جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعـــــــة ديـــــــــالى

كليـــــــــة العـــــــلوم

التحري عن البكتريا المرضية متعددة المقاومة لمضادات الحياة ودراسة التأثير التثبيطي لمستخلصات نباتي

Withania somnifera L. and *Scabiosa palaestina* L.

رسالة مقدمة إلى

مجلس كلية العلوم - جامعة ديالى وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة من قبل الطالب

هادي علي حمودي

بكالوريوس علوم حياة – 2002

بإشراف

أ.م.د. كريم إبراهيم مبارك

١٤٤٢هـ ٢٠٢٠م

Republic of Iraq

Ministry of Higher Education

and Scientific Research

University of Diyala

College of Science

The Investigation of Multiple Antibiotic Resistant Pathogenic Bacteria and study the Inhibitory Effect of *Withania somnifera* L. and *Scabiosa palaestina* L. Extracts

A Thesis

submitted to Council college of Science, Diyala University, in partial fulfillment of requirements for the degree of

Master of Science in Biology

By

Hadi Ali Hammoudi

B. Sc. in Biology – 2002

Supervised by

Dr.Kareem Ibrahim Mubarak

Assistant Professor

2020 A.D 1442 A.H

1- المقدمة Introduction :

تُعد الأمراض الانتقالية اليوم سببا مهما في زيادة الحالات المرضية و الوفيات مع توسع عصر المضادات الحيوية في القرن العشرين (Lister *et al*., 2009). و من المسببات الرئيسية لها هي الكائنات الدقيقة كالبكتريا ، وأغلبها تعتبر غير ضارة أو مفيدة (Magiorakos *et al*., 2012).

تنتشر وتتطور باستمرار العديد من أنواع البكتريا و العزلات ضمن النوع الواحد المقاومة لمضادات الحياة و المسببة لمختلف الأمراض لدى الانسان بسبب سوء استخدام تلك المضادات من قبل المرضى كالإستخدام العشوائي من دون التحري عن البكتريا المسببة للمرض و عزلها مختبريا ، لذا فإنّ تلك الأحياء المجهرية تظهر بإستمرار مقاومة لواحد أو أكثر من العوامل ضد الميكروبية (Magiorakos *et al*., 2012) ، وبالتالي فشل علاج الكثير من الأمراض المتسببة من قبل البكتريا ذات المقاومة المتعددة لمضادات الحياة بشكل واسع و في جميع أنحاء العالم (Trebi, 2017) .

يُعد ظهور البكتيريا المقاومة لمضادات الحياة من أكثر المشاكل المعقدة للتطور الميكروبي في العقدين الأخيرين إذ يصف الأطباء مضادات حياة واسعة النطاق بدون اختبار الحساسية لتلك المضادات ، لذا يمكن اختبار المنتجات المشتقة من النباتات لتحديد النشاط المضاد للبكتيريا الذي يمكن استخدامه لعلاج الأمراض المعدية (Iqbal and Ashraf, 2019) ، كذلك التكلفة الطبية الغالية جرّاء الاستمرار بتعاطي مضادات الحياة لذا فان الباحثين حاولوا إيجاد البديل لتطوير أدوية جديدة من النباتات الطبية (Karpagam and Manonmani, 2019). وللتغلب على مشكلة المقاومة وتطورها باستمرار وتجاوز التأثيرات الجانبية للمضادات الميكروبية المصنعة فمن الممكن أن يذهب النهج باتجاه البدائل من النباتات و الأعشاب ذات الأهمية الطبية كالنبات *Withania somnifera* قيد البحث و غيرها من النباتات الطبية ، و لوجود مركبات و عناصر فعالة و بتراكيز معينة في تلك النباتات يمكن أن تكون بديلا عن المضاد الحياتي بتراكيز الحد الأدنى لتثبيط نمو البكتريا (Karpagam and Manonmani, 2019).

استُخدم نبات سم الفراخ *W.somnifera* الذي ينتمي للفصيلة الباذنجانية Solanaceae أو ما تسمى بعائلة الظل الليلي منذ سنوات بعيدة مضت في الهند كدواء للعديد من الأمراض كذلك أستُخدم في مناطق أخرى من العالم لوجوده بشكل بري في أماكن متعددة و بشكل واسع في أجزاء كثيرة من الهند و منطقة البحر الأبيض المتوسط في شمال أفريقيا (Parita *et al*, 2018) لاحتوائه على القلويدات ذات المحتوى الكيمياوي النشط و كذلك مركبات الستيرول (Khanchandani *et al*., 2019).

إن نبات سم الفراخ له استخدامات دوائية عديدة و متنوعة كأن يكون مضاد للبكتريا ومضاد للفطريات ومضاد للفيروسات فضلا عن استخدامات طبية أخرى لها تأثير إيجابي على صحة الانسان (Uddin *et al*., 2012).

كما يُعد نبات الجريبات الفلسطينية *Scabiosa palaestina* أحد أنواع النباتات المستخدمة طبيا أيضا ، حيث تحمل مستخلصاتها خصائص دوائية وهي نشطة بايولوجيا بحيث كشفت الدراسات المختبرية أن لها أنشطة ضد مايكروبية و ضد الأكسدة لذا تعد أنواع الجرب مهمة بسبب تطبيقاتها في أنظمة الطب التقليدي و هناك عدد قليل فقط من أنواع الجرب خضعت إلى دراسات كيميائية نباتية ، ومع ذلك ، تم تحديد مجموعة واسعة من المستقلبات الثانوية وسُمح بالتأكد على أن هذه الأنواع من هذا الجنس هو غني بالفلافونويد والتربينويد (Flavonoids and Terpenoids) ، و هذا النبات هو من عائلة كبيرة تسمى : Caprifoliacea (Pinto *et al*., 2018) .

و نظراً لأهمية النباتات الطبية في علاج العديد من الأمراض التي تصيب الإنسان و ذلك لتوفرها و انخفاض ثمنها و قلة تأثيراتها السمية فضلاً عن مشكلة التطور المستمر لمقاومة العزلات البكتيرية المتعددة لمضادات الحياة Multidrug resistance (MDR) ، عليه عكف الباحثون و المهتمون في الطب و صناعة الأدوية للبحث عن البديل الفعّال من خلال الحصول على مركبات فعّالة من المصادر الطبيعية (النباتات) ، و نظراً لقلة الدراسات في محافظة ديالى بهذا الصدد على العزلات البكتيرية المرضية المتعددة المقاومة اقتُرحت هذه الدراسة بهدف :

1 – دراسة التأثير التثبيطي لمستخلصات الماء الحار ، البارد ، الكحول الإيثيلي والأسيتون للمجموعة الهوائية لنباتي: *Withania somnifera* L. و *Scabiosa palaestina* L. على بعض أنواع البكتيريا المسببة للأمراض المعزولة من نماذج مسببة للأمراض المختلفة التي لديها مقاومة متعددة لمضادات الحياة .

2- الكشف عن المحتويات الكيميائية للنباتين باستخدام تقنية كروماتوغرافيا الغاز - مطياف الكتلة (Gas chromatography–mass spectrometry) .

3- تحديد المستخلصات النباتية التي تؤثر بدرجة أكبر على تثبيط البكتيريا المسببة للأمراض قيد الدراسة .

1- المقدمة Introduction :

تُعد الأمراض الانتقالية اليوم سببا مهما في زيادة الحالات المرضية و الوفيات مع توسع عصر المضادات الحيوية في القرن العشرين (Lister *et al*., 2009). و من المسببات الرئيسية لها هي الكائنات الدقيقة كالبكتريا ، وأغلبها تعتبر غير ضارة أو مفيدة (Magiorakos *et al*., 2012).

تنتشر وتتطور باستمرار العديد من أنواع البكتريا و العزلات ضمن النوع الواحد المقاومة لمضادات الحياة و المسببة لمختلف الأمراض لدى الانسان بسبب سوء استخدام تلك المضادات من قبل المرضى كالإستخدام العشوائي من دون التحري عن البكتريا المسببة للمرض و عزلها مختبريا ، لذا فإنّ تلك الأحياء المجهرية تظهر بإستمرار مقاومة لواحد أو أكثر من العوامل ضد الميكروبية (Magiorakos *et al*., 2012) ، وبالتالي فشل علاج الكثير من الأمراض المتسببة من قبل البكتريا ذات المقاومة المتعددة لمضادات الحياة بشكل واسع و في جميع أنحاء العالم (Trebi, 2017) .

يُعد ظهور البكتيريا المقاومة لمضادات الحياة من أكثر المشاكل المعقدة للتطور الميكروبي في العقدين الأخيرين إذ يصف الأطباء مضادات حياة واسعة النطاق بدون اختبار الحساسية لتلك المضادات ، لذا يمكن اختبار المنتجات المشتقة من النباتات لتحديد النشاط المضاد للبكتيريا الذي يمكن استخدامه لعلاج الأمراض المعدية (Iqbal and Ashraf, 2019) ، كذلك التكلفة الطبية الغالية جرّاء الاستمرار بتعاطي مضادات الحياة لذا فان الباحثين حاولوا إيجاد البديل لتطوير أدوية جديدة من النباتات الطبية (Karpagam and Manonmani, 2019). وللتغلب على مشكلة المقاومة وتطورها باستمرار وتجاوز التأثيرات الجانبية للمضادات الميكروبية المصنعة فمن الممكن أن يذهب النهج باتجاه البدائل من النباتات و الأعشاب ذات الأهمية الطبية كالنبات *Withania somnifera* قيد البحث و غيرها من النباتات الطبية ، و لوجود مركبات و عناصر فعالة و بتراكيز معينة في تلك النباتات يمكن أن تكون بديلا عن المضاد الحياتي بتراكيز الحد الأدنى لتثبيط نمو البكتريا (Karpagam and Manonmani, 2019).

استُخدم نبات سم الفراخ *W.somnifera* الذي ينتمي للفصيلة الباذنجانية Solanaceae أو ما تسمى بعائلة الظل الليلي منذ سنوات بعيدة مضت في الهند كدواء للعديد من الأمراض كذلك أستُخدم في مناطق أخرى من العالم لوجوده بشكل بري في أماكن متعددة و بشكل واسع في أجزاء كثيرة من الهند و منطقة البحر الأبيض المتوسط في شمال أفريقيا (Parita *et al*, 2018) لاحتوائه على القلويدات ذات المحتوى الكيمياوي النشط و كذلك مركبات الستيرول (Khanchandani *et al*., 2019).

Abstract

This study was conducted in the city of Baquba / Diyala governorate. Clinical samples were collected from various sources for the reviewers of Baquba Teaching Hospital and Al Batoul Teaching Hospital and the patients in them in addition to the public health laboratory reviewers / Baqubah for the period from 1/11/2019 until 1/3 / 2020. Samples were transferred directly to culture in appropriate food media for isolation and diagnosis in the Public Health Laboratory / Baquba.

It included 170 clinical samples and 113 bacterial isolates were diagnosed 66.47% of the total examined samples, and 57 samples were 33.53% free from bacterial growth, depending on the phenotypic, cultural and biochemical characteristics, of the total bacterial isolates diagnosed under study (63 isolates), they included *Acinetobacter baumannii* 31.75%, *Pseudomonas aeruginosa* 25.40%, *Staphylococcus aureus* 28.57%, and *Staphylococcus saprophyticus* 14.57%.

The results of the investigation of virulence factors showed that all *Staphylococcus aureus* were resistant to methicillin, 94.44% produced lipase, 88.89% were protease enzymes, 16.67% produced extended β-lactamase enzymes, and 11.11% were metallo β-lactamase, as for *Staphylococcus saprophyticus* showed results of 66.66%, of which it was positive for the protease enzyme, 44.44% produced the lipase enzyme, as for the metallo β-lactamase, only 11.11% of the bacteria produced this enzyme, while the Gram-negative bacteria showed that all *Acinetobacter baumannii* isolates (100%) produced biofilms, but they did not produce extended β-lactamase enzymes and the lipase enzyme, while 95% of this bacteria produced the metallo β-lactamase enzymes and 90% produced the protease enzyme, and All the isolates of *Pseudomonas aeruginosa* produced the lipase enzyme, and 87.50% were the protease enzyme, while only 12.50% of these bacteria produced both the (metallo and Extended) β-lactamase reticulate enzymes alike.

The results of antibiotics sensitivity of the bacteria under study showed that , the *Staphylococcus aureus* bacteria was more resistant to the antibiotic (Penicillin G), at a rate of 88.89%, which means that it is the least sensitive antibiotic by the bacteria, and the least resistant to the antibiotic (Chloramphenicol) at a rate of 5.56%, this means that most of the antibiotics were the susceptible bacteria. As for the *Staphylococcus saprophyticus* bacteria, 100% of them were resistant to (Penicillin G), which is the most resistant among the antibiotics used in the study by

those bacteria, the results of multiple resistance bacteria also showed a rate of 61.11% for *Staphylococcus aureus* and 88.89% for *Staphylococcus saprophyticus*.

While the results of antibiotics sensitivity of the *Acinetobacter baumannii* showed a percentage of 100% multiple resistance to all antibiotics used in the study, with the exception of Doxycycline, which showed resistance to it by 30%, and *Pseudomonas aeruginosa* was more resistant to Piperacillin than the antibiotics used in the study by 68.75%, the least resistance was against Ceftazidime by 6.25%, followed by the carbapenem antibiotics (Imipenem & Meropenem) with 12.50% resistance to each, as the result of *Pseudomonas aeruginosa* multi-resistance was shown by 37.50% and the bacteria sensitive to the antibiotics used in the study 62.50%.

It was found that most of the bacterial isolates of the multiple resistant *Staphylococcus aureus* were from the infected wounds, the multiple drug resistant *Staphylococcus saprophyticus* from vaginal swabs, while the multiple drug resistant of Gram-negative bacteria under study were the source of burns.

Two types of plants were used in the study, *Withania somnifera* and *Scabiosa palaestina*, as the first plant was obtained from Baghdad Governorate and was found as wild plants, which are of the Solanaceae family, and the second plant was also found as wild plants in flat lands and the foothills of the mountains of the Kurdistan region in Northern Iraq.

The method of infusion and filtration was used in the process of extracting the two mentioned plants, and the inhibitory effect of these extracts on the multi-resistant bacteria of the four types under study was studied by dissolving each plant extract with solvents 80% ethanol, 80% acetone, hot water and cold water, at concentrations (100, 200, 300, 400) mg / mL each to study the inhibitory effect of plant extracts on the growth of bacterial species from multiple antibiotic-resistant isolates.

There was an inhibitory effect of the alcoholic extracts of *Withania somnifera* on the Gram positive bacteria. The alcoholic solvent (ethanol) of the plant inhibited the growth of *Staphylococcus aureus* bacteria and did not affect the *Staphylococcus saprophyticus*, while the acetone solvent had an inhibitory effect on the growth of both types of staphylococcus under study, the aqueous plant extracts also had a inhibitory effect on the above bacteria, the hot aqueous solvent of the plant had a inhibitory effect on the growth of the two types of *Staphylococcus aureus* and *saprophyticus*, while the cold aqueous solvent of the plant only affected the

Staphylococcus saprophyticus. While the aqueous extracts of *Withania somnifera* had an inhibitory effect on both Gram-negative bacteria under study with different diameters of the inhibition zones.

The ethanol and acetone solvents of *Scabiosa palaestina* had an inhibitory effect on bacterial growth for both types of staphylococcus, with at different diameters of the inhibition areas, and the hot aqueous solvent partially affected both types of staphylococcus with different concentrations, and the cold aqueous solvent did not affect against bacteria.

The results also showed that there was no inhibitory effect of the ethanolic and acetone plant extracts of both types of plants on the isolates of pathogenic Gram-negative bacteria, while the aqueous solvents had an inhibitory effect on the growth of the above bacteria according to the different rates of inhibition areas on the culture medium with different solvent concentrations.