Pathogens, Q.A.S., 4: 33-40.

11-Jung E, Kim Y, Joo N. 2013. Physicochemical properties and antimicrobial activity of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). J Sci Food Agric. 93:3769–3776.

12-Jung, S.W.; Thamphiwatana, S.; Zhang, L. and Obonyo, M. (2015). Mechanism of antibacterial activity of liposomal linolenic acid against *Helicobacter pylori*. PLoS One 10:e0116519.

13-Ley, B.; Mtore, G.; Thriemer, K.; Amos, B.; Seidlein, L.V.; Hendriksen, I.; Mwambuli , A. ;Shoo, A. ;Malahiyo, R. ;Ame, S.M.; Kim, D.R.; Ochiai, L.R.; Clemens, J.D.; Reyburn , H. ;Wilfing, H.; Megesa, S. and Deen, J.L. (2012). Evaluation of the widal tube agglutination test for the diagnosis of typhoid fever among children admitted to a rural hospital in Tanzanina and comparison with studies.BMV Infect.Dis.10:180.

14-MacFaddin, J. F.(2000). Biochemical tests for the identification of medical bacteria 3rd ed., The Williams and Williams .and .Wilkins -Baltimor, U.S.A.

15- Nascimento, G.; Locatelli, J. and Freitas, P. *et al*. (2000).Antibacterial activity of plant extracts and phytochemical on antibiotic resistant bacteria. Brazilian Journal of Microbiolog;31(4):246-256 .

16-Nsutebu, E.F.; Martins, P . and Adiogo, D.(2003). Prevalence of typhoid fever in Febrile patients with symptoms clinically compatible with typhoid fever in comeroon. Trop. Med. Int. Health, 8(6):575-578.

17-Rukayadi YJ, Shim S, Hwang JK. 2008. Screening of Thai medicinal plants for anticandidal activity. Mycoses51:308–312. .

18-Tasi, P. J. ; Mcintish, J .;Pearce, P. ;Camden, B. and Jordan, B.R .(2002). Anthocyanin and antioxidant capacity in Roselle(*H. sabdarffia*) extract, 35:351-6.

19-Yin, M.C. and Chao, C.Y. (2008). Anti-campylobacter, anti-aerobic and anti-oxidative effects of roselle calyx extract and protocatechuic acid in ground beef. Int J Food Microbiol. 127:73–77.