



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة كربلاء

كلية العلوم / قسم علوم الحياة

تحضير مركبين نانويين هجينين من الكلور هكسدين وحامض التانيك

وتحديد فعلهما المضاد للأحياء المجهرية المعزولة من مرضى

الحروق في محافظة كربلاء المقدسة

رسالة مقدمة

الى مجلس كلية العلوم - جامعة كربلاء

وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير علوم في علوم الحياة

من قبل

نورس مجيد حميد الخفاجي

بكالوريوس علوم حياة - الجامعة المستنصرية 2001

إشرافه

□ أ.م.د. علي عبد الكاظم الخانمي

تشرين الأول 2015 م

ذي الحجة 1436 هـ

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

وَإِنزِيلِ الْكِتَابِ  
وَأَنزِيلِ الْكِتَابِ  
وَأَنزِيلِ الْكِتَابِ

هُوَ سَفِينٌ  
هُوَ سَفِينٌ  
هُوَ سَفِينٌ

وَأَنزِيلِ الْكِتَابِ  
وَأَنزِيلِ الْكِتَابِ  
وَأَنزِيلِ الْكِتَابِ

سورة «الإسراء» الآية (82)

## إقرار المشرف

اشهد بأن إعداد هذه الرسالة قد جرى تحت إشرافي في جامعة كربلاء بوصفها جزءاً من متطلبات نيل شهادة ماجستير علوم في علوم الحياة .

التوقيع:

الاسم: د . علي عبد الكاظم الغانمي

المرتبة العلمية : استاذ مساعد

التاريخ : 2015 / 9 / 30

## توصية رئيس قسم علوم الحياة

بناءً على التوصيات أعلاه , أحيل هذه الدراسة الى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها.

التوقيع :

الاسم: د . نكري عدنان جواد

المرتبة العلمية : استاذ مساعد

العنوان : رئيس قسم علوم الحياة

التاريخ : 2015 / 9 / 30

## إقرار المقوم اللغوي

أشهد أنني قومت رسالة الماجستير الموسومة بـ( تحضير مركبين نانويين هجينين من الكلور هكسدين وحامض التانيك وتحديد فعلهما المضاد للأحياء المجهرية المعزولة من مرضى الحروق في محافظة كربلاء المقدسة) بوصفها جزءاً من متطلبات نيل درجة ماجستير علوم في علوم الحياة إذ تمت مراجعتها من الناحية اللغوية وتصحيح ما ورد فيها من أخطاء لغوية وتعبيرية وبذلك أصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة بقدر تعلق الأمر بسلامة الأسلوب وصحة التعبير .

التوقيع :

الاسم : علي ذياب محي

المرتبة العلمية : مدرس

التاريخ : / /



الهي لا يطيب الليل الا بمناجاتك ولا يطيب النهار الا بطاعتك .....

ولا تطيب الدنيا الا بذكرك ولا تطيب الآخرة الا بعفوك .....

الله

الى خير مولود.. وأحسن موجود.. والحوض المورود....

والذي كشفه همّ بالسجود... والشفيع في اليوم المشهود...

سيدنا محمد صلى الله عليه واله وسلم

الى من علمني النجاح والصبر .. الى من افتقده في مواجهة الصعاب....

إلى من فاضت روحه إلى بارئها تحته وطأة الآلام وشدتها ...

الى والدي وفاء وحنينا

الى رمز الحب ولبس الشفاء... الى القلب الناصع بالبياض .....

الى ينبوع العطاء ..الى من رفعت كفيها بالدعاء.....

امي الغالية

الى من هو اقرب الي من روجي ...الى سندي وملاذي.....

الى من اخذ بيدي ورسم الأمل في كل خطوة مشيتها....

زوجي الغالي

الى من يسعد قلبي بلقياهم .. الى سعادتني واملتي .....

الى ازهار حياتي التي تفيض حبا ونقاء وعطرا .....

اطفالي

الى ينابيع الوفاء ... الى من رافقوني في السراء والضراء

الى من عرفته معهم معنى الحياة .. الى اصدق الاصحاب ...

أخي وأختي



أهدي هذا الجهد المتواضع



نورس



## شكر وتقدير

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ والصلاة والسلام على النبي محمد وآل بيته الطيبين الطاهرين ....

الحمد لله الذي جعل الحمد مفتاحاً لذكره وخلق الأشياء ناطقةً بحمده وشكره , والصلاة والسلام على نبيه مُحَمَّدٍ الْمُشْتَقِّ  
اسمُهُ من اسمه المحمود , وعلى آله الطاهرين أولي المكارم والجلود , الحمد لله على ما عمرني به من سدادٍ وتوفيق و ما  
منحني به من صبرٍ وثبات حتى تم انجاز هذه الرسالة .

لايسعني الا ان أتقدم بوافر الشكر والتقدير الى أستاذي الفاضل الدكتور علي عبد الكاظم الغانمي لإقتراحه موضوع  
الرسالة والذي أحاطني بحسن رعايته وعمرني بسديد توجيهاته وأغدق علي من فيض عطائه العلمي والذي اثمر في خروج  
هذا البحث الى النور .

كما اتوجه بخالص التقدير والاحترام الى عمادة كلية العلوم و رئاسة قسم علوم الحياة لإتاحة الفرصة لي لإكمال دراستي.  
وهنا أخص بالذكر الدكتور نايج هاشم كاظم و الدكتورة ذكري عدنان جواد والدكتورة وفاء صادق محسن لتقديمهم الدعم  
المعنوي جزاهم الله على ذلك خير الجزاء...

ولا يفوتني ان أتقدم بخالص امتناني وتقديري لمنتسبي كلية الطب البيطري في جامعتنا واخص بالذكر الدكتورة وفاق  
البازي والزهيلة منى علوان .

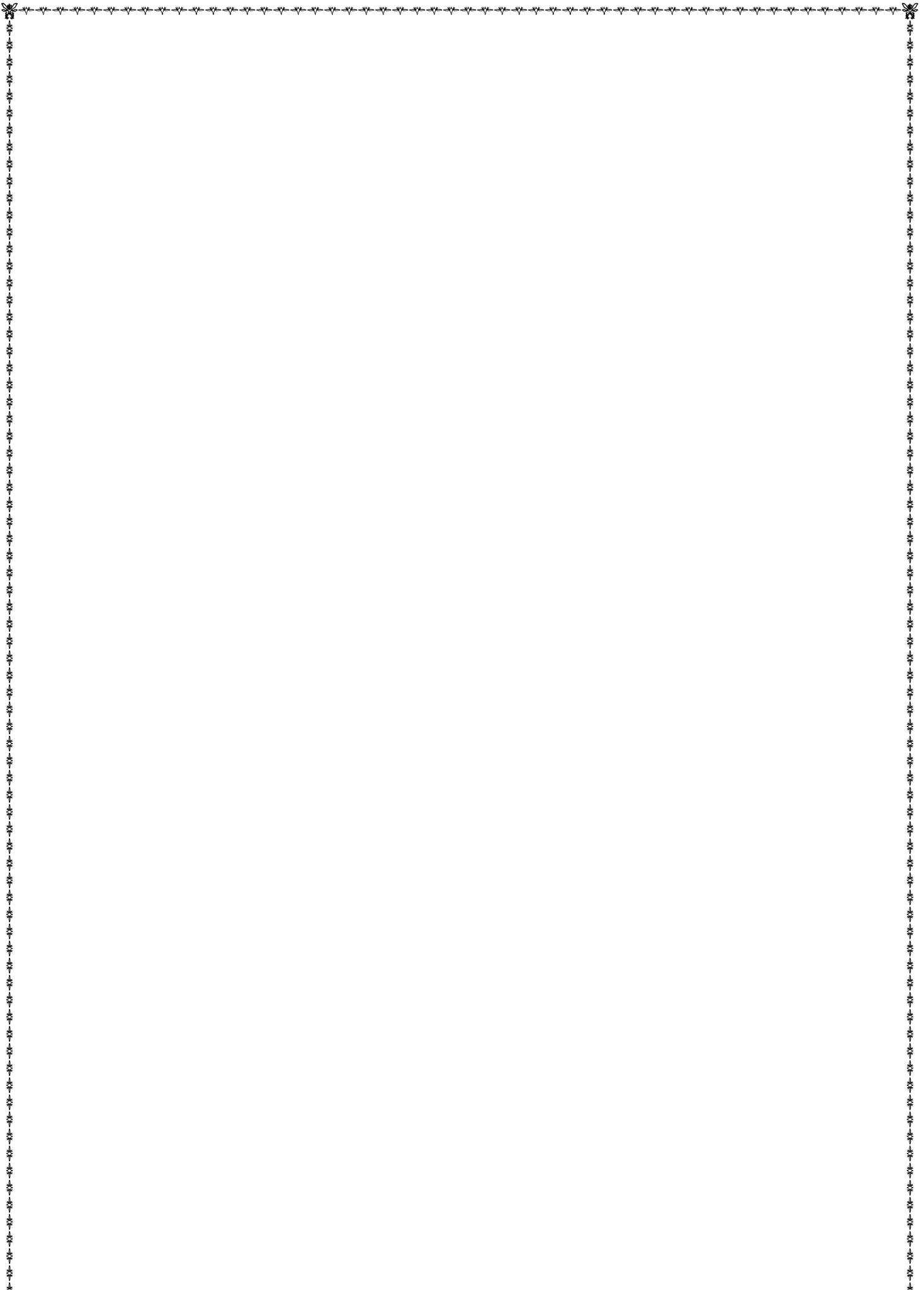
ومن دواعي الوفاء ان اوجه شكري وتقديري الى منتسبي مختبر الصحة العامة ادارة ومنتسبين واخص بالذكر السيدة  
أميرة محمد جبر و الدكتور اسامة صادق جاسم , جعل الله ثمرة ذلك في موازين حسناتهم .....

ولا يفوتني ان أتقدم بخالص امتناني وتقديري للدكتور علاء عبد الحسين الدعيمي والدكتور عباس مطرود باشي /كلية  
العلوم التطبيقية /جامعة كربلاء لتفضلهم بإنجاز التحليل الإحصائي الذي تطلبه البحث فضلا عن تفسير بعض نتائج  
الدراسة. كما يطيب لي ان اتقدم بخالص الشكر والتقدير للدكتور زيد حسن والدكتورة لمى مجيد والسيد نصير كاظم /كلية  
العلوم /قسم الكيمياء .

كما يطيب لي ان اتقدم بجزيل شكري وامتناني الى زميلتي العزيزة ميساء صالح والى الأخوين عباس ديوان وحسنين محمد  
جواد لما قدموا من المساعدة خلال فترة البحث.

كما يطيب لي ان اتقدم بوافر الحب والتقدير الى كل من قدم لي يد المساعدة او النصيحة او حثني على المشاركة  
والاصرار وانار لي طريق البحث العلمي مما لا يتسع المجال لذكرهم فلهم مني تحية اخلاص و وفاء . ختاماً ، أمتناني وعميق  
عرفاني لعائلتي التي ساندتني و وقفت الى جانبي وتحملت معي الكثير .

الباحثة



الخلاصة

Summary

## الخلاصة

تضمنت هذه الدراسة عزل وتشخيص أهم أنواع البكتيريا المسببة لأحماج الحروق كما تضمنت أيضاً تحضير وتشخيص مركبين نانويين هجينين أحدهما من المطهر كلورهكسدين والآخر من حامض التانيك. تم تقييم الفعالية التثبيطية للمطهر النانوي المحضر أعلاه ضد البكتيريا المعزولة في هذه الدراسة كما تم تحديد الفعالية المضادة للأوكسدة لحامض التانيك النانوي الهجين وقد اظهرت النتائج ما يأتي :-

1- من مجموع 32 مُسحة مأخوذة من مرضى الحروق الراقدين في ردهة الحروق في مدينة الأمام الحسين عليه السلام الطبية في محافظة كربلاء المقدسة، تم الحصول على 22 عزلة بكتيرية منها 8 عزلات ( 34.78 ) % من جنس *Pseudomonas* كانت 7 منها *Pseudomonas aeruginosa* وواحدة *P. oryzihabitans* و 4 عزلات (17.39) % *Klebsiella pneumoniae* و 4 عزلات (17.39) % *Acinetobacter baumannii* وعزلة واحدة ( 4.34 ) % من كل من بكتيريا *Proteus mirabilis* و *Escherichia coli* و *Serratia liquefaciens* و *Chryzeobacterium meningosepticum* وعزلتين ( 8.69 ) % من بكتيريا *Staphylococcus aureus* فضلاً عن عزلة واحدة ( 4.34 ) % من خميرة *Candida guilliermondii* .

2- أُستخدم المطهر كلورهكسدين وحامض التانيك في تحضير مركبين نانويين هجينين بعد تحميل كل منهما على طبقات ثنائية الهيدروكسيد Mg/Al layered double hydroxide (Mg/Al-LDH)، وقد اوضحت نتائج الفحص بمطيافية الأشعة تحت الحمراء FTIR عن ظهور مجاميع كيميائية معينة واختفاء مجاميع أخرى كما اوضحت مطيافية الأشعة السينية (XRD) عن ظهور مستويات حيود جديدة في طيف كل من المطهر النانوي الهجين Mg/Al-CHX-LDH و طيف حامض التانيك النانوي الهجين Mg/Al-TA-LDH مقارنة بطيف الحامل Mg/Al-LDH، مما يشير الى ان المركبين المحضرين قيد الدراسة

مركبان نانويان . وأظهرت نتائج الفحص بالمجهر الإلكتروني الماسح (SEM) عن تغير شكل السطح لكل من المركبين النانويين المحضرين أعلاه مقارنة بالطبقة ثنائية الهيدروكسيد، واتضح من نتائج الفحص بمجهر القوة الذرية (AFM) أن أبعاد أقطار جزيئات المطهر النانوي الهجين وحامض التانيك النانوي الهجين بلغت ( 121.66 و 77.70 ) نانوميتر ، على التوالي .

3- دُرست الفعالية التثبيطية للمطهر النانوي الهجين Mg/Al-CHX-LDH والمطهر الحر ( Free CHX ) وقد أوضحت نتائج هذه الدراسة ما يأتي :-

a. أملاك المطهر النانوي الهجين أعلى فعالية تثبيطية ضد عزلي البكتريا (11 و A - 24) *P. aeruginosa* بقطر تثبيط مقداره 24 ملم لكل منهما بينما كان قطر تثبيط المطهر الحر 23.5 ملم ضد العزلة C - 4 *P. aeruginosa* .

b. أظهر المطهر النانوي الهجين أعلى فعالية تثبيطية ضد العزلتين (A-16 و A-31) *A. baumannii* بقطر تثبيط مقداره 18 ملم لكل منهما في حين كانت أعلى فعالية تثبيطية للمطهر الحر ضد العزلة B - 22 *A. baumannii* بقطر تثبيط مقداره 19.5 ملم .

c. أبدى المطهر النانوي الهجين أعلى فعالية تثبيطية ضد العزلة B - 16 *K. pneumoniae* بقطر تثبيط مقداره 24.5 ملم بينما كانت أعلى فعالية تثبيطية للمطهر الحر ضد العزلة B - 15 *K. pneumoniae* بقطر تثبيط مقداره 24.5 ملم .

d. كانت أعلى فعالية تثبيطية للمركب النانوي الهجين ضد كل من بكتريا *P. mirabilis* و *E. coli* بقطر تثبيط مقداره 23.5 ملم ، بينما كانت أعلى فعالية تثبيطية للمطهر الحر ضد بكتريا *E. coli* بقطر تثبيط مقداره 24.5 ملم ، في حين كانت بكتريا *C. meningosepticum* الأقل تأثراً من بين الأنواع البكتيرية المعزولة بقطر تثبيط مقداره 8 ملم للمطهر الحر بينما كانت مقاومة للمطهر النانوي الهجين .

e. كانت أقصى فعالية تثبيطية للكلور هكسدين النانوي ضد العزلة 21 *S. aureus* بقطر تثبيط مقداره 28.5 ملم فيما كانت أعلى فعالية تثبيطية للكلور هكسدين الحر ضد العزلة *S. aureus* 22- A بقطر تثبيط مقداره 31.5 ملم .

f. تقاربت الفعالية التثبيطية للمطهر النانوي الهجين والمطهر الحر ضد خميرة *C. guilliermondii* بقطر تثبيط مقداره (28 و 29) ملم ، على التوالي .

4- أثبتت نتائج دراسة الفعالية المضادة للأكسدة ما يأتي :

a. كانت قيمة  $IC_{50}$  (Half maximal inhibitory concentration) بطريقة كسح الجذور الحرة (باستخدام الجذر ABTS) لحامض التانيك الحر عند التركيز 10 مايكرو غرام / مل ، بينما بلغت تلك القيمة عند التركيز 125 مايكرو غرام/ مل لحامض التانيك النانوي الهجين Mg/Al-TA-LDH .

b. بينت نتائج قياس القوة الاختزالية لأيون الحديديك امتلاك حامض التانيك الحر قوة اختزالية أعلى من حامض التانيك النانوي الهجين Mg/Al-TA-LDH .

## قائمة المحتويات

الصفحة	المحتويات	التسلسل
1	المقدمة	
4	استعراض المراجع	-1
4	المطهرات (Antiseptics and Disinfectants)	1-1
5	الكلور هكسدين (Chlorhexidine)	1-1-1
7	أستخدامات الكلور هكسدين	2-1-1
8	التانينات (Tannins)	2-1
9	حامض التانيك (Tannic acid)	1-2-1
11	أستخدامات حامض التانيك	1-1-2-1
11	A. المجال الصناعي	
11	B. المجال الطبي	
11	الحروق ( Burns )	3 -1
12	خمج الحروق ( Burns infection )	1-3-1
13	التهاب الحروق ( Burns inflammation )	2-3-1
13	الأحياء المجهرية المسببة لخمج الحروق	4-1
15	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1-4-1
16	<i>Acinetobacter baumannii</i>	2-4-1
17	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3-4-1
19	<i>Proteus mirabilis</i>	4-4-1
20	<i>Escherichia coli</i>	5-4-1
20	<i>Staphylococcus aureus</i>	6-4-1
22	العلاج الموضعي للحروق ( Topical treatment for burns )	5-1
23	التقنية النانوية ( Nanotechnology )	6-2
23	التقنية النانوية في المجال الطبي	1-6-1

24	الدقائق النانوية ( Nanoparticles )	2-6-1
26	الحوامل النانوية	3-6-1
26	الطبقات ثنائية الهيدروكسيد ( Layered Double Hydroxide , LDH )	1-3-6-1
29	<b>المواد وطرائق العمل</b>	-2
29	المواد والاجهزة المستخدمة	1-2
29	الاجهزة المستخدمة والشركات المصنعة لها	1-1-2
30	المواد الكيميائية والاسواط الزرعية المستخدمة والشركات المصنعة لها	2-1-2
32	<b>طرائق العمل</b>	2-2
32	جمع عينات الحروق	1-2-2
33	الاسواط الزرعية المستخدمة في عزل وتشخيص البكتريا المسببة لخمج الحروق	2-2-2
35	الكواشف والمحاليل المستخدمة في عزل وتشخيص البكتريا المسببة لخمج الحروق	3-2-2
38	عزل وتشخيص البكتريا المسببة لخمج الحروق	4-2-2
38	تمييز البكتريا الموجبة عن السالبة لصبغة كرام	1-4-2-2
38	عزل وتشخيص بكتريا <i>Pseudomonas</i>	2-4-2-2
38	الفحوصات المجهرية (Microscopic tests)	1-2-4-2-2
38	الفحوصات الكيموحيوية ( Biochemical tests )	2-2-4-2-2
42	عزل وتشخيص بكتريا <i>Acinetobacter</i>	3-4-2-2
42	عزل وتشخيص بكتريا <i>Klebsiella</i>	4-4-2-2
43	عزل وتشخيص بكتريا <i>Proteus</i>	5-4-2-2
43	عزل وتشخيص بكتريا <i>Escherichia coli</i>	6-4-2-2
43	عزل وتشخيص بكتريا <i>Serratia</i>	7-4-2-2
43	عزل وتشخيص بكتريا <i>Chryseobactirum</i>	8-4-2-2
43	عزل وتشخيص بكتريا <i>Staphylococcus</i>	9-4-2-2
44	الفحوصات المجهرية (Microscopic tests)	1-9-4-2-2
44	الفحوصات الكيموحيوية ( Biochemical tests )	2-9-4-2-2
44	عزل وتشخيص خميرة <i>Candida</i>	5-2-2

45	اختبار حساسية البكتريا المعزولة للمضادات الحيوية	6-2-2
46	حفظ وإدامة العزلات	7-2-2
46	تحضير المركبات النانوية الهجينة المستخدمة في هذه الدراسة	8-2-2
46	تحضير المضيف او الحامل (Host or Carrier)	1-8-2-2
48	تحضير محلول الكلور هكسدين	2-8-2-2
48	تحضير حامض التانيك النانوي (Tannic acid)	3-8-2-2
50	تشخيص المركبات النانوية الهجينة	9-2-2
50	التشخيص باستخدام طيف الاشعة تحت الحمراء FT-IR	1-9-2-2
50	التشخيص باستخدام طيف حيود الاشعة السينية XRD	2-9-2-2
51	التشخيص باستخدام مجهر القوة الذرية AFM	3-9-2-2
51	التشخيص باستخدام المجهر الالكتروني الماسح SEM	4-9-2-2
51	التحليل الدقيق لعناصر C, H, N للمادة المطهرة كلور هكسدين	10-2-2
51	تقدير كمية حامض التانيك	11-2-2
53	دراسة تحرر المركبين النانويين Mg-Al-CHX-LDH و Mg-Al-TA-LDH	12-2-2
54	تعيين منحنى المعايرة (Calibration curve) للكلور هكسدين	1-12-2-2
54	تعيين منحنى المعايرة (Calibration curve) لحامض التانيك	2-12-2-2
56	طريقة تحرر المركبين النانويين الكلور هكسدين وحامض التانيك الى المحلول المنظم	3-12-2-2
56	دراسة النسب المئوية لتحرر المركبين النانويين الكلور هكسدين وحامض التانيك من بين طبقات المركبين النانويين الهجينين	4-12-2-2
57	الفعالية التثبيطية للمادة المطهرة Chlorhexidine ضد الأنواع المعزولة في هذه الدراسة	13-2-2
59	تقدير الفعالية المضادة للأكسدة لمركب حامض التانيك النانوي	14-2-2
59	تقدير الفعالية المضادة للأكسدة بطريقة كسح الجذور الحرة (Free radicals scavenging)	1-14-2-2
61	تقدير الفعالية المضادة للأكسدة بقياس القوة الاختزالية المضادة للأكسدة لأيون الحديد Ferric Reducing Antioxidant power (FRAP)	2-14-2-2
63	التحليل الاحصائي (Statistical analysis)	15-2-2

64	النتائج والمناقشة	-3
64	عزل وتشخيص البكتريا المسببة لالتهاب الحروق	1-3
66	تشخيص البكتريا المسببة لخمج الحروق	2-3
66	تشخيص بكتريا <i>Pseudomonas</i> spp.	1-2-3
66	الصفات الزرعية والمجهريّة (Cultural and microscopical characteristics)	1-1-2-3
68	الفحوصات الكيموحيوية (Biochemical tests)	2-1-2-3
68	تشخيص بكتريا <i>Pseudomonas</i> spp. باستخدام عدة التشخيص Api 20 E	3-1-2-3
70	تشخيص بكتريا <i>A. baumannii</i>	2-2-3
70	الصفات الزرعية والمجهريّة (Cultural and microscopical characteristics)	1-2-2-3
71	الفحوصات الكيموحيوية (Biochemical tests)	2-2-2-3
71	تشخيص بكتريا <i>A. baumannii</i> باستخدام عدة التشخيص Api 20 E	3-2-2-3
71	تشخيص بكتريا <i>K. pneumoniae</i>	3-2-3
71	الصفات الزرعية والمجهريّة (Cultural and microscopical characteristics)	1-3-2-3
73	الفحوصات الكيموحيوية (Biochemical tests)	2-3-2-3
73	تشخيص بكتريا <i>K. pneumoniae</i> باستخدام عدة التشخيص Api 20 E	3-3-2-3
75	تشخيص بكتريا <i>P.mirabilis</i>	4-2-3
75	الصفات الزرعية والمجهريّة (Cultural and microscopical characteristics)	1-4-2-3
76	الفحوصات الكيموحيوية (Biochemical tests)	2-4-2-3
76	تشخيص بكتريا <i>P. mirabilis</i> باستخدام عدة التشخيص Api 20 E	3-4-2-3
76	تشخيص بكتريا <i>E. coli</i>	5-2-3
76	الصفات الزرعية والمجهريّة (Cultural and microscopical characteristics)	1-5-2-3
78	الفحوصات الكيموحيوية (Biochemical tests)	2-5-2-3

78	تشخيص بكتريا <i>E. coli</i> باستخدام عدة التشخيص Api 20 E	3-5-2-3
80	تشخيص بكتريا <i>Serratia liquefaciens</i>	6-2-3
80	الصفات الزرعية والمجهريّة (Cultural and microscopical characteristics)	1-6-2-3
81	الفحوصات الكيموحيوية (Biochemical tests)	2-6-2-3
81	تشخيص بكتريا <i>S. liquefaciens</i> باستخدام عدة التشخيص Api 20 E	3-6-2-3
81	تشخيص بكتريا <i>C. meningosepticum</i>	7-2-3
81	الصفات الزرعية والمجهريّة (Cultural and microscopical characteristics)	1-7-2-3
83	الفحوصات الكيموحيوية (Biochemical tests)	2-7-2-3
83	تشخيص بكتريا <i>C. meningosepticum</i> باستخدام عدة التشخيص Api 20 E	3-7-2-3
85	تشخيص بكتريا المكورات العنقودية <i>Staphylococcus</i>	8-2-3
85	الصفات الزرعية والمجهريّة (Cultural and microscopical characteristics)	1-8-2-3
85	تشخيص بكتريا <i>S. aureus</i>	2-8-2-3
85	A- النمو على وسط Manitol salt agar	
86	B- الفحوصات الكيموحيوية (Biochemical tests)	
87	تشخيص خميرة <i>C. guilliermondii</i>	9-2-3
87	الصفات الزرعية والمجهريّة (Cultural and microscopical characteristics)	1-9-2-3
87	التشخيص باستخدام العدة <i>Api Candida</i>	2-9-2-3
87	اختبار حساسية العزلات المسببة لخمج الحروق للمضادات الحيوية	3-3
87	اختبار حساسية عزلات البكتريا السالبة لصبغة كرام للمضادات الحيوية	1-3-3
92	اختبار حساسية عزلات البكتريا الموجبة لصبغة كرام للمضادات الحيوية	2-3-3
95	تشخيص المركبات النانوية المحضرة بالطرائق الطيفية	4-3
95	طيف الأشعة تحت الحمراء FT-IR	1-4-3
95	طيف الأشعة تحت الحمراء لطبقات المغنيسيوم/الالمنيوم ثنائية الهيدروكسيد	1-1-4-3

95	طيف الأشعة تحت الحمراء للمضاد للكلور هكسدين الحر ( CHX )	2-1-4-3
96	Mg/AL - CHX -LDH طيف الأشعة تحت الحمراء للكلور هكسدين النانوي الهجين	3-1-4-3
97	طيف الأشعة تحت الحمراء لحمض التانيك الحر (TA)	4-1-4-3
97	Mg/AL - TA -LDH طيف الأشعة تحت الحمراء لحمض التانيك النانوي الهجين	5-1-4-3
103	طيف حيود الأشعة السينية (XRD)	2-4-3
105	مجهر القوة الذرية (AFM)	3-4-3
109	المجهر الإلكتروني الماسح (SEM)	4-4-3
111	التحليل الدقيق للعناصر	5-3
111	تقدير حامض التانيك المحمل على طبقات ثنائية الهيدروكسيد	6-3
113	دراسة تحرر المركبات النانوية الهجينة	7-3
113	تحرر الكلور هكسدين من المطهر النانوي الهجين Mg/Al-CHX-LDH	1-7-3
114	تحرر حامض التانيك من الحامض النانوي الهجين Mg/Al-TA-LDH	2-7-3
115	دراسة حركيات التحرر (Release kinetics)	3-7-3
118	الفعالية التثبيطية للمطهر كلور هكسدين (CHX) ضد الأحياء المجهرية المسببة لخمج الحروق	8-3
118	الفعالية التثبيطية للكلور هكسدين ضد بكتريا <i>Pseudomonas spp.</i>	1-8-3
121	الفعالية التثبيطية للكلور هكسدين ضد بكتريا <i>A. baumannii</i>	2-8-3
123	الفعالية التثبيطية للكلور هكسدين ضد بكتريا <i>K. pneumoniae</i>	3-8-3
125	الفعالية التثبيطية للكلور هكسدين ضد بكتريا <i>S. mirabilis</i> و <i>E. coli</i> و <i>C. meningosepticum</i> و <i>liquefaciens</i>	4-8-3
128	الفعالية التثبيطية للكلور هكسدين ضد بكتريا <i>S. aureus</i>	5-8-3
129	الفعالية التثبيطية للكلور هكسدين ضد خميرة <i>C. guilliermondii</i>	6-8-3
130	الفعالية المضادة للأوكسدة لحمض التانيك النانوي الهجين والحر	9-3
130	الفعالية المضادة للأوكسدة بطريقة كسح الجذور الحرة	1-9-3
133	الفعالية المضادة للأوكسدة بطريقة قياس القوة الأختزالية المضادة للأوكسدة لأيون الحديدك ( FRAP )	2-9-3

136	الاستنتاجات والتوصيات	
137	المصادر	

## فائمة الأخطاء

رقم الخطأ	العنوان	الصفحة
1	التركيب الجزيئي للكور هكسدين	6
2	التركيب الجزيئي لحمض التانيك	10
3	أهم أنواع الدقائق النانوية	25
4	المنحنى القياسي لحمض التانيك لتقدير الفيولات الكلية بطريقة Folin-Ciocalteu	53
5	منحنى المعايرة لمحلول المادة المطهرة الكور هكسدين (CHX)	55
6	منحنى المعايرة لمحلول حامض التانيك	55
7	أنواع الأحياء المجهرية المعزولة من مرضى مصابين بالحروق في محافظة كربلاء المقدسة	65
8	طيف الأشعة تحت الحمراء لطبقات المغنيسيوم/الألمنيوم ثنائية الهيدروكسيد	89
9	طيف الأشعة تحت الحمراء لمطهر الكور هكسدين CHX الحر	99
10	طيف الأشعة تحت الحمراء للمطهر الكور هكسدين النانوي الهجين Mg/Al-CHX-LDH	100
11	طيف الأشعة تحت الحمراء لحمض التانيك TA	101
12	طيف الأشعة تحت الحمراء لحمض التانيك النانوي الهجين Mg/Al-TA-LDH	102
13	طيف حيود الأشعة السينية (XRD) لطبقة المغنيسيوم/الألمنيوم ثنائية الهيدروكسيد (Mg/Al-NO <sub>3</sub> -LDH)	104
14	طيف حيود الأشعة السينية (XRD) للكور هكسدين النانوي الهجين Mg/Al-CHX-LDH	104

105	طيف حيود الأشعة السينية (XRD) لحامض التانيك النانوي الهجين Mg/Al-TA-LDH	15
106	صورة ثنائية الأبعاد (a) وثلاثية الأبعاد (b) للمطهر النانوي الهجين Mg/Al-CHX-LDH	16
108	صورة ثنائية الأبعاد (a) وثلاثية الأبعاد (b) لحامض التانيك النانوي الهجين Mg/Al-TA-LDH	17
110	صورة بالمجهر الإلكتروني الماسح (SEM) لطبقات المغنيسيوم/الالمنيوم ثنائية الهيدروكسيد (Mg/Al-NO <sub>3</sub> -LDH)	18
110	صورة بالمجهر الإلكتروني الماسح للمطهر النانوي الهجين Mg/Al-CHX-LDH	19
111	صورة بالمجهر الإلكتروني الماسح للحامض النانوي الهجين Mg/Al-TA-LDH	20
112	المنحنى القياسي لتقدير حامض التانيك الحر بطريقة Folin-Ciocalteu	21
112	المنحنى القياسي لتقدير الحامض النانوي الهجين Mg/Al-TA-LDH بطريقة Folin-Ciocalteu	22
113	النسبة المئوية لتحرر المطهر كلور هكسدين من المطهر النانوي الهجين Mg/Al-CHX-LDH الى محلول منظم الفوسفات (برقم هيدروجيني 7.4) بطريقة التبادل الأيوني المباشر	23
115	لنسبة المئوية لتحرر حامض التانيك من الحامض النانوي الهجين Mg/Al-TA-LDH الى محلول منظم الفوسفات (برقم هيدروجيني 7.4) بطريقة التبادل الأيوني المباشر	24
116	موديل الرتبة الأولى و الثانية للكلور هكسدين الى محلول منظم الفوسفات (pH 7.4)	25
117	موديل الرتبة الأولى و الثانية لتحرر حامض التانيك الى محلول منظم الفوسفات (pH 7.4)	26
131	الفعالية المضادة للأوكسدة للمضاد القياسي Trolox	27
132	الفعالية المضادة للأوكسدة لحامض التانيك الحر بطريق كسح الجذور الحرة	28
132	الفعالية المضادة للأوكسدة لحامض التانيك النانوي الهجين بطريق كسح الجذور الحرة	29

134	المنحنى القياسي لكبريتات الحديدوز بطريقة FRAP	30
135	الفعالية المضادة للأوكسدة لحمض التانيك الحر بطريقة FRAP	31
135	الفعالية المضادة للأوكسدة لحمض التانيك النانوي الهجين بطريقة FRAP	32

## قائمة الجداول

8	بعض إستخدامات الكلور هكسدين الطبية	1
67	الاختبارات الشكلية والكيموحيوية لبكتريا <i>Pseudomonas spp.</i>	2
69	اختبارات العدة التشخيصية Api-20 E. لتشخيص بكتريا <i>Pseudomonas spp.</i>	3
70	الاختبارات الشكلية والكيموحيوية لبكتريا <i>A. baumannii</i>	4
72	اختبارات العدة التشخيصية Api-20 E. لتشخيص بكتريا <i>A. baumannii</i>	5
73	الاختبارات الشكلية والكيموحيوية لبكتريا <i>K. pneumoniae</i>	6
74	اختبارات العدة التشخيصية Api-20 E. لتشخيص بكتريا <i>K. pneumoniae</i>	7
75	الاختبارات الشكلية والكيموحيوية لبكتريا <i>P. mirabilis</i>	8
77	اختبارات العدة التشخيصية Api-20 E. لتشخيص بكتريا <i>P. mirabilis</i>	9
78	الاختبارات الشكلية والكيموحيوية لبكتريا <i>E. coli</i>	10
79	اختبارات العدة التشخيصية Api-20 E. لتشخيص بكتريا <i>E. coli</i>	11
80	الاختبارات الشكلية والكيموحيوية لبكتريا <i>S. liquefaciens</i>	12

82	اختبارات العدة التشخيصية Api-20 E. لتشخيص بكتريا <i>S. liquefaciens</i>	13
83	الاختبارات الشكلية والكيموحيوية لبكتريا <i>C. meningosepticum</i>	14
84	اختبارات العدة التشخيصية Api-20 E. لتشخيص بكتريا <i>C. meningosepticum</i>	15
86	الاختبارات الشكلية والكيموحيوية لبكتريا <i>S. aureus</i>	16
89	اختبار حساسية عزلات بكتريا <i>Pseudomonas spp.</i> تجاه مضادات الحيوية	17
91	اختبار حساسية عزلات بكتريا <i>K. pneumoniae</i> و <i>A. baumannii</i> تجاه مضادات الحيوية	18
93	اختبار حساسية عزلات بكتريا <i>P. mirabilis</i> و <i>E. coli</i> و <i>S. liquefaciens</i> و <i>C. meningosepticum</i> تجاه المضادات الحيوية	19
94	اختبار حساسية عزلات بكتريا <i>S. aureus</i> تجاه المضادات الحيوية	20
106	اقطار وحجوم وتجمعات جزيئات المركب النانوي Mg/Al-CHX-LDH بعد فحصه بمجهر القوة الذرية	21
108	اقطار وحجوم وتجمعات جزيئات المركب النانوي Mg/Al-TA-LDH بعد فحصه بمجهر القوة الذرية	22
120	الفعالية التثبيطية للمركب النانوي CHX-LDH و المركب الحر CHX ضد البكتريا <i>Pseudomonas spp.</i>	23
122	الفعالية التثبيطية للمركب النانوي CHX-LDH و المركب الحر CHX ضد بكتريا <i>A. baumannii</i>	24
124	الفعالية التثبيطية للمركب النانوي CHX-LDH و المركب الحر CHX ضد البكتريا <i>K. pneumoniae</i>	25
126	الفعالية التثبيطية للمركب النانوي CHX-LDH و المركب الحر CHX ضد بكتريا <i>P. mirabilis</i>	26
126	الفعالية التثبيطية للمركب النانوي CHX-LDH و المركب الحر CHX ضد بكتريا <i>E. coli</i>	27

127	الفعالية التثبيطية للمركب النانوي CHX-LDH و المركب الحر CHX ضد بكتريا <i>S.liquefaciens</i>	28
127	الفعالية التثبيطية للمركب النانوي CHX-LDH و المركب الحر CHX ضد بكتريا <i>C. meningosepticum</i>	29
129	الفعالية التثبيطية للمركب النانوي CHX-LDH و المركب الحر CHX ضد البكتريا <i>S. aerus</i>	30
130	الفعالية التثبيطية للمركب النانوي CHX-LDH و المركب الحر CHX ضد الخميرة <i>C. guilliermondii</i>	31

### قائمة المخططات

الصفحة	العنوان	رقم المخطط
28	المجالات المختلفة لتطبيقات المواد ثنائية طبقات الهيدروكسيد LDH	1
38	عزل وتشخيص الاحياء المجهرية المسببة لخمج الحروق	2
49	تحضير المركبين النانويين الهجينين Mg/Al-TA -LDH و Mg/Al-CHX-LDH بطريقة التبادل الايوني المباشر	3

## فائمة المحتويات

ABTS	(2,2'-azinobis-3 ethylbenzothiazoline 6-sulfonic acid)
AFM	Atomic Force Microscope
APi	Analytical profile index
CHX	Chlorhexidine
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EPA	Environmental Protection Agency
ESBL	Extended – spectrum $\beta$ – lactamase
FRAP	Ferric reducing antioxidant potential
FT-IR	Fourier transform infrared spectroscopy
IC <sub>50</sub>	Half maximal inhibitory concentration
KIA	Kligler Iron Agar
L.S.D	Least significant difference
LDH	Layered double hydroxide
MDR	Multidrug- resistant
Mg/Al- CHX -LDH	Mg/Al- Chlorhexidine -Layered double hydroxide
Mg/Al- TA-LDH	Mg/Al- Tannic Acid -Layered double hydroxide
MRSA	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
PVL	Panton – Valentine Leulocidin
SEM	Scanning Election Microscope
SFD	Staphylococcal Food Borne Disease

TA	Tannic acid
UTI	Urinary tract infection
XRD	X-ray diffraction

المقدمة

*Introduction*

## المقدمة

تمثل أخماج الحروق (Burns infections) الخطر الرئيس الذي يهدد حياة مرضى الحروق ، إذ تشير الإحصائيات العالمية المتوفرة إلى أن هذه الأخماج تتسبب بما يقارب من 75 % من إجمالي الوفيات في ضحايا الحروق ( Al – Ibran *et al.*, 2013 ).

تعد الأحياء المجهرية وفي مقدمتها البكتريا المسبب الرئيس لهذه الأخماج، إذ تؤدي الحروق الى تدمير الجلد الذي يمثل الخط الدفاعي الأول ضد هذا النوع من الأحياء كما أنها توفر مواقع مناسبة لتضاعف البكتريا، فضلاً عن أن تحطم الأوعية في الأنسجة المحروقة يجعل الأحياء المجهرية في منأى عن آليات المضيف الدفاعية والمضادات الحياتية الجهازية ( Order *et al.*, 1965 ; Agnihotri *et al.*, 2004 ).

تميزت بعض أنواع البكتريا بكونها مسببات شائعة لأخماج الحروق عبر أملاكها لعوامل ضراوة مختلفة أولاً: فضلاً عن تطور مقاومتها لعدد كبير من المضادات الحياتية ثانياً، تشتمل هذه الأنواع بالدرجة الرئيسة على بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* و *Acinetobacter baumannii* و *Klebsiella pneumonia* و *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* و *Enterobacter* و *Proteus ssp.* ( Ekrami and Kalantar , 2007 ) .

استخدمت المطهرات Antiseptics and Disinfectants في علاج أخماج الحروق عبر دورها في تثبيط نمو الأحياء المجهرية سواء تلك الموجودة على الأنسجة الحية أو الموجودة على المواد غير الحية . ويعد الكلور هكسدين ( Chlorhexidine ) من أهم المطهرات الموضعية ( Topical Antiseptics ) ، إذ أوضحت الدراسات السابقة أن استخدامه حتى بالتراكيز المنخفضة يؤدي وبشكل ملحوظ إلى اختزال المجاميع البكتيرية في الجروح الملوثة ( Waldron and Trevor , 1993 ; Mims *et al.*, 2004 ) .

ومن جانب آخر، فقد أتجهت بعض الدراسات الى عمل مستحضرات من بعض أنواع التانينات وخصوصاً حامض التانيك ( Tannic acid ) عبر ربطه بمواد بايولوجية

أخرى لاستخدامه في علاج الجروح بالنظر للمميزات العديدة التي يمتلكها هذا الحامض وأهمها خصائصه المضادة للأكسدة ( Antioxidant activity ) ( Aelenei *et al.*, ) ( 2009 ) .

اكتسبت التقنية النانوية (Nanotechnology) أهمية بالغة في الطب وتطورت تطبيقاتها وتسارعت بشكل ملفت للنظر في غضون عقود قليلة من الزمن. ويهدف الطب النانوي (Nanomedicine) إلى تسخير التقنية النانوية بما يصب في تحسين صحة الإنسان وتحقيق رفاهيته، إذ أن الدقائق النانوية (Nanoparticles) التي تتراوح أبعادها بين (1-100) نانوميتر قد تم تصميمها لتكون مهيئة للاستخدام لأغراض التشخيص (Diagnosis) والعلاج (Therapeutics) وكأدوات طبية حيوية (Biomedicl tools) في المجال البحثي ( Surendiran *et al.*, 2009 ). فضلاً عما سبق فقد أتجهت التقنية النانوية في السنوات الأخيرة نحو إيجاد الحلول الكفيلة بتوصيل المركب العلاجي (Delivering therapeutic compound) الى موقع الهدف بشكل كفوء لذا فقد تم تحميل الأدوية (Drugs) على حوامل نانوية (Nanocarriers) ، إذ تتصف الأخيرة بسهولة أستقبالها من قبل الخلايا مقارنة بالجزيئات الأكبر منها لذا فقد تم إستخدام تلك الحوامل بنجاح كأدوات توصيل ( Delivery tools ) للمركبات الفعالة حيويًا، إذ أن طريقة أتحاد الدواء بالحامل النانوي وإستراتيجية وصوله إلى الهدف تعد مهمة جداً لاستخدامه في العلاج (Suri *et al.*, 2007 ; Wilczewska *et al.*, 2012) .

وبالنظر لخطورة أخماج الحروق ، لذا فقد هدفت هذه الدراسة الى الحصول على مطهر موضعي كفوء في تثبيط الأحياء المجهرية المسببة لهذه الأخماج عبر تحقيق المحاور الآتية :

- 1- عزل وتشخيص الأحياء المجهرية المسببة لأخماج الحروق .
- 2- تحضير مطهر نانوي هجين من المطهرات شائعة الأستخدام في علاج الحروق .
- 3- تحضير مركب نانوي هجين من أحد أنواع التانينات .
- 4- تشخيص كل من المطهر النانوي والمركب التانيني النانوي الهجينين بالطرائق الطيفية والفحوصات المجهرية .

- 5- تحديد كفاءة المطهر النانوي الهجين في تثبيط الاحياء المجهرية المسببة لأخماج الحروق .
- 6- تحديد الكفاءة المضادة للأكسدة للمركب التانيني النانوي الهجين المحضر في هذه الدراسة .

الفصل الأول

استعراض المراجع

*Literature Review*

## 1 - استعراض المراجع

## 1-1 المطهرات Antiseptics and Disinfectants

تصنف العوامل المضادة للأحياء المجهرية إلى صنفين ( Cole , 2007 ) :

- 1- الأدوية المضادة للأحياء المجهرية ( Antimicrobial drugs ) مثل المضادات الحيوية ( Antibiotics ) .
- 2- المطهرات (Antiseptics and Disinfectants)

أن مصطلحي Antiseptic و Disinfectant يستخدمان بصورة عامة وبشكل متبادل إلا أنه يمكن التمييز بينهما اعتماداً على دور كل منهما ، إذ أن مصطلح Antiseptic يشير إلى ” المادة التي لها فعالية مضادة للأحياء المجهرية واسعة الطيف ( Broad spectrum ) وتقوم بتنشيط نمو الأحياء المجهرية الموجودة على الأنسجة الحية ، بينما يشير مصطلح Disinfectant إلى المادة التي تثبط نمو الأحياء المجهرية الموجودة على المواد غير الحية أو تلك الموجودة على السطوح ”. ويلعب كل منهما دوراً مهماً في السيطرة على نمو الأحياء المجهرية في عمليتي التعقيم ( Sterilization ) أو الحفظ ( Preservation ) ( Mims *et al.*, 2004).

على عكس المضادات الحيوية التي تعمل بشكل انتقائي على هدف محدد فإن المطهرات تتسع أهدافها لتشمل طيفاً واسعاً من الفعالية ضد كل من البكتريا والفطريات والفايروسات والأبتدائيات وحتى البريونات (Prion) (Drosou *et al.*, 2003; Thomas *et al.*, 2009).

تمتلك Antiseptic طيفاً واسعاً من التأثير ضد الأحياء المجهرية وقد يكون لها تأثيراً محفزاً لعملية الشفاء وتتصف بكونها غير سامة نسبياً للأنسجة إلا أنها تبدي سميتها لعدد من مكونات ابيض الخلية البكتيرية أكثر من المضادات الحيوية إذ تتصف الأخيرة بكونها أكثر تخصصاً في التأثير مثل تنشيطها للأنزيمات ، كما تمتلك Disinfectant طيفاً واسعاً من التأثير ضد جميع الأشكال الخضرية من الأحياء المجهرية فضلاً عن الأبواغ (Spores) بيد أن لها تأثيراً ساماً على الأنسجة لذا تعد غير مناسبة للأستخدام في الجروح المفتوحة ( Leaper and Durani., 2008 ) .

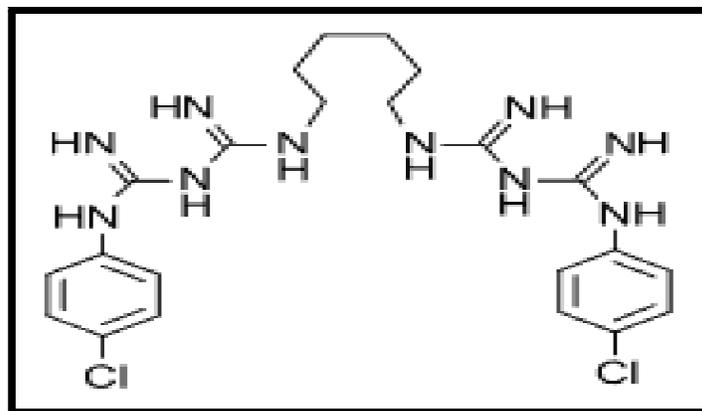
ومن بين أنواع المطهرات برزت المطهرات الموضعية (Topical antiseptics) التي تعد الأساس في السيطرة على التهابات الجروح ( Jakson and Mahon., 2005 ) . وقد شاع استخدامها بالنظر لانخفاض

معدلات مقاومة الأحياء المجهرية لها فضلاً عن انخفاض مخاطر الحساسية المرتبطة بهذه المركبات ( Drosou *et al.*, 2003; Thomas *et al.*, 2009 ) .

تتصف المطهرات الموضعية بكونها فعالة ضد كل من الفلورا المستوطنة (Residant) والمنتقلة (Transient) الموجودة على الجلد ، وتمتلك القابلية على اختزال أعداد الأحياء المجهرية إما بواسطة الإزالة الميكانيكية (Mechanical removal) أو عن طريق فعلها الكيميائي (Chemical action) أو كليهما ، وتتوفر أنواع متعددة من المطهرات الموضعية التي صممت لاستخدامها لأغراض مختلفة مثل العناية الصحية (Health care) والعاملين في كل من المجال البيطري وتداول الغذاء أو عامة المستهلكين ( Edlich *et al.*, 2010 ) .

### 1-1-1 الكلور هكسدين (Chlorhexidine)

الكلور هكسدين (CHX 1:6 di [4-chlorophenyldiguanido]-hexane) مُطهر موضعي مُصنع بدأ إنتاجه صناعياً عام 1954 وهو عبارة عن Chlorophenyl-bis-biguanide يحتوي على سلسلتين كلوروجوانيد مرتبطين بواسطة سلسلة سداسية المثيلين (Hexamethylene chain) كما في الشكل 1 . يعد الكلور هكسدين قاعدة قوية ويكون بشكل أيونات ثنائية موجبة الشحنة عند الرقم الهيدروجيني الفسيولوجي، وهو عادةً غير ذائب في الماء لذا يجب تحويله إلى أملاح ذائبة في الماء من خلال تفاعله مع حامض الكلوكونيك (Gluconic acid) أو حامض الخليك لتكوين أملاح digluconate و diacetate ، على التوالي ، أما محاليل الكلور هكسدين فتكون عديمة اللون والرائحة وذات طعم مر ( Calogiuri *et al.*, 2013 ) . وتتصف جزيئية الكلور هكسدين بكونها امفوتيرية (Amphipathic) تحتوي على مجاميع محبة للماء وأخرى كارهة له ، تُصنع هذه الجزيئة من البروكوانيل ( Proguanil ) وتنتمي إلى العائلة ثنائية الجوانيد (Biguanid family) التي تعد مجموعة مركبات لها فعالية مضادة للملاريا (Antimalarial activity) ( Al-tannir and Goodman., 1994).



الشكل 1 : التركيب الجزيئي للكلورهكسدين (Calogiuri *et al.*, 2013)

يتوفر الكلورهكسدين بشكل أملاح الاستيت و الكلوكونيت والهيدروكلوريد ويمتاز بالصفات الآتية

: (Lozier , 1993)

1- ذو فعالية مضادة للبكتريا واسعة الطيف .

2- ذو فعالية متبقية جيدة ( Good residual activity ) .

3- له امتصاص جهازى واطئ .

4- يمتلك سمية واطئة .

ان استخدام المحلول المائي Chlorhexidine diacetate بتركيز 0.05 % يؤدي وبشكل ملحوظ إلى اختزال المجاميع البكتيرية الموجودة في الجروح الملوثة دون أن يؤدي إلى زيادة التهاب الأنسجة (Waldron and Trevor,1993) وعلى الرغم من امتلاك الكلورهكسدين فعالية ضد مدى واسع من البكتريا وبعض الفطريات والفايروسات إلا أن بعض أنواع البكتريا السالبة لصبغة كرام والتي تشمل *Klebsiella* و *Pseudomonas* و *Serratia* قد اكتسبت مقاومة للكلورهكسدين (Carson *et al.*, 1972;) (Sebben , 1983 ; Thomas *et al.*, 2000) . يتفاعل الكلورهكسدين مع الدهون المفسفرة (Phospholipids) و متعدد السكريد الدهني (Lipopolysaccharide) الموجودة في غشاء الخلية البكتيرية ويدخل الى الخلية بواسطة بعض أنواع آليات النقل الفعال أو السلبي (Active and passive transport) (Athanassiaddis *et al.*, 2007) . وتعود فعالية هذا المركب إلى تفاعل الشحنة الموجبة للجزيئة مع مجاميع الفوسفات ذات الشحنة السالبة على جدار الخلية المايكروبية مما يؤدي إلى تغيير التوازن الازموزي للخلية

وبالتالي زيادة نفاذية جدار الخلية ودخول جزيئات المركب إلى البكتيريا . عند استخدام الكلور هكسدين بتركيز قليل (0.2%) فإن المواد واطئة الوزن الجزيئي سوف تتسرب إلى خارج الخلية خاصة البوتاسيوم والفسفور، أما عند استخدامه بتركيز عالي (2%) فإنه يكون قاتل للبكتيريا (Bactericidal) إذ يؤدي إلى ترسيب مكونات السايئوبلازم مؤدياً إلى موت الخلية ( Greenstein *et al.*, 1986 ; Gomes *et al.*, 2003a,b ).

### 2-1-1 استخدامات الكلور هكسدين

يستخدم الكلور هكسدين وخاصة Digluconate ester بشكل واسع في العديد من التطبيقات موضعية كمحاليل غسول الفم ومعاجين الأسنان بسبب قابليته على الارتباط بأسطح الفم المخاطية و بذلك يمنع تسوس الأسنان ، كما يوجد في اللصقات والضمادات والمراهم والتحاميل وهلامات منع الحمل وكمحاليل لتعقيم الجروح ، ويستعمل كعامل وقاية في أنواع مختلفة من الصابون السائل ورغوات الاستحمام ومستحضرات التجميل لأنه يمنع التلوث البكتيري . وبالنظر لكون الكلور هكسدين يقلل بشكل كبير من استعمار البكتيريا للجلد لذلك يستعمل بكثرة في المجال الجراحي كمطهر موضعي يوضع قبل إجراء الشق الجراحي ، فضلاً عن استخدامه كمطهر جلدي لتقليل حالات الإصابة بالعدوى داخل الأوعية الدموية المرتبطة بالقسطرة. إن العديد من الأدوات الطبية مثل القسطرة البولية والقسطرة الوريدية المركزية والكنيولات تكون مغلفة بطبقة رقيقة من الكلور هكسدين لزيادة تعقيم هذه الأدوات . أما Chlorhexidine diacetate فيستعمل كمادة حافظة في منتجات عديدة مثل تحضير مضادات الحموضة و سوائل العدسات اللاصقة ومواد التجميل وفي التعامل مع المواد الغذائية التجارية كما يوجد في المواد المطهرة المنزلية (Lim and Kam , 2008) ، و يوضح الجدول 1 بعض استخدامات الكلور هكسدين في المجالات الطبية (Foulkes , 1973) .

وقد سمحت وكالة حماية البيئة الامريكية (EPA) Environmental Protection Agency

بأستخدام Chlohexidine diacetate كمطهر في المجال الزراعي والبيطري إذ تم استخدامه في تداول وتعبئة البيض واللحوم والدواجن (Levy , 1998 ; Mc Donnell and Russel , 1999) .

الجدول 1 : بعض استخدامات الكلوروكسدين الطبية

طريقة العلاج	التركيب	مجال الاستخدام
موضعي	محلول	التهاب الجلد
موضعي	محلول	الجروح
موضعي	محلول	الحروق
فموي	أقراص مص	التهاب الفم
موضعي	كريم	التوليد
موضعي	محلول	ري المثانة
تغطيس	محلول	تعقيم الادوات الطبية
موضعي	صبغة	طب الاسنان
فموي	أقراص مص	التهاب المريء
متنوعة	متنوعة	مطهر عام

## 2-1 التانينات (Tannins)

تم تعريف التانينات من قبل (Smith and Swein 1962) على أنها مركبات فينولية ذائبة بالماء، لها أوزان جزيئية عالية تتراوح بين (500-3000) دالتن، تظهر التفاعلات الفينولية الاعتيادية ولها صفات خاصة مثل القابلية على ترسيب القلويدات والجيلاتين والبروتينات الأخرى وقد بين (Khanbabaee and Ree, 2001) بأن هذا التعريف لايشمل جميع التانينات لأنه قد عزلت مؤخراً جزيئات ذات كتل مولارية تصل الى 20,000 دالتن وقد صنفت على انها تانينات اعتماداً على تراكيبيها الجزيئية .

تعد التانينات مواد ايض ثانوية معقدة جدا ذائبة بالمحاليل القطبية ويمكن تمييزها عن باقي المركبات الفينولية المتعددة بواسطة قابليتها على ترسيب البروتين (Silanikove *et al.*, 2001) فالعديد من الفينولات الذائبة التي لها خصائص كيميائية وتركيبية مماثلة للتانينات لاترسب البروتين (Reed, 1995), فضلاً عن ذلك تتميز التانينات عن باقي أنواع المركبات الفينولية الأخرى بارتباطها بالمركبات الأساسية والصبغات والمركبات الجزيئية الكبيرة والايونات المعدنية ونشاطها المضاد للاكسدة (Okuda and Ito, 2011) .

التانينات مركبات غير ثابتة حرارياً (Thermolabile), عالية القطبية (Highly polar) , تكون صعبة التآين (Perret *et al.*, 2001) تذوب في الماء عند درجات حرارة (20-35) °م باستثناء بعض التانينات

ذات الاوزان الجزيئية العالية (Hassanpour *et al.*,2011) مكونة محاليل غروية تعتمد في درجة ذوبانها على درجة البلورة (Bele *et al.*,2010) .

يمكن تصنيف التانينات اعتماداً على الصفات الكيميائية إلى مجموعتين (1989, Nonaka,1989 ; Würdig and Woller):-

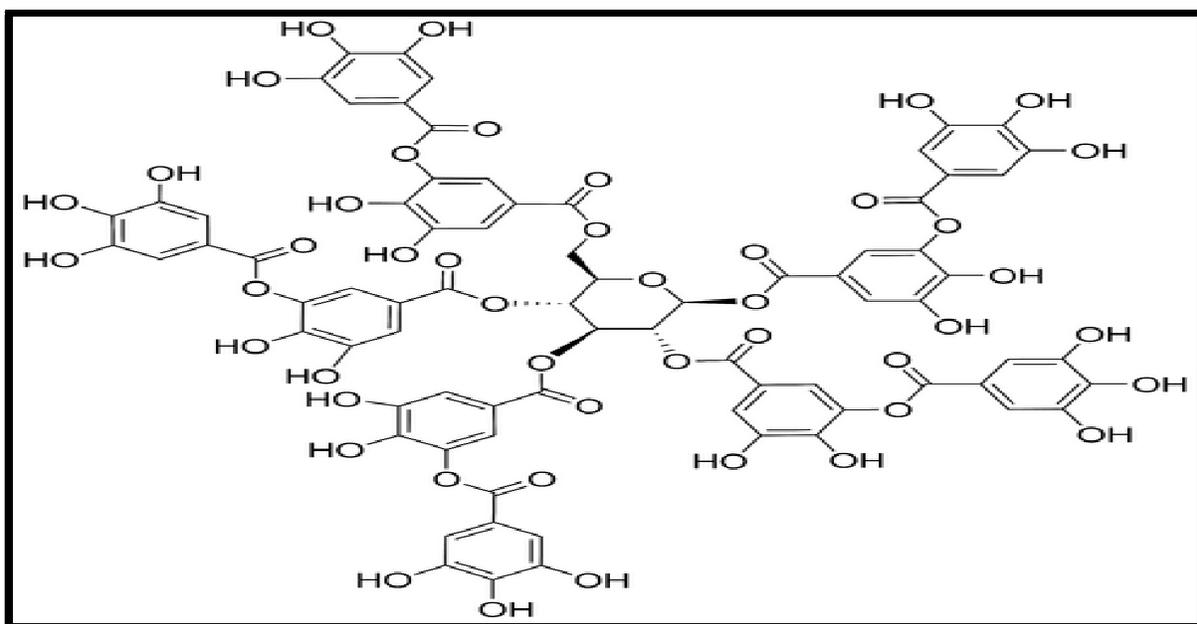
- 1- التانينات القابلة للتحلل المائي (Hydrolysable tannins): وهي مشتقات حامض الكاليك وتضم كلا من Gallotannins و Ellagitannins.
- 2- التانينات غير القابلة للتحلل المائي (Non- hydrolysable tannins): والتي يطلق عليها التانينات المكثفة (Condensed tannins).

### 1-2-1 حامض التانيك (Tannic acid)

حامض التانيك penta- m -digalloyl glucose يمتلك الصيغة الجزيئية  $C_{76} H_{52} O_{46}$  و ينتمي إلى مجموعة Gallotannins التابعة للتانينات القابلة للتحلل المائي (Hydrolysable tannins) التي تتحلل بواسطة الحوامض الضعيفة أو القواعد الضعيفة لتنتج كاربوهيدرات وحوامض فينولية (Ashok and Upadhyaya , 2012). يتواجد هذا الحامض بكثرة في أفراسات جذور النباتات وبقايا النباتات المتحللة وكذلك التربة كما أنه واسع الانتشار في المملكة النباتية (Khan *et al.*, 2000).

لا يعد حامض التانيك حامضاً حقيقياً بالنظر لعدم احتوائه على مجاميع الكربوكسيل ( $-COOH$ ) المميزة لجميع الحوامض العضوية بيد أنه يحتوي على عدد من المجاميع الفينولية ( $C_6H_5OH$ ) لذلك يُعرف بأنه مركب متعدد الفينولات (Polyphenol). يتكون حامض التانيك من جزيئة كلوكوز تحتل موقعاً مركزياً فيه وترتبط هذه الجزيئة عن طريق مجاميعها الهيدروكسيلية بواحدة أو أكثر من ثُمالات الكالويل (Galloyl residues) كما في الشكل 2. تتراوح قيمة pKa للحامض بين 7-8 كدالة على درجة التفكك (Degree of dissociation) إذ يتحلل الحامض جزئياً تحت الظروف الحامضية أو القاعدية المعتدلة إلى كلوكوز وحامض الكاليك (gallic acid) (Sivaraman *et al.*, 2009) .

يُعرف حامض التانيك بأسماء مختلفة تشتمل على Acidumtannicum و Gallotanic acid و Digallic acid و Tanninum و Quercotannic ويتصف هذا الحامض بكونه مركب ذو لون بني محمر ويبلغ وزنه الجزيئي 1701.2 غم/مول أما نقطة انصهاره فهو يتفكك بدرجة حرارة أعلى من 200 م° فضلاً عن ذائبته العالية في الماء (Singh , 2012) .



الشكل 2: التركيب الجزيئي لحامض التانيك (Sivaraman et al., 2009)

يتميز حامض التانيك بفعالياته المضادة للتطهير (Antimutagenic) والمضادة للتسرطن (Anticarcinogenic) و المضادة للأكسدة (Antioxidant) و المضادة للبكتريا (Antibacterial) و المضادة للإنزيمات (Antienzymatic) فضلاً عن فعاليتها القابضة (Astringent) (Lopes et al., 1999 ; Aelenei et al., 2009) .

## 1-1-2-1 استخدامات حامض التانيك

## A. المجال الصناعي

يستخدم حامض التانيك في دباغة الجلود كما يعد هذا الحامض المكون الأساسي في صبغات الخشب الكيميائية كما أنه مادة مثبتة (Mordant) شائعة الاستعمال في صباغة الألياف السليلوزية مثل القطن (Singh, 2012). أما في التصنيع الغذائي فيستخدم هذا الحامض كمضاف غذائي (Food additive) إذ تتراوح الجرعة الآمنة منه بين (10 – 400) مايكروغرام اعتماداً على نوع الغذاء المضاف إليه (Chen and Chung, 2000)، كما يستخدم في ترويق النبيذ بسبب قابليته العالية على التداخل مع الكربوهيدرات والبروتينات إذ يكون مُعقدات غير ذائبة تترسب مع البروتينات (Aelenei et al., 2009).

## B. المجال الطبي

يستخدم الحامض بشكل كبير في علاج القرحة الجلدية والجروح والآم الأسنان وبسبب فعاليته المضادة للبكتريا والانزيمات فضلاً عن فعاليته القابضة فإن الحامض يستخدم كدواء لعلاج الإسهال ومضاد للبواسير بيد أنه يجب تحاشي استخدام الحامض بكميات كبيرة بالنظر لتثبيطه امتصاص الحديد في الجسم فضلاً عن اختزال فعالية الانزيمات الهاضمة (Aelenei et al., 2009).

## 1-3 الحروق ( Burns )

الحرق هو تلف النسيج الذي يتسبب بفعل عدد من العوامل مثل الحرارة و الكهرباء و أشعة الشمس والإشعاع النووي ( Mbaga and Mwafongo , 1998 ) .

صنف ( Dai et al., 2010 ) الحروق إلى أربع درجات اعتماداً على عمقها و شدتها وهي :

A. الدرجة الأولى ( First-degree ) : وتقتصر عادةً على حصول احمرار، وتكون صفيحة بيضاء وألم خفيف في موقع الإصابة وتشمل هذه الحروق فقط بشرة الجلد .

- B. الدرجة الثانية ( Second-degree ) : تتميز بالاحمرار وظهور فقاقيع سطحية من الجلد والتي تتكون من طبقة الأدمة السطحية (Papillary) ويمكن أن تشمل أيضاً طبقة الأدمة العميقة (Reticular).
- C. الدرجة الثالثة ( Third-degree ) : تتميز بتلف البشرة مع حدوث أضرار للأنسجة تحت الجلد ويعاني ضحايا الحروق من التقرح وأضرار بالغة للبشرة وأحياناً تكون مصحوبة بظهور ندبة ( Eschar ) شديدة .
- D. الدرجة الرابعة ( Fourth- degree ) : يسبب الحرق تلف لأنسجة العضلات و الأوتار والأربطة مؤدياً إلى حدوث تقزم وتلف كبير للأنسجة تحت الجلد .

### 1-3-1 خمج الحروق ( Burns infection )

يعد الجلد الخط الدفاعي الأول ضد الأحياء المجهرية وان انهيار هذا الحاجز الأساسي في إصابات الحروق يترك المرضى معرضين بشكل كبير للغزو من قبل الكائنات الممرضة ويزيد من معدلات الاعتلال (Morbidity) والوفيات (Mortality) بين المرضى ، إذ يعد مرضى الحروق مضائفة مثالية للإصابات الأنتهازية (Cochran *et al.*, 2002) .

توفر الحروق مواقع مناسبة لتضاعف البكتيريا وتشكل مصادر غنية للخمج (Infection) أكثر من الجروح الجراحية وذلك بسبب المساحة الكبيرة التي تنطوي عليها فضلاً عن الفترة الطويلة التي يقضيها المريض في المستشفى (Agnihotri *et al.*, 2004) ، أن الخمج هو السبب الرئيس لحصول الاعتلال والوفيات بين مرضى الحروق في المستشفيات (Mc Manus *et al.*, 1994) وتشير التقديرات إلى أن حوالي 75% من وفيات إصابات الحروق تكون مرتبطة بتعفن الدم ( sepsis ) خاصة في الدول النامية (Donati *et al.*, 1993) . كما يمكن أن تسبب العدوى موت (50- 60) % من مرضى الحروق على الرغم من العلاج المكثف بالمضادات الحياتية سواءً الموضعية منها أو الوريدية (Arturson,1985) . يختلف نمط العدوى من مستشفى إلى آخر كما أن الفلورا البكتيرية المختلفة الموجودة في جرح ملوث قد تتغير بشكل كبير خلال فترة الشفاء (Kumar *et al.*, 2001).

أن معدل العدوى المكتسبة داخل المستشفى هو الأعلى بين مرضى الحروق بسبب عدد من العوامل مثل طبيعة الحرق وحالة نقص المناعة عند المريض (Pruitt *et al.*, 1998) إضافة إلى عمر المريض ومدى الإصابة وعمق الحرق مضافاً لها العوامل المايكروبية مثل عدد ونوع الأحياء المجهرية و أنتاج السموم

والإنزيمات واستيطان موقع الحرق والانتشار أجهازي للأحياء المجهرية المستوطنة (Pruitt *et al.*, 1984) فضلاً عن ذلك فإن مساحة كبيرة من الأنسجة تكون مكشوفة لفترة أطول مما يجعل المرضى عرضة للتسمم بواسطة البكتريا الاجتياحية (Invasive bacteria) ، وفي حالة الحروق الشديدة تتضاعف الأحياء المجهرية في الندبة (Eeschar) وعندما تتجاوز كثافتها 100,000 خلية لكل غرام من النسيج فأنها تنتشر إلى الدم وتسبب تجرثم الدم القاتل (Lethal bacteremia) لذا فإن الهدف من علاج اخماج الحروق هو أبقاء أعداد الكائنات الحية أقل من 100,000 خلية لكل غرام من النسيج مما يزيد من فرص نجاح ترقيع الجلد (Magnet *et al.*, 2013) .

أن البروتين الممسوخ الموجود في ندبة الحرق يوفر التغذية للأحياء المجهرية كما أن تحطم الاوعية (Avsclarity) في الأنسجة المحروقة تجعل الأحياء المجهرية في منأى عن آليات المضيف الدفاعية والمضادات الحياتية الجهازية (Order *et al.*, 1965) ، ويمكن أن يسبب الازدحام في أقسام الحروق العدوى بين مرضى الحروق (Gupta *et al.*, 1993) .

### 2-3-1 التهاب الحروق ( Burns inflammation )

يحدث الالتهاب عادةً بعد 7-10 أيام من حدوث الحرق إذ إن تدفق الدم في الحرق بعد هذه المدة يكون عند أعلى مستوياته ، لذلك فإن الجراحة قد تكون خطيرة بسبب النزف ، الأمر الذي يجعل الجراحين يقومون باستئصال الجرح في وقت مبكر (Williams , 2002) .

### 4-1 الأحياء المجهرية المسببة لخمج الحروق

يكون سطح الحرق معقماً مباشرة بعد الإصابة الحرارية بيد أن هذه الجروح تصبح مستعمرة من قبل الأحياء المجهرية فيما بعد (Monafu and Freedman, 1987) ، ومن أخطر إصابات الأحياء المجهرية هي التي تُصنف كإصابات أجتياحية (Invasive) إذ تعتمد الأخيرة على خطورة الحرق وضراوة نوع أو سلالة الكائن المجهرى . وتمثل الضراوة توليفة من عوامل مختلفة تتضمن :

a. القابلية على استيطان الجرح عبر الالتصاق بخلايا وأنسجة المضيف .

b. أنتاج الإنزيمات المحللة للبروتينات .

c. التغذية (Nutrition) على المضيف .

d. القابلية على تجنب استجابة المضيف المناعية.

ويمكن التنبؤ إلى حد ما بأنواع الأحياء المجهرية التي تستعمر أو تصيب الحرق ، فالبكتريا الموجبة لصبغة كرام والمتحملة للحرارة مثل *Staphylococci* والتي توجد في عمق الغدد العرقية وحوصلات الشعر تستوطن بشدة سطح الحرق خلال 48 ساعة الأولى، وبعد 5-7 أيام تُستعمر الحروق من قبل أحياء مجهرية أخرى قادمة من فلورا المضيف الطبيعية الموجودة في الجهاز الهضمي والجهاز التنفسي العلوي أو من بيئة المستشفى . وتشمل هذه الممرضات البكتريا السالبة لصبغة كرام بينما تميل الخمائر والفطريات إلى أن تكون آخر المستوطنين (Dai et al. , 2010) .

تاريخياً ، تعد المكورات العنقودية *Staphylococci* والمكورات المسبحية *Streptococci* المحللة للدم (نوع بيتا) الأكثر شيوعاً من بين الأحياء المجهرية المسببة لخمج الحروق في أوائل القرن الماضي ( Riaz and Babar,1996) واحتلت بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* مركز السيادة من بين فلورا الحروق المعزولة من إصابات حروق 70% من المرضى خلال الأسبوع الثالث من التعرض للحرق وبغياب العلاج الموضوعي (Church et al., 2006).

وعموماً تشتمل الأحياء المجهرية التي تُعزل بشكل روتيني من الحروق على الآتي

: (Lawrence and Lilly, 1972)

A. أحياء مجهرية هوائية مثل :

*Staphylococcus aureus* و *Streptococcus pyogenes* و *E.coli* و *Klebsiella spp.* و

*Proteus* وغيرها .

B. أحياء مجهرية لاهوائية مثل :

*Bacteroides fragilis* و *Peptostreptococcus* و *Propionibacterium spp.* و

*Fusobacterium spp.*

C. الفطريات مثل:

*Aspergillus niger* و *Zygomycetes* و *Candida spp.*

وظهرت مؤخراً بكتريا المكورات العنقودية المقاومة للمثيسيلين ( Methicillin-resistant MRSA , *Staphylococcus aureus* ) مسبباً رئيساً لخمج الحروق . ومن بين الأحياء المجهرية السالبة لصبغة كرام والتي تمتلك صفة المقاومة المتعددة ( Multiresistant ) برز جنس *Acinetobacter* مسبباً رئيساً للخمج في وحدة الحروق (Greenhalgh , 2009).

ومن أهم أنواع البكتريا المسببة لخمج الحروق :

### ***Pseudomonas aeruginosa* 1-4-1**

وهي عُصيات هوائية سالبة لصبغة كرام غير مكونة للأبواغ تتراوح أبعادها بين (0.5-1.5) مايكروميتر قطراً و (1.5-3) مايكروميتر طولاً و تتحرك بواسطة سوط قطبي مفرد محاط بغلاف . و تتمكن من النمو بمدى من درجات الحرارة (4-42) م° كما يمكنها العيش بوجود مستويات منخفضة من المواد الغذائية (Stover et al., 2000 ; Vissillier et al., 2001).

تعد بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* من الممرضات الانتهازية وتسبب معدلات عالية من الوفيات وخاصة لدى المرضى الذين يعانون من نقص المناعة والمصابين بالجروح ( Traumatic wounds ) والحروق و التليف الكيسي (Cystic fibrosis) و الاضطرابات الأيضية (Metabolic disorders) فضلاً عن الأورام الخبيثة (Malignancies) . لهذه البكتريا القابلية علي البقاء حية لفترة طويلة في الصابون و الأسفنج والجلود و مقاييس الحرارة الفمية و معدات الاستنشاق وسوائل غسيل الكلى و ماء الحنفية والملابس وغيرها (Corona-Nakamura et al., 2001).

لهذه البكتريا القابلية على إصابة جميع الأنسجة تقريباً بالنظر لامتلاكها عدد كبير ومتنوع من عوامل الضراوة التي تشمل على الشعيرات (Pilli) والاسواط (flagella) ومتعدد السكريد الدهني (Lipopolysaccharide) وانزيم البروتينيز (Protease) و السم الخارجي (Exotoxin A) و الأنزيمات الخارجية ( Exoenzymes ) والألجنيت (Alginate) و الفينازين ( Phenazin ) فضلاً عن الهيموليسين (Hemolysin) المتحمل و غير المتحمل للحرارة (Darby et al., 1999 ; Jeffery et al., 2000).

تتمكن هذه البكتريا من إنتاج عدد من الصبغات التي تثبط نمو أنواع البكتريا الأخرى وأهم هذه الصبغات هي Pyocin (وتكون زرقاء ذائبة في الماء) وصبغة Pyoverdin (وتكون خضراء مصفرة وتسمى أيضاً

(Pseudobactin) وتتصف هذه الصبغات بكونها سامة لخلايا المضيف ، فضلاً عما سبق تقوم هذه البكتريا بانتاج صبغة Pyprubrin ذات اللون الأحمر وصبغة Pyomelanin ذات اللون البني ( Ravel and Cornelis , 2003).

تمتلك بكتريا *P. aeruginosa* درجة عالية من المقاومة الطبيعية للمضادات الحيوية مثل مضادات Aminoglycosides ( Gentamicin و Amikacin ) و Cephalosporins (وتشمل Cefotaxime و Ceftazidime و Cefoperazone ) و Fluoroquinolones (وتشمل Ciprofloxacin و Ofloxacin و Perfloxacin ) و Penicillin (وتشمل Piperacillin و Ticarcillin و Azlocillin ) ومما يجدر الإشارة إليه أن جينات المقاومة لتلك المضادات محمولة على كل من كرموسوم وبلازميدات هذه البكتريا . ولغرض السيطرة على سلالات هذه البكتريا في حالة الإصابات الموضعية يمكن استخدام Topical colistin و Polymyxin B أو 1% من حامض ألكليك ( Hemalatha and Dhasarathan, 2010).

### ***Acinetobacter baumannii* 2-4-1**

وهي بكتريا هوائية أنتهازية غير مخمرة سالبة لصبغة كرام وتكون بشكل عُصيات Coccobacilli ( Bayuga et al., 2002 ; Wilson et al., 2004 ) وهي واسعة الانتشار في التربة والماء وتنمو في بيئات ذات درجات حرارية وأرقام هيدروجينية مختلفة وتستخدم مجموعة واسعة من المواد لغرض النمو ( Gusten et al., 2002 ; Simor et al., 2002 ) . حالياً ، أصبحت هذه البكتريا من الكائنات المرضية المهمة في المستشفيات في جميع أنحاء العالم وهي مسؤولة عن ( 2 - 10 ) % من جميع الاخماج التي تسببها البكتريا السالبة لصبغة كرام ( Richet and Fournier , 2006 ) ، إذ أن هذه البكتريا كائنات ممرضة انتهازية لها القابلية على الانتشار بين المرضى في المستشفيات والبقاء في بيئة المستشفى . أن هذه البكتريا معروفة بشكل أساسي عاملاً مسبباً للالتهاب الرئوي (Nosocomial pneumonia) وتجرثم الدم ( Bacterimia ) وإصابات المجاري البولية ( Urinary tract infection ) واخماج الجروح (Wound infection) والتهاب السحايا الثانوي ( Secondary meningitis ) ( Bergogen- Berezin ) (and Towner, 1996).

وبشكل عام يمكن أن تعزى أمراضية بكتريا *Acinetobacter baumannii* الى عدة عوامل وهي :

- a. قابليتها على تكوين الأغشية الحيوية ( biofilms ) ومقاومة الجفاف على السطوح غير الحية مثل الأدوات الطبية والسطوح البيئية (Vidal et al., 1996 ; Loehfelm et al., 2008).
- b. قابليتها على الالتصاق ( Adhere ) واستعمار (Colonize) واجتياح (Invade) خلايا الإنسان الطلائية (Lee et al., 2006 ; Lee et al., 2008).
- c. امتلاكها آليات مقاومة للمضادات الحيوية قادرة على تنظيمها بسرعة كبيرة وحسب الحاجة.
- d. قابليتها على الحصول على مواد وراثية خارجية عبر نقل الجينات لتعزيز بقائها بوجود المضادات الحيوية وضغوط المضيف الانتخابية (Smith et al., 2007 ; Adams et al., 2008).

منذ ما يقارب 25 سنة لاحظ الباحثون اكتساب بكتريا *A. baumannii* المقاومة للأدوية المضادة للأحياء المجهرية التي كانت سائدة في ذلك الوقت من ضمنها مضادات Aminopenicillins ومضادات Ureidopenicillins والجيلين الأول والثاني من مضادات Cephalosporins ومضادات Cephameycins ومعظم مضادات Aminoglycosides ومضادات Chloramphenicol ومضادات Tetracyclines ( Abbo et al., 2005) . ومنذ ذلك الوقت اكتسبت سلالات بكتريا *A. baumannii* مقاومة للأدوية المطورة حديثاً ضد الأحياء المجهرية ، وعلى الرغم أن بكتريا *A. baumannii* التي تمتلك صفة المقاومة المتعددة ( Multidrug- resistant , MDR ) نادراً ما توجد في عزلات المجتمع ( Community isolates ) إلا أنها أصبحت سائدة في العديد من المستشفيات ( Zeana et al., 2003 ) .

### ***Klebsiella pneumoniae* 3-4-1**

*Klebsiella pneumoniae* بكتريا عصوية (Rod - shaped) غير متحركة سالبة لصبغة كرام مخمرة لسكر اللاكتوز لاهوائية اختيارية (Facultative - anaerobic) تعطي نتيجة سالبة في فحص الاوكسيديز (Oxidase - negative) حاوية على كبسولة مكونه من متعدد السكريد ( Polysacchrid ) ، توجد هذه البكتريا في الفلورا الطبيعية للفم والجلد والأمعاء كما توجد في البراز البشري (Feces)

(Commensal resident) ( Ryan and Ray , 2010 ; Tiga , 2011 ) ، إذ انها توجد كمقيم متعايش ( Commensal resident ) في القناة الهضمية للإنسان ( Seaton , 2000 ) .

توجد هذه البكتيريا في التربة بصورة طبيعية ومن الناحية السريرية تعد بكتيريا *K. pneumoniae* من أهم الأنواع التابعة لجنس *Klebsiella* التابع للعائلة المعوية وقد أصبحت هذه البكتيريا من أهم المسببات المرضية للالتهابات المكتسبة في المستشفيات ( Postgate , 1998 ; Riggs et al ., 2001 ) .

تسبب هذه البكتيريا مختلف أنواع الاخماج المتعلقة بالعاية الصحية (Health care-associated infections) مثل الخمج الرئوي (Pneumonia) وإصابات مجرى الدم (Bloodstream infections) والسحايا (Meningitis) كما تسبب خمج المجاري البولية واخماج الأنف المزمنة واخماج الشعب الهوائية وحتى الغنغرين (Gangrene) . كما أن المرضى الذين يحتاجون إلى أجهزة طبية كأجهزة التنفس (Breathing machines) والقسطرة الوريدية (Intravenous catheters) وكذلك المرضى الذين يتلقون دورات علاجية طويلة من بعض المضادات الحيوية يكونون أكثر عرضة للإصابة بهذه البكتيريا (Tiga , 2011) .

تمتلك بكتيريا *K. pneumoniae* عدداً من عوامل الضراوة أهمها المحفظة (Capsule) وعوامل الالتصاق أو الاستعمار (Adhesions or colonization factors) وإنتاج أنظمة سحب الحديد (Siderophore production) ( Brooks et al ., 2001 ; Steward et al., 2001 ) .

أن الانتشار المتزايد لسلاسل *K. pneumoniae* المقاومة للمضادات الحيوية أدى إلى زيادة الأهمية السريرية لهذه الأنواع ، فقد تبين أن هذه البكتيريا طورت مقاومة للمضادات الحيوية كان آخرها صنف من المضادات معروف باسم Carbapenems ( Timko , 2004 ; Tiga , 2011 ) .

### ***Proteus mirabilis* 4-4-1**

هي بكتيريا سالبة لصبغة كرام لاهوائية اختيارية عصوية الشكل وتتميز بحركة تؤدي إلى العج (Swarming motility) وتفرز أنزيم Urease وتنتمي إلى العائلة المعوية ، تسبب هذه البكتيريا 90 % من

مجموع الاخماج التي يسببها جنس *Proteus* في الإنسان ، إذ تعد هذه البكتيريا سبباً رئيساً للالتهابات في الإنسان جنباً إلى جنب مع الأنواع التابعة إلى أجناس *Escherichia* و *Klebsiella* و *Enterobacter* و *Serratia* ( Sarangi , 2011 ) .

توجد هذه البكتيريا في التربة والماء والقناة المعوية للبانن بما فيها الإنسان كما أنها تسبب اخماج المجاري البولية (Urinary tract infection ; UTI) و اخماج الجهاز التنفسي و اخماج الجروح وتجرثم الدم (Bacteremia) و اخماج أخرى ( Mobley and Belas , 1995 ; Rozalski et al., 1997 ) .

تكون بكتيريا *P. mirabilis* ثنائية الشكل (Dimorphic) إذ تخضع لتغيرات شكلية وفسلجية سريعة كاستجابة للنمو على السطوح والبيئات اللزجة وأن هذه التغيرات تكون مطلوبة للحصول على حركة عجية بمساعدة الاسواط (Flagellum – assisted swarming motility) على سطح وسط المغذي الصلب (Nutrient agar) إذ تتحول البكتيريا من خلايا خضرية قصيرة سابعة إلى شكل متطاوول عالي التسوط (Highly flagellated) تسمى Swarmer cells ، وقد لوحظت هذه الظاهرة من قبل Hauser عام 1885 وهي سمة مميزة لهذه البكتيريا ( , Rather , Mobley and Belas , 1995 ; Allison et al., 1993 ; Allison et al., 2005 ) .

تمتلك هذه البكتيريا عدداً من عوامل الضراوة التي تلعب دوراً رئيساً في امراضيتها واهم عاملين هما الاسواط (Flagella) وانزيم Urease (Gygi et al., 1995 ; Belas and Flaherty , 1994 ) . فضلاً عن عوامل الضراوة الأخرى المتمثلة ب Hemolysin وأربع أنواع من الشعيرات (Fimbriae) وانزيم Amino acid deaminase وانزيم Protease ( Allison et al., 1992 ) .

تكون بكتيريا *Proteus mirabilis* حساسة لمضادات Cephalosporins ومثبطات  $\beta$  - lactam /  $\beta$ - lactamase وفي عام 1990 ظهرت سلالات مقاومة لمضادات  $\beta$  - lactams من خلال أكتسابها لأنزيمات  $\beta$ - lactamase المحمولة على البلازميدات ( Chanal et al ., 2000 ) .

### *Escherichia coli* 5-4-1

هي بكتريا عصوية سالبة لصبغة كرام تنتمي إلى العائلة المعوية ( Enterobacteriaceae ) ، معظم سلالات بكتريا *Escherichia coli* تكون متعايشة طبيعياً في الأمعاء أما السلالات المرضية التابعة لهذه البكتريا فيمكن تمييزها عن الفلورا الطبيعية من خلال امتلاكها لعوامل الضراوة مثل السموم الخارجية ( Exotoxins ) . أن العوامل التي تحدد أمراضية هذه البكتريا تتنوع وفقاً لطبيعتها وقد تسبب سلالات هذه البكتريا أحماج متنوعة من ضمنها أحماج الجروح ( Edwards , 2003 ; Cooper , 2003 ; Wassilew , 1990 ; and Harding , 2004 ) .

تستوطن بكتريا *E. coli* القناة الهضمية للإنسان والحيوانات وكذلك توجد في المياه والتربة ، وتنمو هذه البكتريا في درجات حرارية تتراوح من (7- 46) °م ودرجة الحرارة المثلى لنموها هي 37 °م ويمكنها النمو في أوساط تتراوح أرقامها الهيدروجينية بين (4.4- 9) ، كما تنمو هذه البكتريا بسرعة كبيرة وقد لوحظ أن بعض سلالاتها تنتج انزيم يسمى (ESBL) Extended – spectrum  $\beta$  – lactamase الذي يساعد البكتريا على مقاومة أنواع كثيرة من المواد المضادة للأحياء المجهرية (Tiga, 2011) .

### *Staphylococcus aureus* 6-4-1

هي بكتريا كروية ( Spherical ) موجبة لصبغة كرام يصل قطرها إلى 1 مايكرومتر تتجمع خلاياها بشكل يشبه عناقيد العنب ( Grape like – clusters ) بالنظر لحدوث انقسامها الخلوي في أكثر من مستو واحد . توجد هذه البكتريا متعايشة (Commensal) في الجلد والغدد الجلدية والأغشية المخاطية وخاصة أنوف الأشخاص الأصحاء ( Crossley and Archer , 1997 ) .

تكون البكتريا مستعمرات متوسطة الحجم ذهبية اللون (Golden colonies) على الأوساط الأغنائية كما أنها تسبب تحلل الدم ( نوع  $\beta$  ) على الاطباق الحاوية على أكار الدم ( Blood agar ) ( Ryan and Ray , 2004 ) ، أن اللون الذهبي لمستعمرات هذه البكتريا يُعزى لإنتاجها صبغة الكاروتينات (Carotenoides) ويُعتقد أنها عامل ضراوة يحميها من عوامل الأكسدة التي ينتجها النظام المناعي للمضيف (Liu et al., 2005) . وتكون هذه البكتريا لاهوائية اختيارية قادرة على إنتاج الطاقة عن طريق التنفس الهوائي وكذلك التخمر

(Fermentation) منتجة حامض اللبنيك ( Lactic acid ) بشكل رئيس. تعطي هذه البكتيريا نتيجة موجبة في فحص الكاتليز ونتيجة سالبة في فحص الأوكسيديز وتحتاج إلى مواد غذائية معقدة مثل الأحماض الأمينية وفيتامين B لغرض النمو ، كما أنها تتحمل التراكيز العالية من كلوريد الصوديوم قد تصل إلى 1.7 مولر ( Plata et al., 2009 ) . تنتج البكتيريا أنزيم Coagulase الذي يتفاعل مع Prothrombin في الدم مسبباً تجلط البلازما من خلال تحويل Fibrinogen إلى Fibrin ويستخدم تجلط الدم لتمييز بكتيريا *S. aureus* عن أنواع البكتيريا الأخرى التابعة لجنس *Staphylococcus* والتي يُشار إليها مجتمعة Coagulase – negative Staphylococci ( Ryan and Ray , 2004 ) ، كما تنتج البكتيريا عدداً من السموم الحالة للخلايا ( Cytolytic toxins ) من بينها Gamma hemolysin و Beta hemolysin و Alpha hemolysin و ( Panton – Valentine Leulocidin (PVL) ( Kaneko and Kamio , 2004 ) .

يُقدر أن حوالي (20-30) % من السكان يحملون بكتيريا المكورات العنقودية الذهبية ( Heyman Hospital and community , 2004 ) وهي أحد الأسباب الرئيسة للعدوى في المستشفيات والمجتمع ( acquired infections ) ويمكن أن تؤدي إلى نتائج خطيرة ( Diekema et al., 2001 ) ، إذ أن الأخماج التي تسببها هذه البكتيريا في المستشفيات قد تصيب مجرى الدم والجلد والأنسجة الرخوة والجزء السفلي من الجهاز التنفسي كما يمكن أن تكون سبباً لتجرثم الدم المرتبط بالقسطرة الوريدية ( Central venous catheter - associated bacteremia ) والخمج الرئوي المرتبط بأجهزة التنفس وقد تسبب أخماج عميقة وخطيرة مثل خمج الشغاف ( Endocarditis ) و خمج نقي العظم ( Osteomyelitis ) ( Schito , 2006 ) . فضلاً عن ذلك فهي غالباً ما تكون مسؤولة عن الأمراض التي تحدث بسبب السموم مثل متلازمة الصدمة السمية ( Toxic shock syndrome ) وأمراض المكورات العنقودية المنقولة عن طريق الأغذية ( Staphylococcal Food Borne Disease , SFD ) ( Lindsay and Holden , 2004 ) .

أن علاج الاخماج التي تسببها بكتيريا المكورات العنقودية الذهبية يكون صعباً بسبب المقاومة التي طورتها هذه البكتيريا للعديد من الأدوية المضادة للأحياء المجهرية ( Lowy , 2003 ) .

## 5-1 العلاج الموضعي للحروق ( Topical treatment for burns )

تهدف عملية علاج الحروق الى السماح للجرح بالشفاء بأقل قدر ممكن من الندوب (Scarring) (Greenhalgh , 2009) . أن علاج الحروق يعتمد على عمق الجرح لذا ينبغي توفر إستراتيجيات مختلفة لعلاج كل نوع من أنواع الحروق ، ومن المعروف أن حروق الدرجة الأولى لا تحتاج إلى أي شكل من أشكال العلاج سوى المواد المرطبة ( Moisturizer ) ، بينما في حروق الدرجة الثانية ( Second degree ) فعلى الرغم من فقدان الجلد لطبقة البشرة إلا أنه يحتفظ بكثافة كافية من ملحقات الجلد (Skin adnexa) مثل حويصلات الشعر والغدد العرقية والدهنية والتي تكون كافية لإعادة اندمال النسيج الطلائي (Re-epithelialize) للجرح . تتميز حروق الدرجة الثانية التي تشفى خلال 2-3 أسابيع بعدم ظهور ندب واضحة ، في حين تكون الندب واضحة في الحروق التي تستغرق مدة أكثر من ذلك للشفاء ( Deitch et al., 1983 ) ، لذا فإن الهدف من علاج هذه الجروح السطحية هو تسهيل إعادة اندمال النسيج الطلائي مما يسمح بشفاء الجرح بأسرع وقت ممكن ، أما علاج الحروق العميقة (Deep burns) فيتطلب استخدام إستراتيجيات أخرى مثل الاستئصال ( Excision ) والترقيع ( Grafting ) لذا فإن الهدف من استخدام العوامل الموضعية في علاج هذا النوع من الحروق هو لتقليل استعمار البكتريا حتى يكتمل الترقيع ( Greenhalgh , 2009 ) .

صُممت العديد من العوامل الموضعية المضادة للأحياء المجهرية لاستخدامها بشكل وقائي لمنع تطور الخمج ( Infection developing ) في حين صُمم بعضها الآخر لقتل لأحياء المجهرية التي تتكاثر داخل منطقة الحرق خلال تطور الخمج ( Dai et al., 2010 ) .

ينبغي توفر العديد من الخصائص في العوامل الموضعية المضادة للأحياء المجهرية منها ( Lipsky and Hoey , 2009 ) :

- A. أن يكون تركيزها عالياً ومستديماً في موقع الإصابة .
- B. يحدد كمية المضادات الحياتية الكلية المطلوبة .
- C. يكون امتصاصها الجهازى وسميتها محدودين .
- D. تجنب استخدام المضادات الحياتية الجهازية وبالتالي الحد من تطور المقاومة للمضادات الحياتية .
- E. يمكن استخدامها بسهولة في العيادات الخارجية أو من قبل المريض وبذلك يمكن الحد من الحاجة إلى رعاية المؤسسات الصحية .

F. يكون التصاقها جيداً عند استخدامها للعلاج خاصة للأطفال .

يجب أن يتصف العامل الموضعي المثالي المضاد للأحياء المجهرية ( Ideal topical antimicrobial )

(agent) بالموصفات الآتية ( Lipsky and Hoey , 2009 ) :

A. يجب أن يكون ذو طيف يستهدف بشكل خاص نوع الجرح المصاب .

B. تكون فعاليته القاتلة للبكتريا ( Bactericidal ) سريعة .

C. أن يكون فعال بوجود سوائل الجسم والبروتينات المفرزة في الجرح .

D. لا يحفز البكتريا على تطوير المقاومة .

E. أن يكون له القابلية على اختراق الجلد دون حدوث امتصاص جهازى .

F. أن لا يكون سام لأنسجة المضيف أو يسبب الحساسية .

G. له خصائص أو صفات تجميلية مقبولة .

H. رخيص الثمن .

## 6-1 التقنية النانوية ( Nanotechnology )

### 1-6-1 التقنية النانوية في المجال الطبي

تتم في التقنية النانوية (Nanotechnology) استخدام طرائق فيزيائية وكيميائية مختلفة لإنتاج مواد وتراكيب وظيفية (Functional materials and structures) لمدى يتراوح بين (0.1-100) نانومتر ( Schulz , 2000 ) .

ويمثل الطب النانوي ( Nanomedicine ) تطبيقاً لتقنية النانو في مجال العلاج والتشخيص والمراقبة والسيطرة على الأنظمة الحيوية ( JiMin and ZiJian , 2013 ) .

## 2-6-1 الدقائق النانوية ( Nanoparticles )

تُعرف الدقيقة ( Particle ) في تقنية النانو بأنها جسم صغير يتصرف كوحدة واحدة أو وحدة كاملة من ناحية النقل ( Transport ) والخصائص ( Properties ) وقد تم تصنيفها اعتماداً على حجمها إلى :

1- الدقائق الناعمة ( Fine particles ) : يتراوح قطرها ما بين ( 100 – 2500 ) نانوميتر.

2- الدقائق متناهية الصغر ( Ultrafine particles ) ويتراوح حجمها بين ( 1 – 100 ) نانوميتر .

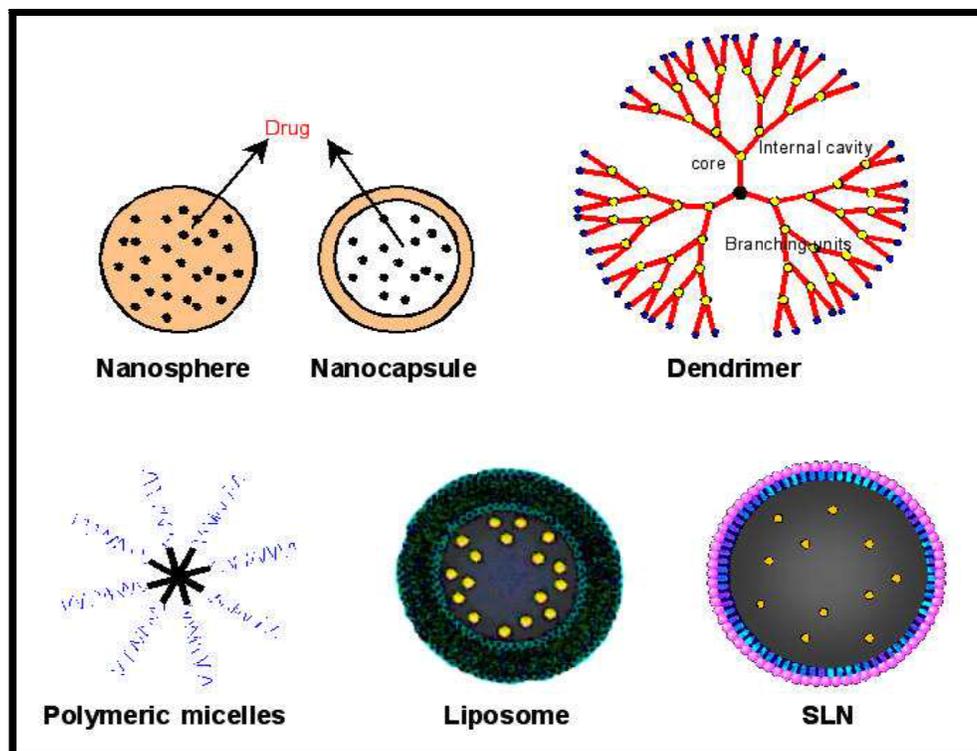
اما الدقائق النانوية (Nanoparticles) فتشبه الدقائق متناهية الصغر من ناحية الحجم إذ يتراوح حجمها بين (1-100) نانوميتر الاً أنها تختلف عنها اختلافاً كبيراً بالنظر لأمتلاكها خصائص فريدة ومهمة مثل زيادة نسبة مساحة سطحها إلى كتلتها مقارنة ببقية أنواع الدقائق والمواد الأخرى مما يتيح إمكانية تعزيز كفاءتها الحفزية ( Catalytic ) للتفاعلات فضلاً عن قابليتها على ادمصاص وحمل المركبات الأخرى (Borm and Kreyling , 2004 ; Buzea *et al.*, 2007) ويوضح الشكل 3 أهم أنواع الدقائق النانوية .

جذبت الدقائق النانوية اهتمام الباحثين بالنظر لأتساع تطبيقاتها في مجالات الطب الحيوي (Biomedical) والبصريات (Optical) والالكترونيات (Electronic) فضلاً عن استخدامها في تقنية إيصال الدواء إلى الهدف (Targeted drug delivery) (Borm and Kreyling , 2004) .

من المعروف أن هناك طريقتان لتحضير الدقائق متناهية الصغر (Ultrafine particles) (Horikoshi and Serpone , 2013) هما :

1- طريقة التفسير [ Breakdown ( top – down ) method ] : ويتم فيها استخدام قوة خارجية على المواد الصلبة مما يؤدي إلى تفكيكها إلى دقائق أصغر .

2- طريقة البناء [ Build – up ( bottom – up ) method ] : يتم بناء الدقائق من ذرات الغاز أو السوائل بالاعتماد على التحولات الذرية ( Atomic transformation ) أو تكثيف الجزيئات (Molecular condensations) .



الشكل 3 : أهم أنواع الدقائق النانوية (Buzea et al., 2007)

على الرغم من وجود تقنيات مختلفة لتصنيع الدقائق النانوية إلا أن هناك خصائص مشتركة بين جميع الطرائق إذ ينبغي تحضير هذه الدقائق باستخدام أدوات أو عمليات تحقق المتطلبات الآتية (Horikoshi and Serpone , 2013 ) :

- السيطرة على حجم الدقائق ( Particle size ) وتوزيع الحجم ( Size distribution ) والشكل ( Shape ) والتركيب البلوري ( Crystal structure ) .
- تحسين نقاوة الدقائق النانوية ( شوائب أقل ) .
- السيطرة على التجمع ( Aggregation ) .
- ثبات الخصائص الفيزيائية و التركيب و المتفاعلات .
- تكرارية عالية ( Higher reproducibility ) .
- زيادة كتلة الإنتاج وخفض التكاليف .

## 3-6-1 الحوامل النانوية

أستخدمت الدقائق النانوية كحوامل للأدوية (Drug carrier). ويجب أن تتوفر بعض الشروط في الحوامل النانوية المستخدمة في الطب منها أن تكون متوافقة حيويًا (Biocompatible) [ أي لها القابلية على الاندماج مع النظام البيولوجي دون ظهور أي استجابة مناعية أو تأثيرات سلبية ] وغير سامة (Non toxic) للنظام البيولوجي. إن التأثيرات المرغوبة للجزيئات النانوية تعتمد بشدة على حجم وشكل وكمية وكيمياء السطح لهذه الجزيئات وطريقة تجريعها وتفاعلها مع النظام المناعي فضلاً عن مدة بقائها في مجرى الدم (Ai et al., 2011) إن الجزيئات النانوية المقبولة في النظام البيولوجي هي التي تتراوح أقطارها بين ( 10 – 100 ) نانومتر إذ أنها تحظى بخصائص صيدلانية مثالية بينما الجزيئات التي تكون أقطارها أصغر من هذا الحد يمكن أن تتعرض إلى نضح خارج الأنسجة ويتم تصفيتها في الكلى فيما تكون الجزيئات الكبيرة هدفاً للخلايا البلعمية (Macrophages) التي تقوم بابتلاعها وتخليص مجرى الدم منها (Cole et al., 2011).

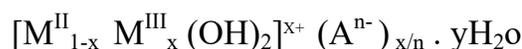
يمكن تصنيف الحوامل النانوية عموماً إلى ( Pandey and Khuller, 2006 ) :

- 1- حوامل نانوية طبيعية ( Natural nanocarriers ): مثل اللابوسومات ( Liposomes ) وحامض الالجنيك ( Alginic acid ) والجيلاتين ( Gelatin ) و الدكستريينات ( Dextrines ) .....الخ .
- 2- حوامل نانوية مصنعة (Synthetic nanocarriers): مثل Poly glycolic acid (PGA) و Poly lactic acid (PLA) , Poly (DL-lactide-co-glycolide) (PLG) و Polyanhydrides و Polymethyl acrylates .....الخ .

## 1-3-6-1 الطبقات ثنائية الهيدروكسيد (Layered Double Hydroxide , LDH)

تصنف الطبقات ثنائية الهيدروكسيد LDHs ضمن المعادن الطينية ذات الأيونات السالبة (Anionic clay minerals) وقد تكون ذات أصل طبيعي أو مُصنعة ( Synthetic ) وأكثر أطياف LDH المتواجدة في الطبيعة هي الهيدروتالسايت ( Hydrotalcite ) التي تمتلك الصيغة الكيميائية  $Mg_6 Al_2(OH)_{16} CO_3O . 4 H_2O$  . وهو أول معادن هذه المجموعة الذي تم دراسة تركيبه وخصائصه

بشكل موسع ، وبذلك فإن الطبقات ثنائية الهيدروكسيد تُعرف أيضاً بالمواد الشبيهة بالهيدروتالساييت (Hydrotalcite-like compound) والصيغة الكيميائية العامة للطبقات ثنائية الهيدروكسيد هي :



إذ أن  $M^{II}$  تمثل الايونات الموجبة ثنائية التكافؤ مثل  $Mg^{2+}$  و  $Zn^{2+}$  و  $Ca^{2+}$  ، بينما  $M^{III}$  تمثل الايونات الموجبة ثلاثية التكافؤ مثل  $Al^{3+}$  و  $Cr^{3+}$  و  $Fe^{3+}$  و  $Co^{3+}$  ، في حين أن  $A^{n-}$  تمثل أيونات سالبة الشحنة مثل  $Cl^-$  و  $CO_3^-$  و  $NO_3^-$  ، وتحل الايونات السالبة المنطقة البينية لهذه المواد الطبقية البلورية . (Cavani *et al.*, 1991 )

تم تطوير طرائق عدة لتصنيع الطبقات ثنائية الهيدروكسيد هي :

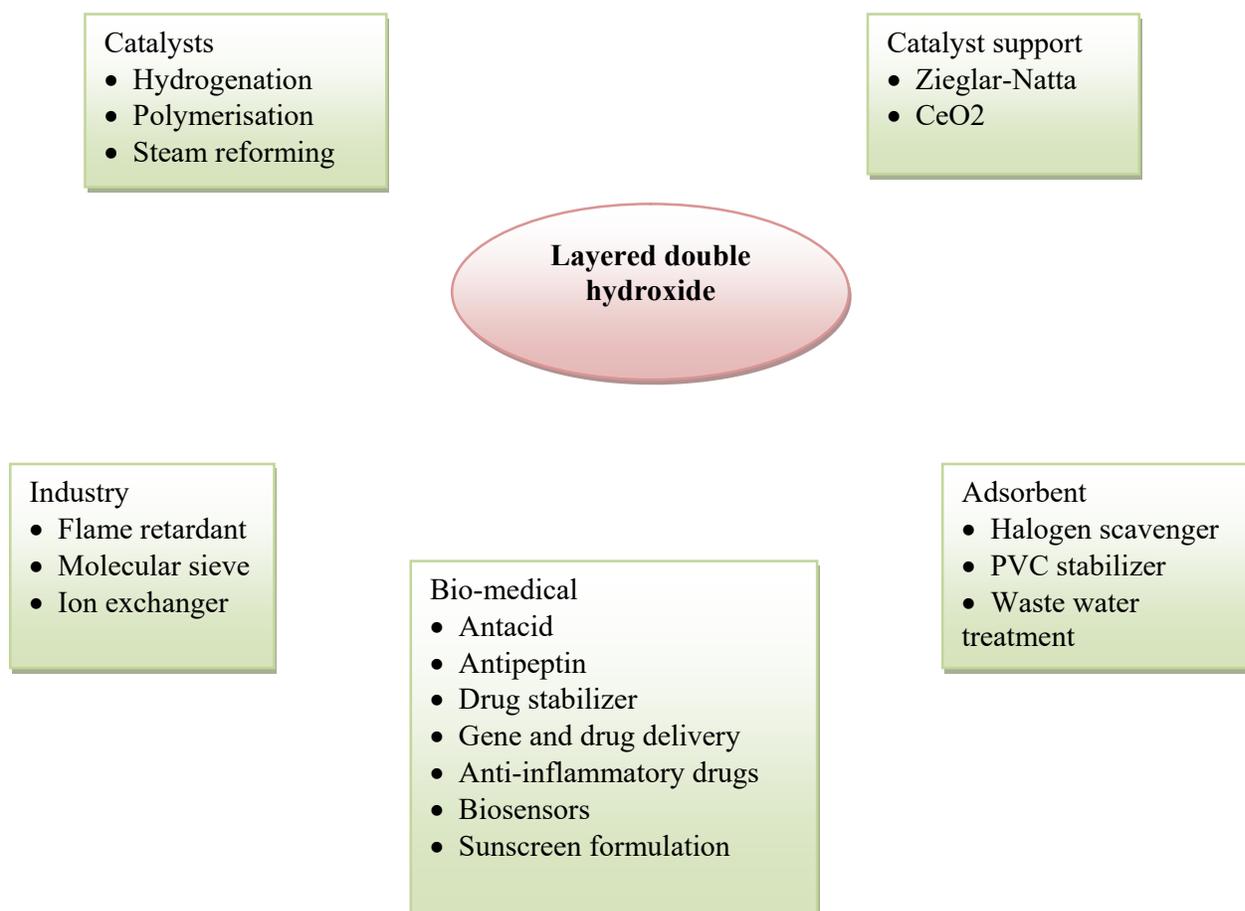
- A. الترسيب المشترك ( Co – precipitation ) .
- B. طريقة اليوريا ( Urea method ) .
- C. طريقة الهلام ( Sol gel method ) .
- D. طريقة الأشعة المايكروية ( Microwave irradiation method ) .
- E. طريقة المعادن القلوية ( Alkali metal method ) .

ولكل طريقة مميزاتها ومساوئها عند مقارنتها بالطرائق الاخرى وتعد طريقة الترسيب المشترك من أبسط

الطرائق وأكثرها شيوعاً لتحضير الطبقات ثنائية الهيدروكسيد ( Lv *et al.*, 2006 ; Olf *et al.*, 2009; ) . (Othman *et al.*, 2009 )

تمتلك LDH مزايا عديدة منها تراكيبها الكيميائية المتناسقة (Tunable chemical compositions) ونقاوتها وعدم سميتها ووجود كمية كبيرة من الماء محصورة في تركيبها فضلاً عن إمكانية تحويلها بأستخدام عدد كبير من الايونات السالبة العضوية وغيرها ، كما أن الطبقات ثنائية الهيدروكسيد التي تحتوي على المغنيسيوم والالمنيوم تستخدم كمضادات للحموضة ( Antiacid ) ومضادات للبيسين ( Antipepsin ) لذا فإن

LDH متوافقة حيوياً ( Biocompatibile ) ، أن تلك الميزات جعلتها مؤهلة للدخول في العديد من التطبيقات المختلفة وحسب ما هو موضح في المخطط 1 ( Reny , 2007 ; Nalawade *et al.*, 2009 ) .



مخطط 1 : المجالات المختلفة لتطبيقات المواد ثنائية طبقات الهيدروكسيد LDH (Reny , 2007)

# الفصل الثاني

## المواد وطرائق العمل

## *Materials & Methods*

## 2- المواد وطرائق العمل

## 1-2 المواد والاجهزة المستخدمة :

## 1-1-2 الاجهزة المستخدمة والشركات المصنعة لها

الشركة المصنعة	اسم الجهاز	ت
AFM model ,AA3000 Advanced Angstrom Inc,USA	Scan prob microscope	1
Angstrom Advanced Inc.	المجهر الالكتروني الماسح Scanning Electron Microscope ( S.E.M AIS 2300C)	2
Binder – Germany	حاضنة ( Incubator )	3
Denver – Germany	ميزان حساس ( Sensitive balance )	4
Euro EA 3000	جهاز تحليل العناصر الدقيق Elemental analyzer	5
GFL-Germany	جهاز تقطير ( Distiller )	6
Hettich – Germany	جهاز طرد مركزي ( Centrifuge )	7
Human-Germany	ماصات دقيقة ( Micropipettes )	8
Jeio-Tech-Korea	هود بايلوجي ( Laminar flow cabinet )	9
Jenway-Germany	مصباح بنزن ( Bunsen burner )	10
Labtech-Korea	جهاز مزج ذو الصفيحة الساخنة (Magnetic stirrer with hot plate)	11
Labtech-Korea	حاضنة هزازة ( Shaker incubator )	12
Labtech-Korea	مؤسدة Autoclave	13
LG-Korea	ثلاجة ( Refrigerator )	14
Mauritius-Germany	جهاز قياس الرقم الهيدروجيني ( pH-meter )	15
Motic-Germany	المجهر الضوئي ( Light microscope )	16
Perkin-Elmer 1725x-Japan	مطياف الاشعة تحت الحمراء Fourier Transform	17

	Infrared Spectrophotometer (FT-IR)	
ROMA-Italy	مازج (Vortex)	18
Shimadzu XRD-6000 powder diffractometer Japan	مطياف حيود الأشعة السينية (X-Ray) Diffraction	19
Shimadzu -1800 Japan	مطياف الأشعة المرئية – فوق البنفسجية (UV- Visible spectrophotometer)	20
Tafesa - Germany	حمام مائي (Water path)	21
Tudor-Korea	مطياف ضوئي (Spectrophotometer)	22

2-1-2 المواد الكيميائية والأوساط الزراعية المستخدمة والشركات المصنعة لها :

الشركة المصنعة	اسم المادة	ت
Analytical Rasayan	حامض الهيدروكلوريك (HCl)	1
BDH	Sodium dodecyl sulfate (SDS)	2
BDH	كربونات الصوديوم $Na_2CO_3$	3
BDH	رباعي مثيل بارافينيلين ثنائي امين ثنائي هيدروكلورايد (Tetramethyl P-phenylen diamine dihydrochloride)	4
BDH	كليسيرول (Glycerol)	5
BDH	كلوريد الباريوم (Barium chloride)	6
BDH	كبريتات الحديدوز المائية Ferrous sulfate hydrate ( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ )	7
BDH	Aluminum (III) Nitrate nine hydrate	8
BDH	Magnesium (II) Nitrate hexa hydrate	9
Bioanalyse	اقراص المضادات الحيائية	10

Biomerieux	عدة التشخيص ( Api 20 E )	11
Biomerieux	عدة التشخيص ( Api Candida )	12
Fluka	فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	13
GCC-UK	حامض الخليك الثلجي ( CH <sub>3</sub> COOH )	14
GCC-UK	Folin- Ciocalteu	15
Himedia-India	المطهر Chlorhexidine	16
Himedia	حامض التانيك (Tannic acid)	17
Himedia	ABTS(2,2'-azinobis-3 ethylbenzothiazoline 6-sulfonic acid)C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub> S <sub>4</sub>	18
Himedia	Ferrozine	19
Himedia	وسط الكروم الصلب ( CHROM agar )	20
Himedia	وسط (Blood agar base)	21
Himedia	وسط (MacConkey agar)	22
Himedia	وسط ( Nutrient agar )	23
Himedia	وسط ( Nutrient broth )	24
Himedia	وسط Trypton	25
Himedia	Agar powder	26
Himedia	وسط Muller- Hinton agar	27
Himedia	وسط Brain – Heart infusion broth	28
Himedia	وسط Sabouraud dextrose agar	29
Loba Chemie	Dimethyl sulfoxide (DMSO)	30
Lab M limited (UK)	وسط Kligler iron agar	31

Oxoid	وسط Mannitol salt agar	32
Schorlau- European Union	هيدروكسيد الصوديوم NaOH	33
Scharlau-European Union	ايتانول مطلق (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH)	34
Schorlau- European Union	هيدروكسيد البوتاسيوم KOH	35
SEARLE	حامض الكبريتيك المركز (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	36
Sigma-Aldrich	مضاد الاكسدة القياسي Trolox	37
Thomas Baker -India	كلوريد الصوديوم (NaCl)	38
معهد المصول واللقاح العراقية (VSI)	بيروكسيد الهيدروجين 3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	39
معهد المصول واللقاح العراقية (VSI)	كاشف الاوكسيديز	40
معهد المصول واللقاح العراقية (VSI)	صبغة كرام (Gram stain)	41

## 2-2- طرائق العمل:

### 2-2-1- جمع عينات الحروق :

لغرض عزل الأحياء المجهرية المسببة لخمج الحروق جُمعت 32 مسحة قطنية من المرضى المصابين بالحروق الراقدين في وحدة الحروق التابعة لمدينة الأمام الحسين (ع) الطبية في محافظة كربلاء المقدسة .

تم الاستعانة بالعاملين في ردهات الحروق في جمع العينات من كلا جنسي المصابين وحسب الطريقة الموصوفة من قبل Church *et al.* (2006) مع بعض التحوير، إذ تم أخذ المسحة من الحروق بعد إزالة الضمادات والمواد الموضعية المضادة للاحياء المجهرية فضلاً عن تنظيف سطح الجرح .

2-2-2- الاوساط الزرعية المستخدمة في عزل وتشخيص البكتريا المسببة لخمج الحروق :

#### ❖ وسط Blood agar base :

حضر هذا الوسط بحسب تعليمات الشركة المجهزة وذلك بإذابة 40 غم في لتر من الماء المقطر و عقم بالمؤصدة وبعد اكمال عملية التعقيم برد الى درجة (45-50) م° وأضيف إليه دم الإنسان بنسبة (3-5)% , استخدم هذا الوسط وسطاً أغنائياً في عزل وتشخيص البكتريا , فضلاً عن ملاحظة مناطق تحلل الدم (Hemolysis) للكشف عن إنتاج البكتريا للإنزيم حال الدم (Hemolysin).

#### ❖ وسط MacConkey agar :

حضر هذا الوسط بحسب تعليمات الشركة المجهزة , وذلك بإذابة 51.5 غم في لتر من الماء المقطر و عقم بالمؤصدة ، استخدم هذا الوسط لعزل البكتريا السالبة لصبغة غرام وتشخيصها من حيث قابليتها على تخمير سكر اللاكتوز .

#### ❖ وسط Mannitol salt agar :

حضر هذا الوسط بحسب تعليمات الشركة المجهزة , وذلك بإذابة 108 غم في لتر من الماء المقطر و عقم بالمؤصدة ، استخدم هذا الوسط لعزل المكورات العنقودية وتشخيصها من حيث قابليتها على تحمل ملوحة الوسط فضلاً عن قابليتها على تخمير سكر المانيتول وتحويل لون الوسط الى الاصفر.

#### ❖ وسط Nutrient agar :

حضر هذا الوسط بحسب تعليمات الشركة المجهزة , وذلك بإذابة 28 غم في لتر من الماء المقطر و عقم بالمؤصدة ، استخدم هذا الوسط في تنمية وحفظ العزلات وإدامتها ودراسة الخواص الزرعية والمظهرية للبكتريا.

## ❖ وسط Muller- Hinton agar :

حضر هذا الوسط بحسب تعليمات الشركة المجهزة , وذلك بإذابة 38 غم من الوسط في لتر من الماء المقطر . عقم الوسط باستخدام المؤصدة وبعد اكمال عملية التعقيم برد الى درجة (45-50) °م وتم صبه في أطباق بتري معقمة. وقد استخدمت الاطباق لتنمية العزلات البكتيرية لغرض اختبار فحص الحساسية للمضادات الحيوية.

## ❖ وسط Kligler iron agar :

حضر هذا الوسط بحسب تعليمات الشركة المجهزة , وذلك بإذابة 49 غم من الوسط المغذي السائل في لتر من الماء المقطر ووزع في انابيب وعقم بالمؤصدة وبعد إكمال عملية التعقيم وضعت الأنابيب بشكل مائل لعمل Slant . استخدم هذا الوسط لاختبار قابلية البكتريا على تخمير سكر الكلوكوز و اللاكتوز و انتاج غاز كبريتيد الهيدروجين ( H<sub>2</sub>S ) و ثاني اوكسيد الكربون (CO<sub>2</sub>) .

## ❖ وسط Sabouraud dextrose agar :

حضر هذا الوسط بحسب تعليمات الشركة المجهزة , وذلك بإذابة 65 غم في لتر من الماء المقطر وعقم بالمؤصدة ، استخدم هذا الوسط لعزل الخمائر.

## ❖ وسط CHROM agar :

تم تحضير هذا الوسط وفقا لتعليمات الشركة المجهزة وذلك بتعليق 42.72 غم من الاكار في 1 لتر من الماء المقطر، وبعدها تم تسخين المحلول لدرجة الغليان لإذابة الوسط بالكامل، بعدها تم تبريده الى 50 °م لغرض إضافة مدعمات الوسط CHROM agar supplement ، استخدم هذا الوسط لتشخيص الخمائر .

## ❖ وسط Semi solid :

حضر هذا الوسط بإذابة 10 غم من التربتون (Tryptone) و 5 غم من كلوريد الصوديوم و 5 غم من الأكار (Agar) . وأذيبت المواد سوياً في لتر من الماء

المقطر ثم وزع في انابيب اختبار زجاجية بواقع 5 مليلتر للأنبوبة وعقم بالمؤصدة .  
استخدم هذا الوسط للكشف عن قابلية البكتريا على الحركة .

#### ❖ وسط Brain – Heart infusion broth :

حضر هذا الوسط بحسب تعليمات الشركة المجهزة , وذلك بإذابة 37غم من  
الوسط المغذي السائل في لتر من الماء المقطر ووزع في انابيب وعقم بالمؤصدة . وقد  
استخدم هذا الوسط لغرض تنمية وتنشيط البكتريا فضلا عن استخدامه لحفظ العزلات  
البكتيرية وذلك بإضافة 15% كليسيرول الى 85 % من الوسط السائل بعد تعقيمه.

#### ❖ وسط Nutrient broth :

حضر هذا الوسط بحسب تعليمات الشركة المجهزة , وذلك بإذابة 13 غم من الوسط  
المغذي السائل في لتر من الماء المقطر ووزع في انابيب وعقم بالمؤصدة . وقد استخدم هذا  
الوسط لغرض تنمية وتنشيط البكتريا.

#### 2-2-3- الكواشف والمحاليل المستخدمة في عزل وتشخيص البكتريا المسببة لخمج الحروق :

##### • كاشف الكاتليز (Catalase reagent) :

استخدمت مادة بيروكسيد الهيدروجين بتركيز 3% للتحري عن قابلية البكتريا  
على انتاج انزيم الكاتليز (Tille, 2014) .

##### • كاشف الاوكسيديز (Oxidase reagent):

حضر الكاشف أنياً بإذابة 1 غم من مادة رباعي مثيل بارافينيلين ثنائي امين ثنائي  
هيدروكلورايد (Tetramethyl P-phenylen diamine dihydrochloride) في 100 مل  
من الماء المقطر في قنينة معتمدة. استخدم هذا الكاشف في التحري عن قابلية البكتريا على إنتاج  
إنزيم الاوكسيديز (Macfaddin,2000) .

- صبغة كرام (Gram stain):

استخدم هذا الملون لدراسة الخصائص المظهرية للبكتريا المعزولة .

- المحلول الملحي الفسيولوجي (Normal saline):

حضر بإذابة 0.85 غم من كلوريد الصوديوم في 50 مل ماء مقطر , وبعد اتمام عملية الاذابة اكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر ايضا.

- محلول ماكفرلاند ( أنبوب رقم 0.5 ) Macfarland solution :

حضر هذا المحلول بحسب الطريقة الموصوفة من قبل (Tille, 2014) إذ يتكون من محلولين:

A- محلول كلوريد الباريوم (1.175%) : أذيب 1.175 غم من كلوريد الباريوم في كمية من الماء المقطر وبعد اتمام الاذابة أكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر.

B- محلول حامض الكبريتيك (1%) : أضيف 1 مل من حامض الكبريتيك المركز الى 99 مل من الماء المقطر .

حضر محلول مكفرلاند (انبوبة رقم 0.5 ) وذلك باضافة 0.5 مل من محلول A الى 99.5 مل من محلول B ومزج المحلول جيداً للحصول على العكورة المطلوبة التي تعادل  $10^8 \times 1.5$  وحدة مكونة للمستعمرة/ مل (CFU/ mL).

- محلول ماكفرلاند ( أنبوب رقم 3 ) Macfarland solution :

تم تحضيره وفقا للطريقة الموصوفة من قبل المنظمة البريطانية للعلاج الكيميائي المضاد للمكروبات ( British Society for Antimicrobial Chemotherapy, BSAC ) لعام 2013 حيث تم إضافة 0.3 مل من كلوريد الباريوم (0.048M)  $BaCl_2$  الى 9.7 مل من حامض الكبريتيك (0.18M)  $H_2SO_4$  و تم مزجها جيدا للحصول على العكورة المطلوبة التي تعادل  $10^8 \times 9$  وحدة مكونة للمستعمرة/ مل (CFU/ mL) .

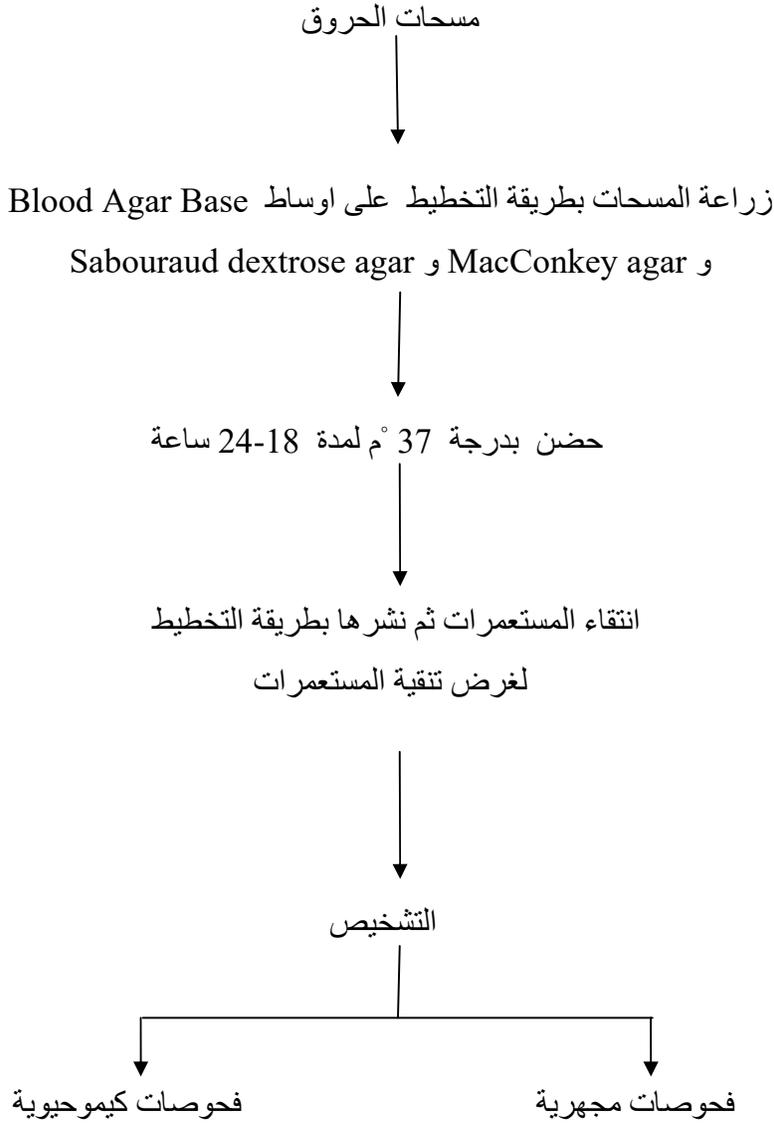
## • المضادات الحيوية

استخدمت اقراص المضادات الحيوية المجهزة من شركة Bio-analyse والتي شملت:

التركيز mcg	الرمز	اسم المضاد	ت
30	TE	Tetracycline	1
100/10	TPZ	Piperacillin-Tazobactam	2
30	NET	Netilmicin	3
5	CFM	Cefixime	4
30	CRO	Ceftriaxon	5
10	TOB	Tobramycin	6
30	AV	Vancomycin	7
2	CD	Clindamycin	8
10	IPM	Imipenem	9
30	CAZ	Ceftazidime	10
5	CIP	Ciprofloxacin	11
30	AK	Amikacin	12
30	CTX	Cefotaxime	13
10 unit	P	Pencillin	14
15	AZM	Azithromycin	15
30	AZT	Aztreonam	16
15	E	Erythromycin	17
30	FOX	Cefoxitin	18
20/10	AMC	Amoxicillin-Clavulanic Acid	19
100	PIP	Piperacillin	20
10	CN	Gentamycine	21

## 2-2-4- عزل وتشخيص البكتريا المسببة لخمج الحروق :

يمكن ايجاز عملية العزل والتشخيص وفق المخطط 2 :-



المخطط 2: عزل وتشخيص الاحياء المجهرية المسببة لخمج الحروق

**2-2-4-1- تمميز البكتريا السالبة عن الموجبة لصبغة كرام :****أختبار هيدروكسيد البوتاسيوم (KOH test) :**

أجري هذا الأختبار بمزج عروة كاملة من المستعمرات النامية على وسط Blood agar الصلب مع كمية من هيدروكسيد البوتاسيوم KOH بتركيز 3 % على شريحة زجاجية نظيفة . أن تكون مادة هلامية خلال 60 ثانية دليل على ايجابية الفحص و أن البكتريا تكون سالبة لصبغة كرام ( Markey et al., 2013 ) .

**2-2-4-2- عزل وتشخيص بكتريا Pseudomonas :**

تم تمميز المستعمرات الشبيهة بمستعمرات بكتريا Pseudomonas اذ تم تشخيصها من خلال تنميتها بدرجة 42 م° فضلاً عن الفحوصات المجهرية والاختبارات الكيموحيوية الآتية :-

**2-2-4-2-1- الفحوصات المجهرية (Microscopic tests) :****• تصبغ البكتريا :**

تم انتقاء المستعمرات النامية على وسط MacConkey agar الصلب وتم تصبيغها بصبغة كرام للتعرف على شكل الخلايا وتجمعاتها .

**2-2-4-2-2- الفحوصات الكيموحيوية ( Biochemical tests ) :****• اختبار الكاتليز (Catalase test):**

اجري هذا الاختبار بمزج مستعمرة بكتيرية بعمر (18-24) ساعة مع قطرة من كاشف بيروكسيد الهيدروجين 3 % على شريحة زجاجية نظيفة . ان ظهور الفقاعات دليل على ايجابية الفحص (Tille, 2014) .

• اختبار الاوكسيديز (Oxidase test) :

تم نقل مستعمرة بكتيرية بعمر (18-24) ساعة بواسطة عود خشبي معقم (stick) الى ورقة ترشيح واضيف لها قطرة من كاشف الاوكسيديز , مع الاحتكام الى ان تحول لون المستعمرة الى اللون البنفسجي الغامق دليل على ايجابية الفحص (Tille, 2014) .

• اختبار الحركة (Motility test):

لقت الانابيب الحاوية على وسط اختبار الحركة بمزارع عمرها 24 ساعة بطريقة الطعن باستعمال الإبرة (Needle) وحضنت لمدة (18-24) ساعة . إن انتشار النمو حول محور الطعنة دلالة على قابلية البكتريا على الحركة (Hart and Shears, 2004) .

• الكشف عن إنتاج كبريتيد الهيدروجين (Production of hydrogen sulfite):

لقت الانابيب الحاوية على وسط Kligler iron agar بمزارع عمرها 24 ساعة بطريقة الطعن وحضنت لمدة (24-48) ساعة, وسجلت نتائج تخمر سكر الكلوكوز واللاكتوز وتكوين الراسب الاسود (Hart and Shears, 2004) .

• تشخيص البكتريا باستخدام عدة التشخيص API 20E :

A- تحضير اللقاح :

حضر المزروع البكتيري بنقل عدد من مستعمرات العزلات النامية على وسط الماكونكي إلى 5 مليلتر من دارئ الفوسفات الملحي المحضر مسبقا في أنبوبة نظيفة ومعقمة , وتم رجها جيداً للحصول على عكورة ملائمة .

B- اجراء الفحص :

- 1- حضرت حافظة الحزن ( incubation box ) وذلك بإضافة كمية قليلة من الماء المقطر في الحفر ( Grooves ) لجعل الظروف رطبة .
- 2- تم تعليم الحافظة بكتابة اسم البكتريا او العزلة على جانب الحافظة .

- 3- لفتح الشريط باستخدام ماصة باستور نظيفة ومعقمة , إذ تم ملئ الجزء السفلي Tube والجزء العلوي Cupule بالعالق البكتيري في حالة الفحوصات VP ، GEL ، CIT ، بينما في حالة الفحوصات ADH ، H<sub>2</sub>S ، URE ، LDC ، ODC تم ملئ الجزء السفلي بالعالق البكتيري في حين تم ملئ الجزء العلوي بزيت البارافين السائل المعقم لجعل الظروف لا هوائية فيما اقتصرت بقية الفحوصات على ملئ الجزء السفلي فقط بالعالق البكتيري , بعدها اغلقت الحافظة بالغطاء الخاص بها.
- 4- تمت قراءة النتائج بعد مدة حضن (18-24) ساعة بدرجة حرارة 37°م , وسجلت نتائج الاختبارات في الأنابيب التي لا تحتاج إلى إضافة الكواشف مباشرة فيما أضيفت الكواشف للأنابيب التي تحتاج للإضافة بحسب تعليمات الشركة المجهزة وتم تحديد ايجابية الاختبار من عدمه على وفق الجدول الاتي:

ت	نوع الاختبار	الرمز	الاستجابة السالبة	الاستجابة الموجبة
-1	$\beta$ -galactosidase(Ortho NitroPhenyl- $\beta$ D-Galactopyranosidase)	ONPG	Colorless	Yellow
-2	Arginine DiHydrolase	<u>ADH</u>	Yellow	Red-Orange
-3	Lysine Decaroxylase	<u>LDC</u>	Yellow	Red-Orange
-4	Omithine Decarboxylase	<u>ODC</u>	Yellow	Red-Orange
-5	Citrate utilization	<u>CIT</u>	Pale Green-Yellow	Blue Green-Blue
-6	H <sub>2</sub> S production	<u>H<sub>2</sub>S</u>	Colorless-greyish	Black deposite- thin line
-7	UREase	<u>URE</u>	Yellow	Red-Orange
-8	Tryptophane DeAmminase	TDA	Yellow	Reddish brown
-9	INDole production	IND	Colorless-pale green-yellow	Pink
-10	Acetoin production (Voges Proskauer)	<u>VP</u>	Colorless-pale pink	Pink-Red

Diffusion of black pigment	No diffusion	GEL	GE <sub>L</sub> atinase	-11
Yellow-Gryeish yellow	Blue-Blue-green	GLU	Fermentation – oxidation(GLU <sub>c</sub> ose)	-12
Yellow	Blue-Blue-green	MAN	Fermentation – oxidation(MAN <sub>n</sub> itol)	-13
Yellow	Blue-Blue-green	INO	Fermentation – oxidation(INO <sub>s</sub> itol)	-14
Yellow	Blue-Blue-green	SOR	Fermentation – oxidation(SOR <sub>b</sub> itol)	-15
Yellow	Blue-Blue-green	RHA	Fermentation – oxidation(RHA <sub>m</sub> nose)	-16
Yellow	Blue-Blue-green	SAC	Fermentation – oxidation(SA <sub>C</sub> harose)	-17
Yellow	Blue-Blue-green	MEL	Fermentation – oxidation(MEL <sub>i</sub> biose)	-18
Yellow	Blue-Blue-green	AMY	Fermentation – oxidation(AMY <sub>g</sub> dalin)	-19
Yellow	Blue-Blue-green	ARA	Fermentation – oxidation(ARA <sub>b</sub> inose)	-20

### 3-4-2-2 عزل وتشخيص بكتريا *Acinetobacter* :

تم تمييز المستعمرات الشبيهة بمستعمرات بكتريا *Acinetobacter* اذ تم تشخيصها اعتمادا على الفحوصات المجهرية والاختبارات الكيموحيوية المستخدمة في تشخيص بكتريا *Pseudomonas* الفقرة (2-4-2-2).

### 4-4-2-2 عزل وتشخيص بكتريا *Klebsiella* :

تم تمييز المستعمرات الشبيهة بمستعمرات بكتريا *Klebsiella* اذ تم تشخيصها اعتمادا على الفحوصات المجهرية والاختبارات الكيموحيوية المستخدمة في تشخيص بكتريا *Pseudomonas*.

**2-2-4-5 عزل وتشخيص بكتريا *Proteus* :**

تم تمييز المستعمرات الشبيهة بمستعمرات بكتريا *Proteus* اذ تم تشخيصها اعتمادا على الفحوصات المجهرية والاختبارات الكيموحيوية المستخدمة في تشخيص بكتريا *Pseudomonas*.

**2-2-4-6 عزل وتشخيص بكتريا *Escherichia coli* :**

تم تمييز المستعمرات الشبيهة بمستعمرات بكتريا *E. coli* و تم تشخيصها اعتمادا على الفحوصات المجهرية والاختبارات الكيموحيوية المستخدمة في تشخيص بكتريا *Pseudomonas*.

**2-2-4-7 عزل وتشخيص بكتريا *Serratia* :**

تم تمييز المستعمرات الشبيهة بمستعمرات بكتريا *Serratia* اذ تم تشخيصها اعتمادا على الفحوصات المجهرية والاختبارات الكيموحيوية المستخدمة في تشخيص بكتريا *Pseudomonas*.

**2-2-4-8 عزل وتشخيص بكتريا *Chryseobactirum* :**

تم تمييز المستعمرات الشبيهة بمستعمرات بكتريا *Chryseobactirum* اذ تم تشخيصها اعتمادا على الفحوصات المجهرية والاختبارات الكيموحيوية المستخدمة في تشخيص بكتريا *Pseudomonas*.

**2-2-4-9 عزل وتشخيص بكتريا *Staphylococcus* :**

تم تمييز المستعمرات الشبيهة بمستعمرات المكورات العنقودية *Staphylococcus* spp. والتي ظهرت على اكار الدم خلال 24 ساعة من الحضان بدرجة 37°م , اذ تم تشخيصها اعتمادا على الفحوصات المجهرية والاختبارات الكيموحيوية الاتية :-

**1-9-4-2-2 الفحوصات المجهرية (Microscopic tests) :****• تصبغ البكتريا :**

تم انتقاء المستعمرات النامية على وسط Blood agar الصلب وتم تصبغها بصبغة كرام للتعرف على شكل الخلايا وتجمعاتها .

**2-9-4-2-2 الفحوصات الكيموحيوية ( Biochemical tests ) :****• اختبار الكاتليز ( Catalase test ) و الاوكسيديز (Oxidase test)**

اجري هذان الاختباران بحسب الطريقة الموصوفة في تشخيص بكتريا *Pseudomonas* .

**• الزرع على وسط Mannitol salt agar :**

استخدم هذا الوسط لعزل المكورات العنقودية الذهبية وتشخيصها من حيث قابليتها على تحمل ملوحة الوسط , فضلا عن قابليتها على تخمير سكر المانيتول وتحويل لون الوسط الى الاصفر (Tille, 2014) .

**• اختبار انزيم التجلط ( Coagulase test ) :**

تم اختبار العينات باستخدام بلازما الانسان إذ تم وضع 0.5 مل من البلازما في انابيب معقمة ثم نقلت مستعمرة بكتيرية بعمر (18-24) ساعة بواسطة عروة ( loop ) الى الانابيب الحاوية على البلازما ومزجت جيدا ثم حضنت بدرجة حرارة (35-37) °م لمدة 4 ساعات . ان حصول التجلط دلالة على ايجابية الفحص (Tille, 2014) .

**5-2-2 عزل وتشخيص خميرة Candida :**

تم تمييز المستعمرات الشبيهة بمستعمرات الخميرة اذ تم تشخيصها باستخدام عدة التشخيص API Candida بحسب تعليمات الشركة المجهزة ،فضلاً عن زراعتها على وسط CHROM agar .

• تشخيص الخميرة باستخدام عدة التشخيص API Candida

A- تحضير اللقاح :

حضر المزروع بنقل 3-5 مستعمرات من العزلات النامية على اكار الدم إلى 5 مليلتر من دارى الفوسفات الملحي المحضر مسبقا في أنبوبة نظيفة ومعقمة , وتم رجها جيداً للحصول على عكورة تعادل 3 ماكفر لاند .

B- اجراء الفحص :

- 1- حضرت حافظة الحضان ( incubation box ) وذلك بإضافة كمية قليلة من الماء المقطر في الحفر ( Grooves ) لجعل الظروف رطبة .
- 2- تم تعليم الحافظة بكتابة اسم العزلة على جانب الحافظة .
- 3- لقح الشريط باستخدام ماصة باستور نظيفة ومعقمة ، إذ تم ملئ الجزء السفلي باللقاح المحضر اعلاه اعقب ذلك غلق الحافظة بالغطاء الخاص بها . وحضنت النماذج بدرجة (37-35) م° لمدة 18-24 ساعة ، جرى بعد ذلك قراءة النتائج .

2-2-6 اختبار حساسية البكتريا المعزولة للمضادات الحيوية :

استخدمت طريقة انتشار الأقراص (Disk diffusion test) لتحديد حساسية البكتريا المعزولة للمضادات الحيوية على وفق ما جاء في (Morello *et al.*, 2006) بحسب الخطوات الاتية :-

- 1- حضنت الأنابيب الحاوية على المزروع البكتيري السائل بدرجة 37 م° لمدة 24 ساعة.
- 2- نقل جزء من المزروع السائل (0.1 مل) إلى أنابيب تحوي المحلول الملحي الفسلجي , وقورنت عكورة النمو مع عكوره محلول ثابت العكورة القياسي ( McFarland standard 0.5 ) والذي يعطي عدداً تقريبياً للخلايا  $1.5 \times 10^8$  وحدة تكوين مستعمرة / مليلتر .

- 3- نقل 100 مايكرو ليتر من العالق البكتيري بوساطة الماصة الدقيقة (Micropipette), ثم نشر بوساطة الناشر الزجاجي على سطح وسط أكار مولر – هنتون بصورة متجانسة ، بعدها تركت الأطباق لتجف في درجة حرارة الغرفة لمدة 10-15 دقيقة.
- 4- نقلت أقراص المضادات الحيوية بوساطة ملقط معقم إلى الأطباق ، ثم حضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 °م لمدة 24 ساعة.
- 5- تم قراءة النتائج بقياس قطر مناطق التثبيط بالملم حول أقراص المضادات الحيوية .

### 7-2-2 حفظ وإدامة العزلات :

تم حفظ العزلات لفترة قصيرة الامد و ذلك بزرعها في انابيب اختبار مائلة (Slants) حاوية على الوسط المغذي الصلب , و تحضن لمدة 18 ساعة لتتميتها في درجة حرارة 37 °م و بعدها حفظت بالثلجة , اذ يتم تجديد المزارع كل شهر , كما تم حفظها لفترة طويلة الامد باستخدام الوسط المغذي السائل Brain heart infusion broth المدعم بـ 15% من الكليسيرونول .

### 8-2-2 تحضير المركبات النانوية الهجينة المستخدمة في هذه الدراسة

تم استخدام المادة المطهرة الكلور هكسدين وحامض التانيك (Tannic acid) في تحضير المركبات النانوية الهجينة .

### 1-8-2-2 تحضير المضيف او الحامل (Host or Carrier)

- المحاليل المستخدمة :

محلول رقم (1): محلول نترات المغنسيوم  $(0.5M) Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$

حضر هذا المحلول بإذابة 32.05 غم من نترات المغنسيوم في كمية من الماء المقطر المزال منه الايونات ،وبعد اتمام عملية الاذابة اكمل الحجم الى 250 مل بالماء المقطر المزال منه الايونات ايضا.

### محلول رقم (2): محلول نترات الالمنيوم $(0.125M) Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$

حضر هذا المحلول بإذابة 11.72 غم من نترات الالمنيوم في كمية من الماء المقطر المزال منه الايونات ،وبعد اتمام عملية الاذابة اكمل الحجم الى 250 مل بالماء المقطر المزال منه الايونات ايضا.

### محلول رقم (3): محلول هيدروكسيد الصوديوم ( 2 M , NaOH )

حضر هذا المحلول بإذابة 4 غم من هيدروكسيد الصوديوم في كمية من الماء المقطر المزال منه الايونات ،وبعد اتمام عملية الاذابة اكمل الحجم الى 50 مل بالماء المقطر المزال منه الايونات ايضا .

#### • طريقة التحضير:

تحضير طبقات المغنسيوم \ الالمنيوم ثنائية الهيدروكسيد  $Mg/Al-NO_3-LDH$  بوساطة

الترسيب المشترك (Co-precipitation) :

تم تحضير طبقات المغنسيوم \ الالمنيوم ثنائية الهيدروكسيد بوساطة الترسيب المشترك على وفق الطريقة الموصوفة من قبل ( Klemkaite et al.(2011) مع بعض التحوير وذلك بمزج محلول نترات المغنسيوم المائية مع محلول نترات الالمنيوم المائية، إذ تم الترسيب عند الرقم الهيدروجيني 10.5 وذلك بإضافة قطرات من محلول هيدروكسيد الصوديوم بتركيز 2 مولاري مع استمرار تحريك المزيج مغناطيسيا لمدة ساعتين اعقبه وضع المزيج في الحاضنة عند درجة حرارة 70 °م لمدة 18 ساعة ثم فصل الراسب بوساطة جهاز الطرد المركزي بسرعة 5000 دورة / دقيقة ولمدة 20 دقيقة ومن ثم غسل بالماء

المقطر المزال منه الايونات مرات عدة وبعدها جفف عند درجة حرارة 60 °م ثم طحن جيداً للحصول على مسحوق ناعم تم تخزينه في الثلاجة .

### 2-8-2-2 تحضير محلول الكلور هكسدين :

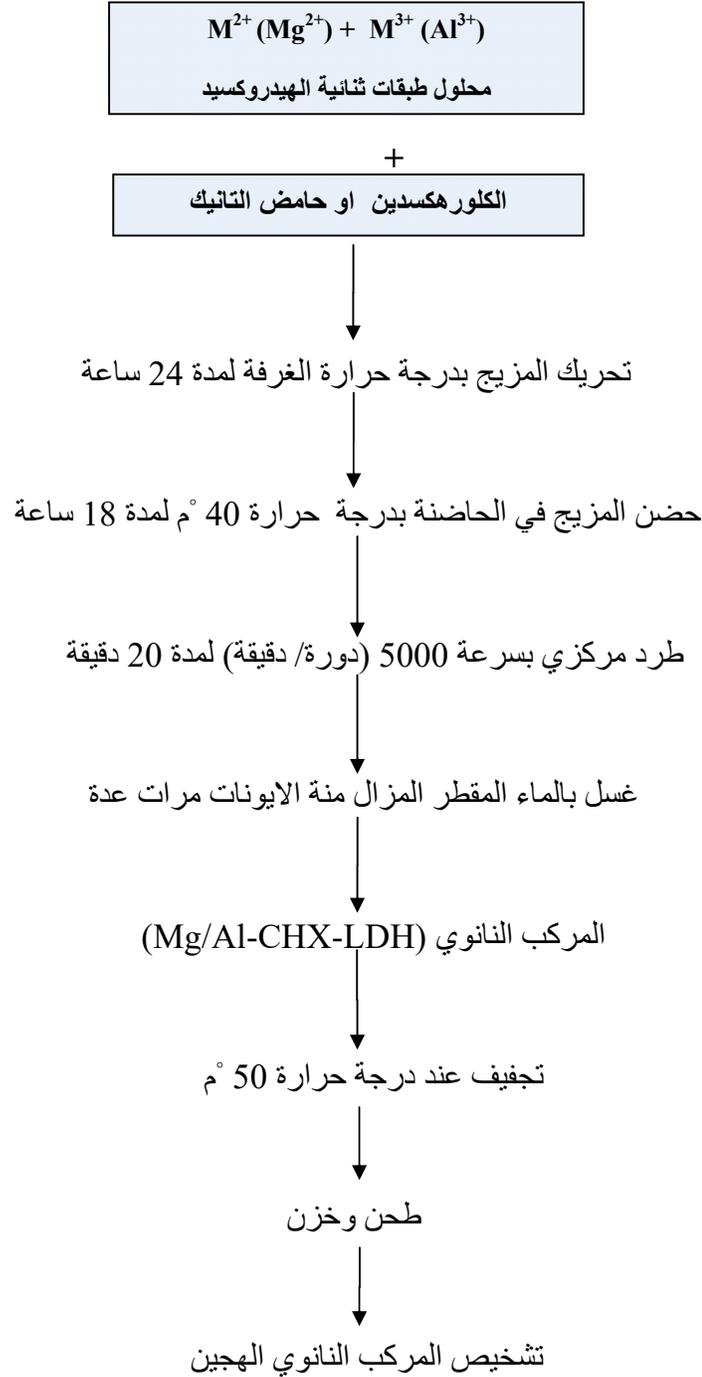
حضر هذا المحلول بإذابة 1.2غم من الكلور هكسدين في كمية من الماء المقطر المزال عنه الايونات , وبعد اتمام عملية الاذابة اكمل الحجم الى 50 مل بالماء المقطر المزال منه الايونات ايضا .

• تحضير المركب النانوي الهجين من طبقات المغنسيوم \ الالمنيوم ثنائية الهيدروكسيد (Mg/Al-NO<sub>3</sub>LDH) مع الكلور هكسدين بطريقة التبادل الايوني المباشر :

اتبعت الطريقة الموصوفة من قبل Bashi *et al.*(2013) مع بعض التحوير في تحضير المركب النانوي الهجين وذلك بإضافة 50 مل من الكلور هكسدين المحضر اعلاه الى محلول الطبقات الثنائية الهيدروكسيد (الناتج عن اذابة 1 غم من راسب الطبقات الثنائية الهيدروكسيد في 50 مل من الماء المقطر المزال منه الايونات ) وحرك المزيج مغناطيسياً بدرجة حرارة الغرفة لمدة 24 ساعة ثم وضع المزيج في الحاضنة عند درجة حرارة 40°م لمدة 18 ساعة اعتقبه ، فصل الراسب بواسطة جهاز الطرد المركزي بسرعة 5000 دورة / دقيقة ولمدة 20 دقيقة ومن ثم غسل بالماء المقطر المزال منه الايونات مرات عدة وبعدها جفف الراسب عند درجة 50 °م وتم طحنة بالهاون الخزفي واخيراً خزنه كما هو موضح في المخطط 3 .

### 3-8-2-2 تحضير حامض التانيك النانوي (Tannic acid) :

تم تحضير حامض التانيك النانوي من طبقات المغنسيوم \ الالمنيوم ثنائية الهيدروكسيد Mg/Al-NO<sub>3</sub>LDH مع حامض التانيك بطريقة التبادل الايوني المباشر وبحسب الخطوات المتبعة في تحضير المركب النانوي من المادة المطهرة الكلور هكسدين.



المخطط 3 : تحضير المركبين النانويين الهجينين Mg/Al-CHX-LDH و Mg/Al-TA-LDH

بطريقة التبادل الايوني المباشر

### 9-2-2 تشخيص المركبات النانوية الهجينة :

تم استخدام اربع طرائق لتشخيص المركبات النانوية الهجينة قيد الدراسة ، اشتملت هذه الطرائق على طيف الاشعة تحت الحمراء ( Fourier Transform Infrared ) وطيف حيود الاشعة السينية ( X-Ray diffraction, XRD ) فضلا عن استخدام مجهري القوة الذري ( Atomic Force Microscope, AFM ) والالكتروني الماسح ( Scanning Electron Microscope, SEM ) .

#### 1-9-2-2 التشخيص باستخدام طيف الاشعة تحت الحمراء FT-IR

تم دراسة طيف الاشعة تحت الحمراء لكل مركب من المركبات النانوية الهجينة قيد الدراسة وكذلك حامض التانيك والكلوروكسدين بشكلهما الحر فضلا عن طبقات ثنائية الهيدروكسيد, اذ تم عمل قرص من كل مركب من هذه المركبات مع بروميد البوتاسيوم (KBr) بعد طحنها بصورة جيدة وتم قياس طيف الاشعة تحت الحمراء في مدى من الاعداد الموجية (400- 4000) سم<sup>-1</sup> وتم تثبيت جميع الحزم الظاهرة مع اعدادها الموجية كما تم تشخيص معظم الحزم الرئيسية .

#### 2-9-2-2 التشخيص باستخدام طيف حيود الاشعة السينية XRD

تم تشخيص المركبات النانوية الهجينة باستخدام طيف حيود الاشعة السينية (X-Ray) والذي يوضح الاختلاف في سمك الطبقة قبل عملية الاقحام وبعدها لكل من حامض التانيك والكلوروكسدين وذلك باستخدام قانون براك  $n\lambda = 2d\sin\theta$  لاستخراج قيمة سمك الطبقة (d) قبل عملية الاقحام وبعدها.

إذ ان :

n : رتبة المستوى البلوري الذي يكون منه حيود للأشعة السينية

$\lambda$  : الطول الموجي للأشعة السينية المستخدمة ( أنبوبة نحاس )

$\theta$  : زاوية الحيود للأشعة السينية

d : المسافة البلورية العمودية بين مستويين متوازيين

### 2-2-9-3 التشخيص باستخدام مجهر القوة الذرية AFM

استخدم مجهر القوة الذرية في فحص المركبين النانويين Mg/Al-CHX-LDH و Mg/Al-TA-LDH وقياس اقطار وحجوم وتجمعات الجزيئات النانوية ، اذ تم ارسال النموذجين الى د. عبد الكريم السامرائي / كلية العلوم / جامعة بغداد لغرض فحصهما .

### 2-2-9-4 التشخيص باستخدام المجهر الالكتروني الماسح SEM

تم فحص المركبين النانويين Mg/Al-CHX-LDH و Mg/Al-TA-LDH بالمجهر الالكتروني الماسح لغرض معرفة شكل السطح للمركبين قيد الدراسة ، اذ تم ارسال النموذجين الى جامعة بغداد / كلية التربية ابن الهيثم / المختبر الخدمي المركزي لغرض فحص النماذج المشار اليها .

### 2-2-10 التحليل الدقيق لعناصر C, H, N للمادة المطهرة كلورهكسدين

تم تقدير نسب العناصر C, H, N للمادة المطهرة كلورهكسدين بحالتها الحرة والنانوية الهجينة لتحديد نسبة المضاد الداخل في الحامل (Carrier).

### 2-2-11 تقدير كمية حامض التانيك :

تم تقدير حامض التانيك بطريقة تقدير المحتوى الفينولي الكلي الموصوفة من قبل Budrat and Shotipruk (2008) مع بعض التحوير وذلك لتحديد نسبة الحامض الداخلة في الحامل ، وكالاتي :

• عمل المنحني القياسي :

1- المحاليل المستخدمة :

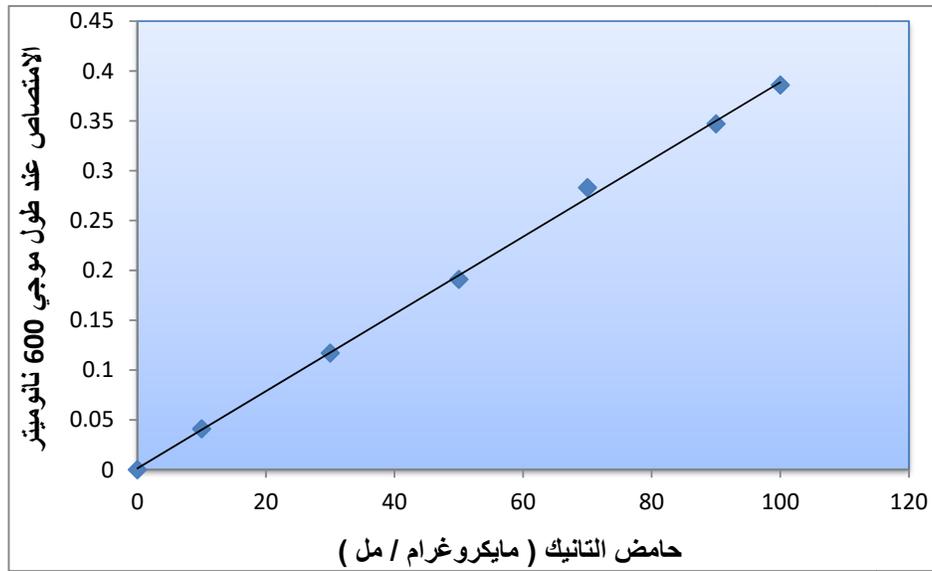
- محلول رقم (1)- محلول حامض التانيك بتركيز 100 مايكروغرام/ مل .  
 أذيب 10 ملغم من حامض التانك الحر في كمية مناسبة من 50 % (DMSO) Dimethyl sulfoxide وبعد اتمام الاذابة أكمل الحجم الى 100مل بنفس المذيب .
- محلول رقم (2)- محلول فولن – سيوكالتيو 50 % .  
 أضيف 2 مل من كاشف فولن الى 2 مل ماء مقطر للحصول على تركيز 50 % .
- محلول رقم (3)- كاربونات الصوديوم بتركيز 7% .  
 أذيب 7 غرام من كاربونات الصوديوم في كمية من الماء المقطر وبعد أتمام عملية الاذابة أكمل الحجم الى 100مل بالماء المقطر .

تم تحضير تراكيز متدرجة من حامض التانيك الحري حسب الجدول الاتي :-

التركيز النهائي ( مايكروغرام/ مل )	50 % ( DMSO ) ( مل )	حامض التانيك ( مل )	رقم الانبواب
0.0	1.0	0.0	1
10	0.9	0.1	2
30	0.7	0.3	3
50	0.5	0.5	4
70	0.3	0.7	5
90	0.1	0.9	6
100	0.0	1.0	7

## 2- طريقة التقدير:

- 1- أضيف 7.5 مل ماء مقطر الى 1.0 مل من كل من التراكيز المذكورة اعلاه ووضعت في انابيب اختبار سعة 10 مل .
- 2- أضيف 0.5 مل من محلول فولن- سيوكالتيو الى كل أنبوبة .
- 3- أضيف 1 مل من محلول كاربونات الصوديوم ( 7% ) واكمل الحجم بالماء المقطر ليصبح الحجم 10 مل .
- 4- حضن المزيج بدرجة حرارة الغرفة لمدة 30 دقيقة وتم قياس الامتصاص على الطول الموجي 600 نانوميتر الشكل 4 .



الشكل 4 : المنحنى القياسي لحامض التانيك لتقدير الفينولات الكلية بطريقة Folin-Ciocalteu

## 12-2-2 دراسة تحرر المركبين النانويين Mg/Al-CHX-LDH و Mg/Al-TA-LDH

### 1- المحاليل المستخدمة :

**محلول رقم (1) : محلول هيدروكسيد الصوديوم (2M) NaOH**

حضر هذا المحلول بإذابة 4 غم من هيدروكسيد الصوديوم في كمية من الماء المقطر المزال منه الايونات وبعد اتمام عملية الاذابة اكمل الحجم الى 50 مل بالماء المقطر المزال منه الايونات ايضا.

**محلول رقم (2) : محلول حامض الهيدروكلوريك (2M) HCl**

حضر هذا المحلول بمزج 4.2 مل من حامض الهيدروكلوريك المركز مع كمية من الماء المقطر المزال من الايونات ومن ثم اكمل الحجم الى 50 مل بالماء المقطر المزال منه الايونات ايضا .

**محلول رقم (3) : محلول منظم الفوسفات (0.1M , pH=7.4)**

حضر هذا المحلول بإذابة 1.36 غم من مادة فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين في كمية من الماء المقطر المزال من الايونات وبعد تعديل الرقم الهيدروجيني إلى 7.4 أكمل الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر المزال منه الايونات أيضا .

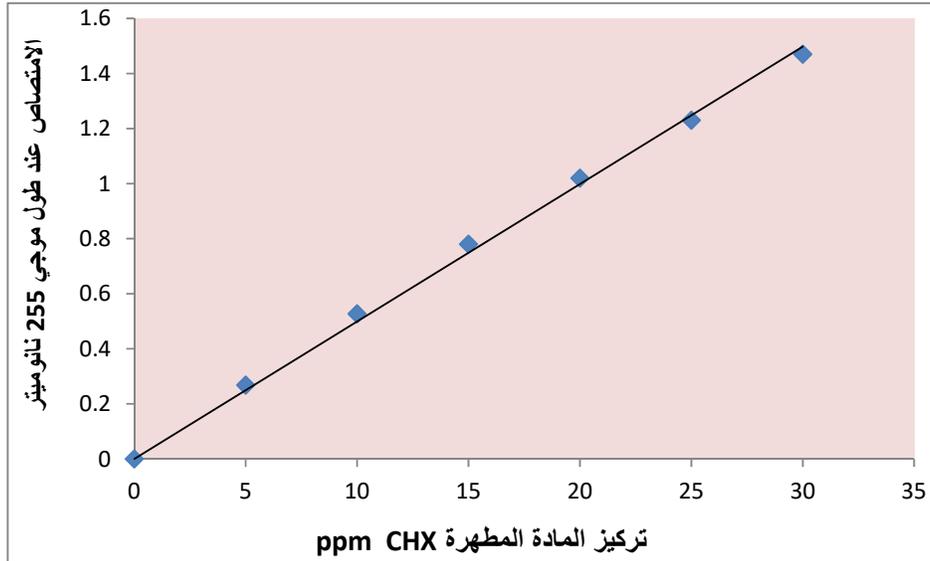
**2-12-2-2 تعيين منحنى المعايرة (Calibration Curve) للكلور هكسدين :**

تم تعيين منحنى المعايرة الذي يمثل العلاقة بين الامتصاص والتركيز عن طريق تحضير ستة تراكيز متتابعة ضمن المدى (5-30 ppm) من محلول الكلور هكسدين المستخدم في الدراسة وتم قياس الامتصاص لهذه التراكيز عند الطول الموجي الأعظم ( $\lambda_{max}$ ) للكلور هكسدين والذي يبلغ 255 نانوميتر بعدها رُسم المنحنى القياسي بين الامتصاص والتركيز كما مبين في الشكل 5 ومن معادلة الخط المستقيم التالية  $Y = mx + b$  يتم تعيين منحنى المعايرة.

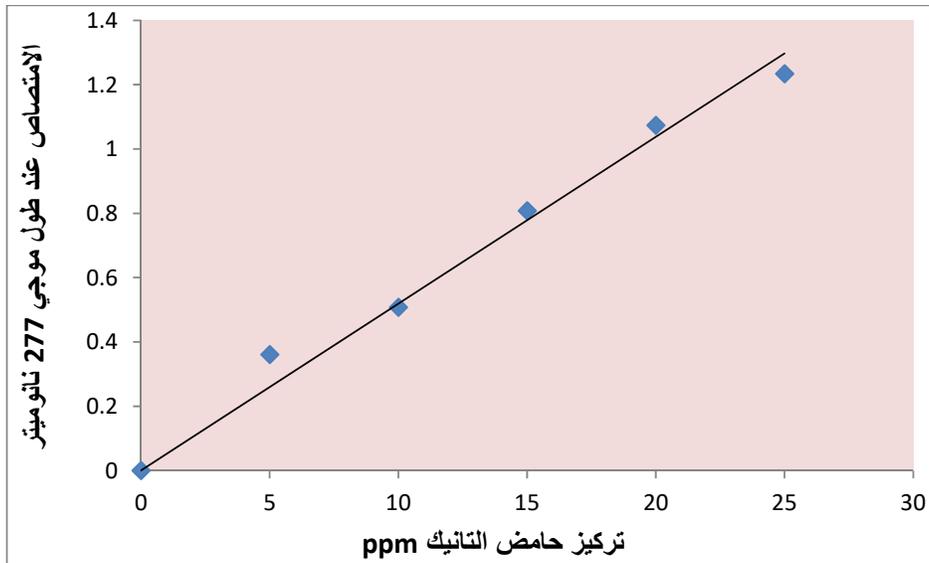
**2-12-2-2 تعيين منحنى المعايرة (Calibration Curve) لحامض التانيك :**

تم تعيين منحنى المعايرة حسب الطريقة الموصوفة في تعيين منحنى المعايرة للكلور هكسدين وتم قياس الامتصاص عند الطول الموجي الأعظم ( $\lambda_{max}$ ) لحامض التانيك الذي

يبلغ 277 نانوميتر وبعدها رُسم المنحنى القياسي بين الامتصاص والتركيز كما مبين في الشكل 6 ومن معادلة الخط المستقيم التالية  $Y = mx + b$  يتم تعيين منحنى المعايرة.



الشكل 5 : منحنى المعايرة لمحلول المادة المطهرة الكلور هكسدين (CHX) .



الشكل 6 : منحنى المعايرة لمحلول حامض التانيك

### 2-2-12-3 طريقة تحرر المركبين النانويين الكلوروكسدين وحامض التانيك الى المحلول المنظم :

تم دراسة تحرر المركبين النانويين الكلوروكسدين وحامض التانيك من المضيف (طبقات ثنائية الهيدروكسيد) الى محلول منظم الفوسفات (pH=7.4) ، وقد تم استخدام مطياف الاشعة فوق البنفسجية - المرئية في هذه الدراسة إذ تم تعيين الطول الموجي الأعظم لكل من الكلوروكسدين وحامض التانيك وتم عمل منحنى المعايرة وتعيين معادلة الخط المستقيم .

اتبعت الطريقة الموصوفة من قبل (Abdeen and Salahuddin (2013) في دراسة تحرر المركبين النانويين الكلوروكسدين وحامض التانيك الى المحلول المنظم المشار اليه أعلاه وذلك بإضافة 30 ملغم من كل من المركبين النانويين الهجينين (كلاً على إنفراد) الى 150 مل من المحلول المنظم المستخدم في الدراسة إذ تمت متابعة عملية التحرر خلال فترات زمنية (0.25 و 0.5 و 1 و 2 و 3 و 4 و 5 و 25 و 26) ساعة إذ تم سحب 1.5 مل من المركب المتحرر و غُوض عنه بإضافة 1.5 مل من المحلول المنظم ، ودرست عملية التحرر من خلال زيادة مقدار الامتصاص بدلالة الزمن استناداً الى قانون بير.

### 2-2-12-4 دراسة النسب المئوية لتحرر المركبين النانويين الكلوروكسدين وحامض التانيك من بين طبقات المركبين النانويين الهجينين :

تم متابعة دراسة النسبة المئوية لتحرر المركبين الكلوروكسدين وحامض التانيك (كلاً على انفراد) بوساطة مطياف الاشعة فوق البنفسجية - المرئية (Uv-Visible) وذلك بإضافة 1 ملغم من المركب النانوي الهجين الى 5 مل من محلول حامض الهيدروكلوريك (2 مولاري) وتم قياس الامتصاص لها عند قيمة الامتصاص العظمى لكل مركب منهما لمعرفة التركيز الكلي للمركب داخل الطبقة (CT) وبقسمة التركيز عند كل زمن (Ct) المستخرجة في الفقرتين (1-12-2) و (2-12-2) على التركيز الكلي وحسب المعادلة الآتية يتم حساب النسب المئوية للتحرر .

$$\text{Release}\% = \frac{Ct}{CT} \times 100 \dots\dots(1)$$

كما تم دراسة مسار التحرر لتحديد الرتبة التي يسلكها هذا المسار. فاذا كان المسار المذكور يستند إلى موديل الرتبة الأولى الكاذبة فإنه يخضع للمعادلة الآتية :

$$\text{Log} (1- Ct/ CT) = K_1t/ 2.303 \dots\dots\dots(2)$$

بينما في حالة سلوكه الرتبة الثانية الكاذبة فإنه يخضع للمعادلة الآتية :

$$t/ Ct = 1/ K_2CT^2 + t/ CT\dots\dots\dots(3)$$

إذ أن :

t: زمن التحرر

Ct : التحرر عند زمن t

CT : التحرر الكلي عند زمن ∞

K1 : ثابت السرعة للرتبة الأولى

K2 : ثابت السرعة للرتبة الثانية

## 2-2-13 الفعالية التثبيطية للمادة المطهرة كلوروكسدين ضد الأنواع المعزولة في هذه الدراسة

### العزلات المستخدمة في الدراسة :

استخدمت 22 عزلة بكتيرية من العزلات المسببة لخمج الحروق بالإضافة الى عزلة واحدة من الخمائر والتي تم عزلها في هذه الدراسة وذلك لاختبار الفعالية التثبيطية للمادة المطهرة كلوروكسدين بشكله الحر والنانوي الهجين .

**A- تحضير اللقاح البكتيري :**

تم تحضير اللقاح بنقل 3- 5 مستعمرات لها الصفات المظهرية نفسها نامية على وسط Nutrient Agar بوساطة Loop إلى أنبوبة تحوي 5 مللتر من الوسط Nutrient Broth . حضنت الأنابيب الحاوية على المزروع البكتيري السائل بدرجة 37 °م لمدة 24 ساعة. نقل بعد ذلك جزء من المزروع السائل إلى أنابيب تحوي المحلول الملحي الفسلجي , وقورنت عكورة النمو مع عكورة محلول ثابت العكورة القياسي (McFarland standard 0.5) , والذي يعطي عدداً تقريبياً للخلايا  $1.5 \times 10^8$  وحدة تكوين مستعمرة / مليلتر.

**B- تحضير لقاح الخميرة :**

تم تحضير لقاح الخميرة بالطريقة الواردة نفسها في تحضير اللقاح البكتيري عدا كون مستعمرات الخميرة منماة على وسط Sabouraud dextrose agar بدلاً من Nutrient agar .

**C- طريقة تقدير الفعالية التثبيطية للمادة المطهرة قيد الدراسة:**

تم اختبار الفعالية التثبيطية للمركب النانوي الهجيني Mg/Al- Chlorhexidine -Layered double hydroxide (Mg/Al- CHX -LDH) والمركب Chlorhexidine (CHX) الحر ضد العزلات المتحصل عليها في هذه الدراسة وبتراكيز (0.01, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 5) ملغم / مل على وفق طريقة الانتشار في الاكار بوساطة الحفر (Egorove, 1985) بحسب الآتي :

1- سحب 0.1 مل من اللقاح المحضر , و اضيف الى اطباق حاوية على وسط Muller Hinton agar الصلب وتم نشره جيداً على سطح الطبق بوساطة الناشر L-Shape و تركت الاطباق مدة ساعة في الثلاجة .

2- تم عمل حفر على سطح الاكار باستخدام الثاقب الفليني ذو قطر 5 ملم اذ كانت المسافة متساوية بين حفرة و اخرى.

- 3- خفف مركب الكلور هكسدين الحر والنانوي الهجين باستعمال المذيب Dimethyl sulfoxide (DMSO) للحصول على تراكيز متدرجة تراوحت بين (0.01 - 5) ملغم/مل .
- 4- وضع 60 مايكروليتر من كل تركيز من تراكيز المركبات قيد الدراسة في كل حفرة و وضعت لمدة ساعة في الثلاجة ، و من ثم حضنت في الحاضنة بدرجة حرارة 37 °م لمدة 24 ساعة.
- 5- تم قياس اقطار تثبيط نمو البكتريا (ملم) باستعمال المسطرة بعد اكمال فترة الحضانة .

## 2-2-14 تقدير الفعالية المضادة للأكسدة لمركب حامض التانيك النانوي

### 2-2-14-1 تقدير الفعالية المضادة للأكسدة بطريقة مسح الجذور الحرة (Free Radicals Scavenging)

استخدمت الطريقة الموصوفة من قبل (Budrat and Shotipruk (2008) مع بعض

التحوير بحسب الآتي :-

#### 1- المحاليل المستخدمة :

#### محلول رقم (1): محلول هيدروكسيد البوتاسيوم (0.1M)

حضر هذا المحلول بإذابة 0.5611غم من هيدروكسيد البوتاسيوم في كمية من الماء

المقطر وبعد اتمام الاذابة اكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر ايضا.

#### محلول رقم (2): محلول خلات البوتاسيوم (0.1M)

حضر هذا المحلول بمزج 1.2 مل من حامض الخليك الثلجي مع كمية من الماء المقطر

المزال منه الايونات وعدل الرقم الهيدروجيني الى 4.7 باستعمال محلول هيدروكسيد البوتاسيوم

المحضر أعلاه ثم اكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر المزال منه الايونات ايضا .

محلول رقم (3) : محلول

(2,2-azionbis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonicacid (ABTS)(1Mm)

الحاوي على Potassium persulfate(2.45mM)

حضر هذا المحلول بإذابة 0.132غم من بيرسلفات البوتاسيوم في كمية من محلول خلات البوتاسيوم 0.1 مولر ثم اضيف 0.11 غم من الجذر ABTS الى المحلول وبعد اتمام عملية الاذابة اكمل الحجم الى 100 مل باستعمال خلات البوتاسيوم .

## 2- طريقة التقدير:

1- تم عمل سلسلة من التخفيف للمركب النانوي الهجين Mg-Al-TA-LDH اضافة الى المضاد القياسي Trolox وحمض التانيك الحر باستخدام المذيب Dimethyl sulfoxide (انحصرت تراكيز المركبات قيد الدراسة بين 0.015 - 1 ملغم /مل) .

2- خفف محلول ABTS ليعطي امتصاصا مقداره  $(0.7 \pm 0.02)$  عند طول موجي 734 نانوميتر بعد تصفير الجهاز بمحلول خلات البوتاسيوم المنظم , ثم اضيف 3 مل من المحلول اعلاه الى 0.3 مل من كل تركيز من تراكيز المركبات المستخدمة في الدراسة .

3- رجت الانابيب باستخدام جهاز المازج (Vortex) وحضن المزيج بدرجة حرارة الغرفة لمدة 10 دقائق .

4- تم قياس الامتصاص بطول الموجي 734 نانوميتر .

قدرت نسبة تثبيط الجذر ABTS بحسب المعادلة الآتية :

$$PI (\%) = [1 - (At / Ar)] * 100$$

اذ ان At و Ar هما امتصاصيتي العينة و ABTS، على التوالي .

2-14-2-2 تقدير الفعالية المضادة للأكسدة بقياس القوة الاختزالية المضادة للأكسدة لأيون

### الحديد (FRAP) Ferric Reducing Antioxidant power

قدرت القوة الاختزالية وفقا للطريقة الموصوفة من قبل (Benzin and Strain (1996

و (Katalinic *et al.*(2005 بحسب الاتي :

#### 1- عمل المنحنى القياسي :

##### • المحاليل المستخدمة :

محلول رقم (1): محلول (TPTZ) 2,4,6-Tripyridyl-s-Triazine (10mM)

حضر هذا المحلول بإذابة 0.0312غم من مادة TPTZ في 5 مل من حامض الهيدروكلوريك (40 ملي مولر) وبعد اتمام عملية الاذابة اكمل الحجم الى 10 مل بحامض الهيدروكلوريك ايضا.

محلول رقم (2) : محلول كلوريد الحديدك (FeCl<sub>3</sub>(20mM)

حضر هذا المحلول بأذابة 0.162غم من كلوريد الحديدك في كمية من الماء المقطر المزال منه الايونات وبعد اتمام عملية الاذابة اكمل الحجم الى 50 مل بالماء المقطر المزال منه الايونات ايضا.

محلول رقم (3): محلول منظم خلات الصوديوم (0.3M)

حضر هذا المحلول بمزج 1.714 مل من حامض الخليك الثلجي مع كمية من الماء المقطر وعدل الرقم الهيدروجيني الى 3.6 باستعمال محلول هيدروكسيد الصوديوم ثم اكمل الحجم الى 100مل بالماء المقطر.

محلول رقم (4): محلول كاشف Frap

حضر هذا المحلول بمزج المحاليل الثلاثة اعلاه بنسبة 10:1:1 .

محلول رقم (5): محلول كبريتات الحديد سباعية جزئ الماء  $(1\text{mM}) \text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   
 حضر هذا المحلول بإذابة 0.0278 غم من كبريتات الحديد سباعية جزئ الماء في كمية من الماء المقطر وبعد اتمام عملية الاذابة اكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر المزال منه الايونات ايضا.

## 2- طريقة التقدير

1- حضرت تراكيز متدرجة من محلول كبريتات الحديد سباعية جزئ الماء انحصرت بين (1-0.1) ملي مولاري كما هو موضح في الجدول الاتي:

التركيز النهائي (mM)	حجم الماء المقطر (مل)	حجم محلول $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1mM) (مل)	رقم الانبوب
0.1	0.9	0.1	1
0.3	0.7	0.3	2
0.5	0.5	0.5	3
0.7	0.3	0.7	4
0.9	0.1	0.9	5
1.0	0.0	1.0	6

2- اضيف 3.6 مل من كاشف Frap الى 200 مايكروليتر من كل تركيز من تراكيز محلول كبريتات الحديد سباعية جزئ الماء.

- 3- مزجت المحاليل جيداً وتركت بدرجة حرارة الغرفة لمدة 4 دقائق .
- 4- تم قراءة الامتصاص عند طول موجي 593 نانوميتر بعد تصفير جهاز المطياف بالمحلول المتكون من مزج 200 مايكروليتر من خلات الصوديوم مع 3.6 مل من كاشف Frap.
- 5- استحصل المنحنى القياسي من رسم الامتصاص عند الطول الموجي 593 نانوميتر مقابل تراكيز الكبريتات .

قدرت الفعالية المضادة للأكسدة للمركبات قيد الدراسة بعمل سلسلة من التراكيز لهذه المركبات (انحصرت بين 0.015 - 1 ملغم/مل) ثم اكملت بقية خطوات التقدير بطريقة عمل المنحنى القياسي بنفسها .

## 15-2-2 التحليل الاحصائي ( Statistical Analysis )

خلت النتائج احصائياً بهدف معرفة الفروقات المعنوية بين معدل التثبيط للعوامل المدروسة ضد الانواع المعزولة في هذه الدراسة و تمثلت العوامل بالكلوروكسدين الحر والنانوي الهجين والعزلات والتراكيز المستعملة من المركبين المدروسين , وقد حددت الفروق المعنوية على مستوى احتمالية 0.05 اذ شمل التحليل الاحصائي تحليل تجارب العاملية  $6 \times 8 \times 2$  للجدول (23) و  $6 \times 4 \times 2$  للجدولين (24 و 25) و  $6 \times 2$  للجدول (26 و 27 و 28 و 29 و 31) و  $6 \times 2 \times 2$  للجدول (30) وبمكررين , كما تم اختبار الفروق المعنوية بين المتوسطات باستعمال اختبار اقل فرق معنوي LDS وعلى مستوى احتمالية 0.05 (الامام , 2007) .

# الفصل الثالث

## النتائج والمناقشة

## *Results & Discussion*

## 3- النتائج والمناقشة

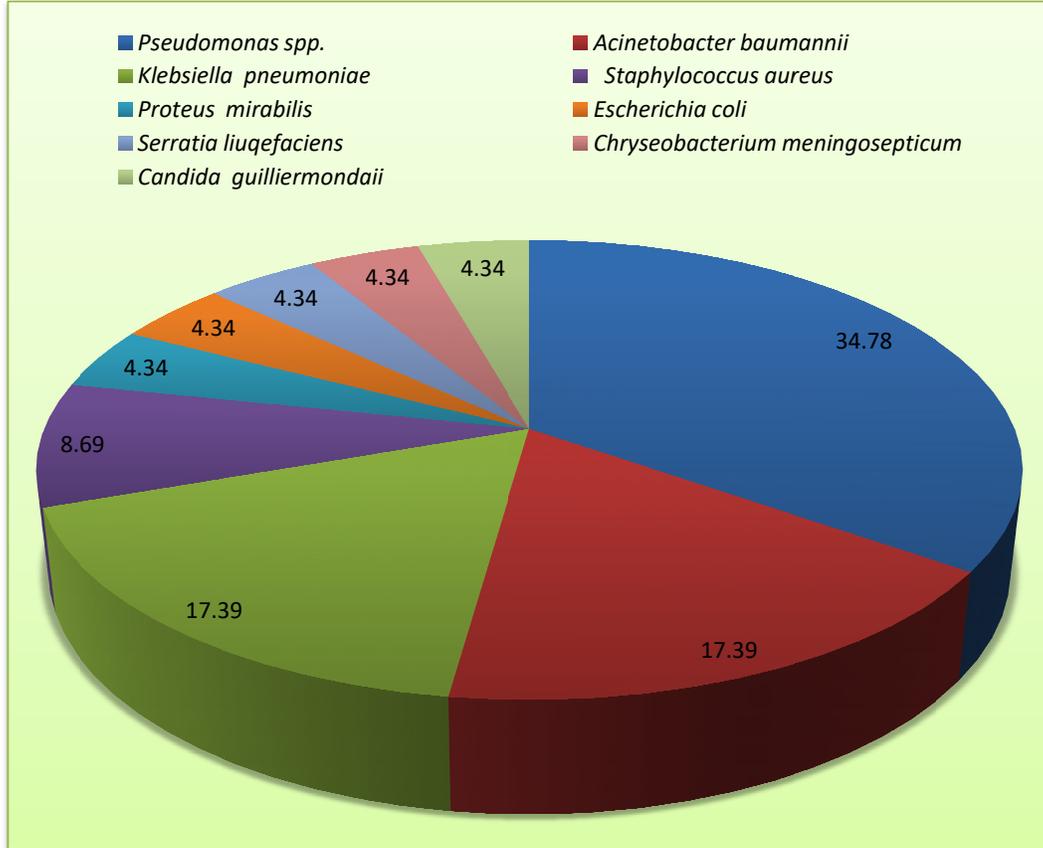
## 1-3 عزل وتشخيص الأحياء المجهرية المسببة لخمج الحروق

بعد زرع العينات المتحصل عليها من مرضى الحروق على وسطي أكار الدم والماكونكي والسابرويد تم الحصول على 22 عزلة بكتيرية فضلاً عن عزلة واحدة من الخمائر. ادت عملية معاملة العزلات البكتيرية بمحلول هيدروكسيد البوتاسيوم (3%) عن الحصول على 20 عزلة سالبة لصبغة كرام أي بنسبة (90.9%) من مجموع البكتريا المعزولة فضلاً عن عزلتين موجبتين لهذه الصبغة أي بنسبة (9.09%) من مجموع البكتريا المعزولة في هذه الدراسة ايضاً ، واعتماداً على نتائج التشخيص التي سيرد ذكرها لاحقاً ، أسفرت عملية العزل عن الحصول على 8 عزلات (34.78%) من جنس *Pseudomonas* كانت 7 منها *Pseudomonas aeruginosa* وواحدة *Pseudomonas oryzihabitans* و 4 عزلات *Klebsiella* (17.39%) و 4 عزلات *Acinetobacter baumannii* (17.39%) و *pneumoniae* وعزلة واحدة (4.34%) من كل من *Proteus mirabilis* و *Escherichia coli* و *Serratia liquefaciens* و *Chryzeobacterium meningosepticum* وعزلتين (8.69%) من *Staphylococcus aureus* اما الخميرة فقد شُخصت بأنها *Candida guilliermondii* وحسب ما هو موضح في الشكل 7 .

تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما ورد في دراسات سابقة إذ أن الأنواع البكتيرية المعزولة في هذه الدراسة تماثل ما تم عزله في دراسات سابقة فقد تمكن *Al – Ibran et al.* (2013) من عزل بكتريا *Pseudomonas* و *Staphylococcus* و *Klebsiella* و *Enterobacter* و *Proteus* و *E. coli* من مرضى الحروق في الباكستان بنسب بلغت (36.6 و 23.6 و 16 و 11.8 و 8.4 و 3.7%) ، على التوالي .

بالرجوع الى الشكل 7 يتضح سيادة بكتريا *P. aeruginosa* على بقية الأنواع البكتيرية المعزولة من أصابات الحروق في محافظة كربلاء المقدسة وقد جاءت هذه النتائج موافقة لما أشار اليه العديد من الباحثين إذ كان هذا النوع من البكتريا هو السائد في إصابات الحروق في كل من العراق ومصر و ايران ايضاً بنسب بلغت (48.9 و 36.14 و 37.5%)

، على التوالي ( Alharbi , 2011 ; Alwan *et al.*, 2011 ; Ekrami and Kalantar , 2007 ; and Zayed , 2014 ) .



الشكل 7 : أنواع الأحياء المجهرية المعزولة من مرضى مصابين بالحروق في محافظة كربلاء المقدسة

إن سيادة بكتريا *P. aeruginosa* في الجروح الحرقية يمكن أن يُعزى الى مقاومة هذه البكتريا للمطهرات فضلاً عن قابليتها على تلويث الكثير من المركبات والمحاليل . إذ تتمكن هذه البكتريا من البقاء لفترات طويلة على أسطح انابيب البولي فينيل كلوريد ( Polyvinyl chloride pipes ) والفولاذ المقاوم للصدأ ( Stainless steel ) والصابون واحواض غسيل الأطباق والمرافق الصحية والزجاج ، إذ أن هذه البكتريا لها القابلية على تحمل انواع مختلفة من المطهرات ( Quinn , 1998 ; Guimares *et al.*, 2000 ) .

ومن جهة أخرى ، لا تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما حصل عليه Liwimbi and Komolafe ( 2007 ) إذ كانت بكتريا *Staphylococcus* هي السائدة بين البكتريا المعزولة من مرضى الحروق في إحدى المستشفيات في ملاوي . أن التباين في النتائج المستحصل عليها من حيث سيادة نوع بكتيري على آخر من أحماج الحروق يمكن أن يُعزى الى الطرائق المتبعة في إدارة وعلاج الحروق فضلاً عن الظروف البيئية المحيطة بالمرضى ( Alharbi and Zayed , 2014 ) . اما فيما يتعلق بعزل خميرة *C. guilliermondaii* فقد جاءت نتائج الدراسة الحالية موافقة لما حصل عليه كل من (2005) De Macedo and Santos و Al-Tameemi and Khalaf (2013) إذ تم الحصول على عزلة واحدة من الخميرة أعلاه وذلك من مرضى الحروق في كل من البرازيل والعراق ، على التوالي .

### 2-3 تشخيص البكتريا المسببة لخمج الحروق

#### 1-2-3 تشخيص بكتريا *Pseudomonas* spp.

##### 1-1-2-3 الصفات الزرعية والمجهرية

#### ( Cultural and microscopical characteristic ) :

بعد زرع مسحات الحروق على وسط أكارالدم وحضنها بدرجة حرارة 37 °م لمدة 24 ساعة تم الحصول على ثماني عزلات بهيئة مستعمرات منتشرة , كانت سبع منها مسطحة وذات حافات مسننة متموجة النمو وتمتلك بريقاً معدنياً ذو لون أخضر ولها رائحة شبيهه برائحة العنب فضلاً عن ظهور مناطق شفافة حول المستعمرات بسبب إنتاج البكتريا للهيموليسين الذي يحلل الدم الموجود في الوسط وغالباً ما يكون التحلل ( نوع  $\beta$  ) , اما مجهرياً فكانت بهيئة عصيات سالبة لصبغة كرام . ان هذه الصفات الزرعية والمجهرية تشير الى ان العزلات البكتيرية السبع هي *P. aeruginosa* اما العزلة الثامنة فقد كانت مستعمراتها صفراء شفافة مجمدة ناعمة أو خشنة ، ومجهرياً كانت بهيئة عصيات سالبة لصبغة كرام لذا فأن هذه الصفات الزرعية والمجهرية تشير الى أن هذه العزلة هي *P. oryzihabitans* ( Tille , 2014 ) (الجدول 2).

تميزت مستعمرات كل من بكتريا *P. aeruginosa* و *P. oryzihabitans* المنمأة على وسط Semi solid بانتشارها حول منطقة الزرع دلالة على قابلية البكتريا على الحركة ( Hart and Shears, 2004 ). تمكنت بكتريا *P. aeruginosa* من النمو عند حفظها بدرجة حرارة 42 °م في حين لم تتمكن بكتريا *P. oryzihabitans* من النمو في تلك الدرجة الحرارية ( Tille , 2014 ).

اما عند تنمية بكتريا *Pseudomonas* المعزولة في هذه الدراسة على وسط الماكونكي فقد ظهرت المستعمرات شاحبة على هذا الوسط بسبب عدم قابليتها على تخمير اللاكتوز ( Tille , 2014 ).

الجدول 2 : الاختبارات الشكلية و الكيموحيوية لبكتريا *Pseudomonas spp.*

الاستجابة		الاختبار	ت
بكتريا <i>P. oryzihabitans</i>	بكتريا <i>P. aeruginosa</i>		
-	-	صبغة كرام	1
خلايا عصوية الشكل	خلايا عصوية الشكل	المظهر الخلوي	2
هوائية	هوائية	ظروف النمو	3
+	+	اختبار الكاتليز	4
-	+	اختبار الاوكسيديز	5
+	+	اختبار الحركة	6
-	-	تخمير اللاكتوز	7
K\K	K\K	KIA	8
+	+	فحص KOH	9

(+): نتيجة موجبة , (-):نتيجة سالبة

يعد وسط الماكونكي وسطاً اختيارياً- تقريبياً، فهو اختياري من جهة لأنه يحتوي على صبغة Crystal violet المثبطة لنمو البكتريا الموجبة لصبغة كرام كما يحتوي ايضاً على

ملح Bile salt المثبط لنمو البكتريا السالبة لصبغة كرام عدا مجموعة البكتريا المعوية (Enteric Bacteria) ومن جهة اخرى يعد هذا الوسط وسطاً تفریقياً كونه يميز بين الجراثيم المخمرة وغير المخمرة لسكر اللاكتوز. يحتوي هذا الوسط على اللاكتوز والفينول الاحمر إذ يعد الاخير دليلاً للرقم الهيدروجيني (pH indicator) لذا فان المستعمرات المخمرة لسكر اللاكتوز تنتج حامض الذي يعمل بدوره على تغيير لون الدليل الى اللون الاحمر (Hart and Quinn *et al.*, 2004 ; Shears , 2004 ).

### 2-1-2-3 الفحوصات الكيموحيوية ( Biochemical tests ) :

اظهرت نتائج الفحوصات الكيموحيوية الموضحة في الجدول 2 ان كل من بكتريا *P. aeruginosa* و *P. oryzihabitans* قد اعطتا نتيجة موجبة في فحص الكاتليز اما في فحص الأوكسيدز فقد اعطى هذان النوعان من البكتريا نتيجة موجبة وأخرى سالبة في هذا الأختبار ، على التوالي بينما اعطى كلا النوعين النتيجة K\K في اختبار الـ KIA .

### 3-1-2-3 تشخيص بكتريا *Pseudomonas spp.* باستخدام عدة التشخيص Api 20 E :

تم تشخيص بكتريا *P. aeruginosa* و *P. oryzihabitans* باستخدام عدة التشخيص Api 20 E وقد تبين من خلال النتائج الموضحة في الجدول 3 ان بكتريا *P. aeruginosa* اعطت نتائج موجبة في اختبارات ADH و CIT و URE بينما أعطت نتائج سالبة في اختبارات ONPG و LDC و ODC و H<sub>2</sub>S و TDA و IND و VP و MAN و INO و SOR و RHA و MEL و AMY ونتائج متغايرة في أختبارات GEL و GLU و SAC و ARA و ان نتائج العدة التشخيصية اعلاه تؤكد ان البكتريا المعزولة هي *P. aeruginosa* . أما بكتريا *P. oryzihabitans* فقد أعطت نتيجة موجبة في أختبار CIT وأعطت نتائج سالبة في أختبارات ONPG و ADH و LDC و ODC و H<sub>2</sub>S و URE و TDA و IND و VP و GEL و GLU و MAN و INO و SOR و RHA و SAC و MEL و AMY و ARA، أن نتائج العدة التشخيصية اعلاه تؤكد أن البكتريا المعزولة هي *P. oryzihabitans* .

الجدول 3 : اختبارات العدة التشخيصية Api-20 E. لتشخيص بكتريا *Pseudomonas spp.*

<i>P. oryzae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	الاختبارات	ت
-	-	ONPG	1
-	+	ADH	2
-	-	LDC	3
-	-	ODC	4
+	+	CIT	5
-	-	H <sub>2</sub> S	6
-	+	URE	7
-	-	TDA	8
-	-	IND	9
-	-	VP	10
-	V	GEL	11
-	V	GLU	12
-	-	MAN	13
-	-	INO	14
-	-	SOR	15
-	-	RHA	16
-	V	SAC	17
-	-	MEL	18
-	-	AMY	19
-	V	ARA	20

(+) : نتيجة موجبة ، (-) : نتيجة سالبة ، v (variable reaction)

2-2-3 تشخيص بكتريا *A. baumannii*

## 1-2-2-3 الصفات الزرعية والمجهرية

## :(Cultural and microscopical characteristics)

بعد زرع مسحات الحروق على وسط أكار الدم وحضنها بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة تم الحصول على أربع عزلات بهيئة مستعمرات ناعمة غير شفافة ( Opaque ) , مرتفعة كريمة اللون بينما على وسط الماكونكي كانت المستعمرات أرجوانية اللون ولكنها غير مخمرة للاكتوز, اما مجهرياً فكانت بهيئة Coccobacilli سالبة لصبغة كرام . ان هذه الصفات الزرعية والمجهرية تشير الى ان العزلات البكتيرية الاربعة هي *A. baumannii* ( , Tille ( 2014 ) (الجدول 4) .

الجدول 4 : الاختبارات الشكلية والكيموحيوية لبكتريا *A. baumannii*

ت	الاختبار	الاستجابة
1	صبغة كرام	-
2	المظهر الخلوي	Coccobacilli
3	ظروف النمو	لاهوائية اختيارية
4	اختبار الكاتليز	+
5	اختبار الاوكسيديز	-
6	اختبار الحركة	-
7	تخمير اللاكتوز	-
8	KIA	K\K
9	فحص KOH	+

(+): نتيجة موجبة , (-):نتيجة سالبة

### 2-2-2-3 الفحوصات الكيموحيوية ( Biochemical tests ) :

اظهرت نتائج الفحوصات الكيموحيوية الموضحة في الجدول 4 ان بكتريا *A. baumannii* كانت لاهوائية اختيارية موجبة لفحص الكاتليز وسالبة لفحص الأوكسديز وغير متحركة كما أعطت النتيجة K\K في اختبار الـ KIA .

### 3-2-2-3 تشخيص بكتريا *A. baumannii* باستخدام عدة التشخيص Api 20 E :

تم تشخيص بكتريا *A. baumannii* باستخدام عدة التشخيص Api 20 E وقد تبين من خلال النتائج الموضحة في الجدول 5 ان بكتريا *A. baumannii* اعطت نتائج موجبة في اختبارات GLU و MEL و ARA بينما أعطت نتائج سالبة في اختبارات ONPG و ADH و LDC و ODC و CIT و H<sub>2</sub>S و URE و TDA و IND و VP و MAN و INO و SOR و RHA و SAC و AMY ونتيجة متغايرة في اختبار GEL . ان نتائج العدة التشخيصية اعلاه تؤكد ان البكتريا المعزولة هي *A. baumannii* .

### 3-2-3 تشخيص بكتريا *K. pneumoniae*

#### 1-3-2-3 الصفات الزرعية والمجهرية

#### :(Cultural and microscopical characteristics)

بعد زرع مسحات الحروق على وسط أكار الدم وحضنها بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة تم الحصول على أربع عزلات بهيئة مستعمرات رمادية اللون مخاطية ( mucoid ) بينما ظهرت المستعمرات على وسط الماكونكي كبيرة وردية فاتحة مخاطية , اما مجهرياً فكانت بهيئة عصيات سالبة لصبغة كرام . ان هذه الصفات الزرعية والمجهرية تشير الى ان العزلات البكتيرية الاربعة هي *K. pneumoniae* ( Markey et al., 2013 ) (الجدول 6) .

الجدول 5 : اختبارات العدة التشخيصية E. Api-20 لتشخيص بكتريا *A. baumannii*

ت	الاختبارات	<i>A. baumannii</i>
1	ONPG	-
2	<u>ADH</u>	-
3	<u>LDC</u>	-
4	<u>ODC</u>	-
5	<u>CIT</u>	-
6	<u>H<sub>2</sub>S</u>	-
7	<u>URE</u>	-
8	TDA	-
9	IND	-
10	<u>VP</u>	-
11	<u>GEL</u>	V
12	GLU	+
13	MAN	-
14	INO	-
15	SOR	-
16	RHA	-
17	SAC	-
18	MEL	+
19	AMY	-
20	ARA	+

(+): نتيجة موجبة , (-):نتيجة سالبة ، v (variable reaction)

## 3-2-3 الفحوصات الكيموحيوية ( Biochemical tests ) :

اظهرت نتائج الفحوصات الكيموحيوية الموضحة في الجدول 6 ان بكتريا *K. pneumoniae* كانت لاهوائية اختيارية سالبة في فحصي الكاتليز والأوكسيديز غير متحركة و قد اعطت النتيجة A\A with gas في اختبار KIA .

الجدول 6 : الاختبارات الشكلية والكيموحيوية لبكتريا *K. pneumoniae*

ت	الاختبار	الاستجابة
1	صبغة كرام	-
2	المظهر الخلوي	خلايا عصوية الشكل
3	ظروف النمو	لاهوائية اختيارية
4	اختبار الكاتليز	-
5	اختبار الأوكسيديز	-
6	اختبار الحركة	-
7	تخمير اللاكتوز	+
8	KIA	A\A with gas
9	فحص KOH	+

(+): نتيجة موجبة , (-):نتيجة سالبة.

3-3-2-3 تشخيص بكتريا *K. pneumoniae* باستخدام عدة التشخيص Api 20 E :

تم تشخيص بكتريا *K. pneumoniae* باستخدام عدة التشخيص Api 20 E وقد تبين من خلال النتائج الموضحة في الجدول 7 ان بكتريا *K. pneumoniae* اعطت نتائج موجبة في اختبارات ONPG و URE و GLU و MAN و INO و SOR و RHA و SAC و MEL و AMY و ARA بينما أعطت نتائج سالبة في اختبارات ADH و LDC و ODC و H<sub>2</sub>S و TDA و IND و نتائج متغايرة في اختبارات CIT و VP و GEL . ان نتائج العدة التشخيصية اعلاه تؤكد ان البكتريا المعزولة هي *K. pneumoniae* .

الجدول 7 : اختبارات العدة التشخيصية Api-20 E لتشخيص بكتريا *K. pneumoniae*

نت	الاختبارات	<i>K. pneumoniae</i>
1	ONPG	+
2	<u>ADH</u>	-
3	<u>LDC</u>	-
4	<u>ODC</u>	-
5	<u>CIT</u>	v
6	<u>H<sub>2</sub>S</u>	-
7	<u>URE</u>	+
8	TDA	-
9	IND	-
10	<u>VP</u>	v
11	<u>GEL</u>	v
12	GLU	+
13	MAN	+
14	INO	+
15	SOR	+
16	RHA	+
17	SAC	+
18	MEL	+
19	AMY	+
20	ARA	+

(+) نتيجة موجبة ، (-) نتيجة سالبة ، v (variable reaction)

4-2-3 تشخيص بكتريا *P. mirabilis*

## 1-4-2-3 الصفات الزرعية والمجهريّة

## : (Cultural and microscopical characteristics)

بعد زرع مسحات الحروق على وسط أكار الدم وحضنها بدرجة حرارة 37 °م لمدة 24 ساعة تم الحصول على عزلة واحدة ذات مستعمرات رمادية يتميز نموها بكونه Swarming يُغطي سطح الطبق ويكون النمو بشكل امواج (Waves) وتحول اكار الدم الى اللون البني كما أن لها رائحة كريهة (Foul smell) اما على وسط الماكونكي فقد كانت المستعمرات شاحبة وذات حافات غير منتظمة , وواضح الفحص المجهرى أن العزلة كانت بهيئة عصيات سالبة لصبغة كرام . ان هذه الصفات الزرعية والمجهريّة تشير الى ان العزلة البكتيرية هي *P. mirabilis* ( Markey et al., 2013 ) (الجدول 8) .

الجدول 8 : الاختبارات الشكلية والكيموحيوية لبكتريا *P. mirabilis*

ت	الاختبار	الاستجابة
1	صبغة كرام	-
2	المظهر الخلوي	خلايا عصوية الشكل
3	ظروف النمو	لاهوائية اختيارية
4	اختبار الكاتليز	+
5	اختبار الاوكسيديز	-
6	اختبار الحركة	+
7	تخمير اللاكتوز	-
8	KIA	K\ A , H <sub>2</sub> S +
9	فحص KOH	+

(+): نتيجة موجبة , (-):نتيجة سالبة

### 2-4-2-3 الفحوصات الكيموحيوية ( Biochemical tests ) :

اظهرت نتائج الفحوصات الكيموحيوية الموضحة في الجدول 8 ان بكتريا *P. mirabilis* كانت لاهوائية اختيارية موجبة لفحص الكاتليز وسالبة لفحص الأوكسيدز و متحركة و قد اعطت النتيجة  $K\ A, H_2S +$  في اختبار KIA .

### 3-4-2-3 تشخيص بكتريا *P. mirabilis* باستخدام عدة التشخيص Api 20 E :

تم تشخيص بكتريا *P. mirabilis* باستخدام عدة التشخيص Api 20 E وقد تبين من خلال النتائج الموضحة في الجدول 9 ان البكتريا اعطت نتائج موجبة في اختبارات ODC و  $H_2S$  و URE و TDA و VP و GEL و GLU بينما اعطت نتائج سالبة في اختبارات ONPG و ADH و LDC و CIT و IND و MAN و INO و SOR و RHA و SAC و MEL و AMY و ARA . ان نتائج العدة التشخيصية اعلاه تؤكد ان البكتريا المعزولة هي *P. mirabilis* .

### 5-2-3 تشخيص بكتريا *E. coli*

#### 1-5-2-3 الصفات الزرعية والمجهرية

#### :(Cultural and microscopical characteristics)

بعد زرع مسحات الحروق على وسط أكارالدم وحضنها بدرجة حرارة 37 °م لمدة 24 ساعة تم الحصول على عزلة واحدة بهيئة مستعمرات رمادية اللون ناعمة براقعة (Shiny) اما عند تنميتها على وسط الماكونكي فكانت المستعمرات وردية جافة مسطحة مُحاطة بمنطقة وردية غامقة نتيجة ترسب أملاح الصفراء, اما مجهرياً فكانت بهيئة عصيات سالبة لصبغة كرام . ان هذه الصفات الزرعية والمجهرية تشير الى ان العزلة البكتيرية هي *E. coli* ( Markey et al., 2013 ; Till , 2014 ) (الجدول 10) .

الجدول 9 : اختبارات العدة التشخيصية E. Api-20 لتشخيص بكتريا *P. mirabilis*

ت	الاختبارات	<i>E. coli</i>
1	ONPG	-
2	<u>ADH</u>	-
3	<u>LDC</u>	-
4	<u>ODC</u>	+
5	<u>CIT</u>	-
6	<u>H<sub>2</sub>S</u>	+
7	<u>URE</u>	+
8	TDA	+
9	IND	-
10	<u>VP</u>	+
11	<u>GEL</u>	+
12	GLU	+
13	MAN	-
14	INO	-
15	SOR	-
16	RHA	-
17	SAC	-
18	MEL	-
19	AMY	-
20	ARA	-

(+): نتيجة موجبة , (-): نتيجة سالبة

## 3-2-5-2 الفحوصات الكيموحيوية ( Biochemical tests ) :

اظهرت نتائج الفحوصات الكيموحيوية الموضحة في الجدول 10 ان بكتريا *E. coli* كانت هوائية اختيارية موجبة لفحص الكاتليز وسالبة لفحص الأوكسيديز و متحركة كما أعطت النتيجة A \ A with gas في اختبار KIA .

الجدول 10 : الاختبارات الشكلية والكيموحيوية لبكتريا *E. coli*

الاستجابة	الاختبار	ت
-	صبغة كرام	1
خلايا عصوية الشكل	المظهر الخلوي	2
هوائية اختيارية	ظروف النمو	3
+	اختبار الكاتليز	4
-	اختبار الاوكسيديز	5
+	اختبار الحركة	6
+	تخمير اللاكتوز	7
A \ A with gas	KIA	8
+	فحص KOH	9

(+): نتيجة موجبة , (-):نتيجة سالبة

3-5-2-3 تشخيص بكتريا *E. coli* باستخدام عدة التشخيص Api 20 E :

تم تشخيص بكتريا *E. coli* باستخدام عدة التشخيص Api 20 E وقد تبين من خلال النتائج الموضحة في الجدول 11 ان بكتريا *E. coli* اعطت نتائج موجبة في اختبارات ONPG و LDC و ODC و IND و GLU و MAN و SOR و RHA و SAC و MEL و ARA بينما اعطت نتائج سالبة في اختبارات ADH و CIT و H<sub>2</sub>S و URE و TDA و VP و GEL و INO و AMY . ان نتائج العدة التشخيصية اعلاه تؤكد ان البكتريا المعزولة هي *E. coli* .

الجدول 11 : اختبارات العدة التشخيصية E. coli Api-20 لتشخيص بكتريا *E. coli*

ت	الاختبارات	<i>E. coli</i>
1	ONPG	+
2	<u>ADH</u>	-
3	<u>LDC</u>	+
4	<u>ODC</u>	+
5	<u>CIT</u>	-
6	<u>H<sub>2</sub>S</u>	-
7	<u>URE</u>	-
8	TDA	-
9	IND	+
10	<u>VP</u>	-
11	<u>GEL</u>	-
12	GLU	+
13	MAN	+
14	INO	-
15	SOR	+
16	RHA	+
17	SAC	+
18	MEL	+
19	AMY	-
20	ARA	+

(+): نتيجة موجبة , (-):نتيجة سالبة .

6-2-3 تشخيص بكتريا *Serratia liquefaciens*

## 1-6-2-3 الصفات الزرعية والمجهرية

## : (Cultural and microscopical characteristics)

بعد زرع مسحات الحروق على وسط أكار الدم وحضنها بدرجة حرارة ٣٠ م° لمدة 24 ساعة تم الحصول على عزلة واحدة ذات مستعمرات محدبة دائرية متوسطة الحجم رصاصية اللون اما على وسط الماكونكي فقد كانت المستعمرات وردية فاتحة لماعة ذات حافات كاملة , اما مجهرياً فكانت بهيئة عصيات سالبة لصبغة كرام . ان هذه الصفات الزرعية والمجهرية تشير الى ان العزلة البكتيرية هي *S. liquefaciens* (الجدول 12) .

الجدول 12 : الاختبارات الشكلية والكيموحيوية لبكتريا *S. liquefaciens*

ت	الاختبار	الاستجابة
1	صبغة كرام	-
2	المظهر الخلوي	خلايا عصوية الشكل
3	ظروف النمو	لاهوائية اختيارية
4	اختبار الكاتليز	+
5	اختبار الاوكسيديز	-
6	اختبار الحركة	+
7	تخمير اللاكتوز	+
8	KIA	A \ A with gas
9	فحص KOH	+

(+): نتيجة موجبة , (-): نتيجة سالبة

### 2-6-2-3 الفحوصات الكيموحيوية ( Biochemical tests ) :

اظهرت نتائج الفحوصات الكيموحيوية الموضحة في الجدول 12 ان بكتريا *S. liquefaciens* كانت لاهوائية اختيارية موجبة لفحص الكاتليز وسالبة لفحص الأوكسيديز ومتحركة كما أعطت النتيجة A\ A with gas في اختبار KIA .

### 3-6-2-3 تشخيص بكتريا *S. liquefaciens* باستخدام عدة التشخيص Api 20 E :

تم تشخيص بكتريا *S. liquefaciens* باستخدام عدة التشخيص Api 20 E وقد تبين من خلال النتائج الموضحة في الجدول 13 ان هذه البكتريا اعطت نتائج موجبة في اختبارات ONPG و ODC و CIT و VP و GEL و GLU و MAN و SOR و SAC و MEL و AMY و ARA . بينما اعطت نتائج سالبة في اختبارات و URE و H<sub>2</sub>S و LDC و ADH و RHA و INO و IND و TDA . ان نتائج العدة التشخيصية اعلاه تؤكد ان البكتريا المعزولة هي *S. liquefaciens* .

### 7-2-3 تشخيص بكتريا *C. meningosepticum*

#### 1-7-2-3 الصفات الزرعية والمجهرية

#### :(Cultural and microscopical characteristics)

بعد زرع مسحات الحروق على وسط أكار الدم وحضنها بدرجة حرارة 37 °م لمدة 24 ساعة تم الحصول على عزلة واحدة ذات مستعمرات ملساء دائرية كبيرة لماعة ذات لون أصفر فاتح اما على وسط الماكونكي فقد كانت المستعمرات شاحبة , فيما كانت مجهرياً بهيئة عصيات سالبة لصبغة كرام . ان هذه الصفات الزرعية والمجهرية تشير الى ان العزلة البكتيرية هي *C. meningosepticum* ( Tille , 2014 ) (الجدول 14) .

الجدول 13 : اختبارات العدة التشخيصية E. Api-20 لتشخيص بكتريا *S. liquefaciens*

ت	الاختبارات	<i>S. liquefaciens</i>
1	ONPG	+
2	<u>ADH</u>	-
3	<u>LDC</u>	-
4	<u>ODC</u>	+
5	<u>CIT</u>	+
6	<u>H<sub>2</sub>S</u>	-
7	<u>URE</u>	-
8	TDA	-
9	IND	-
10	<u>VP</u>	+
11	<u>GEL</u>	+
12	GLU	+
13	MAN	+
14	INO	-
15	SOR	+
16	RHA	-
17	SAC	+
18	MEL	+
19	AMY	+
20	ARA	+

(+): نتيجة موجبة , (-): نتيجة سالبة

## 3-7-2-2 الفحوصات الكيموحيوية ( Biochemical tests ) :

اظهرت نتائج الفحوصات الكيموحيوية الموضحة في الجدول 14 ان بكتريا *C. meningosepticum* كانت هوائية موجبة لفحصى الكاتليز و الأوكسيديز وغير متحركة و قد أعطت النتيجة K\ K في اختبار KIA .

الجدول 14 : الاختبارات الشكلية والكيموحيوية لبكتريا *C. meningosepticum*

ت	الاختبار	الاستجابة
1	صبغة كرام	-
2	المظهر الخلوي	خلايا عصوية الشكل
3	ظروف النمو	هوائية
4	اختبار الكاتليز	+
5	اختبار الأوكسيديز	+
6	اختبار الحركة	-
7	تخمير اللاكتوز	-
8	KIA	K\ K
9	فحص KOH	+

(+): نتيجة موجبة , (-):نتيجة سالبة

3-7-2-3 تشخيص بكتريا *C. meningosepticum* باستخدام عدة التشخيص Api 20 E :

تم تشخيص بكتريا *C. meningosepticum* باستخدام عدة التشخيص Api 20 E وقد تبين من خلال النتائج الموضحة في الجدول 15 ان هذه البكتريا اعطت نتائج موجبة في اختبارات ONPG و IND و GEL بينما اعطت نتائج سالبة في اختبارات و ADH و LDC و ODC و CIT و H<sub>2</sub>S و URE و TDA و VP و GLU و MAN و INO و SOR و RHA و SAC و MEL و AMY و ARA . ان نتائج العدة التشخيصية اعلاه تؤكد ان البكتريا المعزولة هي *C. meningosepticum*.

الجدول 15 : اختبارات العدة التشخيصية E. Api-20 لتشخيص بكتريا *C. meningosepticum*

ت	الاختبارات	<i>C. meningosepticum</i>
1	ONPG	+
2	<u>ADH</u>	-
3	<u>LDC</u>	-
4	<u>ODC</u>	-
5	<u>CIT</u>	-
6	<u>H<sub>2</sub>S</u>	-
7	<u>URE</u>	-
8	TDA	-
9	IND	+
10	<u>VP</u>	-
11	<u>GEL</u>	+
12	GLU	-
13	MAN	-
14	INO	-
15	SOR	-
16	RHA	-
17	SAC	-
18	MEL	-
19	AMY	-
20	ARA	-

(+): نتيجة موجبة , (-): نتيجة سالبة

### 8-2-3 تشخيص بكتريا المكورات العنقودية *Staphylococcus*

#### 1-8-2-3 الصفات الزرعية والمجهرية

##### (Cultural and microscopical characteristics):

اسفرت نتائج الزرع الميكروبي على وسط اكار الدم بعد مدة حضانة 24 ساعة بدرجة حرارة 37 م° عن الحصول على مستعمرات دائرية ومحدبة وبراقة وذات لون أصفر - ذهبي، ولم تتمكن هذه المستعمرات من النمو على اغلب تركيبات وسط الماكونكي . اما مجهرياً فكانت بهيئة مكورات موجبة لصبغة كرام ومتجمعة بهيئة عناقيد (clusters) مما يدل على ان هذه البكتريا تعود لجنس المكورات العنقودية (*Staphylococcus*) وهذا يتفق مع ما وصفه (Quinn *et al.*, 2004) لذا فقد اسفرت عملية التشخيص عن الحصول على عزلتين من بكتريا المكورات العنقودية .

#### 2-8-2-3 تشخيص بكتريا *S. aureus* :

لغرض تشخيص بكتريا *S. aureus* فقد تم تنميتها على وسط MSA فضلاً عن الفحوصات الكيموحيوية .

##### A- النمو على وسط (MSA) Manitol Salt Agar:

امتازت مستعمرات بكتريا *S. aureus* النامية على الوسط MSA بكونها مستعمرات غير شفافة (Opaque) وبراقة (Shiny) وذات لون اصفر. يستخدم وسط MSA لتمييز بكتريا *S. aureus* عن بقية المكورات الموجبة لصبغة كرام المنتجة للكتاليز. يحتوي هذا الوسط على 7.5 % من كلوريد الصوديوم الذي يثبط نمو الكثير من الأحياء المجهرية , اما بكتريا *Staph.* فتتمكن من النمو عليه وتعمل على تخمير سكر المانيتول الموجود فيه مؤدية الى انتاج حامض الذي يتسبب في تحول كاشف الفينول الأحمر من اللون الوردي الى الأصفر . (De La Maza *et al.*, 1997)

## B- الفحوصات الكيموحيوية ( Biochemical tests ) :

عند اجراء الفحوصات الكيموحيوية على عزلتي بكتريا المكورات العنقودية وجد أن كل منهما كانت منتجة للكاتليز من خلال مقدرتهما على تحطيم بيروكسيد الهيدروجين (  $H_2O_2$  ) وتحويله الى ماء وغاز الأوكسجين اذ اتسمت النتيجة الموجبة بظهور فقاعات غازية .

وعندما خضعت العزلتين لأختبار إنتاج انزيم مجلط البلازما (coagulase) فقد اعطت كل منها نتيجة موجبة , مما يدل على أن هاتين العزلتان تعود لبكتريا *S.aureus* وهذا يتفق مع ما وصفه ( Quinn et al. ,2004 ) . ويوضح الجدول 16 الاختبارات الشكلية والكيموحيوية لبكتريا *S.aureus* .

الجدول 16 : الاختبارات الشكلية و الكيموحيوية لبكتريا *S. aureus*

ت	الاختبار	الاستجابة
1	صبغة كرام	+
2	المظهر الخلوي	خلايا كروية بشكل عناقيد
3	ظروف النمو	لا هوائية اختيارية
4	اختبار الكاتليز	+
5	اختبار الاوكسيديز	-
6	تخمير المانيتول	+
7	اختبار التجلط	+
8	الوسط الانتقائي Manitol-Salt Agar	+
9	فحص KOH	-

( + ) نتيجة موجبة , ( - ) نتيجة سالبة

### 9-2-3 تشخيص خميرة *C. guilliermondii*

#### 3-9-2-1 الصفات الزرعية والمجهرية

##### (Cultural and microscopical characteristics):

تم تشخيص الخميرة من خلال زرعها على وسط SDA وحضانها بدرجة حرارة 37 °م لمدة 24 ساعة إذ تم الحصول على عزلة واحدة ذات مستعمرات مسطحة لامعة (Glossy) بحافات ملساء كريمية اللون (Cream-colored) (Stefanetti et al., 2014)، في حين كانت المستعمرات ذات لون وردي فاتح عند تنميتها على وسط CHROM agar بعد فترة حضانة 48 ساعة بدرجة حرارة 37 °م، إذ يحتوي هذا الوسط على مواد تفاعل مرتبطة بأصباغ كيميائية (Chemical dyes) يمكنها من التفاعل مع الأنزيمات المفرزة من الأحياء المجهرية مما يؤدي الى ظهور ألوان خاصة بكل نوع من أنواع خميرة الـ *Candida* (Kitch et al., 1996)، أما مجهرياً فقد كانت خلاياها بيضوية الشكل متطاولة ذات احجام مختلفة (Stefanetti et al., 2014).

#### 3-9-2-2 التشخيص باستخدام العدة *Api Candida* :

بينت نتائج التشخيص باستخدام العدة التشخيصية أن عزلة الخميرة المتحصل عليها في هذه الدراسة هي *C. guilliermondii*.

### 3-3 اختبار حساسية العزلات المسببة لخمج الحروق للمضادات الحيوية

#### 3-3-1 اختبار حساسية عزلات البكتريا السالبة لصبغة كرام للمضادات الحيوية :

تم اختبار حساسية عزلات بكتريا *P. aeruginosa* و *P. oryzihabitans* تجاه عدد من المضادات الحيوية اشتملت على Tobramycin و Amoxicillin – Clavulanic acid و Imipenem و Piperacillin و Tetracycline و Gentamicin و Ceftriaxone

و Cefixime و Aztreonam و Piperacillin – Tazobactam و Cefotaxime و Ceftazidime و Netilmicin و Amikacin و Ciprofloxacin .

واظهرت النتائج الموضحة في الجدول 17 ان جميع عزلات بكتريا *Pseudomonas* كانت مقاومة بنسبة 100 % لمضادات Tobramycin (TOB) و Ceftriaxone (CRO) و Amoxicillin - Clavulanic acid (AMC) (CFM) و Cefotaxime (CTX) و Cefixime وبنسبة 87.5 % لكل من Gentamicin (CN) و Aztreonam (AZT) و Piperacillin - Tazobactam (PTZ) و (CAZ) و Ceftazidime وبنسبة 75% لمضاد Piperacillin وبنسبة 62.6 % للمضادين Tetracycline (TE) و Netilmicin (NET) وبنسبة 50 % لكل من Amikacin (AK) و Ciprofloxacin (CIP) بينما كانت العزلات أقل مقاومة لمضاد Imipenem (IPM) إذ بلغت نسبة المقاومة 37.5 % .

تُصنف مضادات AMC و CRO و CFM و CTX و ATZ ضمن مجموعة  $\beta$ -lactams ، ويمكن ان تتحقق مقاومة البكتريا لهذه المضادات بثلاث آليات الأولى : تتمثل بافراز انزيمات Lactamases -  $\beta$  التي تعمل على تحلل حلقة البيتا لاكتام الموجودة في المضاد والثانية : تقليل نفاذية البكتريا للمضادات وبالتالي تمنعها من الدخول الى داخل الخلية اما الثالثة : فتعتمد على تغيير الهدف المحدد للمضاد الموجود في الخلية مما يتعذر على المضاد الارتباط بالهدف المرسوم له، وبالتالي عدم قتل البكتريا . يعود مضاد Ciprofloxacin لمجموعة Fluoroquinolones وتتمكن البكتريا من مقاومته من خلال تقليل نفاذية جدار البكتريا لمضادات الحيوية وبالتالي تمنعها من الدخول الى داخل الخلية البكتيرية (Kumar and Varela , 2013) .

الجدول 17: اختبار حساسية عزلات بكتريا *Pseudomonas* spp. تجاه المضادات الحيوية

<i>P. oryzae</i>	<i>P. aeruginosa</i>							اسم العزلة		
	14 - B	28 - B	11	24 - A	4 - C	18	15 - A	1	رقم العزلة المضاد الحيوي	ت
R	R	R	R	R	R	R	R	R	TOB	1
R	R	R	R	R	R	R	R	R	AMC	2
R	R	I	R	R	R	R	R	I	PIP	3
R	S	S	S	S	R	I	R	R	IPM	4
I	R	S	I	R	R	R	R	R	TE	5
R	R	R	S	R	R	R	R	R	CN	6
R	R	R	R	R	R	R	R	R	CRO	7
R	R	R	R	R	R	R	R	R	CFM	8
I	R	R	R	R	R	R	R	R	AZT	9
R	R	R	S	R	R	R	R	R	PTZ	10
R	R	R	R	R	R	R	R	R	CTX	11
R	R	R	R	R	R	R	R	I	CAZ	12
R	R	S	S	R	S	R	R	R	NET	13
S	R	S	S	R	R	R	R	S	AK	14
S	R	S	S	R	R	R	R	S	CIP	15

Intermediate (I) , Resist (R) , Sensitive (S)

تتفق نتائج الدراسة الحالية في جزء منها مع ما حصل عليه (Owlia et al. 2006) إذ أن بكتريا *P. aeruginosa* المعزولة من أحد مراكز الحروق في طهران بايران كانت مقاومة لمضادات Amikacin و Gentamicin و Cefotaxime و Ceftazidime

و Cefixime و Ceftriaxone بنسب بلغت ( 95 و 96 و 81 و 95 و 100 و 92 ) % ، على التوالي . كما تتفق نتائج الدراسة الحالية أيضاً مع ما حصل عليه ( 2007 ) Mohammed إذ أن بكتريا *P. aeruginosa* المعزولة من مرضى الحروق في مستشفى اليرموك التعليمي ببغداد كانت مقاومة للمضادين Cefixime و Ciprofloxacin بنسبة ( 100 و 46.2 ) % ، على التوالي .

تم اختبار حساسية عزلات بكتريا *K. pneumoniae* و *A. baumannii* تجاه المضادات نفسها المستخدمة في اختبار حساسية بكتريا *P. aeruginosa* وظهرت النتائج الموضحة في الجدول 18 ان جميع عزلات بكتريا *K. pneumoniae* كانت حساسة بنسبة 100 % لمضاد Ciprofloxacin وبنسبة 25 % لمضاد Tetracycline ، في حين كانت هذه العزلات مقاومة بنسبة 100% لبقية المضادات المستخدمة في هذه الدراسة . وقد جاءت هذه النتائج موافقة في جزء منها مع ما توصل اليه ( Magnet et al., (2013) إذ كانت عزلات بكتريا *Klebsiella spp* المعزولة من مرضى الحروق من أحد المستشفيات في بنغلادش حساسة بنسبة 100 % لمضاد Ciprofloxacin .

اما عزلات بكتريا *A. baumannii* فكانت حساسة بنسبة 100 % لمضاد Netilmicin في حين أظهرت العزلتان (16-A و 22-B) مقاومة متوسطة لكل من المضادين Tetracycline و Ciprofloxacin فيما تبين أن العزلتين (14-A و A-31) كانتا حساستين لهذين المضادين .

لا تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما حصل عليه ( Ekrami and Kalantar (2007) اللذان اشارا الى أن بكتريا *A. baumannii* المعزولة من إحدى المستشفيات في إيران كانت حساسة للمضادين Gentamicin و Ciprofloxacin بنسبة ( 100 و 85 ) % ، على التوالي .

الجدول 18 : اختبار حساسية عزلات بكتريا *A. baumannii* و *K. pneumoniae* تجاه المضادات الحيوية

<i>A. baumannii</i>				<i>K. pneumoniae</i>				اسم العزلة	
22 - B	31 - A	14 - A	16 - A	15 - B	16 - B	4 - B	27	رقم العزلة / المضاد الحيوي	ت
R	R	R	R	R	R	R	R	TOB	1
R	R	R	R	R	R	R	R	AMC	2
R	R	R	R	R	R	R	R	PIP	3
R	R	R	R	R	R	R	R	IPM	4
I	S	S	I	R	R	S	R	TE	5
R	R	R	R	R	R	R	R	CN	6
R	R	R	R	R	R	R	R	CRO	7
R	R	R	R	R	R	R	R	CFM	8
R	R	I	R	R	R	R	R	AZT	9
R	R	R	R	R	R	R	R	PTZ	10
R	R	R	R	R	R	R	R	CTX	11
R	R	R	R	R	R	R	R	CAZ	12
S	S	S	S	R	R	R	R	NET	13
R	R	R	R	R	R	R	R	AK	14
I	S	S	I	S	S	S	S	CIP	15

Intermediate (I) , Resist (R) , Sensitive (S)

تتنمي مضادات Tobramycin و Gentamicin و Netilmicin و Amikacin الى مجموعة Amimoglycosides وتقاوم البكتريا هذه المضادات من خلال عدة آليات تتضمن : الأولى : تثبيط المضاد من خلال أنزيم يعمل على تغيير تركيب المضاد عن طريق نقل مجموعة فعالة (Functional group) للمضاد مثل مجاميع acyl و ribosyl و phosphoryl او

Thiol عن طريق تغيير تركيب المضاد بفعل انزيم Nucleotide transferase والثانية : تتمثل بتحويل الهدف للمضاد الحيوي بواسطة عملية Methylation على الحامض النووي 16S rRNA, والثالثة : تقليل نفاذية جدار البكتريا للمضادات الحيوية وبالتالي تمنعها من الدخول الى داخل الخلية البكتيرية (Kumar and Varela , 2013).

تم اختبار حساسية عزلات كل من بكتريا *P. mirabilis* و *E. coli* و بكتريا *S. liquefaciens* و *C. meningosepticum* تجاه المضادات نفسها المستخدمة في اختبار حساسية بكتريا *P. aeruginosa* و اظهرت النتائج الموضحة في الجدول 19 ان جميع عزلات البكتريا كانت مقاومة للمضادات المستخدمة في هذه الدراسة بنسب ( 80 و 73.33 و 86.66 و 73.33) %، على التوالي .

تقاوم البكتريا مضاد التتراسايكلين بأليتين هما الاخراج الفعال (Active efflux) للمضاد من البكتريا مما يؤدي إلى تخفيف تركيز المضاد داخل الخلية فضلاً عن الآلية الأقل شيوعاً المتمثلة بإيقاف فعالية المضاد عن طريق عمليات الاكسدة و الاختزال (Redox process) (Kumar and Varela , 2013).

### 2-3-3 اختبار حساسية عزلات البكتريا الموجبة لصبغة كرام للمضادات الحيوية :

تم اختبار حساسية عزلات بكتريا *S. aureus* تجاه عدد من المضادات الحيوية اشتملت على Erythromycin و Clindamycin و Azithromycin و Netilmicin و Vancomycin و Tobramycin و Imipenem و Gentamicin و Tetracycline و Cefoxitin و Pencillin و Amoxicillin – Clavulanic acid .

الجدول 19 : اختبار حساسية عزلات بكتريا *P. mirabilis* و *E. coli* و *S. liquefaciens* و

*C. meningosepticum* تجاه المضادات الحيوية

<i>C. meningosepticum</i>	<i>S. liquefacien</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. mirabilis</i>	أسم العزلة	
				رقم العزلة	ت
24 - B	28 - A	22 - C	5 - B	المضاد الحيوي	
R	R	R	R	TOB	1
I	R	R	R	AMC	2
S	R	R	R	PIP	3
R	R	S	R	IPM	4
R	R	R	R	TE	5
R	R	R	R	CN	6
R	R	R	R	CRO	7
R	R	R	R	CFM	8
R	R	R	R	AZT	9
S	R	I	R	PTZ	10
R	R	R	R	CTX	11
R	R	R	R	CAZ	12
R	S	S	S	NET	13
R	S	S	S	AK	14
S	R	R	S	CIP	15

Intermediate (I) , Resist (R) , Sensitive (S)

واظهرت النتائج الموضحة في الجدول 20 ان بكتريا *S. aureus* كانت مقاومة لـ 9 مضادات من المضادات المستخدمة في هذه الدراسة في حين كانت البكتريا حساسة لمضاد

Vancomycin، وتميزت العزلة A - 22 بكونها حساسة لمضاد Netilmicin و متوسطة المقاومة لمضاد Amoxicillin – Clavulanic acid .

تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما توصل اليه (2005) De Macedo and Santos إذ كانت عزلات بكتريا *S. aureus* المعزولة من مرضى الحروق في احد مستشفيات البرازيل حساسة بنسبة 100 % لمضاد Vancomycin.

الجدول 20 : اختبار حساسية عزلات بكتريا *S. aureus* تجاه المضادات الحيوية

رقم العزلة	المضاد الحيوي	ت
22 - A	21	
R	R	1
R	R	2
R	R	3
S	I	4
S	S	5
R	R	6
R	R	7
R	R	8
R	R	9
I	R	10
R	R	11
R	R	12

Intermediate (I) , Resist (R) ,Sensitive (S)

ينتمي المضادان Erythromycin و Azithromycin لمجموعة Macrolide ويمكن تفسير مقاومة البكتريا لهما باليتين : الاولى: من خلال افراز انزيم Estrase الذي يعمل على تحلل حلقة اللاكتون (Lactone ring) او يعمل الانزيم على تغيير تركيب المضاد عن طريق نقل مجموعة فعالة (Functional group) للمضاد مثل مجاميع acyl و ribosyl و phosphoryl, والثانية : تتمثل بتغيير الهدف للمضاد الحيوي , بينما تتمكن البكتريا من مقاومة المضاد Clindamycin عن طريق تغيير تركيب المضاد بفعل انزيم Nucleotide transferase (Kumar and Varela, 2013).

### 4-3 تشخيص المركبات النانوية المحضرة بالطرائق الطيفية

#### 1-4-3 طيف الأشعة تحت الحمراء FT-IR

##### 1-1-4-3 طيف الأشعة تحت الحمراء لطبقات المغنيسيوم \ الالمنيوم ثنائية الهيدروكسيد

يتضح من الشكل 8 ان طبقات المغنيسيوم \ الالمنيوم ثنائية الهيدروكسيد أظهرت العديد من الحزم المميزة عند ترددات معينة ، فالحزمة عند 3527 سم<sup>-1</sup> تعود الى اهتزاز المط لرابطة (O-H) , وهي حزمة مستعرضة لوجود تداخل من انواع مختلفة من الهيدروكسيل مثل هيدروكسيل الطبقة الثنائية و هيدروكسيل الماء الممتز فيزيائيا (Cheng et al., 2010 ;Parida et al .,2010) اما الحزمة المميزة عند 1383 سم<sup>-1</sup> فتعزى الى مجموعة النترات (NO<sub>3</sub>) الموجودة بين الطبقات ( Arizaga et al., 2009 ; Chai et al.,2009 ) بينما تعود الحزم الواقعة بين 400- 600 سم<sup>-1</sup> الى اهتزاز رابطة Mg-O و Al-O ( Feng et al., 2006 ) .

##### 2-1-4-3 طيف الأشعة تحت الحمراء للمظهر كلور هكسدين الحر (CHX)

يتضح من الشكل 9 أن الكلور هكسدين بحالته الحرة يُظهر العديد من الحزم المميزة عند ترددات معينة إذ أن ظهور الحزمة عند التردد 3338 سم<sup>-1</sup> يشير إلى اهتزاز مط لمجموعة -NH- الأمينية ، كما يشير ظهور الحزمة عند التردد 3178 سم<sup>-1</sup> الى وجود مط لمجموعة

=NH . اما ظهور الحزمتين عند الترددین ( 2937 و 2870 ) سم<sup>-1</sup> فيعودان الى اهتزاز مط مجموعة CH<sub>2</sub> غير المتماثل والمتماثل ، على التوالي في حين يُعزى ظهور الحزمة عند التردد 1639 سم<sup>-1</sup> إلى حصول مط مجموعة C=N . اما ظهور الحزمتين عند الترددین ( 1546 و 1492 ) سم<sup>-1</sup> فيعزى الى وجود مط هيكلية لحلقة البنزين C<sup>≡</sup>C فيما يُعزى ظهور الحزمة عند التردد 1411 سم<sup>-1</sup> الى وجود حني لمجموعة CH<sub>2</sub> . كما أن ظهور الحزمة عند التردد 1084 سم<sup>-1</sup> يشير الى وجود مط C-Cl . وأخيراً يُعزى ظهور الحزمتين عند الترددین ( 821 و 721 ) سم<sup>-1</sup> الى وجود حني مجموعة C-H الاروماتية خارج المستوي ( Out of plane ) ( Silverstein *et al.*,2005).

### 3-1-4-3 طيف الاشعة تحت الحمراء للكوروكسدين النانوي الهجين – CHX – Mg/Al

#### LDH

من ملاحظه الشكل 10 يتضح أن المطهر النانوي الهجين يُظهر العديد من الحزم المميزة الجديدة التي تدل على نجاح عملية إقحام المطهر كلوروكسدين بين طبقات ثنائية الهيدروكسيد . أن ظهور الحزمة عند التردد 3331 سم<sup>-1</sup> يُعزى الى مط -NH- الأمينية بينما يُعزى ظهور الحزمة عند التردد 3129 سم<sup>-1</sup> الى وجود مط لمجموعة =NH . في حين يُعزى ظهور الحزمتين عند الترددین ( 2926 و 2860 ) سم<sup>-1</sup> الى وجود مط مجموعة CH<sub>2</sub> غير المتماثل والمتماثل ، على التوالي . اما ظهور الحزمة عند التردد 1639 سم<sup>-1</sup> فيشير الى وجود مط لمجموعة C=N . كما يُلاحظ في الشكل ظهور حزمة امتصاص عند التردد 1533 سم<sup>-1</sup> والذي يشير الى المط الهيكلية لحلقة البنزين وقد حصل فيه انزياح نحو التردد الأقل . ويمكن أن يفسر ظهور الحزمتين عند الترددین ( 1367 و 1348 ) سم<sup>-1</sup> بحصول ازدواج اهتزاز (Vibration coupling) ما بين حني مجموعة CH<sub>2</sub> وحزم طبع الأصابع . ويشير ظهور الحزمة عند التردد 1084 سم<sup>-1</sup> الى وجود مط C-Cl . فيما يشير ظهور الحزمتين عند الترددین ( 821 و 723 ) سم<sup>-1</sup> إلى حصول حني C-H الاروماتي خارج المستوي ( Silverstein *et al.*,2005).

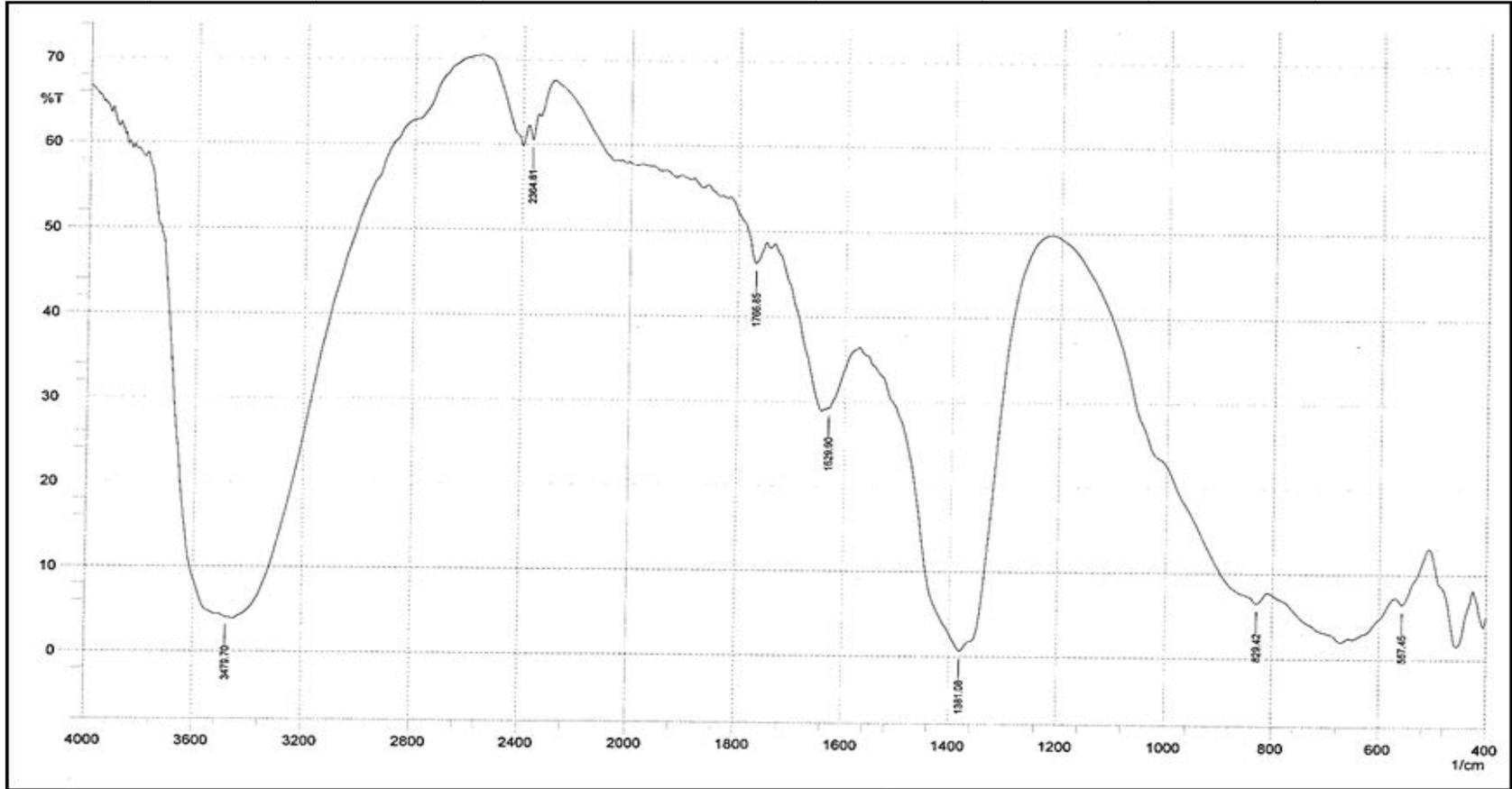
### 4-1-4-3 طيف الأشعة تحت الحمراء لحمض التانيك الحر (TA)

من ملاحظة الشكل 11 يتضح وجود مط لمجموعة OH الفينولية عند الترددات 3367 و 3338 سم<sup>-1</sup>. كما يُلاحظ وجود مط لمجموعة CH الأليفاتية عند التردد 2762 سم<sup>-1</sup>. أما ظهور حزمة الامتصاص عند التردد ( 1705 و 1321 ) سم<sup>-1</sup> يشير الى وجود مجموعة الكاربونيل C=O أسترية . كما أن ظهور حزم امتصاص عند الترددات ( 1614 و 1537 و 1450 ) سم<sup>-1</sup> يشير الى وجود مط هيكلية لحلقة البنزين C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>. ويلاحظ أيضاً ظهور حزمة امتصاص عند التردد 1205 سم<sup>-1</sup> والذي يشير الى مط C-O الفينولية ، في حين أن ظهور حزم امتصاص عند الترددات ( 869 و 759 ) سم<sup>-1</sup> فيشير الى حني مجموعة CH الأروماتية خارج المستوي ( Out of plane ) (Silverstein *et al.*,2005).

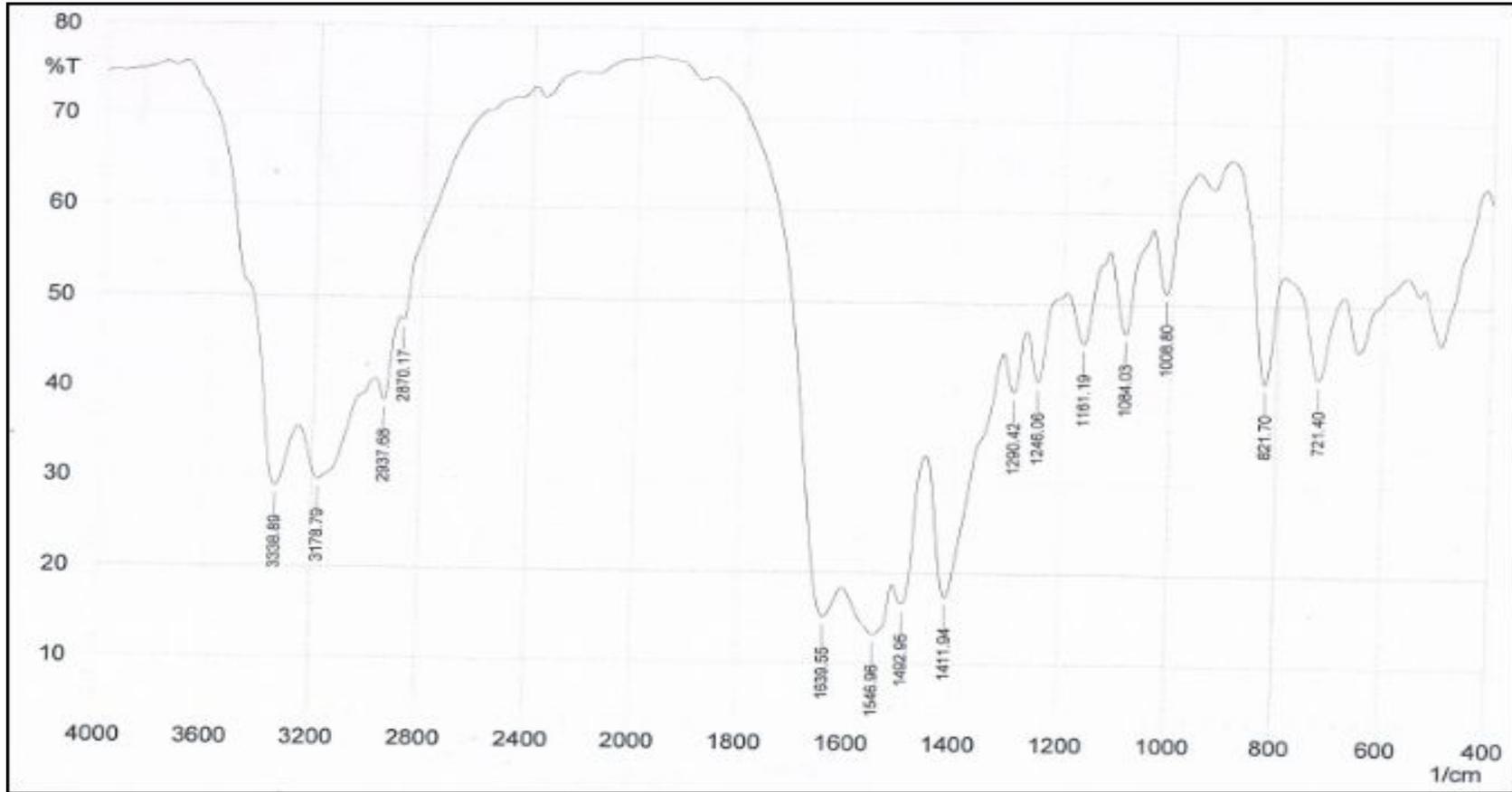
### 5-1-4-3 طيف الأشعة تحت الحمراء لحمض التانيك النانوي الهجين – TA – Mg/Al

#### LDH

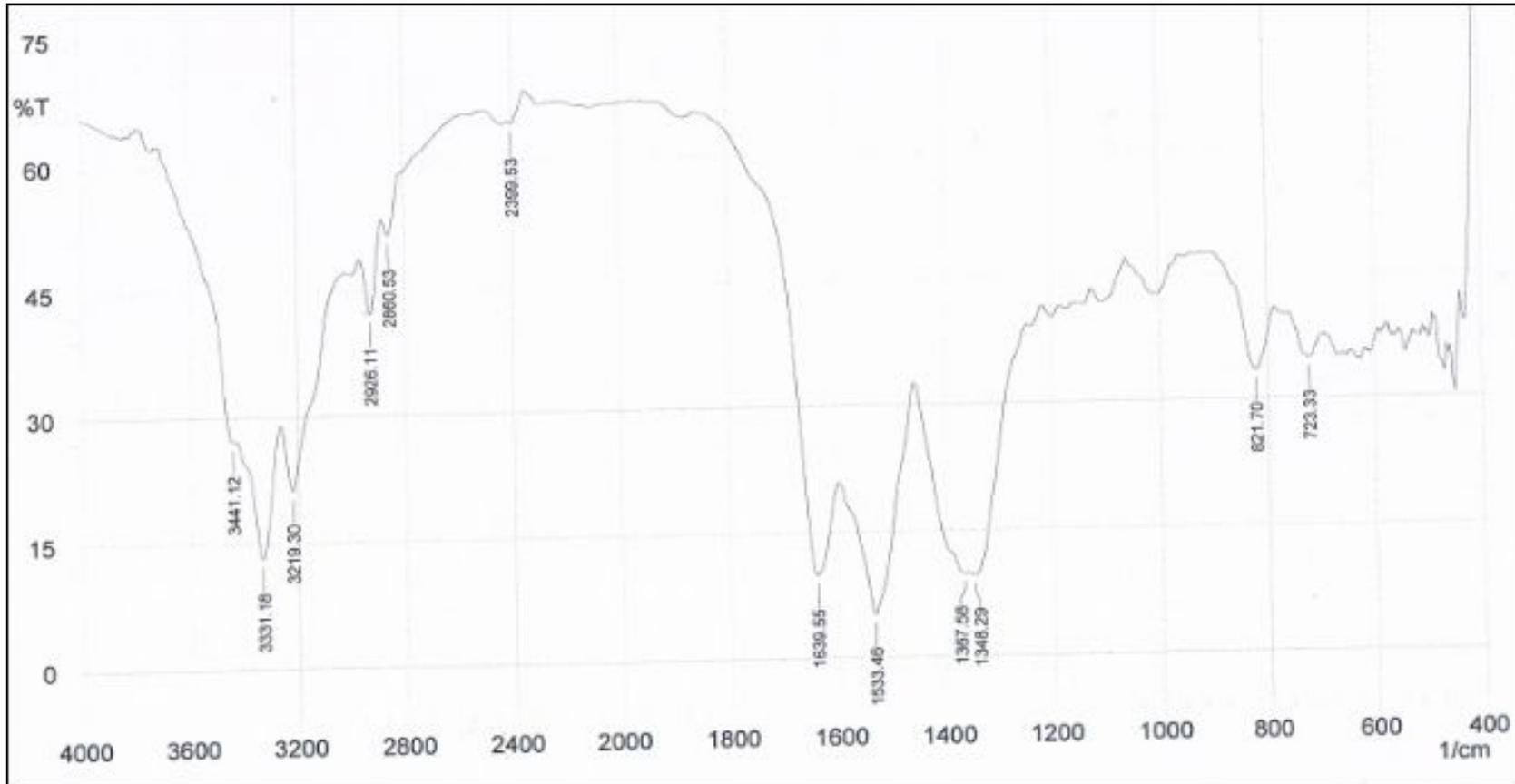
يتضح من الشكل 12 ظهور حزمة امتصاص عند التردد 3412 سم<sup>-1</sup> والتي تشير الى مط مجموعة OH الفينولية . كما يُلاحظ وجود حزمة امتصاص عند التردد 1687 سم<sup>-1</sup> والتي تعود الى مط مجموعة الكاربونيل C=O الاسترية والتي بدت مُزاحة نحو تردد أقل بحوالي 18 سم<sup>-1</sup> ، بينما يشير ظهور الحزم عند الترددات ( 1581 و 1496 و 1440 ) سم<sup>-1</sup> الى حصول المط الهيكلية لحلقة البنزين وقد حصل فيها انزياح نحو الترددات الأقل . أما ظهور الحزمة عند التردد 1367 سم<sup>-1</sup> فيعود الى حني ( Bending ) لمجموعة OH داخل المستوي . ويشير ظهور الحزمتين عند الترددات ( 1325 و 1209 ) سم<sup>-1</sup> الى وجود مط لمجموعة C-O الاسترية والفينولية ، على التوالي . فيما يتضح من الشكل أيضاً ظهور حزم امتصاص عند الترددات ( 833 و 758 ) سم<sup>-1</sup> واللذان تشيران الى وجود حني لمجموعة CH الأروماتية خارج المستوي (Silverstein *et al.*,2005).



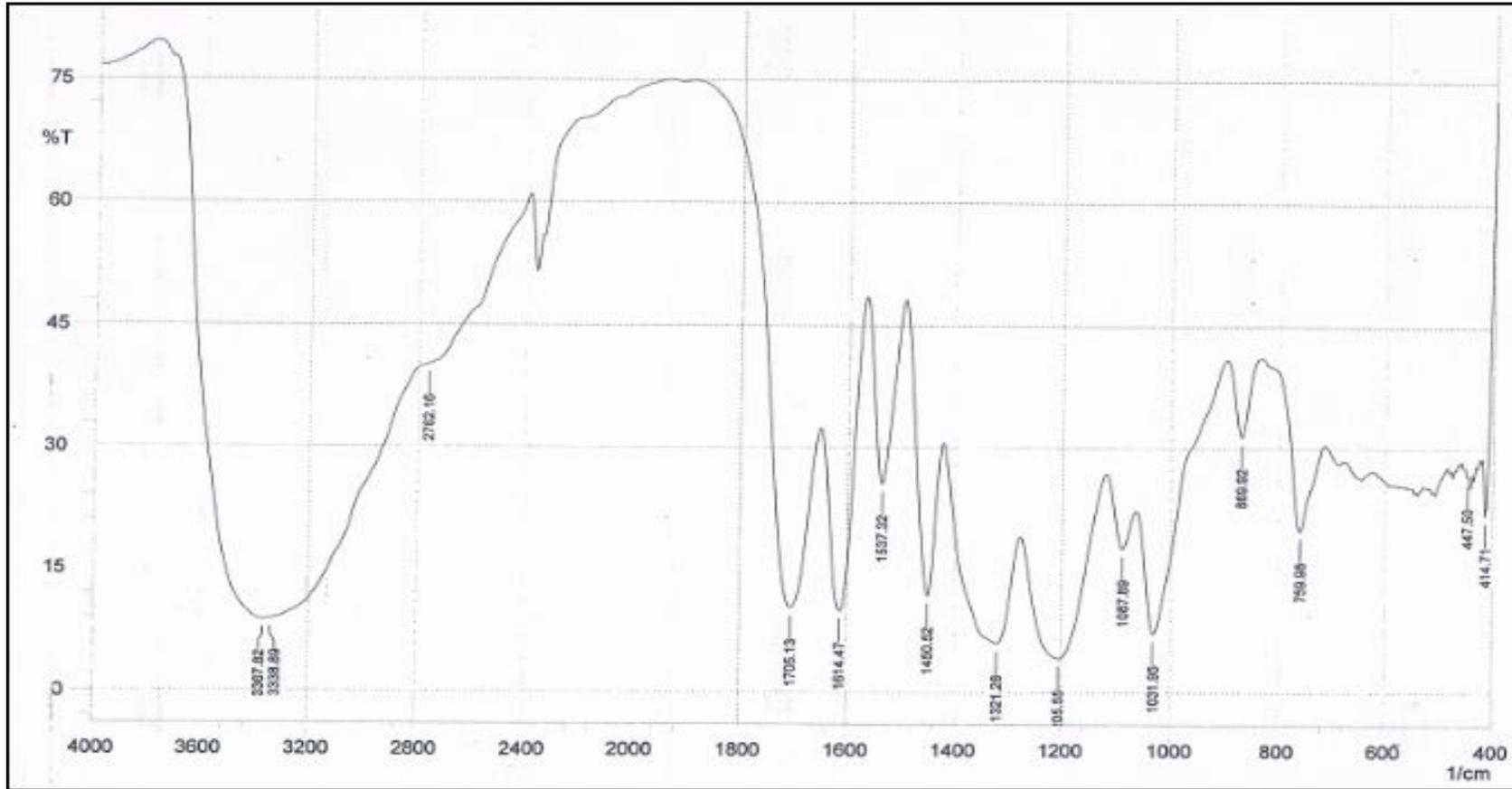
الشكل 8 : طيف الأشعة تحت الحمراء لطبقات المغنيسيوم/الألمنيوم ثنائية الهيدروكسيد



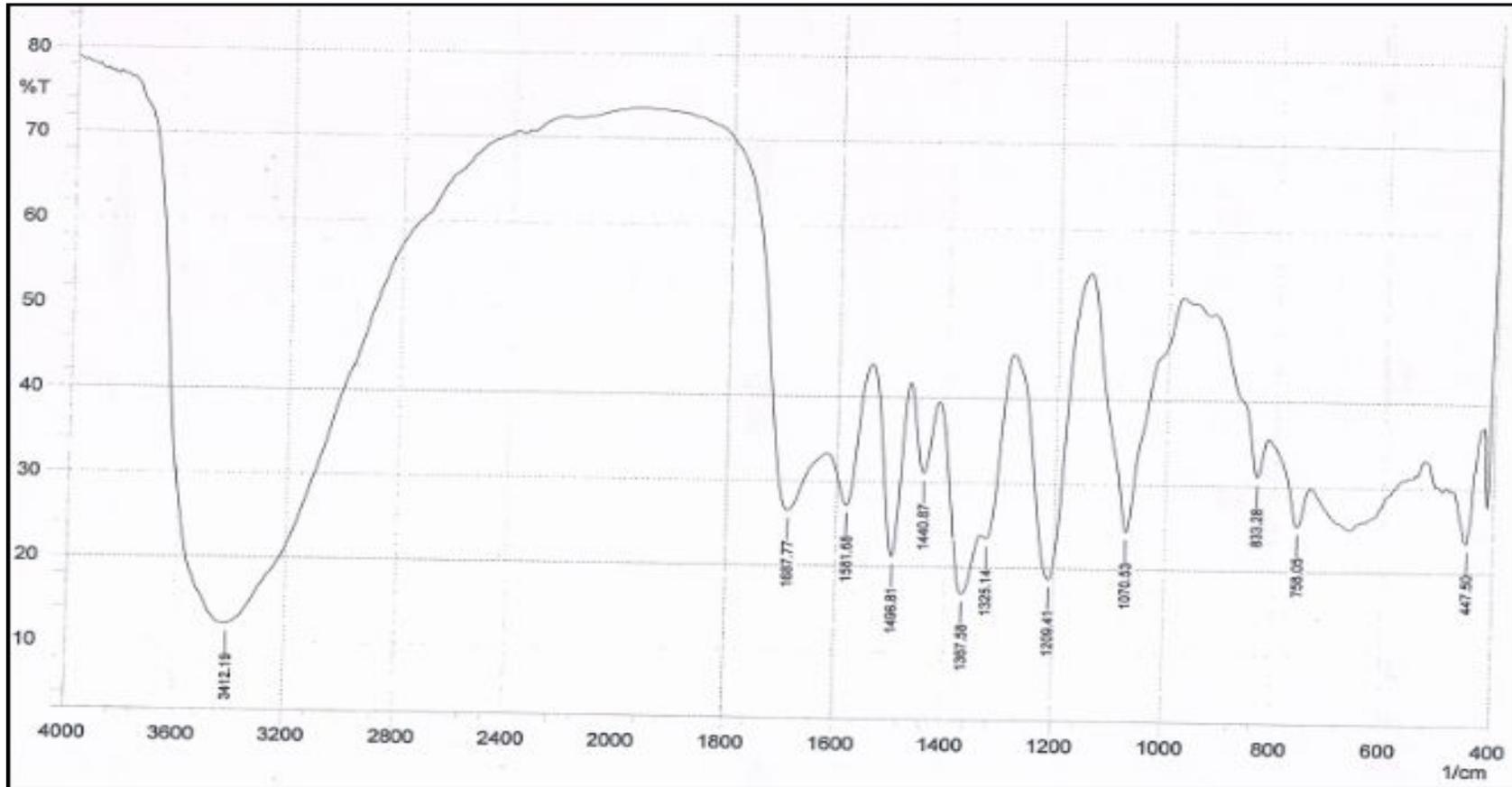
الشكل 9 : طيف الأشعة تحت الحمراء لمطهر الكلور هكسدين CHX الحر



الشكل 10 : طيف الأشعة تحت الحمراء للمطهر الكلور هكسدين النانوي الهجين Mg/Al-CHX-LDH



الشكل 11 : طيف الأشعة تحت الحمراء لحمض التانيك TA



الشكل 12: طيف الأشعة تحت الحمراء لحمض التانيك النانوي الهجين Mg/Al-TA-LDH

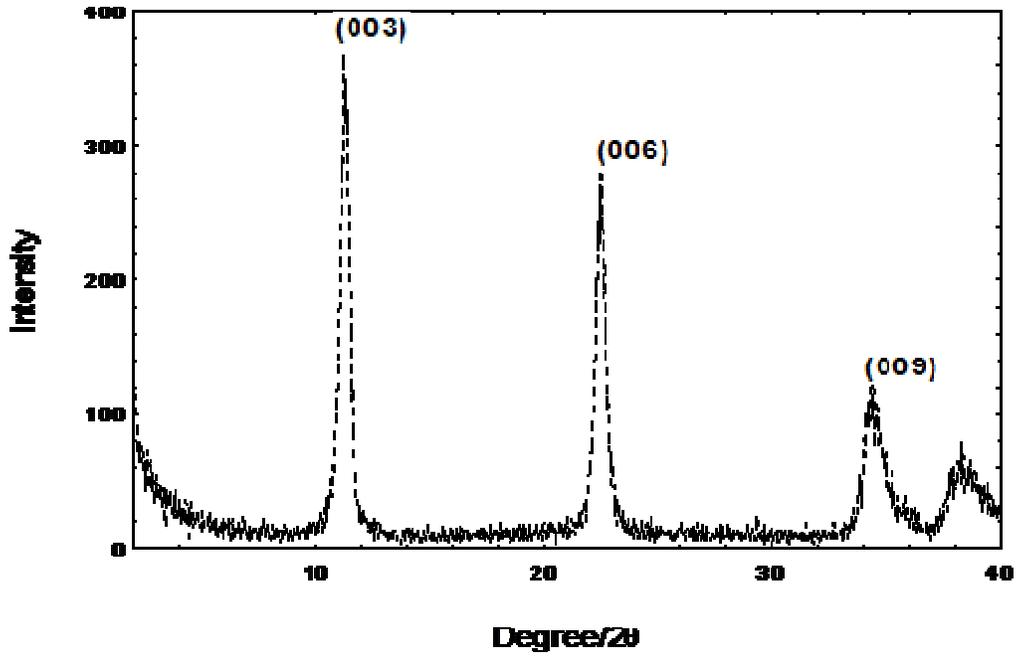
### 3-4-2 طيف حيود الأشعة السينية (XRD)

تم دراسة طيف حيود الأشعة السينية لكل من الكلور هكسدين النانوي الهجين Mg/Al-CHX-LDH وحامض التانيك النانوي الهجين Mg/Al-TA-LDH وطبقات المغنسيوم \ الالمنيوم ثنائية الهيدروكسيد (Mg/Al-NO<sub>3</sub>-LDH) لمعرفة الاختلاف في سمك الطبقة قبل عملية اقحام كل من الكلور هكسدين وحامض التانيك داخل طبقات ثنائية الهيدروكسيد وبعدها باستخدام قانون براك.

يبين الشكل 13 طيف حيود الأشعة السينية لطبقة المغنسيوم \ الالمنيوم ثنائية الهيدروكسيد اذ لوحظت المستويات البلورية (003) و (006) و (009). فالمستوى (003) يظهر عند الزاوية (10.47)° و بمسافة بلورية تساوي (0.84) اما المستوى (006) فيظهر عند الزاوية (22.03)° و بمسافة بلورية تساوي (0.41) نانوميتر، بينما يظهر المستوى (009) عند الزاوية (34.44)° و بمسافة بلورية تساوي (0.26) نانوميتر.

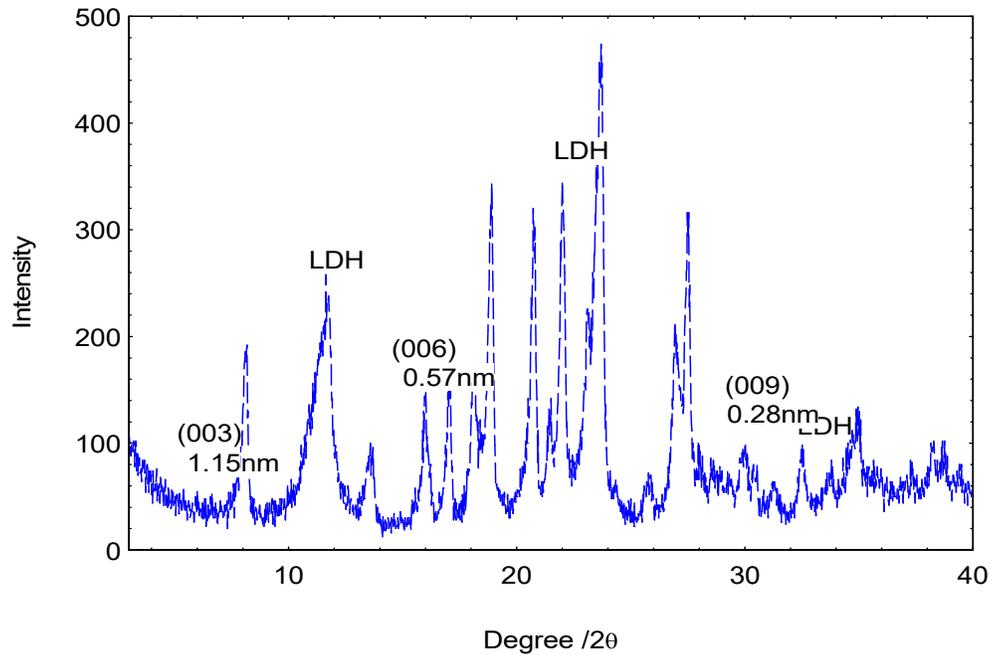
اسفرت عملية اقحام المطهر كلور هكسدين عن ظهور مستويات حيود جديدة وبأكثر من طور . يمثل الطور الأول : الطور العمودي وتم فيه الحصول على المستويات (003) و (006) و (009) وبمستويات بلورية عمودية كانت المسافة البلورية لها (d) تساوي (1.15 و 0.57 و 0.28) نانوميتر ، على التوالي . اما الطور الثاني : والذي يمكن تفسيره بأن الجزيئات المقحمة أتخذت شكلاً مائلاً بين طبقتي LDH ، إذ ظهرت d له للمستويات البلورية (003) و (006) و (009) عند (1.08 و 0.55 و 0.27) نانوميتر ، على التوالي (الشكل 14).

و من خلال ملاحظة طيف حيود الأشعة السينية لحامض التانيك الهجين في الشكل 15 يبدو أن عملية الاقحام قد تمت بنجاح إذ لوحظ ظهور حزم حيود متداخلة بعضها يعود لحامض التانيك واخرى تعود لطبقات ثنائية الهيدروكسيد ومتقاربة في المواقع مما تعذر فصلها بشكل واضح جداً . تقع المستويات البلورية (003) و (006) و (009) عند المسافات البلورية (1.587 و 0.76 و 0.39) نانوميتر، على التوالي .

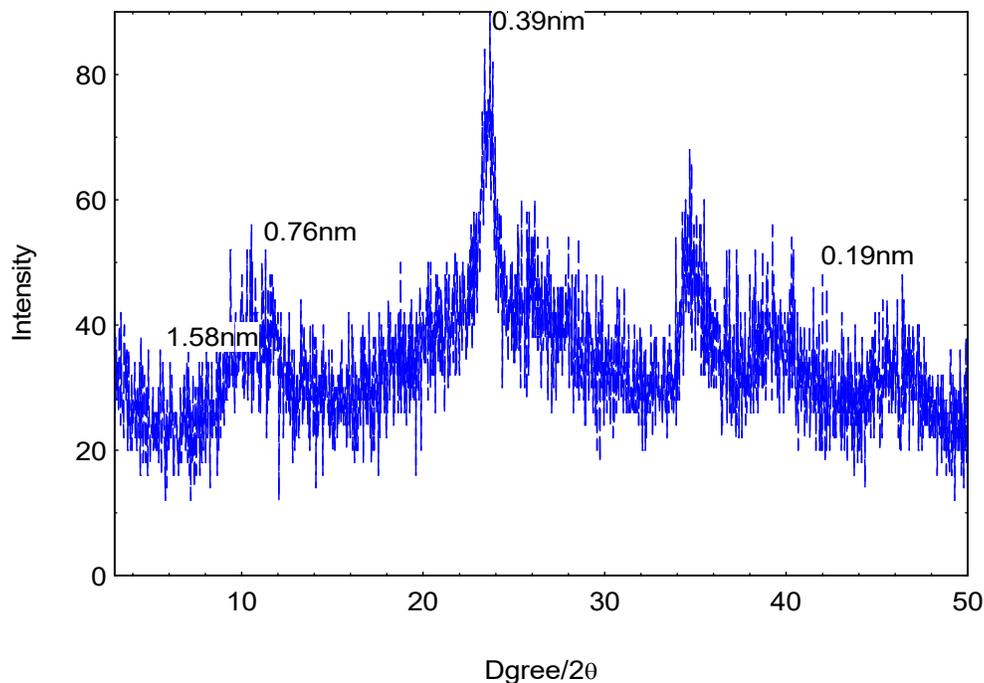


الشكل 13: طيف حيود الأشعة السينية (XRD) لطبقة المغنيسيوم/الألمنيوم ثنائية الهيدروكسيد

(Mg/Al-NO<sub>3</sub>-LDH)



الشكل 14 : طيف حيود الأشعة السينية (XRD) للكوروكسين النانوي الهجين Mg/Al-CHX-LDH



الشكل 15 : طيف حيود الأشعة السينية (XRD) لحامض التانيك النانوي الهجين Mg/Al-TA-LDH

### 3-4-3 مجهر القوة الذرية (AFM)

تم دراسة السطح الخارجي لكل من المطهر النانوي الهجين Mg/Al-CHX-LDH وحامض التانيك النانوي الهجين Mg/Al-TA-LDH باستخدام مجهر القوة الذرية ويبين الشكل 16a صورة ثنائية الأبعاد للمطهر النانوي تظهر فيها تجمعات جزيئية ذات أشكال شبه كروية ، كما يظهر الشكل 16b صورة ثلاثية الأبعاد لمقطع من سطح المطهر النانوي الهجين ويُلاحظ فيها ارتفاع التجمعات الجزيئية الذي يكون بحدود 1.41 نانوميتر مما يشير إلى تصنيع مطهر نانوي هجين من المطهر الحر وطبقات ثنائية الهيدروكسيد .

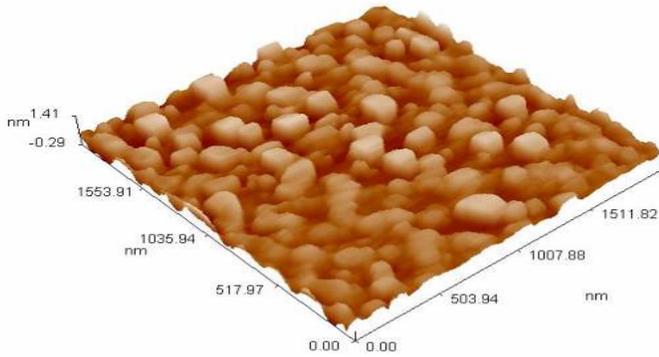
ويتضح من الجدول 21 أن معدل أحجام الجزيئات (Means of particl size) للمطهر النانوي Mg/Al-CHX-LDH هي بحدود 121.66 نانوميتر وقد أدت عملية تحضير هذا المطهر الهجين إلى الحصول على جزيئات بأقطار 90 و 100 نانوميتر بنسب (10.20 و 11.22) % ، على التوالي .

الجدول 21: أقطار وحجوم وتجمعات جزيئات المركب النانوي Mg/Al-CHX-LDH

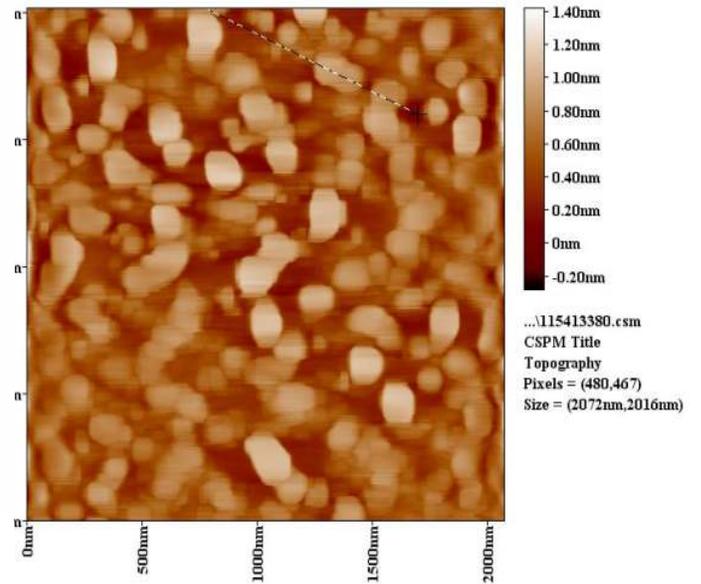
بعد فحصه بمجهر القوة الذرية

**Avg. Diameter:121.66 nm**

Diameter(nm)<	Volume(%)	Cumulation(%)	Diameter(nm)<	Volume(%)	Cumulation(%)	Diameter(nm)<	Volume(%)	Cumulation(%)
90.00	11.22	11.22	130.00	11.22	63.27	170.00	2.04	96.94
100.00	10.20	21.43	140.00	11.22	74.49	180.00	3.06	100.00
110.00	14.29	35.71	150.00	9.18	83.67			
120.00	16.33	52.04	160.00	11.22	94.90			



( b )



( a )

الشكل 16 : صورة ثنائية الابعاد (a) وثلاثية الابعاد (b) للمطهر النانوي الهجين Mg/Al-CHX-LDH

تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما وجدته (Beherei *et al.*, 2011) إذ تم الحصول على جزيئات نانوية هجينة مضادة للبكتريا بمعدل أقطار تتراوح بين ( 95.5-196) نانوميتر، كما تتفق أيضاً مع توصل اليه (Du *et al.*, 2009) الذي تمكن من الحصول على عدة أنواع من جزيئات نانوية هجينة لها فعالية مضادة للأحياء المجهرية ذات أقطار (90.29 و 95.81 و 102.3 و 121.9 و 210.9) نانوميتر وذلك عبر التهجين بين الكيتوزان وايونات بعض المعادن .

يبين الشكل **17a** صورة ثنائية الأبعاد لحامض التانيك النانوي الهجين -Mg/Al-TA LDH تظهر فيها تجمعات جزيئية ذات أشكال شبه كروية كما يظهر الشكل **17b** صورة ثلاثية الأبعاد لمقطع من سطح حامض التانيك النانوي الهجين ويُلاحظ فيها ارتفاع التجمعات الجزيئية الذي يكون بحدود 0.28 نانوميتر مما يشير الى تصنيع حامض عضوي نانوي هجين من حامض التانيك الحر وطبقات ثنائية الهيدروكسيد .

ويتضح من الجدول 22 أن معدل أقطار احجام جزيئات المركب Mg/Al-TA-LDH هي بحدود 77.70 نانوميتر وقد أدت عملية تحضير هذا الحامض الهجين الى الحصول على جزيئات بأقطار ( 20 و 25 و 30 و 35 و 40 و 45 و 50 و 55 و 60 و 65 و 70 و 75 و 80 و 85 و 90 و 95 و 100) نانوميتر بنسب ( 0.91 و 1.37 و 0.46 و 2.28 و 3.20 و 4.11 و 5.48 و 6.85 و 6.85 و 5.94 و 3.65 و 5.48 و 7.31 و 5.48 و 4.57 و 3.65 و 7.31) % ، على التوالي .

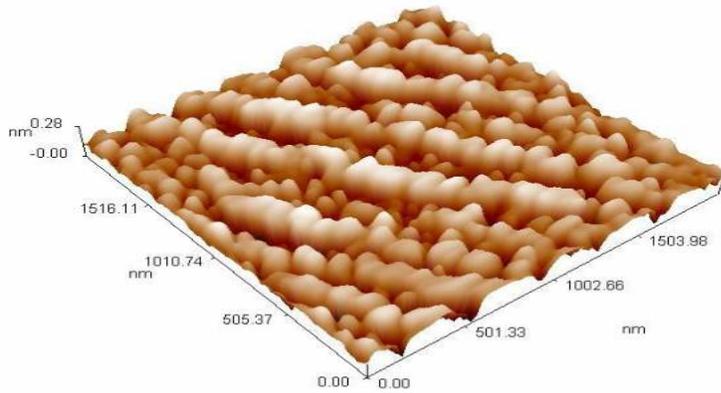
تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما وجدته (Zarina & Nanda, 2014) إذ تم الحصول على جزيئات مضادات نانوية هجينة ذات أشكال كروية بمعدل أحجام تتراوح بين (50- 76) نانوميتر . كما تتفق أيضاً مع ما حصل عليه الفتلاوي (2014) و الحمداني ( 2015 ) إذ أدى إقحام كل من المضاد Octyl gallate وكذلك المضاد Oxyteracyclin بين طبقات ثنائية الهيدروكسيد الى الحصول على مركبات نانوية هجينة بمعدل أقطار ( 82.49 و 76.16) نانوميتر ، على التوالي .

الجدول 22: اقطار وحجوم وتجمعات جزيئات المركب النانوي Mg/Al-TA-LDH

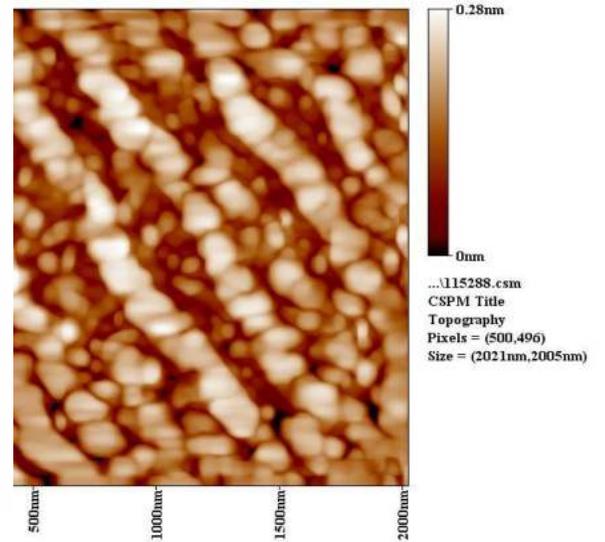
بعد فحصه بمجهر القوة الذرية

**Avg. Diameter:77.70 nm**

Diameter(nm)<	Volume(%)	Cumulation(%)	Diameter(nm)<	Volume(%)	Cumulation(%)	Diameter(nm)<	Volume(%)	Cumulation(%)
20.00	0.91	0.91	60.00	6.85	31.51	100.00	7.31	74.89
25.00	1.37	2.28	65.00	5.94	37.44	105.00	7.76	82.65
30.00	0.46	2.74	70.00	3.65	41.10	110.00	2.28	84.93
35.00	2.28	5.02	75.00	5.48	46.58	115.00	5.48	90.41
40.00	3.20	8.22	80.00	7.31	53.88	120.00	4.57	94.98
45.00	4.11	12.33	85.00	5.48	59.36	125.00	2.74	97.72
50.00	5.48	17.81	90.00	4.57	63.93	130.00	2.28	100.00
55.00	6.85	24.66	95.00	3.65	67.58			



(b)



(a)

الشكل 17 صورة ثنائية الأبعاد (a) وثلاثية الأبعاد (b) لحامض التانيك النانوي الهجين Mg/Al-TA-LDH

## 3-4-4 المجهر الإلكتروني الماسح (SEM)

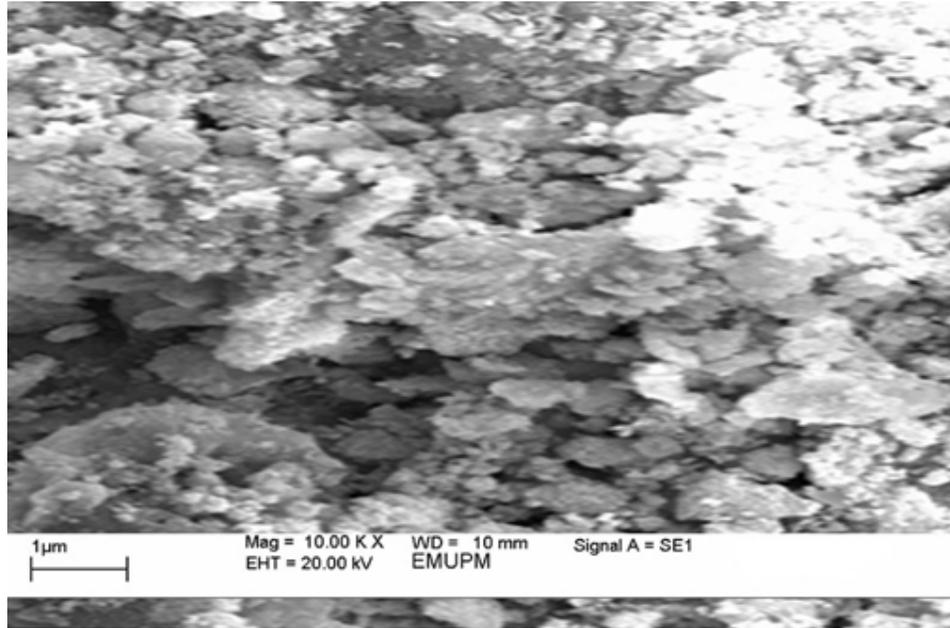
تم دراسة السطح الخارجي لكل من الكلوروكسدين النانوي Mg/Al-CHX-LDH و حامض التانيك النانوي Mg/Al-TA-LDH وكذلك سطح الطبقات ثنائية الهيدروكسيد باستخدام المجهر الإلكتروني الماسح (SEM) .

يبين الشكل 18 صورة المجهر الإلكتروني الماسح للطبقات ثنائية الهيدروكسيد إذ يلاحظ فيها وجود تراكيب شبيهة بالصفائح ( Plate-like structures ) قليلة المسامات ذات أشكال و أحجام غير منتظمة (Wang & Zhang, 2012) ، في حين أن صورة المجهر الإلكتروني الماسح للكلوروكسدين الهجين تبين وجود تراكيب ذات مسامية عالية بين الطبقات نتيجة للتجاذب الحاصل بين المطهر و سطح الطبقات ثنائية الهيدروكسيد مما يدل على نجاح عملية إقحام المطهر بين الطبقات ثنائية الهيدروكسيد كما في الشكل 19 .

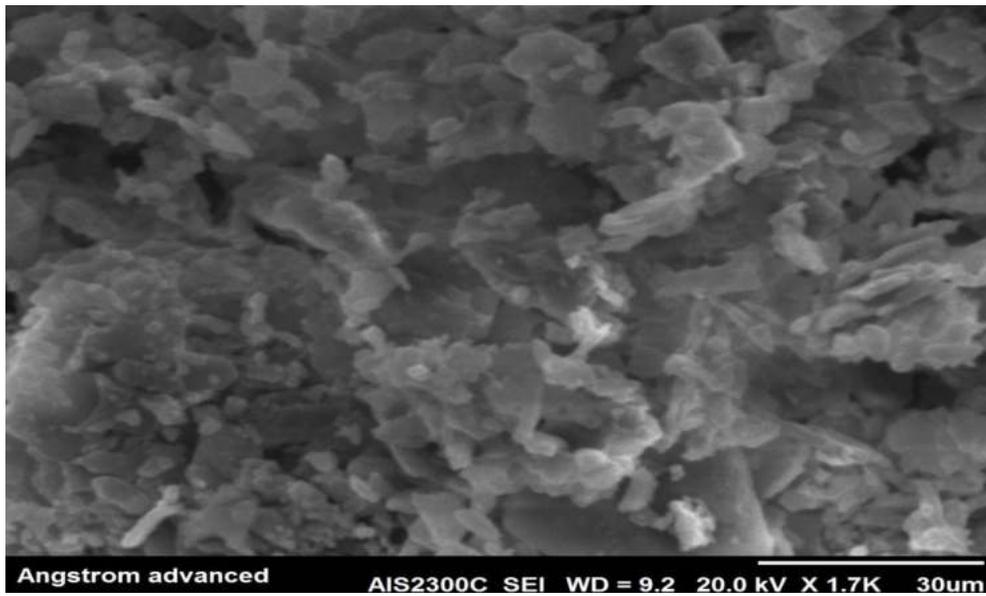
تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما حصل عليه الفتلاوي (2014) و الحمداني ( 2015 ) إذ أدى إقحام كل من المضادين Octyl gallate وكذلك المضاد Oxyteracyclin بين طبقات ثنائية الهيدروكسيد الى تكوين تراكيب ذات مسامية عالية .

وتبين صورة المجهر الإلكتروني الماسح لحامض التانيك الهجين الموضحة في الشكل 20 ظهور شكل غير مسامي عند تكوين الحامض النانوي الهجين الناتج عن التفاعل المباشر لطبقات ثنائية الهيدروكسيد مع حامض التانيك الحر مما يدل على نجاح عملية إقحام الحامض الى طبقات ثنائية الهيدروكسيد.

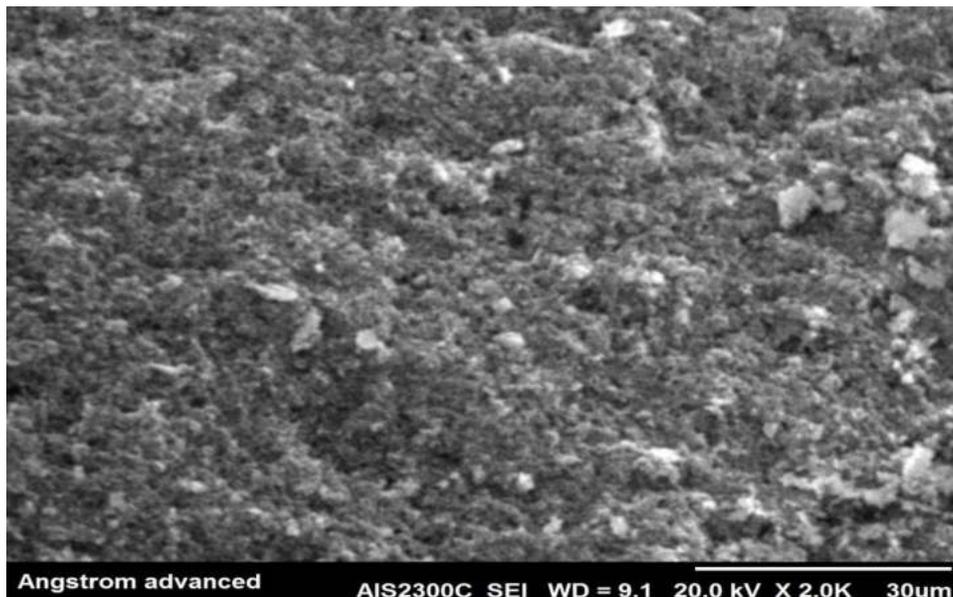
تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما حصل عليه السعيد (2015) إذ تم الحصول على مضاد فطري نانوي هجين ذو تركيب غير مسامي عبر تفاعل المضاد نستاتين مع أوكسيد الزنك . في حين أشار Bhattachary *et al.* (2012) الى أن إقحام المضادات Ampicillin و Streptomycin و Kanamycin في جزيئات الذهب النانوية (Gold nanoparticles) يؤدي الى الحصول على تراكيب مكعبية (Cubic structures) وقضيبية (Rod) و شبيهة بالنجمة (Extended star like structure) ، على التوالي .



الشكل ( 18 ) صورة بالمجهر الالكتروني الماسح (SEM) لطبقات المغنيسيوم الالمنيوم ثنائية الهيدروكسيد (Mg/Al-NO<sub>3</sub>-LDH)



الشكل 19 : صورة بالمجهر الإلكتروني الماسح للمطهر النانوي الهجين Mg/Al-CHX-LDH



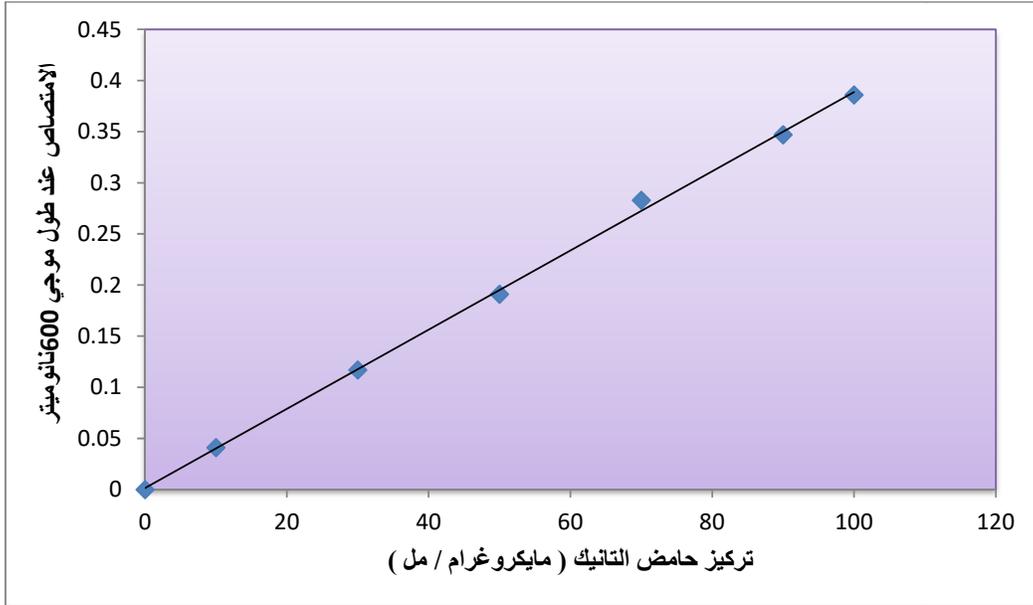
الشكل 20 : صورة بالمجهر الإلكتروني الماسح للحامض النانوي الهجين Mg/Al-TA-LDH

### 5-3 التحليل الدقيق للعناصر :

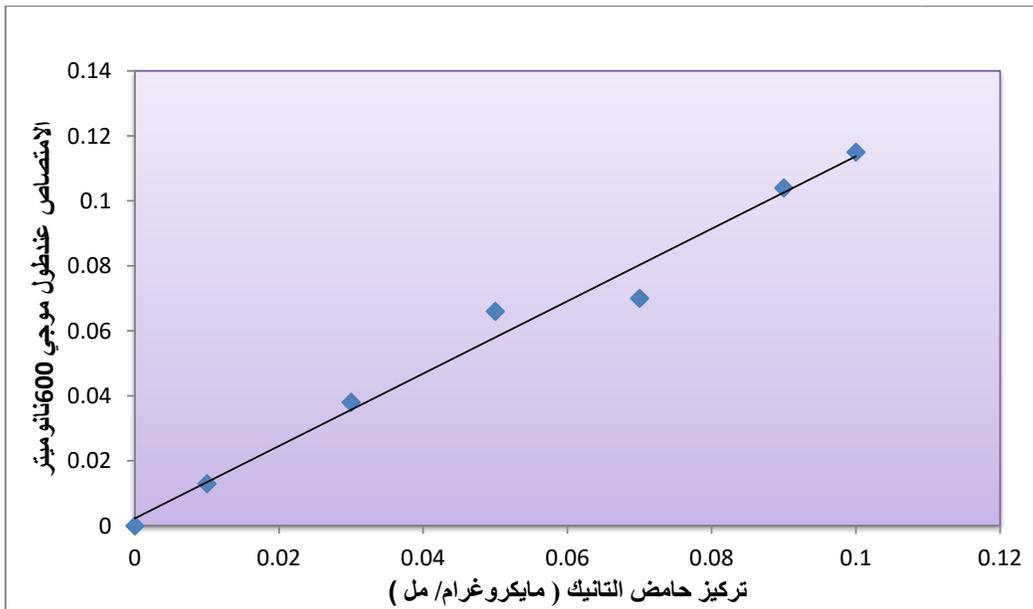
أوضحت نتائج التحليل الدقيق للعناصر إحتواء المطهر النانوي الهجين Mg/Al-CHX-LDH و المطهر الحر على نسب من الكربون و الهيدروجين والنيتروجين بلغت ( 30.259 و 4.931 و 18.214 ) % و ( 48.201 و 6.339 و 21.060 ) % ،على التوالي . ومن خلال هذه النتائج يتضح أن نسبة الكلور هكسدين المحمل بين طبقات ثنائية الهيدروكسيد بلغت 62.77 % .

### 6-3 تقدير حامض التانيك المحمل على طبقات ثنائية الهيدروكسيد :

تم عمل منحنى قياسي لكل من حامض التانيك الحر وحامض التانيك النانوي الهجين بمدى من التراكيز تراوحت بين ( 10-100 ) مايكروغرام / مل . واعتماداً على هذين المنحنيين الموضحين في الشكلين ( 21 و 22 ) تبين أن كمية حامض التانيك المحمل بين طبقات ثنائية الهيدروكسيد تساوي 33.08 % .



الشكل 21 : المنحنى القياسي لتقدير حامض التانيك الحر بطريقة Folin-Ciocalteu



الشكل 22 : المنحنى القياسي لتقدير الحامض النانوي الهجين Mg/Al-TA-LDH

بطريقة Folin-Ciocalteu

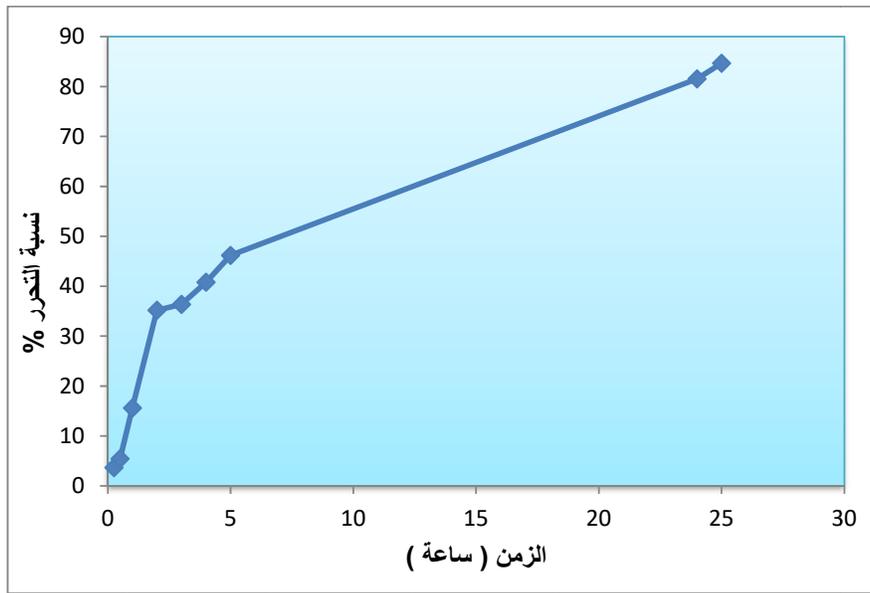
## 3-7 دراسة تحرر المركبات النانوية الهجينة

## 1-7-3 تحرر الكلوروكسدين من المطهر النانوي الهجين Mg/Al-CHX-LDH

تم دراسة تحرر الكلوروكسدين من المطهر النانوي الهجين Mg/Al-CHX-LDH الى المحلول المنظم الفسيولوجي وبمدد زمنية تراوحت بين (0.25- 25) ساعة باستخدام المعادلة الآتية :

$$\text{Release \%} = \text{Ct} / \text{CT} * 100$$

يتضح من الشكل 23 أن نسبة تحرر الكلوروكسدين من المطهر النانوي الهجين Mg/Al-CHX-LDH الى المحلول منظم الفوسفات (pH 7.4) بلغت 84.66 % بعد مرور 25 ساعة.



الشكل 23 : النسبة المئوية لتحرر المطهر كلوروكسدين من المطهر النانوي الهجين Mg/Al-CHX-LDH الى محلول منظم الفوسفات (برقم هيدروجيني 7.4) بطريقة التبادل الأيوني المباشر

تعد نتائج الدراسة الحالية مقارنة لما حصل عليه Tabary *et al.* (2014) الذي أشار الى أن نسبة تحرر الكلوروكسدين المحمل على السيللوز 80 % في الوسط الفسيولوجي المتعادل بعد مرور 48 ساعة ، كما تتفق ايضاً مع (Loveymi *et al.* 2012) إذ وصلت نسبة تحرر

المضاد Vancomycin المحمل على Eudragit RS 100 الى (84-87) % بعد مرور 24 ساعة ، كما تعد نسبة التحرر المستحصلة من هذه الدراسة عالية مقارنة بما ورد في دراسات أخرى ، إذ بلغت نسبة تحرر الباراسيتامول المحمل بين طبقات ثنائية الهيدروكسيد (Mg/Al) في وسط الفوسفات المتعادل (pH 7.4) الى 60 % بعد مرور ساعة , (Kovanda *et al.* , 2011) .

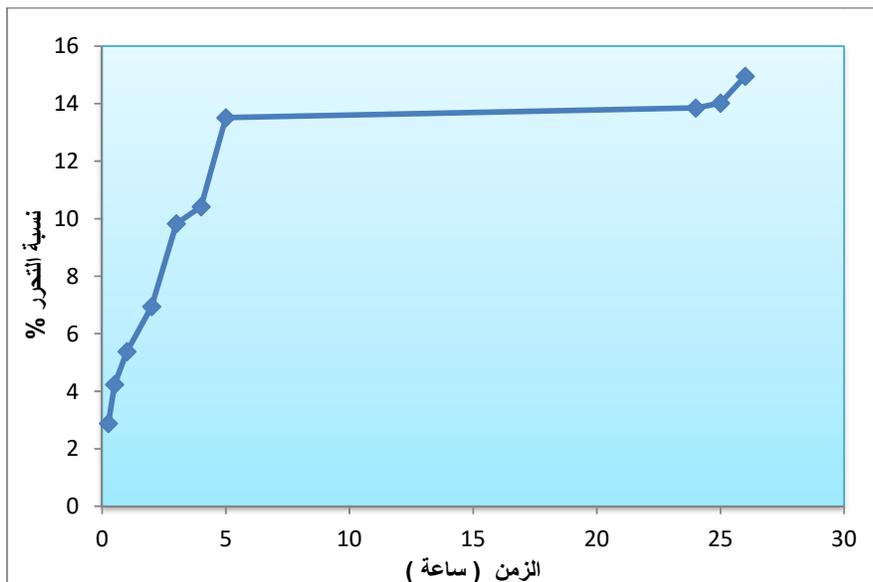
تعد نسبة التحرر المستحصلة في هذه الدراسة أقل مما حصل عليه ( Khalil *et al.*, 2013 ) إذ وصلت نسبة تحرر النستاتين المحمل على Solid lipid الى 100% بعد مرور 24 ساعة . كما بلغت النسبة ذاتها للمضاد streptomycin المحمل على الكيتوزان الى وسط الفوسفات المتعادل (pH 7.4) بعد مرور 350 دقيقة (Hussein- Al-Ali *et al.*, 2014) .

### 2-7-3 تحرر حامض التانيك من الحامض النانوي الهجين Mg/Al-TA-LDH

تم دراسة تحرر حامض التانيك من الحامض النانوي الهجين Mg/Al-TA -LDH الى المحلول المنظم الفسيولوجي وبنفس الظروف المتبعة في دراسة تحرر الكلوروكسدين المشار اليها في الفقرة السابقة .

يتضح من الشكل 24 أن نسبة تحرر حامض التانيك من الحامض النانوي الهجين Mg/Al-TA-LDH الى المحلول منظم الفوسفات (pH 7.4) بلغت 14.95 % بعد مرور 26 ساعة .

تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما توصل اليه (Aelenei *et al.* (2009) إذ كانت نسبة تحرر حامض التانيك المحمل على الكيتوزان (Chitosan) في الوسط المتعادل أقل من 20 % . في حين تعد نسبة التحرر المستحصلة في هذه الدراسة أقل مما حصل عليه السعيد (2015) إذ وصلت نسبة تحرر المضاد الفطري الكلوتريمازول المحمل على طبقت ثنائية الهيدروكسيد (Mg/Al) في وسط الفوسفات المتعادل (pH 7.4) الى 40 % بعد مرور 4 ساعات ليستقر عند هذه النسبة بعد مرور 24 ساعة .

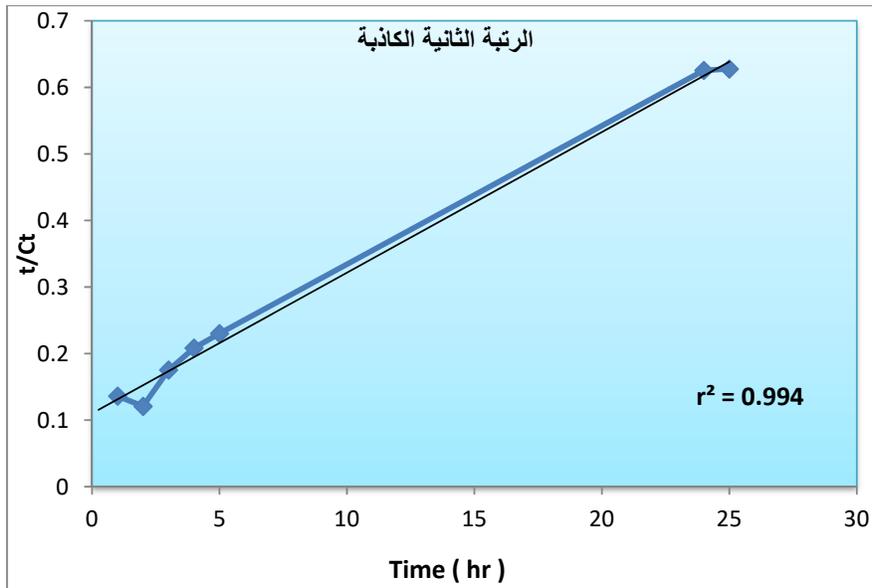
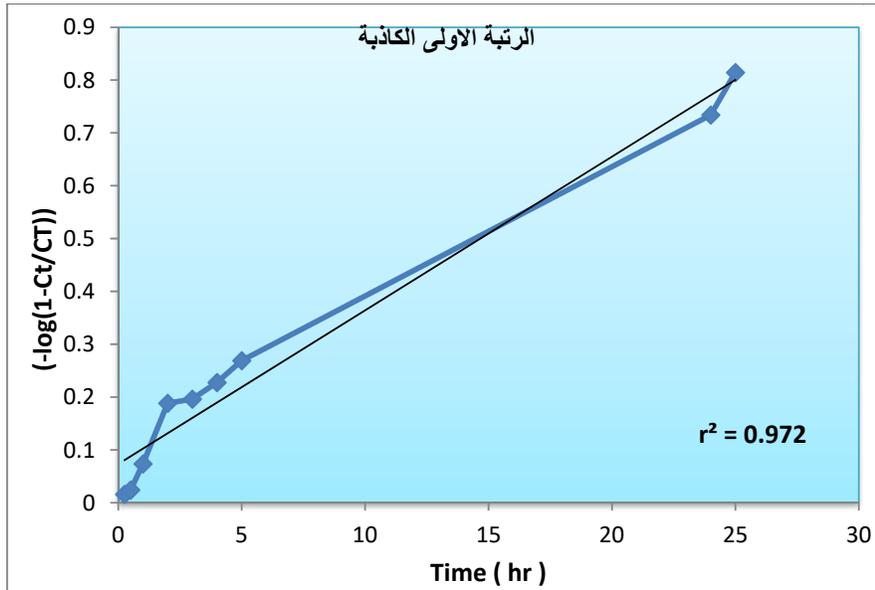


الشكل 24 : النسبة المئوية لتحرر حامض التانيك من الحامض النانوي الهجين Mg/Al-TA-LDH الى محلول منظم الفوسفات (برقم هيدروجيني 7.4) بطريقة التبادل الأيوني المباشر

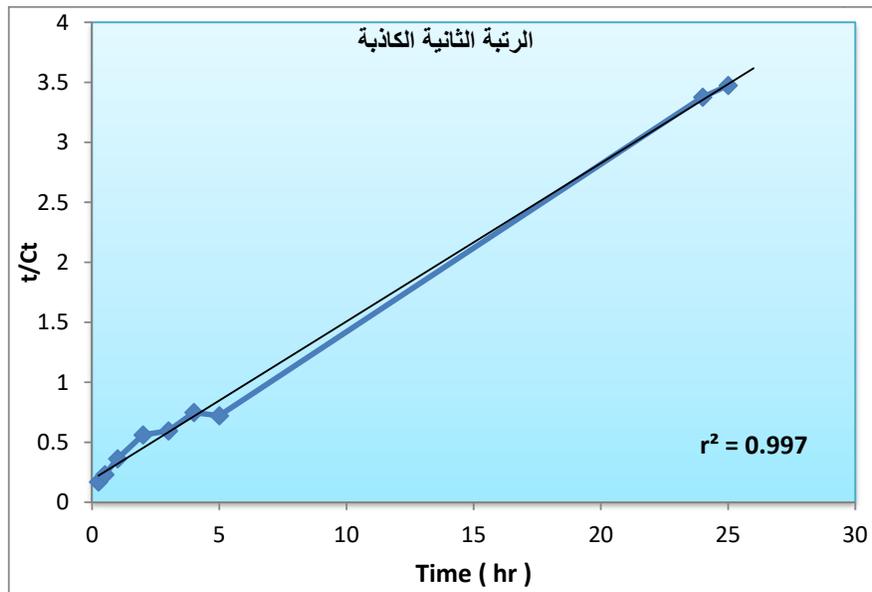
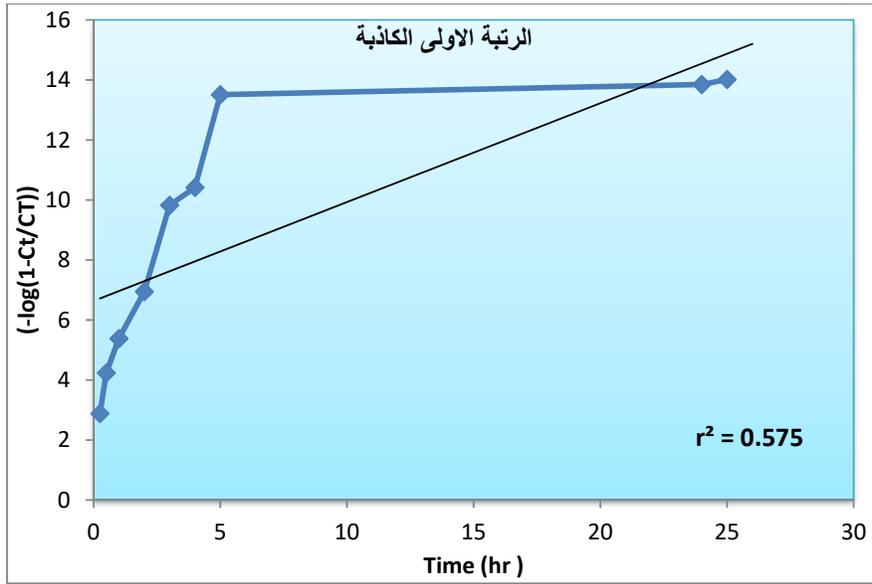
### 3-7-3 دراسة حركيات التحرر (Release Kinetics)

تم دراسة حركيات التبادل الأيوني لتحرر كل من الكلوروكسدين وحامض التانيك الى محلول منظم الفوسفات (pH 7.4) من خلال تطبيق معادلات الرتبة الأولى و الثانية الكاذبتين للإنتشار .

يلاحظ من الأشكال 25 و 26 إنحراف القيم عن الخط المستقيم مما يدل على عدم مطاوعة عملية التحرر لموديل الرتبة الأولى الكاذبة ولذلك طبقت معادلة الرتبة الثانية الكاذبة إذ تم رسم  $t/ct$  مقابل الزمن  $(t)$  و تم إستخراج قيم معامل الارتباط ( $r^2$ ) لذا يتضح من الأشكال المذكورة أعلاه أن الموديل الرياضي للرتبة الثانية الكاذبة هو الأكثر إنطباقاً لتفسير سلوكية تحرر المطهر كلوروكسدين وحامض التانيك من بين طبقات المطهر النانوي الهجين Mg/Al-CHX-LDH و الحامض النانوي الهجين Mg/Al-TA-LDH ، على التوالي للمحلول المنظم قيد الدراسة . وقد بلغت قيم معامل الارتباط ( $r^2$ ) (0.994 و 0.997) للكلوروكسدين وحامض التانيك ، على التوالي .



الشكل 25 : موديل الرتبة الأولى و الثانية للكلوروكسدين الى محلول منظم الفوسفات (pH 7.4)



الشكل 26 : موديل الرتبة الأولى و الثانية لتحرر حامض التانيك الى محلول منظم الفوسفات (pH 7.4)

تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما وجدته الفتلاوي ( 2014 ) إذ كان موديل الرتبة الثانية الكاذبة هو الأكثر إنطباقاً لتفسير سلوكية تحرر المادة الحافظة Octyl gallate من طبقات ثنائية الهيدروكسيد فقد تراوحت قيمة معامل الارتباط ( $r^2$ ) بين ( 0.9997 و 1 ) و تتفق أيضاً مع ماتوصل اليه السعيد ( 2015 ) إذ كان موديل الرتبة الثانية الكاذبة هو الأكثر إنطباقاً لتفسير سلوكية تحرر المضاد الفطري الكلوتريمازول المحمل على طبقات ثنائية الهيدروكسيد فقد بلغت قيمة معامل الارتباط  $r^2=1$  في الوسط الفسيولوجي المتعادل، في حين كان موديل الرتبة الأولى الكاذبة هو الأكثر إنطباقاً لتفسير سلوكية حركية تحرر المضاد Streptomycin من بين طبقات الكيتوزان فقد بلغت قيمة معامل الارتباط  $r^2= 0.9863$  ( Hussein-Al-Ali et al. 2014 ) .

### 8-3 الفعالية التثبيطية للمطهر كلورهكسدين (CHX) ضد الأحياء المجهرية المسببة لخمج الحروق.

#### 1-8-3 الفعالية التثبيطية للكلورهكسدين ضد بكتريا . *Pseudomonas spp*

تم دراسة الفعالية التثبيطية للمطهر CHX بنوعيه الحر والنانوي الهجين ضد بكتريا *Pseudomonas spp* المسببة لخمج الحروق والمعزولة في هذه الدراسة ويتضح من النتائج المبينة في الجدول 23 ان هناك تبايناً في تأثير المطهر الحر و النانوي الهجين على الانواع البكتيرية المدروسة اذ ان العزلتين ( 11 و A - 24 ) *P. aeruginosa* هما الاكثر تأثراً بالمطهر النانوي LDH -CHX بقطر تثبيط مقداره 24 ملم عند التركيز 5 ملغم/ مليلتر لكل منهما بينما كانت العزلة C - 4 *P. aeruginosa* الاكثر تأثراً بفعل الكلورهكسدين الحر إذ بلغت الفعالية التثبيطية 23.5 ملم عند التركيز ذاته .

كما يتضح من الجدول نفسه ان العزلة 18 هي الاقل تأثراً بفعل الكلورهكسدين النانوي الهجين بقطر تثبيط مقداره 18.5 ملم عند التركيز 5 ملغم/ مليلتر بينما كانت العزلة A- 24 هي الاقل تأثراً بفعل الكلورهكسدين الحر بقطر تثبيط مقداره 19.5 ملم عند التركيز ذاته ايضاً .

يملك الكلوروكسدين فعالية مضادة للأحياء المجهرية إذ تعتمد آلية تأثيره على الارتباط بجدار الخلية البكتيرية ذو الشحنة السالبة مؤثراً بذلك على التوازن التناضحي (Osmotic equilibrium) للخلية، إذ ترتبط المجاميع ثنائية الكوانيد (Biguanide groups) بقوة مع المواقع ذات الأيونات السالبة الموجودة على كل من جدار وغشاء الخلية البكتيرية. إن تكوين الجسور بين المجاميع الرأسية للدهون المفسفرة المتجاورة يؤدي إلى استبدال الأيونات الموجبة ثنائية التكافؤ مثل  $Ca^{2+}$  و  $Mg^{2+}$  التي تعمل طبيعياً على استقرار غشاء الخلية وكنتيجة لذلك فإن غشاء الخلية البكتيرية يصبح ناضحاً لكل من أيونات البوتاسيوم والبروتونات، أما عند استخدام تراكيز عالية من الكلوروكسدين فإن ارتباطه بالغشاء يؤدي إلى فقدان السلامة التركيبية (Structural integrity) للغشاء مؤدياً إلى موت الخلية (Horner et al., 2012).

في دراسة قام بها Owlia et al. (2006) عن استخدام الكلوروكسدين ضد بكتريا *P. aeruginosa* المقاومة للأدوية المعزولة من خمج الحروق من احد المستشفيات في مدينة طهران بأيران، تبين أن هذا المطهر كان فعالاً ضد البكتريا قيد الدراسة بقطر تثبيط مقداره  $14.4 \pm 1.9$  ملم، وفي دراسة أخرى أجريت في البرازيل تم الحصول على فعالية تثبيطية أعلى للكلوروكسدين ضد البكتريا ذاتها بمعدل تثبيط مقداره 24 ملم (Estrela et al., 2003).

أظهرت نتائج التحليل الإحصائي أن هناك فروقات معنوية  $p < 0.05$  بين العزلات المدروسة من بكتريا *Pseudomonas spp.* وكذلك بين المركب الحر والنانوي الهجين Mg/Al-CHX-LDH وبين التراكيز المستعملة من هذين المركبين.

تبين النتائج في الجدول ذاته أن العزلة *P. oryzihabitans* 14-B كانت أكثر حساسية تجاه المركبين المدروسين إذ أعطت أعلى معدل تثبيط والبالغ 13.50 ملم وبفروقات  $p < 0.05$  معنوية عن بقية العزلات بينما كانت عزلتا *P. aeruginosa* (15-A و 4-C) أكثر مقاومة للمركبين إذ أعطيا أقل معدل تثبيط وهو (6.75 و 6.875) ملم، على التوالي.

الجدول 23: الفعالية التثبيطية للمركب النانوي CHX-LDH و المركب الحر CHX ضد البكتريا *Pseudomonas spp.*

معدل تثبيط العزلات	CHX-Free						CHX-LDH						المركبات
	5	1	0.5	0.25	0.1	0.01	5	1	0.5	0.25	0.1	0.01	تركيز المركب (ملغم/مل)
	قطر التثبيط بالملم												عزلات البكتريا
9.375 C	20.5	17	12	11	0	0	22.5	16.5	13	0	0	0	<i>P. aeruginosa</i> 1
6.75 F	20	13	11.5	0	0	0	22.5	14	0	0	0	0	<i>P. aeruginosa</i> 15-A
7.66 E	21	14	11.5	0	0	0	18.5	15.5	11.5	0	0	0	<i>P. aeruginosa</i> 18
6.875 F	23.5	15.5	11	0	0	0	20	12.5	0	0	0	0	<i>P. aeruginosa</i> 4-C
12.75 B	19.5	14.5	13	11.5	0	0	24	21	18.5	17	14	0	<i>P. aeruginosa</i> 24-A
12.875 B	22	16	13.5	12	0	0	24	18.5	18	16	14.5	0	<i>P. aeruginosa</i> 11
8.125 D	20	16	13	0	0	0	21.5	16	11	0	0	0	<i>P. aeruginosa</i> 28-B
13.50 A	22.5	21	19.5	17.5	15	0	21.5	16.5	15	13.5	0	0	<i>P. oryzihabitans</i> 14-B
	21.12 b	14.62 d	13.12 e	6.50 g	1.875 j	0.0 k	21.81 a	16.31 c	10.87 f	5.812 h	3.562 i	0.0 k	معدل تثبيط التركيز
	9.539 B						9.727 A						معدل تثبيط المركبات

\* الحروف الكبيرة المختلفة عموديا تشير الى وجود فروقات معنوية ( $p < 0.05$ ) بين عزلات البكتريا.

\* الحروف الكبيرة المختلفة افقيا تشير الى وجود فروقات معنوية ( $p < 0.05$ ) بين المركبات.

\* الحروف الصغيرة المختلفة افقيا تشير الى وجود فروقات معنوية ( $p < 0.05$ ) بين تراكيز المركبات.

العامل	المركبات	العزلات	التركيز	التداخل
LSD <sub>0.05</sub>	0.167	0.334	0.289	1.159

كما تظهر النتائج الموضحة في الجدول ذاته تفوق المركب النانوي الهجين على المركب الحر معنوياً  $p < 0.05$  إذ كان معدل التثبيط للمركب النانوي الهجين 9.727 ملم والذي يختلف معنوياً  $p < 0.05$  عن معدل تثبيط المركب الحر والبالغ 9.539 ملم . ومما تجدر الإشارة إليه أن معدل التثبيط للتراكيز الستة المستعملة يزداد معنوياً  $p < 0.05$  بزيادة التركيز المستعمل إذ كان أعلى معدل تثبيط للمركبين النانوي والحر عند التركيز 5 ملغم/ مليلتر هو ( 21. 81 و 21.12 ) على ، التوالي .

### 3-8-2 الفعالية التثبيطية للكوروكسين ضد بكتريا *A. baumannii*

يتضح من النتائج المبينة في الجدول 24 ان المركب النانوي الهجين -Mg/Al-CHX LDH يبدي أعلى فعالية تثبيطية ضد العزلتين (16-A و 31-A) بقطر تثبيط مقداره 18 ملم عند التركيز 5 ملغم/ مليلتر لكل منهما بينما كانت أقل فعالية له ضد العزلة 22-B بقطر تثبيط مقداره 16.5 ملم عند التركيز المستخدم ذاته ، بينما ابدي المطهر CHX الحر أقل فعالية له ضد العزلة 14-A بقطر تثبيط مقداره 18 ملم عند التركيز 5 ملغم / مليلتر فيما كانت أعلى فعالية تثبيطية له ضد العزلة 22-B بقطر تثبيط مقداره 19.5 ملم عند التركيز المستخدم ذاته .  
تمكن ( Echague et al. ( 2010 من اختبار الفعالية التثبيطية للكوروكسين ضد عدد من عزلات بكتريا *Acinetobacter spp* و *Klebsiella spp* وقد تراوحت أقطار التثبيط للعزلات المدروسة بين ( 10 - 19.9 ) ملم .

أظهرت نتائج التحليل الإحصائي أن هناك فروقات معنوية  $p < 0.05$  بين العزلات المدروسة من بكتريا *A. baumannii* وكذلك بين المركب الحر والنانوي الهجين Mg/Al-CHX-LDH وبين التراكيز المستعملة من هذين المركبين .

تبين النتائج في الجدول ذاته أن العزلة 14-A كانت أكثر حساسية تجاه المركبين المدروسين إذ أعطت أعلى معدل تثبيط والبالغ 8.916 ملم وبفروقات معنوية  $p < 0.05$  عن بقية العزلات بينما كانت العزلة 22-B أكثر مقاومة للمركبين إذ أعطت أقل معدل تثبيط وهو 7.583 ملم .

الجدول 24 : الفعالية التثبيطية للمركب النانوي CHX-LDH و المركب الحر CHX ضد بكتريا *A. baumannii*

معدل تثبيط العزلات	CHX-Free						CHX-LDH						المركبات
	5	1	0.5	0.25	0.1	0.01	5	1	0.5	0.25	0.1	0.01	تركيز المركب (ملغم/مل)
	قطر التثبيط بالملم												عزلات البكتريا
8.791 A	18.5	15.5	14.5	13.5	0	0	18	14	11.5	0	0	0	<i>A. baumannii</i> 16-A
8.916 A	18	16.5	15	13.5	0	0	17.5	14	12.5	0	0	0	<i>A. baumannii</i> 14-A
8.75 A	19	15.5	14	13	0	0	18	14	11.5	0	0	0	<i>A. baumannii</i> 31-A
7.583 B	19.5	15	13.5	0	0	0	16.5	14.5	12	0	0	0	<i>A. baumannii</i> 22-B
	18.75 a	15.62 c	14.25 d	10.0 f	0.0 g	0.0 g	17.5 b	14.12 d	11.87 e	0.0 g	0.0 g	0.0 g	معدل تثبيط التركيز
	9.77 A						7.248 B						معدل تثبيط المركبات

\* الحروف الكبيرة المختلفة عمودياً تشير الى وجود فروقات معنوية ( $p < 0.05$ ) بين عزلات البكتريا.

\* الحروف الكبيرة المختلفة أفقياً تشير الى وجود فروقات معنوية ( $p < 0.05$ ) بين المركبات.

\* الحروف الصغيرة المختلفة أفقياً تشير الى وجود فروقات معنوية ( $p < 0.05$ ) بين تراكيز المركبات.

العامل	المركبات	العزلات	التركيز	التداخل
LSD <sub>0.05</sub>	0.146	0.207	0.253	0.717

كما تظهر النتائج الموضحة في الجدول ذاته تفوق المركب الحر على المركب النانوي الهجين معنوياً  $p < 0.05$  إذ كان معدل التثبيط للمركب الحر 9.77 ملم والذي يختلف معنوياً عن معدل تثبيط المركب النانوي الهجين والبالغ 7.248 ملم . ومما تجدر الإشارة اليه أن معدل التثبيط للتراكيز الستة المستعملة يزداد معنوياً  $p < 0.05$  بزيادة التركيز المستعمل إذ كان أعلى معدل تثبيط للمركبين الحر و النانوي الهجين عند التركيز 5 ملغم/مليتر هو ( 17.5 و 18.75 ) ملم ، على التوالي .

### 3-8-3 الفعالية التثبيطية للكوروكسين ضد بكتريا *K. pneumoniae*

يتضح من الجدول 25 ان المركب النانوي الهجين Mg/Al-CHX-LDH يبدي أعلى فعالية تثبيطية ضد العزلة B - 16 بقطر تثبيط مقداره 24.5 ملم عند التركيز 5 ملغم/مليتر بينما كانت أعلى فعالية تثبيطية للمطهر CHX الحر ضد العزلة B - 15 بقطر تثبيط مقداره 24.5 ملم عند التركيز المستخدم ذاته في حين كانت العزلة B - 4 الأقل تأثراً بكل من الكوروكسين النانوي الهجين والحر بقطر تثبيط مقداره ( 20.5 و 20 ) ملم عند التركيز ذاته ، على التوالي .

أظهرت نتائج التحليل الإحصائي أن هناك فروقات معنوية  $p < 0.05$  بين العزلات المدروسة من بكتريا *K. pneumoniae* وبين التراكيز المستعملة لكل من المركب الحر والنانوي الهجين Mg/Al-CHX-LDH في حين كانت الفروقات بين هذين المركبين غير معنوية  $p > 0.05$  .

تبين النتائج في الجدول ذاته أن العزلتين (B-16 و 27) كانتا أكثر حساسية تجاه المركبين المدروسين إذ أعطتا أعلى معدل تثبيط والبالغ ( 15.25 و 15.166 ) ملم ، على التوالي وبفروقات معنوية  $p < 0.05$  عن بقية العزلات بينما كانت العزلة B-4 أكثر مقاومة للمركبين إذ أعطت أقل معدل تثبيط وهو 13.708 ملم .

كما أن النتائج الموضحة في الجدول تبين أن الفرق بين المركب النانوي الهجين و المركب الحر غير معنوي  $p > 0.05$  إذ كان معدل التثبيط للمركب النانوي الهجين والحر هو (14.393 و 14.643) ملم ، على التوالي ، كما أن معدل التثبيط للتركيز الستة المستعملة يزداد معنوياً  $p < 0.05$  بزيادة التركيز المستعمل إذ كان أعلى معدل تثبيط للمركبين النانوي الهجين والحر عند التركيز 5 ملغم/مليتر هو ( 22.25 و 21.62 ) ملم ، على التوالي .

الجدول 25: الفعالية التثبيطية للمركب النانوي CHX-LDH و المركب الحر CHX ضد البكتريا *K. pneumoniae*

معدل تثبيط العزلات	CHX-Free						CHX-LDH						المركبات
	5	1	0.5	0.25	0.1	0.01	5	1	0.5	0.25	0.1	0.01	تركيز المركب (ملغم/مل)
	قطر التثبيط بالملم												عزلات البكتريا
15.166 A	22	20.5	18	17	15.5	0	23.5	18.5	17.5	16	13.5	0	<i>K. pneumoniae</i> 27
13.708 C	20	17.5	17	15.5	12	0	20.5	17	16.5	16	12.5	0	<i>K. pneumoniae</i> 4-B
15.25 A	22.5	21	18	15	14.5	0	24.5	20	17	16	14.5	0	<i>K. pneumoniae</i> 16-B
14.291 B	24.5	17.5	17	16	10.5	0	22	19.5	16.5	15	13	0	<i>K. pneumoniae</i> 15-B
	22.25 a	19.12 c	17.5 e	15.87 g	13.12 i	0.0 j	21.62 b	18.75 d	16.87 f	15.75 g	13.37 h	0.0 j	معدل تثبيط التركيز
	14.643						14.393						معدل تثبيط المركبات

\* الحروف الكبيرة المختلفة عموديا تشير الى وجود فروقات معنوية ( $p < 0.05$ ) بين عزلات البكتريا.

\* الحروف الصغيرة المختلفة افقيا تشير الى وجود فروقات معنوية ( $p < 0.05$ ) بين تراكيز المركبات.

العامل	المركبات	العزلات	التركيز	التداخل
LSD <sub>0.05</sub>	غير معنوي	0.195	0.145	0.676

### 3-8-4 الفعالية التثبيطية للكلوروكسدين ضد بكتريا *P. mirabilis* و *E. coli* و *S.*

#### *C. meningosepticum* و *liquefaciens*

تم دراسة الفعالية التثبيطية للمطهر CHX بنوعيه الحر والنانوي الهجين ضد كل من بكتريا *P. mirabilis* و *E. coli* و *C. meningosepticum* و *S. liquefaciens* المسببة لخمج الحروق والمعزولة في هذه الدراسة ويتضح من النتائج المبينة في الجداول 26 و 27 و 28 و 29 ان هناك تبايناً في تأثير المطهر الحر و النانوي الهجين على الانواع البكتيرية المدروسة إذ كانت أعلى فعالية تثبيطية للمركب النانوي الهجين CHX-LDH ضد كل من بكتريا *P. mirabilis* و *E. coli* بقطر تثبيط مقداره 23.5 ملم عند التركيز 5 ملغم/ مليلتر لكل منهما بينما كانت أعلى فعالية تثبيطية للمطهر CHX الحر ضد بكتريا *E. coli* بقطر تثبيط مقداره 24.5 ملم عند التركيز المستخدم ذاته ، في حين كانت بكتريا *C. meningosepticum* الأقل تأثراً من بين الأنواع البكتيرية المعزولة بقطر تثبيط مقداره 8 ملم عند التركيز ذاته للمطهر الحر بينما كانت مقاومة للمطهر النانوي الهجين .

تمكن (Negreanu-Pirjol et al. (2011 من تحضير خمس معقدات ( Complexs ) عبر تفاعل الكلوروكسدين مع ايونات النحاس والزنك وقام بأختبار فعاليتها التثبيطية ضد بكتريا *E. coli* وأوضحت نتائج الدراسة أن المعقد الخامس هو الأكثر فعالية ضد البكتريا المذكورة بقطر تثبيط مقداره 15 ملم . وفي دراسة أخرى قام بها ( Sharma et al. ( 2012 تم الحصول على قطر تثبيط مقداره 7 ملم عند استخدام المطهر CHX في تثبيط بكتريا *E. coli* .

أظهرت نتائج التحليل الإحصائي أن هناك فروقات معنوية  $p < 0.05$  بين المركب الحر والنانوي الهجين Mg/Al-CHX-LDH وبين التركيز المستعملة من هذين المركبين في تثبيط الأنواع البكتيرية قيد الدراسة . أظهرت النتائج الموضحة في الجداول ذاتها تفوق المركب الحر على المركب النانوي الهجين معنوياً  $p < 0.05$  إذ كان اعلى معدل تثبيط للمركب الحر 17.25 ملم ضد بكتريا *E. coli* في حين كان أقل معدل تثبيط له والبالغ 1.333 ملم ضد بكتريا *C. meningosepticum* . ومما تجدر الإشارة اليه أن معدل التثبيط للتراكيز الستة المستعملة يزداد معنوياً  $p < 0.05$  بزيادة التركيز المستعمل.

الجدول 26 : الفعالية التثبيطية للمركب النانوي CHX-LDH و المركب الحر CHX ضد بكتريا *P. mirabilis*

LSD <sub>0.05</sub> للمركبات	معدل تثبيط المركبات	تركيز المركب (ملغم/مل)						المركبات
		5	1	0.5	0.25	0.1	0.01	
		قطر التثبيط بالملغم						
0.317	7.333 B	23.5	20.5	0	0	0	0	CHX- LDH
	12.916 A	24	20.5	18.5	14.5	0	0	CHX- Free
LSD <sub>0.05</sub> للتداخل 0.776		23.75 a	20.5 b	9.25 c	7.25 d	0.0 e	0.0 e	معدل تثبيط التركيز
		0.549						LSD <sub>0.05</sub> للتكريز

الجدول 27 : الفعالية التثبيطية للمركب النانوي CHX-LDH و المركب الحر CHX ضد بكتريا *E. coli*

LSD <sub>0.05</sub> للمركبات	معدل تثبيط المركبات	تركيز المركب (ملغم/مل)						المركبات
		5	1	0.5	0.25	0.1	0.01	
		قطر التثبيط بالملغم						
0.236	15.5 B	23.5	20	19	15.5	15	0	CHX- LDH
	17.25 A	24.5	22	20.5	19	17.5	0	CHX- Free
LSD <sub>0.05</sub> للتداخل 0.578		24.0 a	21.0 b	19.75 C	17.25 d	16.25 e	0.0 f	معدل تثبيط التركيز
		0.409						LSD <sub>0.05</sub> للتكريز

\* الحروف الكبيرة المختلفة عموديا تشير الى وجود فروقات معنوية ( $p < 0.05$ ) بين المركبات.

\* الحروف الصغيرة المختلفة افقيا تشير الى وجود فروقات معنوية ( $p < 0.05$ ) بين التراكيز.

الجدول 28 : الفعالية التثبيطية للمركب النانوي CHX-LDH و المركب الحر CHX ضد بكتريا *S. liquefaciens*

LSD <sub>0.05</sub> للمركبات	معدل تثبيط المركبات	تركيز المركب (ملغم/مل)						المركبات
		5	1	0.5	0.25	0.1	0.01	
		قَطْر التثبيط بالملم						
0.236	11.166 B	20.5	18	15.5	13	0	0	CHX-LDH
	16.416 A	23.5	21	20	18.5	15.5	0	CHX-Free
LSD <sub>0.05</sub> للتداخل 0.578		22 a	19.5 b	17.75 c	15.75 d	7.75 e	0.0 e	معدل تثبيط التركيز
		0.409						LSD <sub>0.05</sub> للتكريز

الجدول 29 : الفعالية التثبيطية للمركب النانوي CHX-LDH و المركب الحر CHX ضد بكتريا *C. meningosepticum*

LSD <sub>0.05</sub> للمركبات	معدل تثبيط المركبات	تركيز المركب (ملغم/مل)						المركبات
		5	1	0.5	0.25	0.1	0.01	
		قَطْر التثبيط بالملم						
0.211	0.0 B	0	0	0	0	0	0	CHX-LDH
	1.333 A	8	0	0	0	0	0	CHX-Free
LSD <sub>0.05</sub> للتداخل 0.517		4 a	0.0 b	0.0 b	0.0 b	0.0 b	0.0 b	معدل تثبيط التركيز
		0.366						LSD <sub>0.05</sub> للتكريز

\* الحروف الكبيرة المختلفة عموديا تشير الى وجود فروقات معنوية ( $p < 0.05$ ) بين المركبات.

\* الحروف الصغيرة المختلفة افقيا تشير الى وجود فروقات معنوية ( $p < 0.05$ ) بين التراكيز.

### 4-8-3 الفعالية التثبيطية للكوروكسين ضد بكتريا *S. aureus*

تم دراسة الفعالية التثبيطية للمطهر CHX بنوعيه الحر والنانوي الهجين ضد بكتريا *S. aureus* المسببة لخمج الحروق والمعزولة في هذه الدراسة ويتضح من النتائج المبينة في الجدول 30 ان عزلتي بكتريا *S. aureus* هما الأكثر تأثراً من بين الأنواع البكتيرية المعزولة بكل من الكوروكسين النانوي الهجين Mg/Al-CHX-LDH والحر إذ كانت أقصى فعالية تثبيطية للكوروكسين النانوي ضد العزلة 21 بقطر تثبيط مقداره 28.5 ملم عند التركيز 5 ملغم/مليتر فيما كانت أعلى فعالية تثبيطية للكوروكسين الحر ضد العزلة A-22 بقطر تثبيط مقداره 31.5 ملم عند نفس التركيز .

الجدول 30 : الفعالية التثبيطية للمركب النانوي CHX-LDH و المركب الحر CHX ضد البكتريا *S. aureus*

معدل تثبيط المركبات	معدل تثبيط العزلات	تركيز المركب (ملغم/ملم)						عزلات البكتريا	المركبات
		5	1	0.5	0.25	0.1	0.01		
		قطر التثبيط بالملم							
19.124 b	19.583 B	28.5	25.5	24	20.5	19	0	<i>S. aerus</i> 21	CHX-LDH
	18.666 C	27.5	24.5	22	21	17	0	<i>S. aerus</i> 22 A	
19.665 a	18.83 C	30.5	26	24	22	18.5	0	<i>S. aerus</i> 21	CHX-Free
	20.5 A	31.5	25.5	25	21	20	0	<i>S. aerus</i> 22 A	
		29.5 a	25.37 b	23.75 c	21.12 d	18.62 e	0.0 f	معدل تثبيط التركيز	

\* الحروف الكبيرة المختلفة عمودياً تشير الى وجود فروقات معنوية ( $p < 0.05$ ) بين عزلات البكتريا.

\* الحروف الصغيرة المختلفة عمودياً تشير الى وجود فروقات معنوية ( $p < 0.05$ ) بين المركبات.

\* الحروف الصغيرة المختلفة أفقياً تشير الى وجود فروقات معنوية ( $p < 0.05$ ) بين تراكيز المركبات.

العامل	المركبات	العزلات	التركيز	التداخل
LSD <sub>0.05</sub>	0.230	0.210	0.364	0.728

قام Semenoff *et al.* (2010) بدراسة الفعالية التثبيطية للمطهر CHX ضد بكتريا *S. aureus* وأسفرت نتائج الدراسة التي أجريت في البرازيل عن الحصول على قطر تثبيط

مقداره 15.8 ملم . وأدى استخدام المطهر CHX بتركيز 2 % الى الحصول على تثبيط مقداره 18 ملم ضد بكتريا *S. aureus* ( Estrela et al., 2003 ) .

أظهرت نتائج التحليل الإحصائي أن هناك فروقات معنوية  $p < 0.05$  بين العزلتين المدروستين من بكتريا *S. aureus* وكذلك بين المركب الحر والنانوي الهجين -Mg/Al-CHX-LDH وبين التركيز المستعملة من هذين المركبين في تثبيط البكتريا قيد الدراسة.

تبين النتائج في الجدول ذاته أن العزلة 22-A كانت أكثر حساسية تجاه المركب الحر إذ أعطت أعلى معدل تثبيط والبالغ 20.5 ملم وبفروقات معنوية  $p < 0.05$  عن العزلة الأخرى كما ان هذه العزلة كانت أكثر مقاومة للمركب النانوي الهجين إذ أعطت أقل معدل تثبيط والبالغ 18.666 ملم وبفروقات معنوية عن العزلة ذاتها .

كما تظهر النتائج الموضحة في الجدول ذاته تفوق المركب الحر على المركب النانوي الهجين معنوياً  $p < 0.05$  إذ كان معدل التثبيط للمركب الحر 19.665 ملم والذي يختلف معنوياً  $p < 0.05$  عن معدل تثبيط المركب النانوي الهجين والبالغ 19.124 ملم . ومما تجدر الإشارة اليه أن معدل التثبيط للتركيز الستة المستعملة يزداد معنوياً  $p < 0.05$  بزيادة التركيز المستعمل.

### 3-8-6 الفعالية التثبيطية للكلوروكسدين ضد خميرة *C. guilliermondii*

تم دراسة الفعالية التثبيطية للمطهر CHX بنوعيه الحر والنانوي الهجين ضد خميرة *C. guilliermondii* المسببة لخمج الحروق والمعزولة في هذه الدراسة ويتضح من النتائج المبينة في الجدول 31 أنه لا يوجد تباين كبير في تأثير نوعي المطهر المستخدم في هذه الدراسة على الخميرة المدروسة إذ كانت الفعالية التثبيطية للمطهر النانوي الهجين -Mg/Al-CHX-LDH والمطهر CHX الحر متقاربة بقطر تثبيط مقداره (28 و 29) ملم عند التركيز 5 ملغم / مليلتر ، على التوالي . أظهرت نتائج التحليل الإحصائي أن هناك فروقات معنوية  $p < 0.05$  بين المركب الحر والنانوي الهجين -Mg/Al-CHX-LDH وبين التركيز المستعملة من هذين المركبين في تثبيط الخميرة قيد الدراسة .

أظهرت النتائج الموضحة في الجدول تفوق المركب الحر على المركب النانوي الهجين معنوياً  $p < 0.05$  إذ كان معدل تثبيط المركب الحر والنانوي الهجين (19.25 و 16.583) ، على التوالي . كما أن معدل التثبيط للتراكيز الستة المستعملة يزداد معنوياً  $p < 0.05$  بزيادة التركيز المستعمل .

الجدول 31 : الفعالية التثبيطية للمركب النانوي CHX-LDH والمركب الحر CHX ضد الخميرة *C. guilliermondii*

LSD <sub>0.05</sub> للمركبات	معدل تثبيط المركبات	تركيز المركب (ملغم/مل)						المركبات
		5	1	0.5	0.25	0.1	0.01	
		قطر التثبيط بالملم						
	16.583 B	28	25.5	19	15	12	0	CHX-LDH
0.298	19.25 A	29	25.5	22.5	21	17.5	0	CHX-Free
LSD <sub>0.05</sub> للتداخل		28.5 a	25.5 b	20.75 c	18 d	14.75 e	0.0 f	معدل تثبيط التركيز
0.732		0.517						LSD <sub>0.05</sub> للتكرز

\* الحروف الكبيرة المختلفة عمودياً تشير الى وجود فروقات معنوية ( $p < 0.05$ ) بين المركبات.

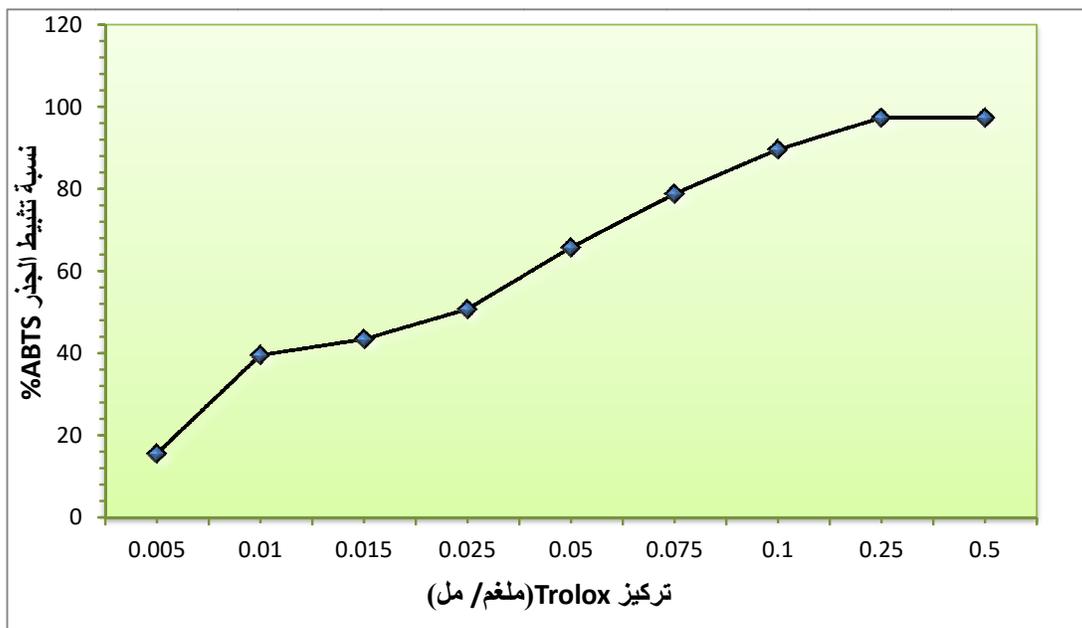
\* الحروف الصغيرة المختلفة أفقياً تشير الى وجود فروقات معنوية ( $p < 0.05$ ) بين التراكيز.

### 9-3 الفعالية المضادة للأوكسدة لحمض التانيك النانوي الهجين والحر

#### 9-3-1 الفعالية المضادة للأوكسدة بطريقة كسح الجذور الحرة

أستخدمت طريقة كسح الجذور الحرة في تقدير الفعالية المضادة للأوكسدة لكل من حامض التانيك الحر والنانوي الهجين Mg/Al-TA-LDH من خلال تحديد تركيز المركب الذي له القابلية على أختزال او تثبيط امتصاص الجذر ABTS الى النصف (  $IC_{50}$  ) والذي عادة ما يعبر عنه بشكل نسبة مئوية ( PI ) % . يتضح من الشكل 28 أن لحامض التانيك الحر فعالية مضادة للأوكسدة عند التركيز 10 مايكروغرام/مل وهي أعلى من تركيز المضاد القياسي

Trolox القادر على اختزال او تثبيط امتصاصية الجذر الحر ABTS الى النصف عند تركيز 25 مايكروغرام/ مل (الشكل 27) , بينما كانت الفعالية المضادة للاكسدة لحمض التانيك النانوي الهجين عند تركيز 125 مايكروغرام/مل (الشكل 29) .

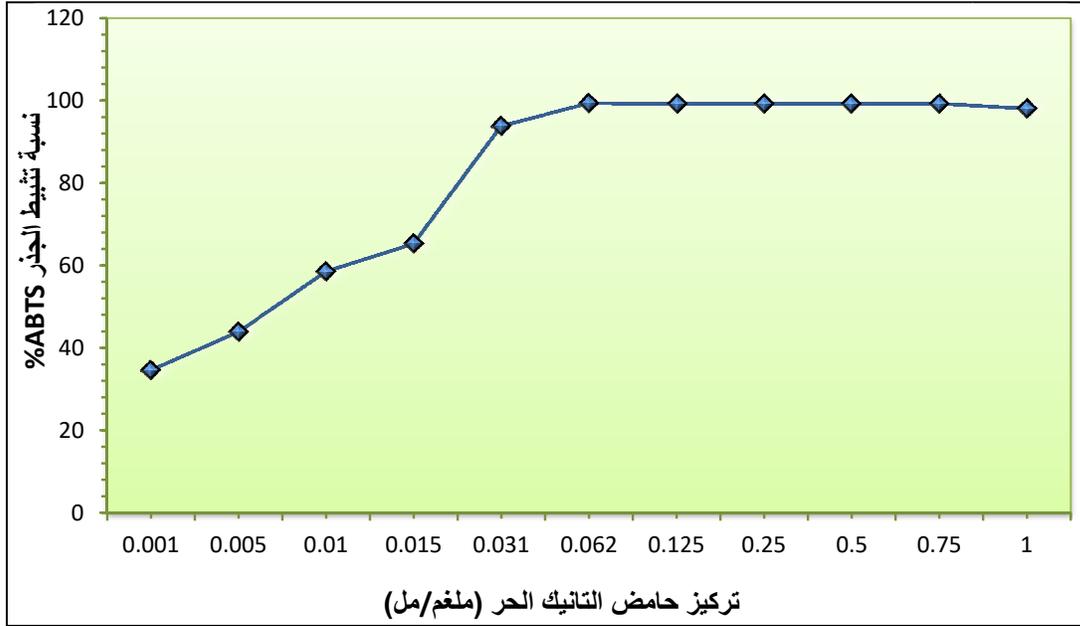


الشكل 27 : الفعالية المضادة للأكسدة للمضاد القياسي Trolox

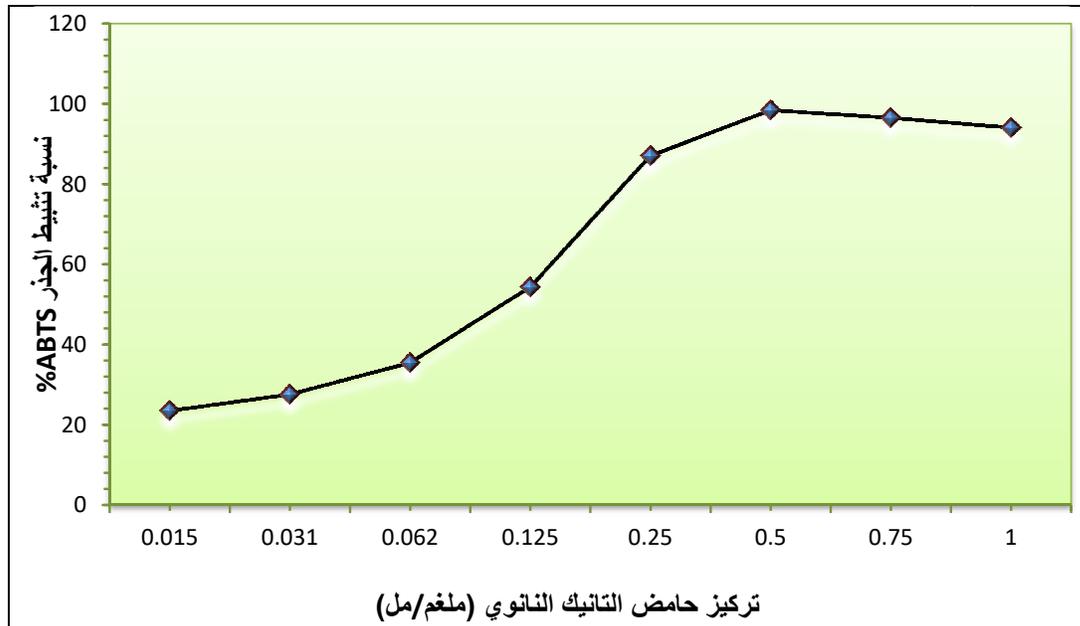
أن الفعالية المضادة للأكسدة التي يمتلكها حامض التانيك يمكن أن تعزى الى تركيبه الوظيفي الفريد (Unique functional structure) عبر امتلاكه لعدد كبير من مجاميع الهيدروكسيل (Kozlovskaya *et al.* 2010) .

تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما وجدته Gülçin *et al.* (2010) إذ كانت فعالية حامض التانيك الحر في كسح الجذر الحر ABTS أعلى من فعالية مضاد الأكسدة القياسي Trolox.

تعد الفينولات (Phenols) من المواد التي تمتلك فعالية مضادة الأكسدة (Yanishlieva *et al.*, 1999) إذ أشار Gutiérrez- Larrainzar *et al.* (2012) إلى أن حامض الكاليك يمتلك فعالية عالية لكسح الجذور الحرة مقارنة مع مركبات فينولية أخرى مثل Thymol و Carvaerol و Hydroquinone .



الشكل 28 : الفعالية المضادة للأكسدة لحامض التانيك الحر بطريق كسح الجذور الحرة



الشكل 29 : الفعالية المضادة للأكسدة لحامض التانيك النانوي بطريق كسح الجذور الحرة

تُستعمل طريقة (ABTS) بشكل واسع في تقدير الفعالية المضادة للأكسدة للعديد من المواد إذ أن الجذر ABTS<sup>•</sup> الذي يُمتص عند الطول الموجي 734 نانومتر (مُعطياً لوناً أخضر مزرق) يتكون من فقدان الإلكترون من ذرة النتروجين من (2,2-azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulphonic acid)) وفي وجود المركبات أو المستخلصات المضادة للأكسدة التي لها القابلية على وهب ذرة هيدروجين فإن ذرة النتروجين لجذر ABTS<sup>•</sup> سوف تقتنص ذرة الهيدروجين مما يؤدي إلى إزالة لون المحلول (Decolorization) (Marc *et al.*, 2004).

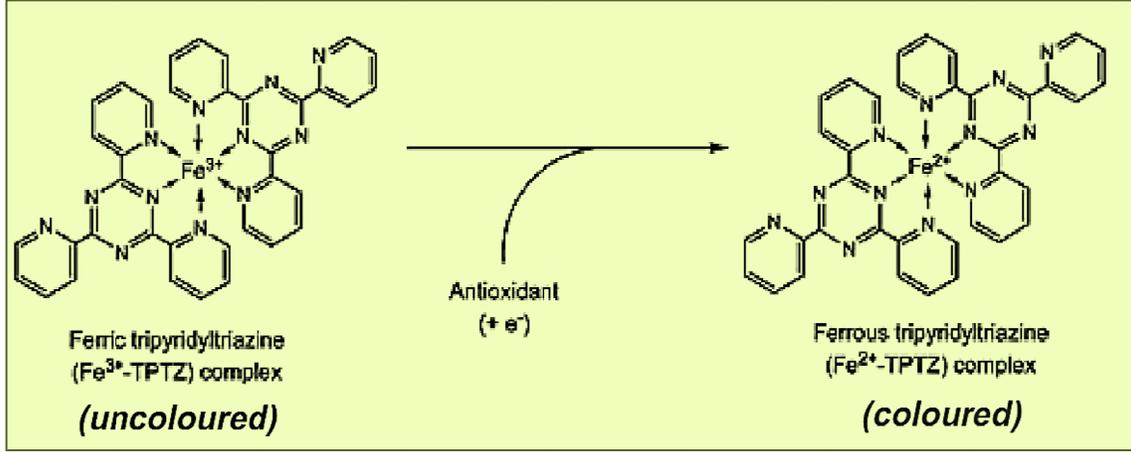
### 2-9-3 الفعالية المضادة للأكسدة بطريقة قياس القوة الأختزالية المضادة للأكسدة لأيون

#### الحديديك (FRAP)

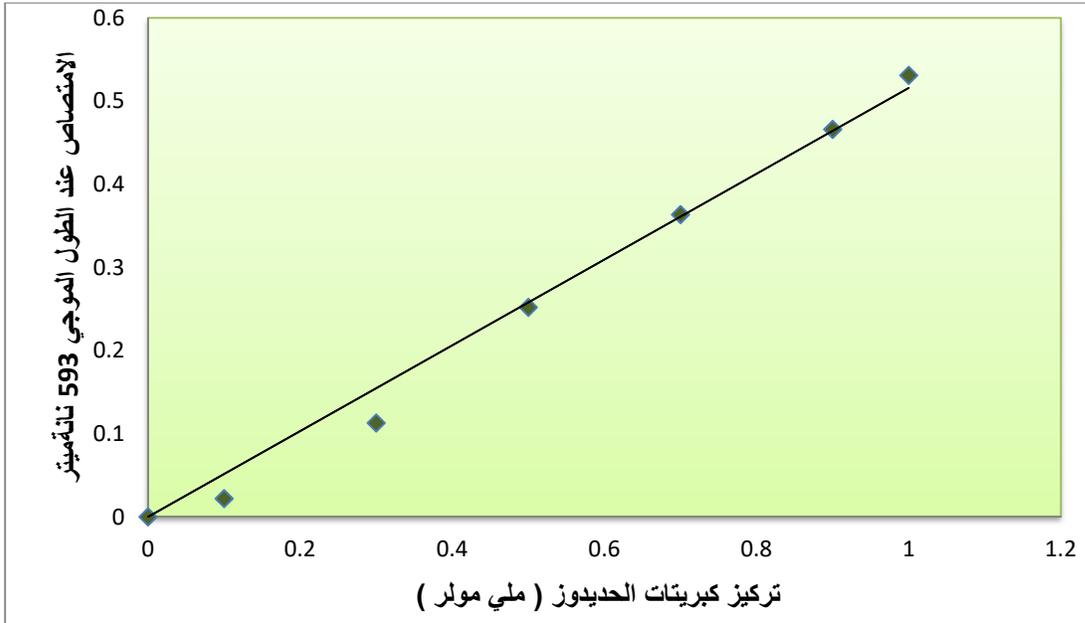
تم قياس القوة الأختزالية التي يبديها كل من حامض التانيك الحر والنانوي الهجين Mg/AL-TA-LDH اعتماداً على المنحنى القياسي لكبريتات الحديدوز (FeSO<sub>4</sub>).

أظهرت النتائج الموضحة في الأشكال 30 و31 و32 زيادة القوة الأختزالية للمركبات قيد الدراسة بزيادة تراكيزها مما يعني أن هذه المركبات تتمكن من منح ذرة الهيدروجين لكسر سلاسل الجذور الحرة. وعند التمعن في الأشكال اعلاه يتضح ان حامض التانيك الحر يمتلك قوة اختزالية اعلى من حامض التانيك النانوي الهجين.

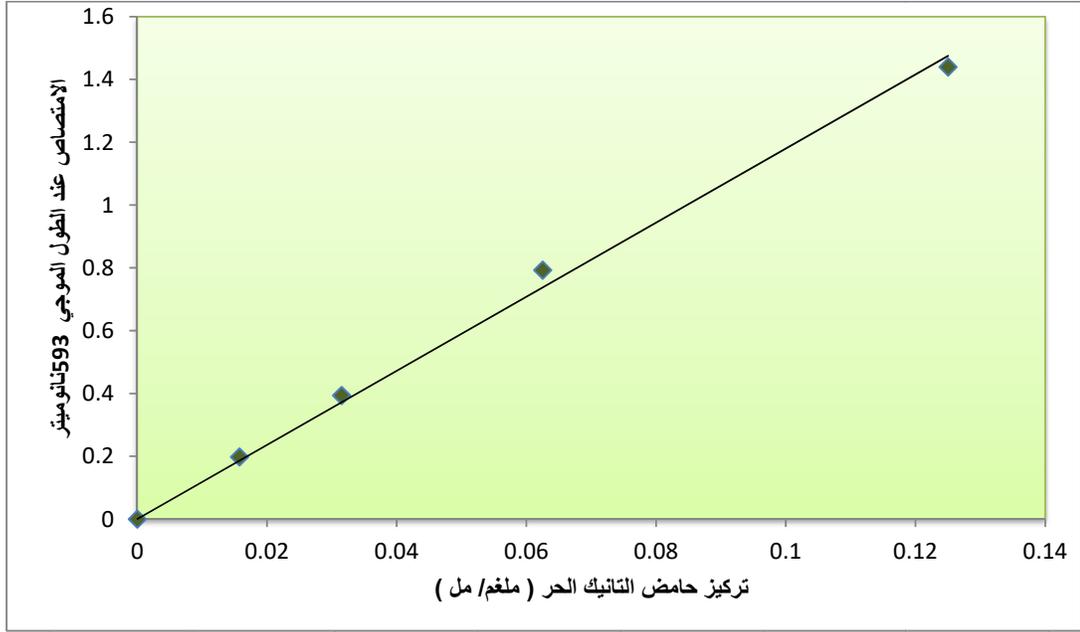
يعتمد مبدأ القوة قياس القوة الاختزالية التي تبديها مضادات الأكسدة (FRAP) على قابلية هذه المضادات على أختزال المعقد Fe(III)- TPTZ complex مما يؤدي الى تكوين أيون الحديدوز Ferrousn (II) يتبعه تطور لون أزرق حاد يُقاس طيفياً عند الطول الموجي 593 نانوميتر كما هو موضح في المعادلة الآتية (Lomillo, 2011):



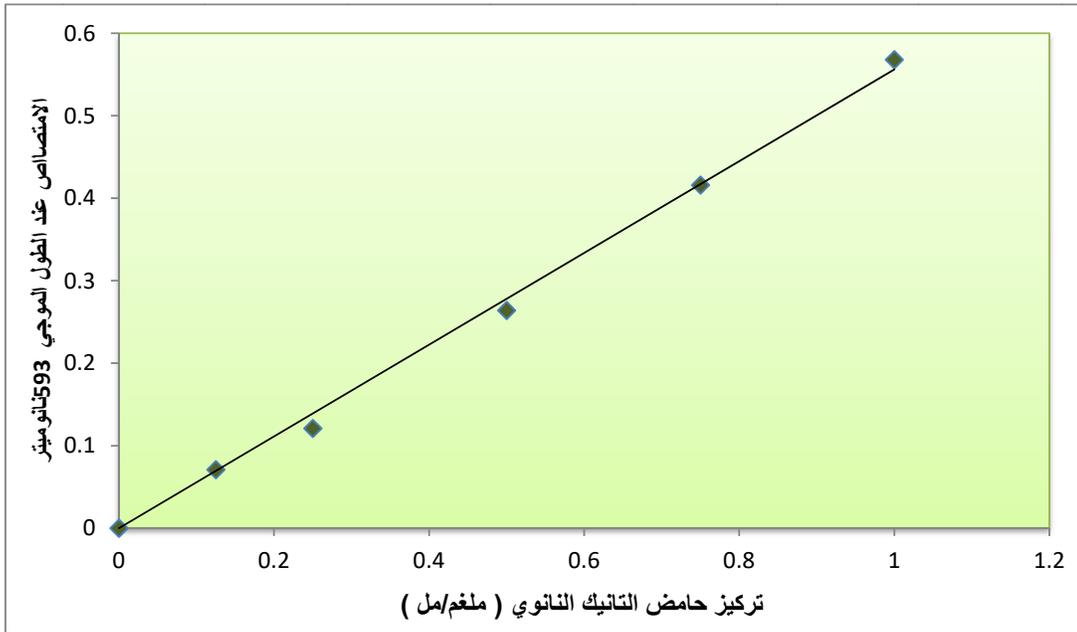
وبالمقارنة مع الطرائق الأخرى تعد طريقة FRAP من الطرائق البسيطة والسريعة وغير مكلفة ، كما انها لا تتطلب معدات متخصصة ويمكن إجرائها باستخدام الطرائق الآلية او اليدوية ( Prior *et al.*, 2005 ) .



الشكل 30 : المنحنى القياسي لكبريتات الحديدوز بطريقة FRAP



الشكل 31: الفعالية المضادة للأكسدة لحامض التانيك الحر بطريقة FRAP



الشكل 32 : الفعالية المضادة للأكسدة لحامض التانيك النانوي الهجين بطريقة FRAP

الإستنتاجات والتوصيات

*Conclusions*

&

*Recommendations*

## الاستنتاجات

- 1- أن جنس *Pseudomonas* هو المسبب الرئيس لأخماج الحروق في مرضى الحروق في محافظة كربلاء المقدسة .
- 2- بالنظر لمقاومة البكتريا المعزولة في هذه الدراسة لمعظم أنواع المضادات الحيوية المستخدمة في علاج مرضى الحروق فأن ذلك يقود الى الاستنتاج بأن استخدام هذه المضادات لم يكن بشكل مدروس في علاج المرضى في المحافظة .
- 3- امكانية تحضير مطهرات نانوية هجينة من المطهرات المستخدمة في معالجة حالات الحروق .
- 4- كفاءة المطهر كلور هكسدين بشكله الحر والنانوي الهجين في تثبيط الأحياء المجهرية المسببة لأخماج الحروق المعزولة في هذه الدراسة .

## التوصيات

- 1- تحضير مطهرات نانوية هجينة أخرى وتقييم كفاءتها التثبيطية ضد الأحياء المجهرية المسببة لأخماج الحروق .
- 2- عمل مستحضر طبي عبر التوليف بين المطهر النانوي الهجين وحامض التانيك النانوي الهجين ودراسة فعله العلاجي على الحيوانات المختبرية .
- 3- تحضير مضادات حيوية هجينة من المضادات الحيوية الجهازية المستخدمة في علاج الحروق وأختبار كفاءتها التثبيطية ضد الأحياء المجهرية المعزولة في هذه الدراسة .
- 4- تقييم الفعل التثبيطي للمطهر النانوي الهجين ضد أنواع بكتيرية مرضية أخرى مثل البكتريا المعزولة من الجروح .

المصادر

*References*

## المصادر العربية :

- الامام , محمد محمد الطاهر (2007) . تصميم وتحليل التجارب . دار المريخ للنشر . المملكة العربية السعودية .
- الفتلاوي , صلاح هاشم شهيد (2014) . تهجين مركبات نانوية مع مادة أوكنتيل كالبنت الحافظة للأغذية ودراسة بعض فعالياتها الحيوية.رسالة ماجستير.كلية العلوم / جامعة كربلاء.
- الحمداني ، ميساء صالح مهدي (2015) . تحديد الكفاءة التثبيطية لمضاد الأوكسي تتراسايكلين والتايلوسين المحضرين نانويًا ضد البكتريا المسببة لالتهاب الضرع في الأبقار في محافظة كربلاء المقدسة . رسالة ماجستير.كلية العلوم / جامعة كربلاء.
- السعيد ، زهراء شاكر محمود (2015) . تحضير مضادين فطريين نانويين هجينين من النستاتين والكلوتريمازول وتقييم كفاءتهما التثبيطية ضد بعض أنواع خميرة *Candida spp.* رسالة ماجستير.كلية العلوم / جامعة كربلاء.

**المصادر الانكليزية :**

- Abbo, A.;** Navon-Venezia, S.; Hammer-Muntz, O.; Krichali, T.; Siegman-Igra, Y. and Carmeli, Y.(2005). Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Emerging Infectious Diseases*. 11(1):22-29.
- Abdeen, R.** and Salahudeen, N. (2013).Modified Chitosan-Clay Nanocomposite as a Drug Delivery System Intercalation and *In Vitro* Release of Ibuprofen. *Journal of Chemistry*.Article ID 576370, 9 pages.
- Adams, M.** Goglin, K.; Molyneaux, N.; Hujer, K.; Lavender, H. ; Jamison, J.; MacDonald, I.; Martin, K.; Russo, T.; Campagnari, A.; Hujer, A .; Bonomo, R. and Gill, S. (2008). Comparative genome sequence analysis of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J.Bacteriol*.190,8053-8064.
- Aelenei, N.;** Popa, M.; Novac, O.; Lisa, G. and Balaita, L. (2009).Tannic acid incorporation in chitosan-based microparticles and in vitro controlled release. *J. Mater. Sci:Mater. Med*.20(5).
- Agnihotri, N.;** Gupta V. and Joshi R. (2004). Aerobic bacterial isolate from burn wound infections and their antibiograms - a five - year study. *Burns* . 30(8): 241-243.
- Ai , J. ;** Biazar , E. ; Montazeri, M. ; Majdi , A. ; Aminifard , S.; Safari , M. and Akbari , H. R.(2011). Nanotoxicology and nanoparticle safety in biomedical designs. *Int J Nanomedicine*.6: 1117-1127.
- Alharbi, S.** and Zayed, M. (2014).Antibacterial susceptibility of bacteria isolated from burns and wounds of cancer patients. *Journal of Saudi Chemical Society*.18:3-11.

- Al-Ibran, E.;** Meraj, S.; Nasim, M.; Khan, M. and Rao, M. (2013). Pattern of microorganisms isolated from flame burn wounds, and their trends of susceptibility to antibiotic during past three years. *Journal of the Dow University of Health Sciences Karachi*.7(2):49-53.
- Allison, C.;** Lai, H. and Hughes. C. (1992).Co-ordinate expression virulence genes during swarm cell differentiation and population migration of *Proteus mirabilis*. *Mol.Microboil*.6:1583-1591.
- Allison, C.;** Lai, H.; Gygi, D. and Hughes. C.(1993).Cell differentiation of *Proteus mirabilis* is initiated by glutamine, a specific chemoattractant for swarming cells.*Mol.Microboil*.8:53-60.
- Al-Tameemi, H. and Khalaf, J. (2013).**Isolation and identification of fungi from wounds and burns of human and farm animals. *The Iraqi Journal of Veterinary Medicine*.37(2):251-256.
- Al-Tannir, M. and Goodman, H. (1994).** A review of chlorhexidine and its use in special population. *Special Care in Dentistry*.14:116-122.
- Alwan, M.;** Lafta, I. and Hamzah, A. (2011).Bacterial isolation from burn wound infections and studying their antimicrobial susceptibility. *Kufa Journal for Veterinary Medical Sciences*. 1:121-130.
- Arizaga, G. ;** Gardolinski, J.; Schreiner, W. and Wypych, F.( 2009). Intercalation of an oxalatoxonioabate complex into layered double hydroxide and layered zinc hydroxide nitrate. *Journal of Colloid and Interface Science*. 330:352–358.
- Arturson, M. (1985).** The pathophysiology of severe thermal injury. *J. Burn Care Rehabil*.129-34.(Cited from Shahzad *et al.*,2012).

- Ashok, P.** and Upadhyaya, K.(2012).Tannins are astringent. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*.8192.
- Athanassiadis, B.;** Abbott, P. and Walsh, L. (2007). The use of calcium hydroxide, antibiotics and biocides as antimicrobial medicaments in endodontics. *Australian Dental Journal*. 52(Suppl),S64-82.
- Bashi, A.;** Haddawi, S. and Mezaal, M. (2013). Layered double hydroxide nanohybrid intercalation with folic acid used as delivery system their controlled release properties. *Arab. J. Sci. Eng* . 38:1663-1680.
- Bayuga, S.;** Zeana, C.; Sahni, J.; Della-Latta, P.; El-Sadr, W. and Larson, E.(2002).Prevalence and antimicrobial patterns of *Acinetobacter baumannii* on hands and nares of hospital personnel and patients: the iceberg phenomenon again. *Heart Lung*.31(5):382-390.
- Beherei, H.;** El-Magharby, A. and Abdel-Aal, M. (2011). Preparation and characterization of novel antibacterial nano-ceramic-composites for bone grafting. *Der Pharma Chemica*. 3(6):10-27.
- Belas, R.** and Flaherty, D.(1994).Sequence and genetic analysis of multiple flagellin-encoding genes from *Proteus mirabilis*. *Gene*. 148:33-41.
- Bele, A.;** Jadhav, M. and Kadam,V. (2010). Potential of Tannins (Review).*Asian Journal of Plant Sciences*. 9 (4):209-214.
- Benzin, I.** and Strain, J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “ antioxidant power “ : The FRAP assay. *Anal. Biochem* . 239:70-76.
- Bergogne-Berezin, E.** and Towner, K. (1996). *Acinetobacter spp.* as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features .*Clin.Microbiol.Rev*.9:148-165.

- Bhattacharya, D.;** Saha, B. ; Mukherjee, A. ; Santra,C. and Karmakar,P. (2012).Gold nanoparticales conjugated antibiotics; stability and functional evaluation. *Naosience and nanotechnology*. 2(2):14-21.
- Borm, P. and Kreyling, W.**(2004).Toxicological hazards of inhaled nanoparticales-potential implications for drug delivery.*Journal of nanoscience and nanotechnology*.4(6):1-11.
- Brooks, G.;** Bultel, J.; and Morse, S. (2001).Jawetz Melnich and Adelbergs Medical Microbiology.22<sup>nd</sup> edn. Lange McGraw-Hill, N.Y.
- Budrat, P. and Shotipruk, A.** (2008). Extraction of phenolic compounds from fruits of Bitter Melon (*Momordica charantia*) with subcritical water extraction and antioxidant activities of these extracts. *Chiang Mai J. Sci.* 35(1): 123-130.
- Buzea, C.;** Pacheco, I. and Robbie, K.(2007).Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity.*Biointerphases*.2:17-71.
- Calogiuri, F.;** Di Leo, E.; Trautmann, A.; Nettis, E.; Ferrannini, A. and Vacca, A.( 2013). Chlorhexidine hypersensensitivity: a critical and updated review. *J Allergy Ther.*
- Carson, I.;** Favero, M.; Bond,W. and Petersen, N. (1972). Factors affecting comparative resistance of naturally occurring and subcultured *Pseudomonas aeruginosa* to disinfectants. *Appl. Microbial*.23(5),863-869.
- Cavani, F.;** Trifiro, F. and Vaccari, A.(1991).Hydrotalcite-type anionic clay: preparation, properties and applications .*Catalysis Today*. 11:173-301.

- Chai**, H.; Xu, X.; Lin, Y.; Evans, D. and Li, D. ( 2009). Synthesis and UV absorption properties of 2,3-dihydroxynaphthalene-6-sulfonate anion-intercalated Zn–Al layered double hydroxides. *Polymer Degradation and Stability* . 94:744–749.
- Chanal**, C.; Bonnet, R.; De Champs, C.; Labia, R. and Sirot, J.(2000).Prevalence of  $\beta$ -lactamases among 1072 clinical strains of *Proteus mirabilis*: a 2-yaer survey in a French hospital. *Antimicrob Agents Chemother*.44:1930-1935.
- Chen**, S. and Chung, K. (2000). Mutagenicity and antimutagenicity of tannic acid and its related compound. *Food and Chemical Toxicology*.38(1):1-5.
- Cheng**, X. ; Huang, X. ; Wang, X. and Sun, D. ( 2010). Influence of calcination on the adsorptive removal of phosphate by Zn–Al layered double hydroxides from excess sludge liquor. *Journal of Hazardous Materials*. 177:516–523.
- Church**, D.; Elsayed, S.; Reid, O.; Winston, B. and Lindsay, R. (2006). Burn wound infections. *Clinical Microbiology Reviews*. 19(2). pp.403 - 434.
- Cochran**, A.; Morris, S.; Edelman, L. and Saffle, J.( 2002). Systemic Candida infection in burn patients. *Surg infection Larch mt*. 3: 367-374.
- Cole**, M.(2007). Chemical and Biological Evaluation of Antibiotic-Based Ionic Liquids and Gumbos Against Pathogenic Bacteria. Ph.D. Thesis.USA
- Cole** , A.; Yang , V. and David , A. (2011) . Cancer theranostics: the rise of targeted magnetic nanoparticales . *Trends Biotechnol* . 29:323-332.

- Cooper, R.** (2003). The Contribution of Microbial Virulence to Wound Infection, In: White RJ, ed. The Silver Book. Dinton, Salisbury, UK: Quay Books.
- Corona-Nakamura, A.; Miranda-Navales, M.; Leanos-Miranda, B.; Protillo-Gomez, L.; Aguilar-Benavides, S.**(2001). Epidemiological study of *Pseudomonas aeruginosa* in critical patients and reservoirs. *Arch. Med. Res.* 32:238-242.
- Crossley, K. and Archer, G.** (1997).The *Staphylococci* in Human disease. Churchill Livingstone.
- Dai, T.; Huang, Y.; Sharma, S.; Hashmi, J.; Kurup, D. and Hamblin, M.** (2010).Topical antimicrobials for burn wound infections. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.* 1; 5(2): 124–151.
- Darby, C.; Cosma, C.; Thomas, J. H.; and Manoil, C.** (1999).Lethal paralysis of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:15202-15207.
- Deitch, E.; Wheelahan, T.; Rose, M.; Clothier, J. and Cotter, J.** (1983) . Hypertrophic scars: analysis of variables . *J Trauma.* 23 : 895-8.
- Diekema, D.; Pfaller, M.; Schmitz, F.; Smayevsky, J.; Bell, J.; Jones, R. and Beach, M.**(2001). Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program 1997-1999. *Clin Infect Dis.*32:114-132.
- De La Maza, L.; Pezzlo, M.; Baron, E.** (1997).Color Atlas of Diagnostic Microbiology. Mosby-year book, Inc. USA.

- De Macedo, J.** and Santos, J. (2005). Bacterial and fungal colonization of burn wounds. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. 100 (5): 535-539.
- Donati, L.;** Scammazo, F.; Gervasoni, M.; Magliano, A.; Stankow, B. and Frascini.(1993). Infection and antibiotic therapy in 4000 burned patients in Milani Italy between 1976 and 1988. *Burns* . 4: 345-8.
- Drosou, A.;** Falabella, A. and Kirsner, R. (3003) Antisepticson wounds: an area of controversy. *Wounds*. 15:146-66.
- Du, W.-L.;** Nui, S-S.; Xu, Y.-L.; Xu, Z.-R. and Fan, C.-L.(2009). Antibacterial activity of chitosan tripolyphosphate nanoparticales loaded with various metal ions. *Carbohydrate Polymers*.75:385-389.
- Echague, C.;** Hair, P.S. and Cunnion, K. (2010).A comparison of antibacterial activity against MRSA and gram negative organisms for antimicrobial compounds in a unique composite wound dressing. Eastern Virginia Medical School. *Scientific data series*.www.SOLUBLESYSTEMS.com.
- Edlich, R.;** Rodeheaver, G.; Thacker, J.; Lin, K.; Drake, D.; Mason, S.; Wack, C.; Chase, M.; Tribble, C.; Long, W. and Vissers, R. (2010). Revolutionary advances in the management of traumatic wounds in the emergency department during the last 40 years:part I. *J. Emerg. Med. In press*.38(2):7-201.
- Edwards, R.** and Harding, K. (2004). Bacteria and wound healing. *Current Opinion Infect Dis*, 17:2, 91–96.

- Egorove, N.** (1985). Antibiotics a scientific approach. Mir Publishers, Moscow.
- Ekrami, A.** and Kalantar, E. (2007). Bacterial infections in burn patients at a burn hospital in Iran. *Indian J Med Res.* 126:541-544.
- Estrela, C.;** Ribeiro, R.; Estrela, C.; Pécora, J. and Sousa-Neto, M. (2003). Antimicrobial effect of 2% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine tested by different methods. *Braz. Dent. J.* 14(1) :58-62.
- Feng, Y.;** Li, D.; Wang, Y.; Evans, D. and Duan, X. (2006). Synthesis and characterization of a UV absorbent-intercalated Zn–Al layered double hydroxide. *Polymer Degradation and Stability.* 91:789–794.
- Foulkes, D.** (1973). Some toxicological observations on chlorhexidine. *J. periodont. Res.* 12:55-57.
- Gomes, B.;** Souza, S.; Ferraz, C.; Teixeira, F.; Zaia, A.; Valdringhi, L. and Souza-Filho, F. (2003a). Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine in vitro. *International Endodontic Journal.* 36,267-75.
- Gomes, B.;** Sato, E.; Ferraz, C.; Teixeira, F.; Zaia, A. and Souza-Filho, F. (2003b). Evaluation of time required for recontamination of coronally sealed canals medicated with calcium hydroxide and chlorhexidine. *International Endodontic Journal.* 36,604-9.
- Gülçin, I.;** Huyut, Z.; Elmastaş, M. and Aboul-Enien, H. (2010). Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal of Chemistry.* 3:43-53.
- Gupta, M.;** Gupta, O.; Yaduvansh, R. and Upadhyahy, J. (1993). Burn epidemiology: the pink city scene. *Burns.* 19:47-51

- Gusten, W.;** Hansen, E.; Cunha, B. (2002). *Acinetobacter baumannii* pseudomeningitis. *Heart Lung*.31:76-78.
- Gutiérrez-Larraínzar, M.;** Rúa, J.; Arriaga, D.; Valle, P. and García-Armesto, M. (2012). In vitro assessment of synthetic phenolic antioxidants for inhibition of foodborne *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Pseudomonas fluorescens* . *Food Control*.30: 393-399.
- Greenhalgh, D.** (2009).Topical antimicrobial agents for burn wounds. *Clin Plastic Surg*. 36: 597-606.
- Greenstein, G.;** Berman, C. and Jaffin, R.(1986). Chlorhexidine:an adjunct to periodontal therapy. *Journal of Periodontology*.57,370-6.
- Guimares, M.;** Tibana, A.; Nunes M. and Santos, K. (2000). Disinfectant and antibiotic activities: a comparative analysis in Brazilian hospitals bacterial isolates. *Braz J Microbiol*.31(3):192-8.
- Gygi, D.;** Bailey, M.; Allison, C. and Hughes, C.(1995).Requirement for FlhA in flagella assembly and swarm-cell differentiation by *Proteus mirabilis*.*Mol. Microbiol*.15:761-769.
- Hart,T and Shears, P.**(2004).Color Atlas of Medical Microbiology. 2<sup>nd</sup> edn.Mosby,an imprint of Elsevier Limited .
- Hassanpour, S.;** Maheri-Sis, N.; Eshratkhah, B. and Mehmandar, F. B. (2011). Plants and secondary metabolites (Tannins). *International Journal of Forest,Soil and Erosion*,1(1);47-53.
- Hemalatha, N. and Dhasarathan,P.** (2010).Multi-drug resistant capability of *pseudomonas aeruginosa* isolates from nasocomal and non-nasacomal sources. *J. Biomed Sci. and Res*. 2 (4), 236-239.

- Heyman, D.**(2004).Control of Communicable Diseases Manual.18<sup>th</sup> edn. American Public Health Association,Washington DC.
- Horikoshi, S.** and Serpone, N.(2013).Microwaves in Nanoparticale Synthesis.1<sup>st</sup> edn. Wiley-VCH Verlag GmbH and Co.KGaA.
- Horner, C.;** Mawer, D and Wilcox, M.(2012). Reduced susceptibility to chlorhexidine in *Staphylococci* :is it increasing and does it matter?. *J Antimicrob Chemother*.doi:10.1093,1-13.
- Hussein-Al-Ali, S. ;** Zowalaty, M. ; Hussein, M. ; Ismail, M. and JWebster, T. (2014). Synthesis, characterization, controlled release, and antibacterial studies of a novel streptomycin chitosan magnetic nanoantibiotic. *International Journal of nanomedicine*. 9:549-557.
- Jackson, M.** and Mahon, Co.(2005).Topical antiseptics in healthcare. <http://www.redorbit.com/news/science/191895>.
- Jeffery, B.;** Carolyn, L.; and Gerald B. (2000). Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Lessons from a versatile opportunist*. (2): 1051-1060.
- JiMin, W.** and ZiJian, L. (2013)Application of nanotechnology in biomedicine.*Chin Sci Bull*.58:4515-4518.
- Kaneko, J.** and Kamio, Y.(2004).Bacterial two-component and hetero-heptameric pore-forming cytolytic toxins: structures pore-forming mechanism organization of the genes. *Biosci Biotechnol Biochem*. 68:981-1003.
- Katalinic, V.;** Modun, D.; Music, I. and Boban, M. (2005). Gender differences in antioxidant capacity of rat tissue determined by 2,2 –azinobis (3- ethyibenzoline 6-sulfonate; ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay. *Comp. Biochem. Physiol*.140:47-52.

- Khalil, R.** ; Kassem, M. ; A.Elbary, A. ; El Ridi, M. and AbouSamra, M. (2013). Preparation and characterization of nystatin- loaded solid lipid nanoparticles for topical delivery. *IJPSR*.4(6): 0975-8232.
- Khan, N.**; Ahmad, A. and Hadi, S.M. (2000). Anti-oxidant, pro-oxidant properties of tannic acid and its binding to DNA. *Chemico-Biological Interactions*.125, 177-189.
- Khanbabaee, K.** and Ree, T.(2001).Tannins: Classification and definition. *Nat. Prod. Rep.* 18:641-649.
- Kitch, T.**; Jacobs, M. ; MaGinnis, M. and Applebaum, P.(1996).Ability of RapID Yeast Plus System to identify 304 clinically significant yeast within 5 hours. *J Clin Microbiol.* 34: 1069-71.
- Klemkaite, K.**; Prosycevas, I.; Taraskevicius, R.; Khinsky, A. and Kareiva, A. (2011). Synthesis and characterization of layered double hydroxides with different cations (Mg, Co, Ni, Al), decomposition and reformation of mixed metal oxides to layered structures. *Cent. Eur. J. Chem.* 9(2) : 275- 282.
- Kovanda, F.**; Maryskova, Z. and Kovar, P. (2011). Intraction of Paracetamol into the hydrotalcite-like host. *Jornal of Solid State Chemistry.* 184: 3329-3335.
- Kozlovskaya, V.**; Kharlampieva, E.; Drachuk, I.; Cheng, D. and Tsukruk, V.V.(2010). Responsive microcapsule reactors based on hydrogen-bonded tannic acid layer-by-layer assemblies. *The Royal Society of Chemistry.* 6,3596-3608.
- Kumar, S.** and Varela, M. (2013) . Molecular Mechanisms of Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents. *Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them: Science, Technology and Education* (A. Méndez-Vilas, Ed.)

- Kumar, V.;** Bhatnagar, S.; Singh, A.; Kumar, S. and Mishra, R. (2001). Burn Wound Infection: A study of 50 cases with special reference to antibiotic resistance. *Indian Journal of Bio Research*. 46: 66-69.
- Lawrence, J. and Lilly, H. (1972).** A quantitative method for investigating the bacteriology of skin: its application to burns. *Br. J. Exp. Pathol.* 53(5):550-9.(Cited from Shahzad *et al.*,2012).
- Leaper, D. and Durani, P.(2008).** Topical antimicrobial therapy of chronic wounds healing by secondary intention using iodine products. *Int Wound J.* 5:361-8.
- Lee, H.; Koh, Y.; Kim, J.; Lee, J.; Lee, Y.; Seol, S.; Cho, D. and Kim. J. (2008).**Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces.*Clin. Microbiol. Infect.*14:49-54.
- Lee, J.; Koerten, H.; van den Broek, P.; Beekhuizen, H.; Wolterbeek, R.; van den Barselaar, M.; van der Reijden, T.; van der Meer, J.; van de Gevel, J. and Dijkshoorn, L. (2006).** Adherence of *Acinetobacter baumannii* strains to human bronchial epithelial cells.*Res. Microbiol.*157:360-366.
- Levy, S. (1998).** The challenge of antibiotic resistance.*Sci. Am.*278(3): 46-53.
- Lim, K. and Kam, P. (2008).** Chlorhexidine-pharmacology and clinical applications. *Anaesth Intensive Care.*36:502-512.
- Lindsay, J. and Holden, M. (2004).** *Staphylococcus aureus*: superbug super genome?.*Trends Microbiol.*12:378-385.
- Lipsky, B. and Hoey, C.(2009).**Topical antimicrobial therapy for treating chronic wounds. *Clinical Infectious Diseases.*49:1541-9.

- Liu, G.;** Essex, A; Buchanan, J.; Datta, V.; Hoffman, H.; Bastian, J.; Fierer, J. and Nizet, V. (2005). *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. *J Exp Med.*202:209-215.
- Liwimbi, O.** and Komolafe, I.(2007). Epidemiology and bacterial colonization of burn injuries in Blantyre. *Malawi Medical Journal.* 19(1):25-27.
- Loehfelm, T.;** Luke, N. and Campagnari, A. (2008). Identification and characterization of *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein. *J.Bacteriol.*190,1036-1044.
- Lomillo, J.** (2011). Antioxidant Activity in Decaffeinated Beverages: Instant Coffee and Black Tea. Master en Seguridad y Biotecnología Alimentarias Universidad de Burgos University of Leeds.
- Lopes, G.;** Schulman, H.; Hermes-Lima, M. (1999). Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. *Biochimica et Biophysica Acta.*1472,142-152.
- Loveymi, B.;** Jelvehgari, M.; Zakeri-Milani, P. and Valizadeh, H. (2012). Statistical Optimization of oral Vancomycin –Eudragits RS nanoparticles using response surface methodology. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research.*11(4): 1001-1012.
- Lowy, F.** (2003). Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest.*111:1265-73.
- Lozier, S.** (1993). Topical wound therapy, in: Harari J editor. Surgical complications and wound healing in small animal practice. Philadelphia, 63-88.

- Lv, L.; He, J.; Wei, M.; Evans, D. and Duan, X. (2006).** Factors influencing the removal of fluoride from aqueous solution by calcined Mg-Al-CO<sub>3</sub> layered double hydroxides. *J.Hazard Mater.* 133(1-3):119-128.
- Macfaddin,J. (2000).**Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria .1<sup>st</sup>ed.,the Williams and Wilkins Baltimore, USA.
- Magnet, M.; Arongozeb ; Khan, G. and Ahmed, Z.(2013).** Isolation and identification of different bacteria from different types of burn wound infections and study their antimicrobial sensitivity pattern.*International Journal of Research in Applied, Natural and Social Sciences.*1(3):125-132.
- Marc, F.; Davin, A.; Deglène-Benbrahim, L.; Ferrand, C. and Baccaunaud M. (2004)** Studies of several analytical methods for antioxidant potential evaluation in food. *Med Sci.* 20: 458-463.
- Markey, B.; Leonard, F.; Archambault, M.; Cullinane, A. and Maguire, D.(2013).**Clinical Veterinary Microbiology. 2<sup>nd</sup> edn. Mosby Elsevier.
- Mbaga, F. and Mwafongo, V. (1998).**Aprofile of burn injury in Dar es Salaam , Tanzania. *Tanzania Medical Journal.*3(2):8-12.
- McDonnell, G. and Russell, A. (1999).** Antiseptics and disinfectants: activity,action and resistance.*Clin.Microbiol.Rev.*12(1):147-179.
- Mc Manus, A.; Mason, A.; McManus, W. and Pruitt, B. (1994).** A decade of reduced gram-negative infections and mortality improved isolation of burned patients. *Arch.Surg.* 129: 1306-1309.
- Mims, C.; Dockrell, H.; Goering, R.; Roitt, I.; Wakelin, D. and Zuckerman, M.( 2004 ).** Medical Microbiology. 3<sup>rd</sup> ed. Mosby,St. Louis.

- Mobley, H.** and **Belas, R.**(1995).Swarming and pathogenicity of *Proteus mirabilis* in the urinary tract. *Trends Microbiol.* 3:280-284.
- Mohammed, S.** (2007). Isolation and identification of aerobic pathogenic bacteria from burn wound infections. *Journal of Al-Nahrain University.*10(2):94-97.
- Monafo, W.** and **Freedman, B.** (1987). Topical therapy for burns. *Surg Clin North Am.* 67: 133-145.
- Morello, J.;** **Mizer, H.;** and **Granato.** (2006). Laboratory Manual and Workbook in Microbiology Applications to Patient Care. 18<sup>th</sup>ed. The McGraw-Hill Companies, Inc., New York, 95-99.
- Nalawade, P.;** **Aware, B.;** **Kadam, V.** and **Hirlerkar, R.** (2009). Layered double hydroxides: a review. *Journal of Scientific and Industrial Research.*68:267-272.
- Negreanu-Pîrjol, T.;** **Negreanu-Pîrjol, B.;** **Călinescu, M.;** **Dumitru, F.;** **Sîrbu, R.;** **Stoicescu, R.;** **Rima, G.** and **Guran, C.** (2011).Cu(II) and Zn(II) complex compounds with biguanides aromatic derivatives. Synthesis, characterization, biological activity. *St. Cerc. St. CICBIA.*12(2): 127-140.
- Nonaka, G.**(1989). Isolation and structure elucidation of tannins. *Pure and Appl. Chem.* 61(3): 357-360.
- Okuda, T.**and **Ito, H.**(2011). Tannins of constant structure in medicinal and food plants-hydrolyzable tannins and polyphenols related to tannins(Review).*Molecules.*16:1291-2217
- Olf, H.;** **Torres-Dorante, L.;** **Eckelt, R.** and **Kosslick, H.** (2009). Comparson of different synthesis routes for Mg-Al layered double hydroxides (LDH):characterization of the structural phases and anion exchange properties. *Applied clay science.*43(3-4):459-464.

- Othman, M. ; Helwani Z.; Martunus and Fernando, W. (2009).** Synthetic hydrotalcites from different routes and their application as catalysts and gas adsorbents: a review. *Applied Organometallic Chemistry*.23(9):335-346.
- Order, S.; Mason, A.; Switzer, W. and Moncrief J. (1965).** Arterial vascular occlusion and devitalization of burn wounds. *Ann Surg*. 161: 502-508.(Cited from Magnet *et al.*,2013).
- Owlia, P.; Saderi, H.; Mansouri, S.; Salemi, S. and Ameli, H.(2006).** Drug resistance of isolated strains of *Pseudomonas aeruginosa* from burn wound infections to selected antibiotics and disinfectants. *Iranian Journal of Pathology*.1(2):61-64.
- Pandey, R. and Khuller, G. (2006).** Nanotechnology based drug delivery system(s) for management of tuberculosis. *Indian Journal of Experimental Biology*. 44: 357-366.
- Parida, K.; Sahoo, M. and Singha, S. (2010).** Synthesis and characterization of a Fe(III)-Schiff base complex in a Zn–Al LDH host for cyclohexane oxidation. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*. 329:7–12.
- Perret, C.; Tabacchi, R. and Pezet, R.(2001).** Analysis of oligomeric and polymeric tannins of grape berries by liquid chromatography / electrospray ionization multiple-stage tandem mass spectrometry.*Eur. J.Mass Spectrom*. 7:419-426.
- Plata, K.; Rosato, A. and Węgrzyn, G.(2009).** *Staphylococcus aureus* as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. *Acta Biochimica Polonica*.4:597-612.

- Postgate, J.** (1998), Nitrogen Fixation (3<sup>rd</sup> ed.). Cambridge University Press. ISBN 978-0521640473.
- Prior, R.;** Wu, X. and Schaich, K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J. Agric. Food Chem.* 53:4290-4302.
- Pruitt, B.;** Colonel, M. and McManus, A. (1984). Opportunistic infections in severely burnt patients. *Am J Med.*76: 146-154.
- Pruitt, B.;** McManus, A.; Kim, S. and Goodwin, C. (1998). Burn wound infections: current status. *World J Surg.* 22: 135-145.
- Quinn, J.** (1998). Clinical problems posed by multiresistant non fermenting gram negative pathogens. *Clin. Infect. Dis.*27(1):S117-124.
- Quinn, P.;** Carter, M.; Markey, B. and Carter, G. (2004). Clinical Veterinary Microbiology. Elsevier limited.
- Rather, P.** (2005).Swarmer cell differentiation in *Proteus mirabilis*. *Environ Microbiol.*7:1065-1073.
- Ravel, J.** and Cornelis, P. (2003). Genomics of pyoverdine- mediated iron uptake in *Pseudomonas*. *Trends Microbiol.* 11: 195-200.
- Reed ,J.** (1995). Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *J ANIM SCI* , 73:1516-1528.
- Reny, C.** (2007). Mg-Al Layered Double Hydroxide: A potential Nanofiller Flame-Retardant for Polyethylene. Ph.D. Thesis. India.
- Riaz, I.** and Babar, A. (1996). Burn wound micro flora and their sensitivity pattern: a prospective study. *Pak J. Surg.* 12: 30-2.

- Richet, H.** and Fournier, P. (2006). Nosocomial infections caused by *Acinetobacter*: a major threat worldwide. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 27:645-646.
- Riggs, P.;** Chelius, M. K; Iniguez, A.; Kaeppler, S. and Triplett, E. (2001), "Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria". *Australian Journal of Plant Physiology.* 29 (8): 829–836.
- Rozalski, A.;** Sidorczyk, Z. and Kotelko, K.(1997). Potential virulence factors of *Proteus* bacilli. *Microbiol Mol Biol Rev.* 61:65-89.
- Ryan, K.** and Ray, C. G. (2004). Sherris Medical Microbiology. An Introduction to Infectious Diseases. 4<sup>th</sup> ed. McGraw Hill.
- Ryan, K.** and Ray, C. (2010). Sherris Medical Microbiology. 5<sup>th</sup> ed. McGraw Hill.
- Sarangi, P.** (2011). Biochemical Characterization and Antibiotic Resistance of Some Medically Important Bacterial Isolates. Degree of master of science in life science. National institute of technology. India.
- Schito, G.** (2006). The importance of the development of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect.* 12:3-8.
- Schulz, W.**(2000). Crafting a national nanotechnology effort. *Chem Eng News.* 78:39-42.
- Seaton, D.** (2000). Pneumonia, in Crofton and Douglas's Respiratory Diseases, 5<sup>th</sup> edn. (eds. A. Seaton, D. Seaton and A. G. Leitch), Blackwell Science Ltd, Oxford, UK.
- Sebben, J.** (1983). Surgical antiseptics. *J. Am. Acad. Dermatol.* 9(5),759-765.
- Semenoff, T.;** Semenoff-Segundo, A.; Borges, A.; Pedro, F.; Caporossi, L. and Rosa-Júnior, A.(2010). Antimicrobial activity of 2%

- chlorhexidine gluconate, 1% sodium hypochlorite and paramonochlorophenol combined with furacin against *S. aureus*, *C. albicans*, *E. faecalis* and *P. aureginosa*. *Rev. odonto ciênc.*25(2):174-177.
- Shahzad**, M.; Ahmed, N.; Khan I.; Mirza, A. and Waheed F.(2012).Bacterial Profile of Burn Wound Infections in Burn Patients. *Ann. Pak. Inst. Med. Sci.* 8(1): 54-57.
- Sharma**, D.; Sachdev, V. and Sharma, N.(2012).Evaluation of antimicrobial activity of root canal irrigants-an in vitro study. *Indian Journal of Dental Sciences.*2(4)37-39.
- Silanikove**, N.; Perevolotsky, A. and Provenza, F.(2001).Use of tannin-binding chemicals to assay effects in ruminants. *Animal Feed Science and Technology.*91:69-81.
- Silverstein**, R. ; Webster, F. and Kiemle, D. (2005). “Spectrometric Identification of Organic Compounds “ 7<sup>th</sup> ed. John Wiley & Sons . INC. Printed in the United States of America .
- Simor**, A.; Lee, M.; Vearncombe, M. Jones-Paul, L.; Barry, C.; Gomez, M.; Fish, J.S.; Cartotto, R.C.; Palmer, R. and Louie, M. (2002). An outbreak due to multiresistant *Acinetobacter baumannii* in a burn unit:risk factors for acquisition and management.*Infect Control Hosp Epidemiol.*23(5):261-267
- Singh**, S.(2012). Adsorptive Removal of Tannic Acid by Activated Carbon From Aqueous Solution. Degree of master of technology. Thapar University,Punjab.
- Sivaraman**, S.; Elango, I.; Kumar, S. and Santhanam, V.(2009). A green protocol for room temperature synthesis of silver nanoparticles in seconds. *Current Science.*97(7): 1055-1059.

- Smith, E.** and Swein, T.(1962).Flavonoid compound.In:Comparative Biochemistry.Eds.H.S.Mason,A.M.Florkin,Academic Press New York(USA),pp.755-809. (Cited from Amarowicz, 2007).
- Smith, M.;** Gianoulis, T.; Pukatzki, S.; Mekalanos, J.; Ornston, L.; Gerstein, M. and Snyder, M. (2007). New insights in to *Acinetobacter baumannii* pathogenesis revealed by high-density pyrosequencing and transposon mutagenesis.*Genes Dev.*21,601-614.
- Stefanetti, V;** Marenzoni, M.; Lepri, E.; Coletti, M.; Proietti, P.; Agnetti, F.; Crotti, S. and Pitzurra, L.(2014).A case of *Candida guilliermondii* abortion in an Arab mare. *Medical Mycology Case Reports.*4:19-22.
- Steward, C.;** Rasheed, J.; Hubert, S.; Biddle, J.; Raney, P.; Anderson, G.; Williams, P.; Brittain, K.; Oliver. A.; McGowan, J.; and Tonover, F. (2001). Characterization of clinical isolates of *Klebsiella pneumonia* from 19 laboratories using the national committee for clinical laboratory standards extended-spectrum  $\beta$ -lactamase detection method. *J.Clin.Microbiol.* 165(2):353-356.
- Stover, C.;** Pham, X.; Erwin, A.; Mizoguchi, S.; Warrenner, P.; Hickey, M.; ; Brinkman, F.; Hufnagle, W.; Kowalik, D.; Lagrou, M.; Garber, R.; Goltry, L.; Tolentino, E.; Westbrook-Wadman, S.; Yuan, Y.; Brody ,L.; Coulter, S.; Folger, K.; Kas, A.; Larbig, K.; Lim, R.; Smith, K.; Spencer, D.; Wong, G.; Wu, Z.; Paulsen, I.; Reizer, J.; Saier, M.; Hancock, R.; Lory, S. and Olson, M.; (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* ;406:959-964.
- Suri , S. ;** Fenniri, H. and Singh, B. (2007) . Nanotechnology –based drug delivery systems . *J Occup Med Toxicol.* 2: 16.

- Surendiran, A.;** Sandhiya, S.; Pradhan, S. and Adithan, C.(2009). Novel applications of nanotechnology in medicine. *Indian J Med Res.*130:689-701.
- Tabary, N.;** Chai, F.; Blanchemain, N.; Neut, C.; Pauchet, L.; Bertini, S.; Delcourt-Debruyne, E.; Hildebrand, H. and Martel, B.(2014). A chlorhexidine-loaded biodegradable cellulosic device for periodontal pockets treatment. *Acta Biomaterialia.* 10:318-329.
- Thomas, G.;** Rael, L.; Bar-Or, R.; Shimonkevitz, R.; Mains, C.; Slone, D.; Craum, M. and Bar-Or, D.(2009). Mechanisms of delayed wound healing by commonly used antiseptics. *Trauma* . 66:82-91.
- Thomas, L.;** Maillard, J.; Lambert, R. and Russell, A. (2000). Development of resistance to chlorhexidine diacetate in *Pseudomonas aeruginosa* and the effect of residual concentration. *J.Hosp. Infect.*46(4):297-303.
- Tiga, S.**(2011).Characterization and Identification of Some Medically Important Bacterial Isolates. Degree of master of science in life science.National institute of technology. India.
- Tille, P.** (2014).Bailey &Scott's Diagnostic Microbiology.13<sup>th</sup> Mosby, Inc.,an affiliate of Elsevier Inc.
- Timko, J.**(2004).Changes of antimicrobial resistance and extended-spectrum beta-lactamase production in *Klebsiella spp.* strains. *J.Infect Chemother.*10:212-215.
- Vidal, R.;** Dominguez, M.; Urrutia, H.; Bello,H.; Gonzalez, G.; Garcia A. and Zemelman, R. (1996).Biofilm formation by *Acinetobacter baumannii*. *Microbios.*68:49-58.
- Vissillier, S.;** Delolne, F.; Brenillon, J.; Saulneir, J. and Wallach, J.(2001). Hydrolysis of glycine-containing elastin pentapeptides by

- LasA metallo-beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur. J. Biochem.* 268: 1049-1057.
- Waldron, D.** and Trevor, P.(1993). Management of Superficial Skin Wounds. In:Slatter DH,editor. Textbook of small animal surgery 2<sup>nd</sup> edn. Saunders, Philadelphia.262-279.
- Wang, Y.** and Zhang, D. (2012) . Synthesis, characterization, and controlled release antibacterial behavior of antibiotic intercalated Mg –Al layered double hydroxides. *Materials Research Bulletin.* 47: 3185–3194.
- Wassilew, S.** (1990). Infection of the skin with Gram-negative bacilli infections of the toe webs. *Microbiology Abstracts Section Bacteriology.* 23: 117.
- Wilczewska, A.** ; Niemirowicz, K. ; Markiewicz, K. and Car, H.(2012). Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacological Reports.* 64: 1020-1037.
- Williams, W.**(2002). Pathophysiology of the Burn Wound, in Herndon, Total Burn Care, 2<sup>nd</sup> ed. Saunders, London, 514-521.
- Wilson, S.;** Knipe,C.; Zieger, M.; Gabehart, K.; Goodman, J.; Volk, H. and Sood, R. (2004). Direct costs of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in the burn unit of a public teaching hospital. *Am.J.Infect Control.*32(6):342-344.
- Würdig, G.**and Woller,R.(1989). Chemie des Weines, Eugen Ulmer GmbH, Stuttgart. (Cited from Khanbabaee and Ree ,2001).
- Yanishilieva, N.;** Marinova, E.; Gordon, M. and Raneva, V. (1999). Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chemistry.* 64:59-66.

---

**Zarina, L.** and Nanda, A.(2014). Green approach for synthesis of silver nanoparticles from marine *Streptomyces*-MS 26 and their antibiotic efficacy, *J. Pharm. Sci. & Res.* 6(10):321-327.

**Zeana, C.;** Larson, E.; Sahni, J.; Bayuga, S.; Wu, F. and Della-Latta, P.(2003).The epidemiology of Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* :dose the community represent a reservior?.*Infect Control Hosp Epidemiol.*24:275-9.

## Summary

This study included the isolation and diagnosis of the most important species of bacteria responsible for the infection in burns. It also included the preparation and detection of two hybrid nano compounds, one of them from the disinfectant chlorhexidine and the other from the tannic acid. The inhibitory activity of the nano disinfectant was assessed against the isolated bacteria in this study also, the antioxidant activity of the hybrid nano tannic acid was identified and the results showed the following :

- 1- As a total 32 samples were taken from burned patients hospitalized in the burning ward Imam Al-Hussien medical city in Sacred Karbalaa governate. It had been obtained 8 isolates (34.78) % from *Pseudomonas* spp. , 7 of them were *Pseudomonas aeruginosa* and one was *P. oryzihabitans* , 4 isolates (17.39) % were *Acinetobacter baumannii* , 4 isolates (17.39) % were *Klebsiella pneumoniae*, and one isolate (4.34) % of *Proteus mirabilis* , *Escherichia coli* , *Serratia liquefaciens* and *Chryzeobacterium meningosepticum* and two isolates (8.69) % of *Staphylococcus aureus* in addition to one isolate (4.43) % from *Candida guilliermondii* yeast .
- 2- Chlorhexidine disinfectant and tannic acid were used in preparation of the two hybrid nano compounds after intercalating each of them on layers of double hydroxide (Mg/Al-LDH). FT-IR spectrum studies has shown the appearance of specific chemical groups and the disappearance of others while the spectrum of x-ray(XRD) has shown

the appearance of new levels of diffraction in the spectrum of the hybrid nano disinfectant Mg/Al-CHX-LDH and the spectrum of the hybrid nano tannic acid Mg/Al-TA-LDH as compared to the spectrum of the Mg/Al-LDH, which indicate that the two prepared compounds under study is a nano hybrid compounds. Results of the scanning electronic microscope has shown, the change in the shape of the surface of the nanohybrid compounds that prepared above as compared to the layer of double hydroxide. It turns out from the results of the examination with the use of Atomic Force Microscope (AFM), that the diameter of the particles of hybrid nano disinfectant and hybrid nano tannic acid were (121.66 and 77.70) nm, respectively.

- 3- The inhibitory activity of the hybrid nano disinfectant Mg/Al-CHX-LDH and the free disinfectant (Free CHX) has been studied and the results revealed followings:
  - a. The hybrid nano disinfectant has the highest inhibitory activity against the two bacterial isolates *P. aeruginosa* (11 and 23-A) with an inhibition diameter of 24 mm for each , while the inhibition diameter for the free disinfectant was 23.5 mm against the isolate *P. aeruginosa* 4- C.
  - b. The hybrid nano disinfectant showed the highest inhibitory activity against the two isolates *A. baumannii* (16-A and 31-A) with an inhibition diameter of 18 mm for each, while the highest inhibition activity for the free disinfectant was against the isolate *A. baumannii* 22-B with an inhibition diameter of 19.5 mm .

- c. The hybrid nano disinfectant showed the highest inhibitory activity against the isolate *K. pneumoniae* (16-B) with an inhibition diameter of 24.5 mm, while the highest inhibition activity for the free disinfectant was against the isolate *K. pneumoniae* 15-B with an inhibition diameter of 24.5 mm also .
  - d. The highest inhibition activity for the hybrid nanoic disinfectant against each of bacteria *P. mirabilis* and *E. coli* with an inhibition diameter of 23.5 mm, while the highest inhibitory activity for the free disinfectant was against the bacteria *E. coli* with an inhibition diameter of 24.5 mm, while the bacteria *C. meningosepticum* was the least affected among the other types of the isolated bacteria with an inhibition diameter of 8 mm and it was resistance to the hybrid nano disinfectant .
  - e. The highest inhibition activity for the hybrid nano chlorhexidine was against the isolate *S. aureus* 21 with an inhibition diameter of 28.5 mm, while the highest inhibition activity for the free chlorhexidine was against the isolate *S. aureus* 22-A with an inhibition diameter of 31.5 mm .
  - f. The inhibitory activity of both the hybrid nano and the free disinfectant against *C. guilliermondii* yeast was closely to each other with an inhibition diameter of (28 and 29) mm, respectively .
4. The study of antioxidant activity confirmed the following:
- a. Using free radical scavenging method, the  $IC_{50}$ (Half maximal inhibitory concentration) value against ABTS free radical were at

10  $\mu\text{g}$  /ml for free tannic acid while it was at 125  $\mu\text{g}$  /ml for the hybrid nano tannic acid Mg/Al-TA-LDH .

- b. Measurement of ferric ion reducing power revealed that free tannic acid had reducing power greater than that of the hybrid nano tannic acid .

**Ministry of Higher Education  
& Scientific Research  
University of Kerbala/College of Science  
Department of Biology**



**Preparation of Two Nanohybrid Compounds from Chlorhexidine  
and Tannic Acid and Determination Their Antimicrobial  
Activities Against Microorganisms Isolated from  
Burns Patients in Sacred Karbala Province**

**A thesis**

**Submitted to the council of the**

**College of Science – University of Kerbala**

**In partial fulfillment of requirements for degree of Master of Science in Biology**

**By**

**Nawras Majeed Hameed AL-Khafaji**

**B.Sc.AL- Mustansiriya University 2001**

**Supervised by**

**Asst. Prof.**

**Dr. Ali Abdul Kadhimi Al-Ghanimi**

**2015 AD**

**1436 AH**