



## تقييم الفعالية الحيوية لجسيمات الفضة النانوية المخلفة من قبل بعض الاحياء المجهرية

رسالة مقدمة إلى

مجلس كلية العلوم - جامعة ميسان

وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير في علوم الحياة  
من قبل الطالبة

نور باسل ابراهيم

بكالوريوس علوم الحياة / جامعة ميسان 2016

بإشراف

أ.م.د. رشيد رحيم حثيت

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

وَلَقَدْ آتَيْنَا دَاوُودَ وَسُلَيْمَانَ عِلْمًا  
وَقَالَا الْحَمْدُ لِلَّهِ الَّذِي فَضَّلَنَا عَلَى  
كَثِيرٍ مِّنْ عِبَادِهِ الْمُؤْمِنِينَ

صدق الله العلي العظيم

سورة النمل آية (15)

## إقرار لجنة المناقشة

نشهد نحن أعضاء لجنة التقويم و المناقشة الموقعين في ادناه بأننا اطلعنا على الرسالة الموسومة  
(ب) تقييم الفعالية الحيوية لجسيمات الفضة النانوية المخلقة من قبل بعض الاحياء المجهرية )  
المقدمة من قبل الطالبة ( نور باسل إبراهيم ) وناقشنا الطالبة في محتوياتها وفيما له علاقة بها ،  
بتاريخ 30 / 12 / 2021 فوجدنا جديرة بالقبول لنيل درجة الماجستير في علوم الحياة .

التوقيع

الأستاذ المساعد

د. زهرة عدنان داخل  
كلية العلوم / جامعة ميسان  
التاريخ : / / 2021  
عضو اللجنة

التوقيع

الأستاذ

د. عبد الأمير عبد الله الموسوي  
كلية التمريض / جامعة البصرة  
التاريخ : / / 2021  
رئيس اللجنة

التوقيع

الأستاذ المساعد

د. رشيد رحيم حنيت  
كلية العلوم / جامعة ميسان  
التاريخ : / / 2021  
عضو اللجنة و المشرف

التوقيع

الأستاذ المساعد

د. منذر عبد الحسن خضير  
كلية العلوم / جامعة ميسان  
التاريخ : / / 2021  
عضو اللجنة

مصادقة عمادة كلية العلوم – جامعة ميسان

التوقيع

الأستاذ

د. صبيح جاسم كاطع  
كلية العلوم / جامعة ميسان  
العميد  
التاريخ : / / 2022

## توصية الأستاذ المشرف

أقر ان إعداد هذه الرسالة جرى تحت إشرافي في قسم علوم الحياة - كلية العلوم - جامعة ميسان - كجزء من متطلبات نيل شهاده الماجستير في علوم الحياة .

### **التوقيع**

الاسم : أ.م.د. رشيد رحيم حنيت

اللقب العلمي : أستاذ مساعد

التاريخ : / / 2022

## توصيه رئيس قسم علوم الحياة

بناءً على التوصية المقدمة من قبل المشرف احيل هذه الرسالة الى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها .

### **التوقيع**

الاسم : أ.م.د. ميثم عبد الكاظم دراج

اللقب العلمي : أستاذ مساعد

التاريخ : / / 2022

## المقومون

المقوم اللغوي :

قومت الرسالة لغوياً من قبل

المقوم العلمي :

قومت الرسالة لغوياً من قبل

## مصادقة عمادة كلية العلوم

بناءً على الصلاحيات المخولة لنا نصادق على ما جاء في قرار لجنة المناقشة في أعلاه .

التوقيع :

الاسم : أ.د. صبيح جاسم كاطع

اللقب العلمي : أستاذ

العنوان : جامعة ميسان / كلية العلوم

التاريخ : / / 2022

## الأعداء

إلى معلم البصرة ومنبع العلم نبينا محمد (صلى الله عليه وآله وسلم)

إلى أماننا صاحب العصر والزمان

إلى من رباني صغيراً، وخمراني مجبها كبيراً، إلى من كناه لهما وراء كل خطوة فضل المحرم والافتاح، و

وراء كل غربة نبل الرجاء والالتواء لابي وأمي مراد الله في عمرهما .

إلى منترني وقروني ومعلمي وملهي ذوالجهد والمجيرة الاستاذ المساعد الدكتور رشيد رحيم حميد

إلى شريك العمر، ورفيق الدرب زوجي مرضي التوازي

إلى التسوس المضيفة في سمائي.. انتمني وانتمواني

## شكر وثناء

أشكر الله الباري عز وجل الذي غمرني برحمته وشملني بمحبته وأفاض علي من نعمه ، فله الحمد وله الشكر والأجلال قولاً وعملاً ، والصلاة والسلام على رسولنا الأكرم محمد بن عبد الله ولآله الطيبين الطاهرين . لا يسعني بعد انجاز رسالتي إلا أن أقف إجلالاً وإكراماً إلى كل من علمني حروف العلم منذ اليوم الأول لرحلة العلم والدراسة ، وأخص بالذكر الأستاذ المساعد الدكتور (رشيد رحيم حنيت) الذي أولاني رعايةً واهتماماً كبيرين ابتداءً من تفضله بقبول الأشراف على رسالتي وعلى ما ابداه من توجيهات وملاحظات علمية قيمة والتي كان لها عظيم الأثر في اكمال هذه الرسالة وإخراجها بشكلها الحالي فجزاه الله عني خير الجزاء و وفقه لما يحب ويرضى .

كما أقدم شكري وتقديري الى عمادة كلية العلوم – جامعة ميسان لما قدمته من التسهيلات لطلبة الدراسات العليا، و وافر الشكر والتقدير الى رئيس قسم علوم الحياة الدكتور (ميثم عبد الكاظم) و إلى أساتذة قسم علوم الحياة وأخص بالذكر الأنسة المدرس (شيماء ربيع بعنون ) لما بذلته من تعاون في إجراء فحوصات DNA والى زملائي طلبة الدراسات العليا هذا العمل ما كان ليتم لو لا مؤازرة أسرتي ومساعدتهم وصبرهم فلهم مني جزيل الشكر و الامتنان .

نور باسل ابراهيم



## الخلاصة

اجريت الدراسة في مختبر الأحياء المجهرية ومختبر الفطريات / كلية العلوم / جامعة ميسان والتي تم خلالها جمع عينات من مختلف اوراق النباتات من مناطق مختلفة في محافظة ميسان خلال الفترة من تشرين الثاني 2019- كانون الثاني 2020 بهدف عزل وتشخيص بكتريا وفطريات النسيج الداخلي لا وراق نباتات قيد الدراسة ، تم جمع 5 انواع من اوراق النباتات من اربعة مواقع في محافظة ميسان (عواشه ، الشبانة ، حديقة كلية العلوم ، حديقة المنزل ) استخدمت طريقة تعقيم السطح لغرض عزل البكتريا والفطريات من النسيج النباتي وقد تم تشخيص اربعة انواع من البكتريا واربعة انواع من الفطريات الموجودة داخل النسيج النباتي لأوراق النباتات ، وجدت الدراسة ان الفطر *Aspergillus terreus* عزل من اوراق النسيج الداخلي لنبات دفلة ، عزل الفطر *Cladosporium uredicola* من نبات السدر ، عزل الفطر *Aspergillus tubingensis* من نبات الريحان و عزل أيضا الفطر *Aspergillus terreus* من نبات الصبار وتم التشخيص المظهري والجزئي بجهاز ال PCR ، وتم تشخيص البكتريا المعزولة من النسيج النباتي بجهاز VITIC 2 COMPACT حيث تم تشخيص بكتريا *Staphylococcus lentus* من اوراق نبات الريحان وبكتريا *Staphylococcus sciuri* من نبات السدر وبكتريا *Staphylococcus hominis* من اوراق نبات البمبر كما تم عزل بكتريا *Staphylococcus vitulinus* من اوراق نبات الدفلة . وتم العمل على تخليق جسيمات الفضة النانوية من رواشح المزارع البكتيرية والفطرية وبينت النتائج ظهور تغير لوني لراشح المزارع المضاف لها  $AgNO_3$  كمؤشر لتكوين جسيمات الفضة النانوية وتم تأكيدها بأجراء الفحوصات الكيميائية والفيزيائية ((Ultra violate visible (UV-Vis) ، Atomic force microscope ، X Ray diffraction (XRD)، Zeta potential (AFM) ، FTIR analysis، (SEM) Scanning electron microscope حيث اظهرت النتائج ان جميع انواع البكتريا والفطريات التي تم الحصول عليها قيد الدراسة منتجة لجزيئات الفضة النانوية ، وقد تم اختبار فعالية الجزيئات الفضية النانوية المخلقة من البكتريا والفطريات ضد بعض انواع من البكتريا المرضية التي تم عزلها من المرضى المراجعين والراقدين لمستشفى الصدر

التعليمي والطفل والولادة في محافظة ميسان . اذ تم عزل وتشخيص 5 انواع من البكتريا المرضية من المصابين بالحروق والتهاب المجاري البولية والتهاب الاذن الوسطى . وقد وجد ان جميع جسيمات الفضة النانوية المحضرة من البكتريا والفطريات تمتلك فعالية ضد العزلات المرضية المختبرة وبأقطار تثبيط مختلفة . كما تم دراسة السمية الخلوية لجسيمات الفضة النانوية ضد كريات الدم الحمر للإنسان واطهرت النتائج بأن الجسيمات النانوية الفضية لا تمتلك اي سمية تجاه كريات الدم الحمر

## المحتويات

الصفحة	العنوان	التسلسل
الفصل الاول : المقدمة		
1	المقدمة Introduction	1-1
2	الهدف من الدراسة The aim of the study	2-1
الفصل الثاني : استعراض المراجع		
3	نبذه تاريخيه	1-2
5	مفهوم النانو تكنولوجي Concept of nanoparticles	2-2
6	الجسيمات النانوية Nanoparticles	3-2
7	خصائص المواد النانوية	4-2
8	الخصائص الميكانيكية	1-4-2
8	الخصائص البصرية	2-4-2
9	نقطة الانصهار	3-4-2
9	النشاط الكيميائي	4-4-2
10	الأحياء المجهرية كمصانع للجسيمات النانوية	5-2
14	جسيمات الفضة النانوية	6-2
14	الاية تخليق الجسيمات النانوية	7-2
16	تطبيقات الجسيمات النانوية الفضية	8-2
18	لماذا الفضة	9-2
19	بكتريا النسيج النباتي كمصدر لإنتاج الجسيمات النانوية Endophytic bacteria as source to produce of nanoparticles	10-2
20	فطريات النسيج النباتي كمصدر لإنتاج الجسيمات النانوية Endophytic fungi as source to produce of nanoparticles	11-2

21	مقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية	13-2
21	آليات مقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية	1-13-2
24	الآلية تأثير أو فعالية جزيئات الفضة النانوية تجاه البكتيريا المرضية	14-2
25	تصنيف الفطريات	15-2
26	البكتيريا السالبة لصبغة جرام	1-15-2
26	<i>E.coli</i>	1-1-15-2
27	<i>Proteus mirabilis</i>	2-1-15-2
27	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3-1-15-2
28	البكتيريا الموجبة لصبغة كرام	2-15-2
28	<i>Staphylococcus aureus</i>	1-2-15-2
29	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2-2-15-2
الفصل الثالث : المواد وطرائق العمل		
30	المواد و طرق العمل	3
30	Equipment and Instrument الاجهزة والمعدات	1-3
32	Chemical Substances المواد الكيميائية	2-3
33	الأوساط الزرعية	3-3
33	الأوساط الزرعية المستخدمة في عزل الفطريات	1-3-3
34	Methods طرائق العمل	4-3
34	Endophytic عزل بكتيريا النسيج النباتي الداخلي bacteria	1-4-3
35	تنقية الانواع البكتيرية وتشخيصها	2-4-3
35	التخليق الحيوي للجزيئات الفضة النانوية من البكتيريا المدروسة	3-4-3
35	Endophytic عزل الفطريات من داخل النسيج النباتي Fungi	5-3

35	تنقية وتشخيص الانواع الفطرية قيد الدراسة	1-5-3
36	التشخيص الجزيئي للفطريات المدروسة	6-3
36	استخلاص ال DNA من الفطريات المعزولة	1-6-3
36	الترحيل الكهربائي ل DNA DNA Electrophoresis	2-6-3
37	تحضير مزيج PCR master mix	3-6-3
38	التخليق الحيوي لجزيئات الفضة النانوية من الفطريات المدروسة	7-3
39	الكشف جسيمات الفضة النانوية المدروسة	8-3
39	التحليل الطيفي للأشعة فوق البنفسجية Ultra violet visible (UV-Vis)	1-8-3
39	التحليل الطيفي للأشعة تحت الحمراء FTIR analysis	2-8-3
40	المجهر الالكتروني الماسح Scanning electron microscope (SEM)	3-8-3
40	مجهر القوة الذرية Atomic force microscope (AFM)	4-8-3
40	حيود الأشعة السينية X Ray diffraction (XRD)	5-8-3
41	جهد زيتا Zeta potential	7-8-3
41	جمع العينات السريرية	9-3
41	زرع العينات	1-9-3
44	تحديد السمية الخلوية لجسيمات الفضة النانوية المدروسة	10-3
45	حفظ العزلات البكتيرية Maintenance of bacterial isolates	11-3
45	اختبار الفعالية ضد بكتيرية لجسيمات الفضة النانوية المدروسة	12-3
46	تحديد التركيز المثبط الأدنى MIC و القاتل الأدنى MBC	13-3

الفصل الرابع : النتائج والمناقشة		
48	النتائج والمناقشة	4
48	العزل والتشخيص	1-4
48	عزل وتشخيص البكتريا	2-4
49	فطريات الاندوفايت Endophytic Fungi	3-4
51	أستخدام تقنية PCR لتشخيص الفطريات	4-4
53	عزل وتشخيص البكتريا المرضية	5-4
54	التخليق الحيوي لجسيمات الفضة النانوية	6-4
60	التحليل الطيفي للأشعة فوق البنفسجية UV_Vis	7-4
65	طيف الأشعة تحت الحمراء FTIR	8-4
68	المجهر الالكتروني الماسح Scanning Electronic Microscope (SEM)	9-4
72	جهد زيتا Zeta Potential	10-4
73	حيود الأشعة السينية XRD	11-4
77	الفحص بأستخدام مجهر القوة الذرية Atomic force microscope (AFM)	12-4
82	السمية الخلوية لجزيئات الفضة النانوية المخلقة AgNps تجاه كريات الدم الحمر	13-4
88	تحديد التركيز المثبط الأدنى MIC والقاتل الأدنى MBC	14-4
الفصل الخامس : الاستنتاجات والتوصيات		
90	الاستنتاجات و التوصيات	5
90	الاستنتاجات	1
91	التوصيات	2
المصادر		
92	المصادر الاجنبية	3
	الملاحق	4

## قائمة الجداول

رقم الجدول	عنوان الجدول	الصفحة
1	بعض انواع البكتريا المنتجة للجسيمات النانوية	12
2	بعض انواع الفطريات المنتجة للجسيمات النانوية	13
3	يمثل الأجهزة والمعدات المخبرية التي استخدمت أثناء مدة الدراسة مع أسم الشركة المصنعة وبلد المنشأ	30
4	يمثل جميع المواد الكيماوية المستخدمة في الدراسة مع أسم الشركة المصنعة وبلد المنشأ	32
5	الأوساط الزرعية الخاصة في عزل البكتريا	33
6	الأوساط الزرعية المستخدمة لعزل البكتريا المرضية	33
7	يوضح اسماء الاوساط الزرعية والتخميرية المستخدمة في عزل وتخمر الفطريات من النبات .	30
8	النباتات المستخدمة في الدراسة الحالية .	34
9	تتابع القواعد النيروجينية باستخدام البادئات ITS1 و ITS4	38
11	برنامج التضخيم ال PCR للبادئات ITS1 و ITS4	38
12	التشخيص الجزيئي للفطريات المعزولة من داخل النسيج النباتي لأوراق بعض النباتات قيد الدراسة .	53
13	العزلات البكتيرية الممرضة المعزولة خلال الدراسة	53
14	المجاميع الفعالة لجسيمات الفضة النانوية المخلقة من راشح العزلة <i>S.lentus</i>	66
15	المجاميع الفعالة لجسيمات الفضة النانوية المعزولة من راشح مزرعة العزلة <i>S. Sciuri</i>	67
16	اقطار تثبيط النمو لجسيمات الفضة النانوية المخلقة من البكتريا تجاه العزلات المرضية	87
17	اقطار تثبيط النمو لجسيمات الفضة النانوية المخلقة من الفطريات باتجاه العزلات المرضية	87
18	نتائج قياس التركيز المثبط الادنى والتركيز القاتل الادنى لجسيمات الفضة	89

النانوية المخلفة من البكتريا و الفطريات المختبرة

قائمة الاشكال

رقم الشكل	عنوان الشكل	الصفحة
1	مفهوما من الأعلى للأسفل ومن الأسفل للأعلى لبناء الجسيمات النانوية	15
2	تطبيقات الجسيمات النانوية الفضية	17
3	اللية تأثير أو فعالية جزيئات الفضة النانوية تجاه البكتريا	25
4	بكتريا <i>Staphylococcus sciuri</i> المعزولة من أوراق نبات السدر	48
5	بكتريا <i>Staphylococcus lentus</i> المعزولة من أوراق نبات الريحان	48
6	بكتريا <i>Staphylococcus hominis</i> المعزولة من اوراق نبات البمبر	49
7	بكتريا <i>Staphylococcus vitulinus</i> المعزولة من اوراق نبات الدفلة	49
8	فطر <i>Aspergillus terreus</i> NRS المعزول من نبات الدفلة	50
9	فطر <i>Aspergillus terreus</i> NRA المعزول من نبات الصبار	50
10	فطر <i>Aspergillus tubingensis</i> المعزول من اوراق نبات الريحان	50
11	فطر <i>Cladosporium uredinicola</i> المعزول من اوراق نبات السدر	50
12	نواتج الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز لمنتج ال PCR باستخدام البادئات (ITS1 , ITS4)	51
13	التغير اللوني لراشح مزرعة السلالة <i>S.lentus</i> A. راشح المزرعة غير المعامل ب AgNo3 . B راشح المزرعة الحاوي على AgNo3 بعد 48 ساعة من الحضان	55
14	التغير اللوني لراشح مزرعة السلالة <i>S.sciuri</i> A. راشح المزرعة غير المعامل ب AgNo3 . B راشح المزرعة الحاوي على AgNo3 بعد 48 ساعة من الحضان	56



56	التغير اللوني لراشح مزرعة مزرعة السلالة <i>S.hominis</i> A. راشح المزرعه غير المعامل ب AgNo3B.(B) راشح المزرعه الحاوي على AgNo3 بعد 48 ساعة من الحضان	15
57	التغير اللوني لراشح مزرعة مزرعة السلالة <i>S.vitulinus</i> A. راشح المزرعه غير المعامل ب AgNo3B.(B) راشح المزرعه الحاوي على AgNo3 بعد 48 ساعة من الحضان	16
58	التغير اللوني لراشح مزرعة الفطر <i>Asp.tubingensis</i> A. راشح المزرعه غير المعامل ب AgNo3B.(B) راشح المزرعه الحاوي على AgNo3 بعد 72 ساعة من الحضان	17
58	التغير اللوني لراشح مزرعة الفطر <i>C. uridinicola</i> A. راشح المزرعه غير المعامل ب AgNo3B.(B) راشح المزرعه الحاوي على AgNo3 بعد 72 ساعة من الحضان	18
59	التغير اللوني لراشح مزرعة الفطر <i>A. terrus</i> A. راشح المزرعه غير المعامل ب AgNo3 (B). راشح المزرعه الحاوي على AgNo3 بعد 72 ساعة من الحضان.	19
59	التغير اللوني لراشح مزرعة الفطر <i>A. terrus</i> A. راشح المزرعه غير المعامل ب AgNo3 (B). راشح المزرعه الحاوي على AgNo بعد 72 ساعة من الحضان	20
61	طيف الاشعة فوق البنفسجية لراشح مزرعة السلالة <i>S. lentus</i>	21
61	طيف الاشعة فوق البنفسجية لراشح مزرعة السلالة <i>S. Sciuri</i>	22
62	طيف الاشعة فوق البنفسجية لراشح مزرعة السلالة <i>S. hominis</i>	23
62	طيف الاشعة فوق البنفسجية لراشح مزرعة السلالة <i>S. vitulinus</i>	24
63	طيف الاشعة فوق البنفسجية لراشح الفطر <i>A. terreus</i> NRS المعزول من النسيج الداخلي لنبات الدفلة	25
63	طيف الاشعة فوق البنفسجية لراشح الفطر <i>A. terreus</i> NRA المعزول من النسيج الداخلي لنبات الصبار	26

64	طيف الاشعة فوق البنفسجية لراشح الفطر <i>A.tubingensis</i>	27
64	طيف الاشعة فوق البنفسجية لراشح <i>C. uredinicola</i>	28
65	يوضح طيف الأشعة تحت الحمراء لجسيمات الفضة النانوية لراشح العزلة <i>S.lentus</i>	29
67	يوضح طيف الاشعة تحت الحمراء لجسيمات الفضة النانوية لراشح العزلة <i>S. Sciuri</i>	30
68	صور المجهر الالكتروني SEM لجسيمات الفضة النانوية المخلقة من العزلة البكتيرية <i>S. lentus</i>	31
69	صور المجهر الالكتروني SEM لجسيمات الفضة النانوية المخلقة من العزلة البكتيرية <i>S. sciuri</i>	32
70	صور المجهر الالكتروني SEM لجسيمات الفضة النانوية المخلقة من راشح الفطر <i>Asp.tubingensis</i>	33
70	صور المجهر الالكتروني SEM لجسيمات الفضة النانوية المخلقة من راشح الفطر <i>C.uredinicola</i>	34
71	صور المجهر الالكتروني SEM لجسيمات الفضة النانوية المخلقة من راشح الفطر <i>Asp.terrus1 NRS</i>	35
71	صور المجهر الالكتروني SEM لجسيمات الفضة النانوية المخلقة من راشح الفطر <i>Asp.terrus2 NRS</i>	36
72	جهد زيتا لجزيئات الفضة النانوية AgNps لراشح مزرعه العزلة <i>S. lentus</i>	37
72	جهد زيتا لجزيئات الفضة النانوية لراشح مزرعه السلالة الفطرية <i>A. terreus</i>	38
74	نمط حيود الاشعة السينية لجسيمات الفضة النانوية المخلقة من بكتريا <i>S. lentus</i>	39
75	نمط حيود الاشعة السينية لجسيمات الفضة النانوية المخلقة من بكتريا <i>S. Sciuri</i>	40
75	نمط حيود الاشعة السينية لجسيمات الفضة النانوية المخلقة من فطر <i>A. terreus</i>	41

76	نمط حيود الاشعة السينية لجسيمات الفضة النانوية المخلقة من <i>Asp.tubingensis</i> الفطر	42
76	نمط حيود الاشعة السينية لجسيمات الفضة النانوية المخلقة من الفطر <i>C. uridinicola</i>	43
78	صورة ثنائية الابعاد لراشح العزلة <i>S.lentus</i> بواسطة مجهر القوة الذرية	44
78	صورة ثلاثية الابعاد لراشح العزلة <i>S.lentus</i> بواسطة مجهر القوة الذرية	45
79	صورة ثنائية الابعاد لراشح العزلة <i>S.sciuri</i> بواسطة مجهر القوة الذرية	46
79	صورة ثلاثية الابعاد لراشح العزلة <i>S.sciuri</i> بواسطة مجهر القوة الذرية	47
80	صورة ثنائية الابعاد لراشح الفطر <i>A. terreus</i> بواسطة مجهر القوة الذرية	48
80	صورة ثنائية الابعاد لراشح الفطر <i>A. terreus</i> بواسطة مجهر القوة الذرية	49
81	صورة ثنائية الابعاد لراشح الفطر <i>C. uredinicola</i> بواسطة مجهر القوة الذرية	50
81	صورة ثلاثية الابعاد لراشح الفطر <i>C. uredinicola</i> بواسطة مجهر القوة الذرية	51
84	فعالية الجسيمات النانوية الفضية لراشح المزرعة البكتيرية <i>S. Lentus</i>	52
84	فعالية الجسيمات النانوية الفضية لراشح مزرعة العزلة البكتيرية <i>S.sciuri</i>	53
85	فعالية الجسيمات النانوية الفضية لراشح مزرعة العزلة الفطرية <i>A. terreus</i> NRA	54
85	الفعالية التثبيطية لـ AgNo3 لراشح المزرعة الفطرية <i>A. terreus</i> NRA	55
86	الفعالية التثبيطية لـ AgNo3 لراشح المزرعة الفطرية <i>A. tubingensis</i>	56
86	الفعالية التثبيطية لـ AgNo3 لراشح بالمزرعة الفطرية <i>C. uridinicola</i>	57

87	الفعالية التثبيطية للمضاد الحيوي Gentamycin تجاه العزلات البكتريا المرضية	58
----	--	----

# الفصل الأول

## المقدمة

# Chapter one Introduction

## Introduction

## 1 المقدمة

يعد علم تكنولوجيا النانو Nanotechnology علماً حديثاً نشوء يتضمن تصنيع وتطوير المواد إلى جزيئات نانوية (Naveen *et al.*, 2010) إذ يتراوح معدل أحجام الجزيئات النانوية ما بين 1-100 نانومتر ولهذا يمكن استعمالها في الطب والطاقة والتشخيص والبصريات والالكترونيات (Saxena *et al.*, 2014). تمتلك هذه الجزيئات خصائص فريدة بالاعتماد على الحجم والشكل المظهري والتركيب الكيميائي لها (Ravindran *et al.*, 2013). هنالك طرق متعددة لتخليق الجزيئات النانوية منها الطرق الفيزيائية والكيميائية والبيولوجية (Xu *et al.*, 2004). الطرق الفيزيائية والكيميائية مكلفة اقتصادياً و ذات تأثير سلبي في صحة الإنسان وكذلك البيئة تحتاج إلى تهيئة ظروف خاصة مثل توفير مواد أولية كيميائية سامة عادةً ومصدر للطاقة و درجة حرارة وضغط عالٍ، لهذا فإن تحضير الجزيئات النانوية باعتماد الطرق البيولوجية عادة يعود لسهولةها وكونها آمنة ورخيصة وايضا صديقة للبيئة (Ahmad *et al.*, 2011) في الآونة الأخيرة ازداد التوجه نحو استخدام مصادر حيوية متوفرة وذات تكلفة منخفضة كالأحياء المجهرية، والنباتات وكان أكثرها استخداماً هي الفطريات لما امتازت به عن بقية المصادر مثل البكتريا والنباتات لتحملها الظروف البيئية غير المناسبة (Saha *et al.*, 2010)، كما تمتاز الفطريات بامتلاكها كتلة حيوية Biomass كبيرة وتعد مصدراً لإنتاج الأنزيمات الخارج خلوية، لهذا تستعمل لتصنيع الجزيئات النانوية من خلال اختزال بعض المواد كالمعادن وتحويلها إلى جزيئات نانوية (Rai *et al.*, 2009).

تعد الجسيمات النانوية (NPs) الوحدة الأساسية لتقنية النانو والتي تتضمن جسيمات عضوية مثل جسيمات الكربون النانوية أو جسيمات غير عضوية كالألمنيوم والذهب والفضة والنحاس بسبب امتلاكها خصائص فيزيائية وكيميائية متميزة وتلعب دوراً كبيراً في تطوير الأجهزة النانوية الجديدة والتي يمكن استخدامها في العديد من التطبيقات الفيزيائية والبيولوجية والكيميائية والطبية والصيدلانية وغيرها (Gusseme *et al.*, 2013). ومن أهم تلك الجسيمات أو الجزيئات هي جزيئات الفضة النانوية إذ تتميز بأنها ذات تكلفة اقتصادية منخفضة فضلاً عن كونها غير سامة وآمنة بيئياً وإمكانية استعمالها في تطبيقات متنوعة، إذ يمكن ان تستعمل على نطاق واسع في مجال الطب النانوي (Wu *et al.*, 2008).

من جملة تطبيقات الجسيمات الفضة النانوية AgNPs امتلاكها فعالية مضادة لمدى واسع من البكتريا الممرضة والفطريات وبعض السلالات المقاومة للمضادات الحيوية والتي أصبحت تمثل مشكلة حقيقية فمثلا بكتريا (MRSA) *Methicilin resistant Staphlococcus aureus* أصبحت تشكل مشكلة عالمية في المجال الطبي لذلك ظهرت حاجة ملحة للبحث عن عوامل غير عضوية ومن مواد طبيعية كمضادات للجراثيم ، لذلك فأن تكنولوجيا علم النانو فتحت الأفق في مجال طب النانو ، وتحضير وصناعة الجزيئات الثانوية التي تعد بديلاً يمكن ان يحل كمضاد حيوي لحل مشكلة المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية (MRD) *Multiple Resistance Drugs* التي تظهرها معظم الكائنات المجهرية (Emily.,2010)

تعمل جزيئات الفضة النانوية AgNps على أحداث تحطم او ضرر في الغشاء البلازمي للبكتريا فتفقد البكتريا المحتويات السايوبلازمية ، أو تثبيط عملية التضاعف للمادة الوراثية للبكتريا DNA ، كما يمكن ان تثبط قدرة الأنزيمات البكتيرية حيث لا يستطيع الكائن المجهرى ان يطور مقاومته بسهولة للجسيمات النانوية كما يحصل في المقاومة للمضادات الحيوية (Zhou *et al.*, 2012)

كما تمتلك جسيمات الفضة النانوية دوراً في تثبيط الغشاء الحيوي (BioFilm) للعديد من الانواع البكتيرية المرضية كما لهذه الجزيئات القدرة على تثبيط عوامل الضراوة المنتجة من قبل بعض الانواع البكتيرية المرضية (Gurunthan *et al.*,2014; Lee *et al.*, 2014).

## 2-1 الهدف من الدراسة

- 1- عزل وتشخيص فطريات وبكتريا النسيج النباتي الداخلي Endophytic Microorganism بالطرق الجزيئية و كذلك عزل وتشخيص بعض انواع البكتريا الممرضة للإنسان .
- 2- تخليق جزيئات الفضية النانوية باستخدام التخليق الحيوي Biosynthesis من الأحياء المجهرية .
- 3- تحديد خصائص تلك الجزيئات الفضية النانوية المخلقة حيوياً باستخدام تقنانان فيزيائية وكيميائية مثل ( SEM ، AFM ، FTIR ، XRD ، Zeta potential ، UV-vis ) .
- 4- دراسة الفعالية التثبيطية للجزيئات النانوية المصنعة تجاه بعض انواع البكتريا المرضية للإنسان.

الفصل الثاني

استعراض المراجع

**Chapter Two**  
**Literature Review**



## 2 استعراض المراجع

## Literature Review

## 1-2 نبذة تاريخية عن اكتشاف المواد النانوية

لا تعرف البدايات الاولى لاستخدام الانسان المادة ذات الحجم النانوي ، لكن منذ الآف السنين استعمل الانسان النانو دون أن يعرف مفهوم ذلك المصطلح غير انه من الواضح أن اوائل الناس الذين استعملوا هذه التقنية دون أن يدركوا ماهيتها هم صانعو الزجاج في العصور الوسطى اذ أستعملوا في تكوين الزجاج حبيبات الذهب النانوية الغروية في تكوين الزجاج فقد كان كاس الملك الروماني لايكورجوس Lycurgus والذي يعود تأريخه الى القرن الرابع الميلادي والموجود في المتحف البريطاني يحتوي على جزيئات من الذهب والفضة بحجم نانوي ، حيث أظهرت نتائج الفحص بأستخدام المجهر الإلكتروني أن جزيئات الفضة والذهب بحجم 70 نانومتر والتي تقترب من حجم الأطوال الموجية للضوء المرئي لهذا السبب يتغير لون كأس الملك من اللون الاخضر الى اللون الاحمر الغامق عند تعرضه للضوء (Savag,2012 and Ashby *et al* .,2009) كما أن العرب والمسلمين حظاً من هذه التقنية فقد كانت السيوف الدمشقية والتي صنعت في القرن الثامن الميلادي والتي عرف عنها بأنها تقطع السيوف الأوربية وكذلك الصخور فهي تعد من اقدم التطبيقات لهذه التقنية ومن خلال فحوصات أجريت على عينات من نصول تلك السيوف بواسطة المجهر الإلكتروني قام بها الباحث في علوم المواد بجامعة Dresden التقنية الالمانية Peter Paufl حيث بين بأن السيوف الدمشقية تدخل في تركيبها مواد نانوية تعطيها صلابة أكثر، حيث عثر فريقة على تراكيب لأنابيب بأحجام نانوية والتي تتميز بصلابتها وخفة وزنها (Lilehei., 2010) وجود احدى المقتنيات في المتحف البريطاني تؤكد أن صانعي الزجاج قبل حوالي الفي عام استخدموا حبيبات الذهب النانوية الغروية للتلوين دون ان يدركوا ماهيتها (الصالحي والضويان ،2007) . في العام 1959 اعطى العالم ريتشارد فينمان R.Feynman تصورا خلافا عن أمكانية تغيير خواص اي مادة عن طريق اعادة ترتيب ذراتها ، وذلك خلال محاضرة القاها امام الجمعية الفيزيائية الامريكية بعنوان (هناك متسع كبير في القاع There is plenty of rooms at

( bottom ) والتي كانت بمثابة الشرارة الاولى لتفجير ثورة تقنية النانو Nanotechnology ( Feynman,1959) ( Tc et al., 1974) .

وفي عام 1974 اطلق العالم الياباني نوريو تانيجوتشي Norio Taniguchi مصطلح تقنية النانو Nanotechnology في مؤتمر الجمعية اليابانية للهندسة الدقيقة من خلال ورقة التي يبين فيها أن تقنية النانو تركز على عمليات تتضمن فصل واندماج وإعادة تشكيل المواد بواسطة ذرة أو جزيئة واحدة فقط (Koodalia and Klabunde.,2012) وفي عام 1981 وهو عام اختراع المجهر الإلكتروني الماسح Scanning electron microscope (SEM) بواسطة العالمين جيرد بيننج Gerd Binnig وهينريك روهرير Heinrich Rohrer أزهرت البحوث المتعلقة بالنانو بدراسة التصنيع النانوي وتراكيبه للعديد من المواد . قد حصل العالمان على جائزة نوبل في الفيزياء عام 1986 بسبب هذا الاختراع الكبير (Binnig and Rohrer .,1986) ، أعقب هذا الاختراع بفترة وجيزة اختراع مجهر القوة الذرية Atomic Force Microscope (AFM) مما ساعد في سهولة وتسريع عملية فهم الخواص الذرية والجزيئية والذي ساعد في وصف ومعالجة المواد على المستوى النانوي.

اما عالم الرياضيات الأمريكي Eric Drexler و مؤلف كتاب ( محركات التكوين Engines of creation ) الذي أشار فيه للمخاطر المحتملة لتقنية النانو مثل صنع مركبات ومحركات نانوية تستطيع ان تستنسخ نفسها ولا يمكن الحد من أنتشارها ، كما أشار في كتابه هذا الى الافكار الاساسية لتقنية النانو مثل إمكانية القدرة على صناعة اي مادة بواسطة رصف مكوناتها الذرية واحدة تلو الاخرى ويعد هذا العالم اول من حصل على درجة الدكتوراه في موضوع تقنية النانو الجزيئية Molecular Nanotechnology وذلك عام 1999 .

ونشر العالم اريك دريكسلر عام 1986 اول بحث في موضوع يتعلق بتطبيقات النانو تكنولوجي (Drexler, 1986) . وفي عام 1991 تمكن العالم سوميو ليجما Sumio Lijima من اكتشاف انابيب الكربون النانوية والتي ساهمت بشكل كبير في تطور تقنية النانو . وفي عام 1998 أكتشف ترانزستور أنابيب الكربون النانوية من قبل فريق من الباحثين في جامعة Delft ، اذ يلعب

ترانزستور أنابيب الكربون النانوية دورا فعال في مجال الالكترونيات . وفي عام 2000 استطاع العالم الفلسطيني منير نايفة تصنيع عائلة من حبيبات السيليكون اصغرها ذات قطر 1 نانومتر ، والذي رسم صورة لقلب بجانبه حرف P بأستخدام الذرات المفردة في الاشارة الى حبه لفلسطين (الصالحي والضويان ، 2007) .

اما في عام 2004 تمكن العالمان الروسيان أندرية غييم وكونستانتين نوفو سيلوف من أنتاج وتطوير وعزل مادة تدعى الكرافيت وهي مادة نانوية والتي تمتاز بكونها ثنائية الابعاد سداسية الترتيب وتتألف من طبقة من ذرات الكربون وبعرض ذرة واحدة تمتلك صفات فريدة من نوعها من الصلابة وقلة السمك وهذا ما يجعلها منافساً قوياً للسليكون . في عالم الألكترونيات أيضاً حازا العالمان على جائزة نوبل عام 2010 عن هذا العمل الكبير (Hazen et al ., 2013) وبتطور التقانات الحديثة اصبح امراً ممكناً التفاعل مع عالم الذرات والجسيمات النانوية من الناحية العلمية.

## 2-2 مفهوم النانو تكنولوجي Concept of nanoparticles

استطاع الانسان بعد اختراع المجاهر الحديثة مثل المجهر النفقي الماسح والمجهر الالكتروني الماسح ومجهر القوة الذرية من رؤية ودراسة الاجسام على المستوى الذري الدقيق ، وقد ساعد ذلك في تغيير هيكله وترتيب ذرات المادة ، مما نتج عن ذلك مواد جديدة بخصائص فريدة من نوعها ، ما تمكن من تصغير المادة للحجم النانوي بطرق مختلفة ، كما لاحظ العلماء ان خصائص بعض المواد تتغير عند تصغيرها للحجم النانوي لابعاد لا تتجاوز 100 نانومتر (Wang et al.,2005). من المعروف ان ترتيب الذرات في جزيء معين يمنح تلك الجزيئات صفات جديدة تعتمد اعتماداً كلياً على الترتيب الذي تتخذه الذرات لتشكل الجزيء فمثلاً كل من حجر الألماس والفحم مصنوعات من عنصر الكربون C ولكن ترتيب الذرات في كل منها مختلف عن الآخر . وقد استغل العلماء هذه الخصائص في انتاج مواد واجهزة وادوات تخدم البشرية وهو ما اطلق عليه مصطلح النانوتكنولوجي أي تقنية النانو تستند هذه التقنية على خاصية كلما صغر حجم الجسيمات زادت نسبة مساحة السطح الى الحجم ومن هذه الخصائص الزيادة في سرعة التفاعلات الكيميائية وكذلك خصائص فيزيائية مثل تأثيرات قوانين الميكانيك الكمي (Wang et al.,2012). وكذلك زيادة صلابة المعادن

وقلة الوزن وزيادة المقاومة الكهربائية وأيضاً تحول بعض المواد من الحالة الصلبة الى الحالة السائلة في درجات الحرارة الاعتيادية مثل الذهب وتحول بعض المواد الى الشفافية مثل النحاس (Contescu and Putyera.;2009) ولا تعد تقنية النانو علماً جديداً من العلوم بل وسيلة جديدة للرؤية والدراسة . ويستخدم بعض الباحثين احيانا مصطلح تقنية الصغائر للتعبير عن تقنية النانو رغم عدم دقة التعريف فهو لا يحدد مجاله في المقياس النانوي . ولا يقصد بتقنية النانو المقياس النانوي بحد ذاته وإنما يقصد بها التقنية التي تتعامل مع جسيمات بهذا المقياس بهدف انتاج مواد وادوات وأجهزة بكفاءة عالية ، ولا يعني ذلك أن الأدوات والأجهزة يكون حجمها في الحجم النانوي أيضا ، بل قد يدخل في تركيبها جسيمات نانوية ، مثل الهواتف النقالة وبمعنى آخر أن المتر يحتوي مليار جزء من النانومتر ، وهذا المقياس أصغر من طول موجة الضوء المرئي ، وأقل بمائة ألف مرة من سمك شعرة الإنسان ، تشير التطورات العلمية في الالونه الأخيره أن تقنية النانو ساهمت بشكل كبير في التقدم العلمي في مجال البحث والتكنولوجيا . تعرف تقنية النانو أنها دراسة وتطبيق الأشياء أو الأجسام الصغيرة جدا التي يمكن استخدامها في جميع المجالات مثل الكيمياء والفيزياء والبايولوجيا وعلوم المواد الهندسيه .

### 3-2 الجسيمات النانوية Nanoparticles

الجسيمات النانوية عبارة عن جسم أساسي يعمل كوحدة كاملة كما يشير المصطلح أو الأسم نانو في اليونانية أو الأغرريقية تعني (dwarf) أو الشبي المتناهي في الصغر والذي يقل قطره عن 100 نانوميتر .وصغر حجم هذه الجسيمات اكسبها أهميه كبيرة جدا بسبب الخصائص الجديدة التي ابتدها المواد على المستوى النانوي اي على مستوى التلاعب الذري وهذه خاصية مهمة والتي هي زيادة في مساحة السطحية الى نسبة الحجم الذي يغير الخواص الميكانيكية والحرارية .وله تأثير كبير على التطبيقات الطبية الحيوية المتنوعة ، مثل الأجهزة التشخيصية ، والطبية ، لممارسة الرعاية الصحية على وجه الخصوص وبأماكنيات كبيرة في مجموعة واسعة من التطبيقات مثل العوامل المضادة للميكروبات. يعد تطوير طرق جديدة لتخليق الجسيمات النانوية مجال بحث فعال و تعود زيادة الاهتمام في هذا المجال الى تميز الجسيمات النانوية في خصائصها الفيزيائية والكيميائية والألكترونية والكهربائية والميكانيكية والمغناطيسية والحرارية والعازلة والضوئية والبيولوجية مقارنة

بخصائص المواد السائبة (Shmid1992; Daniel and Astruc 2004) . يؤدي تقليل حجم الجسيمات الى تأثيرات واضحة على الخصائص الفيزيائية للجسيمات النانوية . كما يعود التغيير في خصائصها الفيزيائية الى مساحة السطح الكبيرة ، والحصر المكاني ، والعيوب المنخفضة . تختلف الجسيمات النانوية أختلافاً كبيراً عن المواد السائبة نظراً لرنينها السطحي ، وتشتت رايلي المعزز ، وتبعثر رامان عادي السطح ، وتأثير الحجم الكمي ، والمغناطيسية الفائقة . لذلك ، فإنها تعمل كوحدات أساسية للألكترونيات الضوئية ، ومجموعة من أجهزة الاستشعار الكيميائية والحيوية ، بناءً على حجمها وشكلها وبلوراتها (Ramanavicius *et al.* 2005) صنفت الجسيمات النانوية الى مجموعتين الجسيمات النانوية العضوية والجسيمات النانوية غير العضوية أثارت الجسيمات النانوية غير العضوية اهتماما كبيرا نظرا لخصائصها المادية والوظيفية الفائقة والمتعددة الاستخدامات كذلك بسبب ميزة حجم النانو فإنه يستخدم بسهولة لأغراض كثيرة منها الاستخدام الدوائي والصناعي والزراعي ومجالات أخرى مختلفة ، على الرغم من نجاح الطرق الكيميائية والفيزيائية في إنتاج الجسيمات النانوية إلا انها تعاني من قيود معينة مثل ارتفاع تكلفة الإنتاج ، التلوث بالمنتجات الثانوية الخطرة وطول الوقت اللازم للتخليق . (Nagajyothi and Lee, 2011) لذلك فإن طرق التخليق الحيوي للنانو (التوليف الأخضر) آثار اهتمام العلماء في مجالات العلوم والصناعة (Ahmad *et al.*, 2011) لذلك أتجه العلماء بأن تكون الكائنات الحية الدقيقة والمستخلصات النباتية أفضل الطرق البديلة عن الطرق الفيزيائية والكيميائية في تخليق الجسيمات النانوية لان طرق التخليق الحيوي سهلة واقتصادية وصديقة للبيئة لذلك يمكن للمصادر الحيوية مثل البكتريا والفطريات والخمائر والطحالب والنباتات أن تكون ضمن جزء من استراتيجيات التركيب الحيوي الحديثة والقائمة على التفاعلات الأنزيمية لقد تم اجراء العديد من الأبحاث حول تخليق الجسيمات النانوية من النظام البيولوجي لتطبيقها في مجال الاستخدامات الطبية الحيوية والصيدلانية والتجميلية والبيئية. (Harekrishna *et al.*, 2009)

## 4-2 خصائص المواد النانوية

عندما يقترب حجم الجزيئات من المقياس النانوي لوحظ أن خصائصها تتغير في بعض الاحيان بعد أن كانت خصائصها الفيزيائية ثابتة ، لهذا أخذت تلك المواد اهتماماً واسعاً بفعل تلك الخصائص

الجديدة ، فضلا عن التطبيقات الجديدة في مختلف الحقول (Garg, 2011) . تشير المراجع الى أن هنالك سببين رئيسيين في الاختلاف النوعي لخصائص المواد النانوية عن المواد الأعتيادية ، السبب الاول زيادة المساحة السطحية حيث تمتلك مساحة سطحية كبيرة اذا ما قورنت مع المساحة السطحية لجزيئات المواد الاعتيادية وهذا يجعل المواد النانوية أكثر نشاطا كيميائيا فيؤدي الى تغير في الخصائص المغناطيسية والكهربائية وخواص أخرى مقارنة بالمادة ذات الحجم الأكبر ، فالمساحة السطحية الكبيرة دليل على أن لا توجد ذرة بعيدة عن سطح المادة ولهذا فأن عمل الذرات في هذه المواقع يكون بطاقة اعلى وهذا يؤثر بشكل كبير على خصائص المواد (Smith *et al.*, 2008) ان نسبة الذرات المتواجدة على سطح الجزيئات النانوية أعلى من نسبة الذرات التي في الداخل وهي أعلى نسبة تواجد الذرات السطحية في جزيئات المواد الأعتيادية غير النانوية الأكبر حجما وبما أن التفاعلات الكيميائية تحصل عند السطح فأن المواد النانوية تصبح أكثر نشاطاً من مثيلاتها ذات الحيز الأكبر حجماً (Hewakuruppu *et al.*, 2013). أما السبب الثاني فهو تأثيرات الكم quantum إذ تلعب دوراً في التحكم بخواص الجزيئات ضمن حدود المقياس النانوي فتؤثر في الخصائص الفيزيائية والكيميائية للمواد (Roduner, 2006) وهذه الاسباب ادت الى أن تمتاز الجزيئات النانوية بالخصائص التالية :

#### 1-4-2 الخصائص الميكانيكية

تحتل الخصائص الميكانيكية المراتب الأولى على قائمة الخصائص المستفيدة من تصغير حجم الجزيئات النانوية و وجود أعداد كبيرة من الذرات السطحية لتلك المواد حيث يؤدي ذلك الى زيادة الصلادة Hardness وكذلك مقاومة تأثير الأتقال المسلطة عليها من خلال تصغير حجم جزيئاتها التي تكون بحجم ذات بعد واحد أو اثنين أو ثلاث ومثال ذلك الاختلاف في صلابة الكربون عندما تحول من الماس الى الكرافيت (Guoxin xie and Luo,2013).

#### 2-4-2 الخصائص البصرية

يؤثر حجم الجسيمات في تغيير الخصائص البصرية للمادة بأحداث حالات الانكسار الضوئي أو التشتت لسطح تلك الجزيئات النانوية فتظهر الخصائص البصرية الجديدة وغير المتوقعه فقد أشارت

دراسة (Taylor et al (2013) بأن صغر حجم الجسيمات يسبب حصر الألكترونات ضمن نطاق ضيق وتنتج تأثيرات الكم ، مثال ذلك لون مادة الذهب الطبيعي اصفر ذهبي لكن تظهر جزيئات الذهب النانوية اللون متباين الاحمر الغامق الى الاسود كلما صغرت حجم جزيئاته اي الحجم النانوي بينما النحاس والذي يمتاز بكونه معتم عند الحيز الاعتيادي يصبح شفاف مرئي ضمن الحيز النانوي (Zong et al., 2005).

### 2-4-3 نقطة الانصهار

تتغير قيم درجة حرارة انصهار المواد عندما يقترب حجم المواد من المقياس النانوي ، حيث تتخفض درجة أنصهار المواد مع صغر حجمها وهذه تعد ظاهرة بارزه في المواد النانوية الحجم والتي تذوب بدرجة حرارة اقل بمئات المرات من درجة انصهار المواد الاعتيادية ويعود السبب في ذلك الى صغر حجم جزيئاتها وكذلك الزيادة في حجم اسطحها الخارجية اي نسبة مساحة السطح الى الحجم كبيرة مقارنة بالمواد الاعتيادية وايضاً أختلاف مواضع ترتيب الذرات كما هو الحال في فلز الذهب في حجمة الاعتيادي حيث تصل درجة انصهار الى 1064م° والتي يتحول عندها الى فلز الذهب النقي من الحالة الصلبة الى الحالة السائلة وتعرف بنقطة الانصهار Melting point وأن قيم نقاط درجة الانصهار لفلز الذهب تتناقص بشكل واضح عندما يصل حجم جسيمات فلز الذهب الى المقياس النانوي وتصل الى 300 C° عند وصول اقطار جسيمات الذهب الى نحو (2.5) نانومتر (Martinez. 2006).

### 2-4-4 النشاط الكيميائي

أن وجود اعداد كبيرة من الذرات السطحية للجسيمات النانوية بفعل كبر المساحة السطحية زاد من النشاط الكيميائي للمواد النانوية مقارنة بالمواد الاعتيادية فالنفاعل الكيميائي يحصل بشكل أكبر على سطحها وليس السبب في ذلك كبر المساحة السطحية فقط وإنما أيضاً بسبب التغيرات الحاصلة في حالة الترابط للذرات السطحية ففي حالة المواد البلورية النانوية يكون ارتباط ذراتها له تأثير في التفاعل والنشاط التحفيزي وخصائص الامتصاص للمواد المستعملة طبياً فمثلاً الذهب كمعدن يكون خامل لكن عندما يكون تحت أو ضمن المقياس النانوي فإنه يكون فعال كيميائياً

(Stratakis and Garcia., 2012). أثبتت الدراسات ومنها دراسة (Garg , (2011) زيادة قدرة الجزيئات النانوية على النفاذ واختراق الحواجز الحيوية وهذا ما أدى الى تسهيل عملية وصول الادوية والعقاقير للجزء المصاب من الجسم عبر الاغشية والاعوية الدموية .

## 5-2 الأحياء المجهرية كمصانع للجسيمات النانوية .

في الآونة الأخيرة تم استكشاف الموارد الحيوية بشكل متكرر من أجل التخليق الحيوي للجسيمات النانوية المعدنية والتي عادة ما توفر طرق متنوعة واقتصادية وصديقة للبيئة لتصنيع الجسيمات النانوية المعدنية (Gurunathan .,2019) . والتي تتميز بخصائص فيزيائية وكيميائية وبيولوجية مثيرة للأهتمام. تعتمد الطرق الحيوية لتكوين الجسيمات النانوية المعدنية على الاستخدام المنتظم للمستخلصات النباتية والكائنات الحية الدقيقة مثل البكتريا والخمائر والفطريات في التخليق الحيوي (Huang et al., 2017).

من منظور وظيفي وميكانيكي تمتلك الكائنات الحية الدقيقة قدراً كبيراً من الإمكانيات للتخليق الحيوي الصديق للبيئة وخالي من استخدام المواد الكيميائية الخطرة . اذ تعتبر الكائنات الحية الدقيقة فعالة من حيث التكلفة ولا تتطلب متطلبات طاقة عالية بالإضافة الى ذلك إمكانية تراكم و إزالة السموم من المعادن الثقيلة من خلال أنزيمات الأختزال والتي تحول الأملاح المعدنية الى جزيئاتها النانوية المقابلة (Khan et al .,2018).

تم استخدام التركيب الحيوي لخلايا البكتريا كمصانع للجسيمات النانوية المعدنية المختلفة من خارج الخلية وداخل الخلايا، يحدث التخليق الحيوي خارج الخلية البكتيرية بعد تطبيق تقنيات متنوعة مثل استخدام الكتلة الحيوية البكتيرية ، استخدام معلق المزارع البكتيرية و باستخدام المزارع الخالية من الخلايا البكتيرية (Kashyap et al.,2013) .أستخدمت الجسيمات النانوية في مجموعة واسعة من التطبيقات ولكن في الغالب للأستخدامات الطبية الحيوية (Nasar et al., 2019, Aldujaili et al., 2020) فقد أظهرت جسيمات الفضة النانوية AgNPs التي تم تصنيعها باستخدام *Bacillus brevis* فعالية ضد ميكروبية تجاه السلالات المقاومة للمضادات مثل المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* و *Salmonella typhi* (Saravanan et al., 2018). كما



ان بكتريا *Aeromonas hydrophila* هي سلالة بكتيرية سالبة لصبغة كرام استخدمت في التخليق الحيوي للجسيمات النانوية لأكسيد الزنك ZnO والتطبيقات المضادة للميكروبات (Sarkar et al., 2012). كما تم انتاج الجسيمات النانوية CuO لأكسيد النحاس الثنائي مؤخرا باستخدام *Halomonas elongate* وتم تأكيد فعاليتها المضادة للسرطان anticancer ضد خطوط الخلايا MCF-7 Cell line و 3T3 بطريق تعتمد على الجرعة (Taran et al., 2018) كما أشارت دراسة اخرى تم فيها فحص ثمانية سلالات بكتيرية للتحقق من إمكاناتها للتخليق الحيوي لل AgNps. أشارت النتائج الى ان سبعة سلالات بكتيرية مزروعة قادرة على انتاج AgNps تحت الضوء ومع ذلك ، كانت ثلاثة فقط قادرة على انتاج AgNps في الظلام (Ahmad et al., 2011). ويوضح الجدول رقم (1) بعض انواع البكتريا المنتجة للجسيمات النانوية ونمط البناء الحيوي والحجم والشكل لهذه الجسيمات تم تطبيق Myco-nanotechnology في التخليق الحيوي للجسيمات المعدنية النانوية المختلفة بنجاح وبالمثل في البكتريا ويمكن ان يكون التخليق الحيوي داخل الخلايا أو خارج الخلية . في التخليق ، داخل الخلايا يتم تحويل أملاح المعادن الى الشكل الاقل سمية في الخيوط الفطرية ، والتي يمكن استخدامها من قبل الفطريات (Gopinath et al., 2015). يتضمن التخليق الحيوي خارج الخلية استخدام المزارع التخمرية (Ahmad et al., 2003) تعد الفطريات أكثر إنتاجية نسبيا من البكتريا في التخليق الحيوي للجسيمات النانوية بسبب وجود عدد من المستقبلات النشطة بيولوجيا، كما وجدت دراسة أن الفطريات الخيطية المختلفة تكون بارعة في التخليق الحيوي ل AuNps حيث اشار الباحثون أن المركبات الفطرية ومكونات الوسائط الفطرية يحتمل ان تلعب دورا في استقرار الجسيمات النانوية اذ تم استخدام ثلاث سلالات مختلفة من الفطريات وهي *Fusarium pullulans* ، *Fusarium oxysporum* ، *Fusarium Sp* . في التخليق الحيوي AuNps (Rautio et al., 2006) ويوضح الجدول (2) بعض انواع الفطريات المنتجة للجسيمات النانوية ونمط بنائها وحجمها وشكلها . كما أشارت احدى الدراسات الى أن التخليق خارج الخلية ل AgNps بأستخدام *Candida glabrata* ادى الى انتاج جسيمات نانوية تمتلك فعالية جيدة مضادة للميكروبات (Jalal et al., 2018).

جدول (1) بعض انواع البكتريا المنتجه الجسيمات النانوية .

المصدر	نمط البناء الحيوي	حجم الجسيمات (nm)	شكل الجسيمات	النوع	البكتريا المستخدمه
Manisha <i>et al.</i> ,(2014)	Extracellular	6-10	Spherical	Ag	<i>Rhodopseudomonas sp</i>
Srivastava <i>et al.</i> ,(2014)	Extracellular	10-40	Spherical	Ag	<i>Halococcus salifodinae</i>
Prakash <i>et al.</i> ,(2010)	Extracellular	10-20	Spherical	Ag	<i>Bacillus megaterium</i>
Singaravelu <i>etal.</i> ,(2007)	Extracellular	8-12	planar		<i>Sargassum wightii</i>
Wypij <i>et al.</i> ,(2016)	Extracellular	13.2	Spherical	Ag	<i>Actinobacter</i>
Prema <i>et al.</i> ,(2016)	Extracellular	10-15	Spherical	Au	<i>Klebsiella pneumonia</i>
Gan <i>et al.</i> ,(2018)	Extracellular	5.1	Spherical	Ag	<i>Bacillus endophyticus</i>
Vijayabharathi <i>et al.</i> ,(2018)	Extracellular	-19.5 20.9	Spherical	Ag	<i>Streptomycesgriseoplanus</i>
Saravanan <i>et al.</i> ,(2018)	Extracellular	41-68	Spherical	Ag	<i>Bacillus brevis</i>
Lv <i>et al.</i> , (2018)	Extracellular	10-16	Spherical	Cu	<i>Shewanella loihica</i>
Shah <i>et al.</i> , (2017)	Extracellular	30-100	Spherical		<i>Halomonas salina</i>
Bao <i>et al.</i> , (2010)	Extracellular	2-3	Round	Cd Te	<i>Escherichia coli</i>
Silver .(2003)	Extracellular	100-200	Spherical	Ag	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
Gurunathan <i>et al.</i> , (2009)	Extracellular	50	Spherical	Ag	<i>Escherichia coli</i>
Husseiny <i>et al.</i> ,(2007)	Extracellular	15-30	Spherical	Au	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Rajeshkumar <i>et al.</i> ,(2013)	Extracellular	50-100nm	Spherical	Ag	<i>Vibrio alginolyticus</i>
Manisha <i>et al.</i> ,(2014)	Extracellular	6-10nm	Spherical	Ag	<i>Rhodopseudomonas sps.</i>
Das <i>et al.</i> ,(2014)	Extracellular	42-92nm	Spherical	Ag	<i>Bacillus strain CS 11</i>

جدول (2) بعض انواع الفطريات المنتجة للجسيمات النانوية .

المصدر	نمط البناء الحيوي	حجم الجسيمات (nm)	شكل الجسيمات	النوع	الفطريات المستخدمة
Kalpna <i>et al.</i> , (2018)	Extracellular	53–69	Spherica	ZnO	<i>Aspergillus niger</i>
Kobashigawa <i>et al.</i> , (2019)	Extracellular	5–65	Ellipsoida	Ag	<i>Trametestrogii</i>
Tripathi <i>et al.</i> , (2018)	Extracellular	32–44	Spherica	Au	<i>Trichoderma harzianum</i>
Shenet <i>et al.</i> , (2017)	Extracellular			Au	<i>Aspergillus sp.</i>
El Domany <i>et al.</i> , (2018)	Extracellular	10–30	Spherica	Au	<i>Pleurotusostreatus</i>
Singhet <i>et al.</i> , (2018)	Extracellular	16–57		Ag	<i>Aspergillus terreus</i>
Neethuet <i>et al.</i> , (2018)	Extracellular	10–15		Au	<i>Penicillium polonicum</i>
Jalalet <i>et al.</i> , (2018)	Extracellular	2–15		Ag	<i>Candida glabrata</i>
Vijayanandan <i>et al.</i> , (2018)	Extracellular	20-29		CoO	<i>Rhodotorulaglutinis</i>
Bawaskar <i>et al.</i> , (2010)	Extracellular	5-25	Spherica	Ag	<i>Fusarium culmorum</i>
Dutta <i>et al.</i> , (2014)	Extracellular	25	spherical	Ag	<i>Penicillum sp.</i>
Ingle <i>et al.</i> , (2009)	Extracellular	5-35	Polydispersed spherical	Ag	<i>Fusarium solani</i>
Desai and Datta, (2015)	Extracellular	30–40	Spherical	Ag	<i>Pencillium notatum</i>
Siva <i>et al.</i> , (2014)	Extracellular	3–24	Spherical	Ag	<i>Penicillium verrucosum</i>
Gade <i>et al.</i> , (2008)	Extracellular	20	Spherical	Ag	<i>Aspergillus niger</i>
Saravanan and Nanda, (2010)	Extracellular	550–600	Polydispersed	Ag	<i>Aspergillus clavatus</i>
Rathna <i>et al.</i> , (2013)	Extracellular	*100	Spherical	Ag	<i>Aspergillus terreus</i>
Vigneshwaran <i>et al.</i> , (2007)	Extracellular	30.5 ± 4.0	Polydispersed	Ag	<i>Pleurotus sajorcaju</i>
Mukherjee <i>et al.</i> , (2001)	Extracellular	2–20	Spherical	Ag	<i>Verticillum sp.</i>

## 6-2 جسيمات الفضة النانوية

وتعتبر جسيمات الفضة النانوية AgNps ذات أهمية كبيرة بسبب الخصائص الفريدة التي تمتلكها مثل الحجم والشكل والخصائص البصرية والكهربائية والمغناطيسية و يمكن استخدامها كمضادات ميكروبية ، وكذلك في تطبيقات الألياف المركبة ، والمواد فائقة التوصيل ، ومنتجات التجميل ، والمكونات الالكترونية .تم استخدام العديد من الطرق الفيزيائية والكيميائية لتجميع واستقرار جسيمات الفضة النانوية (Senapati, 2005) . تعتبر الأساليب الكيميائية هي الأكثر شيوعاً في تخليق جسيمات الفضة النانوية بما في ذلك الاختزال الكيميائي باستخدام مجموعة متنوعة من عوامل الاختزال العضوية والغير عضوية والتقنيات الكهروكيميائية ، و الاختزال الفيزيائي الكيميائي والتحلل الأشعاعي على نطاق واسع لتوليف أو لتخليق الجسيمات النانوية الفضية . في الأونة الأخيرة يعد تجميع الجسيمات النانوية من بين المجالات العلمية الأكثر أثارة للأهتمام ، وهناك أهتمام متزايد بإنتاج الجسيمات النانوية باستخدام الكيمياء الخضراء . عمل الجسيمات النانوية الفضية على الميكروبات : الآلية الدقيقة التي تستخدمها الجسيمات النانوية الفضية لأحداث تأثير مضاد للميكروبات غير معروف بوضوح وهي موضوع نقاش . ومع ذلك ، هناك العديد من النظريات حول عمل الجسيمات النانوية الفضية على الميكروبات لأحداث تأثير قاتل للبكتريا . الجسيمات النانوية لديها القدرة على تثبيط جدار الخلية البكتيرية ثم اختراقها ، وبالتالي تسبب تغييرات هيكلية في غشاء الخلية مثل نفاذية غشاء الخلية وموت الخلية . وهناك تراكم للجسيمات النانوية على سطح الخلية (Sondi and Salopek .; 2004).

## 7-2 الية تخليق الجسيمات النانوية

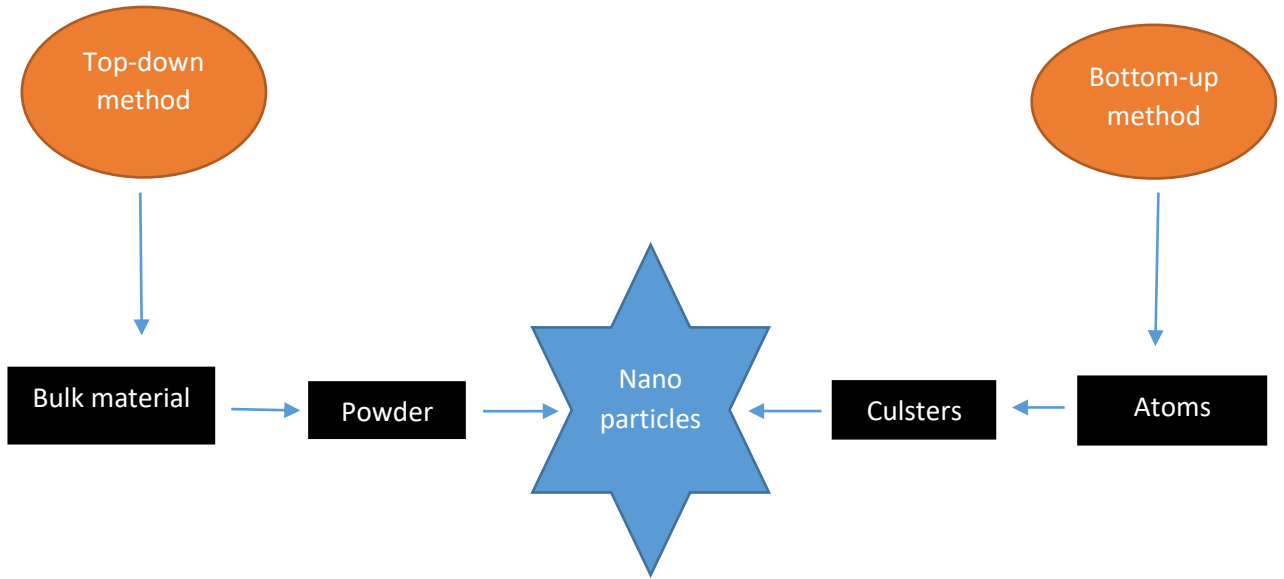
للحصول على جسيمات نانوية بأشكال مختلفه وتطبيقاتها وكذلك من أجل التمييز بين التخليق على المستوى الجزيئي أو التجميع الذاتي وبين الصناعات التقليدية وضع العلماء مفهومين رئيسيين لتخليق الجسيمات النانوية شكل (1) .

### المفهوم الأول: من الأعلى للأسفل Top-Down

يشير هذا المفهوم الى تحول المواد ذات الحجم الكبير الى حجم أصغر وصولاً الى الحجم النانوي المطلوب فأصغر حجم امكن الوصول اليه 100 نانومتر بأستخدام الوسائل التقليدية كالقطع والطحن أو التشريح والحفر أو بواسطة الطرق الفيزيائية كالأشعاع بالليزر أو التفكك الحراري (Koole et al., 2014).

### المفهوم الثاني : من الأسفل للأعلى Bottom-up

يشير هذا المفهوم الى بناء التراكيب النانوية ذرة بعد ذرة وجزئية بعد جزئية لتكون ذو حجم أكبر اذ يتم الحصول على جزيئات تتميز بصغر حجمها اذ تم الحصول عليه بحجم واحد نانومتر ومن الطرق المستعملة طريقة البناء الحيوي Biosynthesis والتي تعتمد على سلسلة تفاعلات ومن أهمها عمليات الأختزال للمواد الحيوية ويمتاز هذا المفهوم بالحصول على قوة ترابط بين الجسيمات النانوية الناتجة وكذلك قلة هدر المادة الأصلية (Ahmed and lee.; 2015) و (Nadaroglu et al., 2017).



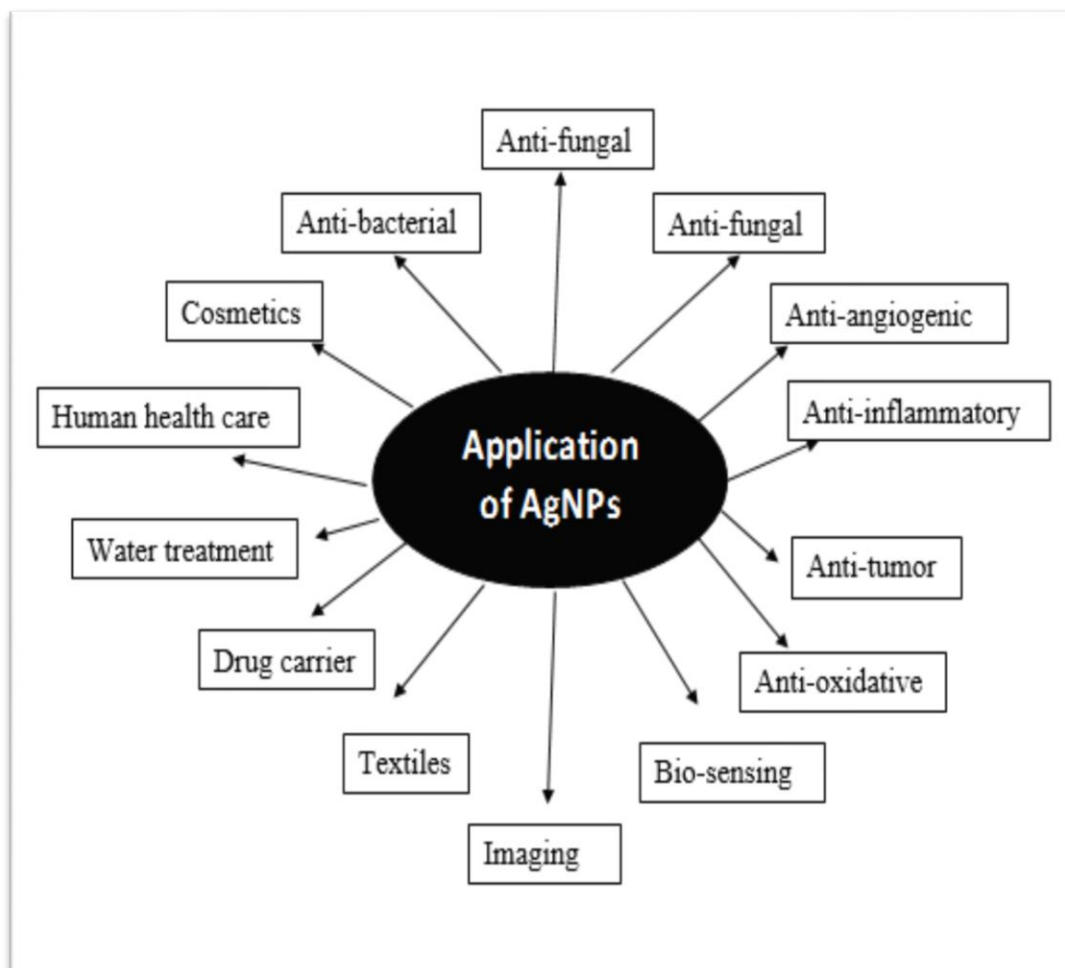
الشكل (1) مفهوما من الأعلى للأسفل ومن الأسفل للأعلى لبناء الجسيمات النانوية

وبصورة عامة يتم أدراج طرق التخليق النانوية الفيزيائية والكيميائية والبايولوجية ضمن المفهومين اعلاه (Khan *et al.*, 2017). اذ تندرج الطرق الفيزيائية ضمن مفهوم التخليق من الأعلى للأسفل Top-down بينما تندرج الطرق الكيميائية والبايولوجية ضمن مفهوم من الاسفل الى الاعلى (Cao and Hu.; 2009) bottom-up

## 8-2 تطبيقات جسيمات الفضة النانوية

تعتبر الجسيمات النانوية ذات أهمية كبيرة ، نظرا لحجمها الصغير للغاية ونسبة سطحها الى حجمها الكبير ، مما يؤدي الى الأختلافات الكيميائية والفيزيائية في خصائصها مقارنة بكميات كبيرة من نفس التركيب الكيميائي ، مثل خصائص ميكانيكية وبيولوجية ومعقمة ، ونشاط تحفيزي ، وموصلية حرارية وكهربائية ، وامتنصاص بصري ونقطة أنصهار (Daniel and Astruc.; 2004). لذلك ، يمكن أن ينتج تصميم وأنتاج مواد بدون تطبيقات عن طريق التحكم في الشكل والحجم على مقياس النانومتر. تظهر الجسيمات النانوية خصائص تعتمد على الحجم والشكل والتي تهم التطبيقات التي تتراوح من التحسس الحيوي والمحفزات الى البصريات والنشاط المضاد للميكروبات ، ترانزستورات الكمبيوتر ، أجهزة الاستشعار الكيميائي ، والمجال الالكتروني اللاسلكي ومخططات الذاكرة . هذه الجسيمات لها أيضا تطبيقات عديدة في مجالات مختلفة من التصوير الطبي ، الفلاتر ، توصيل الأدوية (Tan *et al.*, 2006) وتطبيقات اخرى كما في شكل (2). لفتت الجسيمات النانوية الفضية أنتباه الباحثين بسبب تطبيقات واسعة النطاق في مجالات مثل الدوائر المتكاملة (Kottaus *et al.*, 1997)، (Kasthuri and Rajendran.; 2009). وأجهزة الاستشعار (Kathaus *et al.*, 199). مرشحات بايولوجية تعمل على تصفية ألياف مزيل العرق المضاد للميكروبات (Wen-zheng *et al.*, 2003) وأقطاب الخلية (Klaus-Joerger *et al.*, 2001). وبطاريات ورقية منخفضة التكلفة (اسلاك الفضة النانوية )، (Hong *et al.*, 2006) ومضادات الميكروبات (Cho *et al.*, 2005)، (Durán *et al.*, 2007) والمنسوجات وعدد من التطبيقات البيئية. وقد تسببت الخصائص المضادة للميكروبات للجسيمات النانوية الفضية في استخدام هذه المعادن النانوية في مختلف مجالات الطب ، والصناعات المختلفة ، وتربية الحيوانات ، والتغليف ، والأكسسوارات ، ومستحضرات التجميل والصحة (Durán *et al.*, 2007) كما وجد أن

الجسيمات الفضة النانوية المرتبطة ببروتينات البكتريا المحتوية على الكبريت تتسبب في قتل البكتريا .



الشكل (2) تطبيقات الجسيمات النانوية الفضية

## لماذا الفضة؟ 9-2

الفضة هي احدى العناصر الاساسية التي يتكون منها كوكبنا . أنه عنصر نادر ، لكنه موجود بشكل طبيعي أصعب قليلا من الذهب وقابل جداً للطرق . الفضة النقية لديها توصيلة كهربائية وحرارية عالية لجميع المعادن ولها أدنى مقاومة للتلامس . يمكن أن توجد الفضة في ثلاث حالات أكسدة مختلفة :  $Ag^0$  ،  $Ag^{+2}$  ،  $Ag^{+3}$  الأولين هما الأكثر وفرة ، والأخيرة غير مستقرة في الأحياء المائية البيئية (Ramya and Subapriya.; 2012). والفضة غير قابلة للذوبان في الماء ، لكن الملح المعدني لنترات الفضة  $AgNO_3$  وكلوريد الفضة القابلة للذوبان في الماء (منظمة الصحة العالمية ،2002) ، استخدمت معدن الفضة في الجانب الجراحي و الجبائر والمبيدات الفطرية والعملات المعدنية ، تم استخدام مركبات الفضة القابلة للذوبان مثل شرايح الفضة في علاج الأمراض العضلية والصرع بالإضافة للأمراض المعدية مثل مرض الزهري Syphilis و السيلان Gonorrhoea (Drake and Hazelwood.; 2005). تعتمد السمية الحادة للفضة في البيئة على توافر أيونات الفضة الحرة ، وقد أظهرت الدراسات أن تراكيز أيونات  $Ag^+$  منخفضة للغاية بحيث لا تؤدي الى سمية الرصاص (منظمة الصحة العالمية ،2002) . أن الفضة المعدنية تشكل الحد الأدنى من المخاطر على الصحة (Drake and Hazelwood.; 2005). يعتقد أن الفضة بأي شكل من الأشكال غيرسامة للجهاز المناعي للقلب والأوعية الدموية أو الجهاز العصبي أو التناسلي ، فلا تعتبر مادة مسرطنة (Furst and Schlauder.; 1978). وبالتالي فإن الفضة غير سامة نسبيا (Chen and Schluesener. 2008). وقد عرفت الفضة بأهميتها لأمتلاكها للخصائص العلاجية لعدة قرون حيث تعتبر من أكثر المعادن التي درست على مستوى كبير و واسع لمكافحة الجراثيم المسببة لفساد المواد الغذائية ويعود السبب في تراجع استخدامها نتيجة لتطور المضادات الحيوية فقد استخدمت أيونات الفضة من قبل الكثير من الدول ولغاية القرن العشرين للوقاية من البكتريا المسببة للرمم (Galdieroetal.,2011).



## 10-2 بكتريا النسيج النباتي كمصدر لإنتاج الجسيمات النانوية Endophytic bacteria as source to produce of nanoparticles

يشير مصطلح Endophyte الى الكائنات الحية التي تنمو في داخل الأنسجة النباتية ، والتي تميزت بأنها لا تسبب ضرراً للنسيج النباتي Nonharmfull والتي بدورها تقوم بحماية المضيف النباتي من الأضرار التي تسببها الكائنات الحية المجهرية المتواجدة في بيئة المضيف (Mishra ,.et al 2014) عن طريق إنتاج بعض المركبات التي تسمى الايض الثانوي Secondary metabolites (Islam and Math, 2010) و(Trivedi et al., 2010) . كانت العديد من المواد الفعالة حيويًا التي تنتجها بكتريا الناбот الداخلي Endophytic bacteria جديدة نسبياً لذلك هناك إمكانيات هائلة لاختبارت جديدة ذات فعالية عالية ومنخفضة السمية من الكائنات الحية الدقيقة مثل المضادات الحيوية ومضادات الأكسدة والمبيدات الحشرية ومضادات السكر (Strobel et al., 199) و (Lee et al., 1995). يعد البحث عن المضادات الحيوية والمنتجات الميكروبية الطبيعية الأخرى أمراً محورياً في الكفاح العالمي ضد مشكلة مقاومة المضادات الحيوية المتزايدة ومن الضروري ايجاد مضادات حيوية جديدة لمعالجة هذه المشكلة (James et al., 2004) و (Verma et al., 2011). فقد اجريت دراسات عديدة حول هذا الموضوع منها ما أشار اليه الباحث (Hateet.,2017) الى عزل وتشخيص بكتريا *Bacillus megaterium* من النسيج الداخلي لنبات الحنطة المحلية وإمكانية الحصول على الأيض الثانوي لهذه البكتريا والذي امتهك فعالية ضد ميكروبية ضد بعض انواع البكتريا مثل *Escherichia coli* , *Salmonella typhi* and *Pseudomonas aeruginosa* , وضد بعض الخمائر مثل *Candida albicans* و *Candida kruzi* . كما أختبرت السمية الخلوية لمركبات الأيض الثانوي للبكتريا اعلاه والتي لم تظهر أي سمية تجاه كريات الدم الحمراء (RBS) لبكتريا Endophytic bacteria القدرة على تخلق جسيمات الفضة النانوية (Hateet., 2017).

## 11-2 فطريات النسيج النباتي كمصدر لإنتاج الجسيمات النانوية Endophytic fungi as source to produce of nanoparticles

تشير التقديرات الى أن الفطريات النباتية الداخلية Endophytic fungi ممثلة بما لا يقل عن مليون نوع تعيش في النباتات (Dreyfuss and Chapela .; 1994). تشير الدراسات الجزيئية الحديثة ان الفطريات القديمة موجودة منذ أكثر من مليار سنة ، كما ركز معظم الباحثين في الآونة الأخيرة على نشاط وقدرة الفطريات الداخلية endophyte fungi التي يمكن أن تنتج مركبات للاغراض الصناعية والصيدلانية والزراعية (Jia ., et al 2016). كما يمكن أيضاً استخدام المادة الفعالة التي تنتجها هذه الفطريات كعوامل مضادة للفطريات Antifungal، مضادة للبكتريا Antibacterial، مضادة للأورام Antitumor ومضادة للسكر Antidiabetic (Padhi et al., 2013). تتراوح العلاقة الرئيسية الموجودة بين الفطريات والنباتات المضيضة من التكافلية Symbiotic الى العدائية Antagonistic او المسببة للأمراض Pathogenic او التبادلية (2013) Mutualistic (Bairwa et al .). وتمثل النباتات الوعائية مصدرا ملائما لإيواء فطريات وبكتريا النسيج الداخلي Endophyte (Joseph and Priya.; 2011). لم يتم اجراء بحوث كثيرة على فطريات النسيج الداخلي المنتجة للجسيمات النانوية الفضية فقد أجريت دراسات قليلة في هذا المجال مثل دراسة (Panacek et al., 2006) اذ تم خلالها تخليق جسيمات الذهب النانوية من الفطر Colletotrichum Sp المعزول من النسيج الداخلي لنبات Pelargonium graveolens . كما أجريت دراسة أخرى لإنتاج جزيئات الفضة النانوية بواسطة الفطر Aspergillus clavatus المعزول من نبات Azadirachta indica ودراسة فعاليتها المضادة للأحياء المجهرية (Dias et al., 2002). من المتوقع أن تؤثر الظروف البيئية والتكوينية على طبيعة وتعداد النباتات الداخلية . أنها مصدر مهم وجديد للمركبات الطبيعية النشطة بيولوجياً مع تطبيقات محتملة كبيرة في الزراعة والطب والعديد من العلماء المهتمين بدراسة النباتات الداخلية الفطرية كمنتجين محتملين للمركبات الجديدة والنشطة بيولوجياً . (Tawiah. et, al 2012).

## 2-13 مقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية

تعرف المضادات الحيوية على أنها مركبات كيميائية حيوية تنتج من قبل بعض الكائنات المجهرية وكما يمكن تحضيرها صناعياً وتعمل بتراكيز منخفضة على تثبيط أو قتل نمو البكتيريا (Bradford, 2001). وقد كان لأكتشاف هذه المركبات الأثر الكبير في تقليل معدلات الأصابات البكتيرية المختلفة للإنسان ولكن بمرور الزمن بدأ ظهور سلالات بكتيرية مقاومة لهذه المضادات وأصبحت تمثل مشكلة طبية كبيرة ومصدر قلق عالمي (Ventole, 2015)، (Patel and Grank., 2005).

يوجد نوعان من مقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية :

1- المقاومة الذاتية : والتي تكون فيها الخصائص التركيبية هي المسؤولة عن المقاومة للمضادات الحيوية فبعض البكتيريا تمتلك متعدد السكريد الشحمي Lipopolysaccharide (Lps) الذي يعد أحد مكونات outer membrane مثل بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* لذلك تكون ذات قدرة في منع دخول المضاد الحيوي إلى داخل الخلية البكتيرية وبذلك تكون مقاومة للمضادات الحيوية (Murray et al., 1999).

2- المقاومة المكتسبة : تحدث عند وجود سلالات بكتيرية مقاومة في الأنواع البكتيرية الحساسة مسبقاً للمضادات الحيوية والسبب في ذلك يعود لأمتلاكها بلازميدات أو بسبب حدوث طفرة كروموسومية (Sandhue, 2010) و (Ray and Bhunia., 2014)

## 2-13-1 آليات مقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية

تمتلك البكتيريا العديد من الآليات والتي تمكنها من مقاومة المضادات الحيوية منها :

1- حاجز النفاذية Permeability barrier : يمثل حاجز النفاذية العشاء الخارجي outer membrane والذي من خلاله تستطيع البكتيريا السالبة لصبغة كرام G-ve مقاومة العديد من المضادات الحيوية والتي تحتوي على ثقب مسامية ذات طبيعة بروتينية تدعى (Porins) والتي بدورها تقوم بعمليات النقل الأيونات والجزيئات الصغيرة الذاتية في الماء ومنها المضادات الحيوية ،

التغيرات الحاصلة في عدد وحجم وانتقائية تلك الثقوب هي التي تتحكم في المقاومة للمضاد الحيوي (Ruppé *et al* ,2015) . لذلك فإن اي طفرة تسبب أحتزال عدد أو أقطار تلك الثقوب تؤدي الى منع جزيئات المضادات الحيوية من الدخول الى داخل الخلية البكتيرية وبذلك تعد مقاومة للمضادات الحيوية (Yildirin *et al* , 2005) .

2- التغير في الموقع الهدف Altration in target site : عند حصول اي طفرة وراثية في الجينات المسؤولة عن الموقع الهدف يحدث تغيير في هذا الموقع ويؤدي ذلك الى عدم قدرة المضاد الحيوي على التعرف على الموقع الهدف له وبهذا لا يحصل ارتباط للمضاد الحيوي بالموقع والهدف فتتحول البكتريا الحساسة للمضاد الحيوي الى مقاومة مثال ذلك الموقع الهدف لمضادات البيتا لاکتام هو Pencillin binding proteins (PBPs) في حال حصول طفرة وراثية لهذا الموقع الهدف فإن المضاد لا يستطيع التعرف عليه فتتحول البكتريا الى مقاومة لمجموعة مضادات البيتا لاکتام (Cao *et al* ., 2002).

3- التحور في المسارات الأيضية Medfication of metallic pathways : نتيجة لتشابه بين تركيب بعض المضادات الحيوية وبعض المواد الأولية الضرورية لإنتاج احماض مهمة للبكتريا مثل حمض الفوليك Folic acid ، فالمضاد الحيوي Sulfoamide المثبط للمسار الأيضي لحامض الفوليك تمتلك تركيب مماثل لمركب ( Para amino benzoic acid ) الذي يدخل في المسار الحيوي لتكوين حامض الفوليك فتقوم البكتريا برفع إنتاج هذا المركب ليتنافس مع المضاد الحيوي في فاعليته (Jeanne *et al* ., 1996).

4- عوامل الضراوة Virulence factor : تمتلك البكتريا القدرة على إنتاج عوامل عديدة تسبب أحداث الأمراض تعرف بعوامل الضراوة ، البعض من تلك العوامل توجد ضمن الجدار الخلوي فمثل البكتريا الموجبة لصبغة كرام تمتلك طبيعة البيتايدوكلايكان والمحفظة Capsule وغيرها ، أما البكتريا السالبة لصبغة غرام تمتلك Pilli ، Flagella ، Lipopolysaccharides ، وهناك عوامل ضراوه تفرز خارج الخلية البكتيرية كالسموم والأنزيمات والتي تمكن البكتريا من اختراق دفاعات المضيق (Todar *et al* ., 2008) . ومن هذه العوامل :

أ- الغشاء الحيوي Biofilm : يعرف بأنه عبارة عن تجمع من الكائنات المجهرية محاطة بطبقة عديد السكريد المخاطي (EPs) Exopolysachride والتي تساعد على التصاق البكتريا مع بعضها او على الأسطح (Kimura et al ., 2009)

تستطيع أنواع عدة من البكتريا أنتاج الغشاء الحيوي منها *E.coli* , *k.pneumonia* , *P.aeruginosa* , *S.aureus* , *S.viridans* وغيرها فالأنواع البكتيرية التي تمتلك أغشية خلوية تمتاز بدرجة عالية من المقاومة للمضادات الميكروبية والوسائل الدفاعية للجهاز المناعي للمضيف (Donlan and Costerton ., 2002). العلاج بالمضادات الحيوية للمصابين بالبكتريا المنتجة للغشاء الحيوي يظهر لديهم قمع مؤقت لاعراض العدوى بسبب قتل البكتريا الغير مرتبطة بالغشاء الحيوي (الحره)

(Stewart and Costerton, 2001)

اذ لا يتم قتل البكتريا المنطوية في طبقة الغشاء الحيوي والتي تظهر مقاومة بمقدار 1000-1500 مره أكثر من البكتريا الغير المنتجة للغشاء الحيوي ولهذا عند أيقاف العلاج بالمضاد الحيوي يلعب الغشاء الحيوي دور في عملية إعادة نشوء وأحداث الأصابة من قبل نفس النوع البكتيري (Wu et al.,2002)

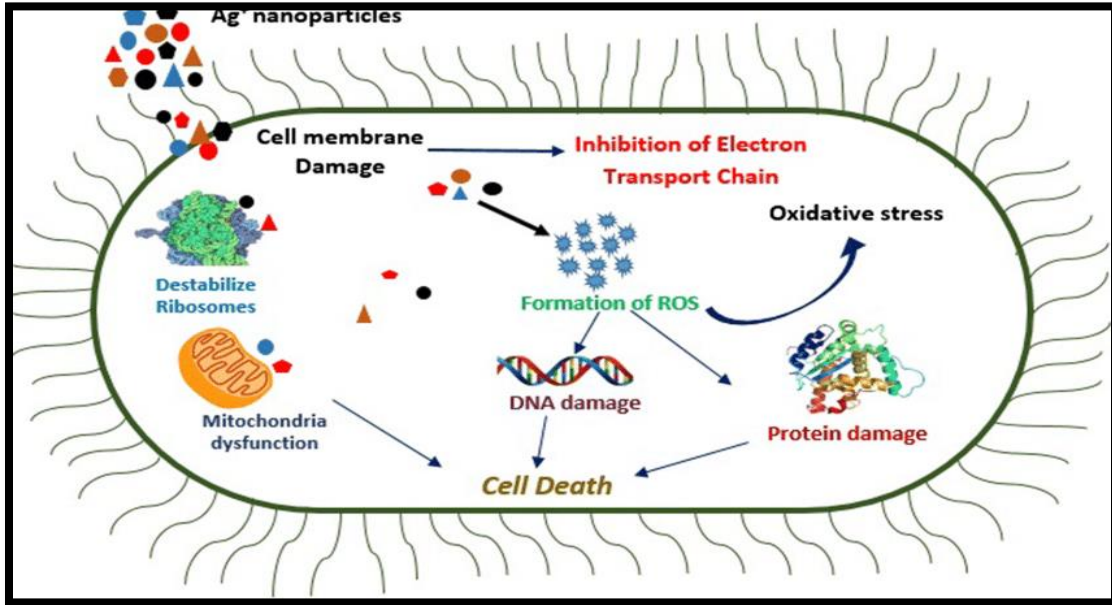
ب- السموم المحللة لكريات الدم الحمر Hemolysis تعمل السموم الخلوية البكتيرية ومنها الهيمولايسين على تدمير الغشاء الخلوي لكريات الدم الحمراء RBC للمضيف ، بشكل عام أنواع عديدة من البكتريا تنتج هذه السموم التي تسبب أمراضية البكتريا ، (katri et al .,2007).

ت- أنزيم البروتينيز protease enzyme يعتبر من أهم عوامل الضراوة خلال مرحلة غزو البكتريا لدفاعات جسم المضيف يعمل أنزيم البروتينيز على تحطيم أنسجة المضيف أثناء احداث الإصابة التي تسببها أنواع بكتيرية عديدة منها *S.aureus* , *S.mutans* , *P.aeurgenosa* اذ يعمل على تحليل البروتينات من خلال كسر أصرة الأمليز للبروتين (Todard ,2005) .

## 14-2 الية تأثير أو فعالية جسيمات الفضة النانوية تجاه البكتريا المرضية

تزايد المقاومة البكتيرية للمضادات الحيوية في الفترة الأخيرة قلل من كفاءة هذه المضادات وأصبحت أقل فاعلية بفعل الاستعمال العشوائي لها . أشارت الدراسات الى أثبات فعالية أنواع عديدة من الجسيمات النانوية المضادة للبكتريا من خلال الدراسات التي أجريت عليها في المختبرات Invitro وكذلك على نماذج من الحيوانات المختبرية (Huh and Kwon.;20011). ونتيجة لأمتلاك جزيئات الفضة النانوية آليات متعددة التي يتم من خلالها تأثيرها على الخلية البكتيرية شكل (3) فقد عدت ذات أهمية كبيرة لإنتاج انواع جديدة من المضادات الحيوية (Sondi and Salopek,2004) . اذ لها القدرة على الارتباط بغشاء الخلية فتتشكل تقوياً على الغشاء الخلوي وبالتالي فقدان مكونات الخلية البكتيرية فيؤدي الى موت الخلية (Sahayaraj and Rajesh.; 20011, Anbukkarasi *et al.*, 2017). كما يمكن لجزيئات الفضة النانوية أن تدخل الى سيتوبلازم البكتريا فتتمكن قدرأ معيناً من أيونات الفضة الموجبة الشحنة التي يتم تحريرها من قبل الجزيئات النانوية أن تصل الى الساييتوبلازم (Morones, 2005) . وبينت دراسة Gogoi *et al.*(2006) قدرة جزيئات الفضة النانوية اذ يحدث توقف تعبير S2 وبذلك ثبط عملية تخليق البروتين. كذلك يمكن لجزيئات الفضة النانوية الموجبة الشحنة الارتباط مع مجاميع الفوسفات السالبة الشحنة والموجودة في الحامض النووي DNA مما يؤدي الى أيقاف عملية تضاعف المادة الوراثية للبكتريا (Morones, 2005) (Sulaimanal *et al.*, 2013, Zhang *et al.*, 2013) كما يمكن لجزيئات الفضة النانوية أن ترتبط مع الأنزيمات والبروتينات التي تحتوي على الكبريت فتؤدي الى مسخها (Yunat *et al.*, 2013) أذ وجد أن جزيئات الفضة النانوية لها القدرة على تثبيط عمل أنزيمات السلسلة التنفسية من خلال المجاميع الوظيفية thiot group وهذا النشاط يؤدي الى توقف نقل الألكترون عن طريق السلسلة التنفسية وبالتالي توقف إنتاج الطاقة وموت الخلية البكتيرية (Holt and Bard.; 2005) شكل (3).

وجد Choi and Hu (2008) قدرة جسيمات الفضة النانوية على أكسدة مكونات الخلية البكتيرية مثل البروتينات والدهون والحامض النووي DNA.



الشكل (3) الية تأثير جزيئات الفضة النانوية تجاه البكتريا.

## 15-2 تصنيف الفطريات

هو مجال واسع للغاية ، وان توصيفها وتصنيفها يتغير بسرعة وفق توفر التكنولوجيا الحديثة التي تساهم وبشكل كبير في اكتشاف مميزات جديدة لم تكن معروفة من قبل (Yilmaz *et al.*, 2014; Federhen, 2012). وتصنيف الفطريات بالاعتماد على المظهر الخارجي أو تكوين الكونيدات يخلق صعوبة في تصنيفها ولا يعكس العلاقات التطورية بين الأنواع لوجود التشابه والتقارب بين الأنواع من حيث اشكالها واحجامها ، كما أن التصنيف بالاعتماد على الطراز المظهري لا يعكس العلاقات التطورية ولا يفى بالغرض خصوصا للدراسة التطبيقية بسبب التقارب في الشكل الخارجي للفطريات . لذا فإن استخدام الطرق الجزيئية هو الامثل في تصنيف الفطريات (Bills *et al.*, 1999). بفضل تطور تقنية (Polymerase Chain Reaction) PCR اصبح العلماء يمتلكون معلومات عن تتابع القواعد النيتروجينية في الكائنات الحية وفي الوقت الحاضر فإن المعلومات الوراثية لألاف الفطريات المخزنة في بنك الجينات Gene bank ، والتي لها اهمية في الدراسات الجينية (Khan and Bhadanria, 2018) . تعد تقنية ال PCR إحدى الطرق الحديثة والمستخدمة

في تصنيف الفطريات ، وقد اكتشفت هذه التقنية على يد العالم Karry Mullis مع ميشيل سمث في عام (Weile and Knabbe, 2009) 1985 ولا تزال هذه التقنية تستخدم لوقتنا الحالي بسبب قلة تكلفتها من ناحية الأجهزة والمواد المستخدمة للمختبرات على الرغم من اكتشاف العديد من التقنيات (Bretagne and Costa, 2006). كما أصبحت تقنية ITS (Internal Transcribed Spacer) التي تشفر الحامض النووي من اهم التقنيات الجزيئية واداة مهمة لتحديد الأنواع (Quaedvlieg et al., 2012). وقد أصبحت تقنية ال PCR من التقانات المستخدمة في المختبرات البيولوجية لمختلف التطبيقات ، وخصوصا في مجال تشخيص الأحياء المجهرية كالبكتريا والفطريات والفايروسات والطفيليات (Wellinghausen et al., 2004).

## 2-15-1 البكتريا السالبة لصبغة جرام

### *Esherishia coli* 1-1-15-2

هي عصيات سالبة لصبغة جرام تتراوح أبعادها ما بين 1.5x5.6 مايكرومتر وغير مكونة للأبواغ ولا هوائية اختيارية . كما أن بعض سلالاتها لها القدرة على تكوين المحفظة وموجبة لاختبار الكاتليز وسالبة لاختبار اليوريز وألوكسيديز وتحلل الجيلاتين، وتظهر مستعمراتها على وسط أكار الماكونكي الصلب بلون وردي بسبب قدرتها على تخمر سكر اللاكتوز ، بينما تظهر بشكل مستعمرات ذات لمعان معدني براق على وسط الأيوسين مثلين الأزرق (EMB) Eosin methylene blue (Ihan.et al., 2005; Collee et al., 1996). تستوطن *E.coli* بشكل طبيعي أمعاء الإنسان ولكن تعد من الممرضات الانتهازية فهي إحدى المسببات الرئيسية لعدوى المستشفيات والإصابات المكتسبة في المجتمع (Karlowsky et al., 2004) ، أذ تسبب حوالي 90% من حالات التهاب المسالك البولية وتسبب حالات تسمم الدم والإسهال وأيضا تسبب التهاب حوضي الكلية Pyelonephritis (Dippol, 2005) ، كما تسبب حدوث التهابات المثانة Cystitis والتهاب القناة الصفراوية Cholecystitis والتهاب الرئة Pneumonia وأخماج الجروح Wound Infection وكذلك التهاب المعدة والأمعاء Gastroenteritis عند الأطفال الرضع كما تسبب أمراض الجهاز التنفسي المكتسب من المستشفيات وأحداث التهاب الغشاء المساريقي peritonitis (Jawetz et al., 2007).



***Proteus mirabilis* 2-1-15-2**

أطلقت تسمية *Proteus* من قبل العالم Hauser عام 1885 وهيه كلمة لاتينية تعني الانقلاب في الشكل لهذه البكتريا (Koneman *et al.*,1997; Buchanan and Gibbons, 1974) وتمتاز بكونها عصيات سالبة لصبغة جرام يتراوح قطرها ما بين 0.4-0.8 مايكرومتر وطولها 1-3 مايكرومتر، هوائية اختيارية، لا تكون ابواغ موجبة لاختبار الكاتاليز واختبار فنيل الانين دي أمينيز deaminase phenylalanine وسالبة لاختبار الاوكسيديز، منتجة لغاز H<sub>2</sub>S(Iwalokun and Akinwnmi,2002) ، وذات مستعمرات شاحبة اللون على وسط أكار الماكونكي لكونها غير مخمرة لسكر اللاكتوز ، متحركة أذ تتحرك بواسطة الأسواط المحيطية وتمتاز بظاهرة Swarming التي تظهر على سطح وسط أكار الدم بطبقة رقيقة متموجة مشكلة خطوطا دائرية متحدة المركز ، وتمتلك القدرة على إنتاج أنزيم اليوريز الذي يمتلك القدرة على التحلل المائي لليوريا في الإدرار وتحويلها الى أمونيا وبالتالي ارتفاع قاعدية الإدرار (Kafaf,2000) . تسبب هذه البكتريا العديد من الأمراض للإنسان والحيوان وهي من الممرضات الانتهازية Opportunistic pathogens خلال مغادرتها مكانها الطبيعي في القناة المعوية تسبب أخماج المسالك البولية وخمج الحروق والجروح ، وتأتي بكتريا المتقلبات بالمرتبة الثانية بعد بكتريا *E.coli* في احداث إصابات UTIs المكتسبة من المستشفيات. (Garcia *et al.*, 2007).

***Pseudomonas aeruginosa*3-1-15-2**

تعتبر من الممرضات أالانتهازية عسوية الشكل، غير مكونة للسبورات، متحركة بسوط قطبي واحد أو أكثر، هوائية، سالبة لصبغة كرام، موجبة لفحص الأوكسيديز والكاتاليز ولها القابلية على إنتاج صبغة البايوسيانين. (Som, 2005)(Pyocyanin) هذه البكتريا تظهر بشكل مستعمرات شاحبة على وسط الماكونكي لعدم قدرتها على تخمر سكر اللاكتوز ، تنمو جيدا بدرجة حرارة 42م كما تمتاز بأنها تمتلك مقاومة للمضادات الحيوية لامتلاكها آليات تمكنها من التخلص من فاعلية تلك المضادات منها نظام الدفع efflux pumps والغشاء الخارجي (Antoliotak *et al.*, 2007). تسبب هذه البكتريا العديد من الامراض مثل التهاب نقي العظم ، تسمم الدم ، التهاب شغاف

القلب ، التهاب المسالك البولية كما تسبب التهاب الجروح والحروق والتهاب المفاصل والتهاب العظام والتهاب العيون كذلك التهاب الجيوب الانفية (Cole et al., 2014).

### 2-15-2 البكتريا الموجبة لصبغة كرام

#### *Staphylococcus aureus* 1-2-15-2

تتصف هذه البكتريا بمستعمراتها الكروية الشكل ملساء رقيقة يصل قطرها 3 ملم تظهر بشكل تجمعات شبيه بعناقيد العنب تأخذ مستعمراتها لون أصفر ذهبي براق على الأوساط الزرعية. الغنية ، كما تتصف بأنها لا هوائية اختياريه غير متحركة مخمرة لسكر المانتول لهذا عند نموها على وسط آكار المانيتول الملحي Mannitol salt agar اذ ان تغير لون الوسط من الوردى الى الأصفر هي صفة تشخيصية لهذا النوع البكتيري (Tacconelli et al., 2006) ، يمتاز هذا النوع من البكتريا بانه موجب لاختبار الكاتليز وموجب لاختبار Coagulase وموجب لاختبار DNase ومحلل للدم ومنتجة للمحفظة Capsule. تسبب هذه البكتريا العديد من الأمراض أذ أنها تعتبر من الممرضات الانتهازية فهي تعد المسبب الرئيس للإصابات المكتسبة من المستشفيات والناجمة من التداخل الجراحي (Todar, 2004) ، كما تسبب العديد من الالتهابات مثل الإصابات الجلدية مثال ذلك البثور (Pimples) والدمامل (Boils) وداء القوباء (Impetigo) والخراجات (Abscesses) وكذلك التهاب الجروح Wound infection كما تسبب التهاب خطير متمثل بالتهاب نقي العظم (Osteomyelitis)، فضلا عن كونها مسبب لإصابات المسالك البولية وتسمم الدم وحالات الإسهال وإصابات الجهاز ، كما تسبب التسمم الغذائي (Food poisoning) بواسطة افراز السموم المعوية في الأغذية ، أذ يساعد البكتريا في اختراق دفاعات الجسم وأحداث الإصابة فضلا عن إنتاجها بعض عوامل الضراوة التي تمنحها القدرة على أحداث الأمراض ومن تلك العوامل انزيم البوتيز وأنزيم الالبيز والهيمولايسين وغيرها من العوامل (Abubakar, 2009).

***Staphylococcus epidermidis 2-2-15-2***

هي مكورات موجبة لصبغة كرام تشابه المكورات الذهبية في شكلها ولكنها سالبة لاختبار التجلط coagulase-negative وتظهر بشكل مستعمرات بيضاء الى رمادية اللون على وسط أكار الدم وهي غير منتجة للصبغات (Books *et al.*, 2007) ، وهي تتميز بكونها غير مخمرة لسكر المانتول هوائية اختيارية وتنمو بشكل فلورا طبيعية لذلك اطلق عليها المكورات العنقودية الجلدية (Otto, 1997) (Koneman *et al.*, 1997) ; 2004 وكما يمكنها اختراق دفاعات المضيف الطبيعية عند توفر الظروف الملائم لأحداث الإصابة نتيجة انخفاض دفاعات الجسم المناعية فهي تعد من الممرضات الانتهازية للإنسان و الأكثر عرضة للإصابة هم متعاطي الأدوية عن طريق الحقن الوريدية ، المواليد الجدد والمسنين ، فضلاً عن تسببها في أحداث عدد من الإصابات المرضية منها أخماج القلب ذي الصمامات الصناعية والطبيعية والأخماج المرافقة للقسطرة داخل الوريد والذين يستخدمون القسطرة البولية لفترات طويلة ، وتمتاز بامتلاكها 24 سلالة ، ويمكن للبعض منها البقاء على قيد الحياة على سطح جاف لفترة طويلة من الزمن (Crossley *et al.*, 2009) .

# الفصل الثالث

## المواد وطرق العمل

## Chapter Three Methods and Materials

## Material and Methods

## 3 المواد وطرائق العمل

## 1-3 الأجهزة والمعدات Equipment's and Instruments

جدول (3) يمثل الأجهزة والمعدات المختبرية التي استخدمت أثناء مدة الدراسة مع

أسم الشركة المصنعة وبلد المنشأ

الشركة المصنعة (المنشأ)	أسم الجهاز
Shownic(Korea)	Microwave مسخن
Bio neer (Korea)	2ml Epindroff ابندروف (انابيب)
Iso Lab (Germnay)	Cylinder أسطوانات مدرجة باحجام مختلفة
Bio zek medical (Holland)	Petri Dishes اطباق بتري
ALS(Canada)	Test tubes انابيب اختبار
Whatman No.1(UK)	Filter papers أوراق ترشيح
Vistal(Poland)	Refrigerator ثلاجة
Shimadzu(Japan)	UV visible Spectroscop جهاز الاشعة فوق البنفسجية
Consort(Belgium)	Electrophoresis جهاز الترحيل الكهربائي
GFR® ( Germnay)	Distallwato جهاز التقطير
Hettich(Germnay)	Centrifuge جهاز الطرد المركزي
Epindroff(Germnay)	Epindroff centrifuge جهاز الطرد المركزي
Medilab (Korea)	Vortex mixturee جهاز المازج الدوار
Heidolph(Germnay)	Magnatic stirrers جهاز المازج المغناطيسي
Vilberlourmat (France)	Gel Documentation جهاز تصوير الهلام
Eppendorf (Germany)	Cooling Centrifuge جهاز نبذ مركزي مبرد
Human Lab(Korea)	Incubator الحاضنة
Zenith lab(China)	Shaking Incubator الحاضنة الهزازة

Memmert(Germnay)	Water path	الحمام المائي
Iso Lab (Germnay)	flask	دورق مختلفة
Superestar(India)	Slides and cover slides	شرائح زجاجية وغطاء الشريحة
Memmert(Germnay)	oven	فرن كهربائي
Pyrex (England)	Screw cap bottles	قناني محكمة الغلق
Lab Tech (France)	Biosafety cabinet	كابينة الزرع
Broche(Malaysia)	Gloves	كفوف
Dragon(China)	Micropipettes 0.5-10 $\mu$ L, 10-100 $\mu$ L, 100-1000 $\mu$ L	ماصات
Olympus(Japan)	Light Microscop	مجهر ضوئي
Superestar(India)	Disposable Syringes	محاقن طبية
Prime (UK)	Thermo cycler	المدور او المضخم الحراري
Iraq	Benzen burner	مصباح بنزن
Knflaboport(USA)	vaccum pump	مضخة ضغط
Hirayama(Japan)	Autoclave	المؤصدة
Sartorius(Germnay)	Sensitive Balace	الميزان الحساس
Himedia (India)	Standard wire loop (1m)	الناقل الزرعي

2-3 المواد الكيميائية Chemical Substances

جدول (4) يمثل جميع المواد الكيميائية المستخدمة في الدراسة مع أسم الشركة المصنعة وبلد المنشأ

الشركة المصنعة (المنشأ)	اسم المادة	
Bio neer (Korea)	Free nuclease water	
Bio neer (Korea)	Ladder 100bp	
Bio basic (Canada)	TBE buffer	
	Didionzation water	ماء منزوع الايونات
TEDIA (USA)	Acetone	اسيتون
KR (Chile)	Agar	اكار
Bio basic (Canada)	Agarose	اكاروز
RBL (Spain)	Absolute ethanol	ايثانول مطلق
RBL (Spain)	Barafilm	بارا فلم
Bio basic (Canada)	Isopropanol	ايزوبروبانول
Bio neer (Korea)	Primers	بادئات
BDH (England)	Pepton	ببتون
Bio basic (Canada)	Ethidium bromide	بروميد الاثيديوم
CHEMLAB(Belgium)	Ethyl acetate	خلات الاثيل
AVONCHEM (UK)	Dextrose	دكستروز
Homedia (India)	Cycloheximide	سايكلو هكيساميد
Sigma-Aldrich (USA)	Ammonium sulfate saturated	سلفات الامونيوم المشبعة
Bio neer (Korea)	Lactophenol-cotton blue stain	صبغة اللاكتوفينول القطنية
Bio neer (Korea)	Bromo phenol Blue	صبغة بروموفينول الزرقاء
Lifeline® (UK)	phosphate buffered saline	فوسفات بفر سلاين
AQUA (Turkey)	Ethanol 95%	كحول اثيلي 95 %
Alpha® (Turkey)	Ethanol 70%	كحول اثيلي 70 %
INF (Indonasia)	Chloramphenicol	كلورامفينيكول
SCR® (China)	Sodium chloride	كلوريد الصوديوم
SCR® (China)	calcium chloride	كلوريد الكالسيوم
BDH (England)	Normal saline	محلول فسيولوجي
Bio neer (Korea)	Master Mix	مزيج التفاعل
Sigma-Aldrich (UDA)	Elastin	مسحوق الايلاستين
SCR® (China)	KOH	هيدروكسيد البوتاسيوم
(China)	AgNo3	نترات الفضة

## 3-3 الأوساط الزرعية

## جدول (5) الأوساط الزرعية الخاصة في عزل البكتريا

العدد	اسم الوسط	طريقة التحضير	الشركة المصنعة	المنشأ
1	Nutrient agar أكار المغذي	حضر حسب تعليمات الشركة المصنعة	Hi Media	(India)
2	Nutrient broth المرق المغذي	حضر حسب تعليمات الشركة المصنعة	Hi Media	(India)
3	Chocoate agar	حضر حسب تعليمات الشركة المصنعة	Hi Media	(India)
4	Blood agar وسط آكار الدم	حضر حسب تعليمات الشركة المصنعة	Hi Media	(India)
5	MacConkey agar وسط آكار ماكونكي	حضر حسب تعليمات الشركة المصنعة	Hi Media	(India)

## 3-3-1 الأوساط الزرعية المستخدمة في عزل الفطريات

## جدول (6) الأوساط الزرعية والتخميرية المستخدمة في عزل وتخمير الفطريات من

## النبات .

العدد	الأوساط الزرعية المستخدمة	طريقة التحضير	الشركة المصنعة
1	Potato dextrose agar extract.(PDA) وسط آكار دكستروز البطاطس	حضر حسب تعليمات الشركة المصنعة	Hi Media
2	Malt agar وسط آكار الشعير	حضر حسب تعليمات الشركة المصنعة	Hi Media
3	وسط Malt Glucose Pepton (MGPY) Yeast	حضر بأذابة _Malt extract (3g) -Yeast extract (3g) -Glucose (10g) -Pepton (5g) Dw 1000 ml	



## 3-4 طرائق العمل Methods

جمع العينات النباتية قيد الدراسة :جمعت العينات النباتية لغرض عزل البكتريا والفطريات من داخل النسيج النباتي من النباتات والمناطق المؤشرة أزائها وللفترة من تشرين الثاني 2019- كانون الثاني 2020

## جدول (8) النباتات المستخدمة في الدراسة الحالية .

العدد	أسم النبات	منطقة العزل	الجزء المستخدم
1	الريحان <i>Ocimum basilicum</i>	الاسواق المحلية	الاوراق
2	السدر <i>Frangula alnus</i>	حدائق كلية العلوم	الاوراق
3	البمبر <i>Cordia myxa</i>	حدائق منطقة الشبانة في ميسان	الاوراق
4	الدفلة <i>Nerium oleander</i>	حدائق منطقة الشبانة	الأوراق
5	الصبار <i>Cactaceae</i>	حديقة منزلية	الاوراق

## 3-4-1 عزل بكتريا النسيج النباتي الداخلي Endophytic bacteria

- 1- أتمتت طريقة تعقيم السطح Surface sterilization حسب طريقة (Ravirajaet al ., 2006) والتي تضمنت الخطوات التالية:
- 2- غسل جميع العينات النباتية بماء الحنفية الجاري .
- 3- قطعت الاوراق النباتية الى قطع صغيرة بحدود (6 ملم) .
- 4- غمرت بالكحول بتركيز 75% لمدة 2 دقيقة .
- 5- غطست بمحلول هاييوكلورات الصوديوم (Naocl) بتركيز 5% لمدة 3 دقيقة.
- 6- غمرت بالكحول بتركيز 75% لمدة 30 ثانية .
- 7- جففت القطع النباتية بواسطة أوراق ترشيع وفي ظروف معقمة .
- 8- وضعت القطع النباتية على اطباق بتري حاوية على وسط الأكار المغذي.
- 9- حضنت بدرجة حرارة 37C° لمدة (24-48) ساعة وبمعدل ثلاث مكررات.

**3-4-2 تنقية الانواع البكتيرية وتشخيصها :**

نقلت الانواع البكتيرية النامية باستخدام loop full الى الوسط الزرعي (N.A) الأكار المغذي وحضنت بدرجة حرارة  $37^{\circ}\text{C}$  لمدة (24-72) ساعة ثم نقلت الانواع البكتيرية النامية الى اوساط زرعية مائلة والتي حفظت لحين الاستخدام .ومن اجل تشخيص الانواع البكتيرية المعزولة حضرت شرائح زجاجية صبغت بصبغة كرام لفحصها تحت المجهر الضوئي . كما أؤكد التشخيص بأستخدام جهاز Vitek 2 compact system .

**3-4-3 التخليق الحيوي لجسيمات الفضة النانوية من البكتريا المدروسة:**

تم أخذ مستعمرات بكتيرية نقية بواسطة loop full وأضيفت الى الوسط Nitrate Broth في قناني زجاجية خاصة بمقدار 100مل وحضنت بحاضنة هزازة بدرجة حرارة ( $37^{\circ}\text{C}$ ) وبمعدل 200 دورة بالدقيقة ولفترة (24-72) ساعة ، بعدها رشحت المزارع البكتيرية بواسطة جهاز Vacuum وجهاز الطرد المركزي 8000 دورة بالدقيقة ولمدة 15 دقيقة وبمعدل ثلاث مكررات ثم أخذ 10مل من راشح المزارع البكتيرية وأضيف اليها 90 مل من محلول نترات الفضة (الماء اللايوني مع  $\text{AgNO}_3$ ) للوصول الى تركيز 3mM في قناني سعة 400 مل وحضنت بحاضنة هزازة بدرجة حرارة  $37^{\circ}\text{C}$  ولمدة 48 ساعة وعدد دورات 200 دورة بالدقيقة وبمعدل ثلاث مكررات (Fouad *et al.*, 2017).

**3-5-3 عزل الفطريات من داخل النسيج النباتي Endophytic Fungi :**

أتبعت نفس الطريقة المتبعة في الفقرة (3-4-1) بأستثناء وضع الأجزاء النباتية على اطباق بتري حاوية على الاوساط الزرعية (وسط آكار الشعير و وسط اكار دكستروز البطاطس) وحضنت بدرجة حرارة  $27^{\circ}\text{C}$  ولفترة (2-4) أسبوع وبمعدل ثلاث مكررات .

**3-5-1 تنقية وتشخيص الانواع الفطرية قيد الدراسة :**

نقلت الانواع الفطرية النامية الى الوسط الزرعي آكار الشعير للحصول على مزارع نقية ومن ثم نقلت أجزاء من المستعمرات المعزولة الى اوساط مائلة وحضنت بدرجة حرارة  $27^{\circ}\text{C}$  لمدة (5-7) أيام . ثم حفظت في الثلاجة بدرجة حرارة من ( $6-8^{\circ}\text{C}$ ) لحين الاستخدام. ومن أجل تشخيص الانواع المعزولة حضرت شرائح زجاجية مصبوغة بصبغة Lacto phenol cotton blue .

## 3-6 التشخيص الجزيئي للفطريات المدروسة:

## 3-6-1 استخلاص ال DNA من الفطريات المعزولة

تم أستخلاص DNA الفطريات العزولة في هذه الدراسة من مستعمرات بعمر 7-10 باستخدام عدة ال Genomic DNA Mini Kit . حسب تعليمات الشركة المصنعة. وتم التأكد من وجود DNA بالترحيل الكهربائي.

## 3-6-2 الترحيل الكهربائي لل DNA Electrophoresis of DNA

اعتمدت طريقة Sambrook (1989) في إجراء التجارب الخاصة بالترحيل الكهربائي وفق الخطوات التالية:

- 1- وزن 1 غم من الأكاروز وتمت أذابته في 100 مل من TBE buffer لكي يصبح بتركيز 1x .
- 2- سخن المزيج بأستعمال جهاز Microwave الى ان يذوب الأكاروز بصورة جيدة ، ثم ترك المزيج ليبرد الى درجة حرارة تتراوح ما بين (40-50) م ° ثم أضيف اليه (0.5) مايكرو لتر من صبغة Ethidium bromide .
- 3- حضر قالب الترحيل الكهربائي وربط المشط comb في احدى نهايتيه لعمل الحفر داخل الأكاروز ومن ثم صب محلول الهلام ، وبعدها ترك ليتصلب بدرجة حرارة الغرفة ، ثم رفع المشط والقطع المطاطية واعيد القالب في مكانه لجهاز الترحيل ، وغمر بمحلول TBE الى ان يصل الى ارتفاع 2-3 ملم تقريباً.
- 4- مزج (2) مايكرو لتر من صبغة Bromo phenol Blue و 5 مايكرو لتر من ال DNA ووضع المزيج في حفر الأكاروز.
- 5- ربطت اقطاب جهاز الترحيل الى مجهر القدرة وثبتت قوة التيار الكهربائي 75 فولت وترك الهلام حوالي 30 دقيقة ، وللدلالة على بدء عملية الترحيل نلاحظ خروج الفقاعات الهوائية .
- 6- تم فحص هلام الأكاروز بعد ان تحركت الصبغة الى نهاية هلام الأكاروز، ثم فحصت تحت الاشعة فوق البنفسجية لملاحظة وجود ال DNA ، وتم تصوير النتائج باستخدام الكاميرا.

## 3-6-3 تحضير مزيج PCR master mix

عمل مزيج التفاعل ال PCR باستعمال عدة PCR Accuowor® التي صنعت من قبل الشركة الكورية Bioneer وبحسب تعليمات الشركة كما في الجدول :

## جدول (9) مكونات مزيج ال PCR master mix لل ITS1 ، ITS4

PCR master mix	Volume
DNA template	7 µ
Forward primer (10 pmol)	2 µ
Reverse primer (10pmol)	2 µ
PCR Water	9 µ
Total	20 µ

## اختبار تفاعل سلسلة انزيم البلمرة Polymerase Chain Reaction

لأجراء الاختبار ، اتبعت طريقة Liu et al. (1997) و Liu et al. (2000) ، فقد تم خلط مكونات المزيج ال master mix في انابيب اختبار ذات حجم 0.2 مل خاصة بعدة فحص ال PCR (Accuowor® PCR premix) والمحتوية على باقي مواد التفاعل ، استخدمت البادئات ITS1 و ITS4 الموضحة في الجدول (10) ، أجرى تخفيفها بأضافة 0.5 مل من TE حسب التعليمات المدونة من الشركة المصنعة ، وخلطت المكونات بواسطة جهاز Vortex ، وتم وضع العينات في جهاز المضمخ الحراري PCR Thermocycler ، وشغل وفق البرنامج الموضح في الجدول (11) ، وبعد انتهاء البرنامج ال PCR ، تم وضع 4 مايكروليتر من DNA Ladder (1000-100pb) في الحفرة الأولى من هلام الأكاروز و5 مايكروليتر من منتج ال PCR ، في الحفرة الثانية ، وهكذا بالنسبة لباقي العينات ومن ثم رحل كهربائياً على هلام الأكاروز ، بوزن 1 غم من الأكاروز وأذابته في 100 مل من محلول ال TBE buffer بتركيز 1x وتم أضافة 3 مايكروليتر من صبغة Ethidium bromide وثبتت قوة التيار على (70 فولت) ولمدة 75 دقيقة وبعد الانتهاء من عملية الترحيل تم فحص الهلام بجهاز UV وتصوير النتائج بالكامرا . ثم ارسلت عينات المادة الوراثية ال DNA المختبرة الى معهد Macrogen في كوريا لغرض معرفة تتابعات القواعد النروجينية ومقارنتها مع العزلات في بنك الجينات NCBI .

**جدول (10) تتابع القواعد النيروجينية باستخدام البادئات (ITS1 و ITS4)**

Primers	Primers Sequences	Length
ITS4	5- TCCTCCGCTTATTGATATGC -3	20 Base
ITS1	5- TCCGTAGGTGAACCTGCGG -3	19 Base

**جدول (11) برنامج التضخيم ال PCR للبادئات ITS4 و ITS1**

PCR Step	Repeat cycle	Temperature	Time
Initial denaturation	1	95 °C	4 min
Denaturation	30	95 °C	1 min
Annealing		58 °C	1 min
Extension		72 °C	2 min
Final extension	1	75 °C	10 min
Hold	-	4 °C	Forever

**3-7 التخليق الحيوي لجسيمات الفضة النانوية من الفطريات المعزولة :**

اتبعت الطريقة الموصوفة من قبل (Devi and Joshi, 2012) والتي تضمنت اخذ قطعتين من الفطريات النامية بواسطة الثاقب الفليني وبقطر 6 ملم ووضعها في قناني زجاجية بسعة 400 مل والحاوية على 200مل من الوسط التخمرى Malt extract glucose peptone yeast (MGPY) وبمعدل ثلاث مكررات لكل فطر ثم حضنت بحاضنة هزازة بدرجة حرارة 27°C° وبمعدل 120 دورة /الدقيقة ولفترة (7-10) ايام ثم رشحت المزارع الفطرية باستخدام جهاز Vacuum وكذلك جهاز الطرد المركزي لغرض الحصول على الكتلة الحية للفطريات (Biomass) والتي تم غسلها بالماء منزوع الايونات ثلاث مرات متتالية .

وزن 10 غم من الكتلة الحية الفطرية وأضيفت الى قناني زجاجية بسعة 250مل وبسعة 400 مل واضيف 100مل من الماء منزوع الايونات المعقم وحضنت في حاضنة هزازة ولمدة 72 ساعة وبدرجة حرارة (27°C°) وبمعدل 120 دورة/الدقيقة ، ثم رشحت المزارع الفطرية بواسطة أوراق الترشيح نوع (Whatman. No1) وكذلك استخدم جهاز Vacuum بعدها أضيف 100 مل من

محلول نترات الفضة  $AgNO_3$  للوصول الى تركيز (0.1mM) وبمعدل ثلاث مكررات لكل راشح فطري.

### 8-3 الكشف عن جسيمات الفضة النانوية المدروسة

أجريت دراسة خصائص الجسيمات النانوية الفضية من خلال فحص حجم الجسيمات وشكلها وكميتها ، وقد أستخدم لهذا الغرض بعض التقانات الكيميائية والفيزيائية منها:

### 1-8-3 التحليل الطيفي للأشعة فوق البنفسجية - (UV- Ultra violate visible (Vis)

عند الأطوال الموجية (900 – 300) نانومتر حضرت العينة لفحص طيف الامتصاص Absorption Uv-Vis بعد فترة التحضين ، اذ نقل 2مل من المحلول جزيئات الفضة النانوية المحضر بعد ترشيحه من الفطر وفحص بجهاز وباستعمال طول موجي تراوح ما بين (300-800) نانومتر.

### 2-8-3 التحليل الطيفي للأشعة تحت الحمراء (FTIR analysis)

يستخدم لهذا الفحص جهاز طيف الاشعة تحت الحمراء FTIR spectrometer ضمن مدى أمتصاصية يتراوح بين  $(400-40000)cm^{-1}$ .

تم تحويل جسيمات الفضة النانوية الذائبة في المحلول إلى مسحوق بالاعتماد على الطريقة الموصوفة من قبل (Raheman et al., 2011) وكما يأتي :

- 1- تم أخذ 2 مل من المحلول الحاوي على AGNPS و وزع في أنابيب اختبار معقمه.
- 2- مزجت الانابيب مع مذيب الأسيتون بنسبة 5:1 وترك لمدة 15 دقيقة .
- 3- طردت الانابيب مركزياً بمعدل 4500 دورة/دقيقة و لمدة 15 دقيقة.
- 4- بعد الانتهاء رجت الأنابيب جيداً ثم كررت عملية الطرد المركزي لثلاث مرات .
- 5- بعدها أفرغ الطافي و أضيف 1 – 2 مل أسيتون إلى الكريات المترسبة.

6- رجت الانابيب بصورة جيدة ثم أفرغت محتويات الأنابيب في أطباق بتري زجاجية معقمة و تركت بدرجة حرارة المختبر لغرض التبخر .

7- جمع الراسب من مسحوق الفضة النانوية و أستخدم بطريقة ضغط القرص الصلب

لبروميدي البوتاسيوم KBR لغرض الفحص IR

8- كما أستخدم طافي المزرعة الفطرية بعد الترشيح باستخدام فلتر 0.45 Millipore ( $\mu\text{m}$ ) و تجفيفه إلى مسحوق و استخدم كعامل سيطرة .

9- سجلت الاطياف لمسحوق الفضة النانوية و طافي المزارع الفطرية عند الأطوال  $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$  باستخدام جهاز FT IR نوع SHIMA DZU-Japan

### 3-8-3 المجهر الإلكتروني الماسح Scanning electron microscope (SEM)

يستخدم هذا الفحص لتحديد حجم وشكل جسيمات الفضة النانوية المحضرة .إستخدم المجهر الإلكتروني الماسح SEM نوع INSPECT S 50-Netherland لغرض تحديد شكل و حجم الجسيمات و حضرت العينات وفقاً إلى (Vanmathi selvi and Sivakumar (2012):

- 1- رشح المحلول الحاوي على Ag NPs باستخدام الفلتر المعقمة ( $0.2 \mu\text{m}$ ) Millipore
- 2- حمل ما يقارب 5 مايكرو ليتر من المحلول و وضع على حامل المجهر الإلكتروني
- 3- تركت العينات بدرجة حرارة الغرفة لغرض التجفيف
- 5- عرضت للفحص باستخدام قوى تكبيريه مختلفة

### 4-8-3 مجهر القوة الذرية Atomic force microscope (AFM)

يستخدم هذا النوع من المجاهر لقياس تضاريس جسيمات الفضة النانوية ويعطي صورة ثلاثية الابعاد لشكل العينة .

### 5-8-3 حيود الأشعة السينية X Ray diffraction (XRD)

تستخدم هذه التقنية لدراسة جسيمات الفضة النانوية ويعطي صورة ثلاثية الابعاد لتضاريس العينة المدروسة على جهاز كمبيوتر خاص .

### 6-8-3 تشتت الضوء الديناميكي (DLS) Dynamic light scattering

تستخدم تقنية تشتت الضوء الديناميكي DLS analysis لتحديد حجم الجزيئات النانوية قيد الدراسة

### 7-8-3 جهد زيتا Zeta potential

يستخدم في توضيح الجهد الكهربائي الناتج عن تشتت الجسيمات المحضرة في المحلول الغروي

### 9-3 جمع العينات السريرية

جمعت العينات السريرية من مرضى بأعمار مختلفة ومن كلا الجنسين من الحروق والادرار و الاذن الوسطى ،جمعت العينات تبعاً لنوع الاصابة فقد استخدمت المسحات (Swabs)المباشرة في جمع عينات الحروق (Burns) و الاذن الوسطى في حين جمعت عينات الادرار (Urine) في انابيب اختبار معقمة.

### 1-9-3 زرع العينات

زرعت العينات جميعا على وسط اكار الدم الاساس واكار الماكونكي حضنت الاطباق جمعياً بالحاضنة بدرجة حرارة (37) م°. (Macfaddin, 2000).

شخصت العزلات المتحصل عليها اعتماداً على (Macfaddin et al., 2000) على وفق الاسس الاتية:-

### 1. الخصائص المظهرية Morphological characteristics

درست الصفات المظهرية للعزلات على وسطي الأكار المغذي وأكار الدم

من حيث شكل المستعمرة، الحجم، اللون، الحواف، العتمة والقوام وغيرها. كما درست الصفات المظهرية للخلايا بعمل مسحات جافة للفحص المجهرى المباشر لملاحظة شكل ولون الخلايا وانتظامها وتفاعلها مع صبغة كرام.

### 2. الاختبارات الكيموحيوية Biochemical test



تم إجراء سلسلة من الاختبارات الكيموحيوية مع الأخذ بعين الاعتبار خصوصية كل نوع من أنواع البكتريا المدروسة

### 1- اختبار الكاتليز Catalase test

تم إجراء الفحص بنقل جزء من مستعمرة بكتيرية منمأة على الوسط المغذي الصلب بعمر 24 ساعة باستخدام عيدان خشبية معقمة الى شريحة زجاجية نظيفة وجافة مضاف لها قطرة من كاشف بيروكسيد الهيدروجين (3%)، ان تكون فقاعات هوائية هو دليل على الاختبار الموجب (Baron, et al., 1998).

### 2- اختبار الاوكسيداز Oxidase test

تم إجراء الفحص بنقل جزء من مستعمرة بكتيرية منمأة على الوسط المغذي الصلب بعمر 24 ساعة باستخدام عيدان خشبية معقمة الى ورقة ترشيح مشبعة بكاشف (N,N, N,N-Tetramethyl-P-phenyldiaminedihydrochloride). ان ظهور اللون البنفسجي خلال 10 ثواني دليل الاختبار الموجب (Baron, et al., 1998).

### 3- اختبار تخمر المانيتول Mannitol fermentation test

تم زراعة العالق البكتيري على وسط المانيتول الملحي الصلب وحضن عند درجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة، النتيجة الموجبة لتخمر سكر المانيتول هو تحول لون الوسط من الوردي الى الاصفر (Macfaddin, 2000).

### 4- التحري عن الانزيم المخثر لبلازما الدم وعامل التكتل Coagulase & Clumping factor detection

استخدمت طريقة انابيب الاختبار للتحري عن الانزيم المخثر لبلازما الدم ، اذ نميت البكتريا في وسط نقيع القلب والدماغ السائل عند درجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة. مزج 0.1 من المزروع البكتيري مع 0.5 مل من بلازما الانسان الطبيعي غير المخفف في انبوبة اختبار زجاجية معقمة

وحضنت في حمام مائي عند درجة حرارة 37 م° لمدة 4 ساعات مع المراقبة كل 15 دقيقة . سجلت النتائج الموجبة عند تكون الخثرة وتصلب البلازما (Macfaddin,2000).

في حين تم التحري عن عامل التكتل باستخدام طريقة الشريحة الزجاجية (Slide test))، اذ وضعت قطرتان من البلازما على جانبي الشريحة واضيف الى احداها النمو البكتيري بينما اضيف الى الاخرى قطرة من المحلول الملحي الطبيعي لغرض المقارنة (سيطرة) ان حدوث أي تخثر للبلازما مقارنة مع السيطرة دليل على ايجابية الفحص (Macfaddin, 2000).

### 5- اختبار أنزيم اليوريز Urea's test :

خطط وسط اليوريا المائل بالبكتريا وحضن بدرجة حرارة (37)م° لمدة (1-7) أيام ، إن تغير لون الوسط من الأصفر الى الأحمر دلالة على النتيجة الموجبة (Macfaddin,2000) .

### 3- تشخيص الانواع البكتيرية باستخدام جهاز Vitek2-compact

استخدم جهاز (Vitek2-compact) والمصنع من قبل شركة (Bio Meurax)) في مستشفى الصدر التعليمي في محافظة ميسان .باتباع الخطوات التالية:-

1. تحضير العالق البكتيري Suspension Preparation: يحضر العالق حسب تعليمات الشركة المجهزة، كما يلي :

أ- تحضير أنابيب بلاستيكية معقمة.

ب- وضع 3 مل من المحلول الملحي بتركيز (5-4.5% NaCl) في الأنبوبة المعقمة.

ج-نقل عدد من المستعمرات النقية من الطبق الزرعي إلى الأنبوب بوساطة عروة ناقل معقمة Loop ومزج جيدا إلى أن أصبح المحلول عكراً

د- قياس عكوره المعلق باستخدام جهاز DensiChek والتي يجب ان تكون ( 0.5 – 0.6).

**2. تلقيح البطاقة Inoculation of the card: تلقيح البطاقة حسب الخطوات لتالية:**

أ- نقل العالق والبطاقة الحامل الجهاز و وضعاً في الاماكن المخصصة لهما، ثم تم ربط البطاقة والعالق بوساطة قناة توصيل رفيعة جداً micro-channel ويدخل رمز البطاقة بوساطة الماسح الضوئي.

ب- وضع الحامل في حجرة خاصة مفرغة من الهواء Vacuum chamber ، إذ ان عملية تفريغ الهواء تعمل على نقل المايكرو بالتالي البطاقة فضلاً عن توزيعها في الحفر الموجودة فيها.

3- ختم البطاقة وحضنها Card Sealing and Incubation: تقطع قناة التوصيل الياً من قبل الجهاز خلال مدة 10 - 15 دقيقة ويتم ختم البطاقة أي احكام اغلاق المنفذ القناة لمنع أي تسرب، ثم تنتقل الى الحاضنة Carousel incubator وتحضن البطاقات بدرجة  $35.5 \pm 1 \text{ C}^\circ$

4- النظام البصري Optical System : يعمل النظام البصري في الجهاز على تسقيط عدد من الحزم الضوئية تجاه البطاقة للتعرف على الأطوال الموجية للتفاعلات وترجمتها من خلال التغيرات اللونية و العكورة فضلاً عن النواتج الايضية.

5- نتائج الاختبار وتقنيات التحليل Test Reaction results & Analytical Techniques : يعمل الجهاز على حساب النتائج ومقارنتها بالنتائج المخزونة بالجهاز والتي تضم العديد من قياسات الاختبار لعدد كبير من السلالات النامية والمعزولة من أماكن متنوعة، يظهر الجهاز النتائج بشكل تقارير على شاشة ملحقه بالجهاز .

**3-10 تحديد السمية الخلوية لجسيمات الفضة النانوية المدروسة**

أجري فحص اختبار السمية الخلوية باستخدام كريات الدم الحمراء RBC بأخذ 2 مل من الدم في انبوبة اختبار من نوع EDTA و فصلت كريات الدم الحمراء بجهاز الطرد المركزي حيث اخذ 0.8 مل من كريات الدم الحمراء وأكمل الحجم بإضافة 0.2 مل من محلول جسيمات الفضة النانوية المدروسة وبتراكيز مختلفة ثم حضنت بالحاضنة لفترة ثلاث ساعات وبدرجة حرارة  $37 \text{ C}^\circ$  وبمعدل ثلاث مكررات لكل تركيز .

### 11-3 حفظ العزلات البكتيرية Maintenance of bacterial isolates

حفظت العزلات البكتيرية بعد تشخيصها على أوساط زرعية مائلة من Nutrient agar الأكار المغذي بدرجة حرارة 4 م° مع استخدام عملية الأدامة بشكل دوري من خلال تجديدها شهريا على أوساط جديدة للمحافظة على نشاطها طيلة فترة الدراسة وهذا النوع من الحفظ يدعى الحفظ قصير الامد ولضمان حفظ العزلات لفترات طويلة والمحافظة على نشاطها ولمنع حدوث الطفرات تم تحضير 5 مل من وسط المغذي السائل Nutrient broth وتلقيحه بمستعمرة فتية وحضنت بالحاضنة بدرجة حرارة 37 C° ولمدة 24 ساعة حفظت باستخدام وسط المغذي السائل نسبة 80% وأضيف إليه 20% من الكليسرول وتم رجه بشكل جيد وتم حفظ بدرجة حرارة 20C° - لحين الاستخدام. (Collee et al., 1996).

### حفظ الفطريات المعزولة storage of fungi

#### الحفظ لفترة قصيرة Short storage period

حضر الوسط Potato Dextrose Agar وصب في قناني زجاجية Scro cap المعقمة ثم وضعت بشكل مائل بدرجة حرارة 25C° ولفترة 24 ساعة ثم لقت باللقاح الفطري وحضنت بدرجة حرارة 25 ولفترة 24 ساعة ثم لقت باللقاح الفطري وحضنت بدرجة حرارة 27C° لمدة 4 أيام ثم حفظت بالثلاجة بدرجة حرارة 4C° للاستعمال عند الحاجة ولفترة شهرين .

#### الحفظ لفترة طويلة Long storage period

لقت كل فطر في 100 مل من وسط PDB وحضنت بدرجة حرارة 37C° ولفترة 4 يوم ثم أخذ النمو الفطري و رشح بواسطة الشاش المعقم ثم نقل 1.6 مل من الراشح الفطري في قناني معقمة بعد ذلك أضيف إليها 400 مايكروليتر من الكليسيرول وحفظ بدرجة 20C° - لمدة طويلة .

### 12-3 اختبار الفعالية ضد بكتيرية Anti-bacterial activity test

اعتمدت طريقة الانتشار بالأقراص على الوسط الصلب (Disic diffusion method) بعد تحضير اقراص ورق ترشيح (Filter paper) بقطر 6 ملم مشبعة بالمادة المختبرية (Gould and Bowie) والمحورة من قبل (Al-Duboon(1997) أذ وضعت الاقراص الورقية في قناني

زجاجية بمعدل 100 قرص لكل قنينة ثم جففت بالفرن بدرجة حرارة  $150^{\circ}\text{C}$  ولفترة 60 دقيقة . ثم وزن 10 ملغم من المادة المختبره (جسيمات الفضة النانوية المحضرة ) لكل عينة وأذيب في 1 مل من المذيب العضوي Dimethyl Sulphoxide (DMSO) مع الايثانول و وضع في القناني الحاوية على 100 قرص ورقي ليكون تركيز المادة المختبرة 100 مايكرو غرام / قرص وضعت الاقراص المشبعة بالمادة المختبرة على منتصف اطباق بتري حاوية على وسط M H A والملقحة ب0.1 مل من عالق السلالات البكتيرية المختبرة وبتركيز  $10^8$  خلية/ مل والمزروعة بطريقة النشر ، حضنت الأطباق بدرجة حرارة  $37^{\circ}\text{C}$  لفترة 24 ساعة بعدها قيست منطقة التنشيط حول الاقراص الورقية المشبعة بالمادة المختبرة وقد استخدم المضاد الحيوي Gentamycin كعامل سيطرة موجب تجاه العزلات البكتيرية المرضية .

### 13-3 تحديد التركيز المثبط الأدنى MIC و القاتل الأدنى MBC

لأجل تحديد التركيز المثبط الأدنى للمركبات الايضية المختارة اذ أذيب 8 ملغم من جزيئات الفضة النانوية المخلقة لكل فطر وبكتريا مختبرة في 4 مل من المذيب العضوي 100% ( Dimethylsulphoxide(DMSO) ) ليصبح تركيز المحلول 2000 مايكرو غرام/مل ثم حضرت سلسله من التخفيف ( 1000 و 500 و 250 و 125 و 65 و 32.5 و 15 و 7 و 3 ) ملي غرام /مل ومن ثم أخذ 2مل من كل تخفيف وأضيف إلى قناني حاويه على (18) مل من وسط MHA قبل تصلبه ليكون التركيز النهائي لكل قنينة (0.3 و 0.7 و 1.5 و 3.1 و 6.5 و 12.5 و 25 و 50 و 100 و 200 ) ملي غرام/ مل ثم سكب محتوى كل قنينة في طبق بتري معقم وترك ليتصلب . لقع كل طبق بـ 0.1 مل من البكتريا المختبرة أي ما يعادل  $10^8$  خليه /مل والمنماة على وسط NB لمدة 24 ساعة وحضنت الأطباق بدرجة حرارة  $37^{\circ}\text{C}$  ولمدة 24 ساعة ثم حدد التركيز المثبط الأدنى والقاتل الأدنى لكل نوع من جسيمات الفضة النانوية المخلقة على أساس أوطأ تركيز لا يظهر فيه نمو (Brownand ؛ *et al.*,2011) ( Samuel ( Kothari,1975)

## الفصل الرابع

### النتائج والمناقشة

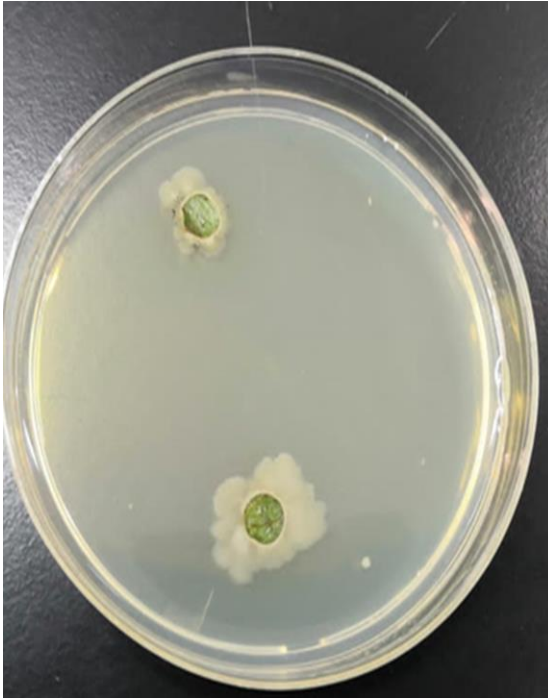
### Results and Discussion

## Results and Discussion

4 النتائج والمناقشة  
1-4 العزل والتشخيص

## 2-4 عزل وتشخيص البكتريا

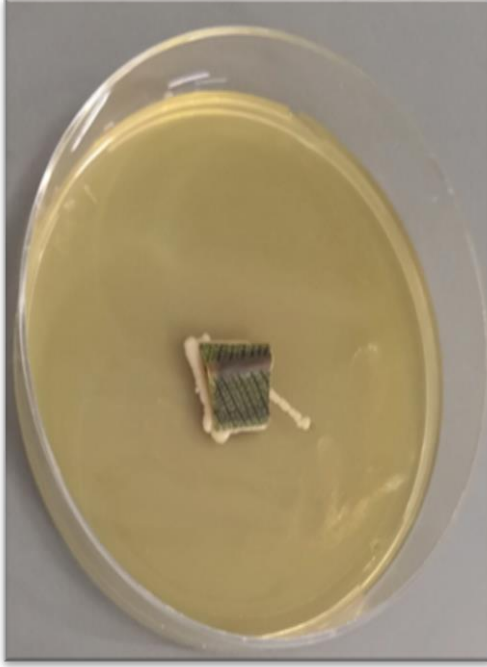
تم خلال الدراسة الحالية عزل اربعة انواع من البكتريا وشخصت باستخدام جهاز Vitek-2 تابعة لنفس الجنس من داخل النسيج النباتي لأربعة انواع من النباتات حيث تم عزل بكتريا *S. sciuri* من نبات السدر شكل (4) و بكتريا *S. lentus* من اوراق نبات الريحان شكل (5) وبكتريا *S. hominis* من اوراق نبات البمبر شكل (6) كما تم عزل بكتريا *S. vitulinus* من اوراق نبات الدفلة شكل (7). اذ اشارت العديد من الدراسات الى إمكانية عزل انواع مختلفة من البكتريا من داخل النسيج النباتي منها دراسة (Hateet.,2017) التي تم خلالها عزل بكتريا *Bacillus megaterium* من النسيج الداخلي لنبات الحنطة .



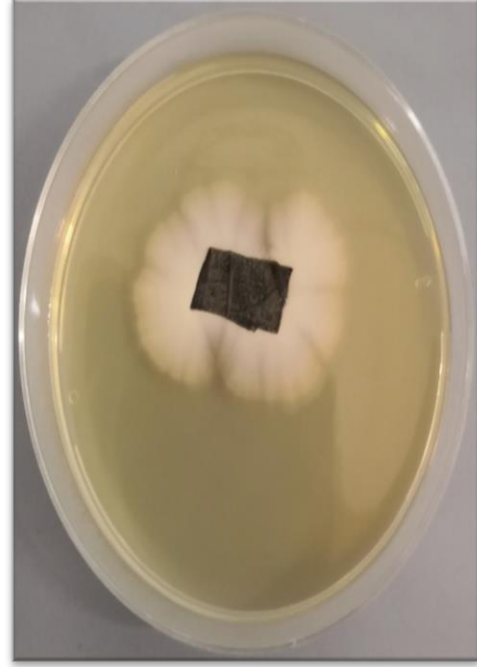
شكل (5) بكتريا *Staphylococcus lentus* المعزولة من أوراق نبات الريحان



شكل (4) بكتريا *Staphylococcus sciuri* المعزولة من أوراق نبات السدر



شكل (7) بكتريا *Staphylococcus vitulinus* المعزولة من اوراق نبات الدفلة



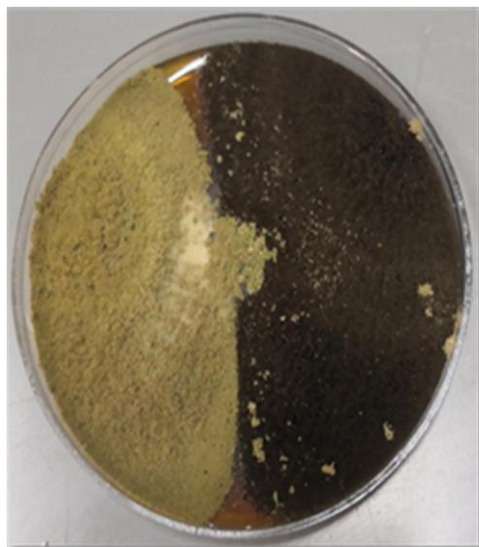
شكل (6) بكتريا *Staphylococcus hominis* المعزولة من اوراق نبات البمبر

### 3-4 فطريات الاندوفاييت Endophytic Fungi

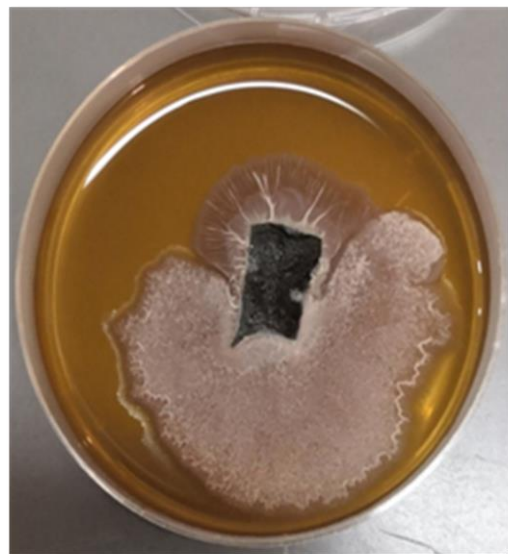
خلال الدراسة عزل اربعة انواع فطرية من داخل النسيج النباتي لأربع نباتات بطريقة تعقيم السطح فقد عزل الفطر *Aspergillus terreus* NRS من نبات الدفلة شكل (8) والفطر NRA *Aspergillus terreus* عزل ايضا من نبات الصبار شكل (9) كما عزل الفطر *Aspergillus tubingensis* من أوراق نبات الريحان شكل (10) والفطر *Cladosporium uredinicola* من اوراق نبات السدر شكل (11). تعد الفطريات من اهم مجاميع الاحياء المجهرية في البيئات المختلفة حيث اشارت الدراسات الى وجود العديد من الانواع الفطرية داخل النسيج النباتي لمعظم النباتات والتي لا تسبب الضرر لهذه الانسجة وانما توفر الحماية للنباتات من الاحياء المجهرية المتواجدة في البيئة (Jia et al., 2016) اذ انها تمتلك القدرة على انتاج العديد من المركبات الفعالة (padha et al., 2013) فقد أشارت دراسات عديدة منها دراسة (Irobi et al (1996 الى قدرة هذه



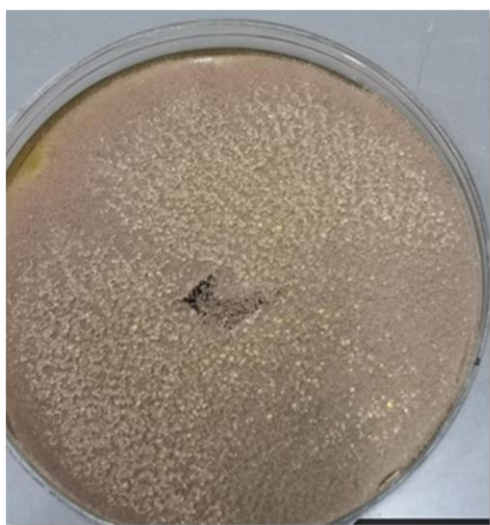
الفطريات على انتاج مركبات فينولية والتربينات الاحادية والثنائية كما تعتبر الفطريات مصدر من مصادر المضادات الحيوية (Fischbach,2009 ; Mekawey,2010).



شكل (9) فطر *Aspergillus NRA terreus* المعزول من نبات الصبار



شكل (8) فطر *Aspergillus NRS terreus* المعزول من نبات الدفلة



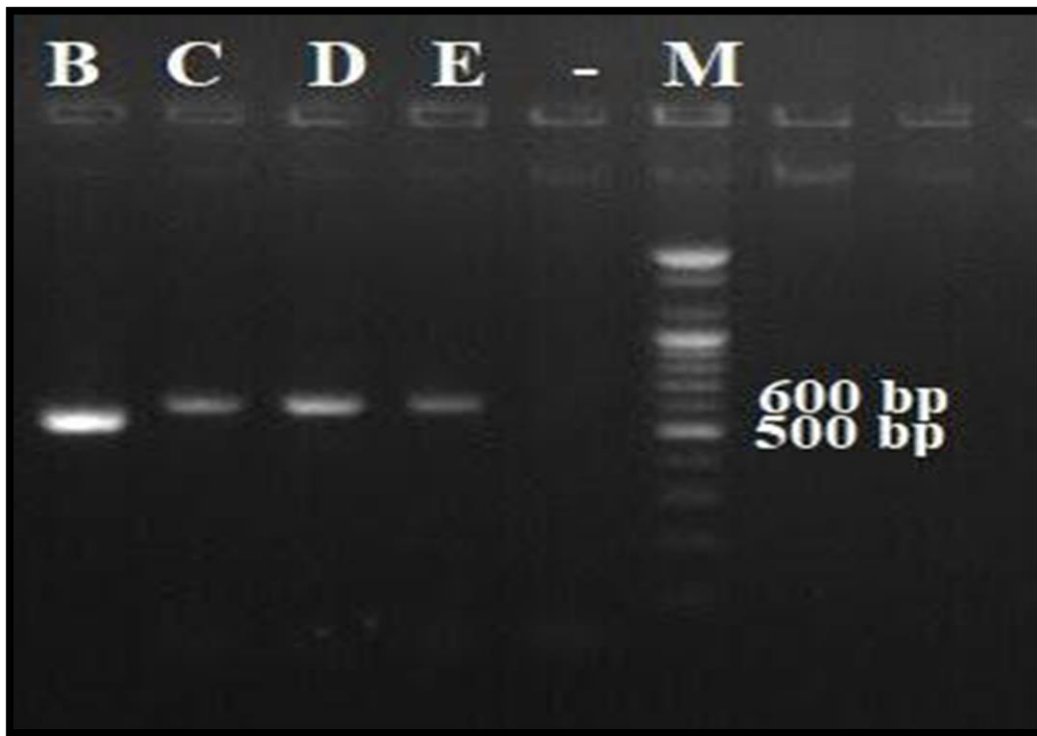
شكل (11) فطر *Cladosporium uredinicola* المعزول من اوراق نبات السدر



شكل (10) فطر *Aspergillus tubingensis* المعزول من اوراق نبات الريحان

## 4-4 استخدام تقنية ال PCR لتشخيص الفطريات

تم أستخلاص ال DNA لأربعة أنواع من الفطريات المعزولة من داخل النسيج النباتي ، حيث أظهرت النتائج باستخدام تقنية ال PCR ان البادئات (ITS1 , ITS4) قامت بتضخيم الشريط الوراثي وظهرت مواقع الحزم المتضخمة بين (500-600) pb شكل (12)



شكل رقم (12) نواتج الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز لمنتج PCR باستخدام البادئات (ITS1,ITS4)

E: *Aspergillus terreus*

Negative control (-)

D: *Aspergillus terreus*

C: *Cladosporium uredinicola*

B: *Aspergillus tubingenensis*

M: Marker

أظهرت نتائج تحليل تتابعات القواعد النيتروجينية للمادة الوراثية الـ DNA لأنواع الفطرية المدروسة ومقارنتها مع العزلات الموجودة في بنك الجينات NCBI تشخيص أربعة أنواع من الفطريات التي عزلت من الأنسجة الداخلية لأوراق بعض النباتات قيد الدراسة كما في جدول (12) إذ تم تسجيل نوعين من الفطريات المدروسة وهما *Aspergillus terreus* NRS والذي عزل من النسيج الداخلي لأوراق نبات الدفلة *Aspergillus terreus* NRA والذي عزل من النسيج الداخلي لأوراق نبات الصبار كما بينت نتائج التحليل الجزيئي للمادة الوراثية تطابقاً في التشخيص الجزيئي لكلا النوعين من الفطريات قيد الدراسة هي *Cladosporium uredinicola* و *Aspergillus tubingensis* و بنسبة (100%) مع العزلات الموجودة في بنك الجينات ، حيث بلغت نسبة التطابق الفطر *Cladosporium uredinicola* (100%) ، وبلغت نسبة التطابق الفطر *Aspergillus tubingensis* (100%) . هنالك العديد من التقانات التي قدمت معلومات تخص التصنيف ، لكن يعتبر تسلسل القواعد النيتروجينية وتنظيم الحامض النووي هو من أفضل احتماليات إعطاء تمييز واضح وحساس بين أنواع الكائنات الحية وكذلك إعطاء إشارة إلى العلاقات التطورية بينها (Demirel et al., 2013) يعد تصنيف الفطريات بالاعتماد على الطرق الجزيئية من التقانات المهمة في إزالة الأخطاء والمعوقات التي تحصل أثناء التشخيص المظهري وذلك يعود إلى أن التشخيص الجزيئي يعتمد على الصفات الوراثية لكل نوع فطري بالاعتماد على تسلسل القواعد النيتروجينية لشريط DNA (Weber, 2009) .

**جدول (12) التشخيص الجزيئي للفطريات المعزولة من داخل النسيج النباتي لأوراق بعض النباتات قيد الدراسة .**

اسم السلالة الفطرية	نسبة التطابق	Accession	اسم السلالة الجديدة بعد التسجيل في بنك الجينات	رمز العزلة
<i>Cladosporium tenuissimum</i> isolate MMI00053	100%	JQ246357.1		B
<i>Aspergillus terreus</i> strain .Algharawi-A.te	94%	MZ995426.1	<i>Aspergillus terreus</i> NRS	C
<i>Aspergillus tubingensis</i> strain Algharawi-A.te	100%	MK673550.1		D
<i>Aspergillus terreus</i> isolate FOEV52	94%	MZ997333.1	<i>Aspergillus terreus</i> NRA	E

**5-4 عزل وتشخيص البكتريا المرضية**

تم خلال الدراسة عزل انواع من السلالات البكتيرية اذ تم عزل بكتريا *E.coli* , *P. mirabilis* , *S. epidermidis* من الادرار وكذلك تم عزل بكتريا *P.aeruginosa* من الحروق وايضا تم عزل بكتريا *S. aureus* من الاذن كما في جدول (13)

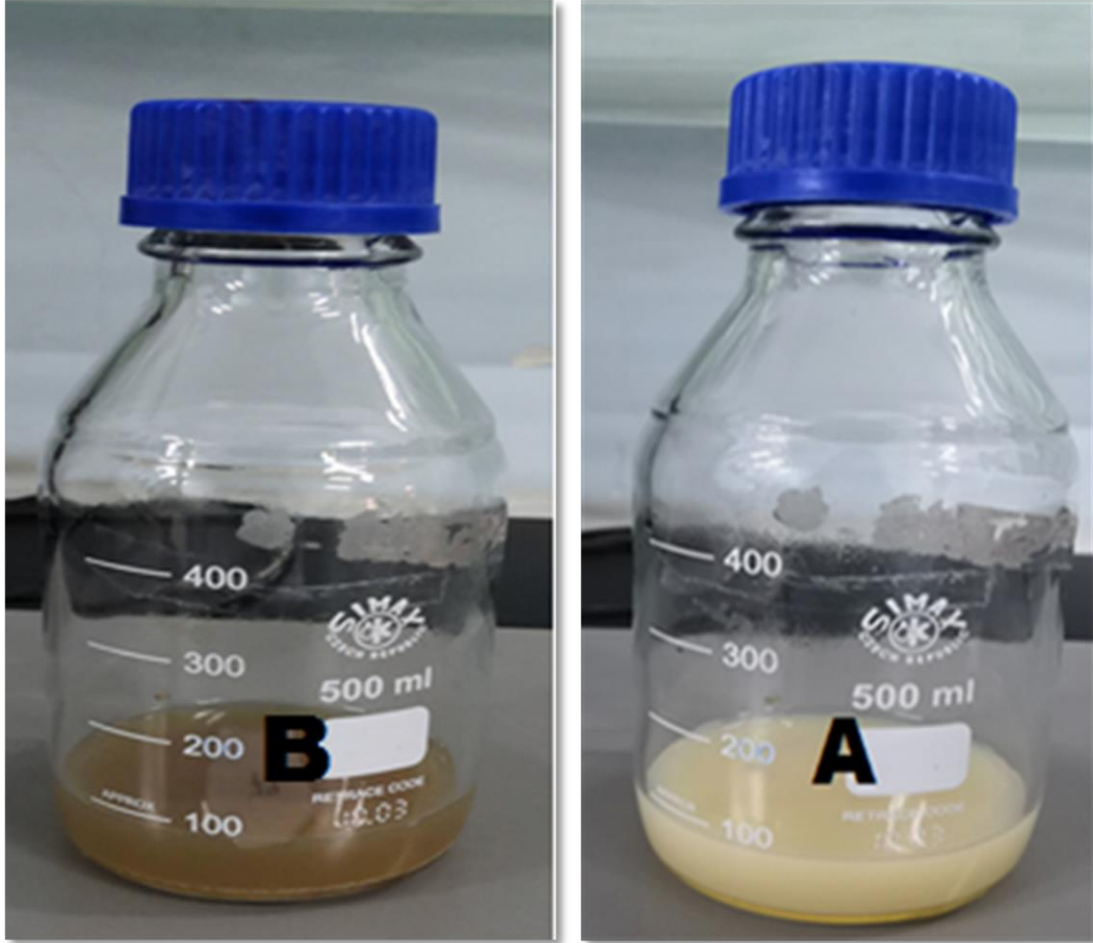
**الجدول (13) العزلات البكتيرية الممرضة المعزولة خلال الدراسة**

مصدر العينة	العدد	عزلات البكتريا
الإدرار	10	<i>E.coli</i>
الإدرار	12	<i>P. mirabilis</i>
حروق	10	<i>P.aeruginosa</i>
الأذن	15	<i>S. aureus</i>
الإدرار	13	<i>S. epidermidis</i>

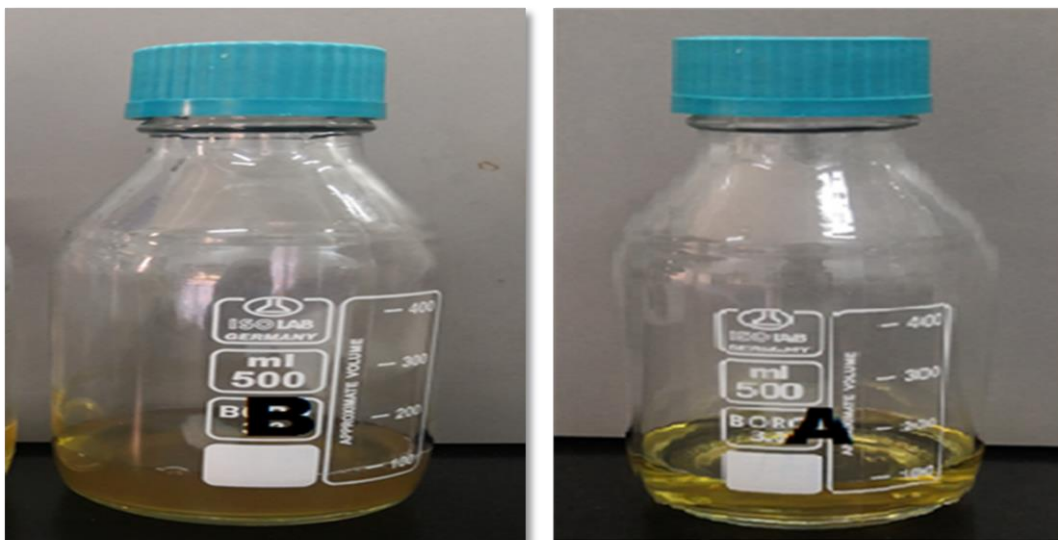
## 4-6 التخليق الحيوي لجسيمات الفضة النانوية

احتلت طرق تصنيع الجزيئات النانوية اهتماماً كبيراً وخاصة الطرق الصديقة للبيئة المعروفة بالطرق البايولوجية من خلال استعمال الاحياء المجهرية كالفطريات والبكتريا لذلك ركزت دراستنا على تقييم قدرة بعض الاحياء المجهرية على تصنيع الجزيئات النانوية للفضة وقد بينت نتائج الدراسة الحالية قدرة الانواع الفطرية والسلالات البكتيرية المعزولة من داخل الانسجة النباتية المدروسة على البناء الحيوي لجسيمات الفضة النانوية بعد انمائها على الاوساط التخمرية ومعاملة رواشح المزارع الفطرية (FCS) Fungal Culture Supernatant والبكتيرية Culture Supernatant (BCS) Bacterial

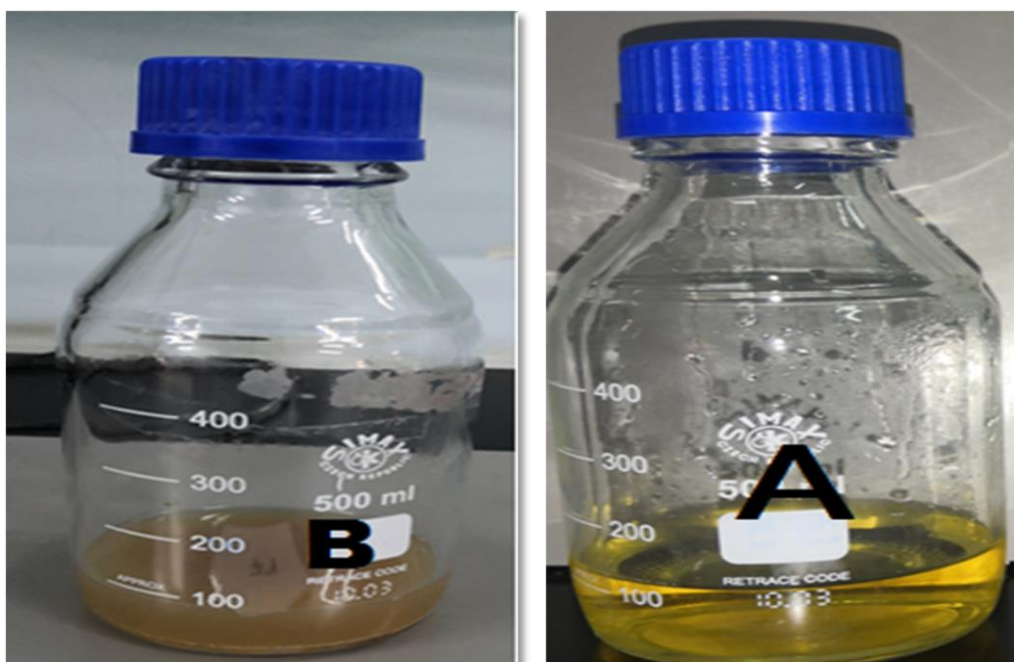
بملح نترات الفضة  $AgNO_3$  من خلال الكشف الابتدائي بالمشاهدة البصرية عن عملية الأختزال الحيوي Bioruduction والتي تكون مسؤولة عن ظهور التغيرات اللونية في راشح المزارع الفطرية والبكتيرية (El-Saadony et al., 2019) اذ تم مشاهدة راشح المزارع البكتيرية بعد مرور 48 ساعه من الحضانة بالحاضنة الهزازة بدرجة حرارة  $37^{\circ}C$  حيث أظهر راشح مزرعة السلالة *S. lentus* تغيراً لونياً من اللون الابيض الى اللون البني الفاتح شكل (13) فيما أظهر راشح مزرعة السلالة *S. sciuri* تغيراً لونياً من اللون الاصفر الى اللون البني الغامق شكل (14) واظهر راشح مزرعة السلالة *S. hominis* تغيراً لونياً من اللون الاصفر الى اللون البني الغامق أيضاً كما في الشكل (15) أما السلالة *S. vitulinus* فقد أظهر راشح المزرعة تغيراً الى اللون البني بعد ان كان ذو لون أصفر كما في الشكل (16).



شكل (13) التغير اللوني لراشح مزرعة السلالة *S.lentus*  
A. راشح المزرعة غير المعامل ب  $AgNO_3$  B. راشح المزرعة الحاوي على  $AgNO_3$  بعد 48 ساعة من  
الحضن



شكل (14) التغير اللوني لراشح مزرعة السلالة *S. sciuri*  
 A. راشح المزرعة غير المعامل ب  $AgNO_3$ . B. راشح المزرعة الحاوي على  $AgNO_3$  بعد 48 ساعة من  
 الحضن



شكل (15) التغير اللوني لراشح مزرعة السلالة *S. hominis*  
 A. راشح المزرعة غير المعامل ب  $AgNO_3$ . B. راشح المزرعة الحاوي على  $AgNO_3$  بعد 48  
 ساعة من الحضن



شكل (16) التغير اللوني لراشح مزرعة مزرعة السلالة *S.vitulinus*

A. راسح المزرعة غير المعامل ب AgNo3B. (B) راسح المزرعة الحاوي على AgNo3 بعد 48 ساعة من الحضن

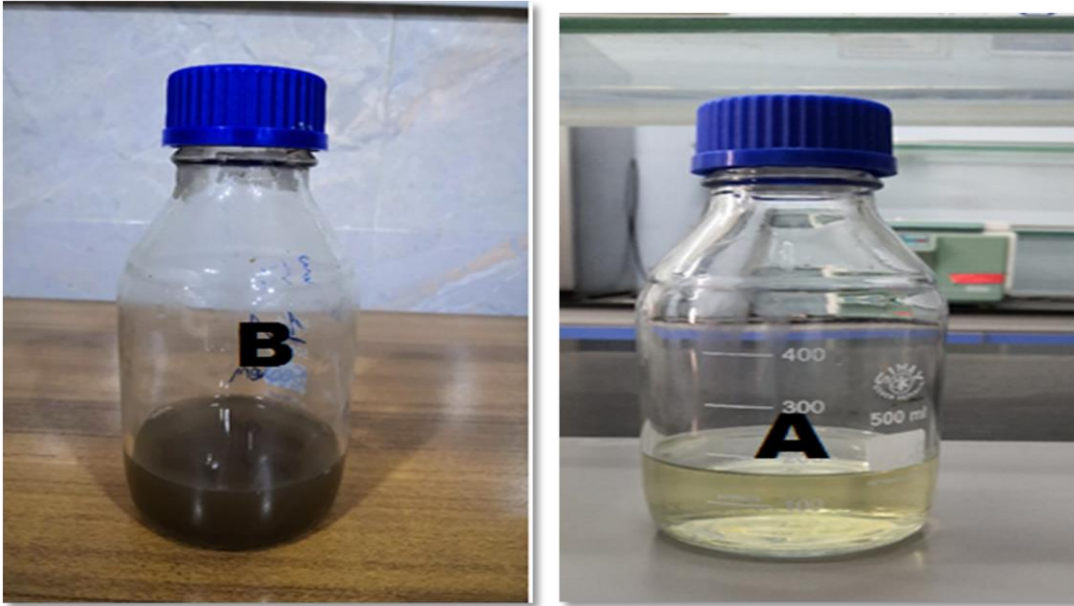
اما بالنسبة للفطريات المعزولة خلال الدراسة فقد تم استخدامها جميعاً في التخليق الحيوي لجسمات الفضة النانوية اذ تم مشاهدة راسح المزارع الفطرية بعد مرور 72 ساعة من الحضن بحاضنة هزازة بدرجة حرارة 27م° فقد اظهرت النتائج ان جميع رواشح الفطريات المختبرة قد اظهرت تغير لوني اذ اظهر راسح الفطر *Asp.tubingensis* تغير لوني من اللون الاصفر الشاحب الى اللون البني الداكن الشكل (17) كما أظهر راسح مزرعة الفطر *Cladosporium uridinicola* تغير لوني من اللون الاصفر الشاحب الى اللون الاسود شكل (18). أما راسح مزرعة الفطر *Aspergillus terrus* NRS فقد تغير اللون من اللون الاصفر الشاحب الى اللون البني الغامق شكل (19). فيما أظهر راسح مزرعة الفطر *Aspergillus terrus* NRA تغيراً لوني من اللون الاصفر الشاحب الى اللون البني المحمر شكل (20) . لوحظت التغيرات اللونية بعد 48 ساعة بالنسبة للبكتريا وبعد 72 ساعة بالنسبة للفطريات من الحضن في راسح المزارع المعاملة بنترات الفضة AgNO<sub>3</sub> وهذا يشير الى حدوث عملية الاختزال Bio redaction لأيونات الفضة وتشكل جسيمات الفضة النانوية في رواشح المزارع ويعود السبب في ذلك الى ظاهرة بلازمون السطح (SPR) Surface Plasmon Resonance لجسيمات الفضة النانوية وهذا يتفق مع دراسة ( Borase et al.,2014; Huang et



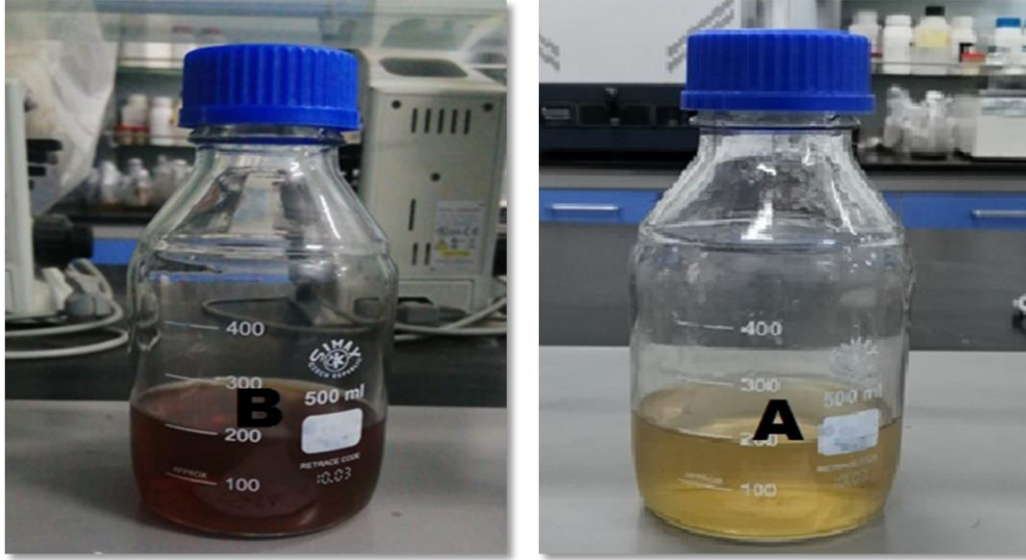
(al., 2020). ان التغير اللوني ناتج عن آثاره سطح البلازمون SPR لجزيئات الفضة النانوية (Verma *et al.*, 2015) نتيجة اختزال ايونات الفضة النانوية بفعل أنزيم اختزال يعرف بأنزيم



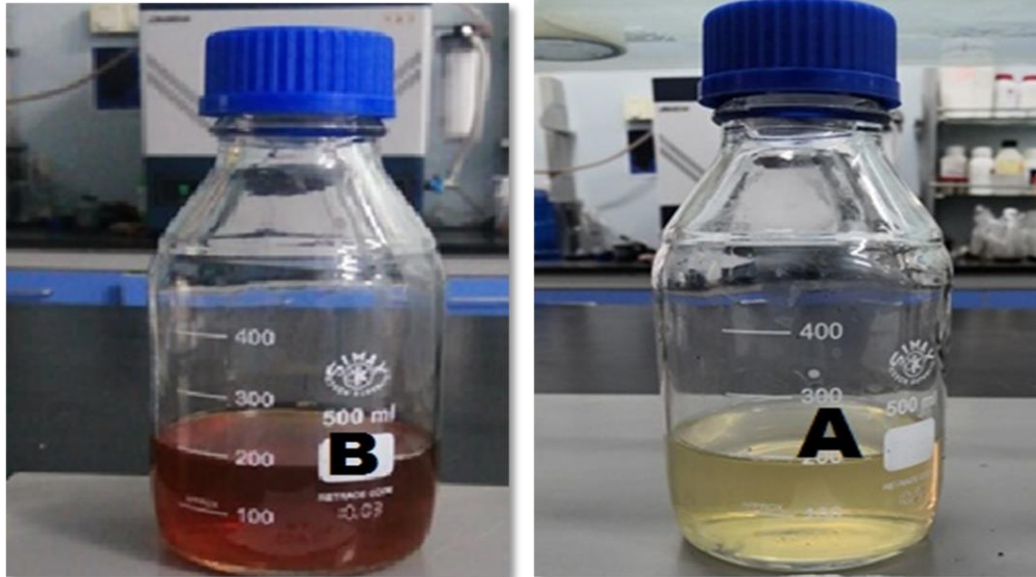
شكل (17) التغير اللوني لراشح مزرعة الفطر *A. tubingensis* A. راشح المزرعة غير المعامل ب  $AgNO_3$  B. راشح المزرعة الحاوي على  $AgNO_3$  72 ساعة من الحضانة



شكل (18) التغير اللوني لراشح مزرعة الفطر *C. uridinicola* A. راشح المزرعة غير المعامل ب  $AgNO_3$  B. راشح المزرعة الحاوي على  $AgNO_3$  بعد 72 ساعة من الحضانة



شكل (19) التغير اللوني لراشح مزرعة الفطر *Aspergillus terreus* NRS  
 A. راشح المزرعة غير المعامل ب  $AgNO_3$  (B). راشح المزرعة الحاوي على  
 $AgNO_3$  بعد 72 ساعة من الحضانة.

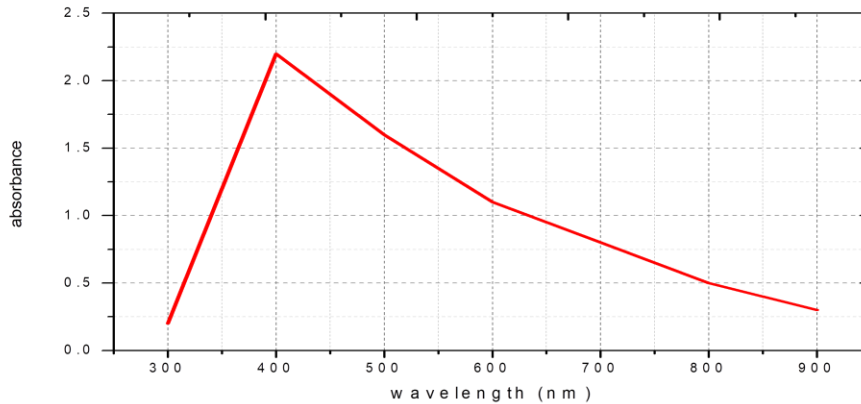


شكل (20) التغير اللوني لراشح مزرعة الفطر *Aspergillus terreus* NRA  
 A. راشح المزرعة الحاوي على  $AgNO_3$  (B). راشح المزرعة غير المعامل ب  
 بعد 72 ساعة من الحضانة  $3AgNO_3$

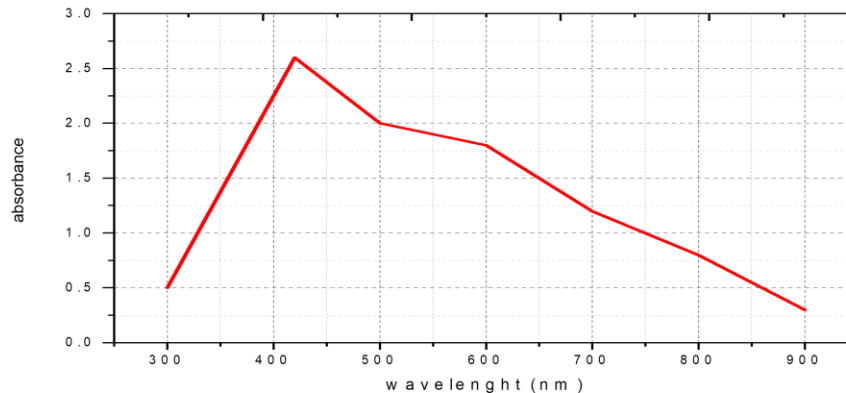
## 7-4 التحليل الطيفي للأشعة فوق البنفسجية UV\_Vis

أظهرت نتائج الدراسة الحالية لطيف الأشعة فوق البنفسجية UV\_Vis عند الأطوال الموجية (300-900) نانومتر والمسجلة بعد 48 ساعة بالنسبة لرواشح المزارع السلالات البكتيرية أظهرت قمة امتصاص مختلفة وعند أطوال موجية محددة أذ اظهر راشح مزرعة السلالة *S. lentus* قمم امتصاص عند الطول الموجي 400 نانومتر عند قيمة امتصاص 2.2 كما في الشكل (21). فيما أظهر راشح مزرعة السلالة *S. Sciuri* قيمة امتصاص 2.4 عند طول موجي 420 نانومتر شكل (22). أما راشح مزرعة السلالة *S. hominis* أظهر قيمة امتصاص بلغت 2.6 عند طول موجي 420 نانومتر شكل (23). فيما أظهر راشح مزرعة السلالة *S. vitulinus* قيمة امتصاص بلغت 2.5 عند طول موجي 400 نانومتر شكل (24). اما بالنسبة لرواشح المزارع الفطرية أظهرت قمم امتصاص مختلفة أيضاً وعند اطوال موجية محددة اذ اظهر راشح مزرعة الفطر *A.terrus* NRS قمم امتصاص ضيقة عند الطول الموجي 420 نانومتر وعند قيمة امتصاص 2.5 كما في الشكل (25). فيما أظهر راشح مزرعة الفطر *A. terreus* NRA قيمة امتصاص 2.4 عند طول موجي 400 نانومتر شكل (26). أما راشح مزرعة الفطر *A.tubingensis* أظهرت قيمة امتصاص بلغت 2.4 عند طول موجي 420 نانومتر شكل (27) . أما بالنسبة لراشح مزرعة الفطر *C. uredinicola* فقد أظهر قيمة امتصاص بلغت 2.6 عند طول موجي 420 نانومتر شكل (28). في حين لم يظهر راشح المزارع غير المعاملة بنترات الفضة  $AgNO_3$  والمستخدم كعامل سيطرة (Control) اية قمم امتصاص تذكر. فقد اتفقت نتائج أطياف الاشعة فوق البنفسجية UV\_Vis مع ما توصلت اليه دراسات سابقة (Huq 2020; Baltazar et al., 2019).تعتبر مطيافية الاشعة فوق البنفسجية UV-Vis اداة تقنية تحليلية مهمه للكشف عن جسيمات الفضة النانوية في المحاليل بسبب الخصائص البصرية التي تظهرها الجسيمات النانوية والنااتجة عن SPPR (Othman et al ., 2019) ، كما أن الامتصاصية عند الأطوال الموجية المحددة يرتبط ارتباط وثيق بالحجم والابعاد النسبية للجسيمات النانوية ، كما يعتبر طيف الاشعة فوق البنفسجية UV-Vis ذو امتصاصية عالية للجزء الأكبر من SPPR وبالتالي تحديد عملية الاختزال الحيوي لأيونات الفضة وكذلك تحديد حجم الجسيمات النانوية من خلال تحديد مواقع الامتصاصية عند

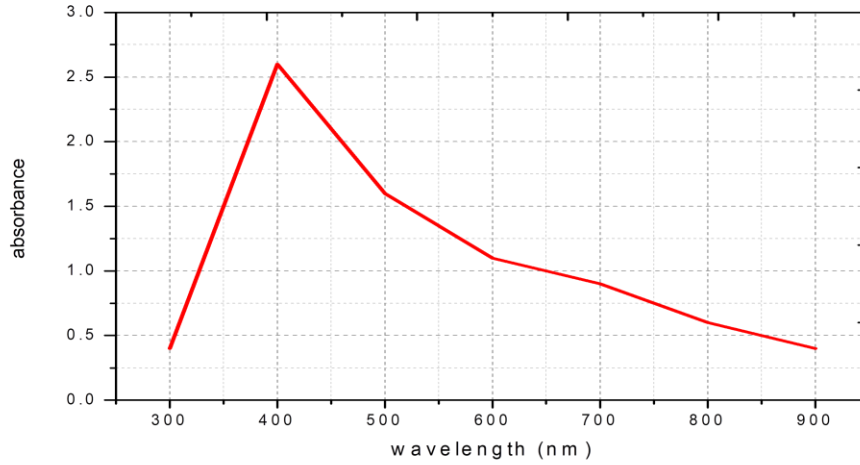
الأطوال الموجية ، وكذلك فإن زيادة حجم الجسيمات النانوية يؤدي الى انتقال قمة SPPR الى طول موجي أطول (Prathna *et al.*, 2011) . كما أشارت العديد من الدراسات الى ان عملية التخليق الحيوي لجسيمات الفضة النانوية ومواقع الامتصاصية لها تختلف باختلاف انواع الاحياء المجهرية ، فقد ذكرت دراسة (El-Saadony *et al.*, 2019) أن التخليق الحيوي لجسيمات الفضة النانوية باستخدام راشح المزرعة البكتيرية لبكتريا *Bacillus pseudomycoides* يحدث عند فترة حضانة 24 ساعة ودرجة حرارة 30 درجة مئوية كما أظهر قمة امتصاص =1.0 عند الطول الموجي 420 نانومتر كما اكدت ذلك دراسة (Rani *et al.* , 2017) والتي اشارت الى ان التخليق الحيوي لجسيمات الفضة النانوية لراشح مزرعة الفطر *Aspergillus terreus* المعزول من داخل النسيج النباتي Endophytic Fungi لنبات *Calotropis procera* يحدث عند درجة حرارة الغرفة والذي



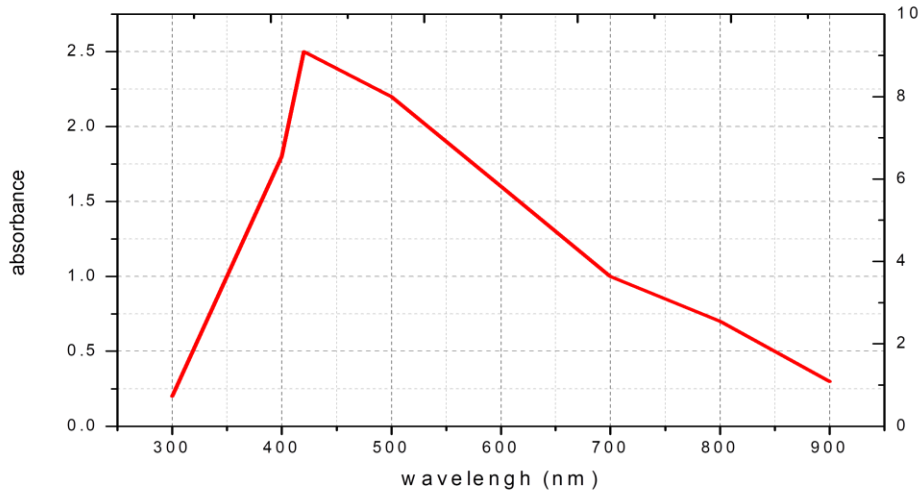
شكل (21) طيف الاشعة فوق البنفسجية لراشح مزرعة السلالة *S. lentus*



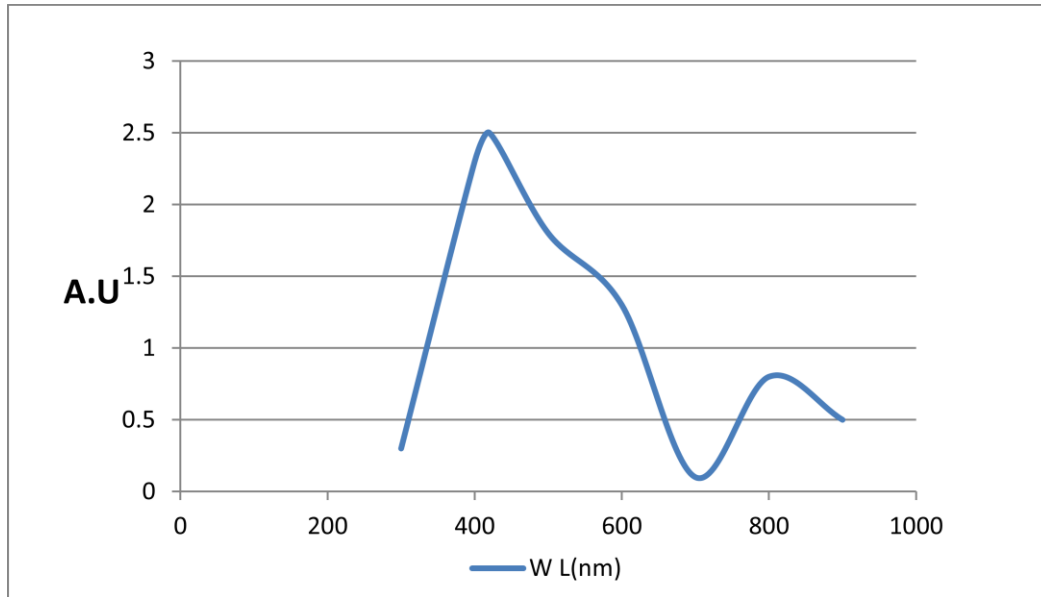
شكل (22) طيف الاشعة فوق البنفسجية لراشح مزرعة السلالة *S. Sciuri*



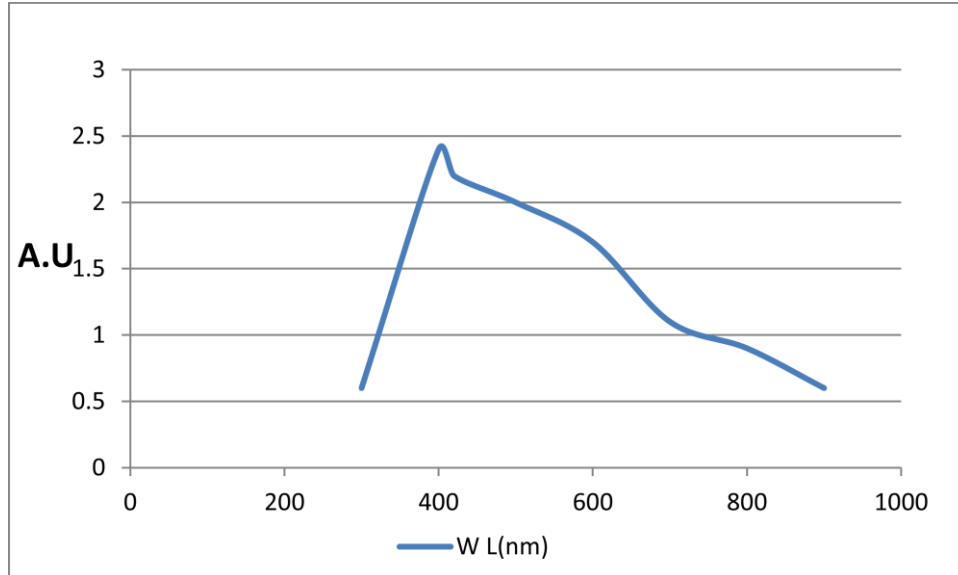
شكل (23) طيف الاشعة فوق البنفسجية لراشح مزرعة السلالة *S. hominis*



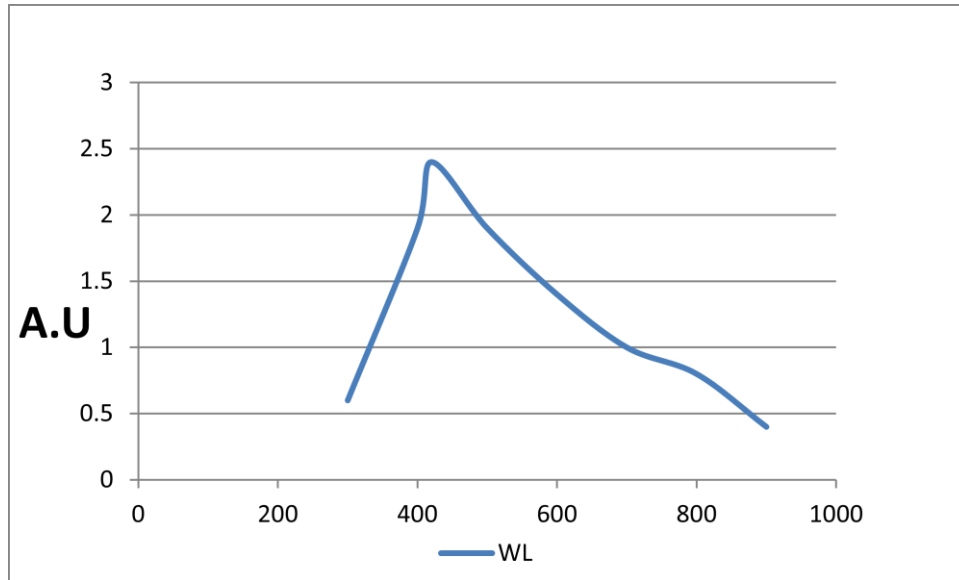
شكل (24) طيف الاشعة فوق البنفسجية لراشح مزرعة السلالة *S. vitulinus*



شكل (25) طيف الاشعة فوق البنفسجية لراشح الفطر *A. terreus* NRS المعزول من النسيج الداخلي لنبات الدفلة

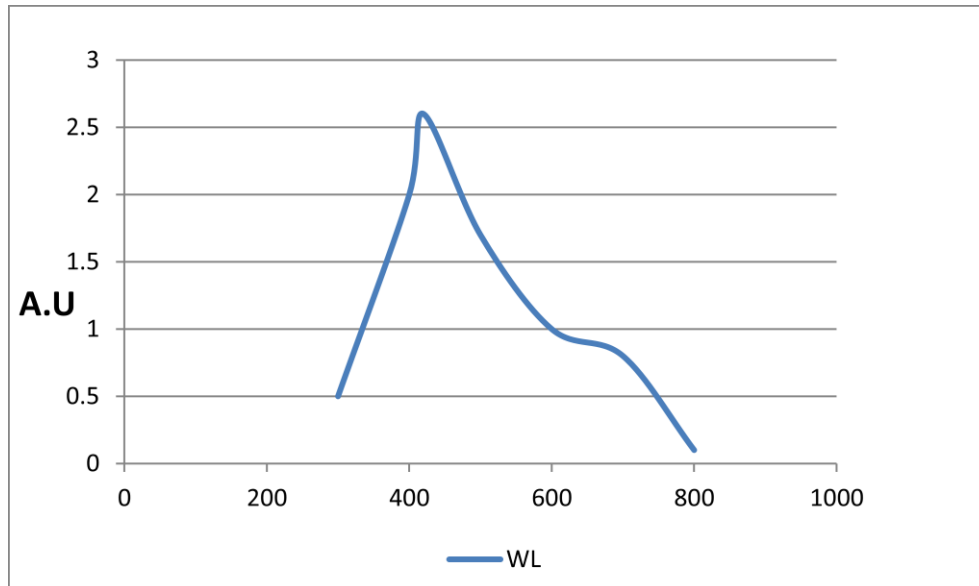


شكل (26) طيف الاشعة فوق البنفسجية لراشح الفطر *A. terreus* NRA المعزول من النسيج الداخلي لنبات الصبار



شكل (27) طيف الاشعة فوق البنفسجية لراشح الفطر

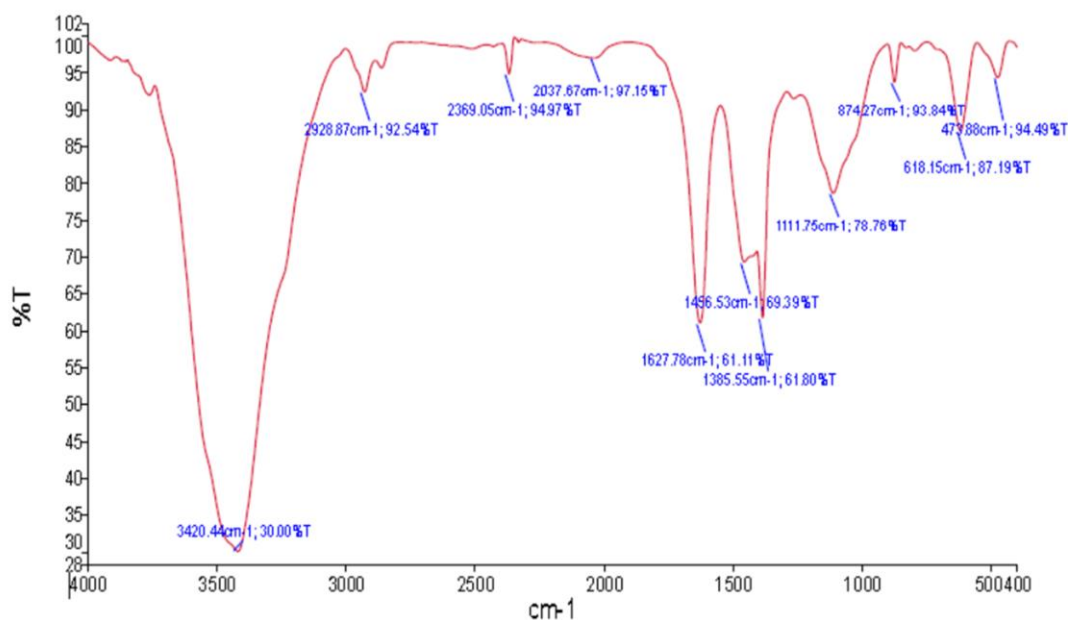
*A. tubingensis*



شكل (28) طيف الاشعة فوق البنفسجية لراشح *C. uredinicola*

## 8-4 طيف الأشعة تحت الحمراء FTIR

تشير نتائج طيف الأشعة تحت الحمراء FTIR الى تواجد عدد من الجزيئات الحيوية التي تحتوي على مجاميع فعالة مرتبطة مع جسيمات الفضة النانوية . اذ أظهر طيف الأشعة تحت الحمراء لجسيمات الفضة النانوية شكل (29) المخلفة من راشح العزلة *S.lentus* الى وجود مجاميع كيميائية فعالة عند الاعداد الموجية المختلفة وقد مثلت بيانات طيف الأشعة تحت الحمراء لجسيمات الفضة النانوية من العزلة المذكورة في جدول (14).



شكل (29) يوضح طيف الأشعة تحت الحمراء لجرسيمات الفضة النانوية لراشح العزلة *S.lentus*



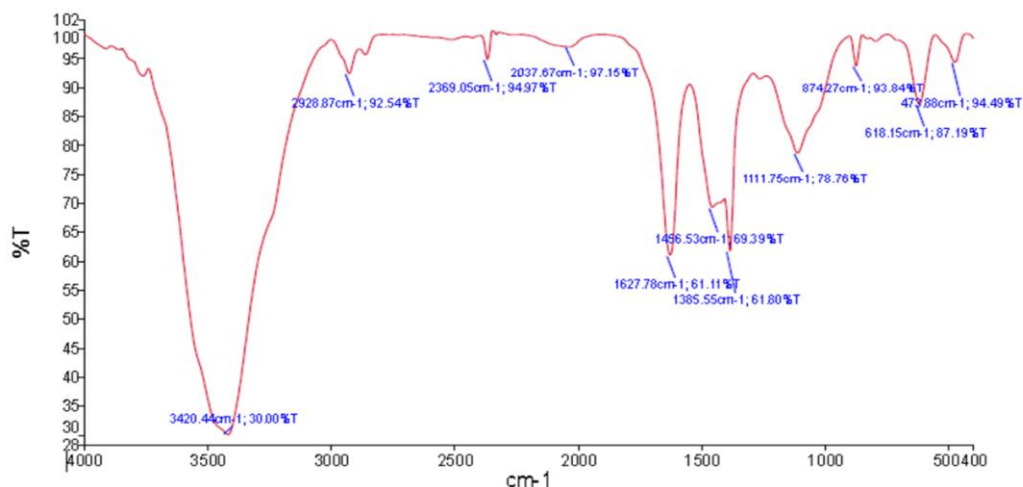
## جدول (14) المجاميع الفعالة لجسيمات الفضة النانوية المخلقة من راسح العزله

*S.lentus*

التردد cm-1	المجاميع الفعالة
3398	OH
2995	CH
1492	C=C
1379	C-H
1320	C-O

اما طيف الاشعة تحت الحمراء لجسيمات الفضة النانوية المخلقة من راسح مزرعة العزلة *S. Sciuri* شكل (30) . فقد سجل وجود حزم أمتصاصية للمجاميع الكيميائية الفعالة عند الاعداد الموجية المختلفة وقد مثلت بيانات هذا بالطيف في جدول (15). وتعد هذه النتائج مماثلة الى نتائج دراسات اخرى (Raheman et al.,2011) والتي ذكرت ان البروتينات المتواجدة ترتبط مع الجسيمات النانوية من خلال بقايا المجاميع الأمينية او مجاميع الكربوكسيل السالبة الشحنة في الانزيمات الموجودة في رواشح المزارع المايكروبية .

كما أشارت دراسة MukherJell et al.(2008) بأستخدام مطيافية FTIR عن الألفة المحتملة لتغليف Encapsulation الجسيمات النانوية اذ اشار الى ان مجاميع الكربونيل الكربوكسيلية و مجاميع الامين الحرة والتي ترتبط بصورة مباشرة مع جسيمات الفضة النانوية مؤدية الى عملية تغليفها كما واستنتج في دراسته ان الأواصر البيبتيدية والاحماض الامينية الحرة المسؤولة عن تغليف جسيمات الفضة النانوية من ما يزيد من استقرارها وثباتها ومنع تكتلها في المحلول المائي .

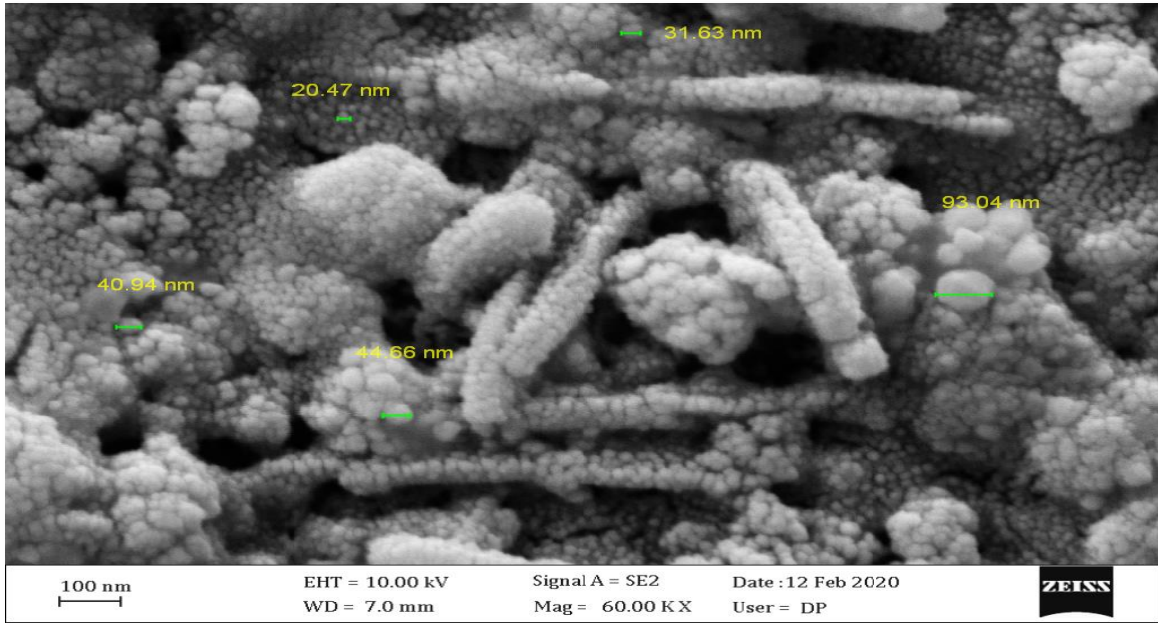


شكل (30) يوضح طيف الاشعة تحت الحمراء لجسيمات الفضة النانوية لراشح العزلة  
**جدول (15) الجامع الفعالة لجسيمات الفضة النانوية المعزولة من راشح مزرعة العزلة**  
*S. sciuri*

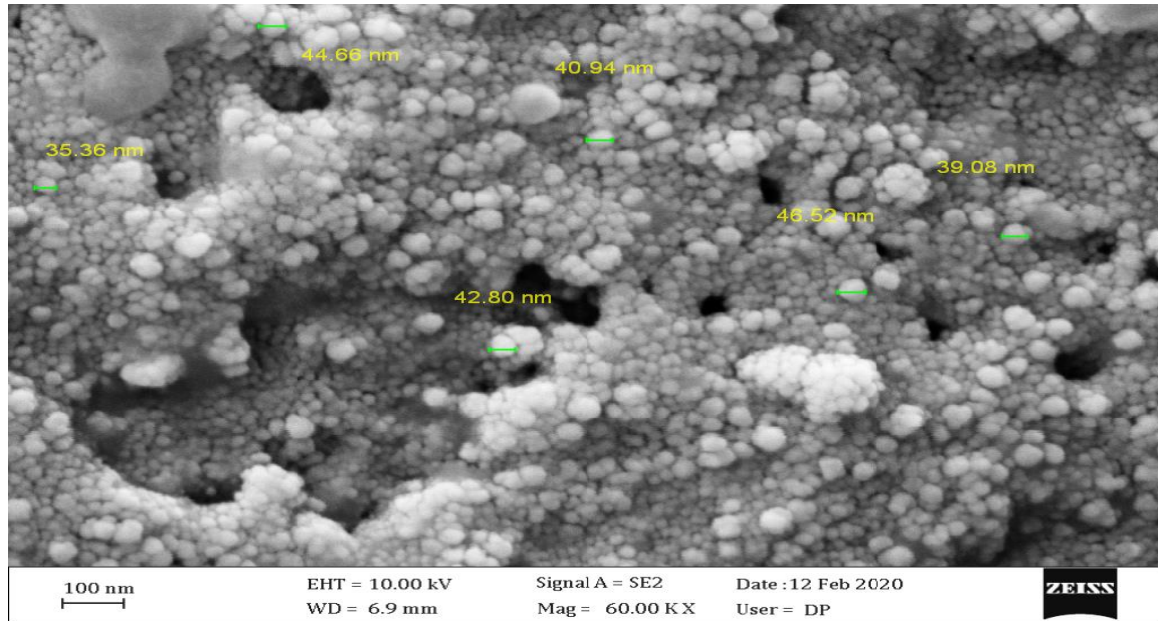
التردد $cm^{-1}$	الجامع الفعالة
3420.44	N-H , OH
2928.87	CH , CH <sub>2</sub>
2369.05	C≡C
2037.67	C≡C
1627.78	C=O-NH
1456.53	CH-CH <sub>3</sub>

#### 9-4 المجهر الإلكتروني الماسح (SEM) Scanning Electronic Microscope

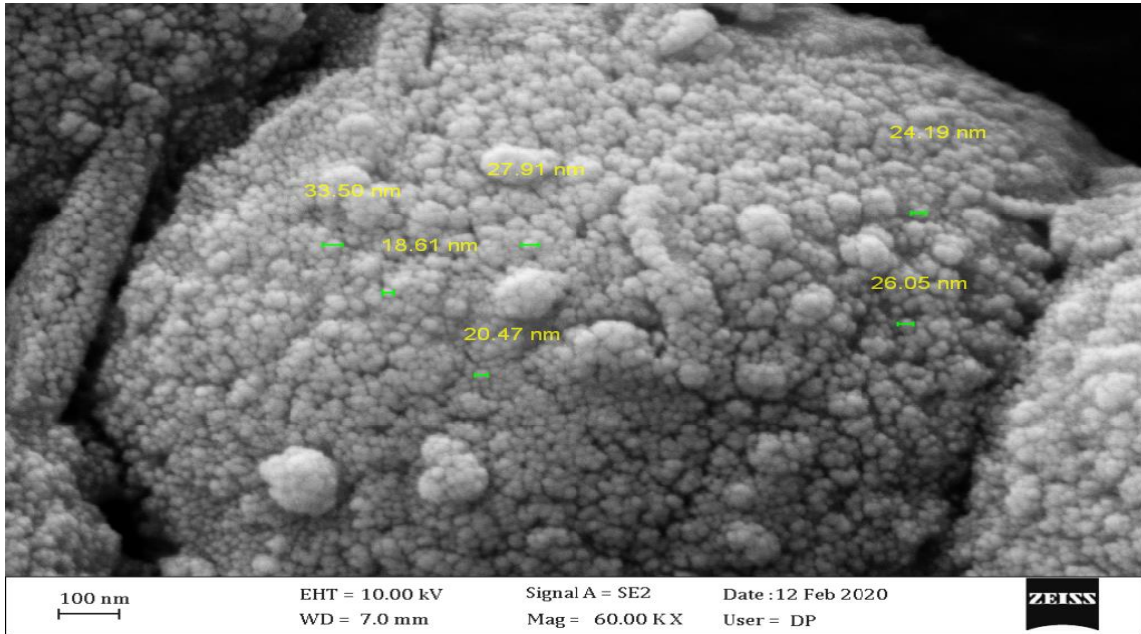
المجهر الإلكتروني الماسح SEM بينت صور المجهر الإلكتروني اشكال واحجام جسيمات الفضة النانوية المنتجة من راشح مزارع العزلات البكتيرية والفطريات المختبرة فقد اظهرت الصور المجهرية أن جسيمات الفضة النانوية المنتجة من راشح السلالة *S. lentus* كروية الشكل و ذات أبعاد تتراوح بين بين (20.47) نانومتر شكل (3131) كما كانت الجسيمات النانوية المنتجة من راشح السلالة البكتيرية *S. sciuri* كروية الشكل وذات ابعاد تتراوح بين (35.36-46.52) نانومتر شكل (3232). في حين أظهرت صور الجسيمات الناتجة من راشح الفطر *A.tubingenosis* اشكال كروية مع بعض التجمعات وبأبعاد تراوحت بين (35.36-44.66) نانومتر شكل (33(33). اما جسيمات الفضة النانوية المنتجة من راشح الفطر *C.uredinicola* فكانت ذات اشكال كروية ايضا وبأبعاد تراوحت بين (18.16-33.50) نانومتر شكل (34). فيما ان جسيمات الفضة النانوية المنتجة من راشح الفطر *Asp.terrus* NRS فكانت ذات شكل عشوائيا وبأبعاد تراوحت بين (91.53-29.75) نانومتر شكل (35). اما راشح الفطر *A.terrus* NRA فقد أظهر جسيمات ذات شكل كروي وبأبعاد (30.51-99.59) نانومتر شكل (36). بينت الدراسة الحالية أن الجسيمات النانوية الفضية المنتجة من راشح الفطر *A.tubingenosis* كانت الاقل حجما مقارنة مع جسيمات الفضة النانوية المنتجة من قبل البكتريا والفطريات المختبرة خلال الدراسة .وبهذا يكون فطر *A.tubingenosis* هو الأكفأ في تخليق اصغر حجم لجسيمات الفضة النانوية من بين سلالات البكتريا والفطريات المختبرة في الدراسة الحالية. يعد المجهر الإلكتروني من الادوات المهمة في تحديد حجم وشكل الجسيمات النانوية حيث أظهرت النتائج من خلاله ان غالبية جسيمات الفضة النانوية المنتجة كانت ذات شكل كروي مع ظهور بعض التجمعات لهذه الجسيمات وتعود التجمعات نتيجة تجفيف العينات خلال فترة اعدادها للفحص (Sadowski et al. 2008) .



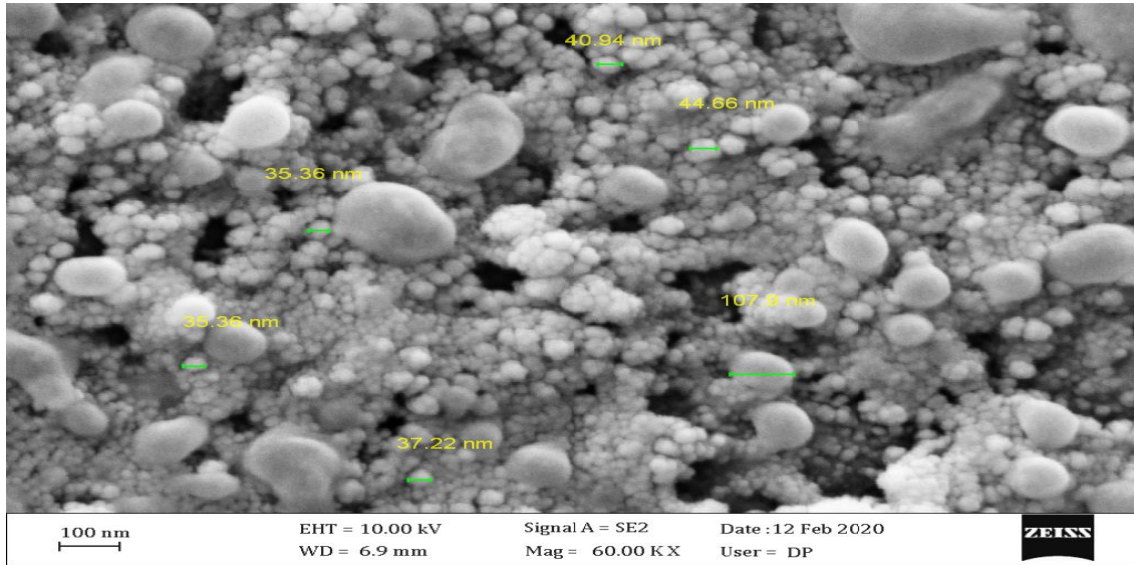
شكل (31) صور المجهر الالكتروني SEM لجسيمات الفضة النانوية المخلقة من العزلة البكتيرية *S. lentus*



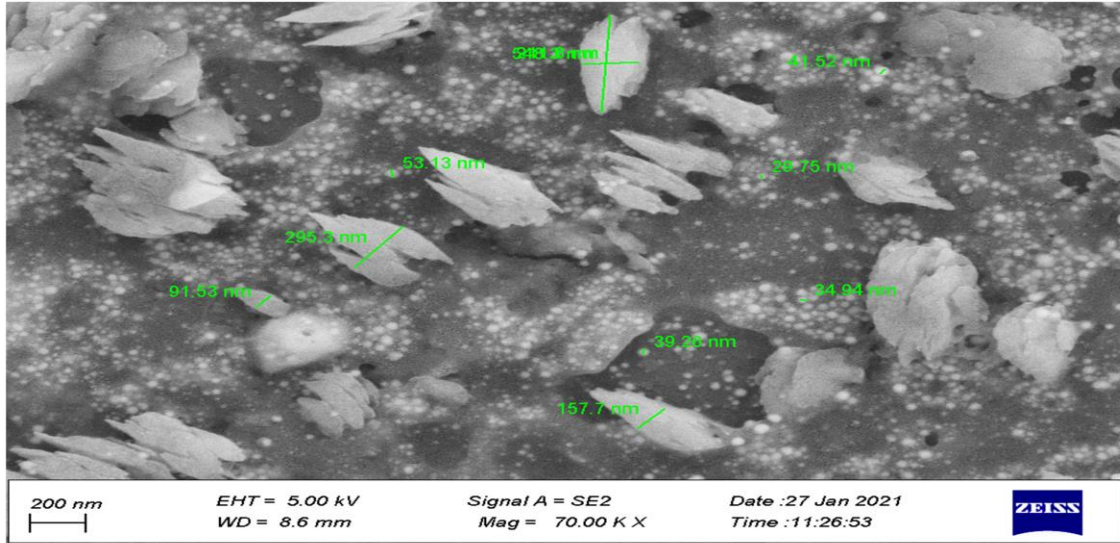
شكل (32) صور المجهر الالكتروني SEM لجسيمات الفضة النانوية المخلقة من العزلة البكتيرية *S. sciuri*



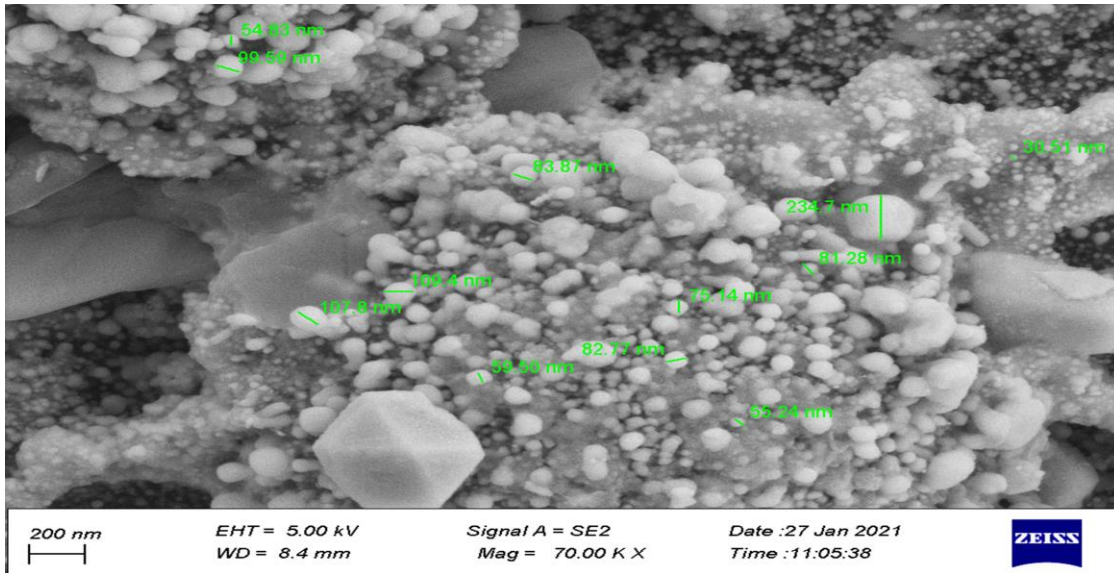
شكل (33) صور المجهر الالكتروني SEM لجسيمات الفضة النانوية المخلفة من راشح الفطر *A.tubingenensis*



شكل (34) صور المجهر الالكتروني SEM لجسيمات الفضة النانوية المخلفة من راشح الفطر *C. uredinicola*



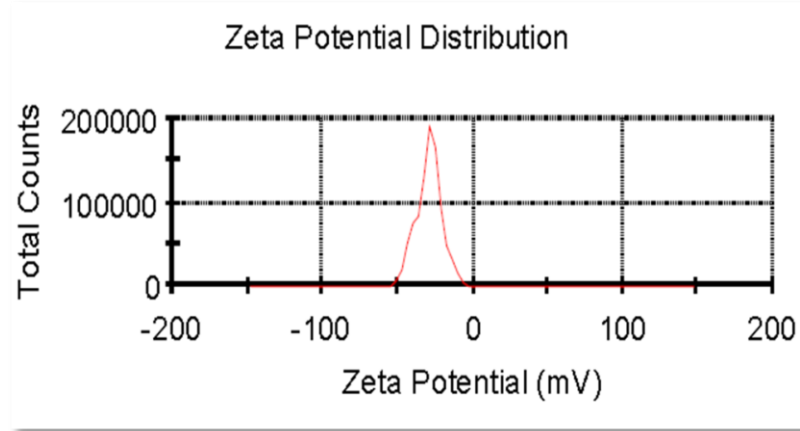
شكل (35) صور المجهر الالكتروني SEM لجسيمات الفضة النانوية المخلفة من راشح الفطر *A. terrus* NRS



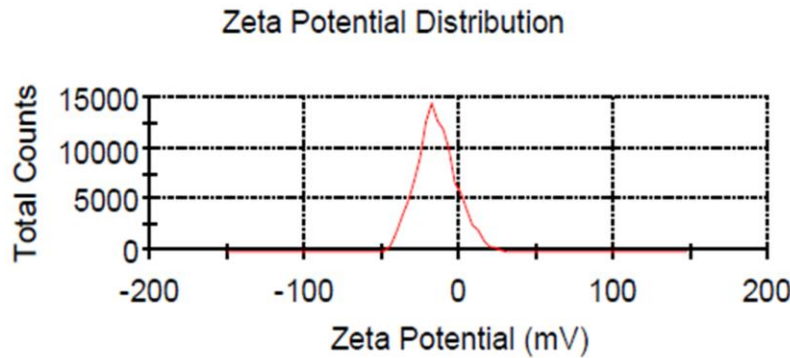
شكل (36) صور المجهر الالكتروني SEM لجسيمات الفضة النانوية المخلفة من راشح الفطر *A. terrus* NRA

## 10-4 جهد زيتا Zeta Potential

تم اجراء تحليل جهد زيتا للكشف عن الشحنات السطحية التي اكتسبتها جسيمات الفضة النانوية المخلقة . في الدراسة الحالية التي يمكن من خلالها اخذ فكره حول ثبات جسيمات الفضة النانوية المخلقة التي تم الحصول عليها . يعطي الجهد الكهربائي لقياس فرق جهد زيتا مؤشر حول استقرارية المحلول الغروي ، اذا كانت هذه الجسيمات تمتلك قيمة موجبه او سالبة عالية فأن هذه الجسيمات تقوم بعد بعضها البعض وبذلك لن يكون هنالك تجمع لهذه الجسيمات مع بعضها . تم تحديد قيمة زيتا في جسيمات الفضة النانوية المختلفه من الاحياء المجهرية المدروسة اذا كانت القيمة (-29.1) ملي فولت كما مبين بالشكل (37) بالنسبة للعزلة *S. lentus* و بمعدل حجم Average size (75.39) نانومتر ، اما بالنسبة لجسيمات الفضة النانوية المخلقة من راشح الفطر *A. terreus* فقد كانت قيمة زيتا (-22.0) وبمعدل حجم Average size (72.50) كما في الشكل (38) ان القيمة العالية تؤكد التنافر بين الجزيئات مما يؤدي الى استقرار جسيمات الفضة النانوية .



شكل (37) جهد زيتا لجسيمات الفضة النانوية AgNps لراشح مزرعه العزلة *S. lentus*



شكل (38) جهد زيتا لجسيمات الفضة النانوية لراشح مزرعة السلالة الفطرية *A. terreus*

## 11-4 حيود الأشعة السينية XRD

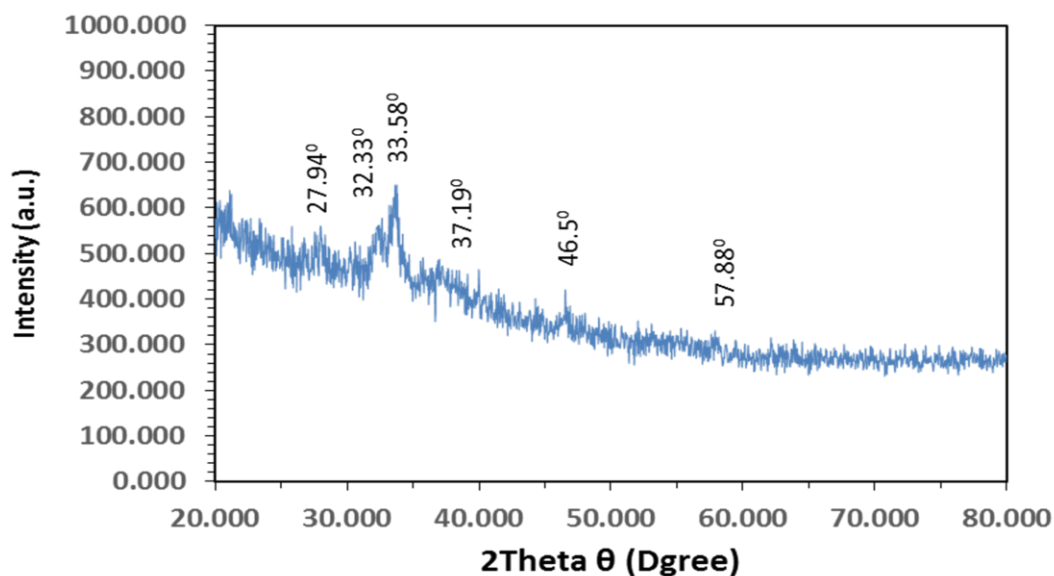
اجري فحص حيود الأشعة السينية للجسيمات النانوية الفضية المخلقة حيويا في الدراسة الحالية للحصول على البلورة ومتوسط حجم الجسيمات . يظهر طيف حيود الأشعة السينية XRD لجسيمات الفضة النانوية المخلقة بواسطة العزلة البكتريا والفطريات المختبرة توافق القمم الرئيسية التي تم الحصول عليها مع انعكاسات براك وعند قيمة 2 ثيتا للزوايا التي ظهرت وبالأشارة الى ملف بيانات JCPDS رقم 04-0783 تم التوصل الى ان الجسيمات النانوية كانت بلورية بطبيعتها ذات شكل تكعيبي مع عدم وجود بعض الشوائب.

خضعت الجسيمات النانوية المخلقة حيويا من راشح مزارع الاحياء المجهرية المختبره للفحص بجهاز حيود الأشعة السينية XRD للحصول على البلورة ومتوسط الحجم لجسيمات النانوية المخلقة . الشكل (39) يظهر حيود الأشعة السينية XRD للجسيمات النانوية المخلقة من راشح العزلة البكتيرية *S. lentus* توافق القمم الرئيسية التي تم الحصول عليها عند (111)(200)(720) مع انعكاسات براك عند قيمة ثيتا للزوايا للزوايا  $33.58^\circ$  ،  $46.50^\circ$  و  $57.88^\circ$  تؤكد هذه النتائج ان المادة المفحوصة هي جسيمات الفضة النانوية وتم استخراج معدل حجم الجسيمات النانوية للفضة باستعمال معادلة شرر وكان متوسط حجم الجسيمات Average size (42) نانومتر .

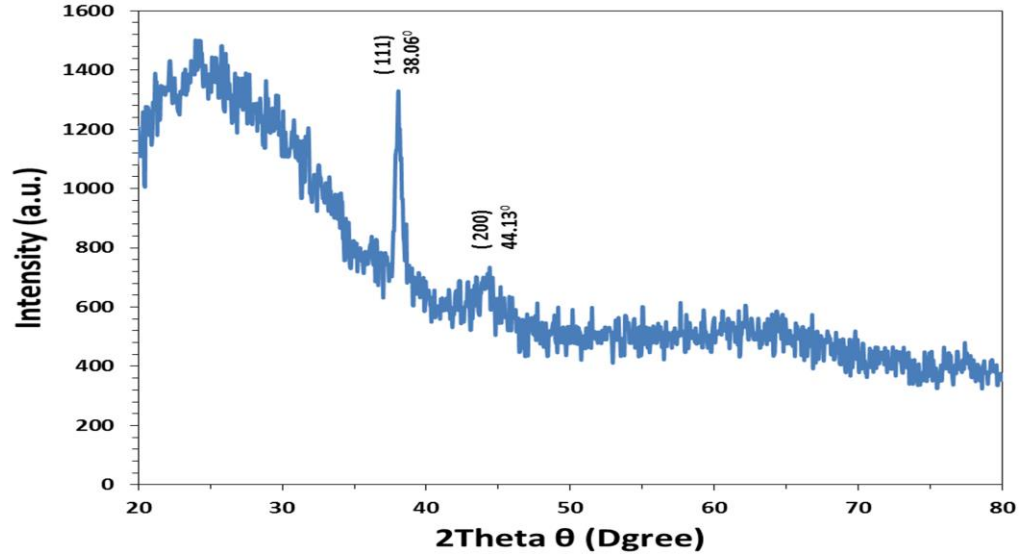
كما يظهر الشكل (40) حيود الأشعة السينية XRD للجسيمات النانوية المختلفة من راشح مزرعة السلالة *S. Sciuri* ويبين توافق القمم الرئيسية التي تم الحصول عليها عند (111) و (220) مع انعكاسات براك وعند قيمة 2 ثيتا للزوايا  $38.06^\circ$  و  $44.13^\circ$  تؤكد هذه النتائج ان الجسيمات المفحوصة تعود للفضة وتم استخراج معدل حجم الجسيمات النانوية Average size ايضا والبالغ (31.7) نانو متر . أما بالنسبة للجسيمات النانوية المخلقة من راشح مزرعة الفطر *A. terrus* NRS فيظهر الشكل (41) توافق القمم الرئيسية التي تم الحصول عليها (111) و (200) مع انعكاسات براك عند قيمة 2 ثيتا للزوايا  $38.12^\circ$  و  $44.22^\circ$  و  $34^\circ$  على التوالي وبذلك تؤكد هذه النتائج ان المادة المفحوصة هي جسيمات الفضة وتم استخراج معدل حجم هذه الجسيمات باستخدام معادلة شرر ويبلغ (45.37) نانومتر وبذلك تكون هذه الجسيمات هي جسيمات



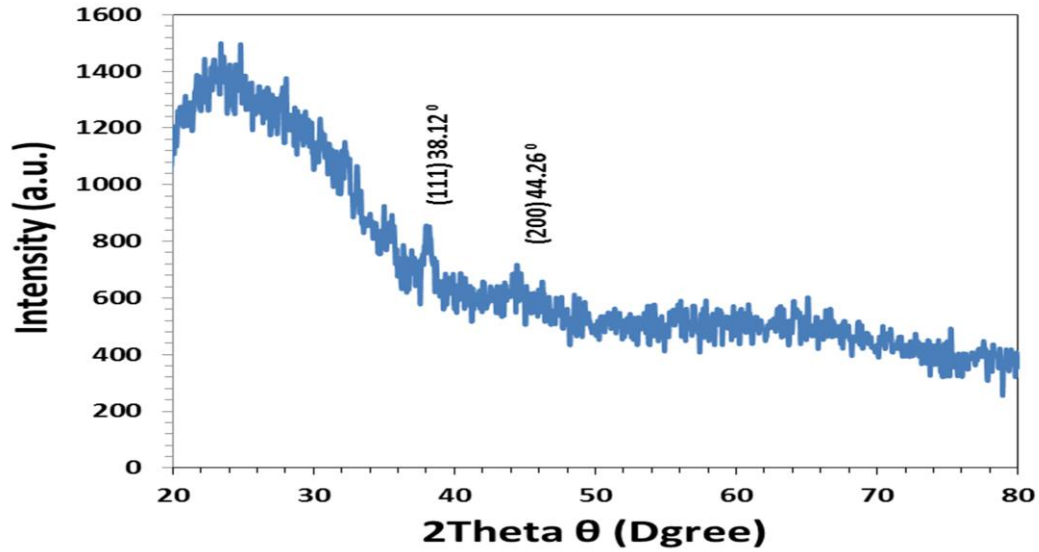
الفضة النانوية . اما بالنسبة للجسيمات المخلفة من راسح مزرعة الفطر *A.tubingensis* فيظهر الشكل (42) توافق القمم الرئيسية التي تم الحصول عليها (111) (200) (311) (220) مع انعكاسات براك عند قيمة 2  $\theta$  لزاويا  $38.12^\circ$  و  $44.36^\circ$  و  $64.72^\circ$  على التوالي تؤكد هذه النتائج ان المادة المفحوصة هي جسيمات الفضة وتم ايضا استخراج معدل حجم الحبيبات Average size وبلغ (58.99) نانومتر وبذلك تكون هذه الجسيمات هي الفضة النانوية . اما بالنسبة للجسيمات المخلفة من راسح مزرعة الفطر *C. uridinicola* فأظهر الشكل (43) قمة رئيسية واحدة هي 111 والتي توافقت مع انعكاس براك عند قيمة 2  $\theta$  للزاوية  $38.27^\circ$  تؤكد هذه النتائج ان المادة المفحوصة هي جسيمات الفضة والتي تم تحديد معدل حجم الحبيبات للفضة Average size وبلغ 74.4 نانومتر وبهذا تكون المادة المستحصلة عليها هي جسيمات الفضة النانوية . وقد اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع ما توصلت اليه العديد من الدراسات ومنها دراسة Baran., (2019) التي اشارت الى ان القمم الرئيسية عند (111) و (200) و (220) و (311) توافقت مع الزوايا  $30.01^\circ$  ،  $45.83^\circ$  ،  $64.29^\circ$  و  $77.34^\circ$  على التوالي عند قيمة 2  $\theta$  أيضاً تم حساب متوسط حجم البلوره على انه 12.63 نانومتر .



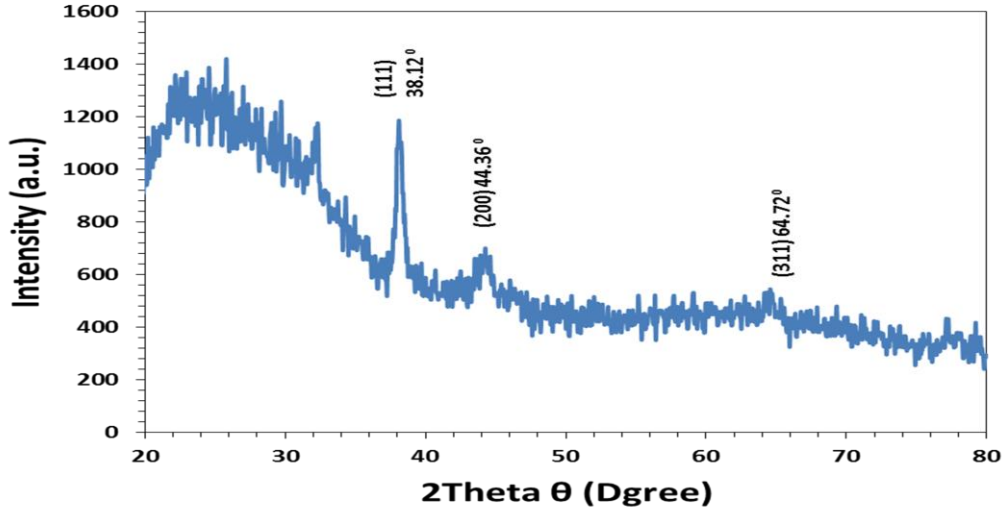
شكل (39) نمط حيود الاشعة السينية لجسيمات الفضة النانوية المخلفة من بكتريا *S. lentus*



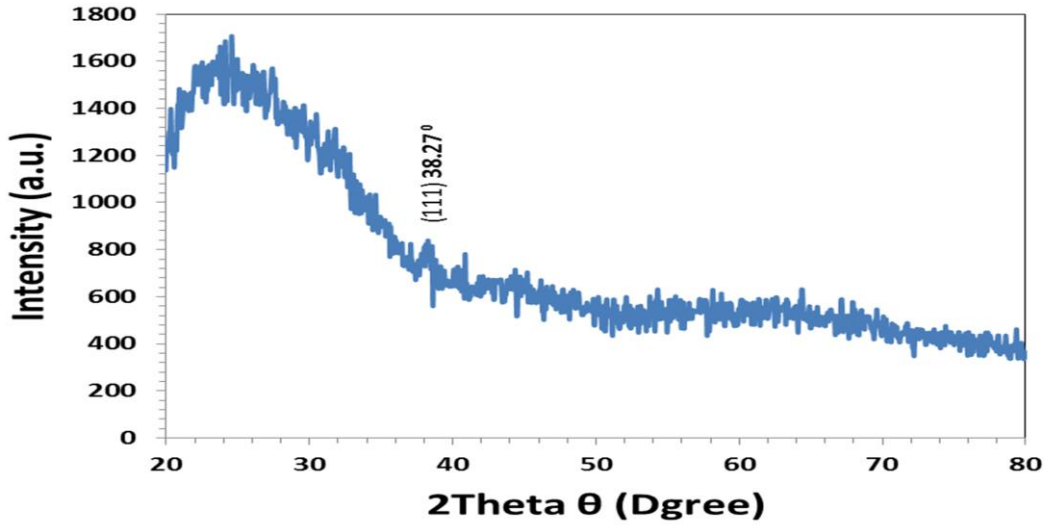
شكل (40) نمط حيود الاشعة السينية لجسيمات الفضة النانوية المخلفة من بكتريا *S. Sciuri*



شكل (41) نمط حيود الاشعة السينية لجسيمات الفضة النانوية المخلفة من فطر NRS *A. terrus*



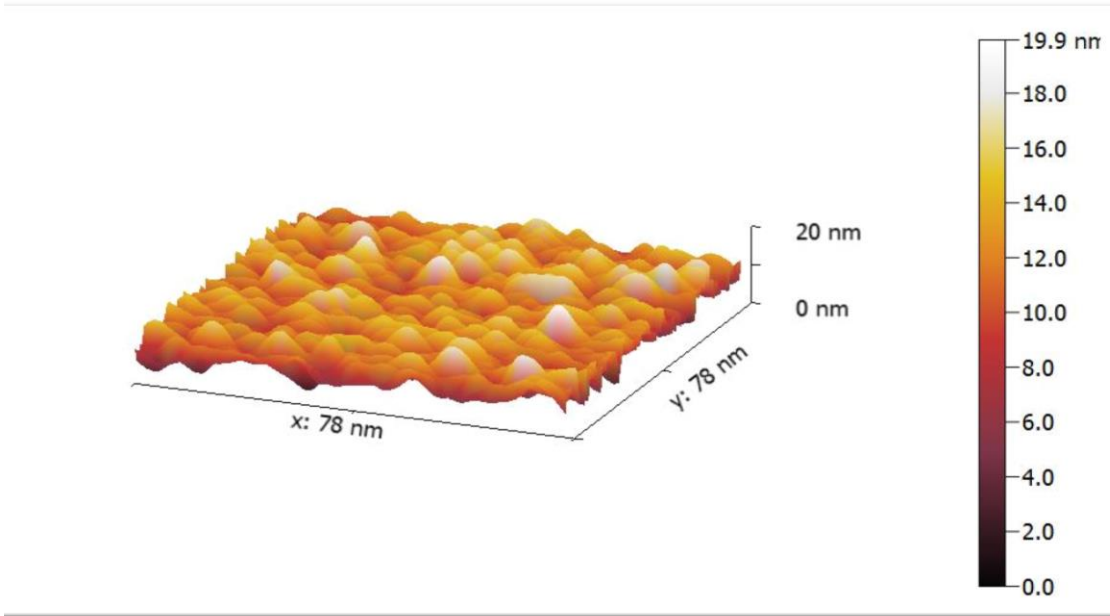
شكل (42) نمط حيود الاشعة السينية لجسيمات الفضة النانوية المخلفة من الفطر *A. tubingensis*



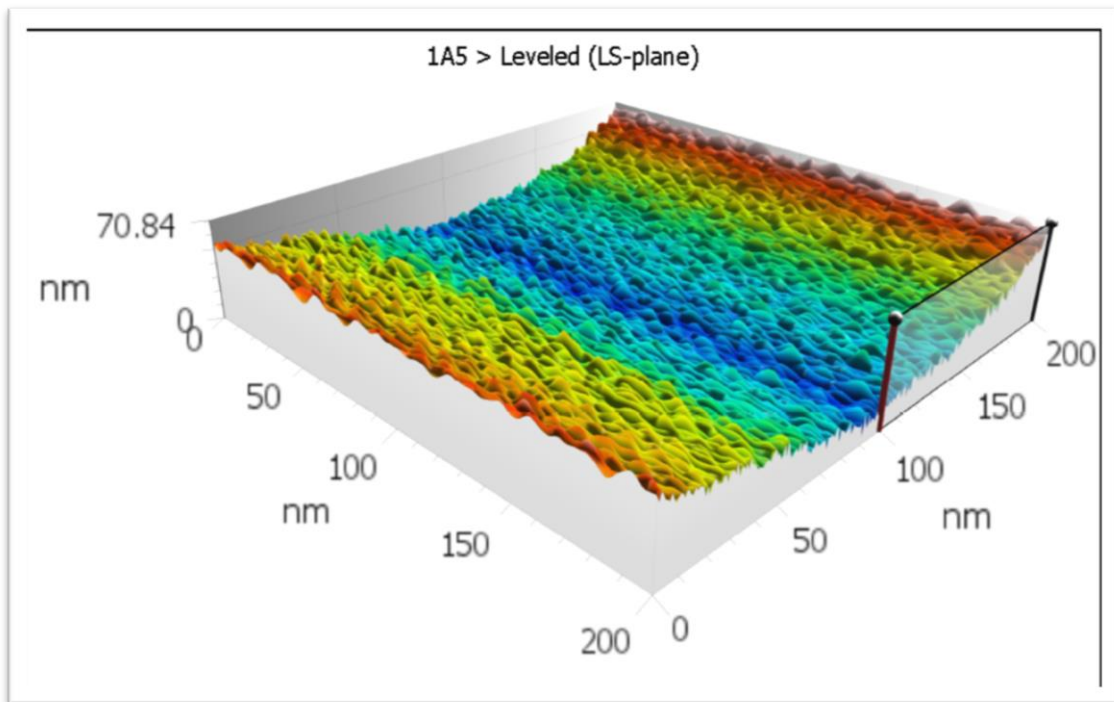
شكل (43) نمط حيود الاشعة السينية لجسيمات الفضة النانوية المخلفة من الفطر *uridinicola*

#### 12-4 الفحص باستخدام مجهر القوة الذرية (AFM) Atomic force microscope

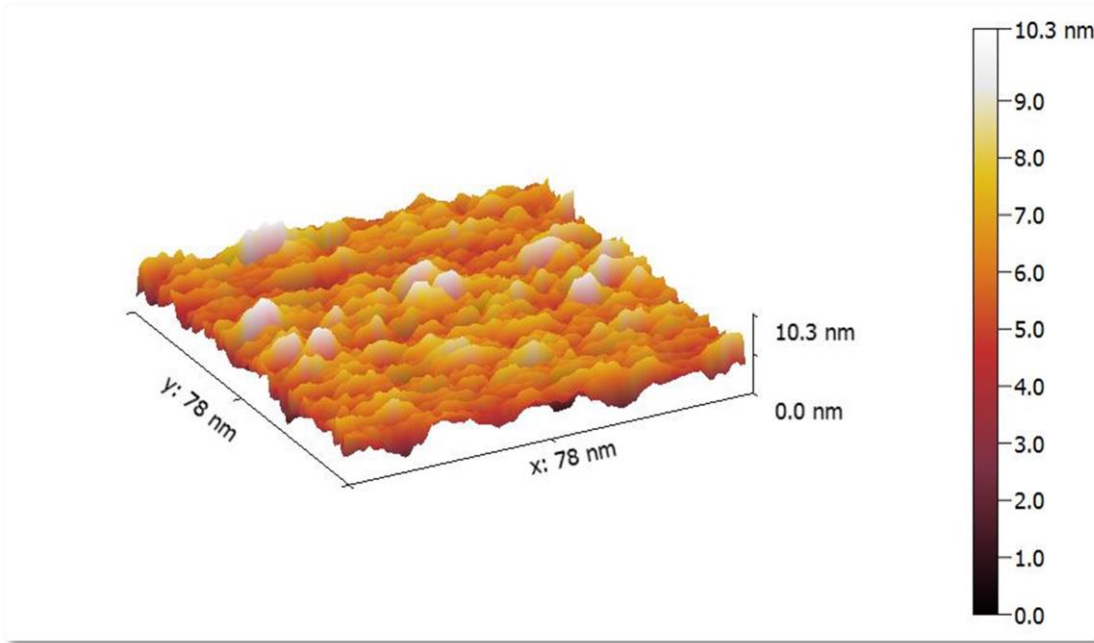
تم استخدام مجهر القوة الذرية AFM لتحليل مورفولوجيا او السطح الخارجي او ما يسمى التضاريس الخارجية لجسيمات الفضة النانوية المخلقة من رواشح بعض الاحياء المجهرية المختبرة والذي بين لنا بوضوح اننا قد حصلنا على جزيئات بأبعاد نانوية اذ تم التقاط صور ثنائية وثلاثية الابعاد لهذه الجسيمات . يبين الشكلين (44,45) صورة ثنائية وثلاثية الابعاد لمقطع من سطح الجسيمات النانوية المخلقة من راشح مزرعة العزلة البكتيرية *S. lentus* يلاحظ في الصورة ثلاثية الابعاد ارتفاع التجمعات الجزيئية الذي يكون بحدود 70.84 نانومتر وأن معدل أحجام الجزيئات (Means of particle size) هي بحدود 32.28 نانومتر. كما يظهر الشكل (46,47) ثنائية و صورة ثلاثية الأبعاد لمقطع من سطح الجسيمات النانوية المخلقة من راشح العزلة البكتيرية *S. scirri* حيث بينت الصورة ثلاثية الابعاد ارتفاع التجمعات الجزيئية الذي يكون بحدود 18.41 نانومتر اما معدل أحجام الجزيئات (Means of particle size) هي بحدود 11.21 نانومتر. أما بالنسبة للجسيمات النانوية الفضية المخلقة من رواشح المزارع الفطرية فقد بينت الصور الثنائية والثلاثية الابعاد لمقطع من سطح الجسيمات المخلقة من الفطر *A. terreus* ارتفاع التجمعات الجزيئية الذي يكون بحدود 41.2 نانومتر اما معدل أحجام الجزيئات (Means of particle size) هي بحدود 32.81 نانومتر شكل (48,49). كما يوضح الشكل (50,51) صورة ثنائية وثلاثية الابعاد لمقطع من سطح الجسيمات النانوية المخلقة من راشح مزرعة الفطر *C. uredinicola*. اذ يلاحظ في الصورة ثلاثية الابعاد ارتفاع التجمعات الجزيئية الذي يكون بحدود 20 نانومتر اما معدل أحجام الجزيئات (Means of particle size) هي بحدود 14.60 نانومتر. تتفق نتائج دراستنا الحالية مع ما وجدته Daphedar and Taranath.; 2018 اذ يستخدم مجهر القوة او الطاقة الذرية (AFM) في معرفة تضاريس السطوح ذات الابعاد النانوية وحتى الميكروية، ففي السنوات الأخيرة تنوع استخدام هذا الجهاز حيث أصبح يستخدم في قياسات أخرى مثل قياس مرونة الجزيئات الميكروية والنانوية والخلايا كما أصبح يستخدم في قياس طاقة الالتصاق بين الجزيئات الكيميائية.



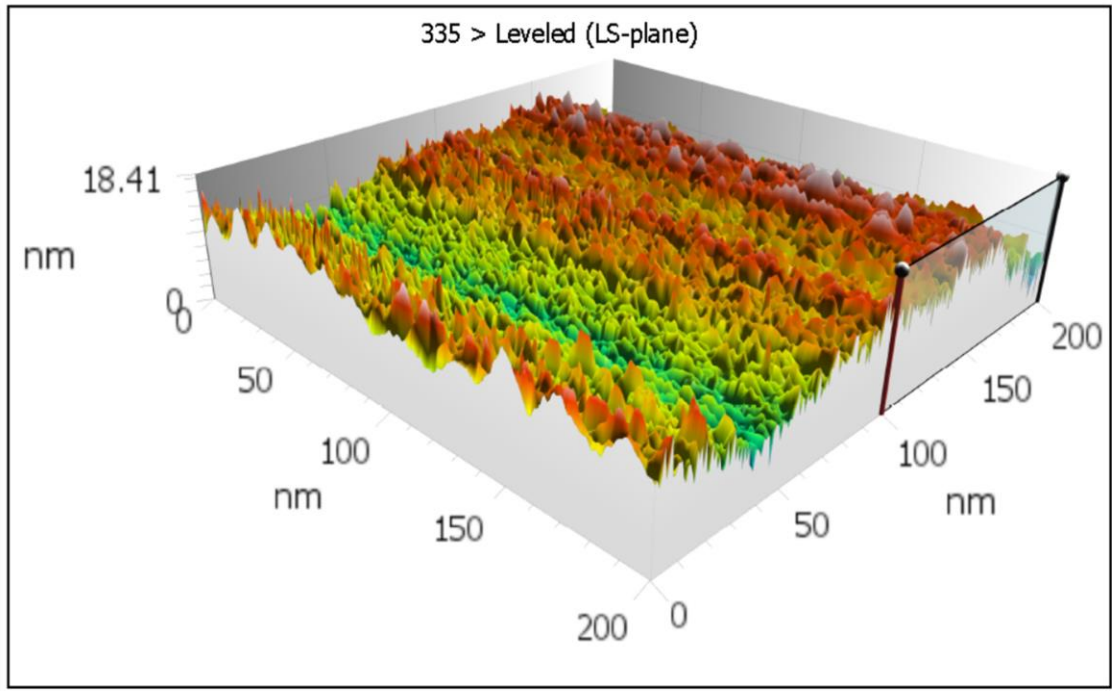
الشكل (44) صورة ثلاثية الابعاد لراشح العزلة *S.lentus* بواسطة مجهر القوة الذرية



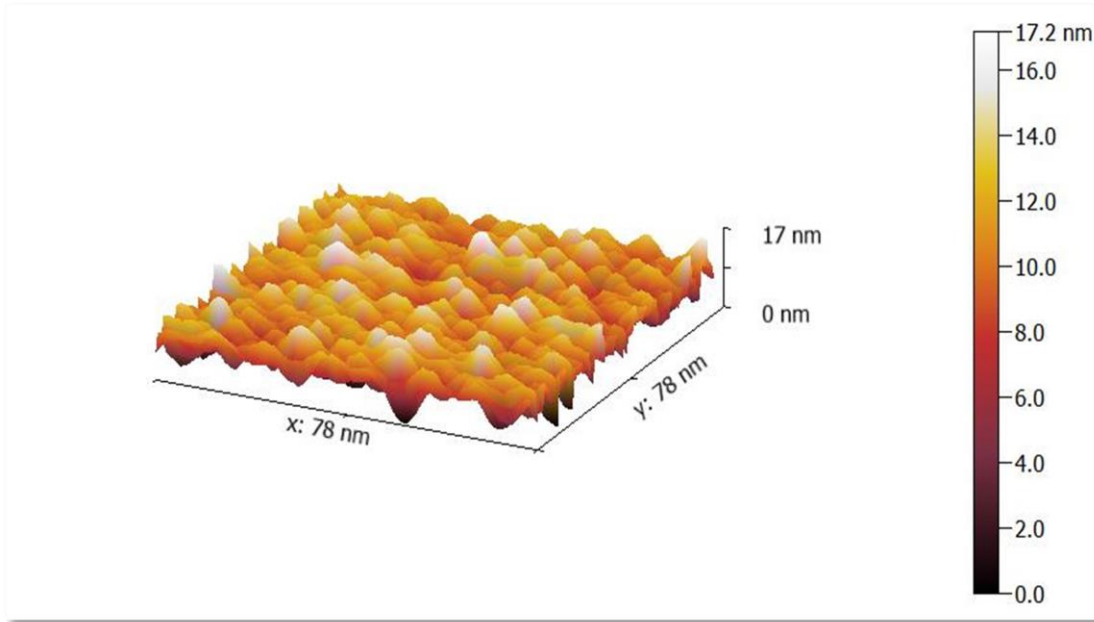
الشكل (45) صورة ثلاثية الابعاد لراشح العزلة *S.lentus* بواسطة مجهر القوة الذرية



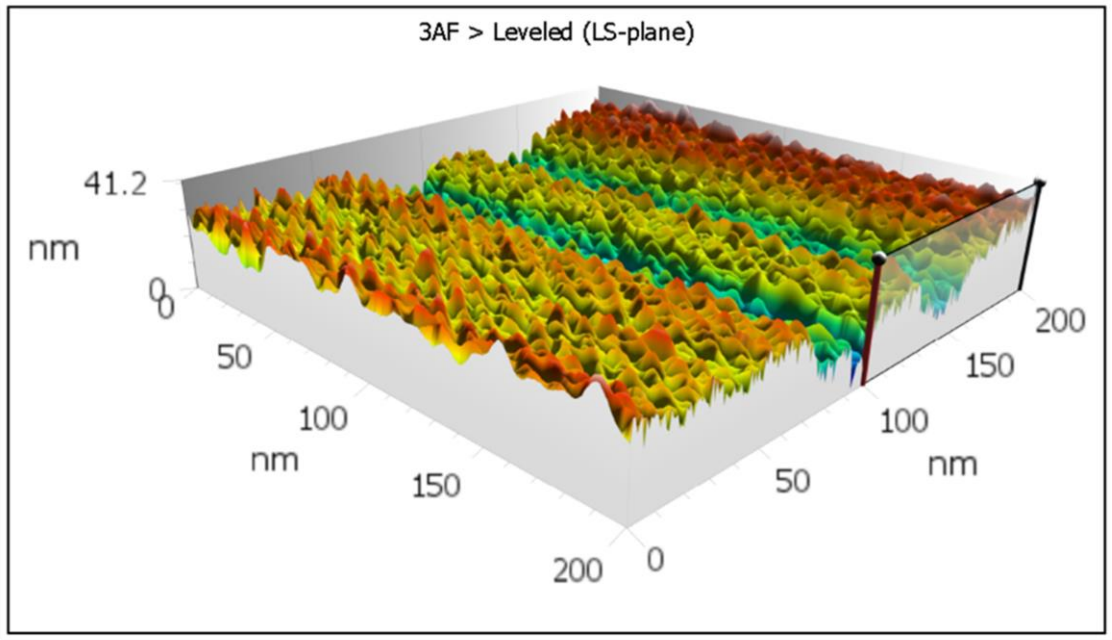
الشكل (46) صورة ثنائية الابعاد لراشح العزلة *S. sciuri* بواسطة مجهر القوة الذرية



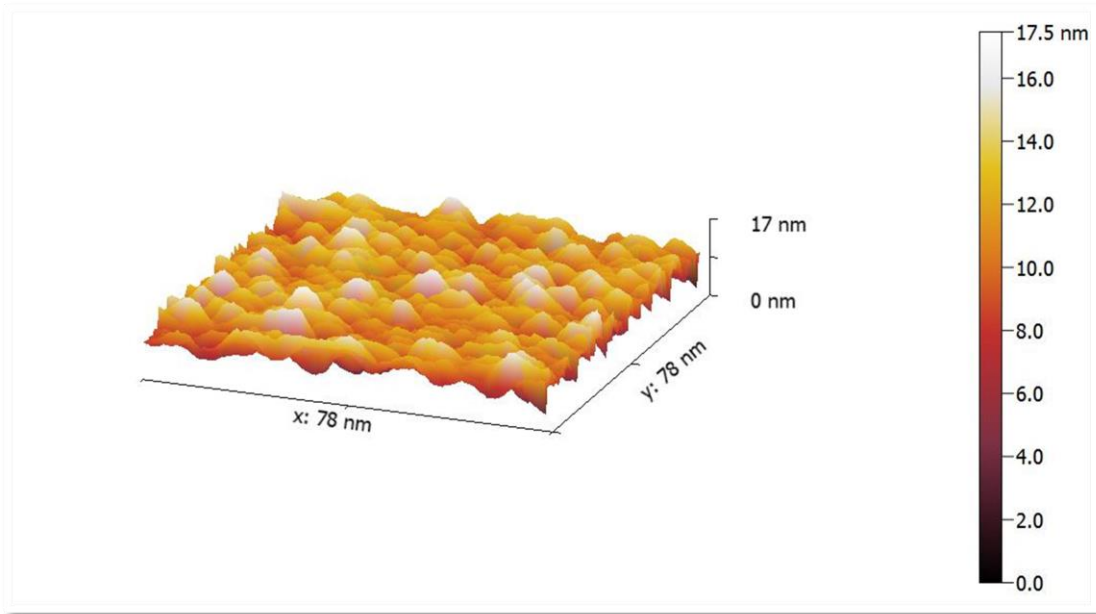
الشكل(47): صورة ثلاثية الابعاد لراشح العزلة *S. sciuri* بواسطة مجهر القوة الذرية



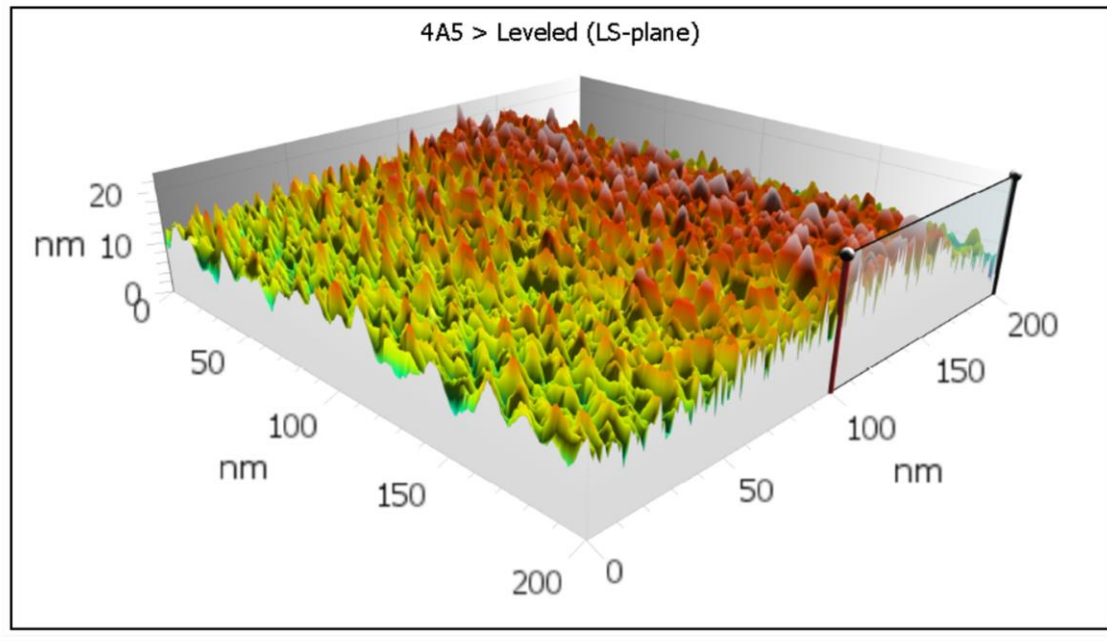
شكل (48) صورة ثنائية الابعاد لراشح الفطر *A. terreus* بواسطة مجهر القوة الذرية



شكل (49) صورة ثنائية الابعاد لراشح الفطر *A. terreus* بواسطة مجهر القوة الذرية



الشكل (50) صورة ثنائية الابعاد لراشح الفطر *C. uredinicola* بواسطة مجهر القوة الذرية



الشكل (51) صورة ثلاثية الابعاد لراشح الفطر *C. uredinicola* بواسطة مجهر القوة الذرية



## 13-4 السمية الخلوية لجزيئات الفضة النانوية المخلفة AgNps تجاه كريات الدم

## الحمرة

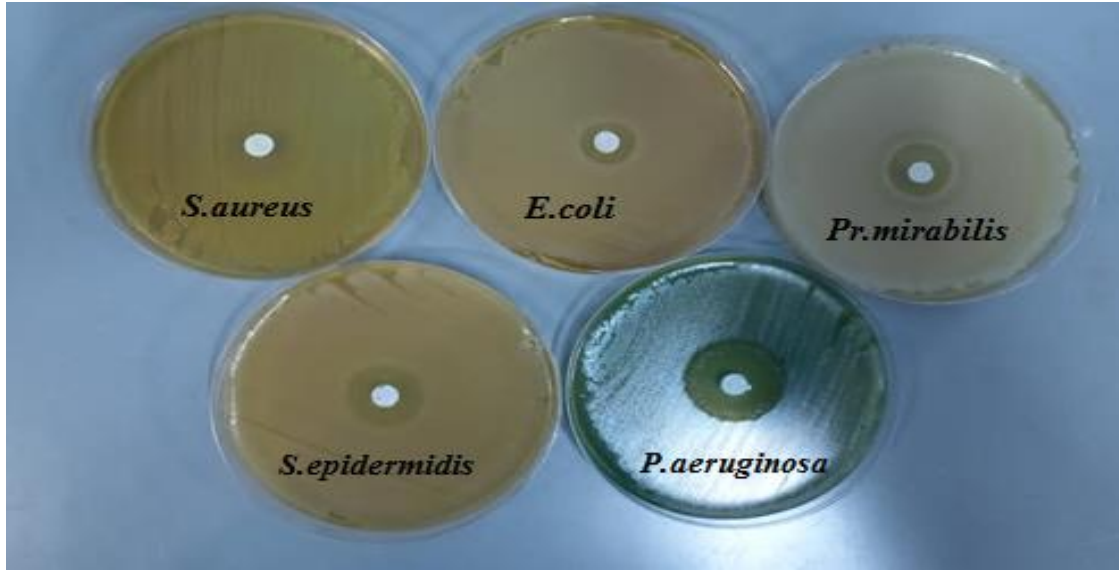
لم تظهر التراكيز المستخدمة لجسيمات الفضة النانوية المنتجة من الاحياء المجهرية المختبرة أية قدرة على تحلل كريات الدم الحمراء لكن لوحظ التحلل بصورة واضحة في معامل السيطرة الموجبة والحاوي على ماء حنفية بينما لم يظهر التحلل في معامل السيطرة السالبة DMSO

## 13-4-فعالية الجزيئات النانوية للفضة AgNps المخلفة تجاه البكتريا المرضية المعزولة

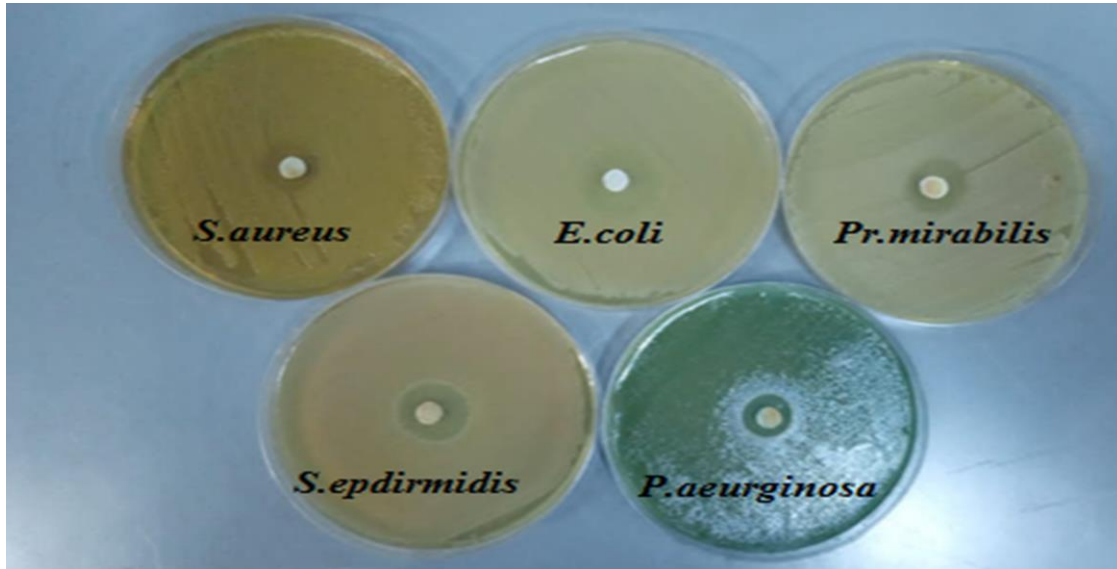
اظهرت نتائج فحص تأثير جزيئات الفضة النانوية على نمو العزلات البكتيرية المختبرة تأثيراً واضحاً على بعض هذه العزلات . فقد اظهرت جزيئات الفضة النانوية المعزولة من راسح المزرعة *S. Lentus* اقطار تثبيط لنمو العزلات المختبرة تتراوح بين (14.5-25.5) ملم وكان اكبر قطر تثبيط تجاه العزلة *P.aeruginosa* تلاه في ذلك قطر تثبيط النمو تجاه العزلة *E.coli* بقطر تثبيط 14.5 ملم شكل (52) جدول (16) اما بالنسبة لتأثير جزيئات الفضة النانوية المخلفة من راسح العزلة *S.sciuri* فقد تراوحت بين (13.5 – 21.5) ملم حيث كان اكبر قطر تثبيط هو (21.5) ملم تجاه العزلة المرضية *E.coli* و اقل قطر تثبيط تجاه العزلة المرضية *P.aeruginosa* بمقدار تثبيط (13.5) ملم شكل (53) جدول (16) . اما بالنسبة لجزيئات الفضة النانوية المخلفة من رواسح المزارع الفطرية فقد امتلك قدرة تثبيطية تجاه العزلات المرضية فقد اظهرت الجسيمات الفضة النانوية المخلفة من راسح الفطر *A. terreus* قدرة تثبيطية تراوحت بين (14.5 – 31.5) ملم تجاه العزلات المرضية حيث كان اكبر قطر تثبيط للنمو (31.5) ملم تجاه العزلة *S.aureus* واقل قطر تثبيط للنمو (14.5) ملم تجاه العزلة *Proteus* شكل (54) جدول (17) . اما بالنسبة لجزيئات الفضة النانوية المخلفة من راسح الفطر *A. terreus* فقد امتلك قدرة تثبيطية تراوحت بين (R- 27.5) ملم حيث كان اكبر قطر تثبيط للنمو هو (27.5) ملم تجاه العزلة *S.epidermidis* ،فيما اظهرت العزلة *P.aeruginosa* مقاومة لجسيمات الفضة النانوية المخلفة من راسح الفطر *A. terreus* شكل (55) جدول (17) . فيما اظهرت العزلة *P.aeruginosa* مقاومة لجسيمات الفضة النانوية المخلفة من راسح الفطر *A. tubingensis*

بينما اظهرت اكبر قطر تثبيط للنمو (38.5) ملم تجاه العزلة *S.aureus* شكل (56) جدول (17) . كذلك اظهرت العزلة *P.aeruginosa* مقاومة لجسيمات الفضة النانوية المخلفة من راشح الفطر *C. uredinicola* وكان اكبر قطر تثبيط للنمو (30) ملم تجاه العزلة *S.epidermidis* شكل (57) جدول (17) . من المعروف تأثير ايونات الفضة على الكائنات الحية الدقيقة اذ يعتقد ان الحامض النووي DNA يفقد قابليته على التضاعف وكذلك تصبح البروتينات الخلوية معطلة عند تعرضها لايونات الفضة وبالتالي تؤدي الى تمسخ البروتين (Feng et al., 2000) . تمتلك جزيئات الفضة النانوية AgNps اليات متعددة والتي من خلالها تؤثر على الغشاء الخلوي وبالتالي فقدان مكونات الخلية البكتيرية مما يؤدي الى موت الخلية (Sahayaraj and Rajesh.; 20011, Anbukkarasi et al., 2017) . كما يمكن لجزيئات الفضة النانوية ان تدخل الى سايتوبلازم البكتريا فتتمكن بعض ايونات الفضة الموجبة الشحنة التي يتم تحريرها من قبل الجزيئات النانوية بالوصل الى السايتوبلازم (Morones, 2005) .

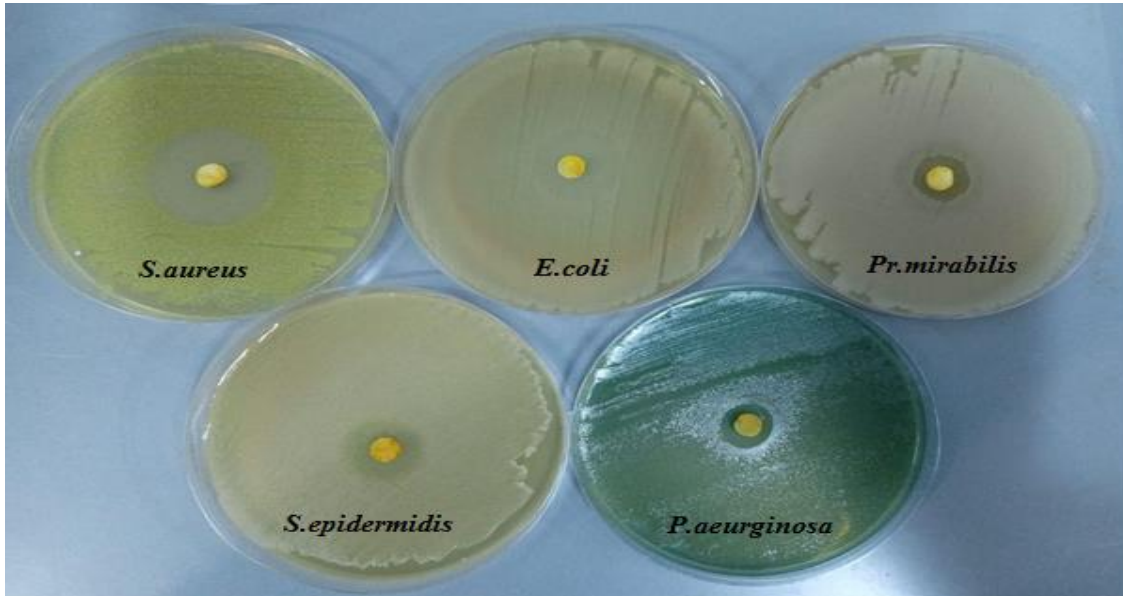
قد يعود السبب في قدرة الجزيئات الفضة النانوية في تثبيط النمو البكتيري الى امتلاك هذه الجزيئات القدرة على الارتباط مع الانزيمات والبروتينات التي تحتوي على الكبريت فتؤدي الى مسخها (yuna et al., 2013) . يمكن كذلك لجزيئات الفضة النانوية الموجبة الشحنة الارتباط مع مجاميع الفوسفات السالبة الشحنة والموجودة في الحامض النووي للـ DNA مما يؤدي الى توقف عملية تضاعف المادة الوراثية (Morones, 2005) . استخدام المضاد الحيوي Gentamycin كعامل سيطرة موجب والذي أظهر فعالية تثبيطية تجاه السلالات البكتيرية المختبرة وكان اعلى قطر تثبيط تجاه العزلة *P.mirabilis* والذي بلغ 22 ملم تلتها العزلتين *S.aureus* و *S.epidermidis* بقطر تثبيط بلغ 20 ملم فيما بلغ قطر تثبيط العزلة *E.coli* 16ملم أما تجاه العزلة *P.aeruginosa* فقد بلغ قطر التثبيط 13 ملم شكل (58).



شكل (52) فعالية الجسيمات النانوية الفضية لراشح المزرعة البكتيرية *S. Lentus*

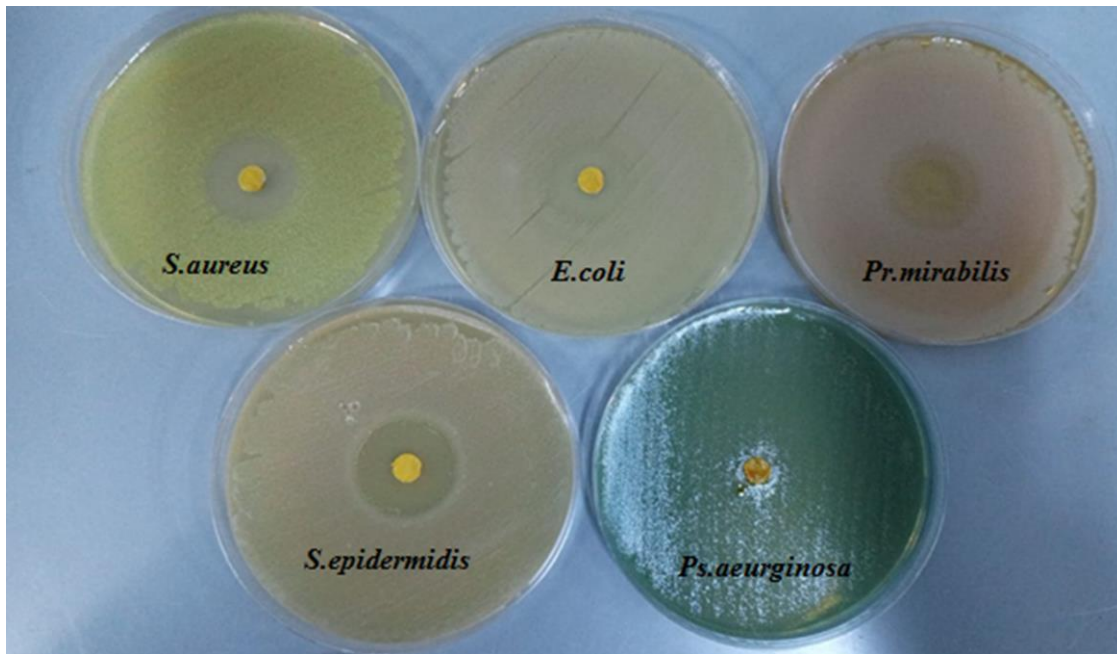


شكل (53) فعالية الجسيمات النانوية الفضية لراشح مزرعة العزلة البكتيرية *S. sciuri*

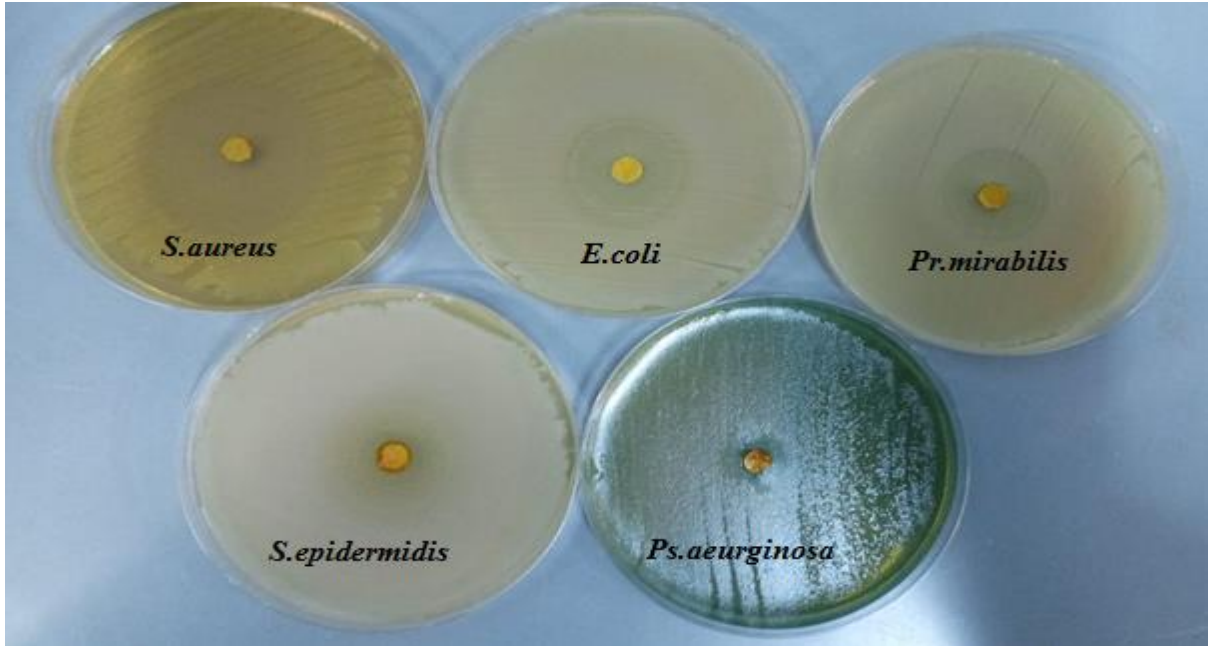


شكل (54) فعالية الجسيمات النانوية الفضية لراشح مزرعة العزلة الفطرية

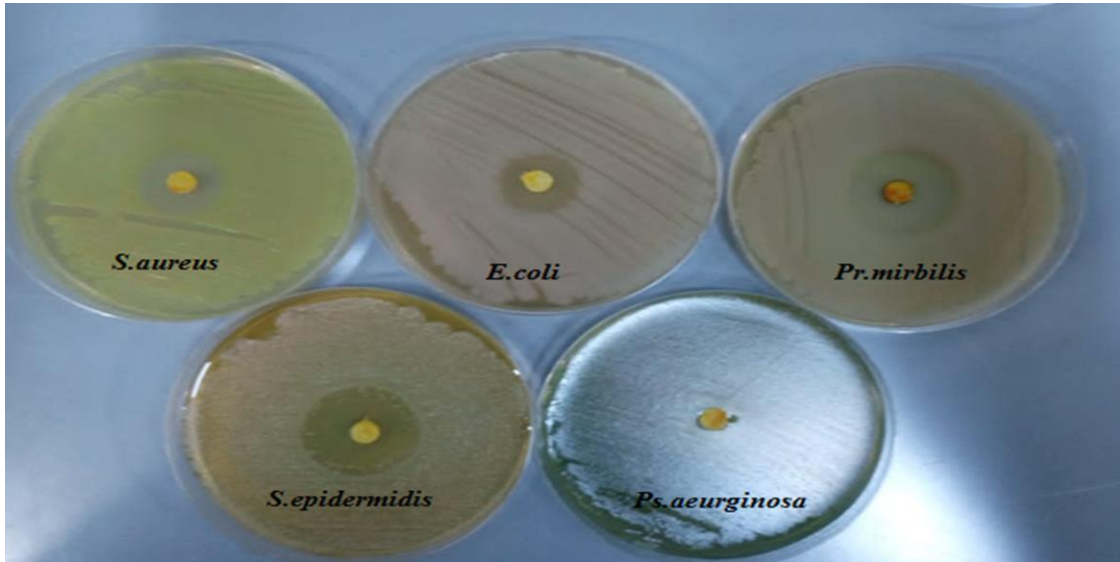
*A. terreus* NRS



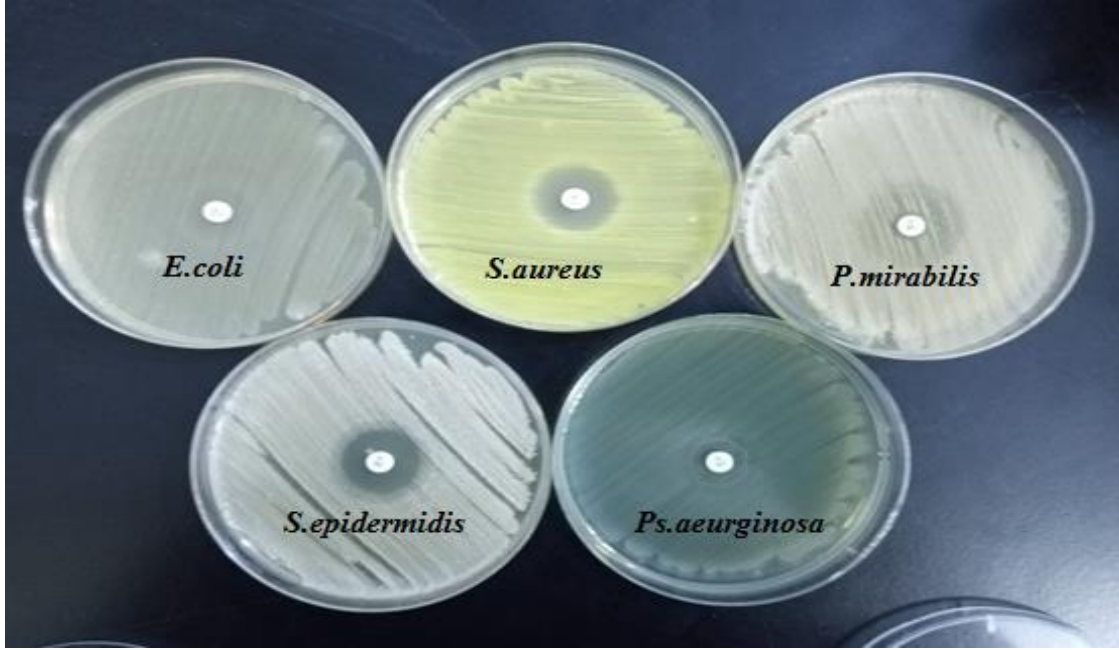
شكل (55) الفعالية التثبيطية لل AgNps لراشح المزرعة الفطرية *A. terreus* NRA



شكل (56) الفعالية التثبيطية للـ AgNps لراشح المزرعة الفطرية *A.tubingensis*



شكل (57) الفعالية التثبيطية للـ AgNps لراشح المزرعة الفطرية *C. uredinicola*



شكل (58) الفعالية التثبيطية للمضاد الحيوي Gentamycin تجاه العزلات البكتريا المرضية

جدول (16) اقطار تثبيط النمو لجسيمات الفضة النانوية المخلقة من البكتريا تجاه العزلات المرضية

معدل اقطار تثبيط النمو (مم)					البكتريا المخلقة لجسيمات الفضة النانوية
<i>P.aeruginosa</i>	<i>S.epidermidis</i>	<i>Pr.mirabilis</i>	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	
25	20.5	18.5	14.5	15	<i>S.lentus</i>
13.5	18.5	15.5	21.5	14.5	<i>S.sciuri</i>

**جدول (17) اقطار تثبيط النمو لجسيمات الفضة النانوية المخلقة من الفطريات باتجاه  
العزلات المرضية**

معدل اقطار تثبيط النمو (ملم)					الفطريات المخلقة لجسيمات الفضة النانوية
<i>P.aeruginosa</i>	<i>S.epidermidis</i>	<i>Proteus</i>	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	
15.5	20.5	14.5	22.5	31.5	<i>Aspergillus terreus</i>
R	22 27.5	19.5	20.5	23.5	<i>Aspergillus terreus</i>
R	17.5	25.5	28.5	38.5	<i>Aspergillus tubingensis</i>
R	30	28.5	19.5	20.5	<i>Cladosporium uredinicola</i>

**14-4 تحديد التركيز المثبط الأدنى MIC والقاتل الأدنى MBC**

يبين الجدول (18) نتائج قياس التركيز المثبط الأدنى والتركيز القاتل الأدنى لجسيمات الفضة النانوية المخلقة من راشح العزلتين *S.lentus* ، *S.sciuri* وكذلك من راشح الفطريات *Aspergillus* ، *Aspergillus terreus* NRA ، *Aspergillus terreus* NRS ، *Cladosporium uredinicola* ، *tubingensis* لوحظ من خلال الدراسة ان التراكيز المثبطة الدنيا MIC لجسيمات الفضة النانوية المخلقة من السلالة البكتيرية *S.lentus* تجاه البكتريا المدروسة تراوحت بين (0.003-0.025) ميكروغرام /مل اما بالنسبة لل MBC تراوحت بين (0.006-0.050) ميكروغرام/مل كذلك بالنسبة لجسيمات الفضة النانوية المخلقة من السلالة البكتيرية *S.sciuri*. كما أختبر التركي المثبط الأدنى والقاتل الأدنى لجسيمات الفضة النانوية المخلقة من راشح المزارع الفطرية المدروسة إذ تراوح التركيز المثبط الأدنى للفطر *Aspergillus terreus* NRS بين (0.006-0.050) ميكروغرام/مل أما التركيز القاتل الأدنى فقد تراوح بين

(0.012-0.100) ميكروغرام امل اما بالنسبة للتركيز المثبط الادنى لجسيمات الفضة النانوية المخلفة من راشح الفطر *Aspergillus terreus* NRA فقد تراوح بين (0.012-0.010) ميكروغرام امل اما التركيز القاتل الادنى فقد تراوح بين (0.020-0.050) ميكروغرام امل فيما كان التركيز المثبط الادنى لجسيمات الفضة النانوية المخلفة من راشح الفطرين *Aspergillus tubingensis* و *Cladosporium uredinicola* فقد تراوح بين (0.012-0.025) ميكروغرام امل أما التركيز القاتل الادنى فقد تراوح بين (0.025-0.050) ميكروغرام امل. النتائج اتفقت مع ما توصلت اليه دراسة (Nirjanta Devi et al., 2009).

**جدول (18) نتائج قياس التركيز المثبط الادنى والتركيز القاتل الادنى لجسيمات الفضة النانوية المخلفة من البكتريا و الفطريات المختبرة.**

<i>S.epidermidis</i>		<i>P.aeruginosa</i>		<i>Pr.mirabilis</i>		<i>S.aureus</i>		<i>E.coli</i>		الاحياء المجهرية المنتجة لجسيمات الفضة النانوية
MBC mg/ml	MIC mg/ml	MBC mg/ml	MIC mg/ml	MBC mg/ml	MIC mg/ml	MBC mg/ml	MIC mg/ml	MBC mg/ml	MIC mg/ml	
0.006	0.003	0.050	0.025	0.020	0.010	0.020	0.010	0.006	0.003	<i>S.lentus</i>
0.050	0.020	0.006	0.003	0.050	0.025	0.006	0.003	0.020	0.010	<i>S.sciuri</i>
0.050	0.025	0.100	0.050	0.050	0.020	0.012	0.006	0.050	0.025	<i>A. terreus NRS</i>
0.025	0.012	0.020	0.010	0.020	0.010	0.050	0.025	0.020	0.010	<i>A. terreus NRA.</i>
0.050	0.025	0.050	0.025	0.025	0.012	0.025	0.012	0.050	0.025	<i>A. tubingensis</i>
0.050	0.025	0.050	0.025	0.025	0.012	0.050	0.025	0.025	0.012	<i>C. uredinicola</i>



الاستنتاجات والتوصيات

**Conclusions and  
Recommendations**

## Conclusions and Recommendations

## 5 الاستنتاجات و التوصيات

## 1-5 الاستنتاجات

- 1- تم خلال الدراسة تشخيص البكتريا المستخدمة لتخليق الجزيئات النانوية للفضه بواسطة جهاز ال Vitek-2 حيث شخست انواع من البكتريا *S. lentus* من نبات الريحان وبكتريا *S. sciuri* من نبات السدر و بكتريا *S. hominis* من اوراق نبات البمبر كما تم تشخيص بكتريا *S. vitulinus* من اوراق نبات الدفلة .
- 2- تشخيص الفطريات المنتجة لجزيئات النانو بدقة عالية بالاعتماد على التتابعات النروجينية بتقنية ال PCR و مقارنة هذه النتائج في بنك الجينات NCBI .
- 3- اوضحت الدراسة ان اختلاف انتاج الجسيمات النانوية المخلقة من البكتريا والفطريات الموجودة داخل النسيج النباتي تعود الى اختلاف نوع النبات والجزء المأخوذ منه .
- 4- اظهرت نتائج هذه الدراسة ان جزيئات النانوية الفضية المخلقة من الاحياء المجهرية تمتلك فعالية مثبطة ضد بعض انواع من البكتريا المرضية وبأقطار تثبيط مختلفة القياس .
- 5- اوضحت الدراسة ان الفعالية السمية الخلوية للجسيمات النانوية الفضية ضد كريات الدم الحمر تكون سلبية اي لا تمتلك اي سمية تجاه كريات الدم الحمر للإنسان.
- 6- تم تسجيل نوعين من الفطريات لأول مرة في العراق .

5-2 التوصيات

- 1- تخليق مواد نانوية مختلفة من اجزاء مختلفة من النباتات ومن اجزاء اخرى من النباتات وتقييم الفعالية الحيوية للاحياء المجهرية المعزولة منها .
- 2- اجراء اختبارات لفحص السمية الخلوية للجزيئات النانوية للفضة على حيوانات التجارب المخبرية ومعرفة مدى فعاليتها الحيوية.
- 3- استخدام الكثير من التقنيات الحديثة للكشف عن هذه الجزيئات ويمكن توظيفها في العديد من المجالات التي لا حصر لها .
- 4- استخدام مواد نانوية مختلفة منها الذهب وغيرها ومعرفة مدى فعاليتها في تثبيط الاحياء المجهرية واستخدامها بديل للمضادات الحيوية .
- 5- اختبار الفعالية الحيوية لجسيمات الفضة النانوية وتأثيرها على الخلايا السرطانية وكذلك على الفطريات الجلدية المرضية .
- 6- استخدام المواد النانوية الفضية في علاج الامراض المناعية .

# References المصادر

---

---

**References**

- Ahmad, A., Mukherjee, P., Senapati, S., Mandal, D., Khan, M. I., Kumar, R., & Sastry, M. (2003).** Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 28(4), 313-318.
- Ahmad, N., Sharma, S., Singh, V. N., Shamsi, S. F., Fatma, A., & Mehta, B. R. (2011).** Biosynthesis of silver nanoparticles from *Desmodium triflorum*: a novel approach towards weed utilization. *Biotechnology Research International*, 2011.
- Ahmed, I. S. & Lee, Y. S. (2015).** Nanoparticles as Alternative Pesticides: Concept, Manufacturing and Activities, Article .P207-213.
- Aldujaili, N. H., & Banoon, S. R. (2020).** Antibacterial Characterization of Titanium Nanoparticles Nanosynthesized by *Streptococcus Thermophilus*. *Periódico Tchê Química*, 17(34), 311-320.
- Anbukkarasi, M., Thomas, P. A., Sheu, J. R., & Geraldine, P. (2017).** In vitro antioxidant and anticataractogenic potential of silver nanoparticles biosynthesized using an ethanolic extract of *Tabernaemontana divaricata* leaves. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 91, 467-475.
- Bacon, C. Wand White, J. F (2000)** *Microbial Endophytes*. Marcel Dekker Inc. N.Y. New York.
- Bairwa, R., Gupta, P., Gupta, V. K., & Srivastava, B. (2012).** Traditional medicinal plants: use in oral hygiene. *Int J Pharm Chem Sci*, 1(4), 1529-38.
- Baltazar-Encarnación, E., Escárcega-González, C. E., Vasto-Anzaldo, X. G., Cantú-Cárdenas, M. E., & Morones-Ramírez, J. R. (2019).** Silver Nanoparticles Synthesized through Green Methods Using *Escherichia coli* Top 10 (Ec-Ts) Growth Culture Medium Exhibit Antimicrobial Properties against Nongrowing Bacterial Strains. *Journal of Nanomaterials*.
- Bao, H., Lu, Z., Cui, X., Qiao, Y., Guo, J., Anderson, J. M., & Li, C. M. (2010).** Extracellular microbial synthesis of biocompatible CdTe quantum dots. *Acta biomaterialia*, 6(9), 3534-3541.

- BARAN, M. F. (2019).** Green synthesis, characterization and antimicrobial activity of silver nanoparticles (AgNPs) from maize (*Zea mays* L.). *APPLIED ECOLOGY AND ENVIRONMENTAL RESEARCH* 17(2):4097-4105.
- Bawaskar, M., Gaikwad, S., Ingle, A., Rathod, D., Gade, A., Duran, N., ... & Rai, M. (2010).** A new report on mycosynthesis of silver nanoparticles by *Fusarium culmorum*. *Current nanoscience*, 6(4), 376-380.
- Borase, H. P., Salunke, B. K., Salunkhe, R. B., Patil, C. D., Hallsworth, J. E., Kim, B. S., & Patil, S. V. (2014).** Plant extract: a promising biomatrix for ecofriendly, controlled synthesis of silver nanoparticles. *Applied biochemistry and biotechnology*, 173(1), 1-29.
- Bradford, P. A. (2001).** Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clinical microbiology reviews*, 14(4), 933-951.
- Cao, V., Lambert, T., Nhu, D. Q., Loan, H. K., Hoang, N. K., Arlet, G., & Courvalin, P. (2002).** Distribution of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in clinical isolates of Enterobacteriaceae in Vietnam. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(12), 3739-3743.
- Chen, X., & Schluesener, H. J. (2008).** Nanosilver: a nanoparticle in medical application. *Toxicology letters*, 176(1), 1-12.
- Cho, K. H., Park, J. E., Osaka, T., & Park, S. G. (2005).** The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient. *Electrochimica Acta*, 51(5), 956-960.
- Choi, O., & Hu, Z. (2008).** Size dependent and reactive oxygen species related nanosilver toxicity to nitrifying bacteria. *Environmental science & technology*, 42(12), 4583-4588. *cumini* (L) . Nano Biomed. Eng. 3: 174-178.
- Daniel, M. C., & Astruc, D. (2004).** Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chemical reviews*, 104(1), 293-346.

- Daphedar, A., & Taranath, T. C. (2018).** Characterization and cytotoxic effect of biogenic silver nanoparticles on mitotic chromosomes of *Drimia polyantha* (Blatt. & McCann) Stearn. *Toxicology reports*, 5, 910-918.
- Das, V. L., Thomas, R., Varghese, R. T., Soniya, E. V., Mathew, J., & Radhakrishnan, E. K. (2014).** Extracellular synthesis of silver nanoparticles by the *Bacillus* strain CS 11 isolated from industrialized area. *3 Biotech*, 4(2), 121-126.
- De Gusseme B, Sintubin L, Baert L, Thibo E, Hennebel T, Vermeulen G, Uyttrendaele M, Verstraete W, and Boon N.** Biogenic silver nanoparticles for disinfection of viral contaminated water. *Commun Agric Appl Biol Sci*. 2011; 76: 73-76
- De, B. G., Sintubin, L., Baert, L., Thibo, E., Hennebel, T., Vermeulen, G., ... & Boon, N. (2011).** Biogenic silver nanoparticles for disinfection of viral contaminated water. *Communications in agricultural and applied biological sciences*, 76(1), 73-76.
- Desai, D., & Datta, M. (2015).** GREEN SYNTHESIS OF SILVER ANTIMICROBIALS FOR ITS POTENTIAL APPLICATION IN CONTROL OF NOSOCOMIAL INFECTIONS. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 219-223.
- Devi, L. S., & Joshi, S. R. (2012).** Antimicrobial and synergistic effects of silver nanoparticles synthesized using soil fungi of high altitudes of eastern Himalaya. *Mycobiology*, 40(1), 27-34.
- Dias, M. A., Lacerda, I. C. A., Pimentel, P. F., De Castro, H. F., & Rosa, C. A. (2002).** Removal of heavy metals by an *Aspergillus terreus* strain immobilized in a polyurethane matrix. *Letters in applied microbiology*, 34(1), 46-50.
- Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002).** Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews*, 15(2), 167-193.
- Drake, P. L., & Hazelwood, K. J. (2005).** Exposure-related health effects of silver and silver compounds: a review. *The Annals of occupational hygiene*, 49(7), 575-585.
- Dreyfuss, M. M., & Chapela, I. H. (1994).** Potential of fungi in the discovery of novel, low-molecular weight pharmaceuticals.

- In *Discovery of Novel Natural Products with Therapeutic Potential* (pp. 49-80). Newnes.
- Duran, N., Marcato, P. D., De Souza, G. I., Alves, O. L., & Esposito, E. (2007).** Antibacterial effect of silver nanoparticles produced by fungal process on textile fabrics and their effluent treatment. *Journal of biomedical nanotechnology*, 3(2), 203-208.
- El Domany, E. B., Essam, T. M., Ahmed, A. E., & Farghali, A. A. (2018).** Biosynthesis physico-chemical optimization of gold nanoparticles as anti-cancer and synergetic antimicrobial activity using *Pleurotus ostreatus* fungus. *J. Appl. Pharm.*
- El-Saadony, M. T., El-Wafai, N. A., El-Fattah, H. I. A., & Mahgoub, S. A. (2019).** Biosynthesis, optimization and characterization of silver nanoparticles using a soil isolate of *Bacillus pseudomycooides* MT32 and their antifungal activity against some pathogenic fungi. *Adv. Anim. Vet. Sci*, 7(4), 238-249.
- Emily, A., Morell, B.A., Balkin, D.M. (2010).** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a pervasive pathogen highlights the need for new antimicrobial development. *Yale J. Biol.Med.* 84(4),223-233.
- Feng, Q. L., Wu, J., Chen, G. Q., Cui, F. Z., Kim, T. N., & Kim, J. O. (2000).** A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of biomedical materials research*, 52(4), 662-668.
- Fouad, H., Hongjie, L., Yanmei, D., Baoting, Y., El-Shakh, A., Abbas, G., & Jianchu, M. (2017).** Synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis* to control filarial vector *Culex pipiens pallens* and its antimicrobial activity. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 45(7), 1369-1378.
- Furst, A., & Schlauder, M. C. (1978).** Inactivity of two noble metals as carcinogens. *Journal of environmental pathology and toxicology*, 1(1), 51.
- Gade, A. K., Bonde, P. P., Ingle, A. P., Marcato, P. D., Duran, N., & Rai, M. K. (2008).** Exploitation of *Aspergillus niger* for synthesis of silver nanoparticles. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*, 2(3), 243-247.



- Gan, L., Zhang, Y., Zhang, L., Li, X., Wang, Z., He, L., ... & Tian, Y. (2018).** Planococcus halotolerans sp. nov., isolated from a saline soil sample in China. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 68(11), 3500-3505.
- Gogoi, S. K., Gopinath, P., Paul, A., Ramesh, A., Ghosh, S. S., & Chattopadhyay, A. (2006).** Green fluorescent protein-expressing escherichia coli as a model system for investigating the antimicrobial activities of silver nanoparticles. *Langmuir*, 22(22), 9322-9328.
- Gopinath, P. M., Narchonai, G., Dhanasekaran, D., Ranjani, A., & Thajuddin, N. (2015).** Mycosynthesis, characterization and antibacterial properties of AgNPs against multidrug resistant (MDR) bacterial pathogens of female infertility cases. *asian journal of pharmaceutical sciences*, 10(2), 138-145.
- Guo, D., Xie, G., & Luo, J. (2013).** Mechanical properties of nanoparticles: basics and applications. *Journal of physics D: applied physics*, 47(1), 013001.
- Gurunathan, S. (2019).** Rapid biological synthesis of silver nanoparticles and their enhanced antibacterial effects against Escherichia fergusonii and Streptococcus mutans. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(2), 168-180.
- Gurunathan, S., Han, J. W., Kwon, D. N., & Kim, J. H. (2014).** Enhanced antibacterial and anti-biofilm activities of silver nanoparticles against Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Nanoscale research letters*, 9(1), 1-17.
- Gurunathan, S., Kalishwaralal, K., Vaidyanathan, R., Venkataraman, D., Pandian, S. R. K., Muniyandi, J., ... & Eom, S. H. (2009).** Biosynthesis, purification and characterization of silver nanoparticles using Escherichia coli. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 74(1), 328-335.
- Gurunathan, S., Han, J. W., Kwon, D. N., & Kim, J. H. (2014).** Enhanced antibacterial and anti-biofilm activities of silver nanoparticles against Gram-negative and Gram-Positive bacteria. *J. Nano.Res.* (9):P 373.2-17
- Hateet, R. R. (2017).** Evaluation of Antimicrobial and Antioxidant activity of secondary metabolites isolated from endophytic bacterium

- Bacillus megaterium isolated from wheat root in Iraq. *Diyala Journal For Pure Science*, 13(1-part 1), 78-88.
- Hemath Naveen, K. S., Kumar, G., Karthik, L., & Bhaskara Rao, K. V. (2010).** Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the filamentous fungus *Penicillium* sp. *Arch. Appl. Sci. Res*, 2(6), 161-167.
- Holt, K. B., & Bard, A. J. (2005).** Interaction of silver (I) ions with the respiratory chain of *Escherichia coli*: an electrochemical and scanning electrochemical microscopy study of the antimicrobial mechanism of micromolar Ag<sup>+</sup>. *Biochemistry*, 44(39), 13214-13223.
- Hong, K. H., Park, J. L., Sul, I. H., Youk, J. H., & Kang, T. J. (2006).** Preparation of antimicrobial poly (vinyl alcohol) nanofibers containing silver nanoparticles. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 44(17), 2468-2474.
- Huang, W., Bao, Y., Duan, H., Bi, Y., & Yu, H. (2017). Antifungal effect of green synthesised silver nanoparticles against *Setosphaeria turcica*. *IET Nanobiotechnology*, 11(7), 803-808.
- Huang, W., Yan, M., Duan, H., Bi, Y., Cheng, X., & Yu, H. (2020).** Synergistic antifungal activity of green synthesized silver nanoparticles and epoxiconazole against *Setosphaeria turcica*. *Journal of Nanomaterials*.
- Huh, A. J. and Kwon, Y.J. (2011).** Nanomaterials in the antibiotics resistant cra. *J.con.Rel. Soci.*156 (2): P 128-145.
- Huq, M. (2020).** Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using *Pseudoduganella eburnea* MAHUQ-39 and Their Antimicrobial Mechanisms Investigation against Drug Resistant Human Pathogens. *International journal of molecular sciences*, 21(4), 1510.
- Husseiny, M. I., Abd El-Aziz, M., Badr, Y., & Mahmoud, M. A. (2007).** Biosynthesis of gold nanoparticles using *Pseudomonas aeruginosa*. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 67(3-4), 1003-1006. important fungus *T. asperellum*. *Nanotechnology*. 19: 075103. in vietnam. *J.Dec.*46(12):p43-51.

- Ingle, A., Rai, M., Gade, A., & Bawaskar, M. (2009).** Fusarium solani: a novel biological agent for the extracellular synthesis of silver nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*, 11(8), 2079-2085.
- Islam, S. M. A., Math, R. K., Kim, J. M., Yun, M. G., Cho, J. J., Kim, E. J., ... & Yun, H. D. (2010).** Effect of plant age on endophytic bacterial diversity of balloon flower (*Platycodon grandiflorum*) root and their antimicrobial activities. *Current microbiology*, 61(4), 346-356.
- Jalal, M., Ansari, M. A., Alzohairy, M. A., Ali, S. G., Khan, H. M., Almatroudi, A., & Raees, K. (2018).** Biosynthesis of silver nanoparticles from oropharyngeal candida glabrata isolates and their antimicrobial activity against clinical strains of bacteria and fungi. *Nanomaterials*, 8(8), 586.
- James, H.; Gary, S and Daisy, B. (2004)** Natural Products from Endophytic Microorganisms, 67(2):257–268.
- Jeanne , G.; Schereri , S. and Roach , C. (1996) .** Introductory clinical pharmacology , 5<sup>th</sup> .ed . Churchill living ston.
- Jia, M., Chen, L., Xin, H. L., Zheng, C. J., Rahman, K., Han, T., & Qin, L. P. (2016).** A friendly relationship between endophytic fungi and medicinal plants: a systematic review. *Frontiers in microbiology*, 7, 906.
- Joseph, B., & Priya, R. M. (2011).** Bioactive Compounds from Endophytes and their Potential in. *American Journal of biochemistry and Molecular biology*, 1(3), 291-309.
- Kalpana, V. N., Kataru, B. A. S., Sravani, N., Vigneshwari, T., Panneerselvam, A., & Rajeswari, V. D. (2018).** Biosynthesis of zinc oxide nanoparticles using culture filtrates of *Aspergillus niger*: Antimicrobial textiles and dye degradation studies. *OpenNano*, 3, 48-55.
- Kamalakaran, S., Gobinath, C., & Ananth, S. (2014).** Synthesis and characterization of fungus mediated silver nanoparticle for toxicity on filarial vector, *Culex quinquefasciatus*. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res*, 24(2), 124-132.

- Kashyap, P. L., Kumar, S., Srivastava, A. K., & Sharma, A. K. (2013).** Myconanotechnology in agriculture: a perspective. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(2), 191-207.
- Kasthuri J, K.K., Rajendran N., "*Phyllanthin assisted biosynthesis of silver and gold nanoarticles a novel biological approach.*". *J Nanopart Res*, 2009. 11: p.1075-1085.
- Kasthuri, J., Veerapandian, S., & Rajendiran, N. (2009).** Biological synthesis of silver and gold nanoparticles using apiin as reducing agent. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 68(1), 55-60.
- Katri, N., & Gilboa-Garber, N. (2007).** Ethanol effects on *Pseudomonas aeruginosa* lectin, protease, hemolysin, pyocyanin, autoinducer, and phosphatase levels depending on medium composition and choline presence. *Current microbiology*, 54(4), 296-301.
- Khan, A. U., Malik, N., Khan, M., Cho, M. H., & Khan, M. M. (2018).** Fungi-assisted silver nanoparticle synthesis and their applications. *Bioprocess and biosystems engineering*, 41(1), 1-20.
- Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2019).** Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian journal of chemistry*, 12(7), 908-931.
- Klaus, T., Joerger, R., Olsson, E., & Granqvist, C. G. (1999).** Silver-based crystalline nanoparticles, microbially fabricated. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(24), 13611-13614.
- Klaus-Joerger, T., Joerger, R., Olsson, E., & Granqvist, C. G. (2001).** Bacteria as workers in the living factory: metal-accumulating bacteria and their potential for materials science. *TRENDS in Biotechnology*, 19(1), 15-20.
- Kobashigawa, J. M., Robles, C. A., Ricci, M. L. M., & Carmaran, C. C. (2019).** Influence of strong bases on the synthesis of silver nanoparticles (AgNPs) using the ligninolytic fungi *Trametes trogii*. *Saudi journal of biological sciences*, 26(7), 1331-1337.
- Kotthaus, S., Gunther, B. H., Hang, R., & Schafer, H. (1997).** Study of isotropically conductive bondings filled with aggregates of nano-sited Ag-particles. *IEEE Transactions on Components, Packaging, and Manufacturing Technology: Part A*, 20(1), 15-20.

- Lee, J. C., Lobkovsky, E., Pliam, N. B., Strobel, G., & Clardy, J. (1995).** Subglutinols A and B: immunosuppressive compounds from the endophytic fungus *Fusarium subglutinans*. *The Journal of Organic Chemistry*, 60(22), 7076-7077.
- Lee, J. H., Kim, Y. G., Cho, M. H. & Lee, J. (2014).** Zon nanoparticles inhibit *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and virulence factor production. *J.Micro.Res.* 169, 888-896.
- Ly, Q., Zhang, B., Xing, X., Zhao, Y., Cai, R., Wang, W., & Gu, Q. (2018).** Biosynthesis of copper nanoparticles using *Shewanella loihica* PV-4 with antibacterial activity: Novel approach and mechanisms investigation. *Journal of hazardous materials*, 347, 141-149.
- Mahendra, R., Alka, Y., Bridge, P., & Aniket, G. (2009).** Myconanotechnology: a new and emerging science. *Applied mycology*, 258-267.
- Manisha, D. R., Ramchander, M., Prashanthi, Y., & Pratap, M. P. R. (2014).** Phototrophic bacteria mediated synthesis, characterisation and antibacterial activity of silver nanoparticles. *Nanosci. Nanotechnol. Int. J*, 4(2), 20-24.
- Manisha, D. R., Ramchander, M., Prashanthi, Y., & Pratap, M. P. R. (2014).** Phototrophic bacteria mediated synthesis, characterisation and antibacterial activity of silver nanoparticles. *Nanosci. Nanotechnol. Int. J*, 4(2), 20-24.
- Martín-Palma, R. J., Agulló-Rueda, F., & Martínez-Duart, J. (2006).** *Nanotechnology for microelectronics and optoelectronics*. Elsevier.
- Mishra, Y., Singh, A., Batra, A., & Sharma, M. M. (2014).** Understanding the biodiversity and biological applications of endophytic fungi: a review. *J. Microbiol. Biochem. Technol.* 5, 8.
- Mishra, Y., Singh, A., Batra, A., & Sharma, M. M. (2014).** Understanding the biodiversity and biological applications of endophytic fungi: a review. *J. Microbiol. Biochem. Technol.* 5, 8.
- Morell, E. A., & Balkin, D. M. (2010).** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a pervasive pathogen highlights the need



- of silver nanoparticles by *Penicillium polonicum* ARA 10 isolated from *Chetomorpha antennina* and its antibacterial efficacy against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 180, 175-185.
- Othman, A. M., Elsayed, M. A., Al-Balakocy, N. G., Hassan, M. M., & Elshafei, A. M. (2019).** Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles induced by fungal proteins and its application in different biological activities. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 17(1), 8.
- Padhi, L., Mohanta, Y. K., & Panda, S. K. (2013).** Endophytic fungi with great promises: A Review. *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research*, 3(3).
- Patel, G. P., & Crank, C. W. (2005).** Gram-negative resistance in the intensive care unit. *Journal of Pharmacy Practice*, 18(2), 91-99.
- Prakash, A., Sharma, S., Ahmad, N., Ghosh, A., & Sinha, P. (2010).** Bacteria mediated extracellular synthesis of metallic nanoparticles. *Int Res J Biotechnol*, 1(5), 071-079.
- Prathna, T. C., Chandrasekaran, N., & Mukherjee, A. (2011).** Studies on aggregation behaviour of silver nanoparticles in aqueous matrices: effect of surface functionalization and matrix composition. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 390(1-3), 216-224.
- Prema, P., Iniya, P. A., & Immanuel, G. (2016).** Microbial mediated synthesis, characterization, antibacterial and synergistic effect of gold nanoparticles using *Klebsiella pneumoniae* (MTCC-4030). *RSC advances*, 6(6), 4601-4607.
- Raheman, F. ; Deshmukh, S. ; Ingle, A. ; Gade, A. and Rai, M. (2011).** Silver
- Rai, M.; Yada, A. Bridge, P. Gade, A. (2009).** Myconanotechnology: a new and emerging science, in *Applied Mycology*, ed by Rai MK and Bridge PD. CAB International Publishers, New York. P 258-268
- Rajeshkumar, S., Malarkodi, C., Paulkumar, K., Vanaja, M., Gnanajobitha, G., & Annadurai, G. (2013).** Intracellular and extracellular biosynthesis of silver nanoparticles by using marine bacteria *Vibrio alginolyticus*. *Nanosci Nanotechnol*, 3(1), 21-25.

- Ramya, M., & Subapriya, M. S. (2012).** Green synthesis of silver nanoparticles. *Int J Pharm Med Biol Sci*, 1(1), 54-61.
- Rani, R., Sharma, D., Chaturvedi, M., & Yadav, J. P. (2017).** Green synthesis, characterization and antibacterial activity of silver nanoparticles of endophytic fungi *Aspergillus terreus*. *J. Nanomed. Nanotechnol*, 8(4).
- Rathna GS, Elavarrsi A, Peninal S, Subramanian J, Mano G, Kalaiselvam M (2013)** Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles by endophytic fungus *Aspergillus terreus* and its anti-dermatophytic activity. *Int J Pharm Biol Arch* 4:481–487
- Rautio, J. J., Smit, B. A., Wiebe, M., Penttilä, M., & Saloheimo, M. (2006).** Transcriptional monitoring of steady state and effects of anaerobic phases in chemostat cultures of the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *BMC genomics*, 7(1), 247.
- Ravindran, A.Chandran, P. &Khan,S.S.(2013).**Biofunctionalized nanoparticiles: advances and prospects. *J.Colloids Surf B: Biointerfaces*105.P342-302
- Raviraja, N. S., Maria, G. L., & Sridhar, K. R. (2006).** Antimicrobial evaluation of endophytic fungi inhabiting medicinal plants of the Western Ghats of India. *Engineering in Life Sciences*, 6(5), 515-520.
- Ray, B., & Bhunia, A. (2014).** *Fundamental Food Microbiology* 5th Ed. 99-115.
- Rodriguez, R. J., White Jr, J. F., Arnold, A. E., & Redman, A. R. A. (2009).** Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New phytologist*, 182(2), 314-330.
- Ruppé, É. Woerther, P. L., & Barbier, F. (2015).** Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. *Annals of intensive care*, 5(1), 21.
- Saha S, Sarkar J, Chattopadhyay D, Patra S, Chakraborty A, Acharya K.(2010).**Production of silver nanoparticles by a phytopathogenic fungi *Bipolaris nodulosa* and its antimicrobial activity. *Dig. J. Nanomater .Bio.*5(4): 887-895.
- Saha, S., Sarkar, J., Chattopadhyay, D., Patra, S., Chakraborty, A., & Acharya, K. (2010).** Production of silver nanoparticles by a



- phytopathogenic fungus *Bipolaris nodulosa* and its antimicrobial activity. *Dig J Nanomater Biostruct*, 5(4), 887-895.
- Saravanan M, Nanda A (2010)** Extracellular synthesis of silver bionanoparticles from *Aspergillus clavatus* and its antimicrobial activity against MRSA and MRSE. *Colloids Surf B Biointerfaces* 77(2):214–218
- Saravanan, M., Barik, S. K., MubarakAli, D., Prakash, P., & Pugazhendhi, A. (2018).** Synthesis of silver nanoparticles from *Bacillus brevis* (NCIM 2533) and their antibacterial activity against pathogenic bacteria. *Microbial pathogenesis*, 116, 221-226.
- Sarkar, B., Mahanty, A., Netam, S. P., Mishra, S., Pradhan, N., & Samanta, M. (2012).** Inhibitory role of silver nanoparticles against important fish pathogen, *Aeromonas hydrophila*. *Int J Nanomater Biostruct*, 2(4), 70-74.
- Saxena, S., Banerjee, G., Garg, R., & Singh, M. (2014).** Comparative study of biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients of lower respiratory tract infection. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, 8(5), DC09.
- Selvi, K. V., & Sivakumar, T. (2012).** Isolation and characterization of silver nanoparticles from *Fusarium oxysporum*. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci*, 1(1), 56-62.
- Senapati, S. (2005).** Biosynthesis and immobilization of nanoparticles and their applications.
- Shah, R., Oza, G., Pandey, S., & Sharon, M. (2012).** Biogenic fabrication of gold nanoparticles using *Halomonas salina*. *J Microbiol Biotechnol Res*, 2(4), 485-492.
- Shen, W., Qu, Y., Pei, X., Li, S., You, S., Wang, J., ... & Zhou, J. (2017).** Catalytic reduction of 4-nitrophenol using gold nanoparticles biosynthesized by cell-free extracts of *Aspergillus* sp. WL-Au. *Journal of hazardous materials*, 321, 299-306.
- Silver, S. (2003).** Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *FEMS microbiology reviews*, 27(2-3), 341-353.

- 
- 
- Singaravelu, G., Arockiamary, J. S., Kumar, V. G., & Govindaraju, K. (2007).** A novel extracellular synthesis of monodisperse gold nanoparticles using marine alga, *Sargassum wightii* Greville. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 57(1), 97-101.
- Singh, D., Rathod, V., Ningnanagouda, S., Hiremath, J., Singh, A. K., & Mathew, J. (2014).** Optimization and characterization of silver nanoparticle by endophytic fungi *Penicillium* sp. isolated from *Curcuma longa* (turmeric) and application studies against MDR *E. coli* and *S. aureus*. *Bioinorganic chemistry and applications*, 2014.
- Singh, P. S., & Vidyasagar, G. M. (2018).** Biosynthesis of antibacterial silver nano-particles from *Aspergillus terreus*. *World News of Natural Sciences*, 16, 117-124.
- Smith, A. M., Duan, H., Mohs, A. M., & Nie, S. (2008).** Bioconjugated quantum dots for in vivo molecular and cellular imaging. *Advanced drug delivery reviews*, 60(11), 1226-1240.
- Sondi, I., & Salopek-Sondi, B. (2004).** Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of colloid and interface science*, 275(1), 177-182.
- Srivastava, P., Braganca, J., Ramanan, S. R., & Kowshik, M. (2014).** Green synthesis of silver nanoparticles by haloarchaeon *Halococcus salifodinae* BK6. In *Advanced Materials Research* (Vol. 938, pp. 236-241). Trans Tech Publications Ltd.
- Stewart, P. S., & Costerton, J. W. (2001).** Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The lancet*, 358(9276), 135-138.

## Abstract

The study was conducted in the Microbiology Laboratory and the Fungi Laboratory / College of Science / University of Misan. To do so, the researcher collected samples of various plant leaves from different regions in Misan Governorate during the period from November 2019 - January 2020 in intention to isolate and diagnosing bacteria and fungi of the internal tissue of the leaves of listed plants. In the study, 5 types of plant leaves were collected from four places in Misan Governorate (Awasha, Shabana, College of Science garden, and home garden).

The surface sterilization method was used for the purpose of isolating bacteria and fungi from plant tissue. Four types of bacteria and four types of fungi were identified. Within the plant tissue of plant leaves, the study came up with that *A.terreus* was isolated from the leaves of the inner tissue of oleander plant, *C.uredicola* was isolated from Sidr plant, *A.tubingensis* was isolated from basil plant and *A.terreus* was isolated from Aloe vera plant and the phenotypic diagnosis was made.

The bacteria isolated from the plant tissue were diagnosed by the Vitek - 2device, where *S.lentus* bacteria were diagnosed from the leaves of the *Ocimum basilicum* and *S.sciuri* bacteria from the *frangula lanus* and Bacteri *S.hominis* from the leaves of the plant, *S.vitulinus* was also isolated from the leaves of the *Nerium oleander*. The synthesis of silver nanoparticles was carried out from bacterial and fungal culture filtrate, and the results showed the appearance of a color change in the culture filtrate with AgNo<sub>3</sub> added as an indicator for the formation of silver nanoparticles, and it was confirmed by chemical and physical examinations (UV-vis), Zeta potential, XRD, AFM, FTIR, (SEM where The results showed that all types of bacteria and fungi that were obtained under the study produced silver nanoparticles, and the effectiveness of silver nanoparticles synthesized from bacteria and fungi was tested against some types of pathogenic bacteria that were isolated from patients visiting and attending Al-Sadr Teaching Hospital, Children and Maternity Hospital in Maysan Governorate. Five types of pathogenic bacteria were isolated and diagnosed from people with burns, urinary tract infection and otitis media. It was found that all silver nanoparticles prepared from bacteria and fungi have activity against the tested pathogenic isolates with different inhibition diameters. The cytotoxicity of these silver nanoparticles was also

studied. against human red blood cells, and the results showed that silver nanoparticles do not have any toxicity. E human red blood cells.



**Evaluation of the biological activity of synthetic silver nanoparticles by some microorganisms**

**A Thesis**

**Submitted to The Council of the College of Science /  
University of Misan In Partial Fulfillment of the  
Requirements for the Master Degree in Biology**

**By**

**Noor Basil Ibrahim**

**B.Sc. Biology / University of Misan (2016).**

**Supervised by**

**Assist. Prof. Dr. Rashid Rahim Hatit**

**2022 A.D.**

**1443 A.H**