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

التأثير التثبيطي لجسيمات الفضه النانويه على *E.coli*

بحث مقدم إلى

قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة القادسية وهي جزء من
متطلبات نيل درجة البكالوريوس علوم في علوم الحياة

من قبل الطالبة

زهراء حامد كاظم

بإشراف

د. سيوف خومان فرمان الرماحي

1440 هـ

2019م

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَٰنِ الرَّحِيمِ

﴿وَيُعَلِّمُكُم مَّا لَمْ تَكُونُوا تَعْلَمُونَ﴾

صدق الله العلي العظيم

سورة البقرة الآية (151)

MY HOUSE ON WEB

الإهداء

إلى منارة العلم والإمام المصطفى . . . إلى الأمي إلى سيد الخلق

إلى رسولنا الكريم سيدنا محمد (صلى الله عليه واله وسلم)

إلى معنى الحب والحنان . . . إلى الينبوع الذي لا يمل من العطاء

إلى من كان دعاؤها سر نجاحي . . . . (أمي الحبيبة)

إلى من سعى وشقى لأنعم بالراحة والهناء . . . إلى من كلله الله بالهيبة والوقار

إلى من أحمل اسمهُ بكل افتخار . . . إلى قدوتي (شيخي الموقر) . . . (أبي)

إلى من حبهم يجري في عروقي ، ويلهج بذاكرهم فؤادي . . . (أخواني وأخواتي)

إلى من سرنا سوياً ونحن نشق الطريق معاً نحو النجاح والابداع . . . إلى من تكاتفنا يداً

بيد ونحن نقطف زهرة . . . (زميلاتي وزملائي)

إلى من علموا حروف من ذهب . . وكلمات من درر . . وعبارات من أسمى

واجلى عبارات في العلم . . . (اساتذتنا)

MY HOUSE ON WEB

الشكر والتقدير

بسم الله الرحمن الرحيم

الحمد لله ربِ العرش العظيم والصلاة والسلام على أشرف الخلق سيدنا محمد "صلى الله عليه واله وسلم"

يشرفني أن أتقدم بجزيل الشكر والامتنان لأستاذتي الفاضلة الدكتورة (سيوف خومان فرمان الرماحي لتفضلها بالإشراف على هذا البحث.

كما واتقدم بالشكر الجزيل إلى عمادة ورئاسة قسم علوم الحياة لما قدموه لنا من توجيهات ونصائح طيلة فترة الدراسة

MY HOUSE ON WEB

المقدمة:

تعد الأمراض الناتجة عن خمج المجرى البولي من المشاكل التي تعاني منها دول العالم حيث يتعرض الأطفال والبالغون من الذكور والإناث للإصابة بها لدرجة جعلتها تأتي بالمرتبة الثانية بعد إصابات المجرى التنفسي العلوي (Fischbach *et. al.*, 1989).

تلعب البكتيريا في المجرى البولي تأثير مهم في إحداث عدد من الأمراض كارتفاع ضغط الدم وتشوهات القناة البولية والعجز الكلوي وفي النساء الحوامل يجب التحري عن وجود البكتيريا في الإدرار لأنها تؤدي إلى الإصابة بخمج حوض الكلية ومخاطر الولادة قبل المدة الطبيعية (Anon, 1985) وتضم خمجات المجرى البولي عدة حالات مرضية منها خمج المثانة (Cystitis) وخمج الاحليل (Urethritis) وخمج حوض الكلية (Pyelonephritis) (Davidson *et. al.*, 2002).

إن بكتيريا E.coli تسبب 85% من إصابات المجرى البولي للبالغين وتؤلف بكتيريا Enterobacter , Psedomonas ,Proteus , Klebsiella نسبة 15% أما الأنواع الأخرى Chlamydia ,Fungus فتمثل 5%. وتمتلك البكتيريا عوامل ضراوة متعددة منها الخمل Fimbria والأسواط Flagella والسموم Toxins على الرغم من استخدام العلاج المكتشف يجمع المختصون على الفحص الدائم والتشخيص المبكر للحوامل للحفاظ على صحة الجسم وسلامته من أجل حمايته من المضاعفات ونتيجة لظهور صفة المقاومة للمضادات الحياتية لدى بعض أنواع البكتيريا المسببة للخمجات التي تتناسب طردياً مع زيادة في استخدام المضادات الحياتية ولذلك يتكرر خمج المجرى البولي وصولاً إلى النوع المزمن (Collee *et. al.*, 1996) لذلك يحاول الباحثون تلافي هذه المشاكل بإيجاد معالجات جديدة ومنها مستخلصات نباتية تستعمل كطب شعبي بشكل نقيع (Anesini & Perez, 1993) أو بعد فصل وتحديد المركبات المانعة لنمو المسبب المرضي (Nishino *et. al.*, 1987) كما استخدمت مستخلصات لنباتات طبية نتيجة لاستخدام المضادات الحياتية وتزايد مقاومة الكائنات الحية لها.

ومما تقدم تمثلت مواضيع مشروع البحث الذي قمنا به بما يأتي:

1. عزل البكتيريا المسببة لخمج المجرى البولي من النساء الحوامل وغير الحوامل المصابات وتشخيصها والعوامل المهيئة للإصابة.
2. تحديد دور الحمل في تفاقم الإصابة من عدمها.
3. معرفة تأثير المضادات الحياتية المتوافرة في الصيدليات حالياً كعلاج على البكتيريا المسببة للمرض الشائعة الاستعمال طبياً.
4. تحديد تأثير بعض مستخلصات النباتات الطبية على البكتيريا المرضية المعزولة.
5. تحديد التركيز المثبط الأدنى (MIC) لمستخلصات النباتات المستخدمة مختبرياً.
6. المقارنة بين المضادات الحياتية والمستخلصات النباتية من حيث الكفاءة التثبيطية ضد البكتيريا.

تعد المرارة أحد أجزاء الجهاز الهضمي المهمة في جسم الإنسان وذلك لما تقوم به من دور في عملية الهضم إذ تقوم بالمساعدة على هضم الدهون من خلال إفراز العصارة الصفراوية التي تكون مركزة وتفرز أثناء الوجبات (Townsend *et. al.*, 2001) تكون أمراض المرارة بنوعين الأول خمج المرارة بدون وجود حصى Cholecystiyis والنوع الثاني هو وجود حصى داخل المرارة Cholelithiasis والحالة الأخيرة أكثر انتشاراً إذ تبلغ نسبتها 95% (Kumar *et. al.*, 2003).

تكون الحالة الثانية أكثر شيوعاً في الإناث من الذكور وتكون أقل في الأطفال وكبار السن وجود الحصى في المرارة يعد من المشاكل الصحية الرئيسة في الكثير من الأقطار في العالم وخاصة في الدول النامية (Schirmer *et. al.*, 2005) إذ ان هناك عدة عوامل تؤدي إلى تكوين حصى المرارة منها ترسب المادة الصفراء والعامل الوراثي الذي يكون لهُ دور مهم في الإصابة بحصى المرارة (Beckingham, 2001). ومن العوامل الأخرى المساعدة في حدوث الإصابة بخمج المرارة هو داء السكري (Brody *et. al.*, 1998).

إن خمج المرارة الحاد يحدث نتيجة تكون حصى المرارة أو بسبب حدوث تليف في جدران المرارة ويعرف بخمج المرارة غير حصوي (Ruby & Mohack, 2011).

من أكثر الأنواع البكتيرية المعزولة من مرض المرضى المرارة هي البكتيريا المعوية السالبة لصبغة كرام وبالخصوص E.coli وأنواع بكتيرية أخرى وهذا ما أكدته العديد من الدراسات التي أجريت في أنحاء مختلفة من العالم (Flores *et. al.*, 2003; Cepoor *et. al.*, 2008) تمتلك بكتيريا E.coli القدرة على الالتصاق وغزو بعض مناطق الجسم وإحداث العديد من الأخماج نتيجة امتلاكها عوامل ضراوة متعددة منها:

1. قدرتها على انتاج المحفظة.
2. قدرتها على افراز انزيمات كالانزيم المحلل للدم والبكتريوسين (Cornut *et. al.*, 2008).

وهذه العوامل تساعد البكتيريا على الاستيطان وغزو بعض مناطق الجسم.

MATERIALS & METHODS المواد وطرائق العمل

جمع العينات Samples collection:

شملت الدراسة 110 مصاب بخمج المرارة راجعوا مستشفى الديوانية التعليمي للمدة من شهر تشرين الثاني 2013 ولغاية شهر نيسان 2014 لغرض الاستئصال الجراحي للمرارة.

أخذت عينات الحصى والمادة الصفراء بعد العملية مباشرة وغسلت الحصى بواسطة محلول ملحي معقم لإزالة التلوث السطحي ووضعت في أنابيب معقمة وأخذت للزرع البكتيري، جمعت العينات من فئات عمرية مختلفة (15-65) سنة ومن كلا الجنسين (13 ذكر و 97 انثى). سحبت المادة الصفراء بواسطة محاقن طبية معقمة في ظروف معقمة وحفظت في أنابيب معقمة خلال 30 دقيقة من الجمع . كما أخذت عينات نسيج المرارة و وضعت في أنابيب زجاجية معقمة ذات فوهة واسعة تحتوي على وسط ناقل (مرق نقيع القلب- المخ BHI) ، مع تسجيل المعلومات المتعلقة بالمريض. نقلت عينات الحصى والمادة الصفراء ونسيج المرارة بعد مدة وجيزة إلى المختبر للزرع البكتيريولوجي وإجراء بقية الاختبارات.

الزرع البكتيري للمرارة Microbial culture for Gallbladder:

شمل الزرع البكتيري للمرارة المناطق الآتية:

1. حصى المرارة (السطح الخارجي واللب الداخلي للحصى).
2. المادة الصفراء
3. نسيج المرارة

زرعت المسحات المأخوذة من جميع هذه المناطق على الاوساط الزرعية الآتية:

وسط الاكار المغذي و وسط اكار الماكونكي و وسط اكار الدم حضنت الاطباق بدرجة 37°م لمدة 24-48 ساعة (Macfaddin, 2000)

تشخيص البكتيريا المعزولة Identification of bacteria:

شخصت المستعمرات البكتيرية النامية اعتمادا على :

1. خصائص الصفات المظهرية والمجهرية Morphological and Microbial Characteristics:

درست الصفات المظهرية للمستعمرات البكتيرية النامية على الاوساط الزرعية المختلفة وشخصت هذه المستعمرات بشكل مبدئي من حيث (اللون، والشكل ، والقوام، والحواف والنمو او عدم النمو على الاوساط التفريقية والانتقائية ، أما الصفات المجهرية للخلايا البكتيرية المعزولة فقد درست من خلال عمل مسحات مباشرة من الاوساط الزرعية والتي صبغت بواسطة صبغة غرام لتفريق البكتيريا السالبة عن الموجبة والتعرف على أشكال الخلايا وترتيبها (Winn et. al., 2006) .

2. **الاختبارات الكيموحيوية** Biochemical test:

1. **النمو على وسط غراء الايوسين المثيلين الازرقEosin methylene blue:**

استخدم لتفريق بكتيريا E.coli عن البكتيريا المعوية الاخرى إذ تظهر المستعمرات البكتيرية بلون أخضر ذات بريق معدني بعد زرعها على هذا الوسط لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37˚م ، دليل على النتيجة الموجبة (MacFaddin, 2000)

2. **اختبار انزيم الكتاليزCatalase test:**

تم اجراء الفحص بنقل كمية قليلة من النمو البكتيري النامي على الوسط الزرعي بعمر 24 ساعة بواسطة العيدان الخشبية المعقمة إلى سطح شريحة زجاجية نظيفة وجافة ثم أضيف لها قطرة من 3% (H_2O_2)، إن ظهور الفقاعات الغازية يدل على النتيجة الموجبة (Collee *et. al.*, 1996).

3. **اختبار انزيم الاوكسيديزOxidase test:**

تم إجراء الفحص بنقل كمية من النمو البكتيري بواسطة العيدان الخشبية المعقمة إلى ورقة ترشيح مشبعة بكاشف الأوكسديز ، وتلون المستعمرات البكتيرية باللون البنفسجي دليل على النتيجة الموجبة للأختبار (Collee *et. al.*, 1996).

4. **اختبار انتاج كبريتيد الهيدروجين Production of hydrogen sulfite test:**

تم إجراء الفحص بتلقيح وسط كلكلر بالمزروع البكتيري المراد فحصه وحضن بدرجة حرارة 37˚م لمدة 24 ساعة ، إن ظهور الراسب الأسود في الانبوبة يدل على النتيجة الموجبة (MacFaddin, 2000) .

5. **اختبار استهلاك السترات Citrate utllization test:**

أجري الفحص بتلقيح وسط السترات المائل بالمزروع البكتيري المراد فحصه وحضن بدرجة حرارة 37°م لمدة 24 – 48 ساعة. إن تحول لون الوسط الأخضر إلى الأزرق وظهور النمو على خطوط الزرع يدل على النتيجة الموجبة (MacFaddin, 2000).

6. اختبار قابلية الحركةMotility test:

أجري الفحص بتلقيح الأنابيب الحاوية على الوسط بالمزروع البكتيري وحضن بدرجة حرارة 37°م لمدة 24 – 48 ساعة، انتشار النمو خارج حدود الطعنة يدل على النتيجة الموجبة (Collee *et. al.*, 1996).

7. اختبار انتاج الاندولIndol test:

لقحت الأنابيب الحاوية على الوسط الزرعي بالمزروع البكتيري، حضنت بدرجة حرارة 37°م لمدة 18 – 24 ساعة ، عندها اضيفت بضع قطرات من كاشف كوفاكس إلى كل أنبوبة مع الرج الجيد. ظهور حلقة حمراء في أعلى الوسط دليل على النتيجة الموجبة للاختبار(MacFaddin, 2000).

8. اختبار احمر المثيل Methyl red test:

لقحت الأنابيب الحاوية على الوسط الزرعي MRVP بالمزروع البكتيري وحضنت بدرجة حرارة 37°م لمدة 24 – 48 ساعة بعدها أضيفت 5 قطرات من كاشف أحمر المثيل مع رج الأنبوبة، إن ظهور اللون الأحمر في الأنبوبة دليل على التحلل الكامل للسكريات وانتاج الحامض (Collee *et. al.*, 1996).

9. **اختبار انزيم اليوريزUrease test** :

تم الكشف عن هذا الانزيم بتلقيح وسط اكار اليوريا بالمزروع البكتيري ثم حضن بدرجة حرارة 37°م لمدة تتراوح من 24 ساعة ولغاية سبعة أيام، ظهور اللون الوردي يدل على النتيجة الموجبة (Collee *et. al.*, 1996).

3. التشخيص بنظام الفايتك Vitek 2 compact system diagnosis:

استخدم النظام المذكور أنفاً وبحسب تعليمات الشركة المجهزة لهُ وفقاً لما جاء في Fritsche وجماعته (2011):

1. زرعت العزلات الجرثومية على وسطي آكار الدم والماكونكي وحضنت بدرجة حرارة 37°م لمدة 24 ساعة.
2. حضر من المزروع البكتيري عالقاً جرثومياً؛ وذلك بنقل مستعمرة واحدة من كل طبق إلى أنابيب اختبار حاوية على 3 مل من المحلول الملحي الفسلجي بتركيز 0.85% ثم خففت عكورة النمو للحصول على عالق كثافته تتراوح بين (0.50 – 0.63) ملغم. مل$^{-1}$ والذي يكافئ 1.5 × 10^8 خلية. مل$^{-1}$ باستخدام جهاز المطياف الضوئي بطول موجي 230 نانومتر.

3. وضع الـــ Card cassette الخاص بتشخيص الأنواع البكتيرية في كل أنبوبة من أنابيب الاختبار الحاوية على العالق الجرثومي المخفف ومن ثم وضعت الأنابيب في جهاز الفايتك الذي يقوم بقراءة النتائج تلقائياً وتحديد نوع البكتيريا الموجودة في العالق.

حفظ وإدامة العزلات البكتيرية Preservation and maintenance of bacterial isolates:

1. **الحفظ قصير الأمد :**

لقحت الأنابيب الحاوية على الوسط المغذي الصلب المائل بالبكتيريا المراد حفظها ، وحضنت في درج حرارة 37°م لمدة 24 ساعة ، ثم حفظت في درجة 4°م ، وكررت عملية الحفظ لتجديد حيوية العزلات كل شهر(Collee *et. al.*, 1996).

2. **وسط الحفظ طويل الأمد Maintenance medium:**

حضر الوسط بإضافة 5% من الكليسيرول إلى الوسط نقيع القلب والدماغ السائل المحضر بإذابة 4 غرام من الوسط في 50 ملي لتر من الماء المقطر، وأكمل الحجم إلى 100 ملي لتر، وعقم بالمؤصدة ، وترك ليبرد في درجة حرارة 56°م باستعمال الحمام المائي، ووزع على أنابيب اختبار معقمة وذات سدادات محكمة وحفظ في 4°م لحين الاستعمال . استعمل هذا الوسط لحفظ البكتيريا المعزولة والمشخصة لعدة أشهر في درجة حرارة -20°م (NCCLS, 2003a).

اختبار فحص الحساسية للمضادات الحيوية (طريقة الانتشار بالقرص) Antibiotic Susceptibility test:

اختبرت الحساسية الدوائية للعزلات البكتيرية بطريقة الاقراص اعتماداً على طريقة Bauer وجماعته (1966) و (CLSI) (2013) وتضمنت:
نقل 2-4 مستعمرات نقية من بكتيريا E.coli باستعمال عروة الناقل الحلقي إلى أنابيب اختبار حاوية على 5 مليليتر من وسط نقيع القلب والدماغ السائل وحضنت الأنابيب بدرجة حرارة 37°م لمدة 8 ساعات خفف النمو الحاصل باستعمال محلول الملح الفسلجي ، ثم تمت مقارنة النمو في الأنبوب مع أنبوبة ماكفرلاند (0.5) القياسية ، وتم غمس المسحة القطنية في وسط نقيع القلب والدماغ السائل المزروع وأزيل الفائض بالضغط على الجوانب الداخلية للأنبوبة. باستعمال مسحة قطنية معقمة نشرت البكتيريا بطريقة التخطيط لأكثر من مرة وباتجاهات مختلفة على وسط أكار المولر هنتون بالتساوي وتركت الاطباق لمدة 15 دقيقة في درجة حرارة

الغرفة لضمان امتصاص الرطوبة ، وضعت أقراص المضادات الحيوية المذكورة في الفقرة (6) بواقع 5 أقراص في طبق قياس 100 مليمتر ، 12 قرص في طبق قياس 150 مليمتر ، والمسافة بين كل قرص وآخر 20 مليمتر من مركز القرص الأول إلى مركز القرص الآخر بواسطة ملقط معقم وحضنت الأطباق بدرجة حرارة 37°م لمدة 18 ساعة لأنواع المضادات الحيوية جميعها ، ثم قيست أقطار التثبيط باستخدام الفيرنيا وقورنت مع القيم القياسية المذكورة في (CLSI, 2013).

اسم المضاد	رمز المضاد	تركيز المضاد
Amikacin	AK	10
Amoxicillin	AX	25
Amphotricin B.	AMB	20.10
Augmentin (Amoxillin–Clavulanic aid)	AUG	30
Cefatrizine	CEF	30
Cefotaxime	CTX	10
Ceftazidime	CAZ	10
	CTR	30
Ciprofoxacin	CIP	30
Erythromycin	ER	10
Gentamycin	GEN	10
Meropenem (Merrem)	MRP	5
Tetracyclie	TE	30
Vancomycin	VA	5

RESULTS & DISCUSSION 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
E.coli	19	17	1	18	1	2	2	1	21	1	1	19	1	1

أظهرت النتائج في الجدول اعلاه ان تراكيز كل من المضادات AK 19 وتركيز المضاد AXهو 17 وتركيز المضاد AMP هو 1 و وتركيز المضاد , AUG هو 18 وتركيز المضاد AUG هو1 وتركيز المضاد CEFهو 2 وتركيز المضاد CTX هو 2 وتركيز المضاد CIP هو 21 وتركيز المضاد ER هو 1 وتركيز المضاد GEN هو 1 وتركيز المضاد MRP هو 19 وتركيز المضاد TE هو 1 وتركيز المضاد VA هو 1

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

Fungal isolate	Concentration (ug/ml) Zone of inhibition (mm)	
	Amphotericin B	Ketaconazole
Asp.flavus	20	29
Asp.parasitics	22	37
Asp.terrus	23	26
Candid albicans	21	26

أظهرت النتائج في الجدول اعلاه ان الفطر *Asp.flavus* يكون تركيز المضاد في منطقة التثبيط Amphotericin B هو 20 و في منطقة Ketaconazole هو 29 والفطر *Asp.parasitics* في منطقة التثبيط Amphotericin Bهي 22 وفي منطقة Ketaconazole هو 37 والفطر *Asp.terrus* في منطقة التثبيط Amphotericin B هو 23 وفي منطقة Ketaconazole هو 26 وتركيز الفطر *Candid albicans* في منطقة التثبيط Amphotericin B هو 21 وفي منطقة Ketaconazole هو 26

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

Bacterial isolates	Concentration (ug/ml) Zone of inhibition (mm)			
E.coli	8	21	31	41

يظهر الجدول اعلاه مناطق التثبيط لجزيئات السلفر ضد بكتيريا E.coli تظهر التراكيز (8, 21, 31, 41)

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

Fungal isolate	Concentration (ug/ml) Zone of inhibition (mm)			
	11	21	31	41
Asp.flavus	42	45	46	62
Asp.parasitics	40	41	46	50
Asp.terrus	39	42	47	49
Candid albicans	40	44	44	63

يظهر الجدول اعلاه مناطق التثبيط لجزيئات السلفر ضد *Asp.flavus* بالتراكيز (42-45-46-62) وضد*Asp.parasitics* بتراكيز 40 و41 و46 و50 وضد *Asp.terrus* وبتراكيز 39 , 42 , 47, 49 و *Candid albicans 40 , 44, 44, 63.*

المناقشة:

دراسة ميكانيكية

تم إعادة المعلق الحيوي لجزيئات الفضة النانوية AgNPs قد تم خلطها مع MS_2 عاثية القولونية للحصول على 10ml من نظام التفاعل ما لم ينص على خلاف ذلك . التركيز البدائي لـ MS_2 للعاثية القولونية تم الحفاظ عليها في هذه الدراسة في 10^6PFU/ml كل التفاعلات اجريت تحت ظروف تحريك مستمرة في درجة حرارة الغرفة وغطيت بواسطة رقائق الالمنيوم لحفظ تأثير الضوء المحيط بها . وقت الاتصال كان محفوظاً في 10 دقائق غير محدودة

من أجل تحقيق قاعدة تحرير أيونات الفضة 157.4mg من AgNo3 تم تذويبها في 100ml من ماء مقطر للحصول على 1000mg Ag/L من المحلول الخزين Bio-AgPNs تم خلطها

مع MS2 عاثية قولونية في تركيز معلوم (10.25 and 50mg/L) وزمن اتصال قدره (5 – 10) دقائق . مقارنة تعطيل العاثية البكتيرية MS2
كانت أيضاً قد أجريت في 10mg/L لـ bio-AgPNs 0.5mg/L من Ag على التوالي تم اخذ العينات في 5, 10, 30, 60 دقيقة لدراسة قاعدة ROS 15ml من البنسلين داخل الزجاجات مع 10mg/L من bio-AgPNs والعاثية القولونية MS2 تم حضنها تحت مستويات مختلفة من الاوكسجين بظروف لاهوائية زجاجات البنسلين تم ازالتها مع N2 لخمس دقائق بينما 2.5ml من الاوكسجين النقي قد ارتفعت إلى منطقة الرأس في الزجاجات لتحقيق حالة فرط الاوكسجين تم اخذ العينات في ظروف الثلاثة وفي وقت اتصال قدرة 5 , 10, 30, 60 دقيقة على التوالي قاعدة الاتصال المباشر تم دراستها مع خطوات واضحة.
تم استخدام أنابيب غسيل الكلى لمنع الاتصال المباشر بين MS2 وAgPNs الحيوي وللسيطرة تم خلط AgPNs الحيوي مع MS2 جيداً في الحاوية عندما كان نفس انبوب الغسيل موجود بعد التعريض لمدة ساعة واحدة . تم اخذ العينات واجريت أوساط الالواح على الفور بعد التخفيف.

التخليق الحيوي لجزيئات الفضة النانوية :
التخليق الحيوي AgNPs اخذ وفقاً لـ (Sintubin *et. al.*, 2009) تم شراء L.Fermentum ATCC11976 من النوع الامريكي مجموعة في الوسطUS , (ATCC) تم حضنها في وسط Rogosa-sharrpe broth قد حضن في جهاز الاوتوكليف في درجة حرارة C30 لمدوة 48 ساعة بعد هذه الفترة كان الوزن الجزيئي للخميرة L.Fermentum قد اخذت وتم غسلها 3 مرات بواسطة Centerfuge بعد إذابة 4.6g/Lاصبح الوزن الجزيئي قاعديا بواسطة اضافة 2.56% من 1M من محلول NaOH 16.5g mg/L من (Ag) من محلول Ag (NH3)2NO3 قد تم اضافتها فيما بعد الى الوزن الجزيئي الذي حصلت عليه لكي تحصل على نسبة 1:4.6 من Ag:CDW الخليط تم تغطيته بحذر بورق من شرائح الالمنيوم وتم خلطها في درجة حرارة الغرفة ولمدة 24 ساعة بعدها تم تنقية جزيئات الفضة النانوية الحيوية باستخدام Centerfuge في هذه الحالة bio-AgPNs تم خلطها والوزن الجزيئي والزوائد الاخرى تم اخراجها من الوزن الجزيئي لكي لا تستخدم .

توصيف جزيئات الفضة النانوية:
TEM (JEM3010JEDLLtd . Japan) تم استخدامه في هذه الدراسة لوصف الشكل وحجم جزيئات الفضة النانوية في 300Kv.
العينات تم تحضيرها بواسطة وضع قطرة جديدة من المعلق السائل لجزيئات الفضة النانوية على شبكة من الكاربون مطلية بالنحاس من الجهتين ومجففة بالهواء في درجة حرارة الغرفة اختبارTEM مع طاقة مندثرة من الاشعة السينية للطيف المتحلل من أجل التأكد من صحة وجود AgPNs من خلال حدوث القمة المتخصصة من Ag الى جانب ذلك الذي تم تخليقه بعد

هضمها %56من HNo3و H2O2%30 بالتزام مع USEPA3050B عمليةالهضم التي حصلت تم شرحها ادناه:
2ML من معلق AgPNSتم اضافته الى بيكر يحتوي2ML من HNO3%65 وسخنت لحد الغليان بعد ذلك 1mlمن H2O2 %30 تم اضافتها هذا المعلق تمو حفظه في درجة الغليان الى ان تحول من معلق داكن اللون الى معلق عديم اللون ومحلول شفاف فضة ايونية.

المصادر :

1. Beckingham (2001) Clinical review acute cholecystitis B M. J . 325: 639-643.
2. Brody (1998) Clinical factors associated with positive bile cultures during primary percutaneous biliary during 5 vase interv Radiol 9:572-578.
3. Collee (1996) practical medical microbiology 14th Churchill livingstone . New York P: 131- 150.
4. Fritsche (2011). Evaluation of the seasititre AR1S2x and Vitek 2 Automated systems For identification of bacterial pathogens Recovered from Veterinary Specimens Marshfield labs Lacrosses Oniv. Wisconsin USA.
5. Kumar (2003) Basic pathology 7th ed. Philadelphia London , pp:628- 623.
6. Macfaddin J. F. (2000) Bio chemical Tests for identification of medical Bacteria 3rd ed. Awolters Kluwer company Baltimor 78-424.
7. Ruby & Monack (2011) at home with hostility : how do pathogenic bacteria evade mammalian immune surve illance to establish persistent infection F 1000 Bio Reports 3:1.
8. Schirmer (2005) cholethiasis and cholecystitis . J. long Term eff med Implants 15 (3): 329-38.
9. Townsend (2001) Text book of surgery : the Biological Basis of modern Surgical practice 6th ed. Volume 3 Philadelphia, London p:1078-1085.