العلاقة التأزرية لصبغة البايوسيانين pyocyanin المنتجة من بكتريا *Pseudomonasaeruginosa* و خميرة *Saccharomyces cerevisiae* تجاه بعض انواع البكتريا المرضية و المعزولة من عينات سريرية متعددة

فاطمة حسين بريج مورد [1*] , رغد أكرم عزيز [2*] , محمد فرج شذر [3*]

مستخلص البحث:
تضمنت الدراسة تأكيد تشخيص 29 عزلة من بكتريا *Pseudomonasaeruginosa* بالأعتماد على الفحوص الزرعية و المجهرية و الكيموحيوية , وعزلتين منخميرة *Saccharomyces cerevisiae*, فضلا عن جمع 12 عزلة مرضية من عينات سريرية متعددة من بعض مستشفيات مدينة الطب شملت كلا من *Staphylococcusaureus* , *Escherichia coli*, و تم تأكيد تشخيص جميع العزلات بنظام VITEK2 وحسب الكارت الخاص بالبكتريا السالبة و الموجبة لصبغة كرام بالإضافة للكارت الخاص بالخميرة ,ثم اجريت غربلة لبكتريا *Pseudomonasaeruginosa* المعزولة من الجروح و الحروقو القشع لغرض اختيار العزلة الأكفأ في انتاج صبغة البايوسيانين pyocyanin اذ بينت النتائج ان عزلة الجروح التي تمتلك اعلى تركيز و سجلت اعلى درجة امتصاصية هي الافضل في انتاج صبغة البايوسيانين pyocyanin, اختبرت حساسية البكتريا المرضية تجاه 10 انواع من المضادات الحياتية , وبينت النتائج ان اغلب العزلات مقاومة لمضادات (Ciprofloxacin, Imipenem, Amikacin) و متباينة التأثير لبقية المضادات , هذا و استعملت خمائر الخبز الجافة للحصول على عزلات خميرة *Saccharomyces cerevisiae* التي شملت كل من العزلة By 1 من الخميرة Super maya الصينية المنشأ والعزلة By2 من خميرة Glorpan الصينية المنشأ .كما أجريت غربلة لعزلات خميرة *S.cerevisiae* من اجل انتخاب العزلة الاكفأ في انتاج البروتينات المثبطة بإستعمال طريقة الانتشار في الحفر لمعرفة تأثير هذه المواد تجاه البكتريا المرضية قيد الدراسة , و قد اظهرت النتائج ان العزلة By 1 أعطت اعلى معدل تثبيط تجاه العزلات *S .aureus* , *E .coli* من العزلة By 2. ايضا تمقياس التركيز المثبط الادنى MIC لكل من صبغة البايوسيانين Pyocyaninو راشح خميرة *S.cerevisiae* تجاه العزلات البكتيرية قيد الدراسة و بإستعمال طريقة العكارة في الانابيب , واثبتت النتائج ان قيمة MIC كانت متباينة حسب تركيز الراشح و فعاليته و حسب تدرج البكتريا المرضية . كما درست العلاقة التأزرية بين صبغة البايوسيانين Pyocyanin و راشح *S.cerevisiae* تجاه البكتريا المرضية التي تم اختيارها لهذا الاختبار حسب درجة مقاومتها للمضادات الحيوية ,اذ اظهرت النتائج ان العلاقة كانت تآزرية و لا وجود لأي علاقة اخرى بسبب فعالية الصبغة مع الراشح على تثبيط فعل البكتريا المرضية . لذلك توصي الدراسة على التركيز على صبغة البايوسيانين Pyocyaninمع خميرة*Saccharomycescerevisiae* (كخلية كاملة او المواد المثبطة التي تنتجها) علاجاللإصابات التي تسببها بعض انواع البكتريا المرضية .

الكلمات المفتاحية :بكتريا *Pseudomonasaeruginosa*, صبغة البايوسيانين Pyocyanin, خميرة*Saccharomycescerevisiae* , البكتريا المرضية

***البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الاول .**

1 باحث قسم العلوم , كلية التربية الاساسية , الجامعة المستنصرية , واسط , العراق 07746068190 alok.hugerq1134@gmail.com
2 أستاذ دكتورة , قسم العلوم , كلية التربية الاساسية , الجامعة المستنصرية , بغداد ,العراق 07730405068drraizz@yahoo.com
3 أستاذ دكتور , قسم علوم الحياة , كلية العلوم , الجامعة المستنصرية , بغداد , العراق 07901756021dr.marjani@uomustansiriyah.edu.iq

المقدمة Introduction

ظهر اهتمام واسع في الآونة الاخيرة بإستخدام المعززات الحيوية من بكتريا و فطريات في مجال تعزيز صحة الانسان و الوقاية من الامراض , تعيش العديدمن الاحياء المجهرية في بيئتها الطبيعية حسب نظام التضاد المكروبي. (Microbial antagonism)والتي تعني ان كائن مجهري. يستطيع ان يقتل او يضر او يوقف نشاط ونمو كائن مجهري اخر بصورة مباشرة او غير مباشرة من دون أن يتأثرالاول به,اذتعد بكتريا*Pseudomonasaeruginosa*من الانواع البكتيرية الممرضة المنتشرة في البيئة (التربة والماء وعلى الانسجة النباتية والحيوانية) ، تعتبر هذه البكتريا من الكائنات الانتهازية Opportunistic Pathogens التي تشكل خطر على حياة الانسان فهي احد اهم مسببات عدوى المستشفياتinfectionNosocmial (Ranio واخرون ,2020) .تمتلك بكتريا*P. aeruginosa* اليات التصاق فعالة تمكنها من غزو واستعمار مواقع تشريحية مختلفة في جسم المضيف ، بسبب قدرتها على الانتشار في الانسجة الموضعية وتحطُّمها، كما يكون لها ميل لغزو مجرى الدم واحداث الامراض الجهازية diseaseSystemic (Esmat واخرون ,2020), و تمتلك هذه البكتريا مقاومة عالية لعملية البلعمة Phagocytosis و الدفاعات المناعية للمضيف Host immune defenses وتفرز انزيمات خارجية و ذيفانات وتعد من عوامل الضراوة الخارجية , اذ تحطم الحواجز الدفاعية و تشترك في الغزو البكتيري للأنسجة. تنتج بكتريا *P. aeruginosa* صبغات متنوعة تعد من نواتج الايض الثانوي ذات التأثيرالمثبط للعديد من انواع الاحياء المجهرية، و اهم تلك الصبغات : صبغة البايوسيانين Pyocyanin لونها ازرق مخضر , تلاحظ على سطح الطبق الزرعي الصلب و تعد هذه الصبغة صفة تشخيصية للبكتريا(Karakonstantis واخرون ،2020) , و تعد صبغة pyocyanin مستقلب ثانوي ازرق – مخضر اللون ، ولها نشاط واضح في تثبيط انواع بكتيرية اخرى، اذ تم دراسة تأثيرها المضاد تجاه عدد من الانواع البكتيرية في المختبر *In vitro* وفي جسم الكائن الحي *In vivo* . تعتبر صبغة البايوسيانين pyocyanin من اهم مشتقات الفينازينات Phenazines المنتجة من بكتريا *P. aeruginosa* , اذ تستعمل الفينازينات كمضادت حيوية ، فضلا عن استعمالها الواسع في مجال الادوية و التقانات الحيوية (Montel, 2015) . تأتي الفطريات بعد البكتريا في قدرتها على انتاج المواد المثبطة أو السامة للأحياء المجهرية الاخرى فيمكن للعديد من الخمائر ان تنتج او تفرز سموما خارج الخلايا((Extracellular toxins التي قد تكون مميتة(Lethal) لباقي سلالات الخمائر الحساسة لها(Martins , 2007).تعتبر خميرة *S.cerevisiae*من المعززات الحيوية التي تنتج مواد مثبطة قادرة على قتل الميكروبات و الممرضات الموجودة معها في نفس الوسط , و هذه المواد عبارة عن مواد بروتينية ذات فعالية قاتلة تعمل على تحطيم الغشاء البلازمي للخلية البكتيرية , وهذه الفعالية التثبيطية تعتمد على درجة الحرارة و الرقم الهيدروجيني pH فضلا عن انتاجها للسموم و الانزيمات المثبطة لخلايا الممرضات , للخميرة دور في تعزيز الجهاز المناعي لهذا استعملت في تطبيقات علاجية متعددة مثل علاج الاسهال , ايضا تنتج الخميرة انزيم الفوسفاتيز phosphatase الذي يعمل على ازالة السموم الداخلية المفسفرة و يثبط اثارها السامة للخلايا مثل عديد السكاريد الدهنية في *E . coli* و حسب ما جاء به Elghandour وآخرون (2020).

المواد و طرائق العمل and methodsMaterials

عزلات بكتريا*Pseudomonasaeruginosa*

استعملت خلال هذه الدراسة 29 عزلة من بكتريا *P. aeruginosa* من اصابات الجروح و الحروق و القشع المعزولة من مصادر سريرية متعددة , تم التأكد من تشخيصها بالأعتماد على الفحوص الزرعية و المجهرية و الكيموحيوية و حسب ما جاء بهShivangiوآخرون (2017) على انها بكتريا *P. aeruginosa* فضلا عن تشخيصها بإستعمال نظام Vitek 2 لغرض استعمالها في انتاج صبغة البايوسيانين Pyocyanin .

عزلاتخميرة *Saccharomycescerevisiae*

تم جمع نماذج مختلفة من الخميرة المستوردة من مناشيء مختلفة من الأسواق المحلية شملت كلا من العزلة1 By من الخميرة Super maya الصينية المنشأ والعزلة By2 من خميرة Glorpan الصينية المنشأ . شخصت العزلات حسب الصفات المجهرية و الزرعية الخاصة والاختبارات الكيموحيوية كذلك التشخيص بإستعمال نظام Vitek 2(Elghandour , 2020) .

عزلات البكتريا المرضية isolatesbacterialPathological

جمعت 12 عزلة من البكتريا المرضية من مصادر سريرية متعددة (الجروح والحروق) من بعض مستشفيات مدينة الطب في بغداد شملت كلا من *Escherichia coli* , *Staphylococcusaureus* , تم تشخيص العزلات بالأعتماد على الصفات المظهرية و الزرعية (Bedard وآخرون , 2016) فضلا عن التشخيص بجهاز Vitek 2. فحص حساسية عزلات البكتريا المرضية لبعض انواع المضادات الحياتية اختبرت حساسية العزلات البكتيرية لبعض انواع المضادات الحيوية كمضادات (Amikacin , Cefotaxime , Amoxicillin , Ceftazidime , Imipenem , Ciprofloxacin , Norfloxacin , Piperacillin , Streptomycin , Tetracycline) حسب الطريقة المذكورة في, .Parai وآخرون (2018) و بإستعمال الوسط الزرعي المغذي الصلب .

الكشف المظهري لصبغة pyocyanin المنتجة من بكتريا *P. aeruginosa*

تعد الصبغة الخضراء من منتجات الايض الثانوي لبكتريا *P. aeruginosa*اذ تم الكشف المظهري عنها بتلقيح البكتريا في وسط Nutrient broth بإستعمال ماصة دقيقة micropipette , بعد تنميتها على وسط king – A agar ثم حضنت بدرجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة (Alka واخرون , 2018) .

الكشف الكمي عن صبغة pyocyanin

تم تلقيح بكتريا *P. aeruginosa*على وسط Nutrient broth بدرجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة , في انابيب اختبار ثم وضعت الانابيب في جهاز النبذ المركزي بسرعة 4000 دورة/ بالدقيقة ،لمدة 10 دقائق , بعدها اخذ الرائق واضيف له الكلوروفورم بنسبة 2 : 1 % ثم مزج بشكل مستمر لمدة 10 ثوان ، اذ تحولت الطبقة السفلى الى اللون الأزرق ، ثم اضيف حجمين من الطبقة الزرقاء الى حجم واحد من محلول كاشف صبغة pyocyanin - Hcl حامض الهيدروكلوريك بتركيز 2 . 0 عياري مع المزج لمدة 10 ثوان ، اذ تحول اللون الأزرق الى لون وردي – محمر، بعدها قيست الامتصاصية على طول موجي 520 نانومتر بجهاز المطْياف الضوئي لمعرفة تركيز الصبغة وذلك بالأعتماد على المعادلة التالية

تركيز صبغة pyocyanin = O.D × 17.072 (ALmarjani و Khadem , 2018) .

استخلاص صبغةالبايوسيانين pyocyanin

حسب ما جاء في Nawas و ELfeghali (2018) تمتحضير 1 لتر من وسط Nutrient broth في دوارق حجمية معقمة بحجم 500 مللتر, ثم لقحت بكتريا*P. aeruginosa*المنشطة على وسط Nutrient agarفي درجة حرارة37 م لمدة 24 ساعةبنسبة 5% من حجم الوسط السائل ، ووضعت في الحاضنة الهزازة shaker incubator في درجة حرارة37 م لمدة 72 ساعة، مع سرعة150 هزة / دقيقة ، بعد انتهاء فترة التحضين وضع الوسط الحاوي على الخلايا البكتيرية في انابيب اختبار التي وضعت بعد ذلك في جهاز النبذ المركزي بسرعة 4000دورة / بالدقيقة ،لمدة 15 دقيقة ثم أُخذ الرائق واضيف له الكلوروفورم بنسبة 2 : 1 % و بعد المزج المستمر لمدة 10 ثوان الى ان تحولت الطبقة السفلى الى اللون الأزرق تم اضافة حجمين من الطبقة الزرقاء مع حجم واحد من محلول كاشف صبغة pyocyanin Hcl حامض الهيدروكلوريك بتركيز 2. 0 عياري مع المزج لمدة 10 ثوان اذ تحول اللون الأزرق الى لون وردي – احمر، ثم اضيف كاشف صبغة NaoH – pyocyanin Boratبتركيز 4. 0 مولاري , ذي رقم هيدروجيني 10 ، للمحلول اعلاه الى ان تغير اللون الأحمر الى ازرق ، تم اعادة خطوة اضافة الكلوروفورم و الخطوات اللاحقة لها , ثم ترك المستخلص لكي يتبخر الكلوروفورم في درجة حرارة الغرفة للحصول على المادة المطلوبة بشكل مسحوق للصبغة , و للتأكد من الصبغة قرأت في جهاز المطّياف الضوئي Spectrophotometer على طول موجي 490 نانومتر، وسجلت الامتصاصية (Nawas و ELfeghali , 2018) .

التحري عن الفعالية التثبيطية لصبغة البايوسيانين pyocyanin تجاه البكتريا المرضية

تم اعتماد طريقة الانتشار في الحفر Well diffution methodللتحري عن الفعالية التثبيطيةلصبغة البايوسيانين pyocyaninضد البكتريا المرضية (Bezalwarوآخرون,2019).

غربلة عزلات خميرة *S.cerevisiae* المستعملة قيد الدراسة

إجريت غربلة لعزلات الخميرة الجافة والمستوردة المستعملة قيد الدراسة والتي تشمل كلا من العزلة By1 من خميرة Super maya الصينية المنشأ والعزلة By2 من خميرة Glorpan الصينية المنشأ من اجل اختيار العزلة الأكفأ انتاجابالأعتماد على قطر منطقة التثبيط التي تحدثها رواشح الخمائر المركزة لمرتين بإستعمال اكياس التنافذ الغشائي في البكتريا الاختبارية التي تم تنميتها على وسط المولر هنتون الصلب (Aziz , 2015) .

التحري عن الفعالية التثبيطية لراشح خميرة *S.cerevisiae* ضد البكتريا المرضية

استخدمت طريقة الانتشار في الحفر Well diffution methodللتحري عن الفعالية التثبيطية لراشح خميرة *S.cerevisiae*ضد البكتريا المرضية (Bezalwar . 2019)

تقدير البروتين estimationProtein

اتبعت الطريقة التي وصفها Bradford (1976) لتقدير تركيز البروتين .

قياس التركيز المثبط الأدنى القاتل (MIC) و (MBC) لصبغة البايوسيانين Pyocyanin و راشح خميرة *S.cerevisiae* تجاه البكتريا المرضية

لتحديد قيمةMinimum inhibitory concentration (MIC)و Minimum Bactericidal Concentration (MBC) لتركيز صبغة Pyocyanin و راشح خميرة *S.cerevisiae* في تثبيط نمو البكتريا المرضية ، اتبعت طريقة الأنابيب Tube method كما جاء في Pitchaipillaiواخرون (2020)

1) نشطت العزلات البكتيرية على وسط نقيع القلب والدماغ السائلBrainInfusion - Heart broth في درجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة.ثم حضر عالق البكتريا المرضية وتم عمل ماكفرلاند لها كما في اختبار حساسية المضادات الحيوية.
2) تم إذابة صبغة البايوسيانين Pyocyanin بتركيز(0.0121 gm) في 8 مللتر ماء مقطر لتحضير سائل من الصبغة بالتراكيز المخففة النصفية .
3) حضرت تخافيف نصفية من راشح خميرة *S.cerevisiae* المركز(93.979) , و للعمل تم اضافة 500 مايكرولتر من وسط السائل المغذي brothNutrient , و اضافة 500 مايكرولتر من التخافيف المحضرة مسبقا , ثم اضيف 10 مايكروليتر من البكتريا المرضية المحضرة حسب محلول ماكفرلاند لكل انبوبة . مع عمل انبوبة سيطرة ControlPositive موجبة يوضع فيها نفس الاضافات عدا التخافيف المحضرة , و انبوبة سيطرة سالبة Negative Control يوضع فيها الوسط المحضر فقط .
4) وضعت الانابيب بعد ذلك في جهاز المزج Vortex لضمان انتشار البكتريا في العالق . ثم وضعت الانابيب في الحاضنة بدرجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة . وللتأكد من وجود نمو ادنى للبكتريا ، تم اخذ عالق من الانبوب الأقل تضبب بعد الحضن ، وزرع على وسط Nutrient agar للتأكد من وجود نمو بسيط للمستعمرات. تمت قراءةالنتائج فيما بعد حيث اعتبرتاخرمنطقة فيها نمو على الوسط هي منطقةMICوالمنطقةالتي تليها من عدم النموهي منطقةMBC (Panàček واخرون , 2016) .

دراسة التأثير التآزري لصبغة البايوسيانين Pyocyanin و راشح خميرة *S.cerevisiae*
اتبعت طريقة رقعة الشطرنج Chequer board لأنها الطريقة التي تستطيع تحديد نوع العلاقة بين مضادين وتحديد أقل تركيز من المضاد الاول مع أقل تركيز من المضاد الثاني والذي يعطي تأثيرا و كما يلي:
1) اختيار العزلة الاكفأ من البكتريا المرضية,و اختيار محلول صبغة البايوسيانين Pyocyanin والعزلة الأكفأمن خميرة *S.cerevisiae* حسب عمل MIC
2) عمل 8 تخافيف للعزلات المختارة للعمل في النقطة السابقة و تم اضافة 4 مللتر من وسط السائل المغذي brothNutrient لكل انبوبة .
3) تم تنشيط العزلات البكتيرية على وسط نقيع القلب والدماغ السائل Brain - Heart Infusion broth في درجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة , و عمل تخفيف ماكفرلاند من العزلات بعد انتهاء الحضن.
4) تم اضافة 100 مللتر من الوسط نفسه لكل حفرة من الحفر الخاصة بأطباق المعايرة الدقيقة microtiter , ثم اضيفت التخافيف من التراكيز العالية للتراكيز الواطئة في الحفر.
5) اضيف 20 مللتر من العالق البكتيري المحضر حسب ماكفرلاند , يترك اخر صفين من الحفر للسيطرة الموجبة و السالبة كما في عمل MIC .
6) توضع microtiter في الحاضنة بعد انتهاء العمل في درجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة , بعد انتهاء مدة الحضن تم قراءة النتائج بجهاز المطياف الضوئي .

تم حساب التركيز المثبط الجزئي Fractional Inhibition Concentration (FIC) بتطبيق معادلة التركيز المثبط الجزئي لكل مضاد و كما يلي :

$$FCI = \frac{MIC\ of\ A}{MIC\ of\ B}$$

ΣFIC =FIC for Pyocyanin + FIC for *S.cerevisiae*

A : محلول صبغة البايوسيانين .

B: المادة المستخلصة من خميرة *S.cerevisiae*

النتائج و المناقشة Discussion andResults

جمع و تشخيص عزلات بكتريا *P. aeruginosa*

تم الحصول على 29 عزلة من بكتريا *P. aeruginosa*معزولة من الحروق و الجروح و القشع , و بينت نتائج الفحوص الزرعية للمستعمرات النامية على اوساط مختلفةمنها وسط الاكار المغذي الصلب agarNutrient , وسط السترمايد الصلب Cetrimide agar , وسط King A agar الذي يعتبر وسط تفريقي للبكتريا المذكورة , و بدرجة حضن 37 م لمدة 24 ساعة ان المستعمرات مستديرة , ناعمة , مخاطية , ذات لون اخضر مزرق بسبب انتاج البكتريا لصبغة Pyocyanin بنسبة عالية جدا عن باقي الصبغات الاخرى التي تنتج من نفس البكتريا (Ankita واخرون , 2016) , في حين بينت نتائج الفحص المجهري من خلال المجهر الضوئي بأن الخلايا البكتيرية قيد الدراسة و المصبوغة بصبغة كرام خلايا عصوية الشكل قد تلونت بلون احمر , و سالبة لصبغة كرام و ذات خلايا مفردة او مزدوجة (Moore و Hatcher ,2019), اما نتائج الفحوص الكيموحيوية المعتمدة في التشخيص بينت ان جميع عزلات بكتريا *P. aeruginosa*موجبة لاختبار الكتاليز Catalase Test و الأوكسيديزTest Oxidaseواختبار النمو بحرارة 45 مْ فضلا عن ايجابيتها لاختبار الحركة الذي بين قدرة بكتريا *P. aeruginosa* على الحركة , في حين اظهرت نتيجة سالبة لاختبار فوكس برسكاور – احمر المثيل واتفقت هذه النتائج مع ما ذكره Shivangi (2017) , واكد التشخيص بنظام الفايتك ان جميع العزلات قيد الدراسة تعود الى *P. aeruginosa* .

عزل و تشخيص خميرة *S.cerevisiae*

أمكن الحصول على عزلتين تعود لخميرة *S.cerevisiae* و التي عزلت من خمائر الخبز الجافة , اذ زرعت على الوسط السائل YEGP الخاص بالخميرة , و بعد حضن بدرجة حرارة 30 م لمدة من 24 الى 48 ساعة و بظروف هوائية , اظهرت الصفات الزرعية ان المستعمرات النامية على الوسط الصلب , كانت ناعمة , مرفوعة من الوسط , ذات لون كريمي , حوافها ملساء , مسطحة , كبيرة الحجم و دائرية الشكل , اضافة الى رائحتها المميزة (Al-Musawi واخرون , 2016) .اما الفحوص الكيموحيوية و التشخيص بنظام الفايتك Vitek 2 و حسب الكارت الخاص بالخميرة , اكد ان العزلات تابعة لخميرة *S.cerevisiae* .

جمع و تشخيص البكتريا المرضية isolatesbacterialPathological

جمعت 12 عزلة بكتيرية مرضية و زرعت على اوساط متعددة منها التفريقية ومنها الاختيارية لغرض التشخيص الاولي لها بالأعتماد على صفاتها الزرعية و المجهرية , اذ تميزت بكتريا *S aureus*. بمستعمراتها , اذ نميتعلى وسط المانيتول الصلب agarsaltManetol , و حضنت بدرجة حرارة 37 م و لمدة 24 ساعة , بعد انتهاء الحضن شخصت البكتريا عن طريق صفاتها المظهرية على هذا الوسط التفريقي للبكتريا, اذ كانت مستعمراتها صفراء , مستديرة , ملساء , مرتفعة و ذهبية اللون , بسبب قدرتها على مقاومة التركيز الملحي العالي للوسط , منتجة للحامض بعد 24 الى 48

ساعة من الحضن في درجة حرارة 37 م (Tracey و Unakal, 2019). وعادة ما تشكل البكتريا صبغة كاروتينويد التي تسمى Staphyloxanthin التي تعطيها اللون الذهبي المميز لمستعمراتها , و هذا يعزز من إمراضيه البكتريا عن طريق تعطيل تأثير المضادات الحيوية , وانواع الاوكسجين التفاعلية داخل خلايا العدلة Neutrophil كما في جدول (1) (Mahon و Lehman، 2019) . و ظهرت بكتريا*S .aureus* خلال الفحص المجهري بشكل كريات بنفسجية موجبة لصبغة كرام نتيجة لأصطباغها بصبغة كريستال البنفسجية , و منتظمة بشكل عنقود العنب حسب ما ورد في Arleenواخرون (2018) .في حين ظهرت مستعمرات بكتريا *E. coli* بلون وردي لماع مع حواف ناعمة متميزة على وسط الماكونكي الصلب, بسبب قدرتها على تخمر سكر اللاكتوز الموجود في الوسط , هذا يؤدي لتكوين حامض اللاكتيك الذي يعمل على تغير لون المادة الكاشفة للون الاحمر , يعد هذا الوسط من الاوساط التفريقية لهذه البكتريا بسبب احتوائه على املاح الصفراء وصبغة violet Crystal التي تثبط نمو البكتريا الموجبة لصبغة كرام (Jawetz و Melnick، 2019) . اما التشخيص المجهري لبكتريا *E. coli* , بين ان البكتريا سالبة لصبغة كرام كما في جدول (2) (Sohyunواخرون, 2018) . بعدها تم تشخيص البكتريا المرضية بنظام Vitek 2 لأنه نظام التشخيص الاكثر دقة لهذه العزلات.

جدول (1) : نوع و مصدر و عدد بعض العزلات البكتيرية المرضية و المعزولة من عينات سريرية متعددة

العزلات البكتيرية	مصدر العزلة	العدد	النسبة %
E. coli	(Urine – Wounds جروح, Burns حروق)	3	7.31
Pseudomonasaeruginosa	(حروق Burns, جروح Wounds - قشع Sputum)	29	70.73
S .aureus	(حروق Burns, جروح Wounds)	9	21.95
المجموع		41	

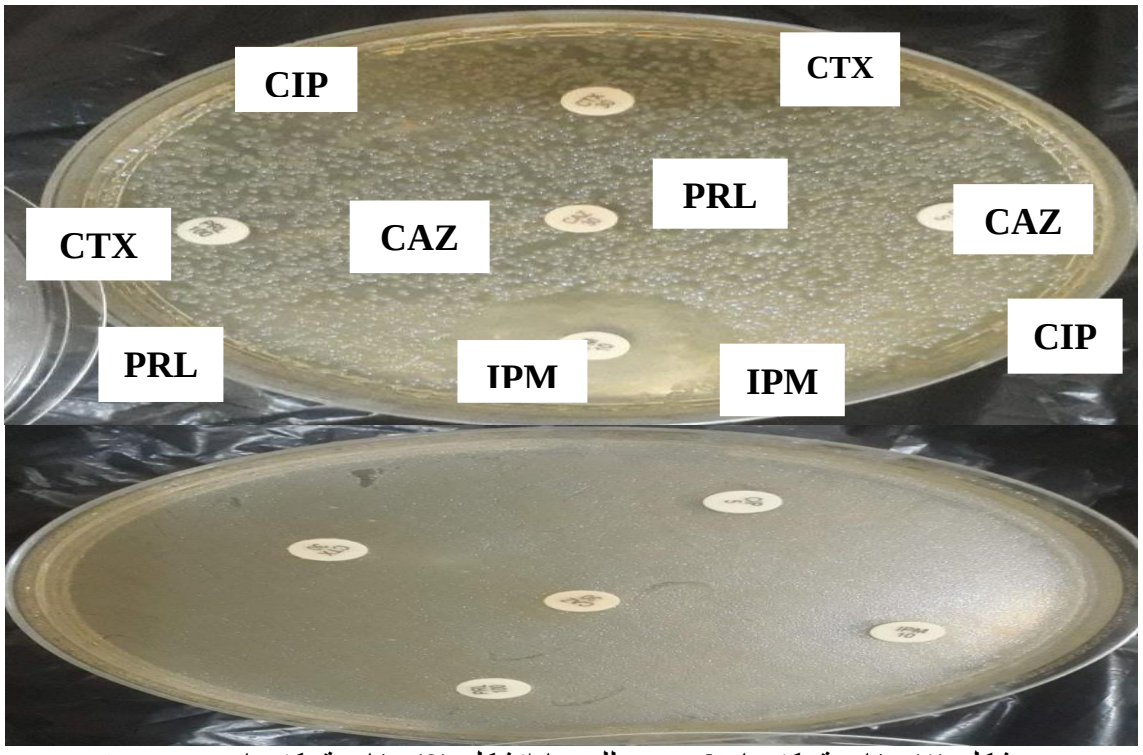
جدول (2) : نتائج الاختبارات الكيموحيوية للعزلات البكتيرية قيد الدراسة

العزلات الاختبار	*S .aureus*	*P. aeruginosa*	*E. coli*
اختبار الأوكسيديز	_	+	_
اختبار الكتاليز	+	+	+
اختبار احمر المثيل	----------	_	+
اختبار MR - VP	----------	_	_
النمو بحرارة 45 مْ	----------	+	----------
اختبار الحركة	----------	+	----------

+ نتيجة موجبة , -النتيجة سالبة , ------- لا يوجد اختبار

اختبار حساسية البكتريا المرضية للمضادات الحيوية

اختبرت حساسيةَ 12 عزلة بكتيرية مرضية تجاه 10 انواع من المضادات الحيوية وتم اعتماد النتائج وفق قياس اقطار تثبيط البكتريا الحساسة Sensitive و المتوسطة الحساسية Intermediate و البكتريا المقاومة Resistance للمضادات بمقارنتها مع (2020,CLSI) . أظهَرت عزلات *E. coli* المعزولة من الحروق و الجروح و الادرار كما في شكل(1) مقاومة اتجاه مضادCiprofloxacin, Cefotaxime, Amoxicillin,Ceftazidime,Norfloxacin, Piperacillin, Tetracycline, بينما كانت متوسطة الحساسية تجاه Amikacin , و حساسة تجاه مضاد Imipenem, Streptomycin. ان سبب المقاومة العالية لأكثر المضادات الحيوية حسب ما اشار اليه Mourouge و Al–Rafyai (2019) بسبب الاستعمال المفرط للمضادات الحيوية، الطفرات التي تشفر لأنزيمات و انتقال المقاومة بوساطة البلازميد , ان انتاج انزيمات β-lactamases التي تضمنت انزيمات Cephalosporinase و Penicillinase اذ تعمل على تحطيم حلقة البيتا لاكتام β- lactam التي تثبط عمل المضادات الحيوية التابعة لمجموعة Penicillinsو Cephalosporins, فضلاً عن تغيير نفاذيَّة الغشاء الخارجي للخلية, وامتلاكها انظمة الدفقEfflux pumps مكنت بكتريا *E. coli* من هذه المقاومة العالية (Paraiواخرون ,2018) . اما المقاومة لمضادات مجموعةQuinolones ومنها مضاد Ciprofloxacin هي بسبب تغيير موقع الهدف , و تقليل نفاذية الغشاء الخارجي للبكتريا (mdul واخرون ، 2018) , كذلك تثبيط تصنيع الحامض النووي DNA عن طريق انزيمgyrase DNA(Tuleواخرون،2017).في حين اظهرت معظم عزلات *S .aureus* المعزولة من الجروح مقاومة تجاه مضادات Piperacillin , Ciprofloxacin , Tetracycline , Cefotaxime , Ceftazidime. ومتوسطة الحساسية تجاه Amikacin , Streptomycin , Amoxicillin , Ciprofloxacin . و حساسة تجاه مضادات Imipenem, اما بكتريا *S .aureus* المعزولة من الحروق اظهرت مقاومة تجاه مضاد Piperacillin, Cefotaxime, Tetracycline , Ceftazidime, . و كانت حساسة تجاه Amikacin, Imipenem, Norfloxacin. و متوسطة التأثير تجاه مضاد Streptomycin , Amoxicillin, Ciprofloxacin كما هو موضح في جدول (3) و شكل (2) . يعد مضاد Tetracyclineمن المضادات التي تؤثر على عملية تصنيع البروتين من خلال الارتباط مع رايبوسوم الخلية البكتيرية ,و سبب المقاومة لهذا المضاد هو انظمة الدفق التي تمتلكها البكتريا اذ تعمل هذه الانظمة على تقليل َتراكم المضاد داخل الخلية مما ينتج عنه تلك المقاومة (Lok واخرون , 2018) . ان مقاومة البكتريا لمضادات β- lactam يرجِع الى قابليتها الفائقة على انتاج انزيمات β-lactamase اذ تعمل هذه الانزيمات على تحطيم حلقة β- lactam للمضاد الحيوي , اما مضاد Ciprofloxacin فتقاربت النتائج مع دراسةCaneirasواخرون (2018) الذي اشار الى نسبة مقاومة لعزلات بكتريا 20*S .aureus* % (Jeber وSaeed, 2013) .



شكل (1) مقاومة بكتريا *E. coli* للمضاداتشكل (2) مقاومة بكتريا *S .aureus* للمضادات Ceftazidime, Piperacillin Ceftazidime, Piperacillin Ciprofloxacin, Imipenem, Cefotaxime, Ciprofloxacin, Cefotaxime, Imipenem وحساسة

جدول (3) : مقاومة و حساسية العزلات البكتيرية المرضية تجاه المضادات الحيوية

المضادات الحيوية										العزلات البكتيرية
AK		PRL	CIP CAZ		CTX IPM		AX S	TE NOR		
I	R	R	R	R	R	R	S	S	R	*E. coli*
I	R	R	R	R	R	R	S	S	R	*E. coli*
I	R	R	R	R	R	R	S	S	R	*E. coli*
R	R	I	R	I	R	R	I	I	R	*S .aureus 1*
S	R	S	R	I	R	R	S	I	S	*S .aureus 2*
I	R	R	R	I	R	R	R	R	R	*S .aureus 3*
S	R	S	R	I	R	R	S	I	S	*S .aureus 4*

S	R	S	R	I	R	R	S	I	S	*S .aureus 5*
I	R	I	R	I	R	R	I	I	I	*S .aureus 6*
I	R	I	R	I	R	R	I	I	I	*S .aureus 7*
R	R	I	R	I	R	R	I	I	R	*S .aureus 8*
I	R	I	R	I	R	R	I	R	R	*S .aureus 9*

مقاومة R حساسة S متوسطة I

, CAZ: Ceftazidime , CTX: Cefotaxime , AX: Amoxicillin , AK : Amikacin
,S : Streptomycin , IPM:Imipenem , CIP:Ciprofloxacin , PRL: Piperacillin
NOR : Norfloxacin , TE : Tetracycline

التشخيص بنظام 2Vitek

بينت نتائج التشخيص بنظام الفايتك و بإستعمال كارت خاص بالبكتريا السالبة و الموجبة لصبغة كرام ان جميع العزلات كانت عائدة لبكتريا *Pseudomonasaeruginosa*, *S.aureas*وبكتريا*E.coli*المعزولة من الجروح و الحروق , فضلا عن تشخيص خميرة*S.cerevisiae* بالكارت الخاص بها , اذ كان هذا التشخيص دقيق جدا و هو تأكيد للفحوصات الكيموحيوية اذ يحتوي على 64 اختبار كيميائي , و بوقت تحضين يتراوح بين 5 الى 8 ساعات , اكدت نتيجة تشخيص الفايتك ان البكتريا المعزولة ذات كفاءة عالية تصل الى 98 % من غيرها من العزلات (Gharajalar, 2017) .

اختيار العزلة الأكفأ من بكتريا *P. aeruginosa*و خميرة*S.cerevisiae*

لغرض انتخاب العزلة الأكفأ من اجل اجراء التجارب عليها تمت عملية غربلة للعزلات قيد الدراسة , اذ تمت تنشيط العزلات وتنميتها على الاوساط التفريقية الخاصة بها و بعدها حضنت حسب ظروف الحضن الخاصة بكل عزلة .

الكشف المظهري لصبغة pyocyanin

اظهر الكشف المظهري لصبغة pyocyaninبعد تنميتها على الوسط الامثل لنموها و حسب درجة الحرارة المثلى , pH , تأثير فترة و نوع التحضين, ان انتاج صبغة pyocyanin في 86 .75% من العزلات قيد الدراسة , كان اعلى نسبة انتاج للصبغة في وسط King – A agar , اما وسط Citrmaid agar و Nutrient agar فقد كان انتاج الصبغة اقل فيهما (King , 2017). اشار Queeneth واخرون (2018) ان وسط King – A agar وسط انتقائي لصبغة pyocyanin لأنه يمنع ظهور صبغات اخرى بسبب مكونات الوسط من نيتروجين , فيتامينات , احماض امينية ضرورية تساعد على انتاج الصبغة , ببتون , و كبريتات المغنيسيوم التي تعمل على زيادة انتاج الصبغة وزيادة نشاط الخلايا المنتجة لها , تنتج عزلات بكتريا *P. aeruginosa* صبغات اخرى اضافة لصبغة pyocyanin , كصبغة pyoverdin حمراء اللون , و fluorescein خضراء اللون مصفرة , لذا فإن استخدام الوسط التفريقي يعزز من انتاج الصبغة المطلوبة

(Parai واخرون , 2018) .

الكشف الكمي عن صبغة pyocyanin

اظهر الكشف الكمي لصبغة pyocyaninبإستعمال جهاز المطياف الضوئي ان اعلى انتاج للصبغة17.652 ميكرو غرام / مللتر كانت من عزلات الحروق , اذا ان عزلات الجروح كانت نسبتها اقل في كمية الصبغة المنتجة منها , وهذا الاختلاف بسبب عوامل التنظيم الجيني لكل نوع من العزلات و حسب موقع الاصابة (Barakat واخرون , 2015) , و يعتمد اختبار الكشف الكمي عن صبغة pyocyanin بكمية استخلاص الصبغة و مقدار امتصاص الكثافة الضوئية عند طول موجي 520 نانومتر في محلول حامضي (El- Fouly واخرون , 2015) .كما ان اضافة حجمين من كاشف صبغة pyocyanin حامض الهيدروكلوريك الى حجم واحد من الكلوروفورم الممزوج مع صبغة pyocyaninيحول لون الصبغة الازرق الى اللون الوردي – المحمر بسبب تحول الوسط الى حامضي (Wamik , 2018) .

استخلاص صبغة pyocyanain

لاستخلاص pyocyanin من عزلات بكتريا *P. aeruginosa*, زرعت العزلات على الوسط السائل المغذي Nutrient broth , و حضنت بالحاضنة الهزازة بدرجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة , وبعد انتهاء الحضن وزع الوسط الحاوي بأنابيب اختبار ووضعت الانابيب في جهاز النبذ المركزي بسرعة 3500دورة / بالدقيقة لمدة 15 دقيقة و بدرجة حرارة 25 م , ثم اخذ المستخلص واضيف اليه المذيب العضوي الكلوروفورم بواقع حجمين من الكلوروفورم لكل حجم واحد من المستخلص , انتجت هذه العملية محلول ازرق اللون بعد اضافة الكلوروفورمالى وسط النمو Nutrient brothالذي كان اخضر اللون بنسبة1:2، والذي تم تأكيدهبأضافةكاشف صبغة HCL pyocyanainبتركيز 0.2مولارياذ ادى الى تغير اللونالازرقالى اللون الاحمر (Queeneth واخرون , 2018) .و من خلال هذا الكاشف اكدت pyocyanin بالكشف اللوني , اذ ان Pyocyanin مركب نشط حيويا قابلللذوبان بالماء ، ذات لون ازرق عند استخلاصها بالكلوروفورم, بعدها تم وضع المستخلص في دورق زجاجي و ترك في درجة حرارة المختبر لغرض ان يجف و يتم الحصول على الصبغة كمسحوق و حفظت في انابيب زجاجية محكمة الغلق Screw tubes لحين الاستعمال . دراسة الفعالية التثبيطية لصبغة البايوسيانين pyocyaninو راشح خميرة *S.cerevisiae*بإستعمال طريقة انتشار الحفر Well diffution method

تم دراسة الفعالية التثبيطية لمحلول صبغة البايوسيانين pyocyaninو راشح خميرة *S.cerevisiae*تجاه العزلات المرضية , اذ اظهرت النتائج ان محلول الصبغة المركز و الراشح المركز من خميرة *S.cerevisiae* اعطت اعلى تثبيط من الرواشح المخفف (Bezalwar واخرون , 2019) , اذ بينت نتائج التثبيط لصبغة البايوسيانين pyocyaninاختلاف قطر منطقة التثبيط تجاه العزلات المرضية, اما بكتريا *E.coli*فقد تشابهت نتائج التثبيط لمحلول الصبغة المركز مع نتائج بكتريا *S.aureas*لكنها اختلفت بأقطار تثبيط المحلول المخفف. في حين اظهرت نتائج راشح خميرة *S.cerevisiae*للراشح المركز و للراشح المخفف لبكتريا *S.aureas*وبكتريا*E.coli*نتائج متشابهة لنتائج الصبغة تجاه بكتريا *S.aureas*وبكتريا*E.coli* . ان فعالية صبغة البايوسيانين Pyocyanin التثبيطية شملت البكتريا الموجبة و السالبة لصبغة كرام , اذا اظهرت النتائج ان بكتريا *S .aureus* كانت اكثر العزلات حساسية لفعالية البايوسيانين Pyocyanin , اذ ان تعرض الخلايا البكتيرية الى ظروف الاجهاد التأكسدي بسبب صبغة البايوسيانين Pyocyanin يزيد من مستويات انظمة الكبح التأكسدي (Superoxide disututase (SOD و (GSH - pxperoxidiaseglutathione) .

ايضا ان تفاعل الصبغة مع السلسلة التنفسية لغشاء الخلية الحساسة يؤثر على اداء عمليات الايض الخلوي بشكل طبيعي , لذلك كانت صبغة البايوسيانين Pyocyanin ذات تأثير مثبط للعزلات البكتيرية السالبة و الموجبة لصبغة كرام . اما الاختلاف في اقطار مناطق التثبيط للراشح المركز و المخفف لعزلات خميرة*S.cerevisiae* الى اختلاف الفعالية الفسلجية لكل عزلة مرضية والتي تعود إلى الاختلاف في تركيبتها الجينية التي بدورها تنعكس على فعالياتها الايضية المختلفة ونشاط أنزيماتها و قابليتها على استهلاك المواد الغذائية الموجودة في محيطها والتي لها تأثير مباشر في عملية التكاثر و تخليق التراكيب الخلوية المختلفة , اذ تمتلك بعض سلالات خميرة *S.cerevisiae* القابلية على انتاج السموم القاتلة التي تعمل على منع او تأخير نمو كائنات اخرى تتواجد معها في الوسط نفسه وتكون غير مؤثرة فيها ، اذ كانت اولى الدراسات حول طبيعة هذه المواد المثبطة من قبل Bevan و Wood عام 1968 عندما وجدا ان الخميرة لها القدرة في افراز مواد بروتينية ذات طبيعة حامضية في الوسط الزرعي مما يؤدي الى قتل الخلايا الحساسة لهذه المواد التي تتواجد في الوسط ذاته و سميت حينئذ بالعوامل القاتلة . في حين اشارت دراسات اخرى الى ان المواد البروتينية المثبطة التي تنتجها الخميرة تختلف في فعاليتها التثبيطية تجاه عزلات البكتيرية الموجبة و السالبة اعتمادا على المستقبلات الموجودة على سطح الخلايا البكتيرية كما في جدول (4) (Aziz , 2015)

جدول (4) اقطار مناطق التثبيط لصبغة البايوسيانين Pyocyanin و راشح خميرة *S.cerevisiae* بالملمتر تجاه البكتريا المرضية

البكتريا المرضية	محلول 1 بايوسيا نين 100 ملغرام / مل	محلول 1 بايوسيا نين 50 ملغرام / مل	محلول 2بايوسيانين 100 ملغرام / مل	محلول 2بايوسياند ين50 ملغرام / مل	راشح خميرة مركز 1 مايكروغ رام / مل	راشح خميرة مخفف 1 مايكروغ رام / مل	راشح خميرة مركز 2 مايكروغ رام / مل	راشح خميرة مخفف 2 مايكروغ رام / مل
S .aureus 1	12	10	12	10	16	10	19	12
S .aureus 2	12	10	14	11	17	13	19	13
S .aureus 3	12	10	11	10	15	13	19	16
S .aureus 4	13	11	12	7	14.5	12	19	12
S .aure	12	9	20	11	15	13	18	12

								us 5
11	14	11	20	10	11	10	12	*S .aureus 6*
12	18	16	17	10	12	11	17	*S .aureus 7*
13	19	15	18	10	13	9	12	*S .aureus 8*
13	16	14	16	11	14	11	13	*S .aureus 9*
11	19	19	12	10	12	10	12	*E. coli 1*
11	18	11	17	9	12	9	14	*E. coli 2*
14	19	10	16	11	13	11	13	*E. coli 3*

قياس التركيز المثبط الادنى MIC لصبغة البايوسيانينPyocyanin و راشح خميرة *S.cerevisiae* بطريقة الانابيب تجاه البكتريا المرضية تم قياس التركيز المثبط الادنى MIC لصبغة Pyocyanin و راشح خميرة *S.cerevisiae* و الذي يعد اقل تركيز من الصبغة لم يحدث فيه نموا بكتيريا مرئيا تجاه العزلات الاكثر مقاومة, اذ ظهرت نتائج MIC تجاه عزلات بكتريا *S .aureus* عند تركيز 1.51 % بالنسبة لصبغة البايوسيانين Pyocyanin , و تركيز 5.87 % لخميرة *S.cerevisiae*, اما نتائج MIC لبكتريا *E. coli* كانت عند تركيز6.05 للصبغة , و تركيز 11.75 لخميرة *S.cerevisiae*, , اذ لوحظ وجود نمو و تكون عكارة MBC في الوسط بعد هذه التراكيز , و اشار Devnath واخرون (2017) ان سبب المقاومة العالية من البكتريا المرضية تجاه تراكيز هذه الرواشح بسبب العوامل المؤثرة على MIC منها ظروف الحضن , الوسط الزرعي و حجم اللقاح .اذ ان تأثير صبغة البايوسيانين Pyocyanin المثبط للبكتريا السالبة و الموجبة لصبغة كرام يعود الى طبيعة نقل الالكترونات ضمن سلسلة الخلية التنفسية , و يكون الاوكسجين في الظروف الهوائية هو المستلم للإلكترون و مركب NADPH هو الواهب الرئيسي للأوكسجين , ذكر Liواخرون (2018) ان صبغة البايوسيانين Pyocyanin تستطيع عبور اغشية الخلايا البكتيرية بسهولة و تتفاعل مع مركب NADPH و NADH مما يؤدي الى تحولهما للشكل المختزل , و اشار Banarواخرون (2016) ان صبغة البايوسيانين Pyocyanin تمتلك -methyl -phenazinehydroxyl1- له نشاط تثبيطي

واسع الطيف تجاه اغلب العزلات المقاومة. ان سبب قدرة خميرة *S.cerevisiae* على تثبيط نمو البكتريا المرضية يعود الى افرازها مواد قاتلة متعددة و ان هذه المواد القاتلة هي عبارة عن مواد بروتينية لها فعل عالي الخصوصية يعتمد على مجموعة من العوامل البيئية مثل الأس الهيدروجيني ودرجة الحرارة و التهوية ، اذ وجد ان الاس الهيدروجيني الأمثل لإنتاج هذه المواد من الخميرة يتراوح بين 4 .2 الى 4 .7 بدرجة حرارة تتراوح ما بين 25 الى 30م ، وتتناقص فعالية المواد القاتلة بارتفاع درجة الحرارة وارتفاع قيم الأس الهيدروجيني، وتكون آلية إنتاج السموم ومناعة الخلايا القاتلة لها مرتبطة بوجود عناصر وراثية خارج كروموسومية (Singh واخرون, 2017) , تتميز خميرة*S.cerevisiae*بامتلاكها الكثير من الأليات التي تفسر قدرتها على التأثير في المسببات المرضية ، فمنهامالها تأثير في الممرضات الغازية مباشرة أو عن طريق تثبيط بعض عوامل ضراوة الممرضات مثل الالتصاق وإنتاج السموم فضلا عن تحفيز النظام المناعي ومنع السموم البكتيرية من الوصول الى المستقبلات الموجودة في جسم الكائن الحي وغيرها (Aziz, 2015) .

مما تقدم يتضح ان نتائج MIC و MBC يعود الى تأثير كل من محلول صبغة البايوسيانين Pyocyanin و راشح المعزز الحيوي (خميرة *S.cerevisiae*) ضد البكتريا السالبة و الموجبة لصبغة كرام كما موضح في جدول (5) .

جدول (5) التركيز المثبط الادنى MICلصبغة البايوسيانين و راشح الخميرة

البكتريا المرضية	MIC For Pyocyaninmg/ml	MIC For *S.cerevisiae*
S .aureus 1	1 . 51	11.75
S .aureus 2	1 . 51	5.87
S .aureus 3	1 . 51	5.87
S .aureus 4	1 . 51	5.87
S .aureus 5	1 . 51	5.87
S .aureus 6	1 . 51	5.87
S .aureus 7	3. 025	5.87
S .aureus 8	3. 025	5.87
S .aureus 9	1 . 51	23.5
E. coli 1	6. 05	11.75
E. coli 2	6. 05	11.75
E. coli 3	6. 05	11.75

دراسة التأثير التآزري لصبغة البايوسيانين Pyocyaninو راشح خميرة *S.cerevisiae*

درست العلاقة التآزرية بين صبغة البايوسيانين Pyocyanin بالتراكيز المخففة النصفية (12.1, 6.05 , 3.025 , 1.51 , 75 . 0) ملغم / مللتر , و راشح الخميرة *S.cerevisiae* بالتراكيز (94 , 47 , 5 . 23 , 11. 75 , 5.87) ملغم / مللتر , ضد العزلات البكتيرية قيد الدراسة . حيث اظهرت النتائج ان العلاقة كانت تآزرية ضد البكتريا المرضية, اذ تعد صبغة البايوسيانين Pyocyanin من عوامل الضراوة الاولى التي تفرزها بكتريا *P.aeruginosa* و التي تسهل من تعطيل مسارات و دفاعات خلايا المضيف فضلا عن استهداف الوظائف العضوية لتلك الخلايا , و

تتميز بفعاليتها السمية للخلايا بسبب امتلاكها شحنة ثنائية ووزن جزيئي واطئ يمكنها من اختراق اغشية المضيف , تعمل صبغة البايوسيانين Pyocyanin في الظروف الهوائية على اكسدة مركب NADPH في السايتوبلازم و بشكل مباشر و عندها تكتسب جزيئة الاوكسجين الكترون واحد لتكوين انيون الاوكسجين الفائق مع انخفاض مستوى مركب (ATP), و يتأثر غشاء المايتوكوندريا بسبب وجود تفاعل مباشر بين تلك الصبغة و المايتوكوندريا و عندها تنتشر الصبغة عبر الغشاء الداخليللمايتوكوندريا فتؤديالىتثبيطانزيماتالسلسلة التنفسية(Louayواخرون , 2020). ان لخميرة *S.cerevisiae* فعالية تضادية واسعة لها تأثير مثبط ضد البكتريا المرضية و يعزى ذلك بسبب قدرتها على انتاج مواد مثبطة ذات طبيعة بروتينية حامضية قاتلة شبيهة بالبكتريوسينات التي تفرزها البكتريا ذات فعل متخصص في تحطيم اغشية البلازما للخلايا الحساسة مسببة في فقدان محتوياتها الخلوية فضلا عن تثبيط انتقال الاحماض الامينية , او قد يكون التأثير التثبيطي نتيجة افرازها سموم قاتلة , او بسبب انتاجها انزيمات محللة للبروتينات ذات وزن جزيئي عالي يقدر ب 54 كيلو دالتون قد يكون السبب في تثبيط فعالية انزيم الكتاليز من قبل البكتريا . (Melvydas واخرون , 2016) . مما تقدم يتضح ان عمل التأثير التآزري بين صبغة البايوسيانين Pyocyanin و راشح المعزز الحيوي (خميرة *S.cerevisiae*) ضد بكتريا *S .aureus* و *E. coli* كما موضح في جدول (6), كان نتيجة اجتماع الفعالية التثبيطية للراشح مع صبغة البايوسيانين ادى الى تثبيط نمو الخلايا البكتيرية او اجتماع اكثر من آلية لعملية التثبيط , و بما ان نتائج العمل كانت تأثير تآزري فهذا يدل على تآزر المكونات الخليط مع بعضها ضد البكتريا قيد الدراسة .

جدول (6) التأثير التآزري و التركيز المثبط الادنى MIC للصبغة و راشح *S.cerevisiae* مع التركيز المثبط الجزئي FIC لكليهما بطريقة رقعة الشطرنج boardChequer و نوع العلاقة للعزلات المرضية

FIC Index	FIC	MIC in combind for*S.cerevisiae* extract	MIC for*S.cerevisiae* extract	Concentration in combind for Pyocyanin	MIC for Pyocyan in مايكرو غرام / مل	البكتريا المرضية
Synergistic	.3730	1.467	5.87	0.188	1.51	*S .aureus*
Synergistic	.4980	1.467	5.87	0.377	1.51	*S .aureus*
Synergistic	.2480	2.935	23.5	0.188	1.51	*S .aureus*
Synergistic	.5610	5.87	11.75	0.377	6.05	*E .coli*
Synergist	0.28	2.935	11.75	0.188	6.05	*E*

ic						*.coli*
Synergistic	.0930	1.203	19.25	0.188	6.05	*E .coli*

الاستنتاجات CONCLUSION

أظهرت صبغة البيوسيانين تأثيرًا مثبطًا عاليًا ضد العزلات البكتيرية المسببة للأمراض عند استخدامها مع راشح خميرة الخبز . لذلك يمكن استخدامه في صناعة الأدوية وتطبيقات التكنولوجيا الحيوية.

References

I. Alka, R.; Shikha, C. And Wamik, A. (2018) . Production and Antimicrobial, Antioxidant and Anticancer Applications of Pyocyanin from Isolated *Pseudomonasaeruginosa*. J. Postepy Hig Med Dosw. 1 (2):12-17.

II. ALMarjani, M.F. and Khadim, Z.A. (2018). Effect of Gamma Irradiation on Biofilm Formation of Some Gram- Negative Bacteria Isolated From Burn and Wound Infections . Inter. J. of PharmTech Res.7(3):21-32.

III. Al-Musawi, A.T.; Muhyaddin, M.O. and Al-Soufi, M.A. (2016). Use of (*Saccharomycescerevisiae*) mutant in boremediation of some heavy metals. 2nd Conference on Environment and Sustainable Development: 28-29.

IV. Ankita, H; Agrawal B. and Poonam, C. (2016). Effect of cultivation media components on pyocyanin production and its application in antimicrobial property. 5 (4): 29-33.

V. Arleen, N. ; Suryatenggara; Miftahudin, M. ; Khoeri; Lia, W. ; Wisnu, T.; July, K.; Decy, S. and Dodi, S. (2018). Identification and antibiotic susceptibility of methicllin – resistant *Staphylococcusaureus* strains collected at a referral hospital , Jakarta, Indonesia. . Braz. arch. biol. Tech 49 (6).

VI. Aziz ,K. E .(2015) .Biological, Molecular characteristics and antimicrobial activity of Nisin produced by *Lactococcuslactissubsp*. lactis Isolated from Raw Milk. Ph.D Thesis. College of Science-Al-Mustansiriyah University.Iarq.

VII. Banar, M.; Emaneini, M. and Satarzadeh, M. (2016). Evaluation of Mannosidase and Trypsin Enzymes Effects on Biofilm Production of *Pseudomonasaeruginosa* Isolated from Burn Wound Infections. j. pone PLoS ONE; 11(10):13-22.

VIII. Barakat, Khouloud, M.; Magdy, Z., Mattar; Shawky, Z., Sabae; Osama, M., Darwesh, ; Sahar, H., and Hassan. (2015). Production and Characterization of Bioactive Pyocyanin Pigment by Marine *Pseudomonasaeruginosa* OSh1. September - October 2015 RJPBCS 6(5):34-65.

IX. Bedard, E.; Prévost, M. and Déziel, E. (2016). *Pseudomonasaeruginosa* in premise plumbing of large buildings. Microbiologyopen 5(9): 37-56.

X. Bezalwar, P., M. and Charde, V., N. (2019). Study of Prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* in Various Clinical Samples and Investigation of its Antibiotic Sensitivity Pattern. International J. of Current Microbiology and Applied Sciences. 8 (11)21-36.

XI. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254

XII. Caneiras, C.; Lito, L.; Mayoralas - Alises, S.; Diaz-Lobato, S.; Melo-Cristino, J. and Duarte, A. (2018) .Virulence and resistance determinants of *Klebsiellapneumoniae* isolated from a Portuguese tertiary university hospital centre. Enferm. Infec. Microbiol. Clin.6 (11) .

XIII. CLSI, Clinical Laboratory Standards Institute. (2020). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test

XIV. Devnath, P.; Kamal, Uddin, M.; Ahamed, F.; Hossain, T. and Abul Manchur, M. (2017). Extraction, purification and characterization of pyocyanin produced by *Pseudomonasaeruginosa* and evaluation for its antimicrobial activity. Int. Res. J. Biological Sci.4 (12):11-28.

XV. El Feghali, P.; Abou, R. and Nawas, T. (2018). Pyocyanin: A Powerful Inhibitor of bacterial Growth and Biofilm Formation. Madridge J. of Case Reports and Studies.3 (1). Evidence for S. cerevisiae fermentation in ancient wine. J. Mol. Evol., 57: 226-232.

XVI. El-Fouly, M.Z. ; Sharaf, A.M.; Shahin, M.; Heba, A. El-Bialy and Omara, R. (2015). Biosynthesis of pyocyanin pigment by *Pseudomonasaeruginosa*. J. Essays Biochem.2(4):15-27

XVII. Elghandour, M.M.Y. ;Tan. Z.L.; Abu Hafsa, S.H.; Adegbeye, M.J. ;Greiner,R; Ugbogu,E.A; Monroy,C and Salem, A.Z.M..(2020). *Saccharomyces* cerevisiae as a probiotic feedadditive to non and pseudo-ruminant feeding: a Rev. J. Appl. Microbiol.061 :251-276

XVIII. Esmat, K.; Ailar, J.; Abdollah, A.; Freshteh, E., and Alireza, M. (2020). Evaluation of antimicrobial resistance, bioflm forming potential, and the presence of bioflm-related genes among clinical isolates of *Pseudomonasaeruginosa*. BMC Res J. Essays Biochem.3(11):23-45

XIX. Gharajalar, S. N. and Sofiani, V. H. (2017). Patterns of Efflux Pump Genes Among Tetracycline Resistance Uropathogenic *Escherichiacoli* Isolates Obtained from Human Urinary Infections. Jundishapur J. Microbiol. 1(5).

XX. Jawetz , E. ; Melinick, J. L. and Adelberg's-Broots, G. F. (2019). Medical Microbiology. 28th ed. McGraw-Hill Education. Coliforina.
XXI. Jeber,M.A and Saeed,E.A.(2013). Isolation and identification of bacterial causes from diabetic foot ulcers. Tikrit J.Pure Sci, 18(3):6- 9.
XXII. Karakonstantis, S.; Kritsotakis, E. I. and Gikas, A. (2020). Pandrug-resistant Gram-negative bacteria: a systematic review of current epidemiology, prognosis and treatment options. J. Antimicrob Chemother, 75 (2): 71–82 .
XXIII. King, D.T.; Sobhanifar, S. and Strynadka, N. (2017) . The Mechanisms of Resistance to _Lactam Antibiotics. In Handbook of Antimicrobial Resistance; Springer Science and Business Media LLC:J. Berlin , Germany, 67 (5): 17–20.
XXIV. Li, J. L.; Yang, N.; Huang, L.; Chen, D.; Zhao, Y.; Tang, M. M. and Bao, X. (2018). Pyocyanin inhibits chlamydia infection by disabling infectivity of the elementary body and disrupting intracellular growth.J. Antimicrobial agents and chemotherapy. 62(6).
XXV. Lok, Bahadur, Shrestha; Narayan, Raj, Bhattarai and Basudha, Khanal. (2018). Comparative evaluation of methods for the detection of biofilm formation in coagulasenegative *staphylococci* and correlation with antibiogram. J. Infection and Drug Resistance. 11(2):7–13.
XXVI. Louay M. Al-Ani ؛ Maha, R. Ghreeb , H .؛ Mahmood , M.؛ Bilal, J.M. A. (2020) . Teratogenicity of Pyocyanin Pigment Isolated from Local *Pseudomonasaeruginosa* Isolates on MiceNeural Tube Defects (NTDs) and other Abnormities Sys Rev Pharm;11(12):1312-1316.
XXVII. Mahon, C.R.and Lehman, D.C. (2019). Textbook Of Diagnostic Microbiology. 6 th ed .Elsevier Inc.
XXVIII. Martins, F. S.; Rodrigues, A. C. P.; Tiago, F. C. P.; Penna, F. J.; Rosa, C. A.; Arantes, R. M. E.; Nardi, R. M. D.; Neves, M. J.; Nicoli, J. R. (2007). *Saccharomycescerevisiae* strain 905 reduces the translocation of Salmonella enterica serotype Typhimurium andstimulates the immune system in gnotobiotic and conventional mice. J. Med. Microbiol. 56: 352-359.
XXIX. Mdul, H., Wisplinghoff and Harald, S. (2018). Guide to infection control in the Hospital *Pseudomonas aeruginosa*. 32 (12):43-56.
XXX. Melvydas, V.; Bruzauskait, L.; Gedminien, G. and Siekstel ,R.(2016) A Novel *Saccharomycescerevisiae* killer strain secreting the X factor related to killer activity and inhibition of *S. cerevisiae* K1, K2 and K28 killer toxins. Indian J Microbiol.:(3)56:335- 343

XXXI. MontelMendoza, G.; Ale, C.E.; Nader-Macías, M.E.F. and Pasteris, S.E. (2015). Characterization of a Bacteriocin Produced by *Enterococcusgallinarum* CRL1826 Isolated from captive bullfrog: evaluation of its mode of action against Listeria monocytogenes and gram-negatives. J. Bioprocess Biotech. 5: 3-9.

XXXII. Moore, L. S. and Hatcher, J. C. (2019). Infectious Diseases, Microbiology and Virology: A Qand A Approach for Specialist Medical Trainees.1 th ed .Cambridge University Press.

XXXIII. Mourouge, Saadi, and Hawraa, Mohammed, Al-Rafyai. (2019). Antibiotic Resistance Patterns of Diverse Escherichia coli Phylogenetic Groups Isolated from the Al-Hillah River in Babylon Province, Iraq. Scientific World J. Article4(12):23-44.

XXXIV. Paná˘cek ,A.; Monika S. ; Martina K . ; Robert P. ; Kate˘rina B. ; Renata V. ; Milan K. ; Markéta H. ;Grazyna Anna P. ; Joanna C. ; Radek Z. ; Libor K. (2016) .Strong and nonspecific synergistic antibacterial efficiency of antibiotics combined with silver nanoparticles at very low concentrations showing no cytotoxic effect .Molecules ,21(26).

XXXV. Parai, D.; Banerjee, M.; Dey, A., Chakraborty and Islam, E.S., Mukherjee. (2018). Effect of reserpine on *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing mediated virulence factors and biofilm formation. Biofouling.4(9): 10-15 .

XXXVI. Pitchaipillai, S. G . ; Sivakumar, Vishnupriya, Jamuna; Mariappan, Kumutha, M.; Vellasamy, Esaki and Shanka, M. (2020). Intracellular survival and innate immune evasion of *Burkholderia cepacia*: Improved understanding of quorum sensing-controlled virulence factors, biofilm, and inhibitors. J. Med Microbiol.4(11):23-43.

XXXVII. Queeneth, C. and Lekiah, P. (2018). Antibiotic Susceptibility of Resistant *Pseudomonas* Species Generated Through the Use of Differential and Selective Media for Isolation of *Pseudomonas* from Environmental Samples. South Asian. J. of Research in Microbiology. 45(19) :12-19.

XXXVIII. Ranio, Joaquín, Otero-Asman; José, M., Quesada; Kin, K. ,Jim; Alain, Ocampo-Sosa; Cristina, Civantos;Wilbert, Bitter and María, A., Llamas. (2020) . The extracytoplasmic function sigma factor is active during infection and contributes to phosphate starvation-induced virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Scientific Reports. 34(7) :10-19.

XXXIX. Shivangi, J. (2017). Morpho-cultural and biochemical identification of *Pseudomonas sp*. isolated from the rhizosphere of different vegetable

crops and study its efficacy on Solanum melongena (Brinjal). J. of Pharmacognosy and Phytochemistry. 6(2): 22-28.

XL. Singh, S.; Singh, S. K.; Chowdhury, I.; and Singh, R. (2017). Understanding the mechanism of bacterial biofilms resistance to antimicrobial agents. The open microbiol. J, 11: 53.

XLI.Sohyun, Chol; Lari, M., Hiott; John, B., Barrett; Elizabeth, A., McMillan1; Sandra, L., and Shaheen, B., Humayoun. (2018). Prevalence and characterization of *Escherichia coli* isolated from the Upper Oconee Watershed in Northeast Georgia. Prevalence and characterization of *Escherichia coli* isolated from the Upper Oconee Watershed in Northeast Georgia. J. Bacteriol. 87(43).

XLII. Tracey, A. ; Taylor; Chandrashekhar, S. and Unakal, G. (2019). *Staphylococcus aureus*. Stat. Pearls. ncbi.

XLIII. Tule, A. and Hassani, U. (2017). Colonization with antibiotic-resistant E. coli in commensal fecal flora of newborns. Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci., 6(5): 23-29.

XLIV. Wamik, A. (2018). Production and Antimicrobial, Antioxidant and Anticancer Applications of Pyocyanin from Isolated *Pseudomonas aeruginosa*. SF. J. Ferm Micro Technol 1(3):7.

Synergistic relationship of pyocyanin pigment produced by *Pseudomonasaeruginosa* and *Saccharomycescerevisiae* towards some types of skin infection bacteria.

Fatima Hussain Braij[1*], Raghad A. Aziz [1*] ,and Mohammed F. Al Marjani [2*]
[1]Department of Science, College of Basic Education, Mustansiriyah University, Iraq.
[2]Department of Biology, College of Science, Mustansiriyah University, Iraq.

Abstract

The study included confirming the diagnosis of 29 isolates of *Pseudomonas aeruginosa* bacteria based on culture, microscopic and biochemical tests, and two isolates of *Saccharomyces cerevisiae*, as well as collecting 12 diseased isolates from multiple clinical samples from some hospitals in the city of medicine, including *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*. The diagnosis of all isolates was confirmed by the VITEK2 system and according to the card for gram-negative and gram-positive bacteria in addition to the card for yeast, then a sifting was conducted for *Pseudomonas aeruginosa* isolated from wounds, burns and sputum for the purpose of choosing the most efficient isolate in the production of pyocyanin dye. It has the highest concentration and recorded the highest absorption, which is the best in the production of pyocyanin dye.The sensitivity of pathogenic bacteria to 10 types of antibiotics was tested, and the results showed that most of the isolates were resistant to (Ciprofloxacin, Imipenem, Amikacin) and the effect was different for the rest of the antibiotics. Yeast Super maya of Chinese origin and isolate By2 of Glorpan yeast of Chinese origin. A sifting of isolates of *S.cerevisiae* was also carried out in order to select the isolate most efficient in the production of inhibitory proteins using the method of diffusion in the pits to know the effect of these substances against the pathogenic bacteria under study.The results showed that isolate By 1 gave the highest inhibition rate towards *S.aureus* and *E.coli* isolates than isolate By 2. Also, the minimum inhibitory concentration (MIC) of Pyocyanin and *S.cerevisiae* was measured against the bacterial isolates under study. Using the method of turbidity in tubes, and the results proved that the value of‘ MIC varied according to the concentration of the filtrate and its effectiveness and according to the gradation of pathogenic bacteria. The synergistic relationship between Pyocyanin dye and *S.cerevisiae* filtrate towards pathogenic bacteria selected for this test according to the degree of their resistance to antibiotics was also studied.The results showed that the relationship was synergistic and there was no other relationship due to the effectiveness of the dye with the filter on inhibiting the action of pathogenic bacteria. Therefore, the study recommends focusing on the Pyocyanin dye with *Saccharomyces cerevisiae* (as a whole cell or the inhibitory substances it produces) as a treatment for infections caused by some types of pathogenic bacteria.