P- ISSN 1991-8941 E-ISSN 2706-6703 (JUAPS) مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة Open Access
2018,12 (1) :40-53

تأثير المستخلص الكحولي لنبات إكليل الجبل(*Rosmarinus officinalis*) وعكبر النحل (*Propolis*) في تثبيط الغشاء الحيوي لبكتريا *Klebsiella pneumoniae* و *Staphylococcus aureus* المعزولة من مرضى التهاب المجاري البولية

محمد كامل كودي[1] ، مثنى حامد حسن[2] ، محمد ابراهيم نادر[3]

[1] دائرة صحة الانبار/ وزارة الصحة ، [2] كلية العلوم/ جامعة الأنبار ، [3] معهد الهندسة الوراثية/ جامعة بغداد

معلومات البحث:

تاريخ التسليم: 2018/3/12
تاريخ القبول: 2018/7/9
تاريخ النشر: 27/ 11/ 2018
DOI: 10.37652/juaps.2022.171555

الكلمات المفتاحية:

بكتريا المكورات العنقودية،
الكلبسيلا الرئوية،
Rosmarinus officinalis،
Propolis،
تثبيط الغشاء الحيوي.

الخلاصة:

هدفت الدراسة الحالية الى التحري عن تكوين الغشاء الحيوي في بكتريا *Klebsiella pneumonia* و *Staphylococcus aureus* المعزولة من مرضى التهاب المسالك البولية ودراسة تأثير المواد الطبيعية (إكليل الجبل *Rosmarinus officinalis* وعكبر النحل *Propolis*) في تثبيط الغشاء الحيوي. جمعت 440 عينة إدرار من المرضى الذين يعانون من التهاب المسالك البولية الراقدين والمراجعين لمستشفى الرمادي التعليمي ، مستشفى الرمادي للنسائية الاطفال، مستشفى اليرموك، والمختبرات التعليمية في مدينة الطب ومن كلا الجنسين للمدة الواقعة من (2017/7/5) ولغاية (2017/10/10) وشخصت العينات مختبرياً بزراعتها على الأوساط الانتقائية فضلاً عن الاختبارات الكيميوحيوية وتم تأكيد التشخيص بإستعمال جهاز الفايتك VITEK-2 compact system. أظهرت النتائج العديد من العزلات البكتيرية المختلفة التي تم عزلها وأن نسبة عزل بكتريا *S.aureus* هي 13.1%(52) وبكتريا *K.pneumoniae* بنسبة 17.1%(68). اختبرت حساسيتها ضد (10) مضادات حيوية واظهرت العزلات مقاومة متفاوتة حسب نوع البكتريا، تمَ الكشف عن قابلية البكتريا على إنتاج الغشاء الحيوي بالطرق النوعية والكمية، وتم التحري عن قابلية العزلات ذات الانتاجية العالية للغشاء الحيوي للمقاومة المتعددة للمضادات الحيوية، حضرت المستخلصات الكحولية لنبات إكليل الجبل (*Rosmarinus officinalis*) وعكبر النحل (*Propolis*)ودراسة فاعليتها التثبيطية تجاه الأنواع البكتيرية المعزولة ، وقد أظهرت النتائج أنّ المواد الطبيعية أعطت فاعلية تضادية عالية ضد البكتريا الموجبة لصبغة كرام مقارنة بالسالبة لصبغة كرام. تم اختبار تأثير تركيز subMIC لكل من المستخلص الكحولي لورق *Rosmarinus officinalis* و الـ *Propolis* لتثبيط التصاق الغشاء الحيوي لبكتريا *S.aureus* و *K.pneumoniae* بطريقة اطباق المعايرة الدقيقة، تراوحت نسبة التثبيط بين (92-94%) بالنسبة للمستخلص الكحولي لنبات *Rosmarinus officinalis* لبكتريا *S.aureus* ، اما فيما يخص بكتريا *K.pneumoniae* فكانت نسبة التثبيط بين (16-26%). اما بالنسبة للـ *Propolis* فتراوحت نسبة التثبيط بين (68-75%) و بين (9-12%) لبكتريا *S.aureus* و *K.pneumoniae* على التوالي.

المقدمة:

تعد البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام المسبب الرئيسي لخمج المجاري البولية(Urinary Tract Infections (UTIs والذي يعد احد الامراض الأكثر شيوعاً لدرجة جعلته بالمرتبة الثانية بعد اخماج المسالك التنفسية وهو يصيب الذكور والاناث وفي مختلف الاعمار ابتداءاً من حديثي الولادة حتى مرحلة الشيخوخة (1,2,3) تعد كل من

* Corresponding author at department health anbar Ministry of Health , anbar Iraq;
E-mail address: mmm86kk@gmail.com

بكتريا *S.aureus* المقاومة للمثيسلين (MRSA) وبكتريا *K.pneumoniae* المنتجة لإنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف من الجراثيم التي تسبب مشكلة متفاقمة وتحدي للصحة العامة اذ تحدث معدلات عالية من الوفيات و الامراضية (4) ويرجع ذلك الى امتلاكها العديد من عوامل الضراوة اذ تتضمن وجود مختلف انواع اللواصق مثل fimberiae نوع 1,3، والسموم مثل Heamolysin ومتعد السكريد المحفظي (Capsular polysaccharides) فضلا عن انتاجها مختلف الانزيمات مثل أنزيمات الـ ß–lactemase واسعة الطيف (Extended spectrum ß–lactemases) مما يعزز مقاومتها للمضادات الحيوية (5,6). "تعيش البكتريا على هيئة تجمعات مُعقدة التركيب مُرتبطة بالسطوح بشكل غير قابل للتراجع بدلاً من أن تكون خلايا عالقة حرة Planktonic cells وتترتب بشكل طبقات متراصة و مصفوفة مغمورة في مواد خارج خلوية Extracellular polymeric substances إذ يصعب إزالتها واختراقها مكونة مايُدعى بالغشاء الحيوي" (Bioflim)، والذي يكون واسع الانتشار في الطبيعة إذ يتكون على الأسطح الحيوية ويتسبب في إصابات عدة منها تسوس الأسنان Dental plaque والإصابات الرئوية pulmonary infections والتهابات المسالك البولية Urinary tract infections والاصابات المرتبطة بإستعمال الاجهزة الطبية مثل إستعمال القثاطر البولية، وإصابات القناة الصفراء (Biliary tract infections) والتهاب شغاف القلب Endocariditi وإلتهابات الأذن الوسطى Otitis midia والإلتهابات الكلوية Renal infections (7). وبسبب ظهور أنتشار المقاومة للمضادات الحيوية بين الجراثيم الموجبة لصبغة كرام والسالبة لها دفع الباحثين المهتمين بمجال العلاج الى اكتشاف بدائل علاجية للمضادات الحيوية، ومن هذه البدائل مستخلص نبات إكليل الجبل(*Rosmarinus officinalis*) وما تحتويها من مكونات فعالة مضادة للجراثيم مثل على فلافونيدات flavonoids وحامض العفص gall oak acid وثنائي التربينات وروزمرسين Rosmircine وأن أكثر المركبات المهمة في نبات *Rosmarinus officinalis* هي حامض الكافئين caffiec acid ومشتقاته كحامض الروزمارينيك acid Rosmarinic وغيرها من المواد الطبيعية التي اكدت جدارتها في علاج الأخماج الجرثومية فضلا عن أنه لا توجد بحوث تؤكد امكانية الجراثيم على اكتساب صفة المقاومة لمثل هذه المكونات الفعالة (8). يعد الـ *Propolis*أهم منتجات النحل بعد العسل وقد استخدم في الطب الشعبي منذ قرون ومن ثم تمت إعادة اكتشافها والسبب هو تطور مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية والآثار الجانبية المترتبة على استخدمها فكان من الضروري إيجاد مثل هذه البدائل(9)، ومن هنا جرت محاولات عديدة في مجال استكشاف الأهمية الطبية للمنتجات الطبيعية ومستخلصاتها ومنها مستخلص *Rosmarinus officinalis* و الـ *Propolis* الذي يعد أهم منتجات النحل بعد العسل واستخدامها في تثبيط الغشاء الحيوي في العزلات البكتيرية.

المواد وطرق العمل:

عزل البكتريا والتشخيص: جمعت 440 عينة ادرار للتحري عن البكتريا الممرضة الموجبة والسالبة لصبغة كرام والمعزولة من مرضى اخماج المسالك البولية في مستشفى الرمادي التعليمي ، مستشفى الرمادي للنسائية الاطفال، مستشفى اليرموك التعليمي، والمختبرات التعليمية في مدينة الطب. للفترة من (2017/7/5) ولغاية (2017/10/10). شخصت العزلات اعتمادا على ماورد في (10). شخصت المستعمرات مبدئيا اعتمادا على الصفات المظهرية وتضمنت شكل المستعمرات ، لونها، قوامها، ورائحتها و حجمها على وسط اكار الماكونكي واكار الدم ووسط المانتول الملحي ووسط الايوسين المثلين

الازرق، وخضعت العزلات الى الفحص المجهري باستعمال صبغة كرام للتعرف على شكل البكتريا وتجمعها وتفاعلها مع صبغة كرام واستعملت الفحوصات الكيموحيوية المختلفة مثل فحص الاوكسديز، الكاتليز، الاندول، احمر المثيل ، الفوكس بروسكاور، استهلاك السترات الحركة، انزيم محلل الدم، انزيم Coagulase واليوريا وتم تأكيد التشخيص باستعمال جهاز Vitek2. تم تحضير الأوساط الزرعية وحسب تعليمات الشركة المجهزة إذ تم تعديل الرقم الهيدروجيني والتعقيم باستعمال Auto clave بدرجة حرارة 121م وتحت ضغط 15(بار/انج^2) ولمدة 15 دقيقة.

اختبار الحساسية للمضادات الحيوية: استعملت (10) انواع من المضادات الحيوية المجهزة من شركة Bioanalyse التركية كما في الجدول(1) وذلك بأتباع طريقة الأنتشار بالأقراص Disc diffusion method (11) وقسمت العزلات الى ثلاث فئات الحساسة وشبه الحساسة والمقاومة واعتماداً على القياسات العالمية (12).

جدول(1) المضادات الحياتية المستعملة في اختبار الحساسية

المضاد الحيوي	الرمز	تركيز mcg/disk
Tetracycline	(T)	30
Ceftazidime	(CAZ)	30
Methicillin	(ME)	5
Ciprofloxacin	(CIP)	5
Gentamicin	(GM)	10
Amikacin	(AK)	10
Nitrofurantoin	(NI)	300
Imipenem	(IPM)	10
Rifampicin	(RP)	5
Trimethoprim–Sulfamethoxazol	(TS)	1.25

جمع المواد الطبيعية: جمع نبات إكليل الجبل *Rosmarinus officinalis*) من مدينة البغدادي غرب محافظة الانبار في شهر تشرين الاول، وضعت الاوراق(الجزء المطلوب للدراسة) في اواني نظيفة تم غسلها وتجفيفها. ارسل النبات الى معشب كلية العلوم/جامعة بغداد لغرض تشخيصه. طحن النبات بواسط مطحنة كهربائية حفظ المسحوق بعبوات بلاستيكية جافة وحفظت في الثلاجة لحين الاستعمال. اما الـ *Propolis* فقد تم الحصول عليه من المناحل المحلية في محافظة الانبار وتم حفظ النموذج بالتجميد لتسهيل تكسيره الى قطع ناعمة جدا عند الاستخلاص .

تحضير المستخلصات الطبيعية:

تحضير المستخلص الكحولي لنبات *Rosmarinus officinalis* : حضر المستخلص الكحولي الحار باستعمال جهاز الاستخلاص Soxhlet Extractor بدرجة حرارة 60م بعدها رشح المحلول باستعمال ورق الترشيح Whatman (No.1) باتباع الطريقة المذكورة في (13).

تحضير المستخلص الكحولي لـ *Propolis* : استخلص الـ *Propolis* بوزن 30 غرام ومزجها في 100 ملليتر من الكحول الاثيلي بتركيز 95% أي بنسبة 100:30 (وزن/حجم) ووضع المزيج في قناني معتمة مع الرج لمرتين الى ثلاث مرات يوميا بدرجة 37م واستمرت عملية الحضن لفترة اسبوع رشح المزيج من خلال ورق الترشيح (wattman No.1) للحصول على سائل الاستخلاص الخالي من بقايا الشمع والملوثات الاخرى(14).

اختبار تكوين الغشاء الحيوي لبكتريا *S.aureus* و *K.pneumoniae*: استخدمت طريقة اطباق المعايرة الدقيقة microtitration plates method (MTP) لإنجاز اختبار تكوين الغشاء الحيوي (15).

قياس الفعالية التثبيطية للمستخلص الكحولي لنبات *Rosmarinus officinalis* والـ *Propolis* ضد بكتريا *S.aureus* و *K.pneumoniae*.

اتبعت طريقة الانتشار بالحفر للتحري عن الفعالية التثبيطية well diffusion method ضد بكتريا *S.aureus* و *K.pneumoniae* (16).

تثبيط الغشاء الحيوي Inhibition of Biofilm:

1- تحديد التركيز تحت المثبط الادنى و المثبط الادنى والقاتل للمستخلصات الطبيعية لتحديد التركيز تحت المثبط الادنى للمستخلصات الطبيعية تجاه (5) عزلات لبكتريا *S.aureus* و (5) عزلات لبكتريا *K.pneumoniae* الاقوى تكويناً للغشاء الحيوي والمقاومة للمضادات الحيوية، اتبعت طريقة Broth dilution (17).

2- فعالية المواد الطبيعية لتثبيط تكوين الغشاء الحيوي لبكتريا *S.aureus* و *K.pneumoniae*.

دُرست فعالية المواد الطبيعية في تثبيط التصاق بكتريا *K.pneumoniae* و *S.aureus* باستعمال أطباق المعايرة الدقيقة المسطحة Microtitration plates وذلك بملء حفر تلك الاطباق بمعاملتين تضمنت الحفرة الاولى: (180) مايكروليتر من وسط Trypticase soy broth السائل المدعوم بـ(1%) كلوكوز و(20) مايكروليتر من المزروع البكتيري للبكتريا المرضية قيد الأختبار وعدت معاملة سيطرة للتجربة. فيما مُلئت الحفرة الثانية بـ(100) مايكروليتر من احدى المواد الطبيعية بالتركيز تحت المثبط الأدنى و(100) مايكروليتر من وسط Trypticase soy broth مضافاً اليه (1%) سكروز الحاوي على المزروع البكتيري. تم تغطية الطبق بالـ Parafilm وحضن بدرجة حرارة (37) م لمدة (24) ساعة سُكبت بعدها محتويات الحفر وغُسلت بالماء المقطر وتركت لتجف بدرجة حرارة الغرفة لمدة (15) دقيقة، ثم أضيف (200) مايكروليتر من صبغة الكريستال البنفسجية إلى الحفر وتركت لمدة (20) دقيقة، غُسلت الحفر فيما بعد لمرات عديدة بالماء المقطر ثم تركت لتجف بدرجة حرارة الغرفة لمدة (15) دقيقة، ثم أُضيف (200) مايكروليتر من الكحول الأثيلي بتركيز(95%) لكل حفرة ، ثم قُرأت طيف الامتصاص للحفر على طول موجي 630 نانوميتر باستعمال جهاز ELISA Reader (18,19) حُسبت النسبة المئوية لتثبيط التصاق البكتريا المرضية بتطبيق المعادلة الواردة عن (20).

النسبة المئوية لتثبيط الغشاء الحيوي

$$\text{النسبة المئوية} = \left(1 - \frac{\text{طيف الامتصاص (O.D) بوجود البروتين المثبط}}{\text{طيف الامتصاص (O.D) لمعاملة السيطرة}}\right) \times 100$$

النتائج و المناقشة:

أظهرت النتائج أن (396) عينة بنسبة (90%) أعطت نموا بكتريا على أوساط الزرع الأولي في حين لم تعط العينات الباقية أي نموا بكتيري, ان النسبة المرتفعة للزرع الايجابي لهذه العينات نسبة حقيقية ومتوقعة كون ان جميع العينات المأخوذة هي من حالات مرضية (21). كذلك اوضحت النتائج ان نسبة العزل في النساء اكثر من الرجال بنسبة 66%للنساء و 34% للرجال، اخضعت العزلات لمجموعة من الاختبارات المظهرية والزرعية فضلا عن الاختبارات الكيموحيوية الموضح نتائجها في الجدول (2) كما اظهرت النتائج في الجدول(3) وجود بكتريا *Klebsiella pneumoniae* في (68) عينة ادرار بنسبة (17.1) من العينات الموجبة للزرع البكتيري وبالمرتبة الثانية بعد بكتريا الـ *Escherichia coli* اما بكتريا *S.aureus* فقد بلغت (52) عزلة

P- ISSN 1991-8941 E-ISSN 2706-6703 (JUAPS) مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة Open Access
2018,12 (1) :40-53

بنسبة (13.1) من مجموع العزلات وهذه تتفق مع الدراسة التي توصل اليها الباحث (22).

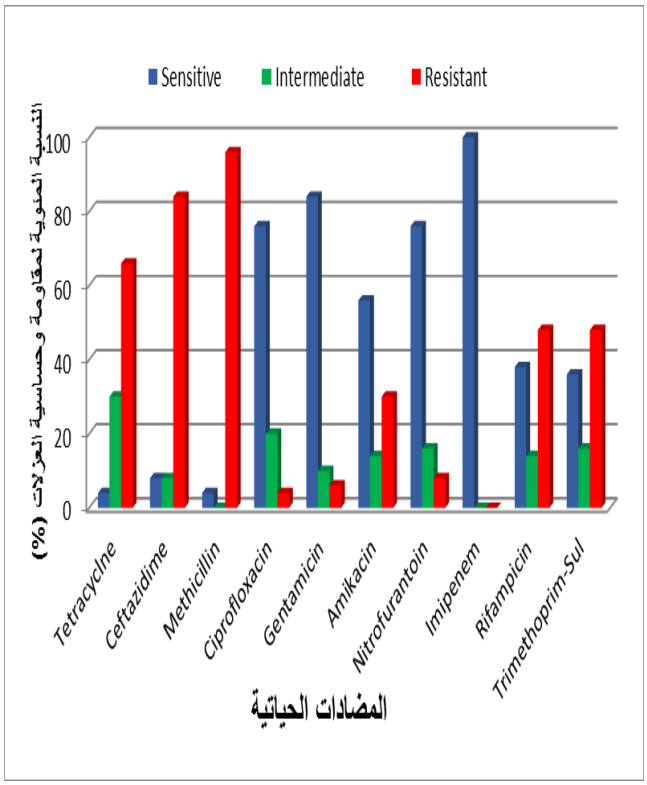
جدول (2) يوضح الاختبارات الكيموحيوية والمجهرية لغرض التميز والتشخيص الأولي

نوع الاختبار	اسم العزلة	
	S.aureus	*K. pneumoniae*
Gram stain	+	.
Fermentation Mannitol	+	.
Motility	.	.
Production Indole	-	.
M- Red	-	.
V-P	-	+
Citrate	-	+
Oxidase	.	.
Catalase	+	+
Urease	+	+
Coagulase	+	.
Haemolysis	+	.

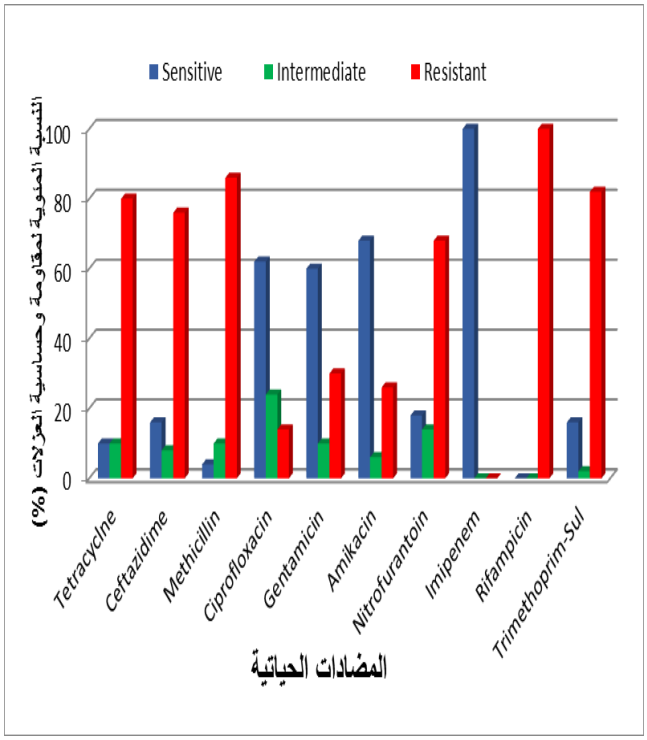
جدول (3) : عدد العزلات البكتيرية ونسبتها المئوية من العينات.

العزلات البكتيرية		عدد العزلات	النسبة المئوية
اشيريشيا القولون	*Escherichia coli*	173	43.68
الكلبسيلا	*Klebsiella pneumoniae*	68	17.17
المتقلبات	*Proteus spp*	61	15.40
المكورات العنقودية الذهبية	*Staphylococcus aureus*	52	13.13
الزائفة الزنجارية	*Pseudomonas aeruginosa*	26	6.56
المكورات العنقودية البشروية	*Staphylococcus epidermidis*	16	4.04
الكلي		396	%100

عزلة لكل نوع بكتيري لفحص الحساسية لـ (10) مضادات حيوية لكلا النوعين من البكتريا وحددت النتائج بوصف البكتريا مقاومة R او متوسطة المقاومة I او حساسة S من خلال قياس قطر منطقة التثبيط ومقارنة ذلك بما ورد في Clinical Laboratory Standards Institute CLSI،(2016) سجلت النتائج الموضحة بالشكلين (1) و(2).



الشكل(1) النسب المئوية لمقاومة وحساسية عزلات *S.aureus* للمضادات الحيوية



الشكل(2) النسب المئوية لمقاومة وحساسية عزلات *K.pneumoniae* للمضادات الحيوية

التحري عن تكوين الغشاء الحيوي لبكتريا *K.pneumonia* و*S.aureus* :

اظهرت نتائج الكشف عن قابلية كل من بكتريا *K.pneumoniae* و *S.aureus* لإنتاج الغشاء الحيوي بطريقتي النمو على آكار أحمر الكونغو Congo red agar (CRA) وطريقة الأنبوب Tube method و طريقة أطباق المعايرة الدقيقة (MTP) الموضحة في الجدول (3) وأظهرت النتيجة الموجبة بدلالة تكوين الأغشية الحيوية على الجدران الداخلية وقعر الأنبوبة بشكل طبقة بنفسجية ملتصقة بالسطح الداخلي للأنبوبة وأما بالنسبة لطريقة آكار أحمر الكونغو (CRA) فقد ظهرت العزلات المكونة للأغشية الحيوية بمظهر أسود جاف فيما بدت العزلات غير المكونة للأغشية بلون وردي أو أحمر او نبيذي وهذا مطابق مع ماذكره (23). اشارت الدراسات الى ان طريقة TM و CRA بوصفها من الطرق النوعية الكفوءة في التحري عن تكوين الغشاء الحيوي وتستخدم كطريقة فحص عامة للكشف عن الاخير في المختبرات (24)، بينت النتائج التي تم الحصول عليها بطريقة MTP كما موضح في الجدول (4) تباين كبير في كمية انتاج الغشاء الحيوي لكلا النوعين من البكتريا إعتماداً على قراءات الكثافة الضوئية OD للعزلات المختلفة، اذ أظهرت بكتريا *K.pneumoniae* تفاوت في معدل قراءات الكثافة الضوئية تراوحت بين (0.066-0.302) ، إذ كانت 30% من عزلات هذه البكتريا منتجة للغشاء الحيوي بشكل قوي و 64% أنتجته بشكل متوسط او ضعيف بينما لم تتمكن 6% من انتاجه ، في الوقت التي أظهرت فيه جميع عزلات بكتريا *S.aureus* قابليتها في إنتاج الغشاء الحيوي ، وتفاوتت في معدلات الإنتاج للغشاء إذ تراوحت بين (0.092-0.782)، إذ تميزت 74% من عزلاتها بإنتاجها القوي للغشاء الحيوي، بينما بلغت العزلات المتوسطة الإنتاج 26%.

ويتبين من النتائج التي تم الحصول عليها أن طريقة MTP هي الأكثر دقة وحساسية من باقي الطرق المستعملة (CRA و TM) كون طريقة MTP لاتعتمد على التميز النوعي بل يتم قراءتها بوساطة جهاز قارئ الـ ELISA . ولم تتفق هذه النتيجة مع (25) إذ لم يلاحظا اي فرق في نسب انتاج الغشاء الحيوي عند استعمال طريقة أطباق المعايرة الدقيقة MTP وطريقة CRA وذكر ان كلا الطريقتين كانتا بالحساسية نفسها واظهرت نتائج متشابهة في التحري عن انتاج الغشاء الحيوي وبنسبة 91% لكليهما ، بينما دراسة (26) فقد اوضحت وجود اختلاف في نتائج الطريقتين وان طريقة CRA كانت الأكفأ في التحري عن انتاج الغشاء الحيوي وهذا لايتفق ايضاً مع نتائج الدراسة الحالية. في حين أشار (27) إلى ان طريقة CRA لا ينبغي ان تستعمل اختبارا لقياس قدرة العزلات على تكوين الغشاء الحيوي لا نها تعطي نتائجا غير حقيقية. واتفقت نتائج دراستنا مع ما أشار اليه (28). ان طريقة MTP تعتبر الاكثر سهولة وحساسية للكشف عن تكوين الغشاء الحيوي.

الجدول (4): إنتاج الغشاء الحيوي بطريقتي النمو على وسط أحمر الكونغو وطريقة الانبوب طريقة اطباق المعايرة الدقيقة.

نوع البكتريا	النسبة المئوية(%)								
	طريقة وسط أحمرالكونغو CRA			طريقة الانبوب TM			اطباق المعايرة الدقيقة MTP		
	قوي	ضعيف	غير المنتجة	قوي	ضعيف	غير المنتجة	قوي	ضعيف	غير المنتجة
S.aureus	%12	%68	%20	%64	%36	%0	%74	%26	%0
K.pneumoniae	%8	%62	%30	%52	%40	%8	%30	%64	%6

اختبار الفعالية التثبيطية للمستخلصات الطبيعية ضد عزلات *K.pneumoniae* و *S.aureus* المكونة للغشاء الحيوي اختبرت الفعالية التضادية للمستخلصات الطبيعية التي شملت نبات *Rosmarinus officinalis* والـ *Propolis*, تجاه عزلات بكتريا *S.aureus* و*K.pneumoniae* المكونة للغشاء الحيوي والمقاومة لمعظم المضادات الحيوية والمنماة على وسط مولر –هنتون باستعمال طريقة الانتشار في الحفر. اتضح من النتائج الموضحة في الجدول (5,6) وجود تباين في تأثير المستخلصات الطبيعية ضد العزلات قيد الدراسة , اذا اظهر مستخلص *Rosmarinus officinalis* كفاءة عاليه في تثبيط نمو بكتريا *S.aureus* مقارنة بالفعالية التثبيطية تجاة بكتريا *K.pneumoniae*إذ كان أعلى قطر تثبيط للمستخلص الكحولي 21 ملم اتجاه بكتريا *S.aureus* عند التركيز 150 ملغم/.مل بينما كان قطر التثبيط لبكتريا *K.pneumoniae* لنفس التركيز 17 ملم، وأما أقل قطر تثبيط فكان 9 ملم لبكتريا *K.pneumoniae* عند التركيز 25 ملغم/مل ، مما يشير الى ان البكتريا الاخيرة هي الاقل تأثرا بالفعل التثبيطي لـ *Rosmarinus officinalis*.في حين لم يظهر لمحلول DMSO اي تأثير ضد بكتيري. إذ تتفق هذه النتائج مع (29). اما فيما يخص المستخلص الكحولي لـ *Propolis* يوضح الجدول(6) تأثيرات متباينة للمستخلص على بكتريا *K.pneumoniae* و *S.aureus* وعند التراكيز التي تراوحت بين(25 –200) ملغم/مل، مقدرة بقطر منطقة التثبيط. واتفقت نتائج دراستنا مع ماتوصل اليه (30). حيث كانت البكتريا الموجبة لصبغة كرام المتمثلة *S.aureus* هي الاكثر تاثرا للمستخلص الكحولي لل*Propolis* من البكتريا السالبة المتمثلة ببكتريا *K.pneumoniae*. ويظهر التحليل الاحصائي وجود فروقات معنوية بين اقطار مناطق التثبيط تبعا لتراكيز المستخلص الكحولي لكلا النوعين من البكتريا بمستوى معنوية (P≤0.05).

جدول(5) تأثير المستخلص الكحولي لورق *Rosmarinus officinalis* على عزلات *K.pneumoniae* و *S.aureus*

المستخلص الكحولي لأوراق *Rosmarinus officinalis*	تركيز المستخلص (ملغم/ مل)	قطر منطقة التثبيط (ملم)	
		K.pneumoniae	*S.aureus*
	150	18	21
	100	16	19
	50	13	17
	25	9	13
قيمة LSD	------	**1.84**	**1.88**
	(P≤0.05)		

جدول(6) تأثير المستخلص الكحولي لـ *Propolis* على عزلات *K.pneumoniae* و *S.aureus*

المستخلص الكحولي لـ *Propolis*	تركيز المستخلص (ملغم/ مل)	قطر منطقة التثبيط (ملم)	
		K.pneumoniae	*S.aureus*
	200	16	20
	150	14	17
	100	13	16
	50	9	14
	25	7	12
قيمة LSD	------	**1.819**	**1.819**
	(P≤0.05)		

تحديد التركيز تحت المثبط الأدنى (subMIC) للمواد الطبيعية بطريقة (REMDA) وتأثيره على نمو بكتريا *K.pneumoniae* و*S.aureus*

بينت نتائج تقدير التركيز المثبط الأدنى للمواد الطبيعية (*Rosmarinus officinalis* و الـ *Propolis*) أن العزلات الموجبة لصبغة كرام هي الأكثر تأثراً بكلا المستخلصين مقارنة بالبكتريا السالبة لصبغة كرام , إذ بينت الدراسة أن عزلات بكتريا *S.aureus* هي الأكثر حساسية للمستخلص الكحولي لنبات *Rosmarinus officinalis* بالمقارنة مع عزلات بكتريا *K.pneumoniae* الأقل حساسية اذ اظهرت النتائج الحصول على التركيز تحت المثبط الادنى لمستخلص *Rosmarinus officinalis* بتركيز 2.3 ملغم/مل لبكتريا *S.aureus* اما بالنسبة لبكتريا *K.pneumoniae* فقد ابدت اكثر مقاومة وبتركيز 4.6 ملغم/ مل للتركيز تحت المثبط الادنى. اما فيما يخص المستخلص الكحولي لـ *Propolis* فقد اظهرت النتائج وجود اختلافات كبيرة في قيم التركيز تحت المثبط الادنى باختلاف العزلة البكترية، اذ اظهرت بكتريا *S.aureus* حساسية عالية تجاة مستخلص الـ *Propolis* والحصول على التركيز تحت المثبط الادنى بتركيز 0.58 ملغم/مل بينما ابدت بكتريا *K.pneumoniae* مقاومة عالية تجاه هذه المستخلص اذ تم الحصول على التركيز تحت المثبط الادني لهذه البكتريا بتركيز 18.7 ملغم/مل وهذه النتيجة جاءت مخالفة لنتائج الباحث(31) فكان للمستخلص الكحولي لل*Propolis* تأثير تثبيطي subMIC تجاه بكتريا *K.pneumoniae* و*S.aureus* بتركيز 100 و 200 ملغم/مل على التوالي، وقد يعزى السبب في اختلاف قيمة MIC للمستخلصات الطبيعية ضد الأنواع البكتيرية إلى الاختلاف في طريقة الاستخلاص. ونوع السلالات ودرجة مقاومتها واختلافها الوراثي.

تأثير المستخلصات الطبيعية على تكوين الغشاء الحيوي لبكتريا *K.pneumoniae* و *S.aureus*.

تم إختبار تأثير التراكيز تحت المثبطة الدنيا للمستخلص الكحولي لأوراق نبات *Rosmarinus officinalis* و الـ *Propolis* في تكوين الغشاء الحيوي لكلا النوعين من البكتريا المتكونة في طبق المعايرة الدقيق للعزلات الـ 10 المنتخبة الاكثر تكوينا للغشاء الحيوي ومقاومة المضادات الحيوية من كلا النوعين من البكتريا بعد مدة حضن 24 ساعة. فأظهرت النتائج انخفاض قيمة الامتصاصية لهذه العزلات إلى قيم أدنى مما كانت عليه قبل المعاملة بمستخلص *Rosmarinus officinalis*.

كانت قيم الكثافة الضوئية (O.D) لحفر السيطرة يطول موجي 360 نانوميتر تراوحت بين (0.759–1.040) الحاوية على وسط زرعي الملقح بالبكتريا فقط بالنسبة *S.aureus*، اما بالنسبة لبكتريا *K.pneumoniae* كانت قيمة الكثافة الضوئية لحفر السيطرة تراوحت بين(0.273–0.302).وحسبت النسبة المئوية لتثبيط التصاق البكتريا المرضية بتطبيق المعادلة الواردة في (32).

النسبة المئوية لتثبيط الغشاء الحيوي=

$$1 - \frac{\text{O.D بوجود المثبط}}{\text{O.D لمعاملة السيطرة}} \times 100$$

يوضح الجدول(7) ان النسبة المئوية لتثبيط تكوين الغشاء الحيوي تراوحت بين (16–26%) و (92–94%) للمستخلص الكحولي لنبات *Rosmarinus officinalis* لبكتريا

K.pneumoniae و *S.aureus* على التوالي، اتفقت هذه الدراسه مع توصل الية الباحث (33) حيث اشار الى تاثير مستخلص *Rosmarinus officinalis* على الغشاء الحيوي للبكتريا الموجبة اكثر مما هو علية في البكتريا السالبة. ويظهر التحليل الاحصائي وجود فروقات معنوية بين نسب التثبيط لكلا النوعين من البكتريا عند مستوى معنوية ($P\leq0.01$).

جدول(7)معدل سمك الغشاء الحيوي لبكتريا *K.pneumoniae* و *S.aureus* قبل وبعد معاملتهما بمستخلص نبات *Rosmarinus officinalis*

K.pneumoniae				*S.aureus*			
النسبة المئوية للتثبيط	بعد المعاملة O.D	قبل المعاملة O.D	رقم العزلة	النسبة المئوية للتثبيط	بعد المعاملة O.D	قبل المعاملة O.D	رقم العزلة
%17	0.228	0.273	K 13	%93	0.071	0.932	S 2
%22	0.216	0.275	K 20	%93	0.070	0.979	S 19
%16	0.255	0.302	K 43	%94	0.070	1.040	S 25
%18	0.233	0.281	K 47	%92	0.061	0.759	S 32
%26	0.251	0.337	K 50	%92	0.075	0.811	S 44
قيمة T المحسوبة = 63.38							

اما بالنسبة لمستخلص الـ *Propolis* فقد بينت النتائج في الجدول (8) امتلاك مستخلص الـ *Propolis* القدرة على تثبيط تكوين الغشاء الحيوي على العزلات البكتيرية قيد الدراسة , مع تباين التأثير التثبيطي على العزلات البكتيرية ، اظهرت النتائج انخفاضاً ملحوظاً في تكوين الغشاء الحيوي عند معاملة المستخلص الكحولي لـ *Propolis* ، اذ سجلت النتائج اعلى نسبة انخفاض 75% تعود لبكتريا *S.aureua* اما اقل نسبة انخفاض فتعود لبكتريا *K.pneumoniae*

9% . ان النسبة المئوية لتثبيط تكوين الغشاء الحيوي بالنسبة لبكتريا *S.aureus* تراوحت بين (68–76) للمستخلص الكحولي لـ *Propolis* اما فيما يخص بكتريا *K.pneumoniae* فكانت نسبة التثبيط قليلة تراوحت بين(9–12) لنفس المستخلص، ويبين التحليل الاحصائي وجود فروقات معنوية بين نسب التثبيط لكلا النوعين من البكتريا عند مستوى معنوية ($P\leq0.01$).

جدول(8) معدل سمك الغشاء الحيوي لبكتريا *K.pneumoniae* و *S.aureus* قبل و بعد معاملتهما بمستخلص الـ*Propolis*

K.pneumoniae				*S.aureus*			
رقم العزلة	O.D قبل المعاملة	O.D بعد المعاملة	النسبة المئوية للتثبيط	رقم العزلة	O.D قبل المعاملة	O.D بعد المعاملة	النسبة المئوية للتثبيط
K 13	0.217	0.197	%10	S 2	0.856	0.263	%70
K 20	0.260	0.230	%12	S 19	0.985	0.256	%75
K 43	0.302	0.269	%11	S 25	0.983	0.245	%76
K 47	0.211	0.193	% 9	S 32	0.821	0.274	%68
K 50	0.251	0.226	%10	S 44	0.811	0.260	%69
قيمة T المحسوبة = 75.57							

قد يعزى الاختلاف في مدى حساسية العزلات البكتيرية المكونة للغشاء الحيوي لهذه المواد الطبيعية تبعا لعوامل عديده التي تتضمن موقع العزل (والتي تتاثر بلا شك بالانواع Species ونوع السلالة الموجوده) , الظروف البيئية الدقيقة (التي ربما تحث تغييرات مظهرية في العزلات) , الفعالية الفسلجية لكل عزلة التي تعود إلى الاختلاف في تركيبها الجيني و التي بدورها تنعكس على فعالياتها الايضية المختلفة ونشاط انزيماتها فضلا عن خصائص الجدار الخلوي. جميع هذه العوامل يمكن أن تؤثر في التداخل بين جزيئات البروتينات المثبطة والمستقبلات السطحية للخلايا فضلا عن عدد ونوع المستقبلات المتاحة التي قد تختلف بين العزلات (34).

المصادر:

1. Al-Begat, Saad Taha Mutlk Hmidon (2007).Study of most commen aerobic bacteria causing lower urinary tract infection(UTI) in Ramadi general hospital. thesis, college of medicine-university of Al- Anbar.

2- Abid, A.J. and Jamal N.S. (2008).The bacterial Roles in Urinary Tract Infections in Women and the Susceptibility of Some Bacterial Isolates to Some Antibacterial Agents ,Al-Qadisiya Journal of vet.Med.Sci.vol 7,No 1.

3- Srivastava, R. N., & Vasudev, A. S. (2011). Urinary tract infections current management . Apollo Medicine, 8(4), 270-275

4- Bagattini, M., Crivaro, V., Di Popolo, A., Gentile, F., Scarcella, A., Triassi, M., & Zarrilli, R. (2006). Molecular epidemiology of extended-spectrum β-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae in a neonatal intensive care unit. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 57(5), 979-982.

5- Lin, H. A., Huang, Y. L., Yeh, K. M., Siu, L. K., Lin, J. C., & Chang, F. Y. (2016). Regulator of the mucoid phenotype A gene increases the virulent ability of extended-spectrum beta-lactamase-producing serotype non-K1/K2 Klebsiella pneumonia. Journal of Microbiology, Immunology and Infection, 49(4), 494-501.

6- Blomqvist, S., Leonhardt, Å., Arirachakaran, P., Carlen, A., & Dahlén, G. (2015). Phenotype, genotype, and antibiotic susceptibility of Swedish and Thai oral isolates of Staphylococcus

14- Katırcıoğlu, H., & Mercan, N. (2006). Antimicrobial activity and chemical compositions of Turkish propolis from different region. African Journal of Biotechnology, 5(11), 1151-1153.

15-heepa,M.,Rashme,V.L.,Appalaraju, B. (2011).Comparision of biofilm Production and multiple drug

resistance in clinical isolates of Acinetobacter baumanii from a tertiary care hospital in south India, Int. J.Pharm .Biomed .Sci. 2(4),103-107.

16- Ouibrahim, A., Tlili-Ait-kaki, Y., Bennadja, S., Amrouni, S., Djahoudi, A. G., & Djebar, M. R. (2013). Evaluation of antibacterial activity of Laurus nobilis L., Rosmarinus officinalis L. and Ocimum basilicum L. from Northeast of Algeria. African Journal of Microbiology Research, 7(42), 4968-4973.

17- Gahlaut, A., & Chhillar, A. K. (2013). Evaluation of antibacterial potential of plant extracts using resazurin based microtiter dilution assay. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 5(2), 372-376..

18- Mireles, J. R., Toguchi, A., & Harshey, R. M. (2001). Salmonella enterica serovar Typhimurium swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: surfactin inhibits biofilm formation. Journal of bacteriology , 183(20), 5848-5854.

19-Ali,O.(2012). Prevention of Proteus mirabilis biofilm by surfactant solution. Egypt.Acad. J. Biolog. Sci.4:1-8.

aureus. Journal of oral microbiology , 7(1), 26250.

7-Mohsin, Rusul Idan(2015). Study of Biofilm formation of Escherichia coli and Proteus mirabilis isolated from urinary tract infection in AL- Najaf Al-Ashraf governorate. thesis, college of Education for Girls-University of Kufa.

8-Herreo, M.A., Ibanez, E and Cifuentes, A.(2005). Pressurized liquid extractioncapillary electrophoresis-mass spectrometry for the analysis of polar antioxidant in rosemary extract. Chromatogr A.1084:54-62.

9- Haddadin, M. S. Y., Nazer, I., Jamal, S., Raddad, A., & Robinson, R. K. (2008). Effect of propolis on two bacterial species with probiotic potential.Paki. J. of Nutr.Vol 7 (2): 391-394.

10- Holt, J. G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.A. and Williams, S.T. (1994). Bergy, s Manual Of Derminative Bacteriology. (9th) ed. Williams and Wilkins

11- Morello , J.K. , Mizer , H. E and Granato , P.A. (2006). Laboratory Manual And work Book in Microbiology Application To Patient Care. 8thed. Mc Graw Hill.

12-CLSI, (Clinical and Laboratory Standards Institute). (2016).Performance standard for antimicrobial susceptibility testing; Twenty- SIX informational supplement; 31(1): 124-128 .

13- Ladd Jr, T. L., Jacobson, M., & Buriff, C. R. (1978). Japanese beetles: extracts from neem tree seeds as feeding deterrents. Journal of economic entomology , 71(5), 810-813.

20- Gudiña, E. J., Rocha, V., Teixeira, J. A., & Rodrigues, L. R. (2010). Antimicrobial and antiadhesive

properties of a biosurfactant isolated from Lactobacillus paracasei ssp. paracasei A20. Letters in applied microbiology, 50(4), 419-424.

21-AlKaabi, Sadik abdulridah gatea (2013). Bacterial Isoates and their antibilogram of Burn Wound infecrions in Burns Specialist Hospital in Baghdad . j. Baghdad for sci.. vol10, No2:331-340

22- الدليمي،حسن هلال رشيد (2016).التحري عن بعض عوامل الضراوة لبعض مسببات التهاب المجاري البولية بأستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل. رسالة ماجستر، كلية العلوم- جامعة الانبار

23-Hassan, A., Usman, J., Kaleem, F., Omair, M., Khalid, A., & Iqbal, M. (2011). Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. Brazilian Journal of Infectious Diseases, 15(4), 305-311.

24-Rewatkar ,A.R. & Wadher, B.J. (2013). Staphylococcus aureus and Pseudomonas aerginosa Biofilm formation methods . IOSR J.Pharm. and Biolog. Sci. , 8(5) : 36-40.

25- Eftekhar, F. and Dadaei, T. (2011). Biofilm formation and detection of IcaAB genes in clinical isolates of methicillin resistant Staphylococcus aureus. Ira. J. Basic Med. Sci.14(2): 132-136.

26- Dadawala, A. I. , Chauhanm, H. C. , Chandelm, B. S. , Ranaware, P. , Patel, S. S. , Khushboo, S. , Ratod, P. H., Shah, N. M. and Kher, H. N. (2011). Assessment of Escherichia coli isolates for in virto biofilm production . J. Infect. Dis.3(8): 364-366

27-Bozkurt, H. , Kurtoglu, M.G. ,Bayram, Y. ,Kesli , R. and Berktas , M.(2009). Correlation of slime production investigated via three different methods in coagulase-negative Staphylococci with crystal violet reaction and antimicrobial resistance. J. Int .Med. Res.,37(121-128).

28- السوداني، احسان علي رحيم(2014). تثبيط نمو وتكوين الغشاء الحيوي لبكتريا Pseudomonas aeruginosa بالبروتينات المنتجة من خميرة Saccharomyces cerevisiae . رسالة ماجستير، كلية العلوم – الجامعة المستنصرية.

29- Stojanović-Radić, Z., Nešić, M., Čomić, L., & Radulović, N. (2010). Antimicrobial activity and cytotoxicity of commercial rosemary essential oil (Rosmarinus officinalis L.). Biologica Nyssana, 1(1-2).

30-Ghasemi, F. S., Eshraghi, S. S., Andalibi, F., Hooshyar, H., Kalantar-Neyestanaki, D., Samadi, A., and Fatahi- Bafghi, M. (2017). Anti-Bacterial Effect of Propolis Extract in

Oil Against Different Bacteria. Zahedan Journal of Research in Medical Sciences, 19(3).

31 – النعيمي، نور محمد طاهر(2013). تأثير تداخل المواد الطبيعية والمضادات الحيوية في حساسية البكتريا المعزولة من خمج الجروح والحروق. رسالة ماجستير، كلية العلوم- جامعة الانبار.

activity of Rosmarinus officinalis L. essential oil against multiple antibiotic resistant Pseudomonas sp. and Staphylococcus sp. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, *12*(3&4), 82-86.

34- Hodgson, V. J., Button, D., & Walker, G. M. (1995). Anti-Candida activity of a novel killer toxin from the yeast Williopsis mrakii. *Microbiology* , *141*(8), 2003-2012.

32- Gudiña, E. J., Rocha, V., Teixeira, J. A., & Rodrigues, L. R. (2010). Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from Lactobacillus paracasei ssp. paracasei A20. *Letters in applied microbiology*, *50*(4), 419-424.

33-Ceylan, O., Uğur, A., Saraç, N., Ozcan, F., & Baygar, T. (2014). The in vitro antibiofilm

P- ISSN 1991-8941 E-ISSN 2706-6703 (*JUAPS*) مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة Open Access
2018,12 (1) :40-53

Effect of alcoholic Extracts of *Rosmarinus officinalis* and *Propolis* on inhibition of *Staphylococcus aureus and Klebsiella pneumoniae* biofilm isolate from urinary tract infection

Mohammed. K. Kodi
department health alanbar
Ministry of Health

Muthanna. H . Hassan
Science College
University of Al-**Anbar**
Email: mmm86kk@gmail.com

Mohamed. I. Nader
Genetic Engineering Institute,
University of Baghdad.

Abstract

The present study aimed to investigate the formation of the biofilm in *Klebsiella pneumonia* and *Staphylococcus aureus* isolated from UTI patients and study the effect of natural substances (*Rosmarinus officinalis* and *Propolis*) in inhibiting the biofilm. A total of 440 urine samples were collected from patients with urinary tract infection, those who were recumbent and were referred to the Al- Ramadi Teaching Hospital, Al-Ramadi Hospital for women and children, Al-Yarmouk Hospital, and educational laboratories in the medicine city for both sexes, during the period from the 5 July, 2017 to 10 October, 2017. Specimens were diagnosed by cultured them on selective media as well as biochemical tests. Also, diagnosis was confirmed using VITEK-2 compact system. Results showed many different bacterial isolates and ratio of *S.aureus* isolating was (52)%13.1 , and *K.pneumonia* was (68)%17.1. Their sensitivity were tested against 10 antibiotics and isolates showed varying resistance depending on the type of bacteria. The susceptibility of the bacteria to produce the biofilm was detected by qualitative and quantitative methods. Also, their susceptibility of high-yielding isolates to the biofilm antibiotics resistance was investigated, preparation of the alcoholic extract of the *Rosemarinus officinalis* plant and *Propolis* and studying its inhibitory effectiveness against isolates bacteria species. The results showed that the natural materials gave a high contrast effect against Gram positive bacteria compared to Gram negative bacteria. The effect of subMIC concentration to both alcoholic extract of *Rosemarinus officinalis* and Propolis were tested to inhibit the adhesion of *S.aureus* and *K.pneumonia* biofilm by micro-calibration dishes. Inhibitory ratio of *Rosemarinus officinalis* alcoholic extract ranged between (92-94%) to *S. aureus* and (16-26%) to *K.pneumonia*. as for *Propolis*, inhibitory ratio ranged (68- 75%) and (9-12%) to *S. aureus* and *K. pneumonia*, respectively.