جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة ديالى
كلية التربية للعلوم الصرفة

الفعالية ضد الميكروبية للبايوسيانين المنتج من بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة محلياً

رسالة مقدمة

إلى

مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى

وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير في

علوم الحياة / علم الاحياء المجهرية

من قبل

الطالبة

مدين عبد المهدي حسين التميمي

بكالوريوس علوم حياة ٢٠٠٦

بإشراف

أ. د. عدنان نعمة عبد الرضا العزاوي

١٤٣٧هـ ٢٠١٦ م

الخلاصة

في الفترة الواقعة ما بين (٢٠١٤/٩/١) ولغاية (٢٠١٥/٤/١) تم جمع مائة وثلاثون عينة , تضمنت عينات سريرية (الادرار , التهاب الاذن الوسطى , الجروح , الحروق) (٥٤ , ٣٨ , ٥ , ٣) على التوالي , وعينات بيئة (تربة , ماء , مخلفات معامل) (١٥ , ١٠ , ٥) على التوالي. اذ شخصت ٤٠ عزلة لبكتريا الزوائف الزنجارية P.aeruginosa و٤٠ عزلة كانت لبكتريا *E.coli* و ٤٠ عزلة لبكتريا *S.aureus* و١٠ عزلات كانت لبكتريا *P.flourescens*. اذ جمعت هذه العينات من محطات مختلفة تضمنت (مستشفى الزهراء للنسائية والاطفال/المقدادية , مستشفى بعقوبة التعليمي , مستشفى المقدادية العام) على التوالي , ومحطات بيئة تضمنت (تربة قضاء المقدادية , ماء نهر ناحية ابي صيدا , مخلفات منشأة القادسية) على التوالي.

اشارت النتائج الى ان اعلى نسبة كانت لبكتريا *P.aeruginosa* المعزولة من حالات التهاب المجاري البولية , وتلتها حالات التهاب الاذن , حالات الجروح ثم الحروق) و بنسبة (٤٢,٥٪ , ١٥٪ , ٧,٥٪ , ٥٪) .

اما بالنسبة للعينات البيئية فقد كانت اعلى نسبة عزل للعينات ضمن التربة والماء وتلتها مخلفات المعامل) اي بنسبة (١٢,٥٪ , ١٢,٥٪ , ٥٪) .

اشارت النتائج ان هناك سيادة واضحة لبكتريا الزوائف الزنجارية على بكتريا *S.aureus* بالنسبة لحالات الحروق , اذ بلغت نسبة العزل (٥٪ , ٢,٥٪) .

اما حالات الجروح كانت بكتريا الزوائف الزنجارية سائدة على بكتريا *S.aureus* اي بنسبة (٧,٥٪ , ٥٪) .

اما العينات البيئية اذ كانت النسب متساوية بين بكتريا *P.aeruginosa* قيد الدراسة وبكتريا *E.coli* ضمن عزلات الماء اي بنسبة (١٢,٥٪ , ١٢,٥٪) .

تم اختبار حساسية ابكتريا الزوائف الزنجارية P.aeruginosa لبعض المضادات الاكثر شيوعاً , اتضح هناك تبايناً واضحاً لتلك المضادات , اذ كانت النتائج ان جميع العزلات البيئية والسريرية ذات مقاومة بنسبة (١٠٠٪) تجاه مضاد *Ciprofloxacin* , في حين اظهرت العزلات السريرية مقاومة عالية تجاه مضادي *Amoxicillin* و

Gentamycin , بينما كانت العزلات البيئية حساسة ١٠٠٪ لهذين المضادين , في حين كانت جميع العزلات السريرية والبيئية حساسة تجاه مضاد *Cefotaxime* و *Ofloxacin* و *Pipercillin* بنسبة (١٠٠٪) .

و قد اظهرت نتائج البحث ان جميع العزلات كانت منتجة لإنزيم الهيمولايسين و صبغة البايوسيانين ، الفينازين ، ما عدا عزلات مخلفات المعامل فهي لم تنتج اي صبغة .

تم استخلاص وتنقية صبغة البايوسيانين من العزلات السريرية وبعض العزلات البيئية لبكتريا الزوائف الزنجارية وتم قياس معدل الامتصاصية لصبغة البايوسيانين , و قد اشارت النتائج بان اعلى معدل للامتصاصية لصبغة البايوسيانين بلغت ٢,٥ وبطول موجي ٣٠٠ نانوميتر كان ضمن المعدل القياسي. تم تحليل مكونات مركب البايوسيانين باستخدام جهاز GC-mass ثم استخلصت صبغة الفينازين منه وتحليلها باستخدام جهاز GC-mass .

اختبرت الفعالية التثبيطية لصبغة البايوسيانين تجاه بعض العزلات لبكترية مثل بكتريا *E.coli* و *S.aureus* , وبعض العزلات الفطرية *Candida albicans* , اشارت النتائج بان هذه العزلات كانت حساسة بنسبة ١٠٠٪ تجاه صبغة البايوسيانين بتركيز 100 ملغم .

قائمة المحتويات

التسلسل	الموضوع	الصفحة
الفصل الاول : المقدمة		
١	المقدمة	١
الفصل الثاني : استعراض المراجع		
1-2	الوصف العام لبكتريا الزوائف الزنجارية *Pseudomonas aeruginsae*	٤
2-2	تصنيف بكتريا *Pseudomonas aeruginsae*	7
3-2	وبائية بكتريا الزوائف الزنجارية Epidemiology of *P.aeruginosa*	8
4-2	امراضية بكتريا الزوائف الزنجارية Pathogenicity of *P.aeruginosa*	10
5-2	الامراض المتسببة عن بكتريا الزوائف الزنجارية Infections caused by *P.aeruginosa*	13
1-5-2	الاصابات الجلدية Skin Infections	13

2-5-2	اصابات الاذن Ear infections	13
3-5-2	اصابات الجهاز البولي Urinary system infections	14
4-5-2	اصابات الجهاز التنفسي Respiratory system infections	14
5-5-2	اصابات الحروق والجروح Wounds burns infections	14
6-5-2	اصابات العيون Eye infections	15
6-2	عوامل الضراوة لبكتريا *Pseudomonas aeruginsae*	١٦
1-6-2	عوامل الضراوة مرتبطة بالخلية Virulence Factors associated with bacterial cell	١٦
2-6-2	عوامل ضراوة خارج الخلية Extracallular virulence factors	١٧
7-2	صبغة البايوسيانين Pyocyanin pigment	18
8-2	صبغة الفينازين phenazine pigment	20
9-2	مضادات الحياة Antibiotics	٢٤
10-2	مقاومة البكتريا *P.aeruginosa* لمضادات الحياة	24
الفصل الثالث : المواد وطرائق العمل		
٣	المواد وطرائق العمل Materials and methods	26
١-٣	المواد	26
٢-٣	المواد الكيميائية المستخدمة	27
٣-٣	الاوساط الزرعية الخاصة بالبكتريا Bacterial culture media	29
A-٣-٣	الاوساط الزرعية الجاهزة	29
B-3-3	الاوساط الزرعية التركيبية	30
١-B-٣-٣	وسط كنغ A وكنغ King A Agar B وking B	30
2-B-3-3	وسط اكار السترمايد Cetrimide agar	30
3-B-3-3	وسط الحد الادنى من الكليسرول والالنين Glycreol-alanine minimal media	31
4-B-3-3	وسط Modified pseudomonas medium (PSP)	31
٥-B-٣-٣	وسط خزن البكتريا	32

٣-٤	مضادات الحياة المستخدمة لاختيار حساسية البكتريا	32
٣-٥	العزلات البكتيرية والخمائر كعُتر قياسية	33
٣-٦	الكواشف والمحاليل	٣٣
٣-٧	مواد متفرقة	34
٤	طريقة العمل	34
٤-١	تحضير المحاليل والكواشف	34
٤-١-١	المحلول الفسلجي الملحي Normal Saline	٣٤
٤-١-٢	محلول اليود Iodin Solution	35
٤-١-٣	محاليل صبغة الكرام	35
٤-١-٤	محلول احمر المثيل Methyl-red-solution	35
٤-١-٥	محلول اليوريا ٢٠٪	35
٤-١-٦	المحلول ثابت العكورة القياسي	٣٦
٤-١-٧	كاشف الاوكسديز Oxidase Reageut	36
٤-١-٨	كاشف الكاتاليز Catalase Reageut	36
٤-١-٩	كاشف الاندول Indole Reageut	37
٤-١-10	محلول الماء المحمض Acidified water	37
٤-١-A-10	HCL (٠.١ مولاري)	37
٤-١-١٠-B	HCL (٠.٥ مولاري)	37
٤-١-١٠-C	HCL (٠.٢ مولاري)	37
٤-١-١١	Hydroxyethl amino methane Tries (١ مولاري)	37
٤-١-12	هيدروكسيد الصوديوم NaoH (٠.١ مولاري)	38
٥-١	الاوساط الزرعية Culture Media	38
٥-١-١	وسط اكار الماكونكي Macconkey agar	38
٥-١-٢	وسط اكار الدم Blood base agar	38
٥-١-٣	وسط اكار اليوريا Urea base agar	39

٥-١-٤	وسط المثل الاحمر فوكاس بروسكاور السائل (MR-VP Broth)	39
٥-١-٥	وسط اكار السيدوموناس Pseudomonas isolation agar	39
٥-١-٦	وسط السترات Cimmon citrate agar	40
٥-١-٧	وسط كنغ اي King-A-agar	40
٥-١-٨	وسط كنغ بي King-B-agar	40
٥-١-٩	وسط الحد الادنى من الكليسرول والالنين Glycerol-alanine minimal agar media	40
٥-١-١٠	وسط اكار السترمايد Cetrimide agar	40
٥-١-١١	وسط Modified pseudomonas P.medium	40
٥-١-١٢	وسط خزن العزلات البكتريا	41
٥-١-١٣	وسط اختبار الحساسية Muller Hinton agar	41
٥-١-١٤	الوسط المغذي السائل Nutrient troth	41
٥-١-١٥	وسط الاكار المغذي Nutrient troth	41
٥-١-١٦	وسط ماء الببتون لاختبار الاندول	41
٥-١-١٧	وسط اختبار حركة البكتريا	42
٦-١	جمع العينات Collection of samples	42
٦-١-١	زرع العينات Samples Culture	42
٦-١-٢	حفظ وادامة العزلات البكتيرية	43
٧-١	تشخيص العزلات البكتيرية	43
٧-١-١	الفحوصات المظهرية	43
٧-١-٢	الفحوصات الكيموحيوية Biochemical tests	44
٧-١-٢-A	اختبار انزيم الكالتاليز Catalase test	44
٧-١-٢-B	اختبار انزيم الاوكسديز Oxidase test	44
٧-١-٢-C	اختبار الاندول Indols test	44
٧-١-٢-D	اختبار احمر المثيل Methylred test	٤٥

٧-١-٢-E	اختبار استهلاك السترات Citrate utilization test	٤٥
٧-١-٢-F	اختبار اليوريز Urease test	٤٥
٧-١-٢-G	التحري عن قابلية البكتريا على الحركة Motility test	45
٧-١-٢-H	اختبار انتاج الهيمولايسين	٤٦
٧-١-٢-I	تأثير درجة الحرارة على نمو عزلات بكتريا الزوائف الزنجارية	٤٦
٧-١-٢-J	اختبار العزلات لانتاج صبغة البايوسيانين	٤٦
٧-١-٢-K	اختبار حساسية البكتريا لمضادات الحياة	٤٧
٨-١	استخلاص صبغة البايوسيانين من الوسط السائل	٤٨
٨-٢	استخلاص صبغة البايوسيانين من الوسط السائل	٤٩
٨-٣	استخلاص البايوسيانين من الوسط الصلب Extraction of pyocyanin pigment from solid media	٥٠
٨-٤	تحليل مركبات البايوسيانين باستخدام جهاز المطياف الضوئي	٥١
٨-٥	تحليل مكونات البايوسيانين باستخدام جهاز GC-Mass	٥١
٨-٦	استخلاص مركبات الفينازين	٥٢
الفصل الرابع : النتائج والمناقشة		
٤	النتائج والمناقشة	٥٣
٤-١	تشخيص البكتريا في العينات السريرية	٥٣
٤-٢	دراسة خصائص بكتريا *Pseudomonas aeruginosae*	٥٩
٤-٢-١	التنمية على وسط الماكونكي اكار Maconkey agar	59
٤-٢-٢	اختبار انتاج الهيمولايسين	٥٩
٤-٢-٣	تأثير درجة الحرارة على نمو العزلات	٦٠
٤-٢-٤	انتاج البايوسيانين	٦٠
٤-٣	دراسة صفات البايوسيانين	٦٢
٤-٣-١	الطريقة الضوئية UV/VS-Spectrophotometer	٦٢

٤-٣-٢	طريقة الكروموتوغرافي الغازي الكتلوي GC-MSS	٦٢
٤-٤	الاختبارات الكيموحياتية Biochemical Tests	٦٣
٤-٥	توزيع العزلات وفق مواقع الاصابة	٦٦
٤-٦	توزيع العينات السريرية بحسب الجنس	٧١
٤-٧	مقاومة العزلات لمضادات الحياة	٧٤
٤-٨	تأثير البايوسيانين من قبل *P.aeruginosae* على بعض البكتريا المرضية والفطريات	٧٨
٤-٩	التأثير التثبيطي للبايوسيانين ومضادات الحياة على بعض العزلات المرضية	٨٠
٤-١٠	تحليل مكونات الفينازين	٨٠
الاستنتاجات والتوصيات		
الاستنتاجات		٨٥
التوصيات		٨٦
المصادر		
المصادر العربية		٨٧
المصادر الاجنبية		٨٩
الملاحق		١١١

قائمة المختصرات

Abbreviation	Key
AIDS	Aquired Immuno Deficiency Syndrome
E.coli	*Escherichia coli*
GsL	Glyco sphingo Lipid
Gc-mass	Gas chromatoraphy- mass spectrometry
Lps	Lipopoly saccharide
MDR	Multi Drug Resistant
NCCLs	National Committee for Clinical Laboratory Standard
NNIS	National Nosochemial Infections Surveillance system
PsP	Modified Pseudomonas P.medium
P.aeruginosae	*Pseudomonas aeruginosa*
S.aureus	*Staphylococcus aureus*
U.T.I	Urinary Tract Infection
UV	Ultra-Violet

قائمة الجداول

التسلسل	الموضوع	الصفحة
١-٢	بعض اهم الحالات المرضية التي تسببها بكتريا *P.aeruginosa* اعتمادا على حالة المريض المصاب	١١
٢-٢	خصائص بعض مركبات الفينازين التي تفرزها انواع *Pseudomonas*	٢٣
١-٣	الاجهزة والمواد المستخدمة في الدراسة	٢٦
٢-٣	المواد الكيميائية المستخدمة في الدراسة	٢٧
A-٣-٣	الاوساط الزرعية الجاهزة	٢٩
٤-٣	مضادات الحياة المستخدمة لاختيار حساسية البكتريا	٣٢
٥-٣	العزلات البكتيرية والخمائر كعُتر قياسية	٣٣
٦-٣	كواشف والمحاليل	٣٣
١-٤	العينات المرضية البيئية والسريرية المأخوذة من محطات مختلفة من محافظة ديالى	٥٨
٤-٤	الاختبارات كيموحياتية Biochemical Tests لبكتريا *P.aeruginosa*	٦٥
٥-٤	النسب المئوية للعزلات من العينات السريرية والبيئية	٧١
٦-٤	توزيع العينات السريرية لبكتريا *P.aeruginosa* حسب الجنس	٧٤
٧-٤	النسب المئوية لحساسية العزلات قيد الدراسة للمضادات الحيوية	٧٧
٨-٤	تأثير مادة البايوسيانين على بعض العزلات المرضية	٧٩

قائمة الاشكال

التسلسل	الموضوع	الصفحة
١-٢	تركيب *Pseudomonas aeruginosae* والالية الامراضية لها	١٢

٢-٢	خصائص بعض المركبات التي تفرزها انواع *Pseudomonas*	٢٣
٢-٣	صبغة البايوسيانين على وسط كنغ A	19
٢-٤	التركيب الكيميائي لصبغة البايوسيانين	٢٠
٢-٥	التركيب الكيميائي لصبغة الفينازين Phenazine	22
٤-١	معدل الامتصاصية القياسي لصبغة البايوسيانين باستخدام جهاز (uV / VIS Spectrophotometer)	82
٤-٢	قياس البايوسيانين باستخدام (VV / VIS Spectrophotometer)	٨٢
٤-٣	تبلور مادة البايوسيانين	٨٢
4-4	البايوسيانين في الوسط الحامضي	٨٣
٤-٥	البايوسيانين في الوسط القاعدي	٨٣
٤-٦	نتائج تحليل مكونات صبغة البايوسيانين باستخدام جهاز GC-MSS	٨٤

قائمة الملاحق

التسلسل	الموضوع	الصفحة
١	استمارة المعلومات الخاصة بالمرضى	١١١
٢	الاختبارات الكيموحيوية لبكتريا *P.flourescens*	١١٢
٣	الاختبارات الكيموحيوية لبكتريا *S.aureus* و *E.coli*	١١٣
٤	اقراص مضادات الحياة المستخدمة واقطار منطقة التثبيط	١١٤

٥	**وسط الحد الادنى من الكليسرول والالنين المنماة عليه بكتريا *P.aeruginosa* عند حضنها بدرجة (٣٧°) و لمدة ٢٤ ساعة**	١١٥
٦	**وسط اكار الستريمايد المنماة عليه بكتريا *P.aeruginosa* للعزلات السريرية والبيئية**	١١٦
٧	نتائج تحليل مكونات صبغة البايوسيانين باستخدام جهاز GC-MSS	١١٧
٨	نتائج تحليل مكونات صبغة الفينازين باستخدام جهاز **(GC–mass)**	١٢١
٩	استخلاص البايوسيانين من الوسط الصلب	١٢٣
١٠	استخلاص البايوسيانين من الوسط السائل	١٢٤
١١	استخلاص صبغة الفينازين	١٢٥

الفصل الأول

المقدمة

Introduction

(١) المقدمة Introduction

تعدَ بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* من الاجناس البكتيرية المهمة جداً بوصفها ذات انتشار واسع في الطبيعة ولامراضيتها العالية بالنسبة للإنسان , والحيوان , والنبات , وللبكتريا القدرة على العيش في بيئات مختلفة فهي حرة المعيشة وتتوافر بصوره شاسعه في البيئات الرطبة بالمستشفيات (**Brook و اخرون , 2007**) للبكتريا القابلية على تحمل مدى واسع من الظروف الفيزيائية ومنها درجه الحرارة وهذه الخاصية تسهم في تعزيز قدرة البكتريا بوصفها ممرضا منتهزا للفرص *Opportunistic bacteria* , وهذا يعكس من وجودها بالتربة والمياه والبيئات الرطبه (Ellen واخرون , 2003)(Mena و Gerba ,2009) .

اذ تعد هذه البكتريا من المسببات المهمة لأخماج المستشفيات Hospital infection لاسيما التهاب الحروق Burn infection والتهابات الجروح Wound infections وهي جراثيم انتهازيه لها القدرة على احداث الاصابات المختلفه كما تسبب التهاب أغشيه الدماغ *Meningitis* والتهاب المجاري البولية *Urinary tract infection* وعدد من الاصابات الخطيرة للعين *Eye infection* والتهاب الاذن الوسطى Otitis media infection كما تسبب اصابات الجهاز التنفسي Respiratory infections ومنها التهاب الرئة لا سيما في الاشخاص المصابين لمرضى التليف الكيسي Cystic fibrosis (Karapagam واخرون , 2013) (Delden و Iglewski , 1998).

بإمكان جرثومة *P.aeruginosa* ان تغزو مجرى الدم وتسبب التسمم الدموي Septicemiae (Murray واخرون , 2003) .

تعد بكتريا *P. aeruginosa* عصوية سالبة لصبغة كرام gram negative bacteria ، متحركة اذ تمتلك سوطاً واحداً طرفي او اكثر من سوط ، وهي هوائية aerobic

مجبرة ، وبعضها يمكن ان تنمو لا هوائيا عند وجود النترات بدل الاوكسجين بوصفه مستقبلاً نهائياً للإلكترونات , غيرمخمرة للسكريات في حين انها تستهلك بعض المركبات العضوية عن طريق الأكسدة ، فضلا عن ذلك تمتاز هذه البكتريا بانها مسؤولة عن تلف الأغذية المجمدة كاللحوم والاسماك والدواجن والبيض وكذلك مسؤولة عن تلف الحليب اذ تمتلك انزيمات حاله للبروتينات والدهون (الهلالي , 2005) .

تظهر صعوبة هذه البكتريا بسبب مقاومتها للعديد من المضادات الحياتية ، مما يجعلها من اخطر الممرضات واكثرها اصابه للإنسان (Salih واخرون , 2011) (Landman وآخرون , ٢٠٠٢) , ويعزى سبب ذلك الى امتلاك هذه البكتريا اليات مختلفة كإنتاجها للأنزيمات المحللة للمضادات الحياتية كما في شكل (٢-١) (Laura واخرون , 2002).

تنتج بكتريا *P. aeruginosa* عوامل ضراوة خارج الخلية كإنتاج صبغات الفينازين (الحمراء) وصبغه البايوسيانين (الخضراء المزرقة) وتستخدم هذه الصبغات عوامل سيطرة حيوية Biological control ضد انواع الفطريات وبعض انواع البكتريا الاخرى والطفيليات(Elfouly واخرون , 2014) (Alshamaa واخرون , 2011).

اذ تعرف السيطرة البايولوجية على انها استخدام الكائنات الدقيقة او افرازاتها لمنع الامراض النباتية او الامراض الفطرية كاستخدام الصبغات التي تنتجها بكتريا *P.aeruginosa* ضد فطر *Candida albicans* (Uzair واخرون , 2008) (seema واخرون ,٢٠١٢) , ومن هذه الصبغات المهمة صبغه Phenazine (PCA) والفينازين عامل مختزل Redox agent غير متجانس الحلقات Heterocyclic تنتجه بكتريا *P.aeruginosa* يحتوي على النتروجين .

وصفت اكثر من 6000 من مشتقات الفينازين خلال القرنين الاخيرين وتنتج هذه المركبات بطريقتين اما بوساطة التخليق الحيوي Biosynthesis او بوساطة البناء الكيميائي Chemosynthesis (Nansathit واخرون , 2009) , فضلا عن ذلك ان العديد من الانواع البكتيريه تفرز اكثر من ١٥٠ من مشتقات الفينازين مثل *Pseudomonads* و *Strptomyces* و *Burkholderia spp* , ويستخدم الفينازين بوصفه مضاداً حيوياً ضد بعض الانواع البكتيرية والانواع حقيقية النواة Eukaryotic فضلا عن ذلك يعد مادة تضادية Antigonistic للتداخل بين الميكروبات , كاستخدام مركب الفينازين 1- (PCA) Phenazine carboxylic acid المنتج من قبل بكتريا *Pseudomonas flourescens* بوصفه عامل سيطرة حيوي ضد الممرضات النباتية *Phytopathogens* (Gibson واخرون , 2008).

الهدف من الدراسة :-

١- عزل وتشخيص بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* من المصادر السريرية والبيئية.

٢- دراسة قدرة بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* على انتاج صبغة البايوسيانين , ودراسة صفاته الفيزيوكيمياوية باستخدام *UV-Spectrophotometer* و *GC-mass* .

٣- اختبار مقاومه وحساسيه بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* تجاه بعض انواع مضادات الحياة .

٤- التعرف على تأثير العوامل البيئة كدرجة الحرارة واختبار افضل انواع العزلات انتاجاً لها .

٥- دراسة التأثير التضادي لمادة البايوسيانين تجاه بعض انواع البكتريا والفطريات المرضية

.

٦- مقارنة الفعالية التثبيطية لمضادات الحياة وصبغة البايوسيانين .

٧-
٨-
٩-
١٠-
١١-
١٢-
١٣-

١٤-الفصل

الثاني

١٥- استعراض المراجع

Literature Review -١٦

(١-٢) الوصف العام لبكتريا الزوائف الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa*

يعد العالم Schroter أول من أطلق تسمية *Bacterium aeruginosae* في عام (1872) إذ عزلها من الجروح المتقيحة (القيح الاخضر المزرق) وبعد ذلك جاء العالم Gessard الذي امتدت دراسته عشر سنوات (1882–1892) وهو اول من استطاع عزل بكتريا *Pseudomonas aeruginsa* من القيح الأخضر للجروح ، وسماها بـ *pyocyanin* *Bacillus* ميزها بوصفها عصوية ، ثم سميت بـ*Pseudomonas pyocyaneas* (2008, Todar) .

تنتمي بكتريا *P . aeruginosa* الى عائلة *Pseudomonaceae* التي تضم جنس *Xanthomonas* فضلا عن جنس *Pseudomonas* الذي يضم 76 نوعا (Baho , 2006) (Macfaddin , ٢٠٠٠). البكتريا سالبة لصبغة كرام Gram negative bacteria غير مكونة للابواغ Non spore forming متحركة Motile بوساطة سوط قطبي واحد في حين ان بعضها تمتلك ٢–٣ اسواط ، وتمتلك هذه البكتريا الخمل Fimbriae ولا سيما في العزلات المرضية الذي له أُثرً مقاوم ضد البلعمة *Antiphagocytic* ويساعد في الالتصاق لغرض الاستيطان (AL–Taaie واخرون ، 2014) (Gales واخرون ,٢٠٠١)(Bhaisn , ٢٠١٥) .

بكتريا *P . aeruginosa* هوائية Aerobic مع أنها أيضا تستطيع أن تستخدم النتروجين بوصفه مستلماً للإلكترون في التنفس اللاهوائي Anaerobic respiration وغير مخمرة للسكريات ، تمتاز هذه البكتريا بان لها متطلبات غذائية بسيطة جدا ولا تحتاج إلى إضافه مواد عضوية إلى وسط النمو ، ويمكن تنميتها بالمختبر على أوساط بسيطة تحوي الخلات كمصدر للكربون ، وكبريتات الامونيوم كمصدر للنتروجين (Hassan و آخرون ، 2014) (Vessilier وآخرون ، 2001).

أبعاد الخلية البكتيرية حوالي 0.6 × 2 مايكروميتر وتكون بهيئة منفردة أو مزدوجة أو سلاسل قصيرة (Brook و آخرون ، 1998) . تنمو البكتريا بدرجة حرارة ما بين ٤ – ٤٢ مْ والحرارة المثلى للنمو تقدر ب ٣٧ مْ إذ أن النمو بدرجه ٤٢ مْ صفة مهمة تميز هذا النوع عن باقي أنواع جنس *Pseudomonas* والرقم الهيدروجيني الأمثل لهذه البكتريا يتراوح ما بين ٤.٧ – ٦.٧ (Forbes وآخرون ، 2002) (Prescott و آخرون ، 1999) . للمزارع البكتيرية رائحة تشبه رائحة العنب Grape like وتعود هذه الرائحة لمركب Amino acetophenon (Sorhabi , ٢٠١٤) .

بعد تنقيه البكتريا على الوسط المغذي الصلب والحضن بدرجة ٣٧ مْ ولمده ٢٤ ساعة تظهر البكتريا في ثلاثة إشكال (أنماط) من المستعمرات النوع الاول الطبيعية المعزولة من الماء والتربة تنتج مستعمرات خشنة وصغيرة ، اما المعزولة سريريا فتنتج نوعين من المستعمرات الاولى كبيره وملساء وذات حافات مستوية ومظهر مرتفع ، اما الثانية غالبا ما تعزل من المجاري التنفسية والبولية وتكون ذات قوام مخاطي *Mucoid* , (Todar ، 2004).

المظهر المخاطي يعزى لإنتاج بعض السلالات للألجنيت وهي عبارة عن طبقه لزجة من السكريات المتعددة Polysaccharide اذ يمنح هذا التركيب المستعمرات مظهراً مخاطياً مميزاً وشكلا مجهريا الذي يشكل المحفظة للبكتريا Capsule يقوم هذا التركيب بحماية البكتريا من المضادات الحياتية (بوصفه حاجزا فيزاويا) Physical barrier اذ تكون السلالات المخاطية اكثر مقاومه للمضادات من السلالات غير المخاطية (Rezaee وآخرون، 2002) .

يساعد انتاج الالجنيت الى الالتصاق بالمادة المخاطية للشعبيات القصبية ، لان الغشاء الحيوي Biofilm انتحاء نحو الأغشية الغنية بالميوسين (Hoiby و Koch , 1998) (Lamppa و Griswold, ٢٠١٣) .

ويساعد هذا الغشاء البكتريا على الالتصاق ويحميها من فعل الخلايا البلعمية والاهداب المتوافرة في الجهاز التنفسي وفعل الاجسام المضادة ويجعلها ايضاً مقاوم للعديد من مضادات الحياه (Hauser و Padman ، 2005) .

يمكن تشخيص البكتريا *P . aeruginosa* في اصابات الحروق او الجروح عن طريق الكشف عن وجود مادة verdoglobin الناتجة من تحلل الهيموغلوبين بفعل انزيم Haemolysin اوعن الكشف وجود صبغة Fluorescent pigment في الحروق او الجروح والادرار باستخدام الاشعة الفوق البنفسجية Ultra violet ray (Brooks و آخرون ، 2001) .

فضلاً عن ذألك يوجد عدد من الاوساط الانتخابية او التفريقية لعزل البكتريا *p.aeruginosa* وذلك باستخدام مادة Cetrimide او Dettol التي تعد من المواد المطهرة وتتمكن هذه البكتريا من العيش فيها , وقد وجد ان وسط PAB (Pseudomonas agar base) مضافا اليه Naldixic acid لقتل البكتريا الموجبة لصبغه كرام Gram possitive bacteria ، وكبريتات الحديد ($FeSo_4$) ، يعد واحدا من بين الاوساط التفريقيه والاختيارية Differential selective media لبكتريا *p.aeruginosa* اذ تظهر المستعمرات ذات لون بني غامق نتيجة لإنتاج صبغه البايوسيانينPyocyanin , (RamaLo وآخرون، 2002) .

(٢-٢) تصنيف بكتريا *Pseudomonas aeruginosa*

تنتمي بكتريا *Pseudomonas aeruginsa* إلى تحت رتبه pseudomonadineaeلرتبة الـ Pseudomonadales التي تضم سبعَ عوائل تتميز بفقدانها لصبغات التركيب الضوئي ، والتي تقسم على نوعين اعتمادا على كيفية اكتسابها للطاقة والكربون وهي autotrophic Chemolihotrophic التي تكتسب طاقتها من الأكسدة القليلة للمركبات اللاعضوية ، وتستهلك إل Co_2 بوصفه مصدرا للكربون ، اما النوع الاخر من العوائل فهي Chemoorganotrophic heterotrophic والتي من بين أعضائها عائله Pseudomonaceae وهي عائلة كبيرة جداً تتكون من ١٥٠ نوعا من أنواع جنس *Pseudomonas* و ٧٥ نوعا من جنس xanthoomonas ، وتقريبا ٣٥ نوعا من ١٠ اجناس اخرى ، وتكون لها القدرة لاستهلاك العديد من المركبات العضوية المعقدة وانواع قليله منها تستهلك الهيدروجين H_2 او الميثان CH_4 وتتميز بانها هوائية مُجبره Obligate aerobic تستخدم الاوكسجين بوصفه مستقبلاً للإلكترون، وبعضها قد تستهلك No_3 , No_2 هوائيا (Kotherواخرون ، 2000) .

ويضم جنس *Pseudomonas* ثلاثة انواع ممرضة للانسان وهي *P.aeruginosa* و *P.mallei* و *P.pseudomallei* (Ehrlich ، 2003).

Kingdom:Bacteria
Phylum:proto bacteria
Class:Gamma protobacteria
Order:pseudomonales
Family:psedomonaceae
Genus: pseudomonas
Species: *pseudomonas aeruginosa*

(Presscott واخرون ،2005).

(٢-٣) وبائية بكتريا الزوائف الزنجارية *epidemiology of P.aeruginosa*

بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* ذات انتشار واسع جدا في التربة والمياه ومياه المجاري وأسطح النبات وفي امعاء الانسان ، وتعد بكتريا رميه Saprophyte , كما تظهر على جلد الاشخاص الاصحاء وعزلت من الحنجرة ومن غائط المرضى خارج المستشفى (kiffer و اخرون ، 2005) (Putty و Analyst , ٢٠٠٧) .

تتصف بكتريا *P.aeruginosa* بانها انتهازية Opportunistic فهي لا تسبب المرض الا اذا كان الشخص ذا بنية او نظام مناعي ضعيف كما في حالة مرضى قلة العدلات Neutropenia وذوي المناعة المثبطة Immunosuppressive وفي حالات تناول العقاقير المثبطة للجهاز المناعي، اضافة إلى ذلك تحتل هذه البكتريا مكانة بارزة اسوة بباقي الممرضات مثل *Streptococcus* , Staphylococcus (Shahid و Abida Malik , 2005) , (ALtaai واخرون ، 2014) .

تسبب البكتريا الاصابة عادة لمرضى المستشفيات وتعرف بالإصابة المكتسبة Nosocomial infection وتشكل خطرا على المرضى الراقدين في وحدات الحروق والمواليد الجدد ومرضى السرطان ومرضى العوز المناعي المكتسب AIDS ومرضى زراعة الاعضاء ومرضى التليف الكيسي Cystic fibrosis , وحالات حقن العقاقير عبر الاوردة . اذ تشكل هذه البكتريا حوالي٥٠٪ من نسبة الوفيات في هذه الحالات المرضية (van Elder , 1999) (Anjum و Mir , ٢٠١٠).

اعتمادا على احصائيات مركز NNIS للسيطرة المرضية والوقائية لبيانات جمعت ما بين الاعوام 1992–1999 فإنَ بكتريا *P.aeruginosa* تأتي في الرتبة الثانية من المسببات الشائعة لذات الرئة ، والمرتبة الرابعة لاخماج المجاري البولية ، وفي المرتبة السادسة من المسببات لإصابة مجرى الدم في وحدات العناية المركزة (Christopher واخرون , 2005) .

فضلا عن ذلك تعد هذه البكتريا ثاني اهم المسببات للأمراض المكتسبة من المستشفى بعد بكتريا *Escherichia coli* اذ وجد ان معدل الاستيطان لهذه البكتريا في الانسان السليم اقل من 6% بينما معدل الاستيطان في المرضى داخل المستشفى يكون 38% اما الذين لديهم ضعف في جهاز المناعي يكون 78% (Songer , ٢٠٠٤) , (Lanini واخرون , ٢٠١١).

للبكتريا قابلية فائقة على التكيف في البيئات غير المناسبة لنمو الاحياء المجهرية كالتي تكون معدومة المغذيات تقريبا ، اذ تتمكن من النمو في البيئات القليلة المغذيات مثل ماء الحنفيات , الماء المقطر اذ يدل على ان المتطلبات الغذائية لهذه البكتريا محدودة جدا (Lomholt و اخرون , 2001) .

(٢ – ٤) إمراضيه بكتريا الزوائف الزنجارية

Pathogenicity of pserudomonas aeruginosa

من اكثر الاصابات الشائعة التي تسببها بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* هي اولا تجرثم الدم Bacteremia في المرضى ذوي الحروق الخطيرة ، واصابات الرئة المزمنة في مرضى التليف الكيسي Cystic fibrosis والتهاب القرنية الحاد في الاشخاص المستخدمين للعدسات اللاصقة (Lyzak و اخرون, 2000) .

اذ تستغل البكتريا الأنسجة المحطمة من الجروح والحروق وعملية القسطرة في مجرى البول وفي الاوردة وجروح العمليات للدخول الى الجسم المضيف ، وتنتشر البكتريا في المستشفيات عن طريق التلوث البرازي Fecal ، والسوائل الجسمية كالإدرار واللعاب، اذ تلوث المغاسل واجهزة ترطيب الجو واجهزة التنفس الاصطناعي , ومحاليل التعقيم , والتطهير عن طريق التماس المباشر بين المرضى وأيدي الممرضات والعاملين في المستشفى لذلك تعد البكتريا المسبب الرابع للإصابات المكتسبة من المستشفيات ، وتكون مسؤولة عن الاصابات خطيرة مثل ذات الرئة Pneumonia والتهاب شفاف القلب endocarcrdititis والتهاب السحايا Meningitis والتهاب الامعاء enter tis وتجرثم الدم bacteremia (Dart و seal , 2001) .

يمكن ان تصل نسبة الوفيات المتسببة عن البكتريا 50% بسبب عوامل عديدة منها:-

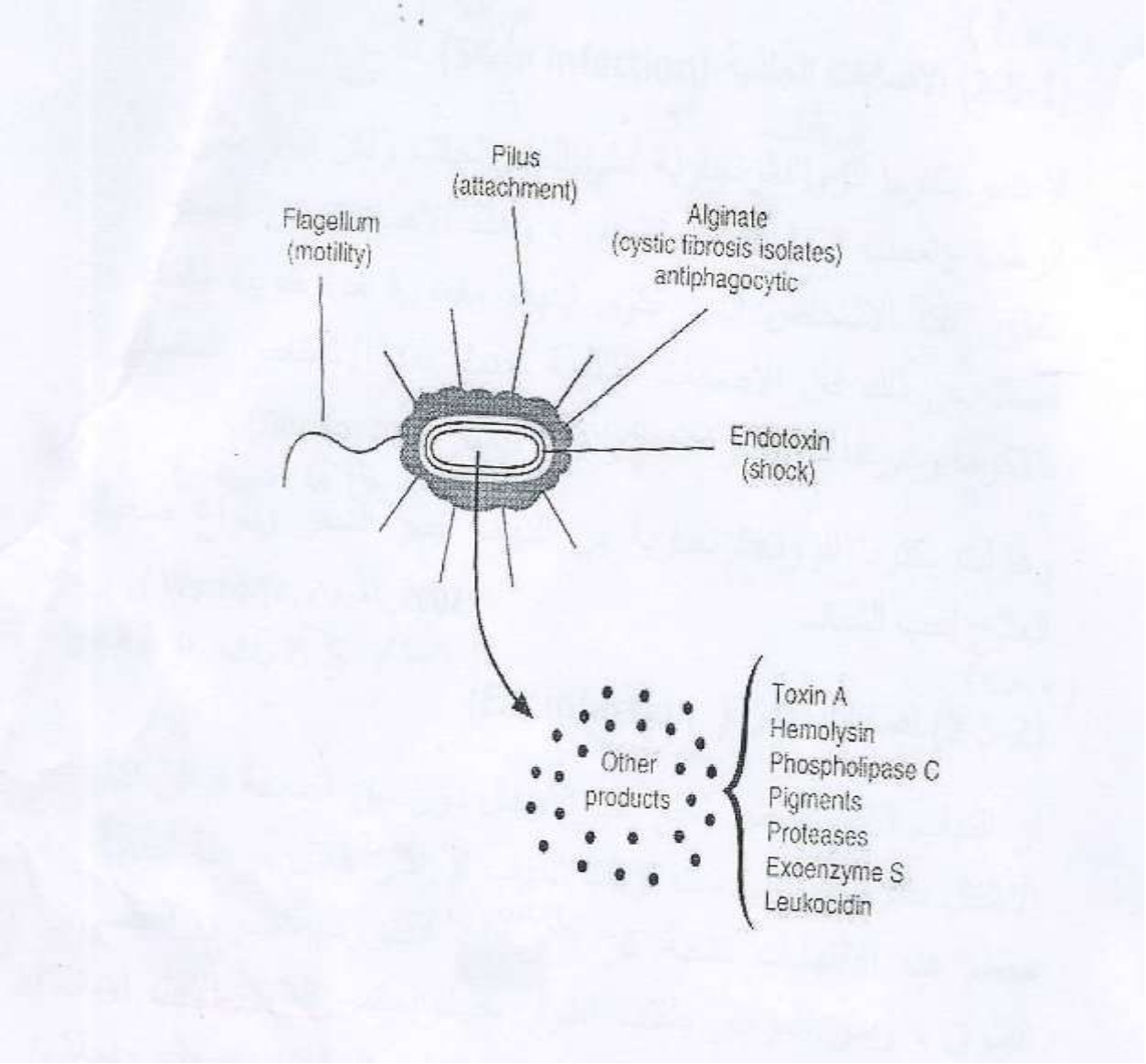
ضعف دفاعات الجسم ، ومقاومة البكتريا للمضادات الحياتية فضلا عن انتاج البكتريا الانزيمات والذيفانات الخارجية Exotoxins (Ellen واخرون , 2003) (Smith واخرون , 2005).

يشير الجدول ٢-١ الى اهم الحالات المرضية التي تسببها بكتريا *P. aeruginosa* , كما ويبين الشكل ٢-١ تركيب تلك البكتريا والية امراضياتها.

جدول(٢-١) بعض اهم الحالات المرضية التي تسببها بكتريا *P. aeruginosa* اعتمادا على حالة المريض المصاب

مرض السكري	التهاب الاذن الخارجية الخبيث (Malignant otitis externa)
ادمان العقاقير عبر الاوردة	التهاب شفاف القلب (Endocarditis) والتهاب النقي والعظم (osteomyelitis)
سرطان الدم (Leukemia)	انتان الدم (Septicemia)
مرضى السرطان	ذات الرئة (Pneumonia) انتان الدم (Septicemia)
الحروق والجروح	التهاب النسيج الخلوي(Cellulitis) انتان الدم (Septicemia)
التليف الكيسي الرئوي	ذات الرئة (Pneumonia)
عمليات الجهاز العصبي المركزي	التهاب السحايا الدماغية (Meningitis)
احداث فتحه دائمه للتنفس في القصبة الهوائية	ذات الرئة (Pneumonia)
اصابة الاطفال	الاسهال (Diarrhea)
تقرح القرنية	التهاب العين الشامل (panophthalmitis)
القسطرة الوعائية	التهاب الوريد الخثري القيحي (Suppurative thrombophlebitis)
القسطرة في مجرى البول	التهاب المجاري البولية (UTI)

. (2004 , Qarah) *



الشكل (٢-١) : تركيب الـ . . *Pseudomonas aeruginosa* والالية الامراضية لها (العزاوي , ٢٠٠٦) .

(٢-٥)الامراض المتسببة عن بكتريا الزوائف الزنجارية

Infections Caused by Pseudomonas aeruginosa:

(٢-٥-١) الاصابات الجلدية Skin infection

لا تنمو بكتريا الزوائف الزنجارية على الجلد الجاف ولكن تنمو على الجلد الرطب وتسبب قيحاً اخضراً مزرقاً , وهذه الاصابات من الممكن ان تتطور عند الاشخاص الذين تكون ايديهم مغمورة مدة طويلة بالماء , فضلا عن ذلك فإنَ الاصابات الثانوية تحدث عند الاشخاص المصابين بالأكزيما وغيرها من الامراض الجلدية (Fiorillo و Zucker , 2001).

عزلت بكتريا الزوائف الزنجارية من التهاب جذر الشعر وانواع صعبة العلاج لحب الشباب (Wyckoff واخرون , 2002).

(٢-٥-٢) اصابات الاذن Ear infection

ان التهاب الاذن مرض شائع عند الاطفال دون سن السابعة اذ ان اكثر الاطفال يتعرضون الى ست نوبات التهاب او اكثر خلال مرحلة الطفولة معظم هذه الالتهابات ناتجة عن الاخماجات الفايروسية للمجرى التنفسي العلوي , ويمر المرض بثلاثة اطوار حيث يستمر الطور الاول لمدة 1-2 يوم ويتميز بحرارة عالية واحتقان الاذن والم شديد وضعف حاسة السمع بعدها يحصل نضح وافرازات بيضاء او صفراء اللون مع انخفاض درجات الحرارة ويستمر الطور الثاني 3-8 يوم ويمكن تقليل الاعراض باستخدام العلاج الموضعي اما اذا لم يعالج فيدخل المريض الطور الثالث الذي يستمر بين 2-4 اسابيع ويعرف بالتهاب الاذن الوسطى الحاد Acute otitis media (Marchetti واخرون , 2005).

فضلا عن ذلك بأنها بكتريا تسبب حالات اصابات الاذن الخارجية مثل التهاب اذن السباحين , وترتبط بحدوث اضرار والتهابات في حالات وجود رطوبة بسيطة فضلا عن ذلك

بأنها بكتريا مسببة لالتهاب الاذن الوسطى المزمن Chronic otitis media (Wairs و Ibe , ٢٠٠٦) , (Olubango واخرون , 2008).

(٢-٥-٣) اصابات الجهاز البولي Urinary system infections

الاصابة عادةً تحدث من تلوث العمليات الجراحية وتعد بكتريا *P.aeruginosa* واحدة من اهم الممرضات التي تلتصق بالخلايا الظهارية للجهاز البولي Uroepithelium اذ ان البكتريا يمكن ان تنتشر من اصابات الجهاز البولي وتغزو الدم وتكون مسؤولة عن ٤٠٪ من حالات تجرثم الدم bacteremia (علي واخرون , 2010).

(٢-٥-٤) اصابات الجهاز التنفسي Respiratory system infections

تعد بكتريا *P. aeruginosa* ثاني مسبب لذات الرئة المكتسب (Torres واخرون ,٢٠١٠) , تصيب المرضى ذوي الضعف الرئوي وتتوطن بالجيوب الانفية لهؤلاء المرضى وتظهر البكتريا في الغائط نتيجة لابتلاع القشع الحاوي عليها (Lu و اخرون , 2014) , (Son واخرون , ٢٠٠٧) , (Sousa , ٢٠١٤).

(٢-٥-٥) اصابات الحروق والجروح Wounds , Burns infections

تعد بكتريا *P. aeruginosa* المسبب الرابع لإصابة جروح العمليات, اذ ان اصابة الجلد ببكتريا *P. aeruginosa* قد تكون موضعية او منتشرة اذ تُسهم اصابة الجلد بالحروق والجروح على دخول البكتريا (deMacedo و Santos , 2005) .

(٢-٥-٦) اصابات العيون *Eye infection*

تسبب البكتريا *Pseudomonas aeruginosa* اصابات بليغة مؤذية ي عين الانسان اذ تعد واحدة من المسببات الشائعة لالتهاب القرنية وخراج الغشاء الخارجي عند الكبار , وتسبب الرمد عند الاطفال , وبكتريا *P. aeruginosa* من الممكن ان تستعمر الطبقة

الطلائية للعين بوساطة الارتباط الهدبي للبكتريا بمستقبلات خلايا الطبقة الطلائية (Feltzer واخرون,2003).

تعد التهاب القرنية واحدة من الآفات الخطرة في علم الامراض , بسبب تكرار حدوثها والمضاعفات الناتجة منها , وتشير احدى الدراسات الى ان هناك عيناً واحدة تخسر يوميا في العالم ويرجع سبب ذلك الى استخدام العدسات اللاصقة اذ تعد البكتريا *P. aeruginosa* احد المسببات لالتهاب القرنية الميكروبي وبالتالي فقدان البصر اذا لم يعالج (Matsumoto , 2004).

تعد البكتريا *Staphylococcus epidermidis* من ضمن الفلورا الطبيعية المعزولة من عيون الاشخاص الاصحاء , بينما تعد بكتريا *S. aureus* و *Pseudomonas aeruginosa* و *Streptococcus Pneumonia* من الممرضات التي تمتلك عوامل ضراوة وتسبب اصابات خطيرة في العين (Dutta واخرون ,٢٠١٢) , (sasaki واخرون , 2005) .

(٢-٦)عوامل الضراوة لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa*

(٢-٦-١) عوامل ضراوة مرتبطة بالخلية Virulence factors in cell

تكون البكتريا متعددة عوامل الضراوة منها المفرزة ومنها المقترنة بالخلية (Prithiviraj واخرون , 2005) . يسهم عديد السكريد الشحمي LipoPolySaccharide (LPS) في امراضية البكتريا اذ يؤدي وجوده بوصفهِ احد منتجات البكتريا الى زيادة الاستجابة

الالتهابية للمضيف في القرنية (Kbatri واخرون , 2002) . من العوامل الاخرى المقترنة بالخلية البكترية هي الاسواط Flagella اذا تمتلك هذه البكتريا ثلاثة انواع من الاسواط هي B و A2 و A1 وقد وجد ان الاختلاف في التركيب الكيميائي لهذه الاسواط لا يؤثر في ضراوة البكتريا (Arora واخرون , ٢٠٠٥) , (Verma واخرون , 2005) .

تشير الدراسات الى ان الاسواط تعد من وسائل البكتريا التي تساعدها على الالتصاق إذ تتمكن من الارتباط الى مستقبلات GSL Glycosphingolipids بطريقة مشابهة لارتباط الاهداب (Lycza واخرون , 2000) .

يعد الـAlginate عاملا اخر مقترناً , وهو عبارة عن الـMannuronic والـ Glucouronic Acid ويكون بشكل قالب مخاطي للغشاء الحيوي Biofilm الذي تنطمر فيه الخلايا البكترية وهكذا فان يقوم بحماية البكتريا من دفاعات الجسم كالخلايا البلعمية Phagocytes والخلايا اللمفاوية lymphocytes , ومن الحركة الهدبية للقناة التنفسية ومن الاضداد والمتمم , (Head و Yu , 2004) .

اما الغشاء الحيوي فهو عبارة عن طبقة نامية لكائنات مجهرية على السطوح الملساء وملتصقة بها عن طريق افرازها لعديد السكريد والبروتينات السكرية(Laverty واخرون , 2014).

فضلا عن ذلك فان للبكتريا القابلية على انتاج عوامل التصاق اخرى مقترنة بالسطح لتساعد على الالتصاق بالخلايا الظهارية ومن ثم تسهم في ضراوة البكتريا , ومن هذه العوامل الاهداب Pilli والتي تكون مسؤولة عن ٩٠٪ من قابلية الالتصاق للبكتريا (Hahn , 1997).

(٢-٦-٢) عوامل ضراوة خارج الخلية *Extracellular Virulence factors*

تنتج البكتريا السم الخلوي Cytotoxin وهو عبارة عن بروتين مسبب للثقوب ويسمى ايضا Leukocidin لتأثيره في الخلايا العدلة , ويكون ساما للخلايا حقيقية النواه وله أثر في عملية الاجتياح (Gieser و اخرون, 2001) .

كما يعد انتاج الـ Siderphore (مركبات ترتبط بالحديد) من احدى الاليات لحصول البكتريا على الحديد ويطلق عليها بمصطلح Pyoverdine او ال Pyocheline وذلك من حيث اختلافهما في التركيب الكيميائي (kim وآخرون , 2003) , (Mohamammed واخرون , ٢٠١٤) . يعد الـ Pyoverdine النوع الرئيس في حين ان Pyocheline النوع الاقل انتشارا بالبيئة (Huston واخرون , 2004) .من عوامل الضراوة الاخرى الخارجية لبكتريا *P. aeruginosa* هو الذيفان الخارجي Exotoxine A , تم التحري عن فاعليته السامة لخلايا القرنية عندما يضاف خارجيا الى العين فضلا عن ذلك يعدَ احد عوامل الضراوة لقرنية العين (Pillar و Hobden , 2002) .

توجد انواع اخرى من الذيفانات الخارجية وهي Exotoxine V , وهي ايضا سامة للخلايا (Gieser واخرون ,2001) , كذلك exo S و exo U يتم انتاجهُ من قبل بكتريا *P. aeruginosa* (Shi واخرون , ٢٠١٥) , اذ تعد هذه الذيفانات من العوامل الامراضية المهمة في الاصابات الناتجة من البكتريا (CoweLL واخرون ,2000) , هناك عوامل خارج خلوية ايضا مثل انتاج البكتريا لانزيمات Alkaline protease و Hemolysin و Urease و Elastase (Sonnleitiner واخرون ,2006).

فضلا عن ذلك يعد انتاج الصبغات pigments من قبل بكتريا *P.aeruginosa* , ومن عوامل الضراوة خارج الخلية , اهمها صبغة البايوسيانين الخضراء المزرقة Pyocyanin صبغة غير متألقة وذات اهمية تشخيصية *P.aeruginosa* لانها النوع الوحيد القادر على

انتاج هذه الصبغة , الصبغة الاخرى هي صبغة البايوفردين Pyoverdin او الفلورسين Florescein وهي صبغة متالفة , وهناك صبغات اخرى مثل الصبغة الحمراء Pyorubin التي تحفز باضافة الحامض الاميني glutamate الى الوسط الزرعي , وندرة من العزلات تفرز الصبغة البنية الغامقة Pyomelanin التي تحفز باضافة احماض امينية اروماتية للوسط الزرعي مثل Phenylalanine وtyrosine (Sewell واخرون , 2014),(Brooks و اخرون , 1998).

(٢-٧) صبغة البايوسيانين *Pyocyanin pigment*

هي صبغة خضراء مزرقة blue green pigment غير متفلورة تنتجها بعض انواع جنس *Pseudomonas* مثل *Pseudomonas aeruginosa* و *fluorescens Pseudomonas* (Mavordi واخرون , 2006) كما مبين في الشكل ٢-٣ و ٢-٤ .

وهي صبغة ذائبة في الماء والكلورفورم تمتلك فعالية ضد بكترية Antibacterial activity (Barakat واخرون ,٢٠١٥) (2002, Moss) .

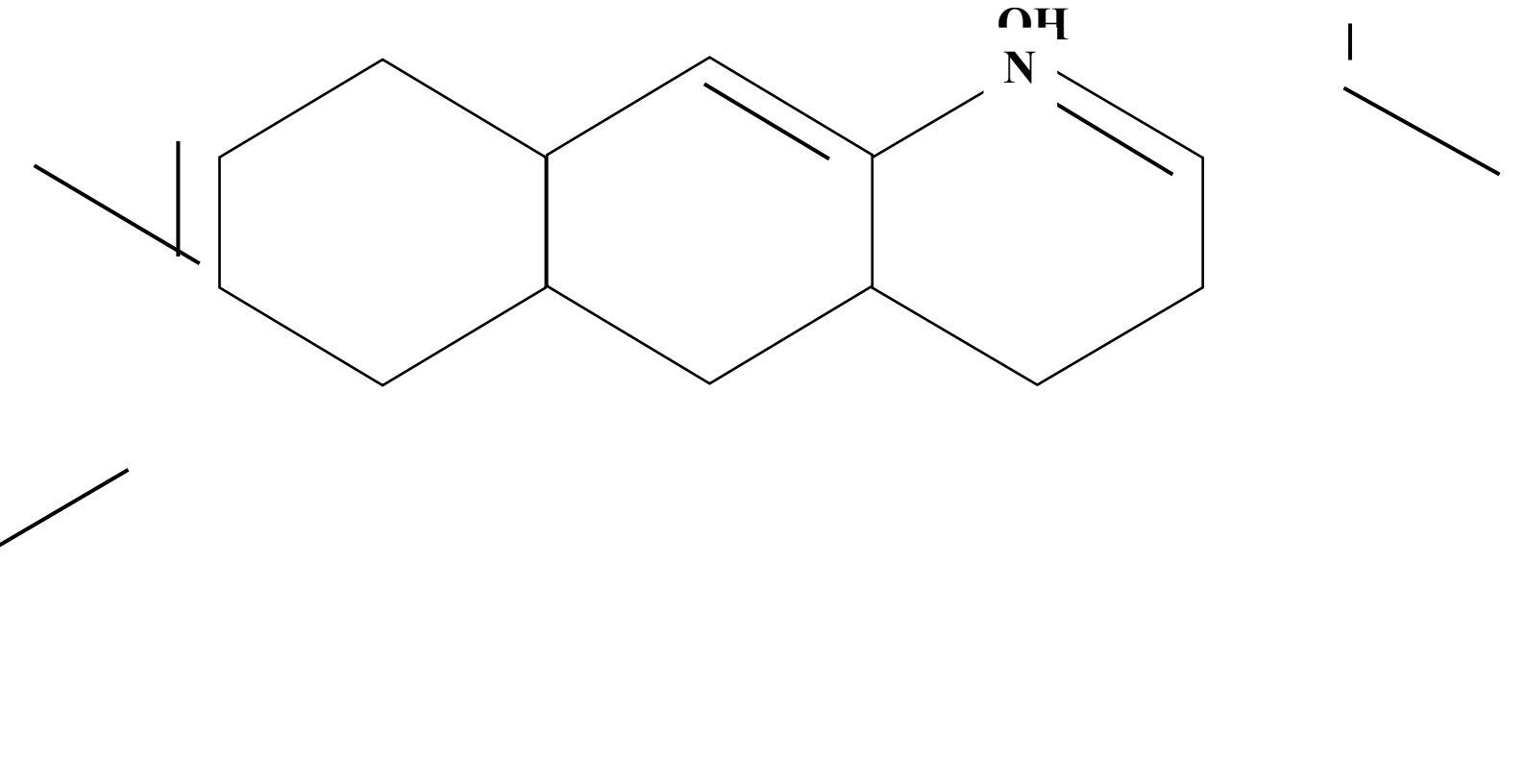
وتعد هذه الصبغة ذات اهمية تشخيصية لجنس *Pseudomonas aeruginosa* إذ تمتلك صبغة البايوسيانين Pyocyanin pigment تاثيرات دوائية متنوعة ضد بعض الانواع البكترية والخلايا الحقيقية النواة ويرجع نشاطها البيولوجي الى التشابه في التركيب الكيميائي لمركبات Flavoprotein وisoalloxazine و Flavin mono nucleotide و Flavin adenine dinucleotide (Ohfuji واخرون , 2004) , والتي تستخدم للسيطرة على الممرضات النباتية (Phytopathogens) (Sudhakar واخرون , 2013).

من التطبيقات المهمة لصبغة البايوسيانين أن لهذه الصبغة القدرة على الارتباط بمركبات عضوية فتنتج معقدات polymers وتستخدم هذه المواد المعقدة في اجهزة انبعاث



الضوء العضوي وهذه الاجهزة اصبح لها اهمية نظرا لما تحتاجه من فرق جهد واطئ وذات انتشار واسع للضوء وخفيفة الوزن (Chen و xiao – chang , 2004).

شكل (٢-٣) صبغة البايوسيانين على وسط كنغ A (Mohammed واخرون , ٢٠١٤)



Pyocyanin

شكل (٢-٤) التركيب الكيميائي لصبغة البايوسيانين (CheLuvappa, 2014).

(٢-٨) صبغة الفينازين *Phenazine pigment*

صبغة فينازينية حمراء تعدَ عاملاً مختزلاً redox agent وهي مركب مختلف الحلقات heterocyclic يحتوي على النتروجين (Aunchaleeb واخرون , 2009) , كما مبين في الشكل ٢-٥ .

أُجريت دراسات مكثفة وابحاث عديدة على هذه الصبغة اكثر من أي مادة ايضية ثانوية تنتجها انواع بكترية أُخرى لان هذه المادة تظهر مدى واسعاً من الفعالية ضد العديد من الفطريات والبكتريا , اذ يعد مضاداً واسع الطيف broad spectrum antibiotic فضلا عن دورها الرئيس في إمراضية البكتريا (Pierson و Pierson , 2010) .

وجد ان بعض التعديلات البسيطة في الهيكل الاساس لصبغة الفينازين سيعطي مجموعة كاملة من الالوان تتراوح ما بين الاحمر الغامق Aerginosin A الى الاخضر الفاتح Pyocyanin (Laursen و Nielsen , 2004) .

ان عدداً من مشتقات الفينازين تنتج من قبل بكتريا *fluorescense Pseudomonas* في حين تُنتج هذه الصبغة من قبل بعض انواع البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام والتي تمتاز بفاعليتها البايولوجية تتضمن: *Erwinia Vibri* و *Pelagoibacter* و *Burkholderia* (Movordi واخرون , 2010) .

تم اكتشاف صبغة الفينازين التي تنتجها بعض الانواع البكتريا المعزولة من الاسفنج البحري الارجواني اذ وجد ان هذه البكتريا منتجة لصبغة الفينازين (Choi واخرون , 2009).

تنتج مشتقات الفينازين بطريقتين هما التخليق الحيوي biosynthesis كإنتاج البكتريا للصبغة , والتخليق الكيميائي chemosynthesis (Denning واخرون , 2003).

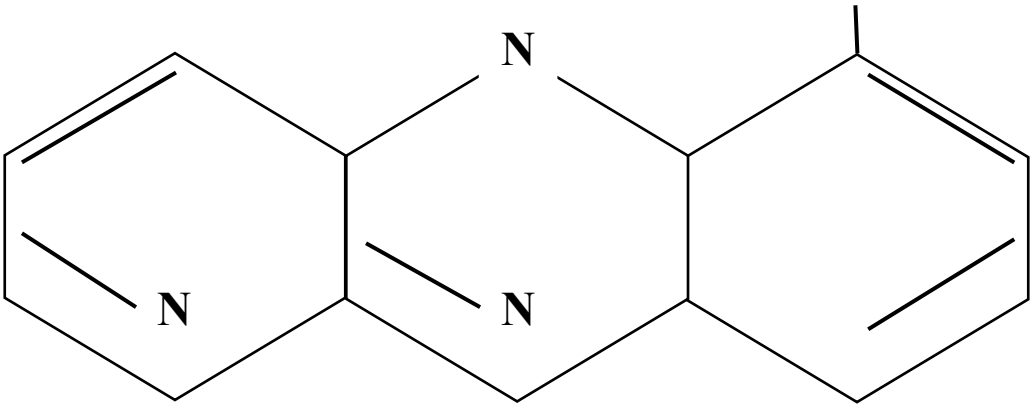
تمتلك صبغة الفينازين عدة تطبيقات بايولوجية اذ تم التحقق من فعالية الفينازين من خلال تثبيطها لنمو بعض البكتريا والفطريات (kim , 2000) , (Morales واخرون ,٢٠١٠) , في حين أُستخدم الفينازين بشكل واسع في المجال الزراعي اذ تم استخدامه للقضاء على بكتريا *Erwinia amylovora* الذي يسبب مرض اللفحة النارية Fire blight disease لزهرة التفاح (Giddens واخرون , 2003) .

اما في المجال الطبي تستخدم مشتقات الفينازين مضاداً فطرياً Antifungal activity ضد العديد من الفطريات مثل فطر *Candida albicans* وفطر *Aspergillus fumigatus* (Kerr واخرون , 1999) , (Mai–Prochnow واخرون , ٢٠١٥) .

أثناء العقدين الماضيين تم اكتشاف ووصف اكثر من ٦٠٠٠ نوعا من مشتقات الفينازين المضادة للأورام والطفيليات. (Laursen و Nielsen , 2004) كما مبين في الجدول ٢–٢ , تكمن فعالية الفينازين السامة الى تراكم مستويات بروكسيد الهيدروجين H_2O_2 في خلايا الانواع البكتيرية .(Mahajan واخرون ,١٩٩٩) , كما تم تسمية الفينازين بـ tubermycin B بسبب امتلاكه فعالية ضد بكتريا *Mycobacterium tubeculosis* (Rane واخرون , 2007) .

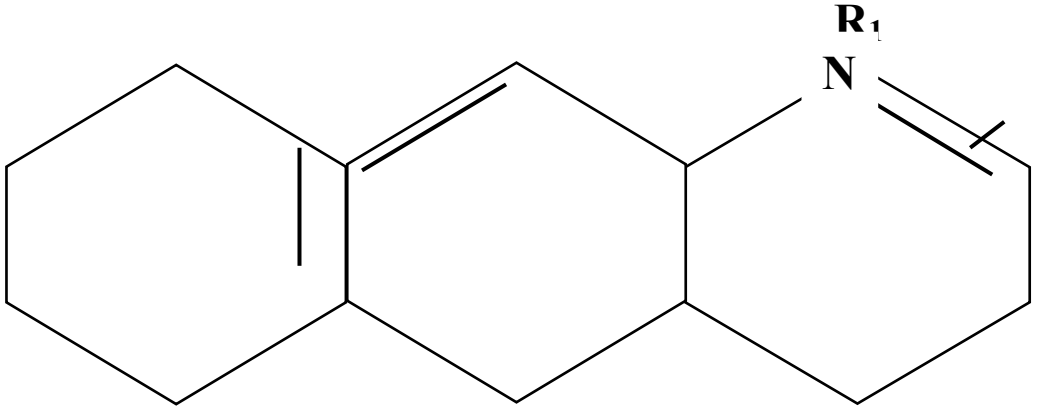
تمتلك صبغة الفينازين

COOH



الشكل (٢-٥) تركيب الكيميائي لصبغة الفينازين Phenazine (Hass و Defago , 2005).

جدول ٢-٢ خصائص بعض مركبات الفينازين التي تفرزها انواع ***P.seudomonas*** (Alexa واخرون , ٢٠٠٦).



الاســـــم	R_1	R_2	R_3	R_4
Aeruginosin A	COOH		CH_3	NH_2
Phenazine−1−carboxylicacid (PCA)	COOH			
Pyocyanin(PYO)	OH		CH_3	
2−Hydroxyphenazine−1−carboxylicacid (2−OHPCA)	COOH	OH		
Phenazine−1−carboxamide (PCN)	$CONH_2$			
1−Hyodroxyphenazine (1−OHPHZ)	OH			

(٢−٩) مضادات الحياة Antibiotics

يشير مصطلح المضادات الحيوية *Antibiotics* الى المواد العضوية الطبيعية المنتجة من قبل الاحياء المجهرية وتكون فعالة ضد احياء مجهرية اخرى (Bayth واخرون , ٢٠١٥).

تقسم المضادات الحيوية الى مضادات قاتلة للبكتريا Bactericide Antibiotic ومضادات تعمل على ايقاف تكاثر البكتريا (مثبطة) وتسمى الـ Antibiotic Bacteriostatic , ويتحدد اختيار المضاد الملائم في العلاج بعوامل عديدة يأتي في مقدمتها معرفة نوع الجرثومية المسبب للخمج ومكان الاصابة وعمر المريض ونوع ومكان الاصابة

وعمر المريض ونوع الخمج (حاد او مزمن) اضافة الى موصفات اخرى تتعلق بالمضاد الحيوي منها كفاءته وعدم سميته للمضيف , وقلة ارتباطه مع بروتينات البلازما , وعدم تداخله مع الادوية الاخرى (القيسي , 2002).

(٢-١٠) مقاومة البكتريا *P. aeruginosa* لمضادات الحياة :

تعد بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* انها ذات مقاومة عالية لمضادات الحياة وهذا يفسر خطورة هذه البكتريا واهمية البحث عن علاج لها (kiffer واخرون , 2005).

تعود خاصية مقاومة بكتريا لعدد من العوامل اهمها :

١. امتلاك البكتريا نظام يسمى Multidrug – effluxsystem , ترتبط البروتينات Mex A–Mex B – OPrM مع بعضها اذ يمثل البروتين Mex B مضخة تقع في الغشاء السايتوبلازمي , في حين ان بروتين OPrM يمثل البروتين المكون للمسامات Pore forming protein يوفر منفذا خلال الغشاء الخارجي , بروتين Mex A يعمل كرابط يربط كل من البروتين السابقين , اذ يعمل هذا النظام بوصفه وحدة متكاملة لضخ ما يدخل للبكتريا الى الخارج (sobel واخرون , 2005) , (Morita واخرون , ٢٠٠٦).
٢. تمتلك سلالات بكتريا *P. aeruginosa* قابلية واسعة في انتاج الانزيمات المحللة لمضادات الحياة ومن هذه الانزيمات هي Oxacillinase , B–Lactamase و Cephalosporinase و Amino glycosidase (Lazzaro واخرون , 2001).
٣. تميل بكتريا الزوائف الزنجارية الى تكوين مستعمرات على الاسطح مشكلة الاغشية الحيوية biofilm مما تجعل البكتريا غير متأثرة بالتراكيز العالية للمضادات الحياتية (Flamm واخرون , 2004) (Laverty واخرون , ٢٠١٤).

٤. وجود البكتريا الطبيعي في التربة يجعلها تتعايش مع العصيات والاكتينومايسيت والاعفان وبذلك فقد طورت اساليب لمقاومة انواع من المضادات الموجودة بشكل طبيعي في البيئة التي تحيط بها (Liver more, 2002).

٥. يحد الغلاف الخارجي outer membrane للبكتريا من مرور مضادات الحياتية بسبب التغير الكبير في الشحنات المحيطة بالغلاف , فضلا عن وجود بروتينات تسمى Porin Protein التي تؤدي دورا في حركة الجزيئات الى داخل الخلية البكترية وخارجها (Richard واخرون , ١٩٩٩).

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل

Materials & Methods

(٣) المواد وطرائق العمل Materials and Methuods

(٣-١) المواد والأجهزة المستخدمة

تم استخدام الاجهزة والادوات , الموضحة في الجدول (٣-١) .

جدول (٣-١) الاجهزة والمواد المستخدمة في الدراسة

ت	الجهاز	الشركة المصنعة	المنشأ
1	كابينة معقمة Laminar flow	Pratt	Germany
2	حاضنة Incubator	Memmert	
3	حمام مائي Water bath	Memmert	
4	ماصات زجاجية بأحجام مختلفة Micropipettes	Brand	
5	مازج Vortex	Labcco	
6	هزاره اعتيادية Shaker	Labcco	
7	مجهر ضوئي light microscope	Olympus	Japan
8	المؤصدة Auto clave	Hirayama	
9	ميزان حساس Sensitive balance	Mettle	Switzerland

10	ثلاجة Refrigerator	Quean	Egypt
11	مقياس الاس الهيدروجيني pH meter	Radio meter	Denmark
12	الحاضنة الهزازة المبردة Shaker incubator	Hiragana	Germany
13	جهاز المطياف Spectorphotometer UV / VS موديل T80	PGInstruments LTD	England
14	فرن Oven	GallenKamp	UK
15	اوراق ترشيح قطر ال0.4 ماكروميتر Filter paper 0.4	Sartorius	Germany
16	اوراق ترشيح قطر ال0.2 ماكروميتر Filter paper 0.2	Sartorius	
17	منظومة ترشيح قابلة للتعقيم Auto clave member filter	Sartorius	
18	جهاز طرد مركزي مبرد cooling centrifuge	MSE-chi spin 2	UK
19	ناشر للزرع Loop	Sartorius	Germany
20	قطن طبي Medical Cotton	Samara	Iraq
21	GC-mass نوع GC-MS-QP 2010 ITra	SHIMADZU	Japan

(٣-٢) المواد الكيميائية المستخدمة

استخدمت المواد الكيميائية المبينة في الجدول (٣-٢):

جدول (٣-٢) المواد الكيميائية المستخدمة في الدراسة : Chemical Materials

ت	المادة	الشركة المصنعة	المنشأ
١.	الحامض الاميني (الالنين) L-alanine	BDH	UK
٢.	السترمايدCetrimide	microbiology	Germany
٣.	الاغار Agar	BDH	

٤.	الكلوروفورم Chloroform	Pharmacies	England
٥.	الكليسرول Glycerol	BDH	
٦.	النشأ starch	BDH	England
٧.	اليود Iodin	BDH	
٨.	يوديد البوتاسيوم Potassium iodide	BDH	
٩.	حامض الهيدروكلوريك Hydrochloride acid	BDH	
١٠.	هيدروكسيد الصوديوم Sodium hydroxide	BDH	
١١.	ايثانول Ethanol	BDH	
١٢.	ببتون peptone	Oxoid	
١٣.	يوريا urea	Merck	Germany
١٤.	كبريتات البوتاسيوم Potassium sulfate	BDH	
١٥.	كبريتات المغنسيوم Magnesium sulfate	BDH	
١٦.	فوسفات البوتاسيوم potassium phosphate	BDH	
١٧.	سترات الصوديوم sodium citrate	BDH	
١٨.	كلوريد البوتاسيوم potassium chloride	BDH	
١٩.	احمر الفينول phenol red	BDH	
٢٠.	صبغة الايودين iodine stain	BDH	
٢١.	صبغة الازرق البلوري crystal violet stem	BDH	
٢٢.	صبغة السفرانيين Safranin stain	BDH	
٢٣.	فوسفات البوتاسيوم المائية $K_2Hpo_4.6H_2O$	BDH	
٢٤.	كبريتات المغنيسيوم المائية $MgSo_4.7H_2O$	BDH	
٢٥.	كلوريد الصوديوم NaCl	BDH	
٢٦.	كبريتات الحديد $FeSo_4$	BDH	
٢٧.	مطحون جل السليكا Silica gell powder	Barcelona	Spain
٢٨.	n-Hexan	BDH	

٢٩.	Ethyl acetate	BDH	

(٣-٣) الاوساط الزرعية الخاصة بالبكتريا Bacterial culture media

(A-٣-٣) الاوساط الزرعية الجاهزة :

استعملت الاوساط الزرعية جاهزة الصنع واتبعت التعليمات المذكورة على العلبة.

ت	الوسط الزرعي	الشركة المجهزة	المنشأ
١.	وسط اكار ماكونكي Macconkey agar	Himedia	India
٢.	وسط اكار الدم الاساس Blood base agar	Himedia	
٣.	وسط اكار السيدوموناس Pseudomonas isolation agar	Himedia	
٤.	وسط الاگار المغذي Nutrient agar	Oxiod	England
٥.	وسط المرق المغذي Nutrient broth	Oxiod	
٦.	وسط اكار اليوريا الاساس urea agar base	Himedia	
٧.	وسط اختبار الحساسية Muller Hinton agar	Himedia	
٨.	وسط مرق احمر المثيل – فوكاس بروسكاور Methyl red – vogas proskauer broth	Oxiod	
٩.	وسط اكار السترات Simmon's citrate agar	Oxiod	

(B-٣-٣) الاوساط الزرعية التركيبة

حضرت الاوساط الزرعية, حسب ماورد في (Barrow و Feltham , ٢٠٠٤) :

(١-B-٣-٣) وسط كنغ A وكنغ B King B Agar و King A

حضر الوسط حسب ما ورد في (العزاوي , ٢٠٠٦) وذلك باذابة المواد الاتية في لتر واحد من الماء المقطر , والمكون من:

١. King A Agar :

Peptone	20 غرام
MgcL	١,٤ غرام
K_2So_4	١٠ غرام
Agar	15 غرام
Glycerol	10 مليلتر

٢. King B Agar :

Peptone	٢٠ غرام
$K_2HPo_4.6H_2O$	١٠ غرام
$MgSo_4.7H_2O$	١,٥ غرام
Agar	١٥ غرام
Glycerol	١٠ مليلتر

ثم يُعدل الرقم الهيدروجيني الى ٧.٢ ويعقم بالمؤصدة A لمدة ١٥ دقيقة

(2-B-٣-٣) وسط اكار السترمايد Cetrimide Agar

هو وسط انتقائي لبكتريا *P. aeruginosa* ويحضر ذلك بإضافة المواد الاتية الى الماء المقطر وهي :-

Peptone	20 غرام
MgcL	١,٥ غرام
K_2So_4	١,٠ غرام
Agar	15 غرام
Glycerol	10 مليلتر
Cetimide	0.3 غرام

(٣-٣-B-٣) وسط الحد الادنى من الكلسيرول والالنين

Glycreol – alanine minimal media :

هو وسط مشجع للانتاج صبغة البايوسيانين , ويتركب هذا الوسط من المواد الاتية وحسب طريقة , حيث تذاب هذه المواد في لتر واحد من الماء المقطر (العزاوي , ٢٠٠٦).

L-alanine	6 غرام
Glycerol	10 مليلتر
$MgSo_4$	٢ غرام
K_2Hpo_4	٠.١ غرام
$FeSo_4$	٠.٠١ غرام
Agar	20 غرام

ثم يُعدل الرقم الهيدروجيني الى ٧.٢ ويعقم بالمؤصدة لمدة ١٥ دقيقة

(٣-٣-B-٤) وسط Modified pseudomonas medium (PSP)

حضر حسب ما جاء عن (Ralph , 1973) يتكون هذا الوسط من اذابة المواد الاتية :

دي الآلنين	٢ غرام
سترات الصوديوم	١٠ غرام
كبريتات البوتاسيوم	٨.٦ غرام
كلوريد البوتاسيوم	١.٤ غرام
كبريتات الصوديوم	١.٤ غرام
فوسفات البوتاسيوم	٥ غرام

أُذيبت هذه المواد في لتر من الماء المقطر وعدل الرقم الهيدروجيني الى ٧.٢ وعُقم الوسط بواسطة الترشيح .

(٣-٣-B-٥) وسط خزن البكتريا

١- الحفظ قصير الامد (Prescott و Harley , ٢٠٠٢)

خططت مستعمرة واحدة نقية من العزلة البكتيرية على اطباق ومائل وسط الاكار المغذي . حضنت بدرجة حرارة ٣٧ م˚ لمدة ٢٤ ساعة , وحفظت بدرجة حرارة ٤م˚ في الثلاجة , ويتم تجديدها باستمرار كل شهرين الى ثلاثة اشهر.

٢- الحفظ طويل الامد (Karch واخرون , ١٩٩٥)

لُقحت العزلات البكتيرية في وسط المرق المغذي , وحضنت بدرجة حرارة ٣٧ م˚ لمدة ٢٤ ساعة , وبعدها حفظت باضافة الكليسيرول بتركيز ١٥٪ الى الوسط وتحفظ بدرجة حرارة ٢٠- م˚.

(٣-٤) مضادات الحياة المستخدمة لاختبار حساسيه البكتريا:

استخدمت المضادات التالية في تلك الدراسة:

الشركة المصنعة والمنشأ	تركيز القرص Concentration	الرمز code	مضادات الحياة Antibiotics
Bioanalyses LTD (Turkey)	30 مايكروغرام	CTX	Cefotaxime
	25 مايكروغرام	AX	Amoxicillin
	100 مايكروغرام	PRL	Piperacillin
	5 مايكروغرام	CIP	Ciprofloxacin

	10 مايكروغرام	CN	Gentamycin
	5 مايكروغرام m^cg	OF	Ofloxacine

(٣-٥) العزلات البكتيرية والخمائر كعُتر قياسية :-

استخدمت العزل البكتيرية والخميرة المجهزة من مستشفى الزهراء للنسائية والاطفال في المقدادية.

ت	العزلة	المصدر
١-	*Staphylococcus aureus*	شُخصت مختبرياً
٢-	*E.coli*	شُخصت مختبرياً
٣-	*Candida albicans*	مستشفى الزهراء للنسائية والاطفال

(٣-٦) الكواشف و المحاليل :

استخدمت الكواشف الاتية كُلاً بحسب الشركة المجهزة.

ت	اسم الكاشف / المحلول	الشركة المصنعة
١	محاليل صبغة الكرام Gram Stain Solution	Syrbio(S.A.A)
٢	كاشف الاندول Kovacs Indole reagent	HI media (India)
٣	كاشف احمر المثيل methyl red	B.D.H (England)
٤	كاشف فوكس بروسكلور Voges –proskauer –vp1 –vp2	Bio – Meuriex (France)

(٣-٧) مواد متفرقة

دم بشري صنف (AB) مجهز من مصرف الدم / ديالى .

(٤) طريقة العمل

(٤-١) تحضير المحاليل والكواشف

حضرت بعض من المحاليل والكواشف حسب طريقة (Barrow و Feltham , ٢٠٠٤) , عقمت بعضها باستخدام جهاز المؤصدة Auto clave عند درجة حرارة ١٢١ م لمدة ١٥ دقيقة وبضغط (١٥ باوند / انج ^{٢}) , بينما عقمت الاخرى التي تتعرض للتلف بدرجات الحرارة العالية مثل وسط Modified pseudomonas p. medium و وسط الحد الادنى من الكليسرول و الالنين السائل , واليوريا بالترشيح باستخدام مرشحات دقيقة Millipore filter بقطر ٠.٢٢ مايكروميتر , اما الادوات الزجاجية فقد عُقمت بالفرن الحراري بدرجة ١٨٠ م^{o} لمدة ساعتين.

(٤-١-١) المحلول الفسلجي الملحي Normal Saline

حُضر المحلول الفسلجي لاستعماله في التخافيف بإذابة ٠.٨٥ غم من كلوريد الصوديوم في ٩٠ مل من الماء المقطر ثم اكمل الحجم الى ١٠٠ مل , عقم بالمؤصدة , وحفظ بدرجة حرارة ٤ م^{o} في الثلاجة لحين الاستعمال .

(٤-١-٢) محلول اليود Iodin solution

حضر المحلول وذلك بإذابة ٢.٠٣ غم من اليود و ٥.٣٢ غم من يوديد البوتاسيوم في ٩٠ مل من الماء المقطر ,بعدها اكمل الحجم الى ١٠٠ مل وحفظ في قنينة محكمة ومعقمة بدرجة ٤ م° .

(٤-١-٣) محاليل صبغة كَرام

استخدمت محاليل جاهزة الصنع وهي صبغة ال الازرق البلوري و صبغة السفرانين وصبغة الايودين, واستخدام هذه الصبغات الجاهزة لغرض اجراء الاختبارات التشخيصية لمعرفة لون الخلية وشكل المستعمرة .

(٤-١-٤) محلول احمر المثيل Methyl- red - solution

حضر بحسب ما جاء عن (Barrow و Fletham , ٢٠٠٤) بإذابة ٠.٠٤ غم من (MR) في ٤٠ مل ايثانول تركيزه ٩٥٪ , ثم اكمل الحجم الى ١٠٠ مل من الماء المقطر .

(٤-١-٥) محلول اليوريا ٢٠٪

تم اذابة ٢٠ غرام من اليوريا في قليل من الماء المقطر ثم اكمل الحجم الى ١٠٠ مل وعقم باستخدام مرشح (Millipore filter) بقياس 0.22 ملي مايكروميتر وحفظ في قناني في الثلاجة.

(٤-١-٦) محلول ثابت العكورة القياسي

حضر بحسب ماجاء في (Baron و Finegold , ١٩٩٤):

محلول -أ- أذيب ١,٧٥ غم من كلوريد الباريوم في ٩٠ مل من الماء المقطر , واكمل الحجم الى ١٠٠ مل.

محلول –ب– حضر ١٪ من حامض الكبريتيك المركز (H_2So_4) باضافة ١ مل من الحامض الى ٩٠ مل من الماء المقطر المعقم ثم اكمل الحجم الى ١٠٠ مل.

اضيف ٠,٥ مل من محلول (أ) الى ٩٩,٥ مل من محلول (ب) رُج المحلول بقوة ووضع في انابيب زجاجية محكمة الغطاء لمنع التبخر وحفظت في الظلام لحين الاستعمال , تمزج محتويات الانبوبة جيداً قبل كل استخدام.

(٤–١–٧) كاشف الاوكسديز Oxidase Reagent

حضر انياً باذابة (١غم) من رباعي المثيل بارافينلين ثنائي الامين هيدروكلوريك (Tetra methyl–p– phenylen diamindihydrochlorid) في ٩٠ مل من الماء المقطر المعقم وبعدها اكمل الحجم الى ١٠٠ مل ,استخدم هذا الكاشف للكشف عن انتاج انزيم الاوكسديز من قبل البكتريا .

(٤–١–٨) كاشف الكاتاليز Catalase Reagent

حضر هذا الكاشف من خلط ١مل من بيروكسيد الهيدروجين المركز ٣٠ % مع ٩مل من الماء المقطر للحصول على تركيز ٣٪ من بيروكسيد الهيدروجين وحفظ بالثلاجة في علبة داكنة, استعمل للكشف عن قابلبة البكتريا على انتاج انزيم الكاتاليز.

(٤–١–٩) كاشف الاندول indole Reagent

حضر بإذابة ٥غم من Para–dimethyl amino benzalaldehyde في 75 مل من الماء المقطر و ٢٥ مل من HCL بتركيز ٣٧٪ وتم اذابة الالديهايد بالماء المقطر وسخن على درجة حرارة ٥٠ – ٥٥ م° ثم برُد واضيف اليه HCL المركز.

(٤–١–١٠) محلول الماء المحمض (Acidified water)

(٤–١–١٠–A) HCL (٠.١ مولاري)

اكمل (١.٦٦) مل من محلول حامض الهيدروكلوريك المركز ب٢٠٠ مل من الماء المقطر .

(٤-١-١٠-B) HCL (٠.٥ مولاري)

اضيف (٨.٣) مل من محلول حامض الهيدروكلوريك المركز الى ٢٠٠ مل من الماء المقطر.

(٤-١-١٠-C) HCL (٠.٢ مولاري)

اضيف (٢.٦) ملم المحلول حامض الهيدروكلوريك المركز الى ١٠٠ مل من الماء المقطر .

(٤-١-11) Hydroxyethyl amino methane Tries (١ مولاري)

برقم هيدروجيني = ١١.٠

(٤-١-12) هيدروكسيد الصوديوم NaOH (٠.١ مولاري)

حضر بإذابة ٤ غم من هيدروكسيد الصوديوم بقليل من الماء المقطر , ثم يكمل الحجم الى لتر من الماء المقطر .

(٥-١) الاوساط الزرعية (Culture Media)

حضرت الاوساط الزرعية بحسب تعليمات الشركة المصنعة والمثبتة على العلب , حسب ما ورد في (Barrow و Feltham , ٢٠٠٤) و (Hendricks واخرون , ١٩٥٧) , وبعدها ضبط الاس الهيدروجيني ٧ ثم عقمت بالمؤصدة Autoclave بدرجة حرارة ١٢١ م° لمدة ١٥ دقيقة و بضغط ١٥ باوند /انج^{٢} , و من ثم حضنت الاطباق عند درجة ٣٧ م° ولمدة

٢٤ ساعة للتاكد من عدم تلوثها ,ومن ثم حفظت هذه الاطباق في الثلاجة عند درجة حرارة ٤ م˚ لحين الاستعمال .

(٥-١-١) وسط اكار الماكونكي Macconkey agar

وهو وسط اختياري تفريقي ,استخدم للتحري عن البكتريا السالبة لملون غرام للعائلة المعوية , حُضر بحسب تعليمات الشركة المنتجة ثم عقم بجهاز المؤصدة , ووزع على اطباق بتري معقمة .

(٥-١-٢) وسط اكار الدم Blood base agar

حضرت قاعدة الدم الاساس بحسب التعليمات المذكورة على العلبة وعقمت بالمؤصدة ,بعدها تركت لتبرد بدرجة حرارة ٤٥م° , ثم اضيف صنف الدم AB بنسبة ٥٪ ومزج جيدا بعدها صب الوسط في اطباق معقمة ,وترك ليتصلب بدرجة حرارة الغرفة , حفظ بدرجة ٤ م˚ لحين الاستعمال لغرض الكشف عن البكتريا المنتجة للهيمولايسين.

(٥-١-٣) وسط اكار اليوريا Urea base agar

حضر ٩٥٠ مل من الوسط حسب التعليمات الواردة على العلبة , وبعد تعقيمه بالمؤصدة و تبريده الى ٤٥ م˚ اضيف اليه ٥٠ مل ٤٠٪ من محلول اليوريا المعقمة بالترشيح باستعمال اغشية ترشيح الدقيقة Millipore filter , ثم صُب بصورة مائلة في انابيب معقمة ذات اغطية محكمة , استخدام الوسط لغرض الكشف عن قابلية الغرلات على انتاج انزيم اليوريز .

(٥-١-٤) وسط المثل الاحمر – فوكاس بروسكاور السائل MR-VP Broth

حُضر بإذابة ٠.٥غم من الببتون و٥غم من فوسفات البوتاسيوم في ١٠٠ مل من الماء المقطر , عقم بالمؤصدة و من ثم يتم توزيعه في انابيب اختبار بواقع ٥مل لكل انبوبة ,

وبعد التبريد اضيف اليه ١٠٪ من محلول سكر الكلوكوز المعقم بالترشيح بحيث اصبح التركيز النهائي للكلوكوز في الوسط ٠.٥٪ ,واستخدم في اختبار احمر المثيل – فوكاس الروسكاور .

(٥-١-٥) وسط اكار السيدوموناس Pseudomonas Isolation agar

حُضر بإذابة ٤٥.٣ غم في ١٠٠٠ مل من الماء المقطر الحاوي على ٢٠ مل كليسرول , وعقم بالمؤصدة واستخدم هذا الوسط في تنمية عزلات *Pseudomonas* لأنه وسط انتقائياً selective media .

(٥-١-٦) وسط السترات Cimmon citrate agar

استخدم الوسط للكشف عن قابلية البكتريا على استهلاك السترات بوصفه مصدراً كاربونياً وحيد إذ حُضر هذا الوسط بحسب التعليمات المذكورة على العلبة للشركة المجهزة, ثم عقم وصب في انابيب معقمة بشكل مائل (Collee, واخرون , ١٩٩٦) .

(٥-١-٧) وسط كنغ اي King – A – Agar

حُضر هذه الوسط حسب الفقرة (٣-٣-B-١) يستخدم هذا الوسط للتحري عن قابلية البكتريا لإنتاج صبغة *Pyocyainin* .

(٥-١-٨) وسط كنغ بي King – B – Agar

حُضر بحسب الفقرة المذكورة سابقا (٣-٣-B-١) , يستخدم هذا الوسط للتحري عن قابلية البكتريا لإنتاج صبغة الفلورسين .

(٥-١-٩) وسط الحد الادنى من الكليسرول والالنين

Glycerol – alanine minimal agar

media

حُضر بحسب الفقرة المذكورة سابقا (٣-٣-B-٣)

(٥-١-١٠) وسط اكار السترمايد cetrimide agar

حضر بحسب الفقرة المذكورة (٣-٣-B-2)

(٥-١-١١) وسط Modified pseudomonas p. medium

حضر بحسب الفقرة (٣-٣-B-٤).

(٥-١-١٢) وسط خزن العزلات البكترية

حضر بحسب الفقرة المذكورة سابقا (٣-٣-B-٥)

(٥-١-١٣) وسط اختبار الحساسية لمضادات الحياة Muller Hinton agar

حُضر بحسب ما ورد في (Barrow و Feltham , ٢٠٠٤) , استخدم في اختبار حساسية البكتريا لمضادات الحياة , حضر حسب تعليمات الشركة المنتجة , عقم بالمؤصدة وصُب في أطباق بتري وحفظ بدرجة ٤ م˚ في الثلاجة لحين الاستعمال .

(٥-١-١٤) الوسط المغذي السائل nutrient broth

استخدم في تنشيط البكتريا وتحضير التخفيف للبكتريا , وحضر حسب تعليمات الشركة المنتجة وعقم بالمؤصدة .

(٥-١-١٥) وسط الاكار المغذي nutrient agar

استخدم هذا الوسط لحفظ العزلات لفترة قصيرة اذ حضر هذا الوسط حسب التعليمات المذكورة على العلبة وصب في انابيب بلاستكية معقمة بشكل مائل الى يتصلب وحفظ بدرجة حرارة ٤ م˚ في الثلاجة لحين الاستعمال .

(٥-١-١٦) وسط ماء الببتون لاختبار الاندول

يحضر في اذابة ٢٠ غرام من الببتون و ٥ غرام من NaCl في قليل من الماء المقطر وعدل الرقم الهيدروجيني الى ٧.٤ قبل التعقيم .

(٥-١-١٧) وسط اختبار حركة البكتريا

حُضر بإضافة ٠.٢- ٠.٥ % من الاكار – اكار الى الوسط المغذي السائل ٥-١-١٤ عقم بالمؤصدة , ووزع على انابيب اختبار معقمة , ثم لقح بالطعنة Stapping

(٦-١) جمع العينات Collection of samples

جمعت ١٣٠ عينة من مصادر مختلفة , شملت ١٠٠ عينة من مصادر سريرية مختلفة من المراجعين والمرضى الراقدين في المستشفى العام ومستشفى الزهراء للنسائية والاطفال قضاء المقدادية , ومستشفى بعقوبة التعليمي للفترة الواقعة من ٢٠١٤/٩/١ ولغاية ٢٠١٥/٤/١ , جُمعت ٥٤ عينة من عينات الادرار و ٣٨ عينة من مسحات الاذن و ٥ عينات من مسحات الجروح و ٣ عينات من مسحات الحروق , اما المصادر البيئية فقد اشتملت على ١٠ عينات من مياه الاسالة قبل المعالجة (لناحية ابو صيدا) , و ١٥ عينة من التربة (المقدادية) و ٥ عينات من مخلفات المعامل (بعقوبة / مخلفات مشأة القادسية) , أُستعمل سواب معقم لجمع العينات من الاذن و قناني بلاستيكية لجمع عينات الادرار , اذ

سجلت المعلومات المختلفة بالمريض من المصدر و العمر , الجنس وامراض اخرى في استمارة خاصة (ملحق ١).

(٦-١-١) زرع العينات Samples culture

زرعت العينات السريرية لعينات الادرار , مسحات الاذن , مسحات الحروق , مسحات الجروح , مباشرة على وسط اكَار الدم و اكَار الماكونكي , وكذلك زرعت عينات المصادر البيئية على الاوساط اعلاه بعد نقلها الى المختبر بحافظة على درجة حرارة -٤ م˚ , بعد اجراء طريقة التخافيف عليها عينات التربة و عينات المياه و عينات مياه المخلفات , ومن ثم تم تنقية المستعمرات لجميع العينات (السريرية و البيئية) بطريقة التخطيط على وسط pseudomonas agar , ثم زرعت على وسط اكار السترمايد , و وسط كنع A و كنع B , لاختبار قابلية العزلات على انتاج الصبغات وثم زرعت على وسط الحد الادنى من الكليسرول والالنين , وحضنت كافة الاطباق هوائيا بدرجة ٣٧ م^{o} ولمدة ٢٤ ساعة , ثم اجراء الفحوصات التشخيصية المورفولوجية و الكيموحيوية للعزلات تحت الدراسة .

(٦-١-٢) حفظ و ادامة العزلات البكتيرية

حفظ جميع العزلات على اوساط زرعية مائلة slant من الاكار المغذي في درجة ٤ م^{o} , واستمرت عملية الادامة بشكل دوري شهريا من خلال زراعتها, وذلك بنقل مستعمرة واحدة الى وسط الاكار المغذي لضمان بقائها نشطة طيلة فترة الدراسة , اما لحفظ العزلات مدة طويلة يحضر وسط المرق المغذي Nutrient broth مضافا اليه ١٥٪ كليسرول ويعقم , ويلقح بأخذ كمية من المزروع البكتيري على وسط صلب , ويحفظ بدرجة حرارة - ٢٠ م˚علماً ان مرحلة الحفظ تمت بعد تشخيص العزلات البكتيرية قيد الدراسة (Barrow و Feltham , ٢٠٠٤).

(٧-١) تشخيص العزلات البكتيرية

(٧-١-١) الفحوصات المظهرية

شُخصت العزلات البكترية اعتمادا على ما جاء في (Barrow و Feltham , ٢٠٠٤) , اذ شخصت العزلات مبدئيا اعتمادا على الصفات المظهرية تضمنت شكل المستعمرات , ولونها , وقوامها , ورائحتها ,حجمها على وسط اكار الماكونكي واكار الدم , و اخضعت العزلات البكتيرية الى الفحص المجهري باستخدام صبغة كرام للتعرف على ترتيب البكتريا و شكلها و تفاعلها مع ملون كرام الخاصة ببكتريا *P. aeruginosa* .

(٧-١-٢) الفحوصات الكيموحيوية Biochemical tests

(٧-١-٢-A) اختبار انزيم الكاتاليز Catalase test

تم نقل جزء من المزروع البكتري باستخدام (Loop) الى شريحة زجاجية نظيفة و اضيف اليها بضع قطرات من كاشف بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 ٣٪ باستخدام ماصة باستور , يعد ظهور الفقاعات غاز الاوكسجين دليل على ايجابية الفحص , ويستخدم هذا الاختبار للكشف عن قدرة البكتريا على انتاج انزيم الكاتاليز الذي يحلل بيروكسيد الهيدروجين الى ماء و يتحرر غاز الاوكسجين بشكل فقاعات.

(٧-١-٢-B) اختبار انزيم الاوكسديز Oxidase test

بواسطة اعواد خشبية معقمة نقلت مستعمرة من العزلة قيد الدراسة الى ورقة ترشيح مشبعة بقطرات من كاشف الاوكسديز تعد النتيجة موجبة عند ظهور اللون البنفسجي خلال ١٠ ثوان من خلال ملامسة الخلايا البكتيرية لهذا الكاشف على الورقة .

(٧-١-٢-C) اختبار الاندول Indole test

يستخدم هذا الاختبار للكشف عن وجود الاندول والذي يعد امر النواتج الايضية للحامض الاميني التربتوفان لامتلاك البكتريا انزيم التربتوفانيز Tryptophanase اذ لقح وسط ماء البتون السائل بالمزروع البكتيري قيد الدراسة وحضن الوسط بدرجة ٣٧ م^{o} لمدة ٢٤ ساعة .

(٧-١-٢-D) اختبار احمر المثيل Methyl red test

يُلقح وسط مرق (MR/VP) بمشروع الغرلة قيد الدراسة , وينقل ١ مل من العالق الى انبوبة اختبار نظيفة ويضاف لها ٠.٦ مل من محلول الفانفثول كاشف VP_1 متبوعا باضافة ٠.٢ مل من محلول هيدروكسيد البوتاسيوم ٤٠٪ كاشف VP_2 مع رج الانبوبة جيدا تعد النتيجة موجبة عند ظهور اللون الاحمر بعد ١٥ دقيقة .

(٧-١-٢-E) اختبار استهلاك السترات citrate utilization test

بعد زرع العزلات البكتيرية قيد الدراسة على وسط المائل من السايمون ستريت , حضنت العينات بدرجة ٣٧ م^{o} ولمدة ٢٤ ساعة , تعد النتيجة موجبة عند تغير اللون من الاخضر الى الازرق لاستهلاك السترات.

(٧-١-2-F) اختبار اليوريز Urease test

لقح وسط اليوريا (٥-١-٣) بالتخطيط وحضن بدرجة حرارة ٣٧ م^{o} ولمدة ٢٤ ساعة , تعد النتيجة موجبة عند تغير لون الوسط الوردي .

(٧-١-2-G) التحري عن قابلية البكتريا على الحركة Motility test

تعتمد البكتريا على وسط شبه الصلب المغذي المتكون من اضافة ٠,٢٪-٠,٥٪ من الاكار- اكار الى الوسط المغذي السائل , لُقح الوسط شبه الصلب (Semi Sold media) ٥-١-١٤ بالطعن Stapping وحضن بدرجة ٣٧ م° ولمدة (٢٤) ساعة , لوحظ حدوث تضبب حول الطعنة تعد النتيجة موجبة.

(٧-١-٢-H) اختبار انتاج الهيمولايسين:

تم الكشف عن قابلية العزلات البكيرية قيد الدراسة على انتاج الهيمولايسين البكتيري بزرع هذه العزلات على وسط اكار الدم ٥-١-٢ , وحضنت الاطباق بعد التلقيح في درجة حرارة ٣٧ م° ولمدة ٢٤ ساعة , بعد ظهور مناطق التحلل متمثلة بمناطق شفافة تحيط بمستعمرات البكتريا المنتجة للهيمولايسين (Atlas , ١٩٩٥).

(٧-١-٢-I) تاثير درجة الحرارة على نمو عزلات بكتريا الزوائف الزنجارية :

تمت متابعة نمو العزلات عند درجة ٤ م° و ٤٢ م° اذ تم زراعة العزلات على وسط الاكار المغذي وعمل مكررين لكل عزلة حضن الاول بدرجة ٤ م° والاخر حضن عند درجة ٤٢ م° لمدة ٢٤ ساعة

(٧-١-٢-J) اختبار العزلات لانتاج صبغة البايوسيانين :

زرعت جميع العزلات على وسط كنغ A (٣-٣-B-١) وكنغ B (٣-٣-B-١) لغرض اختبار العزلة المنتجة للصبغة ثم حضنت الاطباق بدرجة ٣٧ م° ولمدة ٤٨ ساعة وتم اختيار العزلات المنتجة لصبغة البايوسيانين الخضراء المزرقة الظاهرة على وسط king (A) فقط , زرعت العزلات المختارة والتي اعطت اغمق لون على وسط مشجع لانتاج الصبغة وهو وسط اكار الكليسرول والالنين (٣-٣-B-٣) وحضنت بدرجة ٣٧ م° لمدة ٤٨ ساعة , تم

ملاحظة تغير لون الوسط من الابيض الى الازرق بعدما تعرض الاطباق الى مصدر ضوئي وبدرجة حرارة الغرفة ولمدة ٢٤ ساعة إذ تزيد البكتريا من انتاج صبغتها وتحول لون الوسط الى الازرق الغامق (العزاوي , ٢٠٠٦).

(٧-١-٢-K) اختبار حساسية البكتريا لمضادات الحياة تم اتباع طريقة (Bauer واخرون,١٩66)

- لقح ٥ مل من وسط المرق المغذي ب٢-٣ مستعمرات من مزارع بكتريه نقية بعمر ٢٤ ساعة.
- رجت الانابيب جيدا , وحضنت بدرجة ٣٧ م ولمدة ٢٤ ساعة .
- حضر وسط مولد هنتون الصلب ٥-١-١٤ وصب في اطباق معقمة بحيث لايقل ارتفاع الوسط عن ٤ ملميتر في طبق قطره ٩٠ ملمتر وترك يتصلب .
- نقل ٠.١ مل من العالق البكتيري ونشر على وسط المولد هنتون الصلب وتم نشره باستخدام الناشر , وترك الطبق لمدة ٥ دقائق بدرجة حرارة الغرفة لحين جفاف المزروع البكتيري .
- نقلت اقراص المضادات الحيوية المذكورة في الجدول ٣-٤ , الى سطح الوسط الزرعي بواسطة ملقط معقم بمعدل ٦ اقراص في كل طبق .
- حضنت الاطباق بدرجة ٣٧ م^{o} ولمدة ٢٤ ساعة في حاضنة , ثم قيست بعدها اقطار منطقة التثبيط حول كل قرص و عدت البكتريا حساسة او مقاومة او متوسطة حسب مقارنتها مع الجداول القياسية.

(٨-١) استخلاص صبغة البايوسيانين من الوسط السائل

extraction of pyocyanin pigment from broth medium

استخدمت ثلاث طرائق لاستخلاص خام البايوسيانين بحسب طريقة (Al-Shibib و Kanaela , ١٩٩٣) اتبعت لاستخلاص صبغة البايوسيانين مع اجراء بعض التحويرات :-

- حضرت مزرعة قديمة عمرها (٣) ايام من وسط كنغ A السائل حسب الفقرة (٣-٣-B-١) مع الاخذ بنظر الاعتبار عدم اضافة الاكار ولقح بالبكتريا قيد الدراسة وحضنت بدرجة ٣٧ م^{o} لمدة ١١ يوماً .
- حضر وسط psp حسب الفقرة المذكورة سابقا (٣-٣-B-٤)
- حضر عشرة دوارق معقمة بحجم ٢٥٠ مليلتر .
- صب الوسط اعلاه بمقدار ١٠٠ مل في كل دورق.
- اخذ (١) مل من المزرعة القديمة ويلقح كل دورق ووضعت جميعها في حاضنة هزازة على درجة حرارة ٣٧ م^{o} بسرعة (١١٠) دورة في الدقيقة لمدة ثلاثة ايام .
- وزع الوسط الناتج في انابيب معقمة وعمل طرد مركزي مبرد للعينات بعد الحضن على درجة حرارة ٢٠- م^{o} ولمدة ٣٠ دقيقة, (١٠٠٠٠) دورة لإزالة الخلايا الميتة.
- اضيف الكلورفورم الى الناتج النهائي بنسبة ١:٢ .
- رجت الانابيب بواسطة جهاز الدوار (Vortex) .

- لوحظ تجمع الصبغة الخضراء المزرقة في الاسفل والكلوروفورم الى الاعلى , بسبب اختلاف بين الكلوروفورم و الوسط الزرعي .
- تم قياس الامتصاصية وطيف الامتصاص للبايوسيانين الخام باستخدام جهاز UV-visible spectrophotometrec عند طول موجي ٣٠٠ نانومينر .

(٨-٢) حسب ما جاء عن (Sudhakar واخرون ,٢٠١٣)

استخدمت الطريقة لاستخلاص البايوسيانين الخام :-

- حضر وسط PSP بحسب الفقرة (٣-٣-١-B-٤) ويلقح بالمزروع البكتيري قيد الدراسة ويوضع في حاضنة بدرجة ٣٧ م^{o} ولمدة ٢٤ ساعة .
- لوحظ تغير لون الوسط في اليوم الثاني الى اللون الازرق المخضر .
- اضيف الكلوروفورم بنسبة ١:٢ .
- فصل الكلوروفورم من الصبغة بإضافة محلول HCL ٠.٢ مولاري .
- تغيير لون الصبغة الى الاحمر الغامق.
- اخذ هذا المحلول و يوضع في جهاز المطياف , يقرأ اعلى معدل امتصاصية للصبغة .
- اضيف محلول NaoH ٠.١ مولاري يعود الى الشكل المتعادل الازرق ويعدل pH الى ٧.
- استخدمت هذه الطريقة لفصل البايوسيانين من الوسط السائل لقياس معدل الامتصاصية للصبغة.
- ترك المحلول بدرجة حرارة ٤ م لمدة ساعتين إذ تتكون بلورات ابرية , ثم تركت لتجف بدرجة حرارة ٤٠ م^{o} وبعدها تم حساب وزن الجفنة مع البايوسيانين وثم حساب وزن

الجفنة وهو فارغ ثم حساب وزن البايوسيانين من خلال وزن الجفنة و البايوسيانين – وزن الجفنة = وزن البايوسيانين .

(٨-٣)استخلاص البايوسيانين من الوسط الصلب

Extraction of pyocyanin pigment from solid media)

اتبع في استخلاص الصبغة طريقة (1985,COX) وطريقة (العزاوي , ٢٠٠٦) مع بعض التحويرات كالاتي

- بعد زرع العينات على وسط كنغ A وكنغ B لاختيار العزلة المنتجة للصبغة تم زرعها على وسط الحد الادنى من الكليسرول والالنين بحسب الفقرة (٣-٣-١-B-٣) لزيادة انتاج صبغة البايوسيانين ثم اتبعت الخطوات التالية .
- اضيف الكلوروفورم على الوسط Glycerol alanine minimal media المنماة عليه البكتريا وبنسبة ١:٢ ويترك لمدة ساعتين , لوحظ تغير لون الكلوروفورم الى اللون الازرق نتيجة ذوبان صبغة البايوسيانين فيه .
- جُمع الكلوروفورم واستخلص البايوسيانين منه وذلك بغسله بماء حامضي HcL عيارية 0.1 مولاري المحضر حسب الفترة (٤-١-١٠-A) , يتحول البايوسيانين الى الشكل الحامضي (الاحمر).

- تم سحب طبقة HcL وعدل الرقم الهيدروجيني الى ٧ بوساطة ١ مولاري من Tris Hydroxyl amino methane pH = 11.0 يعود البايوسيانين الى الشكل المتعادل (الازرق)
- اعيد استخلاص البايوسيانين من الماء الحامضي المعدل باضافة الكلوروفورم وخلط المحلول عدة مرات لاستخلاص معظم البايوسيانين منه .
- أُهملت طبقة الماء الحامضي ويزال البايوسيانين من طبقة الكلوروفورم باضافة Hcl ٠.٠٥ مولاري لزيادة نقاوة البايوسيانين.
- في الخطوة الاخيرة عدل الرقم الهيدروجيني للماء الحامضي الى ٧ بوساطة ٠.١ مولاري NaoH .
- ترك المحلول على درجة حرارة ٤ م^{o} لمدة ساعتين إذ تتكون بلورات ابرية , جمعت باستخدام ورق ترشيح ٠.٤٥ مايكروميتر , وتركت تجفف في حاضنة على درجة حرارة ٤٠ م^{o} وبعدها تم حساب وزن البايوسيانين حسب الطريقة السابقة .
- ثم تم قياس طيف امتصاص المحلول باستخدام المطياف UV/VS-*Spectrophotometer* وذلك باضافة 0.2 HCL الى المحلول الناتج ويتم قياسه .

(٨-٤) تحليل مركبات البايوسيانين باستخدام جهاز المطياف الضوئي:

اخذ الناتج المحضر في الفقرة ٨-١ و ٨-٢ و ٨-٣ , وضع ٥ مل في خلية جهاز المطياف UV/VS Spectrophotometer ويقاس طيف الامتصاص والامتصاصية للمستخلص الخام.

(٨-٥) تحليل مكونات البايوسيانين باستخدام جهاز GC-Mass :

حسب طريقة (Sudhakar واخرون , ٢٠١٣) أُتبعت الخطوات الاتية لغرض تقدير مركبات البايوسيانين المحضرة بالخطوات ٨-١ و ٨-٢ و ٨-٣ .

أُخذ ١ مايكرو ليتر من المستخلص وحقن في جهاز GC-Mass بعد برمجة الجهاز , تدفق غاز الهيليوم ٢,٥ ملم/دقيقة والحرارة الاولية ٧٠ م° والحرارة النهائية ٢٥٠ م°

يبدأ حقن العينة عند درجة ٢٢٠ م° بعد ١٠ دقائق من استقرار الجهاز , تم تشخيص مركبات البايوسيانين اعتماداً على ما يظهره الجهاز من مركبات قريبة في مكتب الجهاز وذات وزن جزيئي معلوم لغرض مطابقتها مع الوزن الجزيئي للمركبات المراد تشخيصها.

(٨-٦) استخلاص مركبات الفينازين

حسب طريقة (Kumar واخرون , ٢٠١٤) اتبعت الخطوات الاتية :-

A- مرحلة اعداد عمود الفصل :-

عَبئ عمود الفصل بطول ٢٤ سم وقطره ١٠٥ سم بـ٢٠ غم سليكا , غسلت بمحلول الكلوروفورم اضيف ٥ مل من مستخلص البايوسيانين المحضر بحسب الفقرة ٨-١ و ٨-٢ و ٨-٣ استخدمت المذيبات العضوية n-hexan و ethlyl acetate بنسبة ٩:١ لغرض الاستخلاص.

B- جمع مركبات البايوسيانين الخام:-

تم جمع مركبات البايوسيانين في انابيب نظيفة بسعة ١٠ مل , لغرض تحليلها بجهاز GC-Mass (جهاز الكروموتوغرافي الغازي – الكتلوي).

C- تم تحليل مكونات المركبات الناتجة و الموضوعة داخل انابيب الاختبار ياخذ ١ مايكروليتر من كل انبوبة داخل خلية GC-mass لغرض تحليل مركبات الفينازين .

الفصل الرابع

النتائج والمناقشة

Result and Discussion

(٤) النتائج والمناقشة

(٤-1) اعداد العينات المرضية البيئية و السريرية :

يشير الجدول ٤-١ الى تشخيص بكتريا ***P.aeruginosae*** وانواع اخرى من البكتريا تمثلت بـ*Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus* و *Pseudomonas flourescens* بعد جمع العينات من ست محطات (سريرية و بيئية) اذ بلغ عدد العينات الكلي ١٣٠ عينه وتم عزل هذه العينات بالنسبة لمصدر العينة ادرار و حروق و جروح و التهاب اذن و تربة و ماء و مخلفات معامل.

بالنسبة لعينات الادرار التي مصدرها مستشفى الزهراء للنسائية والاطفال , تم تشخيص ١٧ عزلة اي بنسبة ٤٢.٥٪ بالنسبة لبكتريا ***P.aeruginosae*** و ٣١ عزلة بنسبة

٧٣,٨٪ لبكتريا *E.coli* و ٦ عزلات اي نسبة ١٥٪ لبكتريا ***Staphylococcus aureus*** من مجموع ٥٤ عينة .

يلاحظ من خلال النتائج ان *E.coli* كانت سائدة من بين العزلات المرضية , جاءت هذه النتائج مقاربة لما توصل اليه Onuoha و Fatokun (٢٠١٤) واللذان اشارا الى ان بكتريا *E.coli* هي السائدة في حالات التهاب المجاري البولية اذ كانت نسبة العزل ٥٠.٠٪ في حين كانت نسبة عزل ***S.aureus*** ١٧.٣ % وتليها ***P.aeruginosae*** بنسبة ٢.٧٪ .

في حين اختلفت نتائج دراستنا الحالية مع ما توصل اليه Tayebi واخرون (٢٠١٤) والذي اشار بان بكتريا (***S.aureus***) كانت هي السائدة في اصابات التهاب المجاري البولية (**UTI**) اذ كانت بنسبة (٢٤.٧٪) والمسبب الرئيسي لاصابات الجهاز البولي.

اما عينات الحروق والتي تم جمعها من مستشفى بعقوبة التعليمي اذ تم تشخيص عزلتين بنسبة ٥٪ لبكتريا ***P.aeruginosa*** اما عزلات ***S.aureus*** بلغت عزلة واحدة اي بنسبة ٢.٥٪ من مجموع ٣ عينات وجاءت هذه النتائج مقاربة مع ما توصلت اليه الثويني (٢٠٠٨) اذ اشارت ان اعلى نسبة للبكتريا المعزولة من الحروق كانت لبكتريا ***P.aeruginosa*** تليها بكتريا***S.aureus*** اي بنسبة ٥٢.٨٥٪ و ١٤.٢٨٪ على التوالي.

اتفقت هذه الدراسة مع ماتوصل اليه Mohapatra واخرون (٢٠١٤) اذ كانت بكتريا ***P.aeruginosa*** هي السائدة في مسحات الحروق وتليها بكتريا ***S.aureus*** اي بنسبة ٤٦.٥٪ و ١٥.٥٪ على التوالي.

كما جاءت هذه النتائج مقاربة ما توصل اليه Metha واخرون (٢٠٠٧) اذ اوضح ان عزلات بكتريا ***P.aeruginosae*** كانت اعلى نسبة في الحروق ثم تليها بكتريا

S.aureus اي بنسبة ٥١.٥٪ و ١١.٥٪ على التوالي , فضلا عن ذلك اتفقت دراستنا الحالية مع ما توصل اليه Hussein واخرون (٢٠١٢) اذ اشار الى سيادة بكتريا ***P.aeruginosa*** على بكتريا ***S.aureus*** اذ بلغت عدد العزلات ١٠ و ٤ على التوالي .

بعد فحص ٥ عينات من الجروح تم جمعها من مستشفى بعقوبة التعليمي , تم عزل ٣ عزلات وبنسبة ٧,٥٪ من بكتريا ***P.aeruginosa*** .

اما بكتريا ***S.aureus*** المعزولة من الجروح بلغت عزلتين ٥٪ مما يتضح سيادة بكتريا ***P.aeruginosa*** على ***S.aureus*** , وجاءت هذه النتائج مقاربة مع ما توصلت اليه الثويني (٢٠٠٨) اذ هناك سيادة واضحة لبكتريا ***P.aeruginosa*** على ***S.aureus*** اي بنسبة ٥٢.٨٥٪ و ١٤.٢٨٪ على التوالي , في حين لم تتفق هذه النتائج مع ما توصل اليه Yasidi واخرون (٢٠١٥) اذ كانت بكتريا ***S.aureus*** هي السائدة في مسحات الجروح اذ بلغت عدد عزلاتها ١٦٢ بنسبة ٥٣٪ تليها بكتريا ***P.aeruginosa*** اذ كانت عدد العزلات ٥٧ عزلة اي بنسبة ١٩٪ .

كما لم تتفق هذه النتائج مع ما توصل اليه Juayang واخرون (٢٠١٤) في دراسة اجريت على ٢٤ حالة من المرضى لثلاث سنوات ٢٠١٢ و٢٠١١ و٢٠١٠ واتضح سيادة بكتريا ***S.aureus*** في مسحات الجروح ويعزى سبب ذلك الى ان هذه البكتريا انتهازية ويمكن ان تتكاثر بسهولة وتسبب العدوى كلما تم انتقالها الى منطقة اخرى من الجسم فيما اذا توافرت البيئة المناسبة لنموها (forbes واخرون , ٢٠٠٧) (Brooks واخرون ,٢٠١٠) , (Mahon واخرون , ٢٠١١) .

اما مسحات التهاب الاذن والتي تم جمعها من مستشفى المقدادية العام اذ بلغت ٣٨ عينة , وتم عزل بكتريا ***P.aeruginosa*** بواقع ٦ عزلات اي بنسبة ١٥٪ اما بكتريا

S.aureus اذ بلغت ٣١ عزلة اي نسبة ٧٧.٥٪ , اما بكتريا ***E.coli*** اذ بلغت عزلة واحدة اي بنسبة ٢.٣٪ اي ان هناك سيادة لعزلات بكتريا ***S.aureus*** وجاءت هذه النتائج مقاربة لما توصل اليه Hateet (٢٠١٥) اذ تمكن من عزل بكتريا ***S.aureus*** ٣١ عزلة اي بنسبة ٤٠.٠٪ وكانت المسبب الرئيسي لالتهاب الاذن الوسطى .

فضلا عن ذلك جاءت هذه النتائج مقاربة مع ما توصل اليه الباحث Ijaz واخرون (٢٠١٤) اذ بين سيادة بكتريا ***S.aureus*** على بكتريا ***P.aeruginosa*** و ***E.Coli*** اذ كانت النسب ٤٣.٣٪ و ٢٥٪ و ٣.٣٪ على التوالي في حين لم تتفق هذه النتائج مع ما توصل اليه Gul واخرون (٢٠١٤) اذ كانت بكتريا ***P.aeruginosa*** هي السائدة اي بنسبة ٦٠٪ وتليها بكتريا ***S.aureus*** بنسبة ٣١٪ ثم بكتريا ***E.coli*** بنسبة ٢٪ , فضلا عن ذلك لم تتفق هذه النتائج مع MittaL واخرون (٢٠١٤) , الذي اشار بان بكتريا ***P.aeruginosa*** هي المسبب الرئيس لالتهاب الاذن الوسطى , ولم تتفق مع ما توصل اليه الباحث Kumar واخرون (٢٠١٥) اذ كانت نسبة عزل بكتريا ***P.aeruginosa*** ٤١٪ وتليها بكتريا ***S.aureus*** بنسبة ٢٦.٥٪ .

ايضا لم تتفق مع Sulbah واخرون (٢٠١٣) اذ اشار بان هناك سيادة لبكتريا الزوائف الزنجارية ***P.aeruginosa*** بنسبة ٤٥.٩٪ وتليها بكتريا ***S.aureus*** بنسبة ٢٦.٤٪ ويعزى سبب هذا التفاوت في اختلاف النسب وسيادة الانواع البكتيرية الى نوع الاصابة سواء ان كانت حادة او مزمنة , والعمر , والجنس وظروف العزل (Ijaz واخرون , ٢٠١٤) .

شملت عينات البيئة تربة و ماء ومخلفات المعامل اذ بلغت عينات التربة ١٥ عينة عزل منها بكتريا ***P.aeruginosa*** بحدود ٥ عزلات اي بنسبة ١٢,٥٪ و ***Pseudomonas fLourescens*** حوالي ١٠ عزلات كما مبين في جدول ٤-١ .

في حين تمكن الباحث ILLakiam واخرون (٢٠١٤) من عزل بكتريا ***P.aeruginosa*** من التربة بنسبة عالية ووجد ان هذه البكتريا قادرة على انتاج مواد ايضية ثانوية ذات فعالية ممتازة ضد بعض الفطريات مثل فطر ***Macrophomina Phaseoline*** .

فضلا عن ذلك تمكن الباحث Remold واخرون (٢٠١٥) من عزل بكتريا ***P.aeruginosa*** و ***P.flourescens*** اذ وجد هناك سيادة لبكتريا ***P.flourescens*** على انواع اخرى من انواع ***Pseudomonas*** اذ كانت نسبة العزل ٦٢٪ و ٢٣٪ على التوالي.

اما بالنسبة لعينات الماء فقد تم الحصول على ١٠ عينات من ماء نهر ناحية ابو صيدا وتم عزل نوعين من البكتريا هي ***P.aeruginosa*** و ***E.coli*** بلغت ٥ و٥ عزلة على التوالي بنسب متساوية ١٢.٥٪ و ١٢.٥٪ على التوالي وهذا دليل واضح على التلوث , في حين استطاع الباحث Satti و Faidah (٢٠١٥) عزل انواع عديدة من البكتريا من ضمنها ***P.aeruginosa*** و ***E.coli*** من ماء النهر بنسبة ١٠٠٪ و ٤١.٧٪ على التوالي من مياه غير صالحة للشرب , اما بالنسبة لعينات مخلفات المعامل تم تشخيص عزلتين من بكتريا ***P.aeruginosa*** مقابل ٣ عزلات من بكتريا ***E.coli*** من مجموع ٥ عينات اي بنسبة ٥٪ و ٧.١٪ على التوالي في حين تمكن الباحث KAYA واخرون (٢٠١٣) من عزل ٢٦ عزلة من بكتريا ***P.aeruginosa*** من مخلفات معامل النفط اذ كانت بنسبة ٩٩.٩٪ .

كما تمكن الباحث Moges واخرون (٢٠١٤) من عزل العديد من انواع البكتريا المرضية مصدرها مخلفات البيئة غير محيطة بالمستشفيات شمال غرب اثيوبيا كانت من ضمنها بكتريا ***E.coli*** بنسبة ١١.٥٪ وانواع اخرى تابعة لجنس ***Pseudomonas*** بنسبة ١٦.٨٪ , وانواع اخرى من مجموع ٦٠ عينة.

في حين تمكن باحث اخر Ouellet واخرون (٢٠١٤) من عزل بكتريا ***P.aeruginosa*** بنسبة ١٠٠٪ من خط مياه مخلفات وحدات معالجة الاسنان اذ تم الحصول على ٢٩عزلة مشخصة , كما تمكن الباحثان Hassan و Kerpi (٢٠١٥) من عزل بكتريا ***E.coli*** في دراسة اجريت في مناطق ملوثة بمخلفات المعامل الكيميائية في الجمهورية العربية السورية ووجد ظهورها بنسبة ١٠٠٪ .

جدول (٤-١) اعداد العينات العينات البيئية والسريرية و نسب العزلات

مصدر جمع العينة	عدد العينات	عدد عزلات (*P.aeruginosae*) ونسبتها	عدد عزلات (*E.Coli*) ونسبتها	عدد عزلات *(Staphylococcus aureus) ونسبتها*	عدد عزلات (*P.floresceas*)
ادرار	٥٤	١٧ (٤٢.٥٪)	٣١ (٧٣.٨٪)	٦ (١٥٪)	-
حروق	٣	٢(٥٪)	-	١ (٢.٥٪)	-
جروح	٥	٣ (٧.٥٪)	-	٢ (٥٪)	-
التهاب الاذن	٣٨	٦ (١٥٪)	١ (٢.٣٪)	٣١ (٧٧.٥٪)	-
تربة	١٥	٥ (١٢.٥٪)	-	-	١٠ (١٠٠٪)
ماء	١٠	٥ (١٢.٥٪)	٥ (١٢.٥٪)	-	-
مخلفات	٥	٢ (٥٪)	٣ (٧.١٪)	-	-
المجموع	١٣٠	٤٠	٤٠	٤٠	١٠

(٤-٢) دراسة خصائص بكتريا *P.aeruginosae*

بعد تشخيص ٤٠ عزلة من بكتريا ***P.aeruginosae*** ومن مصادر مختلفة تم زراعتها على اوساط تشخيصية وتفريقيه لغرض اجراء تجارب انتاج البايوسيانين والفينازين كما مبين في جدول ٤-٢-١ و ٤-٢-٢ و٤-٢-٣ و ٤-٢-٤.

(٤-٢-١) التنمية على وسط ماكونكي اكار Maconkey agar :

شُخصت العزلات البكتيرية على وسط المانكوكي وهو وسط اختياري تفريقي , يحتوي على (Crystal Violet) المثبطة للمجموعة الموجبة لملون كرام , ووسط تفريقي لانه يميز بين البكتريا المخمرة وغير المخمرة لسكر اللاكتوز , لذلك ظهرت جميع العزلات السريرية والبيئية شاحبة اللون (Pale) جدول ٤-٢-١ , لانها غير مخمرة لسكر اللاكتوز (Benachinmardi واخرون , ٢٠١٤) وجاءت هذه النتائج مقاربة لما توصلت اليه (السعيدي , ٢٠٠٥)

(٤-٢-٢) اختبار انتاج الهيمولايسين :

نمت العزلات المفردة , المنتقاة على وسط اكار الدم الذي يعد وسطاً تنشيطياً ولتحديد قابلية البكتريا على تحليل الدم ونوع التحلل , لوحظ ان العزلات تحت الدراسة محللة للدم تحللاً تاماً بيتا هيمولايسين إذ لوحظت ان جميع العزلات كانت منتجة لأنزيم hemolysin إذ يعد هذا الانزيم من بين عوامل الضراوة المهمة التي تنتجها هذه البكتريا وهو انزيم يُفرز خارجياً Extracellular (Burton وEngelkirk , ٢٠٠٠) وهو مقارب الى ما توصلت اليه (الكَرعاوي , ٢٠٠٦) و (محسن واخرون ,٢٠١٤) .

(٤-٢-٣) تأثير درجة الحرارة على نمو العزلات:

تمت متابعة نمو البكتريا عند درجة (٤م˚ و ٤٢ م˚) إذ زُرعت البكتريا على الوسط المغذي الصلب وعمل مُكررين لكل عزلة , حُضن الاول بدرجة (٤) م˚ والاخر بدرجة (٤٢) م˚ نمت جميع العزلات عند (٤٢) م˚ وهي صفة تشخيصي٢٢٣٢١ذ١ة مهمة تميز بكتريا *P.aeruginosae* عن باقي انواع جنس Pseudomonas , ولم تنمُ العزلات عند درجة (٤) م˚ وهي صفة تشخيصية مهمة لان هذه الدرجة تنمو فيها بكتريا *P.florescens* (Goud و Muralikrishnan , ٢٠٠٨) وجاءت هذه النتيجة مقاربة لما توصل اليه (محسن واخرون , ٢٠١٤) ومطابقة لما توصلت اليه (باصات , ٢٠٠٦) .

(٤-٢-٤) انتاج البايوسيانين

بعد زراعة عزلات بكتريا *P.aeruginosae* البيئية والسريرية على وسط *King A* و *King B* كما مبين في الجدول ٤-٢-٤ , اذ وجد ان جميع العزلات السريرية والبيئية المنماة على وسط *King A* و *King B* أظهرت النمو على الوسط الاول وانتاج صبغة البايوسيانين جاءت هذه النتيجة مقاربة لما توصل اليه Saha واخرون (٢٠٠٨) الذي وجد ان ٩٠ – ٩٥٪ للعزلات تنمو على وسط (King A) وتنتج صبغة البايوسيانين في حين عندما زرعت العزلات على وسط (King B) نمت جميع العزلات على هذا الوسط دون انتاج صبغة البايوسيانين (Sundstorm واخرون ,١٩٩٦) , لان وسط (King B) يحتوي على نسبة اقل من الاملاح المتكونة من املاح الفوسفات والتي تثبط من انتاج صبغة البايوسيانين في حين ان الوسط (King A) يحتوي تراكيز عالية من املاح البوتاسيوم والمغنيسيوم والتي بدورها تشجع من انتاج الصبغة (البايوسيانين) وتثبيط انتاج صبغة البايوفردين التي تنتجها بكتريا (*P.flrourescens*) (Stephen و Hawkey , ٢٠٠٦) , جاءت النتيجة مقاربة لما توصلت اليه العزاوي (٢٠٠٦) .

في حين ان عزلات مخلفات المعامل عندما زرعت على وسط (King A) اعطت النمو دون انتاج الصبغة (البايوسيانين) وفضلاً عن ذلك عندما زرعت على وسط (King B) ايضاً اعطت نمو دون انتاج الصبغة , كما اظهرت هذه العزلات مخلفات المعامل نمو على وسط الحد الادنى من الكليسرول والالنين ووسط السترمايد مع عدم انتاج الصبغة لهذه العزلات كما مبين في الجدول٤-٢-٤

اما بقية العزلات عندما زُرعت على وسط الحد الادنى من الكليسرول والالنين , انتجت الصبغة إذ تحول لون الوسط من الابيض الى اللون الازرق الغامق لغرض استخلاص الصبغة منه وجاءت هذه النتيجة مقاربة لما توصلت اليه العزاوي (٢٠٠٦) ومقاربة لما توصل اليه الباحث (Al-Imaril , ٢٠١١) .

كما اظهرت جميع العزلات النمو وانتاج الصبغة عندما زُرعت على وسط اكار السترمايد بصفته كوسط انتقائي الخاص بهذه البكتريا والمشجع ايضا لإنتاج صبغة (البايوسيانين) (Jebur واخرون , ٢٠١٥) وجاءت هذه النتائج متفقة مع توصل اليه الباحث (AL-Imari , ٢٠١١).

(٤-٣) دراسة صفات البايوسيانين :-

(٤-٣-١) الطريقة الضوئية UV/VS - pectrophotometer:-

تم تحليل مركبات البايوسيانين باستخدام المطياف الضوئي من نوع الاشعة فوق البنفسجية وضع ٥ مل من مستخلص البايوسيانين الخام المحضر في خلية الجهاز , ووضع في الخلية الاخرى مذيب الكلوروفورم , ثم قياس الامتصاصية للنموذج , تم قياس طيف الامتصاص عند مستوى الاشعة فوق البنفسجية وجد ان اقصى قمة وصلتها المركبات الداخلة في مركبات البايوسيانين عند امتصاصية تساوي ٢,٧ وطول موجي ٢٧٨ نانوميتر.

(٤-٣-٢) طريقة الكروموتوغرافي الغازي الكتلوي GC-mass:-

اجراء تحليلان كمي ونوعي لمستخلص البايوسيانين الخام ,باستخدام تقنية الفصل اللوني للغاز جنباً الى جنب مع تقنية الكشف الكتلوي GC-MSS , اذ تتميز هذه التقنية بالحساسية العالية حتى ضخ الكمية الصغيرة من تلك المركبات , بناءً على ذلك اشتملت هذه التقنية بتحديد المواد الكيمياوية ضمن تركيب البايوسيانين الخام ذات النشاط التثبيطي ضد البكتريا المرضية وبعض انواع الفطريات.

تم اذابة ١٠٠ ملي غرام من مستخلص البايوسيانين الخام المستحصل عليه في الخطوة ٨-٣ في ١ مل من الكلوروفورم , حُقن ا مايكرولتر من العينة المذابة في الكلوروفورم في جهاز GC-MSS موديل (QP 2010 ITra). أُستعمل غاز الهليوم كغاز ناقل بمعدل تدفق ٢٥ مل/دقيقة , والسليكا نوع HP_5 كطور ثابت , يُبرمج الجهاز لغرض رفع درجة حرارة الفرن تدريجياً حتى الوصول الى درجة تبخر المذيبات العضوية لتحديد المركبات تحت الدراسة.

درجة الحرارة الابتدائية ٧٠ م˚ وتدريجياً تصل الى ٢٥٠م˚ , حقنت العينة بعد ١٠ دقائق من وصول درجة حرارة الفرن الى ٢٢٠ م˚ ثم متابعة القيمة القصوى , تمثل كتلة المركب المراد دراسته ومقارنته مع الموجودة في مكتبة الطيف الكتلي للمركبات العضوية المقابلة .

(٤-٤) الاختبارات الكيموحياتية (Biochemical Tests)

أظهرت نتائج الاختبارات الكيموحياتية الموضحة في جدول (٤-٤) تطابقاً في جميع العزلات اذ كانت النتائج كالاتي :-

أظهرت جميع العزلات فحصاً موجب لاختبار انتاج الاوكسديز (Isbor و Uwabor , ٢٠١٥) , كما اظهرت بانها مستعمرات سالبة لصبغة كرام عصوية وذات فحص موجباً للكاتاليز اذ اعطت ازيزاً وفقاعات عند اضافة بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 ٣٪ الى الشريحة الزجاجية لان الانزيم (Catalase) يحطم (H_2O_2) على وفق المعادلة الاتية

$$2H_2O_2 \xrightarrow{\text{Catalase}} 2H_2O + O_2\uparrow$$

(Litovenko و Zobotioa , ١٩٨١) , (Su واخرون , ٢٠١٤).

فضلاً عن ذلك أُجري اختبار الاندول ويستخدم هذا الاختبار للتحري عن قابلية البكتريا في تحطيم الحامض الاميني التريتوفان الى الاندول والذي يتم التحري عنه عبر كاشف (كوفاك) إذ يكون الكاشف معقداً مع الاندول ويكون حلقة حمراء , وكانت جميع العزلات سالبة لهذا الفحص (Sandstorm واخرون , ١٩٩٦) (Arora , ٢٠١٥).

كما اظهرت جميع العزلات لاختبار احمر المثيل بقاء لون الوسط (اصفر) عند اضافة الكاشف , وكذلك كانت العزلات جميعها سالبة لاختبار (Voges prosKauer) عند اضافة كاشف α – naphthaL عدم تغير لون الوسط الى اللون الاحمر , وكانت العزلات ايضاً مستهلكة للسترات بوصفها المصدر الوحيد للكربون في وسط (Simon's citrate) وظهرت النتيجة موجبة لكل العزلات بتحول الوسط الى الازرق , وكانت العزلات غير محلله للنشأ عند اضافة كاشف الايودين .

فضلاً عن ذلك كانت العزلات موجبة لاختبار الـ(Urease) تغير اللون الوسط الصلب الى الارجواني وموجبة اختبار الحركة اذ لوحظ ظهور تضبب حول مكان الطعنة عند

زرعها على وسط الشبه الصلب , وجاءت جميع هذه النتائج متفقة مع ما توصل اليه (Hamzah واخرون , ٢٠٠٨) ومتفقه مع ما توصلت اليه الباحثة (الثويني , ٢٠٠٨) .

واتفقت هذه النتائج مع (Brooks , ٢٠٠٧) و (Abro , ٢٠٠٩) ومتفقة مع ما توصل اليه (Priyaja , ٢٠١٢) .

جدول (٤-٤) الاختبارات كيموحياتية (Biochemical Tests) لبكتريا ***P.aeruginosae*** :

مصدر العزلة	Gram stain	Oxidase test	Catalase test	Indol test	Metheyl-Red test	Vogas Proskauey test	Citvate utilization	Ureas test	Starch hydiolysis	Motility test
الادرار	–	+	(+)	–	–	–	+	+	–	+
الاذن	–	+	(+)	–	–	–	+	+	–	+
الحروق	–	+	(+)	–	–	–	+	+	–	+
الجروح	–	+	(+)	–	–	–	+	+	–	+

التربة	−	+	(+)	−	−	−	+	+	−	+
الماء	−	+	(+)	−	−	−	+	+	−	+
مياه مخلفات المعامل	−	+	(+)	−	−	−	+	+	−	+

(٤−٥) توزيع العزلات وفق مواقع الاصابة :−

بعد تشخيص العزلات على وفق ما ذكر سابقا صنفت وفق مواقع الاصابة , جدول ٤−٥ وقد تبين من الجدول ان العدد الاكبر للعزلات كان ضمن عينات التهاب المجاري البولية ٤٢,٥٪ جاءت هذه النتائج متفقة مع ما توصل اليه Olayinka واخرون (٢٠٠٤) والذين اوضحوا ان أعلى نسبة اصابة بجراثيم الزوائف الزنجارية كانت من اخماج المجاري البولية ٥١,١٪ ويليها اخماج الجروح والحروق بنسبة ٤١.٣٪ , ويليها اخماج الاذن الوسطى بنسبة ٢,١٪.

كما اتفقت هذه النتائج مع ما توصل الية Abdullah واخرون (٢٠١٠) والذين اوضحوا ان اعلى نسبة لجراثيم الزوائف الزنجارية كانت معزولة من حالات التهاب المجاري البولية بنسبة ٤٠٪ كما اتفقت هذه النتائج مع ما توصلت اليه السعيدي (٢٠١١) التي اوضحت ان اعلى نسبة للإصابة بالتهاب المجاري البولية كانت نسبة الاصابة ٤١,٣٪ .

يدل ذلك على أثر هذه البكتريا في خمج المسالك البولية وخاصة لدى المرضى الذين يخضعون لعملية القسطرة , ويعزى ذلك الى عوامل الالتصاق التي تمتلكها هذه البكتريا التي تسهل من عملية التصاقها ومقاومتها للعديد من المضادات البكتيرية من خلال توافرها خلال الغشاء الحيوي الكثيف (Thik biofilm) (Brook واخرون ,٢٠٠٧).

هذه النتائج لا تتفق مع ما توصلت اليه عبد الله واخرون (٢٠٠٩) والتي اوضحت ان حالات التهاب المجاري بلغت بنسبة ٤.٥٪ بعدها حالات الحروق والجروح بنسبة ٨١.٨٪ و ١٣.٦٪ على التوالي وقد يُعزى ذلك الى اختلاف ظروف العزل وطبيعة الظروف البيئية لمدينتي بعقوبة والمقدادية ، واختلاف حجم العينة .

وفي دراستنا يأتي معدل الخمج في حالات التهاب الاذن الوسطى جدول (٤-٥) لهذه البكتريا بالدرجة الثانية بعد خمج المسالك البولية اي بنسبة ١٥٪ وهذه النتائج جاءت مقاربة مع ما توصلت اليه السعدي (٢٠١١) التي بينت ان معدل التهاب الاذن الوسطى ايضا يأتي بالدرجة الثانية بنسبة ٢٥.٣ % ، وفي حين لا تتفق هذه النتائج مع ما توصلت اليه alqaisi (٢٠١٢) والتي بينت ان معدل اخماج الاذن الوسطى يأتي بالدرجة الرابعة اي بنسبة ١٧.٣٪ ولا تتفق هذه النتيجة مع ما توصل اليه الباحث Alsaimary واخرون (٢٠١٢) اذ اشاروا ان حالات الاصابة باخماج الاذن الوسطى كانت الاكثر في نسب العزل إذ بلغت ٦٠٪ في حالة الاصابة بجراثيم الزوائف الزنجارية .

ولا تتفق هذه النتيجة مع ما توصل اليه الباحث de Miguel Martinez واخرون (٢٠٠٥) في دراسة اجريت لمرضى التهاب الاذن الوسطى ان بكتريا *P.aeruginsae* كانت لاكثر نسبة ضمن النسب اذ بلغت حوالي ٤٧.٤٪ .

اما نسبة حالات التهاب الجروح في دراستنا الحالية جاءت بالدرجة الثالثة بنسبة ٧.٥٪ والحروق بالدرجة الرابعة بنسبة ٥٪ وهذه النتائج مقاربة لما توصلت اليه السعدي (٢٠١١) .

اذ بلغت النسبة الجروح والحروق ١٨.٦٪ ،١٤.٦٪ على التوالي بالدرجة الثالثة وقد يعود السبب الى ان هذه البكتريا تعد من الممرضات الثانوية الانتهازية للفرص Oppartunistic

p.atuoge اذ انها تنتهز فرصة حدوث اختلالين عام او موضعي في احد دفاعات الجسم الميكانيكية او المناعية او كليهما معاً (Brooks واخرون ,٢٠٠٧).

قد توصل de macedo و Santos (٢٠٠٥) الى ان البكتريا *P.aeruginesae* هي المسبب الثاني لالتهاب اصابات الحروق وتحدث الاصابة بدءا من الاسبوع الثالث للاصابة بالحرق ، وفي دراسة اخرى اجرتها الباحثة العريبي (٢٠١٠) بلغت نسبة الحروق والجروح اعلى نسبة اذ كانت ٤٢.١٪ و ٣٦.٣ % على التوالي .

اما Zhang واخرون (٢٠٠٥) فقد وجدو ان هناك ارتفاعا في نسبة عزل ***P.aeruginosa*** المعزولة من اصابات الحروق اذ كانت نسبة العزل في عام ١٩٩٧ ٢٤.٥ % وارتفعت عام ٢٠٠٣ الى ٥٥.٧٢٪ ، في حين أوضح ALkaabi (٢٠١٣) بان نسبة حالات التهاب الحروق بلغت اعلى نسبة اذ بلغت ٤٨.١٤ % من بين العزلات الاخرى .

بينما اشار Okon (٢٠١٤) ان اكبر عدد من العزلات كانت من الجروح اذ بلغت (٢٥٨٥) ويليها حالات التهاب الاذن اذ بلغت عدد الحالات ١٨٦٩ .

اما بالنسبة لعينات الماء فكانت نسبة العزل ١٢.٥٪ في حين اشار الباحث warrington و Peptio (٢٠٠١) عندما اجرى دراسته على احد المياه الصالحة للشرب في احدى المدن البريطانية (Columbia) .

بينما اشار الباحث Al-Bayatti واخرون (٢٠١٢) عندما اجرى دراسته على مواقع مختلفة على نهر دجلة لمدينة الشعلة ماء النهر و محطة تصفية ماء مدينة الشعلة و الماء الصالح لشرب المنازل اذ تمكن من عزل بكتريا *P.aeruginosae* بنسبة ٢٣٪ و ٣٤٪ و ٢٣٪ على التوالي ، اذ وجد الباحث ان هناك زيادة في نسبة التلوث للماء في محطات التصفية

، اما تلوث المياه الصالحة للشرب يرجع الى تلوث هذه المياه بالنفايات الناتجة من المناطق الحضرية القريبة منه.

في جنوب افريقيا تمكن الباحث Mulamattathil و اخرون (٢٠١٤) من عزل العديد من الانواع البكترية من بيئة مياه النهر .

من ضمنها بكتريا *P.aeruginosae* اذ كانت نسبة عزلها ٩٨٪ من مياه النهر ، اما بعد معالجتها (مياه الشرب) كانت نسبة عزلها ١٪ . في حين تمكن الباحث Bhasin واخرون (٢٠١٥) بان هناك نسبة متفاوتة للعزل اذ بلغت ٢٧.١٠ % و ٢٤.٢٤ % و ٢٠.٢١٪ و ١٥.٣٠٪ و ١٣.٠٩٪ لمواقع مختلفة على نهر Kshipra في الهند .

تمكن الباحث (Hanna واخرون , ٢٠١٤) من عزل بكتريا *P.aeruginosae* من المياه العذبة لنهر النيل في محافظة الشرقية اذ تمكن من عزلها من الاعضاء الداخلية للأسماك المصابه بعد ان ظهرت عليها علامات متمثلة بنزيف وتقرحات الاعضاء الداخلية وكانت هذه البكتريا مسؤولة عن ٤٠٪ من نسبة وفيات هذه الاسماك مما يشير الى وجود نسبة عالية من تلوث هذه المياه .

اما عينات التربة إذ بلغت نسبة العزل فيها ١٢.٥٪ في حين اشار الباحث Bhatt واخرون (٢٠٠٥) الى عزل بكتريا ***p.aeruginosa*** من تصبغات التربة الناتجة من مخلفات النفايات الصناعية ، إذ استخدمت هذه العزلات البكتيرية ***p.aeruginosa*** في ازالة هذه التصبغات للقضاء على ملوثات التربة ، اذ وجد الباحث ان لهذه البكتريا ذات كفاءة متفاوتة في عملية الازالة بمعدل ٩٥- ٨٠٪ .

اشار الباحث Hinani– AL واخرون (٢٠١٠) الى عزل (٢٠) عزلة لبكتريا *P.aerugiuosa* من تربة المنازل إذ تبين ان هذه العزلات تمتلك فعالية تثبيطة ضد فطر

Pythium apnanidermatum المسبب لتعفن البادرات لنبات الخيار ، وتعد هذه اول دراسة لعزلات *P.aeruginosae* لامتلاكها فعالية ضد فطر (*P. aphanidermatum*) في سلطنة عمان.

اما الباحث Lakshmi واخرون (٢٠١٥) اذ قام بعزل البكتريا *P.aerugiuosae* بنسبة ٩٩٪ من المنطقة المحيطة بالجذر لنبات الخروع اذ وجد بان هذه العزلات تنتج مواد ايضية ثانوية (Secondary metabolites) وهي (HCN) سيانيد الهيدروجين وبين بإمكانه استغلال هذه المركبات كعامل سيطرة حيوي في مجال الزراعة (Bio control agent).

بينما اشار الباحثان Kulkarni و Kaliwal (٢٠١٥) الى عزل البكتريا من التربة بنسبة ٩٩٪ وقد وجد بان لهذه العزلات القابلية على مكافحة مركبات (Xenobiotics) مواد سامة لها القابلية على تحطيم النباتات والتأثير على الكائنات الحية بالتربة , من هذه المركبات هي (methomyL), وقدرة هذه العزلات على ازالتها من البيئة الملوثة بشكل كامل .

بلغت نسبة عزل بكتريا الزوائف الزنجارية في مخلفات المعامل ٥٪ في حين اشار الباحث pandian واخرون (٢٠١٤) اذا تمكنوا من عزل بكتريا *P.aerugiuosae* من مخلفات المعامل السائلة الصناعية بنسبة ٩٥٪ اذ وجد ان هذه العزلات قادرة على التحمل في العيش في هذه البيئة بعدما تم تعريضها الى تركيز بنسبة ٢٥٪ من مخلفات المياه الصناعية لوحظ زيادة الكثافة الضوئية وpH الوسط اي انها قادرة على العيش في بيئة المعادن الثقيلة وهذه العزلات من المحتمل ان تمتلك قدرة على ازالة المعادن مثل الكروم والنيكل والزنك من مخلفات المعامل بالمستقبل.

يلاحظ من مقارنة النتائج التي تم الحصول عليها مع النتائج المحلية و العالمية وان هناك تقارباً واختلافا في نسبة عزل البكتريا من العينات المختلفة وهذا يرجع لأسباب منها اماكن العزل كالمستشفيات ومراكز العناية الفائقة ، ويعزى سبب تباين النسب الى عدد العينات التي تم

جمعها من قبل الباحث وايضا يعزى الى سبب درجة الاهتمام بالنظافة ونوع المعقمات والمطهرات المختلفة في المستشفيات لان البكتريا مقاومة لمعظم مواد التعقيم ومضادات الحياة , لان هذه البكتريا مسبب رئيس للاصابات المكتسبة من المستشفيات. (Nosochemial in fection) (Kiffer واخرون , ٢٠٠٥) .

جدول (٤-٥) النسب المئوية للعزلات من العينات السريرية والبيئية .

	مصدر العزل	عدد العينات	عدد العزلات	النسبة المئوية للعزلات
C	الادرار	٥٤	١٧	٤٢,٥
	الحروق	٣	٢	٥
	الجروح	٥	٣	٧,٥
	الاذن	٣٨	٦	١٥
E	التربة	١٥	٥	١٢,٥
	الماء	١٠	٥	١٢,٥
	مخلفات المعامل	٥	٢	٥
	المجموع	١٣٠	٤٠	١٠٠

E: عينة بيئية C: عينة سريرية

(٤-٦) توزيع العينات السريرية بحسب الجنس:

يبين الجدول (٤-٦) توزيع العينات السريرية بحسب الجنس إذ بلغت عزلات الادرار في الذكور ٢٤ عزلة اما بالنسبة للاناث ٣٠ عزلة اي عدد الاشخاص المصابين بالاناث اعلى من الذكور , وجاءت هذه النتائج مقاربة لما توصلت اليه السعيدي (٢٠١١) اذ كان عدد العزلات عند الاناث اعلى من الذكور ٧٧ , ٥٠ على التوالي ويرجع السبب الى قرب المسافة بين فتحة الشرج والمهبل وبالتالي البراز الملوث لبكتريا *P.aerugiuosae* ستغزو

وتستوطن المجرى البولي وتسبب التهابات مجرى البول لدى الاناث (Mohan واخرون , ٢٠١٣) , واختلفت هذه النتائج مع توصل اليه fazeli و Momtaz (٢٠١٤) اذ كانت عدد العزلات للاشخاص المصابين بالتهاب المجاري البولية في الذكور ٦ عزلات اما الاناث ٣ واختلفت هذه النتائج مع ما توصل اليه de Miranda واخرون (٢٠١٤) اذ بلغت عزلات الذكور ٧٦ , اما الاناث ٥٦ بينما اشار الباحث Kumar (٢٠١٤) ان عدد العزلات في الذكور اعلى من الاناث ٧١ و ٢٩ على التوالي.

اما بالنسبة لعزلات التهاب الاذن الوسطى في دراستنا , يشير الجدول ٤-٦ الى ان عدد عزلات الذكور اعلى من الاناث و البالغ عددها ٢٥ و ١٣ عُزلة على التوالي وجاءت هذه النتائج مقاربة لما توصلت اليه السعيدي (٢٠١١) اذ بلغت عزلات الذكور اعلى من الاناث و التي بلغ عددها ٤١ و ٣٨ على التوالي ومقاربة مع ما توصل اليه الباحث Dayaesna واخرون (٢٠١١) كانت نسبة العزلات عند الذكور اعلى من الاناث (٥٥.١٪) , (٤٤.٩٪) على التوالي.

واختلفت مع ما توصل اليه الباحث AsAdoga واخرون (٢٠١٠) اذ كانت العزلات عند الاناث اعلى من الذكور ٥٠ و ٣٠ عزلة على التوالي .

سبب الاختلاف , ربما يعود الى اختلافات اجتماعية او اختلافات فسلجية بين الذكور والاناث فضلا عن قيام الذكور ببعض العادات مثل السباحة التي ترافق التهاب الاذن الوسطى (Verhaz واخرون ,٢٠٠٣).

اما بالنسبة لحالات الجروح في الجدول ٤-٦ ان عدد الاشخاص المصابين بالجروح والمعزولة منهم لبكتريا ***P.aerugiuosae*** في الذكور عزلتان اقل من الاناث والبالغة عددها ٣ عزلات .

اذ اختلفت هذه النتائج مع ما توصل اليه السعدي (٢٠١١) اذ كانت عزلات الذكور اعلى من الاناث ٣١ و ٢٠ على التوالي كما اختلفت مع ما توصل اليه Momtaz و fazeli (٢٠١٤) اذ كانت عزلات حالات الجروح الذكور اعلى من الاناث 20 و ١٦ على التوالي.

اختلفت هذه النتائج مع ما توصل اليه (Yasidi , ٢٠١٥) , اذ بلغت نسبة العزلات لحالات الاصابة بالجروح للذكور ٦٧.٣٪ وهي نسبة اعلى من الاناث التي بلغت ٣٢.٢٪ .

يعزى سبب زيادة عدد العزلات عند المرضى الذكور على الاناث , لان الذكور هم اكثر عرضة للبيئة الخارجية بسبب قدرتهم على الحركة واشغالهم بامور العمل مقارنةً بالاناث (ALMarzoqi و AL Taee, ٢٠١٣).

اما حالات الحروق في دراستنا الحالية اثبتت النتائج ان عزلات الاناث اعلى من الذكور ٢ و١ على التوالي , وجاءت هذه النتائج مقاربة لما توصلت اليه السعدي (٢٠١١) , اذ كانت عدد العزلات عند الاناث اعلى من الذكور ٢٦ و٢١ على التوالي , وجاءت هذه النتائج مقاربة مع ما توصلت اليه الباحثة Hussein واخرون (٢٠١٢) اذ كانت نسبة العزل في الاناث اعلى من الذكور ٧٠٪ و ٣٠٪ على التوالي , و جاءت مقاربة مع ماتوصل اليه Anvarinejad واخرون (٢٠١٤) , اذ كانت عزلات الاناث ٢٩ عزلة اما الذكور ٢٦ , اي ان الاناث اعلى من الذكور في حين اختلفت هذه النتائج مع ما توصل اليه OKO (٢٠٠٩) إذ ان العزلات بالذكور ٥٦ عزلة اما الاناث ٥٠ اي ان اعداد العزلات في الذكور اعلى من الاناث , واختلفت ايضا مع ما توصل اليه Fazeile و Momtas (٢٠١٤) اذ كانت العزلات عند الذكور ١٤ عزلة وهي اعلى من الاناث ١٢ .

يعزى سبب اصابة النساء اعلى من الذكور الى ان معظم النساء تميل الى المزيد من قضاء الوقت بالقرب من النار لانشغالها باعمال الطهي وادوات الطبخ (Hussein واخرون, ٢٠١٢).

جدول (٤-٦) توزيع العينات السريرية لبكتريا *P.aeruginosae* حسب الجنس .

مصدر العزل	عدد الذكور	عدد الاناث	العدد الكلي
إدرار	٢٤	٣٠	٥٤
اخماج الاذن الوسطى	٢٥	١٣	٣٨
جروح	٢	٣	٥
حروق	١	٢	٣
المجموع الكلي	٥٢	٤٨	١٠٠

(٤-٧) مقاومة العزلات لمضادات الحياة :

تم اختبار حساسية ٤٠ عزلة لبكتريا (*Pseudomonaes aeruginosae*) تجاه (٦) من مضادات الحياة جدول (٤-٧) , هي ciprofloxacin و Amoxycillin و cefotaxim و Gentamicin و Ofloxacin و Pipracillin باستخدام طريقة (Kirby-Bauer) , تم تحديد حساسية او مقاومة البكتريا تجاه المضاد بقياس اقطار مناطق التثبيط حول القرص وقورنت النتائج مع جداول القياسية العالمية (NCCLs).

اظهرت النتائج قيد الدراسة ان جميع العزلات البيئية والسريرية كانت ذات مقاومة عالية لمضاد Ciprofloxacin بنسبة (١٠٠٪) إذ ينتمي هذا المضاد الى مجموعة (Quinolones) وجاءت هذه النتائج مقاربة مع ما توصلت اليه AL-Salihi (٢٠١٤) إذ كانت نسبة المقاومة ٨٤٪ وهي نسبة عالية المقاومة لهذا المضاد , في حين اختلفت النتائج مع ما توصل اليه Biswal (٢٠١٤) إذ كانت نسبة المقاومة ١٢.٦٪ ومختلفة مع ما توصل اليه السعيدي (٢٠١١) إذ كانت نسبة المقاومة لجميع العزلات ٢١٪ .

كما اختلفت هذه النتائج مع ماتوصل اليه Gul و Ayub (٢٠١٥) إذ كانت نسبة المقاومة تجاه هذا المضاد ٦٦٪ وهي نسبة قليلة للمقاومة .

كما أظهرت النتائج ان جميع العزلات السريرية كانت ذا مقاومة عالية بنسبة (١٠٠٪) تجاه مضاد (Amoxicillin) وهذه النتائج جاءت مقاربة مع ما توصلت اليه السعدي (٢٠١١) , AL-Saffar (٢٠٠٥) إذ كانت جميع العزلات مقاومة لمضاد (Amoxicillin) بنسبة (١٠٠٪) .

أما عينات البيئة لم تظهر اية مقاومة تجاه هذا المضاد إذ بلغت نسبة الحساسية فيها ١٠٠٪.

بالنسبة لمضاد (Piperacillin) الذي ينتمي الى مجموعة (البنسلينيات) , كانت جميع العزلات البيئة والسريرية حساسة ١٠٠٪ , اي لم تظهر اي مقاومة واختلفت هذه النتائج مع ماتوصلت اليه Al-Derzi و MD (٢٠١٢) إذ بلغت نسبة المقاومة للعزلات ٨١.٧٪ وهي نسبة عالية بالمقارنة مع الدراسة الحالية .

كما اختلفت ايضا مع ما توصل اليه (Gul , ٢٠١٥) إذ بلغت نسبة المقاومة ٧٧٪ وهي نسبة عالية ايضا واختلفت مع ما توصل اليه (Biswal , ٢٠١٤) اذ كانت نسبة المقاومة للعزلات ٦٧٪ .

وجد ان مجموعة السيلفاسبورينات إذ ينتمي مضاد Cefotaxime اليها , اظهرت جميع العزلات البيئية والسريرية حساسية تجاه هذا المضاد ولم تظهر اية مقاومة , اختلفت هذه

النتائج مع ماتوصلت اليه LuaLua'a (٢٠٠٩) إذ بلغت جميع العزلات بنسبة مقاومة ٧٣.٩٪ واختلفت مع ما توصلت اليه AL-Qaisi (٢٠١٢) إذ كانت نسبة المقاومة للعزلات ١٥.٤٪ .

اما مضادات الامينوكلايكوسايد تشمل (Gentamicin) إذ اظهرت جميع العزلات السريرية مقاومة عالية تجاه المضاد بنسبة ١٠٠٪ وجاءت هذه النتائج مقاربة لما توصل اليه AL-Derzi و MD (٢٠١٢) إذ بلغت نسبة المقاومة لعزلاتها ٧٨.٩٪ وهي نسبة عالية ومقاربة مع ما توصل اليه Al-sallih (٢٠١٤) إذ بلغت نسبة المقاومة ٩٧.٣٪ واختلفت مع ما توصل اليه السعيدي (٢٠١١) اذ كانت نسبة المقاومة لعزلاتها (٦٠٪) وهي نسبة قليلة مقارنةً بنتائجنا الحالية. كما لوحظ ان عينات البيئة أظهرت حساسيتها بنسبة ١٠٠٪ تجاه هذا المضاد. اما مجموعة (Quinolones) والتي ينتمي اليها مضاد (Ofloxacin) اظهرت النتائج ان العزلات السريرية والبيئية لم تظهر ايه مقاومة تجاه هذه المضاد إذ كانت حساسة ١٠٠٪ وقورنت هذه النتائج مع ماتوصل اليه السعيدي (٢٠١١) اذ بلغت نسبة المقاومة لهذا المضاد ٣٪ وهي نسبة قليلة جدا , في حين اختلفت النتائج مع ما توصل اليه Motayao واخرون (٢٠١٣) اذ بلغت نسبة المقاومة تجاه المضاد ٢٤.٤٪ . من خلال النتائج نلاحظ ان العزلات السريرية تمتلك صفة MDR (Multi Drugs Resistunce) اي (المقاومة لاكثر من مضاد لنفس العزلة) ويعزى سبب ذلك الى انتاجها لعديد من الانزيمات كانتاجها لانزيم (Aminoglycoside Modifying Enzymes) (PooL واخرون , ٢٠٠٠) , فضلا عن ذلك يرجع الى امتلاكها نظام الضخ الخارجي (Efflux pump) , وقد تحمل جينات هذه تشفر لالية المقاومة على البلازميد او الكروموسوم (Lister , ٢٠٠٩) . يلاحظ من هذه النتائج ان هناك تبايناً عند مقارنة النتائج مع نتائج محلية وعالمية وهذا يرجع لعدة عوامل منها نوع المضاد

المستخدم في كل مستشفى والحالة المرضية والجرع المتناولة الملائمة للعلاج (Vanelder , ١٩٩٩).

جدول (٤-٧) النسب المئوية لحساسية العزلات قيد الدراسة للمضادات الحيوية

مصدر العزلة	العدد الكلي	CIP		AMX		CTX		GN		OF		PRL	
		S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R
مسحات الادرار	١٧	٠	%100	0	%100	%100	0	0	%100	%100	0	%١٠0	0
		٠	(17)	0	(17)	(17)	0	0	(17)	(17)	0	(17)	0
مسحات الجروح	٣	٠	%100	0	%100	%100	0	0	%100	%100	0	%100	0
		٠	(3)	0	(3)	(3)	0	0	(3)	(3)	0	(3)	0
مسحات الحروق	٢	٠	%100	0	%100	%100	0	0	%100	%100	0	%100	0
		٠	(2)	0	(2)	(2)	0	0	(2)	(2)	0	(2)	0
مسحات الاذن	٦	٠	%100	0	%100	%100	0	0	%100	%100	0	%100	0
		٠	(6)	0	(6)	(6)	0	0	(6)	(6)	0	(6)	0
التربة	٥	٠	%100	%100	0	%100	0	%100	0	%100	0	%100	0
		٠	(5)	(5)	0	(5)	0	(5)	0	(5)	0	(5)	0
الماء	٥	٠	%100	%100	0	%100	0	%100	0	%100	0	%100	0

		٠	(5)	(5)	0	(5)	0	(5)	0	(5)	0	(5)	0
مياه مخلفات المعامل	٢	٠	%100	%100	0	%100	0	%100	0	%100	0	%100	0
		٠	(2)	(2)	0	(2)	0	(2)	0	(2)	0	(5)	0

R :- مقاومة .

S :- حساسة .

(٤-٨) تأثير البايوسيانين المنتج من قبل *P.aeruginosa* على بعض البكتريا المرضية والفطريات

اظهرت نتائج الدراسة الحالية كما مبين في الجدول ٤-٨ , ان جميع العزلات المرضية لبكتريا ***E.coli*** **و** ***Staphylococuss aureus*** كانت حساسة لصبغة البايوسيانين كما اظهر فطر الـ(***Candida albicans***) حساسيته تجاه مضاد البايوسيانين .

اتفقت هذه النتائج مع ماتوصل اليه الباحث Vanconcelos واخرون (٢٠١٠) الذي اشار الى ان مادة البايوسيانين المستخلصة من قبل بكتريا *P.aeruginosae* ذات فعالية في تثبيط نمو بكتريا ***Escherichia coli*** , كما اتفقت هذه النتيجة مع ما توصل اليه الباحث Aonofriesei و Crasmaru (٢٠١٥) الذي اشار ايضا الى قدرة البايوسيانين في تثبيط بكتريا *E.coli* , فضلاً عن ذلك اتفقت هذه النتائج مع ماتوصل اليه Cardozo واخرون (٢٠١٣) الذي اشار ان بامكان بكتريا *P.aeruginosae* انتاج مركبات خارج الخلية Extracellular Compounds والتي بدورها تمتلك فعالية تثبيطية ضد بكترية Antibacterial activity ضد بكتريا *Staphylococcus aureus* وهذه المركبات تدعى بالبايوسيانين واتفقت هذه النتائج مع Saha واخرون (٢٠٠٨) , كما اتفقت هذه النتائج مع

ماتوصل اليه Biswax واخرون (٢٠٠٩) , الذي اشار ان لبكتريا الـ*P.aeruginosae* لها القدرة على انتاج عوامل ضراوة (سموم خارجية) (Exotoxins) والتي تستهدف بشكل تفصيلي سلسلة نقل الالكترونات لبكتريا *S.aureus* وبالتالي تثبط من نموها والتي تدعى بالبايوسيانين .

اما بالنسبة لفطر ***Candida albicans*** والذي اظهر حساسيته لمادة البايوسيانين اذ اتفقت هذه النتائج مع ماتوصل اليه UX واخرون (٢٠١٤) واتفقت مع ماتوصل اليه Hogan و Kolter (٢٠٠٢) واللذان اشارا الى وجود تداخل بين فطر ***C.albicans*** وبكتريا *P.aeruginosae* لامتلاك مادة البايوسيانين تأثيرات قاتلة ضد فطر ***C.albicans*** بنسبة ١٠٠٪ كما اتفقت هذه النتائج مع ماتوصل اليه Kerr واخرون (٢٠١٥) والذي اشار الى قدرة البايوسيانين المستخلص من قبل بكتريا *P.aeruginosae* على تثبيط نمو فطر ***C.albicans***.

تعزى سمية هذه المادة Pyocyanin اذ تعد قاتلة للبكتريا Bacteriocidal لأنواع عديدة من البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام , اذ تتواجد هذه الصبغة اما بالصيغة المؤكسدة او بالصيغة المختزلة والاخيرة تبدو على شكل جذور حرة غير مستقرة (Unstable free radical) والتي تتفاعل بسرعة مع جزئيات الاوكسجين , وهذا التأكسد التلقائي يؤدي الى تكوين بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 , اذ عملية القتل تبدو واضحة على اطباق الاكار بشكل مناطق تثبيطية والتي تدل على حساسية البكتريا للبايوسيانين (Stephen و Hawkey , ٢٠٠٦) .

جدول (٤-٨) تأثير مادة البايوسيانين على بعض العزلات المرضية البكتيرية و الفطرية

ت	العزلات المرضية	تركيز البايوسيانين (ميكروغرام/مليلتر)	حساسية العزلة (+/-)	
١	***(Escherichia Coli)***	١٠٠	+	**S**
٢	***(Staphylococcus aureus)***	١٠٠	+	**S**
٣	***(Candida albicans)***	١٠٠	+	**S**

(+) ظهور منطقة تثبيط.
(−) عدم ظهور منطقة تثبيط.
. Sensitive (S)

(٤−٩) التاثير التثبيطي للبايوسيانين ومضادات الحياة على بعض العزلات المرضية :−

من خلال النتائج اتضح تأثير مضاد البايوسيانين المستخلص من بكتريا *P.aeruginosae* ذا تأثير تثبيطي عالٍ على بعض العزلات المرضية المتمثلة *بـE.coli* و *S.aureus* وخميرة *Candida albicans*.

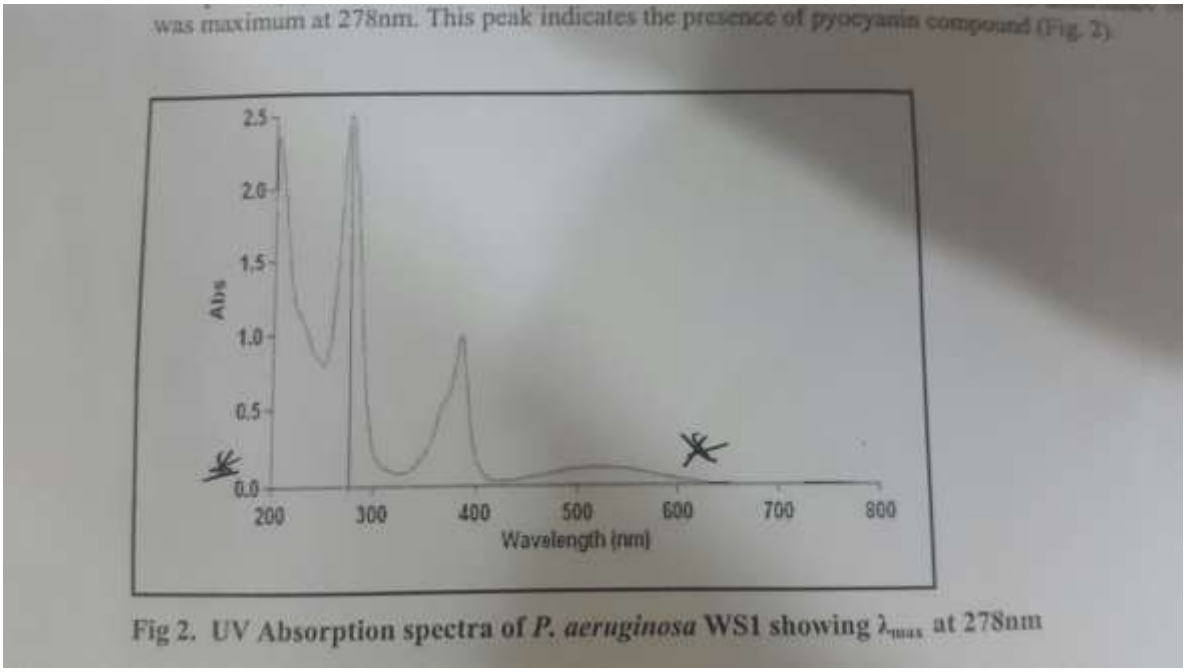
اذ كانت هذه العزلات حساسة بنسبة ١٠٠٪ عندما تم تعريضها لمضاد البايوسيانين بتركيز ١٠٠ مايكروغرام /ملليتر من خلال ظهور مناطق تحلل واضحة في بعض المزارع البكترية والفطرية , اما بالنسبة لمضادات الحياة هناك تفاوت بين المقاومة والحساسية لعزلات بكتريا *P.aeruginosa* اعتماداً على مصدر العزلة والحالة المرضية , اذ اظهرت العزلات البيئية والسريرية عزلة بكتريا *P.aeruginosa* مقاومة عالية تجاه مضاد الـCIP بنسبة ١٠٠٪ , حين كانت جميع العزلات البيئية والسريرية حساسة تجاه مضادات OF و PRL و CTX بنسبة ١٠٠٪ بينما كانت العزلات السريرية اكثر مقاومة من العزلات البيئية تجاه كل من مضاد AMX و GN بنسبة ١٠٠٪ اما العزلات البيئية كانت حساسة بنسبة ١٠٠٪ تجاه المضادين اعلاه.

(٤−١٠) تحليل مكونات الفينازين

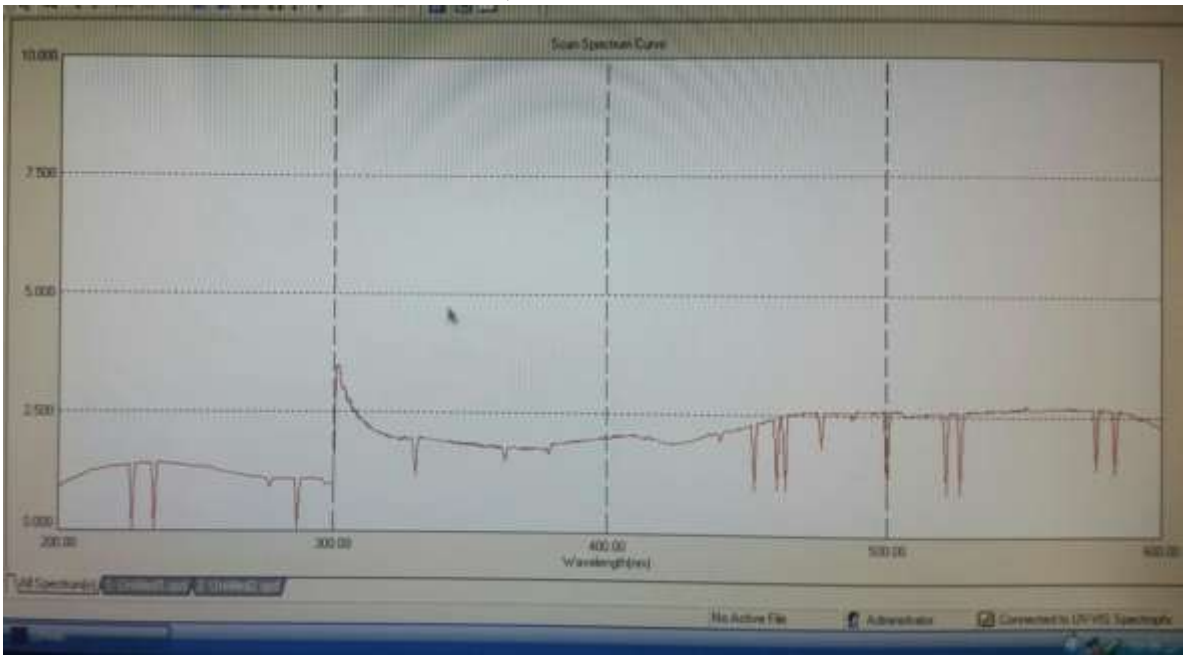
فحصت ٤٠ عزلة من بكتريا ***P.aeruginosa*** و انتخذت عزلة الحروق لقدرتها العالية على انتاج الفينازين ، بعد ان اتبعت طريقة (Kumar و آخرون ، ٢٠١٤) . اذ جمع المستخلص

الخام في انابيب اختبار الناتج من اضافة ٥ مل من البايوسيانين و استخدمت المذيبات العضوية n–hexan , ethylacetate بنسبة ٩:١ بعدها اخذ ١ مايكروليتر من كل انبوبة من المحلول الناتج على شكل مراحل و تم حقنها في خلية جهاز GC–mass بعد برمجة الجهاز . تدفق غاز الهيليوم 2.5 م/دقيقة ، و نبدأ بحقن العينة عند درجة ٢٢٠م° بعد ١٠ دقائق من استقرار الجهاز , وبعد مطابقتها مع المركبات الموجودة في مكتبة الطيف الكتلي للجهاز و تبين تحليل مكونات الفينازين و جاءت هذه النتيجة مطابقة مع ما توصل اليه (عزيز وآخرون ، ٢٠١٢ ; Kumar و آخرون ، ٢٠١٤) .

كما موضح في الملحق (٧–٨) في قائمة الملاحق .



شكل (٤-١) معدل الامتصاصية القياسي لصبغة البايوسيانين باستخدام جهاز (UV / VIS Spectrophotometer حسب ما ورد في (Sudhakar واخرون, ٢٠١٣)



شكل (٤-٢) قياس البايوسيانين باستخدام (UV / VIS Spectrophotometer)



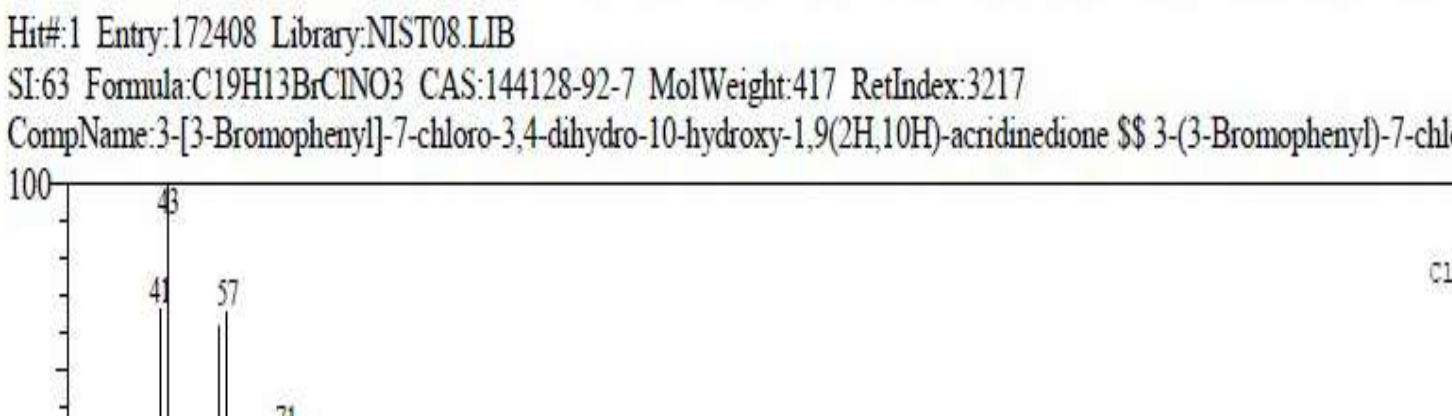
شكل (٤-٣) تبلور مادة البايوسيانين



شكل (٤-٤) البايوسيانين في الوسط الحامضي



شكل(٤-٥) البايوسيانين في الوسط القاعدي



شكل ٤-٦ نتائج تحليل مكونات صبغة البايوسيانين باستخدام جهاز (GC-MSS)

الاستنتاجات والتوصيات

Conclusions & Recommendations

Conclusions الاستنتاجات

١. ظهور أعلى نسبة لعزل بكتريا الزوائف الزنجارية كان ضمن عينات الادرار ، و العينات البيئية كانت ضمن التربة والماء .

٢. عدد الاناث المصابات ببكتريا الزوائف الزنجارية اعلى من الذكور في حالات التهاب المجاري البولية , الحروق , الجروح إذ كانت عدد العزلات ٣٠ و ٢

و ٣ عزلة على التوالي , في حين ان الذكور اعلى اصابة من الاناث في حالات التهاب الاذن الوسطى إذ بلغت ٢٥ عزلة.

٣. ظهور مقاومة عالية من العزلات البيئية والسريرية تجاه مضاد Ciproflaxocin بنسبة ١٠٠٪ , في حين كانت حساسة تجاه مضادات Cefotaxime و Ofloxacine و Pipercillin في حين كانت العزلات السريرية اكثر مقاومة من البيئة تجاه مضادي Amoxicillin و Gentamycin بينما العزلات البيئية كانت حساسة بنسبة (١٠٠٪) تجاه المضادين اعلاه .

٤. ان لصبغة البايوسيانين تأثيراً تثبيطياً على العزلات البكتيرية وبعض العزلات الفطرية عند التركيز ١٠٠mg .

٥. تثبيت مواصفات البايوسيانين *Pyocianin* كماً ونوعاً باستخدام UV-Spectrophotometer و GC-mass .

التوصيات Recommendations

١. اجراء

دراسات وراثية على عزلات *P.aeruginosa* لغرض تحديد الجين المسؤول عن انتاج البايوسيانين .

٢. اجراء

المزيد من الاختبارات لمعرفة تأثير صبغة البايوسيانين في امراض الدم الخبيثة (Hematological Malignance).

٣. اجراء

تجارب على حيوانات مختبرية لدراسة تأثير البايوسيانين والفينازين للتعرف على تأثيرهما المثبط على الخلايا .

المصادر

References

المصادر العربية

الثويني: امنة نعمة, بشرى جاسم محمد و مها احمد نايف (٢٠٠٨). التحري عن بكتريا *Pseudomonas aeruginosae* في تلوث المستشفيات. مجلة ام سلمة للعلوم, المجلد الخامس. ٤-١.

السعدي, لينا عبد الامير سلمان. (٢٠١١). دراسة بكتريولوجية لبكتريا *Pseudomonas aeruginosae* المعزولة من مصادر سريرية مختلفة في مدينة بعقوبة وضواحيها, رسالة ماجستير, كلية العلوم, جامعة ديالى.

العريبي: سناء مهدي. (٢٠١٠). مقاومة جرثومة *Pseudomonas aeruginosae* المعزولة من اصابات سريرية مختلفة لبعض المضادات الحيوية. مجلة علوم ذي قار, المجلد الثاني:١٩٩١-٨٦٩٠.

العزاوي , شيماء صبحي .(٢٠٠٦). التأثير السمي لصبغة البايوسيانين Pyocyanin المستخلصة من بكتريا *Pseudomonas aeruginosae* في بعض خطوط الخلايا السرطانية للإنسان والحيوان , رسالة ماجستير , كلية العلوم , جامعة بغداد .

القيسي, خالدة جليل ابراهيم .(٢٠٠٢). عزل وتشخيص بعض البكتريا الهوائية المسببة لالتهابات القدم عند المرضى المصابين بداء السكري ودراسة التأثير الخلطي للمضادات الحيوية عليها. رسالة ماجستير, كلية العلوم, الجامعة المستنصرية.

الكَرعاوي, يسرى عزيز محمد. (١٩٩٩). دراسة تأثير مستخلص النمو الخام لبكتريا *Pseudomonas aeruginosae* على خطوط خلايا سرطانية وطبيعية, رسالة ماجستير, كلية العلوم, جامعة بغداد.

الهلالي , هدى هادي عطية .(٢٠٠٥). دراسة كيموحيوية لأنزيم الاكاريز المنتج من بكتريا *Pseudomonas Sp* المعزولة محلياً , رسالة ماجستير , كلية العلوم , جامعة بغداد .

باصات, ديمة نزار فرج, (٢٠٠٦). تأثير المستخلصات المائية والكحولية لنبات سم الفراخ والقريص على بعض عوامل الضراوة والدنا البلازميدي لبكتريا *Pseudomonas flouresens* المعزولة محلياً, كلية العلوم, جامعة بغداد. رسالة ماجستير .

عبد الله: انوار علي, ذكرى عبد العالي عبد, انوار كاظم حسين ; زينب محمد جاسم. (٢٠٠٩). علاقة الطبقة المخاطية لبكتريا *Pseudomonas aeruginosae* بالمقاومة لبعض المضادات الحياتية. مجلة جامعة بابل, مجلد ١٧ العدد الاول.

علي, محمد طارق, كريم سعدون, حسن عبد الرزاق شفيق, علي ; زينة طارق (٢٠١٠). اصابات الجهاز البولي والجروح في المرضى البالغين. دراسة تطبيقية في مستشفى اليرموك , مجلة ديالى للعلوم الزراعية. المجلد الثاني: ٢٦-٣٧.

محسن, مسلم عيدان, الشمرني, محمد جاسم محمد و علي, زهرة محسن. (٢٠١٤). عزل وتشخيص البكتريا الملوثة لردهات الحروق في محافظة النجف, مجلة علوم الحياة, المجلد السابع (١): ٢٠٧٣-٨٨٥٤.

المصادر الاجنبية

(NCCLs) NationaL committee for clinical Laboratory standards .(2012). Performance standard fpr AntimicrobiaL suscepitibilty Testing ; Twenty second informational Supplement. M100-S22. USA.

Abdullah, R.M.; Samman , S.F. and AL-Shwaikh, A.M. (2010) . Study the effect of antibiotic combination of beta lactam and aminoglycoside with another group of antics and their synergis effect . Journal of Arab Board of Health Specialization ., Vol 11 . No 1.

Abro, S.h.; Wagan , R.; Tunio, M.T.; Kamboh, A.A. and Munir , M. (2009) . Biochemical Activities of Bacterial species isolated from the frozen semen of cattle . Journal of agriculture and Social Scinces ., Vol . 5 , PP. 109-113 .

Akaabi, S.A.G. (2013) . Bacterial isolates and Their Antibiotibiograms of Burn Wound infections in Burns specialist Hospital in Baghdad . J . Baghdad for Sci., 10(2): 331-339 .

Al Derzi, N. A. and MD. (2012). Resistance of pseudomonas infection in the North of Iraq. Emphasis on the potential Role of a combination antibiogram. Iraqi. J. comm. Med; (2):130-134.

AL Imari, H.M.H . (2011) . Acomprative study on the antimicrobial and cytotoxic effects of pyocyanin produced by wild type and mutant of locally isolated pseudomonas aeruginosae M.S.C., thesis . College of science . University of Baghdad .

Al Marzoqi, A.H. and Altaee. (2013) . Pseudomonas aeruginosae : antibiotic resistance pattern to different isolates in AL- Hillah City , Iraq . Journal of National Sciences Research ., 3(3):2225-0921 .

Alaisi, L.M. (2012) . Purification Characterization and Genetic Evaluation of phenazine produced by pseudomonas aeruginosae local isolates . P.hD. thesis , College of Scince ., University of Baghdad .

AL-Bayatt, K.K.; Arajy, K.H. and AL-Nuaemy, S.H. (2012) . Bacteriological and physicochemical studies on Tigris River Near the water purification stations with in Baghdad province and public Health . 8 pages .
AL-Hinani , A.H.; ALsadi, A.M.; ALBahry, S.N.; Mothershaw, A.S.; ALSaid, F.A.; AL Harthi, S.A. and Deadman , M.L. (2010) . Isolation and characterization of pseudomonas aeruginosae with antagonistic Activity against pythium aphanidematum . Journal of plant pathology., 92(3)653-660 .
Al-Saffar, A.K.H. (2005) Genetic study of pseudomonas aeruginosae causing burn and wound infection in Babil Government. M.S.C. thesis. College of science. Al Mustansirya university.
AL-Salihi, S.S. and Hameed, B.H. (2014) . Antibiotic resistant of pseudomonas aeruginosae isolated from different clinical specimens . Kirkuk University Journal / Scientific studies (KUISS) ., 9(2): 15-28 .
Alsamary, I.e.; Alabbasi, A.M. and Najim , J.M . (2010) . Impact of multidrugs resistant bacteria on the pathogenesis of chronic suppurative otitis media . African journal of Microbiology Research ., 4(13): 1373-1382 .
AL-Shamaa, S.D.; Bahjat , S. A. and Nassir, N.S. (2011) . Production of Extracellular pigments as a virulence factor of psuedumonas aeruginosae . College of Basic Education Researchs Journal ., 11(2): 689-697 .
Al-shibib ,A. and Kanela ,S. (1993) . A study of purified payocyanin by pseudomonas aeruginasae properities and grouping . Acta , Microbiol .Pol., 42(3-4) : 275-278 .
ALtaai, M.E.; Aziz, I.H. and Marhoon , A.A . (2014) . Identification psueudomonas aeruginosae by Ibs Rrna gene for Differentiation from other pseudomonas species that isolated from patient and environment . J. Baghdad for Sci ., 11(2): 1028-1032 .
Anvarinejad , M.; Japoni , A.; Rafaat Pour, N.; Mardauh, J.; Abbasi, P.; Shahidi, M.A.; Dehyadegari, M. and Alipour, E. (2014) . Burn patients infecteel with Metallo-Beta- Lactomase-Producing pseudomonas aeruginosae : Multidrug-Resistant strains. Arch Trauma Res ., 3(2):e 18182 .
Arora , P.K.; Sharma , A. and Bae, H. (2015) . Microbial Degradiation of Indole and its Dervatives . Journal of chemistry ., 2: 13 pages .
Arora, S.K.; Neely , A.N.; Blair, B.; Lory, S. and Ramphal, R. (2005) . Role of motility and flagellin glycosyation in the pathogenesis of psueudomonas aeruginosae burn wound infection . infect . Immune ., 73 (7): 4395-4398 .
As Adoga, E.M.; Malu,D.; Badung, B.P.; Obiesie, I.V. and Nwaorug, O.G. (2010) . Swab and aspiration specimen collection methods and

antibiogram in chronic suppurative otitis media at Jos University teaching hospital : wichis superior ? Annals of African Medicine ., 9(4): 230-234 .
Atlas, R.M.; Parks, L.C. and Brown, A. E. (1995). Laboratory manual of experimental microbiology. 1st ed. Mosby, Inc, USA.
Aunchaleeb N.; Sukanga, A.; Chauokporn, P.; Paweena, P.; Saksit , C. and Chalerm, R. (2009) . synthesis isolation of phenazine dervatires and their antimicrobial activity . Walailak J. Sci . and Tech ., 6(1):79-91.

Aziz, L.M.; Hamza, S.J. and Abdul-Rahman , I.A. (2012) . Isolation and characterization of phenazine produced from mutant pseudomonas aeruginisa . Al-Anbar J. Vet. Sci., 5(1): 42-53 .
Anjum,F. and Mir , A. (2010) . Susceptibility pattern of pseudomonas aeruginosa against various antibiotics. African journal of microbiology., 4(10) :1005-1012 .

Baho, S.I.S. (2006) . Genetic study on the Locally isolated pseudomonas aeruginosae and ability in Lectin production . M.S.C. thesis , college of science, AL Nahrain university .
Barakat, K.M.; Mattar,M.Z.; Sabae, S.Z.; Darwesh, O, M. and Hassan, S.H.(2015) . production and characterization bioactive pyocyanin pigment by marine pseudomonas aeruginosae & sh1 . Research Journal of Pharmaceutical, Biological and chemical Science., 6(5): 0975-8585 .
Barrow, G.I. and Feltham.(2004). Cowan and steel's Manual for the identification of MedicaL Bacteria. 3th (ed). Landon.
Bauer,A.; Kirby, W.; Sherri, J. and Turk, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by astandardized single disk method. American JournaL clinical Pathology, 45(4):493-6.
Bayth, N.; Houri-Haddad, Y.; Domb, A.; Khan, W. and Hazan, R. (2015) . Alternative Antimicrobial Approach : Nano-Antimicrobiol Mterials . Evidence-Based Complementry and Alternative Medicine., 1-16 pages .
Benachinmardi, K.K.; Padmavathy, M.; Malini, J. and Naveneeth, B.V. (2014) .prevalence of non fermenting Gram-negative bacilli and their in vitro suscepitibitibility pattern at ateriary care teaching hospital . Original Article ., 41(3): 162-166 .
Bhasin, S.; Shukla, A.N. and Shrivastava, S. (2015) . oberservation on pseudomonas aeruginosae in kishipra River with Relation to Anthropogenic Activities . International Journal of Current Microbiology and Applied Science, 4(4):672-684 .

Bhatt, N.; Patel, K.; Kenaria, H.(2005). Decolorizeation of diazodye Reactive Blue 172 by pseudomonas aeruginosae NBAR12. JBasic Microbial, 45(6):407-418.
Brook,G.F.; Beutel,J.S.; Carrol,K.C and Morse,S.A. (2007) .Jawetz, Melinick, J.L. and Adlebergs Medical Microbiologi, 24th ed. Alang medical book .
Brooks , G.F.; Butel, J.S . and Mors, S.A. (1998) . Medical Microbiology 21st ed . Appleton and Language . Stamford united states el America . p. 145-176, 231-233 .
Brooks, G.F.; Bulel, J.S. and Morse, S.A. (2001) . Medical microbiology 22nd edition 1. Language Medical Books/Mc Graw-Hill .
Brooks, J.; ButeL,K.; carroL, T.; Mietzner, and Mors,S. The staphylococci in Jawetz Melnick & Al denberg's MedicaL MicrobioLogy, McGraw. Hill, P. New York, NY,USA, 25th edition, 2010.
Bsiwal, I; Arora, B.S.; Kasana, D.; Shree N. (2014). Incidence of Multidury Resis tatant pseudomonas aeruginnosae isolated from Burn paitents and Environment of teaching institution. Microbiology science, 8(5):26-29.
Burton, G.R.W. and Engelkirk, P.G. (2001) . Microbiology of Health Scince (6th edition) . Lippincott Williams and Wikins .
Cardazo, V.F.; Olivera, A.; Nihio, E.K.; perugini, M.R.; Andrade, C.G.; Dilveria, W.; Durfan, N.; Andrade, G.; Kobayashi, R., k. k. and Nakazoto, G. (2013). Antibacterial activity of extracellular compounds by a pseudomonas strain against methicillin-resistant staphylococcus aureus (MRSA) strains. Annal of clinical microbiology antimicrobial, 12(12):1476-0711.
Chen, J. and Xiao-Chang, G. (2004) . organoing light emitting device having phenan throline – fused phenazine . VS.patient ., 6:1-4 .
Choi, E.; Kown, H.; Ham, J. and Yong, H. (2009) . 6-Hydroxy methel-1-phenazine- carboxamide and 1,6 phenazine methanol from a marine purple vase sponage . J. Autibiot. 62:621-624 .
Christopher, A.; Mathe,W. and Pollack,S,. (2005) . infection due to pseudomonas spp. Of Harrisons, PRINCIPLE OF INTERINAL MEDICINE , 16th ed . Mc Graw-Hill, Medical Puplishing Division .
Cowell, B.A.; Chen, Y.; Frank, W.; Uallis, J. and Fleizig. (2000). ExoT of Cytotoxic pseudomonas aeruginosae prevents up take by corneal epithdial Cells. Infect. Immune. 68:403-406.
Cox, C.D. (1985). Roleat pyocyanin in the acquisition of iron from trans ferring. Infect .Immune, 52:263-270.
Cheluvappa ,R. (2014) . Standardized chemical synthesis of pseudomonas aeruginosa pyocyanin . Methodex ., 67-73.

Dart J.K. and Seal, D.V . (2001) . Infections caused by pseudomonas aeruginosae . Rev. Infect. Dis. 5(2):279-313 .
Dayasena, R.P., Dayasir, M.B.; J ayasuriya, C. Perera, D.S. (2011). Aetiological agent in chron supperative otots media in sri lanka. Austuralian Medical Research, 4(2):101-4.
De Miguel Martinez, I.; DelRosario Quintana, C.; Balons Rivero, M. and Ramos Macias, A.(2005). Aetiogy and therapeutic considerations in chronic otitis media. Analysis of a5 year period. Acta. Otorrinolaringol. EsP. 56(10):459-462.
Delden , C.V. and Iglewski, B.H. (1998) . Cell to cell signaling and pseudomonas aeruginosae infection . Emerg . infect . Dis ., 4(4):534-539 .
deMacedo, J.L.S. and Santos, J.B. (2005) . Bacterial and fungal colonization of burn wounds memorias do Instituto oswaldo cruz., 100(5):535-539 .
Demiranda, E.j.; De oliveria, G.S.; Roaue , F.L.; sdntos, S.R.; Olmos, R. O. and Lotufo, P.A.(2014)- susceptibility to antibiotics in urinary track infection in a secondary care setting from 2005-2006 and 2010-2011, in Sao Paulo, BRAZil: Data from 11.943 urine cultures. Revlinstmed Trop sao Paulo . 56(4):313-324.
Denning, G.; Iyer, S.; Reszka, K.; Malley, Y.; Rasmussen,G. and Britigan, B. (2003) . phenazine-1-carboylic acid , a secondary metabolite of p. aeruginosae , alters epression of immune-modulatory proteins by human airway epithelial cells . Am. J. Physiol. Lung. 285:584-592 .
Dutta, D.; Cole, N. and Will cox, M. (2012) . Factors influencing bacterial adhesion to contact lenses . Biology and Genetic in vision Research., 18:14-12 .
Ehrlich, R.L. (2003) . Critical linki pseudomonas aeruginosae . Hel . peop . Hael. Comm ., 7(12):1-17 .
Elfouly, M.Z.; Sharaf, A.M.; Shahin, A.A.; ELBialy, H.A. and Omara, A.M. (2014) . Biosynthesis of pyocyanin pigment by pseudomonas aeruginosae . Journal of Radiation Research and Applied Science .,8:36-48 .
Ellen, J.L.; Cowell, B.A.; Evans, D.J. and Fleiszig, M.J. (2003) . contribution of exs A-regulated factors to corneal infection by cytotoxic and pseudomonas aeruginosae in murine scarification model . invest . opthalmol . Uis . Sci ., 44:3292-3898 .
Fazeli, N. and Momtaz, H.(2014). Virulence Gene Profiles of Multidrug-Resistant Pseudomonas areuginosae Ysolated from Iranian Hospital infection, Iran red crescent med J.16(10): e15722.
Fiorillo, L.; Zucker, M. and Sawyer, D. (2001) . The pseudomonas hot-foot syndrome . NEngl . J . Med., 345(5): 335-8 .

Flamm, R.k.; Weaven, M.K.; Thornseberry, C.; Jones, M.E.; Karlowsky, J.A. and Sahm, D.F. (2004) . Factors associated with relative rates of antibiotic resistance in pseudomonas isolates in the clinical laboratories in the united states from 1999 to 2002 . Antimic . Agent Chemother ., 48(7):2431-2436 .

Fletzer, R.F.; Gray, R.D.; Dean, W.L. and Pierce , W.M. (2003) . Alkaline protenase inhibitor of pseudomonas aeruginosae an interaction of native and N.terminally truncated inhibitor proteins with pseudomonas alkaline proteinase . J.Biol-Chem., 278 (28):25952-25957 .

Forbes, B.A.; Sahm. D.F. and Wessifeld, A.S. (2002) . Bialey and scotts diagnostic microbiology . 9th ed . Mosby . V.S.A. Vol. 1:509 .

Forbes,B.; Sahm, D. and Wessfeld, A. "staphylococcus micrococcus and similar organisms" in Bailey and scott's Diagnostic Microbiology, MosByFlesvier, 12th edition, 2007.

Gales, A.C.; Jones, R.N. and Turuidge, J. (2001) . characterization of pseudomonas aeruginosae isolates : occurrence rate , antimicrobial susceptibility patterns and molecular typing in the global sentry antimicrobial surveillance program 1997-1999. Clin . Inf. Dis ., 32(2):146-155 .

Gibson , J.; Sood, A. and Hogan D.A. (2008) . pseudomonas aeruginosae-candida albicans interaction: Localization and Fungal Toxicity of a phenazine Derivative . Applied and Environmental microbiology , 75(2):504-512 .

Giddens, S.; Houliston, G. and Mahanty, H. (2003) . The influence of antibiotic production and pre-emptive colonization on the population dynamics of pantoea agglomeraus (Eriwinia herbicola) . Eh 1087 and Erwinia amylovora in plant Environ . Microbiol . 5:1016-1021 .

Gieser, T.K.; Kazmierczak, B.I.; Ryan, L.K.; Matthay, M.A. and Engel, J.N. (2001) . pseudomonas aeruginosae Exot inhibits invitro lung epithelial wound repair . Cell Microbiol . 3(4): 223-236 .

Goud, M. and Muralikrishnan . (2008) . Biological control of the three phyto pathogenic fungi by pseudomonas flouresens . Internal Journal of Microbiology ., 7(2):1 Volumm 7 Number 2 .

Gul , S.; Eraj , A.; Ashraf , z.(2015). Pseudomonas aeruginosae : Acommon Causative Agent of Earinfections in south Asian children. International Journal of Current Microbiology and Applied sciences , 6(3) : 156-160.

Gul,S. and ayub, M.(2015). Gradual Decline in the Potency of Antipsendomonas Drugs: Evalated by Retrospective comparative studies of susceptibility and Resistant pattern of Antimicrobials a gainst Pseudomonas areuginosae Isolate obtained from Intensive care Unitc. Wourld Journal of Pharmaceutical Sciences, 3(7):1330-1339.

Hahn, H.P. (1997) . The type-4 pilus is the major virulence – associated adhesion of pseudomonas aeruginosae –are view . Gene . 192(1):99-108 .
Hamzah, H.M.; Ali, S.M.; Hamad I.S.(2008). Conjugative plasmid-Borne antibiotic. Resistance Genes in pseudomonas aeruginosae. Basrah Journal of Science. 26(1):11-19.
Hanna, M.I.; El-Hady, M.A.; Elmeadawy, S.A. and kenwy, A.M. (2014). Acoutribution on pseudomonas aeruginosae in fection in African catfish (clarias gariepinus). Research Journal of pharmaceutical, 5(5):0975-8585.
Hass, D. and Defago, G. (2005) . Biological control of soil borne pathogen by flouresent pseudomonas . Nat Rev. Microbiol., 3(4): 307-19 .
Hassan , N. and Kerp,V.(2015). Populat grown and its environment al impact in Syria : Acase study of Lattakia region. African Journal of Agricultural Research, 10(4) : 161-169.
Hassan, K.I.; Abdullah, S.R. and Hawrami, K. (2014) . PCR Ribotyping for Determining the Deversity of some clinical pseudomonas aeruginosae isolates . Journal of AL Nahrain University., 17(2): 159-164 .
Hateet, R.R. (2015). Study of susceptibility patterns of clinical staphylococcus aurous isolated from patien with otitis media in missan. International Journal of advanced research in biological sciences, 2(4): 268-273.
Hauser, A. and Padman, S. (2005) . Sever pseudomonas aeruginosae infection : talking the conundrum of drug resistance postgrad . Med ., 117(1:41-48 .
Head, N.E. and Yu, H. (2004) . Cross-sectional analysis of clinical and environ mental isolates of pseudomonas aeruginosae : biofilm formation , virulence , and genome diversity . Infect. Immune . 72(2):133-144 .
Hendricks, B.D.; Breed, Stanley, R.S. (1957). Bergys manual of Deminative bacteriology. Editeable web page on open Library. Williams & wikins. Baltimore USA. 1134 pages.
Hogan, D.A. and Kolter, R. (2002). Pseudomonas-candida interactions: an ecotogical role for virulence factors. Science, 296:2229-2232.
Hoiby, N. and Koch, C. (1998) . Cystic fibrosis.1.pseudomonas aeruginosae infection in cystic fibrosis and its management . Thorax., 45(11):881-884 .
Hussein, I.A.; Habeeb, K.A. and Jassim, K.A. (2012). Identification of pseudomonas aeruginosae from burn wounds isolated by PCR using Exotoxin A. specific primers. Iraq. J. Biotech, 11(2):282-291.
Hussien, I.A.; Habib, K.A.; Jassim, K.A.(2012). Bacterial colonization of burn wounds J.Baghdad for sci 9(4):623-631.

Huston, W.M.; Potter, A.J.; Jennings, M.P.; Rello, J.; Hauser, A.R. and Mcewan, G. (2004) . survey of ferroxidase expression and siderephore production in clinical isolated of pseudomonas aeruginosae . J. Clin. Microbiol. 42(6):2806-2809 .

Illakiam, D.; Shankar, M.; ponraj, P.; Rajendhran, J. and Gunasekaran P. (2014). Genome Sequencing of among bean plant growth promoting strain of *P.aeruginosae* with bio control Ability. Int. J. Genomics, 123058.

Ijaz, T.; Aujum , A.A.; Aslam, S.; Raja, S.A.; Khawaja, A.R. and Ijaz, S. (2014). Microbial profiling and risk factors assessment for and otitis media otitis Externa. Advancements in life sciences, 1(4):191-196.

Isibor, J.o. and Uwabor, C.(2015). Antibiotic Susceptibility pattern and plasmid profiles of pseudomonas aeruginosae Isolated from some Hospital patients in Benin city, Nigevia. New york science Jouvnal, 8(7):14-19.

Iglewiki, B.H. (1997) . Pseudomonas aeruginosa . from internet explorer . Google .com,httpi// www.lglewski.com .

Jebur, K. S.H.; AL Hamadani, A.H. and Jebur, M.S.H. (2015) . Evaluation of Genetic study and Bacterial Culture for Diagnosis of pseudomonal Eye Infections . International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences ., 4(3):348-356 .

Juayang, A.C.; Reyes, G.B.; Rama, A.J. and Gallega, C.T. (2014). Antibiotic Resistance profiling of staphylococcus aurous isolated from clinical specimens in a tertiary hospital from 2010 to 2012. Interdisciplinary perspectives on infectious Diseases, 4 pages.

Karapagam, S.A.; Sudhakar, T. and Lakshimpak, M. (2013) . microbiosidal response of pyocyanin produced by p. aeruginosae to ward clinical isolate of fungi . International Journal of pharmacy and pharmaceutical Sciences , 5(3): 870-873 .

Karch, H.; Russman, H.; Schmidt, H.; Schwarzkoph, A.; Heesemaun, J. (1995). Long shedding and ClonaL turnover of EHECO 157in diarrhea disease. Jclin. MicrobioL. 33:1602.

KAYA, T.; Aslim, B. and Kariptas, E. (2013). Production of biosurfactant by pseudomonas spp. Isolated from industrial waste in turkey. Turkish journal of biology, 38:307-317.

Kbatri, S.; Lass,J. H.; Heinzel, F.P.; Petroll, W.M.; Gomez, J.; Diaconu, E.; Kalsow, C.M. and Pearlman, E. (2002) . Regulation of endotoxine – induced keratitis by PECAM-1, MIP-2, and toll-like receptor 4. Invest . ophthalmol. Vis. Sci. 43(7):2278-2284 .

Kerr, J.; Taylor, G.; Rutman, A.; Hoiby, N.; Cole, P. and Wilson, R. (1999) . P.aeruginosae pyocyanin and 1-hydroxyphenazine inhibit fungal growth . J.Clin . Patho 1.52:385-387 .

Kerr, J.R.; Taylor, G. W.; Rutman, A.; Hoiby. N.; Cole, P.J. and Wilson, R. (2015). Pseudomonas aeruginosae pyocyanin and 1-hydroxyphenazine inhibit fungal growth. J. clin patho, 52:385-387.
Kiffer, C. Hsiung, A.; Oplustil, C.; Sampaio, J.; Sakagami, E.; Turner, P. and Mendes, C. (2005) . Antimicrobial susceptibility of Gram-negative bacteria in Brazillian hospitals : the MySTIC program Brazil 2003 .Braz. J. Infect . Dis . 9(3)216-224 .
Kim, E.J.; Sabra, W. and Zeng, A. (2003) . Irom deficiency leads to inhibiotion of oxygen transfer and enhanced formation of virulence factors in culture of pseudomonas aeruginosae PAO1 . Microbiol . 149:2627-2634 .
Kim, K. (2000) . Phenazine-1-carboxylic acid resistance in phenazine -1-carboxilic acid producing Bacillus Sp. B-6.J.Biochem . Mol . Biol. 33:332-336 .
Köther, T.; Curty, L.K.; Barja, F.; Delden, C.V. and pechere, J.C. (2000) . Swarming of pseudomonas aeruginosae is dependent on cell signaling and requires flagella and pilli . J. Bacterial., 182(21) : 5990-5996 .
Kulkarni, A.G. and kaliwal, B.B.(2015). Bioremediation of Methomyl by soil isolate-pseudomonas aeruginosae. Journal of Bioremediation & Biodegration, 6:2155-6199.
Kumar ,. S.N.; Nisha , G.V. Sudaresan , A.; Venngopal, V.V.; Kumar, M.M.; Lankalapalli, R.S. and Kumar, B.S. (2014). Syngeristic activity of Phenazine isolated from Pseudomonas aeruginosae in combination with azole aginst candida species. Medical Mycolog Advances Access, VoL. OO, No. 0.1-9.
Kumar, R.; Agarwal, R.K. and Gupta, S. (2015). a microbiological study of chronic supportive otitis media. International journal of recent scientific research, 6(7):5487-5490.
Kumar, R.; Srivastva, P. Rishi, S.; Dahiya, S.S; Hemwani, K.; Nirwan, P.S. (2014). Detection and Autimicrobial Susceptibility pattern of Pseudomonas aeruginosae Isolates in Various clinical samples with special reference to Metallo Beta Lactaruasc from a tertiary Care hospital in Jaipur, India. National Journal of Medical Research, 4(2):128-131.
Lakshmi, V.; Kumari, S. ; Singh, A.; Prabha, C.(2015). Isolation and Characterization of deleterious pseudomonas aeruginosae KC1 from rhizospheric soils and its interaction with weed seedings. Journal of King Saud university-science, 27(2):113-119.
Lamppa, J.W.; Griswold, K.E. (2013) . Alginate lyase Exhibits Catalysis –Independent Biofilm Dispersion and Antibiotic Synergy . Journal . ASM.org, 57(1):137-145 .

Landman , O.; Quale, J.M.; Mayorga, D.; Adedeji, A.; Vangala, K.; Ravishankar, J.; Flores, C. and Brocks, S. (2002) . citywide clonal outbreak of multiresistant Acinetobacter baumannii and pseudomonas aeruginosae in Brooklyn, NY: the preantibiotic era has returned . Arch intern Med ., 162(13):1515-20 .
Lanini, S.; Arezzo, S.A.; Puro, V.; Martini, L.; Imperi, F.; Piselli, P.; Montanaro, M.; Paoletti, S.; Visca, P. Lppolito, G. (2011) . Molecular Epidemiology of pseudomonas aeruginosae Hospital Outbreak Driven by acontaminated Disinfectant-Saop Dispenser. Journal . Pone . 6(2): 17064 .
Laura, P.; Roberta, M.; Lucia, P.; Ceilia, M.; Erneston, G.; Gianfranco, A.; Egidio, R. and Gain, M. (2002) . Emergin extended spectrum B-Lactamases in proteus mirabilis .
Laursen, J. and Nielsen , J. (2004) . Phenazine natural products: Biosynthesis synthetic analogue and biological activity . Chem. Rev., 104:1663-1685 .
Laverty, G.; Gorman , S.P. and S.p. and Gilmore, B.F. (2014) . Biomolecular Mechanism of pseudomonas aeruginosae and Esherichia Coli Bio film formation . Journal/Pathogens, 5:596-632 .
Laverty, G.; Gorman, S.P. and Gilmore, B.F. (2014) . Biomolecular Mechanism of pseudomonas aeruginosae and Escherichia Coli Biofilm formation pathogen ., Rev., 3:2076-0817 .
Lazzaro, F.; Mantengoli, E.; Perillui, M.; Lombard, G.; Orlandi, V.; Orsatti, A.; Amicosarti, G.; Rossolini, G.M. and Taniolo, A. (2001) . Dynamics of anosochemial outbreak of multidrug – resistance pseudomonad aeruginosae producing the PER-1Extended spectrum B-Lactamase . J. Clin . Microbiol . 39(5):1865-1870.
Lennette, E. H.; Balow, S.A; Haussler, W.J. and Shadonyleds. (1985). ManuaL of ClinicaL Microbiology. Amerivan Society for Microbiology. Washington D.C.
Lister. P.D.; wolter, D.J. and Hauson, N.D. (2009). Antibacterial-resistant pseudomonas aeruginosae: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. Clin microbial Rev. 22(4):582-610.
Litovchenko, P.P. and Zabotina, I.V.(1981). Morphology, Cultural, and biochemical properities of culture of pseudomonas aeruginosae Isolated from protein, animals and environment. Zh. Microbial. EpidemioL. Immunobiol. 5:78-84.
Livermore, D.W. (2002) . Multiple Mechanisims of Antimicrobiol Resistance in pseudomonas aeruginosae . Clin . Infect . Dis., 34(5):634-640 .
Lomholt, J.A.; Poulsen, K . and Kilian, M. (2001) . Epidemic population structure of pseudomonas aeruginosae : evidence for a clone

that is pathogenic to the eye and that has a distinct combination of virulence factors . Infect . Immune . 69(10):6224-6295 .
Lu,o.; eggimann, P.; Luyt, C.E.; Wolff, M.; Tamm, M.; Francois, B.; Mercier, E.; Grabino, J.; Laterre, P.F.; Koch, H.; Gafner, V.; Rudolf, M.P.; Mus,E.; Perez, A.; Lazar, H.; Chastre, J. and Rouby, J.J. (2014) . Licensee Bio Med Central Ltd ., 18(1) .
Lualua'a, S.Z. (2009). Extraction and purification of alginate from pseudomonas aeruginosae and study its role in pathogenesis. M.S.C. thesis. College of science. University of Baghdad.
Lutz, J.K. and Lee,J.(2011). Prevalence and Antimicrobial – Resistance of pseudomonas aeruginosae in swimming PooLs and Hot tubs. Int.J. Environ Res public Health. 8(2):554-564.
Lyzak, J.B.; Cannon, C.L. and Pier, G.B. (2000) . Establishment of pseudomonas aeruginosae infection : Lesson from aversatile opportunist . Microbiol . Infect . 2:1051-1060 .
Macfaddin, J.F. (2000) . Biochemical Test for identification of medical bacteria . 3edth . the Williams and Wilkins . Baltimore, USA .
Mahajan-Miklos, S.; Tan, M.W.; Rahme, L.G. and Ausubel, F.M. (1999) .Molecular mechanism of bacterial virulence elucidated using a pseudomonas aeruginosae caenorhabitis elegans pathogenesis model . Cell., 96:47-56 .
Mahon,D.; Lehman, and Manuselis, G. The Staphylococci in Textbook of Diagnostic Microbiology, P. 317, Sunders Elsvier, 4th edition , 2011.
Mai-Prochhow,A.; Bradburg, M.; Ostrikov, K.; Murphy, A.B. (2015). Pseudomonas aeruginosae .

Marchetti, F.; Ronfani, L.; Nibali, S. and Tamburlini, G. (2005) . Delayed prescription may reduce the use of antibiotics for a cute otitis media : a prospective observational study in primary Carc . Arch pediate Adolesc Med ., 159(7):679-84 .
Matsumoto, K. (2004) . Role of bacterial proteases in pseudomonal and serratial keratitis . walter de G ruyter . 385(11):1007-1016 .
Mavordi, D.V.; Blanken feldt, W. and Thomashow, L.S. (2006) . Annu . Rev . Phyto Chem ., 44:417-445 .
Mavrodi, D.; Peever, T.; Mavrodi, O.; Parejko, J.; Raaijmarkers, J.; Lemancean, P.; Mazurier, S.; Heide, L.; Blankenfeldt, W.; Weller, D. and Thomashow, L. (2010) . Deversity and evolution of the phenazine biosynthesis pathway . Appl . Environ. Microbiol., 76(3):866-79 .
Mena, K.D. and Gerba, cp. (2009) . Risk assessment of pseudomonas aeruginosae in water . Rw Einvron Toxicol ., 201:71-115 .

Metha, M.; Dutta, P. and Gupta, V. (2007). Bacterial isolated from burn wound infections and their antibiograms: An eight year study. Indian Journal of plastic surgy, 40(1):25-28.
Mittal, R.; Grati, M.; Gerring, R.; Black welder, P.; Y; D., Li, J.D. and Liu, Z. (2014). In Vitro interaction of pseudomonas with human middle Ear epithelial cells. plos one, 9(3): eg 1885.
Moges, F.; Endris, M.; Belyhun, Y. and worku, W. (Isolation and Characterization of multiple drug resistance bacterial pathogen from waste water in hospital and non-hospital environments, North west Ethiopia. Research Notes, 7:215.
Moha, B.S; Parshanth, L.R; Nambiar, V.; Basararaj, M.; Venkatesh, N.R.; Mahesh, B.; Srikrishna, R. (2013). Prevelance and Antitiotic Sensitivity pattern of psemdomonas areuginosae; an emerging nosocomial pathogen. International Journal of Biological & Medical Research, 4(1):2729-2731.
Mohammed, H.A.; Yossef, H.S. and Mohammed, F.I. (2014) . They cytotoxity effect of pyocyanin on human hepatocellular carcinoma cell line . Journal of Science., 55(2):668-674 .
Mohapatra, S.; Deb, M.; Agrawal, K.; chopra, S. and Gaind, R. (2014). Bacteriological profile of patients and environmental samples in burn intensive care unit: Aplot study from a tertiary care hospital. Original article, 22(1):62-66.
Morales, D.K.; Jacobes, N.J.; Rajamani, S.; Krishnamurthy, M.; Cubillos-Ruiz, J. and Hogan, D.A. (2010) . Antifungal mechanisms by wich a novel pseudomonas aeruginosae phenazine toxin kills candida albicans in biofilm . Mol Microbiol . 178(6):1379-1392 .
Morita, Y.; Sobel, M.L. and Poole, K. (2006) . Antibiotic Inducibility of the MeXy Multidrug Efflux System of pseudomonas aeruginosae : Involvement of the Antibiotic – Inducible PA5471 Gene product . J. Bacteriol., 188(5):1847-1855 .
Moss, M. (2002) . Bacterial pigments Microbiologist , December :10-12 .
Motayo; B.O. Akinbo J.A.; ogiowa, I.J.; Idowu, A.A; Nwanze, J.C.; onoh, C.C.; okerentugba, P.O.; Innocent Adiele, H.C.; okonko, I.O. (2013). Bacteria colonization and Autibiotic susceptibility pattern of wound infections in a hospital in abeokuta. Frontiers in science, 3(1):43-48.
Mulamattahil, S.G.; Bezuidenhout, C.; Mbewe, M. and Ateba C.N. (2014). Isolation of Environmental Bacteria from surface and Drinking water in Mafikeng, South Africa and characteriziation using Their Antibiotic Profile. Journal of pathogens, 11 pages.

Murray, P.R.; Baron, F.J.; Ellen, J. and James, H. (2003) . Manual of clinical microbiology . 8th ed . Vol.1. Asm press, Washington, D.C.P., 719-728 .
Nansathit , A.; Apipattarakul, S.; Phaosiri, C.; Pongdontri, P.; Chanthai, S. and Ruangviyachai, C. (2009) . Synthesis isolation of phenazine Derivatives and their Antimicrobial Activities. WalaikJsci&Tech., 6(1): 79-91 .
Nexa,P.; Lars,E. and Dianne, K. (2006) . Rethinking secondary metabolism : physiological roles phenazine antibiotics . Nat.chem.Biol. 2(2):71-78 .

Ohfuji, K.; Sato, N.; Hamada-Sato, N.; Kobayashi, T.; Imada, C.; Okuma, H. and Watanabe, E. (2004) . construction of a glucose sensor based on a screen – printed electrode and a novel mediator pyocyanin from pseudomonas aeruginosae . Biosensors and oiolectronics., 19:1237-1244 .
Oko, APC, OW, Bst, UA.(2009). Antibiotic Resistance Patteren of Pseudomonas aeruginosae Isolated from clinical Specimens, in A tertiary Hospital in Northeastern Nigeria. The internet Journal of Microbiology, 8(2):1-10.
Okon, K.o.; Balogun, S.T., Askira, U.M.; J:brin, Y.B.; Aguoru, C.U, Isyaka, T.M. and Ghamba P.E. (2014). Restropective analysis of Gram-Negative Bacterial Isolated at atertiary hospital in Maiduguri, Nigeria, Britsh Microbiology Research Journal, 4(11): 1235-1247.
Olayinka, A.T.; onile, B.A. and olayinka, B.O.(2004). Prevalence of multi-drug resistant (MDR) pseudomonas aeruginosae isolates in SurgicaL units of Ahmad u Bello Teaching Hospital Zaria, Nigeria: an indection for effective Controle measures. Ann Afr Med, 3(1):3-16.
Olubanjo, O.O.; Amusa, Y.B.; Oyelami, O.A. and Adejuiygbe, E. (2008) . Epidemiology of chronic suppurative otitis media in Nigerian children . int. J. Otorhinolaryngol., 5.
Onuoha, S.C. and Fatokun, K. (2014). Prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of urinary tract infection (UTI) among pregnant women in Afikpo, ebonyi state, Nigeria. American Journal of life sciences, 2(2): 46-52.
Ouellet, M.M.; Leduc, A.; Nadeau, C.; Barbeau, J. and charette, S.(2014). Pseudomonas aeruginosae isolates from dental unit waterline can be divided in two distinct group, including one displaying phenotypes similar to isolate from cystic fibrosis paitents. Front microbial, 10.3389/ fmicb. 00802.

Panian, K.; Thatheyus, A.J.; Ramga,D. (2014). Bioremoval of Chromium, Nickel and zinc in Electroplating Effluent by pseudomonas aeruginosae. Open Journal of water pollution and Treatment, 1(2):75-82.
Pierson, S. and Pierson, E. (2010) . Metabolism and function of phenazines in bacteria impacton the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes . App1 Microbiol Biotechnol ., 86;1659-1670 .
Pillar, C.M. and Hobden, J. A. (2002). Pseudomonas aeruginosae exotoxin A and Keratitis in mice. Invest. Ophthalmol-vis. Sci. 43:1437-1444.
Pool, K. (2000). Efflux- mediated resistance to fluoroquinolonesin gram-negative bacteria. A.A.C. 44(9):2233-2241.
Prescott, L.M.; Harley, J. P. and Klean, D.A.(eds) . (1999) . Microbiologi 4th ed . WCB . Mc Graw-Hill Beston .
Prescott, L.M.; Harley, L.P. and Klein, D.A. (2005) . Microbiology . 6th ed . the Mc Graw-Hill companies, Inc . USA. Pp . 485-492 .
Prithirviraj, B.; Bais, H.P.; Weir, T.; Suresh, B.; Najarro, E.H.; Dayakar, B.V.; Schweizer, H.P. and Vivauco, J.M. (2005) . Dowuregulation of virulence factors of pseudomonas aeruginosae by Sali cyclic acid attenuated its virulence on Arabidopsis thaliana and caenorhabditis elegans . Infect . Immune . 73(9):5319-5328 .
Priyaja, P.(2012). Pyocyanin (5-methyl-1-hydrophenazine) produced by pseudomonas deruginosae as Antagonastic to Vibrios in Aquculture: over expression, Downstream process and toxicity. M.S.C. thesis, college of science and Technology, cochin university.
Putty, M. and Analyst, E. (2007) . pseudomonas aeruginosae . Enviromental Microbiology Laboratory., 5(3)1-3 .
Qarah, S. (2004) . pseudomonas aeruginosae infections intranet explorer . eMedicin . com .
Ralph,C.(1973). Studies on pigment production by P.aeruginosae. M.SC. thesis. College of science-Texas Tech University.
Ramalo,R.; Cunba, J.; Texierria, P. and Gibbs, P.A.(2002) . Modified pseudomonas agar : New Differentiatial Medium for the Detection / Enumiration of pseudomonas aeruginosae in Mineral Water . Microbial . Meth. 49:69-47 .
Rane, M.R.; Sarode, P.D.; Chaudhari, B.L. and Chincholkar , S.B. (2007). Detection isolation and identification of phenazine -1-carbolylic acid produced by biocontrol strains of pseudomonas aeruginosae . Journal Scintific and industrial Resarch., 66:627-631 .
Remold, S.K.; purdy-Gibson, M.E.; France, M.T. and Hundley, T. (2015). Pseudomonas putida and pseudomonas fluorescens species group Recovery from human homomes uaries seasonally and by Environment. Plos one, 10(5):e0127704.

Rezaee, M.A.; Nejacl, Q.B.; Pirayeh, Sh.N. and Owlia, O. (2002) . Higher aminoglycoside resistance in mucoid pseudomonas aeruginosae than in non-mucoid strains . p.owlia phD. Department of microbiology , factualy of medicine, shahed university., No 29 .
Rihard, J.R.; Sahm, D.F. and Courvalin, P (1999) . Mechanisim of resistance to antimicrobial agents . In: Murray P.R.; Barron, E. J.; Pfaller, M.A.; Tenover . F.C . and Yollken, R.H. Manual of clinical microbiology. (5^{th} edition) . ASM press .
Saha, S.; Thavas, R. and Jayalakshmi, S. (2008) . phenazine pigments from pseudomonas aeruginosae and their application as antibacterial agent and food colourants . Research Journal of Microbiology., 3(3):122-128 .
Salih, H.A.; Abdulbary, M. and Abdulrida, A.S. (2011) . Susceptibility of pseudomonas aeruginosae isolated from urine to some antibiotics . AL Qadisiya Journal of vet medical Science ., 10(2):68-88 .
Sasaki, A.K.; Nishi, I.; Yonemura, N.; Takatsuka, H.; Mutoh, K.; Matsumoto, K.; Asari, S. and Taninara, H. (2005) . characteristics of pseudomonas corneal infection related to or thokeratology . Cornea ., 24(7):861-863 .
Satti, A.A.; faidah, H.S. (2015). Environmental prevalence of pathogens in different Drinking water Resources in Makkah city (Kingdom of Saudi Arabia). Current world Environment, online ISSN:2320-8031.
Seema, D.; ALam, M.; Kalani, K.; Khaliq, A.; Samad, A.; Srivastava, S.K. and patra, D.D. (2012) . production purification and characterizabioy of Antifungal Metabolite from pseudomonas aeruginosae SD12, a New strain obtained from Tahnery waste polluted soil. J. microbial . Biotechnol., 22(5):674-683 .
Sewell, A.; Dunmire, J.; Wehmann, M.; Row, T. and Bouhenni, R . (2014) . proteomic analysis of keratitis – associated pseudomonas aeruginosae . Biology and Genetic in vision Research., 20:1182-1191 .
Shahid, M. and Malik,A. (2005) . Resestance due to aminoglycoside modifying enzymes in pseudomonas aeruginosae isolated from burns paitients . India J. Med . Res. 122:324-329 .
Shi, H.; Chen, Z.; and Kan, J. (2015). Development of Loop- mediated iso they mal amplification assays for genotyping of type III secretion system in pseudomonas aeruginosae. Lett App Microbial. 61(4):36-366.
Smith , E.E.; Sims, E.H.; Spencer, D.H.; Kaule, R. and Olson, M.V. Evidence for diversifying selection at the pyoverdine Locus of pseudomonas aeruginosae . J. Bacteriol., 187(6):2138-2147 .
Sobel, M.L.; Neshat, S. and Poole, K. (2005) . Mutation in PA2491 (mexs) promote MexT-Dependent mexEF-OPVN Expression and Multidrug Resistance in aclinical strain of pseudomonas aeruginosae . J. Bacteriol. 187:1246-1253 .

Son, M.S.; Matthews, W.J.; Kang, Y.; Nguyen, D.T . and Hoang, T.T . (2014) . Invivo Evidence of pseudomonas aeruginosae Nutrient Acquisition and pathogenesis in the lung of cystic fibrosis patients . American Society for Microbiology ., 25 (11):5313-5224 .
Songer, G. (2004) . Virulence factor and pathogensis of pseudomonas aeruginosae . The University of Arizona .
Sonneleitner, E.; Schuster, M.; Domenigg, T.S.; Greenberg, E.P.; Bläsi, U. (2006). Hfq-dependent alterations of the trancriptome pro file and effects on quorum Sousing in pseudomonas aeruginosae. Molecular Microbiologi, 59(5):1542-1558.
Sorhabi, M.; Zhang, L.; Zhang, K.; Ahmetagic, A . and Qwei, M. (2014) .Volatile Organic Compound as Novel Markers for the Detection of Bacterial infections . Clinical Microbiology ., 15(3):2327-5073 .
Sousa, A.M. and Pereira, M.O. (2014) . pseudomonas aeruginosae Diversification during infection Development in cystic fibrosis Lungs . AReview . Journal/Pathogenesis., 3:680-703 .
Stephan, H.G. and Hawkey, M.P. (2006) . principles and practice of clinical 2ed . John Wiley and Sous, Ltdp. 427-443 .
Su, S.; Panmanee, W.; Wilson, J.J., Mahtani, H.K.; Li, Q.; Vanderwielen, B.D.; Makris, T.M.; Rogers, M.; McDanoel, C.; Lipscomb, J.D., Irvin, R.T.; schurr, M.J.; Lancaster, J.R.Jr, Kovall, R.A. and HasseH, D.J.(2014). Catalase (KatA) Playrole in protection aginst Anaerobic Nitvic oxide in pseudomonas aeruginosae. Plos one, 9(3).
Sudhakar, T.; Karapagam, S. and Shiyama, S. (2013) . Analysis of pyocyanin compound and its antagonistic activity against phytopathogens . International of Chem Tech Research ., 5:1101-1106 .
Sulbah, B.; Tarun, O.; suresh, K.; Amit, S. and pratibha. (2013). Changing microbiological Trands in case of chronic supportive otitis media patients. International journal of current research and Review, 5(15):76-81.
Sundstorm, J.; Jacobson, K.; Munch, J.; Wikland, F. and Ringertz, S. (1996) . pseudomonas aeruginosae otitis externa . Aparticular Variety the bacteria . Arch otolarngol. Hed . Neck. Surg., 112(8):833-836 .
Tjan Elder, J. (1999) . pseudomonas aeruginosae in a nosocomial infection . A survey of resistance in Belagian hospital . J. A ntimicrob. Chemother. 51(21):347-352 .
Todar, K. (2008) . pseudomonas aeruginosae . Todar online Textbook of Bacteriology . University of Wiscon-Madison Department . of Bacteriology .
Todar. (2004) . Textbook of Bacteriology online , Wisconsin – Madison Dept . of Bacteriology .

Torres, A.; Ferrer, M. and Badia, J.R. (2010) . Treatment Guidelines and out Comes of Hospital . A cquired and Ventilator-Associated pneumonia . Oxford Journals., 51(1):48-53 .
Tyebi, Z.; seyedjavadi, S.S.; Goudarzi, M.; Rahimi, M.K.; Boromandi, S.; bostanbad, S.K.; Mirzaili, and mahdiyoun, M. (2014). Frequency and antibiotic resistance pattern in gram positive Uropathogen isolated from hospitalized patients with urinary tract infection in Tehran, Iran. Journal of Genes, Microbes and Immunity, 9 pages.
Uzair,B.; Ahmed, N.; Valimohammad, F. and Ahmad, V.U. (2008) . Detection isolation and partial characterization of Antifungat compounds produced by pseudomonas aeruginosae CMG1055. J. Chem. Soc. Pak., 30(4):649-653 .
Vanconcelos, U.; Lima, M.A. and Calazaus, G.M. (2010). Pseudomonas aeruginosae associated with negative interaction on coliform bacteria growth. SENRA academic publisher, Burnaby, british Columbia, 4(2):1133-1139.
Verhaz, A. ; Skrbic; R.; Rakic- Music, M. and Sabo, A. (2003). Catheter related urinary in fection at the clinical center in Banjaluka. Med- Preg1. 56(10):460-4.
Verma, A.; Arora,S.K.; Kuravi, S.K. and Ramphal, R. (2005) . Roles of specific amino acids in the N-terminus of pseudomonas aeruginosae flagellin and of flagellin glycosylation in the innate immune response . infect . Immune . 37912):8273-8246 .
Vissiller, S.; Delolne, F.; Bernillon, J.; Saulneir, J. and Wallach , J. (2001) . Hydrolysis of glycin-containing elastin pentapeptides by Las A, Metallo-Beta Lactomase from pseudomonas aeruginosae . Eur. J. Bio chem ., 268:1049-1057 .
Wairs, B.A. and Ibe, S.N. (2006) . Bacteriology of chronic discharging ears in port Harcourt . Nigeria . West Afr JMed., 25(3)219-22 .
Warrington, P.D. and RPBio,. D.(2001). Water Quality Criteria for Microbiological Indicators. Environment al protection Division, No2.
Whychoff, J.T.; Thomas, B.; Hasset, J.D. and Wozniak, J.D. (2002) . static growth of mucoid p.aeruginosae select for non-mucoid variants that have a cquired flagellum dependent motility . J. Microbiol . 148:3423-3430 .
Xu, Lo; wang, F.; Shen, Y.; Hou, H.; Liu, W.; Liu, C.; Jain, C.; wang, Y.; sun, M. and sun; Z.(2014). Pseudomonas aeruginosae inhibits the growth of pathogenic. Fungi: in vitro and in vivo studies. Experimental and therapeutic medicine 7:1516-1520.
Yasidi, B.M; Akawn, D.B.; Oinoma, O.j.; Bara, J.Y.; Mohammed, V.H.; Mohammed, G.N.; Ali, Z.B.; Joshua, L.; Ibrahim, H. ; Ali, Z.B.; okwong, O.K.(2015). Retrospective analysis of bacterial pathogens

Isolated from wound infection at atertiary hospital in Nguru, Yobe state Nigeria. American Journal of Bio medical and life science 3(1):1-6.
Zang, Y.H.; Deng, S.L. and Liu, J.W.(2005). Analysis of susceptibility of pseudomonas aeruginosae isolated from burn toward antibiotics in vitro Zhonghue. Shaeo. Shang. Za. Zhi. 12(2):104-106.

الملاحق

Appendix

الملاحق Appendix

ملحق رقم (١) استمارة المعلومات الخاصة بالمرضى

رقم العينة :-

اسم المريض :-

العمر :-

السكن :-

نـوع الـعـيـنـــة :-

تاريخ جمع العينة :-

ملحق رقم (٢) الاختبارات الكيموحيوية لبكتريا *P.flourescens*

Test	Result
Gram stain	-(Rod)
Catalase	+
Oxidase	+
Indole production	-
VP	-
MR	-
Starch hydrolysis	-
Cetrimide agar	+
King A	-
King B	+ yellow pigment

Urease	+
Cimmon citrate	+
النمو عند درجة ٤ م°	+
النمو عند درجة ٤٢ م°	–
Motility	+

ملحق رقم (٣) الاختبارات الكيموحيوية لبكتريا *S.aureus*

Test	E.coli	S.aureus
Gram stain	–(rod)	+(CoCCi)
Catalase	+	+
Oxidase	–	–
Indole production	+	–
VP	(– Ve)	+
MR	(+ Ve)	+
Urease	–Ve	+
Cimmon citrate	–Ve	+
Motility	+	–

ملحق رقم (٤) اقراص مضادات الحياة المستخدمة واقطار منطقة التثبيط (NCCLs , ٢٠١٢)

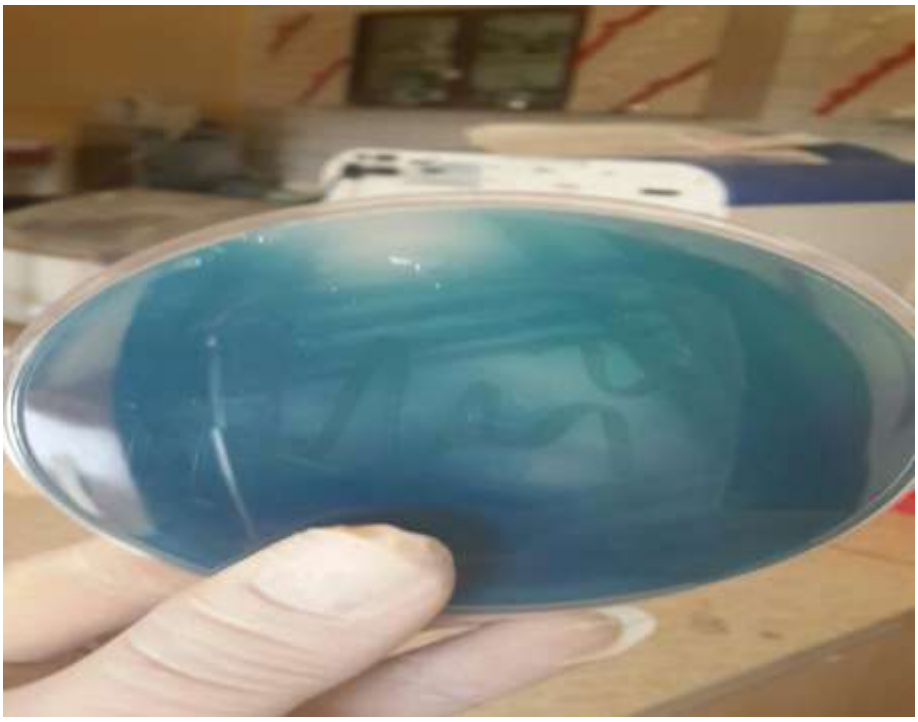
			اقطار منطقة التثبيط		
المضاد الحيوي	الرمز	تركيز القرص	R	I	S
Amoxicillin	AMX	25 mg[c]	11	12–13	١٤
Cefotoaxime	CTX	30 mg[c]	≤ 14	15–22	≥ ٢٣
Pipercillin	PRL	100 mg[c]	≤ ١٤	15–20	≥ ٢١
Ciprofloxacin	CIP	5 mg[c]	≤ ١٥	16–20	≥ ٢١
Gentamicin	CN	10 mg[c]	≤ ١٢	13–14	≥ ١٥
Ofloxacin	OF	5 mg[c]	≤ 12	13–15	≥ ١٦

R = Resistant مقاومة

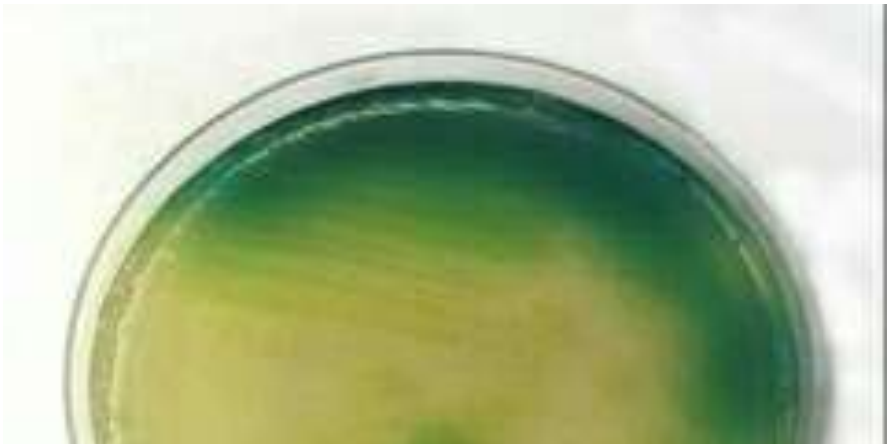
I = Intermediate متوسط مقاومة

S = Sensitive حساسة

ملحق رقم (٥) وسط الحد الادنى من الكليسرول والالنين المنماة عليه بكتريا ***P.aeruginosa*** عند حضنها بدرجة (٣٧ْ) و لمدة ٢٤ ساعة



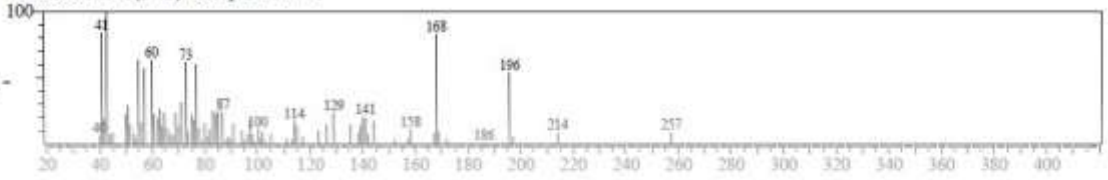
ملحق رقم (٦) وسط اكار السترمايد المنماة عليه بكتريا *P.aeruginosa* للعزلات السريرية والبيئية



ملحق رقم (٧) نتائج تحليل مكونات صبغة البايوسيانين باستخدام جهاز (GC-MSS)

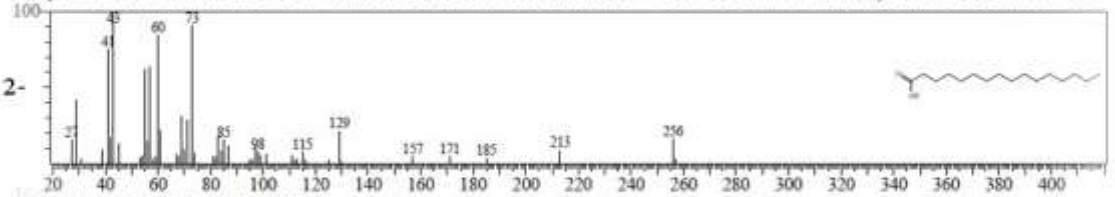
<< Target >>
Line#:14 R.Time:18.092(Scan#:1932) MassPeaks:83
RawMode:Averaged 17.875-18.158(1906-1940) BasePeak:43.00(4154)
BG Mode:17.975(1918) Group 1 - Event 1

1-



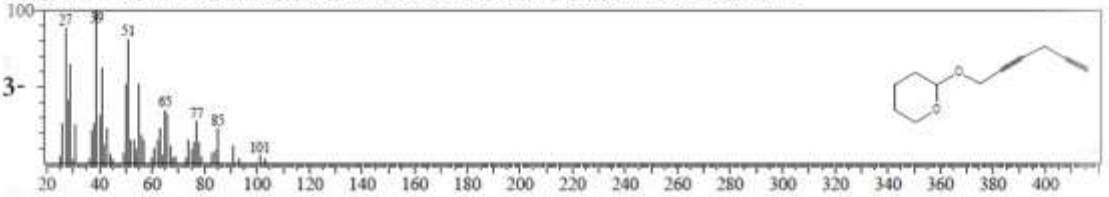
Hit#:2 Entry:80732 Library:NIST08.LIB
SI:63 Formula:C16H32O2 CAS:57-10-3 MolWeight:256 RetIndex:1968
CompName:n-Hexadecanoic acid $$ Hexadecanoic acid $$ n-Hexadecoic acid $$ Palmitic acid $$ Pentadecanecarboxylic acid $$ 1-Pentadecanecarb

2-



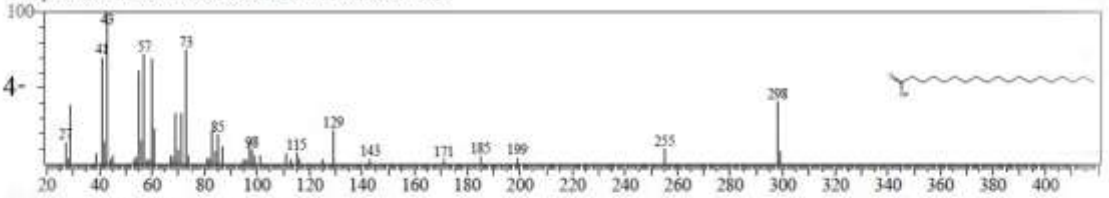
Hit#:3 Entry:29732 Library:NIST08.LIB
SI:62 Formula:C11H14O2 CAS:40924-58-1 MolWeight:178 RetIndex:1358
CompName:2H-Pyran, 2-(2,5-hexadiynyloxy)tetrahydro- $$ 2-(2,5-Hexadiynyloxy)tetrahydro-2H-pyran # $$

3-



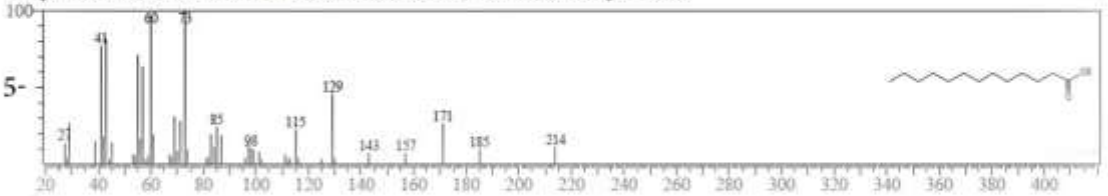
Hit#:4 Entry:110794 Library:NIST08.LIB
SI:62 Formula:C19H38O2 CAS:646-30-0 MolWeight:298 RetIndex:2266
CompName:Nonadecanoic acid $$ n-Nonadecanoic acid $$

4-



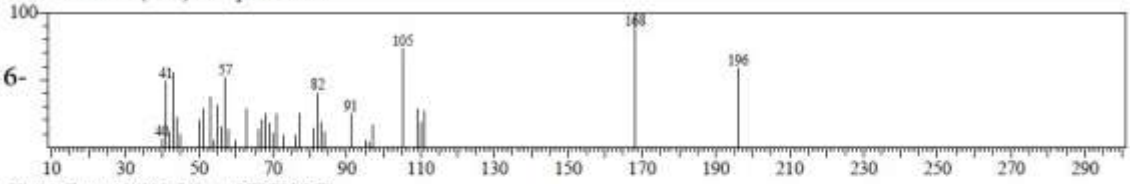
Hit#:5 Entry:52033 Library:NIST08.LIB
SI:62 Formula:C13H26O2 CAS:638-53-9 MolWeight:214 RetIndex:1670
CompName:Tridecanoic acid $$ n-Tridecanoic acid $$ n-Tridecoic acid $$ Tridecylic acid $$

5-



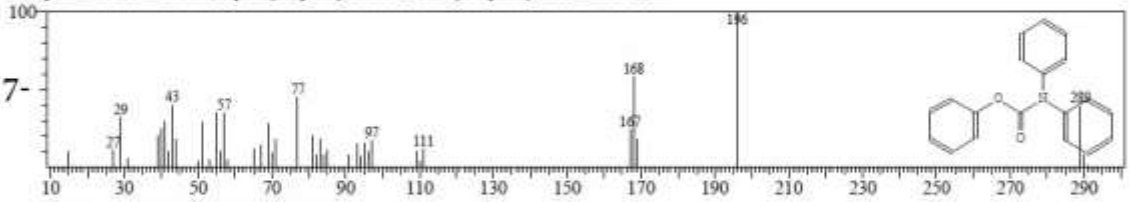
<< Target >>
Line#:12 R.Time:16.917(Scan#:1791) MassPeaks:39
RawMode:Averaged 16.850-16.967(1783-1797) BasePeak:168.15(1597)
BG Mode:16.942(1794) Group 1 - Event 1

6-



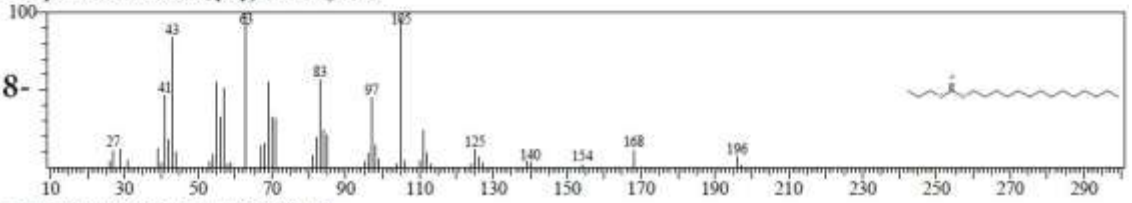
Hit#:1 Entry:104229 Library:NIST08.LIB
SI:71 Formula:C19H15NO2 CAS:5416-45-5 MolWeight:289 RetIndex:2356
CompName:Carbamic acid, diphenyl-, phenyl ester $$ Phenyl diphenylcarbamate # $$

7-



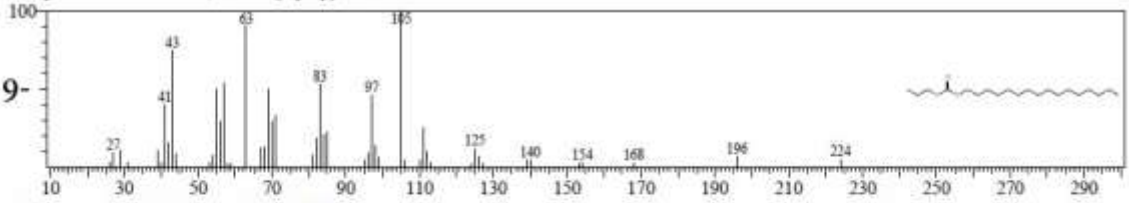
Hit#:2 Entry:112214 Library:NIST08.LIB
SI:71 Formula:C18H36O3 CAS:0-00-0 MolWeight:300 RetIndex:2054
CompName:Carbonic acid, propyl tetradecyl ester

8-



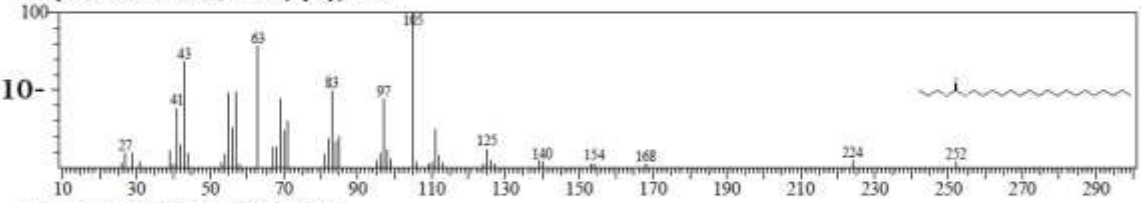
Hit#:3 Entry:131459 Library:NIST08.LIB
SI:70 Formula:C20H40O3 CAS:0-00-0 MolWeight:328 RetIndex:2252
CompName:Carbonic acid, hexadecyl propyl ester

9-



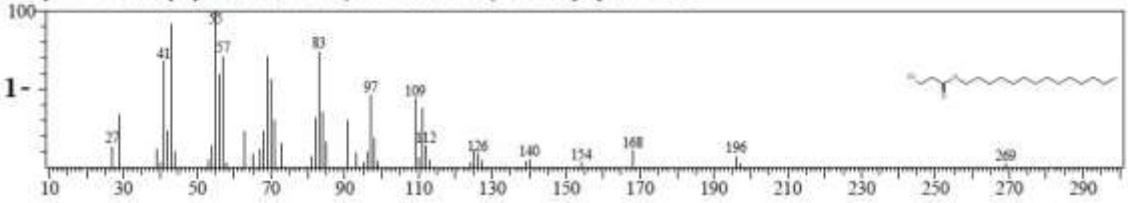
Hit#:4 Entry:148484 Library:NIST08.LIB
SI:70 Formula:C22H44O3 CAS:0-00-0 MolWeight:356 RetIndex:2451
CompName:Carbonic acid, octadecyl propyl ester

10-



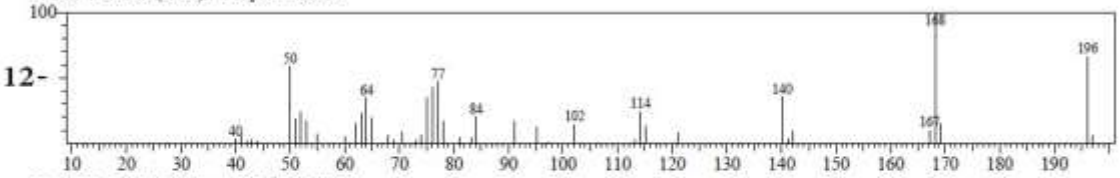
Hit#:5 Entry:114836 Library:NIST08.LIB
SI:69 Formula:C17H33ClO2 CAS:64120-16-7 MolWeight:304 RetIndex:2104
CompName:3-Chloropropionic acid, tetradecyl ester $$ Tetradecyl 3-chloropropanoate # $$

11-



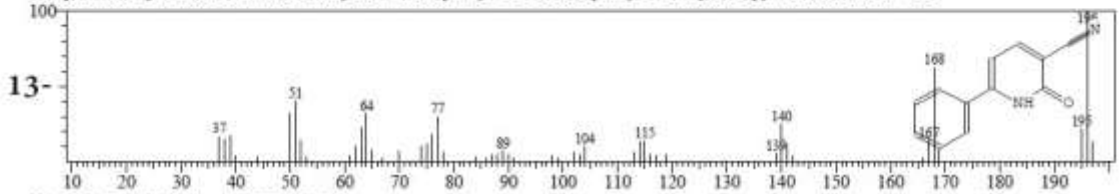
<< Target >>
Line#:8 R.Time:18.050(Scan#:1927) MassPeaks:44
RawMode:Averaged 17.983-18.100(1919-1933) BasePeak:168.15(2247)
BG Mode:18.100(1933) Group 1 - Event 1

12-



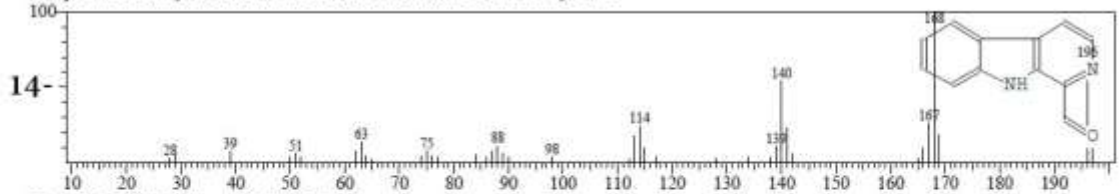
Hit#:1 Entry:40460 Library:NIST08.LIB
SI:77 Formula:C12H8N2O CAS:43083-13-2 MolWeight:196 RetIndex:1845
CompName:3-Pyridinecarbonitrile, 1,2-dihydro-2-oxo-6-phenyl- $$ 2-Oxo-6-phenyl-1,2-dihydro-3-pyridinecarbonitrile # $$

13-



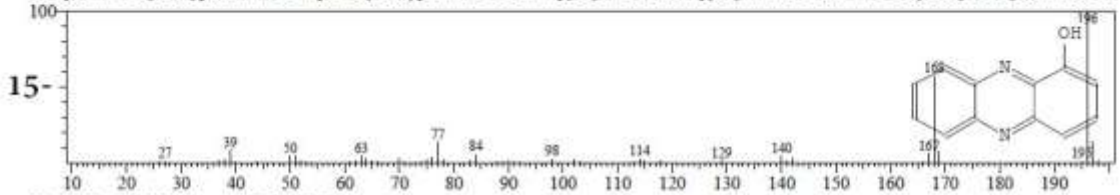
Hit#:2 Entry:40457 Library:NIST08.LIB
SI:69 Formula:C12H8N2O CAS:20127-63-3 MolWeight:196 RetIndex:1935
CompName:1-Formyl-.beta.-carboline $$ 9H-Beta-carboline-1-carbaldehyde # $$

14-



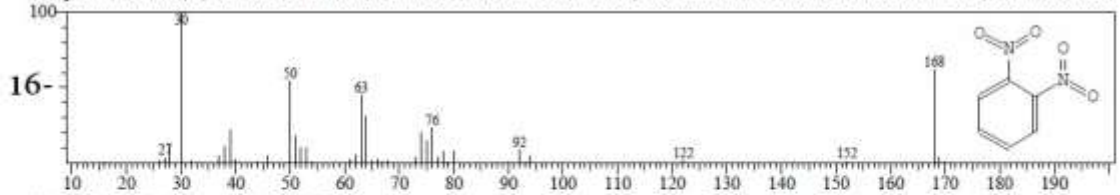
Hit#:3 Entry:40462 Library:NIST08.LIB
SI:67 Formula:C12H8N2O CAS:528-71-2 MolWeight:196 RetIndex:1991
CompName:1-Hydroxyphenazine $$ .alpha.-Hydroxyphenazine $$ Hemipyocyanin $$ Hemipyocyanine $$ Phenazine, 1-hydroxy- $$ Pyoxanthose $$

15-



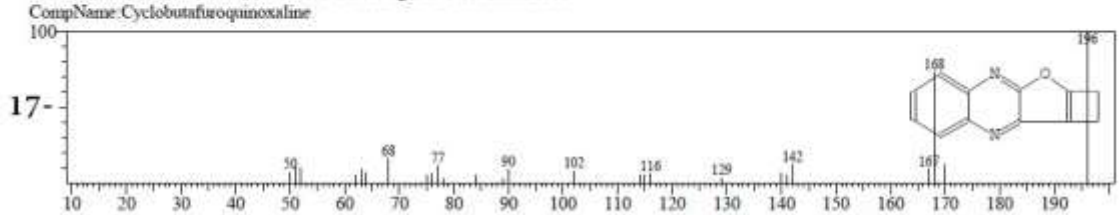
Hit#:4 Entry:23783 Library:NIST08.LIB
SI:66 Formula:C6H4N2O4 CAS:528-29-0 MolWeight:168 RetIndex:1471
CompName:Benzene, 1,2-dinitro- $$ Benzene, o-dinitro- $$ o-Dinitrobenzene $$ 1,2-Dinitrobenzene $$ ortho-Dinitrobenzene $$ 1,2-Dinitrobenzol $

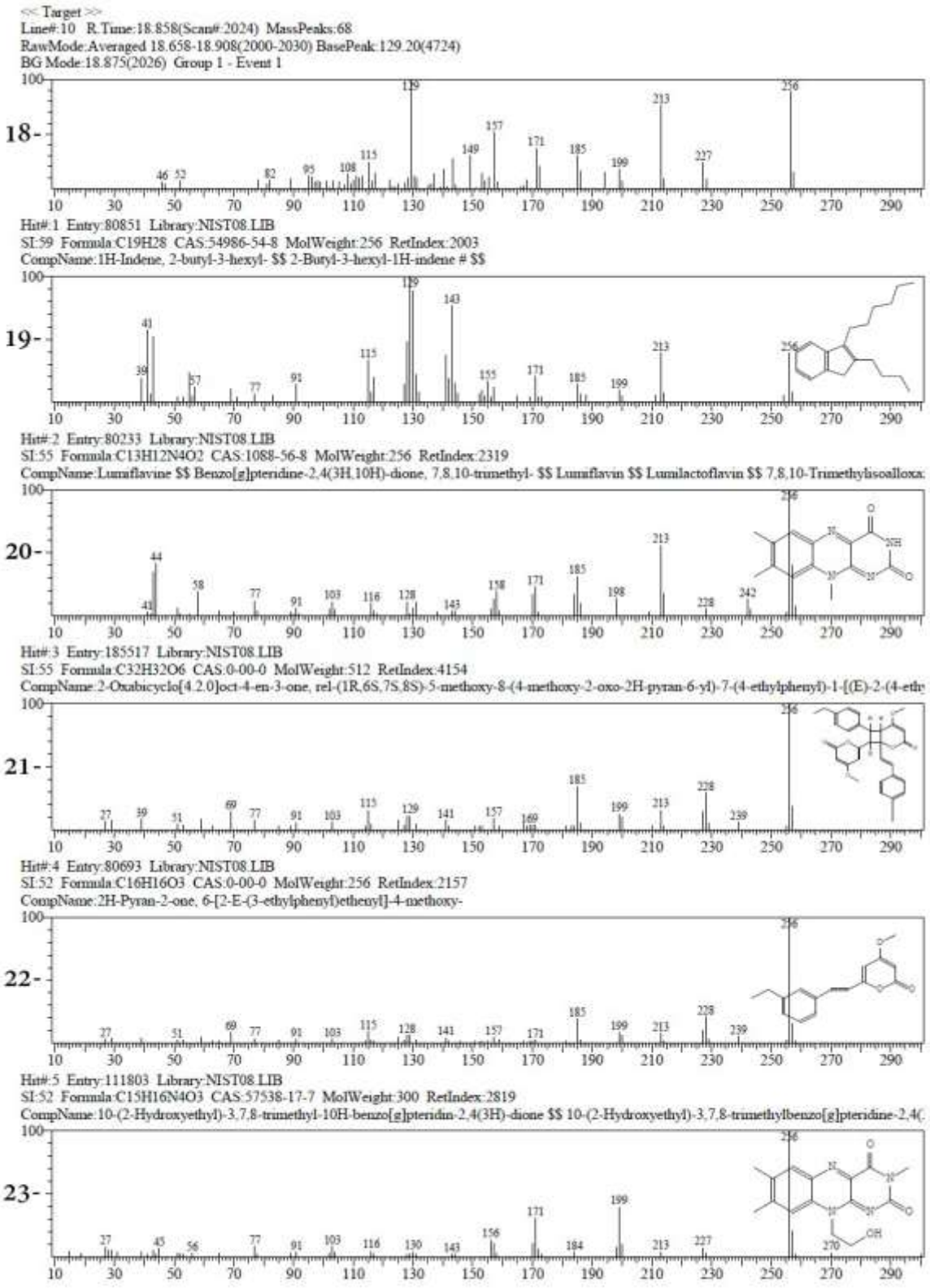
16-



Hit#:5 Entry:40461 Library:NIST08.LIB
SI:66 Formula:C12H8N2O CAS:0-00-0 MolWeight:196 RetIndex:1632
CompName:Cyclobutafuroquinoxaline

17-



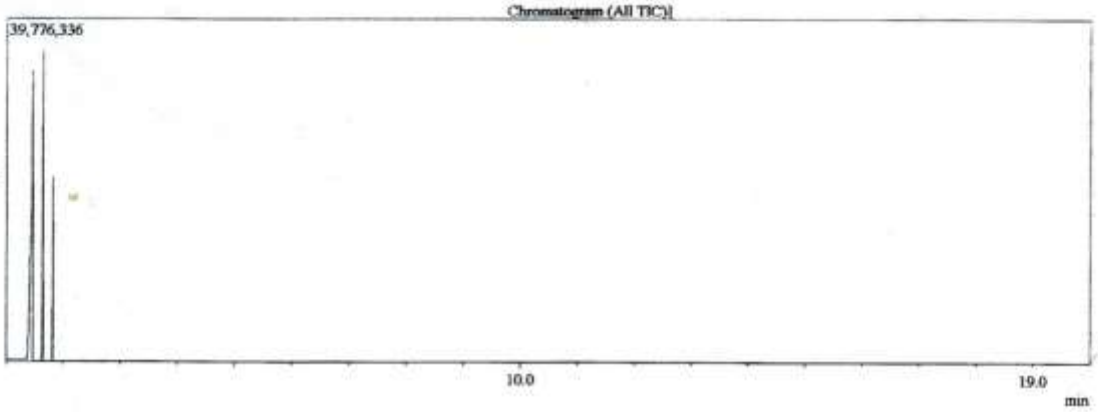


ملحق (٨) نتائج تحليل مكونات صبغة الفينازين باستخدام جهاز

(GC–mass)

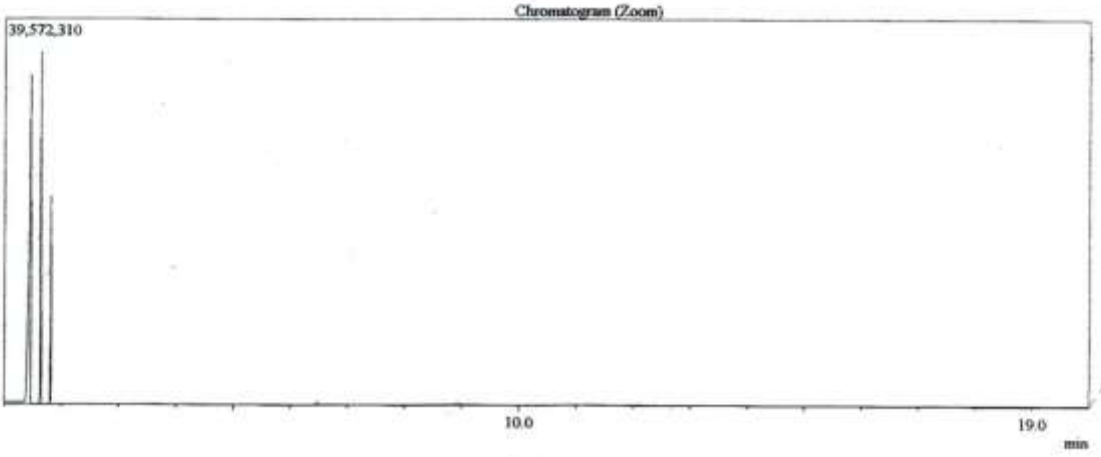
C:\GCMSsolution\Data\Project1\esaden.QGD

Chromatogram (All TIC)]



1-

Chromatogram (Zoom)



2-

Spectrum

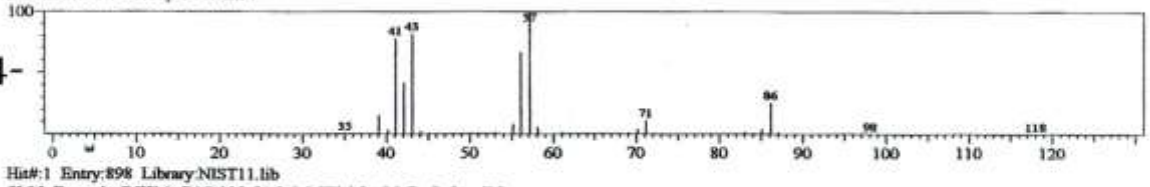
Library Search

<< Target >>

Line#:2 R.Time:1.850(Scan#:171) MassPeaks:65

RawMode:Single 1.850(171) BasePeak:57.15(10000)

BG Mode:None Group 1 - Event 1



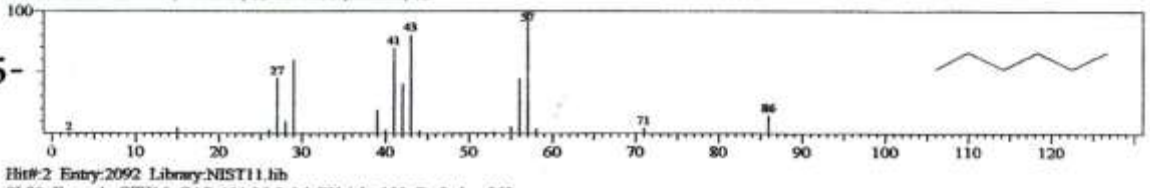
4-

3-

Hit#:1 Entry:898 Library:NIST11.lib

SI:95 Formula:C6H14 CAS:110-54-3 MolWeight:86 RetIndex:618

CompName:n-Hexane $$ Hexane $$ Skellysolve B $$ n-C6H14 $$ Esani $$ Heksan $$ Hexanen $$ Hexyl hydride $$ Gettysolve-B $$ NCI-C60571 $$ NSC 68 472 $$ Exxsol Hexane (Salt/Mix) $$ UN 1208 (Related) $$

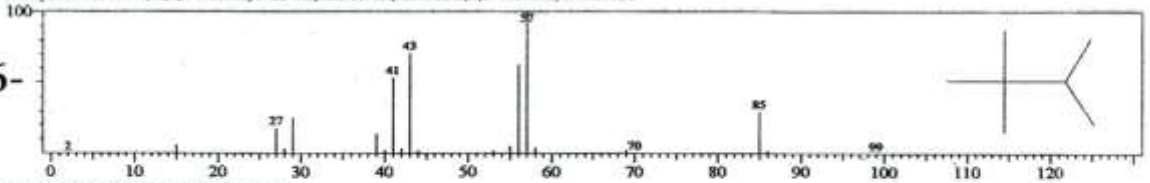


5-

Hit#:2 Entry:2092 Library:NIST11.lib

SI:90 Formula:C7H16 CAS:464-06-2 MolWeight:100 RetIndex:568

CompName:Butane, 2,2,3-trimethyl- $$ Triptan $$ Triptane $$ 2,2,3-Trimethylbutane $$



6-

Hit#:3 Entry:2090 Library:NIST11.lib

SI:89 Formula:C7H16 CAS:565-59-3 MolWeight:100 RetIndex:589

CompName:Pentane, 2,3-dimethyl- $$ 2,3-Dimethylpentane $$ 3,4-Dimethylpentane $$



7-

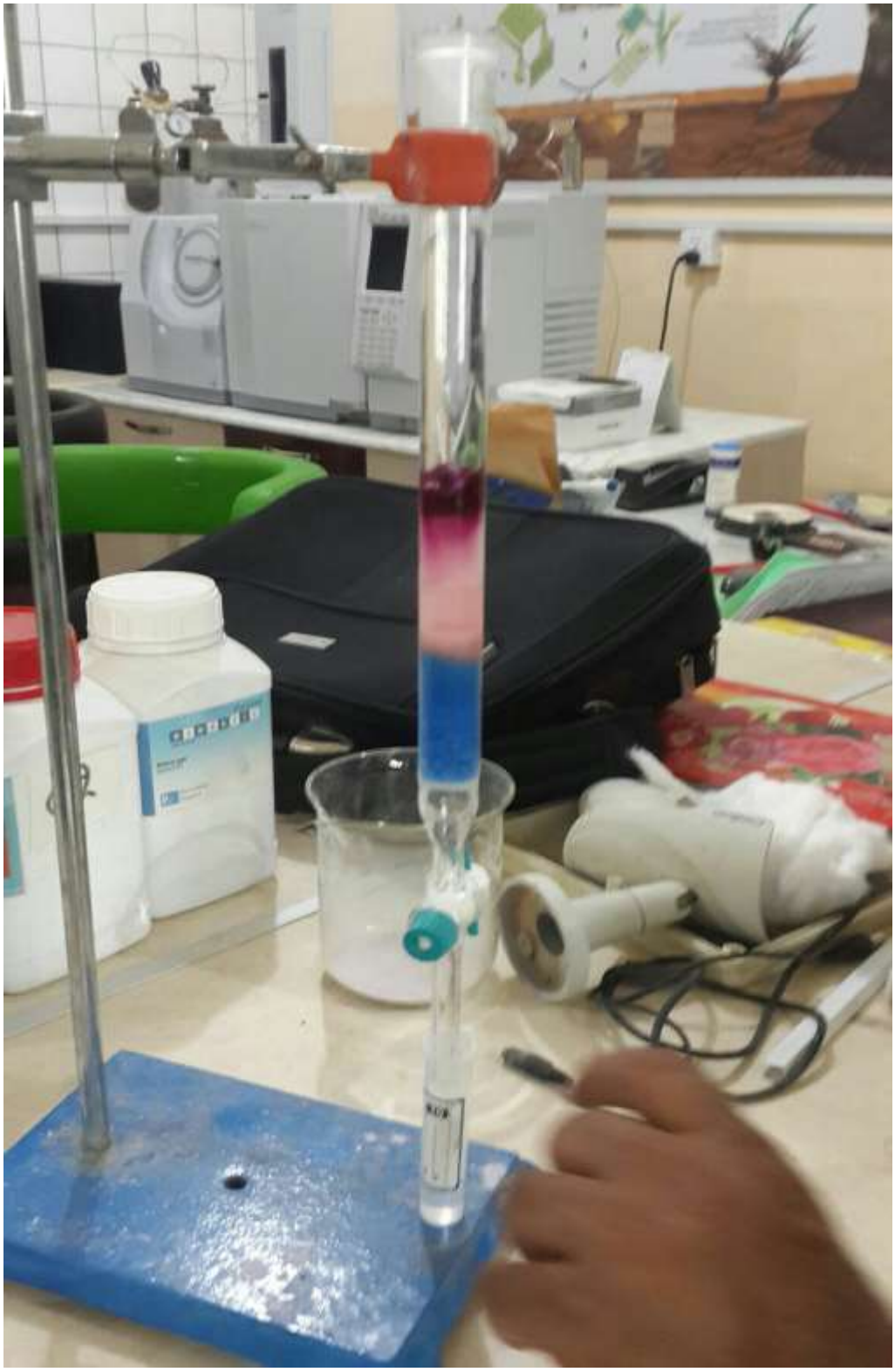
ملحق رقم (٩) استخلاص البايوسيانين من الوسط الصلب







ملحق رقم (١١) استخلاص صبغة الفينازين



Summary

The study investigate one hundred thirty clinical, ecological specimens wich includes urine, burn, wound, ear, soil, water and wasts.

The specimens were collected from different sites, hospitals and ecology in Diyala provenance, Al Zahraa hospital for children, Al Muqdadia hospital and Baquba hospital during the academic year 2014-2015.

Ecological sites includes Soil for Al Muqdadia, Abu saida river, Wasts from Al qadisia factory.

These sample of clinical source includes: (54,38,5,3) for urine, ear, wounds, burns respectively, while the samples of ecological source include : (15,10,5) for soil, water wasts respectively.

In this study we characterize (40) isolate for *P.aeruginosae,* 40 isolate for *E.coli*, 40 isolate for *S.aureus* and 10 isolate for *P.flourescens.*

These result reveal the maximum rate isolate of *P.aeruginosae* were from UTI infections, ear infections, wound infections and burn infections, (42.5%, 7.5%, 5%) respectively, but in the ecological sources the maximum rates of *P.aeruginosae* were from soil. Water and later wasts. (12.5%, 12.5%, 5%).

These result showed that *P.aeruginosae* was predominant on *S.aureus* in burn infections : (5%, 2.5%) in sequence, while in the wound infections *P.aeruginosae* .

***P.aeruginosae* was predominant on *S.aureus* (7.5%, 5%) in sequence, the ecological specimens showed that *P.aeruginosae* was equal to *E.coli* in water samples: (12.5%, 12.5%).**

Sensitivity of local isolates was examined against 6 antibiotics, the result showed different and multi resistance patterns to these antibiotics.

The clinical, ecological samples were resistant against ciprofloxacin antibiotic (100%), but only clinical samples showed high resistance against amoxicillin, gentamycin(100%).

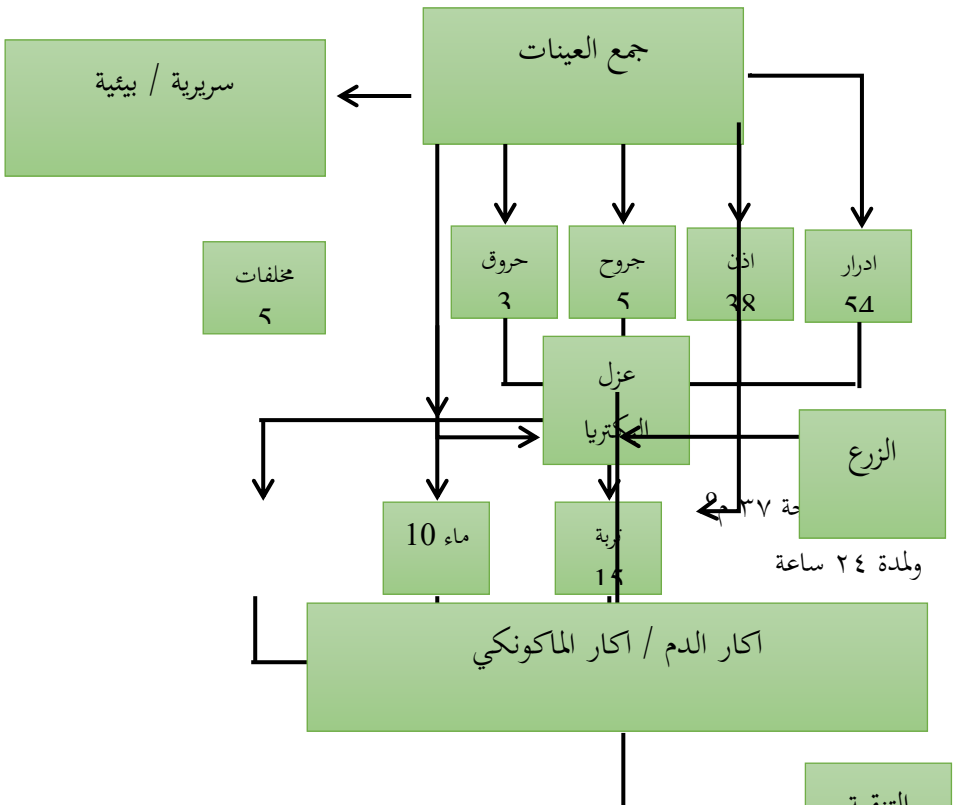
The ecological sample showed very sensitive against amoxicillin, gentamycin(100%), while the ecological, clinical samples showed that very sensitive against ofloxacin, cefotaxime, piperacillin (100%).

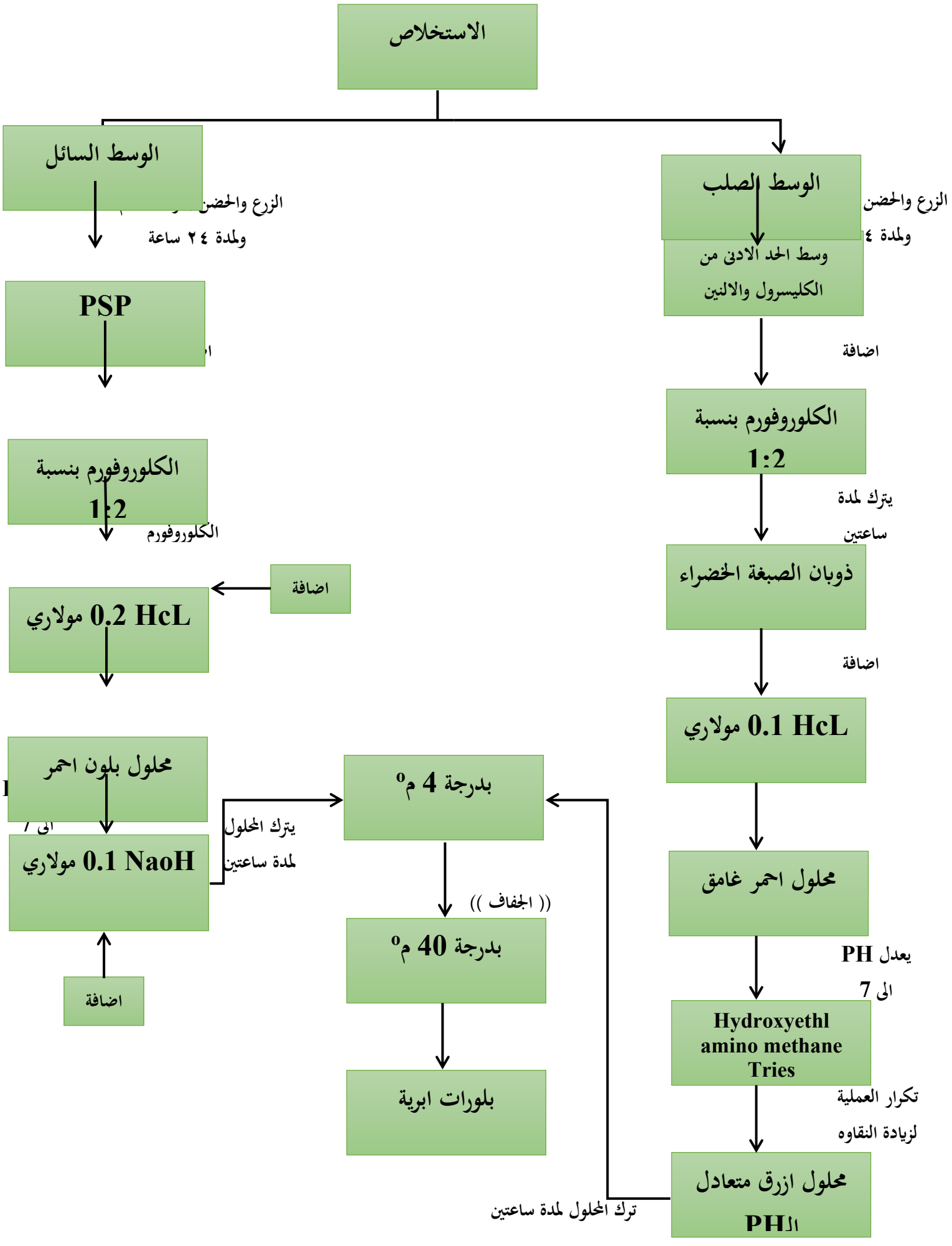
The local isolate of *P.aeruginosae* produce several virulence factors such as hemolysin enzyme and pyocyanin pigment.

We extract and purified pyocyanin pigment from several clinical and ecological samples. The results in this study showed the maximum absorbance rate for pyocyanin pigment is 2.5,300 WV by using UV/VS-Spectrophotometer. GC-MSS was used to analyze pyocynan compound by the research.

We extracted phenazine compound from pyocianin pigment, and GC-MSS was used to analyze compound of ohenazine.

Finally the sensitivity of some pathogenic isolate *E.coli, S.aureus,* and some fungi such as *Candida albicans* were tested and showed very sensitive against pyocyanin pigment in (100 mg) concentration.




الاستخلاص
الوسط السائل
الوسط الصلب
الزرع والحضن
ولمدة ٢٤ ساعة
الزرع والحضن
ولمدة ٤
PSP
وسط الحد الادنى من
الكليسرول والالنين
اضافة
الكلوروفورم بنسبة
1:2
يترك لمدة
ساعتين
الكلوروفورم بنسبة
1:2
الكلوروفورم
ذوبان الصبغة الخضراء
اضافة
اضافة
0.2 HcL مولاري
0.1 HcL مولاري
محلول بلون احمر
بدرجة 4 م°
يترك المحلول
لمدة ساعتين
0.1 NaoH مولاري
((الجفاف))
محلول احمر غامق
بدرجة 40 م°
يعدل PH
الى 7
Hydroxyethl
amino methane
Tries
اضافة
بلورات ابرية
تكرار العملية
لزيادة النقاوه
محلول ازرق متعادل
الPH
ترك المحلول لمدة ساعتين

المصادر العربية

باصات, ديمة نزار فرج, (٢٠٠٦). تأثير المستخلصات المائية والكحولية لنبات سم الفراخ والقريص على بعض عوامل الضراوة والدنا البلازميدي لبكتريا *Pseudomonas flouresens* المعزولة محلياً, كلية العلوم, جامعة بغداد.

الثويني: امنة نعمة, بشرى جاسم محمد و مها احمد نايف (٢٠٠٨). التحري عن بكتريا *Pseudomonas aeruginosae* في تلوث المستشفيات. مجلة ام سلمة للعلوم, المجلد الخامس. ٤-١.

السعيدي, لينا عبد الامير سلمان. (٢٠٠٦). دراسة بكتريولوجية لبكتريا *Pseudomonas aeruginosae* المعزولة من مصادر سريرية مختلفة في مدينة بعقوبة وضواحيها, رسالة ماجستير, كلية العلوم, جامعة ديالى.

عبد الله: انوار علي, ذكرى عبد العالي عبد, انوار كاظم حسين و زينب محمد جاسم. (٢٠٠٩). علاقة الطبقة المخاطية لبكتريا *Pseudomonas aeruginosae* بالمقاومة لبعض المضادات الحياتية. مجلة جامعة بابل, مجلد ١٧ العدد الاول.

العريبي: سناء مهدي. (٢٠١٠). مقاومة جرثومة *Pseudomonas aeruginosae* المعزولة من اصابات سريرية مختلفة لبعض المضادات الحيوية. مجلة علوم ذي قار, المجلد الثاني:١٩٩١-٨٦٩٠.

العزاوي , شيماء صبحي .(٢٠٠٦). التأثير السمي لصبغة البايوسيانين Pyocyanin المستخلصة من بكتريا *Pseudomonas aeruginosae* في بعض خطوط الخلايا السرطانية للإنسان والحيوان , رسالة ماجستير , كلية العلوم , جامعة بغداد .

علي, محمد طارق, كريم سعدون, حسن عبد الرزاق شفيق, علي, زينة طارق (٢٠١٠). اصابات الجهاز البولي والجروح في المرضى البالغين. دراسة تطبيقية في مستشفى اليرموك , مجلة ديالى للعلوم الزراعية. المجلد الثاني: ٢٦-٣٧.

القيسي, خالدة جليل ابراهيم .(٢٠٠٢). عزل وتشخيص بعض البكتريا الهوائية المسببة لالتهابات القدم عند المرضى المصابين بداء السكري ودراسة التأثير الخلطي للمضادات الحيوية عليها. رسالة ماجستير, كلية العلوم, الجامعة المستنصرية.

الكَرعاوي, يسرى عزيز محمد. (١٩٩٩). دراسة تأثير مستخلص النمو الخام لبكتريا *Pseudomonas aeruginosae* على خطوط خلايا سرطانية وطبيعية, رسالة ماجستير, كلية العلوم, جامعة بغداد.

محسن, مسلم عيدان, الشمرني, محمد جاسم محمد و علي, زهرة محسن. (٢٠١٤). عزل وتشخيص البكتريا الملوثة لردهات الحروق في محافظة النجف, مجلة علوم الحياة, المجلد السابع (١): ٢٠٧٣-٨٨٥٤.

الهلالي , هدى هادي عطية .(٢٠٠٥). دراسة كيموحيوية لأنزيم الاكاريز المنتج من بكتريا *P. Pseudomonas* المعزولة محلياً , رسالة ماجستير , كلية العلوم , جامعة بغداد .

المصادر الاجنبية

(NCCLs) NationaL committee for clinical Laboratory standards .(2012). Performance standard fpr AntimicrobiaL suscepitibilty Testing ; Twenty second informational Supplement. M100-S22. USA.

Abdullah, R.M.; Samman , S.F. and AL-Shwaikh, A.M. (2010) . Study the effect of antibiotic combination of beta lactam and aminoglycoside with another group of antics and their synergis effect . Journal of Arab Board of Health Specialization ., Vol 11 . No 1.

Abro, S.h.; Wagan , R.; Tunio, M.T.; Kamboh, A.A. and Munir , M. (2009) . Biochemical Activities of Bacterial species isolated from the frozen semen of cattle . Journal of agriculture and Social Scinces ., Vol . 5 , PP. 109-113 .

Akaabi, S.A.G. (2013) . Bacterial isolates and Their Antibiotibiograms of Burn Wound infections in Burns specialist Hospital in Baghdad . J . Baghdad for Sci., 10(2): 331-339 .

Al Derzi, N. A. and MD. (2012). Resistance of pseudomonas infection in the North of Iraq. Emphasis on the potential Role of a combination antibiogram. Iraqi. J. comm. Med; (2):130-134.

AL Imari, H.M.H . (2011) . Acomprative study on the antimicrobial and cytotoxic effects of pyocyanin produced by wild type and mutant of locally isolated pseudomonas aeruginosae M.S.C., thesis . College of science . University of Baghdad .

Al Marzoqi, A.H. and Altaee. (2013) . Pseudomonas aeruginosae : antibiotic resistance pattern to different isolates in AL- Hillah City , Iraq . Journal of National Sciences Research ., 3(3):2225-0921 .

Alaisi, L.M. (2012) . Purification Characterization and Genetic Evaluation of phenazine produced by pseudomonas aeruginosae local isolates . P.hD. thesis , College of Scince ., University of Baghdad .

AL-Bayatt, K.K.; Arajy, K.H. and AL-Nuaemy, S.H. (2012) . Bacteriological and physicochemical studies on Tigris River Near the water purification stations with in Baghdad province and public Health . 8 pages .

AL-Hinani , A.H.; ALsadi, A.M.; ALBahry, S.N.; Mothershaw, A.S.; ALSaid, F.A.; AL Harthi, S.A. and Deadman , M.L. (2010) . Isolation and characterization of pseudomonas aeruginosae with antagonistic Activity against pythium aphanidematum . Journal of plant pathology., 92(3)653-660 .

Al-Saffar, A.K.H. (2005) Genetic study of pseudomonas aeruginosae causing burn and wound infection in Babil Government. M.S.C. thesis. College of science. Al Mustansirya university.

AL-Salihi, S.S. and Hameed, B.H. (2014) . Antibiotic resistant of pseudomonas aeruginosae isolated from different clinical specimens . Kirkuk University Journal / Scientific studies (KUISS) ., 9(2): 15-28 .

Alsamary, I.e.; Alabbasi, A.M. and Najim , J.M . (2010) . Impact of multidrugs resistant bacteria on the pathogenesis of chronic suppurative otitis media . African journal of Microbiology Research ., 4(13): 1373-1382 .

AL-Shamaa, S.D.; Bahjat , S. A. and Nassir, N.S. (2011) . Production of Extracellular pigments as a virulence factor of psuedumonas aeruginosae . College of Basic Education Researchs Journal ., 11(2): 689-697 .

Al-shibib ,A. and Kanelia ,S. (1993) . A study of purified payocyanin by pseudomonas aeruginasae properities and grouping . Acta , Microbiol .Pol., 42(3-4) : 275-278 .

ALtaai, M.E.; Aziz, I.H. and Marhoon , A.A . (2014) . Identification psueudomonas aeruginosae by Ibs Rrna gene for Differentiation from other pseudomonas species that isolated from patient and environment . J. Baghdad for Sci ., 11(2): 1028-1032 .

Anvarinejad , M.; Japoni , A.; Rafaat Pour, N.; Mardauh, J.; Abbasi, P.; Shahidi, M.A.; Dehyadegari, M. and Alipour, E. (2014) . Burn patients infecteel with Metallo-Beta- Lactomase-Producing pseudomonas aeruginosae : Multidrug-Resistant strains. Arch Trauma Res ., 3(2):e 18182 .

Arora , P.K.; Sharma , A. and Bae, H. (2015) . Microbial Degradiation of Indole and its Dervatives . Journal of chemistry ., 2: 13 pages .

Arora, S.K.; Neely , A.N.; Blair, B.; Lory, S. and Ramphal, R. (2005) . Role of motility and flagellin glycosyation in the pathogenesis of

psueudomonas aeruginosae burn wound infection . infect . Immune ., 73 (7): 4395-4398 .

As Adoga, E.M.; Malu,D.; Badung, B.P.; Obiesie, I.V. and Nwaorug, O.G. (2010) . Swab and aspiration specimen collection methods and antibiogram in chronic suppurative otitis media at Jos University teaching hospital : wichis superior ? Annals of African Medicine ., 9(4): 230-234 .

Atlas, R.M.; Parks, L.C. and Brown, A. E. (1995). Laboratory manual of experimental microbiology. 1st ed. Mosby, Inc, USA.

Aunchaleeb N.; Sukanga, A.; Chauokporn, P.; Paweena, P.; Saksit , C. and Chalerm, R. (2009) . synthesis isolation of phenazine dervatires and their antimicrobial activity . Walailak J. Sci . and Tech ., 6(1):79-91.

Baho, S.I.S. (2006) . Genetic study on the Locally isolated pseudomonas aeruginosae and ability in Lectin production . M.S.C. thesis , college of science, AL Nahrain university .

Barakat, K.M.; Mattar,M.Z.; Sabae, S.Z.; Darwesh, O, M. and Hassan, S.H.(2015) . production and characterization bioactive pyocyanin pigment by marine pseudomonas aeruginosae & sh1 . Research Journal of Pharmaceutical, Biological and chemical Science., 6(5): 0975-8585 .

Barakat, K.M.; Mattar, M.Z.; Sabae, S.Z.; Darwesk, O.M. and Hassan, S.H. (2015) . production and characterization Bioactive pyocyanin pigment by marine pseudomonas aeruginosae & Sh1. Research Journal of pharmaceutical, Biological and chemical Science ., 6(5):0975-8585 .

Baron, E. J. and Finegold, S.M. (1994). Microorganisms Encountered in Urinary Tract in Baily & Scotts Diagnostic Microbiology. (9th) ed. Mosby Company USA.

Barrow, G.I. and Feltham.(2004). Cowan and steel's Manual for the identification of MedicaL Bacteria. 3th (ed). Landon.

Bauer,A.; Kirby, W.; Sherri, J. and Turk, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by astandardized single disk method. American JournaL clinical Pathology, 45:493-496.

Bayth, N.; Houri-Haddad, Y.; Domb, A.; Khan, W. and Hazan, R. (2015) . Alternative Antimicrobial Approach : Nano-Antimicrobiol Mterials . Evidence-Based Complementry and Alternative Medicine., 1-16 pages .

Benachinmardi, K.K.; Padmavathy, M.; Malini, J. and Naveneeth, B.V. (2014) .prevalence of non fermenting Gram-negative bacilli and their in vitro suscepitibitibility pattern at ateriary care teaching hospital . Original Article ., 41(3): 162-166 .

Bhasin, S.; Shukla, A.N. and Shrivastava, S. (2015) . oberservation on pseudomonas aeruginosae in kishipra River with Relation to

Anthropogenic Activities . International Journal of Current Microbiology and Applied Science, 4(4):672-684 .

Bhatt, N.; Patel, K.; Kenaria, H.(2005). Decolorizeation of diazodye Reactive Blue 172 by pseudomonas aeruginosae NBAR12. JBasic Microbial, 45(6):407-418.

Brook,G.F.; Beutel,J.S.; Carrol,K.C and Morse,S.A. (2007) .Jawetz, Melinick, J.L. and Adlebergs Medical Microbiologi, 24th ed. Alang medical book .

Brooks , G.F.; Butel, J.S . and Mors, S.A. (1998) . Medical Microbiology 21st ed . Appleton and Language . Stamford united states el America . p. 145-176, 231-233 .

Brooks, G.F.; Bulel, J.S. and Morse, S.A. (2001) . Medical microbiology 22nd edition 1. Language Medical Books/Mc Graw-Hill .

Brooks, J.; ButeL,K.; carroL, T.; Mietzner, and Mors,S. The staphylococci in Jawetz Melnick & Al denberg's MedicaL MicrobioLogy, McGraw. Hill, P. New York, NY,USA, 25th edition, 2010.

Bsiwal, I; Arora, B.S.; Kasana, D.; Shree N. (2014). Incidence of Multidury Resis tatant pseudomonas aeruginnosae isolated from Burn paitents and Environment of teaching institution. Microbiology science, 8(5):26-29.

Burton, G.R.W. and Engelkirk, P.G. (2001) . Microbiology of Health Scince (6th edition) . Lippincott Williams and Wikins .

Cardazo, V.F.; Olivera, A.; Nihio, E.K.; perugini, M.R.; Andrade, C.G.; Dilveria, W.; Durfan, N.; Andrade, G.; Kobayashi, R., k. k. and Nakazoto, G. (2013). Antibacterial activity of extracellular compounds by a pseudomonas strain against methicillin-resistant staphylococcus aureus (MRSA) strains. Annal of clinical microbiology antimicrobial, 12(12):1476-0711.

Chen, J. and Xiao-Chang, G. (2004) . organoing light emitting device having phenan throline – fused phenazine . VS.patient ., 6:1-4 .

Choi, E.; Kown, H.; Ham, J. and Yong, H. (2009) . 6-Hydroxy methel-1-phenazine- carboxamide and 1,6 phenazine methanol from a marine purple vase sponage . J. Autibiot. 62:621-624 .

Christopher, A.; Mathe,W. and Pollack,S,. (2005) . infection due to pseudomonas spp. Of Harrisons, PRINCIPLE OF INTERINAL MEDICINE , 16th ed . Mc Graw-Hill, Medical Puplishing Division .

Cowell, B.A.; Chen, Y.; Frank, W.; Uallis, J. and Fleizig. (2000). ExoT of Cytotoxic pseudomonas aeruginosae prevents up take by corneal epithdial Cells. Infect. Immune. 68:403-406.

Cox, C.D. (1985). Roleat pyocyanin in the acquisition of iron from trans ferring. Infect .Immune, 52:263-270.

Dart J.K. and Seal, D.V . (2001) . Infections caused by pseudomonas aeruginosae . Rev. Infect. Dis. 5(2):279-313 .

Dayasena, R.P., Dayasir, M.B.; J ayasuriya, C. Perera, D.S. (2011). Aetiological agent in chron supperative otots media in sri lanka. Austuralian Medical Research, 4(2):101-4.

De Miguel Martinez, I.; DelRosario Quintana, C.; Balons Rivero, M. and Ramos Macias, A.(2005). Aetiogy and therapeutic considerations in chronic otitis media. Analysis of a5 year period. Acta. Otorrinolaringol. EsP. 56(10):459-462.

Delden , C.V. and Iglewski, B.H. (1998) . Cell to cell signaling and pseudomonas aeruginosae infection . Emerg . infect . Dis ., 4(4):534-539 .

deMacedo, J.L.S. and Santos, J.B. (2005) . Bacterial and fungal colonization of burn wounds memorias do Instituto oswaldo cruz., 100(5):535-539 .

Demiranda, E.j.; De oliveria, G.S.; Roaue , F.L.; sdntos, S.R.; Olmos, R. O. and Lotufo, P.A.(2014)- susceptibility to antibiotics in urinary track infection in a secondary care setting from 2005-2006 and 2010-2011, in Sao Paulo, BRAZil: Data from 11.943 urine cultures. Revlinstmed Trop sao Paulo . 56(4):313-324.

Denning, G.; Iyer, S.; Reszka, K.; Malley, Y.; Rasmussen,G. and Britigan, B. (2003) . phenazine-1-carboylic acid , a secondary metabolite of p. aeruginosae , alters epression of immune-modulatory proteins by human airway epithelial cells . Am. J. Physiol. Lung. 285:584-592 .

Dutta, D.; Cole, N. and Will cox, M. (2012) . Factors influencing bacterial adhesion to contact lenses . Biology and Genetic in vision Research., 18:14-12 .

Echlich, R.L. (2003) . Critical linki pseudomonas aeruginosae . Hel . peop . Hael. Comm ., 7(12):1-17 .

Elfouly, M.Z.; Sharaf, A.M.; Shahin, A.A.; ELBialy, H.A. and Omara, A.M. (2014) . Biosynthesis of pyocyanin pigment by pseudomonas aeruginosae . Journal of Radiation Research and Applied Science .,8:36-48 .

Ellen, J.L.; Cowell, B.A.; Evans, D.J. and Fleiszig, M.J. (2003) . contribution of exs A-regulated factors to corneal infection by cytotoxic and pseudomonas aeruginosae in murine scarification model . invest . opthalmol . Uis . Sci ., 44:3292-3898 .

Fazeliogn. And Momtaz, H.(2014). Virulence Gene Profiles of Multidrug- Resistant Pseudomonas areuginosae Ysolated from Iranian Hospital infection, Iran red crescent med J.16(10): e15722.

Fiorillo, L.; Zucker, M. and Sawyer, D. (2001) . The pseudomonas hot-foot syndrome . NEngl . J . Med., 345(5): 335-8 .

Flamm, R.k.; Weaven, M.K.; Thornseberry, C.; Jones, M.E.; Karlowsky, J.A. and Sahm, D.F. (2004) . Factors associated with relative rates of antibiotic resistance in pseudomonas isolates in the clinical laboratories in the united states from 1999 to 2002 . Antimic . Agent Chemother ., 48(7):2431-2436 .

Fletzer, R.F.; Gray, R.D.; Dean, W.L. and Pierce , W.M. (2003) . Alkaline protenase inhibitor of pseudomonas aeruginosae an interaction of native and N.terminally truncated inhibitor proteins with pseudomonas alkaline proteinase . J.Biol-Chem., 278 (28):25952-25957 .

Forbes, B.A.; Sahm. D.F. and Wessifeld, A.S. (2002) . Bialey and scotts diagnostic microbiology . 9th ed . Mosby . V.S.A. Vol. 1:509 .

Forbes,B.; Sahm, D. and Wessfeld, A. "staphylococcus micrococcus and similar organisms" in Bailey and scott's Diagnostic Microbiology, MosByFlesvier, 12th edition, 2007.

Gales, A.C.; Jones, R.N. and Turuidge, J. (2001) . characterization of pseudomonas aeruginosae isolates : occurrence rate , antimicrobial susceptibility patterns and molecular typing in the global sentry antimicrobial surveillance program 1997-1999. Clin . Inf. Dis ., 32(2):146-155 .

Gibson , J.; Sood, A. and Hogan D.A. (2008) . pseudomonas aeruginosae-candida albicans interaction: Localization and Fungal Toxicity of a phenazine Derivative . Applied and Environmental microbiology , 75(2):504-512 .

Giddens, S.; Houliston, G. and Mahanty, H. (2003) . The influence of antibiotic production and pre-emptive colonization on the population dynamics of pantoea agglomeraus (Eriwinia herbicola) . Eh 1087 and Erwinia amylovora in plant Environ . Microbiol . 5:1016-1021 .

Gieser, T.K.; Kazmierczak, B.I.; Ryan, L.K.; Matthay, M.A. and Engel, J.N. (2001) . pseudomonas aeruginosae Exot inhibits invitro lung epithelial wound repair . Cell Microbiol . 3(4): 223-236 .

Goud, M. and Muralikrishnan . (2008) . Biological control of the three phyto pathogenic fungi by pseudomonas flouresens . Internal Journal of Microbiology ., 7(2):1 Volumm 7 Number 2 .

Gul , S.; Eraj , A.; Ashraf , z.(2015). Pseudomonas aeruginosae : Acommon Causative Agent of Earinfections in south Asian children. International Journal of Current Microbiology and Applied sciences , 6(3) : 156-160.

Gul,S. and ayut, M.(2015). Gradual Decline in the Potency of Antipsendomonas Drugs: Evalated by Retrospective comparative studies of susceptibility and Resistant pattern of Antimicrobials a gainst Pseudomonas areuginosae Isolate obtained from Intensive care Unitc. Wourld Journal of Pharmaceutical Sciences, 3(7):1330-1339.

Hahn, H.P. (1997) . The type-4 pilus is the major virulence – associated adhesion of pseudomonas aeruginosae –are view . Gene . 192(1):99-108 .

Hamzah, H.M.; Ali, S.M.; Hamad I.S.(2008). Conjugative plasmid-Borne antibiotic. Resistance Genes in pseudomonas aeruginosae. Basrah Journal of Science. 26(1):11-19.

Hanna, M.I.; El-Hady, M.A.; Elmeadawy, S.A. and kenwy, A.M. (2014). Acoutribution on pseudomonas aeruginosae in fection in African catfish (clarias gariepinus). Research Journal of pharmaceutical, 5(5):0975-8585.

Hass, D. and Defago, G. (2005) . Biological control of soil borne pathogen by flouresent pseudomonas . Nat Rev. Microbiol., 3(4): 307-19 .

Hassan , N. and Kerp,V.(2015). Populat grown and its environment al impact in Syria : Acase study of Lattakia region. African Journal of Agricultural Research, 1094) : 161-169.

Hassan, K.I.; Abdullah, S.R. and Hawrami, K. (2014) . PCR Ribotyping for Determining the Deversity of some clinical pseudomonas aeruginosae isolates . Journal of AL Nahrain University., 17(2): 159-164 .

Hateet, R.R. (2015). Study of susceptibility patterns of clinical staphylococcus aurous isolated from patien with otitis media in missan. International Journal of advanced research in biological sciences, 2(4): 268-273.

Hauser, A. and Padman, S. (2005) . Sever pseudomonas aeruginosae infection : talking the conundrum of drug resistance postgrad . Med ., 117(1:41-48 .

Head, N.E. and Yu, H. (2004) . Cross-sectional analysis of clinical and environ mental isolates of pseudomonas aeruginosae : biofilm formation , virulence , and genome diversity . Infect. Immune . 72(2):133-144 .

Hendricks, B.D.; Breed, Stanley, R.S. (1957). Bergys manual of Deminative bacteriology. Editeable web page on open Library. Williams & wikins. Baltimore USA. 1134 pages.

Hgan, D.A. and Kolter, R. (2002). Pseudomonas-candida interactions: an ecotogical role for virulence factors. Science, 296:2229-2232.

Hoiby, N. and Koch, C. (1998) . Cystic fibrosis.1.pseudomonas aeruginosae infection in cystic fibrosis and its management . Thorax., 45(11):881-884 .

Hussein, I.A.; Habeeb, K.A. and Jassim, K.A. (2012). Identification of pseudomonas aeruginosae from burn wounds isolated by PCR using Exotoxin A. specific primers. Iraq. J. Biotech, 11(2):282-291.

Hussien, I.A.; Habib, K.A.; Jassim, K.A.(2012). Bacterial colonization of burn wounds J.Baghdad for sci 9(4):623-631.

Huston, W.M.; Potter, A.J.; Jennings, M.P.; Rello, J.; Hauser, A.R. and Mcewan, G. (2004) . survey of ferroxidase expression and siderephore production in clinical isolated of pseudomonas aeruginosae . J. Clin. Microbiol. 42(6):2806-2809 .

IIIakiam, D.; Shankar, M.; ponraj, P.; Rajendhran, J. and Gunasekaran P. (2014). Genome Sequencing of among bean plant growth promoting strain of *P.aeruginosae* with bio control Ability. Int. J. Genomics, 123058.

Ijaz, T.; Aujum , A.A.; Aslam, S.; Raja, S.A.; Khawaja, A.R. and Ijaz, S. (2014). Microbial profiling and risk factors assessment for and otitis media otitis Externa. Advancements in life sciences, 1(4):191-196.

Isibor, J.o. and Uwabor, C.(2015). Antibiotic Susceptibility pattern and plasmid profiles of pseudomonas aeruginosae Isolated from some Hospital patients in Benin city, Nigevia. New york science Jouvnal, 8(7):14-19.

Jebur, K. S.H.; AL Hamadani, A.H. and Jebur, M.S.H. (2015) . Evaluation of Genetic study and Bacterial Culture for Diagnosis of pseudomonal Eye Infections . International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences ., 4(3):348-356 .

Juayang, A.C.; Reyes, G.B.; Rama, A.J. and Gallega, C.T. (2014). Antibiotic Resistance profiling of staphylococcus aurous isolated from clinical specimens in a tertiary hospital from 2010 to 2012. Interdisciplinary perspectives on infectious Diseases, 4 pages.

Karapagam, S.A.; Sudhakar, T. and Lakshimpak, M. (2013) . microbiosidal response of pyocyanin produced by p. aeruginosae to ward clinical isolate of fungi . International Journal of pharmacy and pharmaceutical Sciences , 5(3): 870-873 .

Karch, H.; Russman, H.; Schmidt, H.; Schwarzkoph, A.; Heesemaun, J. (1995). Long shedding and ClonaL turnover of EHECO 157in diarrhea disease. Jclin. MicrobioL. 33:1602.

KAYA, T.; Aslim, B. and Kariptas, E. (2013). Production of biosurfactant by pseudomonas spp. Isolated from industrial waste in turkey. Turkish journal of biology, 38:307-317.

Kbatri, S.; Lass,J. H.; Heinzel, F.P.; Petroll, W.M.; Gomez, J.; Diaconu, E.; Kalsow, C.M. and Pearlman, E. (2002) . Regulation of endotoxine – induced keratitis by PECAM-1, MIP-2, and toll-like receptor 4. Invest . ophthalmol. Vis. Sci. 43(7):2278-2284 .

Kerr, J.; Taylor, G.; Rutman, A.; Hoiby, N.; Cole, P. and Wilson, R. (1999) . P.aeruginosae pyocyanin and 1-hydroxyphenazine inhibit fungal growth . J.Clin . Patho 1.52:385-387 .

Kerr, J.R.; Taylor, G. W.; Rutman, A.; Hoiby. N.; Cole, P.J. and Wilson, R. (2015). Pseudomonas aeruginosae pyocyanin and 1-hydroxyphenazine inhibit fungal growth. J. clin patho, 52:385-387.

Kiffer, C. Hsiung, A.; Oplustil, C.; Sampaio, J.; Sakagami, E.; Turner, P. and Mendes, C. (2005) . Antimicrobial susceptibility of Gram-negative bacteria in Brazillian hospitals : the MySTIC program Brazil 2003 .Braz. J. Infect . Dis . 9(3)216-224 .

Kim, E.J.; Sabra, W. and Zeng, A. (2003) . Irom deficiency leads to inhibiotion of oxygen transfer and enhanced formation of virulence factors in culture of pseudomonas aeruginosae PAO1 . Microbiol . 149:2627-2634 .

Kim, K. (2000) . Phenazine-1-carboxylic acid resistance in phenazine -1-carboxilic acid producing Bacillus Sp. B-6.J.Biochem . Mol . Biol. 33:332-336 .

Köther, T.; Curty, L.K.; Barja, F.; Delden, C.V. and pechere, J.C. (2000) . Swarming of pseudomonas aeruginosae is dependent on cell signaling and requires flagella and pilli . J. Bacterial., 182(21) : 5990-5996 .

Kulkarni, A.G. and kaliwal, B.B.(2015). Bioremediation of Methomyl by soil isolate-pseudomonas aeruginosae. Journal of Bioremediation & Biodegration, 5:2155-6199.

Kumar ,. S.N.; Nisha , G.V. Sudaresan , A.; Venngopal, V.V.; Kumar, M.M.; Lankalapalli, R.S. and Kumar, B.S. (2014). Syngeristic activity of Phenazine isolated from Pseudomonas aeruginosae in combination with azole aginst candida species. Medical Mycolog Advances Access, VoL. OO, No. 0.1-9.

Kumar, R.; Agarwal, R.K. and Gupta, S. (2015). a microbiological study of chronic supportive otitis media. International journal of recent scientific research, 6(7):5487-5490.

Kumar, R.; Srivastva, P. Rishi, S.; Dahiya, S.S; Hemwani, K.; Nirwan, P.S. (2014). Detection and Autimicrobial Susceptibility pattern of Pseudomonas aeruginosae Isolates in Various clinical samples with special reference to Metallo Beta Lactaruasc from a tertiary Care hospital in Jaipur, India. National Journal of Medical Research, 4(2):128-131.

Lakshmi, V.; Kumari, S. ; Singh, A.; Prabha, C.(2015). Isolation and Characterization of deleterious pseudomonas aeruginosae KC1 from rhizospheric soils and its interaction with weed seedings. Journal of King Saud university-science, 27(2):113-119.

Lamppa, J.W.; Griswold, K.E. (2013) . Alginate lyase Exhibits Catalysis –Independent Biofilm Dispersion and Antibiotic Synergy . Journal . ASM.org, 57(1):137-145 .

Landman , O.; Quale, J.M.; Mayorga, D.; Adedeji, A.; Vangala, K.; Ravishankar, J.; Flores, C. and Brocks, S. (2002) . citywide clonal outbreak of multiresistant Acinetobacter baumannii and pseudomonas

aeruginosae in Brooklyn, NY: the preantibiotic era has returned . Arch intern Med ., 162(13):1515-20 .
Lanini, S.; Arezzo, S.A.; Puro, V.; Martini, L.; Imperi, F.; Piselli, P.; Montanaro, M.; Paoletti, S.; Visca, P. Lppolito, G. (2011) . Molecular Epidemiology of pseudomonas aeruginosae Hospital Outbreak Driven by acontaminated Disinfectant-Saop Dispenser. Journal . Pone . 6(2): 17064 .
Laura, P.; Roberta, M.; Lucia, P.; Ceilia, M.; Erneston, G.; Gianfranco, A.; Egidio, R. and Gain, M. (2002) . Emergin extended spectrum B-Lactamases in proteus mirabilis .
Laursen, J. and Nielsen , J. (2004) . Phenazine natural products: Biosynthesis synthetic analogue and biological activity . Chem. Rev., 104:1663-1685 **Laverty, G.;** Gorman, S.P. and Gilmore, B.F. (2014) . Biomolecular Mechanism of pseudomonas aeruginosae and Escherichia Coli Biofilm formation. Journal/Pathogens., 3:2076-0817 .
Lazzaro, F.; Mantengoli, E.; Perillui, M.; Lombard, G.; Orlandi, V.; Orsatti, A.; Amicosarti, G.; Rossolini, G.M. and Taniolo, A. (2001) . Dynamics of anosochemial outbreak of multidrug – resistance pseudomonad aeruginosae producing the PER-1Extended spectrum B-Lactamase . J. Clin . Microbiol . 39(5):1865-1870.
Lennette, E. H.; Balow, S.A; Haussler, W.J. and Shadonyleds. (1985). ManuaL of ClinicaL Microbiology. Amerivan Society for Microbiology. Washington D.C.
Lister. P.D.; wolter, D.J. and Hauson, N.D. (2009). Antibacterial-resistant pseudomonas aeruginosae: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. Clin microbial Rev. 22(4):582-610.
Litovchenko, P.P. and Zabotina, I.V.(1981). Morphology, Cultural, and biochemical properities of culture of pseudomonas aeruginosae Isolated from protein, animals and environment. Zh. Microbial. EpidemioL. Immunobiol. 5:78-84.
Livermore, D.W. (2002) . Multiple Mechanisims of Antimicrobiol Resistance in pseudomonas aeruginosae . Clin . Infect . Dis., 34(5):634-640 .
Lomholt, J.A.; Poulsen, K . and Kilian, M. (2001) . Epidemic population structure of pseudomonas aeruginosae : evidence for a clone that is pathogenic to the eye and that has a distinct combination of virulence factors . Infect . Immune . 69(10):6224-6295 .
Lu,o.; eggimann, P.; Luyt, C.E.; Wolff, M.; Tamm, M.; Francois, B.; Mercier, E.; Grabino, J.; Laterre, P.F.; Koch, H.; Gafner, V.; Rudolf, M.P.; Mus,E.; Perez, A.; Lazar, H.; Chastre, J. and Rouby, J.J. (2014) . Licensee Bio Med Central Ltd ., 18(1) .

Lualua'a, S.Z. (2009). Extraction and purification of alginate from pseudomonas aeruginosae and study its role in pathogenesis. M.S.C. thesis. College of science. University of Baghdad.

Lutz, J.K. and Lee,J.(2011). Prevalence and Antimicrobial – Resistance of pseudomonas aeruginosae in swimming PooLs and Hot tubs. Int.J. Environ Res public Health. 8(2):554-564.

Lyzak, J.B.; Cannon, C.L. and Pier, G.B. (2000) . Establishment of pseudomonas aeruginosae infection : Lesson from aversatile opportunist . Microbiol . Infect . 2:1051-1060 .

Macfaddin, J.F. (2000) . Biochemical Test for identification of medical bacteria . 3edth . the Williams and Wilkins . Baltimore, USA .

Mahajan-Miklos, S.; Tan, M.W.; Rahme, L.G. and Ausubel, F.M. (1999) .Molecular mechanism of bacterial virulence elucidated using a pseudomonas aeruginosae caenorhabitis elegans pathogenesis model . Cell., 96:47-56 .

Mahou,D.; Lehman, and Manuselis, G. The Staphylococci in Textbook of Diagnostic Microbiology, P. 317, Sunders Elsvier, 4th edition , 2011.

Mai-Prochhow,A.; Bradburg, M.; Ostrikov, K.; Murphy, A.B. (2015). Pseudomonas aeruginosae .

Marchetti, F.; Ronfani, L.; Nibali, S. and Tamburlini, G. (2005) . Delayed prescription may reduce the use of antibiotics for a cute otitis media : a prospective observational study in primary Carc . Arch pediate Adolesc Med ., 159(7):679-84 .

Matsumoto, K. (2004) . Role of bacterial proteases in pseudomonal and serratial keratitis . walter de G ruyter . 385(11):1007-1016 .

Mavordi, D.V.; Blanken feldt, W. and Thomashow, L.S. (2006) . Annu . Rev . Phyto Chem ., 44:417-445 .

Mavrodi, D.; Peever, T.; Mavrodi, O.; Parejko, J.; Raaijmarkers, J.; Lemancean, P.; Mazurier, S.; Heide, L.; Blankenfeldt, W.; Weller, D. and Thomashow, L. (2010) . Deversity and evolution of the phenazine biosynthesis pathway . Appl . Environ. Microbiol., 76(3):866-79 .

Mena, K.D. and Gerbaoscp. (2009) . Risk assessment of pseudomonas aeruginosae in water . Rw Einvron Toxicol ., 201:71-115 .

Metha, M.; Dutta, P. and Gupta, V. (2007). Bacterial isolated from burn wound infections and their antibiograms: An eight year study. Indian Journal of plastic surgy, 40(1):25-28.

Mittal, R.; Grati, M.; Gerring, R.; Black welder, P.; Y; D., Li, J.D. and Liu, Z. (2014). In Vitro interaction of pseudomonas with human middle Ear epithelial cells. plos one, 9(3): e.g. 1885.

Moges, F.; Endris, M.; Belyhun, Y. and worku, W. (Isolation and Characterization of multiple drug resistance bacterial pathogen from waste water in hospital and non-hospital environments, North west Ethiopia. Research Notes, 7:215.

Moha, B.S; Parshanth, L.R; Nambiar, V.; Basararaj, M.; Venkatesh, N.R.; Mahesh, B.; Srikrishna, R. (2013). Prevelance and Antitiotic Sensitivity pattern of psemdomonas areuginosae; an emerging nosocomial pathogen. International Journal of Biological & Medical Research, 4(1):2729-2731.

Mohammed, H.A.; Yossef, H.S. and Mohammed, F.I. (2014) . They cytotoxity effect of pyocyanin on human hepatocellular carcinoma cell line . Journal of Science., 55(2):668-674 .

Mohapatra, S.; Deb, M.; Agrawal, K.; chopra, S. and Gaind, R. (2014). Bacteriological profile of patients and environmental samples in burn intensive care unit: Aplot study from a tertiary care hospital. Original article, 22(1):62-66.

Morales, D.K.; Jacobes, N.J.; Rajamani, S.; Krishnamurthy, M.; Cubillos-Ruiz, J. and Hogan, D.A. (2010) . Antifungal mechanisms by wich a novel pseudomonas aeruginosae phenazine toxin kills candida albicans in biofilm . Mol Microbiol . 178(6):1379-1392 .

Morita, Y.; Sobel, M.L. and Poole, K. (2006) . Antibiotic Inducibility of the MeXy Multidrug Efflux System of pseudomonas aeruginosae : Involvement of the Antibiotic – Inducible PA5471 Gene product . J. Bacteriol., 188(5):1847-1855 .

Moss, M. (2002) . Bacterial pigments Microbiologist , December :10-12 .

Motayo; B.O. Akinbo J.A.; ogiowa, I.J.; Idowu, A.A; Nwanze, J.C.; onoh, C.C.; okerentugba, P.O.; Innocent Adiele, H.C.; okonko, I.O. (2013). Bacteria colonization and Autibiotic susceptibility pattern of wound infections in a hospital in abeokuta. Frontiers in science, 3(1):43-48.

Mulamattahil, S.G.; Bezuidenhout, C.; Mbewe, M. and Ateba C.N. (2014). Isolation of Environmental Bacteria from surface and Drinking water in Mafikeng, South Africa and characteriziation using Their Antibiotic Profile. Journal of pathogens, 11 pages.

Murray, P.R.; Baron, F.J.; Ellen, J. and James, H. (2003) . Manual of clinical microbiology . 8th ed . Vol.1. Asm press, Washington, D.C.P., 719-728 .

Nansathit , A.; Apipattarakul, S.; Phaosiri, C.; Pongdontri, P.; Chanthai, S. and Ruangviyachai, C. (2009) . Synthesis isolation of phenazine Derivatives and their Antimicrobial Activities. WalaikJsci&Tech., 6(1): 79-91 .

Ohfuji, K.; Sato, N.; Hamada-Sato, N.; Kobayashi, T.; Imada, C.; Okuma, H. and Watanabe, E. (2004) . construction of a glucose sensor based on a screen – printed electrode and a novel mediator pyocyanin from pseudomonas aeruginosae . Biosensors and oiolectronics., 19:1237-1244 .

Oko, APC, OW, Bst, UA.(2009). Antibiotic Resistance Patteren of Pseudomonas aeruginosae Isolated from clinical Specimens, in A tertiary Hospital in Northeastern Nigeria. The internet Journal of Microbiology, 8(2):1-10.

Okon, K.o.; Balogun, S.T., Askira, U.M.; J:brin, Y.B.; Aguoru, C.U, Isyaka, T.M. and Ghamba P.E. (2014). Restropective analysis of Gram-Negative Bacterial Isolated at atertiary hospital in Maiduguri, Nigeria, Britsh Microbiology Research Journal, 4(11): 1235-1247.

Olayinka, A.T.; onile, B.A. and olayinka, B.O.(2004). Prevalence of multi-drug resistant (MDR) pseudomonas aeruginosae isolates in SurgicaL units of Ahmad u Bello Teaching Hospital Zaria, Nigeria: an indection for effective Controle measures. Ann Afr Med, 3(1):346.

Olubanjo, O.O.; Amusa, Y.B.; Oyelami, O.A. and Adejuiygbe, E. (2008) . Epidemiology of chronic suppurative otitis media in Nigerian children . int. J. Otorhinolaryngol., 5.

Onuoha, S.C. and Fatokun, K. (2014). Prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of urinary tract infection (UTI) among pregnant women in Afikpo, ebonyi state, Nigeria. American Journal of life sciences, 2(2): 46-52.

Ouellet, M.M.; Leduc, A.; Nadeau, C.; Barbeau, J. and charette, S.(2014). Pseudomonas aeruginosae isolates from dental unit waterline can be divided in two distinct group, including one displaying phenotypes similar to isolate from cystic fibrosis paitents. Front microbial, 10.3389/ fmicb. 00802.

Panian, K.; Thatheyus, A.J.; Ramga,D. (2014). Bioremoval of Chromium, Nickel and zinc in Electroplating Effluent by pseudomonas aeruginosae. Open Journal of water pollution and Treatment, 1(2):75-82.

Pierson, S. and Pierson, E. (2010) . Metabolism and function of phenazines in bacteria impacton the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes . App1 Microbiol Biotechnol ., 86;1659-1670 .

Pillar, C.M. and Hobden, J. A. (2002). Pseudomonas aeruginosae exotoxin A and Keratitis in mice. Invest. Ophthalmol-vis. Sci. 43:1437-1444.

Pool, K. (2000). Efflux- mediated resistance to fluoroquinolonesin gram-negative bacteria. A.A.C. 44(9):2233-2241.

Prescott, L.M.; Harley, J. P. and Klean, D.A.(eds) . (1999) . Microbiologi 4th ed . WCB . Mc Graw-Hill Beston .

Prescott, L.M.; Harley, L.P. and Klein, D.A. (2005) . Microbiology . 6th ed . the Mc Graw-Hill companies, Inc . USA. Pp . 485-492 .

Prithirviraj, B.; Bais, H.P.; Weir, T.; Suresh, B.; Najarro, E.H.; Dayakar, B.V.; Schweizer, H.P. and Vivauco, J.M. (2005) . Dowuregulation of virulence factors of pseudomonas aeruginosae by

Sali cyclic acid attenuated its virulence on Arabidopsis thaliana and caenorhabditis elegans . Infect . Immune . 73(9):5319-5328 .

Priyaja, P.(2012). Pyocyanin (5-methyl-1-hydrophenazine) produced by pseudomonas deruginosae as Antagonastic to Vibrios in Aquculture: over expression, Downstream process and toxicity. M.S.C. thesis, college of science and Technology, cochin university.

Putty, M. and Analyst, E. (2007) . pseudomonas aeruginosae . Enviromental Microbiology Laboratory., 5(3)1-3 .

Qarah, S. (2004) . pseudomonas aeruginosae infections intranet explorer . eMedicin . com .

Ralph,C.(1973). Studies on pigment production by P.aeruginosae. M.SC. thesis. College of science-Texas Tech University.

Ramalo,R.; Cunba, J.; Texierria, P. and Gibbs, P.A.(2002) . Modified pseudomonas agar : New Differentiatial Medium for the Detection / Enumiration of pseudomonas aeruginosae in Mineral Water . Microbial . Meth. 49:69-47 .

Rane, M.R.; Sarode, P.D.; Chaudhari, B.L. and Chincholkar , S.B. (2007). Detection isolation and identification of phenazine -1-carbolylic acid produced by biocontrol strains of pseudomonas aeruginosae . Journal Scintific and industrial Resarch., 66:627-631 .

Remold, S.K.; purdy-Gibson, M.E.; France, M.T. and Hundley, T. (2015). Pseudomonas putida and pseudomonas fluorescens species group Recovery from human homomes uaries seasonally and by Environment. Plos one, 10(5):e0127704.

Rezaee, M.A.; Nejacl, Q.B.; Pirayeh, Sh.N. and Owlia, O. (2002) . Higher aminoglycoside resistance in mucoid pseudomonas aeruginosae than in non-mucoid strains . p.owlia phD. Department of microbiology , factualy of medicine, shahed university., No 29 .

Rihard, J.R.; Sahm, D.F. and Courvalin, P (1999) . Mechanisim of resistance to antimicrobial agents . In: Murray P.R.; Barron, E. J.; Pfaller, M.A.; Tenover . F.C . and Yollken, R.H. Manual of clinical microbiology. (5th edition) . ASM press .

Saha, S.; Thavas, R. and Jayalakshmi, S. (2008) . phenazine pigments from pseudomonas aeruginosae and their application as antibacterial agent and food colourants . Research Journal of Microbiology., 3(3):122-128 .

Salih, H.A.; Abdulbary, M. and Abdulrida, A.S. (2011) . Susceptibility of pseudomonas aeruginosae isolated from urine to some antibiotics . AL Qadisiya Journal of vet medical Science ., 10(2):68-88 .

Sasaki, A.K.; Nishi, I.; Yonemura, N.; Takatsuka, H.; Mutoh, K.; Matsumoto, K.; Asari, S. and Taninara, H. (2005) . characteristics of pseudomonas corneal infection related to or thokeratology . Cornea ., 24(7):861-863 .

Satti, A.A.; faidah, H.S. (2015). Environmental prevalence of pathogens in different Drinking water Resources in Makkah city (Kingdom of Saudi Arabia). Current world Environment, online ISSN:2320-8031.

Seema, D.; ALam, M.; Kalani, K.; Khaliq, A.; Samad, A.; Srivastava, S.K. and patra, D.D. (2012) . production purification and characterizabioy of Antifungal Metabolite from pseudomonas aeruginosae SD12, a New strain obtained from Tahnery waste polluted soil. J. microbial . Biotechnol., 22(5):674-683 .

Sewell, A.; Dunmire, J.; Wehmann, M.; Row, T. and Bouhenni, R . (2014) . proteomic analysis of keratitis – associated pseudomonas aeruginosae . Biology and Genetic in vision Research., 20:1182-1191 .

Shahid, M. and Malik,A. (2005) . Resestance due to aminoglycoside modifying enzymes in pseudomonas aeruginosae isolated from burns paitients . India J. Med . Res. 122:324-329 .

Shi, H.; Chen, Z.; and Kan, J. (2015). Development of Loop- mediated iso they mal amplification assays for genotyping of type III secretion system in pseudomonas aeruginosae. Lett App Microbial. 61(4):36-366.

Smith , E.E.; Sims, E.H.; Spencer, D.H.; Kaule, R. and Olson, M.V. Evidence for diversifying selection at the pyoverdine Locus of pseudomonas aeruginosae . J. Bacteriol., 187(6):2138-2147 .

Sobel, M.L.; Neshat, S. and Poole, K. (2005) . Mutation in PA2491 (mexs) promote MexT-Dependent mexEF-OPVN Expression and Multidrug Resistance in aclinical strain of pseudomonas aeruginosae . J. Bacteriol. 187:1246-1253 .

Son, M.S.; Matthews, W.J.; Kang, Y.; Nguyen, D.T . and Hoang, T.T . (2014) . Invivo Evidence of pseudomonas aeruginosae Nutrient Acquisition and pathogenesis in the lung of cystic fibrosis patients . American Society for Microbiology ., 25 (11):5313-5224 .

Songer, G. (2004) . Virulence factor and pathogensis of pseudomonas aeruginosae . The University of Arizona .

Sonneleitner, E.; Schuster, M.; Domenigg, T.S.; Greenberg, E.P.; Bläsi, U. (2006). Hfq-dependent alterations of the trancriptome pro file and effects on quorum Sousing in pseudomonas aeruginosae. Molecular Microbiologi, 59(5):1542-1558.

Sorhabi, M.; Zhang, L.; Zhang, K.; Ahmetagic, A . and Qwei, M. (2014) .Volatile Organic Compound as Novel Markers for the Detection of Bacterial infections . Clinical Microbiology ., 15(3):2327-5073 .

Sousa, A.M. and Pereira, M.O. (2014) . pseudomonas aeruginosae Diversification during infection Development in cystic fibrosis Lungs . AReview . Journal/Pathogenesis., 3:680-703 .

Stephan, H.G. and Hawkey, M.P. (2006) . principles and practice of clinical 2ed . John Wiley and Sous, Ltdp. 427-443 .

Su, S.; Panmanee, W.; Wilson, J.J., Mahtani, H.K.; Li, Q.; Vanderwielen, B.D.; Makris, T.M.; Rogers, M.; McDanoel, C.; Lipscomb, J.D., Irvin, R.T.; schurr, M.J.; Lancaster, J.R.Jr, Kovall, R.A. and HasseH, D.J.(2014). Catalase (KatA) Playrole in protection aginst Anaerobic Nitvic oxide in pseudomonas aeruginosae. Plos one, 9(3).

Sudhakar, T.; Karapagam, S. and Shiyama, S. (2013) . Analysis of pyocyanin compound and its antagonistic activity against phytopathogens . International of Chem Tech Research ., 5:1101-1106 .

Sulbah, B.; Tarun, O.; suresh, K.; Amit, S. and pratibha. (2013). Changing microbiological Trands in case of chronic supportive otitis media patients. International journal of current research and Review, 5(15):76-81.

Sundstorm, J.; Jacobson, K.; Munch, J.; Wikland, F. and Ringertz, S. (1996) . pseudomonas aeruginosae otitis externa . Aparticular Variety the bacteria . Arch otolarngol. Hed . Neck. Surg., 112(8):833-836 .

Tjan Elder, J. (1999) . pseudomonas aeruginosae in a nosocomial infection . A survey of resistance in Belagian hospital . J. A ntimicrob. Chemother. 51(21):347-352 .

Todar, K. (2008) . pseudomonas aeruginosae . Todar online Textbook of Bacteriology . University of Wiscon-Madison Department . of Bacteriology .

Todar. (2004) . Textbook of Bacteriology online , Wisconsin – Madison Dept . of Bacteriology .

Torres, A.; Ferrer, M. and Badia, J.R. (2010) . Treatment Guidelines and out Comes of Hospital . A cquired and Ventilator-Associated pneumonia . Oxford Journals., 51(1):48-53 .

Tyebi, Z.; seyedjavadi, S.S.; Goudarzi, M.; Rahimi, M.K.; Boromandi, S.; bostanbad, S.K.; Mirzaili, and mahdiyoun, M. (2014). Frequency and antibiotic resistance pattern in gram positive Uropathogen isolated from hospitalized patients with urinary tract infection in Tehran, Iran. Journal of Genes, Microbes and Immunity, gpages.

Uzair,B.; Ahmed, N.; Valimohammad, F. and Ahmad, V.U. (2008) . Detection isolation and partial characterization of Antifungat compounds produced by pseudomonas aeruginosae CMG1055. J. Chem. Soc. Pak., 30(4):649-653 .

Vanconcelos, U.; Lima, M.A. and Calazaus, G.M. (2010). Pseudomonas aeruginosae associated with negative interaction on coliform bacteria growth. SENRA academic publisher, Burnaby, british Columbia, 4(2):1133-1139.

Verhaz, A. ; Skrbic; R.; Rakic- Music, M. and Sabo, A. (2003). Catheter related urinary in fection at the clinical center in Banjaluka. Med- Preg1. 56(10):460-4.

Verma, A.; Arora,S.K.; Kuravi, S.K. and Ramphal, R. (2005) . Roles of specific amino acids in the N-terminus of pseudomonas aeruginosae flagellin and of flagellin glycosylation in the innate immune response . infect . Immune . 37912):8273-8246 .

Vissiller, S.; Delolne, F.; Bernillon, J.; Saulneir, J. and Wallach , J. (2001) . Hydrolysis of glycin-containing elastin pentapeptides by Las A, Metallo-Beta Lactomase from pseudomonas aeruginosae . Eur. J. Bio chem ., 268:1049-1057 .

Wairs, B.A. and Ibe, S.N. (2006) . Bacteriology of chronic discharging ears in port Harcourt . Nigeria . West Afr JMed., 25(3)219-22 .

Warrington, P.D. and RPBio,. D.(2001). Water Quality Criteria for Microbiological Indicators. Environment al protection Division, No2.

Whychoff, J.T.; Thomas, B.; Hasset, J.D. and Wozniak, J.D. (2002) . static growth of mucoid p.aeruginosae select for non-mucoid variants that have a cquired flagellum dependent motility . J. Microbiol . 148:3423-3430 .

Xu, Lo; wang, F.; Shen, Y.; Hou, H.; Liu, W.; Liu, C.; Jain, C.; wang, Y.; sun, M. and sun; Z.(2014). Pseudomonas aeruginosae inhibits the growth of pathogenic. Fungi: in vitro and in vivo studies. Experimental and therapeutic medicine 7:1516-1520.

Yasidi, B.M; Akawn, D.B.; Oinoma, O.j.; Bara, J.Y.; Mohammed, V.H.; Mohammed, G.N.; Ali, Z.B.; Joshua, L.; Ibrahim, H. ; Ali, Z.B.; okwong, O.K.(2015). Retrospective analysis of bacterial pathogens Isolated from wound infection at atertiary hospital in Nguru, Yobe state Nigeria. American Journal of Bio medical and life science 3(1):1-6.

Zang, Y.H.; Deng, S.L. and Liu, J.W.(2005). Analysis of susceptibility of pseudomonas aeruginosae isolated from burn toward antibiotics in vitro Zhonghue. Shaeo. Shang. Za. Zhi. 12(2):104-106.