دراسة أولية في سورية لتشخيص وعزل نوع الزائفة *Pseudomonas stutzeri* المسببة لإنتان الدم المكتسب عند الأطفال واقتراح القلويدات النباتية كمضادات جرثومية مستقبلية تجاهها

لمى محمد أيوب شبيب* **أ.د. جورجيت انترانيك بابوجيان****

* طالبة الدكتوراة، قسم علم الحياة النباتية، كلية العلوم، جامعة دمشق
lama.mena1990@damascusuniversity.edu.sy
** أستاذ في قسم علم الحياة النباتية، كلية العلوم، جامعة دمشق
g.babojian@damasuniv.edu.sy

المخلص :

الهدف من البحث: ازدادت في الآونة الأخيرة بشكل ملحوظ وتيرة عزل *Pseudomonas stutzeri* عالمياً من العينات السريرية، ولاسيما مصادر التلوث للبيئات الطبية، وكمسبب لإنتان الدم المكتسب الناتج عن استعمار هذه الجرثومة لأسطح الأدوات الطبية المختلفة. في عام 2024 استطاعت هذه الدراسة ولأول مرة من اثبات انتشار *Pseudomonas stutzeri* أيضاً في سورية، وكمسبب لإنتان الدم المكتسب عند الأطفال في أعمار مختلفة وصولاً إلى الخدج ضعيفي المناعة، وتأكيد قدرتها على استعمار أسطح الأدوات الطبية، وتشكيل الأغشية الحيوية التي قد تصبح مقاومة لجميع المعاملات الكيميائية مستقبلياً. انطلقت هذه الدراسة من أهمية وخطورة ما سبق وتوجهت نحو عزل وتشخيص *Pseudomonas stutzeri* ووضع وصف دقيق لهذه الجرثومة، والتأكيد على أهم الصفات المخبرية المساعدة في تأكيد انتشارها، ومعرفة مدى استجابتها حتى الآن للعلاج الصادي المطبق مقارنة مع أنواع الزوائف الأخرى، واقتراح حلول مستقبلية لمواجهة انتشارها في حال تمام المقاومة الصادية لديها معتمدة على المنتجات القلويدية النباتية .

طرائق العمل : تم جمع عينات الدم من مستشفى الأطفال الجامعي في دمشق خلال الفترة الزمنية 2023\5\29 وحتى تاريخ 2024\1\8 وتم مراقبة وبالتنسيق مع مخبر المشفى تواتر ظهور عينات

Pseudomonas stutzeri ضمن عينات الإنتان الدموي من أقسام المشفى المختلفة، ثم تم إجراء الزروعات اللازمة على أوساط تفريقيه ونوعية وتطبيق مجموعة من الاختبارات الحيوية لتميز *Pseudomonas stutzeri* ، وبعد تأكيد النوع *Pseudomonas stutzeri* تم إجراء اختبار التحسس تجاه مجموعة من الصادات الحيوية المطبقة للعلاج. في نهاية هذا البحث وكخطوة مستقبلية لعلاج هذه الجرثومة ولمقاومة قدرتها على تشكيل الأغشية الحيوية تم اختيار قلويدات جنس الخشخاش .*Papaver* sp من الفصيلة الخشخاشية كونها الأقوى طبياً كعلاج مستقبلي محلي من الفلورا السورية.

نتائج البحث : أكدت هذه الدراسة على بدأ انتشار *Pseudomonas stutzeri* في أقسام مشفى الأطفال الجامعي المختلفة وكمسبب للإنتان الدموي المكتسب ضمن فئة الأطفال، وقد أوضحت الدراسة أن تسجيل انتشار هذه الجرثومة بدأ منذ العام 2023 حتى الآن ولكن مازالت *Pseudomonas areuginosa* هي الأكثر توتراً وحضوراً بمقاومة تامة تجاه الصادات الحيوية مقارنة مع *Pseudomonas stutzeri* التي أبدت حساسية مقبولة تجاه بعض الصادات الحيوية، وبأقطار هالات تراوحت بين (10–20 ملم)، والملفت للانتباه أن العينات المجموعة من ذات الجرثومة خلال هذا البحث أبدت وجود سلالتين اختلافتا من حيث نمط انحلال الدم ومن حيث المقاومة الصادية، حيث كانت السلالة غير الحالة هي الأكثر مقاومة، ولذلك تم تطبيق خلاصة (الساق والثمار) لست أنواع من نبات الخشخاش البرية في الفلورا السورية (*Papaver hybridum, Papaver rhoeas, Papaver dubium Papaver polytrichum, Papaver umbonatum,Papaver syriacum*)، وسجلت الخلاصات فعالية كبيرة ولاسيما النوعين *Papaver dubium, Papaver syriacum* بأقطار هالات تراوحت بين (35–40 ملم) وسطياً.

الاستنتاجات : أكدت هذه الدراسة الأولى في سورية مساهمة نوع جديد من الزوائف هو *Pseudomonas stutzeri* في عدوى إنتان الدم المكتسب، وبارتفاع ملحوظ للمقاومة الصادية بين سلالتين مختلفتين من حيث نمط انحلال الدم، مترافق مع غياب سابق لتشخيص هذا النوع كمسبب للعدوى والاعتماد فقط في التشخيص على رجوع العدوى إلى عصيات سالبة الغرام متحسسة تجاه الصادات الحيوية، وبذات الوقت أعطت هذه الدراسة حلول مستقبلية لمواجهة انتشار هذا النوع الجرثومي، ولاسيما في ضوء ارتفاع المقاومة الصادية، وبالاعتماد على منتجات آمنة حيوياً على

البيئة وصحة المريض وتتميز الفلورا السورية بالغنى الكبير بها، وتنوع مصادرها وقابلية تطويرها وهي قلويدات الفصيلة الخشخاشية (جنس الخشخاش *Papaver sp*.) ذات التاريخ الطبي الهام .

الكلمات المفتاحية : إنتان الدم المكتسب – *Pseudomonas stutzeri -Papaver sp* المقاومة الصادات الحيوية – القلويدات .

The primary study in Syria to diagnose and isolate *Pseudomonas* stutzeri for childhood acquired septicemia and suggest plant alkaloids as future antimicrobials against it

Lama Mohammed ayoub shbibe * Dr. Georgette Antranik Babujian **
*PHD student , Department of Plant Biology, Faculty of Science , Damascus university lama.mena1990@damascusuniversity.edu.sy
** professor, Department of Plant Biology, Faculty of Science , Damascus university
g.babojian@damasuniv.edu.sy

Abstract:
Introduction and objective: The rate of isolation of *Pseudomonas stutzeri* has recently increased significantly worldwide from clinical samples, especially sources of contamination of medical environments and as a cause of acquired sepsis resulting from the colonization on the surfaces of various medical instruments. To date, the world has not recorded any deaths due to this bacterium, but the increase in the number of medical reports about it globally is ringing the alarm bell towards it. In 2024, this study was able, for the first time, to prove the spread of *Pseudomonas stutzeri* also in Syria, and as a cause of acquired sepsis in children of different ages, reaching premature infants with weak immunity, and to confirm its ability to colonize the surfaces of medical instruments, and to form biofilms that may become

resistant to all chemical treatments in the future. This study was based on the importance and seriousness of the above and directed towards isolating and diagnosing *Pseudomonas stutzer*i and providing an accurate description of this bacteria and emphasizing the most important laboratory characteristics that help in confirming its spread, and knowing the extent of its response so far to the applied antibiotic treatment compared to other *pseudomonas* sp. species , and proposing future solutions based on plant alkaloid products to confront its spread .

Methods: Blood samples were collected from the University Children's Hospital during the period from 5/29/2023 to 1/8/2024, and the frequency of the appearance of *Pseudomonas stutzeri* samples was monitored in coordination with the hospital laboratory, and then the necessary cultures were performed on differential and qualitative media and a set of biological tests were applied to distinguish *Pseudomonas stutzeri*, and after confirming the type *Pseudomonas stutzeri*, a sensitivity test was performed against a set of antibiotics applied for treatment. At the end of this research and as a future step to treat this germ and to combat its ability to form biofilms, alkaloids of *Papaver* sp. from the *Papaveraceae* were chosen as the most powerful medically as a future treatment.

Results: This study confirmed the beginning of the spread of *Pseudomonas stutzeri* in the various departments of the University Children's Hospital and as a cause of acquired sepsis among children. The study showed that the spread of this germ began to be recorded since 2023 until now, but Pseudomonas areuginosa is still the most tense and present with complete resistance to antibiotics compared to *Pseudomonas stutzeri*, which showed acceptable sensitivity to some antibiotics and with halo diameters ranging between (10-20 mm). What is noteworthy is that the samples collected from the same germ during this research showed the presence of two different strains in terms of the pattern of hemolysis and in terms of antibiotic resistance, as the non-hemolytic strain was the most resistant. Therefore, the extract (stem and fruits) of six species of *Papaver* sp. in the Syrian flora (*Papaver hybridum, Papaver rhoeas, Papaver dubium Papaver polytrichum, Papaver umbonatum, Papaver syriacum*) was applied, and it was recorded Abstracts: High efficacy, especially for the two types *Papaver dubium, Papaver syriacum* with halo diameters ranging between (35-40 mm) on average.

Conclusions: This first study in Syria confirmed the contribution of a new type of *Pseudomonas stutzeri* in the infection of acquired sepsis and a significant increase in antibiotic resistance between two different strains in terms of the pattern of hemolysis, accompanied by the previous absence of diagnosis of this type as a cause of infection and reliance only on the return of the infection to Gram-negative bacilli sensitive to antibiotics, and at the same time this study provided future solutions to confront the spread of this bacterial type, especially in light of the increase in antibiotic resistance, and by relying on products that are bio-safe for the environment and the health of the patient. The Syrian flora is characterized by its great richness and diversity of sources and the ability to develop them, which are alkaloids of the (*Papaver* sp.) with an important medical history.

Keywords: septicemia- *Papaver* sp.- Antibiotic resistance- The alkaloids

المقدمة :

اكتشفت *Pseudomonas stutzeri* لأول مرة بواسطة بوري وستوتزر في 1895 (1)، هي بكتيريا هوائية، مسوطة، سالبة الغرام .غير مخمرة للاكتوز إيجابية الأوكسيداز(2)، تتواجد عادة في التربة والماء، تم عزلها لأول مرة من السائل الدماغي الشوكي البشري (3)، وبدأ من ذلك الحين تشخيصها في العديد من البيئات الطبية المختلفة بسبب خصائصها المختلفة، وقدراتها الأيضية العالية (4)، وصنفت بعد ذلك كأحد مسببات الأمراض الانتهازية في البيئات السريرية، وهناك العشرات من التقارير الطبية العالمية التي تصف حالات العدوى ذات الأهمية السريرية لـ*P. stutzeri* . لم تسجل الدراسات والاحصائيات العالمية أي حالات وفاة بسبب هذه الجرثومة، وبجميع الحالات السريرية كانت هذه الزائفة قابلة للعلاج الصادي بفترة زمنية كحد أقصى 6 أسابيع منذ تشخيص الإصابة بها، وعلى الرغم من هذا الانخفاض في نسب الوفاة إلا أن هناك العشرات من التقارير الطبية العالمية التي تصف عدوى *P. stutzeri* ذات الأهمية السريرية كمسبب للعدوى الإنتانية مختلفة التموضع. كما سجلت هذه الجرثومة نسب عالية في إحداث عدوى إنتان الدم المكتسب عالمياً حيث أبدت قدرة كبيرة على استعمار سطوح الأجهزة الطبية (جهاز غسل الكلى – أجهزة التنفس – أجهزة التنظير المختلفة) (1)، ومن خطورة وأهمية ما سبق توجهت هذه الدراسة إلى وضع دراسة أولى في سورية حول بدأ ظهور هذا النوع من الزوائف كمسبب للعدوى الإنتانية التي تهدد حياة الكثير من الأطفال والبالغين، وبدأت هذه الدراسة بعد أن تم تشخيص عدة حالات من إنتان الدم لدى الأطفال في مستشفى الأطفال الجامعي خلال العام 2023 حيث جاء في تقرير مخبر المشفى أن العدوى تعود لعصيات سالبة الغرام ذو مستعمرات زيتية القوام خشنة جداً وكثيفة النمو وتبدي أنماط مختلفة من الانحلالية ولم يسبق تشخيصها في المشفى كمسبب لعدوى إنتان الدم المكتسب. انطلقت الدراسة من هذه المعلومات والتوسع بالتشخيص المخبري لهذه الجرثومة وتطبيق مجموعة من الاختبارات الهامة في تشخيص أنواع الزوائف وبالعودة للمراجعات العالمية تم تأكيد العدوى بزائفة *Pseudomonas stutzeri* لدى الأطفال، كما وأبدت هذه الجرثومة مقاومة صادية مرتفعة ومتعددة. من ناحية أخرى توجهت الدراسة إلى تطبيق قلويدات الفصيلة الخشخاشية المستخلصة بطريقة النقع مع الغلي، والتي سجلت نتائج فعالية مضادة هامة وقابلة للتطوير تجاه هذه الجرثومة .

1- الدراسة المرجعية :

استطاع العالم الميكروبيولوجي الحديث من اكتشاف العديد من سلالات *Pseudomonas stutzeri*كمسببات أمراض انتهازية لدى البشر ومع ذلك، لم يكن الأمر كذلك حتى عام 1973، حيث بدأت قدرة *P. stutzeri* على التسبب في العدوى تصبح موضوعاً للنقاش في الأدبيات العلمية . وقد سجلت أول عدوى عالمية ترافقت لدى حالة كسر في قصبة الساق تطلبت تداخل جراحي أدى إلى حدوث حالة إنتانية لدى المريض (5)، منذ تلك العدوى الأولى عالمياً، تمكنت *P. stutzeri* من التسبب في حالات عدوى لدى الأفراد الذين يعانون من مجموعة متنوعة من الأمراض، بما في ذلك: التهاب الشغاف، والتهابات العظام أو العين أو الجلد أو المسالك البولية، والتهاب السحايا، والالتهاب الرئوي، والتهاب المفاصل، والعديد من الأمراض الأخرى.(3)، حتى أن بعض المرضى يعانون من حالات صحية خطيرة مثل الأورام، والتهاب تجاويف المفاصل، والتهاب الرئتين الحاد . (6)، تم عزل سلالات *P. stutzeri* من بين المصابين بالعدوى من الدم والبراز والسائل الشوكي الدماغي والأذنين والعينين والأعضاء (مثل الجهاز التنفسي والبولي) . إلا أنه تسبب في عدد قليل من الوفيات، مما يمنحه تصنيف ضراوة أقل بكثير مقارنة بأنواع الزائفة الزنجارية الأخرى، مثل *Pseudomonas aeruginosa*. تم تسجيل 33 حالة سريرية كانت تعود الإصابة بها *P. stutzeri* من عام 1977 إلى عام 1993 في أحد مستشفيات الولايات المتحدة الأمريكية، وهي عدوى مكتسبة ثانوية ناتجة عن استعمار أو تلوث الأدوات (3)، تطورت التقارير البحثية بشكل ملوحظ حتى العام 2000 إلى 2010 وتم الإبلاغ عن 93 عزلة من أحدى المستشفيات الفلسطينية(4)، على الرغم من هذا الزيادة، كانت الغالبية العظمى من العزلات السريرية لأنواع الزوائف تعود إلى *P. aeruginosa* حيث تم عزل *P. stutzeri* في أغلب الأحيان من البول (31%)، الجروح (28%)، الدم (19%) ووقعت عشر حالات وفاة منها 8 كانت تعزى إلى اعتلال مشترك مع الإصابة الإنتانية بعدوى *P. stutzeri* (7).

تطورت تقارير حول إنتان الدم المكتسب الناجم عن عدوى *Pseudomonas stutzeri* في العديد من الحالات السريرية وسجلت أحدى الدراسات حالات عن مرضى يخضعون لغسيل الكلى، وقد لوحظت الحمى والقشعريرة والغثيان والقيء لديهم وقد تعافى جميع المرضى، على الرغم من أن اثنين فقط تلقوا علاجاً بالصادات الحيوية المحددة، رصدت مصادر العدوى بشكل مستمر على مدى تسعة أشهر مع تكرار ظهور حالات العدوى لدى مرضى الكلى، تم بعد ذلك عزلت

Pseudomonas stutzeri وكان المصدر النهائي هو الماء منزوع الأيونات الذي يتم دمجه مع السائل المركز في جهاز غسل الكلى.(8)

دعت الدراسات العالمية إلى التوجه بالالتزام السريع بتطبيق خطوات التعقيم من غسل اليدين الدوري للعاملين وتطبيق برامج التعقيم الفعالة على الأجهزة الطبية، والعمل على تطويرها بشكل دوري . انطلقت الدراسات العالمية لوضح مجموعة من الارشادات الطبية التي تحد من انتشار *Pseudomonas stutzeri* كونها مازالت حتى الآن تستجيب للعلاج الصادي عند أغلب المرضى، ولم تسجل ألا حالات وفاة قليلة مقارنة مع أنواع الزوائف الأخرى (8)، وكان لابد من الانطلاق محلياً في سورية نحو تشخيص وجود *Pseudomonas stutzeri* في البيئات المشفوية وكمسبب للإنتان الدموي، وخاصة بعد صدور تقارير من المراكز الصحية عن تكرار ظهور مستعمرات ذات صفات خاصة وغير سابقة في البيئات المشفوية السورية تعود لعصيات سالبة الغرام عُزلت من عينات إنتان دم لدى الأطفال في دمشق، لذلك توجهت هذه الدارسة وبالتقاطع مع الدراسات العالمية إلى تأكيد عودة هذه العصيات لزائفة *Pseudomonas stutzeri* وتحديد مدة استجابتها الصادية، والمقارنة الفورية لأحد المقترحات العلاجية المستقبلية لمواجهة هذه الجرثومة في حال انتشار السلالات ذات المقاومة التامة المتعددة، وكانت فئة القلويدات من المنتجات النباتية القوية وسابقة الفعالية الطبية الكبيرة في مختلف المجالات هي المقترح الأقوى هي هذه الدراسة، ولاسيما أن الفلورا السورية تتميز بغناها بنباتات هذه الفصيلة وتنوعها، وتم اختيار جنس الخشخاش *Papaver* sp. ذو التاريخ

الطبي الطويل وبعد توجه الدراسات العالمية حول الأمكانيات المضادة الجرثومية لقلويدات هذا النبات .

<u>لمحة عن قلويدات نبات الخشخاش:</u>

تتفق جميع الدراسات العالمية القديمة والحديثة منها على أهمية المحتوى القلويدي الكبير والمتنوع للنباتات الفصيلة الخشخاشية، وبالرغم من كثرة هذه الدراسات ولكنها مازالت تعد ضئيلة مقارنة مع الانتشار العالمي الكبير لهذه الفصيلة. حيث احتل النوع الخشخاش المنوم *P. somniferum* المرتبة

الأولى في معظم الدراسات العالمية لفترة زمنية طويلة دون إلقاء الضوء على أنواع نبات الخشخاش الأخرى، خاصة أن هذه الدراسات أكدت على القلوانيات الأفونية ذات الأثر المخدر فقط لأهميتها العالمية من جهة اقتصادية، ومن جهة آخرى تتعلق بالآثار الخطيرة للتجارة والزراعة غير القانونية لها على المجتمع الدولي .

استطاعت على الرغم من ذلك الأبحاث الميكروبيولوجية في الآونة الأخيرة أن تثبت جوانب مفيدة أخرى للخشخاش المنوم بعيداً عن المحتوى المخدر له، حيث أثبتت أثره المضاد للجراثيم كجانب تطبيقي طبي جديد لهذا النبات ذو التاريخ الطبي الطويل، ذلك حسب دراسة أجريت في إيران على المستخلص القلويدي لكامل الأجزاء الهوائية، حيث أبدت فعالية كبيرة تجاه مجموعة كبيرة من الجراثيم إيجابية وسلبية الغرام، وقد عزت الدراسة الاختلاف في التأثير بين القلويدات المختلفة المستخلصة إلى اختلاف بينة جدار الخلية الجرثومية إيجابية وسلبية الغرام. (9). يأتي بعده في المرتبة الثانية، الخشخاش المنثور *P.rhoeas* من حيث الأنواع المنتشرة عالمياً والمعتمد عليها في كثير من الجوانب الطبية والصناعية والتجارية، خاصة أن الكم البتلي الخاص بهذا النوع يمتلك تاريخ طبي و شعبي قديم جداً ومازال متبع حتى اليوم في بعض المجتمعات دون معرفة الآليات الحقيقة لمنقوع البتلات في العلاج؛ منها علاج السل، التهاب الرئة ، الخناق، التهاب المجاري البولية، ففي بعض المناطق السورية مازال يستعمل لمعالجة النزلات الصدرية والسعال في الشتاء ويعرف عامياً في هذه المناطق بشقائق النعمان دون معرفة تصنيفية حقيقية لكونه ينتمتي إلى الفصيلة الخشخاشية و دون الفصل بينه وبين أنواع الخشخاش الأخرى (10)، ولهذا قامت الدراسات العالمية بدراسات تصنيفية حديثة على المستوى الوراثي والكيميائي بهدف بتحديد محتوى هذا النوع من القلوانيات غير المخدرة، واستطاعت اثبات القدرة المضادة لها للمجموعة من الجراثيم مما يفسر اعتمادها شعبياً لمعالجة النزلات الصدرية والإنتانات المختلفة (إنتان المجاري البولية) ومرض السل (10). وانطلاقاً من أهمية ماسبق توجهت هذه الدراسة الأولى محلياً إلى تجريب المستخلص القلويدي لأهم النباتات الطبية عالمياً نبات الخشخاش *papaver* sp. المنتشر برياً

قي الفلورا السورية والمعروف عالمياً باسم شقائق النعمان تجاه أحد الجراثيم التي بدأت تسجل نسب ظهور عالية في أغلب دول العالم في البيئات الصحية المختلفة، وخاصة أن الدراسات المحلية التي تتناول تحديد دقيق لها أو لخصائصها الحيوية لاتزال قليلة أو شبه غائبة، لذلك كان لابد من تسليط الضوء على انتشار الزائفة *Pseudomonas stutzeri* ومساهمتها في إحداث العدوى المكتسبة من المستشفيات .

2- **المواد والطرائق :**

2-1- القسم النباتي :

2-1-1- جمع العينات النباتية :

تم جمع العينات النياتية العائدة لجنس الخشخاش البري .*Papaver* sp من مناطق(دير عطية- دمشق- السويداء) في الفترة مابين 2019-2023 من شهر شباط وحتى شهر نيسان. سُميت أنواع الخشخاش البري حسب المراجع والفلورات العالمية (11-12-13)، بالاعتماد على مجموعة من الصفات المورفولوجية الهامة في تصنيف أنواع نبات الخشخاش (شكل الفارع-الأوراق-الزهرة-الثمار والتي تعد المعيار التصنيفي الأهم لتميز أنواع نبات الخشخاش)، جُففت العينات في الظلام لمدة 5 أسابيع، ومن ثم تم طحن الساق المورق منفصلاً عن الثمار .

2-1-2- استخلاص القلويدات بطريقة النقع مع الغلي:

تم وزن 2 غرام من مسحوق العينة المجفف (الساق المورق- الثمار) مباشرة وتمت معالجتها ب 6 مل من حمض كلور المار و30 مل من الماء، ومن ثم الغليان لمدة 10- 15 دقائق، وبعد ذلك يتم ترشيح المستخلص بواسطة أوراق ترشيح بقطر 0.3 ملم، (تكرر عملية الترشيح) .

2-1-3- الكشف الكيفي بتفاعلات الترسيب عن القلويدات في الخلاصات :

تم نقل 2 مل من الخلاصة المرشحة إلى أنبوب اختبار(عدد 4 أنابيب) ومن ثم يضاف قطرتين من كواشف القلويدات النوعية (دراجندروف – هاجر – واغنر – ماير)، وتترك لمدة 15 دقيقة ومن ثم تسجل النتائج من حيث تشكل عكر في الأنابيب، تُركت الأنبيب مدة 24 ساعة لتأكد أيضاً من تشكل راسب، وعندها سجلت إيجابية تفاعلات الترسيب في الكشف عن القلويدات.

2-2- القسم الجرثومي :

2-2-1- جمع العينات الجرثومية :

جُمعت العينات من مستشفى الأطفال الجامعي في دمشق خلال الفترة الزمنية 29\5\2023 وحتى تاريخ 8\1\2024. وبالتنسيق مع مخبر التشخيص الجرثومي في المستشفى، وتضمنت عينات دم لدى أطفال تظاهرت عليهم أعراض إنتان دموي مكتسب والمزروعة فوراً في وسط سائل مغذي. وتم تسجيل اسم المريض والقسم وتاريخ أخذ العينة ومصدر العينة .

3-2-2- عزل وتشخيص الجراثيم من العينات :

تم زرع العينات بالوسط السائل المحضر بأنابيب معقمة مغلقة لمدة 24 ساعة، وملاحظة تشكل العكر ومن ثم النقل على وسط Blood agar (مغذي عام غني) (Tmmedia, India)، ومن ثم الاعتماد على مجموعة من الأوساط الاصطفائية والانتقائية(EMB,MaConky,king B,)(Tmmedia, India) مترافقة مع تلوين غرام للعينات المعزولة ولتأكيد جنس

Pseudomonas stutzeri تم اعتماد مجموعة من الاختبارات الحيوية؛ Indole, Oxidase test, Catalase test Urease Lactose fermentation, Glucose fermentation, Manitloe fermentation,Nacl

4-2- 2- احتبار الفعالية المضادة الجرثومية للخلاصات القلويدية:

تم تنشيط الزائفة على وسط Blood agar(Tmmedia, India) لمدة 24 ساعة عند الدرجة 37 درجة مئوية. وفي اليوم التالي يُحضر المعلق الجرثومي بأخذ 1-5 مستعمرة وتضبط كثافة المعلق الجرثومي عند0.5 مكفرلاند McFarland، ثم يُفرش المعلق الجرثومي على أطباق من وسط موللر هنتون (Tmmedia, India) بعد 15 دقيقة من تحضيره، حيث تغمس ماسحة قطنية عقيمة في المعلق الجرثومي وتمرر الماسحة القطنية على سطح الوسط الصلب في كافة الاتجاهات من الأعلى والأسفل، حيث يدار الطبق بزاوية 60 درجة. يُترك الطبق ليتم تشرب المعلق بشكل جيد، ثم أُخذت الأداة الخاصة بحفر البئر وعقمت على اللهب، وضع مقدار 20µl من خلاصات نبات الخشخاش الستة انطلاقاً من تركيز 100µg\ml ومددت إلى التراكيز التالة : (100%،50%)، وحُضنت بعد ذلك الأطباق عند الدرجة 37 درجة مئوية ولمدة 24 ساعة تقرأ بقياس قطر الهالة المتشكلة حول الآبار.

- اختبار التحسس :

تم إجراء اختبار التحسس الجرثومي تجاه مجموعة من الصادات الحيوية باتباع طريقة أقراص كربي باور (Bioanalyse) (Cefotaxime, Ampicilln, Amoxicillin, Gentamicin,

Meropenem, Imipenem, Amoxicillin \Clavulanic, Amikacin, chlorampnenicol, Doxyline, Penicillin G, Vancomycin, Cephalexin)، حيث تُحضر أطباق آغار موللر هنتون(Tmmedia, India) ، ويُحضر المعلق الجرثومي للزائفة، ثم تم ضبط كثافة المعلق الجرثومي عند0.5 مكفرلاند McFarland، ثم يُفرش المعلق الجرثومي بعد 15 دقيقة من تحضيره على وسط موللر هنتون في كافة الاتجاهات، ويُترك الطبق ليتم تشرب المعلق بشكل جيد، ومن ثم توزع الأقراص المشربة بالصادات الحيوية، وتُحضن لمدة 24 ساعة، وتقرأ النتائج بعد مرور 24 ساعة بقياس قطر هالة التثبيط.

2-2-5 القسم الإحصائي :

تم العمل على برنامج Excel Worksheet لرسم المخططات التوضيحية لتوزع العينات ونتائج الزرع، واعتماد برنامج spss21 لحساب النسبة المئوية لجنس الزوائف في العينات السريرية، وطُبق اختبارا التباني One-way ANOVA لمعرفة حقيقة الفروق في الفعالية المضادة لخلاصات أنواع الخشخاش القلويدية تجاه الزائفة *Pseudomonas stutzeri* بعد حساب متوسطات هالات التثبيط، وكما تمت معالجية هالات تثبيط الصادات الحيوية باستعمال برنامج spss21.

3- النتائج:

3-1- نتائج القسم النباتي :

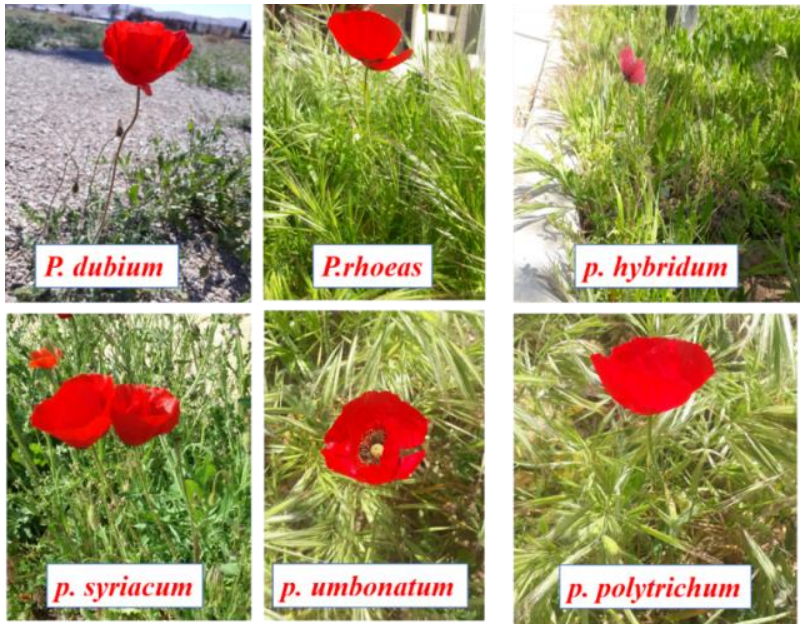
3-1-1- تحديد أنواع نبات الخشخاش البري :

تم اختيار الفصيلة الخشخاشية وبشكل خاص نبات الخشخاش *Papaver sp.* حيث تم اختيار ست أنواع برية غير مدخلة أو مزروعة في الفلورا والسورية (*Papaver hybridum, Papaver rhoeas, Papaver dubium Papaver polytrichum, Papaver umbonatum,Papaver syriacum*) وتمت التمسية بناء على التوصيف المورفولوجية لأجزاء النبات كافة ولاسيما الثمرة والتي تعد الجزء الطبي الهام في العلاج واستخلاص المواد المخدرة في نبات الخشخاش، وتم اعتماد الأنواع الست حسب الانتشار الأكبر الجدول رقم(1)، وتم أعطاؤها الرموز التالية لسهولة الدراسة (*Ph1, Pr2,Pd3, Pp4, Pu5,Ps6*) الجدول رقم(1) الشكل رقم(1) .

الجدول رقم1: توزع الأفراد المدروسة ورمزها ومناطق الجمع مع طريقة الاستخلاص للأجزاء النباتية .

المنطقة		الموقع الدقيق	عدد العينات	أهم الصفات المورفولوجية
Ph1	دمشق	برامكة \ امتداد كلية الحقوق حتى رئاسة جامعة دمشق	50	الفارع منتصب، الزهرة رباعية البتلات متقابلة لها بقعة بنفسجية، الثمرة مويرة بيضوية
	دير عطية	امتداد مدخل دير عيطة – اتوستراد دمشق –حمص	50	
Pr2	دمشق	برامكة \ امتداد كلية الحقوق حتى رئاسة جامعة دمشق	50	الفارع منتصب، الزهرة رباعية البتلات متداخلة لها بقعة سوداء، الثمرة جرداء كمثرية
		غوطة شرقية \ جسرين	50	
		محضر كلية الزراعة	50	
	دير عطية	امتداد مدخل دير عيطة – اتوستراد دمشق –حمص	50	
Pd3	دمشق	برامكة \ امتداد كلية الحقوق حتى رئاسة جامعة دمشق	50	الفارع منتصب، الزهرة رباعية البتلات متداخلة ليس لها بقعة سوداء، الثمرة جرداء متطاولة ضيقة، الغطاء أصغر من قطر الثمرة
		محضر كلية الزراعة	50	
	دير عطية	امتداد مدخل دير عيطة – اتوستراد دمشق –حمص	50	
Pp4	دمشق	برامكة \ امتداد كلية الحقوق حتى رئاسة جامعة دمشق	50	الفارع منتصب، الزهرة رباعية البتلات متداخلة
		محضر كلية الزراعة	50	

	دير عطية	امتداد مدخل دير عيطة – اتوستراد دمشق –حمص	50	ليس لها بقعة سوداء، الثمرة جرداء، أسطوانية إلى كمثرية
Pu5	دمشق	برامكة \ امتداد كلية الحقوق حتى رئاسة جامعة دمشق	50	الفارع منتصب، الزهرة رباعية البتلات متداخلة لها بقعة سوداء، الثمرة جرداء، أسطوانية، بروز واضح في منتصف الغطاء
	دير عطية	امتداد مدخل دير عيطة – اتوستراد دمشق –حمص	50	
Ps6	سويداء	صلخد \ قرية المشقوق	50	الفارع منتصب، قصير، الزهرة رباعية البتلات متداخلة ليس لها بقعة سوداء (متغيرة)، الثمرة جرداء، أسطوانية ضيقة



الشكل رقم2 : الشكل المورفولوجي لأنواع نبات الخشخاش المجموعة من مناطق مختلفة من الفلورا السورية.

2-1-3- الكشف عن المركبات القلويدية للخلاصات المائية بتفاعلات الترسيب :

أشارت النتائج بصورة عامة، إلى احتواء المجموع الخضري لأنواع نبات الخشخاش (الساق المورق- البتلات – الثمار) على القلويدات، ولكن بنسب متفاوتة بين الأجزاء الخضرية من جهة وبين الأنواع الستة المدروسة من ناحية ثانية، وعموماً كان المحتوى الأعلى من القلوانيات يتمثل في الثمار للأنواع جميعها، ومن ثم الأزهار وأخيراً كان الساق هو الأقل من حيث المحتوى القلويدي. تميز النوع *Papaver dubium* بالمحتوى الأعلى من القلوانيات ومن ثم الخشخاش السوري *Papaver syriacum* وبدرجة شبه متساوية الأنواع *(pr2-pp4-pu5)* وأخيراً كان نوع الخشخاش الهجين *Papaver hybrdium* هو الأقل من حيث المحتوى القلواني من بين الأنواع المدرسة وبغياب شبه تام للمحتوى القلويدي في خلاصة الساق .

2-3- نتائج القسم الجرثومي:

3-2-1- تواتر ظهور النوع *Pseudomonas stutzeri* :

انطلقت هذه الدراسة من مراقبة عينات إنتان الدم في مستفشى الأطفال الجامعي في دمشق خلال الفترة الزمنية 2023\5\29 – 2024\1\10 وتم رصد 10 حالات خلال هذه الفترة، تعود الإصابة بها للزائفة *Pseudomonas stutzeri*، الجدول رقم2 وتوزعت أغلب الحالات السريرية في شعبة العناية والحواضن للوليد والخديج في مشفى الأطفال الجامعي، ومتابعة القصة الرسريرية للأطفال. تم العلاج من الحالة الإنتانية بالتغطية الصادية المعدلة بعد التشخيص المخبري للعينات السريرية، وترافقت الإصابة بظهور أعراض سريرية الحمى والقشعريرة والغثيان والقيء، ما يتناسب مع أعراض حدوث العدوى الإنتانية عادة لدى مرضى المستشفيات .

الجدول رقم2: المعلومات حول العينات السريرية الدموية التي تم الحصول عليهامن المشفى مع نتائج التشخيص الأولي للعينة مخبرياً .

رقم العينة	التاريخ	القسم	العينة السريرية	تشخيص أولي \ Blood agar	التوصيف\ Blood agar
1	2023\7\6	عناية	زراعة دم	عصيات سالبة الغرام \ γ	مستعمرات كبيرة الحجم – زيتية اللون – خشنة – غشائية – حوافها ليست منتظمة تماماً- لها بروز في المنتصف – كثيفة النمو- لا تبدي إفراز أصبغة – لا تبدي رائحة مميزة
2	2023\7\8	عناية	زراعة دم	عصيات سالبة الغرام \ β	مستعمرات كبيرة الحجم – زيتية اللون – خشنة – غشائية – حوافها ليست منتظمة تماماً- لها بروز في المنتصف – كثيفة النمو- لا تبدي إفراز أصبغة – لا تبدي رائحة مميزة
3	2023\7\13	جراحة	زراعة دم	عصيات سالبة الغرام \ γ	مستعمرات كبيرة الحجم – زيتية اللون – خشنة – غشائية – حوافها ليست منتظمة تماماً- لها بروز في المنتصف – كثيفة النمو- لا تبدي إفراز أصبغة – لا تبدي رائحة مميزة

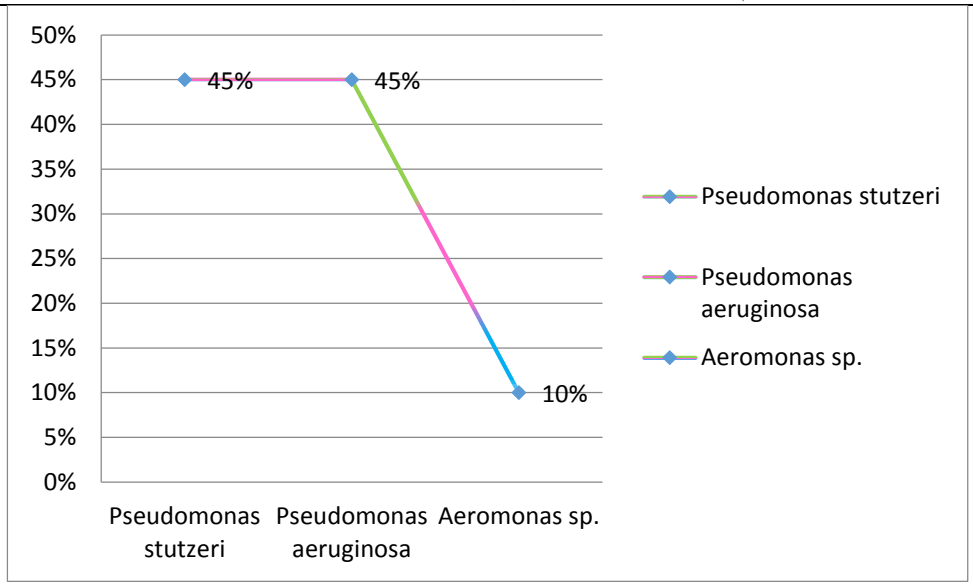
4	2023\7\17	حواضن	زراعة دم	عصيات سالبة الغرام \ γ	مستعمرات كبيرة الحجم – زيتية اللون – خشنة – غشائية – حوافها ليست منتظمة تماماً- لها بروز في المنتصف – كثيفة النمو- لا تبدي إفراز أصبغة – لا تبدي رائحة مميزة
5	2023\7\22	حواضن	زراعة دم	عصيات سالبة الغرام \ β	مستعمرات كبيرة الحجم – زيتية اللون – خشنة – غشائية – حوافها ليست منتظمة تماماً- لها بروز في المنتصف – كثيفة النمو- لا تبدي إفراز أصبغة – لا تبدي رائحة مميزة
6	2023\7\22	خاص	زراعة دم	عصيات سالبة الغرام \ β	مستعمرات كبيرة الحجم – زيتية اللون – خشنة – غشائية – حوافها ليست منتظمة تماماً- لها بروز في المنتصف – كثيفة النمو- لا تبدي إفراز أصبغة – لا تبدي رائحة مميزة
7	2023\7\26	عناية	زراعة دم	عصيات سالبة الغرام \ γ	مستعمرات كبيرة الحجم – زيتية اللون – خشنة – غشائية – حوافها ليست منتظمة تماماً- لها بروز في المنتصف – كثيفة النمو- لا تبدي إفراز أصبغة – لا تبدي رائحة مميزة
8	2023\7\30	عناية	زراعة دم	عصيات سالبة الغرام \ γ	مستعمرات كبيرة الحجم – زيتية اللون – خشنة – غشائية – حوافها ليست منتظمة تماماً- لها بروز في المنتصف – كثيفة النمو- لا تبدي إفراز أصبغة – لا تبدي رائحة مميزة
9	2023\8\8	حواضن	زراعة دم	عصيات سالبة الغرام \ β	مستعمرات كبيرة الحجم – زيتية اللون – خشنة –

					غشائية – حوافها ليست منتظمة تماماً- لها بروز في المنتصف – كثيفة النمو- لا تبدي إفراز أصبغة – لا تبدي رائحة مميزة
10	2023\8\13	حواضن	زراعة دم	عصيات سالبة الغرام \ β	مستعمرات كبيرة الحجم – زيتية اللون – خشنة – غشائية – حوافها ليست منتظمة تماماً- لها بروز في المنتصف – كثيفة النمو- لا تبدي إفراز أصبغة – لا تبدي رائحة مميزة

أوضحت النتائج وكما هو ظاهر في الجدول رقم (3) والمخطط رقم (1) أن الزائفة الزنجارية مازالت تحتل المرتبة الأولى من حيث الانتشار، ويأتي النوع *Pseudomonas stutzeri* في المرتبة الثانية وسُجلت عينة واحدة ناتجة العدوى فيها عن جنس *Aeromonas* sp.

الجدول رقم 3 : النسب المئوية لظهور أنواع الزائف في العينات إنتان الدم المكتسب لدى الأطفال .

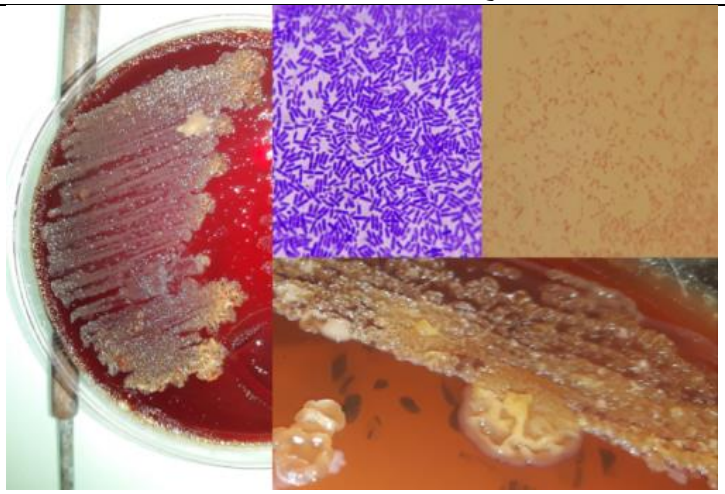
		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	Pseudomonas stutzeri	9	45.0	45.0	45.0
	Pseudomonas aeruginosa	9	45.0	45.0	90.0
	Aeromonas sp.	2	10.0	10.0	100.0
	Total	20	100.0	100.0	



المخطط رقم1 : النسب المئوية لمساهمة أنواع الزوائف المختلفة في عدوى إنتان الدم المكتسب لدى الأطفال خلال فترة الدراسة .

2-2-3- التشخيص المخبري لنوع *Pseudomonas stutzeri*:

بينت نتائج التشخيص المخبري الأولي، أن نوع *Pseudomonas stutzeri* المعزول من مستشفى الأطفال الجامعي في دمشق، تميز بمجموعة من الصفات المورفولوجية الشكل رقم(2)، والتي سُميت بناء على المقارنة مع مجموعة من المراجعات النظرية حول هذه الجرثومة، وبتطبيق مجموعة من الاختبارات أوضحت أنها عصيات سالبة الغرام عشوائية الاصطفاف غير متبوغة،غير مخمرة لسكر اللاكتوز على وسطي MaConky, EMB، وأما على وسط King B فلا تبدي إفراز أي من الأصبغة المميزة التي قد تفرزها الزوائف الأخرى (*Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas* sp.).



الشكل رقم 2: الشكل المورفولجي لمستعمرات *Pseudomonas stutzeri* على وسط *Choco-agar – Blood agar* ونتائج تلوين غرام.

أبدت *Pseudomonas stutzeri* إيجابية للأوكسيداز والكاتلاز وسالبة الأندول واليورياز وإيجابية السيترات، وأما على وسط كليغلر فلم تخمر السكاكر ولم تطلق الغاز. لم تستطيع النمو في درجات الملوحة العالية ولا بدرجات الحرارة العالية أعلى من 40 درجة مئوية. تمت المقارنة هنا مع عزلتين من *Pseudomonas areuginosa* و *Aeromonas* sp. والتي تم عزلها من ذات المشفى لتميز *Pseudomonas stutzeri* عن باقي أنواع الزوائف المنتشرة في ذات البيئة، ومن المميز ان *Aeromonas sp.* تتميز بإفراز أصبغة شديدة وكثيفة خضراء اللون داكنة وذو رائحة قوية جداً والمستعمرات شديد المخاطية و*Pseudomonas areuginosa* تفرز أصبغة زنجارية ومستعمرات منخفضة الكثافة وذو رائحة مميزة، في حين أن *Pseudomonas stutzeri* تميزت بعدم إفرازها للأصبغة وعدم وجود رائحة مميزة للمستعمرات بل تميزت بقوام المستعمرات الغشائية الجافة جداً ومن الصفات المميزة أن هذا النوع من الزوائف يبدي نمطين من انحلال الدم β\γ الشكل رقم(2) الجدول رقم (4).

الجدول رقم 4: الاختبارات الهامة والتفريقية بين أنواع الزوائف *Pseudomonas areuginosa* و *Aeromonas* sp. و *Pseudomonas stutzeri*

	Pseudomonas areuginosa	*Pseudomonas stutzeri*	*Aeromonas sp.*
Oxidase test	+	+	+
Catalase test	+	+	+
Indole	-	-	+
Urease	-	-	+
Lactose fermentation	-	-	-
Glucose fermentation	-	-	+
Manitloe fermentation	-	-	+
>44 ° c	-	+	-
Nacl	-	-	-
Blood agar	α	β\γ	γ
EMB	+\-	+\-	+\-
MaconKy	+\-	+\-	+\-
King B	+\+	+\-	+\+

3-3-3- نتائج اختبار التحسس :

تمتلك *Pseudomonas areuginosa* مقاومة شبه تامة ومتعددة تجاه مجموعة كبيرة من الصادات الحيوية وتليها الزائفة *Aeromonas sp.*، مقارنة مع *Pseudomonas stutzeri* التي أبدت تحسس تجاه أغلب الصادات الحيوية ولكن المفلت للانتباه بأن عينات *Pseudomonas stutzeri* اختلفت فيها نتائج اختبار التحسس حسب نمط انحلال الدم كانت السلالة الحالة للدم هي الأكثر تحسساً تجاه أغلب الصادات الحيوية، في حين أن السلالالة غير الحالة أبدت مقاومة تامة تجاه أغلب الصادات الحيوية في هذه الدراسة، حيث يوضح الجدول رقم (5) والمخطط رقم (2) أن جميع أنواع الزوائف المعزولة من العينات أبدت تحسس تجاه الصاد الحيوي Ampicilln, Gentamicin, Imipenem, Amikacin, chlorampnenicol .

الجدول رقم5 : اختبار التحسس تجاه الصادات الحيوية لل*Pseudomonas stutzeri* مقارنة مع *Pseudomonas areuginosa* و *Aeromonas sp* (AV:المتوسط، st: الانحراف المعياري)

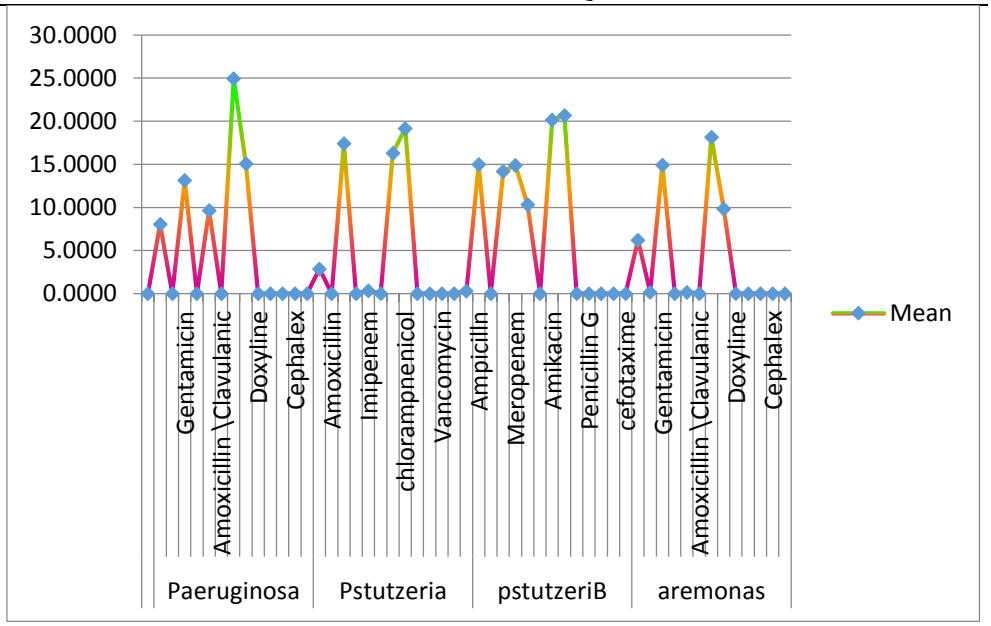
		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
P.aeruginosa	Ampicillin	3	8.0667	.11547	.06667	7.7798	8.3535	8.00	8.20
	Amoxicillin	3	0.0000	0.00000	0.00000	0.0000	0.0000	0.00	0.00
	Gentamicin	3	13.1333	.23094	.13333	12.5596	13.7070	13.00	13.40
	Meropenem	3	0.0000	0.00000	0.00000	0.0000	0.0000	0.00	0.00
	Imipenem	3	9.6667	.57735	.33333	8.2324	11.1009	9.00	10.00
	Amoxicillin \Clavulanic	3	0.0000	0.00000	0.00000	0.0000	0.0000	0.00	0.00
	Amikacin	3	24.9333	.11547	.06667	24.6465	25.2202	24.80	25.00
	chloramphenicol	3	15.0667	.11547	.06667	14.7798	15.3535	15.00	15.20
	Doxyline	3	0.0000	0.00000	0.00000	0.0000	0.0000	0.00	0.00
	PenicillinG	3	0.0000	0.00000	0.00000	0.0000	0.0000	0.00	0.00
	Vancomycin	3	0.0000	0.00000	0.00000	0.0000	0.0000	0.00	0.00

	Cephalex	3	0.0000	0.00000	0.00000	0.0000	0.0000	0.00	0.00
	Cefotaxime	3	0.0000	0.00000	0.00000	0.0000	0.0000	0.00	0.00
	Total	39	5.4513	7.91557	1.26751	2.8854	8.0172	0.00	25.00
P.stutzeria	Ampicilln	3	2.8667	4.96521	2.86667	-9.4676	15.2009	0.00	8.60
	Amoxicillin	3	0.0000	0.00000	0.00000	0.0000	0.0000	0.00	0.00
	Gentamicin	3	17.4000	.34641	.20000	16.5395	18.2605	17.20	17.80
	Meropenem	3	0.0000	0.00000	0.00000	0.0000	0.0000	0.00	0.00
	Imipenem	3	.3333	.57735	.33333	-1.1009	1.7676	0.00	1.00
	Amoxicillin \Clavulanic	3	0.0000	0.00000	0.00000	0.0000	0.0000	0.00	0.00
	Amikacin	3	16.3000	.51962	.30000	15.0092	17.5908	16.00	16.90
	Chloramphenicol	3	19.1667	.28868	.16667	18.4496	19.8838	19.00	19.50
	Doxyline	3	0.0000	0.00000	0.00000	0.0000	0.0000	0.00	0.00
	PenicillinG	3	0.0000	0.00000	0.00000	0.0000	0.0000	0.00	0.00
	Vancomycin	3	0.0000	0.00000	0.00000	0.0000	0.0000	0.00	0.00
	Cephalex	3	0.0000	0.00000	0.00000	0.0000	0.0000	0.00	0.00
	Cefotaxime	3	.3000	.51962	.30000	-.9908	1.5908	0.00	.90

	Total	39	4.3359	7.52356	1.20473	1.8970	6.7748	0.00	19.50
pstutzeriB	Ampicilln	3	15.0000	0.00000	0.00000	15.0000	15.0000	15.00	15.00
	Amoxicillin	3	0.0000	0.00000	0.00000	0.0000	0.0000	0.00	0.00
	Gentamicin	3	14.1667	.28868	.16667	13.4496	14.8838	14.00	14.50
	Meropenem	3	14.9000	.17321	.10000	14.4697	15.3303	14.70	15.00
	Imipenem	3	10.3000	.51962	.30000	9.0092	11.5908	10.00	10.90
	Amoxicillin \Clavulanic	3	0.0000	0.00000	0.00000	0.0000	0.0000	0.00	0.00
	Amikacin	3	20.1667	.28868	.16667	19.4496	20.8838	20.00	20.50
	chloramphenicol	3	20.6667	1.15470	.66667	17.7982	23.5351	20.00	22.00
	Doxyline	3	0.0000	0.00000	0.00000	0.0000	0.0000	0.00	0.00
	PenicillinG	3	0.0000	0.00000	0.00000	0.0000	0.0000	0.00	0.00
	Vancomycin	3	0.0000	0.00000	0.00000	0.0000	0.0000	0.00	0.00
	Cephalex	3	0.0000	0.00000	0.00000	0.0000	0.0000	0.00	0.00
	Cefotaxime	3	0.0000	0.00000	0.00000	0.0000	0.0000	0.00	0.00
	Total	39	7.3231	8.39005	1.34348	4.6033	10.0428	0.00	22.00
Aremonas	Ampicilln	3	6.2000	4.84974	2.80000	-5.8474	18.2474	.60	9.00

	Amoxicillin	3	.1667	.28868	.16667	-.5504	.8838	0.00	.50
	Gentamicin	3	14.9333	.11547	.06667	14.6465	15.2202	14.80	15.00
	Meropenem	3	0.0000	0.00000	0.00000	0.0000	0.0000	0.00	0.00
	Imipenem	3	.1667	.28868	.16667	-.5504	.8838	0.00	.50
	Amoxicillin \Clavulanic	3	0.0000	0.00000	0.00000	0.0000	0.0000	0.00	0.00
	Amikacin	3	18.1667	.28868	.16667	17.4496	18.8838	18.00	18.50
	Chloramphenicol	3	9.8333	.28868	.16667	9.1162	10.5504	9.50	10.00
	Doxyline	3	0.0000	0.00000	0.00000	0.0000	0.0000	0.00	0.00
	Penicillin G	3	0.0000	0.00000	0.00000	0.0000	0.0000	0.00	0.00
	Vancomycin	3	0.0000	0.00000	0.00000	0.0000	0.0000	0.00	0.00
	Cephalex	3	0.0000	0.00000	0.00000	0.0000	0.0000	0.00	0.00
	Cefotaxime	3	0.0000	0.00000	0.00000	0.0000	0.0000	0.00	0.00
	Total	39	3.8051	6.38196	1.02193	1.7363	5.8739	0.00	18.50

(a حالة للدم - b غير حالة للدم)



المخطط رقم 2: مقارنة متوسطات هالات تثبيط الصادات الحيوية تجاه أنواع الزوائف الثلاثة (**aحالة للدم - bغير حالة للدم).**

4-3-3- اختبار فعالية الخلاصات المائية لنبات الخشخاش:

توجهت الدراسة في الشق الأخير منها لاختبار فعالية قلويدات الخشخاش *Papaver* sp. تجاه *Pseudomonas stutzeri* ، انطلاقاً من النتائج السابقة للدراسة والتي أكدت على أن هذا النوع الجرثومي قادرة على استعمار الأسطح في المستشفيات وأسطح الأدوات الطبية، ومن وجود السلالة الغير حالة للدم، والتي أبدت مقاومة شبه تامة ومتعددة لأغلب الصادات الحيوية. تم اختبار فعالية الخلاصات السابقة على السلالة الغير حالة للدم، والتي امتلكت مقاومة شبه تامة ومتعددة تجاه أغلب الصادات الحيوية المطبقة في هذه الدراسة والمستعملة عادة للعلاج، وبينت نتائج هذا القسم من الدراسة الفعالية الكبيرة لخلاصات الأنواع الست من*Papaver* sp. تجاه *Pseudomonas stutzeri* غير الحالة للدم، وكانت خلاصة الثمار القلويدية للنوعين *Papaver dubium* *Papaver syriacum*, هي الأقوى تجاه الزائفة وبتراكيز 50% بأقطار الهالات تراوحيت بين (38.5–40 ملم) وسطياً الجدول رقم(6–7)، في حين أبدت خلاصة الساق فعالية مقبولة (35–20 ملم). سجلت أنواع الخشخاش الأخرى فعالية أقل لكلا الخلاصتين مقارنة مع النوعين *Papaver dubium* ,*Papaver syriacum* الجدول رقم(6–7).

الجدول رقم6 : متوسطات اختبار فعالية خلاصات الساق والثمرة الحمضية على *Pseudomonas stutzeri* غير الحالة للدم مقاسة ب ملم .

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
frui100	ph1	3	9.9333	.11547	.06667	9.6465	10.2202	9.80	10.00
	pr2	3	20.0333	.05774	.03333	19.8899	20.1768	20.00	20.10
	pd3	3	44.6667	.57735	.33333	43.2324	46.1009	44.00	45.00
	pp4	3	15.0000	.00000	.00000	15.0000	15.0000	15.00	15.00
	pu5	3	34.6000	.69282	.40000	32.8789	36.3211	33.80	35.00
	ps6	3	40.0000	.00000	.00000	40.0000	40.0000	40.00	40.00
	Total	18	27.3722	13.43217	3.16599	20.6926	34.0519	9.80	45.00
rui50	ph1	3	4.3333	.28868	.16667	3.6162	5.0504	4.00	4.50
	pr2	3	16.9667	.05774	.03333	16.8232	17.1101	16.90	17.00
	pd3	3	39.8667	.23094	.13333	39.2930	40.4404	39.60	40.00
	pp4	3	9.9333	.11547	.06667	9.6465	10.2202	9.80	10.00
	pu5	3	30.0667	.11547	.06667	29.7798	30.3535	30.00	30.20

	ps6	3	38.5000	.00000	.00000	38.5000	38.5000	38.50	38.50
	Total	18	23.2778	14.12072	3.32829	16.2557	30.2998	4.00	40.00
stem100	ph1	3	25.0667	.11547	.06667	24.7798	25.3535	25.00	25.20
	pr2	3	15.1333	.23094	.13333	14.5596	15.7070	15.00	15.40
	pd3	3	35.2000	.34641	.20000	34.3395	36.0605	35.00	35.60
	pp4	3	10.0000	.00000	.00000	10.0000	10.0000	10.00	10.00
	pu5	3	14.9333	.11547	.06667	14.6465	15.2202	14.80	15.00
	ps6	3	20.0000	.00000	.00000	20.0000	20.0000	20.00	20.00
	Total	18	20.0556	8.46635	1.99554	15.8453	24.2658	10.00	35.60
stem50	ph1	3	19.8333	.28868	.16667	19.1162	20.5504	19.50	20.00
	pr2	3	9.6667	.28868	.16667	8.9496	10.3838	9.50	10.00
	pd3	3	30.1667	.28868	.16667	29.4496	30.8838	30.00	30.50
	pp4	3	5.8333	.28868	.16667	5.1162	6.5504	5.50	6.00
	pu5	3	8.0000	.00000	.00000	8.0000	8.0000	8.00	8.00
	ps6	3	20.1667	.28868	.16667	19.4496	20.8838	20.00	20.50
	Total	18	15.6111	8.80768	2.07599	11.2312	19.9911	5.50	30.50

الجدول رقم7 : مكررات اختبار فعالية خلاصات الساق والثمرة الحمضية على *Pseudomonas stutzeri* **مقاسة ب ملم .**

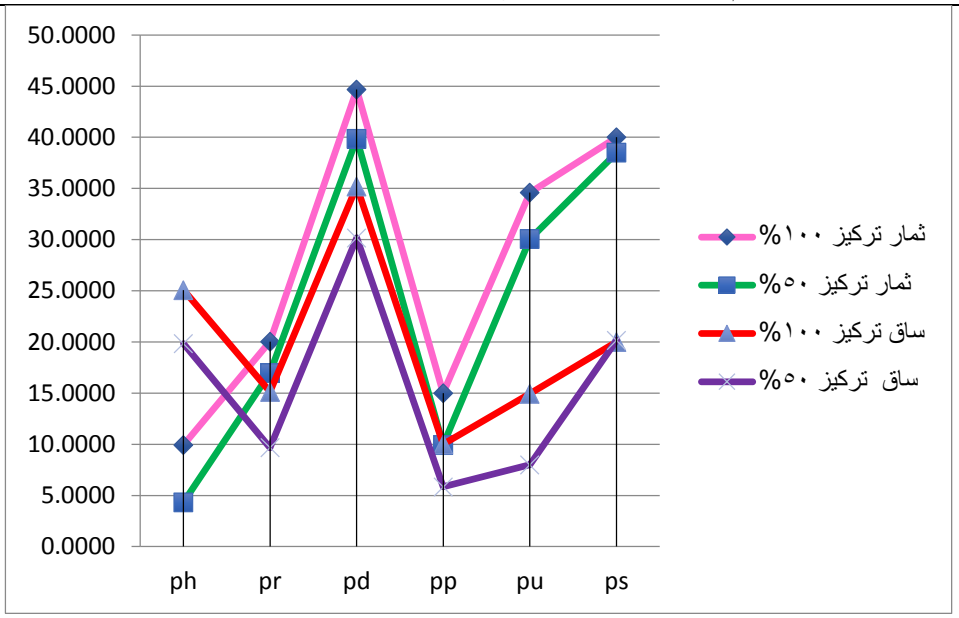
						Species	
Pr2	***Pr2***	***Pr2***	***Ph1***	***Ph1***	***Ph1***	**Fruit**	
20.1	20	20	9.8	10	10	%100	*P.stutzeri*
17	16.9	17	4	4.5	4.5	%50	
Pr2	***Pr2***	***Pr2***	***Ph1***	***Ph1***	***Ph1***	**Species**	
						Stem	
15.4	15	15	25.2	25	25	%100	*P.stutzeri*
9.5	10	9.5	20	19.5	20	%50	
Pp4	***Pp4***	***Pp4***	***Pd3***	***Pd3***	***Pd3***	**Species**	
						Fruit	
15	15	15	44	45	45	%100	*P.stutzeri*
10	9.8	10	40	40	39.6	%50	
Pp4	***Pp4***	***Pp4***	***Pd3***	***Pd3***	***Pd3***	**Species**	
						Stem	
10	10	10	35.6	35	35	%100	*P.stutzeri*
6	5.5	6	30	30	30.5	%50	
Ps6	***Ps6***	***Ps6***	***Pu5***	***Pu5***	***Pu5***	**Species**	
						Fruit	
40	40	40	35	33.8	35	%100	*P.stutzeri*
38.5	38.5	38.5	30	30	30.2	%50	
Ps6	***Ps6***	***Ps6***	***Pu5***	***Pu5***	***Pu5***	**Species**	
						Stem	
20	20	20	14.8	15	15	%100	*P.stutzeri*
20	20	20.5	8	8	8	%50	

أوضحت نتائج اختبار one-way ANOVA الذي طبق لدراسة مدى حقيقة هذا الاختلاف بمتوسطات هالات الثبيط الناتجة عن تطبيق الخلاصات المائية بين الأنواع الستة البرية لنبات الخشخاش، وكما هو موضح بالجدول رقم (8) بأن الاختلافات بين متوسطات هالات تثبيط خلاصات الثمار للأنواع الستة تجاه *Pseudomonas stutzeri* عند التركيز 100% معنوية عند مستوى دلالة 0.05 أي أن هناك فروق حقيقة في الفعالية المضادة لأنواع الخشخاش الستة، وتبقى الفروق معنوية أيضاً بتركيز الخلاصة 50% ، وكذلك هو الأمر بالنسبة لخلاصة الساق بكلا

التركيزين المطبقين . تأكد الدراسة الأحصائية الفعالية المضادة المختلفة لخلاصة الأجزاء النباتية (الساق المورق – الثمار) لأنواع الخشخاش البري الستة المجموعة من الفلورا السورية والتي تعود فعاليتها إلى المحتوى القلواني العالي ويبقى النوعين *P.dubium, P.syriacum* في المرتبة الأولى المخطط رقم(3) من حيث هذه الفعالية وبفروق معنوية حقيقة تجاه *Pseudomonas stutzeri* .

الجدول رقم 8: نتائج اختبار ANOVA لمتوسطات هالات التثبيط لأنواع الخشخاش(*ph1,pr2,pd3,pp4,pu5*).

		Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
frui100	Between Groups	3065.536	5	613.107	4432.100	.000
	Within Groups	1.660	12	.138		
	Total	3067.196	17			
rui50	Between Groups	3389.378	5	677.876	24403.520	.000
	Within Groups	.333	12	.028		
	Total	3389.711	17			
stem100	Between Groups	1218.144	5	243.629	7308.867	.000
	Within Groups	.400	12	.033		
	Total	1218.544	17			
stem50	Between Groups	1317.944	5	263.589	3795.680	.000
	Within Groups	.833	12	.069		
	Total	1318.778	17			



المخطط رقم 3: الفروق بين فعالية الخلاصات المحمضة للثمار والساق بين أنواع بنات تجاه *Pseudomonas stutzeri*.

4- المناقشة :

أكدت هذه الدراسة سهولة تمييز *Pseudomonas stutzeri* بسهولة عن أنواع *Pseudomonas* sp الأخرى. أولاً كونها غير منتجة لأصبغة الفلورسنت الشهيرة لدى أغلب عائلة الزوائف (8)، و أيضاً من خلال قدرة *Pseudomonas stutzeri* على النمو فوق 42 درجة مئوية(10) . وكما أوضحت هذه الدراسة على وجود سلالات مختلفة من *Pseudomonas stutzeri* منتشرة محلياً، وقد يعود هذا التنوع إلى اختلاف مصادر هذه الجرثومة المحتملة والمسببة للانتشار في بيئة المستشفيات، وهذا ما جاءت على ذكره الدراسات العالمية التي عملت على عزل *Pseudomonas stutzeri* من العينات السريرية، حيث أكدت على أن كل سلالة تختلف قليلاً بناءً على مكان عزلها، فإن مجموعة *Pseudomonas stutzeri* تحتوي على العديد من الجينات الطافرة والحمولة على

بلاسميد هذه الجرثومة والقابلة للانتقال والانتشار(14,8)، وهذا يعني أن العديد من سلالات *Pseudomonas stutzeri*يمكن اعتبارها أنواعاً جينية جديدة، وهنا تأتي أهمية أرفاق الدراسات حول سلالات هذه الجرثومة بالدراسات الجينية التي تتضمن توصيف الحمض النووي والتشخيص بناء عليه (14) . وتأتي أهميته الثانية بما بخص آليات المقاومة الصادية وتطورها لدى هذه الجرثومة، في الواقع، لدى *P. stutzeri* العديد من آليات المقاومة لدرجة أنه تم اكتشاف وعزل سلالات *P. stutzeri* المقاومة للصادات الحيوية لكل عائلة من الصادات الحيوية تقريباً باستثناء الفلوروكينولونات (15)، بعض آليات المقاومة التي تمت دراستها بشكل أكبر تشمل: استخدام بيتا لاكتاماز، القادرة على فصل البنسلين، والسيفالوسبورين، والقدرة على تغيير عديد السكاريد الدهني ومكونات بروتين الغشاء الخارجي .من أجل اكتساب مقاومة للفلوروكينولونات (16)، وهذا ماكان واضحاً في هذه الدراسة حيث أبدت السلالات المعزولة من *Pseudomonas stutzeri* مقاومة تامة تجاه اغلب الصادات الحيوية وكانت السلالة الحالة للدمβ هي الأقل مقاومة من السلالة γ وبمقارنة مع *P. aeruginosa* نجد أن هناك تقارب جداً في نتائج اختبار التحسس ولاسيما مع السلالةγ ، كما أشارت هذه الدراسة وعلى الرغم من الانتشار القليل لجنس *Aeromonas. sp* من عائلة الزوائف وكمسبب نادر للعدى الإنتانية ولكن تم عزله من عينات إنتانية أيضاً من ذات أقسام المشفى وأبدى مقاومة قريبة من مقاومة باقي أنواع الزوائف المعزولة، وأكدت نتائج الدراسات العالمية أنه تم العثور على سلالة واحدة فقط من *P. stutzeri* ، لديها طفرات تسمح لها بمقاومة الفلوروكينولونات (17, 18). على الرغم من النتائج المحلية السابقة والعالمية ولكن لاتزال سلالات *P. stutzeri* أقل إثارة للقلق فيما يتعلق بمقاومة للصادات الحيوية المطبقة عادةً لعلاج عدوى إنتان الدم مقارنة بسلالات *Pseudomonas* الأخرى، ولاسيما *P. aeruginosa* ، ويرجع ذلك على الأرجح إلى حقيقة أن السلالات أقل شيوعاً في البيئات السريرية وبالتالي أقل تعرضاً للصادات الحيوية(19, 20)، وانطلاقاً منه جاءت أهمية الشق الأخير في هذه الدراسة ليحقق هدفين أساسين تأكيد الفعالية المضادة جرثومياً لقلويدات نبات الخشخاش العائدة لستت أنواع برية سُمية حسب الفلورات والمراجع العالمية(21,20,19)، ومن جهة أخرى اثبات فعاليته كدواء مستقبلي مقترح وفعال تجاه *Pseudomonas stutzeri* في حال انتشار السلالات تامة ومتعددة المقاومة منها عالمياً، حيث استطاعت هذه الدراسة اثبات الفعالية الكبيرة لخلاصات القلويدية لاسيما خلاصة الثمار المائية وبشكل خاص النوعين *Papaver syriacum, Papaver dubium*. وفي ظل ندرة وقلة

الدراسات المحلية حول تطبيقات قلويدات نبات الخشخاش المضادة مكروبياً تعتبر هذه الدراسة من أولى الدراسات المحلية التي توجهت إلى التأكيد على فعالية المحتوى القلويدي لنبات الخشخاش كمضاد جرثومي، وبالمقارنة مع الدراسات العالمية نجد أن العديد منها أكدت على الفعالية المضادة لخلاصات نبات الخشخاش القلويدية تجاه مجموعة كبيرة من الجراثيم سالبة وإيجابية الغرام متعددة المقاومة(19,20,21) . وأكدت الدراسات كماهو موضح بالجدول رقم (6) على أن هذا المحتوى القلويدي المتنوع لهذين النوعين يمثلان مصادر واعدة للمواد الطبية مستقبلاً .

الجدول رقم 6: اختبار فعالية قلويدات الخشخاش في عدد من الدراسات العالمية وتطبيقاته المضادة للجراثيم.

البلد	التطبيق	النتيجة	المرجع
بريطانيا	مستخلص ثنائي كلور الميثان	الجراثيم سالبة وإيجابية الغرام	(22)
تركيا	اثنا عشر قلويد كان الأساسي هو **Roemerine** بمقدار تبلغ lg / mL 1.22	فعالية كبيرة العنقودية الذهبية ***Staph. Aureus***	(23)
تركيا الأوراق	مستخلص الميثانول	الكليبسلا الرئوية ***K .pneumonia***	(24)
	مستخلص الماء المغلي فعال اتجاه	المكورات العنقودية الذهبية ***Staph.aureus***	
تركيا الثمار الناضجة	كانت خلاصة فعالة بشكل عام اتجاه مجموعة من الجراثيم سالبة وإيجابية الغرام	العنقودية الذهبية***staph.aureus***	(22)

		الزائفة الزنجارية ***Pseudomonas aeruginosa*** ***Klebseilla* sp.** الكليبسلا	
	بشكل خاص مستخلص الكلوروفورم	العنقودية الذهبية ***Staph.aureus***	
لبنان	القلويدات الأكثر شيوعاً **Stylopine Epiberberine, Canadine , Berberine** هو القلويد الرئيس	أبدى فعاليات طبية كبيرة ومتنوعة عند تطبيقه مخبرياً.	(25)

أجريت في باكستان دراسة على الخلاصة المائية لأزهار وأوراق الخشخاش الهجين *P.hybridum*كمضادات جرثومية، وحسب الدراسة لم تبدي هذه الخلاصة أي تأثير مضاد جرثومي، وأوصت بتطبيق خلاصات أخرى مثل الكلوروفورم و الإيثانول (26)، وعلى عكس الدراسة الباكستانية جاءت نتائج هذه الدراسة المحلية التي أُجريت في سوريا على الخلاصة المائية لذات النوع، والذي أبدى فعالية تجاه نوع الزائفة المدروس ولاسميا خلاصة الثمار والساق المورق وبأقطار تثبيط تراوحت بين (25–9 ملم)، أكدت دراسة أخرى في تركيا أن المستخلص القلواني للنوع *p. polytrichum*الحاوي على البربارين berberine ذات فعالية قوية تجاه جراثيم الاشريكية الكولونية *E.coli* ، وأوصت الدراسة بأن تعديل المحتوى البروتيني قد يعطي فعالية أقوى للمستخلصات القلويدية كمنتجات طبية للعلاج(27).

انتهت هذه الدراسة الأولى محلياً إلى تأكيد انتشار *Pseudomonas stutzeri* في بيئة المستشفيات السورية، وكمسبب لعدوى إنتان الدم المكتسب عند الأطفال ولاسيما في شعبة العناية المشددة،

وبالتالي قدرة هذه الجرثومة على استعمار أسطح المعدات والأدوات الطبية الأمر الذي يساعد في زيادة الانتشار، وبالتالي زيادة في المقاومة الصادية التي كما يتضح من هذه الدراسة بأنها متعددة وتامة تجاه مجموعة كبيرة من الصادات الحيوية، وبذات الوقت استطاعت من تسليط الضوء على أمكانية تطبيق المنتجات النباتية في مواجهة انتشار هذه الجرثومة وكعلاج مستقبلي آمناً على الصحة والبيئة وقابل للتطوير الصيدلاني ولاسيما أن الفلورا السورية تتمير بغنى وتنوع كبير في مصادر هذا المنتجات الطبية .

الاستنتاجات :

1- تعد *Pseudomonas stutzeri* مصدراً خطراً للعدوى الإنتانية المكتسبة من البيئات الصحية والقادرة على تشكيل أغشية حيوية تامة المقاومة تجاه الصادات الحيوية المستعملة في التغطية المشفوية أو المواد الكيميائية المستعملة في التعقيم .

2- استطاعت الدراسة تأكيد وجود سلالات مختلفة من *Pseudomonas stutzeri* من حيث أنماط انحلال الدم ومن حيث الاستجابة للعلاج بالصادات الحيوية .

3- أثبتت الدراسة أن لخلاصة الثمار والساق القلويدية لأست أنواع برية من نبات الخشخاش المنتشر في الفلورا السورية فعالية كبيرة تجاه سلالة *Pseudomonas stutzeri* الغير حالة للدم والمقاومة للصادات الحيوية، ولاسيما النوعين *Papaver dubium, Papaver syriacum*،

التوصيات :

1- التوسع في الدراسات الإحصائية المحلية لرصد مصادر انتشار سلالات *Pseudomonas stutzeri* المختلفة متعددة المقاومة الصادية ومدى مساهمتها في إحداث العدوى المكتسبة بكافة أشكالها .

2- اتباع الطرق الجزيئية في تحديد دقيق لنوع *Pseudomonas stutzeri* المسببة للعدوى الإنتانية المكتسبة في المستشفيات السورية .

3- إجراء دراسة تصنيفية موسعة لأنواع نبات الخشخاش المنتشرة في الفلورا السورية والوقوف بالتفصيل على الفوائد الطبية لها ولاسيما الفعالية المضادة الجرثومية.

4- إجراء دراسات تحليلية كيميائية واسعة ومفصلة للمحتوى القلويدي لأنواع نباتات الخشخاش في الفلورا السورية، ولاسيما المركبات ذات الاثر غير المخدر ودراسة التطبيقات الميكروبيولوجية لها.

المراجع:

1. Lehmann KB, Neumann R (1896) - Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speziellen bakteriologischen Diagnostik. Munchen.Lehmann, doi:10.5962/bhl.title.117384.
2. Sijderius R (1946)- Heterotrophe bacterien, die thiosulfaat oxydeeren (Ph.D. thesis). University Amsterdam, pp. 1–146.
3. Park SW, Back JH, Lee SW, Song JH, Shin CH, Kim GE, Kim MJ (June 2013)- Successful antibiotic treatment of Pseudomonas stutzeri-induced peritonitis without peritoneal dialysis catheter removal in continuous ambulatory peritoneal dialysis. Kidney Research and Clinical Practice, **32** (2): 81–3. doi:10.1016/j.krcp.2013.04.004. PMC 4713909. PMID 26877919.
4. Spiers AJ, Buckling A, Rainey PB (October 2000)- The causes of Pseudomonas diversity. Microbiology, 146 (Pt 10) (10): 2345–2350. doi:10.1099/00221287-146-10-2345. PMID 11021911.
5. Gilardi GL, Mankin HJ (December 1973)- Infection due to Pseudomonas stutzeri. New York State Journal of Medicine, **73** (23): 2789–91. PMID 4520361
6. Stanier RY, Palleroni NJ, Doudoroff M (May 1966)- The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. Journal of General Microbiology, **43** (2): 159–271. doi:10.1099/00221287-43-2-159. PMID 5963505.
7. Anzai Y, Kim H, Park JY, Wakabayashi H, Oyaizu H (July 2000)- Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. International Journal of Systematic and Evolutionary

Microbiology, 50 Pt 4 (4): 1563–1589. doi:10.1099/00207713-50-4-1563. PMID 10939664\

8. Lalucat J, Bennasar A, Bosch R, García-Valdés E, Palleroni NJ (June 2006)- Biology of Pseudomonas stutzeri. Microbiology and Molecular Biology Reviews, **70** (2): 510–47. doi:10.1128/MMBR.00047-05. PMC 1489536. PMID 16760312.
9. Peyman S. A, Sonboli. A, Fakhari. Z, Fatemeh. S, Manijeh. D, Bahram, C. (2007)- Narcotic alkaloids of four papaver species from Iran. journal Zeitschrift für Naturforschung C .(2007). 2007 Jan-Feb;62(1-2):16-8. doi: 10.1515/znc-2007-1-203.
10. Oh, H. J. Ha, I.J., Lee, Y.M., Kim, O.E., Park, D., Lee, H.J., Lee, G.S., Kim, W.D., Lee, H.T., Lee, J.E., Kim, K.CH., 2018. Identification and metabolite profiling of alkaloids in aerial parts of Papaver rhoeas by liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. Journal of Separation Science Published 2018, 41(12),2517–2527.
11. Zohary M. (1966) - Flora Palaestina. Part one, Text, Equisetaceae to moringaceae. 1966, p;11-34.
12. Mouterde, S.J. P.(1986)- Nouvelle Flore du Liban et de la Syrie. Beyrouth- Liban, 1986. II:P. 57-69
13. Post, G. E., (1932)- Flora of Syria, Palestine and Sinai. Vol. II, pp. 492-505.
14. Sorokin DY, Teske A, Robertson LA, Kuenen JG (October 1999)- Anaerobic oxidation of thiosulfate to tetrathionate by obligately heterotrophic bacteria, belonging to the Pseudomonas stutzeri group.

FEMS Microbiology Ecology, **30** (2): 113–123. doi:10.1111/j.1574-6941.1999.tb00640.x.hdl:21.11116/0000-0004-C35F-6. PMID 10508936.

15. Bennasar A, Rosselló-Mora R, Lalucat J, Moore ER (January 1996)- 16S rRNA gene sequence analysis relative to genomovars of Pseudomonas stutzeri and proposal of Pseudomonas balearica sp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology, **46** (1): 200–5. doi:10.1099/00207713-46-1-200. PMID 8573496.
16. Sommer M, Xie H, Michel H (September 2017) -Pseudomonas stutzeri as an alternative host for membrane proteins. Microbial Cell Factories, **16** (1): 157. *doi*:*10.1186/s12934-017-0771-0*. *PMC* *5607611*. *PMID* *28931397*.
17. Lapage SP, Hill LR, Reeve JD (November 1968) -Pseudomonas stutzeri in pathological material. Journal of Medical Microbiology, **1** (2): 195–202. doi:10.1099/00222615-1-2-195. PMID 5747915.
18. Seip B, Galinski EA, Kurz M (February 2011) -Natural and engineered hydroxyectoine production based on the Pseudomonas stutzeri ectABCD-ask gene cluster. Applied and Environmental Microbiology, **77** (4): 1368–74. *doi*:*10.1128/AEM.02124-10*. *PMC* *3067233*. *PMID* *21169432*.
19. Graupner S, Wackernagel W (April 2001) -Pseudomonas stutzeri has two closely related pilA genes (Type IV pilus structural protein) with opposite influences on natural genetic transformation. Journal of Bacteriology, **183** (7): 2359–66. doi:10.1128/JB.183.7.2359-2366.2001. PMC 95145. PMID 11244078.

20. Çoban, E.P., Biyi, H., Törün, B., Yaman, F.(2017)- Evaluation the Antimicrobial Effects of Pistacia terebinthus L. and Papaver rhoeas l. Extracts Against Some Pathogen Microorganisms. Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research, 2017.51 (3),377-380.
21. 16- Middletona.P, Stewarta. F, Al-Qahtania.S, Egana. P, O'Rourkea. C, Abdulrahmana. A, Byresa. M, Middletona. M, Kumarasamya. Y, Shoeba. M, Naharb.L, Delazarc.A, Sarker. S.D, (2005)-Antioxidant, Antibacterial Activities and General Toxicity of Alnus glutinosa, Fraxinus excelsior and Papaver rhoeas. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 2005. (2).81-86. doi: https://doi.org/10.22037/ijpr.2010.620
22. 17- Rao, G.X., Zhang, S., Wang, H.M., Li, Z.M., Gao, S., Xu, G.L. (2009)- Antifungal alkaloids from the fresh rattan stem of Fibraurea recisa Pierre. J Ethnopharmacol,2009, 123 ,1–5. DOI: 10.1016/j.jep.2009.02.046 .
23. – Middleton,P ., Stewart, F., Al-Qahtani, S., Egan, P., O'Rourke, C., Abdulrahman,A., Byres, M., Middleton, M., Kumarasamy, Y., Shoeb, M., Nahar, L., Delazar, A., Sarker ,S.D. (2005).- Antioxidant, Antibacterial Activities and General Toxicity of Alnus glutinosa, Fraxinus excelsior and Papaver rhoeas. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 2005. (2).81-86.
24. Hijazi, A.M. Aboul-Ela, E., Bouhadir, B., Fatfat, M., Muhtasib, G.H., Ellakany, A. (2018). Alkaloids of Papaver libanoticum and their Cytotoxic Activity. Rec. Nat. Prod, 2018, 12(6), 611-618.

25. Hawraz Jawdat Jafaar, Ovgu Isbilen1, Ender Volkan1, Gunay Sariyar. Alkaloid profiling and antimicrobial activities of Papaver glaucum and P. decaisnei. Jafaar *et al. BMC Res Notes (2021) 14:348* https://doi.org/10.1186/s13104-021-05762-x.
26. Dulger, B., Gouz, A.2004. Antimicrobail Activity of some Turkish Medicinal Plants. Pakistan Journal of biological science, 2004, 7(9),1559-1562.
27. Hawraz Jawdat Jafaar, Ovgu Isbilen, Ender Volkan ,Gunay Sariyar. Alkaloid profiling and antimicrobial activities of Papaver glaucum and P. decaisnei. BMC Res Notes. 2021 Sep 8;14(1):348. doi: 10.1186/s13104-021-05762-x.