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

تحديد الفعالية التثبيطية لجزيئات الفضة النانوية ضد بعض الأنواع البكتيرية المرضية

بحث مقدم إلى مجلس قسم علوم الحياة في كلية العلوم كجزء من متطلبات نيل درجة البكالوريوس في علوم الحياة

من قبل الطالبة
كوثر عامر صالح

بإشراف
أ.م.د. غيداء جهادي محمد

١٤٤٠هـ ٢٠١٩م

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

﴿ وَقُلْ رَبِّ زِدْنِي عِلْمًا ﴾

صدق الله العلي العظيم

سورة طه (آية ١١٤)

الشكر والتقدير

الحمد لله رب العالمين حمداً يوافي نعمه ويكافئ مزيده والشكر لله على ما وهبني من صبر وهدى وتوفيق تخطيت به الصعاب لانجاز هذا العمل والصلاة والسلام على الرحمة المهداة والنعمة المسداة نبينا محمد (ص) وعلى آله وصحبه وسلم تسليماً كثيرا.

بشعور غامر بالتقدير والوفاء يتقدم الباحث بشكر الخالص مقروناً بجزيل الشكر والعرفان والامتنان الى كل من تفضل وأثرى جوانب هذا البحث سواء برأي أو توجيه أو نصيحة أو ساهم في هذا العمل ولو بجزء يسير واثنى ثناء حسن وأخص بالذكر الدكتورة الفاضلة (غيداء جهادي) على هذه الدراسة وصاحبة الفضل في توجيهي ومساعدتي في تجميع المادة البحثية فجزاها الله كل الخير.

الاهداء

الى من ركع العطاء امام قدميها
الى من جرعت الكأس فارغاً لتسقيني قطرة حب
الى من كللت أناملها لتقدم لنا لحظة سعادة
الى من حصدت الاشواك عن دربي لتمهد لي طريق العلم الى القلب الكبير (أمي)

الى من ارى التفاؤل بعينيهِ ... والسعادة في ضحكتهِ
الى الوجه المفعم بالبراءة وبمحبتك ازهرت ايامي وتفتحت براعم للغد (أخي)

الى توأم روحي ورفيقة دربي .. الى صاحبة القلب الطيب والنوايا الصادقة
الى من رافقتني منذ أن حملنا حقائب صغيرة ومعك سرت الدرب خطوة بخطوة وما تزال ترافقني حتى الان (أختي)

الخلاصة

أجريت الدراسة لتحديد الفعالية التثبيطية لجزيئات الفضة النانوية ضد بعض أنواع البكتريا المرضية ذات المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية والمعزولة من حالات مرضية مختلفة والتي أخذت بعد تشخيصها من قبل المختصين في المختبر البكتريولوجي لمستشفى الديوانية التعليمي خلال الفترة من تشرين الثاني ٢٠١٨ ولغاية شباط ٢٠١٩ .حيث إذ أظهرت جزيئات الفضة النانوية فعالية تثبيطية تجاه الأنواع البكتيرية المدروسة (*Escherchia coli, Proteus mirabilis ,Serratia marecescens*) بطريقة الانتشار بالحفر Well diffusion method بتركيز (٥٠٠ مايكروغرام/مل) وكانت نتيجة أقطار التثبيط بطريقة الانتشار بالحفر للبكتريا المذكورة أعلاه (3,2.8,1.9) سم على التوالي أما طريقة تثبيط النمو فقد أظهرت جزيئات الفضة النانوية فعالية ضد الأنواع البكتيرية المذكورة أعلاه أيضا بتركيز ٥٠٠ مايكروغرام/مل والذي يمثل التركيز المثبط الأدنى والقاتل الأدنى حيث تمت الزراعة من أنبوبة التركيز المثبط الأدنى على وسط الأكار المغذي ولم يظهر أي نمو.

الفصل الاول

Chapter one

المقدمة واستعراض المراجع

Introduction and Literatures Review

الفصل الاول

١-١- المقدمة Introduction

يعد علم الجزيئات النانوية من العلوم الحديثة النشوء تتضمن تصنيع وتطوير بعض المواد الى جزيئات نانوية كالفضة والذهب والبلاتين وقد اكتسب هذا العلم أهمية كبيرة بشكل سريع في عدة مجالات مثل الصحة، التغذية، الصناعة، الاجهزة الالكترونية، الادوية، البصريات إذ أظهرت الجزيئات النانوية خصائص مميزة بالاعتماد على الشكل المظهري والحجم والتركيب الكيميائي لها، يتراوح معدل الحجم ما بين (1-100)نانوميتر (Mansu *et al*.,1995 and Naveen *et al*.,2010).

يتم تصنيع الجزيئات النانوية بالطرق الفيزيائية والكيميائية والبايولوجية لكن الطرق الفيزيائية والكيميائية مكلفة وذات آثار سلبية بيئية وصحية فضلاً عن كونها تحتاج الى توفر الظروف خاصة من ضغط عالي وطاقة حرارية ومواد كيميائية لذلك يتم اللجوء إلى الطريقة البايولوجية التي تعد أسهل لكونها غير مكلفة وآمنة وليس لها تأثير صحي أو بيئي (Thakkar *et al*., 2010; Singhal *et al*., 2011 and Ravindrun *et al*., 2013)

جزيئات الفضة النانوية تعد من اكثر انواع الجزيئات النانوية المعروفة ذات تطبيقات متعددة وتكلفة أقل فضلاً عن امتلاكها فعالية مضادة لمدى واسع من البكتريا الممرضة المقاومة للمضادات الحيوية، حيث اصبح البعض من تلك المضادات عديم الفائدة في علاج الأمراض لا سيما الامراض الحادة والممرضة إذ ان كثرة تعاطي المضادات الحيوية أو زيادة الجرعة عن الحد المسموح به أو قطع العلاج دون اكماله يسمح للبكتريا ان تصبح مقاومة لتلك المضادات بالإضافة الى سهولة الحصول على المضادات الحيوية ادى الى اتساع رفعة المقاومة البكتيرية وتطورها للحد الذي نتج عنه سلالات مقاومة لجميع المضادات الحيوية المتوافرة في العلاج فاصبح من الضروري ايجاد طرق علاجية بديلة لإنتاج مواد فعالة ذات فائدة صحية وبدون آثار جانبية وغير مكلفة اقتصادياً، ومن تلك الحلول البديلة الجزيئات النانوية ومنها جزئيات الفضة النانوية حيث لا يستطيع الكائن المجهري ان يطور مقاومته للجزيئات النانوية بسهولة كما يحصل للمضادات الحيوية (Sosa *et al*.,2010 and Arvizom,2010).

حيث يمكن أن تعمل جزيئات الفضة النانوية على تثبيط تضاعف الـ DNA أو احداث ضرر للغشاء البلازمي للبكتريا فتفقد البكتريا المحتويات السايتوبلازمية أو من خلال تثبيط الانزيمات الحيوية للبكتريا (Zhou *et al*., 2012).

تعتبر بكتريا *Escherchia coli* من البكتريا المرضية الأنتهازية وأمراضيتها تعود لامتلاكها العديد من عوامل الضراوة (Virulence factors) التي تمثل مقياساً لقدرة البكتريا على إحداث المرض في المضيف ومدى قدرتها على مقاومة وتجاوز الخطوط الدفاعية تعود هذه الضراوة لامتلاك البكتريا العديد من العوامل التي يوجد بعضها ضمن التركيب الخلوي والبعض الاخر خارج الجسم مثل الانزيمات وتسهم هذه العوامل في جعل البكتريا اكثر حدة في احداث الخمج (Prescott *et al*., 1990)ومن هذه العوامل: التخمل عند بكتريا *E. coli*، المحفظة، أنتاج الهيمولايسين، انتاج انزيمات البيتا لاكتميز.

تعد بكتريا *Proteus mirabilis* من أهم الأنواع التابعة لجنس الـ *Proteus* وذلك بسبب أمراضيتها حيث تمتلك دورانتهازي في كل من إصابات المجاري البولية، الجهاز التنفسي، الجروح، الحروق، الجلد، الأذن، العين، والجهاز الهضمي عند تناول الأطعمة الملوثة بالبكتريا (Stonkowska *et al*., 2007).

لبكتريا *P. mirabilis* دور في اجتياح مجرى الدم مسببة بذلك تسمم الدم الجرثومي نتيجة للعمليات الجراحية وهو من الأنواع التي يصعب معالجتها وغالباً ما يرافقه الوفاة التي قد تصل نسبتها ما بين (15-88%) (Manos and Belas, 2006).

تمتلك *P. mirabilis* العديد من عوامل الضراوة التي تمكنها من إصابة المضيف وإحداث المرض ومن أهم هذه العوامل قابلية الالتصاق، الاسواط ، عديد السكريد الشحمي، الهيمولا يسن والإنزيم المحلل للبروتين، الإنزيم المحلل لليوريا (Abbas *et al*., 2015).

تعد بكتريا *Serratia marcescens* ممرضاً إنسانيا انتهازياً، وتستفيد من قدرتها على تكوين مجتمعات سطحية متماسكة تسمى الأغشية الحيوية أينما تستطيع وتنتقل عن طريق النقل اليدوي من قبل موظفي المستشفى وتميل إلى استعمال المسالك البولية التنفسية والبولية بدلاً من الجهاز الهضمي (Joshi *et al*., 1989).

تسبب هذه البكتريا التهاب الملتحمة، التهاب القرنية والتهابات القناة الهضمية، التهاب السحايا في الانسان (Fuchs *et al*., 1986).

الهدف من الدراسة:

لتحديد الفعالية التثبيطية لجزيئات الفضة النانوية تجاه بعض أنواع البكتريا المرضية (*Escherchia coli, Proteus mirabilis , Serratia marcescens*) والمعزولة من حالات مرضية مختلفة.

١-٢- استعراض المراجع Literatures Review

١,٢,١.الجسيم النانوي

الجسيم النانوي في تقنية النانو يعرف انه جسيم يتصرف بوصفه وحدة كاملة من حيث انتقاله وخصائصه وتصنف ايضاً وفق الحجم: من حيث القطر، الجسيمات الدقيقة تتراوح ما بين 100 و 2500 نانوميتر في حين تصنف الجزيئات متناهية الصغر فأن الجسيمات النانوية نفس خصائص المرتبطة بالحجم، والتي قد تختلف بصورة واضحة عن تلك التي يمكن ملاحظتها في الجسيمات الدقيقة أو المواد السائبة (Cristina *et al*., 2007).

على الرغم من ان حجم معظم الجزيئات ستناسب مع العرض السابق الا ان الجزيئات الفردية غالباً ما لا يشار إليها على انها جسيمات نانوية، تتسم العناقيد النانوية بوجود بعد واحد على الاقل يتراوح ما بين 1الى 10 نانوميتر بالاضافة الى توزيع صغير الحجم، كما تعد المساحيق النانوية كتلاً من جسيمات متناهية الصغر الجسيمات النانوية بالاضافة الى العناقيد النانوية (Fahlamn, 2007).

وغالباً ما يشار الى البلورات المفردة نانوية الحجم أو الجسيمات المفردة النطاق متناهية الصغر على انها بلورات نانوية وتتركز ابحاث الجسيمات النانوية حالياً حول الفائدة العلمية المكثفة، بسبب التنوع العريض للتطبيقات المحتملة في المجالات الطبية الحيوية والبصرية الالكترونية (Nadiyanto*et al*., 2009).

تلعب الجسيمات النانوية فائدة كبيرة حيث انها تمثل جسراً للتواصل بين المواد السائبة والبنى الذرية والجزيئية حيث يجب ان يكون للمادة السائبة خصائص ثابتة فيزيائية بغض النظر عن حجمها الا انه غالباً ما يتم ملاحظة الخصائص القائمة على الحجم النانوي. ومن ثم تغير خصائص المادة باقتراب حجمها من المقياس النووي، حيث تصبح لنسبة الذرات على سطح المادة اهميتها الخاصة أما بالنسبة للمواد السائبة ة والتي يزيد حجمها عن واحد ميكرون فأن نسبة الذرات على السطح ليست مهمة في علاقتها مع عدد الذرات في مجموع المادة. كما قد تغزو الخصائص المثيرة وفي بعض الاحيان غير المتوقعة للجسيمات النانوية بصورة كبيرة الى مساحة سطح المادة الضخم، والتي تسيطر على التوزيعات التي تتم في تلك المادة وعلى سبيل المثال غالباً ما تكون الجسيمات النانوية للذهب الاصفر والسليكون الرمادي حمراء اللون حيث تذوب جزيئات الذهب عند درجات الحرارة اقل بمقدار (300درجة مئوية لجم 2.5 نانو متر) عن الواح الذهب والتي تتطلب (1064 درجة مئوية) (Burrel *et al*., 1976).

١,٢,٢.الدور الحيوي

لا تعد الفضة أو مركباتها من المركبات السامة على العكس من الفلزات الثقيلة الأخرى، وذلك لأنها لا تمتص بشكل كبير في جسم الانسان عند ابتلاعها، وحتى التي يمتص منها فأنها غالباً ما تحول الى مركبات فضة غير منحلة أو تعقد بواسطة بروتينات ميتالوثيونين، رغم ذلك فأن فلوريد الفضة ونترات الفضة هي مركبات مخدشة يمكنها إيذاء أنسجة الجلد، كما تسبب التهابات معوية واسهال واضطرابات اخرى وجد ان الحيوانات المحقونة بجرعات متكررة من املاح الفضة تصاب بفقر الدم والنمو البطيء كما تتماوت خلايا الكبد والكليتين. تختصر الأعراض الملازمة لأخذ جرعات من الفضة على شكل معلق أو لأملاحها باسم التسمم بالفضة، عند امتصاص الفضة أو مركباتها بجرعات كبيرة في جهات الدوران يصاب الجسم بحالة نادرة الحدوث تسمى التفضض حيث يصبح لون جلد الجسم ازرقاً رمادياً وفي مناطق العينين والأغشية المخاطية (Glehr *et al*., 2013).

١,٢,٣.التخليق (التحضير)

هنالك طرق عديدة ومختلفة لإنتاج جسيمات الفضة النانوية ويمكن تقسيمها الى ثلاث فئات عريضة: الترسيب الفيزيائي للبخار PVD ، غرس الايونات أو الكيمياء الرطبة (Stepanav *et al*., 2002).

١,٢,٤.تقنية النانو

تقنية الجزيئات متناهية الصغر أو تقنية الصغائر أو تقنية النانو هو العلم الذي يهتم بدراسة معالجة المادة على المقياس الذري والجزيئي، تهتم تقنية النانو بابتكار تقنيات ووسائل جديدة تقاس ابعادها بالنانومتر وهو جزء من الألف من الميكرومتر أي جزء من المليون من المليمتر عادة تتعامل تقنية النانو مع قياسات بين 1-100نانوميتر اي تتعامل مع تجمعات ذرية تتراوح بين خمس ذرات الى الف ذرة وهي ابعاد اقل كثيراً من ابعاد البكتريا والخلية الحية حتى الان لا تختص هذه التقنية بعلم الاحياء بل تهتم بخواص المواد وتتنوع مجالاتها بشكل واسع من اشباه الموصلات الى طرق حديثة تماماً معتمدة على التجمع الذاتي الجزيئي. هذا التحديد بالقياس يقابله اتساع في طبيعة المواد المستخدمة فتقنية النانو تتعامل مع اي ظواهر او بيانات على مستوى النانو الصغير مثل هذه الظواهر النانوية يمكن ان تتضمن تقييد كمي التي تؤدي الى ظواهر كهرومغناطيسية وبصرية جديدة للمادة التي يبلغ حجمها بين حجم الجزيء وحجم المادة الصلبة المرئي (Koenderink *et al*., 2013).

1.٤,٢,١.مبادئ تميز تقنية النانو

هنالك العديد من المبادئ التي تتميز بها تقنية النانو عن التقنيات المعروفة لدينا وهي سبب اهتمام العلماء بالوصول إلى هذا الحجم النانوي فقد يخطر على بال الإنسان ما الفائدة من هذه التقنية ولماذا نحتاج الى الوصول لهذا الحجم الدقيق وهو سؤال طرحه العالم الفيزيائي ريتشارد فاينمان وأجاب عنه العالم الفلسطيني منير نايفة وتعرض في هذا الجدول أهم المبادئ والفائدة منها: (نهى علوي الحبشي، ٢٠١١)

المبدأ	الميزة
- امكانية التحكم بتحريك الذرات منفردة واعادة ترتيبها	امكانية بناء اي مادة في الكون لان الذرة هي وحدة البناء لكل المواد
- الخصائص الفيزيائية والكيمائية للمادة عند مقياس النانو تختلف عن الخصائص لنفس المادة في الحجم الطبيعي	اكتشاف خصائص مميزة للمواد ليستفاد منها في الكثير من الاختراعات والمجالات التطبيقية
- تعتمد تقنية النانو على مبادئ الفيزياء والكيمياء والاحياء والهندسة الكهربائية والالكترونية	تربط العلوم وتشجع الجميع باختلاف تخصصاتهم العلمية على الدخول في مجالها والتعاون فيما بينهم
- امكانية التحكم بالذرات في صنع المواد والآلات وتنقيتها من الشوائب وتخليصها من العيوب	تصبح خصائص المواد والآلات أفضل، فهي اصغر واخف واقوى واسرع واقل استهلاكاً للطاقة.
تعتمد تقنية النانو على الابحاث العلمية التي تتصف بإمكانية تطبيقها في اختراعات واستخدامات مفيدة	تحول الخيال العلمي الى واقع حقيقي.

٥,٢,١ .جنس الـ *Escherichia*

١,٥,٢,١ .التوزيع Distribution

الجراثيم الموجودة في هذا الجنس منتشرة انتشاراً واسعاً في الطبيعة ولكن وجودها يكون بصورة طبيعية في امعاء الانسان والحيوان – مجموعة منها ثبتت في كونها تحدث التسمم المعوي في الانسان – الاطفال ومجموعة ثانية تصيب الحيوانات وتتسبب في التسمم والاسهال المعوي فيها، هذه الجراثيم ذات صبغة كرام سالبة وتنمو على كل الاوساط الزرعية وتخمر سكر اللاكتوز من اهم هذه الانواع *E. coli* : في البدء عزل هذا الميكروب من غائط الاطفال الرضع ويعتبر احد مسببات الاسهال الصيفي كما ان الجرثوم موجود في محتويات الأمعاء لكل الفقريات وهو واسع الانتشار وممكن انتشاره عبر المياه والأغذية الملوثة بالغائط (Orville *et al*., 1971).

٢,٥,٢,١ .الأمراضية Pathogenesis

تسبب مرض الكوليباسلوسزColi bacillosis او الاسهال الابيض، كما يصيب الحيوانات والانسان اصابات تجرثم دموي يصيب الابقار ويتسبب في التهاب حوض الكلية والتهاب المهبل والحبل السري والتهاب المثانة (Orville *et al*., 1971).

٣,٥,٢,١.عوامل الضراوة Virulence Factors

١- التخمل

وهي من اهم عوامل الضراوة الموجودة على سطح الخلية وهي انواع مختلفة من الزوائد يطلق عليها اعضاء الالتصاق التي لها دور في الالتصاق على سطح خلية العائل بالإضافة إلى ذلك قد يكون لها وظائف أضافية أخرى منها غزو نسيج العائل (Emdy *et al*., 2003).

٢- المحفظة Capsule

تحاط بعض أنواع البكتريا بطبقة مخاطية مكونة من متعدد السكري وتقع خارج الجدار الخلوي وتسمى هذه الطبقة بالمحفظة Capsule عندما تكون منتظمة وملتصقة بالخلية بحيث يمكن إزالتها بسهولة أما إذا كانت متكونة من مواد غير منتظمة ولا يمكن ازالتها بسهولة فتسمى الطبقة اللزجة Slim layer (Prosecott *et al*., 1990).

٣- إنتاج الهيمولايسين

الهيمولايسين أنزيم ذو طبيعة بروتينية يفرز خارج الخلية من قبل أنواع من البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام (Lane *et al*., 2011).

٤- إنتاج إنزيمات البيتا لاكتميز

البيتا لاكتميز هي إنزيمات تنتج بواسطة بعض الانواع البكتيرية المرضية وتشمل البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام وتوجد مجموعات واصناف عديدة من هذه الانزيمات التي

تقاوم المضاد الحيوي وتمتلك بكتريا *E. coli* إنزيمات البيتا لاكتميز كجزء من عوامل الأمراضية لديها (Bush *et al*., 1995 and Macfaddin, 2000).

٦,٢,١ .جنس الـ *Proteus*

الجراثيم في هذا الجنس عبارة عن عصيات مختلفة الاطوال ذات صبغة كرام سالبة ، متحركة بواسطة أسواط تحيط الجسم كله لا تخمر سكر اللاكتوز(Orville *et al*., 1971) .

١,٦,٢,١.التوزيع

تعيش بكتريا *P. mirabilis* في أمعاء الإنسان وأنواع عديدة من الحيوانات (Normal flora) ويمكن أن توجد في التربة والمياه الملوثة والأسمدة وقد تم عزلها من نماذج مختلفة مثل الإدرار والجروح والحروق والدم واللعاب بوصفها ممرضات انتهازية (Davis and flood, 2011).

٢,٦,٢,١. الأمراضية

P. mirabilis قادر على إحداث التهابات عرضية في المسالك البولية بما في ذلك التهاب المثانة cystitis والتهاب حويض الكلية pyelonephritis وهي موجودة في حالات البيلة الجرثومية بدون أعراض asymptomatic bacteriuria ، خاصة في كبار السن والمرضى الذين يعانون من مرض السكري من النوع ٢ (٢ ، ٣). يمكن أن تسبب هذه الالتهابات أيضًا تجرثم الدم والتقدم في عملية تجرثم البول المهددة للحياة. بالإضافة إلى ذلك ، يمكن أن تسبب الأصابة ببكتريا P. mirabilis الى تكوين الحصى البولية(Matthews and Lancaster, ٢٠١١).

٣,٦,٢,١.عوامل الضراوة

١- **قابلية الالتصاق:** تعد قابلية الجراثيم على الالتصاق بالخلايا الطلائية للمصنفين (Adherence) تعد من أهم عوامل الضراوة التي تمكنها من إحداث الإصابة منها إصابة المجاري البولية، وهذه القابلية ترتبط مع ما يحتويه سطح الجراثيم من أهداب Pili أو خملة (Fimbriae) والتي ثبت أن لها دوراً مهماً في آلية الالتصاق وقد لوحظ أن الخلايا ذات الخملة الكثيفة لها قدرة على أحداث الإصابة أفضل من الخلايا ذات الخملة القليلة (Abbas *et al*.,2015).

٢- **الاسواط:** يكون للأسواط دور في الحركة الانثيالية لجراثيم *P.mirabilis* فضلاً عن أهمية هذه الاسواط في استيطان الجراثيم وانتشارها في منطقة الإصابة إذ تمتلك هذه الجراثيم اسواطاً محيطية تتراوح أعدادها ما بين (6-10) وطولها حوالي (1-2) مايكرومتر (Kishore, 2012).

إن الانثيالية (Swarming) هي حركة بشكل أمواج تبدأ من حافة المستعمرة الأصلية وتنتشر بشكل حلقات متحدة المركز على الأسطح المصلبة بواسطة الاكار أو الجيلاتين (Liaw *et al*.,2003).

٣-عديد السكريد الشحمي:- يعد عديد السكريد الشحمي (Endotoxin) تتكون جزيئته من ثلاث مناطق هي: المستضد الجسمي (Somatic antigen) ومنطقة اللب (core) واللبيد A(Lipid A)(Rozal ski, 2008) يعد الـ LPS من اهم عوامل الضراوة المسببة للمريض في هذه الجراثيم السالبة اذ انه يشترك في العديد من الوظائف الفسيولوجية الممرضة منها:- الحمى، انخفاض ضغط الدم، انتشار التخثر في الأوعية (Kaca *et al*.,2009).

٤- الهيمولايسين Hemolysin :

يتميز الهيمولايسين بطبقة انزيمية لها تأثير سمي على الخلايا اذ تمتاز بقابليتها على تحليل كريات الدم الحمر وتمكن الجراثيم المنتجة لها في إصابات المجاري البولية من خلال فعاليتها السمية الخلايا الطلائية للكلية (Alamuri *et al*, 2009).

٥-الانزيم المحلل للبروتين:-

تنتج جرثومة *P. mirabilis* انزيمات حالة للبروتينات proteases من النوع المعدني (Metallo proteinase) لها دور في تحطيم الكلوبيولينات المناعية IgG, IgA لخلايا المصنف ومن ثم فقدان دورها المناعي في حماية أنسجة المصنفين من الجراثيم ومنتجاتها (Pellegrino *et al*, 2003).

٦-الانزيم المحلل لليوريا Urease:

يعد هذا الانزيم من عوامل الضراوة المهمة التي تنتجها جراثيم *P. mirabilis* وله دور في إمراضيه سلالات عديدة من هذه الجراثيم (Trozewska *et al*, 2014) .

٧,٢,١ . بكتريا *Serratia marcescens*

هي بكتيريا سالبة لكرام انتهازية تصنف في قبيلة *Klebsielleae* والعائلة الكبيرة *Enterobacteriaceae*. تنتشر أنواع السيرشيا في البيئة ، ولكنها ليست مكونًا شائعًا من الفلورا الطبيعية للأنسان(Auwaerter, 2007).

٢,٧,٢,١. التوزيع

توجد عادةً في الجهاز التنفسي والبولي للبالغين في المستشفى وفي الجهاز الهضمي للأطفال. نظرًا لوجودها الوفير في البيئة ، وتفضيلها للظروف الرطبة ، تتواجد *S. marcescens* عادة في الحمامات (خاصة في رص البلاط ، وزوايا الدش ، وخطوط مياه

المرحاض ، والأحواض) ، حيث تتجلى في اللون الوردي والوردي - اللون البرتقالي أو البرتقالي والأغشية الدسمة التي تغذي المواد المحتوية على الفسفور أو المواد الدهنية مثل بقايا الصابون والشامبو(Williamson *et al.*,2006) .

٣,٧,٢,١.الأمراضية

يمكن أن تسبب *S. marcesscens* عدوى في الأنسان في عدة مواقع بما في ذلك الجهاز البولي والجهاز التنفسي والجروح والعين حيث قد تسبب التهاب الملتحمة والتهاب القرنية، التهاب باطن المقلة والتهابات القناة الهضمية كما انه سبب نادر للالتهاب الشفاف والتهاب العظم النقي (خاصة في الأشخاص الذين يتعاطون العقاقير الوريدية بشكل ترفيهي). والالتهاب الرئوي والتهاب السحايا وتقاوم معظم سلالات *S. marcescens* العديد من المضادات الحيوية بسبب وجود عوامل R من نوع البلازميد الذي يحمل جيناً واحداً أو أكثر يشفر المقاومة وكلها تعتبر مقاومة جوهرياً للامبيسيلين والماكروليدات (Fuchs *et al.*,1986).

٤,٧,٢,١.عوامل الضراوة

وصفت *S. marcescens* منذ العصور القديمة بأنها متنكرة على أنها دماء بسبب قدرتها على إنتاج صبغة حمراء. في الوقت الحالي من هذا القرن ، أدت هذه الصبغة الحمراء المميزة للسريشيا المقترنة مع أنخفاض مستوى الضراوة الواضح ، إلى استخدامها كعلامة بيولوجية للعدوى. وبالتالي ، تم استخدام *S. marcescens* في عدد من تجارب انتقال البكتيريا الكلاسيكية ، والتي أدت إلى تحسين فهم وبائيات العدوى (Yu,1979).

الفصل الثاني

Chapter Two

المواد وطرق العمل

Materials and Methods

الفصل الثاني

٢.المواد وطرق العمل: Materials and Methods

1-2 المواد: Materials

أ-الأجهزة والمعدات المستخدمة: Equipments and Instruments

جدول (٢-١)الأجهزة والمعدات المستخدمة

اسم الجهاز	الشركة المصنعة (المنشأ)
١- الحاضنة Incubator	Gallen Kamp (England)
٢- ميزان الكتروني حساس Sensitive electronic balance	Gallen Kamp (England)
٣- أنابيب اختبار Tests Tubes	Super star (India)
٤- اطباق بلاستيكية Disposable Petri dishes	Al-Hani (USA)
٥- دورق مخروطي Conical flasks	BBL/(USA)
٦- Sterilized cotton swabs	Al-Hani Company (Lebanon)
٧- مايكروبابيت Micro pipette	CYAN (VWR) Belgium (USA)
٨- Hood	Labogene (Denmark)
٩- ثاقب فليني Cork Borer	Sigma-Aldrich(Germany)

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

جدول (٢-٢) الأوساط الزرعية

اسم الوسط	الغرض من استخدامه
Brain heart infusion Medium	تنمية وحفظ العزلات البكتيرية
Nutrient broth	لتنمية وحفظ العزلات البكتيرية
ماكونكي اكار MacConkey agar	لعزل معظم البكتريا السالبة لصبغة كرام وتتميز المخمرة للاكتوز من غير المخمرة
Muller Hinton agar	لفحص الحساسية لجزيئات الفضة النانوية

٢-٢- طريقة العمل

اولاً: تحضير الأوساط الغذائية الزراعية

حضرت الأوساط الزراعية Muller Hinton agar ,nutrient agar,MacConkey agar, بالاعتماد على التعليمات المثبتة على العبوة من قبل الشركة المصنعة وضبط الأس الهيدروجين PH=7 ولأجل تعقيم هذه الأوساط وضعت في الموصدةAutoclave بضغط 1باوند/ انج ودرجة حرارة ١٢١مْ لمدة ١٥ دقيقة ثم صبت في الاطباق وتركت حتى تتصلب ليتم العمل عليها بعد ذلك.

ثانياً: التعقيم Sterilization

١- التعقيم الرطب Autoclaving: تم تعقيم الأوساط الغذائية كافة والمحاليل بالموصدة عند درجة حرارة ١٢١مْ ولمدة (١٠-١٥) دقيقة.

٢- التعقيم الجاف Dry sterilization: استخدم الفرن الكهربائي لتعقيم الزجاجات عند درجة حرارة ١٨٠مْ لمدة ساعتين.

ثالثاً: جمع العزلات البكتيرية Collection of Bacterial Samples

لقد تم جمع العزلات البكتيرية من مختبر البكتيريولوجي في مستشفى الديوانية التعليمي خلال الفترة من تشرين الثاني ٢٠١٨ ولغاية شباط ٢٠١٩ بعد عزلها من حالات مرضية مختلفة وتشخيصها من قبل المختصين في المختبر.حيث تم جلب العزلات إلى المختبر في قسم علوم الحياة/ كلية العلوم/ جامعة القادسية وفي ظروف قياسية وزرعت على الأوساط الزراعية المناسبة.

رابعاً: تنشيط العزلات Cultivation of isolates

لقد تم زرع العزلات على وسط MacConkey agar اذ قمنا بتخطيط العينة المأخوذة على الوسط الزر عي بالقرب من نار مصباح بنزن وبعد ذلك تم حضن الطبق الملقح بالعينة في الحاضنة لمدة ٢٤ ساعة وبدرجة حرارة ٣٧مْ بشكل مقلوب ويراقب النمو (Collee *et al.*, 1996).

خامساً: تشخيص العزلات البكتيرية: Identification of bacterial isolates

تم تشخيص العزلات من خلال ما يأتي:-

١- خصائص المستعمرات المظهرية والمزرعية: Morphological and cultural characteristic

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

سادساً: حفظ العزلات البكتيرية: Preservation of bacterial isolates

حفظت العزلات البكتيرية على وسط Brain heart in fusion broth و Nutrient broth المدعمة بـ ١٥% كليسيرول بدرجة ($-20\ C^{\circ}$) لحين الاستخدام (Collee *et al.*,1996).

سابعاً: أختبار الفعالية التثبيطية لجزيئات الفضة النانوية ضد البكتريا Antibacterial activity of AgNPs

أختبرت الفعالية التثبيطية لجزيئات الفضة النانوية ضد الأنواع البكتيرية (*E. coli*, *Proteus mirabilis* ,*Serratia marcescens*) بأستخدام طريقة الأنتشار من الحفر Well Diffusion Method (Vandepitte *et al.*,1991) حيث تم أتباع الخطوات التالية:

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

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

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

٤- تم عمل خمس حفر بقطر (٦ملم) في وسط مولر بواسطة ثاقب فليني على أبعاد متساوية.

٥- باستخدام الما يكروبابيت نقل 50-100 ما يكروليتر من كل تركيز من تراكيز جسيمات الفضة النانوية (50, 100,150,250, and 500 ug/ ml of Ag NPs) المحضرة من محلول الفضة بتركيز (200 جزء بالمليون 200 PPM) إلى الحفر الموجودة في الوسط

حضرت التراكيز بتطبيق المعادلة التالية وباستخدام الماء المقطر المعقم الخالي من الايونات:-

(Stock Concentration) X (Stock Volume required) =(Concentration needed) X (The Volume of final dilution)

Here,

1000 ppm x ? = 1 ppm x 1000 mL? = 1 mL from the stock in a 1000 mL distilled water.

٦-تركت الأطباق لمدة 10 دقائق للسماح بانتشار المادة النانوية في الوسط ثم حضنت في الحاضنة عند درجة 37 مْ لمدة 18-24 ساعة.

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

٨-حدد التركيز المثبط الأدنى(MIC) بعد الحضن لكل نوع من أنواع البكتريا المدروسة والذي يمثل أقل تركيز من محلول جزيئات الفضة النانوية لم يلاحظ فيه نمو بكتيري مرئي .

٧- بعدها تم التخطيط على وسط نيوترنت أكار جديد Nutrient agar (لايحتوي على أي تركيز من تراكيز محلول جزيئات الفضة النانوية المستخدمة) من أنبوبة التركيز الذي مثل التركيز المثبط الأدنى وحضنت لمدة ٢٤ ساعة بدرجة ٣٧ مْ لتحديد التركيز القاتل الأدنى(MBC)،حيث أن عدم ظهور نمو بكتيري على سطح الوسط بعد فترة الحضن يدل على أن هذا التركيز هو التركيز القاتل الأدنى MBC.

الفصل الثالث

Chapter Three

النتائج والمناقشة

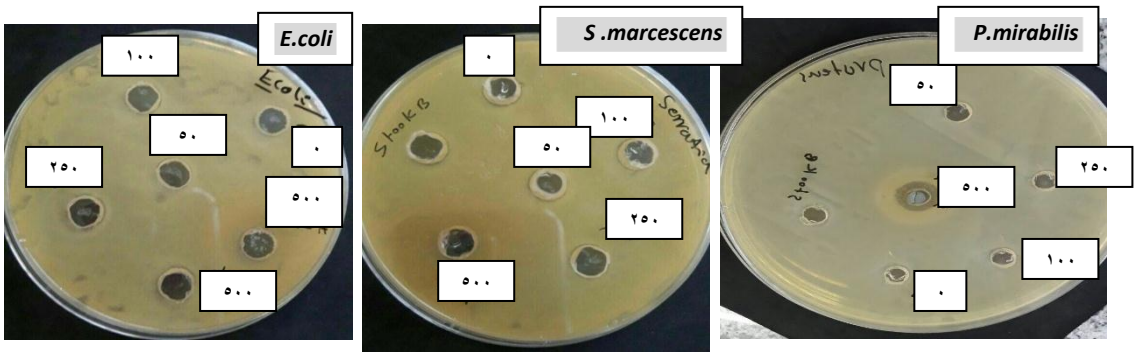
Results and Discussion

الفصل الثالث

٣.النتائج والمناقشة

3-1- نتائج الفعالية التثبيطية لجزيئات الفضة النانوية تجاه الأنواع البكترية قيد الدراسة

حددت الفعالية التثبيطية لجزيئات الفضة النانوية بطريقة الانتشار من الحفر تجاه ثلاثة أنواع من البكتريا وهي (*E. coli, Proteus mirabilis, Serratia marcescens*) والتي أخذت بعد زراعتها وتشخيصها من قبل المختصين في مختبر البكتريولوجي لمستشفى الديوانية التعليمي إذ لوحظت الفعالية التثبيطية لجزيئات الفضة النانوية من خلال مناطق التثبيط التي حددت حول الحفر في الوسط المنماة عليه تلك الأنواع وكما موضح في شكل (٣-١)حيث كان قطر منطقة التثبيط لبكتريا *E. coli* هو(٣ سم) وقطر منطقة التثبيط لبكتريا Proteus mirabilis (2.8 سم) أما بكتريا *Serratia marcescens* فقد كان قطر التثبيط لها(1.9سم) وكما موضح في جدول (٣-١).



شكل (٣-١) المناطق التثبيطية لتراكيز جزيئات الفضة النانوية (0,50,100,250,500) مايكروغرام/ مل ضد الأنواع البكتيرية المدروسة .

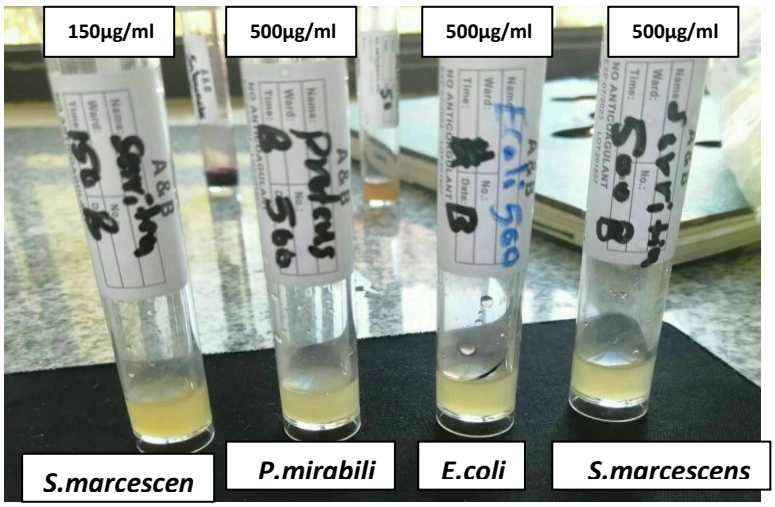
جدول (٣-١) تركيز الفضة النانوية مع قطر التثبيط للأنواع البكتيرية المدروسة

النوع البكتيري	التركيز (µg/ml)	القطر (سم)
E.coli	500	3
Proteus mirabilis	500	2.8
Serratia marcescens	500	1.9

µg: Microgram **ml: Milliliter**

٣-٢-نتائج قياس التركيز المثبط الأدنى والتركيز القاتل الأدنى (MIC &MBC)

استخدمت طريقة التخافيف لقياس التركيز المثبط الأدنى (MIC) والتركيز القاتل الأدنى (MBC) حيث استخدمت مجموعة من الأنابيب الحاوية على وسط مرق مولرهنت (Muller Hinton broth) والحاوي على تراكيز مختلفة من محلول جزيئات الفضة النانوية (500, 250, 100,50 مايكروغرام/مل وحضنت مع كثافة قياسية من الأنواع البكتيرية المدروسة لمدة ٢٤ ساعة حيث لوحظ عدم ظهور نمو لكل من (*E. coli* و *P.mirabilis*) بتركيز (٥٠٠ مايكروغرام/مل) وبتركيز ١٥٠ مايكروغرام/مل لبكتريا *Serratia marcescens* والذي مثل التركيز المثبط الأدنى (MIC) وهذه النتائج موضحة في شكل(٣-٢) ، وعند الزراعة من الأنبوبة الحاوية على هذا التركيز(١٥٠ & ٥٠٠) مايكروغرام /مل على وسط الأكار المغذي Nutrient agar والحضن لمدة (24) ساعة لوحظ أيضا عدم ظهور نمو بكتيري على سطح الوسط لكل الأنواع البكتيرية المختبرة مما يدل على أن التركيز المثبط الأدنى (١٥٠&٥٠٠ مايكروغرام /مل)هو نفسه التركيز القاتل الأدنى (MBC) لكل من بكتريا (*E.coli*, *P.mirabilis* & *S.marcescens* على التوالي .



شكل (٣-٢):أنابيب التركيز المثبط الأدنى(MIC) للأنواع البكتيرية

أن امتلاك جزيئات الفضة النانوية فعالية تثبيطية ضد الأنواع البكتيرية المرضية المختبرة ربما تعود لصغر حجم الدقائق النانوية ومساحتها السطحية الكبيرة حيث (كلما صغر الحجم تجمعت بأعداد اكبر على سطح الخلايا ويؤدي الى زيادة سميتها للكائنات الدقيقة) مما يؤثر على نفاذية الغشاء البلازمي للبكتريا وبالتالي موت الخلية (Lin *et al*., 2014).حيث أن المبدأ واحد لكل الجزيئات النانوية التي تمتلك فعالية تثبيطية للنمو البكتيري هو أن هذه الجزيئات تمتلك

شحنة موجبة فترتبط بالشحنة السالبة لسطح الخلية البكتيرية فيؤدي تجمع الجزيئات على سطح الغشاء الخلوي إلى تحوير في الصفات الفيزيائية والكيميائية للغشاء حيث يحصل له ضرر يؤدي إلى فقدان وظائفه كالنفاذية وتنظيم الأزموزية ونقل الألكترونات والتنفس(Marambio – Jones and Hoek, 2010).

إن الالية التي يتم فيها تفاعل الدقائق النانوية مع الخلايا البكتيرية هي ان الكائنات الدقيقة تحمل شحنات سالبة بينما الاكاسيد المعدنية النانوية تحمل شحنة موجبة مما يخلق تجاذباً كهرومغناطيسياً بين البكتريا وسطح الدقائق وان الدقائق النانوية تطلق الايونات التي تتفاعل مع مجموعة الثايول(SH -) للبروتينات الناقلة للمواد الغذائية التي تبرز من غشاء الخلية البكتيرية مما يخفض نفاذية الغشاء وبالتالي موت الخلية (Zhang *et al*., 2009).

إن ميكانيكية تثبيط $AgNP_s$ ربما أيضا تعود لتأثيرها على قابلية DNA للتضاعف والتعبير الجيني للبروتينات وكذلك التأثير على مختلف البروتينات الخلوية والأنزيمات الضرورية في إنتاج ATP حيث تصبح غير فعالة (Yamanaka *et al*.; 2005).

نستنتج من هذه الدراسة كفاءة جسيمات الفضة النانوية في التأثير على بعض الأنواع البكتيرية المرضية .

المصادر العربية Arabic References

- كتاب ما هي تقنية النانو (مقدمة مختصرة بشكل دروس مبسطة) لنهى علوي الحبشي ١٤٣٢هـ - ٢٠١١م وزارة الثقافة والاعلام في المملكة العربية السعودية.

المصادر الأنكليزية English References

- Arvizo, R.R. (2012). Intrinsic therapeutic applications of noble metal nanoparticles: past, present and future chem Soc. Rev. 41. P: 29-43.
- Auwaerter, P. (2007). "Serratia species". Point-of-Care Information Technology ABX Guide. Johns Hopkins University.
- Burrel, J.P. (1976). "Size ; Buffat, ph effect on the melting temperature of gold particles". Physical Review A. 13(6): 2287.
- Bush, K.; Jacoby G. and Medeiros, A. (1995). A Functrioral classification scheme for B-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents chem other 39: 111. 1233.
- Collee, J. G. ;Fraser, A. G. ;Marmino, B. P. and Simons, A. (1996). Mackin and McCartney Practical Medical Microbiology. 14th ed., The Churchill Livingstone, Inc. U. S. A.
- Cristina, B.;Ivan ,P. and Kevin, R.(2007). Nano materials and Nano particles: Sources and Toxicity Biointerphase. 2: MR17-MR71.
- Davis, N.F. and food, H.D. (2011). Plasmid mediated Virulence factors of some *Proteus* isolates. A card. J. biology. Sci., 2(1): 7-22.
- Emdy, L.; Kerenyi, M, M. and Nagy, G. (2003). Virulence factors of Uropatho genic *E. coli*. International J. of Am-Ag. 22(2): 29-33.
- Fahlman, B.D. (2007). Materials chemistry springer 283-282.A.B.D. Nadiyanto; S. G Kim; F. Iskandar, and K. Okuyama (2009). 447-453.
- Fuchs, R.L. and Mcpherson, S.A.(1986). Cloning of a *Serratia marcenscens* gene encoding chitinase applied and Environmental Microbiology, 52: 504-509.

- Glehr, M., A. Leithner, J. Friessnbichler, W. Goessler, A. Avian, D. Andreou, W. Maurer – Ertl, R. Windhager,and P. U. Tunn(2013): Argyria Following the use of silver – coated megapeos theses. In the Bone and Joint Journal Band 95-B, Ausgabe 7, S. 988-992.
- Joshi, S.; Kozlowski, M.; Richens, S. and Comberbach, D.M. (1989). Chitinase and Chitobiase production during fermentation of genetically improved *Serratia liquefaciens*.
- Kaca. W.; Arabski, M.; Fudala, R.; Holmstrom, E.; Sjoholom, A.; Weintraub, A.; Futoma – Koloch.; B.; Bugal – ploskonska, G. and Dorszkiewicz, W. (2009). Human complement activation by smooth and rough *Proteus mirabilis* Lipopolysaccharides. Arch. Immunol. Ther. Exp. 57: 383-391.
- Koenderink, G.; Jadidi, T.; Nashaghi, S. and Mashaghi.(2013). Lipid Nano technology. Int. J. Mol. Sci. (14): 4242-4282.
- Lane, D.R. and Takhar, S.S. (2011) .Diagnosis and Management of Urinary tract infection and pyelonephritis Emergency medicine clinics of North America 29 (3): 539-52.
- Liaw, I.M., A.W. Lam, E.W. Cham, and A.F. Cheng. (2003). What have we learnt from community – acquired in factious in Hong Kong Antimicro. Agents chem other. 51: 895-904.
- Lin, X. , J. Li, S. Ma, Gliu,and K. Yang.(2014). Toxicity of Tio_2 Nanoparticles to *Escherichia coli*: Effect of particle size, crystal phase and water chemistry. (2014). PLOS ONE 9(10): e110247.
- Manos, J. and Belas, R. (2006). The Genera *Proteus*, *Providencia*, and *Morgnella*. Infect Immun.; 6: 245-269.
- Mansur, H.S; Grieser, F.; Marychurch, M.S.; Biggs, S., Urquhart, R.S. and Furlong, D. (1995).Photoelectro chemical properties of 9-state eds particles in arachidic acid Langmuirblodgett Films. J chemSoc Faraday Trans. 91.P: 665-672.

- Marambio - Jones, C. and Hoek, E.M.V.(2010). Review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. Journal of Nanoparticle Research.12.P:1531 -1551.
- Matthews, S. J. and Lancaster, J.W.(2011). Urinary tract infections in the elderly population. Am J Geriatr Pharmacother,9:286–309. [PubMed] [Google Scholar]
- Naveen, K.S.H.; Kumar, G.; Karthik, L. and Rao, K.V.B. (2010). Extracellular biosynthesis of Silver nanoparticles using the Filamentous. Fungus *Pencillium spp*. Arch Appl. Sci. Res. 2.p: 161-167.
- Orville, W. and Curtis, E. L. (1971). Micro organisms and man published by John Wiley and sons, Inc. New York, London, Sydney, Toronto.
- Pellegrino, R.; Scavone, P. ;Umpierrez, A.; maskell, D.J. and Zunino, P. (2003). *Proteus mirabilis* Uroepithelial cell adhesion (UCA) Fimbria plays a role in the colonization of the urinary tract. Pathog Dis, 67: 104-107.
- Prescott, L.M.; Harelry, L.P. and Klein, D.A. (1990). Microbiology 1st ed. W.M.C. Brown publisher. New York.
- Rai, M.; Yada, A.; Bridge, P. and Gade, A. (2009). Myco nanotechnology: A New and. Emerging science, in Applied My cology. Ed Rai MK and Bridge PD. CAB International Publishers, New York. P: 258-267.
- Rozalski, A. (2008). Lipopoly saccharide (Lps, endotoxin) of *Proteus* bacteria – chemical structure, serological specificity and the role in pathogenicity. Folia Biology. Oecolog. 4: 5-24.

- Sosa, D.J.; Byarugaba, D.K.; Amabile, C. and Hsueh, P. (2010). In: Antimicrobial Resistance in Developing counties, Vol. 97. Springer, New York. P: 908-923.
- Stankowsha, P.K., S.Y. Gbedema, S.N.A. Quay, Y. Adu-Sarkodie and C.O. Okrah. (2007). Occurrence, species distribution and antibitca resistance of proteus isolates: A case study at the komfo Anokye teaching.
- Stepanov, A.L.; Popok, V.N. and Hole, D. E. (2002). Glass physics and chemistry 28: 90.
- Thakkar, K.N. and Mhatre, S.S. (2010). Parikh, R.Y. Biological synthesis of metallic nanoparticles. Nanomed. Nanotechnol. 6.p: 257-262.
- Trezewsska, A.P. (2003) .Crystallization of urine mineral. Depend on the chemical nature of *Proteus* polysaccharides Med Microb b. 52: 471-477.
- Vandepitte, J. K. ;Engback, P.; Piot and G . Heuck. (1991). Basic laboratory procedures in clinical bacteriology. WHO Switzerland .
- Williamson, N.R.; Fineran, P.C.; Gristwood, T.; Leeper, F.J. and Salmond, G.P. (2006). "The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginines". Nature Reviews Microbiology. 4(12): 887–899.
- Yamanaka, M.K. ,T. Hara, and J. Kudo.(2005). Bactericidal actions of a silver ion solution on *Escherichia coli* studied by energy filtering transmission electron microscopy and Protemic analysis applied and Environmental microbiology, 71: 4589.
- Yu, V.L.(1979). Serratia marcescens: historical perspective and clinical review. N Engl J Med.,300:887-893. [PubMed]
- Zhang, H. and G. Ghen.(2009). Poten Antibacterial Activities of Ag/ Tio_2 Nano composite powders synthesized by a one – pot Sol-Gel Method. Environ. Sci. Technol., 43 (8): 2905-2910.

- Zhou, Y.; Kong, Y.; Kundu, S.; Cirillo, J.D. and Liang, H. (2012) Anti-bacterial activities of gold and Silver nanoparticles against *Escherichia coli* and *Bacillus* clamette – Guerin J. Nanobiotechnol. 10 P: 19-28.