



جامعة كربلاء

كلية التربية للعلوم الصرفة

قسم علوم الحياة

تقييم فعالية المركب النانوي لنبات المريمية *Salvia officinalis* في بكتريا
Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa
المعزولة من الجروح والحروق في مدينة كربلاء

رسالة مقدمة إلى مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء وهي جزء من متطلبات نيل
درجة الماجستير في علوم الحياة

كتبت بواسطة

بيداء جميل نعمه

بكالوريوس علوم حياة/ كلية التربية للعلوم الصرفة

جامعة كربلاء / ٢٠٠٤

بإشراف

أ.م.د. قيصر عبدالسجاد محمد حسين

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

﴿ وَمَا تَوْفِيقِي إِلَّا بِاللَّهِ عَلَيْهِ تَوَكَّلْتُ وَإِلَيْهِ أُنِيبُ ﴾

صَدَقَ اللَّهُ الْعَلِيُّ الْعَظِيمُ

(سورة هود الآية ٨٨)

إقرار المقوم اللغوي

اشهد أن هذه الرسالة الموسومة بـ تقييم فعالية المركب النانوي لنبات المريمية *Salvia officinalis* في بكتريا *Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من الجروح والحروق في مدينة كربلاء تمت مراجعتها من الناحية اللغوية وتصحيح ما ورد فيها من أخطاء لغوية وتعبيرية وبذلك أصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة بقدر تعلق الأمر بسلامة الأسلوب وصحة التعبير.

التوقيع : 
الاسم: 

المرتبة العلمية : استاذ

العنوان: كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة كربلاء

التاريخ: ٢٠٢٤ / ٩ / ٨

إقرار المقوم العلمي الأول

اشهد أن هذه الرسالة الموسومة بـ (تقييم فعالية المركب النانوي لنبات المريمية *Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa* في بكتريا *Salvia officinalis* المعزولة من الجروح والحروق في مدينة كربلاء) في كلية التربية للعلوم الصرفة / قسم علوم الحياة/ جامعة كربلاء التي قدمتها الطالبة (بيداء جميل نعمه) قد تمت مراجعتها من الناحية العلمية وبذلك أصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة.

التوقيع :

الأسم : د. أحمد عليوي حسين

المرتبة العلمية: أستاذ

العنوان: جامعة الكوفة / كلية العلوم

التاريخ: / / ٢٠٢٤

إقرار المقوم العلمي الثاني

اشهد أن هذه الرسالة الموسومة بـ (تقييم فعالية المركب النانوي لنبات المريمية *Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa* في بكتريا *Salvia officinalis* المعزولة من الجروح والحروق في مدينة كربلاء) في كلية التربية للعلوم الصرفة / قسم علوم الحياة/ جامعة كربلاء التي قدمتها الطالبة (بيداء جميل نعمه) قد تمت مراجعتها من الناحية العلمية وبذلك أصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة.

التوقيع :

الأسم : د. علاء عبد الحسين كريم

المرتبة العلمية: أستاذ

العنوان: جامعة كربلاء / كلية التربية للعلوم الصرفة

التاريخ: / / ٢٠٢٤

إقرار المشرف على الرسالة

أشهد أن إعداد هذه الرسالة الموسومة: (تقييم فعالية المركب النانوي لنبات المريمية

Salvia officinalis في بكتريا *Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas*

aeruginosa المعزولة من الجروح والحروق في مدينة كربلاء) قد جرى تحت إشرافنا

في قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة كربلاء وهي جزء من متطلبات

نيل درجة الماجستير في علوم الحياة.

التوقيع:

الاسم: أ.م.د. قيصر عبدالسجاد محمد حسين

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

العنوان: كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة كربلاء

التاريخ: / / ٢٠٢٤

توصية رئيس قسم علوم الحياة

إشارة الى التوصية اعلاه من قبل الأستاذ المشرف، أحيل هذه الرسالة الى لجنة

المناقشة لدراستها وبيان الرأي بها.

التوقيع:

الاسم: أ.د. نصير مرزا حمزة

المرتبة العلمية: أستاذ

العنوان: كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة كربلاء

التاريخ: / / ٢٠٢٤

إقرار لجنة المناقشة

نحن أعضاء لجنة المناقشة الموقعين ادناه نشهد بأننا قد اطلعنا على الرسالة الموسومة بـ (تقييم فعالية المركب الذئوي لنبات المريمية *Salvia officinalis* في بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* و *Klebsiella pneumoniae* المعزولة من الجروح والحروق في مدينة كربلاء) في كلية التربية للعلوم الصرفة / قسم علوم الحياة/ جامعة كربلاء التي قدمتها الطالبة (بيداء جميل نعمه) كجزء من متطلبات نيل درجة الماجستير، وبعد اجراء المناقشة العلنية وجد انها مستوفية لمتطلبات الشهادة وعليه نوصي بقبول الرسالة بتقدير امتياز .

عضو اللجنة

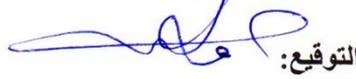
التوقيع: 

الاسم: د. مهدي حسين محيل

المرتبة العلمية: أستاذ

العنوان: جامعة الكوفة / كلية العلوم

عضواً ومشرفاً

التوقيع: 

الاسم: د.قيصر عبد السجاد محمد حسين

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

العنوان: جامعة كربلاء / كلية التربية للعلوم الصرفة

رئيس لجنة المناقشة

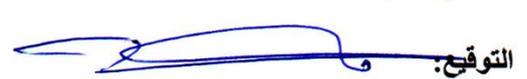
التوقيع: 

الاسم: د. هيام عبد الرضا كريم

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

العنوان: جامعة كربلاء / كلية التربية للعلوم الصرفة

عضو اللجنة

التوقيع: 

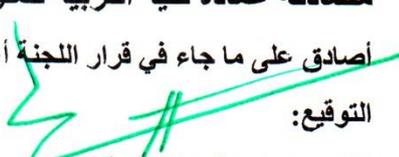
الاسم: د. حيدر محمد علي

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

العنوان: جامعة كربلاء / كلية الطب البيطري

مصادقة عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة

أصادق على ما جاء في قرار اللجنة أعلاه

التوقيع: 

الاسم: د. حميدة عيدان سلمان

المرتبة العلمية: أستاذ

العنوان: جامعة كربلاء / كلية التربية للعلوم الصرفة

التاريخ: ٢٠٢٤ / ٩ / ١٦

الاهداء

لوجهك اللهم خالصا قاصدا نيل رضوانك وبلوغ عفوك وغفرانك

إلى من ننتظر ظهوره ندعو له بتعجيل الفرج إمام آخر الزمان وإمامي المهدي
المنتظر (عليه السلام)

إلى سيدي ومولاي أبا عبد الله الحسين (عليه السلام) رُوحِي وأرواح العالمين
له الفداء

إلى القلوب التي لم تبخل بالعطاء أمي الحنونة

إلى من هون على مصاعب الحياة، صاحب القلب النقي والنفس الطيبة

أبي الغالي أطال الله في عمره وأدامه ذخرا لنا

إلى من شاركوني أيام حياتي بخلوها ومرها إخواني وأخواتي

إلى رفيق دربي ومن كان لي عوناً وسنداً، زوجي مصطفى

إلى قرّة عيني وثمرّة فؤادي، ابني محمد حسين، وبناتي فضاة، فاطمة وأنمي

إلى كل من أسعدهم نجاحي

أهدي ثمرة جهدي المتواضع

بيداء

شكر وتقدير

الحمد لله رب العالمين ، والصلاة والسلام على الأنبياء والمرسلين جميعاً، سيما سيدنا محمد وآله الطاهرين ،
واللعنة على أعدائهم أجمعين إلى يوم الدين

الحمد لله الذي وفقني ومنحني العزيمة والصبر والإرادة لإنجاز هذه الرسالة

أتوجه بالشكر والتقدير إلى رئاسة جامعة كربلاء وإلى عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة ورئيس قسم علوم
الحياة لإتاحة الفرصة لإكمال دراستي

لا يسعني إلا أن أخص بشكري وامتناني لمشرفي الأستاذ المساعد الدكتور قيصر عبد السجاد السلطان
الذي كان له الدور الكبير في إنجاز هذا البحث لما منحه لي من الوقت والجهد ولم ييخل عني بمعلومة أو
توجيه بمنتهى الإخلاص والتواضع خلال مدة البحث متمنية له دوام الصحة والعافية ودام عطائكم
كما أتوجه بالشكر والامتنان لكادر مستشفى مدينة الإمام الحسين (ع) الطبية وحدة الأحياء المجهرية ، لما
أبدوه لي من مساعدة ونصح وإرشاد في البحث

والشكر موصول لكل من قدم لي يد العون خلال دراستي كما اهدي شكري لزميلاتي في الدراسة جميعا
وأتمنى لهم النجاح والتوفيق

واشكر كل من قدم لي نصيحة وكل من آثر في اسنادي معنويا

The summary

هدفت الدراسة الحالية إلى تقييم الفعالية التثبيطية للمركب النانوي الأخضر من أوراق نبات *Salvia officinalis* على مقاومة البكتريا المعزولة من الجروح والحروق قبل وبعد تحميل عقار ciprofloxacin.

تم جمع ١٠٠ عزله من أصل ١٢٠ عزله من كلا الجنسين بعمر يتراوح من (١يوم-٧٠ سنة) من مرضى الحروق والجروح الراقدين في المستشفى ، فكان عدد عزلات الجروح ٦٠ عزلة و عدد عزلات الحروق ٤٠ عزلة ، نقلت العزلات على شكل swab وضعت في وسط ناقل معقم من مستشفى مدينة الامام الحسين الطبية في مدينة كربلاء المقدسة ، زرعت جميع العزلات على وسط MacConkey agar ، Blood agar وتم حضنها لمدة ٢٤ ساعة وبدرجة ٣٧ درجة مئوية وتم تشخيص البكتريا بواسطة جهاز VITEK-2 Compact System وكانت النتيجة *Klebsiella pneumonia* 24 % ، *Coagulase negative* 10% ، *E. coli* 8% ، *Pseudomonas aeruginosa* 21 % ، *staphylococcus aureus* 12% ، *Enterobacter aerogenes* 5 % ، *Acinetobacter baumannii complex* 7% ، *Enterococcus Avium* 4% ، *Enterobacter* ، *Enterococcus gallinarum* 6% ، *Serratia* 1% ، *cloacae* 2%

إذ بينت نتائج الفحص المجهرى للقوة الذرية (AFM) Atomic Force Microscope أن عملية التحميل قد اعطت مؤشرات تدل على نجاح هذه العملية بوساطة وجود تغيرات على سطح المركبات النانوية المحملة بالعقار وأن جميع هذه التغيرات ضمن الحجم والابعاد النانوية والتي تتوافق مع نتائج طيف الأشعة تحت الحمراء (FT-IR) Fourier transform infrared technique ، إذ كشفت صور فحص المجهر الالكتروني الماسح (SEM) Scanning electron Microscopy لمركب السالفيا النانوي AgNPs تجانس توزيع الجزيئات وأغلب اشكال الجزيئات مكعب .

وتم معاملة العزلات البكتيرية الأكثر شيوعا بخمس معاملات وبنسب تركيز $C1 > MIC$ ، التركيز الثاني $C2 = MIC$ ، التركيز الثالث $C3 < MIC$ وكانت المعاملة الأولى T1 المضاد الحيوي CIP والمعاملة الثانية T2 المستخلص المائي لأوراق نبات *Salvia officinalis* والمعاملة الثالثة T3 المركب النانوي والمعاملة الرابعة المستخلص المائي محمل بعقار CIP والمعاملة الخامسة المركب النانوي محمل بعقار CIP وظهرت النتائج مناطق تثبيط واضحة في المعاملتين الرابعة والخامسة المستخلص المائي محمل بعقار CIP والمركب النانوي محمل بعقار CIP ، أظهرت جزيئات الفضة النانوية أعلى كفاءة تآزرية مع المضاد الحيوي سيبروفلوكساسين ضد بكتيريا *K.pneumoniae* المقاومة للأدوية

المتعددة، مسجلة معدل تثبيط $14,33 \pm 1,41$ ، بينما ضد بكتيريا *P. aeruginosa* تم تسجيل معدل تثبيط $13,44 \pm 0,88$.

وأظهرت نتائج التحري عن جينات المقاومة جين *pgaA* في بكتيريا *K. pneumoniae* وجين *pslA* في بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* ان العزلات لها القدرة على تكوين الغشاء الحيوي biofilm بنسبة 100% بواسطة Congo red agar . وأظهرت نتائج التعبير الجيني الخاص ببكتيريا الزوائف الزنجارية باستخدام تقنية RT-PCR أن تركيز $C1 > MIC$ يؤثر سلبيا على مستوى التعبير الجيني لجين *pslA* الخاص بتكوين الغشاء الحيوي للبكتيريا *p. aeruginosa* إذ يعمل المستخلص المائي محمل بالعقار والمركب النانوي المحمل بالعقار كمضاد للغشاء الحيوي antibiofilm مما يؤثر على مقاومتها للمضادات الحيوية.

أستنتجت الدراسة الحالية ان المركبات النانوية تعمل بشكل أفضل عند ما تكون مجتمعة مع المضادات الحيوية، وأثبتت كفاءة عالية عند مرافقتها للمضادات الحيوية مقارنة لو كانت منفصلة.

قائمة المحتويات

رقم الصفحة	الموضوع
	الخلاصة
	قائمة المحتويات
	قائمة الجداول
	قائمة الاشكال
	قائمة المختصرات
Introduction الفصل الاول / المقدمة	
٢-١	المقدمة
٣	الهدف من الدراسة
Literature Review الفصل الثاني / استعراض المراجع	
٤	١-٢ الكلبسيلا الرئوية <i>Klebsiella pneumoniae</i>
٤	١-١-٢ تصنيف الكلبسيلا الرئوية Classification of <i>Klebsiella pneumoniae</i>
٥	٢-١-٢ الوصف العام <i>K. pneumoniae</i> characterization
٥	٣-١-٢ الوبائية Epidemiology of <i>K. pneumoniae</i>
٦	١-٢-٤ عوامل الضراوة Virulence factors of <i>Klebsiella pneumoniae</i>
٧	١-٢-٤-١ المحفظة Capsular Polysaccharide
٧	١-٢-٤-٢ إنتاج حاملات الحديد Siderophores production
٨	١-٢-٤-٣ عوامل الاستعمار (الالتصاق) Colonization factors (Adhesions)
٨	١-٢-٤-٤ عديد السكاريد الدهني Lipopolysaccharide
٩	١-٢-٤-٥ أنزيمات البيتا لاكتام β -lactamases
٩	١-٢-٤-٦ الغشاء الحيوي Biofilm
١٠	١-٢-٥ مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية Bacterial resistance to antibiotics
١١	٢-٢ الزائفة الزنجارية <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
١١	١-٢-٢ الوصف العام Characterization of <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
١٢	٢-٢-٢ الأمراض Pathogenicity of <i>Pseudomonas aeruginosa</i>

١٣	Virulence factors عوامل الضراوة ٣-٢-٢
١٤	Production Protease أنتاج الأنزيمات الحالة للبروتين ١-٣-٢-٢
١٤	Hemolysin: الانزيم الحال للدم ٢-٣-٢-٢
١٥	Biofilm الغشاء الحيوي ٣-٣-٢-٢
١٦	٤-٢-٢ مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية
١٨	٣-٢ المضادات الحيوية: Antibiotics
١٨	٤-٢ مقاومة المضادات الحيوية Antibiotics resistance
١٩	١-٤-٢ آليات المقاومة Mechanisms of antibiotic resistance
٢٠	١-٥-٢ الخط الأول من الدفاع (الأغشية الحيوية) The First Line of Defense: (Bacterial Biofilm)
٢١	٢-٥-٢ خط الدفاع الثاني (الجدار الخلوي والغشاء الخلوي البكتيري) The Second defence: (Bacterial Cell Wall and Cell Membrane)
٢٢	٣-٥-٢ خط الدفاع الثالث: التغيير داخل الخلايا The Third Line of Defense: Intracellular Alteration
٢٤	٦-٢ عقار السيبروفلوكساسين ciprofloxacin drug
٢٥	١-٦-٢ آلية عمل السيبروفلوكساسين The mechanism of action of ciprofloxacin
٢٥	٧-٢ النباتات الطبية Medical plants
٢٦	٨-٢ نبات المريمية <i>Salvia officinalis</i>
٢٦	١-٨-٢ الوصف العام لنبات <i>Salvia officinalis</i>
٢٧	٢-٨-٢ التصنيف العلمي لنبات السالفيا
٢٧	٣-٨-٢ الأهمية الطبية لنبات <i>Salvia officinalis</i>
٢٨	٩-٢ تقنية النانو Nanotechnology
٢٩	١-٩-٢ تصنيف المواد النانوية Classification of nanomaterials
٣٠	٢-٩-٢ الجسيمات النانوية Nanoparticles (NPs)

٣١	٢-٩-٣ طرق تحضير المركبات النانوية
٣٢	٢-٩-٤ خصائص الجسيمات النانوية Nanoparticles properties
٣٢	٢-٩-٥ توصيل الدواء Drug Delivery
٣٣	٢-١٠-١ الدراسة الجينية Genetic study
٣٤	٢-١٠-١ جين <i>pgaA</i> في بكتريا <i>Klebsiella pneumoniae</i>
٣٤	٢-١٠-٢ جين <i>pslA</i> في بكتريا الزائفة الزنجارية
٣-المواد وطرق العمل Materials and Methods	
٣٥	٣-١-١ المواد Materials
٣٥	٣-١-١-١ الأجهزة والأدوات Devices and Tools
٣٦	٣-١-٢ المواد الكيميائية
٣٧	٣-١-٣ العدد التشخيصية
٣٨	٣-١-٤ الأوساط الزرعية Culture media
٣٩	٣-١-٥ البرايمرات المستخدمة في الدراسة كما موضح بالجدول (٣-٤) .
٤٠	٣-٢ الطرق Methods
٤٠	٣-٢-١ تصميم التجربة
٤١	٣-٢-٢ عزل وتشخيص البكتريا
٤١	٣-٢-٣ التعقيم Sterilization
٤١	٣-٢-٤ الأوساط الزرعية culture media
٤١	٣-٢-٣-١ وسط أكار الدم Blood agar media
٤٢	٣-٢-٣-٢ وسط أكار الماكونكي MacConkey agar
٤٢	٣-٢-٣-٣ مرق نقيع القلب والدماغ Brian Heart infusion broth
٤٢	٣-٢-٣-٤ مولر هنتون أكار Muller-Hinton agar
٤٢	٣-٢-٣-٥ وسط الأكار المغذي Nutrient agar media
٤٢	٣-٢-٥ تحضير المحاليل Preparation of solutions
٤٢	٣-٥-٢-١ physiological saline solution
٤٣	٣-٥-٢-٢ محلول مكفر لند القياسي McFarland Standard solutions
٤٣	٣-٢-٦ حفظ العزلات البكتيرية Maintaining of Bacterial isolates

٤٣	٧-٢-٣ التشخيص واختبار حساسية المضادات الحيوية بتقنية جهاز الفايتهك
٤٤	٨-٢-٣ تحضير محلول ١٠٠ مل ١ ملي مولاري نترات الفضة
٤٤	٩-٢-٣ تحضير المستخلص المائي لأوراق نبات <i>Salvia Officinalis</i>
٤٥	١٠-٢-٣ تحضير جسيمات الفضة النانوية باستخدام المستخلص المائي لأوراق السالفيا
٤٥	١١-٢-٣ تنقية المركب النانوي S.-AgNPs
٤٦	١٢-٢-٣ تشخيص جسيمات الفضة النانوية المخلفة حيويًا
٤٦	١٣-٢-٣ طريقة تقدير الفعالية التثبيطة للمركبات النانوية والمضادات الحيوية ومستخلص الميرمية (نبات السالفيا) على العزلات البكتيرية:
٤٨	١٤-٢-٣ اختبار التركيز المثبط الأدنى (MIC) لمركب الميرمية النانوي ومستخلص الميرمية بعد تحميل المضاد الحيوي ciprofloxacin
٤٩	١٥-٢-٣ تحضير تراكيز MIC للمضاد الحيوي CIP والمستخلص S. والمركب النانوي S./NPs
٤٩	١٦-٢-٣ الكشف عن إنتاج الأغشية الحيوية Detection of Biofilm production
٤٩	١٦-٢-٣ أجار الكونغو الأحمر Congo red agar
٥٠	١٧-٢-٣ الدراسة الجزيئية Molecular study
٥٠	١٧-٢-٣ التحري عن جينات مقاومة المضادات الحيوية بواسطة PCR Detection of Antibiotic resistance genes by PCR
٥٠	١٧-٢-٣ استخلاص DNA قبل المعاملة بجزيئات الفضة النانوية DNA extraction before treatment with silver nanoparticles
٥١	١٧-٢-٣ حساب تركيز ونقاوة ال DNA Calculation of DNA Concentration and Purity
٥١	١٧-٢-٣ اختيار وتحضير البرايمرات
٥١	١٧-٢-٣ شروط جهاز التدوير الحراري Condition of PCR
٥٢	١٧-٢-٣ الترحيل الكهربائي لهلام الاكاروز Agarose Gel Electrophoresis

٥٣	Quantitive Reverse PCR ٢-١٧-٢-٣ Transcription Real-Time PCR
٥٨	Statistical analysis ٣-٣ التحليل الاحصائي
٥٩	Results and Discussion ٤- النتائج والمناقشة
٥٩	The distribution of ١-٤ توزيع العزلات حسب الفئات العمرية والجنس Isolates according to age groups and gender
٦٠	٢-٤ توزيع نسب العزلات البكتيرية لعينات الدراسة
٦١	١-٣-٤ توزيع نسب الأصابة البكتيرية المعزولة من عينات الجروح
٦٣	٢-٣-٤ توزيع نسب الأصابة البكتيرية المعزولة من عينات الحروق
٦٥	Diagnosis of green Salvia ٤-٤ تشخيص مركب السالفيا النانوي الأخضر officinalis compound
٦٥	Fourier Transform Infrared (FTIR) ١-٤-٤ طيف الأشعة تحت الحمراء Spectroscopy
٦٨	Atomic Force Microscope (AFM) ٢-٤-٤ مجهر القوة الذرية
٧٣	٣-٤-٤ المجهر الالكتروني الماسح (SEM)
٧٦	٥-٤ نسب مقاومة المضادات الحيوية لبكتريا <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Pseudomonas aurginosa</i>
٧٦	١-٥-٤ نسب مقاومة المضادات الحيوية لبكتريا <i>Klebsiella pneumoniae</i> المعزولة من الجروح والحروق.
٧٨	٢-٥-٤ نسب مقاومة المضادات الحيوية لبكتريا <i>p.aeruginosa</i> المعزولة من الحروق والجروح.
٨٠	٦-٤ التأثير التثبيطي لمستخلص السالفيا ومركب السالفيا النانوي قبل وبعد تحميل المضاد الحيوي ciprofloxacin على بكتريا <i>p.aeruginosa</i> ، <i>K.pneumonia</i>
٨٠	١-٦-٤ التأثير التثبيطي لمستخلص السالفيا ومركب السالفيا النانوي قبل وبعد تحميل المضاد الحيوي ciprofloxacin على بكتريا <i>K.pneumonia</i>

٨١	٢-٦-٤ التأثير التثبيطي لمستخلص السالفيا ومركب السالفيا النانوي قبل وبعد تحميل المضاد الحيوي ciprofloxacin على بكتريا <i>P. aeruginosa</i>
٨٦	٧-٤ تكوين الأغشية الحيوية Biofilm formation
٨٦	١-٧-٤ طريقة آكار الكونغو الأحمر Congo red agar method
٨٧	٨-٤ تفاعل البلمرة المتسلسل للكشف عن جين <i>pgaA</i> في <i>K. Pneumoniae</i> Polymerase chain reaction for <i>pgaA</i> gene detection in <i>K. Pneumoniae</i>
٨٨	٨-٤ تفاعل البلمرة المتسلسل للكشف عن جين <i>Psla</i> في <i>P. aeruginosa</i> Polymerase chain reaction for <i>Psla</i> gene detection in <i>P. aeruginosa</i>
٨٩	٩-٤ النسخ العكسي الكمي في الوقت الحقيقي qPCR gene expression
٩٠	١-٩-٤ طريقة القياس الكمي لجين الادامة (Housekeeping gene)
٩٠	٢-٩-٤ التعبير الجيني لموروث (<i>pslA</i>) بطريقة العد النسبي Relative Quantification
الاستنتاجات والتوصيات	
٩٦	الاستنتاجات
٩٧	التوصيات
٩٩	المصادر References
II-I	الخلاصة باللغة الانكليزية

قائمة الجداول

رقم الصفحة	الموضوع	التسلسل
٣٥	الأجهزة والأدوات المختبرية	(١-٣)
٣٦	المواد الكيميائية	(٢-٣)
٣٧	العدد التشخيصية	(٣-٣)
٣٨	Culture media الأوساط الزرعية	(٤-٣)
٣٩	البرايمرات المستخدمة	(٥-٣)
٤٧	تراكيز المضاد الحيوي الحر CIP والمستخلص Sao الحر والمركب النانوي Sao/NPs قبل وبعد تحميل المضاد الحيوي	(٦-٣)
٥٢	المواد المستخدمة في تفاعل PCR .	(٧-٣)
٥٢	شروط برنامج التدوير الحراري Thermo cycling conditions Program	(٨-٣)
٥٥	معالجة DNase I	(٩-٣)
٥٥	تصنيع cDNA وفقا لتعليمات الشركة	(١٠-٣)
٥٦	تصنيع cDNA	(١١-٣)
٥٧	المزيج الرئيسي الكمي القياسي q PCR	(١٢-٣)
٥٧	شروط جهاز التدوير الحراري	(١٣-٣)
٦٠	توزيع العزلات حسب الفئات العمرية والجنس.	(١-٤)
٦٢	توزيع عزلات بكتريا <i>Klebsiella pneumoniae</i> حسب مصدر العزل والجنس .	(٢-٤)
٦٤	يوضح توزيع عزلات بكتريا <i>p. aeruginosa</i> حسب مصدر العزل والجنس.	(٣-٤)
٧٢	الخصائص الفيزيائية للمستخلص المائي لأوراق نبات السالفيا والمركب النانوي الحر والمحمل بالعقار	(٤-٤)
٧٦	نسب مقاومة المضادات الحيوية لبكتريا <i>K. pneumoniae</i> المعزولة من الجروح .	(٥-٤)

٧٧	نسب مقاومة المضادات الحيوية لبكتريا <i>K. pneumoniae</i> المعزولة من الحروق .	(٦-٤)
٧٩	نسب مقاومة المضادات الحيوية لبكتريا <i>p.aueruginosa</i> المعزولة من الجروح .	(٧-٤)
٧٩	نسب مقاومة المضادات الحيوية لبكتريا <i>p.aueruginosa</i> المعزولة من الحروق	(٨-٤)
٨٣	أقطار التثبيط للمضاد الحيوي ciprofloxacin ومستخلص السالفيا الحر والمركب النانوي الحر والمستخلص محمل بالمضاد الحيوي والمركب النانوي محمل بالمضاد الحيوي على بكتريا <i>K.Pneumonia</i>	(٩-٤)
٨٤	أقطار التثبيط للمضاد الحيوي ciprofloxacin ومستخلص السالفيا الحر والمركب النانوي الحر والمستخلص محمل بالمضاد الحيوي والمركب النانوي محمل بالمضاد الحيوي على بكتريا <i>P.auroginosa</i>	(١٠-٤)
٩١	التعبير الجيني لجين <i>psIA</i> باستخدام طريقة Livak method لبكتريا الزوائف الزنجارية عند استخدام المستخلص المائي لأوراق نبات <i>Salvia officinalis</i> الحر وبعد تحميله على مضاد ال ciprofloxacin والمركب النانوي قبل وبعد تحميله على المضاد.	(١١-٤)

قائمة الاشكال

رقم الصفحة	الموضوع	التسلسل
١٠	عوامل الضراوة في بكتريا <i>K. pneumoniae</i>	شكل (١-٢)
١٦	مراحل تكوين الأعشبية الحيوية (Harper et al., 2014) .	شكل (٢-٢)
٢٣	مخطط يلخص آليات خطوط الدفاع الثلاث من المقاومة في البكتريا ضد العوامل الميكروبية (Zhou et al., 2015a).	شكل (٣-٢)

٢٤	الصيغة التركيبية لعقار السيبروفلوكساسين (Chrysouli <i>et al.</i> ,) (2020).	شكل (٤-٢)
٢٧	نبات المريمية	شكل (٥-٢)
٢٩	ملخص تصنيع النانو (من الأعلى الى الأسفل ومن الأسفل الى الأعلى)	شكل (٦-٢)
٣٠	تصنيف الأبعاد للمواد النانوية	شكل (٧-٢)
٤٠	مخطط الدراسة الحالية	(١-٣)
٤٥	تغيير لون المستخلص المائي لأوراق نبات السالفيا من الأصفر الى اللون البني الغامق.	شكل (٢-٣)
٦١	النسب المئوية للعزلات البكتيرية	شكل (١-٤)
٦٦	طيف الأشعة تحت الحمراء FT-IR للمركب النانوي	شكل (٢-٤)
٦٧	طيف الأشعة تحت الحمراء FT-IR لعقار السيبروفلوكساسين (CIP)	شكل (٣-٤)
٦٧	طيف الأشعة تحت الحمراء FT-IR للمركب النانوي المحمل بعقار السيبروفلوكساسين (CIP)	شكل (٤-٤)
٦٧	طيف الأشعة تحت الحمراء FT-IR لمستخلص أوراق السالفيا	شكل (٥-٤)
٦٨	طيف الأشعة تحت الحمراء FT-IR للمستخلص المائي لأوراق نبات السالفيا محمل بعقار السيبروفلوكساسين	شكل (٦-٤)
٦٩	صور مجهر القوة الذرية (A) صورة ثلاثية الأبعاد لمركب السالفيا النانوي (B) صورة ثلاثية الأبعاد للمستخلص المائي لأوراق نبات السالفيا (c) صورة ثنائية الأبعاد لمركب السالفيا النانوي (D) صورة ثنائية الأبعاد للمستخلص المائي لأوراق نبات السالفيا	شكل (٧-٤)
٦٩	توزيع النسب المختلفة لحجوم جزيئات (A) مركب السالفيا النانوي (B) المستخلص المائي لأوراق نبات السالفيا	شكل (٨-٤)

٧١	صور مجهر القوة الذرية (A) صورة ثلاثية الأبعاد لمركب السالفيا النانوي (B) صورة ثلاثية الأبعاد للمستخلص المائي لأوراق نبات السالفيا (C) صورة ثنائية الأبعاد لمركب السالفيا النانوي (D) صورة ثنائية الأبعاد للمستخلص المائي لأوراق نبات السالفيا	شكل (٩-٤)
٧٢	توزيع النسب المختلفة لحجوم جزيئات (A) مركب السالفيا النانوي (B) المستخلص المائي لأوراق نبات السالفيا	شكل (١٠-٤)
٧٤	صورة المجهر الإلكتروني الماسح لمركب السالفيا النانوي	شكل (١١-٤)
٧٤	صورة المجهر الإلكتروني الماسح لمركب السالفيا النانوي	شكل (١٢-٤)
٧٥	صورة المجهر الإلكتروني الماسح للمستخلص المائي لأوراق نبات السالفيا	شكل (١٣-٤)
٧٥	صورة المجهر الإلكتروني الماسح للمستخلص المائي لأوراق نبات السالفيا	شكل (١٤-٤)
٨٥	التأثير التثبيطي (A) على بكتريا <i>K. Pneumoniae</i> ، (B) على بكتريا <i>P. aeruginosa</i>	شكل (١٥-٤)
٨٦	تكوين الأغشية الحيوية بواسطة (A) congo red agar (<i>P.auroginosa</i> B) ، <i>K.pneumoniae</i>	شكل (١٦-٤)
٨٨	الترحيل الكهربائي لجين <i>pgaA</i> في عزلات <i>K. Pneumoniae</i> M: علامة الحمض النووي؛ (٨-١) منتجات PCR موجبة ، ٥٦ pb 1 نقطة أساس للكشف عن جين <i>pgaA</i> في بكتريا <i>K.Pneumoniae</i>	الشكل (١٧-٤)
٨٩	الترحيل الكهربائي لجين <i>Ps1a</i> في عزلات الزوائف الزنجارية M: علامة الحمض النووي؛ (٨-١) منتجات PCR موجبة ، pb ١١١٦ نقطة أساس للكشف عن جين <i>Ps1a</i> في بكتريا <i>pseudomonas aeruginosa</i>	الشكل (١٨-٤)

٩٠	<p>منحني التضخيم التعبير الجيني لتقنية تفاعل سلسلة البوليميريز بالوقت الحقيقي (Real time-PCR) والخاص بجين <i>SrRNA</i> 16 التابع لبكتريا الزوائف الزنجارية حيث تبين المنحنيات : المنحني باللون الاسود : مجموعة المضاد CIP ، المنحني باللون الأسود : مجموعة المستخلص الحر ، المنحني باللون الأحمر : مجموعة المركب النانوي الحر ، المنحني باللون الأزرق : مجموعة المستخلص +المضاد الحيوي. المنحني باللون الأخضر: مجموعة المركب النانوي + المضاد الحيوي.</p>	شكل (١٩-٤)
٩٣	<p>يوضح التعبير الجيني لجين <i>Psla</i> في بكتريا الزوائف الزنجارية .</p>	شكل (٢٠-٤)
٩٤	<p>منحني التضخيم التعبير الجيني لتقنية تفاعل سلسلة البوليميريز بالوقت الحقيقي (Real time-PCR) والخاص بجين <i>psla</i> التابع لبكتريا الزوائف الزنجارية حيث تبين المنحنيات : المنحني باللون الأخضر : مجموعة المركب النانوي ، المنحني باللون الأصفر : مجموعة المستخلص الحر ، المنحني باللون الأزرق : مجموعة المضاد الحيوي ، المنحني باللون الأسود : مجموعة النانو + المضاد الحيوي ، المنحني باللون الأحمر : مجموعة المستخلص +المضاد الحيوي .</p>	شكل (٢١-٤)

قائمة المختصرات

المختصر	المصطلح
AMR	Anti-microbial resistance
AST	Antibiotic Sensitivity Test
AFM	Atomic Force Microscopy
CPS	Capsular Polysaccharide
CIP	Ciprofloxacin
EPS	Extracellular polymeric substances
ESBL	Extended spectrum-beta lactamase
FT-IR	Fourier-transform infrared
HAP	Hospital acquired pneumoniae
LPS	Lipopolysaccharide
MDR	Multidrug resistance
NPs	Nanoparticles
PABA	paraamino-benzoic acid
QS	Quorum Sensing
SEM	Scanning electron microscopy
AgNPs	Silver nanoparticles

الفصل الأول

المقدمة

Introduction

المقدمة

Introduction

مقاومة المضادات الحيوية Antimicrobial resistance قدرة البكتيريا على تطوير آليات تمكنها من مقاومة تأثيرات المضادات الحيوية ، وتتميز الكائنات الدقيقة المقاومة بكونها صعبة العلاج تحتاج الى جرعات عالية، او اللجوء الى علاجات بديلة والتي ربما تكون أكثر سمية وأكثر كلفة وتتطلب زيادة مدة الإقامة في المستشفيات وتؤدي الى زيادة معدل المرض والوفيات (Mancuso et al., 2021) ، وتنشأ المقاومة أما بصورة طبيعية عن طريق الطفرات الجينية او عن طريق انتقال المقاومة من جنس اكتسبها الى جنس آخر ، وأن أنتشار مقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية مشكلة متزايدة في جميع أنحاء العالم، وأصبح هذا الانتشار يشكل خطر يهدد صحة المرضى وخصوصا الذين يعانون من ضعف الجهاز المناعي والذين يتطلب علاجهم استعمال أجهزه طبية، وهذا الانتشار قد يكون بسبب إساءة استخدام المضادات الحيوية (Baquero et al., 2021) .

وقد تم تحديد *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* جميعها مسببات أمراض ذات معدلات عالية بشكل خاص من مقاومة المضادات الحيوية، مما أدى إلى انخفاض نطاق العلاجات المتاحة لهذه الكائنات (Morris & Cerceo, 2020) ، وأن هذه الكائنات الدقيقة لديها القدرة على إصابة جميع أنسجة الجسم تقريباً نتيجة امتلاكها لمجموعة كبيرة ومتنوعة من عوامل الضراوة التي تساهم بشكل كبير في إمرضية المضيف، ومن عوامل أو جينات الفوعة تكوين الأغشية الحيوية biofilm. يعد التعبير الجيني لجين *psIA* مسؤولاً عن النمط الظاهري لتكوين الأغشية الحيوية بواسطة بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* (Pezzoni et al., 2020) ، وجين *pgaA* في بكتيريا *Klebsiella pneumoniae* ، الأغشية الحيوية، هي عبارة عن مجموعات من الكائنات الحية الدقيقة الملتصقة بالسطح ومغطاة بغشاء مصفوفي من عديد السكاريد الخارجي. أثناء انتقالها من العوائل إلى مجتمع متصل بالسطح استجابةً لبعض الإشارات البيئية المحددة، تتطور الخصائص المظهرية في مثل هذه البكتيريا. يبدو أن تكوين الأغشية الحيوية هو سمة واسعة الانتشار في البكتيريا المقاومة للأدوية المتعددة وقد يسمح بزيادة القدرة على البقاء في ظل الظروف المرهقة مثل انخفاض العناصر الغذائية أو العلاج المضاد للميكروبات (Makhrmash et al., 2022) .

وإن البكتيريا مقاومة للعديد من المضادات الحيوية، بما في ذلك السيبروفلوكساسين، الذي أثبتت فعاليته في علاج الالتهابات البكتيرية المختلفة منذ عام ١٩٨٧، وتم إدراجه كدواء أساسي من قبل منظمة الصحة العالمية (Al-Buriah et al., 2022) ، سيبروفلوكساسين هو مضاد حيوي واسع الطيف وهو من الجيل الثاني من الفلوروكينولون. يتم استخدامه في علاج مجموعة واسعة من البكتيريا (سالبة وموجبة) الكرام، يتم استخدامه لعلاج أو منع بعض الالتهابات التي قد تحدث بسبب بكتيريا السيلان والالتهاب الرئوي والسوم

أو التهابات الجلد والعظام والمفاصل ومنطقة المعدة والبروستات، يعمل على تثبيط الإصابات الخطيرة التي تحدث على المدى الطويل (Sharma *et al.*, 2010).

ولمواجهة مشكلة مقاومة البكتيريا للأدوية المتعددة، اخترع العلماء أنظمة توصيل نانوية أثبتت كفاءة عالية في التغلب على العديد من الحواجز التشريحية والوظيفية التي تحول دون إيصال الدواء إلى الموقع المستهدف. وهكذا، فقد تمكنوا من إنتاج أدوية فعالة للغاية مع آثار جانبية قليلة (Venditti, 2019). تكنولوجيا النانو الخضراء هو مجال يركز على صناعة منتجات صديقة للبيئة وأكثر أماناً لجميع الكائنات الحية وأقل تكلفة وأكثر استقراراً من طرق التصنيع الأخرى مثل استخدام البكتيريا والفطريات والخمائر والفيروسات أو استخدام أجزاء نباتية مختلفة مثل الأوراق والسيقان، الثمار والقشور وغيرها، وقد اجتذب "التخليق الأخضر" للجسيمات النانوية الكثير من الاهتمام لاستخدام أكاسيد المعادن، مثل أكاسيد الفضة (Ag-NO₃)، وذلك بسبب خصائصها البصرية والكيميائية والضوئية والكهربائية (Nasrollahzadeh *et al.*, 2019)، وقد وجد أن المواد النانوية تواجه مشكلة زيادة المقاومة للبكتيريا بسبب خصائصها الفريدة والتي تقع أبعادها ضمن المقياس النانوي (1-100 نانومتر، مثل زيادة الذوبان والثبات وسهولة الإنتاج والتوافق الحيوي. يعد الحجم الصغير للجسيمات النانوية بالنسبة لمساحة سطحها أحد أهم خصائصها (Kesharwani *et al.*, 2018). وأثبتت العديد من الدراسات أن النباتات تعد مصدراً آمناً لصناعة الأدوية ومصدراً وقائياً للعديد من الأمراض، وذلك بسبب الفعالية الطبية للمركبات النباتية التي تحمل خصائص مضادة للأكسدة ومضادة للميكروبات (Sen & Samanta, 2015). ومن النباتات الطبية نبات المريمية الذي ينتمي إلى الفصيلة الشفوية، نبتة عشبية عطرية واسعة الانتشار في أرجاء العالم المشمسة وقد تم استخدامه لمجموعة متنوعة من الأغراض، بما في ذلك تقليل العرق، وعلاج التهاب الحلق (يستخدم كغرغرة)، وتنظيم الدورة الشهرية، ومكافحة الالتهابات، وتحسين حالة الدهون ووظيفة الكبد، وتحسين الشهية والهضم، وتعزيز القدرة العقلية (Ahmed, 2020).

الهدف من الدراسة

- هدفت الدراسة الحالية إلى تقييم الفعالية التثبيطية للمركب النانوي الأخضر من أوراق نبات السالفيا *Salvia officinalis* قبل وبعد تحميل عقار السيبروفلوكساسين في مقاومة البكتريا المعزولة من الجروح والحروق بوساطة المحاور التالية:
- ١- جمع العينات والبيانات من مرضى الجروح والحروق من بعض المستشفيات في مدينة كربلاء المقدسة.
 - ٢- عزل وتشخيص الأنواع البكتيرية.
 - ٣- اختبار مقاومة البكتريا المعزولة للمضادات الحيوية.
 - ٤- تحضير مركب نانوي أخضر من نبات الميرمية (*Salvia officinalis* S/NPs) .
 - ٥- تشخيص المركب النانوي الأخضر (S/NPs) بواسطة تقنية FT-IR و AFM و SEM ودراسة الخصائص الفيزيائية للمركبات المحضرة قبل وبعد تحميل عقار (Ciprofloxacin) .
 - ٦- قياس الفعالية التثبيطية للمركب النانوي المحضر على بعض الأنواع البكتيرية الأكثر شيوعا (*P. aeruginosa* ، *K.pneumoniae*) ودراسة الأثر التثبيطي التازري للمضاد والمركب النانوي قبل وبعد تحميل المضاد الحيوي (Ciprofloxacin) بعد أخذ أقل تركيز مثبط لكل منها Minimum Inhibitory – Concentration (MIC) .
 - ٧- التحري عن جينات المقاومة جين *psgA* وجين *PSLA* المسؤولة عن تكوين Biofilm.
 - ٨- قياس مستوى التعبير الجيني لجين *psIA* في بكتريا الزوائف الزنجارية.

الفصل الثاني

استعراض المراجع

Literatures Review

٢-١ الكلبسيلا الرئوية

Klebsiella pneumoniae

وصفت *Klebsiella pneumoniae* لأول مرة في عام 1882 من قبل Carl Friedlander بعد عزلها من رئات المرضى الذين ماتوا بسبب الالتهاب الرئوي، على أنها عصية مغلفة غير متحركة، سالبة الكرام، موجودة في البيئة ويرتبط بها الالتهاب الرئوي في مجموعات المرضى الذين يعانون من اضطراب تعاطي الكحول أو مرض السكري، تستعمر البكتيريا عادة الأسطح المخاطية للإنسان في البلعوم والجهاز الهضمي (GI) (Ashurst & Dawson, 2018).

يمكن أن تكون البكتيريا شديدة الخطورة والمقاومة للمضادات الحيوية بمجرد دخولها الجسم، يعد الالتهاب الرئوي *K. pneumoniae* السبب الرئيسي للالتهاب الرئوي المكتسب من المستشفيات (HAP) Hospital Acquired Pneumoniae وهو ما يمثل ٨٣٪ من جميع حالات العدوى البكتيرية المستشفوية (Priyanka et al., 2020).

تنتج *K. pneumoniae* أنزيم beta-lactamase الذي يحلل حلقة بيتا لاكتام في الأدوية، تم اكتشاف extended spectrum-beta lactamase (ESBL) *K. pneumoniae* في أوروبا في عام ١٩٨٣ والولايات المتحدة في عام ١٩٨٩، يمكن أن تقوم ESBLs بتحليل oxyimino cephalosporins ، مما يجعل الجيل الثالث من cephalosporins عديمة الفائدة للعلاج بسبب المقاومة أصبح carbapenems خيارًا علاجيًا لـ ESBL (Al-Saffar, 2019) ، وأفادت منظمة الصحة العالمية بان مقاومة تنتج *K. pneumoniae* للجيل الثالث cephalosporins و carbapenems هذا الوضع في العالم يجعل علاج الأمراض المعدية يكون صعبا وتنتج مشكلة أكثر خطورة لحياة الإنسان ظهور مقاومة السلالة الرئوية للمضادات الحيوية في بعض مدن الآسيويين كما تم الإبلاغ عنها (Patilaya et al., 2019).

وأشارت دراسة (Khuzim et al., 2022) إلى أنه أكثر من ٨٠٪ من حالات العدوى بالبكتيريا المعوية المقاومة carbapenems والتي تم الإبلاغ عنها إلى مركز السيطرة على الأمراض كانت ناجمة عن *K. pneumoniae* ترتبط مقاومة carbapenems بزيادة مضخات التدفق وتغيرات الغشاء الخارجي وزيادة تخليق إنزيمات ESBL في الكائن الحي.

٢-١-١ تصنيف الكلبسيلا الرئوية

Classification of *Klebsiella pneumoniae*

تصنف الكلبسيلا تبعا Bergey's Manual of Systematic الطبعة الثانية على النحو التالي:

Domain: Eubacteria

Phylum: Proteobacteria

Class: Gamma Proteobacteria

Order: Enterobacteriales

Family: Enterobacteriaceae

Genus: *Klebsiella*

Species: *pneumoniae* (Singh *et al.*, 2019)

***K. pneumoniae* characterization**

٢-١-٢ الوصف العام

كليبسيلا هي جنس رئيسي في عائلة البكتيريا المعوية ويسبب الالتهاب الرئوي. (Shnaiderman-Torban *et al.*, 2022)، *Klebsiella spp.* سالبة Gram، عصيات متوسطة الحجم $(2-3) \mu\text{m}$ (0.4-0.6)، اختيارية لاهوائية، مخمرة، إيجابية catalase، سالبة oxidase، تخمر lactose، تختزل النترات الى نترت، جميعها قادرة على النمو في الأوساط غير الإغنائية مثل Nutrient agar وتنتج مستعمرات مخاطية وردية شاحبة اللون على وسط MacConkey agar (Jebakumar, 2015)، تكون مرتبة مفردة أو في أزواج أو في سلاسل قصيرة وتمتلك capsule poly sacchride ذات شكل بارز، وهذا يعطي المستعمرات مظهرها على الوسط الزرعى تظهر مستعمرات الكليبسيلا كبيرة الحجم، مخاطية، وحمراء على MacConkey agar، مما يشير إلى تخمر اللاكتوز (Nima & Al-Ramahi, 2020).

٢-١-٣ الوبائية *K. pneumoniae* Epidemiology of

يمكن العثور على الكلبسيلا الرئوية في العديد من البيئات، بما في ذلك المياه والنباتات والتربة ومياه الصرف الصحي وكذلك على الأسطح المخاطية للحيوانات (Piperaki *et al.*, 2017)، وتوجد أنواع الكلبسيلا بشكل Normal flora في الجهاز الهضمي للبشر والحيوانات، والكلبسيلا الرئوية يمكن أن يسبب التهابات خطيرة، بما في ذلك التهاب السحايا والتهاب الشعب الهوائية وتجرثم الدم والالتهاب الرئوي والمسالك البولية وتسبب العدوى في البشر والحيوانات (Haghighifar *et al.*, 2021)، وتم العثور على هذه البكتيريا متطفلة في المسالك الأنفية البلعومية والأمعاء، فضلا عن ذلك *K. pneumoniae* يتم تحديده أيضاً على الجرح بعد جراحة الجلد (Patilaya *et al.*, 2019).

البشر هم الناقل الرئيسي لـ *K. pneumoniae* في عموم السكان ٥٪ إلى ٣٨٪ من الناس لديهم البكتيريا في برازهم و ١٪ إلى ٦٪ في البلعوم الأنفي، تنتشر العدوى في الغالب بواسطة الجهاز الهضمي للمريض والعاملين في المستشفى مما قد يؤدي إلى وباء المستشفيات (Abbas et al., 2024) ، وتم تشخيص العديد من الأنواع المستعمرة في الأشخاص الذين ينتمون للعرق الصيني والذين يعانون من إدمان الكحول المزمن، في المرضى في المستشفى يكون معدل الناقل لـ *K. pneumoniae* أعلى بكثير من المعدل الموجود في المجتمع، وفي دراسة أخرى يمكن رؤية زيادة معدلات الناقل تصل إلى ٧٧٪ في براز الأشخاص الذين يدخلون المستشفى (Chang et al., 2021) .

هناك نوعان من الالتهاب الرئوي الناجم عن *K. pneumoniae* : الالتهاب الرئوي المكتسب من المستشفى أو المكتسب من المجتمع (Liu et al., 2019) ، في حين أن الالتهاب الرئوي المكتسب من المجتمع هو تشخيص سائد، وإن معدلات الإصابة بـ *K. pneumoniae* منخفضة في الدول المتطورة، وتمثل عدوى *K. pneumoniae* ٣٪ إلى ٥٪ من الالتهاب الرئوي المكتسب من المجتمع، بينما في الدول النامية مثل أفريقيا يمكن أن يمثلوا ما يصل إلى ١٥٪ من جميع حالات الالتهاب الرئوي، تسبب عدوى *K. pneumoniae* حوالي ١١,٨٪ من حالات الالتهاب الرئوي المكتسب من المستشفيات في جميع أنحاء العالم. وهي المسؤولة عن ٨٪ إلى ١٢٪ من حالات الالتهاب الرئوي في المرضى الذين يستخدمون أجهزة التنفس الصناعي مقارنة بـ ٧٪ فقط في أولئك الذين لا يستخدمونها، يمكن أن يؤدي إدمان الكحول مع تسمم الدم إلى معدلات وفيات تتراوح من ٥٠٪ إلى ١٠٠٪ (Qu et al., 2022) ، غالباً ما تصيب *K. pneumoniae* الفصوص العلوية للرئة ولكنها يمكن أن تصيب الفصوص السفلية أيضاً ، والتنفس القصبي وزيادة الرنين الصوتي، ومعظمها في الفص العلوي (Duțu et al., 2022) .

يظهر *K. pneumoniae* المكتسب من المستشفيات أعراض بشكل مشابه للالتهاب الرئوي المكتسب من المجتمع، قد يعاني المرضى من السعال والحمى وعدم الراحة في الصدر الجنبى وضيق في التنفس ويوصف البلغم *K. pneumoniae* بأنه "مشوب بالدم" أو "بلون الصدا"، في حين أن الأفراد المصابين ينتجون "currant jelly". يسبب *K. pneumoniae* التهاباً كبيراً ونخراً في الأنسجة المحيطة (Para et al., 2018) .

٢-١-٤ عوامل الضراوة Virulence factors of *Klebsiella pneumoniae*

K. pneumoniae بكتيريا مرضية وضعت في مستوى عالي من مقاومة المضادات الحيوية ، نتيجة للتغيرات في الحامض النووي الأساسي ، وأن *Klebsiella pneumoniae* تنتج عوامل الفوعة مثل lipopolysaccharide (LPS) مع O antigen، شعيرات لالتصاق بخلايا العائل ، Capsules

(K antigen) المضادة للبلعمة ، وحاملات الحديد siderophores التي تساعد البكتيريا في تنافسها مع المضيف لامتناس الحديد، المستعمرات تنتج مخاط على العزلة الأولية، مما يدل على وجود عدد كبير من الكبسولة تحيط بالخلايا الفردية (da Costa de Souza *et al.*, 2022) .

Capsular Polysaccharide

٢-١-٤-١ المحفظة

Capsular Polysaccharide (CPS) هو مصفوفة Polysaccharide توجد خارج الخلية ترتبط بقوة بالجدار الخلوي للبكتيريا، مما يحميها من الموت عن طريق مضادات الجراثيم والجفاف والبلعمة (Paczosa & Meccas, 2016) ، CPS يتكون من Polysaccharide حامضية معقدة التي تحتوي على وحدات فرعية متكررة من (٤-٦) سكريات، مثل وحدة فرعية واحدة من حمض uronic المسؤولة عن تشكيل المستعمرات المخاطية mucoid على الطبقة، بناءً على تنوع مكونات Polysaccharide الموجودة في الكبسولة والهياكل والمستضدات المختلفة، يمكن تقسيم *K. pneumoniae* إلى ٧٩ نمطًا مصليًا serotypes على الأقل (Zhu *et al.*, 2021).

يمكن للسلاسل البكتيرية التي تمتلك كبسولات أن تتجنب الاستجابات المناعية من خلال عدة آليات، أولاً طبيعتها المحبة للماء وشحنها السالبة تصد السطح المشحون سالبًا للخلايا البالعة مما يقلل من إزالة البكتيريا عن طريق البلعمة، ثانياً المحفظة يخفي الأنماط الجزيئية المرتبطة بمسببات الأمراض (PAMPs) التي يتم التعرف عليها بواسطة مستقبلات Toll-like (TLRs) ومن ثم منع تفعيل الاستجابة المناعية ثالثاً: وجود الكبسولة قد يسبب نقص الارتباط، تحلل أو إخفاء المكونات التكميلية زيادة على ذلك قد تكون البكتيريا المغلفة محمية من البيبتيدات المضادة للميكروبات المختلفة الموجودة على الأسطح المخاطية (Bansal *et al.*, 2014) .

Siderophores production

٢-١-٤-٢ إنتاج حاملات الحديد

Siderophores عبارة عن أنظمة عالية الألفة لحمل الحديد ، توفر الحديد للخلايا البكتيرية التي يتراوح وزنها الجزيئي بين (٤٠٠ - ١٥٠٠) Da. فضلا عن، فقد أثبت أن جين حامل السيدروفور قد تم استنساخه من بلازميدات بعض أنواع *K. pneumoniae* وتم نقله إلى بكتيريا غير ضارة (لاتنتج حاملات الحديد) ومع ذلك، فإن إنتاج حامل السيدروفور يؤدي إلى تعزيز النمو في أنسجة المضيف (Clegg & Murphy, 2017) . *K. pneumoniae* تنتج (٤-٦) بروتينات الغشاء الخارجي بعد نموها تحت شروط محددات الحديد، يمكن للسلاسل تشفير enterobactin (enterochelin) ، Siderophores ، aerobactin و yersiniabactin، التي لها درجة عالية للغاية من الحديد ويمكنها إزالة الحديد من جزيئات النقل المضيفة (Lawlor *et al.*, 2007) .

٢-١-٤-٣ عوامل الاستعمار (الالتصاق) Colonization factors (Adhesions)

يجب أن تلتصق البكتيريا بسطح الخلايا الموجودة في أنسجة المضيف بمجرد دخولها جسم المضيف، و هذه هي المرحلة الأولى في عملية العدوى تليها مرحلة تكوين المستعمرات الدقيقة، fimbriae هي ليست أسواط، والتي صنف في الغالب على أساس قدرتها على الالتصاق بكرات الدم الحمراء من الأنواع الحيوانية المتنوعة، تم العثور على نوعين سائدين في *K. pneumoniae* type 1 pili or mannose sensitive hemagglutination (MSHA) type 3 pili or mannose sensitive hemagglutination (MR/KHA) (Al-Husseiny & Nakkash, 2008) . في إحدى الدراسات، تم اكتشاف أن النوع الأول والنوع الثالث من fimbriae تزيد من تشكيل الأغشية الحيوية *K. pneumoniae* على القسطرة البولية، وفي دراسة أخرى تم اكتشاف أنه في النوع الأول من fimbriae ليس له أي تأثير على تكوين الأغشية الحيوية، في حين تم اكتشاف أن تعبير fimbria من النوع ٣ كان يعزز بقوة تكوين الأغشية الحيوية ويشجع نمو *K. pneumoniae* المرتبطة بالقسطرة. وتوصلت إحدى الدراسات أن النوع الأول من fimbria يتم التعبير عنه بواسطة معظم أفراد عائلة البكتيريا المعوية ويتكون من وحدة فرعية رئيسية (fimA) والتصاق طرفي صغير (fimH)، وعادة ما يرتبط بالتهاب المسالك البولية، ويرتبط بالهيكل المحتوية على المانوز الموجودة على الخلايا المضيئة أو في المادة البوليمرية خارج الخلية (EPS) (Zheng et al., 2018) .

تشكل الوحدات الفرعية لبروتين MrkA في الغالب النوع ٣ من fimbriae، مما يحفز تطور الأغشية الحيوية. يحتوي طرف fimbriae على بروتين آخر يسمى mrkD، والذي يمنح الزوائد قدرتها على الالتصاق ببعضها البعض، والالتصاق بالأسطح المصنوعة من polyvinyl chloride (PVC)، polyethylene (PE) مما يحدد قوة الارتباط الخملية (Ochońska et al., 2021) .

٢-١-٤-٤ عديد السكاريد الدهني Lipopolysaccharide

Lipopolysaccharide (LPS) هو مكون الغشاء الخارجي للخلية في بكتريا سالبة الكرام يتكون من ثلاثة أقسام رئيسية: O antigen (Oligosaccharide)، core Oligosaccharide، lipid A (fatty acids، phosphate amine glucose) والسلسلة الجانبية تسمى O antigen يمنع ترسب بروتينات المتمم على سطح غشاء الخلية النشاط المصلي المرتبط بالمتمم (Lee et al., 2017)، (LPS) يشبهه (CPS) مرتبط تساهمياً بجدار الخلية، مستضد O الموجود في LPS المبني من وحدات متكررة من (Oligosaccharide) والتي قد تكون بوليمرات متجانسة أو غير متجانسة-homo- or hetero- polymers، الغرض الأساسي من المستضد O- هو حماية *K.pneumoniae* من الموت بواسطة

المتمم، lipid A وهو المسؤول عن سمية البكتيريا سالبة الجرام التي تسمى endotoxin، وقد ثبت أنها تنشط المتمم عبر مسار البديل. يتم تعديل النشاط المناعي الطبيعي بواسطة التعبير المكمل للاستجابة الخلوية والخلطية للجهاز المناعي (Yossef, 2014).

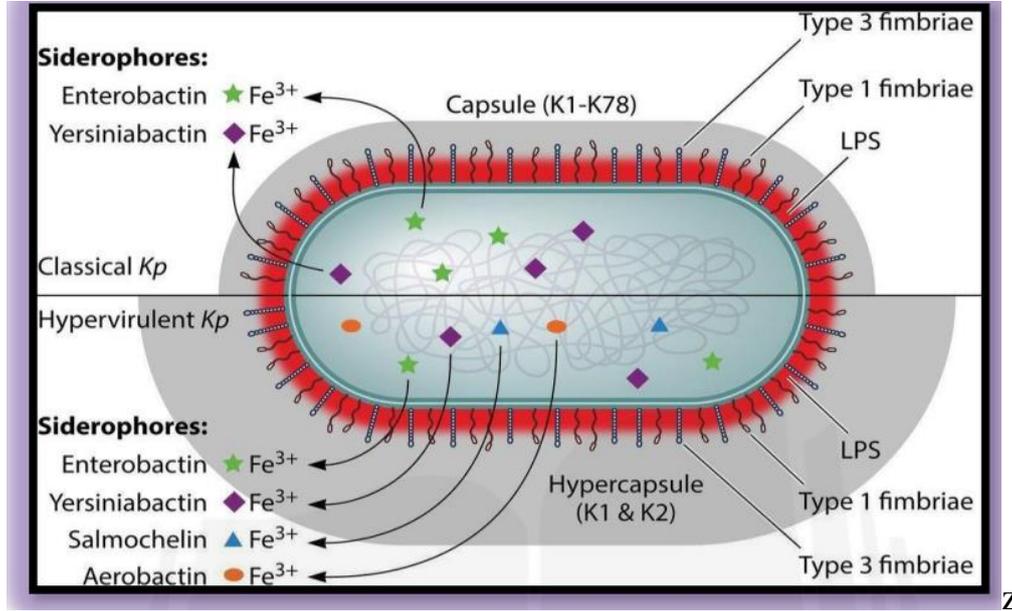
٢-١-٤-٥ أنزيمات البيتا لاكتام β -lactamases

تعرف B-lactamases على أنها إنزيمات تنتجها بعض البكتيريا التي تستطيع مقاومة المضادات الحيوية بيتا لاكتام مثل cephamycin, penicillin, carbapenems (ertapenem)، يقوم β -lactamase بمقاومة المضادات الحيوية عن طريق كسر بنية المضادات الحيوية من خلال التحلل المائي لإنزيم lactamase الذي يكسر حلقة بيتا لاكتام، مما يؤدي إلى إلغاء تنشيط الجزيء المضاد للبكتيريا عادةً ما تُستخدم المضادات الحيوية بيتا لاكتام لعلاج مجموعة واسعة من أمراض البكتيريا إيجابية الجرام وسالبة الجرام، عادةً ما يتم إفراز إنزيمات البيتا لاكتاماز التي تنتجها الكائنات سلبية الغرام، خاصة عند وجود المضادات الحيوية في البيئة (Shehata et al., 2019).

٢-١-٤-٦ الغشاء الحيوي Biofilm:

عبارة عن مجموعات منظمة من الخلايا البكتيرية التي يتم إدخالها داخل مصفوفة منتجة ذاتياً من مادة بوليمرية خارج الخلية (EPS)، تلتصق بالأسطح الحية أو غير الحية (Singh et al., 2020)، EPS عبارة عن بنية معقدة تتكون من الأحماض النووية والبروتينات والدهون الفوسفاتية والدهون والسكريات وألياف amyloid وحتى في بعض الحالات كميات غير متوقعة من الحمض النووي خارج الخلية (Toyofuku et al., 2012)، تتميز خلايا الأغشية الحيوية بأنها مرتبطة بشكل لا رجعة فيه بطبقة أساسية أو ببعضها البعض (Arampatzi et al., 2011)، تعد السكريات المحفوظة capsular polysaccharides، والنوع ١ والنوع ٣ من fimbriae من عوامل الفوعة الرئيسية التي تساهم في تطور الأغشية الحيوية في *K.pneumoniae*، تتشكل الأغشية الحيوية بواسطة البكتيريا استجابة لضغوط بيئية معينة على سبيل المثال، المغذيات والأكسجين ومبيدات الجراثيم. ويتمثل دور الأغشية الحيوية في حماية البكتيريا وإنقاذها من الجهاز المناعي المضيف، والعدوى المستمرة، والعلاج بالمضادات الحيوية. كما أنه يساعد على تبادل المواد الوراثية المقاومة للمضادات الحيوية (Crabbé et al., 2019). الأغشية الحيوية تتشكل على الأسطح الحية وغير الحية أو على الأسطح الصلبة والسائلة وكذلك على الأنسجة الرخوة في الكائن الحي، وتعد الأغشية الحيوية للكليبسيلا الرئوية المتكونة على الأسطح الداخلية للقسطرة والأجهزة الطبية الأخرى هي الأكثر أهمية من الناحية السريرية، وقد تساعد أيضاً في استعمار الجهاز الهضمي والجهاز التنفسي والجهاز البولي ونمو الأحياء الدقيقة الغازية خاصة

عند الأشخاص الذين يعانون من ضعف الجهاز المناعي (Piperaki *et al.*, 2017). وفي كل من البكتيريا سالبة الجرام والإيجابية، وجد أن استشعار النصاب (آلية الاتصال من خلية إلى أخرى) يُظهر دورًا أساسيًا في تكوين الأغشية الحيوية (Preda & Săndulescu, 2019).



شكل (١-٢) عوامل الضراوة في بكتريا *K. pneumoniae*

٢-١-٥ مقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية

Bacterial resistance to antibiotics

إن الإصابات الشديدة المكتسبة من المستشفيات أو من المجتمع تجعل الخيارات العلاجية باستخدام المضادات الحيوية الموجودة محددة وغير كفوة، نتيجة للكائنات الحية الدقيقة المقاومة للأدوية المتعددة، وأدى ظهور مقاومة المضادات الحيوية في عزلات *K. pneumoniae* في جميع أنحاء العالم إلى زيادة خطر فشل العلاج بالمضادات الحيوية لدى البشر (Navon-Venezia *et al.*, 2017). والعدوى التي تنتجها *K. pneumoniae* ترتبط بمستوى الرعاية الصحية والاصابات المكتسبة من المجتمع وكذلك الالتهاب الرئوي والتهابات الجروح والتهابات الدم والتهابات المسالك البولية، ومع ذلك فإن المقاومة تؤدي إلى تأثيرات أكثر خطورة من هذه العدوى (Priyanka *et al.*, 2020b)، هناك عوامل أساسية تؤدي إلى زيادة البكتيريا المقاومة للأدوية المتعددة عبر النقل الأفقي لجينات مقاومة مضادات الميكروبات التي تتوسطها عناصر وراثية متنقلة مثل *integrons* و *plasmids* و *transposon* بين الأنواع البكتيرية المتنوعة وعبرها (Yadegarynia *et al.*, 2017).

عدت بعض الدراسات مقاومة *K. pneumoniae* لـ cephalosporins، fluoroquinolones، aminoglycosides sulfamethoxazole's، carbapenem ticarcillin Ampicillin، carbenicillin وتأتي المقاومة في *K. pneumoniae* للمضادات الحيوية من إنتاج penicillinase الكروموسومات، متغير (SHV-1) sulfhydryl. خلال الثمانينيات أصبحت *K. pneumoniae* دليلاً للبلازميدات التي تشفر بيتا لاكتاماز ممتدة الطيف (ESBLs) التي توفر مقاومة cephalosporins، وأن آليات مقاومة المضادات الحيوية B-Lactams في *K. pneumoniae* هو تصنيع أنزيمات AMPc، carbapenems، B-lactamases، وأن البكتيريا التي تنتج مثل هذه الانزيمات تعتبر مقاومة للأدوية المتعددة (Karam et al., 2016)، في المستشفيات ذات المستويات العالية من مقاومة المضادات الحيوية، قد تحتوي البيئة على كائنات دقيقة إضافية تسهل الانتشار البسيط لجينات المقاومة، علاوة على ذلك فإن هذه البكتيريا قد تكون قادرة على إنتاج إنزيمات مثل B-lactamases المسؤولة عن تحلل المضادات الحيوية (Ferreira et al., 2019)، وكذلك قدرتها على تكوين الأغشية الحيوية ونتيجة لذلك، يحمي الغشاء الحيوي البكتيريا من المضادات الحيوية ومن جهاز المناعة. قد يكون هذا الإنتاج بسبب بطء النمو، أو انخفاض تغلغل المضادات الحيوية، أو من خلال التكيف والحد من العناصر الغذائية. استشعار النصاب، هو وسيلة اتصال بين البكتيريا تعتمد على الكثافة وتمكن البكتيريا من تنسيق التعبير الجيني عن طريق إفراز جزيئات إشارات محددة، وهو عنصر آخر يمكن أن يحسن المقاومة (Jafari-Sales et al., 2018)، وتشمل آليات المقاومة الإضافية مضخات التدفق التي تدعم مقاومة macrolide، nalidixic acid، quinolone، chloramphenicol erythromycin، زيادة على أنه آلية التدفق غير معروفة سابقاً ضد البيتا لاكتام (Li et al., 2015).

٢-٢ الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa*

٢-٢-١ الوصف العام *Pseudomonas aeruginosa*

الزائفة الزنجارية بكتيريا سالبة الكرام gram-negative، إجبارية التهوية obligate aerobic ومع ذلك فإنه قد تنمو أيضاً لاهوائياً باستخدام النترات كمستقبل نهائي للإلكترون بدلا عن الأوكسجين (de Sousa et al., 2021).

وتعد *Pseudomonas aeruginosa* بكتيريا متحركة motile مع سوط قطبي واحد، عصيات على شكل قضيب، بكتيريا ممرضة انتهازية غير مكونة للأبواغ تنمي إلى فصيلة Lactose non-fermenters وتنتج مواد تشبه رائحة الفاكهه، تنمو هذه البكتيريا في درجة حرارة ٣٧-٤٢ درجة مئوية

وتستطيع النمو عند درجة ٤٢ درجة مئوية وهذا يساعد في تميزها عن انواع الزوائف الأخرى (Pang *et al.*, 2019) ، تنتج *Pseudomonas aeruginosa* أنواع متعددة من الصبغات منها pyoverdine و pyocyanin اللذين يولدان لونًا أخضر مزرق مميزًا على الأوساط الصلبة، لتثبيط البكتيريا سالبة الجرام وإيجابية الجرام والفطريات والخلايا البشرية (Bogiel *et al.*, 2021) .

تم عزل الزائفة الزنجارية لأول مرة من مزرعة نقية في عام ١٨٨٢ من قبل Carle Gessard، الصيدلي الفرنسي الذي أطلق عليها في الأصل اسم *Bacillus pyocyaneus* في مقال بعنوان "على التلوين الأزرق والأخضر للضماطات" (Wood *et al.*, 2023) .

تشير كلمة "Pseudo" إلى "وحدة زائفة" باللغة اليونانية، بينما تعني كلمة "monas" "وحدة واحدة" وتعني كلمة *aeruginosa* "زنجار". يتم تصنيف *P. aeruginosa* على النحو التالي.

Kingdom: Bacteria

Phylum: Proteobacteria

Class: Gammaproteobacteria

Order: Pseudomonadales

Family: Pseudomonadaceae

Genus: *Pseudomonas*

Species: *Pseudomonas aeruginosa* (Diggle & Whiteley, 2020)

تؤدي *Pseudomonas aeruginosa* إلى إنتاج مستعمرات شاحبة غير مخمرة للاكتوز على أجار MacConkey agar وعلى الأجار المغذي nutrient agar فإنها تنتج مستعمرات صبغية فلورسنت ضخمة من pyocyanin الأخضر المزرق و pyoverdine، وعلى أجار الدم تشكل منطقة انحلالية β -haemolytic ذات مستعمرات كبيرة ذات لون رمادي إلى أسود، أجار cetrimide هو وسيلة انتقائية لتحديد *P. aeruginosa*. فهو يمنع نمو البكتيريا الأخرى ويعزز تكوين الاصبغ وأن *P. aeruginosa* ينمو بلون أخضر لامع ومستعمرات مرتفعة (Bhuiya *et al.*, 2018) .

٢-٢-٢ الأمراض ٢-٢-٢ Pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa*

العدوى مسؤولة عما يصل إلى ٦٠٪ من الوفيات بين مرضى الحروق، والزائفة الزنجارية لديها أعلى معدل وفيات بين جميع أسباب تجرثم الدم، غالبًا لا يتم اكتشاف هذه العدوى الخبيثة حتى تكون هناك

مزرعة دم إيجابية لمرض *P. aeruginosa* ، مما يعني أن المريض يعاني بالفعل من تجرثم الدم وإن الاختبار الذي يكتشف *P. aeruginosa* بسرعة بينما لا يزال موجودًا بأعداد منخفضة داخل مكان الحرق يمكن أن يكون تحويليًا، لأنه سيسمح بالتدخل العلاجي المبكر والأكثر فعالية (Cueva et al., 2020).

تعد *P. aeruginosa* سببًا مهمًا للمرض والوفيات لدى المرضى الذين يعانون من نقص المناعة، وخاصة مرضى الحروق، يمكن أن يسبب استعمار هذه البكتيريا إلى مجموعة متنوعة من الأمراض الحادة للمرضى في المستشفى بما في ذلك تسمم الدم والالتهاب الرئوي والتهاب الشغاف والتهاب الأذن الوسطى والتهاب القرنية والتهابات الجلد والأنسجة الرخوة، علاوة على ذلك، أصبحت *P. aeruginosa* ممرضًا شائعًا في بيئات المستشفيات بسبب مقاومتها الجوهريّة أو المكتسبة للعديد من المضادات الحيوية واسعة النطاق وأن معدل الوفيات بين مرضى الحروق المصابين أعلى من مرضى الحروق غير المصابين، وخاصة المصابين بالبكتيريا المقاومة للأدوية المتعددة (MDR) بسبب التقارير المتكررة عن عدوى *P. aeruginosa* MDR في وحدات الحروق، فإن فهم وتوصيف السبب في أصابه البكتيريا فيما يتعلق بجروح الحروق له أهمية كبيرة لتطوير أساليب جديدة للوقاية من الالتهابات ذات الصلة وعلاجها والحد من الإصابة (Hasannejad-Bibalan et al., 2021).

تعد *P. aeruginosa* مصدرًا رئيسيًا للعدوى المكتسبة من المستشفيات (HAIs) بسبب مقاومتها للمضادات الحيوية وقدرتها على النمو في البيئات منخفضة المغذيات، وأن تواجدها بمجموعة متنوعة من المناطق الاستوائية، ونموها في كل من البيئات الطبيعية والسريية يسمح لها بإصابة مجموعة متنوعة من الأنسجة (Caschera & Saiko, 2021)، وتشير دراسة (Sizmaz et al., 2016) أن ارتداء العدسات اللاصقة هو السبب الأكثر شيوعًا للإصابة بـ *P. aeruginosa* التهابات القرنية ومن عوامل الخطر الأخرى لالتهاب القرنية يشمل إصابة مرتديها بالصددمات العينية وجراحة العين وتنتقل لتواجدها في محلول حفظ العدسات في محفظة العدسات اللاصقة.

وتعد *P. aeruginosa* بكتيريا شائعة توجد على أسطح الجلد والأنف والجهاز التنفسي العلوي والجهاز الهضمي (Jawezt et al., 2013)، يمكن لعزلات *P. aeruginosa* أن تتحمل البيئات القاسية، بما في ذلك التراكيز العالية من الأملاح والأصباغ والمضادات الحيوية المستخدمة غالبًا في المستشفيات. يمكنها تحمل المطهرات وتنمو في كل من الماء المقطر ومياه الصنبور *Pseudomonas aeruginosa* ولديها اختبار إيجابي قوي Oxidase، Catalase وذلك لقدرتها على إنتاج هذه الإنزيمات وهذا ما يميزها عن *Pseudomonas Putida* و *Pseudomonas Fluorescens*، التي نادرًا ما تكون ضارة (Ezeador et al., 2020). ينتقل هذا العامل الممرض عن طريق الماء ويمكن العثور عليه في العديد من البيئات الرطبة (Streeter & Katouli, 2016).

٢-٢-٣ عوامل الضراوة Virulence factors

إن من عوامل الضراوة المهمة التي تمتلكها بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* هو تكوينها للغشاء الحيوي Biofilm وامتلاكها للشعيرات Pili ، والإنزيمات لكل من الدهون والبروتين و الجيلاتين ، والليفيين والحامض النووي DNA هذه العوامل هي التي تمكن البكتريا من الاستعمار في جسم المضيف مؤدية إلى الحالة المرضية و المقاومة للوسائل الدفاعية الخلوية وهناك شعيرات تمتلكها بكتريا *P. aeruginosa* تدعى Pili وهي تراكيب خيطية منتشرة على سطح الخلية الجرثومية مما يساعد الخلية من الالتصاق و الاستيطان على سطح الأنسجة الطلائية للمضيف وتتكون هذه الشعيرات من بوليمر متجانس البناء (Homopolymer) على هيئة تركيب حلزوني لتكون أنبوبا مجوف (Gajdács *et al.*, 2021) .

٢-٢-٣-١ إنتاج الأنزيمات الحالة للبروتين Production Protease

أن هذه الأنزيمات تعمل على اختراق الأنسجة فتسبب تلفها وتنتج بكتريا *p. aeruginosa* أنواع متعددة من الأنزيمات منها Alkaline protease ،Elastase B (Las B) ،Elastase A (Las A) تعمل هذه الأنزيمات على تحليل الايلاستين Elastin في جدران الأوعية الدموية مما ينتج عنه نضوح مكونات الدم السائلة كالمصل والبلازما حيث تقوم البكتريا في استعمالها في النمو والتكاثر مما يعمل على تسهيل انتشار البكتريا داخل الجسم (Min & Yoon, 2020) ، وأن هذه الأنزيمات تمتاز بقدرتها على تفكيك مجموعة كبيرة من المواد الأساس مثل الكولاجين collagen ومولد الليفيين Fibrinogen وبعض العناصر المناعية المهمة التابعة لمكونات نظام المتمم System Components Complement مما يؤدي إلى تلف الأنسجة الخلوية ، و اكدت دراسات عديدة أن حدوث طفرات وراثية في الجينات المشفرة لهذا الأنزيم سوف يؤثر في ضراوة البكتريا (Silva *et al.*, 2021) .

٢-٢-٣-٢ الانزيم الحال للدم Hemolysin :

يعد انزيم الهيمولايسين من احد عوامل الضراوة المهمة في بكتريا الزائفة الزنجارية ويكون على نوعين النوع الأول Phospholipase C وهذا النوع يتأثر بالحرارة Heat Labile Hemolysin والنوع الثاني من الهيمولايسين هو rhaminolipid ويكون ثابت حراريا Heat Stable Hemolysin وذات تركيب يشبه المنظفات لذلك يساعد على تحليل و أزاله الدهون وبذلك يدفعها للتحطيم بواسطة Phospholipase (PLC) مما يؤدي الى تثبيط فعالية الحركة الهدبية للخلايا الطلائية الموجودة في الجهاز التنفسي ويساعد ذلك الى حدوث الإصابة الحادة و المزممة للبكتريا (Marchant & Banat, 2012) ، تكمن أهمية هذا الأنزيم بانه يعمل على تحليل كريات الدم الحمراء

للمضيف وبذلك يتوفر الحديد اللازم لنمو البكتريا ويؤدي إلى حدوث تنخرات في الجلد وأغلب عزلات بكتريا *p. aeruginosa* منتجة لهذا الانزيم من نوع Beta-hemolysin (Massimelli et al., 2005).

٢-٢-٣-٣ الغشاء الحيوي Biofilm

أحد عوامل الفوعة الذي تكونه البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام سواء التي عزلت من الجسم أو من خارج الجسم بالأخص تلك الموجودة على سطح الأجهزة الطبية مثل أجهزة القسطرة والديليزة و في الحروق والمياه الصناعية وغيرها من أسطح المواد العضوية و غير العضوية (Olar et al., 2022)، والغشاء الخلوي عبارة عن تجمع من الخلايا البكتيرية أذ تقوم قوى فان دير Van der Waals forces بتثبيت الخلايا البكتيرية العالقة على السطح في بادئ الأمر ، ثم بعد ذلك تقوم الزوائد مثل الأسواط ، أو الأهداب كمنبت لقوة الالتصاق، والتصاقها بالأسطح الصلبة ، وتكون مغلفة بمادة بينية خارج خلوية matrix extracellular التي تكون عبارة عن بروتينات وسكريات متعددة و DNA وتساعد هذه المادة الخارج خلوية في تثبيت الغشاء الحيوي (Evgenia et al., 2021).

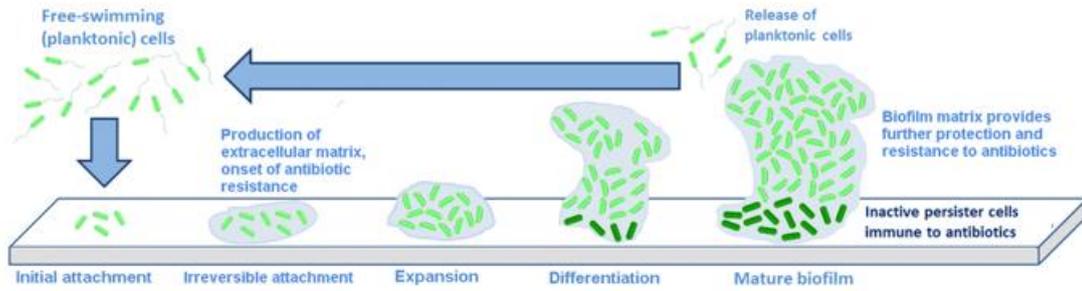
يمكن أن تكون بكتريا *P. aeruginosa* الأغشية الحيوية بسهولة في أي بيئة تساعد على النمو ، مقارنة مع الأنواع الأخرى من البكتريا التي تتطلب ظروفًا معينة مثل درجة الحرارة ودرجة الحموضة وقد ثبت أن تدرجات الضغط الازموزي هي المسؤولة عن الانتشار في سطح الأغشية الحيوية، ويساهم هذا الغشاء في زيادة قابلية البكتريا على مقاومة المضادات الحيوية ، ويوفر حماية الخلايا البكتيرية من آليات الجسم الدفاعية منها خلايا البلعمة phagocytic cells وتعتبر هذه البكتريا أكثر مقاومة للمناعة (Limoli et al., 2015) ، وأن معاملة الأغشية الحيوية بالمضادات الحيوية أو المبيدات الحيوية الأخرى عادة ما يكون غير فعال في القضاء عليها لذلك يعتبر تكوين الأغشية الحيوية سبب رئيسي في مشاكل صحية عديدة منها التهاب الاذن الوسطى المزمن والتهابات الرئة المزمنة في مرضى التليف الكيسي و أن السبب الحقيقي للعدوى المزمنة المستمرة هي الأغشية الحيوية (Moser et al., 2021) ، وأن عملية تكوين الغشاء الحيوي تتضمن المراحل الآتية :

١-التصاق البكتريا بالسطح **adhesion**: عندما تواجه البكتريا سطح حي او غير حي ستقوم مباشرة بتغيير الخصائص الفيزيائية والكيميائية للسطح وتكون عملية الالتصاق ضعيفة جدا في بادئ الأمر بواسطة قوى فان دير فال وان الالتصاق على السطح الخشن اقوى من السطح الأملس.

٢- تكوين المستعمرات الدقيقة **microcolony formation**: تبدأ البكتيريا بعد الالتصاق مباشرة بالانقسام والتكاثر لتكوين مستعمرات ذات شكل ثلاثي الأبعاد تدعى المستعمرات الدقيقة Microcolonies.

٣- نضوج هياكل الأغشية **maturation**: تتجمع المستعمرات الصغيرة في هذه المرحلة منتجة المستعمرات الكبيرة يرافقها إزاحة الطبقة التحتية من الخلايا وتكوين المسام القنوات الفارغة تستخدمها لتبادل المواد والعناصر الغذائية والنفايات.

٤- انتشار وتمايز الأغشية الحيوية **dispersion**: المرحلة الأخيرة التي تتضمن انتشار وتشتت الخلايا البكتيرية نتيجة إشارات ذاتية من البكتيريا مثل استنفاد الغذاء والأوكسجين فتتخذ مواقع جديدة وتقوم بإعادة تكوين الأغشية من جديد (Amankwah *et al.*, 2021).



شكل (٢-٢) مراحل تكوين الأغشية الحيوية (Harper *et al.*, 2014).

٢-٢-٤ مقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية

ترجع المقاومة العالية لبكتيريا *P. aeruginosa* الى امتلاكها آليات رئيسية لمقاومة المضادات الحيوية وأهمها:

١- عدم نفاذية الغشاء الخارجي **outer membrane impermeability**

يعمل الغشاء الخارجي لبكتيريا *P. aeruginosa* كحاجز وعائق كبير أمام دخول المضادات الحيوية لا يسمح بدخول جزيئات المضاد الحيوي كبيرة الحجم ويسمح بدخول الجزيئات صغيرة الحجم والمحبة للماء (B-lactam، quinolones) بوساطة قنوات مائية توفرها بروتينات البورين (Lambert, 2002).

٢- أنظمة التدفق **Efflux pumps systems**

تطرد المضادات الحيوية من خلايا بكتريا *P. aeruginosa* بواسطة بروتينات نقل الغشاء أو ما يسمى مضخات الدفع للأدوية، وتتكون مضخة الدفع من ثلاث مكونات بروتينية تعتمد على الطاقة في السيتوبلازم، وبورين يقع في الغشاء الخارجي، وبروتين رابط يربط مكوني الغشاء معا، وبذلك يتكون من تركيب ثلاثي النظام فعال جدا بدفق المضاد الحيوي الموجود في السيتوبلازم اوفي الغشاء السيتوبلازمي او بين الغشاء السيتوبلازمي والغشاء الخارجي (Lambert, 2002).

٣- تغيير موقع الهدف Alteration target site

أي قد تكتسب البكتريا مجموعة جينات تنتج عنها جدران بكتيرية متغايرة ولم تعد تحوي على مواقع للاستقبال وارتباط المضادات الحيوية (Tenover, 2006).

٤- التطور الافقي **Horizontal Evolution** يحصل هذا التطور عندما تكتسب البكتريا جينات خاصة تمتلك معلومات وراثية مشفرة عن المقاومة تحصل البكتريا على هذه الجينات بواسطة عدة آليات كالاقتران Conjugation والانتقال Transduction والتحول Transformation (Tenover, 2006).

٥- انتاج أنزيمات البيتا لاكتاميز B- lactamase production

تمتاز بكتريا *P. aeruginosa* بقابليتها على انتاج انزيمات البيتا لاكتاميز وهي انزيمات مثبطة للمضادات الحيوية، اذ تساهم في تثبيط فعالية المضادات الحيوية البيتا لاكتام كالبنسلينات Penicillins والسيفالوسبورينات Cephalosporins (Naas et al., 2017).

وأستشعار النصاب Quorum Sensing (QS) هو اتصال كيميائي بين الخلايا البكتيرية اذ تقوم الخلايا البكتيرية المستشعرة للنصاب بإنتاج وإطلاق جزئيات أشاره كيميائية تسمى المحفزات ذاتية autoinducers والتي يزداد تركيزها كدالة لكثافة الخلايا البكتيرية، لغرض تنظيم التعبير الجيني استجابة للتغيرات في الكثافة السكانية للخلايا البكتيرية (D'Almeida et al., 2022)، في عام ١٩٩٤ اكتشف العالم بيتر جرينبيرج نظام QS في بكتريا *Vibrio fischeri*، ويكون هذا النظام على نوعين النوع الاو LuxI/LuxR تستخدمه البكتريا سالبة الكرام اذ تستخدم Acyl Homoserine Lactone(AHL) كمحفزات ذاتية والنوع الثاني تستخدمه البكتريا موجبة الكرام اذ تستخدم البيبتيدات الصغيرة oligo peptides كمحفزات ذاتية (Lee et al., 2015)، QS هي عملية تنظيمية تجعل *P. aeruginosa* تعبر عن عوامل الفوعة، بما في ذلك protease, hemolysis, elastase، virulence، كما لها القدرة على السباحة، والوخز، وإنتاج الأغشية الحيوية، ومقاومة الإجهاد التأكسدي، والعدوى (Parasuraman et al., 2020)، عندما يتم تنشيط QS، تتشكل جزئيات الإشارة وتصل إلى

تركيز العتبة في البيئة، تقوم البكتيريا بعد ذلك بمراقبة هذه المعلومات وضبط عدد خلاياها وتعبيرها الجيني وفقاً لذلك (Xiao et al., 2022).

٢-٣ المضادات الحيوية: Antibiotics

نواتج أيضية ثانوية تنتجها كائنات معينة، وتنشط على مجموعة من الكائنات الحية الدقيقة، وتعرف على أنها مواد كيميائية تنتجها كائنات دقيقة مختلفة، والتي لها القدرة على تثبيط النمو أو قتل الكائنات الحية الدقيقة الأخرى دون التأثير على الخلايا البشرية، ويرتبط إنتاج المضادات الحيوية للأحياء الدقيقة بانخفاض معدلات النمو لها، إذ تنتج المضادات الحيوية في طور الثبات *stationary phase*، ويمكن أن تصنف المضادات الحيوية إلى مجموعتين واسعتين وفقاً لتأثيرها على الكائنات الحية الدقيقة إلى مضادات حيوية قاتلة للبكتيريا (*bactericidal*)، ومضادات حيوية مثبطة لنمو البكتيريا (*Bacteriostatic*)، وتوجد عدة عوامل على أساسها يتم اختيار المضاد الحيوي منها موقع الإصابة وعمر المصاب والنوع الجرثومي الذي يسبب الإصابة ونوع الإصابة (حاددة أو مزمنة)، فضلاً عن صفات خاصة بالمضاد منها أن يكون غير سام وأن يكون قليل الارتباط ببروتينات البلازما وأن لا يتداخل مع غيره من الأدوية الأخرى (Fymat, 2017).

٢-٤ مقاومة المضادات الحيوية Antibiotics resistance

المقاومة قدرة الكائنات الحية الدقيقة على تجنب تأثيرات المضادات الحيوية *Antibiotic*، وقد تتطور مقاومة المضادات الحيوية بواسطة الانتخاب الطبيعي على طفرة عشوائية (Baquero et al., 2021)، وأن انتشار مقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية يشكل تهديداً لصحة الإنسان وخصوصاً بين الفئات السكانية الفقيرة وفي المستشفيات ووحدات العناية المركزة وهذا يؤدي إلى زيادة في تكاليف الرعاية الصحية، وتطور البكتيريا سريعاً آليات جديدة لمقاومة المضادات الحيوية و تم تحديد كل *Escherichiacoli, Pseudomonasaeruginosa, Klebsiellapneumoniae, Acinetobact er baumannii* على أنها مسببات أمراض ذات معدلات عالية بشكل خاص لتطورها عوامل عديدة مقاومة للمضادات الحيوية، مما أدى إلى انخفاض مجموعة العلاجات المتاحة لهذه الكائنات (Morris & Cerceo, 2020).

وأشار Alexander Fleming مكتشف البنسلين في عام ١٩٤٥ "ليس من الصعب جعل الميكروبات مقاومة للبنسلين في المختبر عن طريق تعريضها لتراكيز غير كافية لقتلها وتبين أن تنبؤات

Fleming كانت دقيقة، إذا تعرضت البكتيريا إلى "مستويات غير مميتة" من المضاد الحيوي، فيمكنها استخدامه كإشارة ذات وظائف تنظيمية، يمكن للبكتيريا أن تطلق إنزيمات Beta-lactamases التي تحلل رابطة الأמיד في حلقة بيتا لاكتام مما يؤدي إلى تعطيل نشاط المضاد الحيوي (Terreni) Beta-lactam (et al., 2021).

و أن حالة الطوارئ الصحية العامة الناجمة عن الانتشار غير المنضبط لظاهرة مقاومة البكتريا للأدوية المتعددة (AMR) Antimicrobial resistance تعتمد على عوامل عديدة مسؤولة بشكل أساسي عن زيادة أنتشارها وتشمل هذه العوامل الاستخدام غير الصحيح للمضادات الحيوية، وكذلك عدم اتباع إرشادات الطبيب المختص، مع عدم الاهتمام بتقارير الحساسية للمضادات الحيوية، وكذلك بيع المضادات الحيوية بدون وصفة طبية، و من العوامل الأخرى تدني مستوى النظافة في المجتمع والغذاء الامن، وتراكم المضادات الحيوية في البيئة واستخدامها في الصناعات الحيوانية والغذائية، وأخيراً العامل المهم والأكثر خطورة والمساعد في زيادة معدل السلالات البكتيرية المقاومة هو ضعف مكافحة العدوى في المستشفيات والعيادات، وأصبحت البكتريا المقاومة للأدوية المتعددة تشكل خطر على المرضى الذين تتطلب حالتهم أجهزة طبية مثل أجهزة التنفس الصناعي وقسطرة الدم (Mancuso et al., 2021).

٢-٤-١ آليات المقاومة Mechanisms of antibiotic resistance

تقسم آليات المقاومة بشكل رئيسي إلى:

١- المقاومة الجوهرية Intrinsic resistance : هي الخاصية المتأصلة الطبيعية للبكتيريا لمقاومة المضادات الحيوية، على سبيل المثال تعد البكتيريا سالبة الجرام G^-ve بشكل عام أكثر مقاومة للمضادات الحيوية من البكتيريا إيجابية الجرام G^+ve بسبب وجود الغشاء الخارجي، مما يقلل من نفاذية العديد من المضادات الحيوية وتنتقل إلى النسل عمودياً (Nadeem et al., 2020).

٢- المقاومة المكتسبة Acquired resistance : وتنشأ هذه المقاومة من خلال التعديلات الجينية للبكتيريا الحساسة في الأصل، إما من خلال الطفرات أو عن طريق دمج جينات جديدة عن طريق HGT وبالتالي فإن الكائنات الحية الدقيقة التي تكون حساسة في البداية للمضاد الحيوي تصبح مقاومة بسبب الطفرات التلقائية أو المستحثة التي تغير على سبيل المثال هدف المضاد الحيوي أو امتصاصه بواسطة الخلية أو بعد اكتساب واحدة أو أكثر من الآليات الجزيئية لمقاومة مضادات الميكروبات مثل تعطيل المضادات الحيوية أو زيادة تدفق المضادات الحيوية وأن هذه التعديلات الجينية قابلة للتوريث وستؤدي إلى تأثير دائم وتنتقل المقاومة إلى النسل أفقياً (Zhang & Cheng, 2022).

٣- المقاومة التكيفية Adaptive resistance: هي قدرة البكتيريا على تغيير التعبير الجيني أو إنتاج البروتين بسرعة استجابة للمضادات الحيوية أو الظروف البيئية المحيطة، تتضمن الآلية الجزيئية وراء ذلك الوراثة اللاجينية وعدم التجانس السكاني وتضخيم الجينات ومضخات التدفق التي يتم تنظيمها بواسطة مسارات تنظيمية معقدة (Fernández *et al.*, 2011).

٤- المقاومة المتغيرة Heteroresistance: هو وجود واحدة أو عدة مجموعات سكانية فرعية، ضمن مجموعة سكانية معينة من البكتيريا تظهر مستويات متزايدة من مقاومة المضادات الحيوية مقارنة بالسكان الرئيسيين وغالبًا ما ترتبط هذه الظاهرة بوجود جينات غير مستقرة والتي من شأنها أن تعطي البكتيريا احتمالًا كبيرًا للعودة إلى الحساسية في غياب الضغط الانتقائي للمضادات الحيوية وعدم الاستقرار هذا يجعل اكتشافها صعبًا مما يزيد من خطر فشل العلاج (Uruén *et al.*, 2020).

٢-٥ آليات مقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية

٢-٥-١ الخط الأول من الدفاع (الأغشية الحيوية)

The First Line of Defense: (Bacterial Biofilm)

تعرف الأغشية الحيوية على أنها تجمع من المجتمعات الميكروبية الملتصقة ببعضها البعض على الأسطح العضوية أو غير العضوية، على الرغم من أن العديد منها ان لم يكن الأغلبية ليست "أغشية" مستمرة بالمعنى الدقيق للكلمة، وفي هذا الشكل من الحياة تعيش الكائنات الحية الدقيقة على مقربة شديدة في مصفوفة من المواد البوليمرية خارج الخلية (extracellular polymeric substances (EPS)). (Flemming *et al.*, 2021).

عندما تلتصق الخلايا البكتيرية بسطح حيوي أو غير حيوي صلب فإنها تنتج تدريجيًا EPS رطبًا وتشكل أخيرًا هياكل الأغشية الحيوية والتي تمنع وتعيق نقل العوامل المضادة للميكروبات إلى الخلايا عن طريق التفاعل مع المضاد الحيوي، أو الامتصاص، أو التفاعلات الكهروستاتيكية والكارهة للماء، أو تحلل المضادات الحيوية (Zhou *et al.*, 2015)، وفي الوقت نفسه فقد تبين أن الأغشية الحيوية السميكة تمثل حاجزًا أكثر كفاءة من الأغشية الحيوية الرقيقة في تأخير دخول العوامل المضادة للميكروبات (A. Singh *et al.*, 2022) كما في الشكل (٢-١).

وعندما تنمو الخلايا البكتيرية في الأغشية الحيوية، فإن النمو يتباطأ أو يتوقف بسبب البيئة الغذائية المحدودة والتي عادة ما تكون مصحوبة بزيادة في مقاومة العوامل المضادة للميكروبات وتظهر البكتيريا الموجودة في الأغشية الحيوية مقاومة عن طريق وجود العديد من المجموعات السكانية الفرعية المستمرة

persister subpopulation، ويتم موت أغلب الخلايا ثنائية الطور biphasic أي طور النمو السريع والبطيء الغير قاتل بسرعة في الأغشية الحيوية ، ولكن بعض الخلايا يظل غير متأثر بالعلاج بالمضادات الحيوية المستخدمة مما يدعم فرضية الثبات hypothesis of persistence (Uruén *et al.*, 2020).

٢-٥-٢ خط الدفاع الثاني (الجدار الخلوي والغشاء الخلوي البكتيري)

The Second defence: (Bacterial Cell Wall and Cell Membrane)

يجب أن تصل الأدوية المضادة للميكروبات إلى تركيز عالٍ بدرجة كافية في المناطق المستهدفة داخل الخلايا من أجل ممارسة نشاطها المضاد للبكتيريا ومن أجل الوصول إلى المواقع المستهدفة يتعين على المضادات الحيوية اجتياز جدار الخلية البكتيرية والغشاء، وهما جزءان ضروريان للحفاظ على شكل الخلية وتبادل العناصر الغذائية أو جزيئات الإشارة ، وفي الوقت نفسه يعد جدار الخلية والغشاء أيضاً أهدافاً مهمة للعديد من المركبات المضادة للميكروبات، بما في ذلك β -lactams, glycopeptides, Fosfomycin, daptomycin, Polymyxin، والمضادات الحيوية الأيونية وإن التغيير في جدار الخلية أو توافقات الغشاء أو الاختراق المحدود للعوامل المضادة للميكروبات بواسطة هذين الحاجزين الماديين قد يؤدي إلى ظهور المقاومة، علاوة على ذلك فإن تقبيد وصول العوامل المضادة للميكروبات أو إزالتها بكفاءة عن طريق مضخات التدفق المغطاة في جدار الخلية والغشاء يساهم أيضاً في زيادة مستويات المقاومة ، وأنها تشكل خط الدفاع الثاني للبكتيريا في مكافحة العوامل المضادة للميكروبات (Kamaruzzaman *et al.*, 2017) كما في الشكل (١-٢) .

وأن مقاومة glycopeptides مثل Vancomycin المشتق من تخليق سلائف خماسي الببتيد غير الطبيعية، إذ تمتلك السلائف أطرافاً متغيرة) على سبيل المثال، D-Ala-D-lactate أو D-Ala-D-ser) وانخفاض تقارب glycopeptides ، ويمكن لـ β -Lactams أن يمنع إنزيم transpeptidase وإنزيمات transglucosylase المتشابكة في طبقة peptidoglycan من جدران الخلايا (Ladin *et al.*, 2023) ، تستفيد البكتيريا من استراتيجيتين رئيسيتين للحماية ضد β -lactams : أما تغيير في البروتينات المرتبطة بالبنسلين (PBPs) ، والذي يقلل من ألفة البيتا لاكتام لمواقع العمل، أو إنتاج إنزيم β -lactamase الذي يحلل حلقة البيتا لاكتام مما يجعل الجزيء غير نشط (Fisher & Mobashery, 2020) .

ويوجد حول الجزء الداخلي من جدار الخلية البكتيرية غشاء الخلية البكتيرية cell membrane الذي يعمل كمرشح انتقائي يسمح أو يحد من تغلغل المواد في الخلية بما في ذلك العوامل المضادة

للميكروبات داخل الخلية أو خارجها تشمل العوامل المضادة للميكروبات النشطة غشائياً مثل daptomycin الدهني متعدد الأهداف، والمضادات الحيوية الببتيدية مثل colistin وpolymyxin B والمضادات الحيوية الأيونية مثل salinomycin، monensin و يمثل غشاء الخلية الخارجي حاجز يمنع اختراق الجزيئات المضادة للميكروبات، مما قد يؤدي إلى حدوث مقاومة بكتيرية، لا يمكن للمضادات الحيوية الصغيرة المحبة للماء مثل البيتا لاکتام وquinolones عبور الغشاء الخارجي إلا عن طريق المرور عبر القنوات المائية التي توفرها بروتينات الporin (Zhu et al., 2022).

وأن أنظمة التدفق البكتيري Bacterial efflux systems قادرة على نقل مجموعة واسعة من العوامل المضادة للميكروبات وبتراكيب مختلفة تمنح مقاومة للأدوية المتعددة (MDR)، وبشكل عام تم تصنيف مضخات التدفق البكتيري إلى مجموعتين بناءً على مصدر الطاقة الذي تستخدمه المضخة وتشتمل المجموعة الأساسية على عائلة ATP (adenosine triphosphate) – مجموعة (ABC) الفائقة والتي تستخدم طاقة ربط ATP والتحلل المائي من أجل التدفق و تم العثور على أنظمة التدفق الأخرى في كل من البكتيريا إيجابية الجرام وسالبة الجرام (Huang et al., 2019)، وأن نظام AcrAB/TolC من أنظمة التدفق البكتيري Bacterial efflux الذي يتضمن ناقل الغشاء الداخلي (AcrB) وقناة بروتين الغشاء الخارجي (TolC) وبروتين المحول المحيطي (AcrA) وهو نظام تدفق مدروس جيداً في البكتيريا سالبة الجرام مثل *Escherichia coli* وتم ربط مضخات التدفق بالمقاومة الجوهرية والمكتسبة للأدوية المضادة للميكروبات خاصة في البكتيريا مثل *Klebsiella pneumoniae* (Du et al., 2015).

٢-٥-٣ خط الدفاع الثالث: التغيير داخل الخلايا

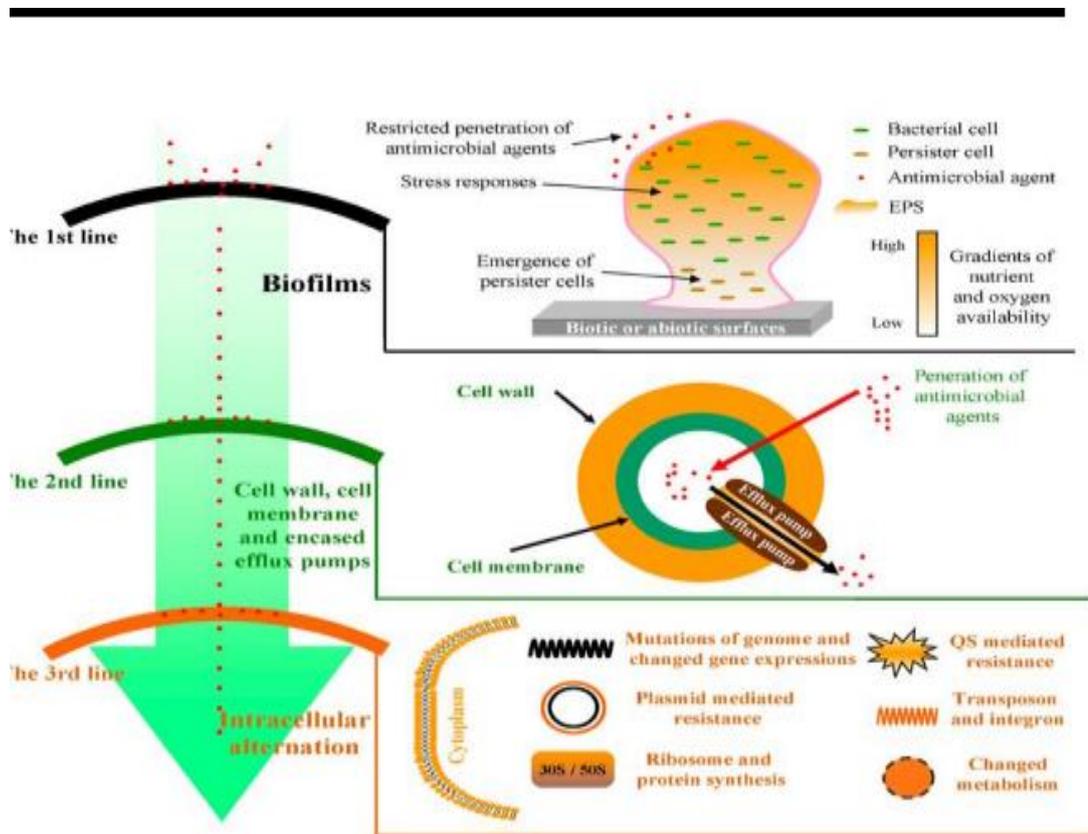
The Third Line of Defense: Intracellular Alteration

أن مجموعة متنوعة من العوامل المضادة للميكروبات يمكنها اختراق الخلية بنجاح وممارسة نشاطها عن طريق تثبيط نمو البكتيريا أو قتل البكتيريا بواسطة تدمير أنظمة التمثيل الغذائي والتعبير الجيني المنظم، سوف تقوم الخلايا البكتيرية بالتنافس مع العوامل المضادة للميكروبات عن طريق تغيير المواقع المستهدفة وإنتاج العوامل المضادة وتنظيم التعبير الجيني (Abd Asada & Al-amri, 2021).

تعمل البروتينات داخل الخلايا البكتيرية بشكل مشابه للأنشطة الأنزيمية، إذ تكتشف الإشارات وتنقلها وتشكل الهياكل الفيزيائية الرئيسية. قد يتسبب تثبيط التخليق الحيوي للبروتين في موت البكتيريا بواسطة التفاعل مع الريبوسوم وتثبيط وظيفته. على سبيل المثال، يمكن أن يعيق Tetracyclines، streptomycin تفاعل aminoacyl-tRNA النقل مع الوحدة الفرعية الريبوسومية 30S البكتيرية، مما

يؤدي إلى تثبيط تخليق البروتين البكتيري. في المقابل، يثبط Chloramphenicol تخليق البروتين عن طريق الارتباط بوحدة الريبوسوم 50S في وجود chloramphenicol acetyltransferase (CAT)، وهو إنزيم يثبط نشاط المضاد. تنتج آلية مقاومة macrolides الأكثر شيوعًا عن مثيلة بقايا الأدينين في المجال V من 23S rRNA (Raju et al., 2022).

يمكن للبكتيريا أن تكتسب مقاومة للأدوية المضادة للميكروبات عن طريق إنتاج مستقلبات تتنافس مع الموقع النشط. على سبيل المثال، يطور *K. pneumoniae* مقاومة للسلفوناميد، وهو نظير paraamino-benzoic acid (PABA)، عن طريق إنتاج المزيد من PABA، يحتوي الجين التنظيمي لمسار التخليق الحيوي للفوسفات على 20 طفرة قد تتنافس مع sulfonamide (Oyedara et al., 2023).



شكل (٣-٢) مخطط يلخص آليات خطوط الدفاع الثلاث من المقاومة في البكتيريا ضد العوامل الميكروبية (Zhou et al., 2015).

٢-٦ عقار السيبروفلوكساسين ciprofloxacin drug

هو عقار ينتمي إلى مجموعة fluoroquinolone antibiotic ، أثبتت فعاليته في علاج الالتهابات البكتيرية المختلفة منذ عام ١٩٨٧ ، وقد تم إدراجه كدواء أساسي من قبل منظمة الصحة العالمية (Rehman *et al.*, 2019) ، سيبروفلوكساسين هو مضاد حيوي واسع الطيف وهو الجيل الثاني من fluoroquinolone ، وفقاً للاتحاد الدولي للكيمياء البحتة والتطبيقية (IUPAC) فإن الاسم الكيميائي الكامل للعقار هو

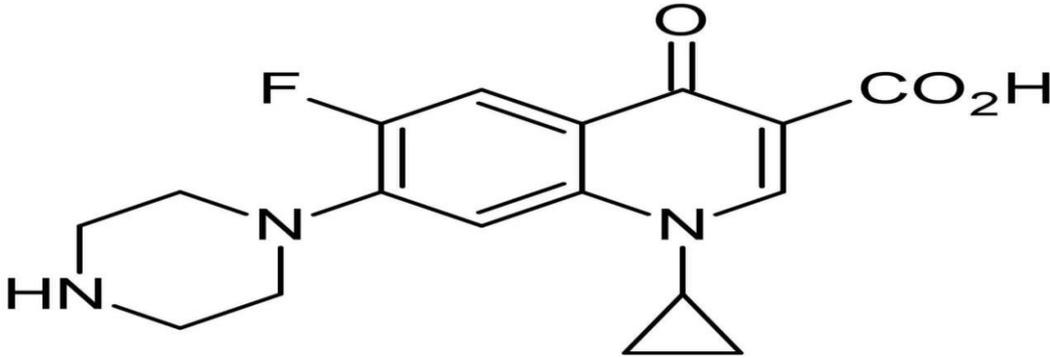
.cyclopropyl-6-fluoro-4-oxo-7-(piperazin-1-yl)-quinoline-3- carboxylic acid

(Al-Buriahi *et al.*, 2022) وهو يمتلك صيغة جزيئية (C17H18FN3O3)

الأسماء التجارية Cipro,Ciprobay,Ciproxan,Ciprinol

وهو مادة صلبة (Sharma *et al.*, 2010) .

أما الصيغة التركيبية له كما مبين في الشكل (٢-٤)



شكل (٢-٤) الصيغة التركيبية لعقار السيبروفلوكساسين (Chrysouli *et al.*, 2020) .

يستعمل في علاج سلسلة واسعة من البكتريا (إيجابية وسلبية) الكرام، والذي يستخدم لإعاقة أو تثبيط إصابات معينه قد تحدث بسبب بكتريا السيلان gonorrhoea والالتهاب الرئوي pneumonia او إصابات الجلد والعظم والمفاصل ومنطقة المعدة والبروستات وانه يعمل على تثبيط الإصابات الخطيرة التي تكون على المدى البعيد (Jawad *et al.*, 2020) .

الآثار الضارة الأكثر شيوعاً Musculoskeletal (AEs) المسجلة عند الأطفال بعد استخدام السيبروفلوكساسين هي التأثيرات العضلية الهيكلية، جميع الأحداث الضارة العضلية الهيكلية الموثقة في الدراسات الطبية كانت قابلة للعكس بعد التوقف عن استخدام السيبروفلوكساسين (Adefurin *et al.*, 2011) .

٢-٦-١ آلية عمل السيبروفلوكساسين The mechanism of action of ciprofloxacin

السيبروفلوكساسين يبدأ العمل بالتدخل في تكرار ونسخ الحمض النووي البكتيري من خلال تثبيط DNA gyrase/topoisomerase II and DNA topoisomerase IV الذي يربط topoisomerase الثاني والرابع يؤدي هذا في النهاية إلى تكوين معقدات الكينولون-إنزيم-الحمض النووي (Vidyavathi & Srividya, 2018) ، ومن ثم توليد الجذور الحرة المؤكسدة مثل الأكسجين المفرد (O_2) وأنيون الأكسيد الفائق (O_2^-) والتي تؤدي إلى موت الخلايا ، فضلا عن ذلك ارتبطت العديد من الآثار الجانبية side effects للسيبروفلوكساسين بما في ذلك السمية الضوئية phototoxicity واعتلال الأوتار tendinopathies بتوليد أنواع الأكسجين التفاعلية ROS (Masadeh *et al.*, 2016).

٢-٧ النباتات الطبية Medical plants

يعرف النبات الطبي plant Medicinal على أنه النبات الذي يحتوي في جزء أو أكثر من أجزائه المختلفة أو تحوراتها على مادة كيميائية فعالة أو أكثر بتركيز منخفض أو مرتفع ولها القدرة الفسيولوجية على معالجة مرض معين أو التقليل من أعراض الإصابة بهذا المرض إذا ما اعطيت للمريض أما في صورتها الخام بعد استخلاصها من المادة النباتية أو إذا ما تم استخدامها بشكلها الطبيعي كعشب نباتي طازج أو مجفف، وأن تركيز المواد الفعالة يتأثر بعمر النبات والوقت خلال اليوم الذي تم فيه جمع أجزاء النبات، وتختلف النباتات بعضها عن بعض منها مفيد ومغذي وبعضها سام وقاتل، ولكن عند تناولها بكميات مناسبة وتحت إشراف المتخصصين يكون لهذه المواد السامة وغير السامة فوائد علاجية كثيرة (Mahomoodally, 2013).

قام العلماء في المدة الأخيرة إلى اللجوء لا جراء أبحاثهم على النباتات للحصول على علاجات طبيعية لتقوية المناعة ولتقليل من الأخطار الناجمة عن الإفراط في استخدام المضادات الحيوية والذي ينتج عنها زيادة مقاومة الميكروبات لهذه المضادات المستخدمة بصورة مستمرة ، وإن النباتات لها القدرة على تصنيع مركبات كنواتج أيضية ثانوية تتواجد في البذور والأوراق أو في الجذور ، ومن هذه المركبات ما يكون لها أهمية من الناحية الطبية وإن العديد من العلماء أشاروا في دراساتهم إلى أهمية المستخلصات النباتية في معالجة الأمراض و مكافحة الميكروبات (Khameneh *et al.*, 2019). تم استخدام النباتات الطبية عبر العصور والعديد منها ما يزال يستخدم على نطاق واسع في العديد من البلدان وذلك لأهميتها العلاجية ، إذ يوجد أكثر من ١٠٠ قانون ينظم طب الأعشاب، وتم استخدام الأعشاب بشكل شائع في الصين منذ ما يقرب من ٢٠٠٠ عام ولقد شهد المعالجون بالأعشاب العشابون Herbalist منذ مدة طويلة

نجاح النباتات الطبية في علاج العديد من الأمراض ، الأمر الذي زاد الاعتقاد بأن "الصيدلية الخضراء" يمكن أن تكون آمنة وأقل تكلفة من الأدوية الصيدلانية وتكون بأثار جانبية أقل وأصبح الأطباء أكثر تقبلا للعلاج بالأعشاب (Sharifi-Rad et al., 2017).

٨-٢ نبات المريمية *Salvia officinalis*

١-٨-٢ الوصف العام لنبات *Salvia officinalis*

السالفيا (*Salvia officinalis* L) يعرف بالحكيم sage، وهو واحد من حوالي ٩٠٠ نوع من جنس السالفيا ، موطنها البحر الأبيض المتوسط ومناطق الشرق الأوسط (Durović et al., 2022) ، ينمو *S. officinalis* على شكل شجيرة معمرة دائمة الخضرة ، يصل ارتفاعها إلى ٦٠ سم ، و الأوراق تكون متقابلة وبسيطة مع وجود شعر أبيض على السطح السفلي للورقة ولون رمادي مخضر في السطح العلوي للورقة ، السيقان منتصبية مع وفرة من الفروع الخضراء الداكنة المشعرة، الأوراق تكون ممدودة ومعنقة مع حافة مسننة و سطح متعرج وأحياناً مع فصوص قاعدية يبلغ طول الأزهار من ٢ إلى ٤ ملم من عنقها، وتكون في شكل زهور علوية كاذبة ذات ٥ إلى ١٠ من اللون الأزرق البنفسجي، زهور ملونة تشكل اشواكا زائفة مركبة تزهر من مارس الى يوليو اعتمادا على الموطن والظروف المناخية (Jakovljević et al., 2019)، كما في الشكل (٢-٥).

وينتمي لعائلة Lamiaceae أ و mint family الشفوية أو عائلة النعناع هي عائلة واسعة الانتشار من النباتات المزهرة المعروفة بأعضائها العطرية، هذه الأعشاب غنية بالمركبات الفينولية ذات الأنشطة المضادة للأكسدة القوية زيادة على مضادات الأكسدة النباتية الشائعة، تحتوي هذه الأعشاب أيضاً على مضادات أكسدة محددة مثل carnosic acid ، carvacrol ، rosmarinic acid، يستخدم العديد من أفراد هذه العائلة كتوابل وأعشاب للطهي (Agatonovic-Kustrin et al., 2022).



شكل (٢-٥) نبات المريمية

٢-٨-٢ التصنيف العلمي لنبات السالفيا

classification of the *Salvia officinalis* plant Scientific

Kingdom: Plantae – Plants

Family: Lamiaceae

Subfamily: Nepetoideae

Tribe: Mentheae

Genus: *Salvia* (Botanica, 2009)

٢-٨-٣ الأهمية الطبية لنبات *Salvia officinalis*

هذا النبات معروف بأنه نبات طبي، يستخدم لعلاج العديد من الأمراض والاضطرابات، مثل الاكتئاب، والسمنة، والسكري، والذئبة والخرف والسرطان وأمراض القلب (Hamidpour *et al.*, 2014) ، ويستخدم عمومًا بشكل طبيعي أو كمستخلص أو كزيت أساسي، زيادة على الاستخدام التقليدي (غذاء الأسرة والطب الشعبي) ويستخدم هذا النبات في صناعة العطور ومواد التجميل وصناعة المواد

الغذائية وأخيراً في صناعة الأدوية (Boufadi *et al.*, 2021) ، يمكن للزيوت الأساسية المستخلصة من نبات المريمية أن تقلل من التهاب الأغشية المخاطية في الجهاز التنفسي العلوي والفم (Anderson & Phillipson, 2002) .

نبات المريمية قد تم استخدامه لمجموعة متنوعة من الأغراض، بما في ذلك تقليل العرق، وعلاج التهاب الحلق (يستعمل كغرغرة)، وتنظيم دورات الحيض، ومكافحة الالتهابات، وتحسين حالة الدهون ووظائف الكبد، وتحسين الشهية والهضم، وتعزيز القدرة العقلية ، يمكن أن تعمل المريمية على تحسين الخصوبة عن طريق زيادة هرمون FSH و LH وتنظيم مستويات هرمون الاستروجين (Adaay *et al.*, 2013) ، يحتوي *Salvia officinalis* على خصائص مضادة للأكسدة تعمل على تحسين وظيفة خلايا الكبد أثناء التسمم الكبدي (Salah *et al.*, 2016) ، تعمل خصائص المريمية المدرة للبول ومضادات الأكسدة على تقليل التأثيرات الضارة على الكلى أثناء السمية الكلوية (Koubaa *et al.*, 2019) .

٩-٢ تقنية النانو Nanotechnology

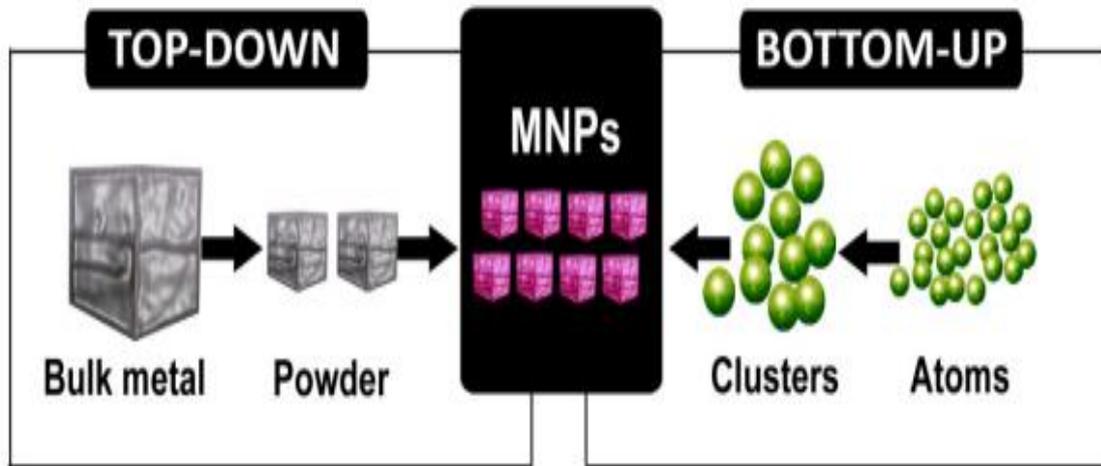
تكنولوجيا النانو هي مجال سريع النمو ينتج جسيمات نانوية يتراوح طولها بين ١-١٠٠ نانومتر، تظهر الجسيمات النانوية خصائص فيزيائية وكيميائية متميزة (Selim *et al.*, 2017) ، أصل مصطلح " Nano " مشتق من الكلمة اليونانية " Dwarf " التي تعني القزم، ويشير إلى قياس بمقياس واحد من المليار 10^{-9} من المتر في الحجم (Wang, 2018) ، علم النانو Nanoscience هو دراسة الأنظمة بأبعاد صغيرة جداً. فهو يجمع بين الكيمياء وعلوم المواد والبيولوجيا، وهو دراسة المواد ذات بعد واحد على الأقل بمقياس نانومتر بينما تقنية النانو هي تطبيق لعلوم النانو وتعززها فهي تصميم، تركيب، تشخيص المواد والأنظمة والأجهزة بوساطة التحكم في الحجم والشكل على مقياس نانوي (Rafique *et al.*, 2020) ، لقد كانت تقنية النانو مجالاً معروفاً للدراسة منذ القرن الماضي، قدم Richard Feynman ، الحائز على جائزة نوبل، في خطابه عام ١٩٥٩ بعنوان "هناك مساحة كبيرة في القاع" مفهوم "تقنية النانو". (Khan *et al.*, 2019) ، وبعد خمسة عشر عاماً، كان نوريو العالم الياباني، أول من تبنى وعرف كلمة "تقنية النانو" في عام ١٩٧٤ على أنها: " معالجة فصل المواد ودمجها بواسطة ذرة واحدة أو جزيء واحد" (Bayda *et al.*, 2019) .

تتيح تقنية النانو تطوير عوامل مضادة للميكروبات غير تقليدية، تُعرف باسم المضادات الحيوية النانوية، لعلاج الأمراض المعدية. تتمتع هذه العوامل بالعديد من المزايا مقارنة بالعوامل المضادة للميكروبات التقليدية، بما في ذلك انخفاض الآثار الجانبية، وزيادة الفعالية ضد الأنواع المقاومة للأدوية،

والقدرة على تجاوز تطور المقاومة عن طريق التدخل في المسارات البيولوجية المختلفة (Kumar *et al.*, 2018).

تعتمد تقنية النانو في تصنيع المواد النانوية (NPs) على طريقتين رئيسيتين هما النهج من الأعلى الى الأسفل Top-down ومن الأسفل الى الأعلى Bottom-up بالنسبة للطريقة الأولى تعمل التقنيات من أعلى إلى أسفل على تقسيم وفصل المواد الكبيرة إلى مواد ذات بنية نانوية، تشمل العمليات من أعلى الى أسفل الطحن الميكانيكي السحق، الحفر والخدش وغيرها (Baig *et al.*, 2021)،

أما الطريقة من أسفل الى أعلى تتضمن بناء المواد النانوية من مواد كيميائية أبسط بالاتجاه المعاكس، باستعمال طرق مختلفة مثل الاختزال الكيميائي Chemical reduction وطريقة السائل الهلامي-Sol-gel والتوليف الأخضر وتسمى بالطريقة البنائية (Khan *et al.*, 2019)، كما موضح في الشكل (٢-٦)



شكل (٢-٦) ملخص تصنيع النانو (من الأعلى الى الأسفل ومن الأسفل الى الأعلى) (Domenech *et al.*, 2012).

٢-٩-١ تصنيف المواد النانوية Classification of nanomaterials

١-المواد النانوية الصفرية الأبعاد (0-D) Zero-dimensional Nanomaterials

تتميز الهياكل النانوية هذه بأن تكون جميع أبعادها تقع ضمن المقياس النانوي Nanoscale اي بين (١-١٠٠ nm) ومن أمثلتها الدقائق النانوية Nanoparticles.

٢- المواد النانوية الأحادية الأبعاد (1-D) One-dimensional Nanomaterials

تتميز الهياكل النانوية هذه بانها تمتلك بعد واحد فقط خارج المقياس النانوي Nanoscale ومن الأمثلة على المواد النانوية أحادية البعد الأنابيب النانوية Nanotubes، الألياف النانوية Nano fibers، الأسلاك النانوية Nanowires.

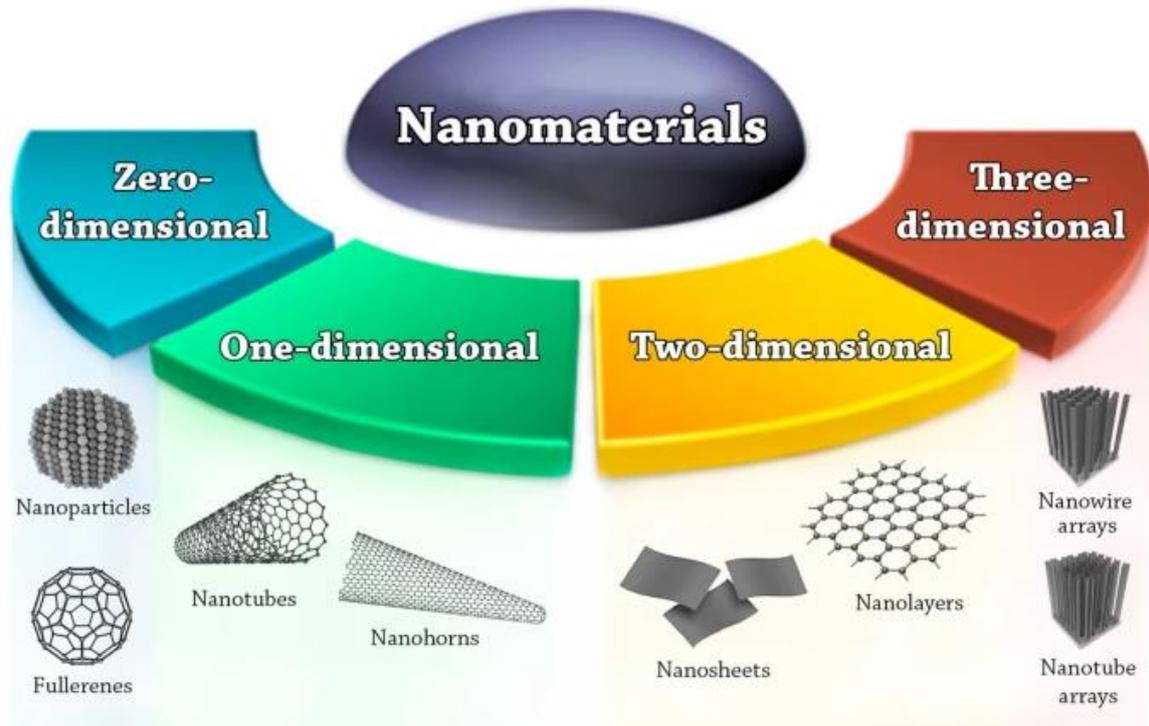
٣-المواد النانوية الثنائية الأبعاد (2-D) Two-dimensional Nanomaterials

تتميز الهياكل النانوية بانها تمتلك بعدين تقع خارج المقياس النانوي Nano scale لذلك المواد النانوية الثنائية الأبعاد تكون على هيئة أشكال مشابهة للصفائح Platelike-shapes مثل الأغشية النانوية Nanofilm والطبقات النانوية Nanolayers والطلاء النانوي Nanocoating.

٤-المواد النانوية الثلاثية الأبعاد (3-D) Three-dimensional Nanomaterials

تسمى الهياكل النانوية هذه بالمواد الكبيرة bulk material وتتميز بأن تكون جميع أبعادها فوق ال 100 nm مثل الدقائق النانوية Nanoparticles وحُزم الأسلاك النانوية Bundles of Nanowires والأنابيب النانوية Nanotubes والطبقات النانوية المتعددة Multinano Layer (T. A. Saleh, 2020).

كما موضح في الشكل (٧-٢) .



شكل (٧-٢) تصنيف الأبعاد للمواد النانوية (Joudeh & Linke, 2022)

Nanoparticles (NPs)

٢-٩-٢ الجسيمات النانوية

اكتسبت الجسيمات النانوية (NPs) اهتماماً كبيراً نظراً لميزاتها الفريدة وتأثيراتها المضادة للبكتيريا والمضادة للالتهابات، عادةً ما توجد الذرات ذات الحجم النانوي على سطح المواد مما يعزز خصائصها وتفاعلاتها بسبب زيادة المساحة السطحية (Lee & Jun, 2019)، فمثلاً تمتلك جزيئات الفضة النانوية الحجم والشكل والخصائص البصرية والكهربائية والمغناطيسية التي تمكن من استخدامها كمضادات للميكروبات، والمواد فائقة التوصيل، ومنتجات التجميل والأجهزة الكهرونية، وتُستعمل جزيئات الفضة النانوية (AgNPs) على مدى واسع في المنتجات الاستهلاكية مثل الصابون والأغذية والبلاستيك والمعاجين والمنسوجات بسبب لأنها مبيدات للجراثيم والفطريات (Guo *et al.*, 2016)، وتم استخدام الفضة لعلاج أمراض العضلات والصرع والأمراض المعدية بما في ذلك مرض السفلس والسيلان، كما تم استخدام نترات الفضة لأغراض مطهرة (Medici *et al.*, 2019).

٢-٩-٣ طرق تحضير المركبات النانوية

١- الطريقة الكيميائية Chemical methods

٢- الطريقة الفيزيائية Physical methods

٣- الطريقة البيولوجية Biological methods

إن الطرق الكيميائية والفيزيائية لتصنيع تكون محدودة بسبب استهلاك الطاقة وارتفاع تكاليف التصنيع وإنتاج المركبات الخطرة، وتعد التقنية البيولوجية خياراً فعالاً من حيث كونها أقل كلفة وأكثر سرعة وغالباً ما تستخدم البكتيريا والنباتات، على سبيل المثال يتم استخدام Ag-NPs على نطاق واسع في الصناعات بما في ذلك الأجهزة الطبية الحيوية، والطب، ومستحضرات التجميل، والمعالجة الحيوية، والطاقة المتجددة (Khan & Jamil Khan, 2017).

إن منهجية التوليف الأخضر Green synthesis methods التي تتضمن استخدام النباتات أو الكائنات الحية الدقيقة لتصنيع AgNPs، تُفضل بشكل متزايد على الأساليب الكيميائية التقليدية، وتشتمل الكائنات الحية الدقيقة على إنزيمات قادرة على إزالة السموم من المعادن أو تقليلها، والتي تم استخدامها في التصنيع الأخضر للجسيمات النانوية مثل الذهب والفضة (Mishra & Das, 2021)، ويمكن إنشاء جسيمات النانو من العديد من المكونات النباتية، مثل الأوراق أو الجذور أو الفواكه أو اللحاء أو البذور أو الكالس أو مستخلصات الساق، يتم تصنيع جسيمات الفضة النانوية (AgNPs) من المستخلصات النباتية عن طريق التفاعل الكهروستاتيكي مع البروتينات والاختزال بواسطة المواد الكيميائية النباتية مثل

الفلافونويد والكينونات والأحماض العضوية، يمكن أن تعمل عوامل الاختزال هذه أيضًا كعوامل تحديد أو تثبيت، مما يلغي الحاجة إلى عوامل إضافية (Küünel *et al.*, 2018).

وأن تصنيع المواد النانوية عن طريق استغلال نشاط بعض الميكروبات والنباتات، تمثل الطرق البيولوجية التي تعد صديقة للبيئة إذ أن هذه الأساليب تقضي على استخدام المواد الكيميائية باهظة الثمن وتستهلك طاقة أقل، وتنتج منتجات غير ضارة بالبيئة وتعد الطرق المعتمدة على النباتات والمستخلصات النباتية أكثر فائدة من تلك التي تستخدم الخلايا والكائنات الحية الدقيقة أن تحويل أيونات المعادن إلى جزيئات نانوية باستخدام المستخلصات النباتية كان معروفًا بالفعل في عام 1900 م (Parsons *et al.*, 2007).

٢-٩-٤ خصائص الجسيمات النانوية Nanoparticles properties

تتغير خصائص المواد بشكل عام وفقًا لمكوناتها النانوية والمركبات التي تتكون من جسيمات بحجم النانو سواء كانت من المعادن أو مادة أخرى تكون أقوى بكثير من نظيراتها في الحجم الأكبر وتمتاز الجسيمات النانوية NPs بعدة خصائص منها :

١- **الخصائص الفيزيائية physical properties** : تتأثر قيم درجة انصهار المادة بانخفاض أبعاد جزيئاتها فمثلا درجة انصهار الذهب في حجمه الطبيعي والتي تصل إلى 1064K درجة تنخفض إلى 500K درجة بعد تقليص أقطار جزيئاته إلى المقياس النانوي (Antoniammal & Arivuoli, 2012).

٢- **الخصائص البصرية optical properties** : أن لون الذهب الطبيعي – الأصفر الذهبي – يتغير إلى شفاف عندما تقل حبيباته إلى أقل من ٢٠ نانومتر، وتتغير ألوانه من الأخضر إلى البرتقالي ثم الأحمر مع تقليل أحجامها بشكل متزايد وتمكننا هذه الميزة من تصنيع شاشات فائقة الدقة تتباين ونقاء الألوان مثل شاشات التلفاز وأجهزة الكمبيوتر والهواتف المحمولة الحديثة (Das *et al.*, 2011).

٣- **الخصائص الكهربائية Electrical properties** : يؤدي تقليل حجم جزيئات المواد إلى أقل من ١٠٠ نانومتر إلى زيادة قدرتها على توصيل التيار الكهربائي، مما يمكننا من استخدام هذه المواد في تصنيع أجهزة الاستشعار الدقيقة والرقائق الإلكترونية (Song *et al.*, 2022).

٤- **الخصائص البيولوجية Biological properties** : زيادة قدرة المواد النانوية على اختراق الحواجز والموانع البيولوجية واختراقها وتحسين التلائم والتوافق البيولوجي، مما يسهل إيصال الأدوية والعقاقير العلاجية إلى الجزء المصاب عن طريق الأغشية والأوعية الدموية (Patra *et al.*, 2018).

٢-١٠-٥ توصيل الدواء Drug Delivery

إن وصول كمية كبيرة من الأدوية إلى أعضاء الجسم غير المصابة يقلل من فعالية الدواء ويؤدي إلى حدوث آثار جانبية غير مرغوب فيها على سبيل المثال نجد أن الطرق التقليدية لعلاج السرطان مثل العلاج الكيميائي والإشعاعي تؤدي إلى آثار جانبية كبيرة ذات فعالية منخفضة في علاج هذا المرض وبالتالي يجب إيجاد طريقة لتوصيل الأدوية المضادة للسرطان إلى الأجزاء المصابة بدقة متناهية للحصول على أقصى فائدة ممكنة من الدواء (Navya et al., 2019).

مما أدى إلى قيام العلماء بابتكار طرق حديثة في أنظمة توصيل الدواء وذلك باستخدام تقنية النانو التي ساهمت في تطور العلوم الطبية وتعتمد هذه التقنية على تصنيع مواد دقيقة في حجم النانو لتحسين التوافر الحيوي للدواء Bioavailability الذي يعني وجود جزيئات الدواء في المكان المطلوب تواجدها فيه داخل الجسم البشري حيث تكون الفائدة منها أفضل ، ومن ثم ينخفض معدل استهلاك الدواء وأعراضه الجانبية والتكلفة الكلية للعلاج ، إذ يتحقق ذلك من خلال التوافر الحيوي للعلاج خلال مدة زمنية معينة باستهداف الجزيئات النانوية للخلية المستهدفة ، كما أن أحد التطبيقات المهمة لتلك التقنية علاج السرطان باستخدام جزيئات الحديد أو الذهب التي تتراكم في الخلايا السرطانية وليس الخلايا الأخرى ، وتسبب موتها دون التأثير على الخلايا الطبيعية وتجنب أضرار العلاج الكيميائي والإشعاعي ، والتي لا تزال في مرحلة البحث وتمثل أمالا كبيرة في علاج آمن للسرطان ، تسمح هذه العلاجات النانوية و التشخيصات بفهم للعلل البشرية التي تشمل السرطان وأمراض القلب والأوعية الدموية والاضطرابات الوراثية (Abd Elkodous et al., 2021).

٢-١٠-١٠ الدراسة الجينية Genetic study

يمكن أن تنشأ المقاومة لدى البكتيريا بشكل طبيعي لبعض أنواع المضادات الحيوية من خلال الطفرات الجينية أو من خلال انتقال جينات من بكتيريا مقاومة إلى بكتيريا أخرى ، مما يؤدي إلى ظهور سلالات مقاومة جديدة ، وأن الطرز الجينية genotypes الجديدة تنشأ عندما تنتقل المادة الجينية من بكتيريا إلى أخرى ، إن مادة DNA المنقولة اما تتحد مع جينوم الخلية المستلمة recipient cell أو تكون البلازميدات plasmids لها القدرة على التضاعف بدون الاتحاد ، وهذه الاتحادات تسبب تغييرات كبيرة في المادة الجينية وهذه الاحداث تتضمن جينات وظيفية يعبر عنها مظهريا phenotype (Martinez, 2014) ، وأن الانتقال الجيني gene transfer (المادة الوراثية DNA) من الخلية الواهبة donor cell إلى الخلية المستلمة recipient cell يتم بثلاث طرق :

- ١- التحول Transformation: تحدث عملية التحول بشكل طبيعي ، حيث تقوم الخلايا البكتيرية بأخذ جزيئات الحامض النووي من البيئة المحيطة من حولها.
- ٢- الانتقال Transduction: هو العملية التي يتم بواسطتها نقل الحامض النووي من بكتريا الى أخرى بواسطة أنواع خاصة من الفيروسات التي تصيب البكتريا bacteriophages .
- ٣- الاقتران conjugation : هو العملية التي تنتقل بها البكتريا مادتها الوراثية الى خلية بكتيرية أخرى من خلال الاتصال المباشر اثناء الاقتران ، تعمل بكتريا واحدة كمتبرع للمادة الوراثية وتعمل الخلية الأخرى كمتقبل ، تكون عادة المادة الجينية المنقولة على شكل بلازميد ، وهو قطعة صغيرة من الحامض النووي ، والتي تعمل على تزويد البكتريا المستلمة بميزات جينية خاصة ، ففي كثير من الحالات يعمل الاقتران على نقل البلازميدات التي تحمل جينات مقاومة المضادات الحيوية (Heuer & Smalla, 2007) .

١٠-٢-١-١-٢ جين *pgaA* في بكتريا *Klebsiella pneumoniae*

The *pgaA* gene in *Klebsiella pneumoniae*

تم التعرف على موضع مكون من أربعة جينات *pgaABCD* تشارك في إنتاج الأغشية الحيوية وكذلك استشعار النصاب *pgaABCD* operon في جينوم بكتريا *K. Pneumoniae* التي تشارك في تصنيع وانتقال والتصاق poly-beta-1,6-N-acetyl-Dglucosamine (PGA) (Makhrmash et al., 2022) ، وهو مشابه لذلك الموجود في بكتريا *E. coli* إذ يقوم بتشفير آلية Pga الممتدة على الغلاف لتخليق وإفراز N-acetylglucosamine المرتبط ب poly-β (PNAG) ، ثبت أن PNAG يتوسط تكوين الأغشية الحيوية وكان له دور في تفاعلات البكتيريا المضيئة وأن وجود موضع *pgaABCD* المحفوظ بين سلالات *K. Pneumoniae* المختلفة يشير إلى أهمية وجود الـ PNAG لهذه البكتيريا، وان فقدان جين *pgaA* أثر على إنتاج PNAG وخفف من إنتاج الأغشية الحيوية ، ويعد Poly-N-acetyl-glucosamine (PNAG) مكونًا أساسيًا لمصفوفة الأغشية الحيوية في البكتيريا المتنوعة من الناحية التطورية (Chen et al., 2014) .

٢-١٠-٢ جين *pslA* في بكتريا الزائفة الزنجارية***pslA* gene in *Pseudomonas aeruginosa* bacteria**

تتكون مصفوفة الأغشية الحيوية للبكتيريا من جزيئات حيوية متنوعة بما في ذلك السكريات المتعددة والبروتينات وحتى الحمض النووي، يمكن العثور على أنواع مختلفة من السكريات المتعددة داخل المصفوفة: alginate، وموضع تشفير (Pel) polysaccharide، وموضع تخليق polysaccharide (Psl)، المشفر بواسطة جين *pslA* هو Exo polysaccharide ذو الشحنة المحايدة، ويتكون من D-mannose و D-glucose و L-rhamnose، مرتبة في مكررات خماسي polysaccharide ويوفر الدعم الهيكلي أثناء تكوين الأغشية الحيوية، ويلعب دورًا في الارتباط من خلية إلى أخرى ومن خلية بالركيزة، أظهرت بعض الدراسات السابقة دورًا مهمًا لجين *pslA* في المراحل الأولية لتكوين الأغشية الحيوية بين عزلات *P. aeruginosa* (Emami et al., 2015)، ويعد التعبير عن جين *pslA* مسؤول عن النمط الظاهري لتشكل الأغشية الحيوية بين السلالات الطافرة لبكتريا *P. aeruginosa*، ومن المثير للاهتمام تحديد الارتباط بين وجود جين *pslA* ومقاومة المضادات الحيوية بين عزلات بكتريا *P. aeruginosa* (Pezzoni et al., 2020).

الفصل الثالث

المواد وطرق العمل

Materials and Methods

3-1-3 المواد Materials

3-1-3 الأجهزة والأدوات المختبرية Devices and tools

تم استخدام مجموعة من الأجهزة والأدوات المختبرية في هذه الدراسة وكما مبين بالجدول (3-1).

جدول (3-1) الأجهزة والأدوات المختبرية .

Origin المنشأ	Company الشركة	Devices and الأدوات والأجهزة Tools
Germany	Heraeus Christ	Autoclave جهاز التعقيم
Germany	Jenway	Burner مصباح بنزن
Germany	Heraeus Christ	Centrifuge جهاز الطرد المركزي
Turkey	Denka	Deep freezer فريزر عميق
Germany	Sartorius	Sensitive balance ميزان حساس
China	Gallenkamp	Incubator حاضنة
Korea	Bioneer	Nano drop قطرة نانو
Japan	Olympus	Light microscope مجهر ضوئي
England	Gallenkamp	Oven فرن
China	My Fugene	Micro spin Centrifuge
Germany	Memmert	Shaker incubator حاضنة هزازة
Germany	GFL	Water Distillator جهاز تقطير
Taiwan	Major Science	Power supply مجهر كهربائي
France	Concord	Refrigerator ثلاجة
Japan	OPTIMA	Spectrophotometer
France	Biomeriux	Vitek-2 compact system
Korea	labtech	pH meter
USA	Applied Biosystem	Mic qPCR Cyler
Turkey	Airstream	Biological hood

Japan	Shimadzu	Fourier Transform Infra-Red spectroscopy (FT-IR)
England	Gallenkamp	Hot plate with magnetic stirrer جهاز مزج ذو صفيحة ساخنة
Germany	Hermile	Blender خلاط كهربائي
Czech Republic	Joint stock	Scanning Electron Microscope مجهر الكتروني ماسح
Germany	Labcoo	Vortex دوامة
Korea	Bioneer	Gel electrophoresis
England	Volac	Ceramic mortar هاون خزفي
China	Sail Brand	Filter paper ورق ترشيح
Germany	SUPERIOR	Graduated Cylinder (500,250, and 100ml) أسطوانة مدرجة
USA	Promega	Tips (0.1, 0,5 and 1 ml)
Germany	Human	Micropipette different sizes
China	Sterling	Metallic loop لوب معدني
USA	BBL	Eppendorf tubes
USA	Sartorius	Millipore Filters NO.0.22 μm

٣-١-٢ المواد الكيميائية

تم استخدام المواد الكيميائية حسب ما موضح بالجدول (٢-٣)

جدول (٢-٣) المواد الكيميائية

Origin المنشأ	Company الشركة	Materials المواد
Jordan	Gold star	Distilled Water
Germany	Sigma- Aldrich	Silver nitrate AgNO_3
Turkey	Ankara	Ciprofloxacin

UK	Gaindand	Congo red stain
Saudia Arabia	PSI	Normal saline(sterile)
England	BHD	Glycerol
England	Oxoid	Agar-Agar
		Standard McFarland solution (0.5)
USA	Promega	Absolut ethanol
Korea	Bioneer	Agarose
USA	Promega	Ethidium Bromide dye Solution
Korea	Bioneer	Free nuclease water

٣-١-٣ العدد التشخيصية

تم استخدام العدد التشخيصية حسب ماموضح بالجدول (٣-٣) .

جدول (٣-٣) العدد التشخيصية .

المنشأ Origin	الشركة Company	المواد Materials
Korea	Addbio	Tris-Borate EDTA Buffer (TBE)
Korea	Bioneer	DNA ladder Buffer
Canada	Alpha DNA	Primers
Korea	INTRON	G-spin™ Total DNA Extraction Mini Kit
France	Biomerieux	Vitek2 Compact System (ID-GNB) Kit

Korea	INTRON	easy-spin™ Total RNA Extraction Kit
Korea	Macrogen	PRIMERS
USA	Promega	GoTaq® G2 Master Mixes
USA	Promega	GoTaq qPCR Master Mix
Korea	Addbio	AddScript Reverse Transcriptase

٣-١-٤ الأوساط الزرعية Culture media

تم استخدام الأوساط الزرعية حسب الجدول (٣-٤) الذي يشير الى الأوساط الزرعية والغاية من استخدامها .

جدول (٣-٤) الأوساط الزرعية

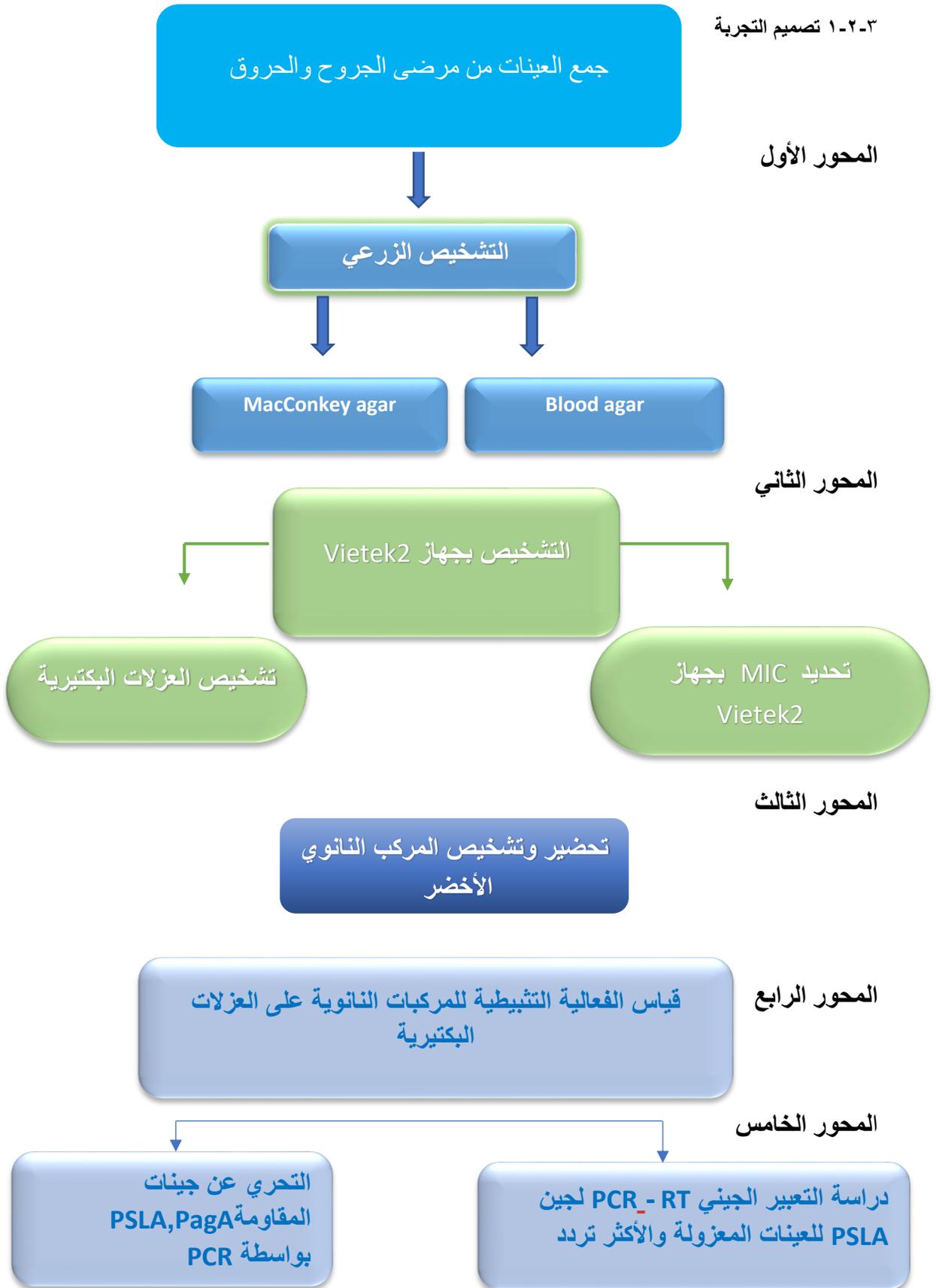
المنشأ Origin	الشركة Company	الغاية من استخدامه	الوسط Media
England	Oxoid	وسط أغنائي لتنمية كل أنواع البكتريا	Blood agar
India	Himedia	عزل العصيات السالبة لصبغة كرام والتفريق بين العصيات المخمرة للاكتوز عن غير المخمرة	MacConKey Agar
India	HiMedia	حفظ العزلات لمدة طويلة في درجة حرارة -20 م°	Brain heart Infusion broth
India	HiMedia	لزراعة وتنشيط العزلات البكتيرية النقية	Nutrient Agar
India	HiMedia	لتنمية وتنشيط العزلات البكتيرية حفظ العزلات بدرجة حرارة -20 م°	Nutrient broth

China		لنقل العزلات البكتيرية	Transport media
India	HiMedia	لاختبار حساسية العزلات البكتيرية	Muller-Hinton Agar (MHA)

٥-١-٣ البرايمرات المستخدمة في الدراسة كما موضح بالجدول (٥-٣).

Primer	Sequence	PCR product	Ref.
PslA (F)	5'- CACTGGACGTCTACTCCGACGATAT-3	1116 bp	(Heydari & Eftekhar, 2015)
PslA (R)	5'- GTTTCTTGATCTTGTGCAGGGTGTC- 3'		
A(F) Pga	5- GCAGACGCTCTCCTATGTC-3	156 bp	Chen <i>et al.</i> , 2020
Pga A(R)	5- GCCGAGAGCAGGGGAATC-3		
16srRNA	5-CAGCTCGTGTCGTGAGATGT-3		Higgins <i>et al.</i> ,) (2004
16srRNA	5- CGTAAGGGCCATGATGACTT-3		

٣-٢ الطرق Methods



شكل (١-٣) مخطط الدراسة الحالية

٢-٢-٣ عزل وتشخيص البكتريا

تم جمع ١٠٠ عزله من كلا الجنسين بعمر يتراوح من (١يوم-٧٠ سنة) خلال المدة الزمنية من ٩/١ / ٢٠٢٣ لغاية ٣٠ / ١٢ / ٢٠٢٣ من مرضى الحروق والجروح في مستشفى مدينة الامام الحسين (ع) الطبية ، فكان عدد عزلات الجراحة ٦٠ عزلة وعدد عزلات الحروق ٤٠ عزلة ، نقلت العزلات على شكل swab وضعت في وسط ناقل معقم ، ، زرعت جميع العزلات على وسط MacConkey agar ، Blood agar وتم حضنها لمدة ٢٤ ساعة وبدرجة ٣٧ درجة مئوية وتم تشخيص البكتريا بواسطة جهاز VITEK-2 Compact System .

٣-٢-٣ التعقيم Sterilization

تم تعقيم المحاليل والايوساط الغذائية التي تتحمل درجات الحرارة العالية بجهاز التعقيم بدرجة 121 درجة مئوية وضغط 15 باوند / أنج لمدة 15 دقيقة في حين تم تعقيم الاصباغ والسكريات والمستخلصات النباتية التي لا تتحمل درجات الحرارة العالية بمرشحات بقطر 0.22 ميكروميتر، أما الزجاجيات والأدوات المستعملة في تحضير وخرن المستخلصات فقد تم تعقيمها باستعمال الفرن الكهربائي بدرجة 180 درجة مئوية لمدة ساعة.

٤-٢-٣ الأوساط الزرعية Culture media

تم تحضير الأوساط الزرعية طبقاً لتعليمات الشركات المصنعة لها، وتم تعقيمها بجهاز التعقيم بدرجة 121 درجة مئوية وضغط 15 باوند / أنج لمدة 15 دقيقة، ثم تركت لكي تبرد، وبعدها تم صبها بأطباق بتري معقمة، وبعد أن تصلبت حضنت عند 37 درجة مئوية لمدة 24 ساعة للتأكد من عدم تلوثها، بعد ذلك حفظت بدرجة حرارة 4 درجة مئوية لحين الاستخدام.

١-٣-٢-٣ اوسط أكار الدم Blood agar media

يستخدم وسط أكار الدم لعزل وزراعة العديد من أنواع البكتيريا شديدة الحساسية ويستخدم للتفريق بين البكتيريا اعتمادا على انحلال الدم. تم إعداده وفقا لتعليمات الشركة المصنعة عن طريق تعليق ٤٠ جم في ١ لتر من الماء المقطر، وتعقيمه، وترك ليصل الى درجة ٥٠ درجة مئوية وإضافة ٥-١٠٪ حجم/حجم من الدم وخالطه جيدا ثم صبه في أطباق بتري معقمة.

MacConkey agar وسط أكار الماكونكي ٢-٣-٢-٣

تم اتباع توجيهات الشركة المصنعة لإعداد أجار ماکونکی بالضبط، ثم تم تعقيمه لمدة ١٥ دقيقة عند ١٢١ درجة مئوية و ١٥ باوند / أنج ٢، والتبريد إلى ٥٠ درجة مئوية، وتم وضعه في أطباق بيتري معقمة وأخيراً تم تبريده إلى ٣٧ درجة مئوية وسمح له بالتصلب في درجة حرارة الغرفة قبل استخدامه (MacFadin, 2000).

Brian Heart infusion broth مرق نقيع القلب والدماغ ٣-٣-٢-٣

يستخدم هذا الوسط لنمو وتنشيط العزلات البكتيرية والحفاظ عليها (MacFadin, 2000).

Muller-Hinton agar مولر هنتون أكار ٤-٣-٢-٣

تم تحضير هذا الوسط بإضافة ٣٨ جم من الوسط في ١٠٠٠ مل الماء المقطر، تم استخدامه في اختبار الحساسية للمضادات الميكروبية (AST) (Antibiotic Sensitivity Test) (MacFadin, 2000).

Nutrient agar media وسط الأكار المغذي ٥-٣-٢-٣

تم اتباع إرشادات الشركة المصنعة أثناء إعداد أساس أجار المغذيات. ترك ليصل إلى ٥٠ درجة مئوية والتعقيم لمدة ١٥ دقيقة عند درجة حرارة ١٢١ درجة مئوية وضغط ١٥ باوند / أنج ٢، تم سكبها في أطباق بيتري معقمة. أخيراً، تم تبريده إلى ٣٧ درجة مئوية وسمح له بالتصلب في درجة حرارة الغرفة، للحصول على درجة الحرارة المستخدمة للحفاظ على مستعمرات العزلات البكتيرية (MacFadin, 2000).

Preparation of solutions تحضير المحاليل ٥-٢-٣

تم تعقيم الكواشف والمحاليل ومحاليل البفر بواسطة جهاز التعقيم أو الترشيح. تم ضبط الرقم الهيدروجيني لهذه المحاليل بإضافة بضع قطرات إما من ٠,١ N من Na OH أو HCl.

physiological saline solution ١-٥-٢-٣

تم تحضيره بإذابة 8.5 جم (NaCl) في 900 مل ماء مقطر ثم تم اكمال الحجم إلى 1000 مل باستخدام ماء مقطر وتعقيمه بواسطة جهاز التعقيم (Bridel et al., 2022).

٣-٢-٥-٢ محلول مكفر لند القياسي McFarland Standard solutions:

المحلول القياسي للتعكر وهو أنبوب القياس الأكثر استخدامًا والذي يحتوي على محلول له كثافة بصرية محددة توفر تعكرًا مشابهًا لذلك الموجود في المعلق البكتيري والذي يساوي 10^8 CFU/ml × 1.5 حسب (Benson, 2002) ، تم إعداد هذا المحلول 0.5McFarland بواسطة:

المحلول (١) تم إذابة جرام واحد من كلوريد الباريوم (BaCl₂) في ٩٠ مل من الماء المقطر ثم أكمل إلى ١٠٠ مل بواسطة الماء المقطر. المحلول (٢) تمت إضافة مليلتر واحد من (H₂SO₄) المركز في ٩٠ مل من الماء المقطر ثم أكمل إلى ١٠٠ مل بواسطة الماء المقطر. تمت إضافة ٠,٥ مل من (١) محلول إلى ٩,٥ مل من المحلول (٢) وتم قياس الامتصاصية بواسطة مقياس الطيف الضوئي عند طول موجي ٦٢٥ نانومتر وتم تخزينه في زجاجة داكنة لحين الاستخدام.

٣-٢-٦ حفظ العزلات البكتيرية Maintaining of Bacterial isolates

تم تحضير شرائح الأجار المغذي ذات النمو البكتيري للعزلات البكتيرية عند درجة حرارة ٣٧ درجة مئوية لمدة ٢٤ ساعة وحفظها في الثلاجة لمدة شهر واحد فقط للتخزين قصير المدى، وتم إجراء طريقة حفظ طويلة الأمد ، حضر الوسط الخاص بحفظ العينات لمدة طويلة لحين الاستخدام بإضافة 20 مل من Glycerol الى 80 مل من Brain heart Infusion broth و عقم بجهاز التعقيم بدرجة حرارة 121 درجة مئوية وضغط 15 باوند / انج^٢ لمدة 15 دقيقة ، ثم ترك ليبرد ثم بعد ذلك وزع في قناني صغيرة ذات غطاء محكم ومعقمة ، ثم لقت بمستعمرات نقية من العزلات المراد حفظها بعمر 24 ساعة ، ووضعت في الحاضنة بدرجة حرارة 37 درجة مئوية لمدة 24 ساعة لملاحظة تكوين العكورة نتيجة النمو البكتيري وبعدها تترك بدرجة حرارة الغرفة لمدة ساعة واحدة ثم تم حفظ هذه القناني بدرجة حرارة 20- درجة مئوية مع مراعاة تدوين المعلومات الخاصة بكل عينة وتاريخ حفظها وتجديدها كل ثلاثة أشهر حفاظا عليها من التلف والموت (Vandepitte, 2003) .

٣-٢-٧ التشخيص واختبار حساسية المضادات الحيوية بتقنية جهاز الفايك**VITEK- 2 Compact system –Identification and Susceptibility test**

تم تحضير عالق البكتيريا وفقًا لتعليمات الشركة المصنعة. تم الحصول على عدد كاف من المستعمرات عن طريق نقل مستعمرة نقية بعمر 24 ساعة وتعليقها في 0.3 مل من محلول ملحي معقم في أنبوب اختبار شفاف (polystyrene) مقاس 12 x 75 mm وتم تعديل العكورة بالمقارنة مع

محلول 0.5 McFarland القياسي المصنع مسبقاً، باستخدام مقياس التعكر Densi-Chek في-GN ID و GP-ID مع جهاز VITEK-2 المدمج، نفس التعليق الذي كان مستعملاً. أخيراً، تم تحميل غرفة vitek-2 مع أنابيب تعليق العينات باستخدام كاسيت GP-ID و GN-ID .

٣-٢-٨ تحضير المستخلص المائي لأوراق نبات *Salvia Officinalis*

Preparation of aqueous extract of *Salvia Officinalis* leaves

تم شراء أوراق السالفيا من محلات بيع الاعشاب في مدينة كربلاء المقدسة وتم تشخيصها من قبل اساتذة مختصين بتصنيف النبات في جامعة كربلاء ، غسلت الأوراق بماء الحنفية ثلاث مرات للتخلص من أي غبار أو شوائب عالقة ، نزلت منها الأجزاء غير المهمة ثم غسلت بماء مقطر ، ثم وضعت على أوراق الترشيح في جو المختبر وتقلب عدة مرات لضمان جفافها ، بعد التأكد من الجفاف التام طحنت بالمطحنة الكهربائية ، تم مزج ٥٠ غم من مسحوق أوراق نبات *Salvia Officinalis* المجفف واطيف اليه ٥٠٠ مل من الماء المقطر المعقم وتم غليه لمدة ١٠ دقائق ، وتمت التصفية باستخدام قطع من الشاش الطبي ثم رشح مرتين بواسطة أوراق الترشيح (Whatman no.1) ، وجمع السائل وأستخدم الراشح فوراً لتحضير جسيمات الفضة النانوية (Metwally et al., 2021) .

٣-٢-٩ تحضير 100 مل محلول ١ ملي مولاري نترات الفضة

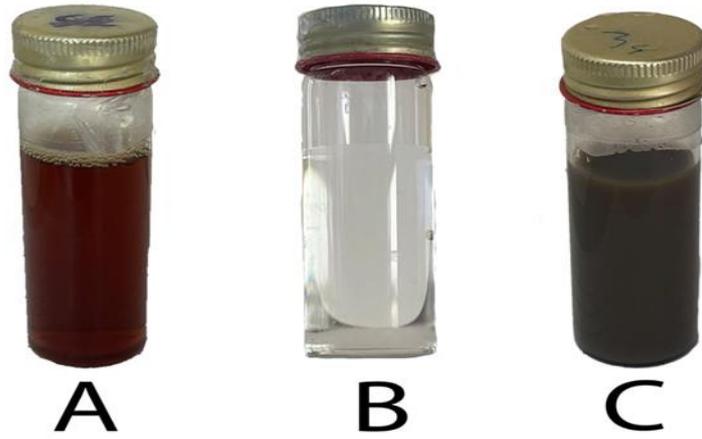
Prepare 100 ml of 1 mM silver nitrate solution

المولارية عدد المولات المذابة لكل لتر بمان الكتلة المولية ل $AgNO_3$ تبلغ 169.87 غم /مول في ١ لتر، ولتحضير محلول 1Mm من $AgNO_3$ يتطلب اذابة 0.169 غم من $AgNO_3$ في 1000 مليلتر، أي ان كل ١ مليلتر يحتوي 0.000169 غم من $AgNO_3$ ، ولتحضير 100 مل من المحلول يتم اخذ 0.0169 غم نترات الفضة في 100 مل من الماء اللأ أيوني سخن المحلول على درجة 60م° لمدة عشر دقائق وبعدها ترك ليبرد وحفظ في قناني معتمه لحين الاستخدام (Alnuaimi et al., 2019) .

٣-٢-١٠ تحضير جسيمات الفضة النانوية باستخدام المستخلص المائي لأوراق السالفيا

preparation of Silver Nanoparticles using *S. Officinalis* leaves

تم تصنيع جسيمات الفضة النانوية الخضراء عن طريق الامتصاص الحيوي لـ Ag^+ في محلول نظيف من مستخلص *Salvia officinalis*. بأخذ ١ ملي مولاري من نترات الفضة وتم تسحيح المستخلص النباتي (١,٥ غم من مستخلص النبات الجاف الجاهز إلى ١٠٠ مل من الماء المقطر اللأأيوني) على المحلول القلوي $AgNO_3$ وبنسبة (محلول نترات الفضة ٨٠% :مستخلص نباتي ٢٠ %) وتم المزج لمدة ٣٠ دقيقة عند ٤٥-٥٥ درجة مئوية. ثم بعد ذلك يراقب الخليط لمدة ٣ ساعات. نلاحظ تغير لون الخليط من اللون الأصفر إلى اللون البني الغامق، كما موضح في الشكل (٣-٢) ، مما يشير إلى تكوين $Ag-NPs$ (Metwally et al., 2021).



شكل (٣-٢) تغيير لون المستخلص المائي لأوراق نبات السالفيا من الأصفر إلى اللون البني الغامق.

(A) محلول المستخلص المائي لأوراق نبات السالفيا. (B) محلول نترات الفضة $AgNO_3$ (C) المستخلص المائي لأوراق نبات السالفيا بعد التفاعل مع محلول 1 ملي مولاري $AgNO_3$ بعد مرور ثلاث ساعات.

٣-٢-١ تنقية المركب النانوي *S. officinalis*-AgNPs

وضع المحلول الحاوي على جزيئات الفضة النانوية بجهاز الطرد المركزي وبسرعة (5000 دورة/دقيقة) ولمدة (١٠ دقائق) بعد انتهاء المدة تم التخلص من الراشح وجمع الراسب وغسل بالماء المقطر الأأيوني ووضع مرة أخرى بجهاز الطرد المركزي وبسرعة (5000 دورة / دقيقة) ولمدة (١٠ دقائق) وكررت العملية (٣) مرات إلى أن يتحول المركب إلى اللون الرائق وحفظ لحين الاستعمال (Alnuaimi et al., 2019).

٣-٢-١ تشخيص جسيمات الفضة النانوية المخلفة حيويًا

Characterization of Biosynthesized silver Nanoparticles**١- مطياف الأشعة تحت الحمراء (FTIR) Fourier-transform infrared**

جفف المحلول النانوي ومزج مع بروميد البوتاسيوم KBr وبنسبة ١:١٠٠ ، عرض المزيج على جهاز مطياف الأشعة تحت الحمراء وينفذ في مدى بين $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ (Okaiyeto *et al.*, 2021) .

٢-المجهر الإلكتروني الماسح Scanning electron microscopy (SEM)

اجري فحص SEM لمحلول الفضة النانوية في دولة إيران لمعرفة حجم وشكل الدقائق النانوية، اسقطت قطرة صغيرة من المحلول على شبكة نحاسية مغلقة بالكربون Coated copper grid ثم تركت لتجف ثم عرضت على جهاز (Tescan Mira3, French) (Sabir *et al.*, 2022) .

٣- التشخيص باستخدام مجهر القوة الذرية Atomic Force Microscopy (AFM)

استخدم مجهر القوة الذرية في فحص المركبات النانوية الحرة و عقار السيبروفلوكساسين بعد تحميله على المركبات النانوية وقياس اقطار وحجوم وتجمعات الجزيئات النانوية ويمكنه تصوير طبوغرافية السطح مع تكبير عالي للغاية ويقدم لنا توصيفاً ثنائي وثلاثي الأبعاد، تم ارسال النماذج الى مركز فاي لعلوم النانو (Kutralam-Muniasamy *et al.*, 2020) .

٣-٢-٣ طريقة تقدير الفعالية التثبيطة للمركبات النانوية والمضادات الحيوية ومستخلص الميرمية (نبات السالفيا) على العزلات البكتيرية:

تم تقييم التأثير التثبيطي للمستخلص النباتي والمركب النانوي لنوعين من البكتريا *K. P. aeruginosa pneumoniae* المزروعة على وسط مولر هنتون آكار Muller Hinton Agar (MHA) المقاومة للمضاد الحيوي ciprofloxacin الحرو كذلك التأثير التآزري بعد تحميله مع المستخلص والمركب النانوي الأخضر ، فيها وزعت عينات الدراسة لخمس معاملات وبواقع ثلاث مكررات وبثلاث تراكيز لكل معاملة من العينتين كما في الجدول أدناه (٣-٦) ، باستخدام طريقة well diffusion method (Kronvall *et al.*, 2011) حسب الخطوات التالية:

١- حضر العالق البكتيري من مزج عدة مستعمرات من بكتريا *K. P. aeruginosa pneumoniae* مع (٥) مل من المحلول الفسيولوجي و ثم مقارنة عكوره العالق مع عكوره محلول MacFarland 0.5 .

والذي يعادل 1.5×10^8 CFU / ml .

٢- سحب ٠,١ مل من التخفيف المناسب لكل عزلة بكتيرية و اضيف إلى أطباق حاوية على وسط Muller Hinton agar الصلب وتم نشره جيدا على سطح الطبق بواسطة الناشر L – Shape المسحة Swaps المعقمة.

٣- نعمل حفر well باستخدام الثاقب الفليني بقطر ٥٠ مايكروليتر على سطح الاكار بأبعاد متساوية على ثلاث مكررات وخمس معاملات وكانت المعاملة الأولى عقار ciprofloxacin ، بتركيز MIC يساوي ٤ تم تحديده بواسطة حساسية جهاز Vietek، المعاملة الثانية مستخلص نبات السالفيا ، المعاملة الثالثة المركب النانوي (Yassin et al., 2022)، المعاملة الرابعة المستخلص محمل بعقار ciprofloxacin ، المعاملة الخامسة المركب النانوي محمل بعقار ciprofloxacin وبثلاث تراكيز اكبر من MIC وبتراكيز MIC وأقل من MIC وبحجم ٥٠ مايكرو ليتر .

٤- باستخدام micropipette تم وضع التراكيز المذكورة أعلاه على الأطباق الحاوية على المزروع البكتيري ثم وضعت الاطباق في الحاضنة بدرجة ٣٧ مئوية ولمدة ٢٤ ساعة.

جدول (٣-٦) تراكيز المضاد الحيوي الحر CIP والمستخلص *S.officinalis* الحر والمركب النانوي *S.officinalis* /NPs قبل وبعد تحميل المضاد الحيوي

المعاملات	التركيز $\mu\text{g/ml}$	<i>K.pneumonia</i>	<i>P .auroginosa</i>
T1 المعاملة الأولى Ciprofloxacin	C1>MIC	8	8
	C2=MIC	4	4
	C3<MIC	2	2
T2 المعاملة الثانية <i>S. officinalis</i>	C1>MIC	16	16
	C2=MIC	8	8
	C3<MIC	4	4
T3 المعاملة الثالثة <i>S. officinalis</i> /NPs	C1>MIC	16	16
	C2=MIC	8	8
	C3<MIC	4	4
T4 المعاملة الرابعة <i>S. officinalis</i> -CIP	C1>MIC	4+8	4+8
	C2=MIC	2+4	2+4

1+2	1+2	C3<MIC	T5 المعاملة الخامسة <i>S.officinalis</i> /NPs- CIP
4+8	4+8	C1>MIC	
2+4	2+4	C2=MIC	
1+2	1+2	C3<MIC	

٣-٢-٤ اختبار التركيز المثبط الأدنى (MIC) لمركب الميرمية النانوي ومستخلص الميرمية بعد تحميل المضاد الحيوي ciprofloxacin

تم تحضير التراكيز اللازمة للكشف عن التركيز المثبط الأدنى لمركب السالفيا النانوي ومستخلص السالفيا وبعد تحميل المضاد الحيوي، تم تحديد MIC كما في الخطوات التالية:

١- حضر العالق البكتيري من مزج عدة مستعمرات من البكتيريا مع (٥) مل من المحلول الفسيولوجي و تم مقارنة عكورة العالق مع عكورة محلول MacFarland القياسي والذي يعادل $10^8 \times 1.5$ CFU / ml .

٢- تحضير تراكيز مضاعفة لكل من المواد قيد الدراسة .

٣- استعملت مجموعة أنابيب معقمة لكل معاملة على حدة و رقمت الأنابيب وأضيف إليها (٥) مل من الوسط الزرع Nutrient broth في كل أنبوبة ثم أضيفت التراكيز على التوالي وهكذا مع كل المواد قيد الدراسة على حدة مع مراعاة تغير الماصة لكل مادة و لكل تركيز لتألفي حدوث أي تلوث بين المواد

٤- بعدها لقت الأنابيب بواسطة Loop من العالق البكتيري المحضر في أول خطوة

٥- تم تحضير أنبوب سيطرة يحوي عالق بكتيري فقط.

٦- حضنت الأنابيب بعد وضعها عمودي في الحاضنة بدرجة حرارة ٣٧ درجة مئوية لمدة ٢٤ ساعة.

٧- سجلت نتائج MIC على أساس ظهور العكورة (Turbidity) حيث إن الأنبوبة التي لم يلاحظ فيها النمو البكتيري بشكل مرئي و واضح في العين المجردة وظهر النمو البكتيري عند القيام بعملية الزرع من عالق الأنبوبة على أطباق حاوية على وسط Mueller Hinton Agar ، فالتركيز الذي أظهر نمواً بعد الحضانة بدرجة حرارة ٣٧ م ° لمدة ٢٤ بكتيريا وان كان قليلاً جداً شخص على أنه التركيز المثبط الأدنى)

MIC في أطباق أما التركيز الذي لم يظهر أي نمو بكتيري في الأطباق شخص على أنه التركيز القاتل MBC و القاضي على البكتيريا نهائيا (Okasha & Meheissen, 2017) .

٣-٢-١٥ تحضير تراكيز MIC للمضاد الحيوي CIP والمستخلص *S.officinalis* والمركب النانوي *S.officinalis/ NPs*

١- تم استعمال المضاد الحيوي CIP كمسحوق وأن تركيز المادة الفعالة 500 ملغم تم أذابتها في الماء المقطر لعمل عالق بكتيري بتراكيز مساوية MIC (4) مايكرو كرام لكل مل لكل من *K.pneumoniae*، *P. aureoginosa*، على التوالي ومعاملة المزروع البكتيري بتركيز 50 مايكرو ليتر بالتراكيز حسب تركيز MIC الذي تم تسجيله من نتائج جهاز Vitek2 .

٢- لتحضير المركب النانوي

* تحضير 100 مل من 1 ملي مولاري نترات الفضة

- تم تحضيره بإضافة نترات الفضة $Ag\ NO_3$ بنسبة % 80 الى مستخلص نبات السالفيا بنسبة 20%

٣- لتحضير تراكيز المركب النانوي محمل بالمضاد الحيوي نجم نصف مل من المركب النانوي ونصف مل من المضاد، و لتحضير تراكيز المستخلص محمل بالمضاد نجم نصف مل من المستخلص ونصف مل من تركيز المضاد يوضع المحلول على جهاز الصفيحة الهزازة لمدة 18 ساعة لحين بقاء ثلث المحلول ويكمل الحجم إلى 15 مل وبعدها يوضع بجهاز الطرد المركزي ويهمل الراسب ويؤخذ الراشح، بعدها يؤخذ 50 مايكرو ليتر لمعاملة المزروع البكتيري لكل من المستخلص والمركب النانوي .

٣-٢-١٦ الكشف عن إنتاج الأغشية الحيوية *Detection of Biofilm production*

للكشف عن الاغشية الحيوية تم استعمال الطريقة التالية:

٣-٢-١٦-١ أجار الكونغو الأحمر Congo red agar

يستخدم للكشف عن إنتاج الأغشية الحيوية وهو عبارة عن وسط معدّ في المختبر، يتم تحضيره عن طريق إذابة ١٨ جم أجار، و ٣٠ جم من (BHI)، و ٣٦ جم سكروز، وفي ٩٠٠ مل من الماء المقطر، ثم تعقيمه بالبخر وتبريده. يتم تحضير صبغة الكونغو الأحمر عن طريق إذابة ٠,٨ جم من الصبغة في ١٠٠٠ مل من الماء المقطر وتعقيمها بالترشيح ثم إضافتها إلى الوسط بعد تبريده ثم سكبها في أطباق بتري معقمة. يستخدم هذا الوسط للكشف عن إنتاج الطبقة الجلاتينية (Niveditha et al., 2012) .

٣-٢-١٧ الدراسة الجزيئية Molecular study

٣-٢-١٧-١ التحري عن جينات مقاومة المضادات الحيوية بواسطة PCR

Detection of Antibiotic resistance genes by PCR

تم إجراء التحري عن جينات المقاومة وبعده خطوات :-

٣-٢-١٧-١-١ أستخلاص DNA قبل المعاملة بجزئيات الفضة النانوية

DNA extraction before treatment with silver nanoparticles

- ١-حضرت عينة البكتريا سالبة الكرام .
- ٢- نقلت من ١-٢ مل من معلق الخلايا البكتيرية المزروعة الى ٢ أنبوب حاوي ٢ مل .
- ٣- وضع عالق البكتيريا بجهاز الطرد المركزي لمدة دقيقة واحدة عند ١٣٠٠٠ دورة في الدقيقة، وتركت المادة الطافية. قمنا بإعادة تعليق pellet الخلية بالكامل مع بقايا المادة الطافية باستخدام vortex .
- ٤- أضيف ٢٠٠ ميكروليتر من CL Buffer، و ٥ ميكروليتر من محلول RNase A في أنبوب العينة وتم خلطهما عن طريق الدوران بقوة.
- ٥- حضن المحلول عند ٥٦ درجة مئوية اما باستخدام الفرن أو حمام مائي لمدة ١٠ ~ ٣٠ دقيقة.
- ٦- عند اكتمال التحلل، أضيف ٢٠٠ ميكروليتر من البفر BL إلى أنبوب العينة وتم خلطه جيدًا. ثم حضن الخليط عند ٧٠ درجة مئوية لمدة ٥ دقائق.
- ٧- وضعت انبوبة العينة في جهاز الطرد المركزي أنبوب العينة عند ١٣٠٠٠ دورة في الدقيقة لمدة ٥ دقائق لإزالة جزيئات الأنسجة غير المتحللة. ثم نقلت ٣٥٠ ~ ٤٠٠ ميكروليتر من المادة الطافية بعناية إلى ١,٥ مل في أنبوب جديد.
- ٨- قمنا بالطرد المركزي لمدة ٦للمدة وجيزة لأنبوب سعة ١,٥ مل لإزالة القطرات من داخل الغطاء.
- ٩- أضيف ٢٠٠ ميكروليتر من الإيثانول المطلق إلى المحللة، واخلط جيدًا بواسطة دوامة النبض. بعد الخلط، قمنا بالطرد المركزي لمدة وجيزة في أنبوب ١,٥ مل لإزالة القطرات من داخل الغطاء.

١٠- نقل الخليط بعناية من الخطوة ٧ إلى عمود الدوران (في أنبوب تجميع ٢ مل) دون ترطيب الحافة، وأغلق الغطاء، وأجهزة الطرد المركزي عند ١٣٠٠٠ دورة في الدقيقة لمدة دقيقة واحدة. تم التخلص من الراشح وضع عمود الدوران في أنبوب تجميع جديد سعة ٢ مل.

١١-إضيف ٧٠٠ ميكرو لتر من البفر WB إلى عمود الدوران دون ترطيب الحافة، وأجهزة الطرد المركزي لمدة ١ دقيقة عند ١٣٠٠٠ دورة في الدقيقة. تجاهل التدفق وإعادة استخدام أنبوب المجموعة.

١٢- تم إضافة ٧٠٠ ميكرو لتر من البفر WB إلى عمود الدوران دون ترطيب الحافة، ثم جهاز الطرد المركزي لمدة دقيقة واحدة عند ١٣٠٠٠ دورة في الدقيقة. تخلصنا من التدفق ووضع العمود في أنبوب تجميع جديد سعة ٢,٠ مل، ثم استخدم جهاز الطرد المركزي مرة أخرى لمدة دقيقة إضافية لتجفيف الغشاء. تجاهل التدفق من خلال وأنبوب التجميع تمامًا.

١٣- وضع عمود الدوران في أنبوب جديد ١,٥ مل وإضافة ٣٠-١٠٠ ميكرو لتر من البفر CE مباشرة على الغشاء. يحضن لمدة دقيقة واحدة عند درجة حرارة الغرفة ثم تم الطرد المركزي لمدة ١ دقيقة عند ١٣٠٠٠ دورة في الدقيقة لأزالة الشوائب.

٢-١٧-٢-٣ حساب تركيز ونقاوة ال DNA

Calculation of DNA Concentration and Purity

تم استخدام جهاز Nano-drop لحساب تركيز الحمض النووي ونقاؤه، ١ ميكرو ليتر من كل عينة DNA المستخدمة في جهاز Nano-drop لتحديد الكثافة البصرية (OD) عند الطول الموجي ٢٦٠ نانومتر و ٢٨٠ نانومتر.

٢-١٧-٢-٣ اختيار وتحضير البرايمرات

تمت إذابة primer المجفف في ٢٥٠ مايكرو ليتر من الماء الخالي من nuclease للحصول على تركيز نهائي قدره (١٠٠ بيكومول / ميكرو ليتر) لتحضير تركيز ١٠ بالمول كمحلول عمل عن طريق أخذ ١٠ ميكرو ليتر من (محلول المخزون) في ٩٠ ميكرو ليتر من الماء الخالي من nuclease أو الماء المقطر ليصبح التركيز النهائي ١٠ بيكومول / ميكرو ليتر (محلول العمل).

٢-١٧-٢-٣ شروط جهاز التدوير الحراري Condition of PCR

تم إدراج مكونات خليط التفاعل وبرنامج PCR على النحو التالي:

جدول (٧-٣) المواد المستخدمة في تفاعل PCR .

PCR reaction components	Volume (μl)
Green master mix	12.5
Primer F	1
Primer R	1
DNA template	5
Nuclease free water	5.5
Total volume	25

جدول (٨-٣) شروط برنامج التدوير الحراري Thermo cycling conditions Program

Steps	Temperature	Time	No. of cycles
Pre-Denaturation	95°C	5 minutes	1
Denaturation	95°C	10 second	35
Annealing	*	45 second	
Extension	72°C	55 second	
Final Extension	72°C	7 minutes	1

* 55°C for PSLA gene and 60 °C for Pga A gene

Agarose Gel Electrophoresis ٥-١-١٧-٢-٣ الترحيل الكهربائي لهلام الاكاروز

تم تحضير هلام الأكاروز عن طريق إذابة ١,٥ جم من مسحوق الاكاروز في ١٠٠ مل من محلول TBE المنظم (الرقم الهيدروجيني ٨) في حمام ماء مغلي، وتركه ليبرد حتى درجة حرارة ٥٠ مئوية، وإضافة بروميد الإيثيديوم بتركيز ٠,٥ مجم/ مل. ثم تم وضع شريط على نهاية علبة الجل. تم

تثبيت المشط في أحد طرفي الحوض لصنع آبار تستخدم لتحميل عينات نتائج تفاعل الخليط. تم سكب الاغاروز بلطف في خزان الترحيل، وتركه ليتصلب في درجة حرارة الغرفة لمدة ٣٠ دقيقة. ثم تمت إزالة المشط بلطف من الحفر بعد ذلك تم تثبيت الاغاروز في غرفة الرحلان الكهربائي التي كانت مملوءة بمادة TBE التي غطت سطح الجل. تمت إضافة ٥ ميكرو ليتر من الـ PCR product وتم تحميل الخليط في الحفر الموجودة في هلام الاغاروز. تم السماح للتيار الكهربائي عند ٧٠ فولت لمدة ساعة. تم استخدام الأشعة فوق البنفسجية عند ٣٢٠-٣٣٦ نانومتر لمراقبة حزم الحمض النووي، وتم تصوير الجل باستخدام الكاميرا الرقمية (Sambrook & Russell, 2001).

٢-١٧-٢-٣ النسخ العكسي الكمي في الوقت الحقيقي Quantitative Reverse PCR

Transcription Real-Time PCR

تم إجراء تقنية تفاعل البوليمرايز المتسلسل الكمي في الوقت اللحظي للكشف الكمي وتحليل التعبير الجيني النسبي لجين psIA لجينات مضخات تدفق مقاومة المضادات الحيوية وتطبيعها بواسطة الجين المحافظ 16sRNA في عزلات *p. aeruginosa* المقاومة للأدوية المتعددة. وتم تنفيذ الطريقة حسب (Livak) وتضمنت الخطوات التالية:

أ. استخلاص الحامض النووي RNA

تم استخلاص أجمالي الحامض النووي الرايبوزي من العزلات البكتيرية *P. aeruginosa* باستخدام (easy-spin™ Total RNA Extraction Kit) وتم إجراؤها وفقاً لتعليمات الشركة المصنعة على النحو التالي:

١- تم اخذ حوالي ١٠ مستعمرات من البكتريا وخلطت مع ٤٠٠ ميكرو ليتر من Lysis Buffer، و٤ ميكرو ليتر من المركبات-إيثانول و٢٠ ميكرو ليتر من محلول Kبروتيناز 20ملغم/مل ونقلت الى أنبوب طرد مركزي صغير سعة ١,٥ مل مع عينة. يتم تجانسها بواسطة المدقة وخلطه بواسطة الدوامة،

٢- تم تحضينها عند ٥٦ درجة مئوية لمدة ١٠ دقائق والطرد عند ١٣٠٠٠ دورة في الدقيقة لمدة ٣ دقائق.

٣- تم نقل المادة الطافية بعناية إلى الخزان العلوي لعمود الدوران ١ (الحلقة البيضاء) باستخدام أنبوب تجميع سعة ٢,٠ مل والذي تم طرده بعد ذلك عند ١٣٠٠٠ دورة في الدقيقة لمدة ٣٠ ثانية وفي الوقت نفسه تم حفظ التدفق..

٤- تمت إضافة البفر (٤٠٠ ميكرو لتر) إلى تدفق العينة في أنبوب التجميع واخلطه جيداً عن طريق الدوران النبضي لمدة ١٠ ثوانٍ متبوعاً بالطرد المركزي عند ١٣٠٠٠ دورة في الدقيقة لمدة دقيقة واحدة.

- ٥- تم نقل ٦٠٠ ميكرو ليتر من المادة الطافية إلى أنبوب طرد مركزي صغير جديد سعة ١,٥ مل، ثم تمت إضافته بنفس الحجم من محلول الربط و ٢٠٠ ميكرو لتر من الإيثانول المطلق وتم خلطه جيدًا.
- ٦- تم نقل ٦٠٠ ميكرو ليتر من المحللة إلى الخزان العلوي لعمود الدوران ٢ (الحلقة الخضراء) باستخدام أنبوب تجميع سعة ٢,٠ مل دون ترطيب الحافة.
- ٧ جهاز طرد مركزي بسرعة ١٣٠٠٠ دورة في الدقيقة لمدة ١٠ ثوانٍ. ثم تمت إزالة التدفق وتجميع عمود الدوران باستخدام أنبوب التجميع سعة ٢,٠ مل.
- ٨- تم تكرار الخطوتين السابقتين باستخدام المحللة المتبقية متبوعة بإضافة ٥٠٠ مايكرو ليتر من محلول الغسيل ١ إلى عمود الدوران باستخدام أنبوب التجميع وأجهزة الطرد المركزي عند ١٣٠٠٠ دورة في الدقيقة لمدة ١٠ ثوانٍ
- ٩- أجهزة الطرد المركزي عند ١٣٠٠٠ دورة في الدقيقة لمدة ١٠ ثانية وتصب من خلال التدفق وتجميع عمود الدوران مع أنبوب جمع ٢,٠ مل.
- ١٠- في أنبوب خالٍ من RNase ، أضف ١٠ ميكرو لتر من 1 DNase وحدة/ميكرو ليتر)، و ٤٠ ميكرو ليتر من DNase I Reaction Buffer واخلط. إضافة الخليط مباشرة على مصفوفة العمود ثم احتضانها في درجة حرارة الغرفة لمدة ١٥ دقيقة.
- ١١- تمت إضافة ٥٠٠ ميكرو ليتر من محلول الغسيل ١ إلى عمود الدوران باستخدام أنبوب التجميع وطرده عند ١٣٠٠٠ دورة في الدقيقة لمدة دقيقة واحدة ثم سكب التدفق من خلاله وتجميع عمود الدوران باستخدام أنبوب التجميع سعة ٢,٠ مل.
- ١٢- تمت إضافة ٧٠٠ ميكرو ليتر من محلول الغسيل ٢ إلى عمود الدوران باستخدام أنبوب التجميع وطرده عند ١٣٠٠٠ دورة في الدقيقة لمدة دقيقة واحدة ثم سكب التدفق من خلاله وتجميع عمود الدوران باستخدام أنبوب التجميع سعة ٢,٠ مل.
- ١٣- تم تجفيف عمود الدوران بواسطة طرد مركزي إضافي عند ١٣٠٠٠ دورة في الدقيقة لمدة دقيقة واحدة لإزالة الإيثانول المتبقي في عمود الدوران والذي تم نقله بعد ذلك إلى أنبوب الطرد المركزي الصغير الجديد سعة ١,٥ مل.
- ١٤- تم شطف الحمض النووي الريبوزي (RNA) بإضافة ٥٠ ميكرو ليتر من محلول الشطف إلى عمود الدوران باستخدام أنبوب طرد مركزي صغير، وتركه لمدة ٣ دقائق ثم طرده مركزياً عند ١٣٠٠٠ دورة في الدقيقة لمدة دقيقة واحدة.

ب. معالجة DNase I

تمت معالجة الحامض النووي RNA المستخرج بأنزيم DNase لإزالة الكميات المرافقة من الحامض النووي الجيني من الحامض النووي الكلي المزال باستخدام عينات من (مجموعة انزيم DNase) وتم إجراؤها تبعا للطريقة التي وصفتها شركة Promega على النحو التالي :

جدول (٩-٣) معالجة DNase I

Mix	Volume
Total RNA 1µg	10µL
DNase I enzyme	1µL
10X buffer	4µL
DEPC water	5µL
Total	10µL

ج. تصنيع cDNA

١- تم استخدام إجمالي عينات الحمض النووي RNA المستخرجة والمعالجة في خطوة تصنيع cDNA باستخدام المجموعة من Add Script Reverse Transcriptase على النحو التالي:

جدول (١٠-٣) تصنيع cDNA وفقا لتعليمات الشركة

RT mix	Volume
Total RNA 100µg	10µL
Random Hexamer primer (50pmol)	1µL
DEPC water	9µL
Total	10ul

٢- جدول (٣-١١) تصنيع cDNA

RT mix	Volume
DEPC water	2µl
Transcript cDNA	10µl
dNTPs	2µl
RNA	5µl
random oligos hexamer	1µl
Total 20 µl	

د- تم الحصول على الحامض النووي منقوص الاوكسجين المتمم عن طريق عمل البرنامج الاتي:

Steps	time	Temperature
Denaturation	10 min	25C°
Reverse transcriptase (RT)	60 min	50 C°
RT inactivation	5 min	80 C°
Store	on hold	4 C°

ه- إعداد النسخ العكسي الكمي 3.1. PCR (RT-qPCR) تضخيم RT-qPCR: في البداية، تم تحقيق التضخيم باستخدام GoTaq qPCR Master Mix (كوريا).

تم تحضير مزيج qPCR الرئيسي باستخدام (GoTaq qPCR Master Mix) بناء على تضخيم الصبغة الخضراء syber في نظام PCR في الوقت اللحظي وتم تحضير المزيج qPCR على النحو التالي : مزيج qPCR للجينات المستهدفة والجين المحافظ .

جدول (١٢-٣) المزيج الرئيسي الكمي القياسي q PCR

Materials	Volume
DPEC water	4 μ l
GoTaq qPCR Master Mix	10 μ l
Forward Primers	1 μ l
Reverse primer	1 μ l
cDNA	4 μ l
Total	20 μ l

و- تم تنفيذ الظروف الحرارية باستخدام جهاز qPCR Applied Biosystem (الولايات المتحدة الأمريكية) على النحو التالي:

جدول (١٣-٣) شروط جهاز التدوير الحراري

Steps Temperature		Time	Cycles
Activation	50 C	2 min	1
Initial denaturation	95 C	10 min	1
Denaturation	95 C	15 sec	40x
Annealing	60 C	60 sec	40x with machine read
Extension	60 C	35 sec	40x

Statistical analysis التحليل الاحصائي ٣-٣

تم إجراء التحليل الإحصائي للتجربة وفق التصميم العشوائي الكامل لدراسة (تقييم الفعالية الحيوية للمركب النانوي الأخضر على مقاومة البكتريا المتعددة المعزولة من مصادر سريرية مختلفة) ، إذ استخدم تحليل التباين spss وأختبار مربع كاي chi square واختيار معنوية الفروقات بين المتوسطات باستخدام اختبار الفرق المعنوي الاصغر (LSD) Least Significant Differences تحت مستوى معنوية (P<0.05) .

الفصل الرابع

النتائج والمناقشة

Results and Discussion

٤- النتائج والمناقشة Results and Discussion

٤-١ توزيع العزلات حسب الفئات العمرية والجنس

The distribution of Isolates according to age groups and gender

بينت نتائج الدراسة الحالية كما موضح في الجدول (٤-١) وعلى النحو الآتي : الفئة العمرية 1 يوم 10- سنة كان عدد العزلات (23 عزله أي بنسبة 22.2%) ، ومن 11 -20 سنة كان عدد العزلات (16 عزله أي بنسبة 16.2%) ، ومن 21-30 سنة كان عدد العزلات (20 عزله أي بنسبة 20.2%) ، ومن 31- 40 سنة كان عدد العزلات (13 عزلة أي بنسبة 13.1%) ، ومن 41- 50 سنة كان عدد العزلات (11 عزلة أي بنسبة 11.1%) ، ومن 51- 60 سنة كان عدد العزلات (5 أي بنسبة 5.1%) ، ومن 61 فأكثر كان عدد العزلات (12 عزلة أي بنسبة 12.1%) .

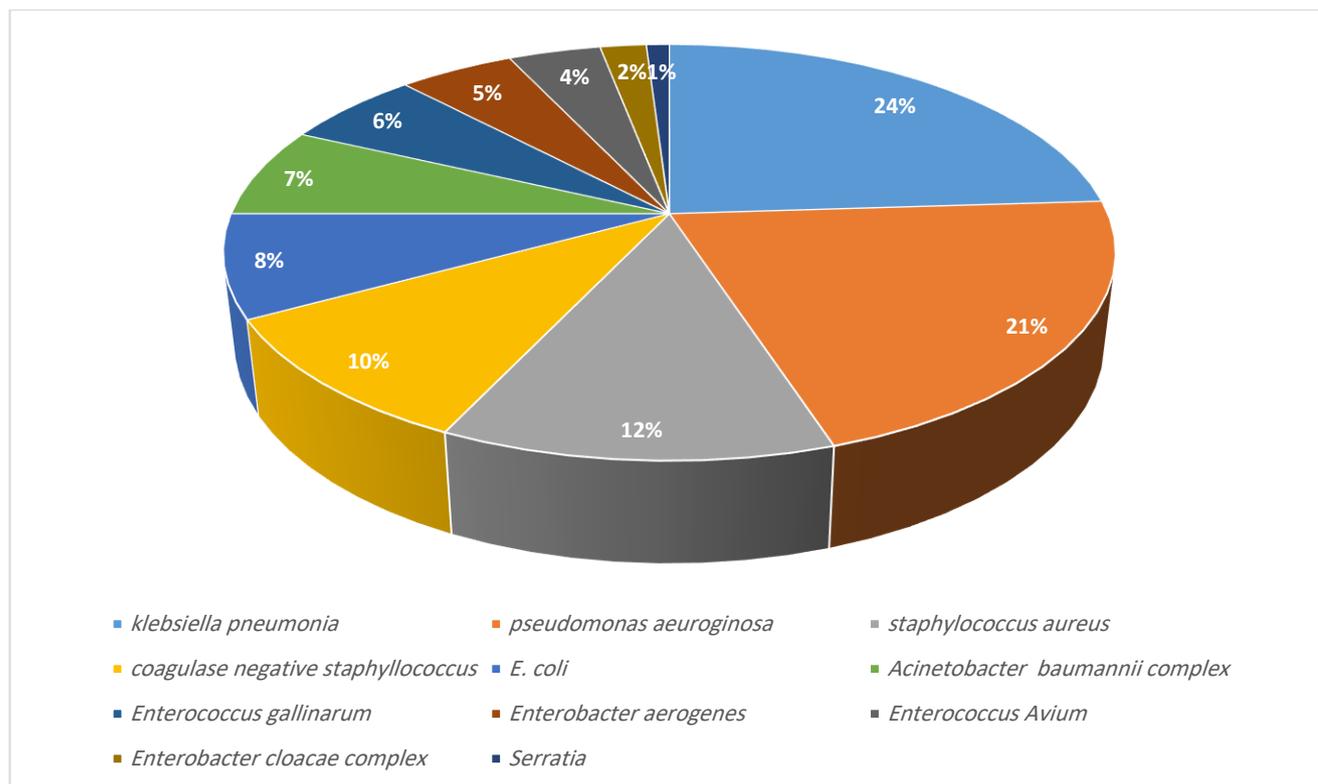
ونلاحظ وجود فروق معنوية في الفئة العمرية (من ٦١ سنة فأكثر) ، ووجود فروق معنوية في الفئة العمرية من (21-30) ، وأظهرت النتائج أن أعلى نسبة لإصابات الجروح والحروق في هذه الدراسة في الفئة العمرية من احد وستون سنة فما فوق وأن زيادة نسبة الإصابة بنسبة (12.1%) وهذه النسبة ليست قليلة بل خطرة نوعا ما يرجع بسبب صعوبة استجابة كبار العمر للعلاج بالمضادات الحيوية ، وذكر (Yahav et al., 2016) أن سبب ازدياد الاصابات البكتيرية عند كبار السن هو ضعف الاستجابة المناعية وأصابتهم ببعض الامراض المزمنة التي تعرقل وظائف أعضاءهم الفسلجية وأن سبب زيادة نسبة الإصابة في الفئة العمرية من (21-30) (فئة الشباب) قد يرجع إلى كونهم الأكثر نشاطا وحركة مما يجعلهم أكثر عرضة لإصابات الجروح والكدمات والحروق ، لكن (Rubio, 2006) ، فسر ارتفاع نسبة الإصابة لأن فئة الشباب أقل التزاما بالتعليمات مما يؤدي إلى تفاقم حالتهم الصحية.

جدول (٤ - ١) توزيع العزلات حسب الفئات العمرية والجنس.

p.v	Total	العمر							count & %	الجنس
		61&more	51-60	41-50	31-40	21-30	11-20	1-10		
0.08	56	11	2	4	4	15	9	11	Count	الاناث
	100.0	20.0	3.6	7.3	7.3	27.3	16.4	18.2	% horizontal	
	55.6	91.7	40.0	36.4	30.8	75.0	56.3	45.5	% vertical	
0.003	44	1	3	7	9	5	7	12	Count	الذكور
	100.0	2.3	6.8	15.9	20.5	11.4	15.9	27.3	% horzantel	
	44.4%	8.3	60.0	63.6	69.2	25.0	43.8	54.5	% vertical	
0.02	100	12	5	11	13	20	16	23	Count	Total
	100.0	12.1	5.1	11.1	13.1	20.2	16.2	22.2	% horizontal	
		0.04	0.66	0.37	0.17	0.03	0.62	0.67	p.v	

٤-٢ توزيع نسب العزلات البكتيرية لعينات الدراسة

أظهرت نتائج الدراسة الحالية فكانت النسب المئوية للعزلات البكتيرية كما في الشكل (٤-١). ان اعلى نسبة بكتريا معزولة *Klebsiella pneumonia* اذ بلغت نسبتها % 24، تليها *Pseudomonas aeruginosa* % 21، *E. coli* % 8، *Coagulase negative staphylococcus* % 10، *Acinetobacter* % 7، *Enterobacter aerogenes* % 5، *Staphylococcus aureus* % 12، *Enterobacter cloacae* % 2، *Enterococcus Avium* % 4، *baumannii complex* % 6، *Enterococcus gallinarum* % 6، *Serratia* % 1، *complex*



شكل (٤-١) النسب المئوية للعزلات البكتيرية

٤-٣ توزيع نسب الإصابة البكتيرية اعتمادا على مصدر العزل :

تم توزيع نسب الإصابة البكتيرية اعتمادا على مصدر العزل كما يلي :

٤-٣-١ توزيع نسب الإصابة البكتيرية المعزولة من عينات الجروح :

بينت نتائج توزيع عزلات *Klebsiella pneumoniae* حسب مصادر عزلها ان عدد العزلات في إصابات الجروح 17 عزلة بنسبة (28.3%) ، أما بكتريا *P.aeruginosa* فكانت عدد عزلاتها 9 عزلة بنسبة (15%) كما في الجدول (٤-٢) .

وان بكتريا *K. pneumoniae* تستعمر إصابات الجروح بشكل رئيسي وجاءت نتائج الدراسة الحالية متفقة مع (Ghanem et al., 2017) ، وكذلك اتفقت مع الدراسة (Iroha et al., 2017) اذ ذكر الباحثين أن الجروح العظمية في الساقين يتم استعمارها في الغالب بواسطة *K. pneumoniae*. لوحظ أعلى معدل انتشار بكتيري في العينات المأخوذة من ضحايا الحوادث بينما لوحظ أقل انتشار في عينات المرضى الذين أصيبوا بالحروق. وتعد بكتريا *Klebsiella pneumoniae* ثاني أكثر البكتريا المعزولة شيوعا في إصابات الحروق بعد بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* و جاءت هذه النتيجة

متفقة مع (Perween et al., 2015) ، حيث يبين نسبة بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* و 8
28.0 نسبة بكتريا *Klebsiella pneumoniae* 22.08.

وأن بكتريا *K. pneumoniae* العزلة السائدة في عينات الجراحة تليها بكتريا *P. aeruginosa*
واتفقت هذه النتائج مع (Valarmathi et al., 2013) ، إذ كانت النسب (20.8%) في بكتريا *K.*
pneumoniae ، (16.6%) *P. aeruginosa* ، (8.3%) *E. coli* ، وكذلك تتفق مع (Hassan et al., 2022) ،
أذ وضحت الدراسة ان *K.pneumoniae* ، *P. aeruginosa* ، *E. coli* هي الأنواع الشائعة في أصابات الجروح .

اظهرت نتائج الدراسة الحالية أن الأناث أكثر تعرضا للإصابة ببكتريا *Klebsiella pneumoniae*
من الذكور عدد عزلاتها بالجروح (12 عزلة أي بنسبة 70.6%) في الأناث ، وعدد
العزلات في الذكور (5 عزلات أي بنسبة 29.4%) ، واتفقت هذه النتيجة مع (Naqid et al., 2020) ،
بان عدد عزلات *K.pneumoniae* في الجروح يكون في الأناث أكثر من الذكور.

جدول رقم (٤-٢) توزيع نسب الإصابات البكتيرية المعزولة من عينات الجروح .

%	Total	الجنس		العدد والنسبة	نوع العزلة
		انثى	ذكر		
28.3%	17	12	5	العدد	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	100.0%	70.6%	29.4%	النسبة	
15%	9	6	3	العدد	<i>pseudomonas aeruginosa</i>
	100.0%	66.7%	33.3%	النسبة	
8.3%	5	2	3	العدد	<i>E. coli</i>
	100.0%	40.0%	60.0%	النسبة	
13.3%	8	4	4	العدد	<i>staphylococcus aureus</i>
	100.0%	50%	50%	النسبة	
10%	6	3	3	العدد	<i>coagulase negative staphylococcus</i>
	100.0%	50.0%	50.0%	النسبة	
6.7%	4	2	2	العدد	<i>Acinetobacter baumannii</i>
	100.0%	50.0%	50.0%	النسبة	
6.7%	4	2	2	العدد	<i>Enterococcus gallinarum</i>
	100.0%	50.0%	50.0%	النسبة	
6.7%	4	2	2	العدد	<i>Enterobacter aerogenes</i>
	100.0%	50.0%	50.0%	النسبة	
1.7%	1	0	1	العدد	<i>Enterobacter cloacae</i>
	100.0%	0.0%	100.0%	النسبة	
3.3%	2	1	1	العدد	<i>Enterococcus Avium</i>
	100.0%	50.0%	50.0%	النسبة	
100%	60	34	26	العدد	Total
	100.0%	56.7%	43.3%	النسبة	

٤-٣-٢ توزيع نسب الأصابة البكتيرية المعزولة من عينات الحروق :

بينت نتائج توزيع عزلات *Pseudomonas aeruginosa* حسب مصادر عزلها ان عدد العزلات في إصابات الحروق 12 عزله بنسبة (30%) أما بكتريا *K. pneumoniae* كانت عدد عزلاتها 7 عزلة بنسبة (17.5%) كما في الجدول (٤-٣) .

كانت هذه النتيجة متوافقة مع نتيجة (Saleh 2022). التي أظهرت أن نسبة إصابات الحروق بهذه البكتريا بلغت 51.75%. وأوضحوا (AL-Shamaa et al., 2016) أن خطر العدوى ببكتريا *pseudomonas aeruginosa* في إصابات الحروق أعلى مما هي عليه في إصابات الجروح اذ بلغت نسبة إصابات الحروق 88.6% و نسبة إصابات الجروح 19.3%، وان (Zhapouni et al., 2009) أكدوا بدراستهم أن ارتفاع نسب الاصابة في مرضى الحروق بصورة خاصة كان نتيجة تعطل آليات الدفاع لدى المرضى والتلف الحاصل في الانسجة المضيقة للبكتريا، وتعد هذه النسبة مقارنة للنتائج التي سجلها الباحثان (Jain & Singh, 2007)، اذ ذكرا الباحثان ان 45.8% من مرضى الحروق لديهم بكتريا *P. aeruginosa*. وفي دراسة أخرى تمكن الباحثون من عزل 75% من بكتريا *P. aeruginosa* من جلد المرضى الحروق والراقدين في المستشفى من (٧-٤) يوم (D. Sousa et al., 2018) ونتائج هذه الدراسة تتوافق مع نتائج دراستنا الحالية عن طريق عزل العامل الممرض ولكنها تختلف في نسبة الإصابة ويرجع السبب الى كون بكتريا *P. aeruginosa* خارجية المنشأ exogenous تنتقل من الكادر الطبي او الزائرين او الأدوات الجراحية ومن الهواء والماء والارضيات في بيئة المستشفى أو تكون داخلية المنشأ endogenous توجد على الجلد وفي الجهاز التنفسي وفي الأمعاء للأشخاص الراقدين في المستشفى. في حين ان (Taneja et al., 2004) فسروا ان القشط المتكرر في موقع الحرق وعدم اتخاذ التدابير الوقائية يؤدي الى زيادة خطورة العدوى وتفشى الإصابة، وفي هذه الدراسة (Agnihotri et al., 2004) توصل الباحثون ان العينات من مرضى وحدة الحروق كانت إيجابية الزرع بنسبة عالية جدا تصل الى (٩٦%) وذلك لان الإصابة الحرارية تضعف وظيفة الحاجز الطبيعي للجلد، وبالتالي فإن السماح بالاستعمار الميكروبي لجروح الحروق والتلوث لا يمكن منعه تقريباً حتى مع استخدام العوامل المضادة للميكروبات الموضعية.

واظهرت نتائج الدراسة الحالية ان الاناث أكثر تعرضا للإصابات الحروق ببكتريا *P. aeruginosa*، كما في الجدول (٤-٣) ، وكشفت النتائج أيضا ان نسبة الإصابة عند الاناث ببكتريا *P. aeruginosa* في عدوى الحروق 7 عزلة من اصل 12 عزلة أي بنسبة (58.3%) وكان عدد العزلات في إصابات الحروق للذكور 5 عزله أي بنسبة (41.7%) . واتفقت هذه النتائج مع (MCPS, 2012)، فسروا أنه من الممكن ان يكون هذا الارتفاع بسبب أن الاناث تقضي معظم الوقت في المطبخ

حيث وقوع الحوادث ، وكذلك اتفقت مع (Hussien *et al.*, 2012) انه من الممكن ان يكون هذا الارتفاع بسبب ان الاناث تقضي وقت طويل بالقرب من النار واعمال المنزل. وكذلك أتفقت مع (Hasan *et al.*, 2019).

جدول رقم (٤-٣) توزيع نسب الإصابات البكتيرية المعزولة من عينات الحروق .

%	Total	الجنس		العدد والنسبة	نوع العزلة
		انثى	ذكر		
30%	12	7	5	العدد	<i>pseudomonas aeruginosa</i>
	100.0%	58.3%	41.7%	النسبة	
17.5%	7	5	2	العدد	<i>klebsiella pneumoniae</i>
	100.0%	71.4%	28.6%	النسبة	
7.5%	3	0	3	العدد	E. coli
	100.0%	0.0%	100.0%	النسبة	
10%	4	3	1	العدد	staphylococcus aureus
	100.0%	75.0%	25.0%	النسبة	
10%	4	2	2	العدد	coagulase negative staphylococcus
	100.0%	50.0%	50.0%	النسبة	
7.5%	3	1	2	العدد	Acinetobacter baumannii
	100.0%	33.3%	66.7%	النسبة	
5%	2	2	0	العدد	Enterococcus gallinarum
	100.0%	100.0%	0.0%	النسبة	
2.5%	1	1	0	العدد	Enterobacter aerogenes
	100.0%	100.0%	0.0%	النسبة	
2.5%	1	0	1	العدد	Enterobacter cloacae
	100.0%	0.0%	100.0%	النسبة	
2.5%	1	0	1	العدد	Serretia
	100.0%	0.0%	100.0%	النسبة	
5%	2	1	1	العدد	Enterococcus Avium
	100.0%	50.0%	50.0%	النسبة	
100	40	22	18	العدد	Total
	100.0%	55%	45%	النسبة	

٤-٤-٤ تشخيص مركب السالفيا النانوي الأخضر

Diagnosis of green nanoparticles *Salvia officinalis* compound

٤-٤-٤ طيف الأشعة تحت الحمراء (FTIR) Fourier Transform Infrared

Spectroscopy

يستخدم تحليل FTIR لتحديد المركبات الكيميائية النباتية الفعالة (المجاميع الوظيفية functional groups)، الموجودة في المستخلص المائي لأوراق نبات *Salvia officinalis* المسؤولة عن اختزال نترات الفضة $AgNO_3$ الى جسيمات الفضة النانوية AgNPs بالإضافة هي مسؤولة أيضا عن استقرار وتغطية الـ Ag NPs (Okaiyeto et al., 2021)، ويمتد في مدى يتراوح بين $4000-400$ cm^{-1} .

أظهرت نتائج تحليل FT-IR كما موضح في الاشكال (٢-٤)(٣-٤) (٤-٤) (٥-٤) (٦-٤) امتدادات مختلفة من الحزم بأرقام موجية متنوعة فكانت لـ AgNPs التي تم تصنيعها باستخدام المستخلص المائي لأوراق نبات *Salvia officinalis* عرضت حزمة امتصاص واسعة وقوية عند التردد $3307,53$ سم^{-١} أما العقار كانت الحزمة عند التردد $3270,25$ سم^{-١}، في حين نلاحظ انزياح في فحص المركب النانوي المحمل بالعقار نحو التردد $3276,57$ سم^{-١} أما المستخلص المائي لأوراق نبات السالفيا يظهر حزمة عند التردد $3276,07$ سم^{-١} في حين نلاحظ انزياح في فحص المستخلص المائي المحمل بالعقار عند التردد $3272,68$ سم^{-١} دليل على اهتزاز أصرة مجاميع الهيدروكسيل O-H الناتجة عن المركبات الفينولية أوالمجاميع الكربوكسيلية الموجودة في المستخلص.

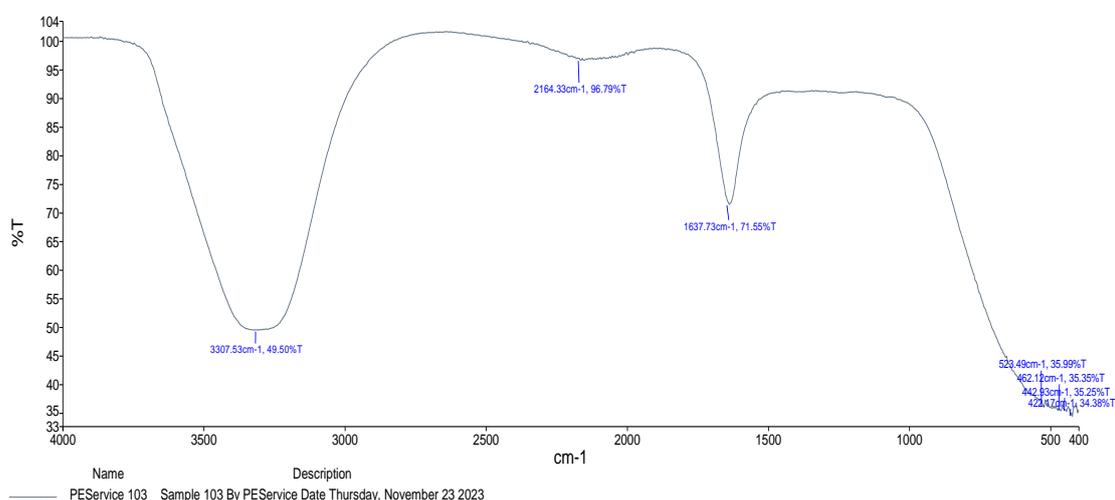
أظهرت جسيمات الفضة النانوية المركبة قمة عند التردد $2164,33$ سم^{-١} والتي تعود الى تمدد اصرة $C \equiv C$ الموجودة في Alkynes أما عقار السيبروفلوكساسين بحالته الحرة يظهر قمة امتصاص عند التردد $2153,22$ سم^{-١} يشير الى تمدد اصرة $C \equiv C$ ، أن طيف الأشعة تحت الحمراء للمركب النانوي محمل بالعقار بين انزياح نحو التردد $2156,93$ سم^{-١} امتطاط لا صرة $C \equiv C$ أما المستخلص المائي لنبات السالفيا يظهر حزمة عند التردد $2158,74$ سم^{-١} في حين نلاحظ انزياح في فحص المستخلص المائي لنبات السالفيا المحمل بالعقار نحو $2125,93$ سم^{-١} دليل على تمدد اصرة $C \equiv C$.

وتمثل القمة الأقل اتساعا $1637,73$ سم^{-١} والتي ظهرت في فحص مركب السالفيا النانوي التي تعبر عن امتداد الاصرة $C=O$ أو الانحناء في اصرة $C-N$ في مجموعة الاميد، ولوحظ في فحص العقار الحر إن القمة $1636,05$ سم^{-١} ناتجة عن الاصرة $C=O$ ، وفي فحص المركب النانوي المحمل بالعقار لوحظ ان القمة بقت في نفس تردداتها عند $1636,36$ سم^{-١} أما المستخلص المائي لنبات السالفيا يظهر

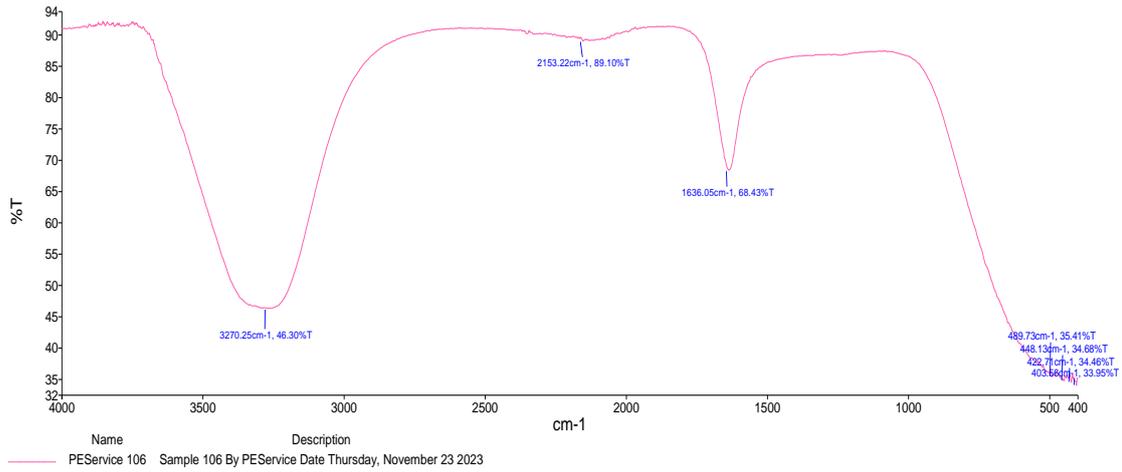
حزمة عند التردد ١٦٣٧,٤١ سم^{-١} بينما فحص المستخلص المائي لنبات السالفيا المحمل بالعقار يظهر ان الحزمة بقت في نفس التردد عند ١٦٣٥,٧٥ سم^{-١} وهذه النتائج تتفق مع (Okaiyeto *et al.*, 2021).

وأظهرت القمم المنخفضة لمركب السالفيا النانوي والعقار والمركب النانوي المحمل بالعقار عند الترددات (٥٢٣,٤٩ و ٤٦٢,١٢ و ٤٤٢,٩٣ و ٤٢٢,١٧) سم^{-١} على التوالي وضمن الاصرة C-I اليود الأليفاتية وجود انزياح في نتائج فحص المركب النانوي المحمل بالعقار مقارنة مع فحص العقار ، إذ توافقت هذه القمم الاهتزازية (الامتصاص والنفاذية) مع وجود الفلافونويدات والترينويدات في المستخلص المائي لأوراق نبات السالفيا المسؤولة عن الأختزال الحيوي للجسيمات النانوية ، في حين يمكن أن تشارك البروتينات في تثبيت AgNPs وحسب ما أفادا به (Balčiūnaitienė *et al.*, 2022).

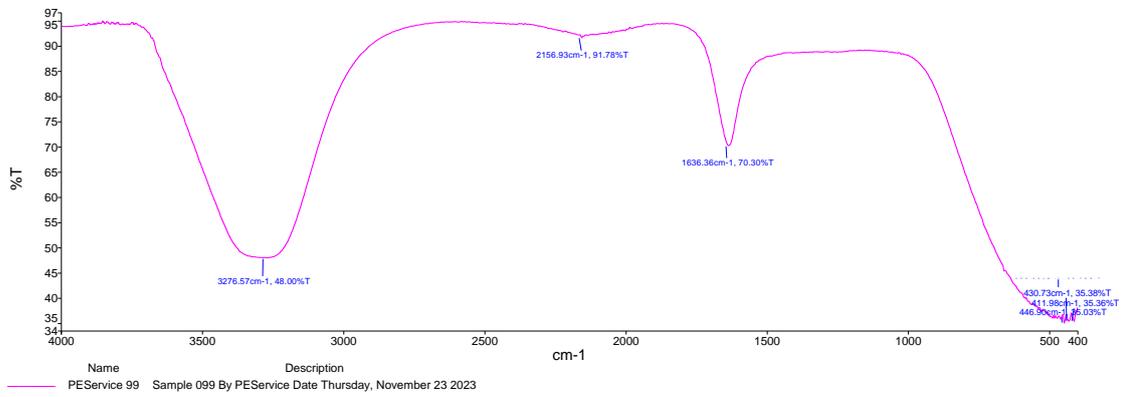
إن وجود المجاميع الوظيفية العضوية مثل الالكانات والكحولات لعبت دورا مهما في عملية اختزال نترات الفضة وتكوين جسيمات الفضة النانوية كما وتمنع هذه الجسيمات من الأكسدة والتحلل فضلا عن عملها في الحفاظ على استقرار الجسيمات النانوية على المدى الطويل (Ahmed *et al.*, 2020) ، وإن الانزياحات التي حصلت في المركب النانوي المحمل بالعقار دليلا واضحا على تحميل عقار السيروفلوكساسين على مركب السالفيا النانوي.



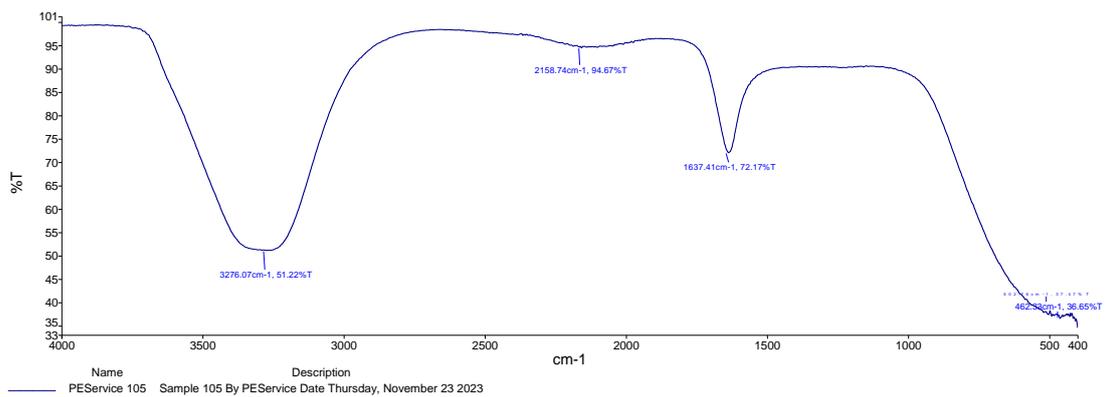
شكل (٤-٢) طيف الأشعة تحت الحمراء FT-IR للمركب النانوي



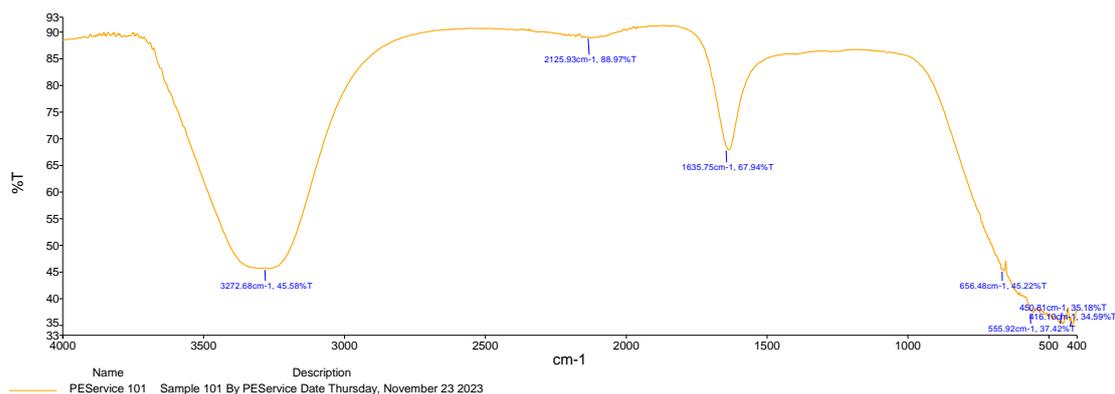
شكل (٣-٤) طيف الأشعة تحت الحمراء FT-IR لعقار السيبروفلوكساسين (CIP)



شكل (٤-٤) طيف الأشعة تحت الحمراء FT-IR للمركب النانوي المحمل بعقار السيبروفلوكساسين (CIP)



شكل (٥-٤) طيف الأشعة تحت الحمراء FT-IR لمستخلص أوراق السالفيا

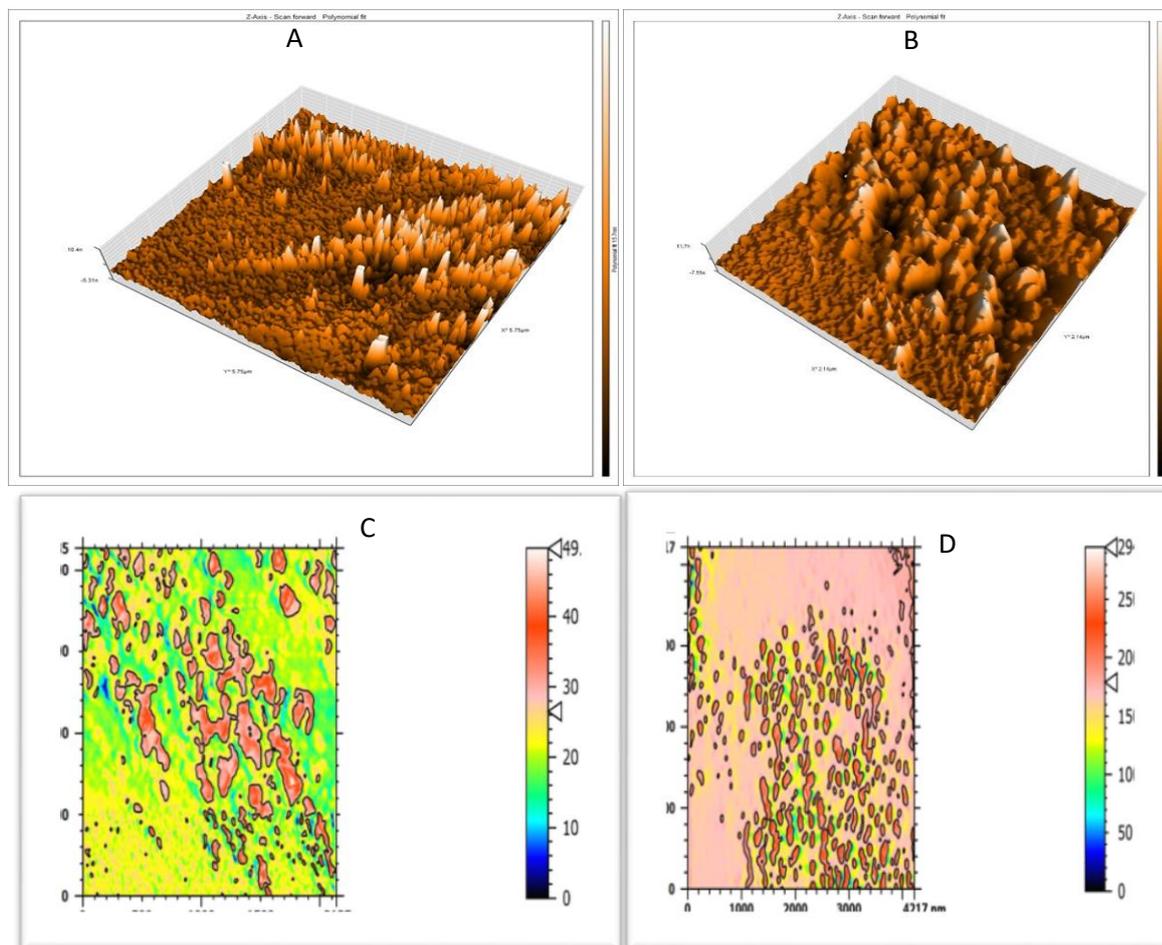


شكل (٦-٤) طيف الأشعة تحت الحمراء FT-IR المستخلص المائي لأوراق نبات السالفيا محمل بعقار السيبروفلوكساسين

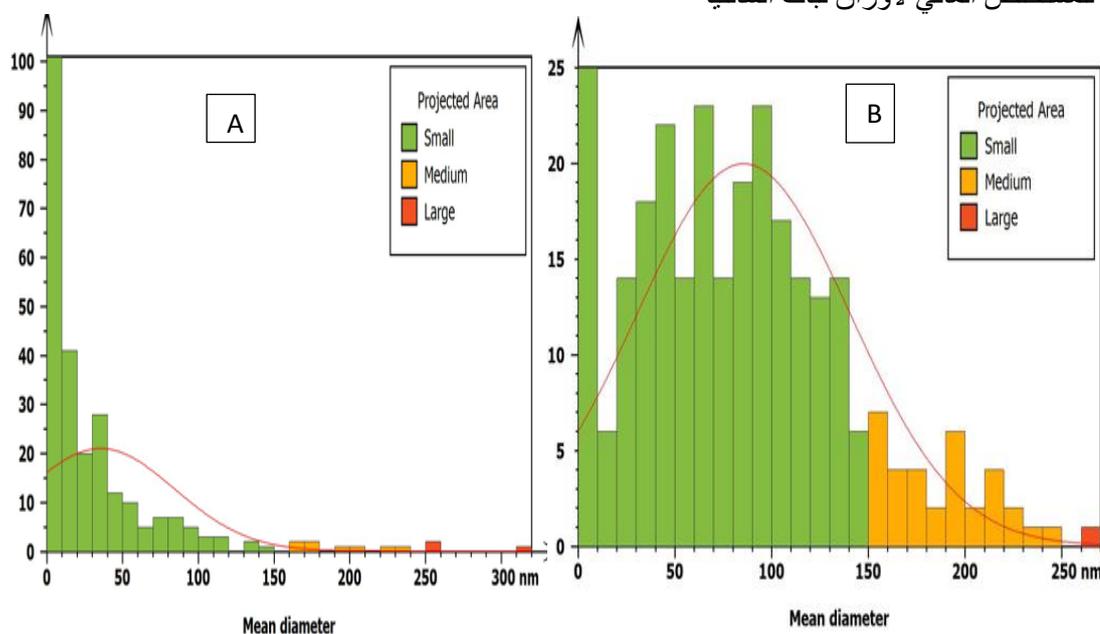
٢-٤-٤ مجهر القوة الذرية (AFM) Atomic Force Microscope

أظهرت نتائج الدراسة الحالية كما في الشكل (٧-٤) صور مجهر القوة الذرية أن معامل خشونة Sa السطح الخارجي لجزئيات مركب السالفيا النانوي *S. officinalis*/NPs ٣,٦٩٨ نانومتر بينما كان معامل خشونة Sa السطح للمستخلص المائي لأوراق نبات السالفيا *S. officinalis* ٦,٧٣٢ نانومتر حيث كان الفرق قبل وبعد تحويل المستخلص المائي لأوراق نبات السالفيا إلى المركب النانوي ٣,٠٣٤ نانومتر مما يدل على نجاح عملية تحضير المركب النانوي من المستخلص، أما معدل الجذر التربيعي Sq لمركب السالفيا النانوي *S. officinalis*/NPs ٤,٥٣٤ نانومتر ومعدل الجذر التربيعي Sq لمستخلص أوراق السالفيا ٩,٤٦١ *S. officinalis* الاختلاف في معدل الجذر التربيعي ٤,٩٢٧ نانومتر، مما يدل إلى ان المركب النانوي يقع ضمن حدود القياسات النانوية (Marza Hamza et al., 2022)، وكانت المساحة السطحية Sdr لمركب السالفيا النانوي *S. officinalis*/NPs ٠,٦١٧٤ نانومتر ومساحة سطح المستخلص المائي لأوراق نبات السالفيا كانت ٠,٧٩٨٣ نانومتر وهذه إشارة مهمة كون السطح مستقبل جيد للجسيمات المراد تحميلها، وكان اتجاه الملمس لمركب السالفيا النانوي ٠,٠٠٢٥٦٧ وللمستخلص المائي لأوراق نبات السالفيا ١٨٠,٠ بينما أقصى ارتفاع للقمم للمركب السالفيا النانوي ١٦,٣٩ وللمستخلص المائي لأوراق نبات السالفيا ٤٤,٩٨ وأقصى ارتفاع للحفرة للمركب السالفيا النانوي ١٢,٤٥ وللمستخلص المائي لأوراق نبات السالفيا ٧٠,١٠.

بينت نتائج الدراسة الحالية في الشكل (٨-٤) ان متوسط الحجم الحبيبي لمركب السالفيا النانوي *S. officinalis*/NPs كان ٣٥,٤٢ نانومتر بعد أن تم تسجيل متوسط الحجم الحبيبي لمستخلص السالفيا *S. officinalis* ١٥,٤٩ نانومتر وكان الفرق بين متوسط الحجمين ٥٠,٠٧ نانومتر كما موضح في الجدول (٤-٤).



شكل (٧-٤) صور مجهر القوة الذرية (A) صورة ثلاثية الأبعاد لمركب السالفيا النانوي (B) صورة ثلاثية الأبعاد للمستخلص المائي لأوراق نبات السالفيا (C) صورة ثنائية الأبعاد لمركب السالفيا النانوي (D) صورة ثنائية الأبعاد للمستخلص المائي لأوراق نبات السالفيا



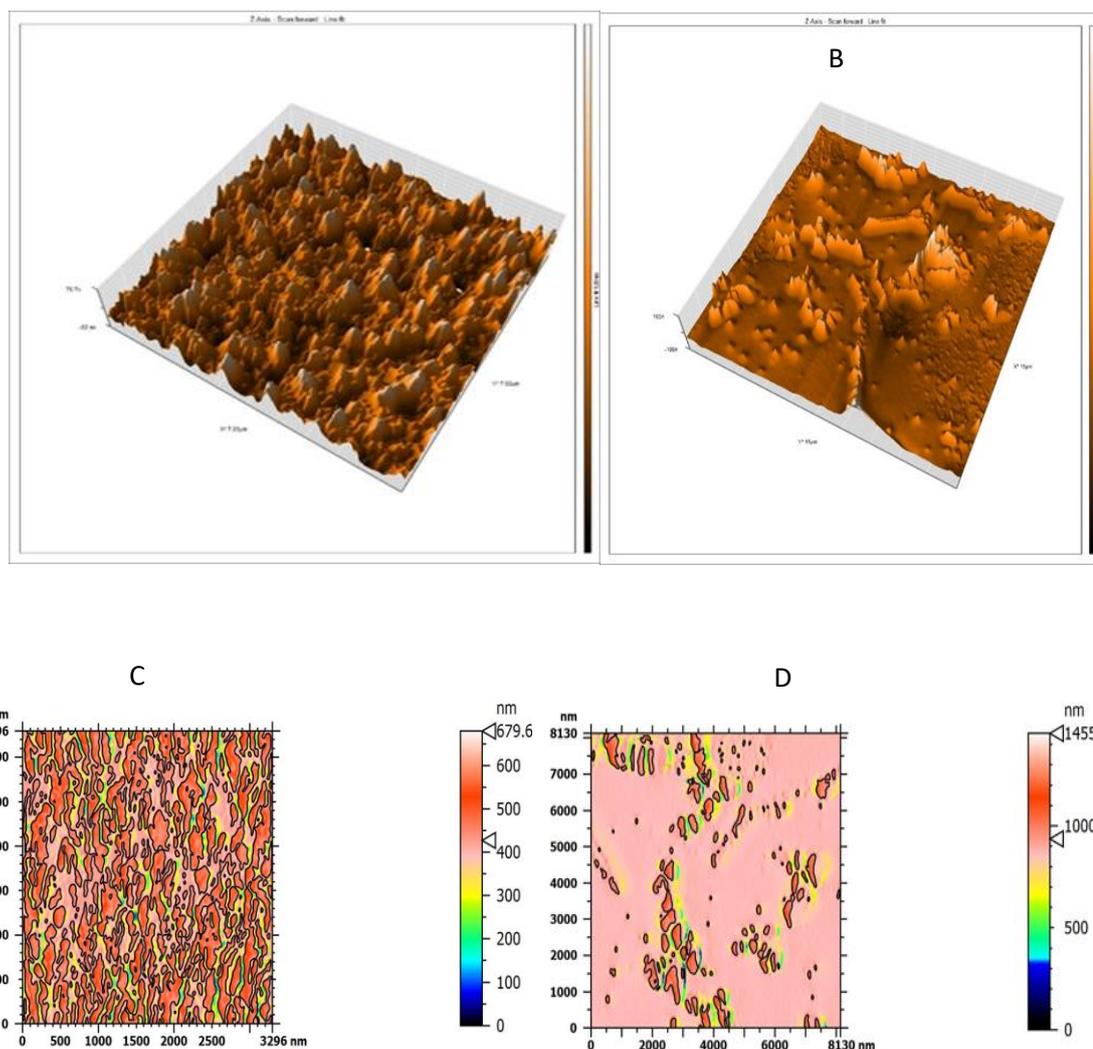
شكل (٤-٨) توزيع النسب المختلفة لحجوم جزيئات

(A) مركب السالفيا النانوي (B) المستخلص المائي لأوراق نبات السالفيا

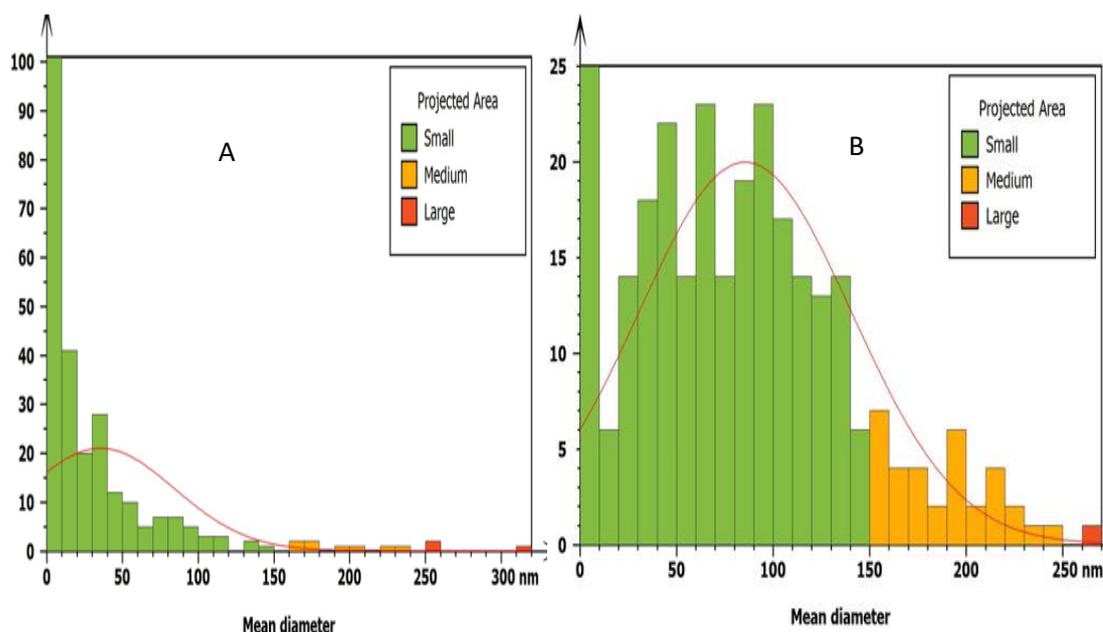
في الشكل (٤-٩) بينت نتائج الدراسة أن للمركب النانوي المحمل بعقار السيبروفلوكساسين معامل الخشونة له ١٥,٢٠ نانومتر، بينما كان معامل الخشونة للمستخلص المحمل بعقار السيبروفلوكساسين ١٨,٥٨ نانومتر وهذا ضروري لضمان تحميل العقار على المركب النانوي بعد تحويل السالفيا الى مركب نانوي (Hussein & Khalaf, 2020) ، كان معدل الجذر التربيعي للمركب النانوي المحمل بعقار السيبروفلوكساسين ١٨,٩٤ بينما كان للمستخلص المحمل بعقار السيبروفلوكساسين ٢٥,٩١ كان الاختلاف في معدل الجذر التربيعي ٦,٩٧ نانومتر وكانت مساحة السطح للمركب النانوي المحمل بعقار السيبروفلوكساسين ٣,٩٦٢٪ بينما مساحة سطح المستخلص المحمل بالعقار ١,٢٥١٪، أظهرت النتائج ان اتجاه الملمس للمركب النانوي المحمل بالعقار ٣,٤٩٠ وان اتجاه ملمس المستخلص المحمل بعقار السيبروفلوسين ١٨٠,٠ بينما كان اقصى ارتفاع للذروة في المركب النانوي المحمل بعقار للسيبروفلوكساسين ٤٧,٢٤ نانومتر وللمستخلص المحمل بالعقار ٦٢,٠٤ وأظهرت النتائج أن أقصى ارتفاع للحفرة في المركب النانوي المحمل بعقار ٣,٩٦٢ السيبروفلوكساسين وبالنسبة للمستخلص المحمل بعقار السيبروفلوكساسين ١,٢٥١ .

بينت نتائج الدراسة الحالية في الشكل (٤-١٠) أن متوسط الحجم الحبيبي للمركب النانوي المحمل بعقار السيبروفلوكساسين *S.officinalis* NPs/CIP كان ٩٢,٢٥ نانومتر، بعد أن كان متوسط الحجم الحبيبي للمستخلص المحمل بعقار السيبروفلوكساسين *S.officinalis* /CIP ١٣٢,٢ نانومتر ، إذ أصبح الفارق ٣٩,٩٥ نانومتر وأثبتت النتائج صغر حجم الجزيئات النانوية وان المساحة السطحية لها اكبر وهذا دليل على نجاح عملية التحضير وهذا يتفق مع (Rafique et al., 2020) ، اذ فسروا ان انخفاض (صغر) الحجم للبلورات النانوية يوفر خصائص فائقة للمواد بالمقياس النانوي غير موجودة في المواد التقليدية حيث ان الحجم الحبيبي الصغير يزيد من عدد الذرات المرتبطة بحدود الحبيبات وكذلك زيادة الواجهات أي زيادة المساحة السطحية نسبة الى الحجم .

كما هو موضح في الجدول (٤-٤) الذي يشير إلى الخصائص الفيزيائية لجسيمات مستخلص السالفيا ومركب السالفيا النانوي قبل وبعد تحميله على العقار



شكل (٩-٤) صور مجهر القوة الذرية (A) صورة ثلاثية الأبعاد لمركب السالفيا النانوي (B) صورة ثلاثية الأبعاد للمستخلص المائي لأوراق نبات السالفيا (C) صورة ثنائية الأبعاد لمركب السالفيا النانوي (D) صورة ثنائية الأبعاد للمستخلص المائي لأوراق نبات السالفيا



شكل (٤-١٠) توزيع النسب المختلفة لحجوم جزيئات

(A) مركب السالفيا النانوي (B) المستخلص المائي لأوراق نبات السالفيا

جدول (٤-٤) الخصائص الفيزيائية للمستخلص المائي لأوراق نبات السالفيا والمركب النانوي الحر والمحمل بالعقار

S. <i>officinalis</i> NPs/cip (nm)	S. <i>officinalis</i> /cip (nm)	S. <i>officinalis</i> /NPs (nm)	S. <i>officinalis</i> (nm)	الخصائص الفيزيائية للمستخلص المائي لأوراق نبات السالفيا والمركب النانوي الحر والمحمل بالعقار
15.20	18.58	3.698	6.732	متوسط الارتفاع الحسابي (Sa) Arithmetical mean height

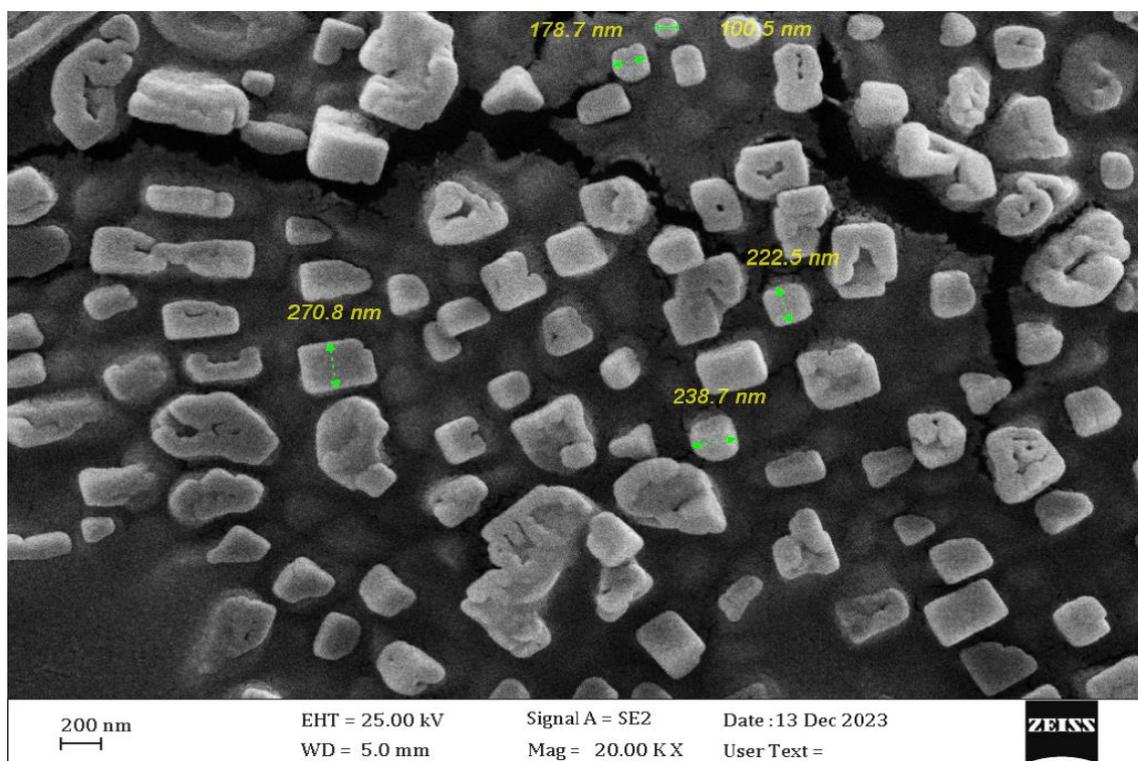
18.94	25.91	4.534	9.461	مربع جذر متوسط الارتفاع (Sq) Root mean square height
3.490	180.0	0.002567	180.0	اتجاه الملمس (Std) Texture direction
70.53	125.3	16.39	44.58	ذروة اقصى ارتفاع (Sp) Maximum peak height
47.24	62.04	12.45	70.10	اقصى ارتفاع للحفرة (Sv) Maximum pit height
3.962%	1.251%	0.6174%	0.7983%	نسبة المساحة البينية المطورة (Sdr) Developed interfacial area ratio
92.25	132.2	35.42	85.49	Mean size

٤-٤-٣ المجهر الإلكتروني الماسح (SEM)

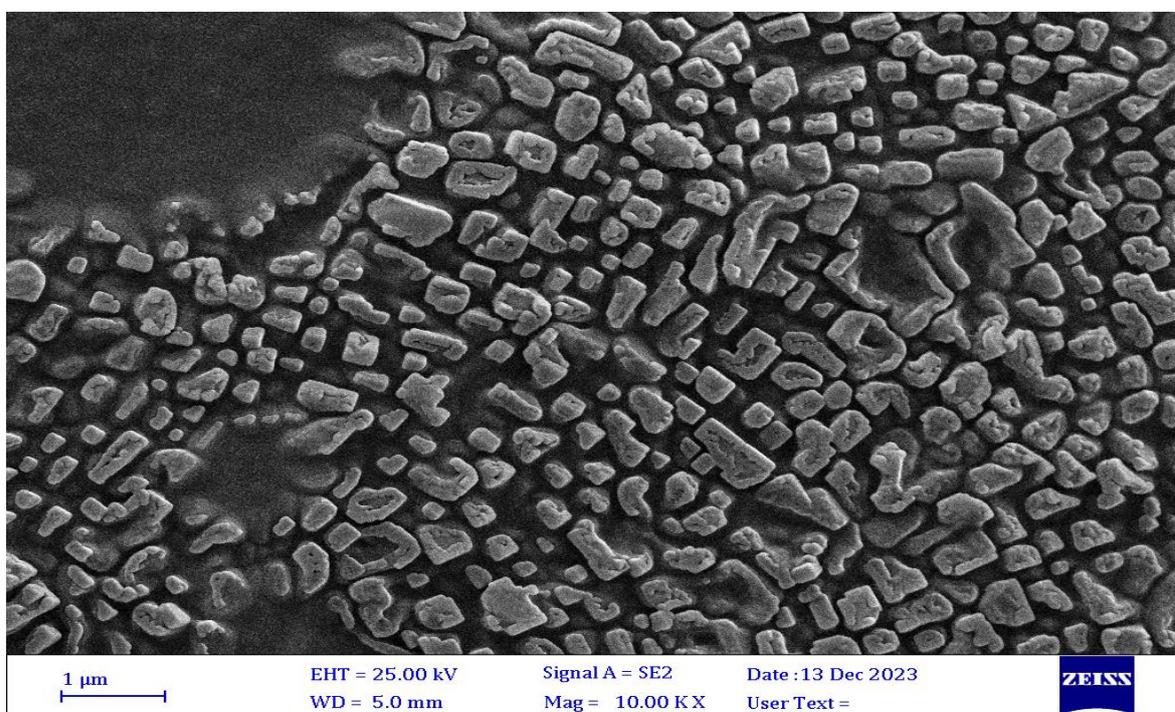
تستخدم هذه التقنية لمعرفة شكل وحجم الجزيئات النانوية أظهرت نتائج الفحص لمركب السالفيا النانوي تجانس وتوزيع جيد وسيادة الشكل المكعب اذ تراوحت احجام الحبيبات بين (١٠٠,٥-٢٧٠,٨) نانومتر كما في الشكل (٤-١١).

بينما كانت نتائج فحص SEM للمستخلص المائي لأوراق نبات السالفيا اشكال غير منتظمة مع تجمعات ووجود بعض الجزيئات الصغيرة التي تمتلك الشكل الكروي وتراوحت احجام الجزيئات بين (٦٦,٤٤-٧٢,٥٧) نانومتر، وأبرز النتائج من الدراسات السابقة يؤكد أن الجسيمات النانوية الكروية الشكل أكثر فعالية من الجسيمات النانوية الشبيهة بالقضبان أو ذات الشكل السداسي وأن النشاط البيولوجي

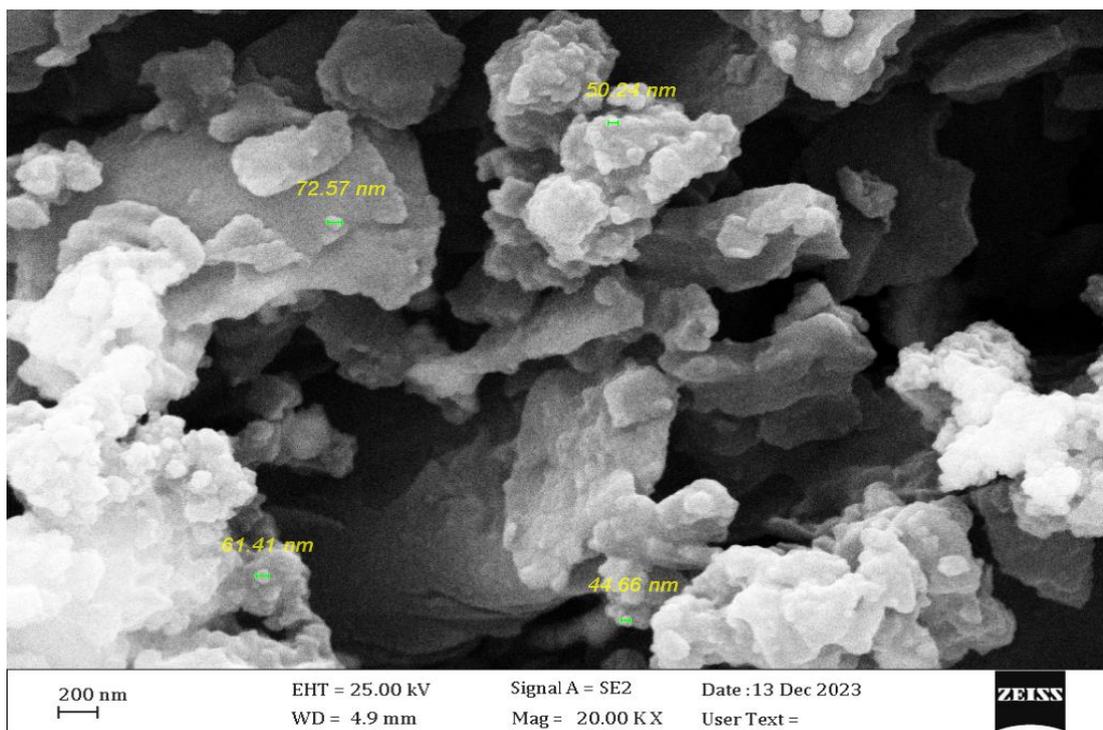
في AgNPs يعتمد في الغالب على حجمها ومساحتها السطحية، الجسيمات النانوية الأصغر لها مساحة سطحية أكبر من الجسيمات النانوية الكبيرة الحجم (Okaiyeto *et al.*, 2021)



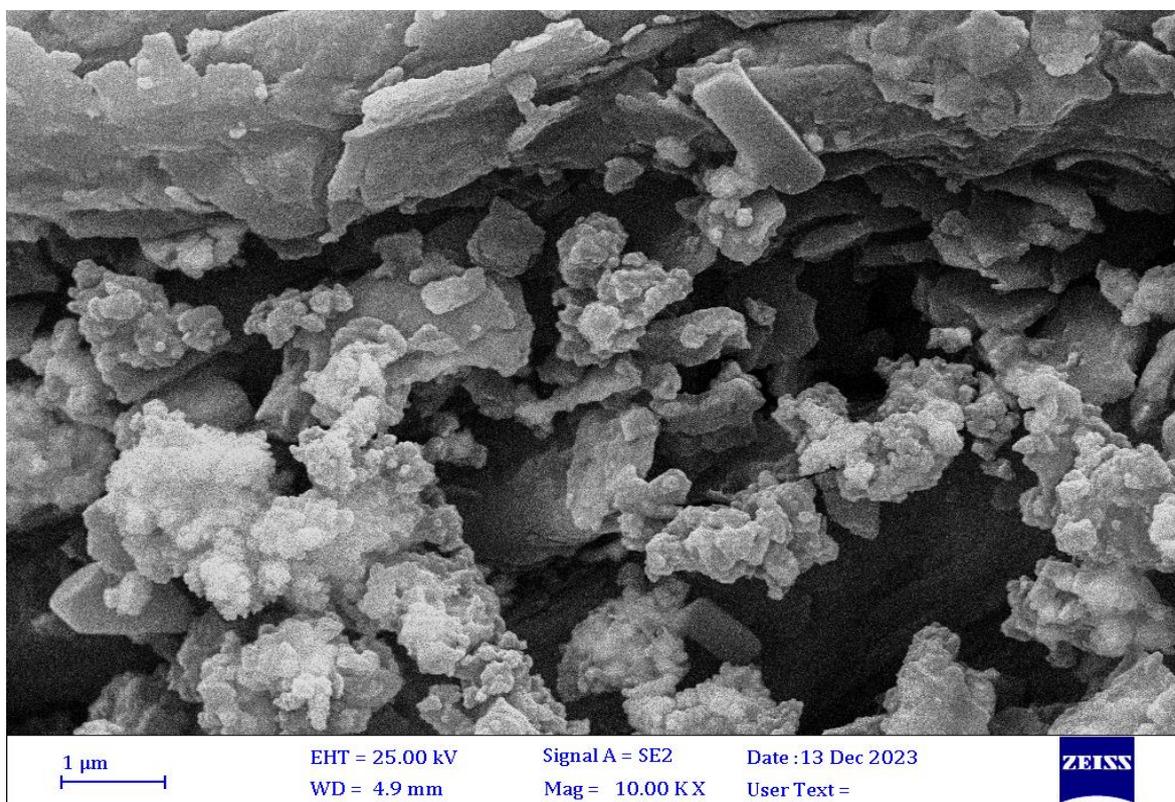
شكل (٤- ١١) صورة المجهر الإلكتروني الماسح لمركب السالفيا النانوي



شكل (٤- ١٢) صورة المجهر الإلكتروني الماسح لمركب السالفيا النانوي



شكل (٤- ١٣) صورة المجهر الإلكتروني الماسح للمستخلص المائي لأوراق نبات السالفيا



شكل (٤- ١٤) صورة المجهر الإلكتروني الماسح للمستخلص المائي لأوراق نبات السالفيا

٥-٤ نسب مقاومة بكتريا *Klebsiella pneumoniae* ، *Pseudomonas aeruginosa* للمضادات الحيوية :

أظهرت النتائج نسب المقاومة للمضادات الحيوية كما يلي :

١-٥-٤ نسب مقاومة المضادات الحيوية لبكتريا *Klebsiella pneumoniae* المعزولة من الجروح والحروق.

بينت نتائج الدراسة الحالية نسب توزيع مقاومة الأنواع الأكثر انتشارا *K.pneumoniae* في مرضى الجروح والحروق أذ أظهرت مستويات عالية من المقاومة للعديد من المضادات الحيوية كما في الجدول (٥-٤) ، (٦-٤) وهذا يدل على أن *K.pneumoniae* من السلالات ذات المقاومة للأدوية المتعددة .

لقد أتفقت نتائج هذه الدراسة مع (Perween et al., 2015) ، التي أوضحت بأن البكتيريا سالبة الجرام هي أكثر البكتيريا المسببة لعدوى جروح الحروق. كانت العزلات سلبية الجرام أكثر بخمس مرات من مسببات الأمراض إيجابية الجرام، وأن بكتريا *K.pneumoniae* أظهرت مقاومة للسيروفلوكساسين والجنتاميسين بنسبة (100%)، وان المقاومة تزداد بمرور الوقت . وكذلك أتفقت مع (Tchakal- Mesbahi et al., 2021) ، ذكرت أن معظم الكائنات الحية المسببة للعدوى في مرضى الحروق كانت شديدة المقاومة للمضادات الحيوية المستخدمة بشكل روتيني .

جدول (٥-٤) نسب مقاومة المضادات الحيوية لبكتريا *K. pneumoniae* المعزولة من الجروح .

%	NO	S/ 43	S/3	S/1 5	S/1 3	S/1 0	S/ 6	S/ 5	S/ 3	S / 1	Antimicrobial
100	9	R	R	R	R	R	R	R	R	R	Ticarcillin
100	9	R	R	R	R	R	R	R	R	R	Ticarcillin/clavulanic acid
88.9	8		R	R	R	R	R	R	R	R	Piperacillin
100	9	R	R	R	R	R	R	R	R	R	Piperacillin/ Tazobactam
100	9	R	R	R	R	R	R	R	R	R	Ceftazidime
66.6	6	s	R			R	R	R	R	R	Cefepime
100	9	R	R	R	R	R	R	R	R	R	Aztreonam
77.7	7	S	R	S	R	R	R	R	R	R	Imipenem

100	9	R	R	R	R	R	R	R	R	R	Meropenem
77.7	7	S	R	R	R	R	R	S	R	R	Amikacin
88.8	8	R	R	R	R	R	R	S	R	R	Gentamicin
88.8	8	R	R	R	R	R	R	S	R	R	Tobramycin
100	9	R	R	R	R	R	R	R	R	R	Ciprofloxacin
											Pefloxacin
88.8	8	R	R	R	R	R	R	S	R	R	Minocycline
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Colistin
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Rifampicin
77.7	7	R	R	R	R	R	R	R	S	S	Trimethoprim/sulfamethoxazole

s* تعني جراحة

R* مقاومة للمضادات الحيوية

* S تعني حساسية للمضادات الحيوية ، الأرقام ١، ٣، ٥، ٦، ... أرقام العزلات

جدول (٤-٦) نسب مقاومة المضادات الحيوية لبكتريا *K. pneumoniae* المعزولة من الحروق .

%	NO	B/25	B/23	B/19	B/2	Antimicrobial
100	4	R	R	R	R	Ticarcillin
100	4	R	R	R	R	Ticarcillin/clavulanic acid
100	4	R	R	R	R	Piperacillin
100	4	R	R	R	R	Piperacillin/tazobactam
100	4	R	R	R	R	Ceftazidime
-	-	-	-	-	-	Cefepime
100	4	R	R	R	R	Aztreonam
100	4	R	R	R	R	Imipenem
100	4	R	R	R	R	Meropenem
50	2	S	R	R	S	Amikacin
50	2	S	R	R	S	Gentamicin
50	2	s	R	R	S	Tobramycin
100	4	R	R	R	R	Ciprofloxacin
-	-	-	-	-	-	Pefloxacin
100	4	R	R	R	R	Minocycline
-	-	-	-	-	-	Colistin
-	-	-	-	-	-	Rifampicin

100	4	R	R	R	R	trimethoprim/sulfamethoxazole
-----	---	---	---	---	---	-------------------------------

* B تعني حروق Burns * R تعني مقاومة للمضادات الحيوية

* S تعني حساسة للمضادات الحيوية ، الأرقام ١، ٣، ٥، ٦، ... أرقام العزلات

٤-٥-٢ نسب مقاومة المضادات الحيوية لبكتريا *P.aeruginosa* المعزولة من الحروق والجروح.

بينت نتائج الدراسة الحالية نسب توزيع مقاومة الأنواع الأكثر انتشارا *P.aeruginosa* في مرضى الجروح والحروق أذ أظهرت مستويات عالية من المقاومة للعديد من المضادات الحيوية كما في الجدول (٤-٧) ، (٤-٨) وهذا يدل على أن *P.aeruginosa* من السلالات ذات المقاومة للأدوية المتعددة .

أُتفقت نتائج هذه الدراسة مع (Rashid Mahmood & Mansour Hussein, 2022) ، تتوسط مقاومة المضادات الحيوية مضخات التدفق، وهي آليات نشطة لنقل المضادات الحيوية خارج الخلية البكتيرية، يتم دعم المقاومة بواسطة مضخة التدفق الأهم المعروفة باسم MexAB-OprM يؤدي تنظيم نظام مضخة التدفق MexAB-OprM إلى تقليل الكينولون والبنسلين المضاد لبكتريا *P.aeruginosa* والحساسية للسيفالوسبورين ، يرتبط تنظيم مضخة التدفق بتنظيم بروتينات الغشاء الخارجي، يحفز موقع معين mexA ، و mexB و OprK مقاومة البيتا لاكتام، والتتراسيكلين كينولونات، والكلورامفينيكول عن طريق تدفق الدواء ويمكن دعم هذه العملية المعتمدة على الطاقة بواسطة بروتينات الغشاء الخارجي .

أظهرت الدراسات الحديثة أن عزلات *P. aeruginosa* تلعب بعض هياكل التدفق المشفرة بالكروموسومات وأغشية الغشاء الخارجي أدوارًا حيوية في مقاومة النمط الظاهري MDR. في النوع البري من عزلات *P. aeruginosa*، يتم نقل مضخة MexAB-OprM بمستوى عالٍ كافٍ لتنشيط MDR المتأصل. يحدث الإفراط في التعبير عن مضخة التدفق MexAB-OprM بسبب طفرات في جين mexR)، وكذلك أُتفقت مع (Hasan et al., 2019) ، وكذلك أُتفقت مع (Japoni et al., 2006) ، تحدث مقاومة *P. aeruginosa* للعديد من العوامل المضادة للميكروبات بشكل رئيسي نتيجة للتأزر بين نفاذية الغشاء الخارجي المنخفضة ونظام تدفق الأدوية المتعددة والنوع ١ AmpC β -lactamase، إن حقيقة اكتشاف البيتا لاكتاماز المحفز في ٧٣٪ من العزلات التي كانت حساسة للسيفتازيديم تشير إلى أن المقاومة قد تظهر أثناء العلاج عن طريق حدوث الطفرات بسبب الانزيم المحفز.

جدول (٧-٤) نسب مقاومة المضادات الحيوية لبكتريا *p.aeruginosa* المعزولة من الجروح .

%	NO	S/42	S/22	S/12	S/14	Antimicrobial
100	4	R	R	R	R	Ticarcillin
100	4	R	R	R	R	Ticarcillin/clavulanic acid
100	4	R	R	R	R	Piperacillin
100	4	R	R	R	R	Piperacillin/ tazobactam
100	4	R	R	R	R	Ceftazidime
50	2	-	-	R	R	Cefepime
-	-	-	-	-	-	Aztreonam
100	4	R	R	R	R	Imipenem
100	4	R	R	R	R	Meropenem
100	4	R	R	R	R	Amikacin
100	4	R	R	R	R	Gentamicin
50	2			R	R	Tobramycin
100	4	R	R	R	R	Ciprofloxacin
-	-	-	-	-	-	Pefloxacin
-	-	-	-	-	-	Minocycline
25	1			R	S	Colistin
-	-	-	-	-	-	Rifampicin
-	-	-	-	-	-	trimethoprim/sulfamethoxazole

*s تعني جراحة surgery ، *R تعني مقاومة للمضادات الحيوية ، *S تعني حساسة للمضادات الحيوية

جدول (٨-٤) نسب مقاومة المضادات الحيوية لبكتريا *P.aeruginosa* المعزولة من الحروق .

%	NO	B/29	B/28	B/17	B/16	Antimicrobial
100	4	R	R	R	R	Ticarcillin
100	4	R	R	R	R	Ticarcillin/clavulanic acid
100	4	R	R	R	R	Piperacillin
100	4	R	R	R	R	Ceftazidime
50	2	-	-	R	R	Cefepime
25	1	R	-	-	-	Aztreonam
100	4	R	R	R	R	Imipenem
100	4	R	R	R	R	Meropenem
100	4	R	R	R	R	Amikacin
100	4	R	R	R	R	Gentamicin
100	4	R	R	R	R	Ciprofloxacin

100	4	R	R	R	R	Tobramycin
-	-	-	-	-	-	Pefloxacin
-	-	-	-	-	-	Minocycline
25	1	R	S	S	S	Colistin
-	-	-	-	-	-	Rifampicin
-	-	-	-	-	-	trimethoprim/sulfamethoxazole

* B تعني حروق Burns * R تعني مقاومة للمضادات الحيوية

* S تعني حساسة للمضادات الحيوية ، الأرقام ١٦، ١٧، ٢٨، ٢٩، ... أرقام العزلات

٤-٦ التأثير التثبيطي لمستخلص السالفيا ومركب السالفيا النانوي قبل وبعد تحميل المضاد

الحيوي ciprofloxacin على بكتريا *K.pneumonia*، *P.aeruginosa*.

اظهر الجدول (٩-٤) (١٠-٤) قيم أقطار التثبيط لكل من مستخلص السالفيا الحر، مركب السالفيا النانوي الحر والمضاد الحيوي CIP الحر، مستخلص السالفيا المحمل بالمضاد الحيوي والمركب السالفيا النانوي المحمل بالمضاد الحيوي ودراسة الفرق في التأثير التثبيطي بالشكل الحر والشكل التآزري بين المستخلص والمركب النانوي والمضاد الحيوي تجاه بكتريا السالبة الكرام *P. K. Pneumonia*، *aeruginosa*.

٤-٦-١ التأثير التثبيطي لمستخلص السالفيا ومركب السالفيا النانوي قبل وبعد تحميل المضاد

الحيوي ciprofloxacin على بكتريا، *K.pneumonia*

ان معاملة الوسط الزرعي ا لخاص ببكتريا *K.pneumoniae* بالمضاد الحيوي الحر (T1) CIP بتركيز (8,4,2) μ g/ ml ، سجل معدل تثبيط بمقدار (0.35 \pm 0.83) ، إذ لم تظهر مناطق تثبيط واضحة للمضاد الحيوي في جميع التراكيز لأن بكتريا *K.pneumoniae* مقاومة للمضاد الحيوي CIP ، وان معاملة بكتريا *K.pneumonia* بالمعاملة الثانية T2 المستخلص المائي لأوراق نبات السالفيا *S.officinalis* بتركيز (16,8,4) μ g/ ml ، سجل معدل تثبيط بمقدار (0.22 \pm 0.86) ، نلاحظ أن T1 ، T2 لم تسجل فروق معنوية (p<0.05) .

وان التأثير المضاد للميكروبات والأنشطة البيولوجية الأخرى التي يقدمها نبات *S. officinalis* يرجع ذلك إلى وجود العديد من المركبات النشطة بيولوجيا في هذا النبات، ومن أهم هذه الجزيئات α -thujone (34.7%), camphor (23.5%), 1,8-cineole (11.5%), carvacrol (7.4%)

(Rafael De Oliveira *et al.*, 2019) ، والفينولات والفلافونويدات وهذه المركبات لها القدرة على التخلص من الجذور الحرة وقد ثبت ان مستخلص نبات *S. officinalis* مضاد للأكسدة والبكتريا بسبب ثرائه بالفلافونويدات (Grzegorzczuk *et al.*, 2007) ، ومعاملة البكتريا بالمعاملة الثالثة T3 المركب النانوي *S.officinalis/NPs* بتركيز (16,8,4) $\mu\text{g/ml}$ سجل معدل تثبيط بمقدار (0.28 \pm 0.83) نلاحظ عدم وجود فروق معنوية ($p < 0.05$) .

ان جزئيات الفضة النانوية تمتلك العديد من الاليات الرئيسية ضد الكائنات الحية الدقيقة ، فعندما تتصل AgNPs بسطح الخلية البكتيرية سالب الشحنة سوف تغيير الخصائص الهيكلية والكيميائية لأغشية الخلايا وجدار الخلية وتعطل وظائف مهمة مثل التناضح والنفاذية والتنفس ونقل الالكترون (Nel *et al.*, 2009) ، ويمكن للجسيمات النانوية ان تسبب المزيد من الضرر للخلايا البكتيرية عن طريق اختراق الخلية والارتباط مع DNA والبروتينات وغيرها من مكونات الخلية التي تحتوي على الفسفور والكبريت (Marambio-Jones & Hoek, 2010) .

المعاملة الرابعة المستخلص المائي لأوراق نبات *S.officinalis* محمل بالمضاد الحيوي CIP بتركيز (4+8,2+4,1+2) $\mu\text{g/ml}$, سجل معدل تثبيط بمقدار (3.50 \pm 14.44) ، وضحت النتائج وجود فروق معنوية ($p < 0.05$) ، والمعاملة الخامسة المركب النانوي محمل بالمضاد الحيوي *S.officinalisNPs/CIP* بتركيز (4 + 8,2 + 4 , 1+2) $\mu\text{g/ml}$ ، سجل معدل تثبيط بمقدار (1.41 \pm 14.33) ، والنتائج الإحصائية تدل على وجود فرق معنوي ($p < 0.05$) ، يلاحظ من خلال الجدول (٤-٩) وجود فروقات بين المعاملات المستخدمة وكانت أقوى معاملة من حيث مناطق التثبيط T5 تليها في القوة المعاملة T4 أما فيما يخص داخل المعاملات ودلالة الفروقات بين التراكيز المختلفة لكل معاملة فلم يظهر التحليل الإحصائي فروقات ذات دلالة إحصائية بين التراكيز المستخدمة لكل معاملة.

٤-٦-٢ التأثير التثبيطي لمستخلص السالفيا ومركب السالفيا النانوي قبل وبعد تحميل المضاد

الحيوي ciprofloxacin على بكتريا *P.aeruginosa*

ان معاملة الوسط الزرعي الخاص ببكتريا *P. aeruginosa* T1 للمعاملة الأولى المضاد الحيوي CIP بتركيز (8,4,2) $\mu\text{g/ml}$ ، سجل معدل تثبيط بمقدار (0.49 \pm 0.64) ، أذ لم تظهر مناطق تثبيط واضحة للمضاد الحيوي في جميع التراكيز لأن بكتريا *P. aeruginosa* مقاومة للمضاد الحيوي CIP ومن تحليل النتائج احصائيا نلاحظ لا توجد فروق معنوية ($p < 0.05$) ، كما في الجدول (٤-١٠) .

وان معاملة بكتريا *P. aeruginosa* بالمعاملة الثانية T2 المستخلص المائي لأوراق نبات السالفيا *S.* بتركيز (16,8,4) $\mu\text{g/ml}$ ، سجل معدل تثبيط بمقدار (0.89 ± 0.18) ، ومعاملة البكتريا بالمعاملة الثالثة T3 المركب النانوي *S./NPs* بتركيز (16,8,4) $\mu\text{g/ml}$ ، سجل معدل تثبيط بمقدار (0.69 ± 0.43) ، نلاحظ أن T1 ، T2 ، T3 لم تسجل فروق معنوية ($p < 0.05$).

وان معاملة الوسط الزراعي الخاص ببكتريا *P. aeruginosa* بالمعاملة الرابعة T4 المستخلص المائي لأوراق نبات *S.* محمل بالمضاد الحيوي بتركيز (4+8,2+4,1+2) $\mu\text{g/ml}$ ، سجل معدل تثبيط بمقدار (1.92 ± 12.78) ، وضحت النتائج وجود فروق معنوية ($p < 0.05$) ، اما عند المعاملة الخامسة T5 المركب النانوي محمل بالمضاد الحيوي *S.NPs/CIP* ، سجل معدل تثبيط بمقدار 0.88 (± 13.44) ، بينت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية ($p < 0.05$).

وأن مناطق التثبيط ظهرت واضحة عند المعاملتين T4, T5 المستخلص المائي لأوراق نبات *S officinalis* محمل بالمضاد الحيوي والمركب النانوي محمل بالمضاد الحيوي حيث أنتجت المعاملتين تأثيرا تازريا ضد مسببات الامراض المقاومة وذلك لان عندما ترتبط AgNPs بالمضادات الحيوية فإن ثباتها ووظائفها وانتقائها يصبح أقوى ونقلها للدواء يكون بشكل محدد للغاية (Kingsley et al., 2006) ، وان AgNPs المقترنة بالمضادات الحيوية تظهر نشاط تثبيطي اكبر مما لو كانت منفردة وأظهرت النتائج أن AgNPs المرافقة للمضاد الحيوي مثل gentamycin, tetracycline, ciprofloxacin, chloramphenicol تستهدف بشكل فعال البكتريا المتعددة المقاومة مثل *K. pneumoniae* . تظهر مناطق تثبيط اكثر وضوحا مما لو كانت المضادات الحيوية منفصلة وأن العديد من الدراسات أفادت أن AgNPs التي تشارك الجزئيات الحيوية في عملها تمتلك اكثر فعالية مضادة مقارنة بـ AgNPs بالشكل المنفرد (Wahab et al., 2021).

تظهر البكتريا سالبة الكرام مناطق تثبيط أكبر مقارنة بالبكتريا موجبة الكرام وهذا يرجع بسبب الاختلاف في تكوين الجدار الخلوي cell wall وان جدار الخلية البكتيرية موجبة الكرام يتكون من طبقة سميكة من peptidoglycan والتي تمتلك سلاسل من السكريات المتعددة الخطية والتي ترتبط بالبيبتيدات القصيرة وبالتالي خلق بنية أكثر شدة مما يؤدي إلى اختراق ضعيف لجسيمات الفضة النانوية بينما في البكتيريا سالبة الجرام يمتلك جدار الخلية طبقة رقيقة من peptidoglycan (Pasquina-Lemonche et al., 2020).

وبينت نتائج دراستنا الحالية أن جسيمات الفضة النانوية الحيوية أظهرت أعلى كفاءة تازريه مع المضاد الحيوي سيبروفلوكساسين ضد سلالة بكتريا المقاومة للأدوية المتعددة *K. pneumoniae* في

المعاملة الخامسة سجلت (1.41 ± 14.33) أما في بكتريا *P. aeruginosa* (0.88 ± 13.44) ، وهذا يدل على ان بكتريا *P. aeruginosa* أقل حساسية للمضاد الحيوي السيبروفلوكساسين.

جدول رقم (٤-٩) أقطار التثبيط للمضاد الحيوي ciprofloxacin ومستخلص السالفيا الحر والمركب النانوي الحر والمستخلص محمل بالمضاد الحيوي والمركب النانوي محمل بالمضاد الحيوي على بكتريا *K.Pneumonia*

LSD	S.D ± Mean	التركيز µg/ml	المعاملات
n.s	0.00 ± 1.00	8 C1	T1 المضاد الحيوي CIP
	0.58 ± 0.67	4 C2	
	0.29 ± 0.83	2 C3	
	Total		
n.s	0.29 ± 0.83	16 C1	T2 المستخلص المائي لاوراق السالفيا
	0.29 ± 0.83	8 C2	
	0.14 ± 0.92	4 C3	
	Total		
n.s	0.14 ± 0.92	16 C1	T3 المركب النانوي
	0.43 ± 0.75	8 C2	
	0.29 ± 0.83	4 C3	
	Total		
n.s	4.04 ± 16.67	4 +8 C1	T4 المستخلص محمل بالمضاد الحيوي
	2.31 ± 15.67	2+ 4 C2	
	0.00 ± 11.00	1+2 C3	
	Total		
1.21	1.15 ± 15.67	4+8 C1	T5 المركب النانوي محمل بالمضاد الحيوي
	1.15 ± 14.33	2+4 C2	
	0.00 ± 13.00	1+2 C3	
	Total		
1.20	0.35 ± 0.83	T1	Total
	0.22 ± 0.86	T2	
	0.28 ± 0.83	T3	
	3.50 ± 14.44	T4	
	1.41 ± 14.33	T5	

	Total	
	0.93	قيمة LSD

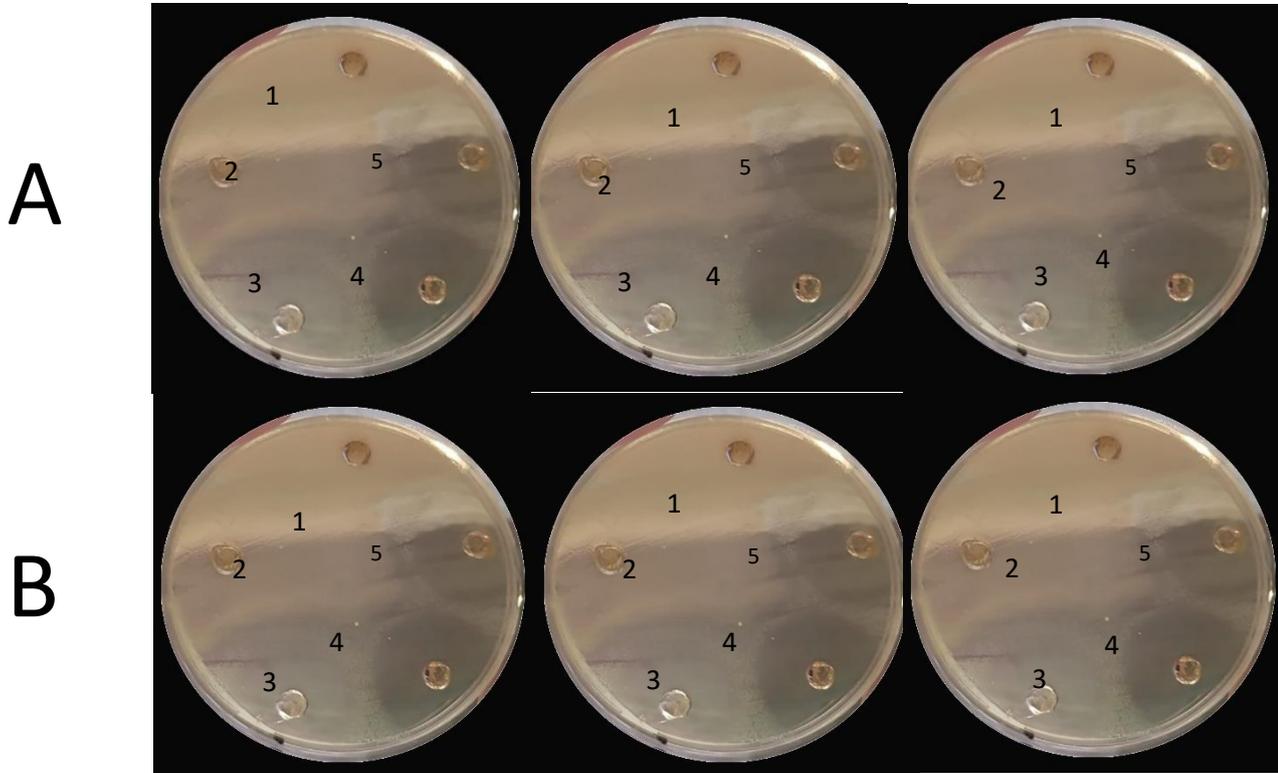
n.s* تعني غير دالة إحصائياً

جدول رقم (٤-١٠) أقطار التثبيط للمضاد الحيوي ciprofloxacin ومستخلص السالفيا الحر والمركب النانوي الحر والمستخلص محمل بالمضاد الحيوي والمركب النانوي محمل بالمضاد الحيوي على بكتريا *P.aeurginosa*

LSD	S.D ± Mean	التركيز µg/ml	المعاملات
n.s	0.14 ± 0.92	8 C1	T1 المضاد الحيوي CIP
	0.58 ± 0.33	4 C2	
	0.58 ± 0.67	2 C3	
	Total		
n.s	0.14 ± 0.92	16 C1	T2 المستخلص المائي لأوراق السالفيا
	0.29 ± 0.83	8 C2	
	0.14 ± 0.92	4 C3	
	Total		
n.s	0.25 ± 0.75	16 C1	T3 المركب النانوي
	0.58 ± 0.67	8 C2	
	0.58 ± 0.67	4 C3	
	Total		
n.s	1.15 ± 14.33	4+8 C1	T4 المستخلص محمل بالمضاد الحيوي
	2.52 ± 12.33	2+4 C2	
	1.15 ± 11.67	1+2 C3	
	Total		
n.s	1.15 ± 13.67	4+8 C1	T5 المركب النانوي محمل بالمضاد الحيوي
	1.15 ± 13.67	2+4 C2	
	0.00 ± 13.00	1+2 C3	
	Total		
0.87	0.49 ± 0.64	T1	Total
	0.18 ± 0.89	T2	
	0.43 ± 0.69	T3	
	1.92 ± 12.78	T4	
	0.88 ± 13.44	T5	
	Total		

n.s	LSD قيمة
-----	----------

n.s* تعني غير دالة إحصائيا

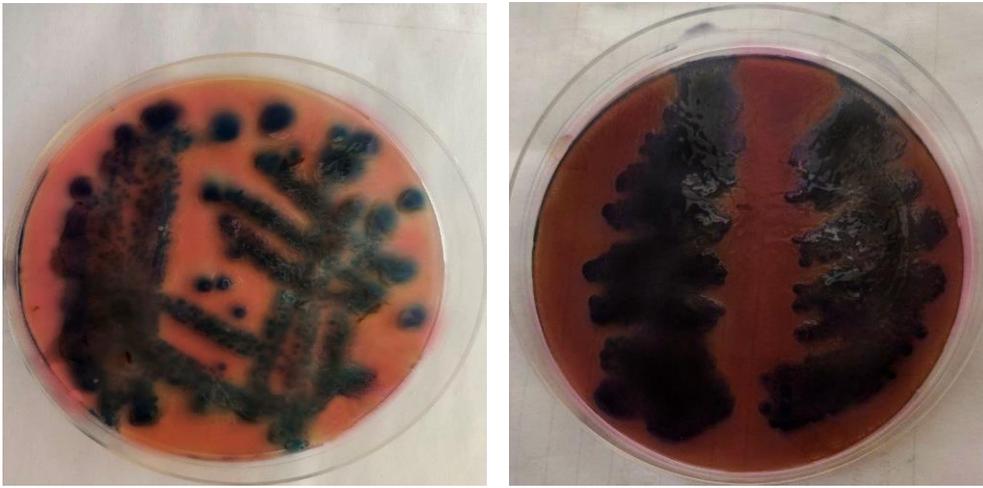


شكل (٤- ١٥) التأثير التثبيتي (A) على بكتريا *K. Pneumoniae* ، (B) على بكتريا *P. aeruginosa*

٧-٤ تكوين الأغشية الحيوية Biofilm formation

١-٧-٤ طريقة آكار الكونغو الأحمر Congo red agar method

أظهرت النتائج أن العزلات لها القابلية على تكوين الأغشية الحيوية، من خلال ملاحظة لون وملس المستعمرات التي تشكلها بكتريا *K. pneumoniae* على أجار الكونغو الأحمر وبكتريا *P. aeruginosa*، صنفت قدرة الأحياء الدقيقة على تكوين الأغشية الحيوية إلى ثلاث مجاميع رئيسية: ذو الأغشية الحيوية القوية strong والمعتدلة moderate والضعيفة كما في الشكل (١٦-٤).



A

B

شكل (١٦-٤) تكوين الأغشية الحيوية بواسطة Congo red agar (A) *K.pneumoniae* ، (B)

P.aeruginosa

اذ لوحظ ان البكتيريا المكونة للأغشية الحيوية القوية عادةً ذات مستعمرات سوداء ذات قوام بلوري جاف على أجار الكونغو الأحمر، يشير اللون الأسود إلى وجود مصفوفة أغشية حيوية قوية الانتشار في الطبق، من جانب اخر اظهرت البكتيريا التي تشكل الأغشية الحيوية بشكل معتدل مستعمرات وردية إلى حمراء على أجار الكونغو الأحمر. وقد تظهر هذه المستعمرات درجة معينة من الاتساق المخاطي، مما يشير إلى مستوى معتدل من تكوين الأغشية الحيوية واخيرا كانت البكتيريا المكونة للأغشية الحيوية لضعيفة مستعمرات ذات لون غير متميز أو شاحب على أجار الكونغو الأحمر حيث تفتقر هذه

المستعمرات إلى القوام البلوري الجاف أو المخاطي المميز المرتبط ببكتيريا الأغشية الحيوية القوية والمعتدلة (Vuotto *et al.*, 2017) (Rewatkar & Wadher, 2013)

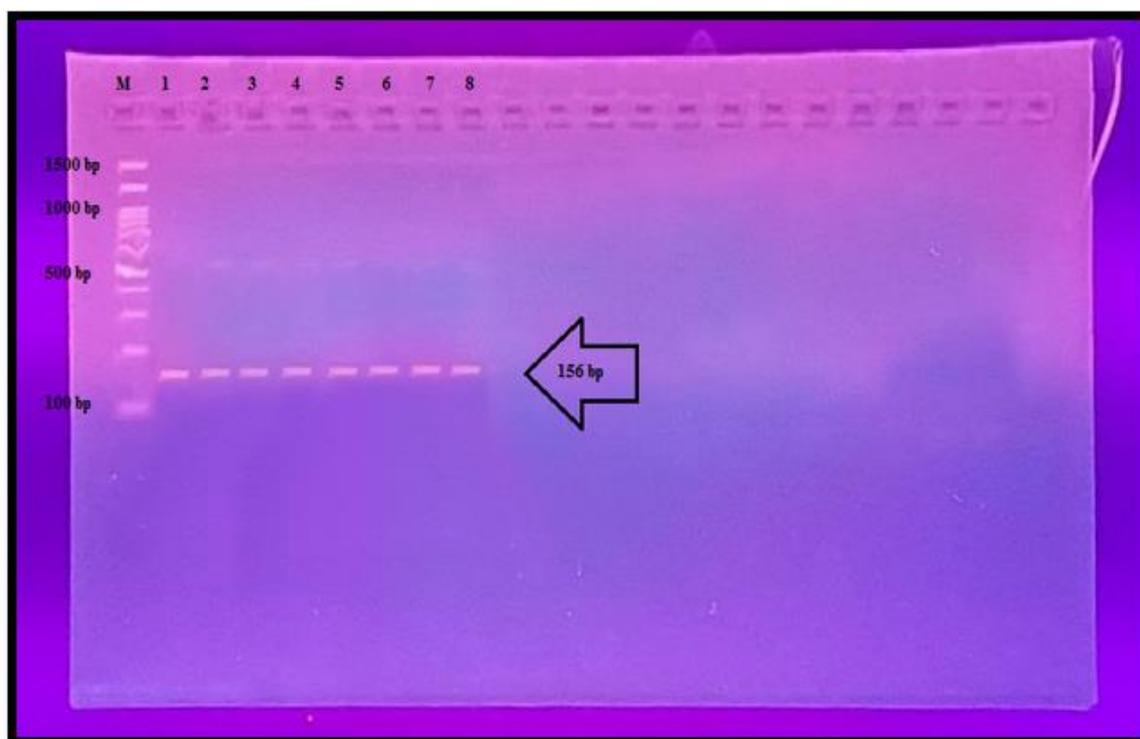
٤-٨ تفاعل البلمرة المتسلسل للكشف عن جين *pgaA* في *K. Pneumoniae*

Polymerase chain reaction for *pgaA* gene detection in *k. Pneumoniae*

في هذه الدراسة تم استخلاص الحامض النووي DNA من مجموعة من العزلات لبكتيريا *Klebsiella pneumoniae* ، وأظهرت النتائج ان جميع العزلات لبكتيريا *K. pneumoniae* تحتوي على جين *pgaA* المرتبط باستشعار النصاب (QS) في بكتيريا *K. pneumoniae* .

أظهرت نتائج الدراسة الحالية ان جميع عزلات *K.Pneumoniae* في دراستنا قادرة على إنتاج الأغشية الحيوية بنسبة (100%) كما في الشكل (٤-١٧)، وأظهرت هذه العزلات مستويات عالية من مقاومة المضادات الحيوية بنسبة (100%)، وأن نتائج الدراسة الحالية تتفق مع (Chen *et al.*, 2014) الذي وجد ان جميع عزلات *K. Pneumoniae* تمتلك نمط مقاومة المضادات الحيوية ولها القدرة على توزيع جين *pgaA* المسؤول عن إنتاج الاغشية الحيوية في العزلات ، أذ يقوم *pgaABCD* بتشفير آلية Pga الممتدة على الغلاف لتخليق وإفراز N-acetylglucosamine المرتبط بـ (PNAG) β -poly. ، ثبت أن المركب مسؤول عن تكوين الأغشية الحيوية وكان له دور في تفاعلات البكتيريا المضيئة. إن وجود موضع *pgaABCD* المحفوظ بين سلالات *K. Pneumoniae* المختلفة يشير إلى أهمية وجود مركب PNAG لهذه البكتيريا.

وأيضاً اتفقت مع (Makhrmash *et al.*, 2022) ، الذين وضحوا بان جميع عزلات بكتيريا *K.Pneumoniae* قادرة على تكوين الاغشية الحيوية بنسبة 100% .



الشكل (٤-١٧): الترحيل الكهربائي لجين *pgaA* في عزلات *M. K. Pneumoniae*: علامة الحمض النووي؛ (1-8) منتجات PCR موجبة ، 1 56 pb نقطة أساس للكشف عن جين *pgaA* في بكتريا *K. Pneumoniae* .

٤-٩ تفاعل البلمرة المتسلسل للكشف عن جين *Psla* في *P. aeruginosa*

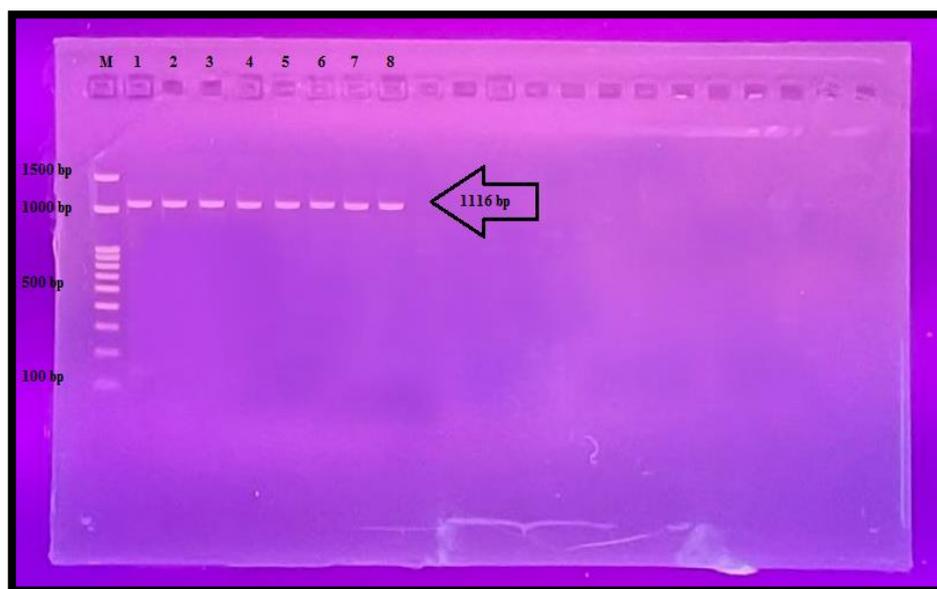
Polymerase chain reaction for *Psla* gene detection in *P. aeruginosa*

في هذه الدراسة، تم استخلاص الحمض النووي الكلي من مجموعة من العزلات السريرية لبكتيريا *P. aeruginosa*، وأظهرت النتائج أن جميع العزلات السريرية تحتوي على جينات *Psla*، المرتبطة بظاهرة استشعار النصاب (QS) في *P. aeruginosa* كما في الشكل (٤-١٨)، يقوم جين *Psla* بتشفير بروتين *Psla*، والذي يعد مكوناً مهماً لنظام استشعار النصاب (QS) في *P. aeruginosa*. يعمل بروتين *Psla* بمثابة تصنيع إشارة QS، وهو المسؤول عن إنتاج جزيء المُحرض الذاتي N-3- يعمل بروتين *Psla* بمثابة تصنيع إشارة QS، وهو المسؤول عن إنتاج جزيء المُحرض الذاتي N-3- (Aflakian *et al.*, 2022) oxo-dodecanoyl-L-homoserinelactone (3O-C12-HSL).

أظهرت نتائج الدراسة الحالية ان جميع عزلات *P. aeruginosa* في دراستنا قادرة على إنتاج الأغشية الحيوية، وأظهرت هذه العزلات المكونة للأغشية الحيوية أيضاً مستويات عالية من مقاومة المضادات الحيوية بنسبة (100%). وان دراستنا الحالية تتفق مع (Emami *et al.*, 2015) الذي وجد ان جميع عزلات *P. aeruginosa* تمتلك نمط مقاومة المضادات الحيوية ولها القدرة على توزيع جين *psIA* المسؤول عن انتاج الاغشية الحيوية في العزلات التي تم الحصول عليها من مياه الصرف الصحي في مركز الحروق في جيلان، إيران. وكذلك اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع الدراسة التي أجراها

(Jabalamehli *et al.*, 2012) من طهران، إيران والتي أظهرت ارتفاع في معدل تكوين الأغشية الحيوية، حيث أن أكثر من ٩٦٪ من عزلات *P. aeruginosa* التي تم جمعها من مرضى الحروق قادرة على تكوين الأغشية الحيوية.

وهذا لا يتوافق مع النتائج الواردة في الدراسة التي أجراها (Gottaslo & Salahi, 2013) من تبريز، إيران، حيث تم تحديد (79%) من سلالات *P. aeruginosa* السريرية الخاصة بهم على أنها منتجة للأغشية الحيوية.



الشكل (٤-١٨): الترحيل الكهربائي لجين *PslA* في عزلات الزوائف الزنجارية M: علامة الحمض النووي؛ (1-8) منتجات PCR موجبة ، 1116pb نقطة أساس للكشف عن جين *PslA* في بكتريا *Pseudomonas aeruginosa*.

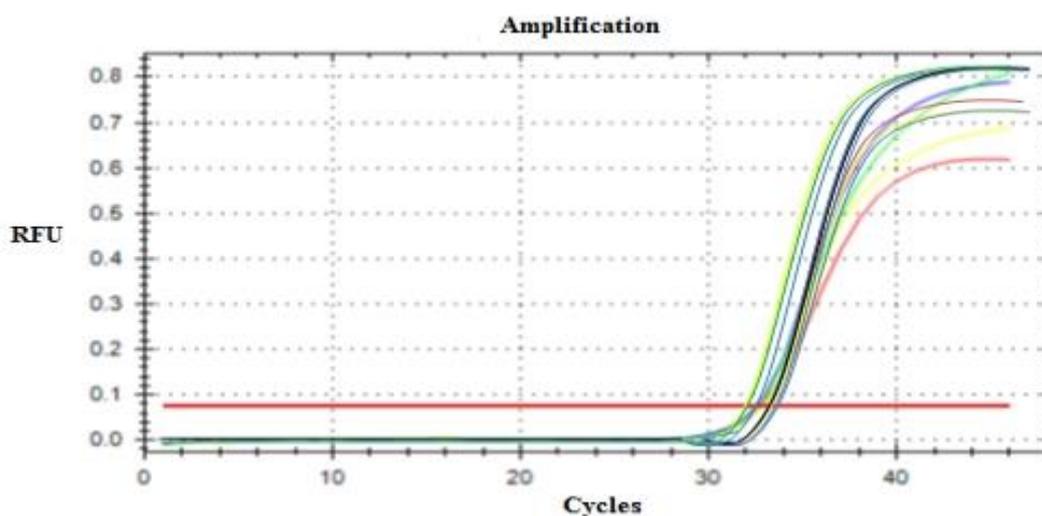
٤-١٠ النسخ العكسي الكمي في الوقت الحقيقي qPCR gene expression

٤-١٠-١ طريقة القياس الكمي لجين الادامة (Housekeeping gene)

تم إجراء النسخ الكمي في الوقت الحقيقي (RT-qPCR) لقياس الكمي النسبي (تحليل التعبير الجيني) لمستويات التعبير الجيني 16SrRNA لبكتريا *P. aeruginosa* التي تم تطبيعها عن طريق التعبير الجيني جينات الادامة (16SrRNA).

كانت طريقة القياس الكمي RT-qPCR في نظام PCR في الوقت الحقيقي تعتمد على أرقام دور عتبة القيم (CT) لكشف التضخيم للجينات المستهدفة وجينات الادامة. حيث أن نتيجة تضخيم PCR في الوقت الحقيقي لجين الادامة لا تحدث فرقاً في القيمة الحرجة او العتبة (critical value)، حيث كان

ت المجموعة الضابطة التي اعتبرت المضاد (CT = 30) في حين أن المجموعات الأربعة الأخرى والتي تشمل مجموعة المركب النانوي الحر ومجموعة المستخلص الحر حيث كانت قيمة الدرجة (critical value) هي (31) و (32) على التوالي أما البقية مجموعة المركب النانوي مع المضاد ومجموعة المستخلص مع المضاد فقد سجلت قيمة الدرجة أو العتبة (CT = 30 و CT = 33) على التوالي.



شكل (٤-١٩) منحنى التضخيم التعبير الجيني لتقنية تفاعل سلسلة البوليميريز بالوقت الحقيقي (Real time-PCR) والخاص بجين 16SrRNA التابع لبكتريا الزوائف الزنجارية حيث تبين المنحنيات : المنحنى باللون الأصفر : مجموعة المضاد CIP ، المنحنى باللون الأسود : مجموعة المستخلص الحر ، المنحنى باللون الأحمر : مجموعة المركب النانوي الحر ، المنحنى باللون الأزرق : مجموعة المستخلص + المضاد الحيوي. المنحنى باللون الأخضر : مجموعة المركب النانوي + المضاد الحيوي.

٤-١٠-٢ التعبير الجيني لموروث (psIA) بطريقة العد النسبي Relative Quantification

لحساب التعبير الجيني لجين (psIA) الذي له علاقة بتكوين الغشاء الحيوي لبكتريا الزوائف الزنجارية عند استخدام التراكيز الثلاثة في المجاميع الخمسة وتضمنت المجموعة الأولى التي تم معاملتها بالمضاد الحيوي ciprofloxacin والمجموعة الثانية التي تم معاملتها بالمستخلص المائي لأوراق نبات *Salvia officinalis* والمجموعة الثالثة التي تم معاملتها بالمركب النانوي والمجموعة الرابعة التي تم معاملتها بالمستخلص المائي محمل بالمضاد الحيوي والمجموعة الخامسة التي تم معاملتها بالمركب النانوي محمل بالمضاد الحيوي وتم إجراء العد النسبي باستخدام معادلة Livak (2-ΔΔCT) المعتمدة على عملية التصحيح Normalization باستخدام جين 16SrRNA المحافظ وحلت قيم ال (CT)

Threshold cycle للجين الهدف psIA باستخدام قيم الـ CT للجين المحافظ او المعياري في كل معاملات التجربة ومجموعة السيطرة لإتمام عملية التصحيح في التعبير الجيني .

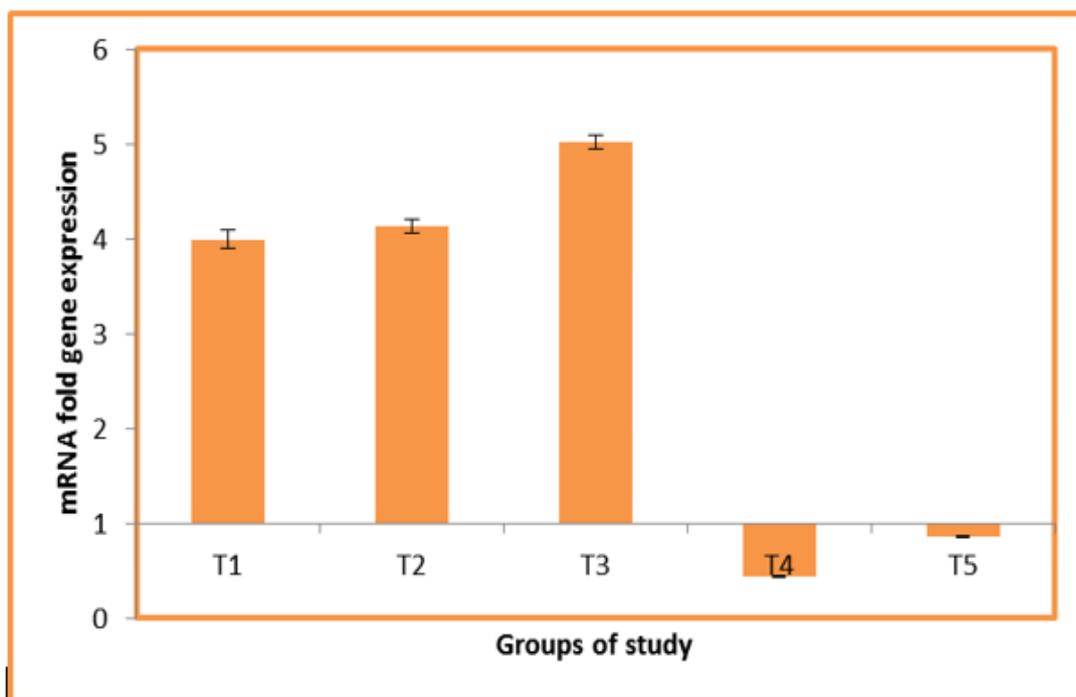
أظهرت مستويات التعبير الجيني للجين (*psIA*) وجود فروقات معنوية واضحة في مستويات التعبير الجيني في عزلات المعاملات ومجموعة السيطرة ، اذ بينت نتائج التعبير الجيني انخفاض واضح (تنظيم منخفض down regulation) في المعاملة الرابعة T4 والمعاملة الخامسة T5 وهي تختلف مع المعاملة الأولى T1 والثانية T2 والثالثة T3 اذ سجلت نتائج التعبير الجيني 3.994، 4.1256، 5.0172، 0.8643، 0.4357 على التوالي مقارنة مع التعبير الجيني لمجموعة السيطرة ، التي تعادل تعبير جيني بمقدار 1 (fold change) حسب طريقة Livak (Livak & Schmittgen, 2001)، وكما موضح في جدول (١١-٤) .

جدول (١١-٤) التعبير الجيني لجين psIA باستخدام طريقة Livak method للبكتريا الزوائف الزنجارية عند استخدام المستخلص المائي لأوراق نبات *Salvia officinalis* الحر وبعد تحميله على مضاد الـ ciprofloxacin والمركب النانوي قبل وبعد تحميله على المضاد.

Treatment المجموع Isolateh	Concentration	CT PSIA	CT 16SrRNA	ΔCT (Test)	ΔCT (contr)	ΔΔCT	Fold change (2 ^{ΔΔCT})	Mean
								±SD
T1	C1	33.15	35.64	-2.49	-0.74482	-1.7451	3.352364	3.994±0.098
T1	C1	33.12	35.78	-2.66	-0.74482	-1.9151	3.771606	
T1	C2	33.19	34.38	-1.19	-0.74482	-0.4451	1.361483	
T1	C2	31.88	36.43	-4.55	-0.74482	-3.8051	13.9789	
T1	C3	32.67	33.87	-1.2	-0.74482	-0.45518	1.370953	
T1	C3	31.59	32.38	-0.79	-0.74482	-0.04518	1.031811	
T2	C1	31.55	34.54	-2.99	-0.74482	-2.2451	4.740959	4.1256±0.0724
T2	C1	31.65	34.44	-2.79	-0.74482	-2.0451	4.127245	
T2	C2	33.55	37.54	-3.99	-0.74482	-3.2451	9.481919	
T2	C2	31.63	34.43	-2.8	-0.74482	-2.0551	4.155952	
T2	C3	34.78	35.81	-1.03	-0.74482	-0.28518	1.218561	
T2	C3	34.89	36.63	-1.74	-0.74482	-0.99518	1.993328	
T3	C1	29.66	34.54	-4.88	-0.74482	-4.1351	17.57167	5.0172±0.0751
T3	C1	29.47	30.39	-0.92	-0.74482	-0.1751	1.129104	
T3	C2	32.78	32.89	-0.11	-0.74482	0.6348	0.644021	
T3	C2	30.95	34.78	-3.83	-0.74482	-3.0851	8.486555	
T3	C3	34.68	35.26	-0.58	-0.74482	0.164821	0.892039	
T3	C3	32.47	33.68	-1.21	-0.74482	-0.46518	1.380489	

T4	C1	33.26	25.821	-0.561	-0.74482	0.183821	0.880368	0.8643±0.0095
T4	C1	25.16	25.49	-0.33	-0.74482	0.414821	0.750113	
T4	C2	25.49	24.11	1.38	-0.74482	2.124821	0.229279	
T4	C2	25.27	25.47	-0.2	-0.74482	0.544821	0.685476	
T4	C3	31.68	32.26	-0.58	-0.74482	0.164821	0.892039	
T4	C3	30.18	31.73	-1.55	-0.74482	-0.80518	1.747363	
T5	C1	26.33	26.11	0.22	-0.74482	0.964821	0.880368	0.4357±0.0088
T5	C1	26.25	25.04	1.21	-0.74482	1.954821	0.257953	
T5	C2	25.49	25.24	0.25	-0.74482	0.994821	0.501798	
T5	C2	27.18	26.31	0.87	-0.74482	1.614821	0.326505	
T5	C3	29.26	29.99	-0.73	-0.74482	0.014821	0.989779	
T5	C3	32.39	27.85	4.54	-0.74482	5.284821	0.025651	

أظهرت نتائج التعبير الجيني لحين psIa لبكتريا الزوائف الزنجارية في المعاملة الرابعة T4 المستخلص المائي محمل بالمضاد الحيوي بتركيز $4+8$ $\mu\text{g/ml}$ (انخفاضا down regulation بمقدار 0.8643 ± 0.0095 fold change) وانخفضت المعاملة الخامسة T5 المركب النانوي محمل بالمضاد بتركيز $4+8$ $\mu\text{g/ml}$ (انخفاضا بمقدار 0.4357 ± 0.0088 fold change) بالمقارنة مع عينة السيطرة التي كان مستوى التعبير الجيني psIa مرتفع up regulation بمقدار 3.994 ± 0.098 fold change) ، ومن ناحية أخرى ان التعبير الجيني لحين psIa في المعاملة الثانية T2 المستخلص المائي لأوراق نبات *Salvia officinalis* بمقدار 4.1256 ± 0.0724 fold change) والمعاملة الثالثة T3 المركب النانوي كان التعبير الجيني بمقدار 5.0172 ± 0.0751 fold change) وهذا المستوى يدل على وجود فروق معنوية في التعبير الجيني بين المجاميع وبالمقارنة مع مجموعة السيطرة واطهر الشكل البياني (٤-٢٠) للتعبير الجيني النسبي لحين psIa وجود فرق معنوي بين معاملات التجربة (T2,T3,T4,T5) ومجموعة السيطرة عند مستوى احتمالية $P < 0.05$.

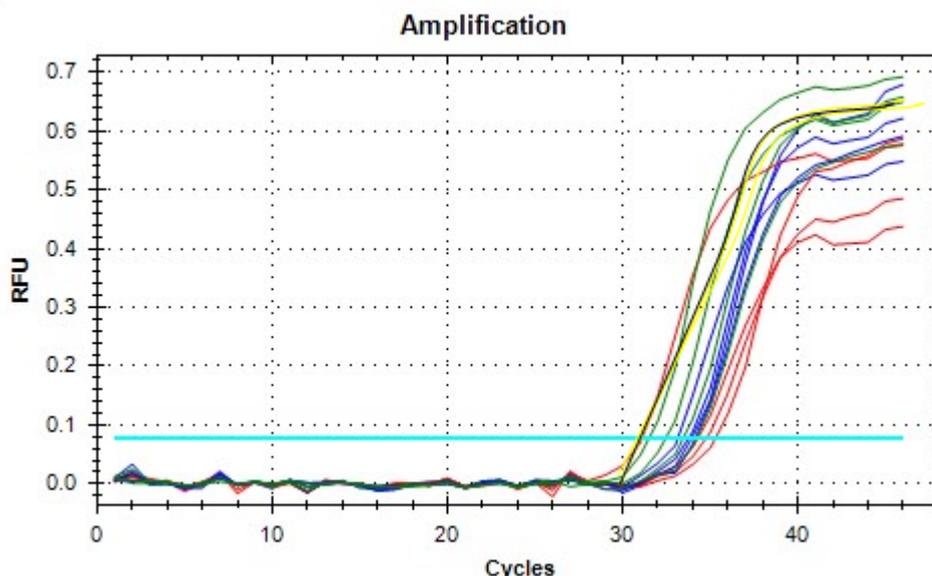


شكل (٤ - ٢٠) التعبير الجيني لجين *Psla* في بكتريا الزوائف الزنجارية .

T1: المضاد الحيوي ، T2 : المستخلص المائي لأوراق نبات السالفيا ، T3 : المركب النانوي ، T4 :

المستخلص المائي محمل بالمضاد الحيوي ، T5 : المركب النانوي محمل بالمضاد الحيوي

أظهرت نتائج التعبير الجيني لجين *psla* الخاص ببكتريا الزوائف الزنجارية ان المعاملتين الرابعة T4 المستخلص المائي لأوراق نبات *Salvia officinalis* محمل بالمضاد والمعاملة الخامسة T5 المركب النانوي محمل بالمضاد بتركيز $C1 > MIC$ يؤثر بشكل سلبي (تقليل تركيز ال RNA) على مستوى التعبير الجيني ، وبالتالي يؤثر على تكوين الغشاء الحيوي لبكتريا الزوائف الزنجارية ، بينما المعاملات المعاملة الأولى T1 مضاد ciprofloxacin والمعاملة الثانية T2 المستخلص المائي الحر والمعاملة الثالثة T3 المركب النانوي الحر أظهرت تاثير واضح على مستوى التعبير الجيني لجين (*Psla*) زيادة في تركيز ال RNA) وهذا يدل على فعالية ونشاط هذا الجين في تنشيط وادامة الغشاء الحيوي وكذلك يلعب دورا مهما في *Qurum sensing* في البكتريا .



شكل (٤-٢١) منحنى التضخيم التعبير الجيني لتقنية تفاعل سلسلة البوليميريز بالوقت الحقيقي (Real time-PCR) والخاص بجين *psla* التابع لبكتريا الزوائف الزنجارية حيث تبين المنحنيات : المنحنى باللون الأخضر : مجموعة المركب النانوي ، المنحنى باللون الأصفر : مجموعة المستخلص الحر ، المنحنى باللون الأزرق : مجموعة المضاد الحيوي ، المنحنى باللون الأسود : مجموعة النانو + المضاد الحيوي ، المنحنى باللون الأحمر : مجموعة المستخلص + المضاد الحيوي .

وكذلك اشارت الدراسة الحالية ونتائج التعبير الجيني ان زيادة التركيز أدى الى انخفاض التعبير الجيني لجين *PsIa* لبكتريا الزوائف الزنجارية لكل من المعاملة الرابعة T4 والمعاملة الخامسة T5 واتفقت هذه الدراسة مع (Yassin *et al.*, 2022) ، وقد يرجع ذلك الى تأثير جسيمات الفضة النانوية المنفصلة أو المقترنة مع المضادات الحيوية حيث تؤدي الى تثبيط كامل للأغشية الحيوية والذي لوحظ خلال ٢٤ ساعة بالإضافة الى التوافق الجيد من مزج الجزيئات النانوية مع المضادات الحيوية (Namasivayam *et al.*, 2012) ، ويمكن ان تؤدي جسيمات الفضة النانوية الى تثبيط تكوين الاغشية الحيوية عن طريق منع انتاج مادة EPS وهي مادة لاصقة ضرورية لربط الخلايا وتثبيتها معا ، وان AgNPs بمجرد التصاقها بغشاء الخلية يمكن ان تخترق وتتراكم في السيتوبلازم البكتيري وهذه الجزيئات المترابطة تؤدي الى تعطيل الأنزيمات من خلال التخثر بمركبات تحتوي على الفسفور والكبريت مثل تلك الموجودة في البروتينات والمسؤولة عن تكوين مادة ال EPS وبذلك تؤدي الى تثبيط الاغشية الحيوية (Galvez *et al.*, 2019) ، وان الجسيمات النانوية الصغيرة تكون اكثر فعالية في تثبيط الاغشية الحيوية لأنها تمتلك مساحة سطحية اكبر وبذلك توفر مساحة سطحية اكبر لأكسدة واطلاق Ag^+ وان حجمها الصغير يسمح لها ان تصل للمستعمرات داخل الاغشية الحيوية وتلتصق بغشاء الخلية وتعطل نفاذيتها والتنفس، ولان الاغشية الحيوية تتميز بوجود قنوات مائية أو مسام داخل المصفوفة تعمل على نقل الغذاء

والجزئيات النانوية كبيرة الحجم لا تستطيع اختراق هذه القنوات (Loo *et al.*, 2014) ، وكذلك تُظهر AgNPs والأيونات المرتبطة بهذه الجسيمات نشاطاً مضاداً للميكروبات عن طريق إتلاف بنية ومكونات الأغشية الحيوية ومنع التمثيل الغذائي البكتيري من خلال إجراءات مختلفة وأن AgNPs تتفاعل مع الأغشية الحيوية، وتخرقها وتهاجر الى الداخل وتتفاعل مع المكونات الرئيسية للأغشية الحيوية مثل الدهون والأحماض النووية والبروتينات، والسكريات عبر الكارهة للماء، والكهرباء الساكنة، وفان دير فالس، والتفاعلات الأيونية، والترابط الهيدروجيني (Ödemiş *et al.*, 2022)

..

الاستنتاجات والتوصيات

**Conclusions and
Recommendations**

الاستنتاجات : Conclusions

توصلت الدراسة الحالية إلى النتائج وعلى النحو الآتي:

- ١- ارتفاع نسبة الإصابة بكتريا الزوائف الزنجارية في ردهات الحروق.
- ٢- تخليق مركب نانوي اخضر صديق للبيئة ذو تأثير ايجابي في النقل وتقليل الآثار الجانبية للعقار.
- ٣- نجاح عملية تحميل عقار السيبروفلوكساسين من خلال ظهور أزاحه الحزم الى أماكن جديدة مما يشير الى نجاح عملية التحميل.
- ٤- إن استخدام تراكيز غير مؤثرة من السيبروفلوكساسين الحر سوف يكون لها تأثير واضح على مقاومة البكتريا بعد تحميلها على المركب النانوي الأخضر.
- ٥- أن معاملة العزلات البكتيرية بعقار السيبروفلوكساسين والمستخلص المائي لأوراق السالفيا ومركب السالفيا النانوي والمستخلص المحمل بالعقار والمركب النانوي المحمل بالعقار أدى الى تثبيط مقاومة البكتريا.
- ٦- بكتريا الزوائف الزنجارية أقل حساسية للمركبات النانوية المحملة بالعقار.
- ٧- معاملة بكتريا الزوائف الزنجارية بالمركبات النانوية المحملة بالعقار أدى الى انخفاض التعبير الجيني لجين *psIA* أي انخفاض قابليتها على تكوين الغشاء الحيوي biofilm.

التوصيات :Recommendations

- ١- استخدام مستخلصات نباتية أخرى لتخليق المركب النانوي ودراسة تأثيرها على البكتريا المقاومة للأدوية المتعددة.
- ٢- دراسة تأثير المركب النانوي الأخضر على عوامل ضراوة أخرى.
- ٣- دراسة تأثير مركب السالفيا النانوي على التعبير الجيني لجين *pgaA* في بكتريا *Klebsiella pneumoniae*.
- ٤- يوصى بتناول شاي الميرمية لأن له دور كبير في تقوية المناعة ومقاومة الامراض المعدية والجذور الحرة المسببة للالتهابات في الجسم، وكذلك يعمل على تنظيم سكر الدم.

المصادر

References

References

- Abbas, R., Chakkour, M., Zein El Dine, H., Obaseki, E. F., Obeid, S. T., Jezzini, A., Ghsssein, G., & Ezzeddine, Z. (2024). General Overview of *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology and the Role of Siderophores in Its Pathogenicity. *Biology*, *13*(2), 78.
- Abd Asada, M. M., & Al-amri, N. A. M. (2021). Molecular identification and Virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from operation hall. *Al-Kufa University Journal for Biology*, *13*(2), 39–46.
- Abd Elkodous, M., Olojede, S. O., Morsi, M., & El-Sayyad, G. S. (2021). Nanomaterial-based drug delivery systems as promising carriers for patients with COVID-19. *RSC Advances*, *11*(43), 26463–26480.
- Adaay, M. H., Al-Dujaily, S. S., & Khazzal, F. K. (2013). Effect of aqueous extract of *Medicago sativa* and *Salvia officinalis* mixture on hormonal, ovarian and uterine parameters in mature female mice. *J Mater Environ Sci*, *4*(4), 424–433.
- Adefurin, A., Sammons, H., Jacqz-Aigrain, E., & Choonara, I. (2011). Ciprofloxacin safety in paediatrics: A systematic review. In *Archives of Disease in Childhood* (Vol. 96, Issue 9, pp. 874–880). <https://doi.org/10.1136/adc.2010.208843>
- Aflakian, F., Rad, M., Hashemitabar, G., Lagzian, M., & Ramezani, M. (2022). Design and assessment of novel synthetic peptides to inhibit quorum sensing-dependent biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biofouling*, *38*(2), 131–146.
- Agatonovic-Kustrin, S., Gegechkori, V., Kustrin, E., & Morton, D. W. (2022). The Effect of Lactic Acid Fermentation on Extraction of Phenolics and Flavonoids from Sage Leaves. *Applied Sciences (Switzerland)*, *12*(19). <https://doi.org/10.3390/app12199959>
- Agnihotri, N., Gupta, V., & Joshi, R. M. (2004). Aerobic bacterial isolates from burn wound infections and their antibiograms—a five-year study. *Burns*, *30*(3), 241–243.
- Ahmed, O. H. (2020). Antiangiogenic effect of *Salvia officinalis*. *International Journal of Psychosocial Rehabilitation*, *24*(10).
- Ahmed, T., Shahid, M., Noman, M., Niazi, M. B. K., Mahmood, F., Manzoor, I., Zhang, Y., Li, B., Yang, Y., & Yan, C. (2020). Silver nanoparticles

- synthesized by using *Bacillus cereus* SZT1 ameliorated the damage of bacterial leaf blight pathogen in rice. *Pathogens*, 9(3), 160.
- Al-Buriahi, A. K., Al-shaibani, M. M., Mohamed, R. M. S. R., Al-Gheethi, A. A., Sharma, A., & Ismail, N. (2022). Ciprofloxacin removal from non-clinical environment: A critical review of current methods and future trend prospects. *Journal of Water Process Engineering*, 47, 102725.
- Al-Husseiny, K. R., & Nakkash, A. F. (2008). Study some virulence factors of *Klebsiella pneumoniae* isolated from clinical sources. *J. Thi-Qar Univ*, 4(3), 45–50.
- Alnuaimi, M. T., Hamdan, N. T., Abdalraheem, E., & Aljanabi, Z. Z. (2019). Biodegradation of malathion pesticide by silver bio-nanoparticles of *Bacillus licheniformis* extracts. *Research on Crops*, 20(spl), 79–84.
- Al-Saffar, V. H. (2019). Extended Spectrum β -lactamases (ESBL) producing *Escherichia coli* (E. coli). *Al-Kufa University Journal for Biology*, 11(1).
- AL-Shamaa, N. F. K., Abu-Risha, R. A., & AL-Faham, M. A. (2016). Virulence genes profile of *Pseudomonas aeruginosa* local isolates from burns and wounds. *Iraqi Journal of Biotechnology*, 15(3).
- Amankwah, S., Abdella, K., & Kassa, T. (2021). Bacterial biofilm destruction: A focused review on the recent use of phage-based strategies with other antibiofilm agents. *Nanotechnology, Science and Applications*, 161–177.
- Anderson, L. A., & Phillipson, J. D. (2002). *Herbal Medicines: A guide for healthcare professionals*. Pharmaceutical Press.
- Antoniammal, P., & Arivuoli, D. (2012). Size and shape dependence on melting temperature of gallium nitride nanoparticles. *Journal of Nanomaterials*, 2012, 8.
- Arampatzi, S. I., Giannoglou, G., & Diza, E. (2011). Biofilm formation: A complicated microbiological process. *Aristotle University Medical Journal*, 38(2), 21–29.
- Ashurst, J. V., & Dawson, A. (2018). *Klebsiella pneumoniae*.
- Azam, M. W., & Khan, A. U. (2019). Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. *Drug Discovery Today*, 24(1), 350–359.
- Baig, N., Kammakakam, I., & Falath, W. (2021). Nanomaterials: A review of synthesis methods, properties, recent progress, and challenges. *Materials Advances*, 2(6), 1821–1871.

- Balčiūnaitienė, A., Liaudanskas, M., Puzerytė, V., Viškelis, J., Janulis, V., Viškelis, P., Griškoniš, E., & Jankauskaitė, V. (2022). Eucalyptus globulus and Salvia officinalis extracts mediated green synthesis of silver nanoparticles and their application as an antioxidant and antimicrobial agent. *Plants*, *11*(8), 1085.
- Bansal, S., Harjai, K., & Chhibber, S. (2014). Depolymerase improves gentamicin efficacy during *Klebsiella pneumoniae* induced murine infection. *BMC Infectious Diseases*, *14*(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-456>
- Baquero, F., Martínez, J. L., F. Lanza, V., Rodríguez-Beltrán, J., Galán, J. C., San Millán, A., Cantón, R., & Coque, T. M. (2021). Evolutionary pathways and trajectories in antibiotic resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, *34*(4), e00050-19.
- Bayda, S., Adeel, M., Tuccinardi, T., Cordani, M., & Rizzolio, F. (2019). The history of nanoscience and nanotechnology: from chemical–physical applications to nanomedicine. *Molecules*, *25*(1), 112.
- Benson, H. J. (2002). *Microbiological applications: a laboratory manual in general microbiology*. [McGraw-Hill].
- Bhuiya, M., Sarkar, M. K. I., Sohag, M. H., Ali, H., Roy, C. K., Akther, L., & Sarker, A. F. (2018). Enumerating antibiotic susceptibility patterns of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from different sources in Dhaka City. *The Open Microbiology Journal*, *12*, 172.
- Bogiel, T., Depka, D., Rzepka, M., Kwiecińska-Piróg, J., & Gospodarek-Komkowska, E. (2021). Prevalence of the genes associated with biofilm and toxins synthesis amongst the *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Antibiotics*, *10*(3), 241.
- Botanica, A. (2009). Micromorphological studies of *Lallemantia* L.(Lamiaceae) species growing in Turkey. *Acta Biol. Crac. Ser. Bot.*, *51*(1), 45–54.
- Boufadi, M. Y., Keddari, S., Moulai-Hacene, F., & Chaa, S. (2021). Chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory properties of *Salvia officinalis* extract from Algeria. *Pharmacognosy Journal*, *13*(2), 506–515. <https://doi.org/10.5530/pj.2021.13.64>
- Bridel, S., Bouchez, V., Brancotte, B., Hauck, S., Armatys, N., Landier, A., Mühle, E., Guillot, S., Toubiana, J., & Maiden, M. C. J. (2022). A comprehensive resource for *Bordetella* genomic epidemiology and biodiversity studies. *Nature Communications*, *13*(1), 3807.

- Caschera, A., & Saiko, G. (2021). On Feasibility of Fluorescence-based Bacteria Presence Quantification: *P. Aeruginosa*. *Bioimaging*, 193–200.
- Chang, D., Sharma, L., Dela Cruz, C. S., & Zhang, D. (2021). Clinical epidemiology, risk factors, and control strategies of *Klebsiella pneumoniae* infection. *Frontiers in Microbiology*, 12, 750662.
- Chen, K.-M., Chiang, M.-K., Wang, M., Ho, H.-C., Lu, M.-C., & Lai, Y.-C. (2014). The role of *pgaC* in *Klebsiella pneumoniae* virulence and biofilm formation. *Microbial Pathogenesis*, 77, 89–99.
- Chrysouli, M. P., Banti, C. N., Kourkoumelis, N., Moushi, E. E., Tasiopoulos, A. J., Douvalis, A., Papachristodoulou, C., Hatzidimitriou, A. G., Bakas, T., & Hadjikakou, S. K. (2020). Ciprofloxacin conjugated to diphenyltin (IV): a novel formulation with enhanced antimicrobial activity. *Dalton Transactions*, 49(33), 11522–11535.
- Clegg, S., & Murphy, C. N. (2017). Epidemiology and virulence of *Klebsiella pneumoniae*. *Urinary Tract Infections: Molecular Pathogenesis and Clinical Management*, 435–457.
- Crabbé, A., Jensen, P. Ø., Bjarnsholt, T., & Coenye, T. (2019). Antimicrobial tolerance and metabolic adaptations in microbial biofilms. *Trends in Microbiology*, 27(10), 850–863.
- Cueva, A. R., Pham, O., Diaby, A., Fleming, D., Rumbaugh, K. P., & Fernandes, G. E. (2020). Pyoverdine assay for rapid and early detection of *Pseudomonas aeruginosa* in burn wounds. *ACS Applied Bio Materials*, 3(8), 5350–5356.
- da Costa de Souza, G., Roque-Borda, C. A., & Pavan, F. R. (2022). Beta-lactam resistance and the effectiveness of antimicrobial peptides against KPC-producing bacteria. *Drug Development Research*, 83(7), 1534–1554.
- D’Almeida, R. E., Sued, N., & Arena, M. E. (2022). Citrus paradisi and Citrus reticulata essential oils interfere with *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing in vivo on *Caenorhabditis elegans*. *Phytomedicine Plus*, 2(1), 100160.
- Das, R., Nath, S. S., & Bhattacharjee, R. (2011). Optical properties of linoleic acid protected gold nanoparticles. *Journal of Nanomaterials*, 2011, 1–4.
- de Sousa, T., Hébraud, M., Enes Dapkevicius, M. L. N., Maltez, L., Pereira, J. E., Capita, R., Alonso-Calleja, C., Igrejas, G., & Poeta, P. (2021). Genomic and metabolic characteristics of the pathogenicity in *pseudomonas*

- aeruginosa*. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 23). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms222312892>
- Diggle, S. P., & Whiteley, M. (2020). Microbe Profile: *Pseudomonas aeruginosa*: opportunistic pathogen and lab rat. *Microbiology*, *166*(1), 30.
- Domenech, B., Bastos-Arrieta, J., Alonso, A., Macanas, J., Munoz, M., & N., D. (2012). Bifunctional Polymer-Metal Nanocomposite Ion Exchange Materials. In *Ion Exchange Technologies*. InTech. <https://doi.org/10.5772/51579>
- Du, D., van Veen, H. W., Murakami, S., Pos, K. M., & Luisi, B. F. (2015). Structure, mechanism and cooperation of bacterial multidrug transporters. *Current Opinion in Structural Biology*, *33*, 76–91.
- Đurović, S., Micić, D., Pezo, L., Radić, D., Bazarnova, J. G., Smyatskaya, Y. A., & Blagojević, S. (2022). The effect of various extraction techniques on the quality of sage (*Salvia officinalis* L.) essential oil, expressed by chemical composition, thermal properties and biological activity. *Food Chemistry: X*, *13*. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100213>
- Duțu, L. E., Popescu, M. L., Purdel, C. N., Ilie, E. I., Luță, E.-A., Costea, L., & Gîrd, C. E. (2022). Traditional medicinal plants—a possible source of antibacterial activity on respiratory diseases induced by *chlamydia pneumoniae*, *haemophilus influenzae*, *klebsiella pneumoniae* and *moraxella catarrhalis*. *Diversity*, *14*(2), 145.
- El Bouamri, M. C., Arsalane, L., El Kamouni, Y., & Zouhair, S. (2015). Antimicrobial susceptibility of urinary *Klebsiella pneumoniae* and the emergence of carbapenem-resistant strains: A retrospective study from a university hospital in Morocco, North Africa. *African Journal of Urology*, *21*(1), 36–40.
- Emami, S., Nikokar, I., Ghasemi, Y., Ebrahimpour, M., Ebrahim-Saraie, H. S., Araghian, A., Faezi, S., Farahbakhsh, M., & Rajabi, A. (2015). Antibiotic resistance pattern and distribution of *pslA* gene among biofilm producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from waste water of a burn center. *Jundishapur Journal of Microbiology*, *8*(11).
- Evgenia, M., Lara, E., Folke, S., & McCarthy, R. R. (2021). Burns and biofilms: priority pathogens and in vivo models. *NPJ Biofilms and Microbiomes*, *7*(1).
- Ezeador, C. O., Ejikegwu, P. C., Ushie, S. N., & Agbakoba, N. R. (2020). Isolation, Identification And Prevalence Of *Pseudomonas Aeruginosa* Isolates From Clinical And Environmental Sources In Onitsha Metropolis,

- Anambra State. *European Journal of Medical and Health Sciences*, 2(2).
<https://doi.org/10.24018/ejmed.2020.2.2.188>
- Fernández, L., Breidenstein, E. B. M., & Hancock, R. E. W. (2011). Creeping baselines and adaptive resistance to antibiotics. *Drug Resistance Updates*, 14(1), 1–21.
- Ferreira, R. L., Da Silva, B. C. M., Rezende, G. S., Nakamura-Silva, R., Pitondo-Silva, A., Campanini, E. B., Brito, M. C. A., da Silva, E. M. L., Freire, C. C. de M., & Cunha, A. F. da. (2019). High prevalence of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* harboring several virulence and β -lactamase encoding genes in a Brazilian intensive care unit. *Frontiers in Microbiology*, 9, 3198.
- Fisher, J. F., & Mobashery, S. (2020). β -Lactams against the Fortress of the Gram-Positive *Staphylococcus aureus* Bacterium. *Chemical Reviews*, 121(6), 3412–3463.
- Flemming, H.-C., Baveye, P., Neu, T. R., Stoodley, P., Szewzyk, U., Wingender, J., & Wuertz, S. (2021). Who put the film in biofilm? The migration of a term from wastewater engineering to medicine and beyond. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 7(1), 10.
- Fymat, A. L. (2017). Antibiotics and antibiotic resistance. *Biomed J Sci & Tech Res*, 1(1), 1–16.
- Gajdács, M., Baráth, Z., Kárpáti, K., Szabó, D., Usai, D., Zanetti, S., & Donadu, M. G. (2021). No correlation between biofilm formation, virulence factors, and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: results from a laboratory-based in vitro study. *Antibiotics*, 10(9), 1134.
- Galvez, A. M., Ramos, K. M., Alexis, J. T., & Baculi, R. (2019). Bacterial exopolysaccharide-mediated synthesis of silver nanoparticles and their application on bacterial biofilms. *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 8(4), 970.
- Ghanem, S., El Shafey, H. M., El Kelani, A. T., & Manzoor, N. (2017). Antimicrobial resistance patterns of *Klebsiella* isolates from clinical samples in a Saudi hospital. *African Journal of Microbiology Research*, 11(23), 965–971.
- Gottaslo, R., & Salahi, B. (2013). Effects of oxygen on in-vitro biofilm formation and antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Pharmaceutical Sciences*, 19(3), 96–99.

- Grzegorzcyk, I., Matkowski, A., & Wysokińska, H. (2007). Antioxidant activity of extracts from in vitro cultures of *Salvia officinalis* L. *Food Chemistry*, *104*(2), 536–541.
- Guo, Z., Chen, G., Liu, L., Zeng, G., Huang, Z., Chen, A., & Hu, L. (2016). Activity variation of *Phanerochaete chrysosporium* under nanosilver exposure by controlling of different sulfide sources. *Scientific Reports*, *6*(1), 20813.
- Haghighifar, E., Norouzi, F., & Dolatabadi, R. K. (2021). Molecular detection of Extended-Spectrum β -lactamases (ESBLs) and biofilm formation in uropathogen *Klebsiella pneumoniae* in Iran. *Medical Journal of the Islamic Republic of Iran*, *35*, 72.
- Hamidpour, M., Hamidpour, R., Hamidpour, S., & Shahlari, M. (2014). Chemistry, pharmacology, and medicinal property of sage (*Salvia*) to prevent and cure illnesses such as obesity, diabetes, depression, dementia, lupus, autism, heart disease, and cancer. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, *4*(2), 82–88.
- Harper, D. R., Parracho, H. M. R. T., Walker, J., Sharp, R., Hughes, G., Werthén, M., Lehman, S., & Morales, S. (2014). Bacteriophages and biofilms. *Antibiotics*, *3*(3), 270–284. <https://doi.org/10.3390/antibiotics3030270>
- Hasan, S. A., Najati, A. M., & Abass, K. S. (2019). Isolation and identification of multi-drug resistant "*Pseudomonas aeruginosa*" from burn wound infection in Kirkuk City, Iraq. *EurAsian Journal of BioSciences*, *13*(2), 1045–1050.
- Hasannejad-Bibalan, M., Jafari, A., Sabati, H., Goswami, R., Jafaryparvar, Z., Sedaghat, F., & Ebrahim-Saraie, H. S. (2021). Risk of type III secretion systems in burn patients with *Pseudomonas aeruginosa* wound infection: A systematic review and meta-analysis. *Burns*, *47*(3), 538–544.
- Hassan, M. A., Abd El-Aziz, S., Elbadry, H. M., Samy, A., & Tamer, T. M. (2022). Prevalence, antimicrobial resistance profile, and characterization of multi-drug resistant bacteria from various infected wounds in North Egypt. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *29*(4), 2978–2988.
- Heuer, H., & Smalla, K. (2007). Horizontal gene transfer between bacteria. *Environmental Biosafety Research*, *6*(1–2), 3–13.
- Heydari, S., & Eftekhari, F. (2015). Biofilm formation and β -lactamase production in burn isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Jundishapur Journal of Microbiology*, *8*(3).

- Higgins, S. T., Heil, S. H., Solomon, L. J., Bernstein, I. M., Lussier, J. P., Abel, R. L., Lynch, M. E., & Badger, G. J. (2004). A pilot study on voucher-based incentives to promote abstinence from cigarette smoking during pregnancy and postpartum. *Nicotine & Tobacco Research*, 6(6), 1015–1020.
- Huang, J., Tang, Y., He, W., & Li, Q. (2019). Singapore's School Excellence Model and student learning: evidence from PISA 2012 and TALIS 2013. *Asia Pacific Journal of Education*, 39(1), 96–112.
- Hussein, K. A. M., & Khalaf, A. A. (2020). Preparation, diagnosis and study of the inhibitory effect of copper nanoparticles before and after Erythromycin loading on *Pseudomonas aeruginosa*. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 928(6), 062003.
- Hussien, I. A., Habib, K. A., & Jassim, K. A. (2012). Bacterial colonization of burn wounds. *Baghdad Science Journal*, 9(4), 623–631.
- Iroha, I. R., Okoye, E., Osigwe, C. A., Moses, I. B., Ejikeugwu, C. P., & Nwakaeze, A. E. (2017). Isolation, phenotypic characterization and prevalence of ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species from orthopedic wounds in National Orthopedic Hospital Enugu (NOHE), South East Nigeria. *J Pharma Care Health Sys*, 4(4), 1–5.
- Jabalamehi, F., Mirsalehian, A., Khoramian, B., Aligholi, M., Khoramrooz, S. S., Asadollahi, P., Taherikalani, M., & Emaneini, M. (2012). Evaluation of biofilm production and characterization of genes encoding type III secretion system among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. *Burns*, 38(8), 1192–1197.
- Jafari-Sales, A., Bagherizadeh, Y., Arzani-Birgani, P., Shirali, M., & Shahniani, A. R. (2018). Study of Antibiotic Resistance and Prevalence of bla-TEM gene in *Klebsiella pneumoniae* Strains isolated from Children with UTI in Tabriz Hospitals. *Focus On Medical Sciences Journal*, 4(1), 9–13.
- Jain, A., & Singh, K. (2007). Recent advances in the management of nosocomial infections. *JK Science*, 9(1), 3–8.
- Jakovljević, M., Jokić, S., Molnar, M., Jašić, M., Babić, J., Jukić, H., & Banjari, I. (2019). Bioactive profile of various *Salvia officinalis* L. preparations. *Plants*, 8(3), 55.
- Japoni, A., Alborzi, A., Kalani, M., Nasiri, J., Hayati, M., & Farshad, S. (2006). Susceptibility patterns and cross-resistance of antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients in the South of Iran. *Burns*, 32(3), 343–347.

- Jawad, A. M., Aljamali, N. M., Jwad, S. M., MJ, A., & MJ, S. (2020). Development and preparation of ciprofloxacin drug derivatives for treatment of microbial contamination in hospitals and environment. *Indian Journal of Forensic Medicine & Toxicology*, *14*(2), 1115–1122.
- Jawezt, E., Melnick, A., Brooks, G. F., Carrol, K. C. B., JS, M. S. A., & Mietzner, T. A. (2013). *Medical microbiology, 26th editon*. McGraw-Hill Companies, Inc., New York.
- Jebakumar, N. (2015). *Development of in vitro infection model methods for Gram-negative bacteria to assess potential broad-spectrum anti-virulence inhibitors*.
- Joudeh, N., & Linke, D. (2022). Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists. *Journal of Nanobiotechnology*, *20*(1), 262.
- Kamaruzzaman, N. F., Kendall, S., & Good, L. (2017). Targeting the hard to reach: challenges and novel strategies in the treatment of intracellular bacterial infections. *British Journal of Pharmacology*, *174*(14), 2225–2236.
- Karam, G., Chastre, J., Wilcox, M. H., & Vincent, J.-L. (2016). Antibiotic strategies in the era of multidrug resistance. *Critical Care*, *20*, 1–9.
- Kesharwani, P., Gorain, B., Low, S. Y., Tan, S. A., Ling, E. C. S., Lim, Y. K., Chin, C. M., Lee, P. Y., Lee, C. M., & Ooi, C. H. (2018). Nanotechnology based approaches for anti-diabetic drugs delivery. *Diabetes Research and Clinical Practice*, *136*, 52–77.
- Khameneh, B., Iranshahy, M., Soheili, V., & Bazzaz, B. S. F. (2019). *Review on plant antimicrobials: a mechanistic viewpoint. Antimicrobial Resistance Infection Control* *8*: 118.
- Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2019). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. In *Arabian Journal of Chemistry* (Vol. 12, Issue 7, pp. 908–931). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>
- Khan, N. T., & Jamil Khan, M. (2017). Biogenic nanoparticles: an introduction to what they are and how they are produced. *Int J Biotechnol Bioeng*, *3*(3), 66–70.
- Khuzim, K., Bamagoos, A., & Ahmed, M. M. M. (2022). Prevalence and Distribution of Multidrug Resistance *Klebsiella Pneumoniae*. *Cell*, *10*, 11.

- Kingsley, J. D., Dou, H., Morehead, J., Rabinow, B., Gendelman, H. E., & Destache, C. J. (2006). Nanotechnology: A focus on nanoparticles as a drug delivery system. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, *1*(3), 340–350. <https://doi.org/10.1007/s11481-006-9032-4>
- Koubaa, F. G., Abdennabi, R., Salah, A. S. Ben, & El Feki, A. (2019). Microwave extraction of *Salvia officinalis* essential oil and assessment of its GC-MS identification and protective effects versus vanadium-induced nephrotoxicity in Wistar rats models. *Archives of Physiology and Biochemistry*, *125*(5), 404–413.
- Kronvall, G., Giske, C. G., & Kahlmeter, G. (2011). Setting interpretive breakpoints for antimicrobial susceptibility testing using disk diffusion. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *38*(4), 281–290.
- Kumar, M. S., Yasoda, K. Y., Batabyal, S. K., & Kothurkar, N. K. (2018). Carbon-polyaniline nanocomposites as supercapacitor materials. *Materials Research Express*, *5*(4), 045505.
- Kutralam-Muniasamy, G., Pérez-Guevara, F., Elizalde-Martínez, I., & Shruti, V. C. (2020). Review of current trends, advances and analytical challenges for microplastics contamination in Latin America. *Environmental Pollution*, *267*, 115463.
- Küünal, S., Rauwel, P., & Rauwel, E. (2018). Plant extract mediated synthesis of nanoparticles. In *Emerging applications of nanoparticles and architecture nanostructures* (pp. 411–446). Elsevier.
- Ladin, K., Tighiouart, H., Bronzi, O., Koch-Weser, S., Wong, J. B., Levine, S., Agarwal, A., Ren, L., Degnan, J., & Sewall, L. N. (2023). Effectiveness of an intervention to improve decision making for older patients with advanced chronic kidney disease: a randomized controlled trial. *Annals of Internal Medicine*, *176*(1), 29–38.
- Lambert, P. (2002). Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of the Royal Society of Medicine*, *95*(Suppl 41), 22.
- Lawlor, M. S., O’connor, C., & Miller, V. L. (2007). Yersiniabactin is a virulence factor for *Klebsiella pneumoniae* during pulmonary infection. *Infection and Immunity*, *75*(3), 1463–1472.
- Lee, C.-R., Lee, J. H., Park, K. S., Jeon, J. H., Kim, Y. B., Cha, C.-J., Jeong, B. C., & Lee, S. H. (2017). Antimicrobial resistance of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology, hypervirulence-associated determinants, and

- resistance mechanisms. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 483.
- Lee, J.-H., Wood, T. K., & Lee, J. (2015). Roles of indole as an interspecies and interkingdom signaling molecule. *Trends in Microbiology*, 23(11), 707–718.
- Lee, S. H., & Jun, B.-H. (2019). Silver nanoparticles: synthesis and application for nanomedicine. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(4), 865.
- Li, X.-Z., Plésiat, P., & Nikaido, H. (2015). The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(2), 337–418.
- Limoli, D. H., Jones, C. J., & Wozniak, D. J. (2015). Bacterial extracellular polysaccharides in biofilm formation and function. *Microbial Biofilms*, 223–247.
- Liu, J., Du, S.-X., Zhang, J.-N., Liu, S.-H., Zhou, Y.-Y., & Wang, X.-R. (2019). Spreading of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* ST131 and *Klebsiella pneumoniae* ST11 in patients with pneumonia: a molecular epidemiological study. *Chinese Medical Journal*, 132(16), 1894–1902.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4), 402–408.
- Loo, C.-Y., Young, P. M., Cavaliere, R., Whitchurch, C. B., Lee, W.-H., & Rohanizadeh, R. (2014). Silver nanoparticles enhance *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm detachment. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 40(6), 719–729.
- MacFadin, J. F. (2000). *Biochemical test for identification medical Bacteriology*. Lippincott.
- Mahomoodally, M. F. (2013). Traditional medicines in Africa: an appraisal of ten potent African medicinal plants. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.
- Makhrmash, J. H., Al-Aidy, S. R., & Qaddoori, B. H. (2022a). Investigation of biofilm virulence genes prevalence in *Klebsiella pneumoniae* isolated from the urinary tract infections. *Archives of Razi Institute*, 77(4), 1421–1427.
- Mancuso, G., Midiri, A., Gerace, E., & Biondo, C. (2021). Bacterial antibiotic resistance: the most critical pathogens. *Pathogens*, 10(10), 1310.

- Marambio-Jones, C., & Hoek, E. M. V. (2010). A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *Journal of Nanoparticle Research*, *12*, 1531–1551.
- Marchant, R., & Banat, I. M. (2012). Biosurfactants: a sustainable replacement for chemical surfactants? *Biotechnology Letters*, *34*, 1597–1605.
- Martinez, J. L. (2014). General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug Discovery Today: Technologies*, *11*, 33–39.
- Marza Hamza, N., M Hussain, K. A., & Al-Safy, A. H. (2022). Synthesis of nanoscale xerogel/MTX and study its effects on the liver and kidney tissue and level of IgG in rats with rheumatoid arthritis. *Journal of Nanostructures*, *12*(2), 254–261.
- Masadeh, M. M., Alzoubi, K. H., Al-Azzam, S. I., Khabour, O. F., & Al-Buhairan, A. M. (2016). Ciprofloxacin-induced antibacterial activity is attenuated by pretreatment with antioxidant agents. *Pathogens*, *5*(1), 28.
- Massimelli, M. J., Beassoni, P. R., Forrellad, M. A., Barra, J. L., Garrido, M. N., Domenech, C. E., & Lisa, A. T. (2005). Identification, cloning, and expression of *Pseudomonas aeruginosa* phosphorylcholine phosphatase gene. *Current Microbiology*, *50*, 251–256.
- MCPS, F. (2012). Bacterial profile of burn wound infections in burn patients. *Ann Pak Inst Med Sci*, *8*(1), 54–57.
- Medici, S., Peana, M., Nurchi, V. M., & Zoroddu, M. A. (2019). Medical uses of silver: history, myths, and scientific evidence. *Journal of Medicinal Chemistry*, *62*(13), 5923–5943.
- Metwally, D. M., Alajmi, R. A., El-Khadragy, M. F., & Al-Quraishy, S. (2021). Silver Nanoparticles Biosynthesized With *Salvia officinalis* Leaf Exert Protective Effect on Hepatic Tissue Injury Induced by *Plasmodium chabaudi*. *Frontiers in Veterinary Science*, *7*. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.620665>
- Min, K. B., & Yoon, S. S. (2020). Transcriptome analysis reveals that the RNA polymerase-binding protein DksA1 has pleiotropic functions in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry*, *295*(12), 3851–3864.
- Mishra, S., & Das, P. K. (2021). *Green synthesis of silver nanoparticles: properties and action against bacterial biofilms*. <https://doi.org/10.5281/zenodo.5775463>

- Morris, S., & Cerceo, E. (2020). Trends, epidemiology, and management of multi-drug resistant gram-negative bacterial infections in the hospitalized setting. *Antibiotics*, 9(4), 196.
- Moser, C., Jensen, P. Ø., Thomsen, K., Kolpen, M., Rybtke, M., Lauland, A. S., Trøstrup, H., & Tolker-Nielsen, T. (2021). Immune responses to *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections. *Frontiers in Immunology*, 12, 625597.
- Naas, T., Oueslati, S., Bonnin, R. A., Dabos, M. L., Zavala, A., Dortet, L., Retailleau, P., & Iorga, B. I. (2017). Beta-lactamase database (BLDB)–structure and function. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 32(1), 917–919.
- Nadeem, S. F., Gohar, U. F., Tahir, S. F., Mukhtar, H., Pornpukdeewattana, S., Nukthamna, P., Moula Ali, A. M., Bavisetty, S. C. B., & Massa, S. (2020). Antimicrobial resistance: more than 70 years of war between humans and bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 46(5), 578–599.
- Namasivayam, S. K. R., Preethi, M., Bharani, A., Robin, G., & Latha, B. (2012). Biofilm inhibitory effect of silver nanoparticles coated catheter against *Staphylococcus aureus* and evaluation of its synergistic effects with antibiotics. *Int J Biol Pharm Res*, 3(2), 259–265.
- Naqid, I. A., Hussein, N. R., Balatay, A. A., Saeed, K. A., & Ahmed, H. A. (2020). The antimicrobial resistance pattern of *Klebsiella pneumonia* isolated from the clinical specimens in Duhok City in Kurdistan Region of Iraq. *Journal of Kermanshah University of Medical Sciences*, 24(2).
- Nasrollahzadeh, M., Sajjadi, M., Sajadi, S. M., & Issaabadi, Z. (2019). Green nanotechnology. In *Interface science and technology* (Vol. 28, pp. 145–198). Elsevier.
- Navon-Venezia, S., Kondratyeva, K., & Carattoli, A. (2017). *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(3), 252–275.
- Navya, P. N., Kaphle, A., Srinivas, S. P., Bhargava, S. K., Rotello, V. M., & Daima, H. K. (2019). Current trends and challenges in cancer management and therapy using designer nanomaterials. *Nano Convergence*, 6(1), 23.
- Nel, A. E., Mädler, L., Velegol, D., Xia, T., Hoek, E. M. V., Somasundaran, P., Klaessig, F., Castranova, V., & Thompson, M. (2009). Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. *Nature Materials*, 8(7), 543–557.

- Nima, M., & Al-Ramahi, S. K. (2020). Isolation and identification *Klebsiella pneumoniae* bacteria from different clinical sources of human in Al-Diwaniyah city. *Al-Qadisiyah Journal of Pure Science*, 25(3), 1–6.
- Niveditha, S., Pramodhini, S., Umadevi, S., Kumar, S., & Stephen, S. (2012). The isolation and the biofilm formation of uropathogens in the patients with catheter associated urinary tract infections (UTIs). *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, 6(9), 1478.
- Ochońska, D., Ścibik, Ł., & Brzywczy-Włoch, M. (2021). Biofilm formation of clinical *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from tracheostomy tubes and their association with antimicrobial resistance, virulence and genetic diversity. *Pathogens*, 10(10), 1345.
- Ödemiş, Ö., Özdemir, S., Gonca, S., Arslantaş, A., & Ağirtaş, M. S. (2022). The study on biological activities of silver nanoparticles produced via green synthesis method using *Salvia officinalis* and *Thymus vulgaris*. *Turkish Journal of Chemistry*, 46(5), 1417–1428. <https://doi.org/10.55730/1300-0527.3448>
- Okaiyeto, K., Hoppe, H., & Okoh, A. I. (2021). Plant-Based Synthesis of Silver Nanoparticles Using Aqueous Leaf Extract of *Salvia officinalis*: Characterization and its Antiplasmodial Activity. *Journal of Cluster Science*, 32(1), 101–109. <https://doi.org/10.1007/s10876-020-01766-y>
- Okasha, H. A. S., & Meheissen, M. A. (2017). In Vitro Activity of Colistin and Vancomycin or Azithromycin Combinations on Extensively Drug Resistant *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates. *Advances in Microbiology*, 7(01), 71.
- Olar, R., Badea, M., & Chifiriuc, M. C. (2022). Metal complexes—A promising approach to target biofilm associated infections. *Molecules*, 27(3), 758.
- Oyedara, O. O., Fadare, O. A., Franco-Frías, E., Heredia, N., & García, S. (2023). Computational assessment of phytochemicals of medicinal plants from Mexico as potential inhibitors of *Salmonella enterica* efflux pump AcrB protein. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 41(5), 1776–1789.
- Paczosa, M. K., & Mecsas, J. (2016). *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(3), 629–661.

- Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T.-J., & Cheng, Z. (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances*, 37(1), 177–192.
- Para, R. A., Fomda, B. A., Jan, R. A., Shah, S., & Koul, P. A. (2018). Microbial etiology in hospitalized North Indian adults with community-acquired pneumonia. *Lung India: Official Organ of Indian Chest Society*, 35(2), 108.
- Parasuraman, P., Devadatha, B., Sarma, V. V., Ranganathan, S., Ampasala, D. R., & Siddhardha, B. (2020). Anti-quorum sensing and antibiofilm activities of *Blastobotrys parvus* PPR3 against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbial Pathogenesis*, 138, 103811.
- Parsons, J. G., Peralta-Videa, J. R., & Gardea-Torresdey, J. L. (2007). Use of plants in biotechnology: synthesis of metal nanoparticles by inactivated plant tissues, plant extracts, and living plants. *Developments in Environmental Science*, 5, 463–485.
- Pasquina-Lemonche, L., Burns, J., Turner, R. D., Kumar, S., Tank, R., Mullin, N., Wilson, J. S., Chakrabarti, B., Bullough, P. A., & Foster, S. J. (2020). The architecture of the Gram-positive bacterial cell wall. *Nature*, 582(7811), 294–297.
- Patilaya, P., Husori, D. I., & Marhafanny, L. (2019). Susceptibility of *klebsiella pneumoniae* isolated from pus specimens of post-surgery patients in Medan, Indonesia to selected antibiotics. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 7(22), 3861–3864. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2019.520>
- Patra, J. K., Das, G., Fraceto, L. F., Campos, E. V. R., Rodriguez-Torres, M. del P., Acosta-Torres, L. S., Diaz-Torres, L. A., Grillo, R., Swamy, M. K., & Sharma, S. (2018). Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *Journal of Nanobiotechnology*, 16, 1–33.
- Perween, N., Prakash, S. K., & Siddiqui, O. (2015). Multi drug resistant *Klebsiella* isolates in burn patients: a comparative study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, 9(9), DC14.
- Pezzoni, M., Pizarro, R. A., & Costa, C. S. (2020). Role of quorum sensing in UVA-induced biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 166(8), 735–750.
- Piperaki, E.-T., Syrogiannopoulos, G. A., Tzouveleki, L. S., & Daikos, G. L. (2017). *Klebsiella pneumoniae*: virulence, biofilm and antimicrobial resistance. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 36(10), 1002–1005.

- Preda, V. G., & Săndulescu, O. (2019). Communication is the key: biofilms, quorum sensing, formation and prevention. *Discoveries*, 7(3).
- Priyanka, A., Akshatha, K., Deekshit, V. K., Prarthana, J., & Akhila, D. S. (2020). *Klebsiella pneumoniae* infections and antimicrobial drug resistance. *Model Organisms for Microbial Pathogenesis, Biofilm Formation and Antimicrobial Drug Discovery*, 195–225.
- Qu, J., Zhang, J., Chen, Y., Huang, Y., Xie, Y., Zhou, M., Li, Y., Shi, D., Xu, J., & Wang, Q. (2022). Aetiology of severe community acquired pneumonia in adults identified by combined detection methods: a multi-centre prospective study in China. *Emerging Microbes & Infections*, 11(1), 556–566.
- Rafael De Oliveira, J., Polyana Das Graças, ç, Vilela, F., Batista De Aguiar Almeida, R., Felipe, ç, De Oliveira, E., Antonio, C., Carvalho, T., Esteves, S., Camargo, A., Olavo, A., Jorge, C., & Dias De Oliveira, ç Luciane. (2019). Antimicrobial activity of noncytotoxic concentrations of *Salvia officinalis* extract against bacterial and fungal species from the oral cavity.
- Rafique, M., Tahir, M. B., Rafique, M. S., & Hamza, M. (2020). History and fundamentals of nanoscience and nanotechnology. In *Nanotechnology and Photocatalysis for Environmental Applications* (pp. 1–25). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-821192-2.00001-2>
- Raju, D. V., Nagarajan, A., Pandit, S., Nag, M., Lahiri, D., & Upadhye, V. (2022). Effect of bacterial quorum sensing and mechanism of antimicrobial resistance. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 43, 102409.
- Rashid Mahmood, A., & Mansour Hussein, N. (2022). Study of antibiotic resistant genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burns and wounds. *Archives of Razi Institute*, 77(1), 403–411.
- Rehman, A., Patrick, W. M., & Lamont, I. L. (2019). Mechanisms of ciprofloxacin resistance in *pseudomonas aeruginosa*: New approaches to an old problem. In *Journal of Medical Microbiology* (Vol. 68, Issue 1, pp. 1–10). Microbiology Society. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000873>
- Rewatkar, A. R., & Wadher, B. J. (2013). *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*-Biofilm formation Methods. *J Pharm Biol Sci*, 8(5), 36–40.
- Rubio, E. F. (2006). Influence of age on conjunctival bacteria of patients undergoing cataract surgery. *Eye*, 20(4), 447–454.

- Sabir, S., Arshad, M., Ilyas, N., Naz, F., Amjad, M. S., Malik, N. Z., & Chaudhari, S. K. (2022). Protective role of foliar application of green-synthesized silver nanoparticles against wheat stripe rust disease caused by *Puccinia striiformis*. *Green Processing and Synthesis*, *11*(1), 29–43.
- Salah, M., Hussein, M., Rana, I., & Khalid, L. B. (2016). Effect of *Salvia officinalis* L.(Sage) aqueous extract on liver and testicular function of diabetic albino male rats. *Journal of Babylon University/Pure and Applied Sciences*, *24*(4), 83–90.
- Saleh, M. M. (n.d.). *Genomics, Bioinformatics and Phage Therapy Analysis of Multi-drug Resistant Clinical Isolates of Pseudomonas aeruginosa*. <https://www.researchgate.net/publication/360575304>
- Saleh, T. A. (2020). Nanomaterials: Classification, properties, and environmental toxicities. *Environmental Technology & Innovation*, *20*, 101067.
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2001 Cold Spring Harbor Laboratory. *New York (Plainview)*.
- Selim, H. M. M., Mohamed, D. S. S., & Eskander, H. M. G. (2017). Silver nanoparticles: synthesis, medical application, and toxicity effects. *International Journal of Nanotechnology and Allied Sciences*, *1*(1), 45–53.
- Sen, T., & Samanta, S. K. (2015). Medicinal plants, human health and biodiversity: a broad review. *Biotechnological Applications of Biodiversity*, 59–110.
- Sharifi-Rad, J., Sureda, A., Tenore, G. C., Daglia, M., Sharifi-Rad, M., Valussi, M., Tundis, R., Sharifi-Rad, M., Loizzo, M. R., & Ademiluyi, A. O. (2017). Biological activities of essential oils: From plant chemoecology to traditional healing systems. *Molecules*, *22*(1), 70.
- Sharma, P. C., Jain, A., Jain, S., Pahwa, R., & Yar, M. S. (2010). Ciprofloxacin: review on developments in synthetic, analytical, and medicinal aspects. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, *25*(4), 577–589.
- Shehata, M. M. K., Radwan, S. M., & Ali, S. A. M. (2019). Effects of gamma-irradiation on antibiotic resistance and diagnostic molecular markers of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Egyptian cancer patients. *International Journal of Radiation Biology*, *95*(12), 1728–1743.
- Shnaiderman-Torban, A., Navon-Venezia, S., Baron, H., Abu-Ahmad, W., Arielly, H., Zizelski Valenci, G., Nissan, I., Paitan, Y., & Steinman, A.

- (2022). Prevalence and molecular characterization of extended-spectrum β -lactamase producing enterobacterales in healthy community dogs in Israel. *Antibiotics*, *11*(8), 1069.
- Silva, S. T., da Costa Lima, J. L., Rabelo, M. A., Neto, A. M. B., Alves, L. R., da Paz Pereira, J. N., de Souza Lopes, A. C., & Maciel, M. A. V. (2021). Phenotypic and genetic analysis of virulence factors in multidrug-sensitive and multidrug-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Research, Society and Development*, *10*(11), e457101120032–e457101120032.
- Singh, A., Amod, A., Pandey, P., Bose, P., Pingali, M. S., Shivalkar, S., Varadwaj, P. K., Sahoo, A. K., & Samanta, S. K. (2022). Bacterial biofilm infections, their resistance to antibiotics therapy and current treatment strategies. *Biomedical Materials*, *17*(2), 022003.
- Singh, A. K., Yadav, S., Chauhan, B. S., Nandy, N., Singh, R., Neogi, K., Roy, J. K., Srikrishna, S., Singh, R. K., & Prakash, P. (2019). Classification of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* based on their in vitro biofilm forming capabilities and elucidation of the biofilm matrix chemistry with special reference to the protein content. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 669.
- Singh, M. P., Singh, P., Li, H.-B., Song, Q.-Q., & Singh, R. K. (2020). Microbial biofilms: development, structure, and their social assemblage for beneficial applications. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Microbial Biofilms* (pp. 125–138). Elsevier.
- Sızmaç, S., Bingöllü, S., Erdem, E., Kibar, F., Koltaş, S., Yağmur, M., & Ersöz, R. (2016). Polymicrobial infection of the cornea due to contact lens wear. *Turkish Journal of Ophthalmology*, *46*(2), 83.
- Song, J.-H., Min, S.-H., Kim, S.-G., Cho, Y., & Ahn, S.-H. (2022). Multi-functionalization strategies using nanomaterials: A review and case study in sensing applications. *International Journal of Precision Engineering and Manufacturing-Green Technology*, *9*(1), 323–347.
- Sousa, D., Cenicerós, A., Galeiras, R., Pértega-Díaz, S., Gutiérrez-Urbón, J.-M., Rodríguez-Mayo, M., López-Suso, E., Mourelo-Fariña, M., & Llinares, P. (2018). Microbiology in burns patients with blood stream infections: trends over time and during the course of hospitalization. *Infectious Diseases*, *50*(4), 289–296.
- Streeter, K., & Katouli, M. (2016). *Pseudomonas aeruginosa: a review of their pathogenesis and prevalence in clinical settings and the environment*.

- Taneja, N., Emmanuel, R., Chari, P. S., & Sharma, M. (2004). A prospective study of hospital-acquired infections in burn patients at a tertiary care referral centre in North India. *Burns*, *30*(7), 665–669.
- Tchakal-Mesbahi, A., Abdouni, M. A., & Metref, M. (2021). Prevalence Of multidrug-resistant bacteria isolated from burn wounds In Algeria. *Annals of Burns and Fire Disasters*, *34*(2), 150.
- Tenover, F. C. (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *The American Journal of Medicine*, *119*(6), S3–S10.
- Terreni, M., Taccani, M., & Pregnotato, M. (2021). New antibiotics for multidrug-resistant bacterial strains: Latest research developments and future perspectives. In *Molecules* (Vol. 26, Issue 9). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules26092671>
- TOMULESCU, C., MOSCOVICI, M., LUPESCU, I., STOICA, R. M., & VAMANU, A. (2021). A Review: *Klebsiella pneumoniae*, *Klebisellaoxytoca* and Biotechnology. *Romanian Biotechnological Letters*, *26*(3), 2567–2586. <https://doi.org/10.25083/rbl/26.3/2567.2586>
- Toyofuku, M., Roschitzki, B., Riedel, K., & Eberl, L. (2012). Identification of proteins associated with the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm extracellular matrix. *Journal of Proteome Research*, *11*(10), 4906–4915.
- Truan, D., Vasil, A., Stonehouse, M., Vasil, M. L., & Pohl, E. (2013). High-level over-expression, purification, and crystallization of a novel phospholipase C/sphingomyelinase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Expression and Purification*, *90*(1), 40–46.
- Uruén, C., Chopo-Escuin, G., Tommassen, J., Mainar-Jaime, R. C., & Arenas, J. (2020). Biofilms as promoters of bacterial antibiotic resistance and tolerance. *Antibiotics*, *10*(1), 3.
- Valarmathi, S., Pandian, M. R., & Senthilkumar, B. (2013). Incidence and screening of wound infection causing microorganisms. *Journal of Academy Industry Research*, *1*(8), 508–510.
- Vandepitte, J. (2003). *Basic laboratory procedures in clinical bacteriology*. World Health Organization.
- Venditti, I. (2019). Morphologies and functionalities of polymeric nanocarriers as chemical tools for drug delivery: A review. *Journal of King Saud University-Science*, *31*(3), 398–411.

- Vidyavathi, M., & Srividya, G. (2018). A review on ciprofloxacin: Dosage form perspective. In *International Journal of Applied Pharmaceutics* (Vol. 10, Issue 4, pp. 6–10). Innovare Academics Sciences Pvt. Ltd. <https://doi.org/10.22159/ijap.2018v10i4.25315>
- Vuotto, C., Longo, F., Pascolini, C., Donelli, G., Balice, M. P., Libori, M. F., Tiracchia, V., Salvia, A., & Varaldo, P. E. (2017). Biofilm formation and antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* urinary strains. *Journal of Applied Microbiology*, *123*(4), 1003–1018.
- Wahab, S., Khan, T., Adil, M., & Khan, A. (2021). Mechanistic aspects of plant-based silver nanoparticles against multi-drug resistant bacteria. In *Heliyon* (Vol. 7, Issue 7). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07448>
- Wang, G. (2018). Nanotechnology: The new features. *ArXiv Preprint ArXiv:1812.04939*.
- Wood, S. J., Kuzel, T. M., & Shafikhani, S. H. (2023). *Pseudomonas aeruginosa*: Infections, Animal Modeling, and Therapeutics. In *Cells* (Vol. 12, Issue 1). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells12010199>
- Xiao, Y., Zou, H., Li, J., Song, T., Lv, W., Wang, W., Wang, Z., & Tao, S. (2022). Impact of quorum sensing signaling molecules in gram-negative bacteria on host cells: current understanding and future perspectives. *Gut Microbes*, *14*(1), 2039048.
- Yadegarynia, D., Karimi, J., Rahmati Roodsari, S., & Arab-Mazar, Z. (2017). Evaluation of the antimicrobial resistance of *Klebsiella pneumoniae* by E-Test method in Khatam_ol_Anbia Hospital, Tehran, Iran, during 2015. *Infection Epidemiology and Microbiology*, *3*(1), 9–11.
- Yahav, D., Eliakim-Raz, N., Leibovici, L., & Paul, M. (2016). Bloodstream infections in older patients. *Virulence*, *7*(3), 341–352.
- Yassin, M. T., Mostafa, A. A.-F., Al-Askar, A. A., & Al-Otibi, F. O. (2022). Synergistic antibacterial activity of green synthesized silver nanomaterials with colistin antibiotic against multidrug-resistant bacterial pathogens. *Crystals*, *12*(8), 1057.
- Yossef, H. S. (2014). Enhancement of Pro-inflammatory Cytokine by Partial Purified Lipopolysaccharide Extracted from Invasive *Klebsiella Pneumoniae*. *Al-Nahrain Journal of Science*, *17*(3), 111–115.

- Zhang, F., & Cheng, W. (2022). The mechanism of bacterial resistance and potential bacteriostatic strategies. *Antibiotics*, *11*(9), 1215.
- Zhapouni, A., Farshad, S., & Alborzi, A. (2009). *Pseudomonas aeruginosa*: burn infection, treatment and antibacterial resistance.
- Zheng, J., Lin, Z., Chen, C., Chen, Z., Lin, F., Wu, Y., Yang, S., Sun, X., Yao, W., & Li, D. (2018). Biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae* bacteremia strains was found to be associated with CC23 and the presence of wcaG. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *8*, 21.
- Zhou, G., Shi, Q.-S., Huang, X.-M., & Xie, X.-B. (2015). The three bacterial lines of defense against antimicrobial agents. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(9), 21711–21733.
- Zhu, J., Wang, T., Chen, L., & Du, H. (2021). Virulence factors in hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 642484.
- Zhu, Y., Hao, W., Wang, X., Ouyang, J., Deng, X., Yu, H., & Wang, Y. (2022). Antimicrobial peptides, conventional antibiotics, and their synergistic utility for the treatment of drug-resistant infections. *Medicinal Research Reviews*, *42*(4), 1377–1422.

The summary

The present study aimed to evaluate the inhibitory effectiveness of the green nanocomposite from *Salvia officinalis* leaves on the resistance of bacteria isolated from wounds and burns before and after loading ciprofloxacin.

100 isolates out of 120 isolates of both sexes with ages ranging from (1 day to 70 years) were collected from burn and wound patients hospitalized. The number of wound isolates was 60 isolates and the number of burn isolates was 40 isolates. The isolates were transferred in the form of swab placed in a sterile carrier medium from Imam Hussein Medical City Hospital in the holy city of Karbala. All isolates were cultured on MacConkey agar, Blood agar and incubated for 24 hours at 37°C. The bacteria were diagnosed by VITEK-2 Compact System and the result was *Klebsiella pneumonia* 24%, *Pseudomonas aeruginosa* 21%, *E. coli* 8%, 10% *Coagulase negative staphylococcus*, *Staphylococcus aureus* 12%, *Enterobacter aerogenes* 5%, *Acinetobacter baumannii complex* 7% , *Enterococcus Avium* 4%, *Enterobacter cloacae* 2%, *Serratia* 1%, *Enterococcus gallinarum* 6%

The results of the Atomic Force Microscope (AFM) showed that the loading process gave indications of the success of this process by the presence of changes on the surface of the nanocomposites loaded with the drug, and that all these changes are within the nanoscale sizes and dimensions, which are consistent with the results of the Fourier transform infrared technique (FT-IR), as the scanning electron microscopy (SEM) images of the AgNPs nanocomposite *Salvia* revealed homogeneity of the distribution of the molecules and most of the shapes of the molecules are cubic. The most common bacterial isolates were treated with five treatments and three concentrations $C1 > MIC$, the second concentration $C2 = MIC$, the third concentration $C3 < MIC$. The first treatment T1 was the antibiotic CIP, the second treatment T2 was the aqueous extract of *Salvia officinalis* leaves, the third treatment T3 was the

nanocomposite, the fourth treatment was the aqueous extract loaded with CIP, and the fifth treatment was the nanocomposite loaded with CIP. The results showed clear inhibition zones in the fourth and fifth treatments, the aqueous extract loaded with CIP and the nanocomposite loaded with CIP. The silver nanoparticles showed the highest synergistic efficiency with the antibiotic ciprofloxacin against multidrug-resistant *K. pneumoniae* bacteria, recording an inhibition rate of 14.33 ± 1.41 , while against *P. aeruginosa* bacteria, an inhibition rate of 13.44 ± 0.88 was recorded.

The results of the investigation of the resistance genes *pgaA* gene in *K. pneumoniae* bacteria showed The *pslA* gene in *Pseudomonas aeruginosa* bacteria, the isolates have the ability to form biofilm by 100% on Congo red agar. The results of the gene expression of *Pseudomonas aeruginosa* bacteria using RT-PCR showed that the concentration of $C1 > MIC$ negatively affects the level of gene expression of the *pslA* gene specific to the formation of biofilm of *P. aeruginosa* bacteria, as the aqueous extract loaded with the drug and the nanocomposite loaded with the drug act as an antibiofilm, which affects its resistance to antibiotics.

The current study concluded that the nanocomposites work better when combined with antibiotics, and proved to be highly efficient when accompanied by antibiotics compared to when they were separate.



University of Kerbala
College of Education for Pure Sciences
Department of Biology

**Evaluation of the effectiveness of *Salvia officinalis*
nanocomposite in *Klebsiella pneumoniae*,
Pseudomonas aeruginosa bacteria isolated from
wounds and burns in Karbala city**

A thesis submitted to the Council of the College of Education for
Pure Sciences / University of Kerbala as part of the requirements
for obtaining a Master's degree in Life Sciences

Written by

Baidaa Jamel Nama

B.Sc. in Biology / University of Kerbala-2004

Supervisor

Ass.Prof.Dr

Kiaser Abdulsajjad Mohammed Hussein

2024.A.D.
A.H.

1446