



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة بغداد
كلية التربية للعلوم الصرفة ابن الهيثم
قسم علوم الحياة

التخليق الحيوي لجزيئات أكسيد الزنك النانوي بوساطة بكتريا الزائفة الزنجارية المعزولة محلياً

رسالة مقدمة

إلى مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة / ابن الهيثم - جامعة بغداد

وهي جزء من متطلبات نيل درجة ماجستير في علوم الحياة / الأحياء المجهرية

من قبل

ذوالنون يونس صالح الجنابي

بكالوريوس علوم حياة/ جامعة بغداد - 2010

بإشراف

الاستاذ المساعد الدكتور عصام جاسم الخليفائي

2019م

1441هـ

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

﴿وَمَا تَكُونُ فِي شَأْنٍ وَمَا تَتْلُو مِنْهُ مِنْ قُرْآنٍ وَلَا تَعْمَلُونَ مِنْ عَمَلٍ إِلَّا كُنَّا عَلَيْكُمْ شُهُودًا إِذْ تُفِيضُونَ فِيهِ وَمَا يَعْزُبُ عَنْ رَبِّكَ مِنْ مِثْقَالِ ذَرَّةٍ فِي الْأَرْضِ وَلَا فِي السَّمَاءِ وَلَا أَصْغَرَ مِنْ ذَلِكَ وَلَا أَكْبَرَ إِلَّا فِي كِتَابٍ مُبِينٍ﴾

صدق الله العظيم

(يونس: ٦١)

اقرار المشرف

اشهد ان الرسالة الموسومة (التخليق الحيوي لجزيئات اوكسيد الزنك النانوي بوساطة بكتريا الزائفة الزنجارية المعزولة محلياً) والمقدمة من قبل الطالب (ذوالنون يونس صالح) قد جرت تحت اشرافي في كلية التربية للعلوم الصرفة ابن الهيثم / جامعة بغداد وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة / علم الاحياء المجهرية.


التوقيع :
اسم المشرف: أ.م.د. عصام جاسم الخليفاوي

التاريخ: ١٦ / ١٢ / 2019

بناء على التوصيات اعلاه ارشح الرسالة للمناقشة


التوقيع :
الاسم: أ.م.د. ثامر عبد الشهيد محسن

رئيس قسم علوم الحياة

التاريخ: ١٧ / ١٢ / 2019

اقرار لجنة المناقشة

نحن اعضاء لجنة المناقشة الموقعون ادناه , نشهد اننا قد اطلعنا على الرسالة الموسومة (التخليق الحيوي لجزيئات اوكسيد الزنك النانوي بوساطة بكتريا الزائفة الزنجارية المعزولة محلياً) المقدمة من قبل الطالب (ذوالنون يونس صالح) كجزء من متطلبات نيل درجة ماجستير في علوم الحياة / علم الاحياء المجهرية.

التوقيع :
٢٠١٩ / ١٢ / ١٦
الاسم : د.سهاد فيصل حاتم

اللقب العلمي:أستاذ مساعد

(عضواً)

التوقيع :
٢٠١٩ / ١٢ / ١٦
الاسم : د.لمى عبد الهادي زوين

اللقب العلمي:أستاذ مساعد

(رئيس اللجنة)

التوقيع :
٢٠١٩ / ١٢ / ١٦
الاسم : د.عصام جاسم الخليفاي

اللقب العلمي:أستاذ مساعد

(عضواً / المشرف)

التوقيع :
٢٠١٩ / ١٢ / ١٦
الاسم : د.محمود ابراهيم اسماعيل

اللقب العلمي:مدرس

(عضواً)

مصادقة عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة / ابن الهيثم

التوقيع :
الاسم : أ.م.د فراس عبد الحميد عبد اللطيف

ع.عميد كلية التربية للعلوم الصرفة / ابن الهيثم

التاريخ : 2019 / 12 / 17

الإهداء

الى :

من ربياني فأحسنا تربيتي
قدوتي في الحياة والذي الشهيد رحمه الله
قرة عيني والدتي اطل الله في عمرها
سندي في الحياة اخي احمد واختاي
زوجتي وطفلتي سر سعادتي
مشرفي الفاضل ... أ.م.د. عصام جاسم الخليفةاوي
من علموني فأجادوا... أساتذتي الافاضل .

أهدي هذا الجهد العلمي المتواضع

ذوالنون

شكر وتقدير

الحمد والشكر لله وحده لاشريك له والصلاة والسلام على سيد المرسلين نبينا الصديق الامين وعلى اله وصحبه اجمعين .

تقف الكلمات عاجزة عن وصف مدى امتناني وشكري لكل من ساهم في ارشادي وتسهيل امري لاتمام هذه الرسالة بدءاً بمشرفي الفاضل الدكتور عصام جاسم الخليفاي الذي كان له الدور الكبير في اتمام هذا العمل من خلال توجيهاته العلمية القيمة وحرصه على ان تكون الرسالة بأحسن صورة ممكنة فجزاه الله كل خير .

والشكر موصول ايضاً الى عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة/ابن الهيثم والى السيد رئيس قسم علوم الحياة أ.م.د. ثامر عبد الشهيد محسن واساتذة القسم الافاضل .

واتوجه بشكري ايضاً الى الدكتور لهامى عبد الهادي زوين التي كانت عوناً لنا على مدى مدة الدراسة والبحث .

وكذلك جزيل الشكر الى منتسبي المختبرات التعليمية ومستشفى بغداد التعليمي ومستشفى غازي الحريري في مدينة الطب لمساعدتهم لي في جمع العينات لأغراض البحث.

وختاماً شكري وعرفاني الى والدي الشهيد الذي زرع في حب العلم والتعلم وايضاً الى عائلتي التي منحني الدعم والثقة لكي اكمل مسيرتي العلمية.

والى زملائي من طلبة الدراسات العليا لوقوفهم معي على مدى دراستي.

ذوالنون يونس صالح

الخلاصة

شملت الدراسة جمع 104 عينة من عدة مصادر سريرية وبأعمار مختلفة وللمدة مابين 2018/12/9 الى 2019/3/3 ومن مستشفيات مدينة الطب في بغداد (مستشفى بغداد التعليمي، مستشفى غازي الحريري، مستشفى الحروق، المختبرات التعليمية).

بعد اجراء الفحوص المجهرية والكيموحيوية تم الحصول على 58 عزلة تعود لبكتريا الزائفة الزنجارية. أستخدم جهاز Vitek compact system 2 من أجل تحديد قيم التراكيز المثبطة الأدنى لثلاثة عشر مضاداً حيويًا لثلاثين عزلة إذ كانت العزلات مقاومة بنسبة كبيرة لكل من مضادي Colistin و Tobramycin وبمعدل 53.3 % وبواقع 16 عزلة لمضاد Colistin وبمعدل 56.7 % وبواقع 17 عزلة لمضاد Tobramycin، تم الكشف عن قابلية بكتريا الزائفة الزنجارية على تكوين عوامل الضراوة إذ كانت 18 عزلة من اصل ثلاثين مكونة لصبغة البايوسيانين في حين كانت جميع العزلات قيد الفحص لها القابلية على احلال الدم من نوع بيتا وعند الفحص على مقدرة البكتريا على انتاج انزيم البروتياز لوحظ ان 25 من اصل ثلاثين عزلة كانت تملك قابلية تكوين انزيم البروتياز وبمعدل اقطار يتراوح مابين 12-20 ملليمتر اما عند الكشف عن قدرة البكتريا على انتاج حاملات الحديد فقد كانت جميع العزلات منتجة لحاملات الحديد وعند دراسة مقدرة البكتريا على تكوين الغشاء الحيوي اعتمدت طريقتان للكشف الاولى باستعمال وسط الكونغو الاحمر والغرض من هذا الفحص دراسة قدرة البكتريا على تكوين طبقة الالتصاق إذ كانت جميع العزلات مكونة لهذه الطبقة ولكن بنسب مختلفة فقد وجد ان 53 % من البكتريا كانت شديدة التكوين لهذه الطبقة بناءً لأمتلاكها لوناً اسود غامقاً بعد النمو و 47 % كانت متوسطة التكوين.

اما الطريقة الثانية فتمت بأعتماد اطباق المعايرة الدقيقة فكانت النتائج في امتلاك جميع العزلات قيد الدراسة القابلية على تكوين الغشاء الحيوي وبدرجات مختلفة مقارنة مع السيطرة السالبة حيث كانت 14 عينة ضعيفة التكوين و 12 عينة متوسطة التكوين واربع عينات شديدة التكوين. تم بعد ذلك اختيار العزلة الاكثر مقاومة للمضادات الحياتية من اجل استعمالها في التخليق الحيوي لجسيمات أوكسيد الزنك النانوية استعمل كبريتيد الزنك ككاشف تحليلي اضيف للراشح البكتيري إذ تمت عملية اختزال لكبريتيد الزنك لتكوين اوكسيد الزنك النانوي. يعد ظهور راسب ابيض في قعر دورق الاختبار دليلا على عملية التحول هذه.

تم دراسة خصائص المادة النانوية الناتجة باعتماد اجهزة التشخيص المتمثلة بجهاز مطيافية الاشعة فوق البنفسجية ومجهر القوى الذري وجهاز حيود الاشعة السينية ومطيافية فيورية للاشعة تحت الحمراء فضلا عن كل من المجهر الالكتروني الماسح و جهاز حساب فرق جهد زيتا المحتملة كانت النتائج لهذه الاجهزة تشير الى تكون جسيمات أوكسيد الزنك بصورة نقية وباشكال مختلفة واحجام تتراوح ما بين 20 -100 نانوميتر.

اخرتبت فعالية الجسيمات النانوية المخلفة ضد بكتريا الزائفة الزنجارية إذ تم الاعتماد على ثلاثة تراكيز مختلفة (10، 100، 500) ملغم / مل وقد اظهر التركيزان 100 و 500 ملغم /مل فعالية في تثبيط نمو البكتريا في حين لم يعط تركيز 10 ملغم/مل أية فعالية.

تم دراسة قدرة الجسيمات النانوية المخلفة وبتركيز (100، 500 ملغم / مل) في تثبيط بعض عوامل الضراوة لبكتريا الزائفة الزنجارية إذ تم دراسة قدرة جسيمات أوكسيد الزنك النانوية على تثبيط انتاج الغشاء الحيوي اظهرت النتائج ان نسبة التثبيط في تركيز 500 ملغم/مل كانت الاكبر وبنسبة 83.8 % في حين كانت نسبة التثبيط في تركيز 100 ملغم /مل (80 %).

اما قدرة هذه الجسيمات على تثبيط انتاج الهيمولايسين إذ لوحظ في تركيز 500 ملغم/مل ان جميع العزلات فقدت مقدرتها على انتاج الهيمولايسين نوع بيتا في حين ان تركيز 100 ملغم/مل بقيت العزلات قادرة على تكوين الهيمولايسين نوع بيتا.

اما تأثير جسيمات أوكسيد الزنك النانوية على انتاج صبغة البايوسيانين إذ لوحظ في تركيز 500 ملغم/مل ان جميع العزلات فقدت مقدرتها على انتاج الصبغة في حين ان تركيز 100 ملغم/مل عينتان فقط كانت قادرة على فقدان الصبغة.

ايضاً كان تأثير جسيمات أوكسيد الزنك النانوية في انتاج انزيم البروتياز إذ لوحظ انه في تركيز 500 ملغم/مل قلت نسبة انتاج انزيم البروتياز في حين لم تتأثر في تركيز 100 ملغم/مل.

واخيراً تم اجراء تجربة الكشف عن تأثير جسيمات أوكسيد الزنك النانوية في انتاج حاملات الحديد إذ لوحظ في كلا التركيزين ان جميع العزلات المستعملة في التجربة قد ضعف انتاجها لحاملات الحديد.

الصفحة	الموضوع	الفقرة
أ-ج	الخلاصة باللغة العربية	
د - ح	المحتويات	
ط	قائمة الجداول	
ي	قائمة الاشكال	
ك	قائمة المختصرات	
	الفصل الاول: المقدمة	
1-3	المقدمة Introduction	1
	الفصل الثاني : استعراض المراجع	
4	استعراض المراجع Literature review	2
4	الخصائص العامة لبكتريا الزائفة الزنجارية	1 .2
5-6	امراضية بكتريا الزائفة الزنجارية	2.2
7-8	عوامل الضراوة	3.2
8-9	وبائية بكتريا الزائفة الزنجارية	4.2
10-11	مقاومة المضادات الحيوية	5.2
11-12	نظام أستشعار النصاب	6.2
13	تكنولوجيا النانو	7.2
13-15	مقدمة في تكنولوجيا النانو	1.7.2
15-17	المواد النانوية كمضادات حيوية	2.7.2
17-18	أليات العمل التي تقتل بها المضادات النانوية البكتريا المعنية	3.7.2
18-19	جسيمات أكسيد الزنك النانوية	4.7.2
	الفصل الثالث: المواد وطرائق العمل	
20	المواد وطرائق العمل Materials and Methods	3
20	المواد Materials	1.3
20-21	الاجهزة والمعدات Equipment's and Apparatus	1.1.3
21-22	المواد الكيميائية والحيوية Chemical and Biological Material	2.1.3
23	الايوساط الزرعوية Culture media	3.1.3

24	المضادات الحيوية المستعملة في تحديد التركيز المثبط الأدنى (MIC)	4.1.3
24	طرائق العمل Methods	2.3
24	التعقيم Sterilization	1.2.3
24	التعقيم بواسطة المؤصدة Sterilization by using Autoclave	1.1.2.3
24	التعقيم بواسطة فرن الهواء الساخن Sterilization by using Hot Air Oven	2.1.2.3
25	التعقيم بواسطة المرشحات ذات الفتحات الصغيرة	3.1.2.3
25	تحضير الكواشف والمحاليل Preparation of reagents and solutions	2.2.3
25	كاشف الكاتليز Catalase reagent	1.2.2.3
25	كاشف الاوكسيديز Oxidase reagent	2.2.2.3
26	أختبار فوكاس- بروسكاور Voges – Proskauer reagent	3.2.2.3
26	تحضير محلول صبغة البنفسج البلوري	4.2.2.3
26	تحضير الاوساط الزرعية Preparation of Cultural Media	3.2.3
26-27	الايوساط الزرعية الجاهزة Readymade media	1.3.2.3
27	تحضير الاوساط الزرعية التركيبية Laboratory prepared media	2.3.2.3
27	وسط اكار السترمييد Cetrmide agar	1.2.3.2.3
27	وسط اكار الدم Blood agar	2.2.3.2.3
28	وسط اكار اليوريا Urea agar medium	3.2.3.2.3
28	وسط اختبار الاندول Indol Test medium	4.2.3.2.3
28	وسط اكار الحليب الفرز Skim milk agar	5.2.3.2.3
29	مرق نقيع القلب والدماغ مع الكلوكوز	6.2.3.2.3
29	استخدام اكار احمر الكونغو للتحري عن الاغشية الحيوية	7.2.3.2.3
29	وسط انتاج صبغة البايوسيانين الصلب King Agar A	8.2.3.2.3
30	جمع العينات Collection of Sample	4.2.3
30	تشخيص العزلات البكتيرية Identification of bacterial isolates	5.2.3
30	الفحوصات المظهرية Morphological Examinations	1.5.2.3
30	الفحوصات المجهرية Microscopic Examination's	2.5.2.3

31	Biochemical Tests الفحوصات الكيموحيوية	3.5.2.3
31	Oxidase test اختبار انزيم الاوكسيديز	1.3.5.2.3
31	Catalase test اختبار انزيم الكاتليز	2.3.5.2.3
31	النمو بدرجتي حرارة (4 م° و 42 م°)	3.3.5.2.3
31	Indol Production test اختبار انتاج الاندول	4.3.5.2.3
32	Methyl red test (MR) اختبار المثل الاحمر	5.3.5.2.3
32	Vogas – Proskauer test اختبار فوكس – بروسكاور	6.3.5.2.3
32	Citrate Utilization test فحص استهلاك السترات	7.3.5.2.3
32	Urease Production test اختبار انتاج اليوريز	8.3.5.2.3
33	Kligler Iron agar test اختبار النمو على وسط اكار كليكلر الحديد	9.3.5.2.3
33	Hemolysin production test اختبار انتاج الهيمولايسين	10.3.5.2.3
33	Protease enzyme production test اختبار انتاج انزيم البروتيز	11.3.5.2.3
34	Preservation of bacterial isolates حفظ العزلات البكتيرية	4.5.2.3
34	Short term storage حفظ العزلات قصير الامد	1.4.5.2.3
34	Medium term storage حفظ العزلات متوسط الامد	2.4.5.2.3
34	Long term storage حفظ العزلات طويل الامد	3.4.5.2.3
35	تحديد قيمة التركيز المثبط الادنى MICs للمضادات باستعمال جهاز الفايثك 2	5.5.2.3
36	الفحص النوعي لقدرة العزلات البكتيرية على انتاج طبقة الالتصاق بواسطة طريقة وسط الكونغو الاحمر.	6.5.2.3
36-38	الفحص النوعي لقدرة العزلات البكتيرية على تكوين الغشاء الحيوي باستعمال اطباق المعايرة.	7.5.2.3
38-39	اختبار قابلية عزلات <i>P.aeruginosa</i> على انتاج المركبات المخلفية للحديد	8.5.2.3
39	Nanotechnology study دراسة تقنية النانو	6.2.3
39	التخليق الحيوي لجزيئات أوكسيد الزنك النانوي	1.6.2.3
39	Preparation of bacterial suspension التحضير البكتيري	2.1.6.2.3
39-40	تكوين جزيئات أوكسيد الزنك النانوي حيوياً	3.1.6.2.3

40	تحليل خصائص جزيئات اوكسيد الزنك النانوية	4.1.6.2.3
40	مطيافية الاشعة فوق البنفسجية	1.4.1.6.2.3
41	جهاز مجهر القوى الذرية Atomic Force Microscopy	2.4.1.6.2.3
41	مطيافية الاشعة تحت الحمراء	3.4.1.6.2.3
41-42	جهاز حيود الاشعة السينية X-ray diffraction	4.4.1.6.2.3
42	المجهر الالكتروني الماسح Scanning Electron Microscopy	5.4.1.6.2.3
42	جهاز فرق جهد زيتا المحتملة Zeta Potential	6.4.1.6.2.3
42	الفحص النوعي لمقدرة جزيئات أوكسيد الزنك النانوية المحضرة في العمل كعامل مضاد للبكتريا	2.6.2.3
43	الفحص المظهري لتأثير جزيئات أوكسيد الزنك النانوية على بعض عوامل الضراوة لبكتريا الزائفة الزنجارية	3.6.2.3
43	التأثير على انتاج الصبغات Effect on pigments production	1.3.6.2.3
43	التأثير على انتاج الهيموليسين Effect on Hemolysin production	2. 3.6.2.3
44	التأثير في تكوين انزيم البروتيز Effect on protease production	3.3.6.2.3
44	التأثير في انتاج البكتريا لمخليات الحديد Effect of bacterial production of siderophore	4.3.6.2.3
44-45	التأثير على تكوين الغشاء الحيوي Effect on Biofilm Formation	5.3.6.2.3
	الفصل الرابع : النتائج والمناقشة	
46	النتائج والمناقشة Results and discussion	4
46-48	عزل وتشخيص بكتريا الزائفة الزنجارية	1.4
49-53	تحديد قيمة التركيز المثبط الأدنى (MIC) للمضادات الحيوية باستخدام جهاز vitek2 compact system	2.4

53	Detection of virulence factors الكشف عن عوامل الضراوة	3.4
54	Pigment production انتاج الصبغات	1.3.4
55	Hemolysin Production انتاج انزيم الهيمولايسين	2.3.4
56	Protease Production انتاج انزيم البروتيز	3.3.4
56-57	Production of Siderophores أنتاج المركبات المخلبية للحديد	4.3.4
58	The ability to form Biofilm القدرة على تكوين الغشاء الحيوي	5.3.4
58-60	الكشف عن قابلية الزائفة الزنجارية على تكوين طبقات الالتصاق بأستخدام طريقة الكونغو الاحمر	1.5.3.4
60-61	الكشف عن قابلية الزائفة الزنجارية على تكوين الغشاء الحيوي	2.5.3.4
61-62	التخليق الحيوي لجسيمات أوكسيد الزنك النانوية	4.4
62-69	خصائص جسيمات أوكسيد الزنك النانوية	5.4
70-71	الفعالية المضادة للمكروبات لجسيمات أوكسيد الزنك النانوية اتجاه الزائفة الزنجارية	6.4
71	تأثير جسيمات أوكسيد الزنك النانوية في بعض عوامل الضراوة مظهرياً	7.4
71-72	تأثير جسيمات أوكسيد الزنك النانوية في انتاج صبغة البايوسيانين	1.7.4
72-73	تأثير جسيمات أوكسيد الزنك النانوية في تكوين الهيمولايسين	2.7.4
73-74	تأثير جسيمات أوكسيد الزنك النانوية في انتاج البروتيز	3.7.4
74-75	تأثير جسيمات أوكسيد الزنك النانوية في انتاج حاملات الحديد	4.7.4
75-78	تأثير جسيمات أوكسيد الزنك النانوية في تكوين الغشاء الحيوي	5.7.4
79	الاستنتاجات	
80	التوصيات	
81-101	المصادر	

قائمة الجداول

الرقم	الجدول	الصفحة
1-3	الاجهزة والمعدات المختبرية المستعملة في الدراسة	20-21
2-3	المواد الكيميائية والحيوية المستعملة في الدراسة	21-22
3-3	الايوساط الزرعية الجاهزة والمحضرة التي تم استعمالها في الدراسة	23
4-3	المضادات الحيوية المستعملة في تحديد التركيز المثبط الادنى (MIC)	24
1-4	نوع وعدد العينات و العزلات للزائفة الزنجارية ونسبها المنوية	46
2-4	الفحوصات المظهرية والكيموحيوية لعزلات الزائفة الزنجارية	48
3-4	النسب المنوية لمقاومة وحساسية التركيز المثبط الادنى للمضادات الحيوية لعزلات الزائفة الزنجارية	50
4-4	انماط المقاومة للمضادات الحيوية لعزلات بكتريا الزائفة الزنجارية	53
5-4	النسبة المنوية لانتاج بعض عوامل الضراوة لجرثومة الزائفة الزنجارية	57
6-4	قابلية جرثومة الزائفة الزنجارية على تكوين الغشاء الحيوي بأستعمال طريقة الكونغو الاحمر	60-59
7-4	قابلية جرثومة الزائفة الزنجارية على تكوين الغشاء الحيوي بأستعمال اطباق المعايرة الدقيقة	61
8-4	اقطار تثبيط نمو لجرثومة الزائفة الزنجارية بأستعمال جسيمات أكسيد الزنك النانوية	70
9-4	نسب انتاج صبغة البايوسيانين بأستعمال جسيمات اوكسيد الزنك النانوية لجرثومة الزائفة الزنجارية	72
10-4	نسب تثبيط انتاج الهيمولايسين بأستعمال جسيمات اوكسيد الزنك النانوية لجرثومة الزائفة الزنجارية	73
11-4	اقطار نسب تثبيط انتاج انزيم البروتياز بأستعمال جسيمات اوكسيد الزنك النانوية لجرثومة الزائفة الزنجارية	74
12-4	نسب تثبيط انتاج حاملات الحديد بأستعمال جسيمات اوكسيد الزنك النانوية لجرثومة الزائفة الزنجارية	75
13-4	نسب تثبيط تكوين الغشاء الحيوي بأستعمال جسيمات أكسيد الزنك النانوية لجرثومة الزائفة الزنجارية	76-77

قائمة الاشكال

الصفحة	الشكل	الرقم
54	تكون صبغة البايوسيانين على وسط King A-Agar	1-4
55	تكون هالات شفافة حول مستعمرات الزائفة الزنجارية النامية على وسط الدم الصلب نتيجة افراز انزيم الهيمولايسين	2-4
57	نمو مستعمرات جرثومة الزائفة الزنجارية على الوسط المغذي الصلب الحاوي على Bipyridal 2,2 والذي يعد دليل على تكون المركبات المخيلية للحديد	3-4
58	تكون طبقات الالتصاق لجرثومة الزائفة الزنجارية على وسط الكونغو الاحمر	4-4
61	التخليق الحيوي لأوكسيد الزنك النانوي بوساطة راسح الزائفة الزنجارية	5-4
62	منحنى الطيف المرئي لجسيمات أوكسيد الزنك النانوية باستخدام جهاز مطيافية الاشعة فوق البنفسجية UV-VIS Spectrophotometer	6-4
63-64	أ- المدى في الاحجام المتحصلة للدقائق النانوية ب- التضاريس لجسيمات أوكسيد الزنك النانوية ثنائية الابعاد ج- - التضاريس لجسيمات أوكسيد الزنك النانوية ثلاثية الابعاد.	7-4
65	نمط حيود الاشعة فوق السينية لجسيمات أوكسيد الزنك النانوية المخلفة حيويًا.	8-4
66	طيف فيوريه للأشعة تحت الحمراء 445.56 سم-1 و 484.13 سم-1 لجسيمات النانو المخلفة حيويًا	9-4
68	أ- التنوع في الاشكال والاحجام المستحصلة من التخليق الحيوي لجسيمات الزنك النانوية المخلفة حيويًا بقوة قياس 10um ب- التنوع في الاشكال والاحجام المستحصلة من التخليق الحيوي لجسيمات الزنك النانوية المخلفة حيويًا بقوة قياس 1um	10-4
69	منحنى فرق جهد زيتا لعينة أوكسيد الزنك المخلفة حيويًا	11-4

قائمة المختصرات

الصفحة	المختصر	الكلمة
1	<i>P.aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
3	W.H.O	World Health Organization
9	C.F.S	Cystic Fibrosis
10	AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome
17	Nps	Nanoparticles
18	SEM	Scanning electron microscopy
18	ROS	Reactive oxygen species
27	MR/VP	Methyl red –Voges Proskauer
35	MIC	Minimal inhibitory concentration
35	AST	Antibiotic sensitivity test card
37	PBS	Phosphate–buffered saline
42	ZnO	Zinc oxide
47	UV	Ultra–violat
47	IMViC	Indol–Methyl red– Voges Proskauer– Cimon citrate
59	CRM	Congo Red Method
59	CRA	Congo Red Agar
60	MTP	Micro titer plate
62	UV–VIS	Ultra Violat visible spectrophotometer

الفصل الأول

المقدمة

Introduction

1. المقدمة Introduction

تعد بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* من الممرضات الانتهازية التي تمتلك العديد من عوامل الضراوة مما يجعلها موضع دراسة واهتمام لما قد تسببه من ضرر على صحة الانسان كونها المسؤولة عن بعض الاصابات التي تصيب الجسم (Deep et al., 2011).

جرثومة الزائفة الزنجارية لها القدرة على احداث العديد من الاخماج المزمنة والحادة مثل الحروق، الجروح، التهاب المجاري البولية، الالتهاب الرئوي، التهاب القرنية، التهاب الاذن الخارجية والتهاب الجريبات. وتعد من المسببات لمرض العدوى المكتسبة لاسيما الاشخاص الذين يعانون من النقص المناعي (Moradali et al., 2017) , وبسبب الاليات المتعددة التي تستعملها البكتريا من عوامل الضراوة تكيفت البكتريا للبقاء في بيئات منخفضة التغذية ومقاومتها لفئات المضادات الحيوية المختلفة (Gellatly and Hancock, 2013).

عوامل الضراوة المختلفة اساساً تقع تحت سيطرة انظمة استشعار النصاب Quorum sensing systems. التي لها دور مهم في احداث الامراضية من حيث مقدرة البكتريا على البقاء والاستعمار ومن خلال تنسيق التقدم من طور المرض الحاد الى طور المزمن (García-Contreras, 2016) .

تملك بكتريا الزائفة الزنجارية تعبير جيني يساهم في انتاج عوامل الضراوة، كما في صبغة البايوسيانين ،الحركة، تكوين الغشاء الحيوي واليات المقاومة للمضادات الحيوية (Barr et al., 2015; La-Sarre and Federle, 2013).

تكون بكتريا الزائفة الزنجارية الغشاء الحيوي على الأسطح الحيوية وغير الحيوية، اغلب الاغشية الحيوية المصفوفة ضمن الخلايا البكتيرية قد تمثل اكثر من 90 % من الوزن الجاف للكتلة

الحيوية الكاملة. إذ ان الاغشية الحيوية المصفوفة تخلق بيئات مناسبة للجراثيم في حين انها تقيهم من الظروف غير المؤاتية (Flemming and Wingender, 2010). يتم تشكيل طبقات الغشاء الحيوي من قبل مواد بوليمرية خارج خلوية التي هي الحمض النووي الخارج خلوي، سكريات متعددة، دهون وبروتينات (Stempel *et al.*, 2013).

الغشاء الحيوي له القدرة على التحمل الشديد للعوامل الخارجية والاجهاد الخارجي إذ يحمي البكتريا من المضادات الحياتية وايضا عدم مقدرة دفاعات الجسم من القضاء على البكتريا (Hall- Stoodley and Stoodley, 2009). يمثل تكوين الغشاء الحيوي للبكتريا مشكلة كبيرة في العديد من المجالات سواء في صناعة الاغذية أو في الدواء (Lo'pez *et al.*, 2010). تجدر الاشارة الى ان الاغشية الحيوية هي السبب في العدوى المستمرة في 80% او اكثر في جميع الاصابات المايكروبية المتسببة في تحرير السموم المؤذية للجسم (Epstein *et al.*, 2012).

تمثل الجسيمات النانوية لأكاسيد الفلزات التي يتراوح حجمها من 1- 100 نانوميتر اتجاهاً جديداً يتم تطويره والاهتمام به بشكل متزايد لاعتماده في البحوث المتعلقة في التطبيقات الطبية، أكاسيد المعادن الايونية النانوية تتميز بقوة مثيرة للاهتمام وايضا بخصائص فيزيائية وكيميائية مميزة وايضا تستعمل كعامل مضاد للمايكروبات ويعود ذلك الى المساحة السطحية الكبيرة التي تملكها هذه الجسيمات مقارنة مع المضادات الحياتية المستعملة، على الرغم من النشاط المضاد للبكتريا وفعالية أكاسيد الزنك النانوية التي تم التحقق منها مختبرياً أن الدراسات حول فعالية جسيمات أكاسيد الزنك النانوية وتأثيرها المضاد في الجراثيم قليلة جداً (Jones *et al.*, 2008). فضلاً عن ذلك تعد جسيمات أكاسيد الزنك النانوية واحداً من خمسة مركبات للزنك مسجلة حالياً ومعترف بها على انها مادة آمنة من قبل منظمة الصحة العالمية (W.H.O) (Lee *et al.*, 2017) ، لذا هدفت الدراسة الى معرفة

تأثير المركبات النانوية المخلقة حيويًا من بكتريا الزائفة الزنجارية كعامل مثبت لنمو البكتريا وبعض عوامل ضراوتها.

ولتحقيق هذا الهدف تم اتباع الخطوات الاتية:

1. جمع العينات السريرية لجراثيم الزوائف الزنجارية مع زرع وتشخيص العينات.
2. التحري عن حساسية العزلات للمضادات الحيوية باستعمال جهاز فايتك 2 كومباكت Vitek2 compact system.
3. امكانية التخليق الحيوي لجسيمات اوكسيد الزنك بوساطة رشح جرثومة الزائفة الزنجارية.
4. دراسة خصائص الدقائق النانوية الناتجة واستعمالها كعامل مثبت لبعض عوامل الضراوة لجرثومة الزائفة الزنجارية.

الفصل الثاني

استعراض المراجع

Literature review

2. استعراض المراجع Literature Review

1.2 الخصائص العامة لبكتريا الزائفة الزنجارية

General Characteristics of *Pseudomonas aeruginosa*

بكتريا الزائفة الزنجارية سالبة لصبغة كرام، هوائية، عصوية الشكل وتعود الى عائلة *Pseudomonadaceae*. تتضمن هذه العائلة عدة اعضاء مقسمين على ثمان مجاميع وان بكتريا الزائفة الزنجارية هي احدى تلك المجموعات (Japion et al., 2009).

بكتريا الزائفة الزنجارية ذات شكل عصوي منحنى قليلا او مستقيمة وقياس من 0.5 الى 1.0 مايكروميتر قطرياً ومن 1.5 الى 5.0 مايكروميتر طولياً، متحركة بوساطة سوط قطبي واحد (Govan, 2007).

بكتريا الزائفة الزنجارية غير قادرة على تحطيم الكربوهيدرات فتقوم بأكسدتها او الاستفاداة منها كمصدر للطاقة بدلاً من مسار التخمر (Brooks et al., 2007). فضلاً عن ذلك ثبت ان النمو اللاهوائي لبكتريا الزائفة الزنجارية ممكن في حالة وجود الارجنين او النترات كمستقبلات الكترون طرفية (Todar, 2008).

ايضاً هناك ميزة هامة لهذه البكتريا وهي مقدرتها على النمو في درجة حرارة ما بين 40-42°م وعدم مقدرتها على النمو في درجة حرارة 4°م. بعض الانواع التي تعود الى جنس *Pseudomonas* لها القدرة على النمو في درجة حرارة 46°م (Choi et al., 2002).

2.2 امراضية بكتريا الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* Pathogenicity

يمكن ان تسبب بكتريا الزائفة الزنجارية مجموعة واسعة من الامراض الانتهازية الحادة في المرضى الذين يعانون من حالات طبية مختلفة (Gellatly and Hancock, 2013). بكتريا الزائفة الزنجارية هي واحدة من الكائنات الحية الدقيقة الرئيسية والمسؤولة عن عدوى المستشفيات التي تحدث في بيئة المستشفى (Poole, 2011)، المؤثرة في المريض خلال مدة النقاهة في المستشفيات كما في المرضى الذين يعانون من الحروق ومن صدمة القرنية والاستعمال الطويل للناييب للمرضى لاسيما الاناييب المستعملة في القصبة الهوائية لمساعدة المريض على التنفس وكذلك ايضا التليف الكيسي والكسور المفتوحة وامراض الرئة والنقص المناعي وكبار السن. الاصابة ببكتريا الزائفة الزنجارية غالبا ما تكون مقاومة للعلاج بوساطة المضادات الحياتية المتعددة التي من الممكن ان تؤدي الى حدوث التهابات حادة ومستمرة (Doshi et al., 2011) ، وهذا يترجم الى المزيد من المضاعفات والالتهابات الفطرية الثانوية الناتجة عن تمديد مدة الاقامة في المستشفى او الفشل العلاجي وفي بعض الحالات الوفاة المبكرة لمرضى التليف الكيسي (Tan, 2008).

تقوم البكتريا خلال مدة الامراضية بانتاج وتكوين العديد من عوامل الضراوة التي تؤدي الى التسبب في عدوى المضيف البشري في الوقت نفسه وبمستويات مختلفة او يتصرف بشكل فردي محدثاً العدوى (Wu et al., 2008).

ومن هذه العوامل: عديد السكريات الدهن Lipopolysaccharide، عديد السكريات الخارجي Exopolysaccharide والاهداب والاسواط وعوامل الضراوة المفرزة بما في ذلك السموم وانزيم البروتيز والدهون المفسفرة فضلاً عن الجزيئات الصغيرة التي تشمل الفيمازين والسيانيد وجزيئات عديدة اخرى (Goven, 2007). أن حدوث الاصابة يعتمد على عدة عوامل متعددة تشمل طبيعة عوامل

الضراوة للانواع او السلالات والحالة المناعية للمضيف وعدد الكائنات الحية في التعرض الاولي (Chiang *et al.*, 1999). عندما تجد البكتريا موقعا مناسباً للاستعمار فانها تبدأ في التعبير عن جينات عوامل الضراوة يليها بعد ذلك انتاج عوامل الضراوة التي تغزو الخلايا المضيفة والتي تؤدي الى حدوث عملية الاصابة (Rasko and Sperandio, 2010).

هناك اربعة انواع رئيسة من العدوى التي تسببها بكتريا الزائفة الزنجارية وهي:

1. عدوى الحروق والجروح التي يمكن ان تلون الحروق وتنتفخ الانسجة بوساطة صبغاتها

الزرقاء والخضراء المشعة التي تؤدي في وقت لاحق الى تسمم الدم (Alinaqvi *et al.*, 2011).

2. عدوى الاذن تعد احد الاسباب الشائعة لمرض التهاب الاذن الوسطى والالتهابات التي

تسببها بكتريا *P.aeruginosa* وايضا قد تسبب التهاب الاذن الخارجية (Roland and Stroman, 2002).

3. التهاب المجاري البولية هي واحدة من اكثر الامراض التي تسببها بكتريا الزائفة الزنجارية

تدخل البكتريا الى مجرى المسالك البولية عن طريق القسطرة والاجهزة الطبية (Elkhatib and Noreddin, 2014).

4. التهاب الجهاز التنفسي تصيب بكتريا الزائفة الزنجارية المرضى الذين يعانون من الكبت

المناعي وامراض الرئة المزمنة وفشل القلب الاحتقاني التي تسبب بدورها الالتهاب الرئوي.

العدوى المزمنة في الجهاز التنفسي السفلي التي تسببها البكتريا تعد شائعة في المرضى الذين يعانون من التليف الكيسي، عزلت بكتريا الزائفة الزنجارية التي تكون مستعمرات مخاطية في

جسم المريض المصاب بالتليف الكيسي تكون شائعة ويصعب علاجها (Govan, 2007).

3.2 عوامل الضراوة Virulence Factors

بكتريا الزائفة الزنجارية هي أحد العوامل المسببة للأمراض و تنتج العديد من عوامل الضراوة بما في ذلك الانزيمات والسموم الخارجية كما ان لها القدرة على تكوين الغشاء الحيوي الذي يحميها من الاجهاد البيئي ومن خلايا البلعمة وايضا الاجسام المضادة للمضيف (Fujitani *et al.*, 2011).

ينتج ايضا هذا النوع من البكتريا عدداً من الاصباغ التي تمنع نمو البكتريا الاخرى ومن اهم هذه الاصباغ صبغة البايوسيانين الزرقاء الذائبة في الماء وصبغة البايوفريدين الخضراء المزرققة التي تكون سامة لخلايا العائل وايضا تنتج صبغات اخرى كما في صبغة البايوروبين الحمراء وصبغة البايوميلانين البنية (Ravel and Cornelis, 2003).

تعطي صبغة البايوسيانين الزرقاء المخضرة لمستعمرات بكتريا الزائفة الزنجارية لونها المميز الذي يؤثر في خلايا المضيف من خلال عوامل الاكسدة ونقل الالكترونات المايوتوكونديري وايضا تعطيل انزيم الكاتليز للمضيف ، تم تنقية البايوسينين مختبريا من اجل دراسة تأثيرها في حث الخلايا على الموت المبرمج لكريات الدم البيض فضلاً عن تثبيط عملية البلعمة في الاجسام التي تسبب موت الخلايا المبرمج (Bianchi *et al.*, 2008).

من عوامل الضراوة الاخرى التي تفرزها البكتريا انزيمات حالة للدهون Lipase وحالة للدهون المفسفرة Phospholipases التي تعمل على تحطيم الدهون والدهون المفسفرة الموجودة في الغشاء السطحي لخلايا المضيف، انزيمات الدهون المفسفرة الحاله قادرة على التحليل المباشر لكريات الدم الحمر في الانسان والاعنام (Kipnis *et al.*, 2006).

يتم افراز العديد من الانزيمات الحاله للبروتينات Proteases من قبل بكتريا الزائفة الزنجارية مثلت هذه الانزيمات دورا في تعفن الدم والتهابات العين إذ لها القدرة على تحليل الالياف Fibrin

والغويبولين المناعي immunoglobulin's وتعطيل الوصلات الظهارية الضيقة (Kipnis *et al.*, 2006).

تعد قدرة البكتريا على انتاج الغشاء الحيوي الية لمقاومة المضادات الحياتية وذلك لان خلايا الغشاء الحيوي اكثر مقاومة بكثير للمضادات الحيوية من خلايا العوالق (Lee *et al.*, 2014). يمكن ان تصبح بكتريا الزائفة الزنجارية مقاومة لبعض المضادات الحياتية مما يزيد من تعقيد عملية علاج العدوى، تنشأ هذه المقاومة بسبب مقدرة البكتريا على تكوين الغشاء الحيوي المتكون من تجمعات مطمورة في شكل مصفوفة في السكريات المتعددة الخارجية (Sharma *et al.*, 2014).

يمكن ان تشكل هذه البكتريا البيئية اغشية حيوية على مجموعة متنوعة من الاسطح الحية وغير الحية كما في السدادات المخاطية في التليف الرئوي والعدسات اللاصقة والقسطرة الملوثة (Hoiby *et al.*, 2010). تتكون هذه الاغشية الحيوية من بروتين وسكريات متعددة وحمض نووي خارج خلوي (Storz *et al.*, 2012). إذ انه يحتفظ بالخلية معا وهو امر ضروري في الاتصال الخلوي ما بين الخلايا كما يسمح بتكوين تراكيب ثلاثية الابعاد تتيح للبكتريا زيادة في الوصول الى العناصر الغذائية ومزايا متعددة اخرى (Sharma *et al.*, 2014).

4.2 وبائية بكتريا الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* Epidemiology

بكتريا الزائفة الزنجارية هي كائن واسع الانتشار موجود في العديد من البيئات المختلفة كما يمكن عزلها من الانسان والحيوان والنبات. ولها القدرة على البقاء على قيد الحياة عندما تكون احتياجاتها الغذائية قليلة وايضاً لها القدرة على تحمل العديد من العوامل الفيزيائية التي تسمح لها بالتواجد في المستشفيات وفي المجتمع (Lister *et al.*, 2009).

أن التنوع الأيضي والوراثي العالي لبكتريا الزائفة الزنجارية يمكنها من التكيف في معظم البيئات الطبيعية و الصناعية عبر العالم من معدات طبية وانسجة الحيوانات والنباتات والماء والتربة وحتى في محطة الفضاء الدولية (ISS) (Kim et al., 2013).

قد تؤدي الإقامة في المستشفى لمدة طويلة الى نسبة عالية من الاصابة بهذه البكتريا التي قد تصل الى 20 % في غضون 72 ساعة. لاسيما في المرضى ممن يعانون من الحروق والجروح الشديدة وايضا ممن يستعملون العامل المناعي المثبط ومضادات الايض والاشعاع التي تساعد على زيادة الاصابة وانتشار هذه البكتريا مسببة ما يطلق عليه بعدوى المستشفيات (Greenwood et al., 2007). ايضاً الاتصال المباشر وغير المباشر مابين المرضى وكذلك استعمال الادوات الجراحية الملوثة تسهل من انتشار هذه البكتريا، تمتلك البكتريا المقدرة على البقاء في المطهرات والعلاجات والادوية السائلة مثل قطرات العين واقنعة التخدير (Japoni et al., 2009).

ازدادت الاصابة بعدوى الالتهاب الرئوي المكتسبة من المستشفيات بسبب بكتريا الزائفة الزنجارية والتي تضاعفت من 9.6% الى 18.1% من عام 1975 الى عام 2003. اظهر المسح الوطني واسع النطاق لوحدة العناية المركزة في الولايات المتحدة ان اكثر بكتريا ممرضة معزولة من هذه الوحدات هي بكتريا الزائفة الزنجارية الهوائية السالبة لصبغة كرام إذ كانت نسبة الجراثيم المعزولة من الجهاز التنفسي 31.6 % في حين كانت نسبة البكتريا المعزولة من وحدات العناية المركزة 23 % اما المرضى الذين يعانون من التليف الكيسي (CFS) تستعمر فيهم البكتريا وتنتشر في وقت مبكر من الاصابة ويزداد توسع الاستعمار والانتشار بتقدم المرض (Fujitani et al., 2011).

5.2 مقاومة المضادات الحيوية Antibiotic resistance

اصبحت بكتريا الزائفة الزنجارية من مسببات الامراض الانتهازية المهمة والمتكررة في المستشفيات تتميز هذه البكتريا بمقاومة لفئات متعددة من المضادات الحيوية مما تسبب امراضاً يصعب علاجها والتي ترتبط بارتفاع معدلات الاعتلال والوفيات (Obritsch *et al.*, 2004). تمثل الالتهابات التي تسببت في الاصابة بالعدوى التي اكتسبها المجتمع بسبب بكتريا الزائفة الزنجارية تحدياً علاجياً كبيراً للعلاج باستعمال المضادات الحيوية لذا فان اختيار الجرعة المناسبة للمضادات الحيوية لبدء العلاج أمر ضروري لتجنب حدوث المضاعفات (Lister *et al.*, 2009).

تمتلك هذه البكتريا انماطاً مختلفة لمقاومة المضادات الحيوية المختلفة علاوة على ذلك تحت ضغط انتقائي محدد قد تطور هذه البكتريا وبسهولة مقاومة قوية اما عن طريق النقل الافقي لجينات المقاومة او من خلال طفرة في الجينات المشفرة كروموسومياً (Ekizoglu *et al.*, 2016).

تعتمد مقاومة بكتريا الزائفة الزنجارية للمضادات الحيوية المتعددة على عدة عوامل مختلفة اهمها هي النفاذية المنخفضة للأسطح الخارجية للبكتريا ، وراثياً فإنه يظهر مجموعة واسعة من الاليات لمقاومة المضادات الحيوية من خلال الاقتران و التحول و التتبغ وايضا مقدرة البكتريا على اكتساب جينات مقاومة اضافية من بكتريات اخرى بوساطة العناصر الجينية المنتقلة (البلازميدات، العاثيات، الجينات القافزة) (Tam *et al.*, 2010).

تم العثور على العديد من الالتهابات الناجمة عن سلالات مقاومة لهذه البكتريا عادة كعدوى ثانوية في مرضى السرطان ومرضى العوز المناعي المكتسب (AIDS) ومرض الانسداد الرئوي المزمن والتليف الكيسي وحتى بين مرضى السكر (Hogardt and Heesemann, 2013).

هناك عدة انواع من المضادات الحيوية (Amikacin, Ceftazidime, Cefepime, Carbapenems, Tobramycin) التي تعد مضادات فعالة ضد الامراض التي تسببها هذه البكتريا. زادت عزلات بكتريا الزائفة الزنجارية من مقاومتها للعديد من المضادات الحيوية الاخرى المرتبطة بمجموعات مختلفة بما فيها Carbencillin في السنوات القليلة الماضية (Martinez et al., 2009).

6.2 نظام استشعار النصاب Quorum sensing (QS) system

نظام استشعار النصاب موجود في بعض انواع البكتريا وهو اتصال كيميائي يحدث ما بين الخلايا لغرض تنسيق وتنظيم كل من التعبير الجيني ونشاطات المجموعة داخل المجتمعات. اكتشف لأول مرة من قبل الدكتور بيتر غرينبرغ عام 1994 في بكتريا *Vibrio fischeri* (Yang, 2009). نظام استشعار النصاب منتشر انتشاراً واسعاً في المملكة البكتيرية مع العديد من الانواع المختلفة وهي أنظمة تواصل إذ تؤدي دوراً مهماً في السيطرة على عوامل الضراوة (Yin et al., 2012).

تمتلك بكتريا الزائفة الزنجارية عدداً وانواعاً كثيرة من عوامل الضراوة بما في ذلك البروتينات المؤثرة المرتبطة بها مثل الدهون المفسفرة خارج خلوية وانزيم البروتيباز والسموم المفترزة من النوع الثالث ونظم الافراز من النوع الثاني والثالث فضلاً عن ذلك فهي تمتلك اسواطاً وأهداباً تساعد على الالتصاق على خلايا المضيف والحركة (Feinbaum et al., 2012).

تعمل عوامل الضراوة على تمكين البكتريا وتسهيلها لغزو العائل والهروب من المراقبة المناعية للمضيف وقمع الاستجابة المناعية للمضيف فضلا عن مقدرتها على تعزيز المقاومة وشدة التحمل للمضادات الحيوية التقليدية (Lyczak *et al.*, 2000).

تمثل عوامل الضراوة بالتأكيد دوراً مهماً في احداث المرض ولكنها لاشارك في النمو البكتيري يعد أستشعار النصاب مسؤولاً عن تنظيم التعبير الجيني لمعظم عوامل الضراوة بما في ذلك العوامل المشفرة لانتاج السموم مثل سيانيد الهيدروجين ،التخليق الحيوي للسكريات المتعددة الخارج خلوية، اكتساب الحديد، انتاج صبغات كالبايوفيريدين والبايوسيانين ، تكوين الغشاء الحيوي (Feinbaum *et al.*, 2012 ; Girard and Bloemberg, 2008).

فضلاً عما ذكر فإن نظام استشعار النصاب يسمح بتنظيم السلوكيات المجتمعية بما في ذلك

الانتشار، السباحة، الحركة، الاقتران (Rutherford and Basler, 2012).

جميع الانظمة البكتيرية التي تمتلك نظام استشعار النصاب تعتمد على انتاج وافراز وكشف جزيئات الاشارة (Kalia and Purohit, 2011). يسمح نظام استشعار النصاب للبكتريا بتحديد مستعمراتها واتخاذ قرارات جماعية تعتمد على كثافة الخلية مما تنسق عمل المجتمع البكتيري بأسره ليتصرف مثل الكائن الحي متعدد الخلايا. عادةً ما تكون هذه السلوكيات مرتبطة دائماً بالامراض والضراوة (LaSarre and Federle, 2013).

7.2 تكنولوجيا النانو Nanotechnology

1.7.2 مقدمة في تكنولوجيا النانو Introduction in Nanotechnology

كلمة نانو مشتقة من الكلمة اليونانية نانوس (Nanos) التي تعني القزم التي تشير للأشياء ذات حجم واحد بليون (10^{-9}) نانوميتر، لقد جذبت الجسيمات النانوية مزيداً من الاهتمام نظراً لأستعمالها في الكثير من المجالات بما في ذلك الطب النانوي وايضا بسبب الخصائص الفريدة والمميزة التي تمتلكها هذه الجسيمات وهذه المميزات أدت الى توفير تقنيات بسيطة لانتاج وتخليق الجسيمات المعدنية بحجمها النانوي، توفر المواد النانوية والجسيمات النانوية حلاً للتحديات البيئية والتكنولوجية في العديد من المجالات وأن هذه المميزات تعتمد بشكل كبير على الشكل والحجم الكلي للجسيمات وتوزيعها (Płaza et al., 2014). ظهرت تكنولوجيا النانو الحيوية كعامل متكامل بين التكنولوجيا النانوية والتكنولوجيا الحيوية من اجل تطوير التخليق الحيوي والصدىق للبيئة لانتاج واعداد المواد والجسيمات النانوية (Sahayaraj and Rajesh, 2011).

تمثل هذه التكنولوجيا بديلاً اقتصادياً للتقنيات الفيزيائية والكيميائية في تشكيل ونتاج المواد والجسيمات النانوية في عام 1974 صاغ مصطلح تقنية النانو الاستاذ نوريو تانيجوشي (Norio Taniguchi) من جامعة طوكيو للعلوم. يمكن تجميع الجسيمات النانوية على نطاق واسع الى مجموعتين وهما:

1. الجسيمات النانوية العضوية Organic nanoparticles: تحتوي هذه المجموعة على

مجاميع أصيلة من الكربون تم اكتشافها في العقدين الاخيرين، ومنذ ذلك الحين يتم أستعمالها في العديد من مجالات العلوم. تشمل الجسيمات النانوية العضوية أوكسيد الكرافين النانوي

وأنايبب الكربون النانوية أحادية الجدار (Adibkia *et al.*, 2011) ، وجسيمات الكربون النانوية التي اظهرت خصائص قوية ومميزة، تعد مساحة وحجم الجسيمات النانوية الكربونية من العوامل المهمة جداً التي تؤثر في نشاطها المضاد للبكتريا لذا فان زيادة مساحة سطح المواد والجسيمات النانوية عن طريق تقليل الحجم تؤدي الى تحسين نشاط التفاعل مع البكتريا (Kang *et al.*, 2008).

2. الجسيمات النانوية اللاعضوية **Inorganic nanoparticles**: تتضمن هذه المجموعة

جسيمات النانو المغناطيسية وجسيمات النانو ذات المعادن النبيلة وجسيمات الذهب والفضة النانوية وجسيمات النانو شبه الموصلة (أوكسيد الزنك وأوكسيد التيتانيوم)، هنالك اهتمام متزايد بالموارد الطبيعية غير العضوية لانها توفر تنوعاً وظيفياً مع خصائص المواد المذكورة إذ تعد جسيمات النانو المعدنية من اهم العوامل الحيوية الطبية مثل الزنك والذهب والكربون والفضة والتيتانيوم والحديد والبلاديوم والنحاس التي تستعمل في الغالب لتخليق هذه الجسيمات، بسبب الحاجة المتزايدة لهذه الجسيمات النانوية يجب ان يتم تطوير عمليات تخليق وانتاج لهذه الجسيمات بطرائق صديقة للبيئة من خلال النهج البيولوجية إذ تعد أقل كلفة وأقل سمية من الطرائق الاخرى (الكيميائية والفيزيائية) (Vadlapudi and Kaladhar, 2014).

تعد جسيمات النانو مهمة جداً في العديد من المجالات لاسيما الطبية وذلك بسبب خصائصها ومميزاتها الفريدة الآتية:

- ❖ حجمها الصغير الذي يتراوح ما بين 1-100 نانوميتر .
 - ❖ المساحة السطحية الكبيرة جداً مقارنةً بحجمها.
 - ❖ الخصائص البيولوجية والكيميائية المميزة.
 - ❖ الصلابة الهيكلية التي تملكها هذه الجسيمات على الرغم من تركيبها الذري الصغير .
 - ❖ تعتمد تجمعات الجسيمات النانوية المحسنة على طبيعة التغيير السطحي الاشارات الضوئية التي تتعرض لها المادة.
 - ❖ شديدة التحمل للحرارة العالية، القدرة على التوصيل الكهربائي، تحسين النشاط السطحي المحفز
- (Sahayaraj and Rajesh, 2011).

2.7.2 المواد النانوية كمضادات حيوية Nanomaterials as antimicrobials

أدى الاستعمال المفرط والمتكرر للمضادات الحيوية الكلاسيكية الى خفض قدرتها أمام الامراض المعدية واسعة الأنتشار واصبح من الضروري القيام بتدخلات طبية عديدة لتفادي هذه الحالة. مهدت المضادات الحيوية الطريق للتطورات الطبية والمجتمعية التي اصبحت ضرورية في جميع النظم الصحية. زادت المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية على نطاق واسع بين العديد من الانواع البكتيرية المسببة لأمراض في جميع انحاء العالم وأدت الى حقيقة أن المضادات الحيوية الأكثر شيوعاً لم تعد فعالة في السيطرة على الامراض المعدية لذا قد خلق قلقاً وتحدياً في قطاع الرعاية الصحية (Laxminarayan *et al.*, 2013). لذلك فإن تطوير أنظمة جديدة مضادة للجراثيم أمام

مسببات الامراض المقاومة للعقاقير يمثل تهديداً كبيراً للعلاج الناجح للمرض الجرثومي (Huttner *et al.*, 2013).

تم تسمية الكائنات متعددة المقاومة للمضادات الحيوية مؤخراً باسم مسببات الامراض مثل:

Enterococcus faecium, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter spp.*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, والتي تدل على قدرتهم على الهروب من أثار العوامل المضادة للبكتيريا أو عدم وجود مضادات حيوية فعالة وجديدة (Giamarellou *et al.*, 2010).

أسباب مقاومة المضادات الحيوية معقدة وتشمل السلوك البشري وعلى مستويات مختلفة من المجتمع التي تؤثر في الجميع في العالم (Levy *et al.*, 2004). بذلت محاولات كثيرة لشرح مقاومة المضادات الحيوية والتدخلات اللازمة لمواجهة هذا التحدي (Organization, 2014). خلقت المقاومة المتزايدة للبكتيريا والفطريات للمضادات الحيوية الكلاسيكية مشاكل سريرية هائلة لاسيما لدى مرضى العوز المناعي (الأيدز) والسرطان، فضلاً عن ذلك فإن تحديد ومعالجة الكائنات الحية الدقيقة المقاومة للمضادات الحيوية أمر صعب ومكلف (Li *et al.*, 2005). علاوة على ذلك فإن المضاعفات المرتبطة بالالتهابات البكتيرية المقاومة للمضادات الحيوية توفر معدلات اعتلال ووفيات عالية (Sefton, 2002). أتمتت تقنية النانو كطريقة لتطوير عوامل جديدة مضادة للميكروبات غير تقليدية تسمى المضادات الحيوية النانوية التي هي علاج فعال للأمراض المعدية التي تمتلك العديد من المزايا مقارنة مع المضادات الحيوية التقليدية بما في ذلك عدم وجود أثار ضارة وزيادة الفعالية ضد الانواع المقاومة للعقاقير والتغلب على تطور المقاومة التي تتداخل مع المسارات البيولوجية المتعددة (Huh and Kwon, 2011). تظهر المضادات النانوية نشاطاً مضاداً للميكروبات من تلقاء نفسها

أو تزيد من فعالية وسلامة ادارة المضادات الحيوية التقليدية مما يؤدي الى تكوين تراكيز محلية عالية ومؤثرة (Hajipour *et al.*, 2012).

المضادات النانوية لديها بعض المميزات الواضحة مقارنة بالمضادات الحيوية التقليدية بما في ذلك سميتها المنخفضة وقدرتها على التغلب على المقاومة البكتيرية للمضادات وانخفاض التكلفة (Huh and Kwon, 2011). يمكن ان تسبب المضادات النانوية المضادة للميكروبات اضطراباً ميكانيكياً في الغشاء البكتيري كالعلاج بوساطة نظام دفاعي للبكتريا (Guzman *et al.*, 2012).

3.7.2 آليات العمل التي تقتل بها المضادات النانوية البكتريا المعنية

The Mechanism of action by which of these NPs Kill bacteria involved

1. انتاج انواع الاوكسجين التفاعلية (Reactive oxygen species) مثل بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 والهيدروكسيد OH والاكسجين O_2 .
2. اضطراب غشاء جدار الخلية البكتيرية.
3. تثبيط تخليق الحمض النووي ونشاط الانزيمات داخل خلوية.
4. قطع وصول الطاقة الى البكتريا (Xie *et al.*, 2011).

تم انتاج العديد من المواد والجسيمات النانوية مع ظهور التكنولوجيا النانوية التي تملك خصائص مضادة للجراثيم لسد فجوة فشل العلاج بالمضادات الحيوية التقليدية (Beyth *et al.*, 2015).

تشمل الجسيمات النانوية ذات الخصائص المضادة للبكتريا أوكسيد الزنك وأوكسيد الحديد (Alkhalifawi, 2015) ، أوكسيد الكرافين (Zhu *et al.*, 2013)، أوكسيد النحاس (Jadhav *et al.*, 2011)، أوكسيد التيتانيوم (Srisitthiratkul *et al.*, 2011)، الفضة

(Alkhalifawi, 2011)، أكسيد المغنيسيوم (Al-Hazmi *et al.*, 2012)، أكسيد النترات (Martinez *et al.*, 2009).

4.7.2 جسيمات أكسيد الزنك النانوية Zinc Oxide Nanoparticles

تحقق جسيمات أكسيد الزنك النانوية اهتماماً خاصاً فيما يتعلق بالعديد من المجالات لاسيما الطبية منها وذلك نظراً لميزاتها الكيميائية والكهربائية والبصرية الفريدة (Jiang *et al.*, 2009).

تظهر جسيمات الزنك النانوية فعالية قوية ضد البكتريا المسببة للأمراض واسعة الطيف ومنها:

Staphylococcus aureus, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas fluorescense*, (Ravishankar Rai and Jamuna Bai, 2011).

يتم استعمال المجهر الإلكتروني الماسح (SEM) لتحليل التغيرات المظهرية للجراثيم المستحثة بالجسيمات النانوية لتحديد الآليات المختلفة، على الرغم من أن النشاط المضاد للجراثيم يشير إلى عدد من الفعاليات مثل الفعالية السمية للجسيمات النانوية التي مازالت غير واضحة ولا تزال مثيرة للجدل والفعالية المضادة للجراثيم تتطلب تفسيراً عميقاً للآليات التي تستعملها المضادات للقضاء على الجراثيم، في حين أن الآليات المميزة للجسيمات النانوية يمكن طرحها على النحو الآتي:

❖ الاتصال المباشر لجسيمات الزنك النانوية مع جدار الخلية البكتيرية يؤدي إلى تدمير هذا الجدار.

❖ إطلاق الأيونات المضادة للبكتريا لاسيما أيونات الزنك الثنائية الشحنة (Kasemets *et al.*, 2009).

❖ تشكيل أنواع الأوكسجين التفاعلية (ROS) (Jalal *et al.*, 2010).

تختلف الآلية السمية في الوسائط المختلفة إذ قد يتغير نوع الزنك الذائب وفقاً لمكونات الوسط فضلاً عن الخصائص الفيزيائية والكيميائية للجسيمات النانوية (Li *et al.*, 2011). في حين ان نشاط الجسيمات النانوية المضاد للبكتريا مهم للغاية إذ يمكن ان يقلل من شدة الاصابة والتهابات الجلد والالتهابات في الفئران وكذلك تحسين بنية الجلد المصابة (Pati *et al.*, 2014). تستعمل جسيمات الزنك النانوية لمنع نمو بكتريا الأشريشية القولونية من خلال تفكيك غشاء الخلية وزيادة نفاذية الغشاء (Huh and Kwon, 2011).

تشير بعض الابحاث الى ان انتاج بيروكسيد الهيدروجين واختراقه للمغلف الحيوي البكتيري وعدم تنظيم الغشاء البكتيري بعد ملامسته لجسيمات الزنك النانوية إذ من المحتمل ان هاتين الأليتين مرتبطتان بتنشيط البكتريا (Huang *et al.*, 2008).

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل

Materials and

Methods

3. المواد وطرائق العمل Material and Methods

1.3 المواد Materials

1.1.3 الاجهزة والمعدات Equipment's and Apparatus

جدول 3-1: الاجهزة والمعدات المختبرية المستعملة في الدراسة.

الشركة المصنعة ومنشأها	اسم الجهاز	ت
Jordan / AFMA	Microtiter plate حفرة 96	1
Spain / GEMA	Millipore filter اغشية ترشيح دقيقة	2
France / BioMérieux	بطاقة اختبار الحساسية للمضادات الحيوية للفايتك 2 Vitek2 AST card	3
China / Shark China / Vestel	Refrigerator ثلاجة	4
USA / BioTek	جهاز الاليزا لفحص الانزيمات المرتبطة مناعيا Enzyme-linked immunosorbent assay	5
Germany / GFL	Distiller جهاز التقطير	6
Korea / Wise Clean	Ultra sonic جهاز الموجات فوق الصوتية	7
Japan /Shimadzu6000	XRD 6000 جهاز حيود الاشعة السينية	8
Germany /Hermle	Centrifuge جهاز طرد مركزي	9
France/ BioMérieux	Vitek compact system 2 جهاز فايتك 2	10
USA / Brookhaven	Analyzer Zeta potential جهاز قياس زيتا المحتملة	11
Germany / Binder	Incubator حاضنة	12
Germany / HT	Shaker Incubator حاضنة هزازة	13
Germany / Memert	Water path حمام مائي	14
Germany / Memert	Electrical Oven فرن كهربائي	15
Korea / Vision	Laminar air flow كابينة زرع	16
Korea / Lab Tech	Hot plate with Magnetic stirrer لوح التسخين المازج	17

Korea / Bionex	Vortex مازج	18
Canada / Bio Basic	Micropipettes ماصات دقيقة مختلفة الاحجام	19
Czech / Tescan Republic	Scanning electron المجهر الالكتروني الماسح microscopy	20
/ Phywe Switzerland	Atomic Force microscopy مجهر القوى الذرية	21
Japan / Olimpus	Light microscope مجهر ضوئي	22
UK / Sterelline	Buccal Swaps مسحات قطنية	23
Biozek / Netherlands	Transport media swap مسحات قطنية مع وسط ناقل	24
Japan / Shimadzu	UV. Vis مطياف الاشعة فوق البنفسجية Spectrophotometer 1800	25
Japan / Shimadzu	Infrared spectroscopy مطيافية الاشعة تحت الحمراء (FT-IR)	26
Singapore / Oakton	pH meter مقياس الرقم الهيدروجيني	27
Korea / Vision	Autoclave مؤصدة	28
Germany / Kern	Sensitive Balance ميزان حساس	29

2.1.3 المواد الكيميائية والحيوية Chemical and Biological Material

جدول 2-3 المواد الكيميائية والحيوية المستعملة في الدراسة

الشركة المصنعة والمنشأ	المادة	ت
Germany / Direvo	2,2-dipyridal (C ₁₀ H ₈ N ₂)	1
Germany / Sigma	Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	2
India / Qualikemis	Methyl red احمر المثليل	3
India / Thomas Baker	α -Nepthol الفا نفتول	4
England / Solvochem	H ₂ O ₂ بيروكسيد الهيدروجين	5
India / Himedia	Nalidixate Acid حامض النالديكسيت	6

مصرف الدم / مستشفى مدينة الطب / بغداد - العراق	Human Blood O+ الدم البشري	7
Switzerland / Syrbio	Gram stain صبغة كرام	8
England / Difco	NNNN Tetra methyl-P - phenylene diamine dihydro chloride كاشف الاوكسيديز -	9
India / CDH	Kovacs reagent كاشف كوفاكس	10
Germany / Merck	ZnSo ₄ كبريتيد الزنك	11
Spain / Sentmenat	Ethanol 70% كحول ايثيلي 70 %	12
Germany / Baker	Absolute Ethanol (99%) كحول ايثيلي مطلق (99%)	13
England/ B.D.H	Absolute Methanol(99%) كحول مثيلي مطلق (99%)	14
Spain /Barcelona	Glucose كلوكوز	15
England/Solvochem	Glycerol كليسروول	16
Germany / Schuchard	Normal Saline محلول الملح الفسلجي	17
England / B.D.H	محلول دارئ الفوسفات الملحي	18
China / Sino-Pharm	Crystal Violet Powder مسحوق البنفسج البلوري	19
/	Skim Milk Powder مسحوق الحليب الفرز	20
Switzerland / Fluka	Congo red Powder مسحوق الكونغو الاحمر	21
England / B.D.H	NaOH هيدروكسيد الصوديوم	22
Spain / Panreac	KOH هيدروكسيد البوتاسيوم	23
India / CDH	Urea يوريا	24

3.1.3 الاوساط الزرعية Culture media

جدول 3-3 الاوساط الزرعية الجاهزة والمحضرة التي تم استعمالها في الدراسة.

الشركة المصنعة ومنشأها	الوسط الزرع	ت
USA / Mast	Agar Agar اكار	1
England / Oxoid	King A-Agar اكار	2
India / Himedia	Urea Agar Base اكار اساس اليوريا	3
England / Oxoid	Blood Agar Base اكار الدم الاساس	4
India / Himedia	Cetrimide Agar اكار السترميد	5
India / Himedia	Simmon Citrate Agar اكار السيمون سيتريت	6
England / Oxoid	MacConkey Agar اكار الماكونكي	7
India / Bio Mark	Nutrient Agar الاكار المغذي	8
India / Himedia	Muller – Hinton Agar اكار المولر - هنتون	9
India / Himedia	Trypton Soya Agar اكار تريبتون الصويا	10
England / Oxoid	Kligler – Iron Agar اكار كليكلر الحديد	11
/Saluceua Netherlands	Peptone Water ماء الببتون	12
England / Mast	Brain –Heart infusion Broth مرق نقيع القلب والدماغ	13
England / Oxoid	مرق احمر المثيل - فوكس بروسكاور Methyl red – Voges Proskauer Broth	14
India / Himedia	Trypton Soya Broth مرق تريبتون الصويا	15
India / Himedia	Luriea Berton Broth مرق لوريا	16
England / Mast	Brain –Heart infusion Agar اكار نقيع القلب والدماغ	17

4.1.3 المضادات الحيوية المستعملة في تحديد التركيز المثبط الأدنى (MIC)

جدول 3-4 يوضح المضادات الحيوية المستعملة في تحديد التركيز المثبط الأدنى (MIC)

الرمز	نقطة التوقف	المضادات الحيوية
AK	≤ 16	Amikacin
FEP	≤ 8	Cefepime
CAZ	≤ 8	Ceftazidime
CIP	≤ 1	Ciprofloxacin
CT	≤ 2	Colistin
CN	≤ 4	Gentamicin
IPM	≤ 2	Imipenem
MEM	≤ 2	Meropenem
PRL	≤ 16	Piperacillin
TZB	$\leq 16/4$	Piperacillin/Tazobactam
TI	≤ 16	Ticarcillin
TIM	$\leq 16/2$	Ticarcillin/Clavulanic acid
TOB	≤ 4	Tobramycin

2.3 طرائق العمل Methods

1.2.3 التعقيم Sterilization

1.1.2.3 التعقيم بواسطة المؤصدة Sterilization by using Autoclave

عقمت الاوساط الزرعية في الجدول (2-3) والمحاليل بواسطة المؤصدة على درجة حرارة

121 °م وبضغط 1.5 باوند / انج² ولمدة 15 دقيقة (Tille, 2015).

2.1.2.3 التعقيم بواسطة فرن الهواء الساخن Sterilization by using Hot Air Oven

عقمت الزجاجيات وجفت بواسطة الفرن الحراري وعلى درجة حرارة 180 °م ولمدة ساعة

واحدة (Tille, 2014).

3.1.2.3 Sterilization by using التتعقيم بوساطة المرشحات ذات الفتحات الصغيرة

Millipore filters

عقمت المحاليل التي تتأثر بالحرارة العالية بوساطة المرشحات Millipore Filter ذات

القطر 0.22 مايكروميتر (Rao, 2008).

2.2.3 تحضير الكواشف والمحاليل Preparation of reagents and solutions

1.2.2.3 كاشف الكاتليز Catalase reagent

حضر تركيز 3 % بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 عن طريق اخذ 12 مل من بيروكسيد

الهيدروجين ذو تركيز 25 % واكمل الحجم الى 100 مل من الماء المقطر ثم حفظ الكاشف في

قنينة معتمة، استعمل الكاشف لتحري عن قابلية العزلات على انتاج الكاتليز (Tadesse and

.Alem, 2006).

2.2.2.3 كاشف الاوكسيديز Oxidase reagent

حضر الكاشف انياً باذابة 1 غم من مادة NNNN tetra methyl para phenylene

diamine dihydrochloride في 100 مل من الماء المقطر تم تعقيمه باستعمال وحدات

الترشيح Millipore Filter وحفظ في قنينة معتمة ووضع في الثلاجة لحين الاستعمال، هذا

المحلول يستعمل للكشف عن قابلية العزلات البكتيرية في انتاج انزيم الاوكسيديز

.(Macfaddin, 2000).

3.2.2.3 Voges – Proskauer reagent بروسكاور - فوكاس اختبار

يتكون من محلولين هما:

المحلول الاول: حضر باذابة 5 غم من الالفا نفتول α -Nepththol في 100 مل من الكحول الايثيلي المطلق.

المحلول الثاني: حضر محلول هيدروكسيد البوتاسيوم باذابة 40 غم منه في 90 مل من الماء المقطر ثم اكمل الحجم الى 100مل. يهدف هذا الاختبار للكشف عن قابلية العزلات على تخمير سكر الكلوكوز وانتاج الاستونين (Cruickshank *et al.*, 1975).

4.2.2.3 تحضير محلول صبغة البنفسج البلوري preparation of crystal violet dye

solution

حضر المحلول باضافة 0.1 غم من مسحوق البنفسج البلوري في 10 مل من الماء المقطر وعقم بوساطة وحدات الترشيح الدقيقة ثم حفظ في درجة حرارة 4 °م، استعمل في التحري عن قدرة العزلات البكتيرية على تكوين الغشاء الحيوي (Biofilm Formation) (Mathur *et al.*, 2006) ; (Babapour *et al.*, 2016 ;

3.2.3 تحضير الاوساط الزرعية Preparation of cultural media

1.3.2.3 الاوساط الزرعية الجاهزة Ready-made media

حضرت جميع الاوساط الزرعية الجاهزة وهي اكار الماكونكي MacConkey agar ، اكار المولر هنتون Muller-Hinton agar ، مرق نقيع القلب والدماغ Brain heart infusion broth ، اكار نقيع القلب والدماغ Brain heart infusion agar ، الاكار المغذي Nutrient agar ، مرق اللوريا Luria Berton broth ، مرق تربتون الصويا Trypton soya broth ، اكار السيمون سيترات Simon-Citrate agar ، اكار كليكلر الحديد Kligler Iron agar ، مرق ماء البيبتون

Peptone Water broth ومرق المثيل الاحمر /فوكس بروسكاور MR/VP broth. حسب تعليمات الشركة المصنعة لها والمثبتة على العبوة. عقت جميعها بالمؤصدة بحرارة 121 °م وبضغط 1.5 باوند /انج² ولمدة 15 دقيقة ثم تركت لتبرد بعد ذلك صبت في اطباق او انابيب معقمة وحفظت في الثلاجة لحين الاستعمال.

2.3.2.3 تحضير الاوساط الزرعية التركيبية Preparation of synthetic Media

1.2.3.2.3 وسط اكار الستراييد Cetrמידe agar

حضر الوسط عن طريق اذابة 46.7 غم من اكار الستراييد في 1000 مل من الماء المقطر الحاوي على 10 مل من الكليسيروول ثم عقم بوساطة المؤصدة بدرجة حرارة 121 °م وبضغط 1.5 باوند / انج² ولمدة 15 دقيقة ثم برد الى 45 °م وبعد ذلك اضيف 15 ملغم من Nalidixic acid ثم مزج جيدا ومن ثم صب في اطباق معقمة وترك ليتصلب واستعمل في عزل وتشخيص بكتريا الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* (Hashim, 2013).

2.2.3.2.3 وسط اكار اساس الدم Blood agar base

حضر وسط اكار الدم حسب تعليمات الشركة المصنعة إذ ذوب 39.5 غم من اكار اساس الدم في لتر واحد من الماء المقطر حرك الوسط ليتجانس ثم عقم بالمؤصدة لمدة 15 دقيقة وعلى درجة حرارة 121 °م وضغط 1.5 باوند /انج². ترك الوسط ليبرد الى درجة حرارة 45 °م ثم اضيف 5-7% من دم الانسان ورج جيدا ثم صب في اطباق معقمة وترك ليتصلب يستعمل هذا الوسط في الكشف عن قدرة العزلات على انتاج انزيم الهيمولايسين Hemolysin (Vandepitte et al., 2003).

3.2.3.2.3 Urea agar medium وسط اكار اليوريا

حضر هذا الوسط عن طريق اذابة 2.4 غم من وسط اساس اكار اليوريا Urea agar base في 95 مل من الماء المقطر ثم عقم بالمؤصدة وترك ليبرد حتى درجة 45°م واضيف للوسط 5 مل من محلول اليوريا ذات تركيز 40 % والمعقمة بالمرشحات الدقيقة ذات قطر 0.45 مايكروميتر ثم صب الوسط في انابيب معقمة ووضعت بشكل مائل ومن ثم حفظت في درجة حرارة 4 °م استعمل هذا الوسط للتحري عن قابلية البكتريا على انتاج انزيم اليوريز (Forbes *et al.*, 2007).

4.2.3.2.3 Indol Test medium وسط اختبار الاندول

حضر عن طريق اذابة 20 غم من البيبتون و5 غم من كلوريد الصوديوم في 950 مل من الماء المقطر وتم اكمال الحجم الى (1) لتر وعقم بالمؤصدة ووزع في انابيب وحفظ في درجة حرارة 4°م، استعمل غرض الكشف عن قابلية العزلات البكتيرية على انتاج حلقة الاندول (Collee *et al.*, 1996).

5.2.3.2.3 Skim milk agar وسط اكار الحليب الفرز

أذيب 10 غم من الحليب الفرز Skim milk powder في 100 مل من الماء المقطر وعقم في المؤصدة لمدة 5 دقائق، حضر الوسط المغذي الصلب بأذابة (25.2) غم في 900 مل من الماء المقطر وعقم بالمؤصدة لمدة 15 دقيقة وترك ليبرد الى درجة حرارة 45 °م، تم اضافة محلول الحليب الفرز الى الاكار المغذي ومزج جيدا وصب في اطباق معقمة وترك ليتصلب. استعمل هذا الوسط للكشف عن قابلية العزلات البكتيرية على انتاج انزيم Protease (Senior *et al.*, 1988).

6.2.3.2.3 مرق نقيع القلب والدماغ مع الكلوكوز

Brain heart infusion broth with glucose 2%

حضر باذابة 0.2 غم من سكر الكلوكوز في 100 مل من مرق نقيع القلب والدماغ، عقم بالمؤصدة من ثم رشح باستعمال المرشحات. يستعمل هذا الوسط في الكشف عن قدرة البكتريا على تكوين الغشاء الحيوي (Babapour *et al.*, 2016).

7.2.3.2.3 استعمال اكار احمر الكونغو للتحري عن الاغشية الحيوية

Use of Congo red agar to investigate biofilm formation

حضر الوسط عن طريق خلط 37 غم/ لتر من مرق نقيع القلب والدماغ مع 50 غم/ لتر كلوكوز و 10 غم / لتر اكار ومن ثم 0.8 غم/ لتر من صبغة الكونغو الحمراء. مسحوق صبغة الكونغو الاحمر حضرت كمحلول مائي مركز وعقمت بصورة منفصلة عن مكونات الوسط الاخرى ، اضيف المسحوق للوسط المعقم بعد ان ترك ليبرد حتى درجة حرارة 45 °م ومزج الخليط جيدا بعد ذلك صببت في اطباق معقمة. الهدف من استعمال هذا الوسط هو الكشف المظهري على تكوين طبقة رقيقة على الاسطح الصلبة (Freeman *et al.*, 1989).

8.2.3.2.3 وسط انتاج صبغة البايوسيانين الصلب King -A Agar

ذوب 46 غم من الوسط في لتر واحد ومن ثم اضيف للوسط 10 مل من الكليسيروول عقم الوسط من ثم ترك ليبرد وصب في اطباق معقمة وحفظ في درجة حرارة 4°م لحين الاستعمال. يستعمل هذا الوسط للكشف عن مقدرة بكتريا الزائفة الزنجارية على تكوين صبغة البايوسيانين Pyocyanin الخضراء المزرققة (Murray *et al.*, 2007).

4.2.3 جمع العينات Collection of Sample

جمع 104 عينة من عدة مصادر سريرية وباعمار مختلفة وللمدة مابين 2018/ 12/9 ولغاية 2019 / 3 /3 وتضمنت: 35 عينة من البول، 25 عينة قشع، 18 عينة اخماج الجروح، 9 عينة اذن، 6 عينة سائل النخاع الشوكي، 5 عينة اخماج الحروق، 4 عينة دم وعينتان خراجات جلدية من مستشفيات مدينة الطب في بغداد (مستشفى بغداد التعليمي، مستشفى غازي الحريري، مستشفى الحروق، المختبرات التعليمية) وزرعت على اوساط الماكونكي ووسط اكار الدم ووسط اكار السيتريمايد لغرض العزل والتشخيص الاولي للبكتريا.

5.2.3 تشخيص العزلات البكتيرية Identification of bacterial isolates

1.5.2.3 الفحوصات المظهرية Morphological Examinations

درست الصفات المظهرية للمستعمرات البكتيرية النامية على وسط اكار الدم Blood agar ووسط اكار الماكونكي MacConkey agar ووسط اكار السيتريمايد Cetrimide agar لتشخيص الصفات المزرعية من اذ شكل المستعمرات وحجمها ولونها والرائحة الصادرة منها وقدرتها على انتاج الصبغات اذ تكون العزلات النامية على وسط الماكونكي شاحبة اللون لعدم مقدرتها على تخمير سكر اللاكتوز كما تظهر باللون الاخضر على وسط اكار السيتريمايد الانتخابي الذي يسمح فقط بنمو بكتريا الزائفة الزنجارية ويمنع نمو انواع البكتريا الاخرى (Levinson,2016).

2.5.2.3 الفحوصات المجهرية Microscopic Examinations

تم الفحص المجهرية للعزلات الجرثومية عن طريق اخذ مسحة smears وصبغت بصبغة كرام ومن ثم فحصت تحت المجهر لملاحظة تفاعلها مع الصبغة فضلا عن شكل وترتيب الخلايا (Forbes et al., 2007).

3.5.2.3 الفحوصات الكيموحيوية Biochemical Tests

اجريت الفحوصات الكيموحيوية من اجل تشخيص عزلات بكتريا *P. aeruginosa* كالآتي:

1.3.5.2.3 اختبار انزيم الاوكسيديز Oxidase test

اخذت مستعمرة بكتيرية مفردة ويعمر 18-24 ساعة بواسطة عود خشبي معقم الى قطعة من ورق الترشيح ثم نضع قطرتين من كاشف الاوكسيديز فوقها ، تعد النتيجة موجبة في حالة تغير اللون الى الارجواني الغامق (Procop et al., 2016).

2.3.5.2.3 اختبار انزيم الكاتليز Catalase test

اخذت مستعمرة بكتيرية مفردة ويعمر 18-24 ساعة ونقلت الى شريحة زجاجية نظيفة، ثم اضيف لها قطرة من بيروكسيد الهيدروجين (3%) الفقرة (1.2.2.2) ، ان ظهور فقاعات هوائية دليل على ايجابية الاختبار (Procop et al., 2016).

3.3.5.2.3 النمو بدرجتي حرارة (4 م° و 42 م°)

زرعت العزلات البكتيرية بطريقة التخطيط (Streaking) وعلى وسط الاكار المغذي وحضنت بدرجة حرارة 4 م° و 42 م° ولمدة 24 ساعة، يعد وجود النمو دليلا على ايجابية الفحص (Forbes et al,2007).

4.3.5.2.3 اختبار انتاج الاندول Indol Production test

لقح وسط ماء البيبتون بمستعمرة بكتيرية مفردة وحضن بدرجة 37 م° ولمدة 24 ساعة بعد ذلك تم اضافة 5 قطرات من كاشف كوفاكس ورج بهدوء، ان ظهور حلقة حمراء اللون في الوسط دليل على ايجابية الاختبار وقدرة البكتريا على انتاج الاندول من الحامض الاميني التريبتوفان (Macfaden, 2000).

5.3.5.2.3 Methyl red test (MR) اختبار الميثيل الاحمر

لقت انابيب الوسط احمر الميثيل - فوكس بروسكاور MR-VP بمستعمرات بكتيرية وبعمر 18-24 ساعة من ثم حضنت في درجة حرارة 37 °م لمدة 24 ساعة ثم تم اضافة خمس قطرات من كاشف احمر الميثيل الى كل انبوية ورجت بعناية. ان تغير اللون الى الاحمر مؤشر على ايجابية الاختبار وقدرة البكتريا على تخمير سكر الكلوكوز ونتاج الحوامض (Macfaden, 2000).

6.3.5.2.3 Vogas – Proskauer test اختبار فوكس – بروسكاور

لقت انابيب وسط احمر الميثيل فوكس - بروسكاور MR-VP بالعزلات البكتيرية ، بعمر من 18-24 ساعة ومن ثم حضنت بحرارة 37 °م ولمدة 24 ساعة بعد ذلك اضيف لها 6 قطرات من (الفا- نفثول) وقطرتان من الكاشف (هيدروكسيد البوتاسيوم) ورج بهدوء، ان تغير لون الوسط الى الاحمر دليل على ايجابية الاختبار ومقدرة البكتريا على تخمر الكلوكوز ونتاج الاستوين Acetion (Forbes et al,2007).

7.3.5.2.3 Citrate Utilization test فحص استهلاك السترات

زرع السطح المائل لانابيب وسط اكار السيمون سترات بالعزلات البكتيرية بطريقة التخطيط وحضنت بدرجة حرارة 37 °م ولمدة 24 ساعة ، ان تغير لون الوسط من الاخضر الى الازرق دليل على ايجابية الفحص (Forbes et al,2007).

8.3.5.2.3 Urease Production test اختبار انتاج اليوريز

لقت وسط اكار اليوريا المائل بالعزلات البكتيرية وبطريقة التخطيط وحضنت بدرجة حرارة 37°م ولمدة 24 ساعة. ان ظهور اللون الوردي دليل على ايجابية الاختبار ومقدرة البكتريا على انتاج انزيم اليوريز (Forbes et al., 2007).

9.3.5.2.3 Kligler Iron agar test اختبار النمو على وسط اكار كليكلر الحديد

لقح قعر انابيب وسط KIA بالبكتريا بطريقة الطعن وعلى السطح المائل بطريقة التخطيط وحضنت بدرجة حرارة 37°م ولمدة 24 ساعة. يعد تحول لون قعر الانبوبة ولون السطح المائل من اللون الاحمر الى الاصفر دليلاً على تخمر السكريات (كلوكوز، لاكتوز). اما في حالة تحول القعر فقط الى اللون الاصفر يعد مؤشراً على تخمر سكر الكلوكوز وانتاج حامض، ان ظهور اللون الاسود في القعر دليل على انتاج كبريتيد الهيدروجين H₂S بينما تجمع الغاز في قعر الانبوبة دليل على انتاج البكتريا للغاز (Leboff *et al.*, 2011).

10.3.5.2.3 Hemolysin production test اختبار انتاج الهيموليسين

لقح وسط اكار الدم بالمستعمرات البكتيرية بعمر 18-24 ساعة ومن ثم حضنت بدرجة حرارة 37°م ولمدة 24 ساعة. ان ظهور هالة شفافة حول النمو او المستعمرة دليل على تحللها للدم وانتاج الهيموليسين (Kayser *et al.*, 2005).

11.3.5.2.3 Protease enzyme production test اختبار انتاج انزيم البروتيز

استعمل وسط اكار الحليب الفرز Skim Milk agar للكشف عن انتاج الانزيم إذ حضر عالق بكتيري بتركيز (1.5 × 10⁸) خلية / مليلتر ، نقل 200 مايكروليتر من العالق البكتيري الى الحفر التي تم عملها في وسط اكار الحليب الفرز بوساطة الثاقب الفليني ذو قطر 8 ملم ثم حضنت بدرجة حرارة 37°م ولمدة 24 ساعة لغرض معرفة مقدرة البكتريا على انتاج هذا الانزيم، ان ظهور هالة شفافة حول الحفر مؤشر على انتاجها لهذا الانزيم (Senior, 1999).

4.5.2.3 حفظ العزلات البكتيرية Preservation of bacterial isolates

1.4.5.2.3 حفظ العزلات قصير الامد Short term storage

لقت العزلات التابعة لبكتريا *P.aeruginosa* على وسط اكار القلب والدماغ المغذي وبطريقة التخطيط ثم تم حضن الاطباق لمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة 37 °م و تم حفظت في درجة حرارة 4 °م (Harley and Prescott, 2002).

2.4.5.2.3 حفظ العزلات متوسط الامد Medium term storage

لقت العزلات التابعة لبكتريا *P.aeruginosa* على وسط اكار القلب والدماغ المغذي المائل وباستعمال انابيب معقمة إذ زرعت البكتريا بطريقة التخطيط على السطح المائل للاكار ، تم حضن الانابيب لمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة 37 °م و تم حفظت في درجة حرارة 4 °م مدة الحفظ في هذه الطريقة ثلاثة اسابيع يتم تجديدها بعد انتهاء هذه المدة (Harley and Prescott, 2002).

3.4.5.2.3 حفظ العزلات طويل الامد Long term storage

تخزن العزلات البكتيرية لمدة طويلة تصل الى اكثر من ثلاثة اشهر في وسط مرق نقيع القلب والدماغ الحاوي على 15% من الكليسيرونول. تعقم الانابيب بالمؤصدة وبعد ان تبرد تنقل عزلة واحدة بواسطة الناقل الى الوسط (لكل انبوية) وبعد ذلك تحضن وبدرجة حرارة 37 °م لمدة 6 ساعات ومن ثم تحفظ العينات في درجة حرارة -20 °م (Ausubel et al., 1987).

5.5.2.3 تحديد قيمة التركيز المثبط الأدنى MICs للمضادات باستعمال جهاز الفايترك 2

Determination of minimal inhibitory concentration of antibiotics using Vitek 2 compact system

حددت قيم التراكيز المثبط الأدنى MICs للمضادات الحيوية في عزلات الزائفة الزنجارية *P.aeruginosa* باستعمال جهاز الفايترك وباتماد البطاقة الخاصة في فحص الحساسية للمضادات الحيوية Antibiotic Sensitivity test card (AST) وحسب ماورد عند Pincus (2006) تحتوي بطاقة اختبار الحساسية على 18-20 مضاداً حيوياً موزعة على 64 حفرة اذ يكون لكل مضاد اكثر من تركيز في البطاقة إذ يعمل الجهاز على تسجيل التغيرات الحاصلة في العكورة بعد النمو البكتيري.

تم زراعة العزلات البكتيرية المراد اختبار الحساسية لها على وسط الستراميد وبطريقة التخطيط وحضنت بدرجة حرارة 37 °م ولمدة 24 ساعة، تم اخذ انابيب Kan tubes ووضع في كل منها على حدة 3 مل من المحلول الفسلجي Normal Saline وبعد ذلك اخذت عدة مستعمرات مفردة من الوسط بواسطة الناقل ونقلت الى الانابيب (كل عينة على حدة) ومزجت مع المحلول الفسلجي لغرض الحصول على عالق بكتيري ثم قيست عكورة العالق باستعمال جهاز Density Check الخاص بالجهاز اذ يجب ان تكون عكورة العالق ما بين (0.50-0.63). وضع الانبوب الناقل Card transfer tube unit المرتبط ببطاقة فحص الحساسية (AST card) في الانابيب وثبت على الحامل الكاسيت الخاص بالاختبار لغرض ادخالها في الجهاز يتم ادخال العينات من باب المليء ليتم نقلها من الانابيب الى البطاقة ثم تنقل العينات يدويا الى باب التحميل لتتم عملية الفحص إذ تحضن بدرجة حرارة 37 °م ولمدة من 6-12 ساعة يتم فيها اعطاء النتيجة على شكل تقرير لكل عينة.

6.5.2.3 الفحص النوعي لقدرة العزلات البكتيرية على انتاج طبقة الالتصاق بوساطة طريقة وسط الكونغو الاحمر.

Qualitative examination of the ability of bacterial isolates to produce the adhesion layer by the Congo red agar method

اخذت مستعمرة نقية واحدة من وسط السترامايد بوساطة الناقل ثم زرعت على وسط الكونغو الاحمر وحضنت بدرجة حرارة 37 °م ولمدة 24 ساعة. تعد النتيجة موجبة في حالتين: الاولى انتاج قوي للغشاء الحيوي متمثل بظهور المستعمرات باللون الاسود الداكن. الثاني انتاج متوسط للغشاء الحيوي متمثل بظهور المستعمرات باللون الاسود الباهت. اما في حالة ظهور المستعمرات باللون الاحمر او باللون الوردي الداكن فتعد النتيجة سالبة (Freeman *et al.*, 1989).

7.5.2.3 الفحص النوعي لقدرة العزلات البكتيرية على تكوين الغشاء الحيوي باستعمال اطباق

المعايرة. Qualitative examination of the ability of bacterial isolates to form the biofilm using Microtiter plate

الكشف عن قابلية العزلات البكتيرية على تكوين الغشاء الحيوي باستعمال طريقة اطباق المعايرة Microtiter plate method كما جاء في كل من Mathur *et al.* (2006) و Babapour *et al.* (2016).

إذ تمت الخطوات كالاتي:

1. حضر العالق البكتيري باستعمال مرق نقيع القلب والدماغ إذ خففت العزلة وقورنت بالمحلول

القياسي McFarland.

2. نقل 20 مايكروليتر من العالق البكتيري الى الحفر في طبق المعايرة الحاوية على 180 مايكروليتر من مرق نقيع القلب والدماغ الحاوي على 2% سكر الكلوكوز، تم عمل ثلاثة مكررات لكل عينة. في حين تم وضع 200 مايكروليتر من مرق نقيع القلب والدماغ الحاوي على 2% سكر الكلوكوز (خالية من البكتريا) في ثلاث حفر وعدت كسيطرة سالبة تستعمل للمقارنة.

3. تم تغطية طبق المعايرة وحضن في درجة حرارة 37 °م ولمدة 24 ساعة.

4. تم التخلص من الخلايا البكتيرية غير الملتصقة عن طريق غسلها ثلاث مرات بمحلول دارى الفوسفات الملحي (PBS) ذي حامضية (7.2) ثم تترك لتجف لمدة 15 دقيقة في درجة حرارة الغرفة.

5. تم تثبيت الخلايا الملتصقة باضافة 200 مايكروليتر من الميثانول المطلق لكل حفرة وتركت لمدة 15 دقيقة بعد ذلك تم التخلص من الميثانول وترك طبق المعايرة بعد ذلك ليحجف.

6. تم اضافة 200 مايكروليتر من صبغة البنفسج البلوري المحضرة بتركيز 0.1 % لكل حفرة وتركت ايضا لمدة 15 دقيقة.

7. تم التخلص من الصبغة ثم غسلت الحفر بمحلول الفوسفات الملحي ثلاث مرات للتخلص من الصبغات غير المرتبطة وتركت لتجف بعد ذلك في درجة حرارة الغرفة.

8. اضيف 200 مايكروليتر من الايثانول المطلق للخلايا الملتصقة والمصبغة بصبغة البنفسج البلوري.

9. قيست الامتصاصية على طول موجي 630 نانوميترًا باستعمال جهاز الاليزا ثم حددت كفاءة العزلات على تكوين الغشاء الحيوي من خلال مقارنة القراءات التي تم الحصول عليها مع المعادلات الآتية:

- تعد العزلة غير مكونة للغشاء الحيوي اذا كان معدل الكثافة الضوئية لمعامل السيطرة اكبر او يساوي معدل الكثافة الضوئية للعزلة ($OD_c \geq OD$).
- تعد العزلة ضعيفة التكوين للغشاء الحيوي اذا كان معدل الكثافة الضوئية للعزلة اكبر من معدل الكثافة الضوئية للسيطرة او مساويا او اصغر من ضعفي الكثافة الضوئية للسيطرة ($OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$).
- تعد العزلة متوسطة التكوين للغشاء الحيوي اذا كان معدل الكثافة الضوئية للعزلة اكبر من ضعفين الكثافة الضوئية للسيطرة او اصغر او يساوي اربعة اضعاف السيطرة ($2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$).
- تعد العزلة شديدة التكوين للغشاء اذا كان معدل الكثافة الضوئية للعزلة اكبر من اربعة اضعاف معدل السيطرة ($OD > 4 \times OD_c$).

8.5.2.3 اختبار قابلية عزلات *P.aeruginosa* على انتاج المركبات المخيلية للحديد

Testing the ability of *P. aeruginosa* isolates on the production of Siderophores

حضر الوسط المستعمل في الاختبار حسب ماجاء في طريقة (Schwyn and Neilands,)

(1987) ، (Aljanaby (2016) إذ حضر لتر من وسط الاكار المغذي عن طريق اضافة 800

مليتر من الماء المقطر، ضبط الرقم الهيدروجيني على 7.2 واكمل الحجم الى 990 مليتر، عقم

الوسط بالمؤصدة ثم ترك ليبرد، اضيف الى الوسط بعد ذلك 2 ملغم من 2,2 dipyridyl المذاب في

10 مليترات من الماء المقطر والمعقمة بوساطة المرشحات الدقيقة، صب في اطباق معقمة وترك ليتصلب، خطت العزلات على الاطباق وحضنت على درجة حرارة 37 °م ولمدة 24-48 ساعة. يعد ظهور نمو للعزلات في هذه الاطباق دليل على قدرة البكتريا على انتاج المركبات المخيلية للحديد.

6.2.3 دراسة تقنية النانو Nanotechnology study

1.6.2.3 التخليق الحيوي لجزيئات أكسيد الزنك النانوي Biosynthesis of Zinc Oxide

Nanoparticles

2.1.6.2.3 التحضير البكتيري Preparation of bacterial suspension

انتخبت العزلة المقاومة لجميع المضادات الحياتية المستعملة في البحث إذ اخذ عدد من المستعمرات المفردة للعزلة المنتخبة ولقحت في 250 مل من وسط نقيع القلب والدماغ في قارورة اختبار مخروطية معقمة ثم حضنت في درجة حرارة 37 °م ولمدة 120 ساعة في حاضنة هزازة مع سرعة اهتزاز 150 هزة بالدقيقة الواحدة. تم عمل طرد مركزي 10000 دورة لمدة 15 دقيقة من ثم رشحت العينة بعد الطرد المركزي باستعمال ورق الترشيح والمرشحات الخاصة بدأ بورق ترشيح ذي قطر 0.45 مايكروميتر ومن ثم ورق ترشيح ذي قطر 0.22 مايكروميتر تم اخذ الراشح من اجل استعماله في تحضير جزيئات أكسيد الزنك النانوية.

3.1.6.2.3 تكوين جزيئات أكسيد الزنك النانوي حيويًا

Biological formation of zinc oxide nanoparticles

خط 50 مل من الراشح البكتيري مع 50 مل من 1ملي مول كبريتات او نترات الزنك وضبط الاس الهيدروجيني للخليط على (7) تم اضافة قارورتين مختبريتين الاولى تحوي على الراشح البكتيري فقط دون اضافة كبريتات الزنك اما الثانية فتحوي على كبريتات الزنك فقط دون اضافة الراشح البكتيري كعامل سيطرة.

حضنت بعد ذلك في حاضنة هزازة مع سرعة اهتزاز 150 هزة بالدقيقة الواحدة ودرجة حرارة 37 °م ولمدة 72 ساعة نلاحظ بعد ذلك تكون راسب ابيض في قعر القارورة المختبرية الحاوية على الراشح البكتيري مع كبريتات الزنك وهذا يعد مؤشراً على تكون جزيئات أكسيد الزنك النانوية، رشح الخليط بواسطة المرشحات الدقيقة للتخلص من الايونات الاخرى والشوائب ذات اقطار 0.45 و 0.22 مايكروميتر (Rajan *et al.*, 2016 ; Gunalan *et al.*, 2012).

تم جمع الراسب الابيض المتكون في قعر القارورة المختبرية وغسل ثلاث مرات باستعمال الماء المقطر وعمل له طرد مركزي بسرعة 10000 دورة في الدقيقة ولمدة 10 دقائق ، أخذ الراسب المتكون ليجفف بواسطة الفرن الحراري وبدرجة حرارة 105 °م ولمدة تتراوح ما بين 5-6 ساعات حتى جفاف الراسب للحصول على جسيمات أكسيد الزنك النانوية (Baskar *et al.*, 2013).

4.1.6.2.3 تحليل خصائص جزيئات اوكسيد الزنك النانوية

The characterization of Zinc Oxide Nanoparticles

1.4.1.6.2.3 مطيافية الاشعة فوق البنفسجية

Ultraviolet Visible spectrophotometer

تم توصيف جزيئات أكسيد الزنك المحضرة واستقرار هذه الجزيئات عن طريق اذابة 0.1 غم من جزيئات اوكسد الزنك النانوية المخلفة في 10 مل من Dimethyl Sulfoxide ثم عرضت للموجات فوق الصوتية لمدة 15 دقيقة ثم قيست في جهاز مطيافية الاشعة فوق البنفسجية إذ تم رصد كل من الفحص البصري والقياسات الامتصاصية تم عمل تصفير للجهاز بواسطة المادة المستعملة بالاذابة من ثم قيست العينة بعد ذلك تتراوح نتيجة قراءة مطيافية جزيئات أكسيد الزنك النانوية عن طول موجي من 200 نانوميتر الى 800 نانوميتر (Chauhan *et al.*, Pavani *et al.*, 2011) ; (2015). يستعمل هذا الفحص للتأكد من تكون جزيئات أكسيد الزنك النانوية.

2.4.1.6.2.3 Atomic Force Microscopy جهاز مجهر القوى الذرية

تمت دراسة شكل الاسطح وجغرافيتها لجزيئات أكسيد الزنك المحضرة بوساطة هذا المجهر إذ اخذ 0.1 غم من المادة المراد فحصها وذوبت في 10 مل من Dimethyl Sulfoxide ثم عرضت للموجات فوق الصوتية لمدة 20 دقيقة. بعد ذلك تم اجراء التحليل وفق تعليمات قياسية (Jayaseelan et al., 2012 ; Nagarajan and Kuppusamy, 2013).

3.4.1.6.2.3 مطيافية الاشعة تحت الحمراء

Fourier transforms infrared spectroscopy

سجلت مطيافية الاشعة تحت الحمراء لجزيئات أكسيد الزنك المحضرة ضمن المدى من 4000 -400 سم وباستعمال اقراص بروميد البوتاسيوم إذ اخذ جزء من المادة المذابة 0.01 غم في 10 مل من محلول Dimethyl Sulfoxide وعرض الى جهاز الموجات فوق الصوتية لكي تذوب المادة بالمحلول بشكل كامل من ثم مزجت مع اقراص بروميد البوتاسيوم من ثم حولت الى كريات باستعمال ضغط عال ناتج عن استعمال مكبس هيدروليكي وادخلت في الجهاز . الهدف من استعمال الجهاز هو تحليل المجاميع الموجودة في المادة المحضرة (Rajan et al., Hassan et al., 2013 ; 2016).

4.4.1.6.2.3 جهاز حيود الاشعة السينية X-ray diffraction

تم تحليل التوصيف الهيكلي من اجل الحصول على معلومات حول حجم الجسيمات، التركيب البلوري وشكل الاسطح بوساطة جهاز من نوع (Shimadzu 600) باستعمال حزمة احادية اللون من النحاس ذات طول موجي (0.15406nm) في التشغيل (40 كيلوفولت) وبتيار 30 امبير وسرعة مسح (0.02deg/s) وضمن مدى زاوي مقداره $2\theta = (0-60)$ وبفتحة لدخول الاشعة قطرها (0.3)

لمليميتر، وضعت المادة المراد فحصها بشكل مسحوق على شريحة زجاجية حاوية على ركيزة من السليكون (Baskar *et al.*, 2013).

5.4.1.6.2.3 Scanning Electron Microscopy المجهر الإلكتروني الماسح

يعتمد هذا الجهاز على مسح سطح العينة بوساطة شعاع الكترون مركز بدقة لغرض الحصول على صور مجهرية لجزيئات أكسيد الزنك المحضرة مع التحقق من تجانس المادة المفحوصة (Elkady *et al.*, 2015). يتم قياس ومطابقة الابعاد النانوية المظهرية لجزيئات أكسيد الزنك المحضرة (Shamsuzzaman *et al.*, 2013). غلفت العينة بالذهب لضمان التوصيل الكهربائي (Vielkind *et al.*, 2013).

6.4.1.6.2.3 جهاز فرق جهد زيتا المحتملة Zeta Potential

يستعمل في توضيح الجهد الكهربائي الناتج عن تشتت الجزيئات المحضرة في المحلول الغروي.

2.6.2.3 الفحص النوعي لمقدرة جزيئات أكسيد الزنك النانوية المحضرة في العمل كعامل مضاد

Qualitative Screening of Antibacterial Activity by using ZNO للبكتريا Nanoparticles

تم اجراء الاختبار باستعمال طريقة الانتشار بالحفر Well diffusion إذ حضر وسط مولر حسب تعليمات الشركة المصنعة ثم ترك ليتصلب ثم حضر العالق البكتيري وقورن بمحلول ثابت العكورة القياسي ، نشرت البكتريا بوساطة مسحات قطنية ثم تم عمل حفر بوساطة الناقب الفليني ونقل 100 مايكروليتر من تراكيز (10،100،500) ملغم/مل المحضرة من جزيئات أكسيد الزنك النانوية ووضعت في الحفر ثم حضنت في الحاضنة بدرجة حرارة 37 °م ولمدة 24 ساعة، سجل قطر التثبيط الناتج عن كل تركيز (Prodan *et al.*, 2013).

3.6.2.3 الفحص المظهري لتأثير جزيئات أكسيد الزنك النانوية في بعض عوامل الضراوة لبكتريا الزائفة الزنجارية

Phenotype study in the effect of Zinc Oxide Nanoparticles against some of the virulence factor in *pseudomonas aeruginosa*

1.3.6.2.3 التأثير في انتاج الصبغات Effect on pigments production

درست الصبغات المنتجة بواسطة بكتريا الزائفة الزنجارية *P.aeruginosa* باستعمال وسط King A الحاوي على تركيز (100، 500) ملغم/مل من المادة النانوية صبت الاطباق وتركت لتجف وتتصلب بعد ذلك زرعت البكتريا على الاطباق بطريقة التخطيط وحضنت في الحاضنة تحت درجة حرارة 37 °م ولمدة 24 ساعة.

سيتم ملاحظة ظهور الصبغات من عدمها على الاطباق (Bajelan, 2015).

2.3.6.2.3 التأثير في انتاج الهيموليسين Effect on Hemolysin production

استعمل وسط اكار الدم في الكشف عن تأثير جزيئات أكسيد الزنك النانوية في انتاج الهيموليسين في بكتريا الزائفة الزنجارية حضر وسط الدم كما في الفقرة (8.2.3.2.2) الحاوي على المادة النانوية وبتركيز (100،500) ملغم/مل وصب في اطباق وتركت لتتصلب بعد ذلك زرعت البكتريا بطريقة التخطيط وحضنت في الحاضنة تحت درجة حرارة 37 °م ولمدة 24 ساعة سيتم ملاحظة ظهور الصبغات من عدمها على الاطباق (Bajelan, 2015).

3.3.6.2.3 Effect on protease production انزيم البروتيتيز

تمت دراسة إنتاج البروتيتيز بواسطة طريقة أكار الحليب. 0.1 مل من تركيزي 100 و 500 ملغم/مل من جسيمات اوكسيد الزنك النانوية اضيفت في الحفر التي تم عملها في الوسط الحاوي على البكتريا ترك الوسط قليلاً ليحجف في درجة حرارة الغرفة من ثم حظنت في درجة حرارة 37 °م ولمدة 24 ساعة. تم دراسة منطقة التحلل المتكونة لغرض معرفة اذ كان هنالك تاثير للجسيمات النانوية على قدرة البكتريا في تكوين انزيم البروتيتيز (Bajelan, 2015).

4.3.6.2.3 التأثير في انتاج البكتريا لمخليات الحديد

Effect of bacterial production of siderophore

حضر الوسط كما في الفقرة (8.5.2.2) وصب في اطباق بعد اضافة المادة النانوية وبتركيز (100،500) ملغم/مل بعد ذلك زرعت البكتريا على الاطباق بطريقة التخطيط وحضنت في الحاضنة تحت درجة حرارة 37 °م ولمدة 24 ساعة.

5.3.6.2.3 Effect on Biofilm Formation التأثير في تكوين الغشاء الحيوي

تم اجراء التجربة حسب الطريقة المذكورة عند (Ali (2012) إذ تم إضافة كل من المعلمات البكتيرية الى مرق نقيع القلب والدماغ الحاوي على 2 % من السكر وحضنت في الحاضنة تحت درجة حرارة 37 °م ولمدة 24 ساعة.

أضيف 80 مايكروليتر من وسط مرق نقيع القلب والدماغ الحاوي على 2% سكر الكلوكوز الى اطباق المعايرة الحاوية على 100 مايكروليتر من المادة النانوية المحضرة ذات تركيز 500 ملغم/مل وعملت واحدة اخرى بتركيز 100 ملغم/مل (تم عمل تجربتين الاولى بتركيز 500ملغم/مل والثانية بتركيز 100 ملغم/مل)، اما عينات السيطرة المستعملة في التجربة فتضمنت 180 مايكروليتر من مرق نقيع القلب والدماغ الحاوي على 2 % من السكر) اضيف 20 مايكروليتر من العالق

البكتيري الى جميع الحفر. تم تغطية اطباق المعايرة من ثم حضنت في الحاضنة تحت درجة حرارة 37 °م ولمدة 24 ساعة.

تم إزالة الخلايا البكتيرية غير الملتصقة عن طريق غسل الاطباق ثلاث مرات بمحلول داري الفوسفات الملحي (PBS) ذي اس هيدروجيني 7.2، تركت الاطباق بعد ذلك لتجف في درجة حرارة الغرفة بعد ذلك تم إضافة 200 مايكروليتر من صبغة البنفسج البلوري المحضرة بتركيز 0.1 % لكل حفرة وتركت ايضا لمدة 20 دقيقة.

تم التخلص من الصبغة من ثم تغسل الحفر بمحلول الفوسفات الملحي ثلاث مرات للتخلص من الصبغات غير المرتبطة ثم تترك لتجف بعد ذلك في درجة حرارة الغرفة. تم إضافة 200 مايكروليتر من الايثانول المطلق للخلايا الحية الملتصقة والمصبغة بصبغة البنفسج البلوري. قيس امتصاصية كل حفرة على طول موجي 630 نانوميتر بوساطة جهاز الاليزا.

تم دراسة تثبيط الغشاء الحيوي للبكتريا باستعمال الجسيمات النانوية عن طريق مقارنة ما قبل

التثبيط وبعد التثبيط وحسب المعادلة الاتية الموصوفة بوساطة (Namasivayam *et al.* (2013).

$$\text{تثبيط تكوين الغشاء الحيوي \%} = \frac{\text{الطول الموجي للسيطرة} - \text{الطول الموجي للمعاملة}}{\text{الطول الموجي للسيطرة}} \times 100$$

الفصل الرابع

النتائج والمناقشة

**Results and
Discussion**

4. النتائج والمناقشة Results and Discussion

1.4 عزل وتشخيص بكتريا الزائفة الزنجارية

Isolation and identification of *pseudomonas aeruginosa*

تم جمع 104 عينة من عدة مصادر سريرية وبأعمار مختلفة وللمدة ما بين 2018/12/9 الى 2019/3/3 ومن مستشفيات مدينة الطب في بغداد (مستشفى بغداد التعليمي، مستشفى غازي الحريري، مستشفى الحروق التخصصي، المختبرات التعليمية). وبعد احراء الفحوصات المجهرية والكيموحيوية تم الحصول على 58 عزلة تعود لجرثومة الزائفة الزنجارية الجدول (1-4) يوضح نوع العينات مع العدد الكلي لكل عينة فضلا عن العدد الكلي للعزلات مع النسبة المئوية للعزلات.

جدول 1-4: نوع وعدد العينات و العزلات للزائفة الزنجارية ونسبها المئوية

نوع العينة	العدد الكلي للعينات	عدد عزلات <i>P.aeruginosa</i>	النسبة المئوية للعزلات %*
ألأدرار	35	18	51.4
ألأذن	9	6	66.6
سائل النخاع الشوكي	6	3	50
أخماج الجروح	18	9	50
أخماج الحروق	5	4	80
القشع	25	14	56
الدم	4	2	50
الخراجات الجلدية	2	2	100
مجموع العينات	104	58	100

*حسبت النسبة المئوية من المجموع الكلي للعزلات

كما تم التشخيص عن طريق دراسة الصفات المظهرية للبكتريا من خلال زرعها على وسط الماكونكي الصلب MacConkey agar إذ ظهرت المستعمرات بلون شاحب وذلك بسبب عدم مقدرتها على تخمير سكر اللاكتوز (Forbes *et al.*, 2007) ، اما وسط الدم الصلب Blood agar إذ ظهرت المستعمرات قدرتها على تحليل الدم من نوع بيتا β -hemolysis وهذا دليل على مقدرة البكتريا على انتاج أنزيم الهيمولايسين (Selim *et al.*, 2015)، وزرعت على وسط الستراييد الصلب Cetrimide agar إذ ظهرت المستعمرات باللون الاصفر المخضر ويطلق عليها بصبغة البايوفريدين Pyoverdine أو باللون الازرق المخضر التي يطلق عليها صبغة البايوسيانين Pyocyanin التي تتألق عند تعرضها للأشعة فوق البنفسجية UV-Light وتتميز هذه الصبغات بكونها ذائبة في الماء (Sudhakar *et al.*, 2015).

تم اجراء الفحص المجهرى إذ أظهر الفحص وجود خلايا عسوية سالبة لصبغة كرام غير مكونة للسبورات وهذا ما قد تم ملاحظته ايضاً لدى (Al-Dahmoshi (2013). تم اجراء الفحوصات الكيموحيوية إذ اظهرت 58 عزلة من أصل 104 نتائج موجبة لكل من فحص الاوكسيديز Oxidase وفحص الكاتاليز Catalase اما اختبارات IMViC التي تضمنت اختبارات الاندول Indole واختبار أحمر المثيل Methyl red واختبار فوكس بروسكاور Voges Proskauer فقد كانت سالبة واختبار استهلاك السترات Citrate utilization كانت النتائج موجبة في هذا الفحص وقد كانت النتائج متباينة في فحص اليوريز وكان التفاعل في كليكلر الحديد قاعدياً واطهرت البكتريا قدرتها على النمو في درجة حرارة 42 °م جاءت هذه النتائج مماثلة لما ذكره كل من (Tadess and Alem (2006 و (Todar (2011) يبين الجدول 4-2 نتائج هذه الفحوصات.

جدول 4-2: الفحوصات المظهرية والكيموحيوية لعزلات الزائفة الزنجارية

النتيجة	الاختبار	ت
-Ve	Gram stain	1 صبغة كرام
عصوية		2 شكل الخلايا وتجمعها
غير مخمرة لسكر اللاكتوز	MacConkey agar	3 النمو على اكار الماكونكي
β - Hemolysis	Blood agar	4 النمو على وسط اكار الدم
+	Cetrimide agar	5 النمو على وسط اكار الستراميد
-		6 النمو بدرجة حرارة 4 °م
+		7 النمو بدرجة حرارة 42 °م
+	Oxidase	8 أنزيم الاوكسيديز
+	Catalase	9 أنزيم الكاتاليز
+/-	Urease	10 أنزيم اليوريز
-	Indole	11 الأندول
-	methyl red	12 المثيل الاحمر
-	Voges Proskauer	13 فوكس بروسكاور
+	Citrate utilization	14 أستهلاك السترات
K/K(base/base)	Kligler Iron Agar	15 كليكلر الحديد

(+) الفحص موجب ، (-) الفحص سالب، β - hemolysis تحلل من نوع بيتا (تحلل كامل)

(-/+ متغايرة ، (K) تفاعل قاعدي

2.4 تحديد قيمة التركيز المثبط الأدنى (MIC) للمضادات الحيوية باستعمال جهاز vitek2 compact system

استعمل جهاز Vitek compact system 2 من أجل تحديد قيم التراكيز المثبطة الأدنى لثلاثة عشر مضاداً حيوياً وهي Amikacin، Cefepime، Ceftazidime، Ciprofloxacin، Colistin، Gentamicin، Imipenem، Meropenem، Piperacillin، Ticarcillin/Clavulanic Acid، Ticarcillin، Piperacillin/Tazobactam و Tobramycin. من خلال اعتماد البطاقة الخاصة بالفحص AST وفقاً لما جاء في Pincus (2006) وحسب ما جاء في تعليمات الشركة المصنعة BioMérieux.

وأظهرت النتائج ان قيمة التركيز المثبط الأدنى لمضاد Amikacin 3 عزلات (10%) مقاومة و 1 (3.3%) متوسطة المقاومة و 26 (86.7%) حساسة. اما المضاد Cefepime فقد اظهرت النتائج 4 عزلات (13.3%) مقاومة و 8 (26.7%) متوسطة المقاومة و 18 (60%) حساسة. وأما المضاد Ceftazidime فقد كانت النتائج تشير الى 9 عزلات (30%) مقاومة و 8 (26.7%) متوسطة المقاومة و 13 (43.3%) حساسة.

وكانت نتائج المضاد Ciprofloxacin تشير الى 8 عزلات (26.7%) مقاومة و 6 (20%) متوسطة المقاومة و 16 (53.3%) حساسة. في حين كانت نتائج المضاد Colistin تشير الى 16 عزلة (53.3%) مقاومة و 14 (46.7%) حساسة في حين لم تظهر عزلات متوسطة المقاومة.

اما مضاد Gentamicin فقد كانت النتائج تشير الى 9 عزلات (30%) مقاومة و 3 (10%) متوسطة المقاومة و 18 (60%) حساسة. وقد كانت نتائج المضاد Imipenem تشير الى 4 عزلات (13.3%) مقاومة و 26 (86.7%) حساسة ولم تظهر عزلات متوسطة المقاومة.

اما المضاد Meropenem فقد كانت النتائج تشير الى 4 عزلات (13.3%) مقاومة و 26 (86.7%) حساسة ولم تظهر عزلات متوسطة المقاومة.

في حين أظهرت نتائج المضاد Piperacillin مقاومة في 15 عزلة (50%) وحساسية 15(50%) في حين لم تظهر عزلات متوسطة المقاومة. واما المضاد Piperacillin/Tazobactam فقد كانت جميع العزلات حساسة لهذا المضاد اي بنسبة 100% . وقد كانت نتائج المضاد Ticarcillin تشير الى مقاومة في 15 عزلة (50%) وحساسية 15(50%) في حين لم تظهر عينات متوسطة المقاومة. كانت نتائج المضاد Ticarcillin/Clavulanic Acid تشير الى 13 عزلة (43.3%) مقاومة و 17(56.7%) حساسة في حين لم تظهر عزلات متوسطة المقاومة.

واخيرا كانت نتائج المضاد Tobramycin الاكثر مقاومة في 17 عزلة (56.7%) و 1(3.3%) متوسطة المقاومة وحساسية في 12 (40%) الجدول (3-4).

جدول 3-4: النسب المئوية لمقاومة وحساسية التركيز المثبط الأدنى للمضادات الحيوية لعزلات

الزائفة الزنجارية.

الحساسية			متوسطة المقاومة			المقاومة			المضاد الحيوي
MIC µg/ml	النسبة المئوية %	العدد	MIC µg/ml	النسبة المئوية %	العدد	MIC µg/ml	النسبة المئوية %	العدد	
<=2	86.7	26	32	3.3	1	>=64	10	3	Amikacin
2	60	18	8	26.7	8	>=64	13.3	4	Cefepime
4	43.3	13	16	26.7	8	>=64	30	9	Ceftazidime
<=0.25	53.3	16	2	20	6	>=4	26.7	8	Ciprofloxacin
<=0.5	46.7	14	/	/	/	>=16	53.3	16	Colistin
<=1	60	18	8	10	3	>=16	30	9	Gentamicin
<=0.25	86.7	26	/	/	/	>=16	13.3	4	Imipenem
<=0.25	86.7	26	/	/	/	>=16	13.3	4	Meropenem
8	50	15	/	/	/	>=128	50	15	Piperacillin
8	100	30	/	/	/	/	/	/	Piperacillin/Tazobactam
32	50 %	15	/	/	/	>=128	50 %	15	Ticarcillin
32	56.7 %	17	/	/	/	>=128	43.3 %	13	Ticarcillin/Clavulanic Acid
<=1	40 %	12	8	3.3 %	1	>=16	56.7 %	17	Tobramycin

وبمقارنة نتائج دراستنا مع الدراسات الاخرى وجد (Khan and Faiz, 2016) ان مقاومة عزلات جرثومة الزائفة الزنجارية في المملكة العربية السعودية لمضاد Ticarcillin 55 % والتي هي قريبة من نتيجة الدراسة الحالية. وفي دراسة سابقة في العراق وجد جعفر وآخرون (2014) أن العزلات السريرية لبكتريا *P. aeruginosa* مقاومة لمضادات Ciprofloxacin و Cefepime و Tobramycin بنسبة 24.14 % ومقاوم لمضادي Ceftazidime و Gentamicin بنسبة 27.5 %.

ذكر (Al-Saray 2016) أن عزلات جرثومة الزائفة الزنجارية أظهرت مستوى من المقاومة لمضاد Piperacillin بنسبة بلغت 56.5 %. فيما أظهرت دراسة اخرى أن 20 % من عزلات بكتريا الزائفة الزنجارية كانت مقاومة لمضاد Piperacillin (Jamunadevi et al., 2012). في العراق دراسة اجراها حسان وآخرون (2012) إذ ذكروا أن نسبة مقاومة البكتريا لمضاد Amikacin بلغت 13.9 %.

وجدت النعيمي (2015) في دراستها لتحديد قيمة MIC بواسطة جهاز الفايثك وعلى 31 عذلة لبكتريا *P. aeruginosa* التي حددت مقاومة لمضاد Amikacin 65 % ونسبة مقاومة للمضادين Piperacillin/Tazobactam و Gentamicin 80% ولكل منهما ونسبة مقاومة Ciprofloxacin 75% ونسبة مقاومة لمضاد Imipenem و Meropenem 70% ولكل منهما. وأشار الباحث (Dhar et al. 2007) الذي حدد نسبة مقاومة مضاد Tobramycin 79.6 % في حين وجد الباحثان (Helal and Khan 2015) في دراستهما على 136 عذلة بكتيرية الذي حدد فيه نسبة مقاومة لمضاد Ticarcillin 54.4 % ومضاد Ticarcillin/Clavulanic Acid 61.8 %.

أظهرت النتائج مقاومة العزلات البكتيرية لمضاد Colistin وبنسبة 53.3 % في حين كانت نتائج ما توصل اليه الباحثون (Mohanty *et al.* (2013) نسبة مقاومة 6 % للمضاد نفسه وهذا يعد مؤشراً على زيادة قدرة البكتريا على مقاومة هذا المضاد خلال هذه المدة من 2013 الى 2019. نستخلص من دراستنا والدراسات السابقة أن سبب مقاومة جرثومة الزائفة الزنجارية للمضادات الحيوية يعود الى امتلاكها العديد من الاليات المختلفة والمتمثلة بقدرتها على تغيير نفاذية الغشاء الخارجي وامتلاكها لمضخات الدفع Efflux pumps وانتاجها لأنزيمات البييتالاكتيميز واسعة الطيف وتكوين الغشاء الحيوي Biofilm فضلا عن امتلاكها لبلازميدات المقاومة R-plasmid الذي يحمل جينات المقاومة للمضادات الحيوية المختلفة (Hong *et al.*, 2016).

أظهرت النتائج أن عزلات *P.aeruginosa* (30عزلة) توزعت على سبعة انماط في مقاومتها للمضادات الحيوية (Antibiotype). لقد وجد أن النمط الأول كان (30/2) وبمعدل 6.6% اذ كانت العزلتين البكتيرية مقاومة للمضادات الحيوية المختبرة عدا المضاد Colistin اذ كانت حساسة له ، النمط الثاني كان (30/2) وبمعدل 6.6% اذ كانت العزلتين البكتيرية مقاومة لتسعة مضادات حيوية عدا مضادي Colistin و ciprofloxacin ، النمط الثالث كان (30/2) وبمعدل 6.6% اذ كان النمط الثالث مقاوم لثمان مضادات حيوية بينما كان النمط الرابع (30/1) وبمعدل 3.3% مقاوم لسبعة مضادات حيوية ثم النمط الخامس (30/2) وبمعدل 6.6% اذ كان مقاوم لستة مضادات حيوية وحساس لستة بينما النمط السادس (30/8) وبمعدل 26.6 اذ كان مقاوم لخمس مضادات حيوية وحساس لسبعة مضادات .

اخيرا النمط السابع (30/3) وبمعدل 10% فقد كان مقاوماً لثلاثة مضادات حيوية وحساساً لتسعة مضادات ويلاحظ ان النمط السادس كان اكثر الانماط تكراراً (جدول 4-4).

جدول (4-4): انماط المقاومة للمضادات الحيوية لعزلات بكتريا الزانفة الزنجارية

النسبة المئوية	عدد العزلات المقاومة	عدد المضادات	النمط
6.6	2	11	الاول
6.6	2	9	الثاني
6.6	2	8	الثالث
3.3	1	7	الرابع
6.6	2	6	الخامس
26.6	8	5	السادس
10	3	3	السابع

3-4 الكشف عن عوامل الضراوة Detection of virulence factors

تمثل قدرة العزلات البكتيرية على احداث التهابات بسبب عوامل الضراوة دوراً مهماً في احداث

العدوى (LaSarre and Federle, 2013). تم دراسة بعض عوامل الضراوة التي تمتلكها بكتريا

الزانفة الزنجارية وهي القدرة على انتاج الصبغات، انتاج أنزيم الهيموليسين Hemolysin، انتاج

أنزيم البروتينيز Protease، انتاج المركبات المخيلية للحديد Siderophores والقدرة على تكوين

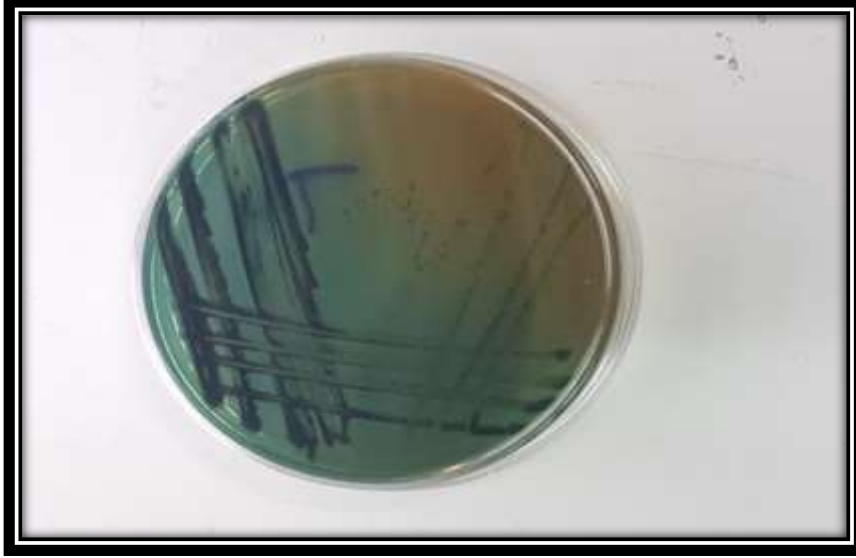
الاغشية الحيوية Biofilms والتي تكون تحت تحكم جينات استشعار النصاب Quorum sensing

بصورة مباشرة او غير مباشرة García-Contreras (2016) كما في الجدول (4-5).

Pigment production

1.3.4 انتاج الصبغات

لقد وجد أن 30/18 عزلة من الزائفة الزنجارية كانت منتجة لصبغة البايوسيانين Pyocyanin اي بنسبة 60 % التي زرعت على وسط King A-Agar وبطريقة التخطيط شكل (1-4)، جدول(4-5).



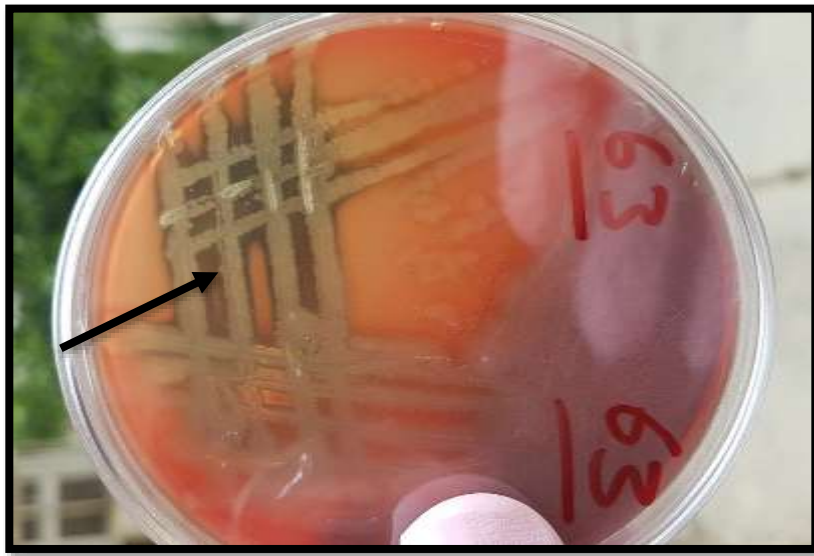
شكل 4-1: انتاج صبغة البايوسيانين لبكتريا الزائفة الزنجارية على وسط King A-Agar.

تعد صبغة البايوسيانين من عوامل الضراوة المهمة يتم انتاج هذه الصبغة اثناء تكوين الغشاء الحيوي إذ انها تؤدي دوراً مهماً في التهابات الشعب الهوائية الحادة والمزمنة، فضلاً عن ذلك فهي بمثابة مركب مضاد للمايكروبات إذ تعمل كعامل مؤكسد وكذلك تمكن البكتريا من البقاء على قيد الحياة في الظروف اللاهوائية (Hotterbeekx *et al.*, 2017). من خلال الاشارة التي تتم ما بين الخلايا وداخلها تمكن صبغة البايوسيانين بكتريا الزائفة الزنجارية من خلق منافسة ناجحة ضد البكتريا الاخرى وحتى الفطريات (Tashiro *et al.*, 2013). اقترح Caldwell *et al.* (2009) ان تعرض الشعب الهوائية لصبغة البايوسيانين يؤدي الى تلف رئوي ويساهم في تطور المرض الى تليف كيسي ولهذه الاسباب أصبح من الضروري ايجاد مادة تثبط انتاج صبغة البايوسيانين وفي هذه الدراسة تم البحث عن تأثير جزيئات أكسيد الزنك النانوي في انتاج الصبغة.

2.3.4 انتاج انزيم الهيمولايسين Hemolysin Production

اظهرت نتائج الدراسة الحالية أن جميع العزلات لها القدرة على انتاج انزيم البيتا هيمولايسين β -hemolysin على أكار الدم Blood agar. اشارت دراسة اجراها (Khalil et al., 2015) في تركيا ان 95.2 % من عزلات الزائفة الزنجارية تنتج هذا الانزيم. كما وجد الارناؤوطي (2015) ان نسبة انتاج الهيمولايسين كانت 100 % لعزلات الزائفة الزنجارية المعزولة من الحروق والجروح والادرار والدم والاذن. أشار الناشي وعلوي (2015) ان نسبة انتاج الهيمولايسين كانت 100 % في عزلات *P.aeruginosa* المعزولة من الحروق والجروح شكل (2-4) وجدول (4-5).

ينتسب انتاج السموم مثل الهيمولايسين في تلف الانسجة مما يسهل من انتشار البكتريا واطلاق العناصر الغذائية للمضيف ، كما انه قد يعدل من مسار الاشارات التي يقوم بها المضيف والتي قد تؤثر في العديد من العمليات بما في ذلك قدرة المضيف في البقاء على قيد الحياة وكذلك الاستجابات الالتهابية وديناميكية الهيكل الخلوي (Wiles et al., 2008).



شكل 2-4: انتاج انزيم β -hemolysin لبكتريا الزائفة الزنجارية على وسط الدم

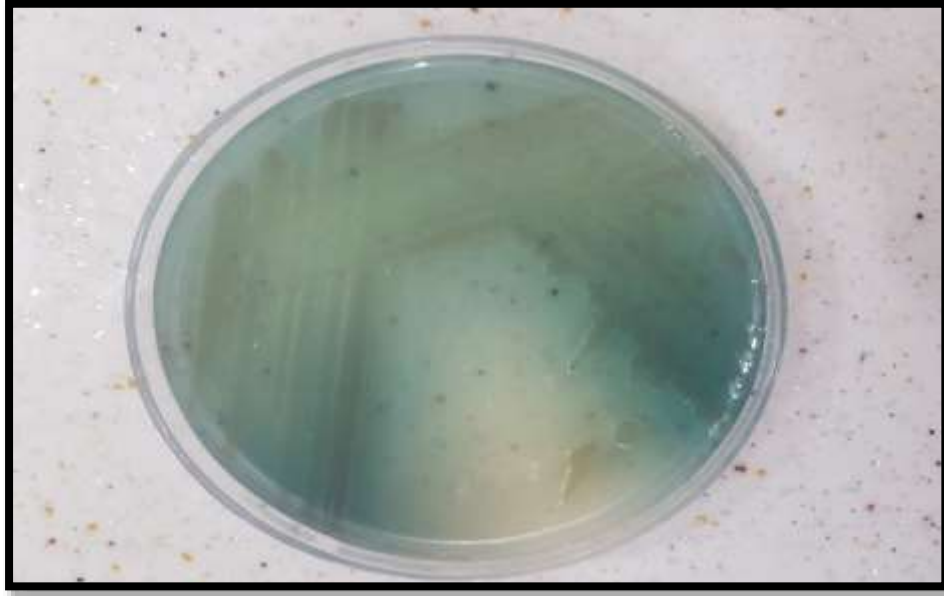
3.3.4 إنتاج انزيم البروتيز Protease Production

أظهرت النتائج قدرة البكتريا على تكوين انزيم البروتيز وبنسبة 83.3 % في (30/25) عزلة جدول (4-5) وبمعدل اقطار يتراوح ما بين 12-20 ملمتر على وسط اكار الحليب الفرز Skim milk. في العراق وجد (Al-Aoubaydy (2015) و Al-Tikrity (2009) ان 88.3 % و 86.1 % على التوالي من بكتريا الزائفة الزنجارية كانت منتجة لأنزيم البروتيز .

لوحظ في هذه الدراسة أن جميع العزلات المقاومة لمضاد Colistin منتجة لهذا الانزيم. تم الاشارة في بعض الدراسات ان التعبير لأنزيم البروتيز يعد أساسياً في القدرة على المقاومة المتأصلة لمضادات البوليميكسين في بعض الانواع البكتيرية (Velkov *et al.*, 2013) وهذا يدل على وجود علاقة بين قابلية انتاج انزيم البروتيز ومقاومة مضادات البوليميكسين.

4.3.4 إنتاج المركبات المخيلية للحديد Production of Siderophores

أظهرت النتائج قدرة البكتريا على تكوين المركبات المخيلية للحديد Siderophores وبنسبة 100 % جدول (4-5) إذ ظهر النمو في جميع العزلات على وسط الاكار المغذي مضافا له مادة 2,2-dipyridal (C₁₀H₈N₂). تعد هذه المركبات على انها مركبات حيوية صناعية تنتجها وتفرزها العديد من الكائنات الحية الدقيقة مثل الفطريات والبكتريا وتقوم بالارتباط بالحديد Fe³ وهي عبارة عن مخالب انتقائية (Aljanaby (2016). وتتفق نتائج الدراسة الحالية مع الدراسات السابقة التي اظهرت ان جميع العزلات السريرية تكون هذه المخليات (Koczura and Kaznowski, 2003 ; Fertas-Aissani *et al.*, 2013) شكل (3-4).



شكل 4-3: انتاج المركبات المخليبية لجرثومة الزائفة الزنجارية على الوسط المغذي الصلب

الحاوي على 2,2 dipyridal

جدول (4-5) النسبة المئوية لانتاج بعض عوامل الضراوة لجرثومة الزائفة الزنجارية .

النسبة المئوية	عدد العزلات المنتجة	عدد العزلات الكلي	عامل الضراوة
60	18	30	انتاج الصبغات
100	30	30	انتاج الهيمولايسين
83.3	25	30	انتاج البروتينيز
100	30	30	انتاج المركبات المخليبية
100	30	30	انتاج الغشاء الحيوي

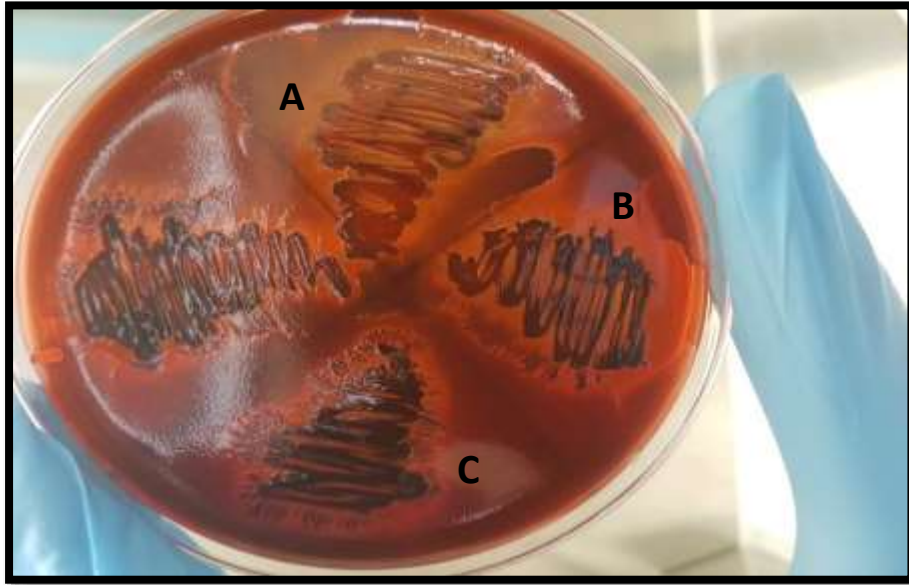
5.3.4 القدرة على تكوين الغشاء الحيوي The ability to form Biofilm

1.5.3.4 الكشف عن قابلية الزائفة الزنجارية على تكوين طبقات الالتصاق باستعمال طريقة

الكونغو الاحمر

Detection of the ability of *P.aeruginosa* to form adhesions layer by using the Congo red method

أظهرت النتائج ان جميع عزلات الزائفة الزنجارية قيد الدراسة التي اجري عليها الاختبار لها القدرة على تكوين طبقات الالتصاق وبنسبة 100% وهذه الطبقات كانت بنسب متنوعة من حيث مقدرتها على التكوين إذ وجد ان 53 % من العزلات البكتيرية كانت شديدة التكوين لهذه الطبقات و40 % كانت متوسطة التكوين لهذه الطبقات و6.6 ضعيفة التكوين اعتماداً على اللون الناتج والشكل 3-4 يوضح هذه الاختلافات شكل (4-4).



شكل 4-4: تكون طبقات الالتصاق لجرثومة الزائفة الزنجارية على وسط الكونغو الاحمر

(A - تكوين ضعيف ، B - تكوين متوسط ، C - تكوين قوي).

طريقة الكونغو الاحمر CRM وباستعمال وسط الكونغو الاحمر CRA هو اختبار وصفي يعتمد على تغيير اللون ومستعمرات النمط المظهري بسبب زيادة تركيز السكر في الوسط التي تتعكس بسبب العوامل الايضية الثانوية المنتجة لعديد السكريات Exopolysaccharide التي تختزل صبغة الكونغو الحمراء في المراحل الاخيرة من الحضانة التي تتناسب نسبياً مع مزيد من السواد والخشونة والجفاف والشكل البلوري اذا كان الانتاج للطبقات الرقيقة الملتصقة للعزلات ينتمي الى فئة التكوين القوي ، اما اذا كان اللون اسود باهت فالعزلات تكون متوسطة التكوين في حين أن المزيد من اللون الاحمر او المستعمرات الوردية الناعمة تنتمي الى فئة ضعيفة التكوين Hou *et al.*, (2012).

كانت نسبة انتاج الطبقات الرقيقة الملتصقة بوساطة الكونغو الاحمر في هذه الدراسة اعلى من البحث البرازيلي (Lima *et al.*, 2017) الذي اظهر من 20 عزلة لبكتريا الزائفة الزنجارية فقط ثلاث عزلات اي بنسبة 15 % كانت قادرة على انتاج هذه الطبقات. والجدول (4-6) يوضح العزلات وتنوعها من حيث مقدرتها على تكوين الطبقات الرقيقة الملتصقة .

جدول 4-6: قابلية جرثومة الزائفة الزنجارية على تكوين الغشاء الحيوي بأستعمال طريقة

الكونغو الاحمر .

رقم العينة		قوي		متوسط		ضعيف	
عدد العزلات	نسبة مئوية	عدد العزلات	نسبة مئوية	عدد العزلات	نسبة مئوية	عدد العزلات	نسبة مئوية
16	53	/	/	/	/	/	/
2,1,47,29,44,38							
11,56,63,60,61,42							

						6,67,57,40
/	/	40	12	/	/	14,34,25,39,64,66 ,62,19,35,9,59,58
6.6	2	/	/	/	/	43,24

2.5.3.4 الكشف عن قابلية الزائفة الزنجارية على تكوين الغشاء الحيوي بأستعمال اطباق المعايرة

الدقيقة

Detection of susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to the formation of the biofilm

تم التحري عن قابلية عزلات الزائفة الزنجارية على تكوين الغشاء الحيوي وبأستعمال اطباق المعايرة الدقيقة (MTP) Micro-titer plate method اثبتت النتائج ان جميع العزلات كانت منتجة للغشاء الحيوي وبنسبة 100% وبدرجات مختلفة مقارنةً مع السيطرة السالبة إذ ظهرت 14 عزلة وبنسبة 47 % ضعيفة التكوين للغشاء الحيوي في حين كانت 12 عزلة وبنسبة 40 % متوسطة التكوين و 4 عزلات وبنسبة 13 % فقد كانت شديدة التكوين جدول (4-7).

تتفق نتائج الدراسة الحالية مع (Al-Saray (2016 إذ كانت نتائجه تشير الى ان 95.56 % من العزلات البكتيرية لها القدرة على تكوين الغشاء الحيوي كما تتفق مع ماتوصلت اليه النعيمي (2015) التي حددت نسبة 100 % من العزلات قابليتها على تكوين الغشاء الحيوي. ان تكون الغشاء الحيوي هو احد الاستراتيجيات الشائعة التي تتخذها البكتريا لغرض البقاء في الظروف البيئية الصعبة، يمكن للبكتريا ان تنشأ غشاءً حيويًا في أنظمة المياه وعلى مجموعة من الاسطح الأحيائية شائعة الاستعمال في مثل هذه الانظمة وكذلك في البيئات المائية الطبيعية (Bronowskil et al., 2014).

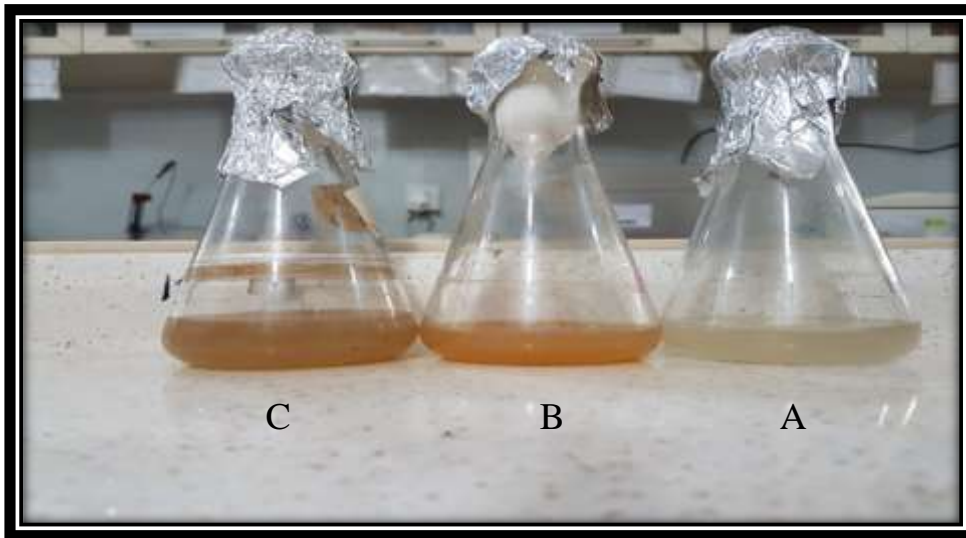
جدول (4-7) قابلية جرثومة الزائفة الزنجارية على تكوين الغشاء الحيوي بأستعمال اطباق المعايرة الدقيقة

ضعيف التكوين		متوسط التكوين		قوي التكوين	
النسبة المئوية	عدد العزلات	النسبة المئوية	عدد العزلات	النسبة المئوية	عدد العزلات
47	14	40	12	13	4

4-4 التخليق الحيوي لجسيمات أكسيد الزنك النانوية

Biosynthesis of ZnO Nanoparticles

تم اختيار عزلة من جرثومة الزائفة الزنجارية تمتلك مقاومة لجميع المضادات الحيوية المستعملة في هذه الدراسة وامتلاكها عوامل الضراوة التي درست. أستعمل راسح هذه الجرثومة كعامل مختزل ومثبت في عملية التخليق الحيوي لأوكسيد الزنك النانوي. بينت نتائج الدراسة ظهور راسب في قعر حوجلة التفاعل وهذا دليل على عملية تخليق جزيئات اوكسيد الزنك النانوي، شكل 4-5. أن من اهم اسباب استعمال التخليق الحيوي لأوكسيد الزنك النانوي هي رخص الثمن ، امانة على البيئة ، عديمة الخطورة ، سهولة العمل ، وقليلة السمية (Heer et al., 2017).



شكل رقم (4-5) التخليق الحيوي لأوكسيد الزنك النانوي بواسطة راسح الزائفة الزنجارية.

A- محلول اوكسيد الزنك النانوي المتكون بعد عملية الفلترة ، B- راسح الزائفة الزنجارية ، C-

راسح الزائفة الزنجارية مع محلول اوكسيد الزنك بعد مرور 72 ساعة نمو.

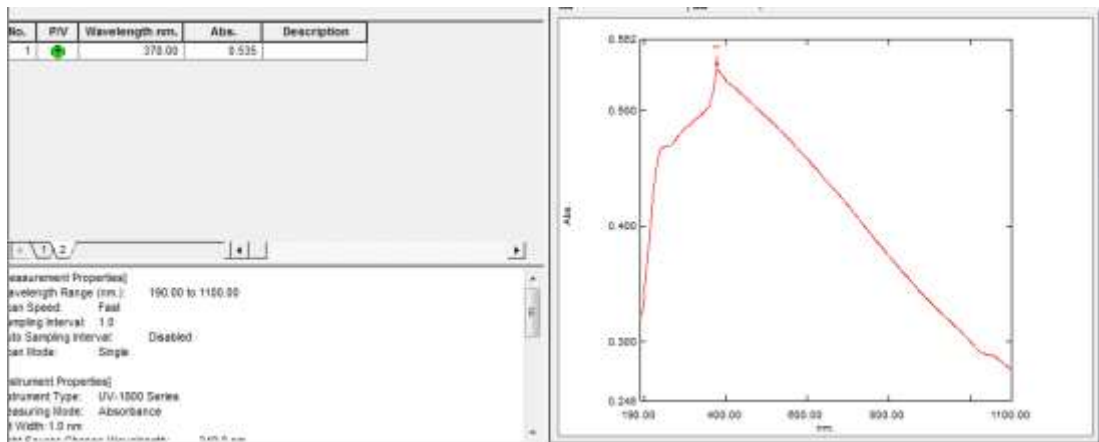
تم الحصول على جسيمات أكسيد الزنك النانوية على هيئة مسحوق ابيض بعد تجفيفه وتم اخذ وزنه وبعد ذلك تم دراسة خصائصه باستعمال مجهر القوة الذري، وحيود الاشعة السينية، مطياف الاشعة تحت الحمراء، المجهر الالكتروني الماسح و جهاز تحليل الجهد زيتا.

تتفق نتائج الدراسة الحالية مع نتائج العديد من الدراسات التي ذكر فيها ان الانزيمات الميكروبية تؤدي دوراً مباشراً و أساسياً في عملية التخليق الحيوي ، تكوين الجسيمات النانوية تحفز حيويًا من خلال التخليق الحيوي خارج خلوي او داخل خلوي اعتماداً على مكان تكون هذه الجسيمات. الكائنات الحية الدقيقة تلتقط الايونات المستهدفة من البيئة التي تحيط بهذه الكائنات ومن ثم تقوم بتحويل ايونات المعادن الى عناصر من خلال انزيماتها التي تحدث عادةً بسبب الفعاليات الخلوية (Li *et al.*, 2011).

5-4 خصائص جسيمات أكسيد الزنك النانوية

Characterization of ZnO Nanoparticles

درس استقرار جزيئات اوكسيد الزنك النانوية في السائل الغروي بوساطة جهاز مطياف الاشعة فوق البنفسجية UV-VIS والشكل 4-6 يوضح رسم الطيف المرئي للاشعة فوق البنفسجية لجسيمات أكسيد الزنك النانوية المخلفة بوساطة راشح الزائفة الزجاجية

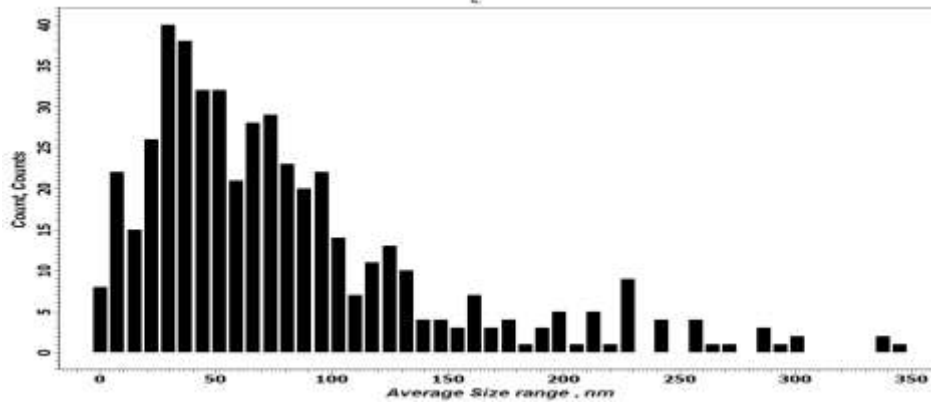


شكل 4-6: منحنى الطيف المرئي لجسيمات أكسيد الزنك النانوية بوساطة جهاز مطيافية الاشعة فوق البنفسجية UV-VIS Spectrophotometer.

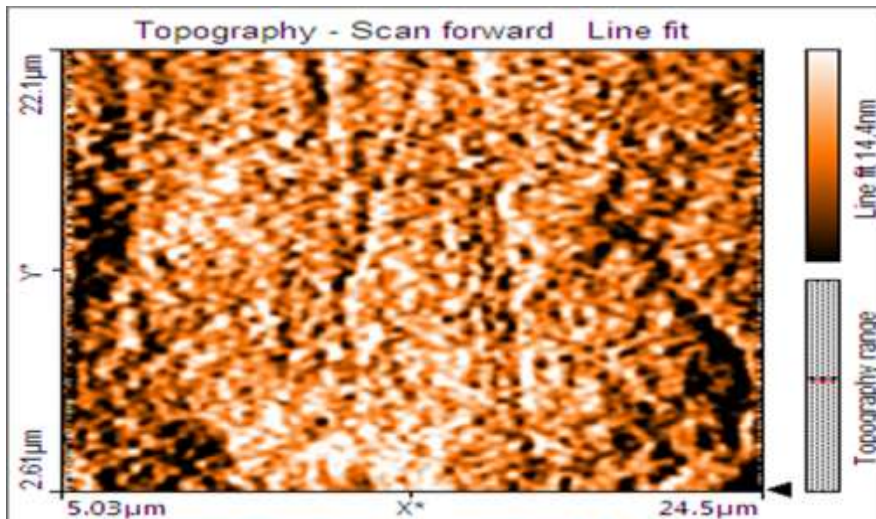
أثبت الفحص بالمطياف أن ذروة الامتصاص عند مدى 378 نانوميترًا وهذه النتيجة تشير الى التخليق الحيوي الناجح لجسيمات أكسيد الزنك النانوية بواسطة راشح الزائفة الزنجارية. وتتفق نتائج هذه الدراسة مع (Jayaseelan *et al.* 2012).

وفيها تم تخليق جزيئات اوكسيد الزنك حيويًا باستعمال راشح فطريات ومستخلصات نباتية وكانت ذروة الامتصاص ضمن المعدل 360-380 نانوميترًا.

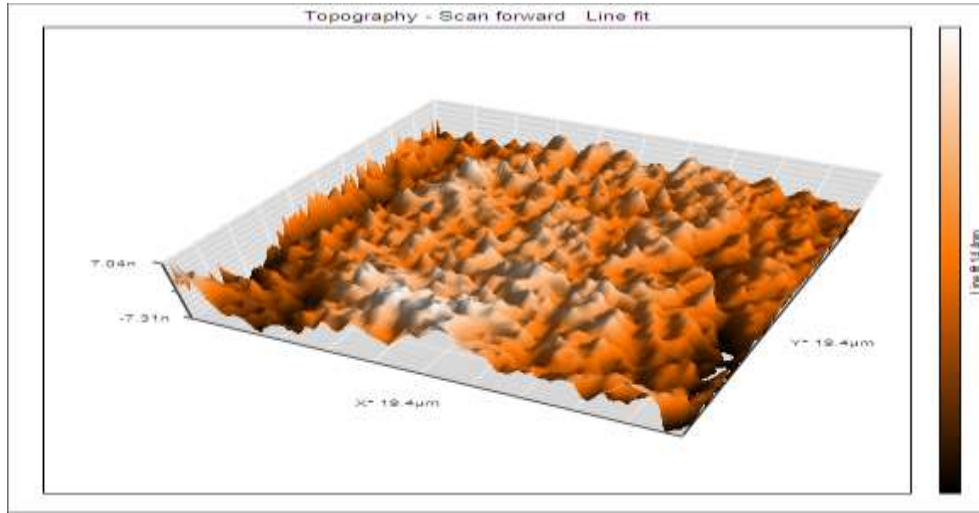
استعمل مجهر القوة الذرية للتحقق من صحة شكل سطح جزيئات اوكسيد الزنك النانوية المخلقة حيويًا بواسطة راشح الزائفة الزنجارية، تم التقاط صور بواسطة مجهر القوة الذرية ثنائية وثلاثية الأبعاد مغلقة بإسقاط في وضع عدم الاتصال. أظهرت النتائج التباين في السمات المظهرية لجزيئات اوكسيد الزنك النانوية اضافة الى حساب حجم الدقائق النانوية والذي يتراوح بين 20-100 نانوميتر (الشكل 4-7).



أ



ب



ج

شكل 4-7: أ- المدى في الاحجام المتحصلة للدقائق النانوية ب- التضاريس لجسيمات أكسيد

الزنك النانوية ثنائية الابعاد ج- - التضاريس لجسيمات أكسيد الزنك النانوية ثلاثية الابعاد.

خضعت الجسيمات النانوية المخلفة حيويًا بواسطة راشح جرثومة الزائفة الزنجارية للفحص

بجهاز حيود الأشعة السينية ، للحصول على البلورة ومتوسط حجم الجسيمات. الشكل 3-8 يظهر

طيف حيود الأشعة السينية للجسيمات النانوية المخلفة بواسطة راشح جرثومة الزائفة الزنجارية توافق

القمم الرئيسية التي تم الحصول عليها عند 100 ، 101 ، 102 ، 110 ، 112 ، 200 ، 202 و 203

مع انعكاسات براك عند قيمة 2 ثيتا للزوايا 31.70° ، 34.34° ، 36.16° ، 47.54° ، 56.48° ،

62.78° ، 67.66° و 69.87° على التوالي. تؤكد هذه النتائج ان المادة المفحوصة هي

أكسيد الزنك النانوية وانها ذات نقاوة عالية. وتم استخراج معدل حجم جزيئات أكسيد الزنك النانوية

باستعمال معادل دبي-شرر وكان متوسط حجم الجسيمات 20-40 نانوميترًا. تم مقارنة القمم

الستحصلة مع قاعدة بيانات حيود الأشعة السينية إذ دعمت هذه القاعدة وبقوة وجود جسيمات أكسيد

الزنك النانوية .

$$D_{hki} = \frac{k \times \lambda}{\beta_{hki} \times \cos \theta_{hki}}$$

$$K = 0.94$$

$$\lambda = 1.05418 \text{ \AA}$$

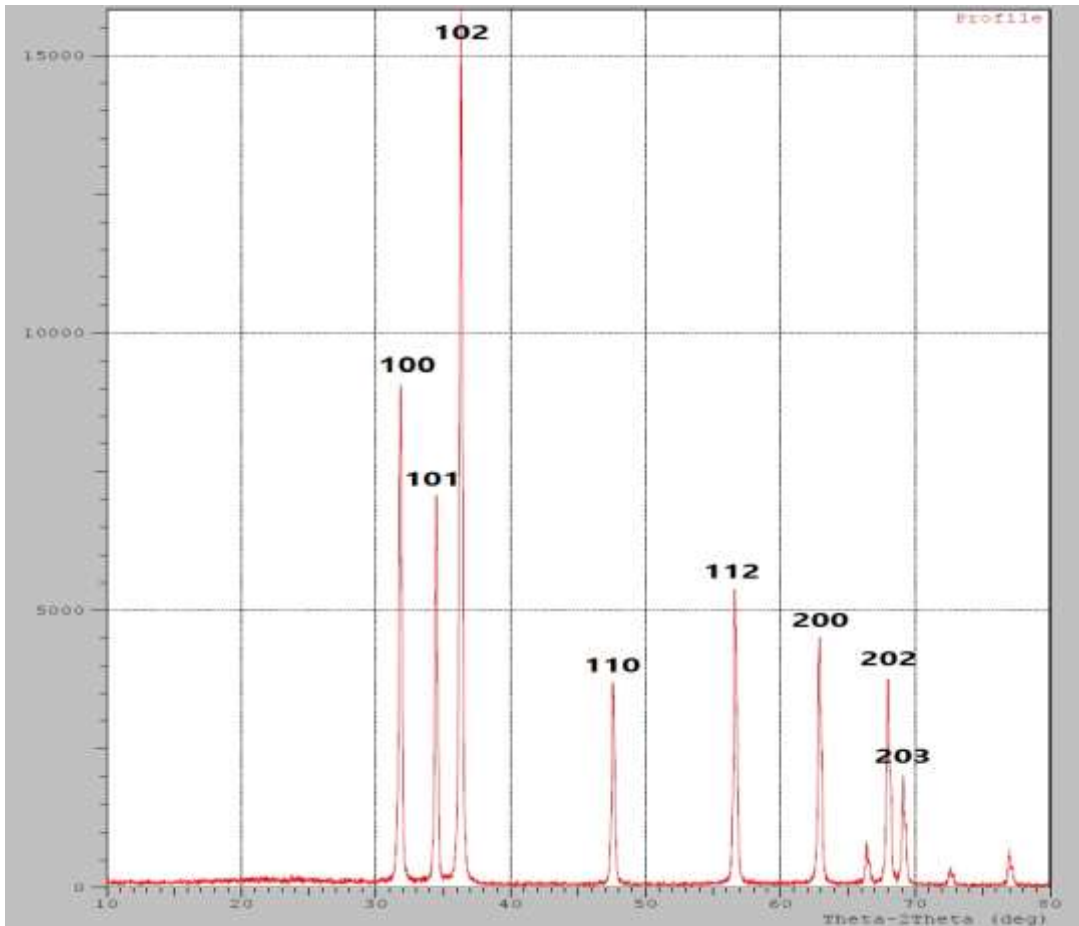
$$\beta_{hki} = \text{deg} \times \frac{\pi}{180}$$

تم مقارنة القيم المستحصلة مع قاعدة بيانات حيود الأشعة السينية حيث دعمت هذه القاعدة

ويقوة وجود جسيمات أكسيد الزنك النانوية. وتم مقارنتها أيضا مع قاعدة البيانات على الانترنت

إذ أشار JCPDS البطاقة رقم 00-036-1451 ZnO الى ان محلول الاختبار يتكون من جسيمات

أكسيد الزنك النانوية. تتفق نتائج الدراسة الحالية مع (Kumar and Rani (2013).

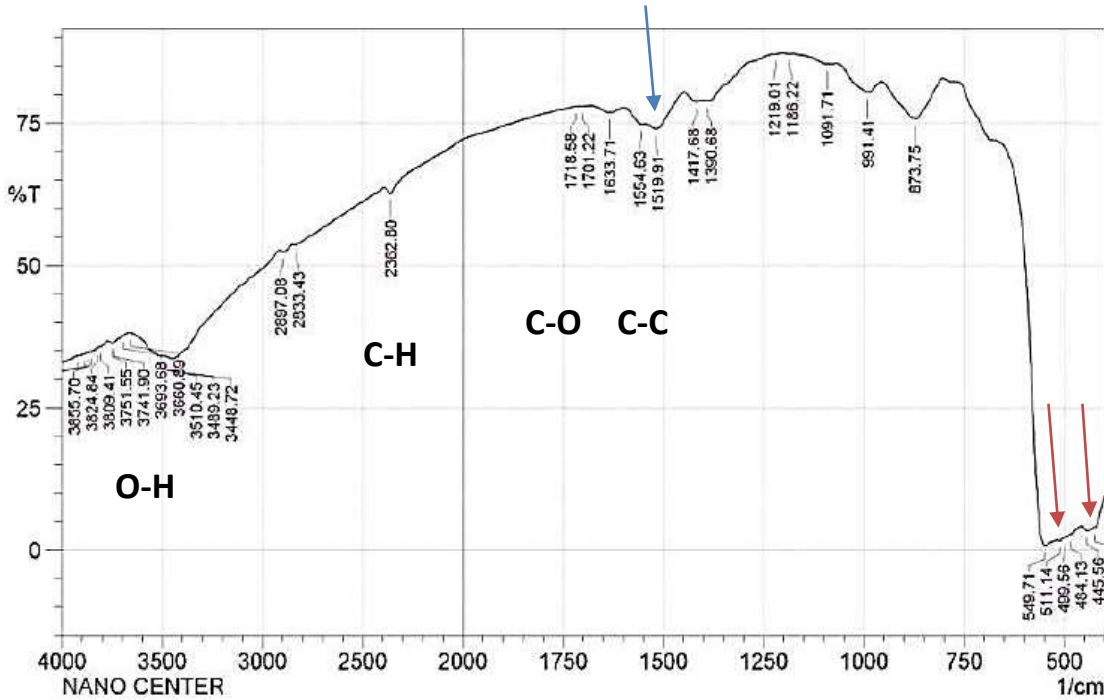


شكل 4-8: نمط حيود الأشعة فوق السينية لجسيمات أكسيد الزنك النانوية المخلفة حيويًا.

تم تحليل جسيمات اوكسيد الزنك النانوية المخلفة بواسطة راشح جرثومة الزائفة الزنجارية بواسطة مطياف فيوريه لتحويل الاشعة تحت الحمراء للتحري عن المجاميع الفعالة الموجود في راشح جرثومة الزائفة الزنجارية التي شاركت في عملية اختزال جسيمات اوكسيد الزنك النانوية وثباتها.

يوضح الشكل 4-9 طيف فيوريه للأشعة تحت الحمراء المسجل لجسيمات النانو قيد الفحص وفي

نطاق من 400- 4000 سم⁻¹ ++

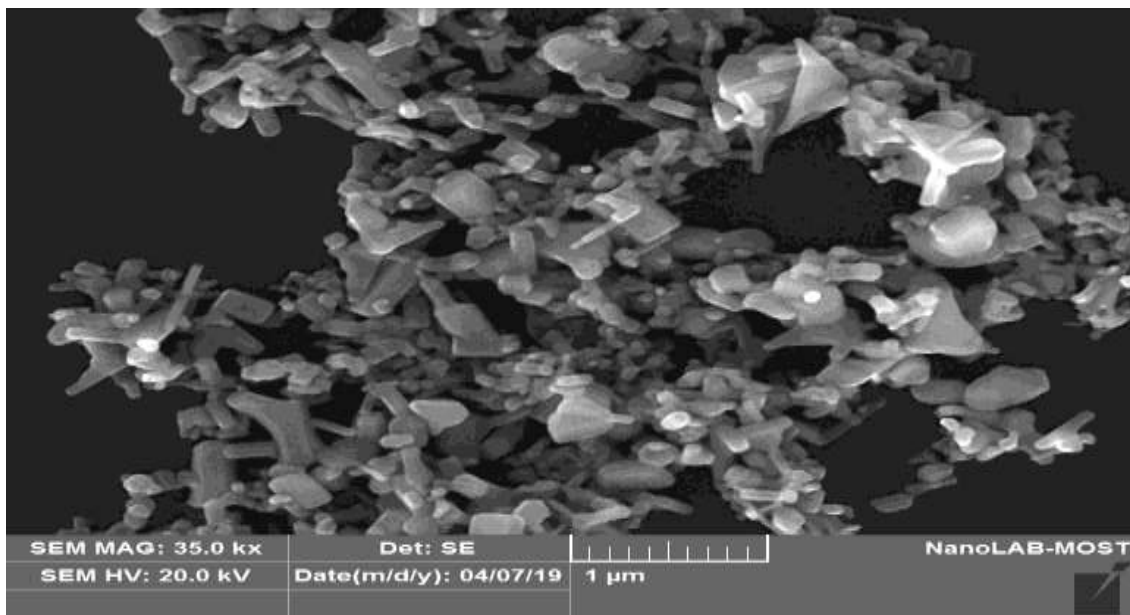
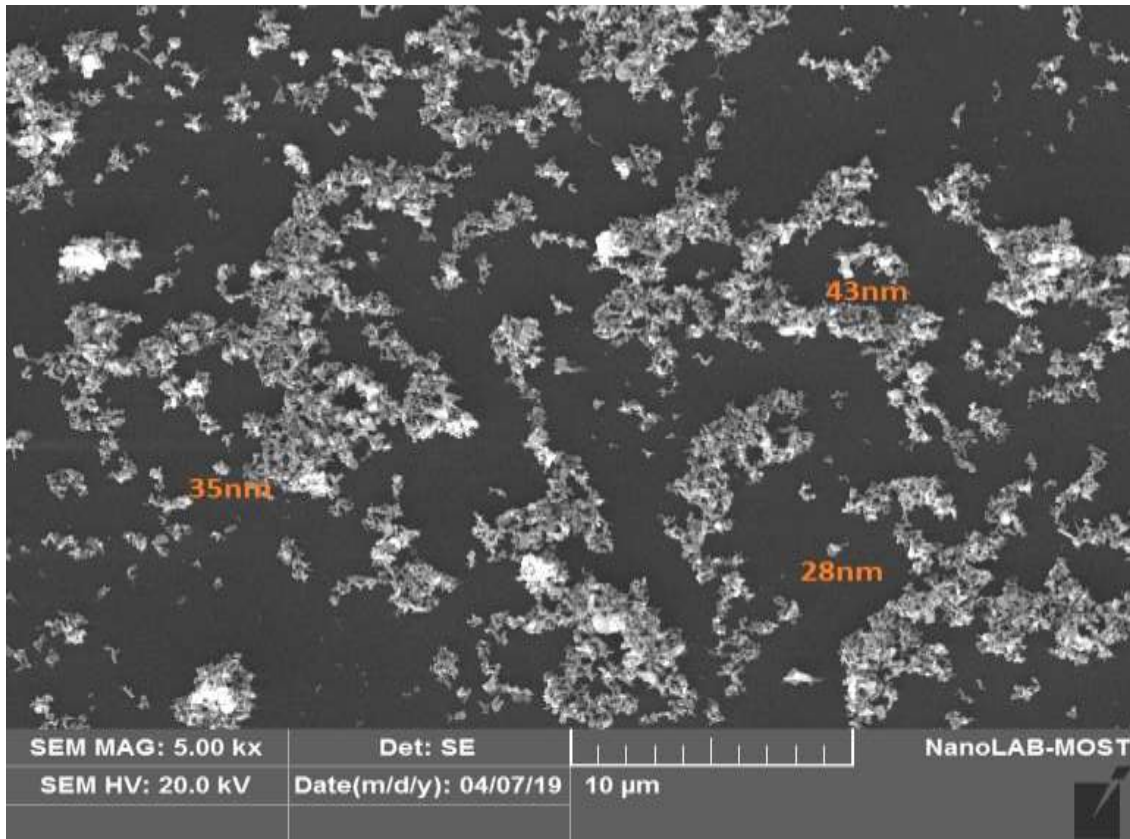


شكل 4-9: طيف فيوريه للأشعة تحت الحمراء 445.56 سم⁻¹ و 484.13 سم⁻¹ لجسيمات النانو المخلفة حيويًا.

أظهر الرسم البياني لتحليل طيف فيوريه للأشعة تحت الحمراء اثنين من القمم وهي 445.56 سم⁻¹ و 484.13 سم⁻¹ وهذا يشير الى انتقال الروابط ما بين جزيئة الاوكسجين وجزيئة الزنك الى نوعين من الاهتزازات وكذلك نلاحظ هناك ذروة ضعيفة وبشدة 1519.91 سم⁻¹ مع نطاق (1500 الى 1600سم⁻¹) التي تشير الى وجود مجموعة كاربون - كاربون (مجموعة الكينية او حلقة عطرية) وهذه النتائج تتفق مع ما وجدته (Rajan et al. (2016).

تشير القمم الممتدة ما بين 1500-1700 سم⁻¹ المجموعات الوظيفية المقابلة لوضع التمدد المتناظر وغير المتناظر لمجموعة كاربون- أوكسجين (C-O) وفي وضع التمدد 2362.80 سم⁻¹ إذ يمثل هذا المدى العلاقة ما بين الكاربون والهيدروجين (C-H) وايضا وضع التمدد في 3660.89 الى 3741.90 سم⁻¹ يمثل وجود مجموعة كاربوكسيل (O-H) إذ يمثل وجود هذه المجموعة وجود جزيئات الماء على سطح جسيمات أكسيد الزنك النانوية وهذه النتائج متوافقة مع مذكرت في الهند للباحثين (Kulkarni and Shirsat (2015).

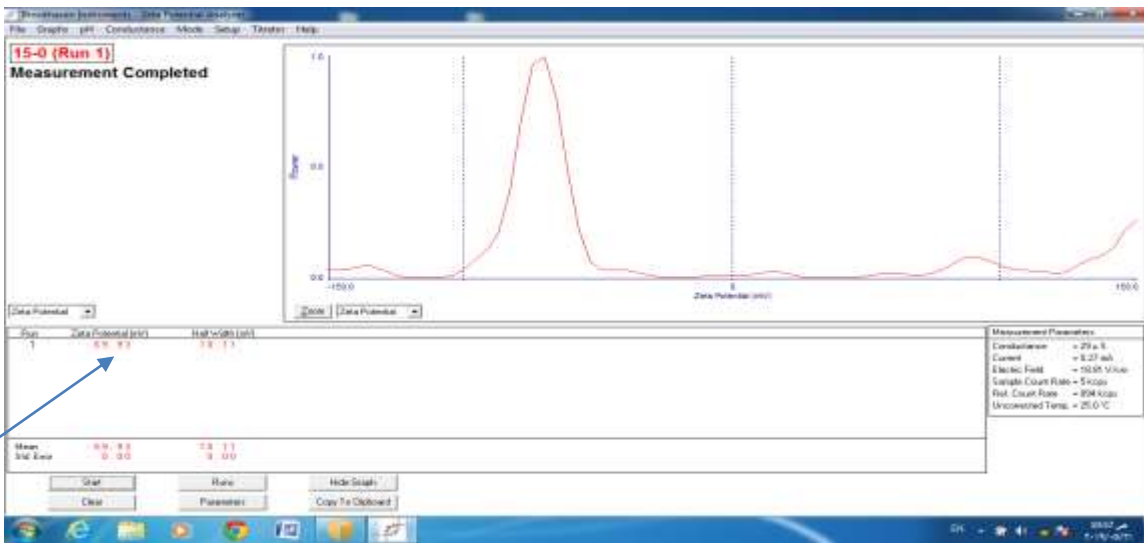
تم استكشاف الشكل الظاهري السطحي لجسيمات أكسيد الزنك النانوية المخلقة بوساطة راسح جرثومة الزنجرارية بوساطة المجهر الاليكتروني الماسح SEM . الشكل 4-10 يوضح ان هذه الجسيمات تحت قوة تكبير مختلفة، غير منتظمة ومتعددة الاشكال إذ تنوعت الاشكال البلورية لهذه الجسيمات ما بين الهياكل المستطيلة والكروية والشعاعية والاسطوانية. ويتراوح متوسط الحجم ما بين 28 - 43 نانوميترًا. نجحت الدراسة الحالية في تحقيق نتائج جيدة في الوصول الى مجموعة ضيقة من احجام الجسيمات النانوية لأوكسيد الزنك التي كانت اقل من الذي وجده (Kulkarni, and Shirsat 2015). وايضا (Pavani et al. (2011 إذ كان متوسط الحجم للجزيئات النانوية المشار اليها في بحثه تتراوح ما بين 50-120 نانوميتر .



شكل 4-10: أ- التنوع في الاشكال والاحجام المستحصلة من التخليق الحيوي لجسيمات الزنك النانوية المخلقة حيويًا بقوة قياس 10um ب- التنوع في الاشكال والاحجام المستحصلة من التخليق الحيوي لجسيمات الزنك النانوية المخلقة حيويًا بقوة قياس 1um.

أجري تحليل جهد زيتا للكشف عن الشحنات السطحية التي اكتسبتها جسيمات أكسيد الزنك النانوية. التي يمكن استعمالها لاختذ فكرة حول ثبات جسيمات أكسيد الزنك الغروية التي تم الحصول

عليها. الجهد المغناطيسي لقياس فرق جهد زيتا يعطي تلميحاً حول استقرارية المحلول الغروي ، اذا كانت الجسيمات في العالق تمتلك قيمة سالبة او موجبة عالية سوف تقوم الجزيئات بصد بعضها البعض ولن يكون هنالك تجمع للجسيمات النانوية ومن ناحية اخرى اذا كانت للجسيمات قيم زيتا صغيرة فلا توجد قوة تمنع تجمع هذه الجسيمات مع بعض. تم تحديد قيمة زيتا في جسيمات اوكسيد الزنك المخلفة حيويًا إذ كانت القيمة 69.93 -ملي فولت كما مبين في الشكل 4-11 . ان القيمة العالية تؤكد التنافر بين الجزيئات مما تؤدي الى استقرار جسيمات اوكسيد الزنك الغروية. تتفق نتائج الدراسة الحالية مع العديد من الدراسات التي تم فيها التخليق الحيوي لجسيمات اوكسيد الزنك النانوية، إذ اعطى تحليل جهد زيتا قيم هي اما اكبر من +30 ميلي فولت أو اصغر من -30 ملي فولت التي يعد فيها العالق ثابتاً. ان القيمة العالية تؤكد التنافر بين الجزيئات مما تؤدي الى استقرار الصيغة (Garcia et al., 1997).



شكل 4-11: منحنى فرق جهد زيتا لعينة اوكسيد الزنك المخلفة حيويًا.

4-6 الفعالية المضادة للمكروبات لجسيمات أكسيد الزنك النانوية اتجاه الزائفة الزنجارية

Antimicrobial activity of zinc oxide nanoparticles against *Pseudomonas aeruginosa*

اجري اختبار الفعالية المضادة للجراثيم لجسيمات أكسيد الزنك النانوية وبثلاثة تراكيز اتجاه جرثومة الزائفة الزنجارية متعددة المقاومة للمضادات الحيوية. أظهرت نتائج الدراسة الحالية حدوث تثبيط في كل من تركيز 500 و 100 ملغم/مل في حين لم يؤثر تركيز 10 ملغم/مل في جرثومة الزائفة الزنجارية والجدول (4-8) يوضح عدد العينات مع حجم منطقة التثبيط لكل تركيز.

جدول 4-8: اقطار تثبيط نمو لجرثومة الزائفة الزنجارية باستعمال جسيمات أكسيد الزنك النانوية.

قطر التثبيط (مم)			رقم العزلة
تركيز 1 ملغم /مل	تركيز 100 ملغم/مل	تركيز 500 ملغم/مل	
0	9	20	1
0	8	21	2
0	10	21	47
0	10	21	44
0	9	20	56
0	9	24	58
0	9	23	61
0	10	22	66

أظهرت دراسة للباحث Janaki (2015) فعالية جسيمات أكسيد الزنك النانوية على كل

من بكتريا الكليبيسيلا الرئوية والمكورات العنقودية.

ومع ذلك فإن جسيمات أكسيد الزنك النانوية لها فعالية كبيرة على تثبيط العديد من البكتريات المرضية (Sultan et al., 2015). ولقد بين (Rauf et al., 2017) ان الجسيمات النانوية لأوكسيد الزنك المخلقة لها تأثير في بكتريا الزائفة الزنجارية و بكتريا الكليبييلة الرئوية والمكورات العنقودية. اظهرت بعض الدراسات ان التشكل والضغط التأكسدي مسؤولان عن فعالية التثبيط لجسيمات أكسيد الزنك النانوي اتجاه البكتريا (Sourabh et al., 2014) ومع ذلك اشارت بعض الدراسات الى ان النشاط المضاد للبكتريا قد يكون بسبب اضطراب في نشاط غشاء الخلية (Brayner et al., 2006). وهناك الية مهمة اخرى هي فعالية انواع الاوكسجين التفاعلي بين الخلايا التي تعمل على تحرير الجذور الحرة (Reactive oxygen species) بما في ذلك بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) الذي يعد ضاراً للخلايا البكتيرية (Jones et al., 2008).

4-7 تأثير جسيمات أكسيد الزنك النانوية في بعض عوامل الضراوة مظهرياً

The Effect of the ZnO Nanoparticles on virulence factors phenotypes

4-7-1 تأثير جسيمات أكسيد الزنك النانوية في انتاج صبغة البايوسيانين

The effect of ZnO Nanoparticles on production of pyocyanin

تم دراسة تأثير جسيمات أكسيد الزنك النانوية في انتاج صبغة البايوسيانين لمجموعة من العزلات المقاومة للعديد من المضادات الحيوية (ثمان عزلات) لبكتريا الزائفة الزنجارية وتم استعمال تركيزين هما 500 و 100 ملغم / مل اثبتت النتائج ان التركيز 500 ملغم/مل جعل جميع العزلات غير قادرة على انتاج الصبغة ، الجدول 4-9 . في حين ان تركيز 100 ملغم/مل عينتان فقط كانت غير قادرة على انتاج الصبغة.

الجدول (4-9) نسب انتاج صبغة البايوسيانين بأستعمال جسيمات اوكسيد الزنك النانوية لجرثومة الزائفة الزنجارية .

100 ملغم /مل		500 ملغم/مل		عدد العزلات الكلي	عامل الضراوة
النسبة	عدد	النسبة	عدد		
النسبة المئوية %	العزلات المثبطة	النسبة المئوية %	العزلات المثبطة	8	Pyocyanin
25	2	100	8		

ذكر Lee et al. (2014) انه قد تم اختيار كلوريد الزنك النانوي (Zncl) في تثبيط انتاج صبغة البايوسيانين في بكتريا الزائفة الزنجارية وذلك بسبب فعاليته في تثبيط الصبغات وايضا تثبيط قدرة البكتريا على تكوين الغشاء الحيوي ومن دون التأثير في نمو البكتريا اما عند استعمال جسيمات أوكسيد الزنك النانوية فقد لوحظ قلة في انتاجية هذه الصبغة.

خفضت جسيمات أوكسيد الزنك النانوية قدرة البكتريا على تكوين الغشاء الحيوي وكذلك تكوين الصبغات في جميع العزلات التابعة لبكتريا الزائفة الزنجارية وهذه تعد اشارة الى امتلاك هذه الجسيمات لطيف واسع ومن الممكن ان تستعمل في علاج الامراض التي تسببها هذه البكتريا (Garacia-Lara et al., 2015).

4-7-2 تأثير جسيمات أوكسيد الزنك النانوية في تكوين الهيموليسين

The Effect of ZnO Nanoparticles on Hemolysin Production

تم دراسة تأثير جسيمات أوكسيد الزنك النانوية في تكوين الهيموليسين لمجموعة من العزلات المقاومة للعديد من المضادات الحيوية (ثمان عزلات) لبكتريا الزائفة الزنجارية وتم استعمال تركيزين هما 500 و 100 ملغم/مل . أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن تركيز 500 ملغم/مل ثبت فعالية

انزيم الهيمولاييسين نوع بيتا في العزلات الثمان جدول 4-10 . اما التركيز 100 ملغم/مل فلم يكن له تاثير يذكر وبقيت العزلات قادرة على تكوين الهيمولاييسين نوع بيتا.

الجدول (4-10) نسب تثبيط انتاج الهيمولاييسين بأستعمال جسيمات اوكسيد الزنك النانوية

لجرثومة الزائفة الزنجارية .

100 ملغم /مل		500 ملغم/مل		عددالعزلات الكلي	عامل الضراوة
النسبة	عدد	النسبة	عدد		
المئوية%	العزلات المثبطة	المئوية%	العزلات المثبطة	8	Hemolysin
0	0	100	8	8	

درس (Terada et al. 1999; Barker et al. 2004) تأثير كلوريد الزنك وأوكسيد الزنك النانوي في انزيم تحلل كريات الدم المفرز من جرثومة الزائفة الزنجارية. ومن المثير للاهتمام، فان كلا المادتين كلوريد الزنك وأوكسيد الزنك النانوي ثبطا وبصورة مستقلة انزيم تحلل كريات الدم الحمر المنتج من جرثومة الزائفة الزنجارية، ووجد ان جسيمات الزنك النانوية كانت اكثر تأثيرا في تثبيط الانزيم الحال لكريات الدم مقارنة بكلوريد الزنك النانوي.

4-7-3 تأثير جسيمات أوكسيد الزنك النانوية في انتاج البروتيز

The effect of ZnO Nanoparticles on production of Protease

تم اجراء تجربة الكشف عن تأثير جسيمات أوكسيد الزنك النانوية في انتاج البروتيز لبعض العزلات المقاومة لعدد من المضادات الحياتية لبكتريا الزائفة الزنجارية وباستعمال تركيزين هما 500 و 100 ملغم / مل على وسط اكار الحليب أذ لوحظ انه في تركيز 500 ملغم/مل قلت نسبة انتاج انزيم البروتيز في حين لم تتأثر في تركيز 100 ملغم /مل كما في الجدول 4-11. لاحظ (MuKherjee et al. (2011 من خلال تجربتهم ان انتاج انزيم البروتيز خارج الخلية ينخفض

بعد التعرض الى الجسيمات النانوية. فضلا عن ذلك فان ايونات الجسيمات النانوية المعدنية ترتبط بمجموعات وظيفية مع البروتينات مما يؤدي الى تغيير في طبيعة البروتين من ثم موت الخلايا (Sondi and Sondi, 2004).

الجدول 4-11 اقطار نسب تثبيط انتاج انزيم البروتيز بأستعمال جسيمات اوكسيد الزنك

النانوية لجرثومة الزائفة الزنجارية

رقم العينة	اقطار انتاج الانزيم (ملم)	اقطار انتاج الانزيم (ملم)	نسبة التثبيط %	اقطار انتاج الانزيم (ملم)	نسبة التثبيط %
1	12	8	0.33	12	0
2	14	9	0.35	14	0
11	17	11	0.35	18	0
14	20	15	0.25	20	0
29	14	10	0.28	14	0
38	16	10	0.37	16	0
42	12	9	0.25	14	0
66	13	11	0.15	14	0

4-7-4 تأثير جسيمات أوكسيد الزنك النانوية في انتاج حاملات الحديد

The effect of ZnO Nanoparticles on production of siderophore

تم اجراء تجربة الكشف عن تأثير جسيمات أوكسيد الزنك النانوية في انتاج حاملات الحديد لبعض العزلات المقاومة لعدد من المضادات الحيوية لبكتريا الزائفة الزنجارية وباستعمال تركيزين هما 500 و 100 ملغم / مل على وسط الاكار المغذي و 2,2 dipyridal الحاوي على الجسيمات

النانوية اذ لوحظ انه في كلا التركيزين ان جميع العزلات المستعملة في التجربة قد ضعف انتاجها لحاملات الحديد الجدول 4-12.

الجدول (4-12) نسب تثبيط انتاج حاملات الحديد بأستعمال جسيمات اوكسيد الزنك النانوية لجرثومة الزائفة الزنجارية

100 ملغم /مل		500 ملغم/مل		عدد العزلات الكلي	عامل الضراوة
النسبة	عدد	النسبة	عدد		
المئوية%	العزلات المثبطة	المئوية%	العزلات المثبطة		
100	8	100	8	8	siderophore

4-7-5 تأثير جسيمات أوكسيد الزنك النانوية في تكوين الغشاء الحيوي

The Effect of the ZnO Nanoparticles on Biofilm formations

درس تأثير جسيمات أوكسيد الزنك النانوية في تكوين الغشاء الحيوي تحت ظروف المختبر من خلال مراقبة ارتباط صبغة البنفسج البلوري بالخلايا الملتصقة مما يعكس وبشكل مباشر القدرة الفعالة لتثبيط الغشاء الحيوي، معالجة البكتريا المكونة للغشاء الحيوي بجسيمات أوكسيد الزنك النانوية سبب انخفاض في قابلية البكتريا على تكوين الغشاء الحيوي والجدول 4-13 يوضح نتائج التثبيط للتركيزين 100 و 500 ملغم/مل .

جدول 4-13: نسب تثبيط تكوين الغشاء الحيوي بأستعمال جسيمات أكسيد الزنك النانوية

لجرثومة الزائفة الزنجارية

رقم العينة	نسبة التثبيط % بتركيز 500 ملغم/مل	نسبة التثبيط % بتركيز 100 ملغم/مل
2	42.5	43
1	26.2	25.4
14	58.1	51.9
34	4.6	9.3
47	20.5	17.7
29	10.1	10.1
44	5	0
25	20.7	23.4
38	49.7	51.4
11	42.3	42.3
56	58.9	55.2
39	77.7	78.9
63	38.8	37.4
60	10.4	11.4
61	15.2	15.2
42	12.6	15.3
6	0	0
67	22.5	25.1
57	0	0
64	16.1	16.1
66	37	35.5
62	19.4	15.7

0	0	19
0	0	35
6.4	5.3	9
49.4	50	59
11.8	17.8	58
64.2	58.7	43
0	0	24
54.9	56.2	40

اظهرت النتائج ان نسبة التثبيط في تركيز 500 ملغم/مل كانت الاكبر وبنسبة 83.8 % في حين كانت نسبة التثبيط في تركيز 100 ملغم/مل (80 %) ، كانت النتائج المستحصلة متقاربة مع نتائج الباحث (Gupta et al. (2014) التي وجدت ان اكثر من 90 % من العينات قد تثبتت بتركيز 125 ملغم /مل.

كانت النتائج متقاربة مع (Dwivedi (2014 والتي سجلت نسبة تثبيط لجسيمات أكسيد الزنك النانوية بتركيز 100ملغم/مل ، ولقد بين (Murthy et al. (2011 ان الجسيمات النانوية لها القدرة على تقليل قابلية البكتريا على تكوين الغشاء الحيوي والخلايا الملتصقة ايضاً. وفي دراسة اخرى للباحث (Lee et al. (2014 إذ اظهرت جسيمات أكسيد الزنك فعالية ضد البكتريا وايضا ضد قابلية البكتريا على تكوين الغشاء الحيوي لجميع العينات التي خضعت للفحص وان قابلية تثبيط الغشاء الحيوي تزداد بزيادة تركيز المادة النانوية المستعملة في التثبيط.

نلاحظ من النتائج تباين نسبة التثبيط في تكوين الغشاء الحيوي مابين العزلات وذلك قد يعود الى مصدر العزلة والسلالة فضلا عن عدم تأثير زيادة التركيز للجسيمات النانوية المخلقة حيوياً في تثبيط تكوين الغشاء الحيوي للتركيزين (100 و 500 ملغم/مل) .

وعند مقارنة نتائج نسبة التثبيط مع مقدار قابلية تكوين الغشاء الحيوي لوحظ ان العزلات ضعيفة التكوين لم تتأثر بالمركبات النانوية المخلقة حيوياً مقارنة مع العزلات المكونة للغشاء الحيوي بشكل متوسط او قوي وذلك قد يعود الى تأثير المركبات النانوية في تكوين وانتاج مواد وعوامل ضراوة تساهم في تكوين الغشاء الحيوي.

الاستنتاجات والتوصيات

Conclusions and Recommendations

الاستنتاجات

1. أظهرت العزلات البكتيرية التي تم دراستها مقاومة متباينة للمضادات الحيوية عند الفحص في جهاز vitek compact 2 ، اعلى مقاومة كانت لمضاد Tobramycin و Colistin واقل نسبة مقاومة كانت لمضاد Piperacillin/Tazobactam.
2. لوحظ من خلال اجراء التجارب للكشف عن عوامل الضراوة للبكتريا امتلاك جميع العزلات لعوامل الضراوة (الهيمولايسين، حاملات الحديد، الغشاء الحيوي) فيما عدا امتلاكها لصبغة البايوسيانين وانزيم البروتياز إذ وجدت بنسب مختلفة اقل.
3. عند الكشف على قابلية البكتريا على تكوين الغشاء الحيوي اظهرت النتائج ان جميع العزلات تملك قابلية تكوين الغشاء الحيوي الاغلب ضعيفة التكوين .
4. أظهرت الدراسة قابلية بكتريا الزائفة الزنجارية على التخليق الحيوي لجسيمات اوكسيد الزنك النانوية.
5. اكدت الفحوصات التي تم اجراؤها على المادة المخلفة انها مادة نانوية ونقية وذات اشكال واحجام متعددة ويتراوح حجمها ما بين 20-100 نانوميتر وكان معدل الحجم المستحصل 30 نانوميتر.
6. اثبتت جسيمات اوكسيد الزنك النانوية المخلفة قدرتها على تثبيط بعض عوامل الضراوة (الصبغات،الهيمولايسين،البروتياز،حاملات الحديد،الغشاء الحيوي).

التوصيات

1. دراسة تأثير الجزيئات النانوية المخلفة من بكتريا الزائفة الزنجارية في تثبيط انواع بكتيرية اخرى.
2. دراسة تأثير جسيمات أكسيد الزنك النانوية في التعبير الجيني لجينات الاغشية الحيوية والجينات المسؤولة عن عوامل الضراوة الاخرى في بكتريا الزائفة الزنجارية او في انواع بكتيرية اخرى.
3. اللجوء الى استخدام مواد اخرى غير مادة كبريتيد الزنك المستخدمة كمادة خام في عملية تخليق جسيمات أكسيد الزنك النانوية.
4. دراسة مدى سمية جسيمات أكسيد الزنك المخلوق حيويًا من خلال تجربتها على الحيوانات المختبرية.

المصادر

References

المصادر

المصادر العربية

النعيمي، علا عبد الكريم كاظم (2015). دراسة تأثير البروبايتك في تكوين الغشاء الحيوي المعزولة

من اخماج الحروق والجروح وانتاج انزيم البروتيز لبكتريا *P.aeruginosa*. رسالة ماجستير،

كلية التربية الاساسية، الجامعة المستنصرية: 101 صفحة.

الأرناؤطي، عباس فالح مهدي (2015). دراسة التتميط الجيني وبعض عوامل الضراوة لبكتريا

Pseudomonas aeruginosa. رسالة ماجستير، كلية التربية للعلوم الصرفة /ابن الهيثم،

جامعة بغداد: 51 صفحة.

الناشي، علي عبد الرحيم وعليوي، زينب عبد الكريم (2015). التحري عن بعض عوامل الضراوة لبكتريا

P. aeruginosa المعزولة من مصادر مختلفة في مستشفى عفك في العراق. Magazine

.306-315 : (2) 7، of Al-Kufa University for Biology

المصادر الاجنبية

- Adibkia, K.; Javadzadeh, Y.; Dastmalchi, S.; Mohammadi, G.; Niri, F.K.; Alaei-Beirami, M. (2011). Naproxen-eudragit RS100 nanoparticles: preparation and physicochemical characterization. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 83(1):155-9.
- Al-Aoubaydy, N. R. M. (2015). Molecular detection and gene expression of efflux pumps in multidrug resistance pseudomonas aeruginosa. M. Sci. Thesis. College of Science. Al-Mustansiriya University.
- Al-Dahmoshi, H. O. M. (2013). Genotypic and Phenotypic Investigation of Alginate Biofilm Formation among *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Burn Victims in Babylon, Iraq Ph.D thesis, Babylon University, Science Faculty-Biology Department, Iraq.
- Al-Hazmi, F.; Alnowaiser, A.; Al-Ghamdi, A.A.; Al-Ghamdi, M.; Aly, R.M.; Al-Tuwirqi, F. and El-Tantawy, A. (2012). New large-Scale synthesis of magnesium oxide nanowires: Structural and antibacterial properties. *Super Lattices Microstruct.*, 52: 200-209.
- Ali, O.A. (2012). Prevention of *Proteus mirabilis* Biofilm by Surfactant Solution. *Egypt. Acad. J. Biol. Sci.*, 4(1): 1- 8.
- Alinaqvi, Z.; Kharal, S.A. and Qamaraziz, M.M. (2011). Burn patient professional. *Med. J.*, 18(2): 300-305.
- Aljanaby, A. (2016). Virulence factors and antibiotic susceptibility patterns of multidrug resistance *Klebsiella pneumonia* isolated from different clinical infections. *Afr. J. Microbiology Res.*, 10: 829-843.
- Alkhalifawi, Isam. (2015). Green synthesis of Magnetite Iron Oxide Nanoparticles by Using Al-Abbas's (A.S.) Hund Fruit (*Citrus medica*) var. *Sarcodactylis Swingle* Extract and Used in Al-'alqami River Water Treatment. 5. 124-135.

- Alkhalifawi, Isam. (2018). Silver Nanoparticles Synthesis by Hamza's Khubdat (A.S.) (Kombucha) Tea and used in Burn Wounds Treatment. (10). 489-500.
- Al-Saray, Z. A. K. (2016). Effect of Gamma Rays on Some Virulence Factors From Burn and Wound Isolated Bacteria. M. Sc. Thesis. College of Science. Al-Mustansiriya University.
- Al-Tikrity, A. L. (2009). Bacteriological and genetical study of pseudomonas aeruginosa isolated from different human infection. M.Sc. Thesis. College of Science. University of Tikrit.
- Ausubel, F.M.; Brent, R.; Kingston, R.E.; Moore, D.D.; Smith, J.A.; Seidman, J.D. and Struhl, K. (1987). Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons, Inc. New York.
- Babapour, E.; Haddadi, A.; Mirnejad, R.; Angaji, S-A. and Amirmozafari, N. (2016). Biofilm formation in clinical isolates of nosocomial *Acinetobacter baumannii* and its relationship with multidrug resistance. Asian Pac. J. Trop. Biomed., 6(6): 528–533.
- Bajelan, K. H. I. (2015). Biosynthesis of titanium oxide nanoparticles by *Lactobacillus* spp. and their activity against some bacterial isolates associated with recurrent urinary tract infection in a sample of Iraqi patients Ph.D. Thesis. College of Science. Al-Mustansiriya University.
- Barker, A.P., Vasil, A.I., Filloux, A., Ball, G., Wilderman, P.J. and Vasil, M.L. (2004). A novel extracellular phospholipase C of *Pseudomonas aeruginosa* is required for phospholipid chemotaxis. Molecular microbiology, 53(4):1089-1098.

- Baskar, G.; Chandhuru, J.; Fahad, K. S.; and Praveen, A.S. (2013). Mycological Synthesis, Characterization and Antifungal Activity of Zinc Oxide Nanoparticles. Asian Pharma Press, 3(4): 142–146.
- Beyth, N.; Hour-Haddad, Y.; Domb, A.; Khan, W. and Hazan, R. (2015). Alternative Antimicrobial Approach: Nano-Antimicrobial Materials. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. ID 246012, 16.
- Bianchi, S.M.; Prince, L.R. and McPhillips, K.; Allen, L.; Marriott, H.M.; Taylor, G. W.; Hellewell, P.G.; Sabroe, I.; Dockrell, D. H.; Henson, P.W. and Whyte, M.K.B. (2008). Impairment of apoptotic cell engulfment by pyocyanin, a toxic metabolite of *Pseudomonas aeruginosa*. Am. J. Respir. Crit. Care Med., 177: 35–43.
- Brayner, R.; Ferrari-Iliou, R.; Brivois, N.; Djediat, S.; Benedetti, M.F. and Fiévet, F. (2006). Toxicological impact studies based on Escherichia coli bacteria in ultrafine ZnO nanoparticles colloidal medium. Nano Lett., 6: 866-870.
- Bronowskil, C.; James, C.E. and Winstanley, C. (2014). Role of environmental survival in transmission of Campylobacter jejuni. FEMS Microbiol. Lett., 356(1):8-19.
- Brooks, F.G.; Carroll, K.C.; Butel, S.; and Morse, A.S. (2007). Medical Microbiology, Edetors, J.E.; and Adelberg, E.A.24 ed. Megraw hill. New York.
- Caldwell, C.C.; Chen, Y.; Goetzmann, H.S.; Hao, Y.; Borchers, M.T. and Hassett, D. J. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin pyocyanin causes cystic fibrosis airway pathogenesis. Am. J. Pathol., 175: 2473-2488.

- Chauhan, R.; Reddy, A.; and Abraham, J. (2015). Biosynthesis of silver and zinc oxide nanoparticles using *Pichia fermentans* JA2 and their antimicrobial property. *Der Pharma Chemica*, 6(3): 63–71.
- Chiang, S. L.; Mekalanos, J. J. and Holden, D. W. (1999). *In vivo* genetic analysis of bacterial virulence. *Ann. Rev. Microbiol.*, 53: 129-154.
- Choi, J. Y.; Sifiri, C. D.; Goumnerow, B. C.; Rahme, L. G.; Ausubal, F. M. and Colderwood, S. B. (2002). Identification of virulence genes in a pathogenic strain of *Pseudomonas aeruginosa* by representational difference analysis. *J. Microbiol.*, 184: 952-961.
- Collee, J.G.; Fraser, A.G.; Marmion, B.P. and Simmons, A. (1996). Practical medical microbiology. 14th ed. Longman. Singapore Publishers (pet) ltd. Singapore: 363-373.
- Cruickshank, R.; Duguid, J. P.; Marmion, B. P. and Swain, R. H. A. (1975). *Medical Microbiology*. 12th ed Churchill. Livingstone (publ.), London.
- Deep, A.; Chaudhary, U.; and Gupta, V. (2011). Quorum sensing and Bacterial Pathogenicity: From Molecules to Disease. *Journal of Laboratory Physicians*, 3 (1): 4–11.
- Dhar, S.; Saraf, R.; Singh, K. and Raina, B. (2007). Microbiological Profile of Chronic Burn Wounds among Patients admitted in Burn Unit. *J. K. Sci.*, 9(4): 182-185.
- Doshi, H.K.; Chua, K.; Kagda, F. and Tambyah, P.A. (2011). Multi drug resistant pseudomonas infection in open fractures post definitive fixation leading to limb loss: a report of three cases. *Int. J. Case Reports Images (IJCRI)*, 2: 1–6.
- Dwivedi, S., Wahab, R., Khan, F., Mishra, Y.K., Musarrat, J. and Al-Khedhairy, A. A. (2014). Reactive Oxygen Species mediated bacterial

biofilm inhibition via Zinc oxide nanoparticles and their statistical determination. Pios One, 9(11): e111289.

Ekizoglu, M.; Sagirogl, M.; Kilic, E. and Hascelik, A. G. (2016). An investigation of the bactericidal activity of chlorhexidine digluconate against multidrug-resistant hospital isolates. Turk. J. Med. Sci., 64:903-909.

Elkady, M. F.; Shokry Hassan, H.; Hafez, E. E.; and Fouad, A. (2015). Construction of Zinc Oxide into Different Morphological Structures to Be Utilized as Antimicrobial Agent against Multidrug Resistant Bacteria. Bioinorganic Chemistry and Applications, 2015: 1–20.

Elkatib, W. and Noreddin, A. (2014). In vitro antibiofilm efficacies of different antibiotic combination with zinc sulfate against *Pseudomonas aeruginosa* recovered from hospitalized patients with urinary tract infection. J. Antibiotics, 3:64-68.

Epstein, A.; Wong, T.S.; Belisle, R. A.; Boggs, E. M.; and Aizenberg, J. (2012). Liquid-infused structured surfaces with exceptional anti-biofouling performance. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 109(33), 13182–13187.

Feinbaum, R.L.; Urbach, J.M.; Liberati, N.T.; Djonovic, S.; Adonizio, A.; Carvunis, A.R. and Ausubel, F.M. (2012). Genome-wide identification of *pseudomonas aeruginosa* virulence-related genes using a *caenorhabditiselegans* infection model. PLoS. Pathog. 8(7): e1002813.

Fertas-Aissani R, Messai Y, Alouache S, Bakour R (2013). Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of *Klebsiella pneumonia* strains isolated from different clinical specimens. Pathol. Biol., 61(5):209-216.

- Flemming, H.C. and Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature .J. Rev .Microbio.*, 8(9): 623–633.
- Forbes, B. A.; Sahm, D. F. and Weissfeld, A. S. (2007). *Bailey and Scott, S. Diagnostic Microbiology*. 12th ed. Mosby. Inc. U.S.A.
- Freeman, D.; Falkiner, F.; and Keane, C. (1989). New method for detecting slime production by coagulase-negative staphylococci. *J. Clin. Pathol.* 42: 872–874.
- Fujitani, S.; Sun, H.Y.; L. Yu, V.L. and Weingarten, J.A. (2011). Pneumonia Due to *Pseudomonas aeruginosa* Part I. Epidemiology, Clinical Diagnosis, and Source. *CHEST Journal*, 139(4): 909-919.
- Garcia, A., Cuesta, A., Montes-Moran, M., Martinez-Alonso, A. and Tascon, J. (1997). Zeta Potential as a Tool to Characterize Plasma Oxidation of Carbon Fibers. *Journal of Colloid and Interface Science*, 192: 363-367.
- García-Contreras, R. (2016). Is quorum sensing interference a viable Alternative to treat *Pseudomonas aeruginosa* infections? *J. Front. Microbiol.*, 7:1454.
- Garcia-Lara, B.; Sausedo-Mora, M.; Roldan-Sanches, J.; Perez- Eretza, B.; Ramasamy, M.; Lee, J. and Garcia-Contreras, R. (2015). Inhibition of quorum sensing-dependent virulence factors and Biofilm Formation of clinical and environmental *Pseudomonas aeruginosa* strains by ZnO nanoparticles. *Lett. Applied Microbiol.*, 61(3): 299-305.
- Gellatly, S.L and Hancock, R.E. (2013). *Pseudomonas aeruginosa*: New insights into pathogenesis and host defenses. *J. Pathog. Dis.*, 67(3):159-73.
- Giamarellou, H. (2010). Multidrug-resistant Gram-negative bacteria: how to treat and for how long. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 36: S50-S54.

- Girard, G. and Bloemberg, G.V. (2008). Central role of quorum sensing in regulating the production of pathogenicity factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Future Microbiol.* 3(1): 97–106.
- Govan, J. R. (2007). *Pseudomonas aeruginosa* and non-fermenters, *Medical Microbiology*. 17thed . Churchill Livingstone Elsevier.
- Greenwood, D.; Slack, R. C. B.; Peutherer, J. F. and Barer, M. R. (2007). *Medical microbiology. A guide to microbial infections: pathogenesis, immunity, laboratory diagnosis and control*. 6th ed., Churchill Livingstone.
- Gunalan, S.; Sivaraj, R. and Rajendran, V. (2012). Green synthesized ZnO nanoparticles against bacterial and fungal pathogens. *Progress Nat. Science: Materials Int.*, 22(6), 693–700.
- Guzman, M.; Dille, J. and Godet, S. (2012). Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram negative bacteria. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.*, 8: 37-45.
- Hajipour, M. J.; Fromm, K. M.; Akbar Ashkarran, A. and Jimenez de Aberasturi, D (2012). Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends Biotechnol.* 30: 499-511.
- Hall-Stoodley, L.; and Stoodley, P. (2009). Evolving concepts in biofilm infections. *Cellular Microbiol.* 11(7): 1034–1043.
- Harley, J. and Prescott H. (2002). *Laboratory exercise in microbiology*. Fifth edition. The McGraw–Hill Companies.
- Hashim, I. (2013). *Microbiology culture media in pharmaceutical industry*.
- Hassan, A. A.; Howayda, M. E. and Mahmoud, H. H. (2013). Effect of Zinc Oxide Nanoparticles on the Growth of Mycotoxigenic Mold. *Studies Chem. Process Technol.*, 1(4): 66–74.

- Hassan, K.I.; Rafik, S.A. and Mussum, K. (2012). Molecular identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Hospitals in Kurdistan region. *J. Adv. Med. Res.*, 2: 90-98.
- Heer,A.S.K. Mansooria,S.M. and Chamria, N .(2017). Biosynthesis and characterization of ZnO nanoparticles using ficus religiosa leaves extract. *World J. Phrma. Res.*, 6 (10): 818-826.
- Helal, Z. H. and khan, M.I. (2015). QacE and QacE1 Genes and their correlation to Antibiotics and Biocides Resistance *Pseudomonas aeruginosa* A.m. *Biomed. Sci.*, 7(2): 52-62.
- Hogardt, M. and Heesemann, J. (2013). Microevolution of *Pseudomonas aeruginosa* to a chronic pathogen of the cystic fibrosis lung. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.*, 358: 91–118.
- Hoiby, N.; Ciofu, O. and Bjarnsholt, T. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis. *Future Microbiol.*, 5(11): 1663-1674.
- Hong, J. S.; Yoon, E-J.; Lee H.; Jeong, S. H.; Lee, K. (2016). Clonal Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* sequence type 235 isolates carrying bla IMP-6 and emergence of bla GES-24 and blaIMP-10 on novel genomic islands PAGI-15 and -16 in South Korea. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 60: 7216–7223.
- Hotterbeekx, A.; Kumar-Singh, S.; Goossens, H. and Malhotra-Kumar, S. (2017). *In vivo* and *In vitro* Interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus* spp. *J. Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 7: 106.
- Hou, W.; Sun, X.; Wang, Z.; and Zhang, Y. (2012). Biofilm-forming capacity of *Staphylococcus epidermis*'s, *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa* from ocular infections. *Investigative Ophthalmol. Visual Sci.*, 53(9): 5624–5631.

- Huang, Z.; Zheng, X. and Yan, D. (2008). Toxicological effect of ZnO nanoparticles based on bacteria. *Langmuir*, 24: 4140 -4152.
- Huh, A.J. and Kwon, Y.J. (2011). Nanoantibiotics: A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *Journal of Controlled Release*, 156:128-45.
- Huttner, A.; Harbarth, S.; Carlet, J.; Cosgrove, S.; Goossens, H. and Holmes, A. (2013). Antimicrobial resistance: a global view from the 2013 World Healthcare-Associated Infections. *Antimicrob Resist. Infect. Control*, 2: 31.
- Jaafar, Z.M.; Dhahi, M. A. R.; Abd, A. H. and Jaafar, S. M. (2014). Molecular identification and antibiotics resistance genes profile of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Iraqi patients. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 8(21):2183-2192.
- Jadhav, S.; Gaikwad, S.; Nimse, M. and Rajbhoj, A. (2011). Copper oxide nanoparticles: synthesis, characterization and their antibacterial activity. *J. Cluster Sci.*, 22:121-129.
- Jalal, R.; Goharshadi, E.K.; Abareshi, M.; Moosavi, M.; Yousefi, A. and Nancarrow, P. (2010). ZnO nanofluids: green synthesis, characterization, and antibacterial activity. *Mater. Chem. Phys.*, 121(1): 198-120.
- Jamunadevi, S.; Balashanmugam, P.; Muralitharan, G. and Kalaichelvan P. T. (2012). Molecular Characterization of Pathogenic and Non-pathogenic *Pseudomonas aeruginosa* with Special Reference to Phenazine Gene. *J. Modern Biotechnol.*, 1(2):70-74.
- Janaki, A.C., Saliatha, E. and Gunasekaran, S. (2015). Synthesis, Characteristics and antimicrobial activity of Zno Nanoparticles.

- Spectrochimica Acta part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 144:17-22.
- Japoni, A., Farshad, S. and Alborzi, A. (2009.) *Pseudomonas aeruginosa*: burn infection, treatment and antibacterial resistance. Iranian Red. Crescent Med. J., 11: 244-253.
- Jayaseelan, C.; Rahuman, A. A.; Kirthi, A. V.; Marimuthu, S.; Santhoshkumar, T.; Bagavan, A. and Rao, K. V. B. (2012). Novel microbial route to synthesize ZnO nanoparticles using *Aeromonas hydrophila* and their activity against pathogenic bacteria and fungi. Spectrochimica Acta-Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy: 78-84.
- Jiang, W.; Mashayekhi, H. and Xing, B. (2009). Bacterial toxicity comparison between nano- and micro-scaled oxide particles. Environ. Pollut., 157: 1619–25.
- Jones, N.; Ray, B.; Ranjit, K. T.; and Manna, A. C. (2008). Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms. FEMS Microbiology Letters, 279(1), 71–76.
- Kalia, V. C. and Purohit, H. J. (2011). Quenching the quorum sensing system: Potential antibacterial drug targets. Critical Rev. Microbiol., 37: 121-140.
- Kang, S.; Herzberg, M.; Rodrigues, D.F.; Elimelech, M. (2008). Antibacterial effects of carbon nanotubes: size does matter! Langmuir, 24(13):6409-13.
- Kasemets, K.; Ivask, A.; Dubourguier, H.C. and Kahru, A. (2009). Toxicity of nanoparticles of ZnO, CuO and TiO₂ to yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Toxicol. In Vitro, 23(6): 1116–1122.
- Kayser, F.H.; Bienz, K.A.; Eckert, J. and Zinkernagel, R.M. (2005). Medical microbiology. Georg thieme Verlag, Stuttgart, New York, USA.

- Khalil, M. A. E. F.; Sonbol, F. I.; Mohamed, A. F. B. and Ali, S. S. (2015). Comparative study of virulence factors among ES β L-producing and nonproducing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Tur. J. Med. Sci.*, 45: 60-69.
- Khan, M.A. and Faiz, A. (2016). Antimicrobial resistance patterns of *Pseudomonas aeruginosa* in tertiary care hospitals of Makah and Jeddah. *Ann. Saudi Med.*, 36(1): 23-28.
- Kim, W.; Tengra, F.K.; Young, Z.; Shong, J.; Marchand, N.; Chan, H.K.; Pangule, R.C.; Parra, M.; Dordick, J.S.; Plawsky, J.L. *et al.* (2013). Spaceflight promotes biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One*, 8: e62437.
- Kipnis, E.; Sawa, T. and Wiener-Kronish, J. (2006). Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Med. Mal. Infect.*, 36(2): 78–91.
- Koczura R, Kaznowski A (2003). Occurrence of the *Yersinia* high-pathogenicity island and iron uptake systems in clinical isolates of *Klebsiella pneumonia*. *Microb. Pathog.*, 35: 197-02.
- Kulkarni, S. S. and Shirsat, M. D. (2015). Optical and Structural Properties of Zinc Oxide Nanoparticles. *IJARPS*. 2(1):14-18.
- Kumar, H. and Rani, R. (2013). Structural and Optical Characterization of ZnO Nanoparticles Synthesized by Microemulsion Route. *International Letters of Chemistry, Physics and Astronomy*, 14:26-36.
- La Sarre, B. and Federle, M.J. (2013). Exploiting quorum sensing to confuse bacterial pathogens. *J. Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 77: 73–111.
- LaSarre, B. and Federle, M.J. (2013). Exploiting quorum sensing to confuse bacterial pathogens. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 77:73-111.

- Laxminarayan, R.; Duse, A.; Wattal, C. and Zaidi, A.K.M. (2013). Antibiotic resistance—the need for global solutions. *The Lancet Infectious Diseases*, 13: 1057-1098.
- Leboffe, M.J. and Pierce, B.E. (2011). A photographic atlas for the microbiology laboratory. 4th. Morton Publishing Company: 96 pp.
- Lee, J.H.; Kim, Y.G.; Cho, M.H. and Lee, J. (2014). ZnO nanoparticles inhibit *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and virulence factor production. *Microbiol. Res.*, 169(12): 888-896.
- Lee, N.; Lim, C.H.; Kim, T.; Son, E.K, Chung, G.S; Rho, C.J; Sang Rook Lee, S.R.; and Yu, I.J. (2017). Which hazard category should specific nanomaterial or groups of nanomaterial be assigned to and how? World Health Organization (WHO): 62pp.
- Levinson, W. (2016). Review of medical microbiology and immunology. 14th ed. McGraw-Hill Education, USA.
- Levy, S.B. and Marshall, B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses, *Nat. Med.*, 10 S122-S129.
- Li, J.; Nation, R.L.; Milne, R.W.; Turnidge, J.D. and Coulthard, K. (2005). Evaluation of Colistin as an agent against multi-resistant Gram-negative bacteria. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 25:11-25.
- Li, M.; Zhu, L. and Lin, D. (2011). Toxicity of ZnO nanoparticles to *Escherichia coli*: mechanism and the influence of medium components. *Environ. Sci. Technol.*, 45(5): 1977–1983.
- Li, X., Xu, H., Chen, Z. and Chen, G. (2011). Biosynthesis of Nanoparticles by microorganisms and there application. *J. Nanomat.*, (8): 1-16.
- Lima, J.L.; Alves, L.R.; Paz, J.N.; Rabelo, M.A. and Maciel, M.A. (2017). Analysis of biofilm production by clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with ventilator-associated pneumonia. *Rev. Bras Ter Intensiva*, 29(3): 1–7.

- Lister, P. D.; Wolter, D. J. and Hanson, N. D. (2009). Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. Clin. Microbiol. Rev., 22(4):582-610.
- Lo´pez, D.; Vlamakis. H and Kolter, R. (2010). Biofilms. Cold Spring Harbor Laboratory Press, June: 1–12.
- Lyczak, J.B.; Cannon, C.L. and Pier, G.B. (2000). Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. Microbes Infect., 2: 1051-1060.
- MacFaddin, F. J. (2000). Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. 3rd ed. The Williams and Wilkins Baltimore. U.S.A.
- Martinez, L.R.; Han, G. and Chacko, M. (2009). Antimicrobial and healing efficacy of sustained release nitric oxide nanoparticles against *Staphylococcus aureus* skin infection. J. Investig. Dermatol., 129: 2463-2469.
- Mathur, T.; Singhal, S.; Khan, S.; Upadhyay, D.J.; Fatma, T. and Rattan, A. (2006). Detection of biofilm formation among the clinical isolates of Staphylococci: An Evaluation of Three Different Screening Methods. Indian J. Med. Microbiol, 24(1): 9-25.
- Mohanty, S.; Maurya, V.; Gaiind, R.; Deb, M. (2013). Phenotypic Characterization and Colistin susceptibilities resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. J. Infect. Der. Ctries., 7(1): 880-887.
- Moradali, M.F.; Ghods, S. and Rehm, B.H.A. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. J. Front. Cell. Infect. Microbiol., 7: 39.
- Mukherjee, A.; Sadiq, M. I.; Prathna, T. C. and Chandrasckaran, N. (2011). Antimicrobial activity of aluminum oxide nanoparticles for potential

- clinical applications. *Communicating Res. Technological Adv.:* 245–251.
- Murray P.R.; Baron, E.J.; Tenenbaum, J.H. and Tenenbaum, P. M. (2007). *Manual of Clinical Microbiology*. 9th ed (9th ed). American Society for Microbiology.
- Murthy, P.S.; Venugopalan, V.P.; Sahoo, P.; Dhara, S.; Das, A.; Tyagi, A.K. and Saini, G. (2011). Gallium Oxide nanoparticles Induced Inhibition of Bacterial Adhesions and Biofilm formation. *Nanoscience, Engineering and Technology, International Conference on Chennai*. 490-493.
- Nagarajan, S.; and Kuppusamy, K.A. (2013). Extracellular synthesis of zinc oxide nanoparticle using seaweeds of Gulf of Mannar, India. *Journal of Nanobiotechnology*, 11(1): 1–11.
- Namasivayam, S.K.R; Preethi, M.; Bharani, A. and Robin, A. (2012). Biofilm inhibitory effect of silver nanoparticles coated catheter against pathogenic bacteria. *Int. J. Pharm. and boil. Sci.*, 20 (2):17-23.
- Obritsch, M.D., Fish, D.N., MacLaren, R. and Jung, R. (2004). National surveillance of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from Intensive Care Unit Patients from 1993 to 2002. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 4606-4610.
- Organization, W.H. (2014). *Antimicrobial resistance: global report on surveillance*, World Health Organization.
- Pati, R.; Mehta, R.K.; Mohanty, S.; Padhi, A.; Sengupta, M.; Vaseeharan, B. (2014). Topical application of zinc oxide nanoparticles reduces bacterial skin infection in mice and exhibits antibacterial activity by inducing oxidative stress response and cell membrane disintegration in macrophages. *Nanomedicine.*, 10(6): 1195-208.

- Pavani, K. V, Balakrishna, K. and Cheemarla, N. R. (2011). Biosynthesis of Zinc Nanoparticles by *Aspergillus* species, 5(1): 27–36.
- Pincus, D.H. (2006). Microbial identification using the bioMerieux vitek® 2 system. Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods. Bethesda, MD: Parenteral Drug Association. p.8.
- Plaza, G. A.; Chojniak, J. and Banat, I. M. (2014). Biosurfactant Mediated Biosynthesis of Selected Metallic Nanoparticles. Int. J. Mol. Sci., 15: 13720-13737.
- Poole, K. (2011). *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. Front Microbiol., 2: 65.
- Procop, G.; Church, D.; Hall, G.; Janda, W.; Koneman, E.; Schreckenberger, P. and Woods, G. (2016). Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 7th ed. Lippincott Williams and Willkins. Philadelphia. Baltimore. New York. London.
- Prodan , A. M.; Iconaru, S. L.; Chifiriuc, C. M. Bleolu, C.;Ciobanu, C. S.; Heino, M. M.; Sizaret, S. and Predoi, D. (2013). Magnetic Properties and Biological Activity Evaluation of Iron Oxide Nanoparticle. Journal of Nanomaterial's, 1: 1–7.
- Rajan, A.; Cherian, E.; and Baskar, G. (2016). Biosynthesis of zinc oxide nanoparticles using *Aspergillus fumigatus* JCF and its antibacterial activity. Int. J. Modern Sci. Technol., 1(2): 52–57.
- Rao, S. (2008). Sterilization and disinfection. (Cited by WWW.Microrao.com).
- Rasko, D. A. and Sperandio, V. (2010). Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. Nat. Rev. Drug Discover, 9: 117-128.
- Rauf, M. A, Owais, M, Rajpoot, R., Ahmed, F., Khan, N. and Zubair, S. (2017). Biomimetically synthesized ZnO nanoparticles attain potent

antibacterial activity against less susceptible *S. aureus* Skin infection in experimental animals. RSC Adv., 7(58):36361- 36373.

Ravel, J. and Cornelis, P. (2003). Genomics of pyoverdine-mediated iron uptake in *Pseudomonas*. Trends Microbiol., 11: 195-200.

Ravishankar Rai, V. and Jamuna Bai, A. (2011). Nanoparticles and their potential application as antimicrobials. In: Mendez-Vilas A, ed. Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances. Formatex Res. Center: 197–209.

Roland, P.S. and Stroman, D.W. (2002). Microbiology of acute otitis externa. Laryngoscope, 112(7): 1166-1177.

Rutherford, S. T. and Basler, B. L. (2012). Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. Cold Spring Harbor perspectives in medicine, 2.

Sahayaraj, K. and Rajesh, S. (2011). Bionanoparticles: Synthesis and antimicrobial applications. Science against microbial pathogens. Commun. Curr. Res. Technol. Adv., 23: 228-244.

Schwyn B, Neilands JB (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Anal. Biochem. 160:47-56.

Sefton, A.M. (2002). Mechanisms of antimicrobial resistance. Drugs, 62:557-566.

Selim, S.; Elkholy, I.; Hagagy, N.; ElAlfay, S. and Abedl Aziz, M. (2015). Rapid identification of *Pseudomonas aeruginosa* by pulsed – field gel electrophoresis. Biotechnol. Biotechnol. Equipment, 1(29): 152-156.

- Senior, B. W.; Albrechtsen, M. and Kerr, M. (1988). A survey of IgA protease production among clinical isolates of the proteases. *J. Med. Microbiol.*, 25: 27-31.
- Senior, B.W. (1999). Investigation of the types and characteristics of the proteolytic enzyme formed by diverse strains of *Proteus* species. *J. Med. Microbiol.*, 48(7): 623 -628.
- Shamsuzzaman, Mashrai, A.; Khanam, H.; and Aljawfi, R. N. (2013). Biological synthesis of ZnO nanoparticles using *C. albicans* and studying their catalytic performance in the synthesis of steroidal pyrazolines. *Arabian Journal of Chemistry*.
- Sharma, G.; Rao, S.; Bansal, A.; Dang, S.; Gupta, S. and Gabrani, R. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: potential therapeutic targets. *Biological*, 42(1):1-7.
- Sondi, I. and Sondi, S. B. (2004). Silver nanoparticles as antimicrobial agents: a case study on *E.coli* as a model for Gram Negative bacteria. *J. Colloid Interface Sci.*, 275 (1): 177–182.
- Sourabh, D.; Rizwan, W.; Farheen, K.; Yogendra, K.M.; Javed, M. and Abdulaziz, A.A. (2014). Reactive Oxygen Species Mediated Bacterial Biofilm Inhibition via Zinc Oxide Nanoparticles and Their Statistical Determination. *PLoS One*, 9: 111289.
- Srisitthiratkul, C.; Pongsorrarith, V. and Intasanta, N. (2011). The potential use of nanosilver-decorated titanium dioxide Nano fibers for toxin decomposition with antimicrobial and self-cleaning properties. *Appl. Surface Sci.*, 257: 8850-8856.
- Storz, M. P.; Maurer, C. K.; Zimmer, C.; Wagner, N.; Brengel, C.; de Jong, J. C.; Lucas, S.; Müsken, M.; Häussler, S.; Steinbach, A. and Hartmann, R. W. (2012). Validation of PqsD as an anti-biofilm target

- in *Pseudomonas aeruginosa* by development of small-molecule inhibitors. *J. Amer. Chem. Soc.*, 134(39): 16143-16146.
- Strepel, N.; Neidig, A.; Nusser, M.; Geffers, R.; Vieillard, J.; Lesouhaitier, O.; et al. (2013). Human host defense peptide LL-37 Stimulates virulence factor production and adaptive resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS ONE.*, 8: e82240.
- SudhaKar, T.; Karpngam, S. and Premkumer, J. (2015). Biosynthesis antibacterial activity of pyocyanin pigment produced by *pseudomonas aeruginosa* SU1. *JCPRG5.* 7(3):921-924.
- Sultan, A., Kahn, H.M., Malik, A., Ansari, M. A., Azam, A. and perween, N. (2015). Antimicrobial activity of ZnO Nanoparticles against ESBL and Amp-C production gram negative isolates from superficial wound infection. *Int. J. Curr. Microbial App. Sci.*, 1:38-47.
- Tadesse, A. and Alem, M. (2006). *Medical bacteriology*. University of Gondar: 61-63.
- Tam, V.; Chong, K.; Abderaonf, A.; Brioso, C. and Ameka, M. (2010). Prevalence, resistance, mechanisms and susceptibility of multi-drug resistant Blood stream isolation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 54(3): 1160-1164.
- Tan, T.T. (2008). "Future" threat of gram-negative resistance in Singapore. *Ann Acad. Med. Singap.*, 37: 884–890.
- Tashiro, Y.; Yawata, Y.; Toyofuku, M.; Uchiyama, H.; and Nomura, N. (2013). Interspecies interaction between *Pseudomonas aeruginosa* and other microorganisms. *J. Microbes Environ.*, 28: 13–24.
- Terada, L.S., Johansen, K.A., Nowbar, S., Vasil, A.I. and Vasil, M.L. (1999). *Pseudomonas aeruginosa* hemolytic phospholipase C suppresses

- neutrophil respiratory burst activity. *Infection and immunity*, 67(5):2371-2376.
- Tille, P. (2014). *Bailey and Scotts Diagnostic Microbiology –E-Book*: Elsevier Health Sciences.
- Tille, P. (2015). *Bailey and Scotts Diagnostic Microbiology–E-Book*: Elsevier Health Sciences.
- Todar, K. (2008). *Online Textbook of Bacteriology 330 Lecture Topics: Pseudomonas aeruginosa*. Annual Reports of Wisconsin University.
- Todar, K. (2011). *Pseudomonas aeruginosa*. *Textbook of Bacteriology*. *Sci. J.*, 304: 1421
- Vadlapudi, V. and Kaladhar, D.S.V.G.K. (2014). Review: Green Synthesis of Silver and Gold Nanoparticles. *Middle-East J. Sci. Res.*, 19 (6): 834-842.
- Vandepitte, J.; Verhaegen, J.; Engbaek, K.; Rohner, P.; Piot, P. and Heuck, C. C. (2003). *Basic laboratory procedures in clinical Bacteriology*. 2nd. World Health Organization Geneva: 109-120.
- Velkov, T.; Roberts, K.D.; Nation, R.L.; Thompson, P.E. and Li, J. (2013). Pharmacology of polymyxins: new insights into an 'old' class of antibiotics. *Future Microbiol.*, 8(6): 711-24.
- Vielkind, M.; Kampen, I.; and Kwade, A. (2013). Zinc Oxide Nanoparticles in Bacterial Growth Medium: Optimized Dispersion and Growth Inhibition of *Pseudomonas putida*, 2013(November): 287–293.
- Wiles, T. J.; Kulesus, R. R. and Mulvey, M. A. (2008). Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Exper. Molec. Pathol.*, 85(1): 11-19.
- Wu, H. J.; Wang, A. H. J. and Jennings, M. P. (2008). Discovery of virulence factors of pathogenic bacteria. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 12: 93-101.

- Xie, Y.; He, Y.; Irwin, P. L.; Jin, T. and Shi, X. (2011). Antibacterial activity and mechanism of action of zinc oxide nanoparticles against *Campylobacter jejuni*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77: 2325-2331.
- Yang, L. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing. A factor in biofilm development and an antipathogenic drug target. Ph.D. thesis, Department of System Biology. Technical University of Denmark.
- Yin, W.F.; Purmal, K.; Chin, S.; Chan, X.Y.; Koh, C.L.; Sam, C.K and Chan, K.G. (2012). *N*-acy homoserine lactone production by *Klebsiella pneumonia* isolated from human tongue surface. *Polish. J .Vet.* 12:3472-3483.
- Zhu, Z.; Su, M.; Ma, L.; Liu, D. and Wang, Z. (2013). Preparation of graphene oxide–silver nanoparticle nanohybrids with highly antibacterial capability. *Talanta*, 117: 449-455.

الملحق

Appendix

1- قابلية جرثومة الزائفة الزنجارية على تكوين الغشاء الحيوي باستعمال طريقة الكونغو الاحمر

رقم العزلة	شديدة التكوين	متوسطة التكوين	ضعيفة التكوين
2	+++		
1	+++		
14		++	
34		++	
47	+++		
29	+++		
44	+++		
25		++	
38	+++		
11	+++		
56	+++		
39		++	
63	+++		
60	+++		
61	+++		
42	+++		
6	+++		
67	+++		
57	+++		
64		++	
66		++	
62		++	
19		++	
35		++	
9		++	
59		++	
58		++	
43		++	
24		++	
40	+++		

2- تكوين الغشاء الحيوي لجرثومة الزائفة الزنجارية باستعمال طريقة اطباق المعايرة الدقيقة

رقم العزلة	معامل السيطرة	نسبة معامل السيطرة	نتائج العينة	نسبة نتائج العينة	شدة تكوين العينة للغشاء الحيوي
2	0.056, 0.054, 0.054	0.054	0.180, 0.234, 0.150	0.188	متوسطة التكوين
1	0.056, 0.054, 0.054	0.054	0.107, 0.111, 0.136	0.118	متوسطة التكوين
14	0.056, 0.054, 0.054	0.054	0.161, 0.122, 0.254	0.179	متوسطة التكوين
34	0.056, 0.054, 0.054	0.054	0.087, 0.080, 0.091	0.086	ضعيفة التكوين
47	0.056, 0.054, 0.054	0.054	0.092, 0.115, 0.116	0.107	ضعيفة التكوين
29	0.056, 0.054, 0.054	0.054	0.092, 0.092, 0.083	0.089	ضعيفة التكوين
44	0.056, 0.054, 0.054	0.054	0.081, 0.078, 0.082	0.080	ضعيفة التكوين
25	0.056, 0.054, 0.054	0.054	0.089, 0.082, 0.159	0.111	متوسطة التكوين
38	0.056, 0.054, 0.054	0.054	0.138, 0.254, 0.116	0.169	متوسطة التكوين
11	0.056, 0.054, 0.054	0.054	0.097, 0.206, 0.109	0.137	متوسطة التكوين
56	0.056, 0.054, 0.054	0.054	0.162, 0.150, 0.340	0.217	شديدة التكوين
39	0.056, 0.054, 0.054	0.054	0.327, 0.626, 0.317	0.423	شديدة التكوين
63	0.056, 0.054, 0.054	0.054	0.120, 0.193, 0.104	0.139	متوسطة التكوين
60	0.056, 0.054, 0.054	0.054	0.097, 0.103, 0.090	0.096	ضعيفة التكوين
61	0.056, 0.054, 0.054	0.054	0.099, 0.074, 0.143	0.105	ضعيفة التكوين
42	0.056, 0.054, 0.054	0.054	0.110, 0.114, 0.111	0.111	متوسطة التكوين
6	0.056, 0.054, 0.054	0.054	0.062, 0.076, 0.085	0.074	ضعيفة التكوين
67	0.056, 0.054, 0.054	0.054	0.164, 0.151, 0.139	0.151	متوسطة التكوين
57	0.056, 0.054, 0.054	0.054	0.106, 0.085, 0.089	0.093	ضعيفة التكوين
64	0.056, 0.054, 0.054	0.054	0.105, 0.098, 0.112	0.105	ضعيفة التكوين
66	0.056, 0.054, 0.054	0.054	0.141, 0.133, 0.132	0.135	متوسطة التكوين

متوسطة التكوين	0.108	0.121,0.098 ,0.105	0.054	0.056,0.054, 0.054	62
ضعيفة التكوين	0.070	0.071,0.063 ,0.076	0.054	0.056,0.054, 0.054	19
ضعيفة التكوين	0.064	0.061,0.069 ,0.063	0.054	0.056,0.054, 0.054	35
ضعيفة التكوين	0.093	0.073,0.134 ,0.074	0.054	0.056,0.054, 0.054	9
متوسطة التكوين	0.176	0.093,0.280 ,0.156	0.054	0.056,0.054, 0.054	59
ضعيفة التكوين	0.101	0.092,0.082 ,0.128	0.054	0.056,0.054, 0.054	58
شديدة التكوين	0.274	0.346,0.206 ,0.272	0.054	0.056,0.054, 0.054	43
ضعيفة التكوين	0.082	0.088,0.079 ,0.079	0.054	0.056,0.054, 0.054	24
شديدة التكوين	0.224	0.270,0.211 ,0.192	0.054	0.056,0.054, 0.054	40

3- ناتج التثبيت لجسيمات اوكسيد الزنك النانوية للغشاء الحيوي لعزلات جراثيم الزائفة الزنجارية

وباستعمال تركيز 100 ملغم /مل

رقم العزلة	المادة النانوية مع المذيب	نسبة المادة النانوية مع المذيب	ناتج التثبيت للعيونة	نسبة ناتج التثبيت للعيونة
2	0.005,0.006,0.003	0.004	0.106,0.104,0.113	0.107
1	0.005,0.006,0.003	0.004	0.078,0.098,0.089	0.088
14	0.005,0.006,0.003	0.004	0.083,0.093,0.083	0.086
34	0.005,0.006,0.003	0.004	0.082,0.073,0.080	0.078
47	0.005,0.006,0.003	0.004	0.086,0.086,0.092	0.088
29	0.005,0.006,0.003	0.004	0.081,0.086,0.073	0.080
44	0.005,0.006,0.003	0.004	0.084,0.080,0.076	0.080
25	0.005,0.006,0.003	0.004	0.079,0.084,0.094	0.085
38	0.005,0.006,0.003	0.004	0.078,0.076,0.092	0.082
11	0.005,0.006,0.003	0.004	0.075,0.075,0.087	0.079
56	0.005,0.006,0.003	0.004	0.091,0.090,0.110	0.097
39	0.005,0.006,0.003	0.004	0.092,0.099,0.075	0.089
63	0.005,0.006,0.003	0.004	0.087,0.089,0.086	0.087
60	0.005,0.006,0.003	0.004	0,081,0.083,0.093	0.085
61	0.005,0.006,0.003	0.004	0.084,0.090,0.093	0.089
42	0.005,0.006,0.003	0.004	0.093,0.100,0.089	0.094
6	0.005,0.006,0.003	0.004	0.067,0.085,0.084	0.079
67	0.005,0.006,0.003	0.004	0.118,0.108,0.113	0.113
57	0.005,0.006,0.003	0.004	0.093,0.103,0.085	0.094

0.088	0.083,0.084,0.098	0.004	0.005,0.006,0.003	64
0.087	0.089,0.081,0.091	0.004	0.005,0.006,0.003	66
0.091	0.094,0.094,0.085	0.004	0.005,0.006,0.003	62
0.082	0.086,0.078,0.082	0.004	0.005,0.006,0.003	19
0.074	0.068,0.084,0.070	0.004	0.005,0.006,0.003	35
0.087	0.085,0.097,0.080	0.004	0.005,0.006,0.003	9
0.089	0.086,0.094,0.086	0.004	0.005,0.006,0.003	59
0.089	0.081,0.091,0.094	0.004	0.005,0.006,0.003	58
0.098	0.109,0.081,0.104	0.004	0.005,0.006,0.003	43
0.090	0.091,0.088,0.090	0.004	0.005,0.006,0.003	24
0.101	0.089,0.112,0.103	0.004	0.005,0.006,0.003	40

4- ناتج التثبيت لجسيمات اوكسيد الزنك النانوية للغشاء الحيوي لعزلات جراثيم الزائفة الزنجارية

وباستعمال تركيز 500 ملغم /مل

نسبة ناتج التثبيت للعيينة	ناتج التثبيت للعيينة	نسبة المادة النانوية مع المذيب	المادة النانوية مع المذيب	رقم العزلة
0.108	0.111,0.101,0.113	0.008	0.006,0.008,0.011	2
0.087	0.080,0.089,0.090	0.008	0.006,0.008,0.011	1
0.075	0.080,0.073,0.073	0.008	0.006,0.008,0.011	14
0.082	0.085,0.080,0.083	0.008	0.006,0.008,0.011	34
0.085	0.084,0.086,0.085	0.008	0.006,0.008,0.011	47
0.080	0.081,0.082,0.076	0.008	0.006,0.008,0.011	29
0.076	0.081,0.080,0.066	0.008	0.006,0.008,0.011	44
0.088	0.088,0.083,0.093	0.008	0.006,0.008,0.011	25
0.085	0.081,0.088,0.087	0.008	0.006,0.008,0.011	38
0.079	0.078,0.075,0.084	0.008	0.006,0.008,0.011	11
0.089	0.091,0.082,0.095	0.008	0.006,0.008,0.011	56
0.094	0.098,0.104,0.080	0.008	0.006,0.008,0.011	39
0.085	0.085,0.087,0.083	0.008	0.006,0.008,0.011	63
0.086	0.084,0.084,0.091	0.008	0.006,0.008,0.011	60
0.089	0.090,0.084,0.094	0.008	0.006,0.008,0.011	61
0.097	0.095,0.099,0.098	0.008	0.006,0.008,0.011	42
0.076	0.070,0.079,0.080	0.008	0.006,0.008,0.011	6
0.117	0.122,0.115,0.116	0.008	0.006,0.008,0.011	67
0.093	0.090,0.096,0.097	0.008	0.006,0.008,0.011	57
0.088	0.084,0.084,0.096	0.008	0.006,0.008,0.011	64
0.085	0.087,0.080,0.089	0.008	0.006,0.008,0.011	66
0.087	0.092,0.087,0.084	0.008	0.006,0.008,0.011	62
0.080	0.082,0.075,0.083	0.008	0.006,0.008,0.011	19
0.075	0.070,0.085,0.072	0.008	0.006,0.008,0.011	35
0.088	0.086,0.100,0.079	0.008	0.006,0.008,0.011	9

الملاحق

0.088	0.084,0.092,0.088	0.008	0.006,0.008,0.011	59
0.083	0.084,0.091,0.073	0.008	0.006,0.008,0.011	58
0.102	0.112,0.085,0.109	0.008	0.006,0.008,0.011	43
0.085	0.089,0.083,0.083	0.008	0.006,0.008,0.011	24
0.098	0.089,0.105,0.101	0.008	0.006,0.008,0.011	40

5- نسبة تثبيط تكوين الغشاء الحيوي باستعمال المادة النانوية المخلفة حيويًا لجراثيم الزائفة

الزنجارية

نسبة التثبيط (500)	نتائج التثبيط للعزلة (500)	نسبة التثبيط (100)	نتائج التثبيط للعزلة (100)	معدل نتائج العزلة	معدل معامل السيطرة السالبة	رقم العزلة
42.5	0.108	43	0.107	0.188	0.054	2
26.2	0.087	25.4	0.088	0.118	0.054	1
58.1	0.075	51.9	0.086	0.179	0.054	14
4.6	0.082	9.3	0.078	0.086	0.054	34
20.5	0.085	17.7	0.088	0.107	0.054	47
10.1	0.080	10.1	0.080	0.089	0.054	29
5	0.076	0	0.080	0.080	0.054	44
20.7	0.088	23.4	0.085	0.111	0.054	25
49.7	0.085	51.4	0.082	0.169	0.054	38
42.3	0.079	42.3	0.079	0.137	0.054	11
58.9	0.089	55.2	0.097	0.217	0.054	56
77.7	0.094	78.9	0.089	0.423	0.054	39
38.8	0.085	37.4	0.087	0.139	0.054	63
10.4	0.086	11.4	0.085	0.096	0.054	60
15.2	0.089	15.2	0.089	0.105	0.054	61
12.6	0.097	15.3	0.094	0.111	0.054	42
0	0.076	0	0.079	0.074	0.054	6
22.5	0.117	25.1	0.113	0.151	0.054	67
0	0.093	0	0.093	0.093	0.054	57
16.1	0.088	16.1	0.088	0.105	0.054	64
37	0.085	35.5	0.087	0.135	0.054	66
19.4	0.087	15.7	0.091	0.108	0.054	62
0	0.080	0	0.082	0.070	0.054	19
0	0.075	0	0.074	0.064	0.054	35
5.3	0.088	6.4	0.087	0.093	0.054	9
50	0.088	49.4	0.089	0.176	0.054	59
17.8	0.083	11.8	0.089	0.101	0.054	58
58.7	0.102	64.2	0.098	0.274	0.054	43
0	0.085	0	0.090	0.082	0.054	24
56.2	0.098	54.9	0.101	0.224	0.054	40

Summary

The study included the collection of 104 samples from several clinical sources of different ages for the period between 9/12/2018 to 3/3/2019 and from Medical City Hospitals in Baghdad (Baghdad Teaching Hospital, Ghazi Al Hariri Hospital, Burns Hospital, Educational laboratories).

After microscopic and biochemical tests, 58 isolates were obtained from *Pseudomonas aeruginosa*.

Vitek compact system 2 was used to determine the minimum inhibitory concentrations of thirteen antibiotics for 30 isolates, where the isolates were highly resistant to Colistin and Tobramycin at 53.3%, 16 isolate Colistin and 56.7% with 17 isolate to Tobramycin.

Then, the ability of *Pseudomonas aeruginosa* bacteria to develop virulence factors was detected. 18 out of thirty isolates were composed of the pyocyanin pigment. While all the isolates under investigation had the ability to produce hemolysin type Beta. When examining the ability of bacteria to produce protease enzyme, it was observed that 25 out of thirty isolates possessed the ability to form protease enzyme at a rate of diameters ranging from 12-20 mm.

When isolating the ability of bacteria to produce iron carriers, all isolates were produced for iron carriers. In the study of the ability of bacteria to form a biofilm, two methods were used to detect the first using Congo red agar method the purpose of this test was to study the ability of bacteria to form adhesion cells. All the isolates were made up of this layer, but in different proportions, it was found that 53% of the bacteria were highly formed according to the possession of a dark black color after growth and 47% were medium composition.

The second method was done using micro titer plate. The results showed that all the isolates under study had the ability to form the biofilm to

varying degrees compared to negative control where 14 samples were poorly formed, 12 were medium formation and four were highly formed.

The most antibiotic-resistant isolation was then selected for use in the biosynthesis of zinc oxide nanoparticles. Zinc sulfide was used as an additive analytical reagent for bacterial filtrate, as a zinc sulfide reduction process was used to form nanoscale zinc oxide. The appearance of a white precipitate at the bottom of the test flask is evidence of this transformation.

The properties of the resulting nanomaterials were studied using diagnostic devices such as UV spectroscopy, atomic force microscope, X-ray diffraction, infrared spectroscopy, scanning electron microscopy and zeta potential. The results of these devices indicate the formation of zinc oxide particles in pure and different forms and sizes ranging from 20 to 100 nanometers.

The efficacy of the synthetic nanoparticles against *Pseudomonas aeruginosa* was tested as three different concentrations (10, 100, 500) mg / ml were adopted, and concentrations of 100 and 500 mg / ml showed efficacy in inhibiting bacterial growth while 10 mg / ml was not given any effectiveness.

The ability of synthetic nanoparticles to inhibit some virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* bacteria was studied. The ability of zinc oxide nanoparticles to inhibit the production of biofilm was studied.

The ability of synthetic nanoparticles with a concentration of (100, 500 mg / ml) to inhibit some of the virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* was studied, as the ability of zinc nanoparticles to inhibit biofilm production was shown. The results showed that the rate of inhibition in the concentration of 500 mg / ml was the largest by 83.8%, while inhibition rate was at a concentration of 100 mg / ml (80%).

As for the ability of these particles to inhibit the production of hemolysin as it was observed in the concentration of 500 mg / ml that all isolates lost their ability to produce hemolysin beta type while the concentration of 100 mg / ml the isolates remained able to form hemolysin beta type.

The effect of zinc oxide nanoparticles on the production of pyocyanin dye it was observed in the concentration of 500 mg / ml all isolates lost their ability to produce the dye, while the concentration of 100 mg / ml only two samples were able to lose the dye.

An experiment was conducted to detect the effect of zinc oxide nanoparticles on the production of protease enzyme the effect of nanoparticles of zinc oxide on the production of protease was observed, at a concentration of 500 mg / ml, the percentage of protease production decreased, while it was not affected by the concentration of 100 mg / ml.

Finally, an experiment was conducted to detect the effect of zinc nanoparticle particles on the production of iron carriers, as it was observed in both concentrators that all isolates used in the experiment had weakened their production of iron carriers.

Ministry of Higher Education and Scientific Research
University of Baghdad
College of Education for Pure Science
(Ibn Al-Haitham)
Department of Biology



Biosynthesis of Zinc Oxide Nanoparticles by *Pseudomonas aeruginosa* Locally Isolated

A thesis

Submitted to the Council of the College of Education for Pure Sciences / Ibn Al-Haitham of the University of Baghdad in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master In

Biology / Microbiology

By

Thooalnoon Younes Saleh Al-Janabi

B.Sc., University of Baghdad, 2010

*Supervised By
Assistant Professor*

Dr. Esam J. Al-Kalifawi

1441 A.H.

2019 A.D.