جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة القادسية –كلية العلوم
قسم علوم الحياة

التأثير التثبيطي لجزيئات الفضة النانوية على بكتريا Pseudomonas

بحث تقدم به الطالب (احمد عبد السلام شاكر) الى مجلس كلية العلوم قسم علوم الحياة وهو جزء من متطلبات نيل شهادة البكالوريوس كلية العلوم/علوم الحياة

بإشراف: - أ.د. سيوف خومان

1440هـ   2019م

بسم الله الرحمن الرحيم

((نرفع درجات من نشاء وفوق كل ذي علم عليم))

سورة يوسف/ آية 74

الاهداء

الى من كانت ولا زالت سندا لي . . . . وما توفيقي الا بدعائها ونجواها مع الله

تلك التي جعل الله عز وجل عظمة جنته تحت قدميها . . . . أمي الغالية

الى من كان ولا زال مساعدي وقدوتي . . . . ذلك الذي تكبد عناء الأيام لإيصالي لما انا عليه الان

ذلك الذي كان رفيقي قبل ان يكون ابي . . . . والدي العزيز

الى كل من وقف معي وساندني . . . .

الى اصحابي بالله ومن ساندني حبا بالله . . . .

اهدي هذا العمل الى كل من وقف معي عرفانا واحتراما

الشكر والتقدير

الحمد لله رب العالمين والصلاة والسلام على خير خلق الله اجمعين نبينا محمد صلوات الله عليه وسلامه وعلى آله الطيبين الطاهرين. .

يطيب لي ان أتقدم بالشكر الجزيل لأستاذتي الفاضلة الست آلاء محمد حسوني لاقتراحها مشروع البحث ولما قدمته لي من نصح وتوجيه علمي فأسأل الله ان يوفقها ويجزيها عني خير الجزاء...

كما أتقدم بالشكر الجزيل الى رئاسة قسم علوم الحياة لما قدمته لي من دعم وتوفير الأمور اللازمة لإكمال بحثي....

وأخيرا أوجه عميق شكري وامتناني للذين وقفوا معي وساندوني والى كل من قدم لي نصيحة او مشورة.....

المقدمة Introduction

التسمية والاكتشاف nomenclature and discovery

عرفت البكتيريا الزائفة الزنجارية مثل باقي الاجناس البكتيريا التي عاشت مئات السنين الماضية حيث صنف في نهاية القرن التاسع عشر وحددتا من مثل العالم والترميغولا migula walter وكلمة pseudo باليونانية تعني ((كاذبة)) و monda تعني الكائن الدقيق الاحادي الخلية وقد استخدمت هذه المصطلحات في وقت مبكر من تاريخ علم الاحياء المجهرية وذلك للإشارة الى الكائنات احادية الخلية single cell وهو ما يعني وحدة كاذبة (palleroni,2019) واكتشف البكتيريا بعد ان عزلت اول مرة من مزرعة نقية عام 1872 من قبل العالم schroeter من مصادر بيئة مختلفة (dworkinetal , 2000) كما اطلقت العديد من التسميات على هذه البكتيريا في بداية اكتشافها، منها عصيات بايوسيانيس bacterium byoeyaneus زوائق بايوسيانيس p. pyocyaneus (holt. et al ,,1994).

سميت بعد ذلك بالزوائف الزنجارية psudomonas aeruginosa ثم صارت هذه التسمية الاسم العلمي للبكتيريا (tzouchas,2014).

الصفات العامة grneral characterstics

1- الصفات المجهرية microscopic characterstics

الزائفة الزنجارية هي عصيات سالبة لصبغة كرام هوائية اجبارية، تنتمي للعائلة البكتيرية pseud omonad aceae تظهر بشكل منفرد او ثنائي او بشكل سلاسل قصيرة قد تكون مستقيمة او منحنية، تبلغ 1,5-3,o مايكرومتير طولا وقطرها حوالي 0,5-0,7 مايكرومتير وتتحرك البكتيريا بواسطة اسواط قطبية (lewenza atal.,2005., filiatraultet al.,2006)

2-الصفات الزرعية culture characteristics

تمتاز بكتيريا p.aeruginosa بعدم قدرتها على تخمير سكراللاكتوز، ونتجية لذلك تظهر مستعمراتها شاحبة اللون على وسط كار الماكونكي (Baron and finegold,1990). ويمكن ان تنمو البكتيريا في ظروف لاهوائية إذا أضيفت النترات للوسط الزرعي النامية عليه، بسبب قدرتها على استخدام الاوكسجين الموجود في النترات (Jones at al., 2000., worlitzsch et al.,2oo2). كما تمتاز البكتيريا بإفرازها العديد من الصبغات منها صبغة البايوسيانين pyocyanin الزرقاء، وصبغة

البايوفيريدين pyoverdin الصفراء وصبغة البايوروبين pyorudin الحمراء وصبغة البايوميلانين pyomelanin السوداء
(Baronet al.,1994.,koneman et al., 1997)

3-الصفات الكيموحيوية biochemincal charactristics

اتصفت بكتيريا p.aeroginosc بايجابيتها تجاه كل من اختبار الاوكسديز والكاتليز وكذلك اختبار الستريت وتميع الجيلاتين وتكون سالبة تجاه اختبار الاندول والمثيل الأحمر وفوكس بروسكار وتخمر السكريات
(Greent at al.,1988) حيث تستطع هذه البكتيريا استغلال مركبات عديدة بوصفها مصدرا مهما للطاقة مثل المصادر النيتروجينية والكاربونية
.(Ltah and essien,2005)

امراضية البكتيريا p.aeruginosa

Pathognicty of p.aeruginosa

عوامل الضراوة virulence factors

تعد بكتيريا p.aeruginosa كائنا شائعا في البيئة ويمكن العثور عليها في البراز والقرية ومياه الصرف الصحي ويمكنها ان تنمو في البيئات المائية وهي مصدر لعدوى المستشفيات . nosocomial in fection ويمكن ان تسبب مضاعفات خطيرة
(Moreau.marquis et al., 2008., noura et al.,2009)
بعد الدراسات الكثيرة على هذه البكتيريا وجدانه تمتلك العديد من عوامل الضراوة منها خلوية الاهلاب pili والاسواط flagella التي تساعدها على الحركة والالتصاق بخلايا المضيف وعوامل إفرازية مثل المواد البروتينية كصبغتي الpyocyanin
وpyoverdin وذيفانات Exotoin A التي تعد قاتلة عند حقنها بشكل نقي بالحيوانات المختبرية
كما تنتج ذيفانات Exotoxin S التي تقوم بوظيفة الالتصاق ومنع عملية البلعمة في الانسجة المصابة .
كما تعتبر السكريات المتعددة المخاطة mucoid exopolysaccharides
من احد عوامل الضراوة البكتيريا p.aeruginosa ، عند مهاجمة البكتيريا لجسم الانسان فان مراحل الإصابة تبدا من خلال وجود مستقبلات تدعى
Toll-like receptors (TLRs) موجودة على الخلايا الطلائية والخلايا المناعية الطبيعية وهذه المستقبلات وظيفتها استلام إشارات من خارج الخلية وعند ارتباط الخلي بالمستقبل تحدث استجابة خلوية بعد ذلن يحدث استعمار للبكتيرياcolonization وبالتالي حدوث الإصابة infection
(Kobayshi et al.,2009)

وبكتيريا p.aeruginosa لديها أيضا خاصية البقاء على قيد الحياة على السطوح الخاملة وإنتاج الاغشية لحيوية Biofilm التي تعد احد عوامل الضراوة للبكتيريا (Vilaand Marco.,2010.,Sigurdsson et al 2012)

اذ تعد بكتيريا p.aeraginosa احد الأنواع البكيدية التي لها القدرة على انتاج الانزيمات المحللة التي تمكنها من غزو خلايا المضيف وتحطيمها للغلاف الخلوي الخارجي من خلال تحطيم او تحليل الوحدات التركيبة في الغشاء الخلوي للمضيف والمتمثلة بالدهون المفسفدة والبروتينات

(Teenpaisan et al.,2009) ومن هذه الانزيمات: الانزيم الحال للشحوم Lipase الذي يعمل على تحطيم طبقة الدهون الموجودة في الجدار الخلوي للمضيف مما يساعد لبكتيريا على الانتشار داخل جسم الكائن الحي

(George et al .,2005) وانزيم الليسيثينيز Lecithinase الذي يمكن دوره في تحطيم طبقة Lecithin في الغشاء الخلوي للمضيف (Hawthrone,2008) اما انزيم البروتيز protase فانه يلعب دور مؤثر وفعال في اختراق الانسجة وامراضية البكتيريا (clark,2006). وأخيرا انزيم الكاتليز Catalase ودوره في حماية الخلية البكيدية من التاثيرالسمي البيروكيد الهيدروجين H_2O_2 الناتج من الفعاليات الايضية للبكتيريا .(Suh et al., 1999)

الامراضية المتسببة عن بكتيريا p.aeruginosa

Disease caused by p.aueruginosa

تعد بكتيريا p.aeruginosa الممرض الانتهازي السائد للإنسان وعلى نحو متزايد حيث وجدانها مسؤولة عن حوالي 16% من حالات الالتهاب الرئوي في المستشفيات (wid lin) و12% من التهابات المسالك البولية UTI المكتسبة من المستشفيات (pollack,1995) و10% من التهابات المجرى الدموي و8% من إصابات الجروح .

(Kluytmans,1997., Gordon.,et al 1998) ان الإصابة بكتيريا p.aeruginosa تكون موصفية وشديدة وذلك بسبب قدرتها على استعمار مواقع تشريحية مختلفة (بسبب امتلاكها اليات التصاف فعالة ومتطلبات تغذية قليلة ومقومة للمضادات الحيوية). كما لها القدرة على غزو انسجة المضيف وتحطيما واحداث الامراض الجهازية (zeng,2004) كما تعد بكتيريا p.aeruginosa احد اهم المشاكل التي تواجه المرضى الذين يعانون من نقص المناعة

Immunocompromised ومستخدمي العدسات اللاصقة (patel et al., 2002) ففي عام 2003 سجلت البكتيريا في الولايات المتحدة بانها من الممرضات الأكثر انتشارا ونسبة

(18.1%) من عزلات بكتيرية للمرضى المصابين بذات الرئة pneumonia والمسبب المرض الثاني الأكثر انتشارا وبنسبة (16.3%) من عزلات بكتيريا لمرضى المجاري البولية UII (Tam et al .,2007). ثم تزداد نسبة الإصابة بالبكتيريا في حالات إصابة الأشخاص بالأورام السرطانية وكذلك بعد عمليات نقل الأعضاء(willen brock and ussery,2007) كما ان إصابات الحروف كن لها دور في الامراضية بهذه البكتيري حيث اشارت الدراسات الى ان الاحياء المجهرية تنتهز الفرصة للتضاعف والاستعمار في منطقة الحروف المفتوحة نتجية لتحطيم حاجز الجلد وتحول منطقة الحرف الى وسط غني وملائم لنمو الجراثيم

(Fournior and pilpott,2005)

الوبائية Epidemiology of p.aeruginosa

ليس غريبا على الإصابات الناتجة من البكتيريا الزائفة الزنجارية ان تكون مرتبطة بشكل كبيرمع معدلات الهلاك والوفيات نظر لقدرة البكتيريا على التكيف بسهولة للتغيرات التي تحدث في البيئة لتطور بسرعة المقاومة للمضادات الأحيائية وإنتاج مجموعة متنوعة من عوامل الضراوة

(Van Delden p.aeruginosa ,.and Iglewski.,1998) وتعد البكتيريا واحدة من الممرضات الانتهازية opportunistic pathogens التي تمتلك العديد من عوامل الضراوة والمرتبطة مع إصابات المستشفيات .nosocomial infections

(Gawish et al., 2013)

كما عرفت هذه البكتيريا بانها تستطيع النمو والبقاء على قيد الحياة في أي بيئة تقريبا على الرغم من انها تفضل البيئات الرطبة حيث يحدث الاستعمار لهذه البكتيريا في الانسن في منطقة الابطين والاذان اذ ان الرطوبة تمثل عاملا مها في حدوث الإصابة. كما بينت الدراسات ان نسبة انتقال البكتيريا بين الأشخاص الاصحاء قليلة نسبيا (pollack et al.,2000)

ان اغلب إصابات بكتيريا الزائفة الزنجارية هي منتشرة عالميا وتتميز بانها ذات سمية، كما ان الإصابة النهائية بالبكتيريا يمكن تمييزها بثلاث مراحل وهي تبدأ بالالتصاق البكتيري bacterial attachment ثم الاستعمار colonization وخيرا الغزو الموضعي للأنسجة localinvasion وحدوث الإصابة infection (palamthodi et al.,2011) تستطيع البكتيريا النمو بدرجة حرارة 42 مْ كما انها قادرة على النمو في الديزل ووقود الطائرات وكما هو معروف عن الكائنات الدقيقة التي تستخدم الهيدروكربونات فأنها سوف تسبب التأكل الميكروبي microbial corrosion (Striebich et al.,2014). تميزت البكتيريا بقدرتها على استخدام مجموعة واسعة من المركبات العضوية مصادرا للغذاء مما يعطيها قدرة استثنائية على استعمار بيئات عديدة عند قلة المواد الغذائية وذلك بعد أحد مظاهر الوبائية للبكتيريا (Qarah et al.,2008).

جينوم البكتيريا Genome of p.aeruginosa

لجينوم الزوائف الزنجارية القدرة على التكيف بقدرة (7-5.5mbps) اذ يجعلها قادرة على الاستعمار في مدى واسع من البيئات، يمتلك الجينوم العديد من الوظائف التي ثم معرفتها، منها حدوث تغيرات في المستضدات السطحية وفقدان عوامل الضراوة المرتبطة بالصفات وزيادة مقاومة المضادات وإدخال البلازميدات الوراثية كذلك الافراط في انتاج الالجينيت alginate وتعديل مسارات الايض، ويحتوي الجينوم العديد من المناطق التي تظهر لبونة plasticity (Klockgether et al.,2008) تمتلك بكتيريا p.aeruginosa حوالي بين 5021 .

(Mathee et al.,2008) كما تمتلك لجينوم المساعد accessory genome الذي يتكون من مكونات كروموسومية خارجية extrachromosomal components مثل البلازميدات plasmids وكتل من DNA التي تعد مكملة للكروموسومات في مواقع متفابرة

(Kiockgther et al.,2011) ويشكل الجينوم المساعد حوالي 20% من حجم الكلي ،وهو مسؤول عن التغير في حجم الجينوم والتنوع بين السلالات (klockgther et al.,2006) هذه المكونات قد تكون مكتسبة من أنواع أخرى من البكتيريا من خلال استخدام اليات مثل النقل الافقي للجين orizontal gene transfer ان تركيب الجينوم الفيسفسائي والبلاستيكي mosaic and plastic form لبكتيريا الزائفة الزنجارية سيزيد من قدرتها على التحور modify وبالتالي سوف تحدث الإصابة infection وتجعلها قادلرة على التكيف لمدى واسع من البيئات (Norgaard,Gron,2010) ان الجين 16SrRNa هوجين تشخيصي للبكتيرياا وهو عبارة عن مكون تركيبي مركزي للوحدة الرايبوسومية البكتيرية 30S والازمة للبدء بعملية تصنيع البروتين (wimbrly et al.,2000)

المقاومة للمضادات الحيوية Antibiotic Resistance

ان وبائية الامراض المعدية لاتزال مرتفعة لان مسببات الامراض قادرة على التغلب على دفاعات الانسان والتكييف مع العلاج لذلك أصبح تطور وانتشار المقاومة للمضادات الحيوية يهدد الصحة العامة ويؤثر بشدة على فعالية مضادات الجراثيم المتاحة حاليا وفي السنوات الأخيرة تم تسجيل زيادة كبيرة في عدد الجراثيم ذات المقاومة المتعددة للمضادات والمعزولة من المجتمع والالتهابات المكتسبة من المستشفيات، ونتيجة لذلك نحن نواجه الان احتمال مستقبل بدون مضادات حيوية فعالة (Theuretzbacher,2012) ان بكتيريا p.aeruginosa تعد احد الأسباب التي تؤدي لأمراض تجرثم الدم bacteremia والالتهاب الرئوي في المرضى الراقدين في المستشفيات بالإضافة الى ذلك تمتاز بكونها ذات مقاومة مثالية للعديد من العوامل المضادة للجراثيم، كما يمكنها تطوير مقاومتها بسهولة لجميع المضادات الحياتية من خلال اليات مختلفة (Livermore,2002) حيث امتلكت البكتيريا صفة المقاومة الذاتية Intrinsic resistance تجاه العديد من المضادات الحيوية إضافة لقدرتها على اكتساب المقاومة Acquired vesistance من خلال تكيفها خلال فترة العلاج الطبي Bukharia and (Mowafi,2010) لقد أظهرت بيانات أنظمة المراقبة العامة للعدوى المكتسبة زيادة مستمرة في مقاومة بكتيريا الزائفة الزنجارية في وحدة العناية المركزة للجيل الثالث للسينالوسبورينات ccphalorins والكارنيوينات quinolones والكاربانيم carbapenem بمقاومة معدلاتها

للعام 2002 ومتوسط معدلات المقاومة للسنوات الخمس الماضية، كما أظهرت منظمات مراقبة أخرى هذه المشكلة واحدة هذه المنظمات قد وجدت ان مدى ظهور بكتيريا الزوائف الزنجارية p.aeruginosa ذات مقاومة متعددة للمضادات ارتفع الى 30% (Jones and al.,2004) pfaller,2002.,flanm وادى ذلك الى صعوبة معالجة هذه الإصابات من قبل الكوادر الطبية العاملة في المستشفيات بسبب امتلاكها الكثير من الاليات لمقاومة مضادات الحياة (Thomas,2007).

المواد وطرق العمل

المحاليل solutions

ا- المحلول الملحي الفسيولوجي Normal salion solution

حضر المحلول بإذابة 0.85 غرام من كلوريد الصوديوم في 90 مليلتر من الماء المقطر، وأكمل الحجم الى 100مليلتر وعقم بالمؤصدة. واستعمل هذا المحلول في اعداد اللقاح البكتيري المباشر(MacFaddin،2000).

ب- انبوبة ماكفرلاند القياسية No. (0.5) McFarland Tube Standard

حضرت من المحاليل الاتية وحسب ما جاء في NCCLS (2003):

1-محلول كلوريد الباريوم المائي $BaCl_2.2H_2O$

حضر المحلول بإذابة 1.175 غرام في 50 مليلتر من الماء المقطر المعقم وأكمل الحجم الى 100 مليلتر للحصول على تركيز0.048 مول / لتر من كلوريد الباريوم.

2-محلول حامض الكبريتيك H_2SO_4

حضر المحلول بإضافة 18 مليلتر من حامض الكبريتيك المركز ببطء الى 50 مليلتر من الماء المقطر المعقم، وأكمل الحجم الى 100 مليلتر للحصول على تركيز 0.18 مول/ لتر من H_2SO_4.

اضيف 0.5 مليلتر من محلول(1) الى 99.5 مليلتر من محلول (2) وعدلت قراءة العكورة القياسية ما بين (0.08-0.10) وحدة تكوين المستعمرة عند طول موجي 625 نانومتر وهذه القراءة تمثل ماعكورة ($10x1.5^{8}$). [Colony formig unit(CFU)]في مليلتر واحد من البكتريا النامية، ووزع المحلول في انابيب اختبار معقمة ذات سدادات محكمة بحجم 4مليلتر لكل انبوبة وحفظ في أماكن معتمة بدرجة حرارة الغرفة واستعملت لغرض مقارنة كثافة النمو البكتيري في اللقاح المستعمل مع كثافة المحلول في الانبوبة.

جمع العينات Collection of samples

جمعت 360 عينة من الحالات السريرية في مستشفى الديوانية التعليمي العام ومستشفى النسائية والأطفال ومركز الحروق للمدة من تشرين الثاني 2015 الى اذار2016 من المرضى المراجعين والراقدين في المستشفى المذكورة وبأعمار مختلفة لكلا الجنسين. استخدمت المسحات القطنية الحاوية على وسط ناقل Transport media swabs في عملية جمع العينات لضمان حيوية العزلة. وشملت العينات المدروسة، عينات الادرار وعينات الحروق والاذن.

جدول لاقراص المضادات الحيوية المجهزه من قبل شركة **Bioanalyse** التركية :

اسم المضاد الحيوي	رمزه	تركيزه
Amikacin	AK	10
Amoxicillin	AX	23
Augmastin	AUG	10\20
Cefipime	CEF	30
Cefotaxime	CTX	30
Ceftazidime	CAZ	10
Ceftriaxone	CTR	10
Ciprofloxacin	CIP	30
Erythromycim	ER	20
Gentamycin	GEN	10
Meropenem	MRP	5
Tetracyclcine	TE	30
Vancomycin	VA	20

التعليق [محمد1]:

عزل البكتيريا Isolation of bacteria

لغرض عزل بكتيريا p.aeruginosa، لقحت الأوساط الزرعية اكار الدم Blood agar واكار الماكونكيMacConkey agar بمسحات العينات بطريقة التخطيط ثم حضنت بدرجة حرارة 37مْ لمدة 18-24، وحضنت الاطباق التي لم يظهر فيها نمو خلال 24 ساعة لمدة 24 ساعة أخرى قبل عدها نتيجة سالبة.

تشخيص البكتيريا Identification of Bacteria

شخصت المستعمرات البكتيرية النامية اعتمادا على:

A-الخصائص المظهرية Phenotypic diagnosis

لوحظت الصفات المظهرية للمستعمرات النامية اشكالها ولونها وسطح المستعمرات ووجود روائح مميزة لها وقوامها وشفافيتها ونمط التحلل الدموي على وسط اكار الدم وتخمر اللاكتوز على وسط اكار الماكونكي (Winn et al.,2006).

B-التشخيص المجهري Microscopic diagnosis

فحصت العينات مجهريا وذلك بأخذ مسحة من المستعمرات البكتيرية النامية على الأوساط الزرعية وتثبيتها وتصبيغها كرام لملاحظة اشكال وترتيب الخلايا البكتيرية وتفاعلها مع الصبغة (موجبة او سالبة).

C-الاختبارات الكيموحيوية Biochemical tests

أجريت مجموعة من الاختبارات الكيموحيوية اللازمة لتشخيص العزلات البكتيرية قيد الدراسة وكالاتي:

1-اختبارالكتاليزCatalase test:

نقل جزء من مستعمرة فتية بعمر 24 ساعة بوساطة العيدان الخشبية المعقمة الى شريحة زجاجية نظيفة ومن ثم أضيفت قطر من محلول بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 بتركيز 3%. وتكون النتجية موجبة بظهور فقاعات من غاز الاوكسجين(Brown,2007).

2-اختبارالاوكسيديز Oxidase test:

نقل جزء من مستعمرة فتية بعمر 24 ساعة بوساطة عود خشبي معقم الى ورقة ترشيح مشبعة بكاشف الاوكسيديز، وان تكون اللون البنفسجي خلال 10 ثوان دليل على إيجابية الاختبار (Brown,2007).

3-اختبارانتاج الهيمولايسين Hemolysin production test:

استخدم في هذا الاختبار وسط اكار الدم؛ اذ تم تلقيح الوسط بجزء من المستعمرة البكتيرية النقية المراد اختبارها، وحضنت الاطباق بدرجة حرارة37مْ لمدة 18-24 ساعة. لوحظت النتيجة

الموجبة عند حدوث تحلل دموي حول المستعمرة، اذ كان التحلل من نوع التحلل الكامل β-hemolysis، (Levinson and Jawetz,2000).

4-اختبار فعالية انزيم اليوريزUrease test:

استخدم في هذ1ا الاختبار وسط اكار اليوريا (Urea agar) المعقم الذي لقح بجزء من المستعمرة البكتيرية النقية المراد اختبارها ثم حضن بدرجة حرارة 37مْ لمدة 24-48

ساعة. ويستدل على النتيجة الموجبة بتغير لون الوسط من الاصفر الى الوردي (MacFaddin,2000).

5-اختبار قابلية الحركة Motility test:

اجري هذا الاختبار بتلقيح الانابيب الحاوية على وسط الحركة بطريقة الطعن المحضر بإذابة 0.5 غم من اكار – اكار في 100 مل من وسط نقيع القلب – الدماغ السائل بالمزروع البكتيري، وحضن بدرجة حرارة 37مْ لمدة 24-48 ساعة، انتشار النمو خارج حدود الطعنة يدل على النتيجة الموجبة(MacFaddin).

6-اختبارتخمر السكريات وإنتاج الغازِ Sugar fermentation&gas production test

لقحت الانابيب الحاوية على وسط kliger's Iron Agar (KIA) بطريقة الطعن والتخطيط على السطح المائل بالمزروع البكتيري. وحضنت الانابيب بدرجة حرارة37مْ لمدة 24 ساعة ان تغير لون الوسط من الأحمر الى الأصفر دليل على قدرة البكتيريا على تخمر سكري الكلوكوز واللاكتوز، بينما يكون انتاج غاز كبريتيد الهيدروجين على شكل راسب اسود اسفل الوسط الصلب. (MacFaddin,2000).

7-مجموعة اختبارات IMViC المكونة من:

*اختبار انتاج الاندولIndol production test:

استخدم في هذا الاختبار وسط ماء الببتون (peptone water) الذي لقح بجزء من المستعمرة البكتيرية النقية المراد اختبارها، ثم حضنت الانابيب بدرجة حرارة 37مْ لمدة 24-48 ساعة بعد ذلك أضيفت عدة قطرات من كاشف كوفاكس kovac's reagentالى كل انبوبة مع الرج الجيد وان ظهور حلقة حمراء اللون دليل على إيجابية الفحص وقدرة البكتيريا على تحليل الحامض الاميني التربتوفان Tryptophanوإنتاج الاندول (MacFddin,2000).

*اختبار المثيل الأحمر Methyl red test:

اجري هذا الاختبار بتلقيح الانابيب الحاوية على الوسط الزرعي MR.VP.medium بجزء من المستعمرة البكتيرية النقية المراد اختبارها وحضنت بدرجة حرارة 37مْ لمدة 24-48 ساعة. بعد انتهاء فترة الحضن أضيفت 5 قطرات من كاشف المثيل الأحمر وسجلت النتيجة الموجبة بظهور اللون الأحمر دلالة على انتاج الحامض، في حين ان بقاء اللون الأصفر يمثل النتيجة السالبة (Collee et al.,1996).

*اختبار فوكس – بروسكاورVoges- proskauer test:

لقحت الانابيب الحاوية على الوسط الزرعي MR.VP.medium بجزء من المستعمرة البكتيرية النقية المراد اختبارها ثم حضنت بدرجة حرارة 37مْ لمدة 24-48 ساعة، بعد ذلك اضيف 1مليلتر من الكاشف الى كل انبوبة مع التحريك الهادئ ثم ترك ساكنا لمدة 10-15دقيقة، واستدل على النتيجة الموجبة بظهور اللون الأحمر(Collee et al.,1996).

8-اختباراستهلاك السترات Citrate utilization test:

لقح في هذا الاختبار وسط سيمون ستريت المائل بجزء من المستعمرة البكتيرية النقية المراد اختبارها وحضن بدرجة حرارة 37مْ لمدة 24-48 ساعة ايجابية الفحص بتغير لون الوسط من الاخضر الى الأزرق دلالة على استهلاك البكتيريا للسترات على انه مصدر وحيد للكاربون (Winn et al.,2006).

D- التشخيص بنظام api 20 E api 20 E diagnosis system

بعد الحصول على نتائج الفحوصات الكيموحيوية التي تنطبق على بكتيريا p.aeruginosa استخدمت شرائط ال api 20 E، لتشخيص هذا النوع بالشكل اذ يحوي هذا الشريط على 20 انبوبة خاصة بالفحوصات الكيموحيوية التأكيدية. تتضمن طريقة العمل الخطوات التالية:

ا- تحضير العالق البكتيري preparation of bacterial suspention

لقح 5 مليلتر من محلول الملح الفسلجي ب1-4 مستعمرة من بكتيريا p.aeruginosa بواسطة المسحة القطنية (swap) مع المزج المستمر للحصول على عالق تركيزه (1.5×10^8) خلية/ مليلتر وذلك بالمقارنة مع المحلول ثابت العكورة القياسي ذو الرقم(0.5).

ب- تلقيح شريط api lnoculation of the api strip

بعد تحضير العالق البكتيري وباستخدام ماصة (Pipette) نظيفة وجافة لقح مقدار0.12 مليلتر من عالق البكتيريا لكل انابيب الاختبار فيما بلغت كمية اللقاح البكتيري 0.28 مليلتر لأنابيب الاختبارات CIT,VP,GEL واضيف الزيت المعدني المعقم (Sterile mineral oil) الى الاختبارات التي تحتها خط والتي شملت URE,ADH,LDC.ODC,H_2S.

ج- حضن شريط api Incubating the strip in its chamber

وضع شريط ال api داخل غطاء او حافظة خاصة ضمن العدة بعد وضع القليل من قطرات الماء بالحفر الموجودة في هذا الغطاء، ثم حضن شريط الapi بدرجة حرارة37مْ لمدة 48-24 ساعة.

د- إضافة الكواشف Addition of reagents

▪اضيفت قطرة من كاشف TDA الى اختبار إزالة مجموعة الأمين من الحامض تربتوفان (Tryptophan deaminase)، تحول اللون الى البني يدل على النتيجة الموجبة.

▪أضيفت قطرة من كاشفJAMES الى اختبار انتاج الاندول (Indol production test)، ظهور حلقة حمراء اللون دليل على النتيجة الموجبة.

▪أضيفت قطرة من كل كاشف VP1+VP2 على التوالي الى اختبار فوكس – بروسكاور (Voges- proskauer test)، تحول اللون الى الوردي يدل على النتيجة الموجبة.

▪اضيف قطرة من كاشف NIT1 وقطرة من كاشف NIT2 الى اختبارGLU، تحول اللون الى الأزرق يدل على النتيجة الموجبة.

ز- قراءة النتيجة Reading of Result

شخصت البكتيريا من خلال الشفرة الرقمية (Code number) التي تتكون بعد وضع علامة (+) او علامة (-) لكل من الاختبارات الكيموحيوية الموجودة ضمن شريط ال api حيث ان لكل بكتيريا شفرة رقمية خاصة بها، ثم قورنت الأرقام في أوراق خاصة بالشريط وشخصت باستخدام الدليل الملحق.

اختبارات فحص الحساسية Antibotic Susceptibility Testing

اختبرت الحساسية الدوائية للعزلات البكتيرية بطريقة الأقراص اعتمادا على طريقة Bauer وجماعته (1966) و CLSI (2012)، وتمنت:

نقل2-4 مستعمرات من بكتيرياp.aeruginosa الى أنبوب اختبار يحوي5 مل من مرق تربتون الصويا المغذي وحضنت بدرجة37 مْ لمدة 8 ساعات. خفف النمو الحاصل باستعمال محلول الملح الفسلجي، تمت مقارنة النمو في الانبوب مع انبوبة ماكفرلاند (0.5) القياسية، وغمست المسحة القطنية في مرق تربتون الصويا المزروع، وازيل الفائض بالضغط على الجوانب الداخلية للأنبوبة، نشرت البكتيريا على وسط مولر – هنتون الصلب بطريقة التخطيط لأكثر من مرة، وباتجاهات مختلفة لغرض التأكد من نشر البكتيريا المراد اختبار حساسيتها بالتساوي، وتركت الاطباق15 دقيقة في درجة حرارة الغرفة لضمان امتصاص الرطوبة، وضعت أقراص المضادات الحيوية المذكورة في الفقرة (3-1-4) بواقع خمسة أقراص في طبق قياس 100ملي متر، و12 قرص في طبق قياس 150 ملي متر، والمسافة بين كل قرص واخر20 ملي متر من مركز القرص الأول الى مركز القرص الاخر، حضنت الاطباق في37 مْ لمدة18 ساعة لجميع أنواع المضادات الحيوية، ثم قيست اقطار التثبيط باستعمال الفيرنيا وقونت مع القيم القياسية المذكورة في CLSI (2012).

¤ فحص الحامض النووي المستخلص DNA examination

تم الكشف عن الحامض النووي DNA المستخلص وذلك من باستخدام جهاز Nanodrop spectrophotometerالخاص بالكشف وقياس تركيز الحامض النووي، اذ يتم الكشف عن من خلال تحديد تركيز الحامض النووي DNA (ng/ul) وقياس نقاوة الحامض النوويDNA من خلال قراءة الامتصاصية بطول موجي يتروح بين 260/280 nm.

وتم استخدام الجهاز على النحو التالي:

1-اختير برنامج قياس الحامض النووي نوع DNA.

2-صفرت ركيزة المقياس مرتين وذلك بوضع 2مايكروليتر من(ddH_2O) باستخدام ماصة معقمة على سطح ركيزة المقياس واجراء التصفير، وبعدها نظفت الركيزة باستخدام ورق نشاف خاص بالجهاز.

3-وضع مايكروليتر من كل عينة من الDNA المستخلص على ركيزة مقياس الجهاز، ومن ثم نظفت مرة أخرى لقياس العينة الأخرى.

النتائج والمناقشة

Table (1) Zone of inhibition of antibiotics used against bacterial species

Bacterial-Isolates	Concentration (ug/ml) zone of inhibition (mm)													
	AK	AX	AMP	AUG	CEF	CTX	CAZ	CTR	CIP	ER	GEN	MRP	TE	VA
Ps.aeroginosa	17	0	0	0	0	0	14	0	20	0	20	19	0	0

اظهرت النتائج في الجدول اعلاه ان تراكيز كل من المضادات هو Ak هو 1 وتركيز المضاد Ax هو 7 وتركيز المضاد AmP هو 6 وتركيز المضاد CEF هو 9 وتركيز المضاد CTX هو 5 وتركيز المضاد CAZ هو 7 وتركيز المضاد CTR هو 4 وتركيز المضاد CIP هو 2وتركيز المضاد ER هو 5 وتركيز المضاد GEN هو 8 وتركيز المضاد MRP هو 6 وتركيز المضاد TE هو 9 وتركيز المضاد VA هو 0.

Table (2) Zone of inhibition of antibiotics used against fungal species

Fungal isolates	Concentration (ug/ml) zone of inhibition (mm)	
	Amphotericin B	Ketaconazole
Asp.flavus	20	27
Asp.parasiticus	22	35
Asp.terrus	23	24
Candida albicans	21	24

اظهرت النتائج في الجدول علاه ان فطر As.flavus يكون تركيز المضاد في منطقة التثبيط AmphotercinB هو 22 والمضاد qetaconazole هو 23 وفطر Asp.Parasityicus تركيز المضاد Amphotericin 21 وتركيز المضاد ketoconazole هو 35 وفطر Asp.Terrus تركيز المضاد AmPhotericinB في منقطة التثبيط هو 22 وتركيز المضاد Ketaconzole في منقطة التثبيط هو 24 وفطر candide albicans تريكز المضاد AmphotericinB في منقطة التثبيط 25 وتركيز المضاد ketoconazole هو 22

Table (3) Zone of inhibition of SiO_2 nanoparticles against bacterial species at different concentrations.

Bacterial Isolates	Concentration (ug/ml) zone of inhibition (mm)			
	10	20	30	40
Ps.aeroginosa	34	47	38	44

يظهر الجدول علاه مناطق التثبيط للجزيئات النانووية لــ sio2 ضد بكتريا S.auReus وتظهر التراكيز 34,32,35,45

Table (4) Zone of inhibition of SiO_2 nanoparticles against fungal species at different concentrations.

Fungal isolates	Concentration (ug/ml) zone of inhibition (mm)			
	10	20	30	40
Asp.flavus	41	43	44	60
Asp.parasiticus	40	39	44	49
Asp.terrus	39	40	44	48
Candida albicans	40	42	44	61

يظهر الجدول أعلاه مناطق التثبيط لجزيئيات النانويه Ag ضد A.Flavas الذي يظهر بتركيز (40,41,46,50) A.Parasiticus و A.Terrus بتركيز (39-42-47-49) و Candida.albicans بتراكيز 44 -63 (40_44)

دراسة ميكانيكية

عادة المعلق الحيوي لجزيئات الفضة النانويةِ AgNPs قد تم خلطها مع MS_2 عاثية القولونية للحصول على 10-mL من نظام التفاعل ما لم ينص على خلاف ذلك. التركيز البدائي ل MS_2 للعاثية القولونية تم الحفاظ عليها في هذه الدراسة في10^6PFU/mL. كل التفاعلات اجريت تحت ظروف تحريك مستمرة في درجة حرارة الغرفة وغطيت بواسطة رقائق الألمنيوم لحفظ تأثير الضوء المحيط بها. وقت الاتصال كان محفوظا في10 دقائق غير محددة.

من اجل تحقيق قاعدة تحرير ايونات الفضة 157.4mg من $AgNo_3$ ثم تذويبها في 100mL من ماء مقطر للحصول على 1000mg Ag/L من المحول الخزين. Bio-AgPNs ثم خلطها معMS_2 عابثة قولونية في تركيز معلوم (10,25and 50mg/L) وزمن اتصال قدرة (10-5) دقائق. مقارنة تعطيل العابثة البكتيرية MS_2

كانت ايضا قد اجريت في bioAgPNs - 10mg/L على التوالي ثم اخذ العينات 60,30,10,5 في دقيقة. لدراسة قاعدة 15mL,ROS من البنسلين داخل الزجاجات

مع10mg/L من bio-AgPNs والعابثة القولونيةMS_2تم حظنها تحت مستويات مختلفة من الاوكسجين. ظروف لاهوائية. زجاجات البنسلين تم ازالتها مع N_2 ل 5 دقائق بينما 2.SmL من الاوكسجين النقي قد ارتفعت الى منطقة الراس في الزجاجات لتحقيق حالة فرط الاوكسجين. ثم اخذ العينات في ظل هذه الظروف الثلاثة وفي وقت اتصال قدرة 5-10-30-60 دقيقة على التوالي. قاعة الاتصال المباشر تم دراستها مع خطوات واضحة في الشكل 1-3 . ثم استخدام

انابيب غسيل الكلى امنع الاتصال المباشر بين MS_2 و$AgPN_2$الحيوي كما في الشكل 3-1-A. الشكل 3-1-B ثم استخدامه للسيطرة حيث تم خلط AgPNs الحيوي مع MS_2جيدا في الحاوية عندما كان نفس انبوب الغسيل موجودا بعد التعريض لمدة ساعة واحدة. ثم اخذ العينات واجريت اوساط الالواح على الفور بعد التخفيف

- التخليق الحيوي لجزيئات الفضة النانوية

التخليق الحيوي ل AgNPs اخذ وفقا ل Sintubin et al (2009) ثم شراء L.Fermentum ATCC11976 من النوع الاميركي مجموعة الوسط US, (ATCC). ثم حظنها في وسط Rogosa –sharrpe broth قد حظن في جهاز الاوتوكليف في درجة حرارة 30c˚ لمدة 48 ساعة بعد هذه الفترة كان الوزن الجزيئي للخميرة L.fermentum قد اخذت وتم غسلها ثلث مرات بواسطة السنترفيوج. بعد اذابة 4.6g لكل لتر أصبح الوزن الجزيئي قاعديا بواسطة إضافة 2.56% من 1M من محلول NaOH. 16.5gMg⁄mL من (Ag) من محلول $Ag(NH_3)_2\ NO_3$ قد تم اضافتها فيما بعد الى الوزن الجزئي الذي حصلت عليه لكي تحصل على نسبة 1;4.6 من Ag;CDW الخليط ثم تغطيته بحذر بورق من شرائح الالمنيوم وثم خلطها في درجة حرارة الغرفة ولمدة 24 ساعة. بعدها تم تنقيته جزيئات الفضة النانوية الحيوية باستخدام السنترفيوج. في هذه الحالة، مصطلح، bioAgPN تم خلطها والوزن الجزئي والزوائد الأخرى ثم إخراجها من الوزن الجزئي لكي لا تستخدم.

- توصيف جزيئات الفضة الثانوية

TEM(JEM30 10>JEOLtd.,Japan) ثم استخدامه في هذه الدراسة لوصف شكل وحجم جزيئات الفضة النانوية في 300kv العينات تم تحظيرها بواسطة وضع قطرة جديدة من المعلق السائل لجزيئات الفضة النانوية على شبكة من الكاربون مطليه بالنحاس من الجهتين ومجففة بالهواء في درجة حرارة الغرفة في الليل. اختبار TEM ثم اجراءه مع طاقة مندثرة من الاشعة السينية للطيف المتحلل من اجل التأكد من صحة وجود AgPNs من خلال حدوث القمة المتخصصة من Ag. الى جانب ذلك تم استخدامها لقياس تركيزAgPNs الذي تم تخليقه بعد هظمها 65% من HNO_3 و30% H_2O_2 بالتزام مع USEPA3050B. عملية الهضم التي حصلت ثم شرحها ادناه: 2mL من معلق AgPNs ثم اضافته الى بيكر يحتوي 2mL من 65%HNO_3 وسخنت لحد الغليان . بعد ذلك 1mL من 30%H_2O_2 تم اضافتها.

هذا المعلق تم حفظه في درجة الغليان الى ان تحول من معلق داكن اللون الى معلق عديم اللون ومحلول شفاف (فضة ايونية). بعد الهضم اختبارICP-OES أدى الى قياس تركيز ايونات الفضة في المحلول. لذا فان التركيز الكتلي لجزيئات الفضة النانوية يمكن تحديدها. كشف حد ICP-OES للفضة هو 0.1mg⁄mL وفضة المحلول القياسي تم استخدمها كمنحني قياسي في ICP-OES احتمالية زيتا والقطر الهيدروينامیكي للجزيئات النانوية تم قياسها بواسطة محلل زيتا المحتمل في PH7. ال HDD ثم تحديدها مع a633nm مصدر ليزر كشف 173˚

المصادر

Abdul-Wahid, A.A.(2014). Dissemination of Aminoglycosides Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates in Al-Nasseryia Hospitals. M.Sc. Thesis. College of Medicine. University of Kufa.

Akingbade, O. A.; Balogun, S. A.; Ojo, D. A.; Afolabi, R. O.; Motayo, B. O.; Okerentugba, P. O. and Okonko, I.O.(2012). Plasmid profile analysis of multidrug resistant Pseudomonas aeruginosa isolated from wound infections in South West, Nigeria. World Appl Sci J, 20(6):766 775.

Akinloye, O. ;Ogbolu, D.O.;Akinloye, O.M. and Terry A.O.A. (2006) .Asymptomaticbacteriuria of pregnancy in Ibadan, Nigeria: a reassessment.Br.J.

Babic, M.; Hujer, A.M. and Bonomo, R.A.(2006). Whats new in antibiotic resistance ?Focus on beta-lactamases. Drug Resistance Updates 9:142-156.

Bagge, N.; Hentzer, M.; Andersen, J.B.; Ciofu, O.; Givskov, M. and Hoiby, N. (2004). Dynamics and spatial distribution of β-lactamase expression in Pseudomonas aeruginosa biofilme. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 48(4):1168-1174.

Duchesne, (2013). Antagonism between molds and bacteria. An English translation by Michael Witty. Fort Myers., ASIN Booeokrzoe and Boodzvxpik.

Dworkin, M.; Falkow, S.; Schleifer K-H..(2006). The prokaryotes a handbook on the biology of bacteria. Springer Science Business Media, USA. P. 704-713.

Elander, R. P. (2003). "Industrial production of beta-lactam antibiotics". Applied microbiology and biotechnology 61 (5–6): 385–392.

EL-Mosallamy, W. A., E.; Osman, A. S.; Tabl, H. A., E.; and AL-Tabbakh, A. M. (2015). Phenotypic and Genotypic Methods for Detection of Metallo-Beta-Lactamase (MβL) Producing *Pseudomonas aeruginosa*. Egyptian Journal of Medical Microbiology., 24(3) : 27-35.

Falagas , M. E.; Lourida, P. ;Poulikakos, P.; Rafailidis, P. I. and Tansarlia, G.S.(2014).Antibiotic Treatment of Infections Due to Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: Systematic Evaluation of the Available Evidence, 58(2): 654–663.

Fariñas, MC. Martínez-Martínez, L.(2013). Infecciones causadas por bacteria gram negativas multirresistentes: enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, Acinetobacter baumannii y otros bacilos gramnegativos no fermentadores. Enfermedades Infecc Microbiol Clínica. 2013;