



جمهورية العراق - وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة كربلاء / كلية التربية للعلوم الصرفة
قسم علوم الحياة

التخليق الاخضر لمركبات السلينيوم واوكسيد الزنك النانوية من
الكرمين وتقييم فعاليتها التثبيطية على بكتريا *Pseudomonas*
Staphylococcus aureus و *aeruginosa*

رسالة تَقَدِّمت بها الطالبة

ورود عنيدي علي حسين العبادي
بكالوريوس تربيته - علوم الحياة 2016

إلى

مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة كربلاء وهي جزء
من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة - علم الحيوان

بإشراف

أ.د. عباس مطرود باشي

أ.م.د. هيام عبد الرضا العواد

2021 م

1442 هـ

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

يَرْفَعُ اللَّهُ الَّذِينَ آمَنُوا مِنْكُمْ وَالَّذِينَ أُوتُوا الْعِلْمَ
دَرَجَاتٍ وَاللَّهُ بِمَا تَعْمَلُونَ خَبِيرٌ

صَدَقَ اللَّهُ الْعَلِيُّ الْعَظِيمُ

الإهداء

الى الذي لا يحيطون بشئ من علمه إلا بما شاء.

الى روح والدي العزيز رحمه الله

الى نبض قلبي ...

أمي العزيزة

إلى عضدي وسندي ومشاطري أفرحي وأحزاني...

إخوتي وأخواتي

الى شهداء الوطن اخوتي (طلعت و عقيل)

إلى أصدقائي وكل من دعا لي بالخير....

أهديكم خلاصة جهدي العلمي المتواضع

ورود

شكر وتقدير

الحمد لله رب العالمين والصلاة والسلام على سيد المرسلين محمد وعلى آله وصحبه أجمعين.

أتقدم بالشكر الى عمادة الكلية والسيدة العميدة (أ.د. حميدة عيدان سلمان) وقسم علوم الحياة لإتاحة الفرصه لإكمال الدراسة وأتقدم بجزيل الشكر والتقدير والامتنان لاستاذي الكريمين (ا.م.د. هيام عبد الرضا العواد) (ا.د. عباس مطرود باشي) على جهودهما وتذليل الصعاب كافة التي واجهتني لتكملة البحث حيث كانا عوننا لي في مراحل دراستي .

كما أقدم شكري وامتناني إلى رئاسة قسم علوم الحياة ولجميع الأساتذة في قسم علوم الحياة ,وفي مقدمتهم (أ.م.د. نصير مرزه حمزة) لما قدمه من مساعدة بالنصح والإرشاد والتشجيع المعنوي .

وأقدم شكري وتقديري إلى الأساتذة الأجلاء لما كان لهم الدور القيم والفعال في إنجاز رسالتي وذلك بإبداء المساعدة العلمية القيمة .

كما أقدم كلمه شكر و عرفان الى الاساتذة الذين كان لهم الدور المميز بمساعدتي في الجانب العملي من رسالتي في مختبر كلية التربية (م.د.قيصر عبد السجاد محمد) وفي مختبر مستشفى المسيب العام الاستاذ (قحطان كريم خضير) .

وأسال الله سبحانه وتعالى أن ينعم على كل من مدّ يد العون لي في إعداد الرسالة بالنجاح والموفقية .

الخلاصة

Summary

الخلاصة

تضمنت الدراسة الحالية اختبار التأثير المضاد للبكتيريا للكرميين (Curcumin) والمركبان النانويان (Curcumin/zinc oxide Nps)(Curcumin/selenium Nps) على نوعين من البكتيريا احدهم موجب لصبغة غرام *Staphylococcus aureus* المعزولة من الادرار والأنف والجروح , والأخرى سالبة لصبغة غرام *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من اصابات الحروق وجروح العمليات , وبواقع 50 عزله لكل نوع بكتيري والتي عزلت من عدة مستشفيات في محافظة بابل (مستشفى المسيب العام والمستشفى التركي والمستشفى الجمهوري) وشخصت بالطرق المظهرية والكيموحيوية من قبل الباحث وقد تم العمل في المده الواقعه مابين 18/10/2020 و 24/1/2021 . فضلا عن استعمال نوعين من المضادات الحيوية وهي Gentamycin و Imipenem للبكتيريا السالبه لصبغه غرام و Vancomycin و Ciprofloxacin للبكتيريا الموجبه لصبغة غرام .

حضر المركبان النانويان (Curcumin/zinc oxide Nps) و (Curcumin/selenium Nps) بالطرق الخضراء (Green synthesis) وقد شخصت هذه المركبات بعدة طرق هي مطياف الاشعة فوق البنفسجية UV-Visible spectroscopy , مطياف الأشعة تحت الحمراء Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) , مجهر حيود الاشعة السينية X-Ray Diffraction(XRD) , المجهر الالكتروني الماسح Scanning electron microscope (SEM) .

أجرِيَ اختبار الـMIC بواسطة طريقة التخفيف بالوسط السائل , وقد وجد أن التركيز المثبط الادنى للكرميين هو 250 و 500 $\mu\text{g/mL}$ لكل من بكتيريا *Staphylococcus aureus* و *Pseudomonas aeruginosa* على التوالي . أما الـCur/zno NPs فقد أعطى 1000 و 2000 $\mu\text{g/mL}$ لكل من بكتيريا *Staphylococcus aureus* و *Pseudomonas aeruginosa* على التوالي. بينما كان الـMIC للـcur/se NPs هو 125 و 250 $\mu\text{g/mL}$ لكل من بكتيريا *Staphylococcus aureus* و *Pseudomonas aeruginosa* على التوالي . ثم قيمت الفعالية التثبيطية للمركبات النانويه والكرميين الحر بالإضافة لعدة انواع من المضادات الحيوية (Vancomycin ,Ciprofloxacin ,Imipenem, Gentamycin) بطريقة انتشار الاقراص (Disk diffusion test) وقد كانت ذو فعالية عالية تجاه أنواع البكتيريا المدروسة ,

و اظهرت النتائج ان بكتريا *Staphylococcus aureus* الموجبة لصبغة غرام كانت أكثر حساسية للمركبات النانوية والمضادات الحيوية من بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* السالبة لصبغة غرام .

اوضحت النتائج أيضا وجود زيادة في تأثير المركبات النانوية على نوعي البكتريا مقارنةً مع الكركمين الحر وهذه الزيادة نتجت عن الفعل التآزري بين المادتين المكونتين للمركب النانوي .

يعد المركبان النانويان (Curcumin/selenium Nps) و (Curcumin/zinc oxide) بديلان للمضادان الحيويان imipenem و Gentamicin على التوالي لما ظهر من تقارب في تأثيراتهم التثبيطية للنمو البكتيري In vitro على بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* .

يعد المركبان النانويان (Curcumin/selenium Nps) و (Curcumin/zinc oxide) بديلان للمضادان الحيويان Ciprofloxacin و Vancomycin على التوالي لما ظهر من تقارب في تأثيراتهم التثبيطية للنمو البكتيري In vitro على بكتريا *Staphylococcus aureus* .

المحتويات

Contents

قائمة المحتويات		
الصفحة	الموضوع	التسلسل
	الفصل الاول	
1	المقدمة	1.1
	الفصل الثاني	
	استعراض المراجع	
4	بكتريا <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1.2
7	بكتريا <i>Staphylococcus aureus</i>	2.2
9	المستخلصات النباتية	3.2
10	نبات الكركم <i>Curcumin longa</i>	1.3.2
13	الجسيمات النانوية Nanoparticles	4.2
14	بناء الجسيمات النانوية Nanoparticle Synthesis Methods	1.4.2
14	1. المنهجية الكيميائية Chemical approach	
15	2. المنهجية الفيزيائية Physical approach	
15	3. المنهجية الحيوية biological approach	
16	اهمية استخدام الدقائق النانويه في اىصال الدواء	2.4.2
17	جسيمات السيلينيوم النانوية (SeNPs) Selenium nanoparticles	3.4.2
18	جسيمات اوكسيد الزنك النانوية (ZnO-NPs) ZnO nanoparticles	4.4.2
19	الأجهزة و التقنيات المستخدمة في تشخيص المواد النانوية	5.2
20	تحرر الدواء من الحوامل النانوية	6.2
	الفصل الثالث	
	المواد وطرائق العمل	
22	المواد والاجهزه المستخدمه materials and device	1.3
22	الاجهزه والادوات المستخدمة	1.1.3
23	المواد المستخدمه والشركات المصنعه	2.1.3
24	طرائق العمل	2.3
24	تحضير المركبات النانويه	1.2.3
24	تحضير المركب النانوي من طبقات اوكسيد الزنك مع الكركمين	1.1.2.3
24	تحضير المركب النانوي من سليينات الصوديوم مع الكركمين (Sodium selenite pentahydrate)	2.1.2.3
27	تشخيص المركبات النانوية	2.2.3
27	مطياف الاشعة فوق البنفسجيه Ultraviolet visible spectrophotometer	1.2.2.3

27	التشخيص باستخدام طيف الأشعة تحت الحمراء FT-IR	2.2.2.3
28	مجهر حيود الأشعة السينية X-ray diffraction (XRD)	3.2.2.3
28	المجهر الإلكتروني الماسح Scanning Election Microscope (SEM)	4.2.2.3
28	عزل البكتريا المدروسة	3.2.3
28	جمع العينات	1.3.2.3
29	حفظ العينات	2.3.2.3
29	حفظ العزلات قصير الامد Short term storage	
29	حفظ العزلات متوسط الامد Medium term storage	
29	حفظ العزلات طويل الامد Long term storage	
29	الايوساط الزرعيه المستخدمه	3.3.2.3
29	وسط Blood agar base	
29	وسط MacConkey agar	
30	وسط Mannitol salt agar	
30	وسط Nutrient Broth	
30	وسط Cetrimide agar	
30	وسط Muller- hinton agar	
31	الكواشف والمحاليل المستخدمة في عزل وتشخيص البكتريا المدروسة	4.3.2.3
31	ملون غرام Gram stain	
31	كاشف الكاتليز Catalase reagent	
31	كاشف الاوكسيديز Oxidase reagent	
31	المحلول الملحي الفسيولوجي Normal saline	
31	محلول ماكفر لاند (انبوب رقم 0,5) Macfarland Solution	
32	عزل وتشخيص البكتريا المدروسة	5.3.2.3
	الفحوصات المجهرية Microscopic tests	1.5.3.2.3
32	الفحوصات الكيموحيوية Biochemical tests	2.5.3.2.3
32	تشخيص البكتريا باستخدام عدة التشخيص API 20E	3.5.3.2.3
35	تقدير التركيز المثبط الادنى للمركبات النانويه Minimal Inhibitory Concentration(MIC)	4.2.3
36	طريقة تقدير الفعالية التثبيطية للمركبات النانوية والمضادات الحيوية ضد البكتريا	4.2.3
36	تقدير الفعاليه التثبيطيه للمركبات النانويه	1.4.2.3
37	تقدير الفعاليه التثبيطيه للمضادات الحيويه	2.4.2.3
37	التحليل الاحصائي Statistical Analysis	6.2.3
	الفصل الرابع	
	النتائج والمناقشة	
38	تشخيص المركبات النانوية المحضرة بالطرائق الطيفية	1.4
38	مطياف الأشعة فوق البنفسجية UV-Visible spectroscopy	1.1.4

39	طيف الأشعة تحت الحمراء Fourier-transform infrared spectroscopy للمركب النانوي Cur-Se Nps	2.1.4
39	طيف الأشعة تحت الحمراء FT-IR للمركب النانوي Cur-Zno Nps	3.1.4
43	طيف حيود الأشعة السينية (XRD) للمركب النانوي Cur-Zno Nps	5.1.4
44	طيف حيود الأشعة السينية XRD للمركب النانوي Cur-Se Nps	6.1.4
45	المجهر الإلكتروني الماسح SEM للمركب النانوي Cur-Zno Nps	7.1.4
45	المجهر الإلكتروني الماسح SEM للمركب النانوي Cur-Se Nps	8.1.4
48	عزل وتشخيص انواع البكتريا المعزولة	2.4
49	تشخيص بكتريا <i>S. aureus</i>	1.2.4
49	تشخيص بكتريا <i>P. aeruginosa</i>	2.2.4
51	التركيز المثبط الأدنى للمركبات النانوية Inhibitory Concentration(MIC)	3.4
52	اختبار حساسية عزلات بكتريا الـ <i>S. aureus</i> للمركبات النانوية	4.4
56	المقارنه بين التأثير التثبيطي للمركبات النانويه مع المضادات الحيوية	5.4
	الاستنتاجات والتوصيات	
58	الاستنتاجات	
58	التوصيات	
	المصادر	
59	المصادر العربية	
60	المصادر الاجنبية	

قائمة الجداول

الصفحة	العنوان	رقم الجدول
	المواد وطرائق العمل	
22	استعملت الاجهزة الموضحة في الجدول (1-3).	1-3
23	استعملت المواد الكيميائيه الموضحة في الجدول (3-3).	2-3
23	استعملت الاوساط الزراعيه الموضحة في الجدول (3-3)	3.3
24	استعملت اقراص المضادات الحيويه الموضحة في الجدول (3-4)	4-3

33	تشخيص البكتريا باستخدام عدة التشخيص API 20E	5-3
	النتائج والمناقشة	
50	النسب المئوية لعزلات انواع البكتريا المعزولة من عينات سريره مختلفة	1.4
	الاختبارات المظهرية والكيموحيوية لبكتريا S.aureus	2.4
51	الاختبارات المظهرية والكيموحيوية لبكتريا P. aeruginosa	3.4
57	الفعالية التثبيطية والتراكيز لمركب الكركمين و Cur/Zno Nps و Cur/Se Nps و IMP.10 و GN.30 تجاه بكتريا Pseudomonas aeruginosa .	4.4
57	الفعالية التثبيطية والتراكيز لمركب الكركمين و Cur/Zno Nps , Cur/Se Nps ,VA30, CIP10 تجاه بكتريا Staphylococcus aureus .	5.4
58	النسب المئوية لحساسية ومقاومة البكتريا للمضادات الحيوية قيد الدراسة .	6.4

قائمة الاشكال

الصفحة	العنوان	رقم الشكل
	استعراض المراجع	
	عملية البناء الحيوي للجسيمات النانوية	1.2
	المواد وطرائق العمل	
25	تحضير المركب النانوي من الكركمين بإضافة اوكسيد الزنك بطريقة التبادل الايوني المباشر	1.3
26	تحضير المركب النانوي من الكركمين بإضافة السلينيوم بطريقة التبادل الايوني المباشر	2.3
35	صوره لفحص الـ Api20E لبكتريا الزائفة الزنجارية	3.3.
	النتائج والمناقشة	
39	مطياف الاشعة فوق البنفسجية للمركب النانوي Cur-Se Nps	1.4

	طيف الأشعة تحت الحمراء FTIR للسلينيوم	2.4
	طيف الأشعة تحت الحمراء FTIR لاوكسيد الزنك	3.4
42	طيف الأشعة تحت الحمراء FT-IR للسلينيوم النانوي المتكون بواسطة الكركمين	4.4
43	طيف الأشعة تحت الحمراء FT-IR لاوكسيد الزنك النانوي المتكون بواسطة الكركمين	5.4
	طيف الأشعة تحت الحمراء FTIR للكركمين	6.4
44	طيف حيود الأشعة السينية XRD لاوكسيد الزنك النانوي ZnO المتكون بواسطة الكركمين	7.4
45	طيف حيود الأشعة السينية (XRD) للسلينيوم النانوي (SeNPs) المتكون بواسطة الكركمين	8.4
47	المركب النانوي Cur-Zno Nps تحت المجهر الإلكتروني الماسح SEM	9.4
48	المركب النانوي Cur-Se Nps تحت المجهر الإلكتروني الماسح SEM	10.4
52	لنتيجة الموجبة لفحص الـ Api20E لبكتريا <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11.4
55	الفعالية التثبيطية لكل المركبات المستعمله في البحث على اغار Mullar hinton	12.4
60	حساسية ومقاومة البكتريا لكل مضاد حيوي تمت دراسته	13.4

قائمة المختصرات

الكلمه كامله	الاختصار	التسلسل
Ciprofloxacin	CIP10	1
Curcumin	cur	2
Cur-Se Nps	Curcumin/selenium nanoparticles	3
Cur-zno Nps	Curcumin/zinc oxide nanoparticles	4
Fourier transform infrared spectrophotometer	FT-IR	5
Gentamycin	GN30	6
Gram negative	Gve-	7
Gram positive	Gve+	8
Imipenem	IMP10	9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	10

Scanning Electron Microscope	SEM	11
Selenium	Se	12
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>S. aureus</i>	13
Ultraviolet visible spectrophotometer	UV-visible spectrophotometer	14
Vancomycin	VA 30	15
X-Ray diffraction	XRD	16
Zinc oxid	Zno	1
VSI	Vaccine & sera institute	19

الفصل الاول

المقدمة

Introduction

الفصل الاول

المقدمة Introduction

1.1 المقدمة Introduction

تعد الأمراض المعدية الناتجة عن الإصابة بالأحياء المجهرية بشكل عام والبكتريا بشكل خاص اكثر الأمراض انتشارا حول العالم وتسبب ملايين الوفيات في كل عام (Singh, 2014). و تعد البكتريا اقدم الكائنات البسيطة التركيب و أكثرها وفرة و انتشاراً على الكوكب اذ وجد علماء الأثار بكتيريا متحجرة تعود إلى ما يقارب 3 مليار سنة (Al-Mohanna et al., 2016). و توجد العديد من الأنواع البكتيرية القادرة على إحداث أمراض للإنسان و الكائنات الحية المختلفة نتيجة لإمتلاكها عدد من الصفات الكيميائية أو الوراثية التي يمكن أن تشكل عامل ممرض للإنسان و الكائنات الأخرى و هذه العوامل يمكن أن نطلق عليها مجتمعة بعوامل الضراوة Virulence factors و التي تساعد الخلية البكتيرية على إحداث الضرر في جسم المضيف مثل إنتاج السموم و عدد من الانزيمات الأخرى (Murray et al., 2020).

يتميز النوع *Pseudomonas aeruginosa* بأنه أحد الأجناس البكتيرية الواسعة الانتشار في الطبيعة وفي ظروف بيئية مختلفة، اذ يمكن عزله من على اجسام كائنات مختلفة كالانسان و الحيوانات و النباتات، كما أنه يتميز بقدرة على تحمل نقص الغذاء في البيئة التي يتواجد فيها فضلا عن مقاومته للظروف البيئية المختلفة و اذ يمكن ان يتواجد في البيئة الطبيعية و بيئة المستشفيات المعقمة، ووفقا لمركز CDC و البيانات التي جمعت بين عامي 1968 - 1998 فإن السيدوموناس يمثل خامس أكثر ملوث مسبب للالتهابات في مستشفيات الولايات المتحدة (Lister et al., 2009). تسبب هذه البكتريا عدد من الالتهابات القوية للاطفال الذين يعانون من عيوب جينية وراثية و للاشخاص الذين يعانون من امراض مكتسبة و كذلك المصابين بالجروح و الحروق، كما ان عدوى الجهاز التنفسي ببكتريا *P. aeruginosa* يعدّ اكبر مسبب للوفاة لدى مرضى التليف الكيسي الوراثي (Darby et al., 2005). كما يُعدّ النوع *S. aureus* أحد أكثر الانواع البكتيرية الممرضة التي تنتقل عن طريق الغذاء الملوث، و تسبب عدد من الامراض الشائعة حول العالم نتيجة لتناول الاغذية الملوثة بهذه البكتريا او الحاوية على السموم المنتجة منها (Al-Bahry et al., 2014). يصيب

بكتريا *S. aureus* عادة الاشخاص الذين يعانون من امراض نقص المناعة، يتواجد هذا النوع على الجلد و في الانف و البلعوم في جسم الانسان و يسبب الالتهابات الموضعية لكثير من الاعضاء كالانف و القناة البولية و القناة الهضمية و المهبل و معظم هذه الالتهابات يمكن علاجها و لا تسبب الوفاة على الرغم من خطورتها البالغة (Harris et al., 2002).

إن الاستعمال المفرط و المتكرر للمضادات الحيوية جعل من ظهور أجيال و سلالات مقاومة من البكتريا مشكلة عالمية (Kariminik & Nazoori , 2018). و من هذا السياق يمكن القول إن هنالك تحديين رئيسيين تواجههما المنظمات الصحية و المراكز العلاجية في العالم اليوم هما : انتشار العدوى في المستشفيات و المراكز الصحية حول العالم و انتقالها من بلد لآخر بشكل سريع و ظهور سلالات و انواع جديدة من البكتريا الممرضة المقاومة للمضادات الحيوية الموجودة Antibiotic resistance bacteria (Niakan et al., 2019). لذا فإن الدراسات تتجه لحل هذه المشكلة عبر البحث عن البدائل كالمواد النانوية Nanomaterials لبعض الفلزات و اكاسيدها و التي بدت كبديل واعد للمضادات الحيوية في السنوات القليلة الماضية (Kariminik & Nazoori , 2018) اذ تمتلك الجسيمات النانوية لبعض المواد خصائص فيزيائية و كيميائية فريدة من نوعها مقارنة بأحجم الطبيعي لها مما يؤهلها للدخول في مجالات عديدة تبدأ من الالكترونيات و لا تنتهي بالمجال الطبي (Ahmad et al., 2017). اذ ان الكثير من العناصر و الفلزات و التي صنفت على أنها آمنة للاحياء المجهرية بالحالة الطبيعية اظهرت سُمّية عالية عند المستوى النانوي، و ذلك بسبب زيادة المساحة السطحية النوعية و زيادة قابلية التفاعل العالية لهذه الجسيمات (Emami-Karvani & Chehrizi, 2011). كما استخدمت اجزاء بعض النباتات و مستخلصاتها الكحولية و المائية كمضادات و علاجات لحالات الاصابات البكتيرية بشكل عام، نتيجة لما تحتويه من مركبات فعالة ذات خصائص علاجية (Lawhavinit Curcuma Longa et al., 2010). يعد الكركم من التوابل التي يتم الحصول عليها من نبات *Curcuma Longa* واحدا من النباتات المستخدمة في المجال الطبي بشكل كبير لما يحتويه من مركبات فينولية و مضادات اكسدة و التي يمكن ان تجعل استخدامه متاحا لعلاج الالتهابات البكتيرية و الفطرية و مقاومة الامراض السرطانية و مسكن للالام و علاج التقرحات (Altunatmaz et al., 2016). و اظهر الكركم ايضا فعالية مضادة للميكروبات المختلفة بشكل واسع جدا، فقد بينت بعض الدراسات فعاليته ضد الفطريات و عدد من البكتريا السالبة و الموجبة لصبغة غرام كما تبين انه يمنع المكورات العنقودية من الالتصاق على سطح الاسنان (Tyagi et al., 2015).

و لتسليط الضوء أكثر على هذه الاجناس البكتيرية الممرضة و ايجاد سبل علاجية ووقائية مختلفة اكثر فاعلية و اقل ضررا و لا سيما بعد ظهور سلالات بكتيرية مقاومة للمضادات الحيوية الشائعة فقد هدفت هذه الدراسة الى :

- اختبار تاثير المركبات النانوية المنتجة بطريقة التخليق الاخضر الصديقة للبيئة ضد البكتريا المرضيه

- المقارنة بين تأثير هذه المركبات النانوية و المضادات الحيوية المتداولة بالوقت الحالي

و يتم ذلك عبر عدد من المحاور أهمها :

1- استعمال تراكيز مختلفة للمركبات النانوية لكل من السيلينيوم و اوكسيد الزنك كضد نوعي للبكتريا المرضية المدروسة و النامية على البيئة المغذية لاختبار فعاليتها التثبيطية.

2- استعمال تركيز من الكركمين ضد البكتريا المرضية النامية على البيئة المغذية لإختبار فعاليتها التثبيطية .

3- إيجاد اقل تركيز مثبط لنمو هذه الاجناس البكتيرية لكل من المركبات النانوية و مستخلص نبات الكركمين.

الفصل الثاني

استعراض المراجع

Literature Review

الفصل الثاني

استعراض المراجع Review of literatures

1.2. بكتريا *Pseudomonas aeruginosa*

تنتمي بكتريا *P. aeruginosa* لعائلة *Pseudomonadaceae* لوحظت لأول مرة من قبل الطبيب الفرنسي جارلس سديلوت Charles Sédillot عام 1850 م ، اذا لاحظ وجود افرازات خضراء اللون مزرققة تظهر على الجروح المصابة بالعدوى بشكل متكرر (Alhazmi , 2015). وبكتريا *P.aeruginosa* هي بكتريا عصوية الشكل Rod shape سالبة لصبغة غرام Gram negative bacteria وتتواجد في بيئات مختلفة في التربة و الماء و على النباتات و الحيوانات و حتى جسم الانسان، اذ ان انها تتواجد بكميات عالية مقارنة بالمسببات المرضية الاخرى و تفضل التواجد في المناطق الرطبة على جسم الانسان و يمكن عزلها من الابط و الاذن و منطقة العجان اسفل الظهر Perineum (Wisplinghoff & Seifert , 2018). كما تدخل هذه البكتريا في المجال التجاري، اذ انها مصدر حيوي مهم لإنزيم اللايباز Lipase المحلل للزيوت و الدهون المنتجة تجاريا (علي و يازجي، 2011). و تصنف هذه البكتريا على أنها بكتريا هوائية Aerobic ، متحركة بسوط واحد قطبي، لا تنتج السبورات، ذات شكل عصوي مستقيم او منحنى قليلا يتراوح طولها من 1.5-5 مايكروميتر و قطرها 0.5-1 مايكروميتر، يمكن للنوع *P. aeruginosa* العيش بمدى حراري واسع يتراوح من 5-24 درجة مئوية علما ان بقية الانواع التابعة لجنس *Pseudomonas* لا يمكنها العيش بدرجة 24، غير مخمرة للسكر و يمكن تنميتها على عدد من الاوساط الصلبة و السائلة كالمكونكي الصلب MacConkey agar ، وسط اكار الدم Blood agar و Chocolate agar (PHE , 2015). معظم سلالات هذه البكتريا تنتج افرازات ذات لون اخضر او اخضر مزرق تظهر على الجروح و هي صبغة البايوسيانين Pyocyanin في حين تتلون بعضها باللون البني المحمر (شمخي و عمر، 2016).

تُعدّ بكتريا *P. aeruginosa* من الانواع الممرضة الانتهازية opportunistic اذا تصيب مرضى نقص المناعة و الراقدين في وحدات العناية المشددة بعد اجراء العمليات الجراحية و المصابين بالحروق و امراض الرئة و تحديدا التليف الكيسي Cystic fibrosis (Awan et al., 2019). كما تُعدّ واحدة من مسببات التهاب الاذن الوسطى الفيحي المزمن (Chronic Suppurative Otitis Media (CSOM)،

إذا يعبر عن حالة المرضى مثقوبي طبلة الاذن بسبب التهاب الاذن الوسطى الحاد بالـ AOM اي Acute Otitis Media، و الذي يتميز بخروج مواد مخاطية Mucoïd material من الاذن و تستمر من 6 اسابيع الى 3 اشهر و تحدث نتيجة دخول الممرض عن طريق الماء الملوث عبر السباحة او الاستحمام (شمخي و عمر، 2016).

تتميز بكتريا *P. aeruginosa* بقدرتها العالية على مقاومة المضادات الحيوية و قابليتها على التكيف مع الظروف البيئية و الصناعية المختلفة و هذا ما يتيح لها البقاء و الانتشار بشكل واسع حتى على الادوات الطبية المختلفة (Gellatly & Hancock , 2013). وتظهر هذه البكتريا عدة اليات مقاومة للمضادات الحيوية ، منها تقليل نفاذية الاغشية الحية، التغيير في التعبير الجيني لانظمة التدفق اذ تقوم بإخراج المواد غير المرغوب فيها الى الخارج عن طريق الية النقل الفعال، انتاج انزيمات تقوم بتحويل التركيب الكيميائي للمضادات الحيوية و تثبيط نشاطها، وتم ذلك عبر شفرات وراثية اساسية او عن طريق اكتساب جينات مقاومة تؤثر في الفئات الرئيسية من المضادات الحيوية كالبكتام β -lactam و الامينوكلايكوسايد Aminoglycosides و الكوينولونس Quinolones و البولي ميكسنز Polymyxins (Bassetti et al., 2018). كما ان وجود البكتريا ضمن مستعمرات او Biofilm يزيد من مقاومتها للمضادات الحيوية، ففي دراسة اجريت على مستعمرات لهذه البكتريا استخدمت فيها مضادات البيبيراسيلين Piperacillin وجد أن أفراد البكتريا قد طورت مقاومتها للبيبيراسيلين وبنسبة 52%، في حين أن وجودها ضمن Biofilm قد زاد من مقاومتها الى نسبة 5% (Jenny & Kingsbury , 2018). تنتج هذه البكتريا عددا من عوامل الضراوة التي تستخدمها في امراضيتها على المضيف، بعض هذه العوامل تساعد على تكوين مستعمرات جديدة للكائن و البعض الاخر يساعد في الغزو البكتيري ، اذ تنتج هذه البكتريا عدد من السموم والانزيمات Haemolysin و الذي يمثل عامل السمية الاقوى و تكون فعاليته بشكل مضاد من عملية البلعمة Phagocytosis مباشرة، و قد تكون مدى قدرة *P. aeruginosa* لبدء عدوى الجهاز التنفسي مرتبطة بمدى انتاجها لإنزيم Haemolysin ، كما تنتج هذه البكتريا كل من الانزيم الحال لليسيثين Lecithinase ، الانزيم الحال للبروتين Protease، الانزيم الحال للايلاستين Elastase و الانزيم الحال للكولاجين Collagenase كما تنتج السموم الخارجية نوع Exotoxin A و انزيم Exoenzyme S (Younis et al., 2015). كما تنتج انزيم الستافيلولايسين Staphylolysin بنوعين Las A و Las D ، اذ ان للنوع A القدرة على تحليل العديد من مكونات الانسجة الرابطة المحتوية على الحامض الاميني Glycine فضلا عن قدرته على تحليل

Collagen و Elastin فضلا عن قدرته على تحليل 33 نوعا من البيبتيدات الخماسية الموجودة في التروبولاستين البشري Tropoelastin ، كما يعمل على تحليل بكتريا *Staphylococcus* المنافسة لـ *P. aeruginosa* و القضاء عليها و هذا ما يساعد في عملية الاستيطان، كما يستعمل ايضا عاملا علاجيا لإلتهاب القرنية الناتج عن الإصابة ببكتريا *S. aureus* ، اما النوع D فهو يعمل على تحويل Staphylolysin A من الشكل غير الفعال الى الشكل الفعال (نجم و فليح، 2013). و وفقا لـ Krieg *et al.* (2010). فإن تصنيف هذه البكتريا كالاتي :

Kingdom : Protista

Phylum : Proteobacteria

Class : Gammaproteobacteria

Order : Pseudomonadales

Family : Pseudomonadaceae

Genus : *Pseudomonas*

Species : *aeruginosa*

2.2. بكتريا *Staphylococcus aureus*

تتنتمي بكتريا *Staphylococcus aureus* إلى العائلة *Staphylococcaceae* و التي تضم عدداً من الأجناس الاخرى مثل *Nosocomiicoccus* ، *Macrococcus* ، *Jeotgalicoccus* و *Gemella* ، و *Salinicoccus* و يضم نوع *Staphylococcus* وحده 47 نوعا Species موصوفا و 21 تحت النوع subspecies قد تم تشخيصها (PHE, 2014). لوحظت هذه البكتريا لأول مرة من قبل الجراح البريطاني (الاسكتلندي) السير الكسندر اوغستون Alexander Ogston عام 1880 م عبر فحصه لـ 88 عينة قيح لخراج بشري تحت المجهر ليلاحظ وجود مكورات صغيرة موجبة لصبغة غرام اطلق عليها اسم *Staphylococcus* و التي تعني بالاغريقية عناقيد العنب "Bunches of grapes" (Myles & Datta, 2012). و بكتريا الـ *S. aureus* هي بكتريا موجبة لصبغة غرام Gram

Positive bacteria افرادها ذات شكل كروي تنقسم بشكل متتالي لتكون مستعمرات تشبه العناقيد Grape-like clusters ، يتراوح قطرها من 0.5 – 1.5 مايكرون ، غير متحركة غير منتجة للسبورات ، اختيارية التنفس اللاهوائي Facultative anaerobes، تظهر بلون ذهبي براق عند تنميتها على البيئة الصلبة و من هنا انت التسمية aureus و التي تعني ذهبي بالغة الرومانية القديمة (Richards *et al.*, 2002). تتميز بقدرتها على مقاومة درجات الملوحة العالية و تعيش بمدى حراري من 6.5- 44 درجة مئوية اما سمومها فهي تنتج بدرجة 14- 38 مئوي وتبقى مستقرة حتى عند 100 مئوي ، موجبة لإختبار اللاكتيز lactase و سالبا للاوكسيديز oxidase كما يمكنها البقاء في الاغذية المجمدة و المجففة لعدة اسابيع و اشهر (Morandi *et al.*, 2009). يمكن ان تتواجد هذه البكتريا بشكل مفرد او بشكل ازواج او في سلاسل من الكريات تميل لتكوين تجمعات كبيرة (Haddadin *et al.*, 2002). تعدّ بكتريا *S. aureus* بكتريا تكافلية تتواجد على اجسام 30% من البشر، و لكن يمكن أن تتحول إلى بكتريا مرضية على الجلد و الجروح و الانسجة الداخلية ، كما أنها يمكن أن تكون اكثر تهديدا للحياة مسببة عددا من الاصابات الجهازية كالالتهاب الرئوي Pneumonitis ، التهاب شغاف القلب Endocarditis و تعفن الدم (تسمم الدم) Septicaemia، و اخماج القناة البولية Urinary tract infection (UTI) كما ان هذه البكتريا احد اكبر الاسباب الاكثر شيوعا للعدوى في المستشفيات حول العالم و زيادة المقاومة للمضادات الحيوية و خاصة الميثيسيلين Methicillin و التي أصبحت تعرف بـ (MRSA) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* و التي هي تعدّ العامل الرئيسي للعدوى في المستشفيات و المجتمعات المحلية و لتصبح مشكلة مرضية رئيسية على مستوى العالم في السنوات الاخيرة (Stark , 2013).

و تعدّ هذه البكتريا أحد مسببات التهاب الثدي البقري bovine mastitis مسببة بذلك خسائر اقتصادية كبيرة بسبب انخفاض كمية الحليب المنتج و سوء جودته، فضلا عن انتاجها لعدد من السموم المعوية enterotoxins و التي أحد أهم أسباب التسمم الغذائي عالميا (Wang *et al.*, 2016). كما أنها مقاومة لمضادات الارثرومايسين Erythromycin و البنسلين Penicillin و التتراسايكلين Tetracycline و على الرغم من تكرار المحاولات لتحويل هذه المضادات الحيوية أو انتاج انواع جديدة منها يمكنها القضاء على المكورات العنقودية إلا أن هذه المحاولات بقيت محدودة النتائج و لمُدّد مؤقتة (الياصري و اخرون ، 2007).

إن السبب الرئيس لمقاومة *S. aureus* للمضادات الحيوية و لا سيما فئة البيتا لاكتام B-lactam يعود الى قدرتها على انتاج انزيم البيتا لاكتاميز B-lactamase كذلك امتلاكها للجين MecA يزيد من مقاومتها الداخلية اذ يعمل على تقليل كمية البروتين الرابط للبنسلين penicillin binding protein و هذا الاخير قليل الالفة للارتباط بمضادات البيتا لاكتام (الدوري، 2016). تنتج هذه البكتريا عدد من المركبات الكيميائية كعوامل ضراوة، فهي تنتج انزيم الهيمولاسين Hemolysins و الذي يعمل مع السموم الخلوية على تحلل كريات الدم الحمر و الصفائح الدموية Lysing erythrocytes و الذي يزيد من تفاقم الاصابة ، كما ينتج سموم (PVL) Panton Valentine leucocidin و التي تقوم بتحطيم الاغشية الخلوية لكريات الدم البيض و تحديدا الخلايا المتعادلة Neutrophil و الذي يؤدي الى تفاقم الالتهاب الرئوي في حالة التهاب الرئة التخري Necrotizing pneumonia ، فضلا عن قدرتها على الاستفادة من بروتين Fibronectin المرتبط نوع أ Fibronectin-binding protein الذي يساعد البكتريا على الالتصاق و الاستمرار داخل خلايا المضيف (Monteiro *et al.*, 2019). كما تنتج عددا من السموم الخارجية Exotoxins و الانزيمات كالانزيم الحال للنواة Nucleases ، الانزيم الحال للبروتين Protease ، الانزيم الحال للكولاجين Collagenase ، الانزيم الحال للهايالورينين Hyaluronidase و والانزيم الحال لليسيئين Lecithinase و الستافلوكاينيز Staphylokinase و التي وظيفتها تحويل انسجة المضيف و مكوناتها الى مغذيات ضرورية لنمو و استمرار البكتريا، كما تنتج ايضا ما يعرف بـ Toxic shock syndrome toxin-1 مع السموم التقشيرية Exfoliative toxins مكونة ما يعرف بـ Pyrogenic toxin superantigens (Bien *et al.*, 2011).

و تسهم انزيمات تحلل الليسيئين Lecithinase و وتحلل اللبد Lipase في امراضية البكتريا بسبب دورها في ايض الدهون، إذ إن التحلل المائي لـ Lecithinase يؤدي الى ارتباط الكليسرول مع الفوسفات الموجودة في الليثيسين و الذي هو احد مكونات الغشاء الخلوي لخلايا المضيف مما يسبب تحلل الخلايا، و ينتج الـ Lipase بشكل برولايبيز Prolipase الذي يحمي البروتين من التحلل و يعمل كمركب يسهل عملية نقل اللايبيز، و هو مسؤول عن اطلاق كمية ملائمة من الاحماض الدهنية تساعد البكتريا على البقاء في الدهون الموجودة في جلد اللبائن (El-baz *et al.*, 2016). ووفقا لـ Krieg (2010) فإن بكتريا المكورات العنقودية تصنف كالاتي

Kingdom: Protista

Phylum: Firmicuts

Class: Bacilli

Order: Bacillales

Family: Staphylococcaceae

Genus: *Staphylococcus*

Species: *aureus*

3.2. المستخلصات النباتية Plant extracts

تشكل النباتات مصدرا مهما لكثير من المضادات الميكروبية الطبيعية و ان استخدام النباتات الطبية كمضادات حيوية ضد مختلف انواع العدوى كان قد سبق استخدام الادوية و العقاقير لمدته طويلة (Akinyemi *et al.*, 2006). و تعدّ النباتات مصدراً طبيعياً و آمناً لكثير من المنتجات القيمة من الناحية الطبية و التي تستعمل لعلاج العديد من الأمراض و وفقا لمنظمة الصحة العالمية World health organization ان ما يقارب الـ 80% من سكان العالم لا يزالون يعتمدون على الاعشاب الطبية كمصدر اساسي للعلاج (Abdallah *et al.*, 2013). و إن العديد من النباتات التي شخّصت كنباتات ذات خصائص طبية في الماضي، أظهرت الدراسات الحديثة أنها تمتلك القدرة على انتاج مركبات كيميائية ذات خصائص علاجية أو مضادات مايكروبية يقوم النبات بإنتاجها كمركبات أيضية ثانوية، و منها الكلايكوسيدات Glycosides، الصابونيات Saponins، الفلافونويدات Flavonoids، سترويدات Steroids و القلويدات Alkaloids (Sen & Batra, 2012). إن الاستعمال المتكرر للمضادات الحيوية أدى إلى ظهور سلالات من مسببات العدوى المقاومة لهذه المضادات، مما شجع الباحثين للبحث عن بدائل آمنة و فعالة في النواتج الطبيعية للنباتات المختلفة (Lewis, & Ausubel , 2006). فقد استخدم (Manandhar *et al.*, 2019)، المستخلص الكحولي لكل من نبات الحميض الاصفر *Oxalis corniculata* و الشيح *Artemisia vulgaris* و الساذج الهندي *Cinnamomum tamala* ضد كل من بكتريا القولون *Escherichia coli*، و بكتريا *Salmonella typhi* و بكتريا *Klebsiella*

pneumoniae على وسط الاكار المغذي، و بينت نتائج الدراسة ان نبات الحميض الاصفر كان ذو فعالية ممتازة ضد كل من الاجناس المذكورة اعلاه، فيما اظهرت المستخلصات الاخرى قدرة تثبيطية لا بأس بها لكن بدرجة اقل من الحميض الاصفر. كما تم استعمال عدد من المستخلصات النباتية ضد كل من *S. aureus* ، *P. aeruginosa* و *E. coli* بشكل تآزري مع عدد من المضادات الحيوية التقليدية، و اظهرت النتائج قدرة تثبيطية عالية على العينات الحاوية على المضادات الحيوية و المستخلصات النباتية، مقارنة مع استعمال المضادات الحيوية بشكل منفرد او المستخلصات النباتية لوحدها (Jouda , 2016).

1.3.2. نبات الكركم *Curcumin longa*

وفرت النباتات و منذ فجر الحضارة مصدراً مهماً للعديد من العقاقير و الادوية، فضلا عن دورها المباشر في مكافحة العديد من الامراض، و اشارت الدراسات و المراجع الا ان نبات الكركم *turmeric* احد هذه النباتات التي استعملت على نطاق واسع في النشاطات الطبية و العلاجات (Nasri et al., 2014). يعود نبات الكركم *C. longa* والذي هو نبات عشبي معمر الى عائلة الزنجبيليات *Zingiberaceae* و يستوطن النبات مناطق شرق اسيا و تحديدا الهند و الصين ، و يستعمل الساق الذي ينتج كمسحوق اصفر اللون في المجال الطبي (Labban, 2014). يعود اكتشاف نبات الكركم الى قرنين من الزمن، عندما ذكر كل من Vogel و Pelletier في تقريرهما انهما قاما بعزل مادة صفراء من سيقان نبات *Curcuma longa* و اطلق عليها اسم الكركمين *curcumin* ، لاحقا تبين أن هذه المادة هي خليط من الراتنج *resin* و زيت الكركم *turmeric oil* (Gupta et al., 2012). يستعمل نبات الكركم ايضا كبهار او تابل وكمادة حافظة و مادة ملونة للاغذية في الهند والصين وجنوب شرق آسيا و يستخدم في الطب التقليدي كعلاج منزلي للعديد من الاضطرابات الصحية بضمنها الاضطراب الصفراوي والسعال وداء البول السكري والاضطراب الكبدي والروماتيزم والجيوب الانفية (Hussain et al., 2012). و نبات الكركم نبات عشبي معمر قصير الساق، يصل ارتفاعه الى متر واحد تقريبا، السيقان من النوع الرايزومي تكون مستطيلة او بيضاوية او ذات شكل كمثري *pyriform* ذات تفرعات قصيرة ، يطلق عليه في الهند اسم *Haldi* و يستخدم في النيبال كعلاج منزلي، كما يستعمل بشكل مسحوق اصفر كتوابل و نكهات للطعام النباتي و غير النباتي نتيجة لفوائده الهضمية (Leon & Araujo, 2001).

يحتوي مستخلص نبات الكركم على مركبات سيسكويتربين Sesquiterpene الناتج من تكسر جزيئة التربين و مركبات البولي فينول Polyphenols و المسماة بالـ Curcuminoids، كما يحتوي على مشتقات حامض الفيوليك Feulic acid المسؤول عن اغلب الفعالية العلاجية الطبية لنبات الكركم، كما ان مضادات الاكسدة من المحتمل ان تسهم في تثبيط نمو الاورام و تطورها فضلا عن عملها كمضاد للتصلب العصبي Antisclerotic كما اشارت العديد من الدراسات الى فعاليته المضادة للحياة المجهرية (Czernicka et al., 2019).

و يحتوي المستخلص المائي لهذا النبات على مركب الكركمين curcumin و بنسبه 5% و الذي هو مركب فينولي مسؤول عن خواص المضادة للاكسدة و هو الذي يعطي اللون الاصفر لنبات C. longa، كما تحتوي الجذور الطازجة لهذا النبات على كميات لا بأس بها من فيتامين سي vitamin-C، كما يحتوي النبات على مركبات التيوميرون Tumerone و الزنجبارين Zingiberene، السينيول Cineole و السابنين Sabinene و اغلب هذه المركبات تكون موجودة في الزيوت الطيارة و التي تشكل 7% من الوزن الجاف للنبات (Panpatil et al., 2013). و منذ التعرف على مركب الكركمين curcumin و هو يدخل انشطة و مجالات دوائية عدة، فهو يستعمل عند خلطه مع عقاقير و مركبات كيميائية اخرى كمضاد للاكسدة و مضاد للالتهابات و السرطانات و مضادات للتقرحات و مضاد للحياة المجهرية الممرضة، فضلاً عن أن مركب الكركمين هو آمن من الناحية السمية حتى عند الجرعات أفعالة فقد أشارت الاحصائيات الى انه امن عند استهلاك 8 غرام منه يوميا و لمدة 3 اشهر متتالية من قبل اشخاص أصحاء كما أنه كان آمنا و أظهرت قدرة علاجية عند استعماله بجرعة 8 غرام يوميا مع مركب Gemcitabine المستخدم لعلاج سرطان البنكرياس (Teow et al., 2016). إن فعالية الكركمين المضادة للحياة المجهرية تظهر على صعيدين مختلفين، فهو يمكن استخدامه لوقاية الجروح و علاجها من البكتريا الممرضة الملوثة لها، و ايضا يمكن استعماله كمادة وقائية للاغذية المحفوظة ضد الممرضات المختلفة، و قد تم تقييمه لدى لجنة الخبراء لمنظمة الدواء و الغذاء FDA و منظمة الصحة العالمية WHO كمضاف غذائي طبيعي مستخرج من النبات و هو يمكن تصنيعه كيميائيا و لكن عند تصنيعه كيميائيا لا يمكن اضافته للغذاء (Altunatmaz et al., 2016).

إن الاستعمال الواسع للمضادات البكتيرية و غير المنتظم ادى الى ظهور السلالات المقاومة ففي عام 2017 نشرت منظمة الصحة العالمية 12 سلالة بكتيرية بحاجة الى عقاقير مضادة جديدة من ضمنها سلالات لبكتريا Staphylococcus، Streptococcus، Helicobacter و Pseudomonas

التي اظهرت التجارب فيما بعد ان هذه السلالات جميعا يمكن تثبيط نموها بواسطة المضادات الحيوية المعروفة بشكل تآزري مع الكركمين ، قد يرجح ان فعالية الكركمين تأتي من قدرته على تقييد الانزيمات المنتجة من قبل البكتريا مما يمنعها من تكسير المركبات المضادة (Brüning *et al.*, 2019). كما و قد تم اختبار فعالية المستخلصات الكحولية لاجزاء مختلفة من نبات *C. longa* و تحديدا مركب الكركمين ضد الاحياء المجهرية بشكل عام و البكتريا بشكل خاص، فقد اختبرت فعاليته و بتركيز 250 و 2500 و 25 مايكروغرام لكل قرص من اقراص الاختبار ضد عزلات مختلفة من بكتريا *Staphylococcus aureus* و قد اظهرت النتائج فعالية الاجزاء النباتية المختلفة في تثبيط نمو البكتريا و بواقع 9- 21 ملم و نسبة 63-73% من العزلات التي تم اختبارها (Gupta *et al.*, 2015). كما استعمل *Iranshahi et al.* (2009) الكركمين كمادة مضادة لبكتريا *S. aureus* و تمت اضافتها بطريقة *disk diffusion method* مقارنة مع المضادات الحيوية *cefixime* و *cefotaxime* و *vancomycin* و *nalidixic acid* و قد بينت النتائج زيادة الفعالية التثبيطية للمضاد *cefixime* و التي تم قياسها عبر حساب منطقة التثبيط *inhibition zone* و بنسبة 52.6 % اعلى مما لو كان المضاد لوحده، كما اتت النتائج بزيادة بنسبة 24.9 و 26.5 % لكل من *cefotaxime* و *vancomycin*. و في دراسة اخرى اجريت على 60 عزلة مختلفة للبكتريا المرضية كالـ *Klebsiella pneumoniae* و *S. aureus* و *Pseudomonas aeruginosa* و *Enterococcus faecalis* لإختبار حساسيتها لعدد من المضادات الحيوية مثل الاميكاسين *amikacin* و الإميبينيم *Imipenem* و الجنتاميسين *Gentamycin* بوجود الكركمين و اظهرت النتائج ان اقل تركيز مثبط للكركمين ضد البكتريا الموجبة لصبغة غرام كان بواقع 126.9 ملغم / ملتر و في حين كان 117.4 ملغم / ملتر للبكتريا السالبة لصبغة غرام، كما ارتفعت حساسية البكتريا لمضادي *Amikacin* و *Imipenem* بوجود الكركمين الى الضعف مما كانت عليه فيما ارتفعت قدرة *Gentamycin* الى ستة اضعاف مما كانت عليه (Kali *et al.*, 2016). كما ان استعمال الكركمين على المستوى النانوي اظهر قدرات فائقة في القضاء على البكتريا المرضية، فقد استعملت جسيمات الفضة النانوية للكركمين *curcumin-silver nanoparticles* ضد كل من *S. aureus* و *P. aeruginosa* مقارنة بالكركمين الحر و كان مستوى التثبيط عالي جدا ضد بكتريا *S. aureus* بنسبة 97% في لم يتجاوز التثبيط الـ 59% بالنسبة لبكتريا *P. aeruginosa* ، ان انتاج عوامل الضراوة كالبايوسيانين *pyocyanin* يمكن ان يتم حجه او التقليل منه، كما ان انظمة التحسس الاساسية و بالخاص *acyl-homoserine lactone* يمكن ان تكون قد تآثرت بفعل الكركمين (Brüning *et al.*, 2019).

4.2. الجسيمات النانوية Nanoparticles

تشير عبارة نانو و التي هي بالاصل اخذت من عبارة اليونانية nanos و التي تعني قزم dwarf اي صغير جدا و وحدة قياس النانومتر هي تشير الى جزء واحد من المليار من المتر اي كل 1 نانومتر = 10^{-9} متر او جزء من المليون من المليمتر اي 1 نانومتر = 10^{-6} متر (سهام، 2019). و تعرف الجسيمات النانوية Nanoparticles بأنها جسيمات دقيقة ذات بعد واحد على الاقل يتراوح حجمه من 1- 100 نانومتر (Christian *et al.*, 2008). كما تعرف الجسيمات النانوية ايضا على انها ركام جزئي او ركام ذري atomic or molecular aggregates ذات ابعاد صغيرة تتراوح بين 1- 100 نانومتر، تمتلك عدد من الخصائص الفريدة تتضمن المساحة السطحية العالية و الطاقة السطحية العالية و التقييد الكمي العالي quantum confinement (Olchowik *et al.*, 2017). و علم تقنية النانو Nanotechnology هو حقل حديث يلعب دورا محوريا يوما بعد يوم في شتى المجالات و يمكن تعريفه على انه العلم الذي يتعامل مع انتاج الوحدات و المواد التي تتراوح احجامها ضمن وحدات النانومتر و معالجتها، و هذه الجسيمات ذات البعد الواحد الذي يتراوح حجمه من 1- 100 نانومتر يمكن استثمارها في مجال الطب و الكيمياء و الفيزياء الذرية و الى اخره من الحقول المعرفية (Shanmugam & Heera , 2015). و تمتلك الجسيمات النانوية خصائص فريدة في التحفيز الالكتروني و المغناطيسي و الكيميائي و كما تتميز بالاستقرار العالي و قلة التفاعلية و تمتلك التوافقية الحيوي كما تفتقر الى السمية نسبيا و تكون بأشكال متعددة و هذا ما يجعلها واسعة التطبيق في شتى مجالات الطب الحيوي كالتشخيص و علاج السرطانات و الامراض الاخرى و صناعة العقاقير و التوصيل الجيني gene delivery ، كما تمتلك بعض الجسيمات النانوية لفلزات خصائص مضادة للفيروسات و البكتريا و الفطريات و بعض الاورام (Vetchinkina *et al.*, 2018).

1.4.2 بناء الجسيمات النانوية Nanoparticle Synthesis Methods

يتم بناء المواد النانوية باليتين رئيسيتين هما من الأعلى إلى الاسفل top-down و من الاسفل الى الاعلى Bottom-up :

• من الاسفل الى الاعلى Bottom-up: معظم التفاعلات التي تحدث هي تفاعلات اكسدة و اختزال و تتضمن تصغير مكونات المادة حتى المستوى الذري، مع المزيد من التجميع الذاتي مما يؤدي الى التراكيب النانوية، و تعمل القوى الفيزيائية على دمج الوحدات الاساسية ضمن هياكل مستقرة اكثر. و تعتبر هذه الطريقة هي الافضل بسبب السيطرة التامة على احجام الجسيمات النانوية و قلة الفضلات الناتجة منها (Rajeswari & Kalpana , 2018).

• من الاعلى للأسفل up-down: و هي الأعلى كلفة و تشمل استخدام مركبات كبيرة نسبيا و التي يمكن السيطرة عليها خارجيا في بناء التراكيب النانوية اي انها تعتمد على تجزئة المواد الصلبة الكبيرة الى قطع اصغر فأصغر بإستخدام قوة فيزيائية كبيرة هذه الطريقة تستلزم الكثير من الطاقة و لا يمكن الحصول من خلالها على اسطح مثالية للجسيمات النانوية بسبب القوى الفيزيائية المستخدمة في تحضيرها (Soni et al., 2018 : Nadaroğlu et al., 2017).

و بشكل عام هنالك ثلاث طرائق أساسية لبناء الجسيمات النانوية :

الطريقة الكيميائية Chemical approach : مثل طرائق الغرويات (Colloids) و طريقة الهلام السائل (Sol-gel) و الشرائح (L-B films) . و تتميز هذه الطرائق بما يأتي :

- تحتاج الى تقنيات بسيطة .

- غير مكلفة إذ أنها تحتاج الى أجهزة أقل مقارنة بالطرائق الفيزيائية .

- تتطلب درجات حرارية واطئة لتصنيعها .

- تكون كميات المواد النانوية المصنعة بهذه الطرائق كبيرة .

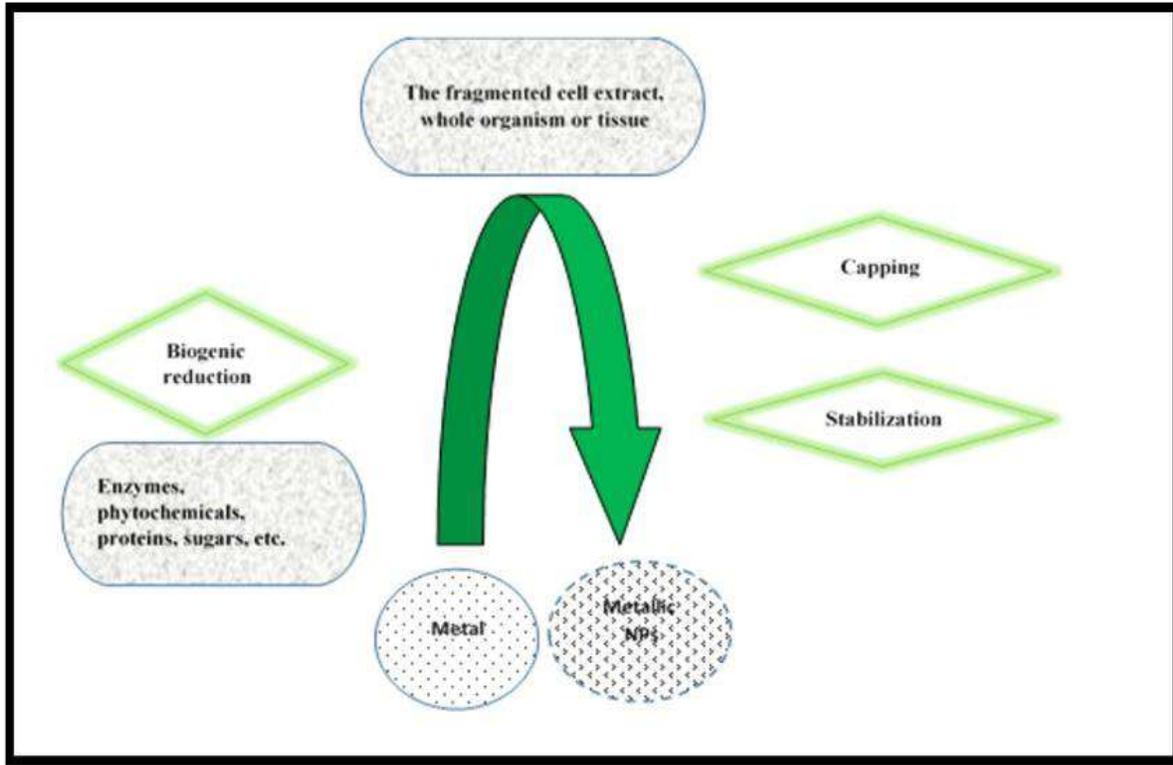
- يمكن تصنيع المواد النانوية بأحجام و أشكال مختلفة .

- تعد طرائق أمينة .

• **الطريقة الفيزيائية Physical approach** : و تتم هذه الطريقة عادة بألية up-down و التي يتم فيها تقليص المادة الى الحالة النانوية بأليات فيزيائية كال موجات الصوتية ultra-sonication ، الاشعاع بالموجات الصغرى microwave irradiation و الطريقة الالكتروكيميائية electrochemical method ، في هذه الطريقة يمكن استخدام انبوب التسخين عند وزن

البارومتري لدمج الجسيمات النانوية بواسطة تكثيف التبخير، و يتم تبخير العنصر المصدر للمادة النانوية داخل عوامة و الحرارة تقوم بتبخيره إلى غاز محمول، و هذه الطريقة تستخدم في بناء الجسيمات النانوية للذهب و الفضة و الرصاص و الكاديوم و كثير من الفلزات الاخرى (Gour & jain, 2019).

- **الطريقة الحيوية Biological approach :** إن من عيوب الطريقتين الكيميائية و الفيزيائية أنهما مكلفتان نسبيا، فضلا ان الطريقة الكيميائية تشتمل على استعمال عناصر و مركبات قد تكون ذات اثر سام و خطر على الباحثين، كما ان بعض المخاطر تتعدى خطورتها البيئة و الاحياء التي تعيش فيها، كما بعض الاليات الفيزيائية و الكيميائية تؤدي الى انتاج جسيمات نانوية لا تلائم الشكل و الحجم و النقاوة المطلوبة و لا يمكن التحكم بها، لذا فإن من الضروري البحث عن طريقة اكثر امانا و دقة و اقل كلفة (Gudikandula & Maringanti , 2016). إن الطريقة الحيوية او ما تعرف بالطريقة الخضراء Green method تتضمن الحصول على مواد اكثر تجانسا مع عيوب اقل، و فيها يمكن ان يتم بناء الجسيمات النانوية عن طريق كائن مجهري كالبكتريا او فطر أو طحلب أو أحد النباتات أو مستخلص نباتي ، ان عدد من الخصائص للكائن الحي كالمسارات الكيموحيوية، الفعاليات الانزيمية، مراحل نمو الخلية و التفاعلات المثالية هي الاعتبارات التي تحدد اختيار الكائن أو مستخلصه لبناء الجسيمات النانوية (Hussain *et al.*, 2016). في هذه الطريقة يتم انتاج الجسيمات النانوية ضمن الوظائف الطبيعية للكائن، و لأن البكتريا سريعة التطور و النمو و واطئة الكلفة و من السهل السيطرة على بيئتها، لذلك تُعدّ هي الكائن الاكثر استخداما في بناء الجسيمات النانوية، كما أن بعض الاجناس البكتيرية لها القدرة على حجب السمية لبعض الفلزات و المعادن الثقيلة ، كما أن بناء المواد النانوية يمكن ان يكون داخل خلوي او خارج خلوي مع الانزيمات من خلال استخدام مزارع لكائنات حقيقية النواة سهلة الزرع و بسيطة الكتلة الحيوية كالعفن و الاعفان. إن عوامل كالحضن و محلول الايون المعدني يؤثر في حجم الجسيمات النانوية المنتجة (Nadaroğlu *et al.*, 2017). و يمكن ملاحظة عملية البناء الحيوي في الشكل رقم (1-2).



شكل(1-2): عملية البناء الحيوي للجسيمات النانوية (Nadaroğlu *et al.*, 2017)

2.4.2. أهمية استخدام الدقائق النانوية في تقنية إيصال الدواء :

إن استخدام الدقائق النانوية في تقنية إيصال الدواء الى الهدف المحدد في الجسم يحقق الفوائد الآتية :

1. يمكن التحكم في حجم الدقائق النانوية و خصائصها السطحية بسهولة لغرض الحصول على إيصال فعال للدواء الى الهدف .
2. زيادة الكفاءة العلاجية وتقليل الآثار الجانبية .
3. السيطرة على تحرر الدواء (Controlled release) .
4. إمكانية إيصال الدواء الى الموقع الخاص بالهدف (Site-specific targeting) .

5. إمكانية استخدام النظام بطرائق تجريع مختلفة تشتمل على التجريع الفموي (Oral) والأنفي (Nasal) والتجريع بواسطة الحقن Parenteral و داخل العين intra - ocular و غيرها (Mohanraj & Chen , 2006) .

3.4.2 جسيمات السيلينيوم النانوية (SeNPs) Selenium nanoparticles

يتواجد عنصر السيلينيوم Se بشكل طبيعي في جسم الانسان و تقاس كميته بوحدة مايكروغرام/لتر، و تختلف نسبته من شخص لأخر باختلاف المنطقة الجغرافية و العمر و الجنس و الحالة الصحية العامة ، و يتم طرح كميات كبيرة من السيلينيوم الى خارج الجسم عبر جهاز الاخراج مع الادرار (Adam-Dima *et al.*, 2018). يؤدي عنصر السيلينيوم دوراً مهماً عبر تحسين عمل الانزيمات مثل Glutathione peroxidase و الذي يعمل على منع و تقليل الامراض التي تؤثر في النظام المناعي، اما على الصعيد الكيميائي و الفيزيائي فإن عنصر السيلينيوم الذي يعد من شبه الموصلات يمتلك خصائص بصرية و وظائف كيميائية عديدة (Rajan *et al.*, 2019). يجذب السيلينيوم النانوي اهتمام الباحثين بشكل اكبر مقارنة بغيره من المعادن، و ذلك لسميته القليلة مقارنة بالجسيمات النانوية العضوية و غير العضوية اذ ان الجسيمات النانوية اللاعضوية تكون اكثر سمية من العضوية و يمتلك السيلينيوم النانوي خصائص حيوية مهمة فهو يتميز بصغر حجمه مما يسهل امتصاصه من قبل الخلايا كما انه يمكن استخدامه في حالة عدم التأكسد Se^0 و هذا اقل سمية مقارنة بحالات الاكسدة الاخرى (Se^{+IV} , Se^{+VI}) ، و على الرغم من انه غير مستقر و يمكن ان يصبح غير فعال بسرعة لكن معالجة هذه المشكلة عبر تغليفه بمادة يعبر عنها بالناقلة النانوية nano-vehicles مثل مركب الكيتوسان Chitosan (CS) (Hosnedlova *et al.*, 2018). يعد السيلينيوم النانوي خياراً جيداً لإستعماله كمضاد للنمو المايكروبي و ذلك لخصائصه المظهيرية و الكيميائية الفريدة ، فقد تم استعماله كمادة حافظة عبر طلاء العلب المعدنية المستعملة لحفظ الاغذية به، كما اختبرت فعاليتها ضد العديد من الاحياء المجهرية الممرضة و الملوثة للانسان و غذائه كفطريات الجلد *Trichophyton rubrum* و *Candida albicans* و عدد من الاجناس البكتيرية الممرضة مثل *Pseudomonas aeruginosa* و *Proteus mirabilis* في مساعي حديثة لحل مشكلة مقاومة المضادات الحيوية (Rajan *et al.*, 2019).

ففي دراسة اجريت لإختبار تأثير السليينيوم النانوي على نمو البكتريا المرضية ، وجد أن قدرة السليينيوم النانوي على تثبيط نمو بكتريا *E. coli* قد وصلت الى 46% مقارنة ببكتريا *S. aureus* و التي ثبت نموها بنسبة 63% بعد مرور 24 ساعة فقط، كما أن بعض الافراد البكتيرية طورت اغلفة جديدة تسمح بمرور المغذيات الاساسية فقط الى داخل الخلية و طرح العناصر غير المرغوب فيها الى الخارج نتيجة لتعرضها للسليينيوم النانوي، إذ تبين أنه يرتبط بغلاف الخلية بواسطة الية الامتزاز الكيميائي Chemisorption ليخترق الخلايا عن طريق Lipopolysaccharides و عبر التغيير في تركيب الانزيمات الثلاث Lipoprotein signal و Preprolipoprotein diacylglycerol transferase و Apolipoprotein N-acyltransferase و التي تعمل دوراً محورياً في الحفاظ على حياة الخلية، بالنسبة لبكتريا *S. aureus* فالمسألة تكون أسهل ؛ لعدم وجود lipopolysaccharide في الغلاف الخارجي للبكتريا الموجبة لصبغة غرام (guisbiers et al., 2016). كما اظهر الـ SeNPs قدرة عالية في تثبيط نمو بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* و تكوينها للـ biofilm فقد بين Prateeksha et al., (2017) أن أقل تركيز مثبط له كان عند 15 مايكروغرام/مل ، كما ان تكوين الـ biofilm قد تراجع بواقع 90% بعد مرور 24 ساعة فقط من اضافة 4.5 مايكروغرام / من SeNPs، كما ان المستعمرات القليل المتكونة لوحظ انها متفككة و قليلة الكثافة مقارنة بعينة السيطرة بعد فحصها تحت المجهر كما أن الفحص المجهرى اظهر عدم تأثر الخلايا الرئوية البطانية المصابة بهذه البكتريا بعد معالجتها بـ SeNPs .

4.4.2 جسيمات أكسيد الزنك النانوية (ZnO-NPs) ZnO nanoparticles

يعدّ الزنك أحد العناصر الفلزية الضرورية للإنسان، فبدونه تصبح العديد من الانزيمات كالـ Carboxypeptidase و Alcohol dehydrogenase غير فعالة، كما أنه يعدّ أقل سمية مقارنة بفلزي الكاديوم و الزئبق الذين ينتميان لنفس الفئة كما يعد اساسي لكثير من الوظائف الخلوية لخلايا حقيقية النواة (Siddiqi et al., 2018). يعدّ اوكسيد الزنك النانوي ZnO-NPs عامل مضاد لكثير من الاحياء المجهرية الممرضة و المفسدة للاغذية، و يتميز ZnO-NPs بتطبيقاته الواسعة كعامل مضاد للميكروبات مقارنة بالجسيمات النانوية للفلزات الاخرى، فهو يتميز بأنه فعاليته المضادة تتم عن طريق الية الاجهاد التأكسدي Oxidative stress نتيجة لتكوينه انواع من الاوكسجين التفاعلي و تعطيل

الاجشية الخلوية نتيجة لتراكم ZnO-NPs (Souza et al., 2019). و لاوكسيد الزنك النانوي القدرة على تثبيط نمو البكتريا السالبة و الموجبة لصبغة غرام على حد سواء و حتى السبورات التي تتحمل درجات الحرارة و الضغط العالي، علاوة على ذلك فهي انتقائية السمية على البكتريا و لاتظهر سوى قدر ضئيل من السمية على خلايا الانسان، و هذا ما ادى إلى تفضيلها في الصناعات الغذائية خاصة مع تزايد الحاجة لإيجاد حلول أقل ضررا و كلفة في مقاومة الملوثات الغذائية و البيئية و المسببات المرضية (Ugaili et al., 2014).

لإختبار مدى فعالية ZnO-NPs ضد البكتريا المرضية فقد قام Lee et al., (2014) بدراسة تأثيره على نمو بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* و عوامل الضراوة الخاصة بها و تكوين المستعمرات، و قد بينت النتائج قدرة الاوكسيد النانوي على تثبيط انتاج مركب Pyocyanin من قبل البكتريا كما انخفض انتاج انزيم Hemolysin المحلل لكريات الدم الحمر فضلا عن ان المنتج منه قد انخفضت فعاليته في تكسير كريات الدم كما بينت النتائج انخفاض بناء المستعمرات و بنسبة 95% بفعل وجود المركب النانوي . وكما بين Souza et al., (2019) في دراسته لتأثير الزنك النانوي على انواع مختلفة من البكتريا السالبة و الموجبة لصبغة غرام ك *Bacillus cereus* و *P. aeruginosa* و *Salmonella typhimurium* و *S. aureus* بإستخدام طريق Disc diffusion methods، ان اقل تركيز مثبت كان 2.5 ملغم/ مل لكل من بكتريا *S. aureus* و *Salmonella typhimurium* في حين ان اقل تركيز مثبت لبكتريا *P. aeruginosa* كان 1 ملغم / مل، في حين لم يكن لأوكسيد الزنك النانوي اي تأثير يذكر في بكتريا *Bacillus cereus* . على الرغم من ان الجسيمات النانوية تمتلك القدرة على تثبيط نمو اجناس مختلفة من البكتريا و التقليل من اثر عوامل الضراوة الخاصة بها، الا انها تختلف في قدرتها من فئة لأخرى و من جنس لأخر، فمثلا اختلاف تركيب الجدار الخلوي بين البكتريا السالبة و الموجبة لصبغة غرام يؤدي احيانا الى قدرة بعض الاجناس على مقاومة العوامل النانوية و التكيف مع التغيرات الناتجة عنها، كما ان السلالات المعدنية التي تنتج منها الجسيمات النانوية يمكن ان تؤثر ايضا في السلوك الكيميائي للمركب النانوي ضد الكائن المجهرى (Sharma et al., 2016).

5.2. الأجهزة و التقنيات المستخدمة في تشخيص المواد النانوية :

يمكن الحصول على المواد النانوية بتراكيب مختلفة فقد تكون محاليل غروية أو مساحيق جافة أو شرائح رقيقة لذا فان تنوع تراكيب هذه المواد يستلزم توفر تقنيات مختلفة لغرض تشخيصها . و عموماً فان أهم التقنيات المستخدمة في هذا المجال هي (Kulkarni , 2009) :

A. المجاهر (Microscopes) :

مثل المجهر الضوئي (Optical Microscope) و المجهر الإلكتروني الماسح (Scanning Electron Microscope , SEM) و المجهر الإلكتروني النافذ (Transmission Electron Microscope , TEM) و مجهر القوة الذرية (Atomic Force Microscope , AFM) و غيرها , وتفيد المجاهر في تحديد شكل و حجم و تركيب المادة و عند الاستعانة ببعض التقنيات الأخرى فان المجاهر يمكن أن تقدم معلومات قيمة عن الخصائص الضوئية (Optical) و المغناطيسية (Magnetic) و الخواص الأخرى للمواد النانوية .

B. تقنيات الحيود للأشعة السينية (X ray diffraction techniques) :

مثل جهاز حيود الأشعة السينية (XRD , X-ray Diffraction) و حيود الإلكترون (Electron Diffraction) و حيود النيوترون (Neutron Diffraction) وغيرها . تستخدم تقنيات الحيود في تحديد حجم الدققة النانوية فضلاً عن تحديد تركيبها .

C. الأجهزة الطيفية (Spectroscopies) :

مثل جهاز مطيافية الأشعة تحت الحمراء FT-IR و مطيافية الامتصاص الذري و مطيافية الرنين النووي المغناطيسي و مقياس الأشعة فوق البنفسجية المرئية (Uv-visible spectroscopy) وغيرها , وتفيد الأجهزة الطيفية في تحديد الحالة الكيميائية و التركيب الإلكتروني للمادة النانوية فضلاً عن خواص المادة الأخرى .

6.2. تحرر الدواء من الحوامل النانوية :

استخدمت الدقائق النانوية كحوامل للأدوية (Drug carriers) . لتطوير نظام جسيمات نانوية ناجح ، يعد كل من نسبة تحرر الدواء (Drug release) والتحلل الحيوي للبوليمر (Polymer biodegradation) من العوامل المهمة الواجب اخذها في الاعتبار. وبشكل عام ، يعتمد معدل إطلاق الدواء على:

- قابلية ذوبان الدواء (Solubility of drug)

- نسبة الدواء الذي يمكن فك ارتباطه من السطح / نسبة الدواء المدمص في الحامل

- انتشار الدواء عبر مصفوفة الجسيمات النانوية

- مصفوفة الجسيمات النانوية تآكل / تدهور

- تآكل (Erosion) و تكسير (Biodegradation) الدقائق النانوية .

وعليه ، فإن قابلية الذوبان والانتشار والتحلل البيولوجي للحامل النانوي تتحكم في عملية التحرر. (Mohanraj & Chen , 2006) .

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل

Materials & Methods

المواد وطرائق العمل

materials and methods

1.3 المواد والأجهزة المستخدمة materials and devices

1.1.3 الأجهزة والأدوات المستخدمة :

جدول (1-3): استعملت الأجهزة الموضحة في الجدول (1-3).

الشركة المصنعة	اسم الجهاز	ت
Memmert (Germany)	حاضنه (Incubator)	1
LG-Korea	ثلاجة (Refrigerator)	2
GFL (Germany)	جهاز تقطير (Distiller)	3
Hettich – Germany	جهاز طرد مركزي (Centrifuge)	4
Labtech (Korea)	جهاز مزج ذو الصفيحة الساخنة (Magnetic Stirrer with hot plate)	5
Memmert (Germany)	فرن (Oven)	6
Jeio-Tech-Korea	كابينة معقمه بايلوجي (Laminar flow cabinet)	7
Scientific Industries	مازج (Vortex)	8
Human (Germany)	ماصات دقيقة (Micropipettes)	9
TE SCAN VEGA-EasyPrpbe	المجهر الالكتروني الماسح (Scanning Electron Microscope)	10
Motic-Germany	المجهر الضوئي (Light microscope)	11
Jenway-Germany	مصباح بنزن (Bunsen burner)	12
Shimadzu (84005) / Japan	مطياف الأشعة تحت الحمراء Fourier transform infrared spectrophotometer (FT-IR)	13
Bruker 2010/D2Phaser (Germany)	مطياف حيود الأشعة السينية X-Ray (XRD) diffraction	14
Tudor-Korea	مطياف ضوئي (spectrophotometer)	15
Labtech (Korea)	مؤسدة (autoclave)	16
Denever Instrument (Germany)	ميزان حساس (Sensitive balance)	17

2.1.3. المواد المستخدمة والشركات المصنعة :

جدول (2-3) : استعملت المواد الكيميائية والحيوية الموضحة في الجدول (3-3).

الشركة المصنعة	اسم المادة	ت
Loba chemie – India	(DMSO) Dimethyl sulfoxide	1
Sigma- Germany	Selenium($\text{Na}_2\text{SeO}_{3.5}\text{H}_2\text{O}$)	2
Scharlau- European Union	أسيٲون ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$) Absolute Acetone	3
Sigma- Germany	او كسيد الزنك Zinc oxid	4
Scharlau-European Union	ايتانول مطلق ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)	5
معهد المصول واللقاح (VSI) العراقية	بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2	6
Analytical Rasayan	حامض الهيدروكلوريك (HCl)	7
BDH	كاربونات الصوديوم Na_2CO_3	8
معهد المصول واللقاح (VSI) العراقية	كاشف الاوكسيديز	9
BDH	كلوريد الباريوم (Barium chloride)	10
BDH	كليسيروول (Glycerol)	11
معهد المصول واللقاح (VSI) العراقية	ملون غرام (Gram Stain)	12

جدول (3-3) : استعملت الاوساط الزرعية الموضحة في الجدول (3-3).

Himedia	وسط (Blood agar base)	1
Himedia	وسط (MacConckey agar)	2
Himedia- India	وسط (Muller hinton broth)	3
Himedia	وسط (Nutrient agar)	4
Alpha-Aleppo Pharmaceutical Ind.-Syria	وسط cetrimide agar	5
Oxoid	وسط Mannitol salt agar	6

جدول (3-4) : استعملت اقراص المضادات الحيوية الموضحة في الجدول (3-4).

Alpha-Aleppo Pharmaceutical Ind.-Syria	اقراص المضاد الحيوي Ciprofloxacin	1
Alpha-Aleppo Pharmaceutical Ind.-Syria	اقراص المضاد الحيوي Gentamycin	2
Alpha-Aleppo Pharmaceutical Ind.-Syria	اقراص المضاد الحيوي Imipenem	3
Alpha-Aleppo Pharmaceutical Ind.-Syria	اقراص المضاد الحيوي Vancomycin	4

2.3.2. طرائق العمل :

1.2.3.1. تحضير المركبات النانوية:

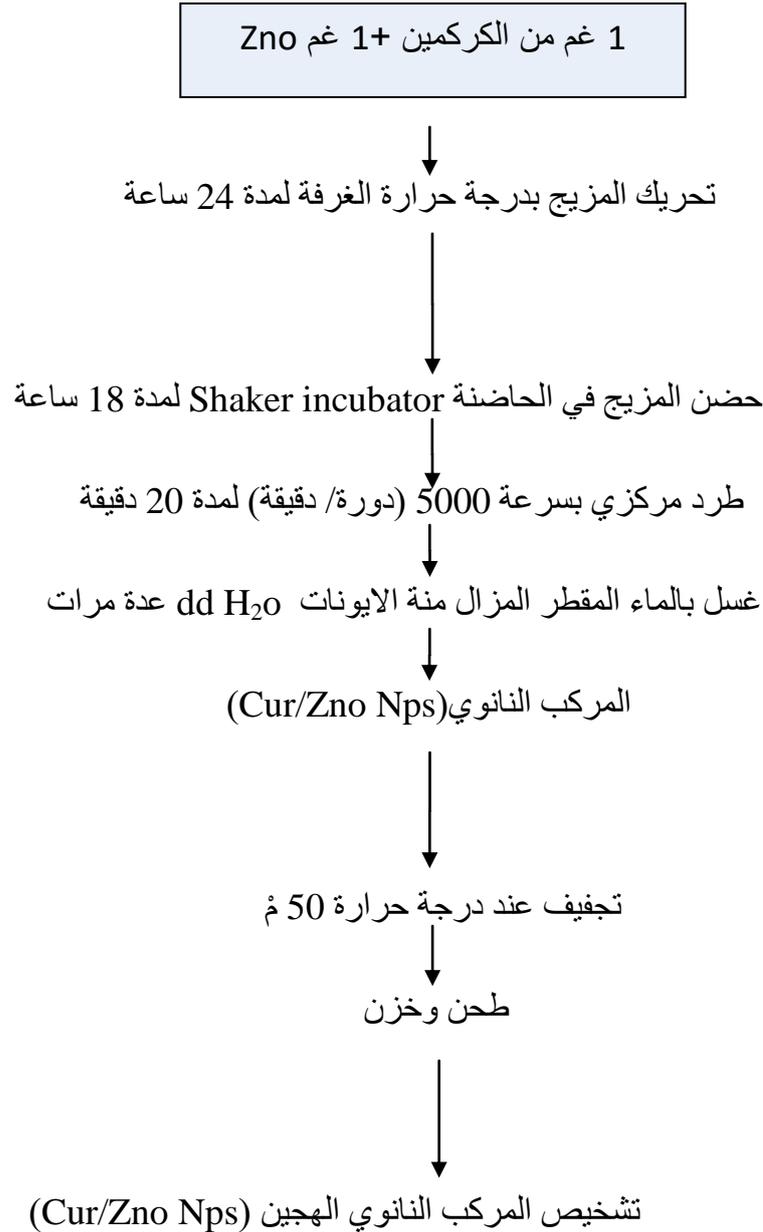
1.1.2.3.1. تحضير المركب النانوي من طبقات أكسيد الزنك (Zinc oxide) مع الكركمين :

اتبعت الطريقة الموصوفة من قبل (Bashi et al. (2013) مع بعض التحوير في تحضير المركب النانوي الهجين , شكل (3-1) , وذلك بإضافة 1 غرام من الكركمين الى محلول اوكسيد الزنك (الناتج من اذابة 1 غم من اوكسيد الزنك في 50 مل من الماء المقطر المزال منه الايونات) وحرك المزيج بواسطة المحرك المغناطيسي Magnetic stirrer بدرجة حرارة الغرفة لمدة 24 ساعة ثم وضع المزيج في الحاضنة الهزازة Shaker incubator عند درجة حرارة 40 م° لمدة 18 ساعة. يتغير لون المحلول من الاصفر الشاحب الى الاصفر المحمر. وفصل الراسب بواسطة جهاز الطرد المركزي بسرعة 3000 دوره لمدة 20 دقيقة ومن ثم غسل بالماء المقطر المزال منه الايونات عدة مرات وبعدها جفف الراسب بالفرن الكهربائي عند درجة حرارة 50 م° ومن ثم طحنه بالهاون الخزفي جيداً للحصول على مسحوق ناعم وحُفظ في الثلاجة لحين استخدامه في الدراسة .

2.1.2.3.2. تحضير المركب النانوي من سليينات الصوديوم (Sodium selenite pentahydrate) مع الكركمين:

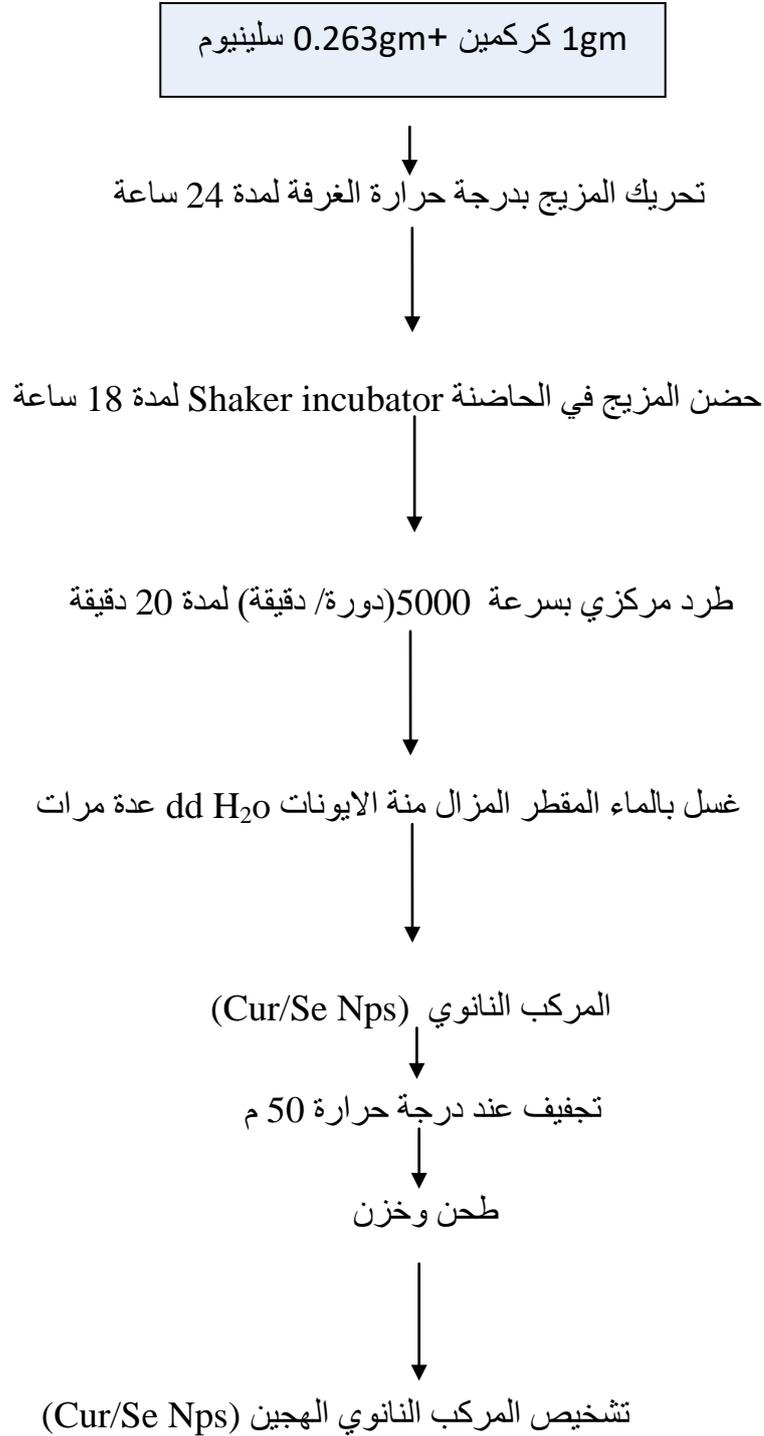
اتبعت الطريقة الموصوفة من قبل (Fan et al. (2020) مع بعض التحوير في تحضير المركب النانوي الهجين وذلك بإضافة 1 غرام من الكركمين الى 2 مل من محلول السلينيوم (المحضر من اذابة 0.263 غرام (0.01 مولاري) في 100 مل من الماء المقطر المزال منه الايونات) ثم وضعه على جهاز المحرك المغناطيسي Magnetic stirrer بدرجة حرارة 40 م° . يتغير لون المحلول من الاصفر

الشاحب الى الاصفر المحمر , ثم يتم قياس النفاذية للمحلول في مقياس الطيف المرئي للأشعة فوق البنفسجية Spectrophotometer ثم يوضع المحلول في الحاضنة Shaker incubator الهزازة لمدة 24 ساعة , فُصل الراسب بوساطة جهاز الطرد المركزي بسرعة 3000 دوره لمدة 20 دقيقة ومن ثم غسل بالماء المقطر المزال منه الايونات عدة مرات وبعدها جفف عند درجة حرارة 50 م° ثم طحن جيدا للحصول على مسحوق ناعم وحُفظ في الثلاجة لحين استخدامه في الدراسة, شكل (2-3).



شكل (1-3) : تحضير المركب النانوي من الكركمين بإضافة اوكسيد الزنك بطريقة التبادل

الايوني المباشر



شكل (2-3) : تحضير المركب النانوي من الكركمين بإضافة السلينيوم بطريقة التبادل الايوني

المباشر

2.2.3. Characterization of nano-composite تشخيص المركبات النانوية :

استخدمت اربعة طرائق لتشخيص المضادات البكتيرية النانوية الهجينة قيد الدراسة ، اشتملت هذه الطرائق مطياف الاشعة فوق البنفسجية Ultraviolet visible spectrophotometer طيف الاشعة تحت الحمراء Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) فضلا عن استخدام مجهري طيف حيود الاشعة السينية X-ray diffraction (XRD) المجهر الالكتروني الماسح Scanning Election Microscope (SEM).

1.2.2.3. مطياف الاشعة فوق البنفسجية Ultraviolet visible spectrophotometer :

وصفت جزيئات الكركمين/سليينيوم النانويه التي حضرت باذابة 500 mg من ماده المحضره في 4 مل من الماء المقطر ثم عرضت للموجات فوق الصوتيه لمدة 15 دقيقه ثم قيست في جهاز مطياف الاشعة فوق البنفسجه اذ رصد كل من الفحص البصري و الامتصاصية , تم عمل تصفير للجهاز بواسطة الكركمين ثم فحصت المواد النانويه وبمدى طول موجي من 200-800nm. ويستعمل هذا الفحص للتأكد من تكون جزيئات الكركمين/سليينيوم النانويه (Pavani *et al.*,2011 ; Chauhan *et al.*,2015).

2.2.2.3. التشخيص باستخدام طيف الاشعة تحت الحمراء Fourier transform (FTIR) :infrared spectroscopy

يعد التحليل الطيفي (FTIR) تقنية فريدة تسمح بأداء التحليل الكيميائي الحيوي للعينات البيولوجية والخصائص الوظيفية والمعلومات الهيكلية للمركب. يتميز مستخلص النباتات بقمم مميزة في طيف FTIR ، مما يشير إلى وجود أو عدم وجود مجموعات وظيفية.

درس طيف الاشعة تحت الحمراء لكل مركب من zinc oxide و selenium الحرين وكذلك ماده العلاجية بشكلها الحر(الكركمين) فضلا عن المركبات النانوية بعد تحميل العلاج عليها , 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 الموجي(400-4000)سم⁻¹ وتم تثبيت جميع الحزم الظاهرة كما تم تشخيص معظم الحزم الرئيسة (Bashi *et al.*,2013).

3.2.2.3. مجهر حيود الأشعة السينية (XRD) X-ray diffraction :

ارسلت العينات للفحص في جامعة كاشان في جمهورية ايران الاسلاميه , اذ تم تشخيص المركبات النانوية الهجينة باستخدام طيف حيود الأشعة السينية (X-Ray) والذي يوضح الاختلاف في سمك الطبقة قبل عملية الاقحام 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 .

λ : الطول الموجي للأشعة السينية المستخدمة (أنبوبة نحاس) .

θ : زاوية الحيود للأشعة السينية .

d : المسافة البلورية العمودية بين مستويين متوازيين (Modena et al., 2019).

4.2.2.3. المجهر الالكتروني الماسح (SEM) Scanning electron microscope :

تم تحديد المورفولوجيا السطحية للمركبان النانويان باستخدام المجهر الالكتروني الماسح (SEM) , حيث تم وضع NPs المشتتة والمجففة فوق قاعده من الألمنيوم يحتوي على شريط كربون موصل مزدوج العصا ومغطى بالذهب تحت جو من الأرجون باستخدام طلاء بالرش , وقد تم ارسال العينات الى جامعه كاشان في جمهورية ايران الاسلاميه لفحصها (Petal & Parsania,2018) .

3.2.3. عزل البكتريا المدروسة :**1.3.2.3 جمع العينات Specimen collection :**

لغرض عزل عينات من بكتريا *S.auerus* جمعت 66 مسحة من اصابات مختلفة من المرضى الراقدين في كل من مستشفى المسيب العام والمستشفى التركي والمستشفى الجمهوري في محافظة بابل وقد شملت مسحات من الادرار والانف والجروح .

اما بكتريا *P. aeruginosa* فقد جمعت 64 مسحة من اصابات الحروق وجروح العمليات من المستشفى التركي والجمهوري في بابل . في المده الواقعه مابين 18/10/2020 و 24/1/2021 .

وأخذت المسحة بتطهير الجرح او الحرق اولا ثم تمرير swab معقمه على الجرح بشكل متعرج مع لف الـ swab بصورة دائرية وبهذا يكون راس القطنه بكامله في حالة تماس مع البكتريا , يمكن ايضا ان تغمر

الـ swab بالقليل من الـ sterile saline لكي يزيد من قابلية التصاق البكتريا بالـ swab, اما مسحة الادرار فتعمر قطنـة الـ swab في cub يحتوي على ادرار شخص مصاب بالتهاب المجاري البولية , اما مسحة الانف فقد اخذت بتمرير القطنـه على البطانة الداخليه للانف مع اللف المستمر للـ swab , ثم تزرع على الـ media المطلوبة .

2.3.2.3 . حفظ البكتريا storage of bacteria :

❖ حفظ العزلات قصير الامد Short term storage

لقتحت العزلات البكتيريـه على وسط **Nutrient agar** وبطريقة التخطيط ثم حضنت الاطباق لمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة 37 م° ثم حفظت في درجة حرارة 4 م° (Harly and Prescott ,2002).

❖ حفظ العزلات متوسط الامد Medium term storage

لقتحت العزلات البكتيرية على وسط **Nutrient Broth** باستعمال انابيب معقمه . ثم حضنت الانابيب لمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة 37 م° ثم حفظت في درجة حرارة 4 م° مدة الحفظ في هذه الطريقة ثلاثة اسابيع ثم يتم تجديدها بعد انتهاء هذه المده (Harly and Prescott,2002).

❖ حفظ العزلات طويل الامد Long term storage

خزنت العزلات البكتيرية لمدة طويلة تصل الى اكثر من ثلاثة اشهر في وسط **Nutrient Broth** الذي يحتوي على 15% من الكليسيروول . حيث عقت الانابيب ثم تم تبريدها ونقلت مستعمره واحده الى كل انبوب ثم حضنت الانابيب لمدة 6 ساعة وبدرجة حرارة 37 م° ثم حفظت في درجة حرارة -20 م° (Harly and Prescott,2002).

3.3.2.3 . الاوساط الزرعـية المستخدمه :

❖ 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 لعزل

وتشخيص البكتريا التي تمتلك القدره على تحليل كريات الدم الحمر بواسطة انتاج انزيم (Hemolysin) .

❖ وسط MacConkey agar :

حضر بإذابة 50 gm من الوسط في 1 لتر من الماء المقطر ثم عقم بالمؤصدة عند 121 م° لمدة 15 دقيقة . تم استخدامه للتمييز بين البكتريا المخمرة للاكتور من غير المخمرة له .

❖ وسط Mannitol salt agar :

حضر هذا الوسط بحسب تعليمات الشركة المجهزة , وذلك بإذابة 108 غم في لتر من الماء المقطر وعقم بالمؤصدة , استخدم هذا الوسط لعزل *Staphylococcus aureus* وتشخيصها من حيث قابليتها على تحمل ملوحة الوسط فضلا عن قابليتها على تخمير سكر المانيتول وتحويل لون الوسط الى الاصفر .

❖ وسط Nutrient broth :

حضر هذا الوسط بحسب تعليمات الشركة المجهزة , وذلك بإذابة 13 غم من الوسط المغذي السائل في لتر من الماء المقطر وعقم بالمؤصده ثم تم توزيعه في انابيب مختلفه . وقد استخدم هذا الوسط لتنمية وتنشيط البكتريا .

❖ وسط Cetrimide agar :

حضر هذا الوسط وبحسب تعليمات الشركة المصنعه بإضافة 45.3 من الوسط في 1 لتر من الماء المقطر ثم اضافة 10 مل من الكليسيرين وتركه يغلي ليذوب تماما ثم تعقيمه بواسطة المؤصده عند 121 م° لمدة 15 دقيقه . ترك الوسط ليبرد حتى يصل 50 م° وتم سكبه في اطباق بتري معقمه .

❖ **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 ثم ترك لتصل حرارته الى درجة (45- 50) م° وتم صبه في أطباق بتري معقمة . استخدم الوسط لتنمية العزلات البكتيرية لغرض اختبار الفعالية التثبيطية للمضادات الحياتية.

4.3.2.3. الكواشف والمحاليل المستخدمة في عزل وتشخيص البكتريا المدروسة :

❖ **ملون كرام Gram stain :**

استخدمت صبغة كرام للتفريق بين البكتيريا السالبة من الموجبه ولمعرفة اشكال البكتريا تحت المجهر.

❖ **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 بارافنيلين ثنائي امين ثنائي هيدروكلورايد (Tetramethyl P-phenylen diamine dihydrochloride) في 100 مل من الماء المقطر في قنينة معتمة. استخدم هذا الكاشف في التحري عن قابلية البكتريا على إنتاج إنزيم الاوكسيديز (Macfaddin , 2000).

❖ **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 محلول ماكفرلاند رقم (0.5) والتي تعادل 1.5×10^8 خلية/مل على النحو التالي:

أ - $1.75\% \text{ BaCl}_2 - 2\text{H}_2\text{O}$ ويكمل الحجم الى 100مل في الماء المقطر .

ب - $1\% \text{ H}_2\text{SO}_4$ (1مل من H_2SO_4 ويكمل الحجم بإضافة 99 مل من الماء المقطر).

ثم 0.5 مل من $\text{BaCl}_2 - 2\text{H}_2\text{O}$ محلول يضاف إلى 99.5 مل من محلول H_2SO_4 ، ويرج هذا الخليط جيداً ويوضع في أنبوب اختبار مغطى ويترك في الظلام عند اربع درجات مئوية (Macfaddin , 2000).

5.3.2.3. عزل وتشخيص البكتريا المدروسه :

1.5.3.2.3. الفحوصات المجهرية :Microscopic tests

❖ تصبغ البكتريا :

فحصت المجهرى للعزلات البكتيرية عن طريق اخذ مسحه وصبغت بصبغة غرام ومن ثم فحصت تحت المجهر لملاحظة تفاعلها مع الصبغة فضلا عن شكل وترتيب الخلايا .

2.5.3.2.3. الفحوصات الكيموحيوية : Biochemical tests

❖ اختبار الكاتليز : Catalase test

تمت إضافة قطرة من بيروكسيد الهيدروجين بنسبة 3% إلى مستعمرة أو كميته من البكتيريا المنقولة سابقاً على شريحة ، تكون النتيجة ايجابيه عند اطلاق فقاعات الاوكسجين من البكتريا (Tille , 2014) .

❖ اختبار الاوكسيديز :Oxidase test

نقل جزء من المستعمرة البكتيرية بواسطة عود خشبي معقم (stick) ووضعه على ورق ترشيح واضيف لها قطره من كاشف الاوكسيديز. ثم الانتظار لمدة 10 ثوان اذا تحول الى اللون البنفسجي فهذا دليل بان الفحص ايجابي (Tille , 2014) .

❖ اختبار انزيم التخثر **coagulase test** :

اختبرت العينات باستخدام بلازما الانسان إذ تم وضع 0.5 مل من البلازما في انابيب معقمة ثم نقلت مستعمرة بواسطة عروة (loop) الى الانابيب الحاوية على البلازما وتم مزجها جيدا ثم حضنت بدرجة حرارة (35-37) م لمدة 4 ساعات . ان حصول التخثر دلالة على ايجابية الفحص (Tille , 2014) .

3.5.3.2.3. تشخيص البكتريا باستخدام عدة التشخيص API 20E :

A- تحضير اللقاح :

حضر المزروع البكتيري بنقل مستعمره من العزلات البكتيرية النامية إلى 5 مليلتر من دارئ الفوسفات الملحي(Phosphate-buffered saline) المحضر مسبقا في أنبوبة نظيفة ومعقمة , وتم رجها جيدا للحصول على عكورة ملائمة .

B- اجراء الفحص :

1. حضرت حافظه الحضان incubation box بإضافة كمية قليلة من الماء المقطر في الحفر لجعل الظروف رطبة .

2. عُلمت الحافظة بكتابة اسم البكتريا او العزلة على جانب الحافظة .

3. لُفح الشريط باستخدام حقنه لضمان عدم تكون فقاعات , إذ تم ملء الجزء السفلي Tube بالعالق البكتيري في كل الفحوصات ما عدا الفحوصات التي يوجد اسفل رمزها خطٍ , في حين تم ملء الجزء العلوي Cupule بزيت البارافين السائل المعقم لجعل الظروف لاهوائية فيما اقتصرت بقية الفحوصات على ملء الجزء السفلي فقط بالعالق البكتيري , بعدها اغلقت الحافظة بالغطاء الخاص بها .

4. قرأت النتائج بعد مدة حضان (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 رقم (5.3):

جدول رقم (5.3) : تشخيص البكتريا باستخدام عدة التشخيص API 20E :

ت	نوع الاختبار	الرمز	الاستجابة الموجبة	الاستجابة السالبة
1	2-nitrophenyl-BD-galactopyranoside	ONPG	Yellow	Colorless
2	L-arginine	ADH	Red/orange	Yellow
3	L-lysine	LDC	Red/orange	Yellow
4	L-ornithine	ODC	Red/orange	Yellow
5	Trisodium citrate	CIT	Blue/blue-green	Yellow / pale green
6	Sodium thiosulfate	H ₂ S	Black deposite/blue	Colorless /greyish
7	Urea	URE	Black deposite /thin line	Yellow
8	L-tryptophane	TDA	Red/orange	Yellow
9	L-tryptophane	IND	Reddish brown	Colorless /pale green /yellow
10	Sodium pyruvate	VP	Pink	Colorless /pale pink
11	Gelatin(bovine origin)	GEL	Pink/red	No diffusion
12	D-glucose	GLU	Diffusion of black pigment	Blue/blue-green
13	D-mannitol	MAN	Yellow/grayish yellow	Blue/blue-green

Blue/blue-green	Yellow	INO	Inositol	14
Blue/blue-green	Yellow	SOR	D-sorbitol	15
Blue/blue-green	Yellow	RHA	L-rhamnose	16
Blue/blue-green	Yellow	SAC	D-sucrose	17
Blue/blue-green	Yellow	MEL	D-melibiose	18
Blue/blue-green	Yellow	AMY	Amygdalin	19
Blue/blue-green	Yellow	ARA	L-arabinose	20

4.2.3. تقدير التركيز المثبط الأدنى للمركبات النانوية Minimal inhibitory concentration(MIC) :

وهو اقل تركيز يؤدي إلى تثبيط نمو البكتيريا قيد الاختبار

- تم زرع كميات ثابتة من البكتيريا في وسط سائل هو وسط Muller Hinton Broth في انابيب اختبار معقمة بعدد التراكيز المطلوب تحضيرها من المضاد (عدد البكتيريا $10^8 \times 1.5$ خلية/مل).
- اضافة تراكيز متزايدة, إذ يحتوي الانبوب الاول (رقم 1) على التركيز (صفر) من المادة النانوية Control ثم يليه الانبوب الثاني (رقم 2) الذي يحتوي على اوطا تركيز من المادة النانوية ويليه الانبوب الثالث (رقم 3) الذي يحتوي تركيز ضعف ما موجود في الانبوب رقم 2 وهكذا بالنسبة لبقية الانابيب. وقد استخدمت التراكيز من $64-2.5 \mu g$.

- حضنت الانابيب جميعا في درجة حرارة ملائمة للبكتيريا المدروسة ويتم فحص الانابيب بعد الحضانة للتعرف على أي منها يحتوي نمو بدلالة العكورة اما الانابيب الرائقة فتشير الى عدم حدوث نمو نتيجة فعالية المضاد.
- يتم اختبار اول انبوب رائق ياتي بعد سلسلة انابيب عكورة فيكون تركيز الماده النانويه فيه هو ال-MIC.

5.2.3. طريقة تقدير الفعالية التثبيطية للمركبات النانوية والمضادات الحيوية ضد البكتيريا:

1.5.2.3. Estimation of the inhibitory activity of nanocomposites

استخدمت طريقة انتشار الأقراص (Disk diffusion test) لتحديد حساسية البكتيريا المدروسة للمركبات النانويه (Cur/Zno Nps , Cur/Se Nps) على وفق ما جاء في (Morello *et al.*, 2006) بحسب الخطوات الآتية :

1. نشطت العزلات البكتيرية على وسط nutrient agar و حضنت في الحاضنة بدرجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة .

2. نقلت كمية قليلة من مستعمرات البكتيريا النامية بواسطة العروة (Loop) إلى أنابيب تحوي المحلول الملحي الفسلجي ومزجت جيداً , وقورنت عكورة النمو مع عكورة محلول ثابت العكورة القياسي McFarland standard 0.5

3. وضع 20 مايكروليتر من العالق البكتيري بواسطة الماصة الدقيقة (Micropipette), ثم

نشر بواسطة الناشر الزجاجي (L-shape) على سطح وسط Muller- hinton agar بصورة متجانسة ، بعدها تركت الأطباق لتجف في درجة حرارة الغرفة لمدة (10-15) دقيقة

4. حضرت اقراص حجم مساماتها 0.01 micron معقمه وشبعت بتراكيز متسلسله من

المركبات النانويه (2,4,6,8 ملغم/مل) بواسطة الماصه الدقيقه (Micropipette) ثم نقلت

هذه الاقراص بواسطة ملقط معقم إلى الأطباق ، ثم حضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة .

5. قرئت النتائج بقياس أقطار مناطق التثبيط بالملم حول كل قرص باستعمال المسطره .

2.5.2.3. تقدير الفعالية التثبيطية للمضادات الحيوية : activity of antibiotics

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. نشطت عزلات بكتريا على وسط Nutrient agar و حضنت في الحاضنة بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة .

2. نقلت كمية قليلة من مستعمرات البكتريا النامية بواسطة العروة (Loop) إلى أنابيب تحوي المحلول الملحي الفسلجي ومزجت جيداً , وقورنت عكورة النمو مع عكوره محلول ثابت العكورة القياسي (McFarland standard 0.5)

3. نقل 20 مايكرو ليتر من العالق البكتيري بواسطة الماصة الدقيقة (Micropipette), ثم نشر بواسطة الناشر الزجاجي على سطح وسط Muller- hinton agar بصورة متجانسة ، بعدها تركت الأطباق لتجف في درجة حرارة الغرفة لمدة (10-15) دقيقة .

4. نقلت أقراص المضادات الحيوية بواسطة ملقط معقم إلى الأطباق ، ثم حضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة .

5. قرائت النتائج بقياس أقطار مناطق التثبيط بالملم حول اقراص المضادات الحيوية بواسطة المسطره .

6.2.3. التحليل الاحصائي Statistical analysis

استخدمت البرنامج الاحصائي الجاهز SBSSV24 لتحليل النتائج واختبار T-test لعينتين مستقلتين واختبار مربع كاي . (الراوي , 1984)

الفصل الرابع
النتائج والمناقشة

Results & Discussion

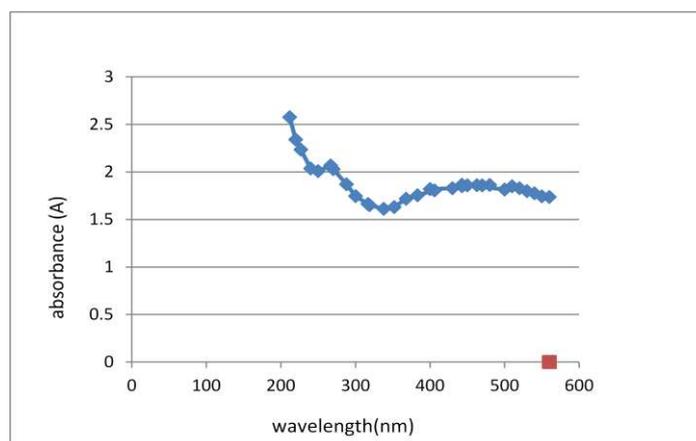
النتائج والمناقشة

Results and Discussion

1.4. تشخيص المركبات النانوية المحضرة بالطرائق الطيفية :

1.1.4. مطياف الأشعة فوق البنفسجية UV-Visible spectroscopy:

ان تغير لون المحلول المحضر من الاصفر الى البرتقالي المحمر يعود الى ذروه رنين البلازمون (Plasmon resonance peak) التي تقع ما بين الـ (300 - 450 nm) (Snigdha, Sugathan, Mathew, 2017). يستخدم الفحص لبيان نوع البلازمون (Plasmon) على سطح المادة النانوية فعند رسم الطول الموجي (nm) على المحور السيني مقابل الامتصاصية على المحور الصادي نشاهد ارتفاع البلازمون كما في الشكل (1.4). إن ظهور الذروة المرتفعة هو النمط الطيفي الذي يحدث بسبب اثاره البلازمونات السطحية الموضعية التي تسبب تشتتاً قوياً للضوء بواسطة مجال كهربائي بطول موجي معين حيث تحدث ظاهرة الرنين (Deepa & Ganesan, 2013). يبدأ الارتفاع من (300 nm) ويكون على شكل بيبضاوي parabolic من الأعلى وله قمة تمثل أعلى امتصاصية تقع عند (450 nm) ثم تهبط بعدها. إن الشكل البيضاوي الذي رأسه الى الاعلى وقاعدته إلى الاسفل دليل على المادة نانويه والتي تبدأ بالتأثر عند تعريضها للأشعة فوق البنفسجية المرئية. تشير الحزم الظاهرة التي لوحظت في المركبات النانوية من المركبات الرئيسية (كركمين+سليينيوم) بوضوح الى حدوث تفاعل بين المكونين وتشكل مركب نانوي مستقر. وتتفق نتيجة الفحص مع (Asadian et al.,2019)



الشكل (1.4): مطياف الأشعة فوق البنفسجية للمركب النانوي cur-se Nps.

2.1.4. طيف الأشعة تحت الحمراء (FT-IR) Fourier-transform infrared spectroscopy**للمركب النانوي cur-se Nps :**

تعدّ تقنية الـ FTIR من التقنيات المهمة لمشاهدة المجاميع الفعاله الموجودة على السطح، ومن هذه المجاميع نستدل على عملية تصنيع المركبات النانويه، ففي طيف السلينيوم كما موضح في شكل(4.4) نشاهد الحزم الموجودة وهي 3439 سم-1 حزمة واطئة الشده (2922 ، 2854 ، 2360،2342) سم-1، وهذه الحزم عائده لتخليق المركبات النانويه من السلينيوم النانوي الذي تم اختزاله بعصارة الكركمين ؛ إذ حدثت عملية تثبيت واختزال بفعل المركبات الموجودة في عصارة الكركمين، إذ تقوم المركبات التي تعمل على الاختزال بالفعل أولاً ثم من بعدها تلك التي تثبت الجزيئات النانويه.

إما الحزم (1734, 1636, 1457) سم-1 فتعزى إلى اهتزاز رابطة O-H الناتجة أما من الماء أو من الكحول . أما مجاميع NH الأمينيه ، فيكون إمتطاط الرابطة عند 3439 سم-1. وفي مكان آخر فإن الحزمة (1734) سم-1 تعني وجود O-H و N-H . الحزمه عند (2800-2900) سم-1 تعزى إلى المركبات التي تحتوي على رابطة C-H . الحزمه عند (2360) سم-1 تعزى إلى رابطة الكربونيل COO ، الحزمه عند (2842) سم-1 خاصة بمجموعة الأمين NH . الحزم عند (1457,1057) سم-1 تعزى إلى إمتطاط رابطة الـ C-H . أما الحزمه الأخيرة مابين (400-600) سم-1 فتعزى إلى تكوين المركب النانوي من السلينيوم والذي يكون إما أوكسيد السلينيوم أو ثنائي أوكسيد السلينيوم .

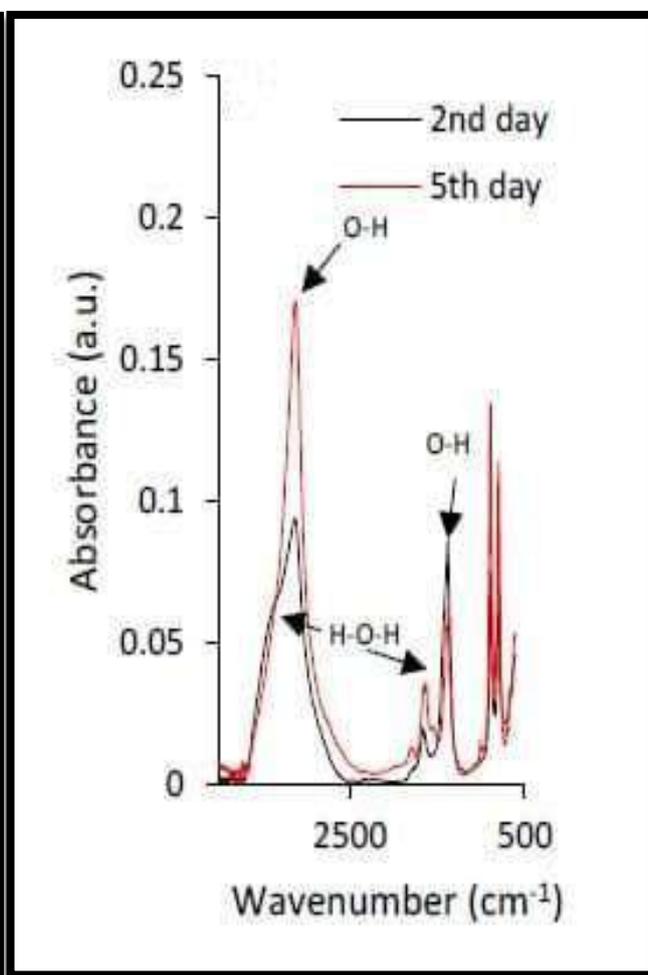
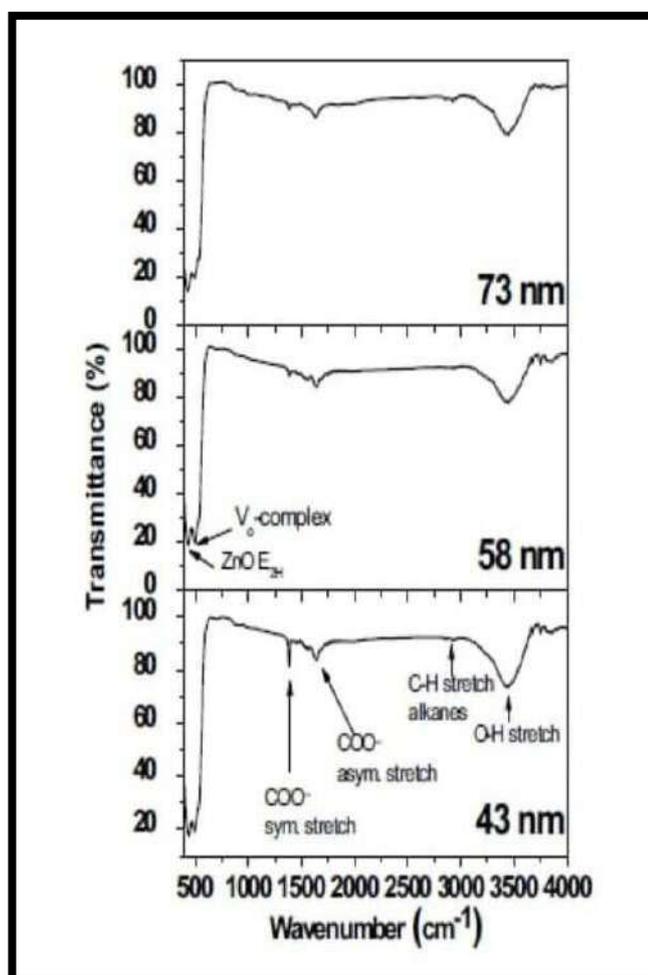
إن القمم التي توافق تمدد واهتزاز الروابط في CH_2 ، $COOH$ ، NH_2 ، $O-H$ تشير إلى وجود مجاميع مختزله قامت بإختزال وتثبيت جزيئات السلينيوم على شكل مركب نانوي، إذ تكونت جزيئات ذات أبعاد ثلاثيه (Sampath *et al.*, 2013) .

3.1.4. طيف الأشعة تحت الحمراء (FT-IR) Fourier-transform infrared spectroscopy**للمركب النانوي Cur/Zno Nps :**

تعد المستقلبات الثانويه العوامل الرئيسة للتخليق الحيوي للجزيئات النانويه ، وتحتوي المستخلصات النباتية على الفينول (Phenol) والكحول (Alcohol)، والأمين (Amine) وحمض

الكربوكسيل (Carboxylic acid) والقلويدات (Alkaloids) والتربينويدات (Terpenoids) المسئولة عن اختزال وتثبيت الجسيمات النانوية (Jha *et al.*, 2009).

يتضح في الشكل (5.4) العديد من الحزم وهي 1450 , 1600 , 2900 , 2800 , 3400 1200 سم-1 التي تعزى الى مجاميع الهيدروكسيل (OH) والامين (NH₂) والكاربوكسائل (COOH) اي لدينا خليط من المركبات الهيدروكاربونية او الاحماض الامينية او الاحماض الكاربوكسيلية تعمل على عملية الاختزال والتثبيت , تتضح الحزم العائدة الى مستخلص الكركمين بين طبقات الزنك , الحزمه بين 400-600 سم-1 تعود لأكسيد الزنك دلالة على وجود هذه المركبات بين طبقات اوكسيد الزنك. وتتفق هذه النتيجة مع Singh *et al.* (2014).



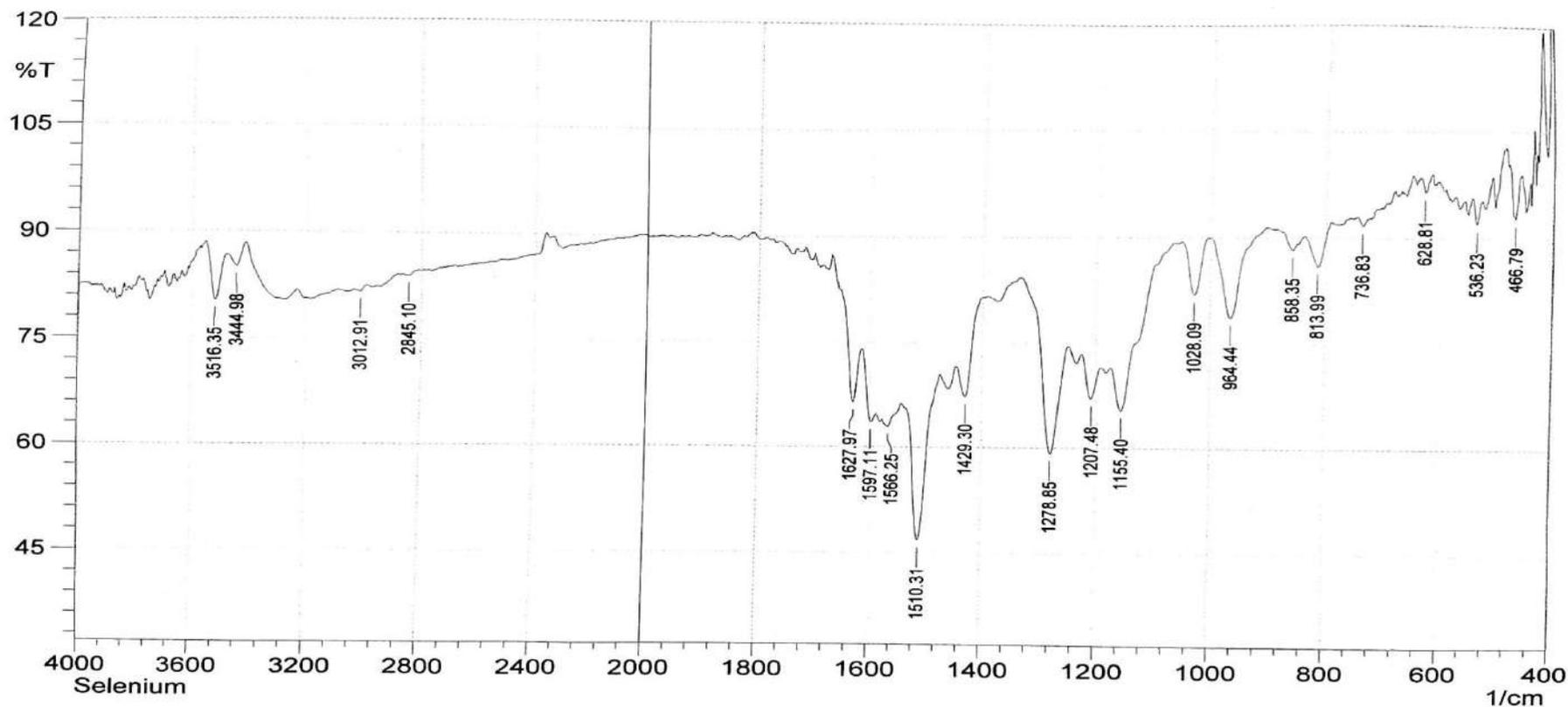
شكل (3.4): طيف الأشعة تحت الحمراء FT-IR

لاوكسيد الزنك. (Xiong *et al.*, 2006)

شكل (2.4): طيف الأشعة تحت الحمراء FT-IR

للسليسيوم. (Matulov *et al.*, 2021)

SHIMADZU

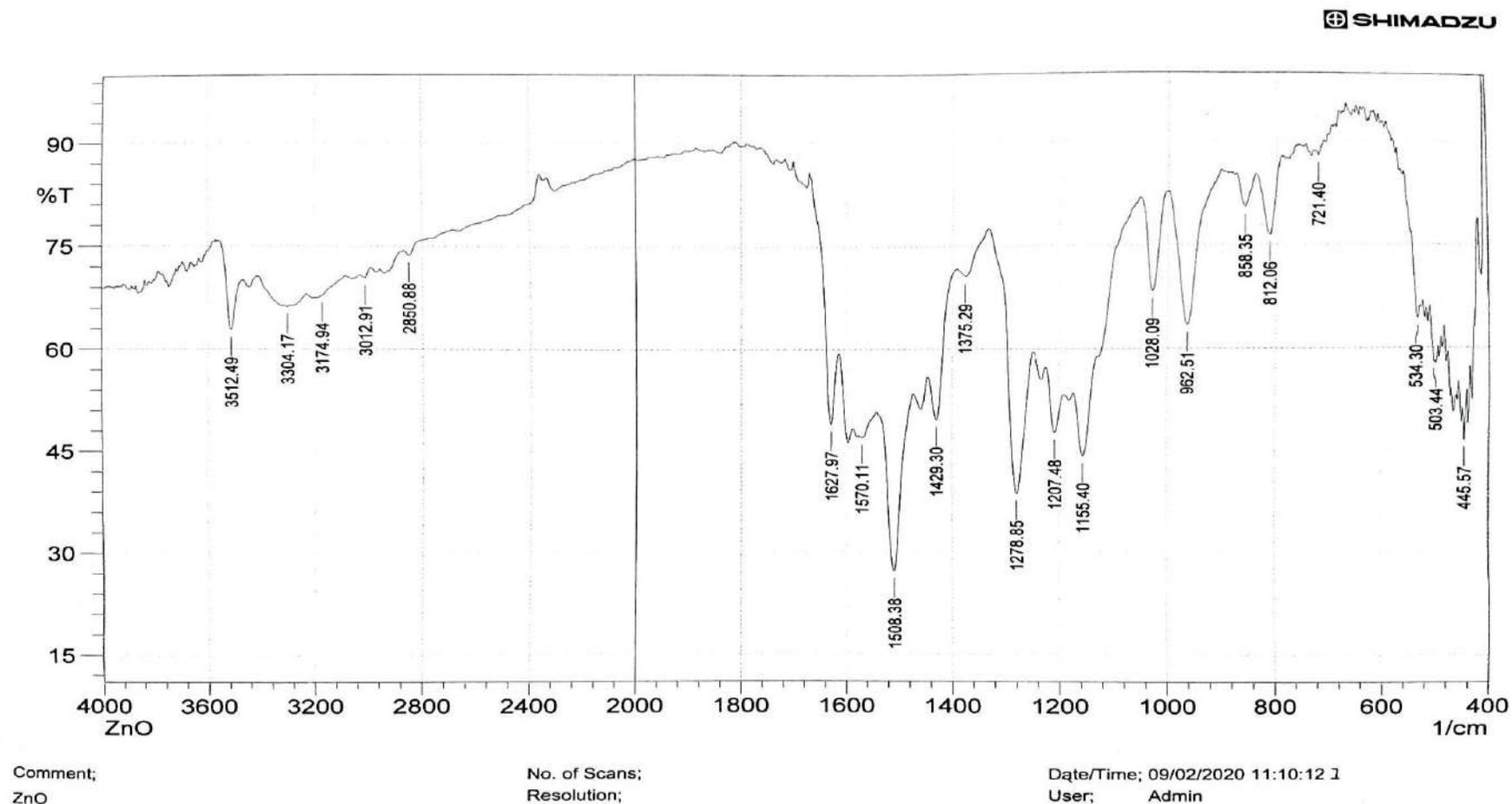


Comment;
Selenium

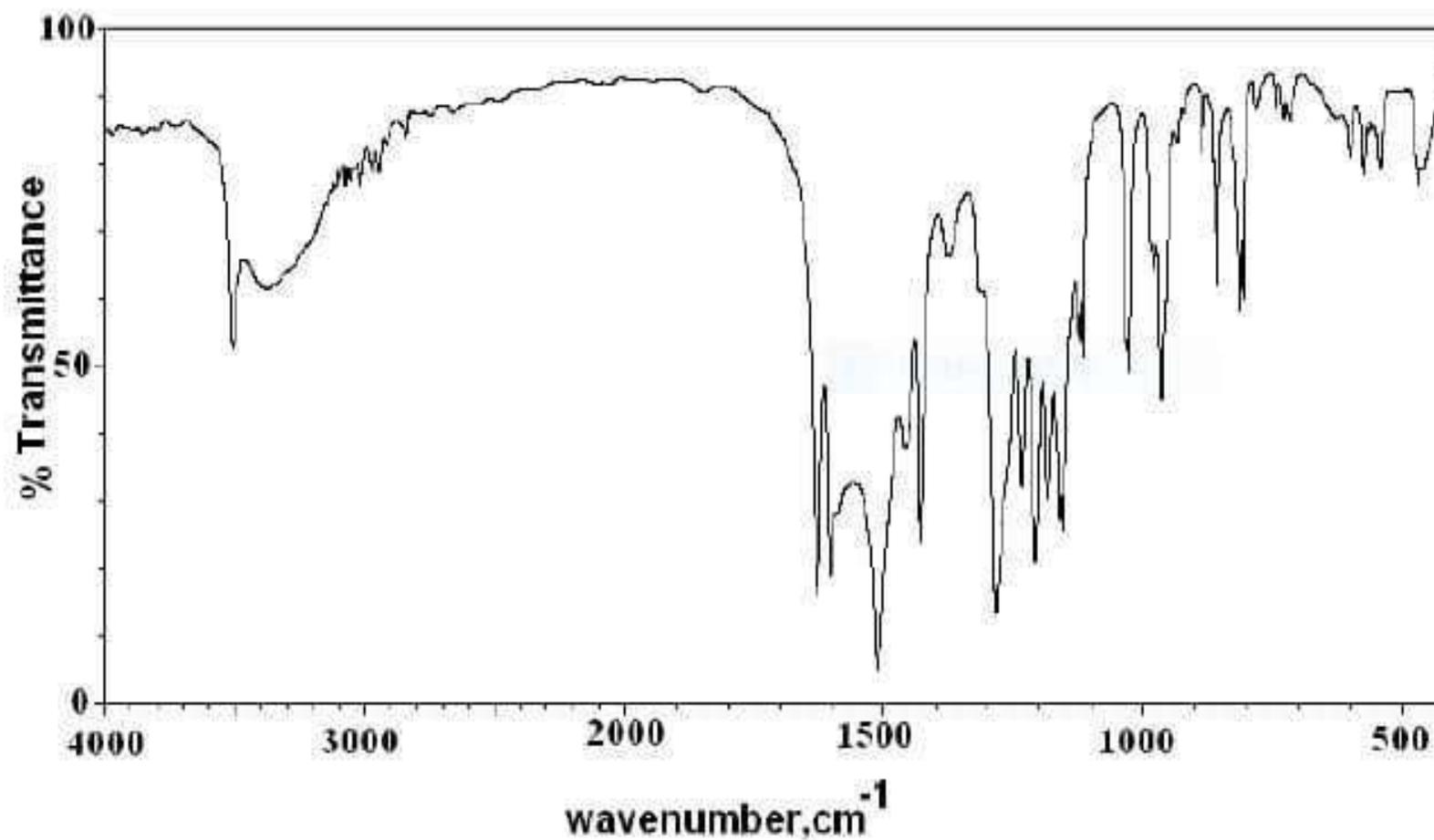
No. of Scans;
Resolution;

Date/Time; 09/02/2020 11:22:48.1
User; Admin

شكل (4.4): طيف الأشعة تحت الحمراء FT-IR للسلينيوم النانوي المتكون بواسطة الكركمين.



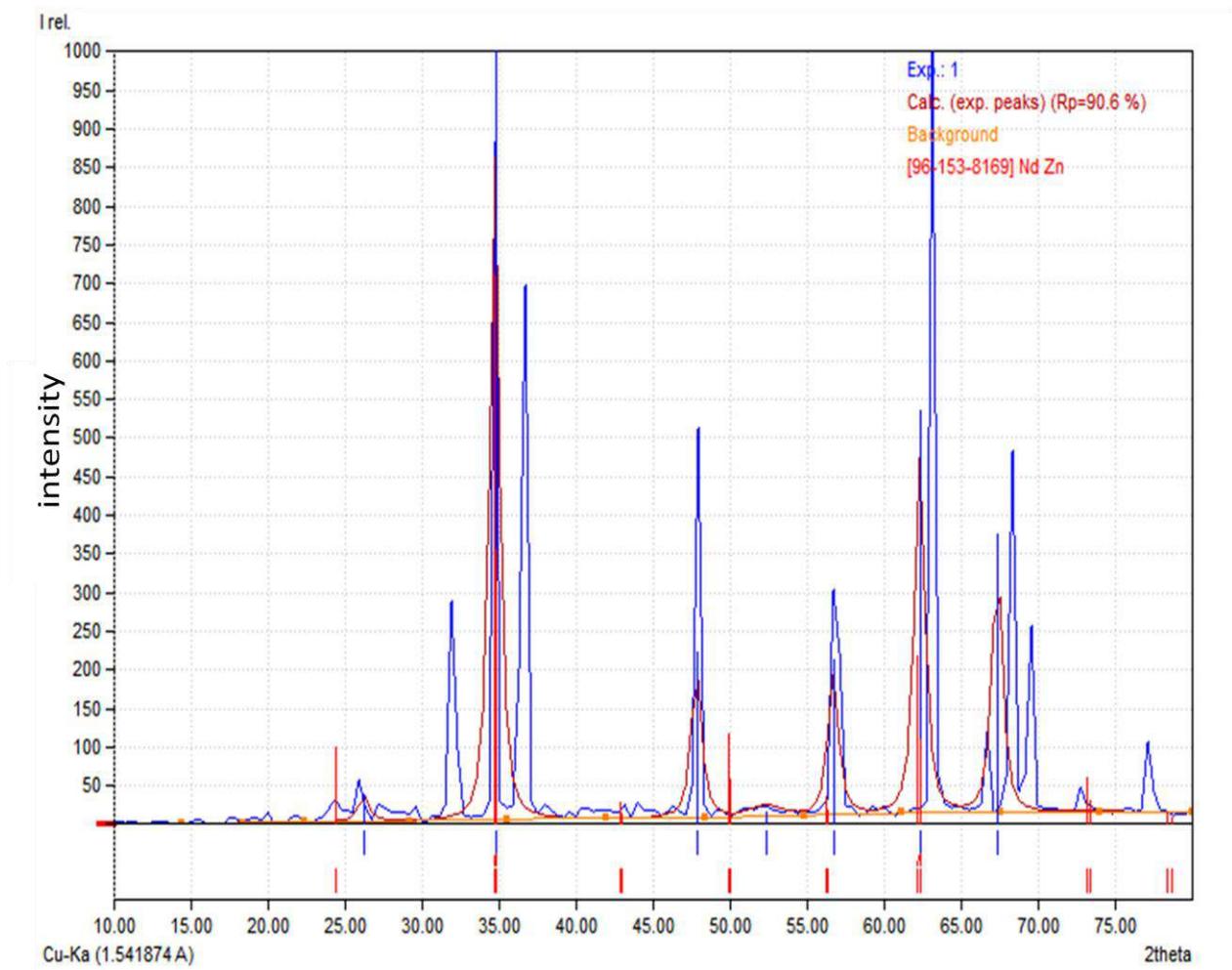
شكل (4.5): طيف الأشعة تحت الحمراء FT-IR لأكسيد الزنك النانوي المتكون بواسطة الكركمين.



شكل (6.4): طيف الأشعة تحت الحمراء FT-IR للكرمين. (Ismail *et al.*, 2014)

5.1.4. طيف حيود الاشعة السينية (XRD) للمركب النانوي Cur/Zno Nps :

نلاحظ أن الطيف الموجود في الشكل رقم (7.4) هو عبارة عن اوكسيد الزنك ولم يتضح الكركمين بين الطبقات ولم يعطي كرسنالات لربما لكونه محشور بشكل افقي فلا يعطي ارتفاع للكرسنالات ولكنها شديدة الوضوح بالنسبة لاوكسيد الزنك وهي عند الزوايا 34.73° , 47.81° , 52.33° , 56.71° , 62.33° , 67.36° , 1000.00 , 221.75 , 16.52 , 213.27 , 536.37 , وبمسافات بلوريه تبلغ 375.84 nm على التوالي وهناك زاوية واحده تدل على الكركمين عند 26.23° وبمسافة بلوريه 38.14 nm. وتتفق النتائج المتحصل عليها مع Annaraj *et al.* (2015).

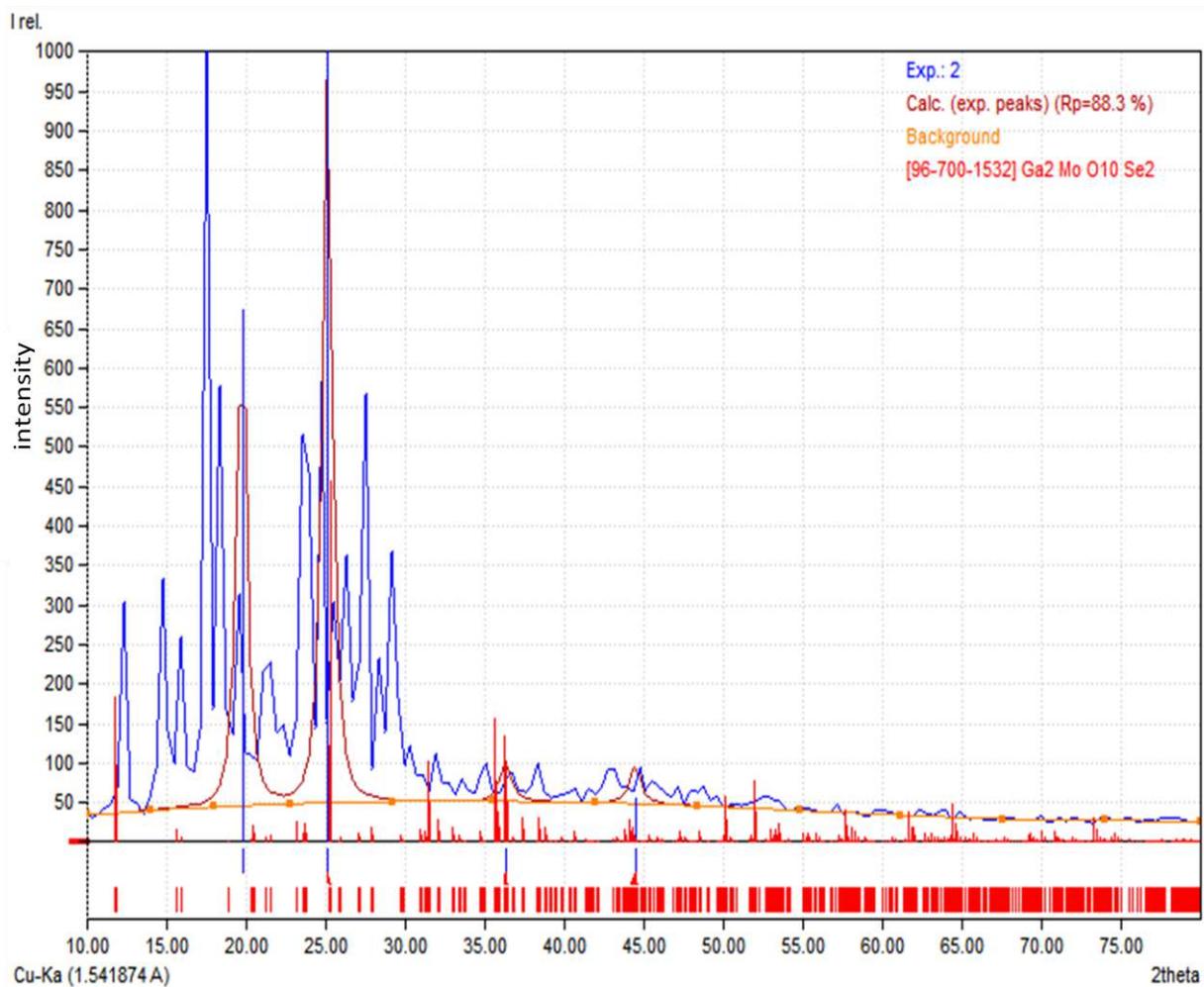


الشكل (7.4) : طيف حيود الاشعة السينية (XRD) لاوكسيد الزنك النانوي (ZnO) المتكون بواسطة الكركمين.

6.1.4. طيف حيود الاشعة السينية (XRD) للمركب النانوي Cur/Se Nps :

تمت دراسة طيف حيود الاشعة السينية للمركبان النانويان Cur-ZnO Nps و Cur-Se Nps لمعرفة الاختلاف في سمك الطبقة قبل و بعد عملية اقحام وباستعمال قانون براك .

يوضح الطيف في الشكل (8.4) أن الزوايا قبل 30° تدل على السلينيوم مما يعني ان الكركمين قد اختزل السلينيوم الى مركب نانوي وظهرت الحزم العائده له بصوره واضحة وحادة , وهي 19.72° , 25.13° , 36.33° , 44.44° وبمسافة بلوريه 674.80, 1000.00, 53.91, 55.07 nm على التوالي .



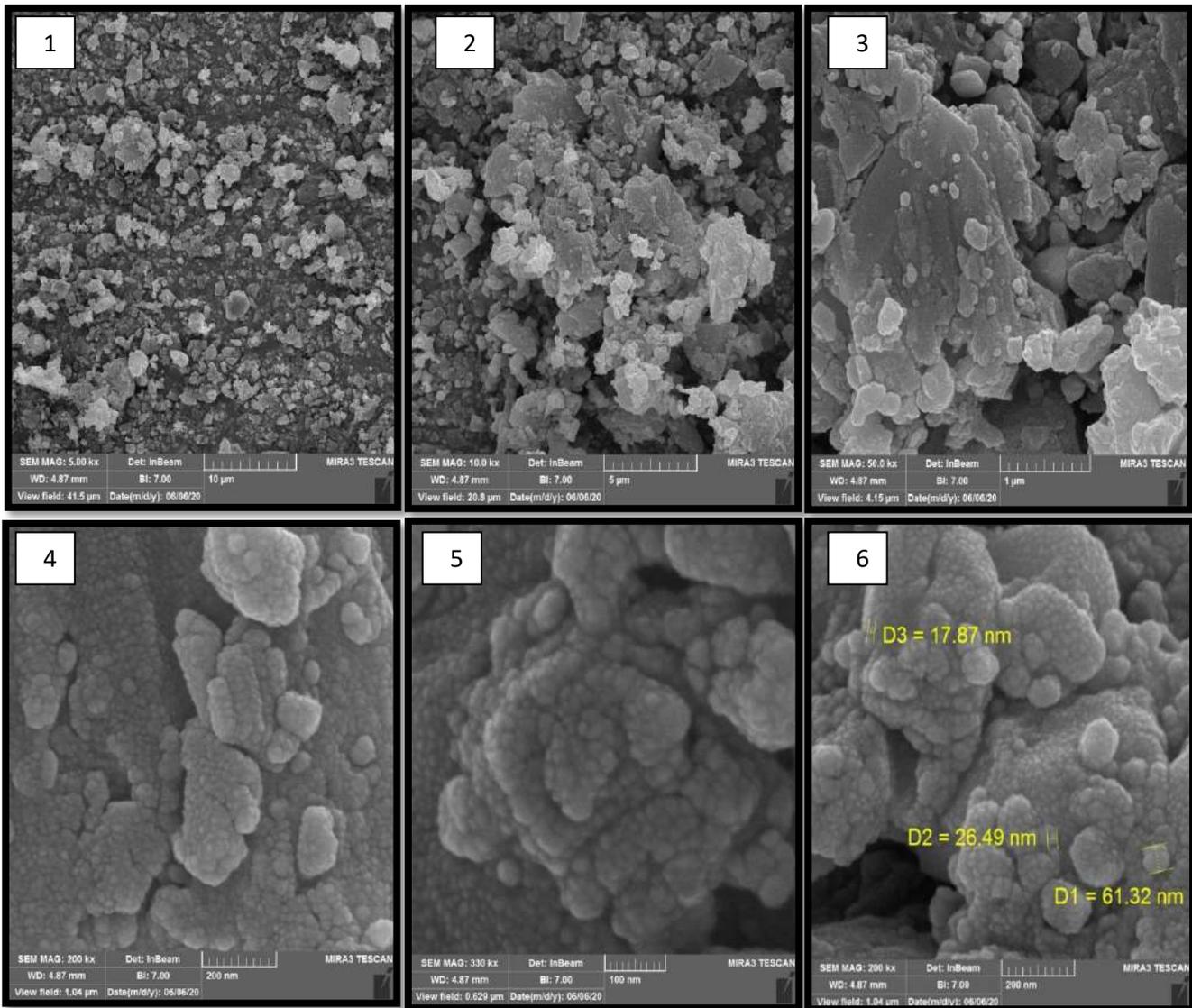
الشكل (8.4) : طيف حيود الاشعة السينية (XRD) للسلينيوم النانوي (Se) المتكون بواسطة الكركمين.

7.1.4. المجهر الالكتروني الماسح (SEM) للمركب النانوي Cur/Zno Nps :

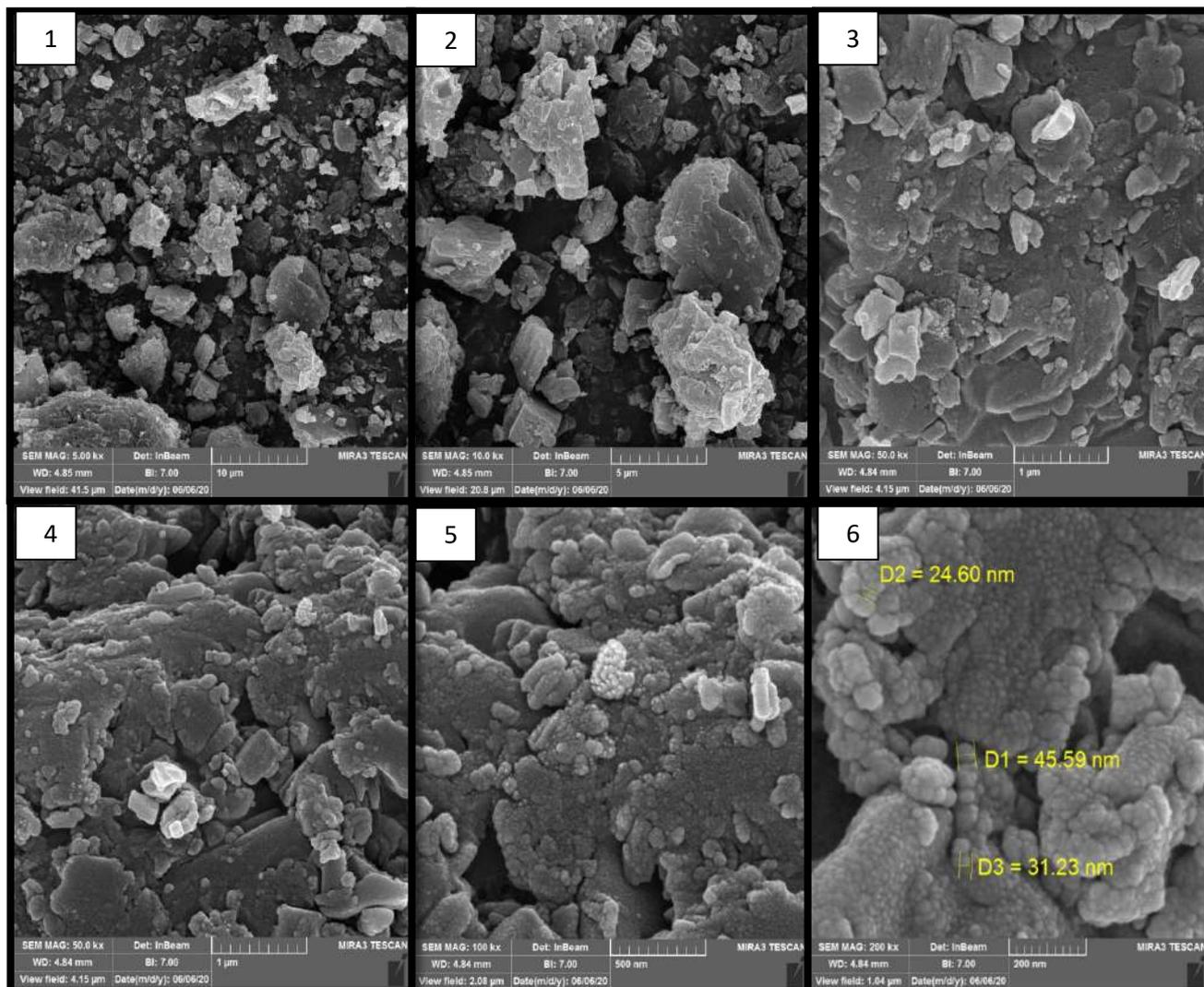
يظهر في الشكل رقم (9.4) مظهر الـ ZnO كبلوره hexagonal , وظهرت بشكل طبقات من اوكسيد الزنك ربما محشور بينها الكركمين ولكن ليس واضح تماما , وظهرت لنا حبيبات اوكسيد الزنك واضحة التركيب على السطح ويتفق هذا مع ما توصل اليه . Khalil *et al.* (2014) , تم اخذ جزيئه واحده حصرها بين خطين وتم حساب قطرها وهي عند d1 تكون 61.32 nm وعند d2 تكون 26.49 nm وعند d3 تكون 17.37 nm دلالة على حدوث اختزال لوجود جزيئات اوكسيد الزنك مختلفة الحجم مما يعني ان الكركمين قام باختزال اوكسيد الزنك (ZnO) لجزيئات ذات احجام مختلفة ,

8.1.4. المجهر الالكتروني الماسح (SEM) للمركب النانوي cur-se Nps :

في شكل رقم (10.4) تتضح طبقات السلينيوم المترسب المختزل على شكل كرساتلات واضحة و تكون هذه الطبقات متراكبة فوق بعضها البعض و فوق الطبقات حبيبات او كرات تابعه للسلينيوم النانوي بصورة تجمعات على شكل زهرة القرنبيط , تم اخذ كرات معينه وحصرها بين خطين وكانت القياسات في d1 تكون 45.59 nm و d2 تساوي 24.60 nm وعند d3 تساوي 31.23 nm دلالة على أن الاختزال غير متجانس ويظهر حجوم جزيئيه بين (24-45 nm) فهذا يبين ان الاختزال إما يكون بشكل سلينيوم ميتالز (selenium metal) او اوكسيد السلينيوم (selenium dioxide) .



شكل (9.4): المركب النانوي cur-zno Nps تحت المجهر الإلكتروني الماسح (SEM). (1) يظهر الـ ZnO كبلوره hexagonal , (2) بشكل طبقات من الزنك او كسايد ربما محشور بينها الكركمين ولكن ليس واضح تماما (3) تظهر لنا حبيبات اوكسيد الزنك واضحة التركيب على السطح ، (4) و(5) تظهر شكل نهايات البلورات السداسيه ، (6) تم اخذ جزيئه واحده و حصرها بين خطين وتم حساب قطرها وهي عند d1 تكون 61.32 nm وعند d2 تكون 26.49 nm وعند d3 تكون 17.37 nm



شكل (10.4): المركب النانوي cur-se Nps تحت المجهر الالكتروني الماسح (SEM). (1) توضح طبقات السلينيوم المترسب المختزل على شكل كرساتلات واضحة , (2) نلاحظ تكبير الصورة ووضوح الطبقات المتراكبة فوق بعضها البعض , (3) و(4) تم تكبير الطبقات وظهرت فوق الطبقات حبيبات او كرات تابعه للسلينيوم النانوي , (5) تكون فيها تجمعات الكرات على شكل زهرة القرنبيط , (6) تم اخذ كرات معينه وحصرها بين خطين وكانت القياسات في $d1$ تكون 45.59 nm و $d2$ تساوي 24.60 nm وعند $d3$ تساوي 31.23 nm

2.4. عزل وتشخيص انواع البكتريا المعزولة :

تم الحصول على نوعين من البكتريا احدهم موجب لصبغة غرام *S. aureus* و الاخرى سالبه لصبغة غرام *P. aeruginosa* وبواقع 50 عزله لكل نوع بكتيري وقد تم استعمال نوعين من المضادات الحيوية وهي Imipenem وGentamycin للبكتريا السالبة لصبغه غرام و Vancomycin و ciprofloxacin للبكتريا الموجبه لصبغة غرام فضلا عن الكركمين والمركبين النانويين . وقد كانت العزلات من اصابات مختلفة من المرضى الراقدين في كل من مستشفى المسيب العام والمستشفى التركي والمستشفى الجمهوري في محافظة بابل وقد شملت عينات من الادرار ومسحات من الأنف والجروح , وقد كان عدد المسحات الكلي 130 مسحة . يشير (Patrida et al., 2010) الى ان الانف يعد موطن طبيعي لهذه البكتريا إما بشكل عابر او تستوطنه بشكل دائمى كجزء من النبيت الطبيعي (Normal flora) كما أشار Brett (1999). إلى امكانية الحصول على بكتريا الـ *S. aureus* من اجزاء اخرى من الجسم ولكن بشكل اقل من الانف الذي يعد المستوطن الرئيس لها ومن هذه المناطق هي الجلد و الجروح و الأذن و مجرى الدم و الادرار. اما بكتريا *P. aeruginosa* فقط شملت مسحات من اصابات الحروق وجروح العمليات وقد تم جمعها من المستشفى التركي في بابل . تشير أحد الدراسات إلى أن بكتريا الـ *P. aeruginosa* هي رابع اكبر مسبب لعدوى جروح العمليات (, Gales et al. , 2001) بينما كانت (50%) من نتائج Al-habib et al., (2011) تعود الى بكتريا *P. aeruginosa* وكانت معزولة من 90 مريضاً مصابين بحروق من الدرجة الثانية والثالثة

جدول (1-4): النسب المئوية لعزلات انواع البكتريا المعزولة من عينات سريره مختلفة .

اسم البكتريا	العينات السريره	عدد العينات	النتيجة الايجابية	النسبه المئوية (%)	النتيجة السلبية	النسبه المئوية (%)
<i>S.aureus</i>	انف	18	18	100	0	0
	ادرار	23	20	86	3	14
	جروح	25	12	48	13	52
اسم البكتريا	العينات السريره	عدد العينات	النتيجة الايجابية	النسبه المئوية (%)	النتيجة السلبية	النسبه المئوية (%)
<i>P.aeruginosa</i>	جروح	28	18	64	10	36
	حروق	36	32	88	4	12

1.2.4. تشخيص بكتريا *S. aureus* :

بعد الزرع على اغار الدم والحضن بدرجه 37 م لمدة 24 ساعة تم الحصول على مستعمرات دائرية ومحدبة وبراقة وذات لون أصفر- ذهبي .

اما الفحص المجهرى فقد ظهرت البكتريا بشكل مكورات موجبة لصبغة غرام متجمعة بشكل عناقيد (Clusters) وهذا دليل على انها تعود لجنس *S.aureus* (*Staphylococcus*) (Quinn et al. , 2004).

عند اجراء فحص الكاتليز وجد بان البكتريا منتجه لهذا الانزيم حيث تقوم بتحطيم بيروكسيد الهيدروجين (H₂O₂) وتحويله الى ماء وأوكسجين ويتضح ذلك عبر ظهور فقاعات غازيه عند وضع البكتريا فوق قطرة من بيروكسيد الهيدروجين . كما قد خمرت البكتريا المانتول عند زرعها عليه والذي يعد احد الاوساط التشخيصيه لبكتريا الـ *S. aureus*. وعندما اخضعت العزلات الى فحص التخثر (Coagulase) اعطت نتيجة موجبه وهذا يدل على انها بكتريا *S. aureus*. الجدول (2.4) يوضع الاختبارات المظهرية والكيموحيوية لبكتريا *S. aureus*

الجدول (2.4): الاختبارات المظهرية والكيموحيوية لبكتريا *S. aureus*

ت	الاختبار	النتيجة
1	صبغة غرام	+
2	المظهر تحت المجهر	خلايا كرويه بشكل عناقيد
3	اختبار الكاتليز	+
4	اختبار الاوكسيديز	-
5	اختبار التجلط	+
6	ظروف النمو	لاهوائيه اختياريه
7	تخمير المانتول	+

2.2.4. تشخيص بكتريا *P. aeruginosa* :

درست الصفات الزرعية و الكيموحيوية فضلاً عن العدة التشخيصية Api20e حيث ظهرت مستعمرات الجرثومة كبيرة و واضحة ولها رائحة تشبه رائحة العنب واغلبها منتجه للصبغة, تمت زراعة العزلات على وسط الماكونكي MacConkey agar إذ ظهرت المستعمرات بشكل شاحب دلالة على عدم قدرتها على تخمير سكر اللاكتوز (Baron et al.,2007), أما على وسط الستراميد الصلب Cetrinide agar الحاوي على الـ Cetrinide

بنسبة (0.03) فقد نمت العزلات اذ ان هذه النسبه لا تؤثر على جرثومة *P.aeruginosa* ولكن تثبط نمو باقي الجراثيم وقد ظهرت المستعمرات بالأصفر المخضر الذي يعود لإنتاج صبغة الـ(pyoverdine) او الازرق المخضر الذي يعود لإنتاج صبغة الـ(pyocyanin) والتي تتألق عند تعرضها للأشعة فوق البنفسجية (Uv-light (Sudhakar et al.,2015). اما عند زرعها على وسط اغار الدم الصلب blood agar فقد قامت بتحليل الدم تحللا كاملا β - lactamase (Procop et al.,2017). أما نتائج الفحص المجهرى بعد التصبيغ بصبغة غرام فقد ظهرت خلايا هذه الجرثومة بشكل خلايا عصويه سالبه لصبغة غرام وهذا يتفق مع ما ذكره (Cappuccino et al.,2018). يوضح الجدول(3.4) نتائج الفحوصات التي تم اجرائها يدويا .

الجدول (3.4) : الاختبارات المظهرية والكيموحيوية لبكتريا *P. aeruginosa*.

ت	الاختبار	النتيجة
1	صبغة غرام	-
2	المظهر تحت المجهر	عصوي
3	اختبار الاوكسيديز	+
4	النمو على وسط السترومايد	+
5	النمو على اغار الماكونكي	غير مخمره لسكر اللاكتوز
6	النمو على اغار الدم	B-hemolysis

وقد تم استعمال العدة التشخيصية Api 20e لإعطاء تشخيص دقيق وهو عبارة عن شريط بلاستيكي يحتوي على انابيب دقيقه تحتوي على مواد مجففة ويعد نظام فعال في تشخيص بكتريا الـ *P. aeruginosa* (Shayegani et al., 1978).

اذ تبين من خلال النتائج أن جميع العزلات المتحصل عليها في هذه الدراسة هي *P. aeruginosa* وذلك بعد تحليل النتائج ومقارنتها مع الفهرس الخاص بالاختبار. يمكن ملاحظة نتيجة الفحص الايجابي الـ Api20E لبكتريا الـ *P.aeruginosa* في الشكل (11.4).



الشكل (4. 11) النتيجة الموجبه لفحص الـ Api20E لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa*.

3.4. التركيز المثبط الادنى للمركبات النانويه (MIC) Minimal inhibitory concentration :

تم استخدام 6 تراكيز متسلسلة من المركبات النانويه (2000 , 1000 , 500 , 250 , 125 , 62.5) $\mu\text{g}/\text{mL}$ بواسطة طريقة التخفيف Broth dilution method , حيث كان الـ MIC للتركيزين 250 و 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ لكل من بكتريا *S.aureus* و *P.aeruginosa* على التوالي . ذكرت احدى الدراسات ان الـ MIC للتركيزين بشكله المنفرد يتراوح من 125 - 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ وأبلغت دراسة اخرى ان الـ MIC للتركيزين على بكتريا *S.aureus* قد بلغ 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Gunes et al. 2013). بينما بكتريا *P.aeruginosa* فقد كان الـ MIC لها 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ حسب ما ذكر (Asadian et al., 2019). و 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ حسب ما ذكر (Gholami et al. (2020). اما الـ Cur/Zno NPs فقد اعطى 1000 و 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ لكل من بكتريا *S.aureus* و *P.aeruginosa* على التوالي . أشارت الدراسات السابقة بأن نسبة الـ MIC للـ Cur/Zno NPs على بكتريا *S.aureus* هو 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Reddy et al., 2007) , بينما كان الـ MIC للـ Cur/Se NPs هو 125 و 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ لكل من بكتريا *S.aureus* و *P.aeruginosa* على التوالي. اما (Boroumand et al. (2019) فقد أشار إلى أن الـ MIC على *S.aureus* كان 125 و 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ عند استعمال الـ Ascorbic acid كعامل مختزل للسليينيوم بدلا عن الـ الكركمين .

4.4. اختبار حساسية عزلات بكتريا الـ *S. aureus* للمركبات النانوية :

تشير النتائج في الجدول (4.4) إلى أن تأثير الكركمين الحر على بكتريا الـ *P.aeruginosa* قد أعطى تثبيطاً جيداً عند تركيز 2 ملغم/مل والذي كان 12.2 ملم بينما على بكتريا الـ *S. aureus* فقد أعطى الكركمين عند نفس التركيز تثبيطاً مقداره 13.7 ملم ويمكن ملاحظة الاقطار التثبيطية في شكل (12.4) . وكانت هذه النتائج مشابهة لما توصل اليه (Oves et al., 2020). اما (Perera et al. (2020) فقد اعطت نتائجهم اقطار تثبيطية مقدارها 8.1 ± 0.4 و 8.8 ± 0.2 ملم عند استعمال 5 غم/مل من الكركمين على نفس البكتريا ,انت نتائج الـ *S. aureus* بما يتفق مع تلك التي وصل اليها اخرون حيث انها واحده من اكثر البكتريا تأثراً بالكركمين (Teow et al., 2016). كما أنه قد ثبت أن للكركمين تأثير مضاد للبكتريا إذ أظهر قدرته على اضعاف الغشاء البكتيري مهما كانت حالته بالنسبة لصبغة غرام مؤديا الى تحلله (Tyagi et al., 2015) .

اما الـ Cur/Zno فقد أعطى قطر تثبيطي مقداره 7.5 ملم على بكتريا الـ *P.aeruginosa* و اعلى من ذلك 8.1 ملم ضد الـ *S. aureus* نجد ان نسبة التثبيط للـ Cur/Zno اعلى من الكركمين لوحده ومن الجدير بالذكر ان تحضير المادة النانوية كانت باستعمال 1 غم من الكركمين الى 1 غم من اوكسيد الزنك اي ان تركيز الكركمين الحر كان ضعف تركيزه في المركب النانوي Cur/Zno, هذا يعني ان هناك زيادة في تأثير المركب النانوي على البكتريا مقارنة مع الكركمين لوحده .تكون هذه الزيادة ناتجة من الفعل التآزري بين الكركمين واوكسيد الزنك . و تشير دراسة (Perera et al.(2020) بان درجة فعالية المواد النانوية تعتمد على الحجم لذلك فان المادة النانوية تعطي نتائج افضل من المادة الحرة فقد كانت نتائج تثبيط Cur/Zno Nps عاليه مما يشير الى ان هناك تأثيراً تآزرياً بين أوكسيد الزنك والكركمين لذلك فهذا المزيج يمكن استخدامه كمضاد بكتيري وعقار طبي , وقد كان معدل قطر منطقة التثبيط 15.4 و 17 ملم على بكتريا *S.aureus* عند استعمال 5 ملغم/مل .

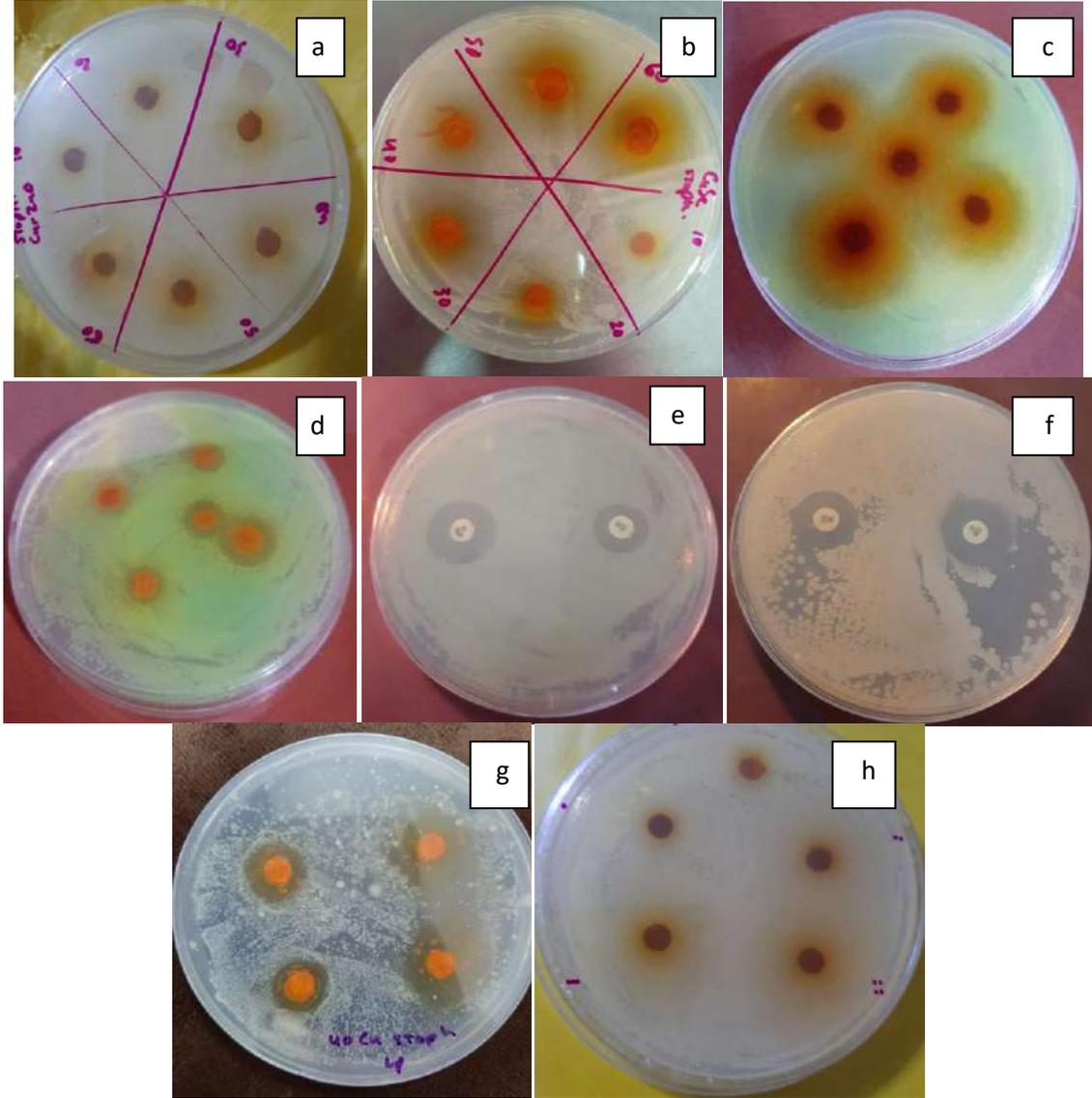
ان الكركمين كاره للماء لذلك فهو يرتبط بقوه بالغشاء البكتيري ويوفر فرصة لزيادة نشاط وفعالية المركبات النانوية (Snigdha et al., 2017) تشمل الاليات الرئيسية المقترحة للـ Cur/Zno Nps تدمير الخلايا البكتيرية من خلال توليد انواع الاوكسجين التفاعليه وإطلاق او تحرير الايونات للزنك (Zn_2) (Augustine et al.,2014؛Sirelkhatim et al.,2015). وبهذا فان كل من الكركمين و اوكسيد الزنك ممكن ان يعملوا بشكل تآزري ليؤديان الى تأثير مضاد ومثبط لـ *S.aureus* (Snigdha et al., 2017) .

من الممكن أن يكون لمركب اوكسيد الزنك النانوي تأثيرات سميّة عند التراكيز العالية وكذلك فان الكركمين من جانب اخر على الرغم من خصائصه العلاجية إلا ان لديه توافر بيولوجي ضعيف (Rasmussen et al. 2010). وبهذا فقد تم الاستفادة في الدراسة الحالية من افضل ما في كلا المادتين من تأثير علاجي حتى في التراكيز المنخفضة , علما أن استخدام تراكيز أقل من هذه المواد يقلل او يلغي السمية الناتجة عنه .

اعطى السلينيوم معدل تثبيط جيد وهي 10.1 ملم ضد بكتريا *P.aeruginosa* أما ضد بكتريا *S.aureus* فقد أعطى معدل تثبيطي 11.6 ملم وتعدّ نسبة التثبيط هذه الاعلى من بين المواد المستعمله في الدراسة . مؤخرا أشارت البحوث إلى أن جسيمات السلينيوم النانويه تعطي تأثيرا جيدا ضد بكتريا *S.aureus* (Srivastava & Mukhopadhyay, 2015). السلينيوم النانوي المحضر بالطرق الخضراء green synthesis والمختزل بواسطة الـ Ascorbic acid اعطى اقطارا تثبيطية تقدر بـ 9.25 و 10.75 لكل من بكتريا *P.aeruginosa* و *S.aureus* على التوالي حسب ما حصل عليه (Boroumand et al. 2019). نلاحظ مما سبق ان الكركمين والمواد النانويه المستخدمه في بحثنا كان تأثيرها اقوى على البكتريا الموجبه لصبغة غرام (*Staphylococcus aureus*) مما هو على البكتريا السالبه لصبغة غرام (*pseudomonas aeruginosa*) وهذا يتفق مع نتائج (Sivasothy et al. 2019) و (Polaquini et al. 2019) و (2020) Adamczak et al.

ويعتقد بان هذا الاختلاف في التأثير ينتج عن الاختلاف في بنية وتكوين الجدار الميكروبي (Karpiński et al., 2019). إذ إن خلايا البكتريا الموجبه لصبغة غرام محاطة بطبقة سميكة من الـ peptidoglycan بالإضافة الى الاحماض الدهنية lipoticoic acid لكنها لا تحتوي على غشاء خارجي outer membrane, إذ ان الغشاء الخارجي في البكتريا السالبه لصبغة غرام مسؤول إلى حد كبير عن مقاومتها لمجموعه واسعه من المضادات الحيوية (Adamczak, 2020).

يمكن الملاحظة أيضا في الجداول رقم (4.4)(5.4) بان هناك علاقة طردية أي كلما زاد التركيز زادت نسبة التثبيط وهذه النتيجة تؤكد ما وصل اليه (Rajeshkumar et al. 2018).



شكل (12.4) الفعالية التثبيطية لكل المركبات المستعملة في البحث على اغار Mullar hinton
p.aeruginosa (c+d). cur/zno Nps + cur/se Nps on *s.aureus* . (a+b).
 . CN+IMP. Antibiotic on *p.aeruginosa* (e).cur/zno Nps + cur/se Nps on
 cur on (h). cur on *s.aureus* (g) *s.aureus* .CIP.+VA. Antibiotic on (f)
p.aeruginosa

جدول (4.4): الفعالية التثبيطية والتراكيز لمركب الكركمين و Cur/Zno Nps و Cur/Se و Nps و IMP.10 و GN.30 تجاه بكتريا *Pseudomonas aeruginosa*.

نوع البكتريا	الماده	التركيز (mg/ml)	معدل مناطق التثبيط (مم)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	curcumin	2	12.22±1.44
	curcumin/zno NPs	2	7.57±1.03
		4	9.37±1.11
		6	11.13±1.19
		8	*12.93±1.22
	curcumin/selenium NPs	2	10.13±1.47
		4	13.13±1.51
		6	15.97±1.79
		8	*18.96±1.36
	imipenem10	2	24.56±4.37
	Gentamycin 30	2	16.88±4.44

جدول (5.4): الفعالية التثبيطية والتراكيز لمركب الكركمين و Cur/Zno Nps , Cur/Se و Nps ,VA30, CIP10 تجاه بكتريا *Staphylococcus aureus*.

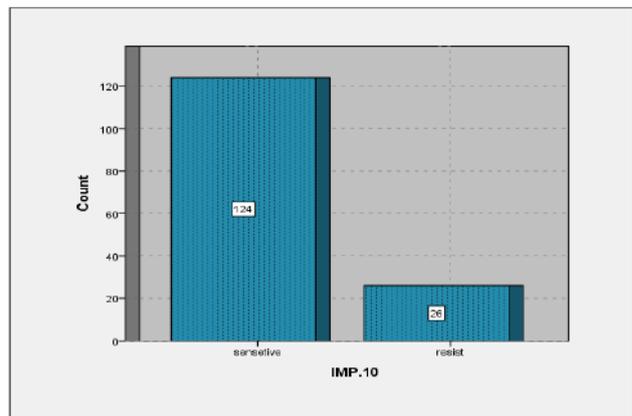
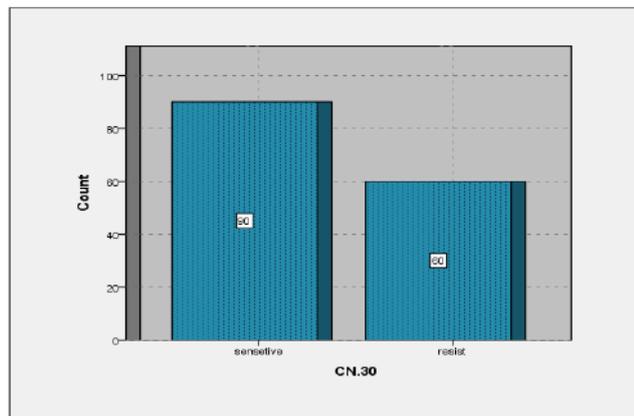
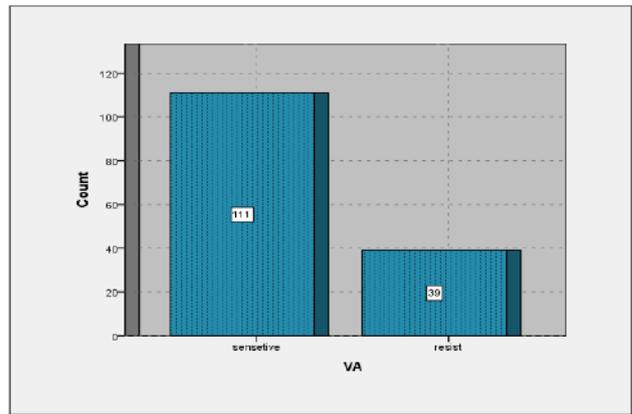
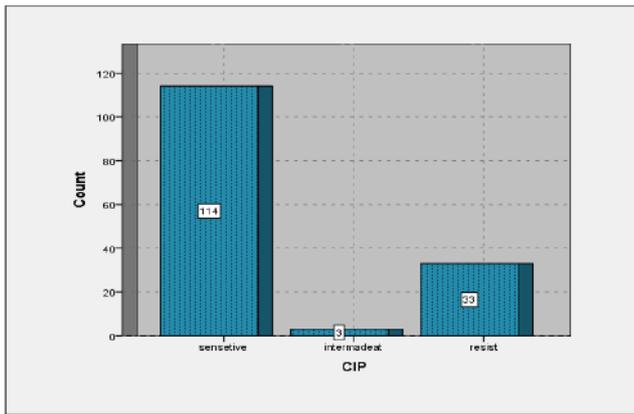
نوع البكتريا	الماده	التركيز (mg/ml)	معدل مناطق التثبيط (مم)
<i>Staphylococcus aureus</i>	curcumin	2	13.77±1.17
	curcumin/zno NPs	2	8.13±0.97
		4	10.12±1.09
		6	12.06±1.05
		8	*13.87±0.97
	curcumin/selenium NPs	2	11.60±1.11
		4	14.38±1.32
		6	17.35±1.14
		8	*20.54±1.60
	vancomycin 30	2	17.69±5.83
	ciprofloxacin10	2	22.18±6.97

5.4. المقارنه بين التأثير التثبيطي للمركبات النانويه مع المضادات الحيويه :

بعد مقارنة معدلات قيم اقطار التثبيط للمضادات الحيويه , vancomycin 30 , Gentamycin 30 , Cur/Zno Nps , Cur/Se Nps وجد بأن المركبات النانويه ciprofloxacin10 , imipenem10 مثبتات جيدة لنمو البكتريا وتظهر نشاطا مضادا للبكتريا مشابها لنشاط المضادات الحيويه المدروسة وذلك في تراكيز معينه , حيث كانت نتائج الـ Cur/Zno Nps قريبة من نتائج المضاد الحيوي Gentamycin 30 عند تركيز 8 ملغم/مل وتقترب نتائج الـ Cur/Se Nps من نتائج المضاد الحيوي imipenem10 كما مبين في الجدول رقم (4.4) , وهذا بالنسبة لبكتريا *P. aeruginosa* . أما بكتريا *S. aureus* فقد كانت نتائج الـ Cur/Zno Nps تقترب من نتائج المضاد الحيوي vancomycin 30 . ونتائج المركب النانوي cur/se Nps تقترب من نتائج المضاد الحيوي ciprofloxacin10 . ويمكن ملاحظة النسبة المئوية لحساسية ومقاومة البكتريا للمضادات الحيويه في الجدول رقم (6.4) والشكل رقم (13.4).

جدول رقم (6.4) النسب المئوية لحساسية ومقاومة البكتريا للمضادات الحيويه قيد الدراسة .

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		Observed N	النسبه (%) المنويه)	Q2	p.value
IMP.10	sensetive	124	0.83	64.03	0.00
	resist	26	0.17		
GN.30	sensetive	90	0.60	6.00	0.01
	resist	60	0.40		
<i>Staphylococcus aureus</i>		Observed N	النسبه (%) المنويه)	Q2	p.value
VA	sensetive	111	0.74	34.56	0.00
	resist	39	0.26		
CIP	sensetive	114	0.76	131.88	0.00
	intermadeat	3	0.02		
	resist	33	0.22		



الشكل (13.4) حساسية ومقاومة البكتريا للمضادات الحيوية قيد الدراسة .

الاستنتاجات والتوصيات

Conclusions

&

Recommendations

**الاستنتاجات والتوصيات
Conclusions and Recommendations**

الاستنتاجات :

1. اثبتت المركبان النانويان (Cur/Zno Nps) (Cur/Se Nps) كفاءه عالية في تثبيط انواع البكتريا المدروسة وكانت هذه الكفاءة مقارنة لكفاءة المضادات الحيوية لذلك فأن هذه المركبات يمكن استخدامها كمضاد بكتيري وعقار طبي .
2. يعد المركبان النانويان (Cur/Se Nps) و (Cur/Zno Nps) بديلان للمضادان الحيويان Imipenem و Gentamicin على التوالي لما ظهر من تقارب في تأثيراتهم التثبيطية للنمو البكتيري *In vitro* على بكتريا *P.aeruginosa* .
3. يعد المركبان النانويان Cur/se Nps و Cur/zno Nps بديلان للمضادان الحيويان Ciprofloxacin و Vancomycin على التوالي لما ظهر من تقارب في تأثيراتهم التثبيطية للنمو البكتيري *In vitro* على بكتريا *S. aureus* .
4. اثبتت الدراسة بان البكتريا الموجهه لصبغة غرام *S.aureus* اكثر تأثرا من البكتريا السالبه لصبغة غرام *p.aeruginosa* بالركمين والمركبان النانويان المدروسان .

التوصيات :

1. تحضير مركبات نانويه اخرى وتقييم كفاءتها التثبيطية ضد بكتريا الزائفة الزنجارويه والمكورات العنقوديه .
2. تقييم الفعل التثبيطي للمضادات النانويه (Cur/Zno Nps)(Cur/Se Nps) على انواع اخرى من البكتريا .
3. اختبار تأثير الكركمين داخل الجسم الحي *In vivo* .
4. دراسة تأثير الكركمين كمضاد للاكسدة.
5. دراسة تحميل مضادات حيوية على سطوح المركبات النانويه .
6. دراسة التأثير التآزري للمركب النانوي مع المضاد المحمل

المصادر

References

المصادر العربية:

الدوري، هيلين صباح صديم (2016). دراسة بكتريولوجية جزيئية لبكتريا المكورات العنقودية المقاومة للمثيسلين المعزولة من مصادر مختلفة. جامعة تكريت ، كلية العلوم , العراق ، رسالة ماجستير، 92

الراوي , خاشع محمود (1984) . المدخل الى الاحصاء . جامعة الموصل , كلية الزراعة والغابات (الطبعة الثانية).

الياسري، إسرائ كتاب، الشامي، زينة محمد و النفاخ، رنا طالب (2007). دراسة بكتريولوجية لعزل وتشخيص بكتريا المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* المتعددة المقاومة للمضادات الحيوية والمعزولة من عينات سريرية مختلفة في محافظة النجف.مجلة كلية الطب. جامعة الكوفة،العراق . 9 .

سهام، تي ونرجس، ممادي (2019). تحضير، تشخيص ، و الفعالية البايولوجية لجسيمات اكسيد الجرافين GO النانوية المفعول ب ZnO. جامعة الشهيد حمه لخضر- الوادي-، كلية العلوم , الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية , الدقيقة رسالة ماجستير، 103.

شمخي، انتصار عبد الجليل و عمر، عبد الكريم فتاح (2016). عزل وتشخيص بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* من المرضى البالغين المصابين بالتهاب الاذن الوسطى القبحي وتحديد مقاومتها لمضادات الحيوية وايجاد محتواها من G+%. مجلة جامعة تكريت للعلوم الصرفة , العراق . 21(5) : 19-23

علي، انور الحاج و يازجي، صباح (2011). عزل بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* و تشخيصها من ترب سورية ملوثة بالزيت وتقييم إنتاجها لأنزيم الليياز. مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية. 27(1) : 229-242

نجم، شيماء سهيل و فليح، مي طالب (2013). استخلاص و تنقية انزيم Staphylolysin المنتج من بكتريا *Pseudomonas aeruginosa*. المجلة العراقية للعلوم. 54 (4) : 1010-1017 .

- Abdallah, N. A., Abd El-Rahman, R. Z., Amer, A. K. and Ismaeel, L. I. M. (2013). Antibacterial activity of some plant extracts on the treatment of surgical wounds infection. *Egyptian Journal of Experimental Biology*. (Bot.), 9(1): 115 – 124 p.
- Adam-Dima, E.-I., Ilie, M., & Purdel, C. (2018). Premises for the therapeutic use of selenium nanoparticles in oxidative stress-associated diseases. *Revista Romana de Materiale*, 48(3), 290–300
- Adamczak, A. (2020). Curcumin , a Natural Antimicrobial Agent with Strain-Specific Activity. 1–12
- Ahmad, A., Wei, Y., Syed, F., Tahir, K., Ur Rehman, A., Khan, A., Ullah, S., and Yuan, Q. (2017). The effects of bacteria-nanoparticles interface on the antibacterial activity of green synthesized silver nanoparticles. *Microbial Pathogenesis*. 102 : 133-142 p
- Al-Bahry, S. N., Mahmoud, I. Y., Al-Musharafi, S. K. and Sivakumar, N. (2014). *Staphylococcus aureus* Contamination during Food Preparation, Processing and Handling. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*. 5 (5) : 388-392 p
- Al-habib, H. M., Al-gerir, A. Z., & Hamdoon, A. M. (2011). *Profile of Pseudomonas aeruginosa in burn infection and their antibiogram study*. 37(1).
- Alhazmi, A. (2015). *Pseudomonas aeruginosa – Pathogenesis and Pathogenic Mechanisms*. *International Journal of Biology*. 7 (2): 44-67 p

- Al-mohanna, M. T. (2016). Bacteria Viruses and Simple Organisms
Bacterial introduction. Chapter 34 : 679-692 p
- Al-mohanna, M. T. (2017). Bacterial introduction. (March 2016).
- Altunatmaz, S. S., Aksu, F. Y., Issa, G., Kahraman, B. B., Altiner, D. D., &
Buyukunal, S. K. (2016). Antimicrobial effects of curcumin against and
E . coli O157 : H7 pathogens in minced meat. 2016(37196), 256–262.
- Altunatmaz, S. S., Aksu, F. Y., Issa, G., Kahraman, B. B., Altiner, D. D. and
Buyukunal, S. K. (2016). Antimicrobial effects of curcumin against *L.*
monocytogenes, *S. aureus*, *S. Typhimurium* and *E. coli* O157:H7
pathogens in minced meat. *Veterinarni Medicina*. 61 (5): 256–262 p
- Al-ugaili, D., Fadhil, A. M. A., & Wohaieb, S. A. (2014). Potential Activity
of Zinc Oxide Nanoparticles and Ethanolic Olive Leaf Extract
Potential Activity of Zinc Oxide Nanoparticles and Ethanolic Olive
Leaf Extract Against Oxacillin Resistant *Staphylococcus aureus* in
vitro. (September 2017).
- Annaraj, J., Dhivya, R., Ranjani, J., Rajendhran, J., & Rajasekaran,
M.(2015). pH responsive curcumin / ZnO nanocomposite for drug
delivery.6(6),505-512.
- Akinyemi, K., Oluwa, O., & Omomigbehin, E. (2006). Antimicrobial
activity of crude extracts of the three medicinal plants used in South-
West Nigerian folk medicine on some food borne bacterial pathogens.
*African Journal of Traditional, Complementary and Alternative
Medicines* (ISSN: 0189-6016) Vol 3 Num 4, 3.

- Asadian, E., Azimi, T., Hashemi, A., & Sharahi, J. Y. (2019). Evaluation of Nano-curcumin effects on expression levels of virulence genes and bio film production of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn wound infection in.
- Augustine R, Malik HN, Singhal DK, Mukherjee A, Malakar D, Kalarikkal N, Thomas S (2014) Electrospun polycaprolactone/ZnO nanocomposite membranes as biomaterials with antibacterial and cell adhesion properties. *J Polym Res* 21:1.
- Awan, A. B., Sarwar, Y., Schierack, P., Ali, A., Böhm, A., Schiebel J. and Nitschke, J. (2019). Association of biofilm formation and cytotoxic potential with multidrug resistance in clinical isolates of *pseudomonas aeruginosa*. *EXCLI Journal*. 18:79-90 p
- Baron, E. J. ; Finegold, S. M. and Peterson, I. L. R., Bailey and Scotts Diagnostic Microbiology. 9th ed. Mosby Company. Missouri (2007).
- Bassetti, M., Vena, A., Righi, E., Croxatto, A. and Guery, B. (2018). How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs in Context*. 7: 18 p
- Bashi, A. M., Zobir, M., Zainal, Z., & Tichit, D. (2013). Journal of Solid State Chemistry Synthesis and controlled release properties of 2, 4-dichlorophenoxy acetate – zinc layered hydroxide nanohybrid. *Journal of Solid State Chemistry*, 203, 19–24

- Bien, J., Sokolova, O. and Bozko, P. (2011). Review Article: Characterization of Virulence Factors of *Staphylococcus aureus*: Novel Function of Known Virulence Factors That Are Implicated in Activation of Airway Epithelial Proinflammatory Response. *Journal of Pathogens*. ID 601905 : 13 p
- Boroumand, Safieh; Safari, Mojdeh; Shaabani, Elnaz; Shirzad, Mahdieh; Faridi-Majidi, Reza (2019). Selenium nanoparticles: synthesis, characterization and study of their cytotoxicity, antioxidant and antibacterial activity. *Materials Research Express*.
- Brett , M. (1999) . Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* in New Zealand in 1999.A report prepared for Ministry oh Health as part of the 1998/1999 contract (project C8) .
- Brüning, J., Praditya, D., Steinmann, E., Kirchhoff, L., Rachmawati, H. and Steinmann, J. (2019). Anti-infective Properties of the Golden Spice Curcumin. *Frontiers in Microbiology*. 10(912) : 16 p
- Cappuccino, J. G., and Welsh, C. T., *Microbiology: A Laboratory Manual*. 11th ed. Pearson Education. England (2018).
- Chauhan, R., Reddy, A., & Abraham, J. (2015). Biosynthesis of silver and zinc oxide nanoparticles using *Pichia fermentans* JA2 and their antimicrobial property. 6(3) 63–71.
- Christian, P., Von der Kammer, F., Baalousha, M. and Hofmann, T. (2008). Nanoparticles: structure, properties, preparation and behavior in environmental media. *Ecotoxicology*. 17: 326–343 p

- Czernicka, L., Marzec, Z., 1, Grzegorzcyk, A., Malm, A., Antosiewicz, B. and Kukula-Koch, W. (2019). Article Antimicrobial Potential of Single Metabolites of *Curcuma longa* Assessed in the Total Extract by Thin Layer Chromatography-Based Bioautography and Image Analysis. *International Journal of Molecular*.20 (898) ; 12p
- Darby, C. (2005). Interactions with microbial pathogens. Worm Book, ed. The *C. elegans* : 15p
- Deepa, B. and Ganesan, V. (2013). Biogenic synthesis and characterization of selenium nanoparticles using the flower of *Bougainvillea spectabilis* willd. *International Journal of science and research*. 4: 2319- 7067
- Dhivya R, Ranjani J, Rajendhran J, Rajasekaran M, Annaraj J (2015) pH responsive curcumin/ZnO nanocomposite for drug delivery. *Adv Mater Lett* 6:505–512.
- El-baz, R., Rizk, D. E., Barwa, R. and Hassan, R. (2016). Virulence factors profile of *Staphylococcus aureus* isolated from different clinical sources. *N. Egyptian Journal of Microbiology*. 43 : 126-144 p
- Emami-Karvani, Z. and Chehrazi, P. (2011). Antibacterial activity of ZnO nanoparticle on gram positive and gram-negative bacteria. *African Journal of Microbiology Research*. 5(12): 1368-1373 p.
- Fan, Dabei; Li, Li; Li, Zhizhen; Zhang, Ying; Ma, Xiaojun; Wu, Lina; Zhang, Haohao; Guo, Feng (2020). Biosynthesis of selenium nanoparticles and their protective, antioxidative effects in streptozotocin induced diabetic rats. *Science and Technology of Advanced Materials*.
- Gales, A. C., Jones, R. N., Turnidge, J., Rennie, R., & Ramphal, R. (2001). Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates : Occurrence

- Rates , Antimicrobial Susceptibility Patterns , and Molecular Typing in the Global Sentry Antimicrobial Surveillance Program , 1997 – 1999. 32601(Suppl 2).
- Gholami, M., Zeighami, H., Bikas, R., Heidari, A., Rafiee, F., & Haghi, F. (2020). Inhibitory activity of metal-curcumin complexes on quorum sensing related virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *AMB Express*, 10(1), 1-10.
- Gellatly, S. L. and Hancock, R. E.W. (2012). *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathogens and Disease*. 67: 159–173 p
- Gour, A. and Jain, N. K. (2019). Advances in green synthesis of nanoparticles. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*. 47(1): 844–851 p
- Gudikandula, K. and Maringanti, S. C. (2016). Synthesis of silver nanoparticles by chemical and biological methods and their antimicrobial properties. *Journal of experimental nanoscience*. 11(9): 714-721 p
- Guisbiers, G., Wang, Q., Khachatryan, E., Mimun, L. C., Mendoza-Cruz, R. (2016). Inhibition of *E. coli* and *S. aureus* with selenium nanoparticles synthesized by pulsed laser ablation in deionized water. *International Journal of Nanomedicine*. 11 : 3731–3736 p
- Gunes H, Gulen D, Mutlu R, Gumus A, Tas T, Topkaya AE (2013) Antibacterial effects of curcumin: an in vitro minimum inhibitory concentration study. *Toxicol Ind Health* 32:246–250.

- Gupta, A., Mahajan, S. and Sharma, R. (2015). Evaluation of antimicrobial activity of *Curcuma longa* rhizome extract against *Staphylococcus aureus*. *Biotechnology Reports* 6: 51–55 p
- Gupta, S. C., Patchva, S., Koh, W. and Aggarwal, B. B. (2012). Discovery of curcumin, a component of golden spice, and its miraculous biological activities. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 39 : 283–299 p
- Haddadin, A. S., Fappiano, S. A. and Lipsett, P. A. (2002). Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the intensive care unit. *Postgrad Med J*. 78: 385–392 p
- Harly, J. and Prescott H. (2002). Laboratory exercise in microbiology. Fifth edition. The McGraw-Hill Companies.
- Harris L. G., Richards, R. G. and Foster, J. (2002). An introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying *S. aureus* adhesins in relation to adhesion to biomaterials: review. *European Cells and Materials*. 4: 39-60 p
- Hosnedlová, B., Kepinska, M., Skalickova, S., Fernández, C., Ruttkay-Nedecky, B., Peng, Q., Kizek, R. (2018). Nano-selenium and its nanomedicine applications: A critical review. *International Journal of Nanomedicine*, 13, 2107–2128.
- Huai, W., Ma, Q., Zheng, J., Zhao, Y. and Zhai, Q., (2019). Distribution and drug resistance of pathogenic bacteria in emergency patients. *World J Clin Cases*. 7(20): 3175-3184 p

- Hussain, A.R. (2012). Study of antibacterial activity of turmeric extracts (aqueous and ethanolic) against pathogenic bacterial isolates from local foods that available in Baghdad city restaurants. 2012, 107–116.
- Hussain, I., Singh, N. B., Singh, A., Singh, H. and Singh, S. C. (2016). Green synthesis of nanoparticles and its potential application. *Biotechnol Lett.* 38: 545–560 p
- Iranshahi, M., Yazdi, M. C., Moghaddam, K. M. and Shahverdi, A. R. (2009). the combination effect of curcumin with different antibiotics against *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Green Pharmacy.* 141- 143 p
- Ismail, E. H., Sabry, D. Y., Mahdy, H., & Khalil, M. M. H. (2014). Synthesis and Characterization of some Ternary Metal Complexes of Curcumin with 1, 10-phenanthroline and their Anticancer Applications.6(3),509-519.
- Jenny, M. and Kingsbury, J. (2018). Properties and Prevention: A Review of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biology and Medical Research.* 2(3) : 8 p
- Jha, A. K.; Prasad, K.; Kumar, V. and Prasad, K. (2009). Biosynthesis of silver nanoparticles using *Eclipta* leaf. *Biotechnology progress.* 25: 1476-1479
- Jouda, M., Elbashiti, T., Masad, A., & Bayoumi, M. (2016). the antibacterial effect of some medical plant extracts and their synergistic effect with antibiotics. *Extracts When Associated with Antibiotic and in Control of Bacteria. world journal of pharmacy and pharmaceutical sciences,* 5, 23–33.

- Kali, A., Bhuvaneshwar, D., Charles, P. M. V. and Seetha, K. S. (2016). Antibacterial synergy of curcumin with antibiotics against biofilm producing clinical bacterial isolates. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*. 7 : 93-96 p
- Kariminik, A. and E. S. Nazoori, (2018). In Vitro Evaluation of Antibacterial Properties of Zinc Oxide Nanoparticles on Pathogenic Prokaryotes. *J Appl Biotechnol Rep*. 5(4):162-165 p
- Karpiński, T. M., & Adamczak, A. (2019). Fucoxanthin—An antibacterial carotenoid. *Antioxidants*, 8(8), 239.
- Khalil, M. I., Al-qunaibit, M. M., Al-zahem, A. M., & Labis, J. P. (2014). Synthesis and characterization of ZnO nanoparticles by thermal decomposition of a curcumin zinc complex. *Arabian Journal of Chemistry*, 7(6), 1178–1184.
- Krieg, N., Staley, J., Brown, D., Hedlund, B., Paster, B., Ward, N., Whitman, W. (2010). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume Four*.
- Kulkarni , S.K.(2009).*Nanotechnology :Principles and practices*. Capital publishing Company.New Delhi
- Labban, L. (2014). Medicinal and pharmacological properties of Turmeric (*Curcuma longa*): A review. *International Journal of Biomedical Science* .5(1):17-23 p
- Lawhavinit, O., Kongkathip, N. and Kongkathip, B. (2010). Antimicrobial Activity of Curcuminoids from *Curcuma longa* L. on Pathogenic Bacteria of Shrimp and Chicken. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 44: 364 – 371 p

- Lee, J., Kim, Y., Cho, M. H. and Lee, J. (2014). ZnO nanoparticles inhibit *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and virulence factor production. *Microbiological Research*. 169: 888–896 p
- Leon, L. L. and C. A. C. Araujo, (2001). Biological Activities of *Curcuma longa* L. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 96 (5): 723-728 p
- Lewis, K., & Ausubel, F. M. (2006). Prospects for plant-derived antibacterials. *Nature biotechnology*, 24(12), 1504-1507
- Lister, P. D., Wolter, D. J. and Hanson, N. D. (2009). Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms. *Clinical Microbiology Reviews*. 22(4) : 582–610 p
- Liu, D. (2015). Enterotoxin-Producing *Staphylococcus aureus*. *Molecular Medical Microbiology (Second Edition)*.
- Macfaddin, J.F. (2000). Biochemical tests for identification of medical bacteria .1st ed., the Williams and Wilkins, Baltimore, USA
- Manandhar, S., Luitel, S., & Dahal, R. K. (2019). In Vitro Antimicrobial Activity of Some Medicinal Plants against Human Pathogenic Bacteria. *Journal of Tropical Medicine*, 2019, 1895340.
- Matulov, M., Bujdoš, M., Miglierini, M. B., Cesnek, M., Duborsk, E., Dekan, J., Ur, M. (2021). The Effect of High Selenite and Selenate Concentrations on Ferric Oxyhydroxides Transformation under Alkaline Conditions. 1–19.
- Modena, M. M., Rühle, B., Burg, T. P., & Wuttke, S. (2019). Nanoparticle Characterization : What to Measure ? 1901556, 1–26.

- Mohanraj, V. J., & Chen, Y. (2006). *Nanoparticles – A Review*. 5(June), 561–573.
- Monteiro, A. S., Pinto, B. L. S., Monteiro, J. M., Ferreira, R. M., Ribeiro, P. C. S. (2019). Phylogenetic and Molecular Profile of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bloodstream Infections in Northeast Brazil. *Microorganisms*, 7 (210) : 14p
- Morandi, S., Brasca, M., Andrighetto, C., Lombardi, A. and Lodi, R. (2009). Phenotypic and Genotypic Characterization of *Staphylococcus aureus* Strains From Italian Dairy Products. *International Journal of Microbiology*.: 1-7p
- Morello , J.A.; Mizer, H.E.; and Granato. (2006). Laboratory manual and workbook in microbiology applications to patient care. 18th.ed. The McGraw-Hill Companies, Inc., New York: 95-99.
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2020). Medical Microbiology E-Book. Elsevier Health Sciences.
- Myles, I. A. & Datta, S. K. (2012). *Staphylococcus aureus*: an introduction. *Semin Immunopathol*. 34(2): 181–184 p
- Nadaroğlu, H., Güngör, A. A. And İnce, S. (2017). Synthesis of Nanoparticles by Green Synthesis Method. *International Journal of Innovative Research and Reviews*. 1(1) : 6-9 p
- Nasri, H., Rafeian-kopaei, M., Sahinfard, N., Rafeian, Mortaza., Rafeian, S. and Shirzad, M. (2014). Turmeric: A spice with multifunctional medicinal properties. *Journal of Herbmed Pharmacology*. 3(1): 5-8 p

- Niakan, M., Pouladi, I., Kaviani, R. and Esmaili, E. (2019). Antimicrobial effect of zinc oxide and silver nitrate nanoparticles against *S. aureus*, *A. baumannii* and *P. aeruginosa*. *Journal of Basic and Clinical Pathophysiology*. 7(1): 27-30 p
- Olchowik, J., Aleksandrowicz-Trzcińska, M., Bzdyk, R. M., Studnicki M., Bederska-Błaszczuk, M., and Urban, A. (2017). The Effect of Silver and Copper Nanoparticles on the Condition of English Oak (*Quercus robur* L.) Seedlings in a Container Nursery Experiment. *Forests*. 8(310): 19 p
- Oves, M., Rauf, M. A., & Ansari, M. O. (2020). Graphene Decorated Zinc Oxide and Curcumin to Disinfect the Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*.
- Panayidou, S. and Apidianakis, Y. (2016). *Pseudomonas aeruginosa*. In book: Laboratory Models for Foodborne Infections, Chapter: 25 : 373-390 p
- Panpatil, V. V., Tattari, S., Kota, N., Nimgulkar, C. and Polasa, K. (2013). *In vitro* evaluation on antioxidant and antimicrobial activity of spice extracts of ginger, turmeric and garlic. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2 (3): 143-148 p
- Patel, J. P., & Parsania, P. H. (2018). biodegradable composites. In Biodegradable and Biocompatible Polymer Composites.55-79.
- Patrida, A.; Espunes, T. and Marines, J.B.(2010). Characterization and Persistence of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from the Anterior Nares and Throats of Healthy Carriers in a Mexican Community. *J. of*

- Clin. Microbiol. 48 (5): 1701-1705.
- Pavani, K. V, balakrishna. And Cheemarla, N.R.(2011).Biosynthesis of Zinc nanoparticles by *Aspergillus species* ,5(1):27-36.
- Perera, W. P. T. D., Dissanayake, R. K., Ranatunga, U. I., Hettiarachchi, N. M., Perera, K. D. C., Unagolla, J. M., Pahalagedara, L. R. (2020). Curcumin loaded zinc oxide nanoparticles for activity-enhanced antibacterial and anticancer. 30785–30795.
- Polaquini, C.R.; Morão, L.G.; Nazaré, A.C.; Torrezan, G.S.; Dilarri, G.; Cavalca, L.B.; Campos, D.L.; Silva, I.C. (2019). Antibacterial activity of 3,3-dihydroxycurcumin (DHC) is associated with membrane perturbation. *Bioorganic Chemistry*, 103031.
- Prateeksha, †, Singh, B. R., Shoeb, M., Sharma, S., 1, Naqvi, A. H., Gupta, V. K. and Singh, B. N. (2017). Scaffold of Selenium Nanovectors and Honey Phytochemicals for Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing and Biofilm Formation. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 7(93): 14 p
- Procop, G.W.; Church, D.L.; Hall, G.S.; Janda,W.M.; Koneman, E.W.; Schreckenberger, P.C.; and Woods, G.L., Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 7th ed. Wolters Kluwer Health, Philadelphia (2017).
- Public Health England (2014). UK Standards for Microbiology Investigations : Identification of Staphylococcus species, Micrococcus species and Rothia species. *Standards Unit, Microbiology Services*. 3(12): 32 p

- Public Health England (2015). UK Standards for Microbiology Investigations Identification of *Pseudomonas* species and other Non Glucose Fermenters. *Bacteriology – Identification*. 17(3): 41 p
- Quinn , P. J.; Carter, M. E.; Markey, B. and Carter, G. R. (2004). Clinical veterinary microbiology ,Elsevier limited.
- Rajan, M. R., Ananth, A. and Keerthika, V. (2019). Synthesis and characterization of nano-selenium and its antibacterial response on some important human pathogens. *Current Science* . 116.(2) : 285-290 p
- Rajeswari, V. D. and Kalpana, V. N. (2018). A Review on Green Synthesis, Biomedical Applications, and Toxicity Studies of ZnO NPs. *Bioinorganic Chemistry and Applications*. 3569758: 12 p
- Rajeshkumar, S., Veena, P., & Santhiyaa, R. V. (2018). Synthesis and Characterization of Selenium Nanoparticles Using Natural Resources and Its Applications.
- Rasmussen JW, Martinez E, Louka P, Wingett DG (2010) Zinc oxide nanoparticles for selective destruction of tumor cells and potential for drug delivery applications. *Expert Opin Drug Deli* 7:1063–1077
- Reddy KM, Feris K, Bell J, Wingett DG, Hanley C, Punnoose A (2007) Selective toxicity of zinc oxide nanoparticles to prokaryotic and eukaryotic systems. *Appl Phys Lett* 90:213902.
- Richards, R. G., Harris, L. G. and Foster, S. J. (2002). An introduction to staphylococcus aureus, and techniques for identifying and quantifying

- s. Aureus adhesins in relation to adhesion to biomaterials: review.
European Cells and Materials. 4 : 39-60 p
- Sampath, K. S., Arunkumar, P., Kumar, M. S., Sujatha, V., Premkumar, K., & Thirunavukkarasu, C. (2013). Green synthesis and characterization of selenium nanoparticles and its augmented cytotoxicity with doxorubicin on cancer cells. 1131–1139.
- Sen, A., & Batra, A. (2012). Determination of antimicrobial potentialities of different solvent extracts of the medicinal plant: *Phyllanthus amarus* Schum. and Thonn. *International Journal of Green Pharmacy (IJGP)*, 6(1).
- Sédillot, C. (1850). De la section des artères dans l'intervalle de deux ligatures comme méthode générale de traitement des hémorragies et des anévrismes. *JB Baillière*.
- Shayegani, M., Maupin, P. S., & Mcglynn, D. M. (1978). Evaluation of the API 20E System for Identification of Nonfermentative Gram-Negative Bacteria. *7(6)*, 539–545.
- Shanmugam, S. and Heera, P. (2015). Nanoparticle Characterization and Application: An Overview. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. Microbiol. App. Sci.* 4(8): 379- 386 p
- Sharma, N. Jandaik, S. And Kumar, S. (2016). Synergistic activity of doped zinc oxide nanoparticles with antibiotics: ciprofloxacin, ampicillin, fluconazole and amphotericin B against pathogenic microorganisms. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*. 88(3) : 1689-1698 p

- Siddiqi, K. S., Rahman, A., Tajuddin, and Husen, A. (2018). Properties of Zinc Oxide Nanoparticles and Their Activity Against Microbes. *Nanoscale Research Letters*. 13(141): 13 p
- Singh, S. R., Krishnamurthy, N. B., & Mathew, B. B. (2014). In situ grafted nanostructured ZnO/carboxymethyl cellulose nanocomposites for efficient delivery of curcumin to cancer .*Article · January 2014*. 2(4), 106–115.
- Snigdha, K. R. S. S., Sugathan, S., & Mathew, J. (2017). Zinc oxide – curcumin nanocomposite loaded collagen membrane as an effective material against methicillin-resistant coagulase- negative Staphylococci. *3 Biotech*, 7(4), 1–10.
- Sirelkhatim A et al (2015) Review on zinc oxide nanoparticles:antibacterial activity and toxicity mechanism. *Nano Micro Lett*7:219–242.
- Sivasothy, Y.; Sulaiman, S.F.; Ooi, K.L.; Ibrahim, H.; Awang, K.(2013). Antioxidant and antibacterial activities of flavonoids and curcuminoids from Zingiber spectabile Griff. *Food Control*. 2013, 30, 714–720
- Soni, M., Mehta, P., Soni, A. & Goswami, G. K. (2018). Green Nanoparticles: Synthesis and Applications. *IOSR Journal of Biotechnology and Biochemistry*. 4(3) : 78-83 p
- Souza, R. C., Haberbeck, L. U., Riella, H. G., Ribeiro, D. H. B. and Carciof, B. A. M. (2019). Antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles synthesized by solochemical process. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 36(2): 885 – 893 p

- Srivastava, N., & Mukhopadhyay, M. (2015). Green synthesis and structural characterization of selenium nanoparticles and assessment of their antimicrobial property. *Bioprocess and Biosystems Engineering*
- Stark, L. (2013). *Staphylococcus aureus* - aspects of pathogenesis and molecular epidemiology . Linköping University, Sweden. Department of Clinical and Experimental Medicine. 81 p
- Sudhakar, T., Karpagam, S., & Premkumar, J. (2015). Biosynthesis, antibacterial activity of pyocyanin pigment produced by *Pseudomonas aeruginosa* SU1. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7(3), 921–924.
- Teow, S. Y., Liew, K., Ali, S. A., Khoo, A. S. B. and Peh, S. C. (2016). Antibacterial Action of Curcumin against *Staphylococcus aureus*: A Brief Review. *Journal of Tropical Medicine*. 2853045 : 10 p
- Tille , P.M.(2014). *Bailey & Scott, s diagnostic microbiology*.13th Mosby, Inc.,an affiliate of Elsevier Inc.
- Tyagi, P., Singh, M., Kumari, H., Kumari, A. and Mukhopadhyay, K. (2015). Bactericidal Activity of Curcumin I Is Associated with Damaging of Bacterial Membrane. *PLoS ONE* 10(3): 15p
- Vetchinkina, I., Loshchinina, E., Kupryashina, M., Burov, A., Pylaev, T. and Nikitina, V. (2018). Green synthesis of nanoparticles with extracellular and intracellular extracts of basidiomycetes. *Peer journal*. 6 (5237): 24 p
- Wang, D., Zhang, L., Yong, C., Shen, M., Ali, T., Shahid, M., Han, K., Zhou, X. and Han, B. (2016). Relationships among superantigen toxin gene profiles, genotypes, and pathogenic characteristics of

- Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis.
Journal of Dairy Science . 100: 4276–4286 p
- Wisplinghoff, H. and Seifert, H. (2018). Guide to infection control in the hospital: Chapter 49: *Pseudomonas aeruginosa*. International society for infectious diseases. 8 p
- Xiong, G., Pal, U., Serrano, J. G., Ucer, K. B., & Williams, R. T. (2006). Photoluminescence and FTIR study of ZnO nanoparticles: the impurity and defect perspective. 3581(10), 3577–3581.
- Younis, G., Awad, A., Maghawry, M. and Selim, F. (2015). Extracellular Enzymes and Toxins of *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Clinically Diseased Egyptian Cows. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*. 3(10): 522-526 p

Summary:

The current study included testing the antibacterial effect of curcumin (Curcumin) and the two nanocomplexes (Curcumin/zinc oxide Nps) (Curcumin/selenium Nps) on two types of bacteria, one of them positive for Gram stain *Staphylococcus aureus* isolated from urine, nose and wounds, and the other negative for Gram stain of *Pseudomonas aeruginosa*. Burn injuries and surgical wounds, and by 50 isolates for each bacterial type, which were isolated from several hospitals in Babylon Governorate (Musayyib General Hospital, Al-Turky Hospital and Al-Jamhory Hospital) and diagnosed by phenotypic and biochemical methods by the researcher, and the work was carried out during the period between 10/18/2020 and 1/24 /2021. As well as the use of two types of antibiotics: Gentamycin and Imipenem for Gram-negative bacteria and Vancomycin and Ciprofloxacin for Gram-positive bacteria.

The two nanocomposites (Curcumin/zinc oxide Nps) and (Curcumin/selenium Nps) were prepared by green synthesis, and these compounds were diagnosed by several methods, which is, UV-Visible spectroscopy, Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR).), X-Ray Diffraction Microscope (XRD), Scanning Electron Microscope (SEM).

The MIC test was carried out by dilution in liquid medium, and it was found that the minimum inhibitory concentration of curcumin is 250 and 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, respectively. As for Cur/zno NPs, it gave 1000 and 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for each of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, respectively. While the MIC of cur/se NPs was 125 and 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, respectively.

Then the inhibitory activity of nanocomposites and free curcumin was evaluated in addition to several types of antibiotics (Ciprofloxacin, Imipenem, Gentamycin Vancomycin) by the the disc diffusion test, and it was highly effective against the types of the studied bacteria.

The results showed that gram-positive *Staphylococcus aureus* was more sensitive to nanocomposites and antibiotics than gram-negative *Pseudomonas aeruginosa*

The results also showed an increase in the effect of nanocomposites on both types of bacteria compared with free curcumin, and this increase resulted from the synergistic action between the two components of the nanocomposite.

The two nanocompounds (Curcumin/selenium Nps and Curcumin/zinc oxide Nps) are alternatives to the antibiotics imipenem and Gentamicin, respectively, due to their affinity for their in vitro inhibitory effects on *Pseudomonas aeruginosa*

The two nanocompounds (Curcumin/selenium Nps and Curcumin/zinc oxide Nps) are alternatives to Ciprofloxacin and Vancomycin, respectively, due to their affinity for their in vitro inhibitory effects on *Staphylococcus aureus*

Republic of Iraq
Ministry of Higher Education and Scientific Research
University of Karbala
College of Education for Pure Sciences
Department of Biology



**Green synthesis of selenium-zinc oxide nano
composites from curcumin and evaluation of their
inhibitory activity on *Staphylococcus aureus*
and *Pseudomonas aeruginosa***

By
Worod Anedi Ali Hussain Al-Ebadi
B. Sc. /2016

A Thesis submitted to the College of Education for Pure
Science Karbala University as a partial fulfillment of the
requirements for the degree of master of science in Biology-
Zoology

Supervised By

Assist Professor Dr.
Hiyam Abdul Ridha AlAwad

Professor Dr.
Abas Matrood Bashi

1442.A. H.

2021.A.D.

