

## تقدير الغشاء الحيوي المتكون بتقنية الاليزا للبكتيريا السالبة لصبغة كرام المعزولة من اخماج الجروح والحروق ودراسة انتاج الغشاء جزيئيا.

عمر نعمه فليح حسن

ليث مصلح نجيب النعيمي

قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة الانبار

رنا كاظم محمد الشمري

قسم التقنيات الإحيائية / كلية العلوم / جامعة بغداد

استلم في: 28/اذار/2016, قبل في: 28/كانون الاول/2016

### الخلاصة

صممت هذه الدراسة للتحري عن قدرة البكتيريا السالبة لصبغة كرام والمعزولة من اخماج الجروح والحروق على إنتاج الغشاء الحيوي، تضمنت العزلات المنتخبة على العزلات الأكثر مقاومة للمضادات الحيوية، وبواقع (10) عزلات لبكتيريا *Pseudomonas aeruginosa*، (9) عزلات *Klebsiella pneumoniae*، (6) عزلات *Escherichia coli*، (5) عزلات *Proteus mirabilis* وعزلتين للنوع *Enterobacter cloacae*. استعملت تقنية الاليزا وربط البنفسج البلوري الذي اعتمد على قيم الكثافة الضوئية للبنفسج والمرتبطة بكتلة الغشاء الحيوي بالاليزا عند طول موجي (620) نانوميتر، بينت نتائج الاختبار تباين في تكوين الغشاء الحيوي بين الأنواع البكتيرية اعتمادا على قيم الكثافة الناتجة في حين كانت أكثر العزلات إنتاجا للغشاء الحيوي هي من البكتيريا المعزولة من المرضى المصابين بقرح السكري. أظهرت نتائج الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز امتلاك جميع العزلات نسقا بلازميدا مختلفة في الحجم والموقع وقد تم استعمال الحرارة كعامل محيد للبلازميدات أظهرت نتائج الترحيل فقدان البلازميدات للعزلات وفقدان واختلاف في كثافة الإنتاج بعد التحديد إشارة إلى دور بلازميدي وكموسومي في تنظيم تلك الظاهرة.

الكلمات المفتاحية: البكتيريا السالبة كرام، الغشاء الحيوي، البلازميدات.

## المقدمة

يتعايش (99%) من الاحياء المجهرية ضمن تجمعات ميكروبية تعرف بالغشاء الحيوي [1] عَرَفَ الغشاء الحيوي على أنه تجمعات خلوية معقدة من الاحياء المجهرية سطحية الالتصاق مطمورة في مواد بوليميرية خارج خلوية مفرزة من الكائنات نفسها ويلاحظ تكون الغشاء الحيوي في بيئة المستشفيات ولاسيما على أسطح الجروح والحروق المعرضة للتلوث الجرثومي [2]. وصف الغشاء الرقيق الحيوي على انه خليط معقد من الأحياء المجهرية المتجمعة والتي التصقت على السطوح الرطبة بوساطة الافرازات المتعددة الخارجية (Exopolysubstances) (EPS) ذات المنشأ الميكروبي [3]. ولقد لوحظ في حالات اخماج الجروح والحروق خلال نمو البكتيريا على أسطح المضيف وتكوين الأغشية الحيوية فأنها تميل إلى تشكيل مثل هذه التجمعات مسببة الالتهابات المستمرة وتعفن الدم وتتميز هذه التجمعات بمقاومتها للظروف القاسية داخل المضيف إضافة لمقاومتها العالية للمضادات الحيوية مما يجعلها صعبة العلاج [4]. وقد وجد أن البكتيريا السالبة لصبغة كرام ولاسيما المتحركة منها هي السائدة في تكوين الأغشية الرقيقة الحيوية وتتميز بكتريا الزوائف الزنجارية بقابليتها العالية على تكوين الأغشية الرقيقة على العدد الطبية المستعملة في علاج المرضى الراقدين في المستشفيات [5]. تمتلك البكتيريا المكونة للغشاء الحيوي القابلية على المقاومة للعوامل والظروف المحيطة بمعدل أعلى من البكتريا الحرة المعيشة وهي من الأسباب المجهولة وغير الواضحة إلى حد الآن [6]. إن معرفة التركيب الوراثي والمستوى الجزيئي للبكتيريا الممرضة والمكونة للغشاء الحيوي يساعد في تشخيص الجينات و الطافرات والمركبات المضادة لفعالية الأغشية الحيوية [7].

تحتوي البكتيريا على عناصر وراثية تسمى البلازميدات Plasmids وهي عبارة عن شريط مزدوج من الـ DNA بشكل حلقي ومغلق تساهميا ولهذه العناصر القدرة على التضاعف بثبات وبصورة مستقلة عن الكروموسوم البكتيري وهي تنتشر ضمن النوع البكتيري الواحد او بين الأنواع المختلفة [8]. تحمل هذه البلازميدات العديد من الجينات المشفرة لعدد كبير من عوامل الضراوة منها صفة المقاومة للمضادات الحيوية وإنتاج السايديفورات والهيموليسين وهي مختلفة في الحجم فمنها ما يكون ذو حجم جزيئي كبير وأخرى احجامها الجزيئية صغيرة ويكون وجودها غير ضروري للمضيف لكن وجود هذه البلازميدات يعطي البكتيريا صفات تمكنها من العيش في ظروف قاسية أو استثنائية إلا أن هناك بلازميدات قد لا يكون لها أي دور على الصفات في البكتيريا لذلك تدعى بالبلازميدات الخفية [9]. تهدف الدراسة إلى تقدير كثافة الغشاء الحيوي المتكون عن طريق الاليزا بربط البنفسج البلوري ومعرفة دور البلازميدات في إنتاج تلك الصفة من اخماج الجروح والحروق للبكتيريا الهوائية والسالبة لصبغة كرام.

## المواد وطرائق العمل

### 1- عزل البكتيريا والتشخيص.

استعملت في هذه الدراسة (32) عزلة من مجموع (120) عزلة من البكتيريا الممرضة السالبة لصبغة كرام والمعزولة من اخماج الجروح والحروق من مستشفى الرمادي التعليمي ومستشفى الحروق التخصصي في مدينة الطب -بغداد للمدة بين 2014/12/20 ولغاية 2015/4/1 للتحري عن مدى تلوثها بالبكتريا. وتوزعت العزلات التي تم اختيارها بناءً على العزلات الأكثر مقاومة للمضادات الحيوية وذات مقاومة متعددة على النحو الآتي (10) عزلات لبكتيريا *P.aeruginosa*، (9) عزلات *K.pneumoniae*، (6) عزلات *Escherichiacoli*، (5) عزلات *Proteus mirabilis* وعزلتين للنوع *Enter.cloacae* وقد شخّصت العزلات اعتمادا على ما ورد في [10]. شخّصت المستعمرات مبدئيا اعتمادا على الصفات المظهرية وتضمنت شكل المستعمرات، لونها، قوامها، رائحتها وحجمها على وسط أكار الماكونكي و اكار الدم و وسط أكار السيدموناس. وأخضعت العزلات إلى الفحص ألمجهري باستعمال صبغة كرام للتعرف على شكل البكتيريا وترتيبها وتفاعلها مع صبغة كرام واستعملت الفحوصات الكيموحيوية المختلفة مثل فحص الاوكسديز، الكاتاليز، الاندول، احمر المثيل، الفوكس بروسكار، استهلاك السترات، الحركة واليوربا جدول (1) وتم تأكيد التشخيص باستعمال عدة التشخيص Api 20E Kit وبجهاز الفايترك 2 المجهزين من شركة Biomerieux الفرنسية. تم تحضير الأوساط الزرعبة الجدول (2) وحسب تعليمات الشركة المجهزة إذ تم تعديل الرقم الهيدروجيني والتعقيم باستعمال Auto clave بدرجة حرارة 121° م وتحت ضغط 15 (بار/انج?) ولمدة 15 دقيقة.

### 2- التحري عن إنتاج الغشاء الحيوي Detection of biofilm formation

أتبعت طريقة [11] في الكشف عن قابلية العزلات على تكوين الغشاء الحيوي وكما هو موضح في أدناه:

- 1- نميت العزلات قيد الدراسة على وسط الاكار المغذي لمدة 24 ساعة عند 37 م.
- 2- تم نقل 3-4 مستعمرات إلى 2 مللتر من المرق المغذي بوساطة ناقل معقم للمقارنة مع محلول ثابت العكورة القياسي (ماكفر لاند رقم 0.5) للحصول على عدد تقريبي للخلايا يقرب من  $1.5 \times 10^8$  خلية / مل.
- 3- نقل 150 مايكروليتر من المزروع إلى أطباق المعايرة الدقيقة وبواقع ثلاث حفر لكل عزلة. كما أضيف 150 مايكروليتر من المرق المغذي المعقم (خال من البكتريا) إلى ثلاث حفر والتي عدت سيطرة.
- 4- تم تغطية الأطباق بوساطة غطاء لتوفير ظروف معقمة ومن ثم حضنت عند درجة 37 م لمدة 24 ساعة.
- 5- غسلت الحفر بالماء المقطر بوساطة جهاز الاليزا الغاسل Elisa Washer وبمعدل ثلاث غسلات وتركت لتجف بهواء الغرفة لمدة 15 دقيقة.

- 6- تم إضافة 200 مايكروليتر من ملون البنفسج البلوري (1%) لكل حفرة وتركت لمدة 15 دقيقة.
- 7- غسلت الحفر عدة مرات بالماء المقطر وتركت لتجف بهواء الغرفة لمدة 15 دقيقة.
- 8- أذيت الصبغة المتبقية بإضافة 200 مايكروليتر من الايثانول بتركيز 95%.
- 9- قرنت النتائج بواسطة جهاز الاليزا القارئ ELISA Reader من شركة Biotek الامريكية عند طول موجي 630 نانوميتر. قسم الغشاء الحيوي إلى ثلاث أقسام حسب نتائج الامتصاصية وكالاتي:
- ا- الغشاء الحيوي الضعيف الذي تكون قيمة الامتصاصية أكثر من قراءة السيطرة وأقل من ضعفي قيمة الامتصاصية للسيطرة.
- ب- الغشاء الحيوي متوسط القوة الذي تكون قيمة الامتصاصية تساوي أو أكثر من ضعفي قيمة الامتصاصية للسيطرة وأقل من أربعة أضعاف قيمة الامتصاصية للسيطرة.
- ج- الغشاء الحيوي القوي الذي تكون فيه قيمة الامتصاصية تساوي أو أكثر من أربعة أضعاف قيمة الامتصاصية للسيطرة.

### 3-استخلاص الـDNA البلازميدي.

- تم الاستخلاص الـDNA البلازميدي بطريقة الحرارة والتبريد كما ورد في [12] التي تتكون من 1-الـDNA البكتيري- 2المحلول المنظم TE Buffer وتمت عملية الاستخلاص وحسب الخطوات الاتية:
- 1- تم تنشيط العزلات على وسط الاكار المغذي وحضنت العزلات لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37 مئوية.
  - 2- نقلت عدد من المستعمرات المفردة النقية باستعمال الناقل الى وسط مرق نقيع القلب والدماغ السائل وحضنت لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37 مئوية.
  - 3- نقل 1مليتر من الوسط السائل الحاوي على النمو البكتيري الى انبوبة صغيرة (1.5 مليلتر) ثم طرد مركزيا بسرعة 13.000 دورة/ دقيقة ولمدة دقيقتين وازيل الرائق وتم الاحتفاظ بالراسب.
  - 4- أضيف للراسب 100 مايكروليتر من المحلول المنظم TE Buffer ومزج برفق مع الراسب الحاوي على الخلايا البكتيرية بواسطة الماصة الدقيقة.
  - 5- نقلت الانبوبة الى حمام مائي بدرجة 100 مئوية ولمدة 10 دقائق لتحليل الخلايا.
  - 6- حُضن النموذج مباشرة بالتلج لمدة 5دقائق.
  - 7- طُرد النموذج مركزيا وبسرعة 13.000 دورة/ دقيقة ولمدة 3دقائق.
  - 8- نقل بعدها الرائق الحاوي على DNA بعناية الى انبوبة جديدة حاوية على 100 مايكروليتر من TE Buffer
  - 9- حُفظ DNA في الثلاجة 4-8 مئوية.

### 4- تحييد البلازميدات بأستعمال الحرارة.

تم أتباع طريقة [13] في تحييد المحتوى البلازميدي بأستعمال الحرارة كعامل محييد وكالاتي إذ تم تلقيح 5 مل من المرق المغذي بمستعمرة مفردة من أنواع البكتيريا المعزولة والمستعملة في الدراسة الحالية، حضنت المزرعة الجرثومية لمدة 24 ساعة عند درجة حرارة 37 م°. بعد انتهاء مرحلة التحضين اخذ 0.1 مل من المزرعة أضيف إليها 10 مل من المرق المغذي وحضن الوسط الغذائي الملقح عند درجة حرارة 37 م° ولمدة (1-2) ساعة ولكل عذلة على حدا، فضلا عن ذلك فقد اخذ 0.1 مل من المزرعة وأضيف لها 10 مل من المرق المغذي ويوقع نموذجين لكل عذلة وحضنت المزرعة عند درجة حرارة 37 م° للنموذج الأول لاستعمالة كنموذج سيطرة لملاحظة التحييد التلقائي مع النموذج الثاني والذي تم حضنه عند درجة حرارة 44 م° ولمدة 24 ساعة للحصول على التحييد التلقائي. تم تنمية العزلات التي تم حضنها لمدة (1-2) ساعة وبدرجة 37 م° إلى درجات حرارية عالية ومختلفة (54-66) م° ولمدة زمنية 10 دقائق لكل درجتان حرارية مختلفة أعلى للوصول إلى نسبة قتل 93%.

### 5-اختبار الحساسية للمضادات الحيوية

استعملت (21) نوع من المضادات الحيوية المجهزة من شركة Bioanalyse التركبية كما في الجدول (3) وذلك بأتباع طريقة الانتشار بالأقراص Disc diffusion method وبالاعتماد على طريقة [14] وقسمت العزلات على فئتين هي الحساسة والمقاومة واعتمادا على القياسات العالمية [15].

### 6-الترحيل الكهربائي للدنا على هلام الأكاروز Agarose gel electrophoresis of DNA

أجري الترحيل الكهربائي بأستعمال هلام الأكاروز وبتركيز 0.8 % , وتم تحضير المحاليل المستعملة في الترحيل الكهربائي بحسب ما ورد في [16] وحددت ظروف الترحيل المتمثلة بالوقت والتيار وفرق الجهد لمجهز القدرة الكهربائية (power supply) اعتمادا على [16] وبعد الانتهاء من عملية الترحيل يرفع الهلام بحذر ويفحص بجهاز UV-Transilluminator لملاحظة حزم الدنا .

## النتائج

اعتمادا على نتائج التشخيص ألمجهري كانت جميع العزلات المعزولة من اخماج الجروح والحروق سالبة لصبغة كرام وبينت نتائج الاختبارات الكيموحيوية تطابقا في جميع العزلات مع صفات الأجناس المنتخبة وكما مبينة في الجدول (1) تم استعمال عدة التشخيص Api 20E وكانت نتائج جميع الاختبارات متطابقة لأنواع البكتيرية المشخصة في حين تم

تأكيد النتائج باستعمال جهاز الفايك 2 لل عزلات إذ أعطت نتائج الاختبار بجهاز الفايك 2 عائدة لأجناس المعزولة وبنسبة تصل إلى (99%). أظهرت العزلات مقاومة عالية تجاه المضادات الحيوية إذ قاومت العزلات أكثر من مجموعتين للمضادات إذ قاومت عزلات بكتيريا *Ps.aeruginosa* (12) مضاد حيوي في حين قاومت بكتيريا *K.pneumonia* (9) مضادات اما بكتيريا *E.coli* فقد كانت مقاومة لـ (10) مضادات اما بكتيريا *Proteus mirabilis* فقد كانت الأكثر مقاومة إذ قاومت (14) نوعا من المضادات الحيوية من مجموع الـ (21) نوعا والمستعملة في الاختبار اما بكتيريا *Enterobacter cloacae* فقد كانت بدورها مقاومة لـ (9) مضادات وكما في الجدول (3).

يبين الجدول (4) والصورة (1) نتائج اختبار الكشف عن إنتاج الغشاء الحيوي في العزلات الأكثر مقاومة للمضادات الحيوية عن طريق ربط البلور البنفسجي بالبكتيريا المنتجة معدل قراءة الامتصاصية للعزلات الشكل (1) أظهرت جميع العزلات القابلية على إنتاج الغشاء وبنسبة (100%) وقد كانت العزلات متباينة في قوة إنتاج الغشاء الحيوي إذ كانت نسبة إنتاج الغشاء الحيوي القوي بنسبة (12.5%) وبواقع عزلتين للنوع البكتيري *P.aeruginosa* في العزلة رقم (1,5) وعزلتين للنوع *K.pneumonia* في العزلة رقم (3,6) في حين كانت نسبة إنتاج الغشاء المتوسط (37.5%) وبنسبة (50%) للغشاء الضعيف توزعت بين العزلات البكتيرية جميعا، كانت نتائج الدراسة الحالية متوافقة مع الدراسة التي أجراها الباحث [17] حيث كانت نسبة إنتاج الغشاء الحيوي لـ *P.aeruginosa*, *K.pneumonia* و *P.mirabilis* و *Enter.cloacae* (100%) و الدراسة التي أجراها [18] بين إن نسبة إنتاج الغشاء الحيوي للعزلات *P.aeruginosa*, *K.pneumonia* و *E.coli* كانت بنسبة (91%)، أظهرت النتائج للنوع *Ps.aeruginosa* اتفاقا مع جاء في [19] إذ كانت نسبة إنتاج الغشاء (100%)، وكانت النتائج متوافقة مع ماجاء للباحثة [20] إذ أشارت إن نسبة إنتاج الغشاء (95%)، ولم تكن متفقة مع ما جاء في [21] إذ كانت نسبة الإنتاج (47%) للزوائف الزنجارية. أما النوع *Klebsiella pneumonia* و *Enterobacter cloacae* فقد كانت النتائج متفقة مع ما جاء [22] و [23] إذ كانت نسبة إنتاج الغشاء الحيوي المنتج (100%)، ولكنها لم تكن متوافقة مع ما جاء في [24] إذ كانت نسبة إنتاج الغشاء (20%) فقط للنوع *Enterobacter cloacae*، أما النوع *E.coli* فقد كانت النتائج مشابهة لما أوجده الباحث [25] إذ كانت نسبة إنتاج الغشاء هي (100%) بينما لم تتفق النتيجة مع ما جاء للباحث [17] إذ كانت (70%) نسبة الإنتاج. تم تنمية العزلات الجرثومية عند درجة حرارة 42 م للحصول على التحييد التلقائي إلا إن العزلات لم تبد أي اختلاف في صفة الإنتاج للغشاء الحيوي في حين كان للحرارة الأعلى تأثيرا كبيرا على صفة الإنتاج وكثافته وكما مبين بالجدول رقم (5) إذ أظهرت نتائج الترحيل الكهربائي فقدان بعض العزلات بلازميدات قد تكون حاملة للموروثات التي قد تكون مسؤولة عن صفة إنتاج الغشاء الحيوي في بعض العزلات التي فقدت القابلية على تكوين أو انخفاض تلك النسب بعد تحييدها بالحرارة كما مبين بالشكل (2) لمعدل الامتصاصية للعزلات بعد التحييد.

## المناقشة

تعد البكتيريا السالبة لصبغة كرام من البكتيريا الواسعة الانتشار فهي تتواجد في مختلف البيئات ومنها التربة والمياه ومنها ما يتخذ من بيئة المستشفيات مستوطنات لها إذ لها القابلية على تحمل الظروف البيئية المختلفة، ولها القدرة على العيش في المطهرات والمعقمات المخففة وقد يكون أحد أسباب تلوث المعقمات والمطهرات هو قلة اهتمام الكادر الطبي في المستشفى بالجوانب الصحية المتعلقة بالتعقيم، فضلا عن عدم إتباع الطرائق الصحيحة في تخفيف المحاليل وتقدير التركيز المثبط للبكتيريا الملوثة [26]. وهي تسبب الإصابات المكتسبة من المستشفى (Acquired infections). تزداد إصابات الزوائف والكلبيسيلا في مرضى السكري والنقص المناعي ولاسيما الداخليين في المستشفيات لغرض المعالجة إذ تتميز اغلب أنواعها بأنها الأكثر شيوعا في بيئة المستشفى كونها انتهازية وهي تسبب اخماج مكتسبة من المستشفى أو ما يسمى عدوى المستشفيات (Nosocomial infections). وتمتاز بقابليتها على تكوين الأغشية الرقيقة الحيوية خاصة عندما تملك اسواط عديدة [27]. ومن خلال الدراسة الحالية فان العزلات المنتخبة لغرض التحري عن الغشاء وتكوينه كانت الأكثر مقاومة للمضادات الحيوية وإن المقاومة للمضادات في البكتيريا السالبة كرام قد تأتي نتيجة تغير أو تحوير في موقع الهدف للمضاد وهي (Penicillin-binding proteins) PBPs المخصصة لارتباط هذه المضادات ومن ثم يصبح المضاد غير فعال [28]. وجد [29] إن 77% من العزلات التابعة للنوع *P.aeruginosa* منتجة لإنزيم MBL (Metallo-Beta-Lactamase)، كما يؤثر نظام الضخ (efflux pump) تأثيرا هاما في مقاومة البكتيريا لمضادات البيتا لاكتام حتى غير المنتجة لإنزيم  $\beta$ -Lactamase وقد تحدث طفرات كروموسومية لمستقبلات المضاد على الرايبوسوم وحدثت الطفرة بتردد عالي [30]. كما قد يعود سبب المقاومة إلى حدوث تغير فيحاجز النفاذية للغشاء الخارجي التي تحتوي على قنوات بروتينية تدعى البورين مما يؤدي إلى صعوبة مرور المضاد والوصول إلى موقع عمله وهذه القنوات بالبكتيريا السالبة لصبغة كرام [31]. تلجا البكتيريا إلى تكوين الغشاء الحيوي كوسيلة لمقاومة الظروف الخارجية كوسيلة دفاعية تحمي بها المجتمع البكتيري المتكون وتحصل في الغشاء الحيوي تكيفات أو تحويرات تستطيع البكتيريا فيها أن تقاوم هذه الظروف إذ أشار [32] أن البكتيريا المقاومة لأكثر من ثلاث مضادات حيوية فان هذه المقاومة قد تكون بسبب التحوير الذي يحصل في تركيب عديد السكريد الشحمي الذي يؤدي إلى انخفاض النفاذية ومن ثم منع مرور المضادات داخل الخلية البكتيرية. ومن الآليات الأخرى التي قد تلجا إليها البكتيريا هي في فقدان بروتينات الغشاء الخارجي والمسؤولة عن تكوين المسام التي تسمح بنقل المضادات داخل البكتيريا التي قد تعطي سبب آخر لمقاومة البكتيريا لهذه المضادات وهذا ما قد أوضحه [33] في دراسته. تعد طريقة ربط البنفسج بالبلوري بالبكتيريا من الطرائق التي يمكن فيها دراسة المراحل المبكرة لتكوين الغشاء

الحيوي لان هذه الطريقة تستعمل ظروف ثابتة أي تكون ساكنة ومستقرة ويمكن أن تكون فعاله في تحديد العديد من العوامل الضرورية لتكون الغشاء الحيوي مثل الإهداب واللصقات والاسواط وغيرها وان الجينات تلعب دورا مهما في إنتاج السكريات الخارجية المتعددة [34] كما أشار [35] أن هذه الطريقة يمكن أن تستعمل مع أنواع بكتيرية مختلفة وتلتصق البكتيريا المتحركة على جدران أو قعر الحفر في حين إن الجراثيم غير المتحركة تلتصق في القعر. أشارت العديد من الدراسات إلى امتلاك البكتيريا السالبة لصبغة كرام العديد من البلازميدات والتي تشفر لأغلب عوامل الضراوة منها إنتاج الغشاء الحيوي إذ أشار [36] باحتواء البكتيريا السالبة على بلازميدات صغيرة مشفرة لإنتاج الغشاء الحيوي ومعظم عوامل الضراوة الأخرى المتمثلة بمقاومة المضادات الحيوية. أظهرت نتائج استعمال الحرارة كمعامل محييد فقداً صفة إنتاج الغشاء الحيوي في عدد من العزلات البكتيرية في حين أبدت بعض العزلات فقدان في قوة الغشاء دون فقدان صفة الإنتاج كما موضح بالشكل (2) بينت نتائج الترحيل الكهربائي لبكتيريا الزوائف الزنجارية فقدان بلازميد واحد أو أكثر من العزلات التي أظهرت اختفاء صفة الإنتاج بعد التحييد الصورة رقم (3) لبكتيريا *Ps.aeruginosa* إذ يتبين فقدان بلازميد واحد ذو وزن جزيئي كبير في العزلة رقم (3, 4, 5) وفقدان بلازميدين اصغر في العزلة (1, 2) إذ فقدت جميع العزلات للبلازميدات وهذا ما أكده الباحث [37] إذ أشار إلى وجود بلازميد كبير (mega plasmid) مسؤول عن تكوين الغشاء الحيوي وهذا ما ظهر واضحا خلال الدراسة. وبالنسبة لبقية العزلات المنتخبة الأخرى إذ قد تؤدي البلازميدات دور كبير في الإنتاج وهذا ما جاء متفق مع [38] إذ وثق امتلاك بكتيريا المتقلبات على بلازميد صغير مسؤول عن إنتاج تلك الصفة إذ فقدت عزلات المتقلبات صفة الإنتاج في جميع العزلات المنتخبة فضلا عن فقدان البلازميد واحد أو أكثر من جميع العزلات عند استعمال الحرارة كمعامل محيد وإجراء الترحيل الكهربائي إذ أعطت النتائج تباين مختلف قبل وبعد التحييد إذ كانت المتقلبات من أكثر البكتيريا مقاومة متعددة للمضادات الحيوية فأن هذا التباين ينعكس على قدرة البكتيريا في المقاومة تجاه مختلف المضادات أي إن العلاجات أو الطرائق التي تمنع النسخ من الجينات المسؤولة عن تكوين الغشاء الحيوي قد يكون استراتيجية ناجحة في منع هذه العدوى.

أشار الباحث [39] ان النقل الأفقي للجينات هو المصدر الرئيس لتطور صفة إنتاج الغشاء الحيوي. وتؤدي البلازميدات الاقترانية دورا مهما بين المجتمع البكتيري إذ إن الاقتران البكتيري يحدث داخل مجتمع الغشاء الحيوي وتحمل أيضا موروثات تستطيع أن تشفر لمقاومة المضادات الحيوية ومن ثم فقدان صفة الإنتاج للغشاء الحيوي يكون مقترنا بصفة المقاومة ومن ثم فان الغشاء الحيوي يؤثر على انتشار المقاومة المتعددة فضلا عن ارتباطها جينيا بالنقل الأفقي مع عوامل الضراوة الأخرى وهذا ما أشار إليه أيضا [40]. إن عدم فقدان الإنتاج لصفة الغشاء الحيوي في بعض العزلات وحدوث نقصان في كثافة الإنتاج قد تعزى إلى الحساسية للحرارة إلى بعض الميكانيكيات المحتملة مثل فقدان بعض التفاعلات منها Protein-Protein أو Protein DNA أو فقدان ارتباطات مختلفة لمستقبلات البروتينات خلال هذا المدى الحراري الذي يقود إلى تثبيط انتقال الجين أو عدم استقراره ومن ثم فأنها تعمل على حدوث تغير في فعالية الإنزيمات المسؤولة عن تضاعف DNA ومن ثم توقف أو تقلل من التضاعف [41]. وقد يعود الاختلاف في النسب المؤية للعزلات ذات الاختلاف في كثافة الإنتاج إلى العزلات قيد الدراسة لإنتاج الغشاء الحيوي إلى اختلاف مصدر العينة إذ إن العزلات كانت من مصادر مختلفة ومن أشخاص مختلفين وبأعمار مختلفة ولاسيما الأشخاص المصابين بداء السكري.

## المصادر

1. Costerton, J. W.; Stewart, P. S. and Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284(5418), 1318-1322.
2. Kramer, A.; Schwebke, I. and Kampf, G. (2006). How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC infectious diseases*, 6(1), 1..
3. Derakhshan, S.; Sattari, M. and Bigdeli, M. (2010). Effect of cumin (*Cuminum cyminum*) seed essential oil on biofilm formation and plasmid Integrity of *Klebsiella pneumoniae*. *Pharmacognosy magazine*, 6(21), 57.
4. Mah, T. F. C. and O'Toole, G. A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in microbiology*, 9(1), 34-39.
5. مهدي، داليا صلاح وناجي، حسن فاضل. (2009). دراسة النسق البلازميدي للبكتريا المعزولة من الأغشية الحيوية للعدد الطبية. عدد خاص بمؤتمر كلية العلوم. جامعة بابل. 27-28 آيار.
6. Dadawala, A. I.; Chauhan, H. C.; Chandel, B. S.; Ranaware, P.; Patel Sandip, S.; Khushboo, S. and Kher, H. N. (2010). Assessment of *Escherichia coli* isolates for in vitro biofilm production. *Vet World*, 3, 364-366.
7. Benoit, M. R.; Conant, C. G.; Ionescu-Zanetti, C.; Schwartz, M., and Matin, A. (2010). New device for high-throughput viability screening of flow biofilms. *Applied and environmental microbiology*, 76(13), 4136-4142.



8. Gerdes, K.; Rasmussen, P. B. and Molin, S. (1986). Uniquetype of maintenance functionpostegregational killing of plasmid free cells. Proe. Natl. Acad. Sci. USA., 38: 3116-3120.
9. Martineau, F.; Picard, F. J.; Ménard, C.; Roy , P. H.; Ouellette, M. and Bergeron, M. G. (2000). Development of a Rapid PCR Assay Specific for Staphylococcus saprophyticus and Application to Direct Detection from Urine Samples. Journal of clinical microbiology, 38(9), 3280-3284.
10. Holt, J. G.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H.A.; Staley, J.A. and Williams, S.T. (1994). Bergy, s Manual Of Derminative Bacteriology. (9th) ed. Williams and Wilkins.
11. Schwartz, T.; Kohnen, W.; Jansen, B. and Obst, U. (2003). Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. FEMS microbiology ecology, 43(3), 325-335.
12. Singh, H.; Rathore, R. S.; Singh, S. and Cheema, P. S. (2011). Comparative analysis of cultural isolation and PCR based assay for detection of Campylobacter jejune in food and faecal samples. Brazilian Journal of Microbiology, 42(1), 181-186.
13. Trevors, J. T. (1986). Plasmid curing in bacteria. FEMS microbiology reviews, 32(3), 149-157.
14. Bauer, A.W.; Kirby, W. M. M.; Sherris, J. C and Truck M.(1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. of Clin.Pathol.45:493-496.
15. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). (2013). Performance standards for disc susceptibility tests, 8<sup>th</sup> ed. Approved standard M2-A8. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
16. Dillon, JA ; Nasim A and Nestmann, E (1985) Recombinant DNA Methodology. John Wiley and Sons Inc., Mississauga, Ontario, Canada.
17. Al-Ani, Narjis Fowzi Ismail. Microbiological Aspects in Biofilm Produced by Some Uropathogens Isolated from Patients with Indwelling Bladder Catheters. Diss. Anbar University, 2008.-495-485 :3 :12
18. Buniya, H. K. (2013). Transformation of some genetic traits carried on Staphylococcus aureus plasmids to E. coli BL21 (DE3) strain Al-Anbar Journal of Veterinary Sciences : V: 6 I: (1) P,(173-179).
19. Moteeb, S. H. (2008). Quantitative and qualitative assay of bacterial biofilm produced by Pseudomonas aeruginosa and klebsiella Spp. J AlAnbar university for pure science, (3).
20. Naji, E. N.; Ali ,A. A. and Hamzah, B. F.(2015)"The Bactericidal Effect of CO2 Laser on Pseudomonas aeruginosa Isolated from Wound and Burn Infections, In-Vitro".Baghdad Science Journal ISSN: P: 20788665 E: 24117986.
21. Al-Enzi, R. M. and Al-Charrakh, A. (2013)" H. Heavy Metals Resistance of Pseudomonas aeruginosa Isolated from Clinical and Environmental Sources in Hilla City".Medical Journal of Babylon ISSN: 1812156X 23126760:: 10: 1: 110-119
22. Oleiwi, S. R. and Abid, H. K.(2014)" Role of Extracted Genomic DNA on Biofilm Formation by Pseudomonas aeruginosa and Klebsiella pneumoniae in vitro". Ibn Al-Haitham J. for Pure and Appl. Sci. 27 (3).
23. Mathur, T.; Singhal, S.; Khan, S.; Upadhyay, D. J.; Fatma, T. and Rattan, A. (2006). Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: an evaluation of three different screening methods. Indian journal of medical microbiology, 24(1), 25.
24. Nktel, f. Al-saad ; Mohammed, S. AL-Saeed and Ilham A. Bnyan. (2012)" Biofilm Formation by Bacterial Isolates from Burn Infected Patients". Medical Journal of Babylon-9-3.
25. Ebraheem, A. A. and Alwendawi, S. A.(2015)" Screening for in Vitro Biofilm Formation Ability of Locally Isolated Uropathogenic Escherichia coli (UPEC)". Iraqi Journal of Science. 56, (2B): (1310-1314).

26. Agnihotri, N.; Gupta, V. and Joshi, R. M. (2004). Aerobic bacterial isolates from burn wound infections and their antibiograms—a five-year study. *Burns*, 30(3), 241-243.
27. Nathwani, D. and Barlow, G. (2005). Is antibiotic resistance a problem, A practical guide for hospital clinicians. *Post. Med. J.*, 81: 680-692.
28. Nelson, D. E.; Ghosh, A. S.; Paulson, A. L.; and Young, K. D. (2002). Contribution of membrane-binding and enzymatic domains of penicillin binding protein 5 to maintenance of uniform cellular morphology of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 184(13), 3630-3639.
29. Zavascki, A. P.; Gaspareto, P. B.; Martins, A. F.; Gonçalves, A. L. and Barth, A. L. (2005). Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo- $\beta$ -lactamase in a teaching hospital in southern Brazil. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(6), 1148-1151.
30. Brooks, G. F.; Butel, J. S. and Morse, S. A. (1998). *Medical Microbiology* 21st ed. Appleton and Lange. Stamford United States el America. P. 145 – 176, 231 – 233.
31. Spanu, T.; Luzzaro, F.; Perilli, M.; Amicosante, G.; Toniolo, A.; Fadda, G. and Italian ESBL Study Group. (2002). Occurrence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in members of the family Enterobacteriaceae in Italy: implications for resistance to  $\beta$ -lactams and other antimicrobial drugs. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(1), 196-202.
32. Hoyle, B. D.; Alcantara, J. and Costerton, J. W. (1992) "Pseudomonas aeruginosa biofilm as a diffusion barrier to piperacillin." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 36.9: 2054-2056
33. Jazani, Nima Hosseini, Afshin Zahedi, and Naser Garebagi. "Phenotypic detection of metallo- $\beta$ -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Urmia hospitals." *African Journal of Microbiology Research [Internet]* 6.7 (2012): 1387-92.
34. Pehl, M. J.; Jamieson, W. D.; Kong, K.; Forbester, J. L.; Fredendall, R. J.; Gregory, G. A. and Orwin, P. M. (2012). Genes that influence swarming motility and biofilm formation in *Variovorax paradoxus* EPS. *PloS one*, 7(2), e31832.
35. O'Toole, G. A. (2011). Microtiter dish biofilm formation assay. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (47), e2437-e2437.
36. Chmielewski, R. A. N. and Frank, J. F. (2003). Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 2(1), 22-32.
37. Dougherty, K.; Smith, B. A.; Moore, A. F.; Maitland, S.; Fanger, C.; Murillo, R. and Baltrus, D. A. (2014). Multiple phenotypic changes associated with large-scale horizontal gene transfer. *PloS one*, 9(7), e102170.
38. Khan, A. U. and Musharraf, A. (2004). Plasmid-mediated multiple antibiotic resistance in *Proteus mirabilis* isolated from patients with urinary tract infection. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, 10(11), CR598-602.
39. Ghigo, J. M. (2001). Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature*, 412(6845), 442-445.
40. Branda, S. S.; Vik, Å.; Friedman, L. and Kolter, R. (2005). Biofilms: the matrix revisited. *Trends in microbiology*, 13(1), 20-26.
41. Sherburne, C. K.; Lawley, T.D.; Gilmour, M.W.; Blattner, F.R.; Burland, V.; Grotbeck, E.; Rose, D. J. and Taylor, D. F. (2000). The complete DNA sequence and analysis of R27, a large IncHI plasmid from *Salmonella typhimurium* that is temperature sensitive for transfer. *Nucleic Acid Research*, 28.2177–2186.

## جدول (1) يوضح الاختبارات الكيموحيوية والمجهريّة لغرض التمييز والتشخيص الأولي

اسم العزلة	Gram stain	Motility	Indole	M- Red	V-P	Citrate	Catalase	Oxidase	Urease	H <sub>2</sub> S	Glucose	Lactose	Co2
<i>P. aeruginosa</i>	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+
<i>Kl. pneumoniae</i>	-	-	+/-	-	+	+	+	-	-/+	-	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+
<i>P. mirabilis</i>	-	+	-	+	+/-	+/-	+	-	+	+	+	-	-
<i>Entero. cloacae</i>	-	+	-	-	+	+	+	-	-/+	-	+	+	-

## جدول (2) الاوساط الزرعية واستعمالاتها والشركة المصنعة لها

ت	اسم الوسيط	الاستعمال	الشركة المصنعة
1.	وسط اكار ماكونكي MacConkey's agar medium	عزل العصيات السالبة لصبغة كرام والتفريق بين العزلات المخمرة لسكر اللاكتوز عن غير المخمرة	Himedia (India)
2.	وسط الدم الاساس Blood agar base	وسط غذائي لاستنبات وتمييز البكتريا المحللة للدم	Himedia (India)
3.	وسط الاكار المغذي Nutrient agar media	لحفظ العزلات البكتيرية النقية على السطح المائل	Oxoid (England)
4.	المرق المغذي Nutrient broth	لتنمية العزلات البكتيرية وتنشيطها لاجراء الاختبارات الكيموحيوية	Himedia (India)
5.	اكار مولر-هنتون Muller-hinton agar	لاختبار حساسية العزلات البكتيرية للمضادات الحيوية	Oxoid (England)
6.	وسط عزل السيدوموناس Pseudomonas isolation agar	لعزل الزوائف الزنجارية وتشخيصها	Himedia (India)
7.	وسط اكار سترات سيمون Simmon citrate agar	هذا الوسيط لاختبار قابلية البكتريا على استهلاك السترات كمصدر للكربون.	Oxoid (England)
8.	وسط اكار كلكر Kligler's Iron agar medium	لتشخيص قدرة البكتريا على تخمير السكريات ، وإنتاج الغاز من تخمير السكريات وانتاج كبريتيد الهيدروجين H <sub>2</sub> S	Himedia (India)
9.	وسط ماء البيبتون Pepton water medium	للتحري عن قابلية البكتريا على تحليل الحامض الاميني (Tryptophan) وانتاج الاندول	Himedia (India)
10.	اكار اليوريا الاساس Urea agar base	للتحري عن قابلية البكتريا على انتاج انزيم اليوريز وتحليل اليوريا	Himedia (India)
11.	مرق نقيع القلب-الدماغ Brain-heart infusion broth	لحفظ العزلات البكتيرية النقية لفترات طويلة دون احتمال تعرضها لفقدان بعض مواصفاتها الوراثية	Oxoid (England)
12.	المثيل الأحمر-الفوكس بروسكاور MR-VP	التحري والكشف عن المثيل الأحمر التي تسهم في خفض الدالة الحامضية (PH) إلى أقل من 4.6	Oxoid (England)



## جدول (3) حساسية العزلات البكتيرية ومقاومتها للمضادات الحيوية

المعدل	<i>E. cloacae</i>	<i>P. Mirabilis</i>	<i>E.coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	المضادات الحيوية ونسبة الحساسية		Antimicrobial class
120	N=(7)	N=(11)	N(14)	N=(34)	N=(54)			
100	100	100	100	100	100	R%	Ampicillin	Penicillins
0	0	0	0	0	0	S%		
100	100	100	100	100	100	R%	Oxacillin	
0	0	0	0	0	0	S%		
100	100	100	100	100	100	R%	Ticarillin	
0	0	0	0	0	0	S%		
100	100	100	100	100	100	R%	Amoxicillin-clavulanic acid	$\beta$ -lactam/ $\beta$ -lactamaseinhibitor
0	0	0	0	0	0	S%		
100	100	100	100	100	100	R%	Cephlothine	Cephems (parenteral )
0	0	0	0	0	0	S%		
%85	(%29)2	100	100	(%94)32	100	R%	Cefotaxime	
%15	(%71)5	0	0	(%6)2	0	S%		
%65	(%86)6	(%9)1	(%50)7	(%85)29	(%93)50	R%	Ceftriaxone	
%35	(%14)1	(%91)10	(%50)7	(%15)5	(%7)4	S%		
100	100	100	100	100	100	R%	Aztreonam	Monobactams
0	0	0	0	0	0	S%		
%1	0	0	0	(%3)1	(%3)2	R%	Imipenem	Penems
%99	(%100)7	(%100)11	(%100)100	(%97)33	(%97)52	S%		
%38	0	(%73)8	(%7)1	(%71)24	(%37)20	R%	Amikacin	Aminoglycoside
%62	(%100)7	(%27)3	(%93)13	(%29)10	(%63)34	S%		
%37	(%14)1	(%18)2	(%36)5	(%70)24	(%48)26	R%	Gentamycin	
%63	(%86)6	(%82)9	(%64)9	(%30)10	(%52)28	S%		
%50	(%14)1	(%73)8	(%21)3	(%83)28	(%57)31	R%	Tobramycin	
%50	(%86)6	(%27)3	(%79)11	(%17)6	(%43)23	S%		
100	100	100	100	100	100	R%	Rifampin	Ansamycins
0	0	0	0	0	0	S%		
%78	(%29)2	100	(%71)10	(%91)31	100	R%	Trimethoprim	Folatepathway inhibitor
%22	(%71)5	0	(%29)4	(%9)3	0	S%		
%74	0	100	(%78)11	(%91)31	100	R%	sulfaTri-	
%26	(%100)7	0	(%22)3	(%9)3	0	S%		
100	100	100	100	100	100	R%	Vancomycin	Glycopeptide
0	0	0	0	0	0	S%		
100	100	100	100	100	100	R%	Clindamycin	Lincosamide
0	0	0	0	0	0	S%		
%53	(%43)3	100	(%86)12	(%18)6	(%19)10	R%	Chloramphenicol	Phenicol
%47	(%57)4	0	(%14)2	(%82)28	(%82)44	S%		
%68	(%29)2	100	(%93)13	(%24)8	(%95)51	R%	Nalidixic acid	Quinolones
%32	(%71)5	0	(%7)1	(%76)26	(%5)3	S%		
%39	(%14)1	0	(%78)11	(%12)4	(%93)50	R%	Ciprofloxacin	
%61	(%86)6	(%100)11	(%22)3	(%88)30	(%7)4	S%		
%73	(%86)6	(%82)9	(%29)4	(%86)29	(%81)44	R%	Tetracycline	Tetracycline
%27	(%14)1	(%18)2	(%71)10	(%14)5	(%19)10	S%		

\*(S)= Sensitive

\*(R) =Resistant

الجدول (4) قيم الكثافة الضوئية للغشاء الحيوي بعد ربط البنفسج البلوري بالعزلات المنتخبة والقراءة عند طول موجي (620nm) قبل التحديد

at3	at2	at1	strong	mid	week	4ac	2ac	ac	at	Sample
0.113	0.128	0.132	False	True	False	0.244	0.122	0.061	0.124	<i>En.cloacae 1</i>
0.07	0.159	0.067	False	False	True	0.244	0.122	0.061	0.098	<i>En.cloacae 2</i>
0.145	0.149	0.146	False	True	False	0.244	0.122	0.061	0.146	<i>P. mirabilis 1</i>
0.142	0.139	0.138	False	True	False	0.244	0.122	0.061	0.139	<i>P. mirabilis 2</i>
0.135	0.085	0.121	False	False	True	0.244	0.122	0.061	0.113	<i>P. mirabilis 3</i>
0.075	0.126	0.072	False	False	True	0.244	0.122	0.061	0.091	<i>P. mirabilis 4</i>
0.125	0.135	0.129	False	True	False	0.244	0.122	0.061	0.129	<i>P. mirabilis 5</i>
0.063	0.093	0.061	False	False	True	0.244	0.122	0.061	0.072	<i>E. coli 1</i>
0.097	0.053	0.087	False	False	True	0.244	0.122	0.061	0.079	<i>E. coli 2</i>
0.082	0.104	0.068	False	False	True	0.244	0.122	0.061	0.084	<i>E. coli 3</i>
0.097	0.061	0.09	False	False	True	0.244	0.122	0.061	0.082	<i>E.coli 4</i>
0.076	0.083	0.088	False	False	True	0.244	0.122	0.061	0.082	<i>E. coli 5</i>
0.127	0.135	0.119	False	True	False	0.244	0.122	0.061	0.127	<i>E. coli 6</i>
0.161	0.187	0.157	False	True	False	0.244	0.122	0.061	0.168	<i>Kl.Pneumoniae1</i>
0.079	0.089	0.1	False	False	True	0.244	0.122	0.061	0.089	<i>Kl.Pneumoniae2</i>
0.25	0.244	0.265	True	False	False	0.244	0.122	0.061	0.253	<i>Kl.Pneumoniae3</i>
0.077	0.073	0.09	False	False	True	0.244	0.122	0.061	0.080	<i>Kl.Pneumoniae4</i>
0.109	0.11	0.112	False	False	True	0.244	0.122	0.061	0.110	<i>Kl.Pneumoniae5</i>
0.258	0.251	0.248	True	False	False	0.244	0.122	0.061	0.252	<i>Kl.Pneumoniae6</i>
0.129	0.15	0.144	False	True	False	0.244	0.122	0.061	0.141	<i>Kl.Pneumoniae7</i>
0.134	0.124	0.126	False	True	False	0.244	0.122	0.061	0.128	<i>Kl.Pneumoniae8</i>
0.131	0.125	0.143	False	True	False	0.244	0.122	0.061	0.133	<i>Kl.Pneumoniae9</i>
0.253	0.243	0.252	True	False	False	0.244	0.122	0.061	0.249	<i>P. aeruginosa 1</i>
0.062	0.105	0.067	False	False	True	0.244	0.122	0.061	0.078	<i>P. aeruginosa 2</i>
0.123	0.1	0.132	False	False	True	0.244	0.122	0.061	0.118	<i>P. aeruginosa 3</i>
0.086	0.108	0.082	False	False	True	0.244	0.122	0.061	0.092	<i>P. aeruginosa 4</i>
0.243	0.228	0.264	True	False	False	0.244	0.122	0.061	0.245	<i>P. aeruginosa 5</i>
0.078	0.113	0.078	False	False	True	0.244	0.122	0.061	0.0896	<i>P. aeruginosa 6</i>
0.133	0.121	0.128	False	True	False	0.244	0.122	0.061	0.1273	<i>P. aeruginosa 7</i>
0.065	0.103	0.164	False	False	True	0.244	0.122	0.061	0.1106	<i>P. aeruginosa 8</i>
0.131	0.136	0.145	False	True	False	0.244	0.122	0.061	0.1373	<i>P. aeruginosa 9</i>
0.164	0.065	0.155	False	True	False	0.244	0.122	0.061	0.128	<i>P.aeruginosa 10</i>

الجدول (5) قيم الكثافة الضوئية للغشاء الحيوي بعد ربط البنفسج البلوري بالعزلات المنتخبة والقراءة عند طول موجي (620nm) بعد التحديد

at3	at2	at1	strong	mid	week	4ac	2ac	ac	at	Sample
0.061	0.054	0.054	False	False	False	0.228	0.114	0.057	0.056	<i>En.cloacae 1</i>
0.059	0.066	0.063	False	False	True	0.228	0.114	0.057	0.062	<i>En.cloacae 2</i>
0.058	0.056	0.056	False	False	False	0.228	0.114	0.057	0.056	<i>P. mirabilis 1</i>
0.057	0.058	0.056	False	False	False	0.228	0.114	0.057	0.057	<i>P. mirabilis 2</i>
0.056	0.055	0.06	False	False	False	0.228	0.114	0.057	0.057	<i>P. mirabilis 3</i>
0.056	0.058	0.056	False	False	False	0.228	0.114	0.057	0.056	<i>P. mirabilis 4</i>
0.057	0.055	0.053	False	False	False	0.228	0.114	0.057	0.055	<i>P. mirabilis 5</i>
0.058	0.058	0.055	False	False	False	0.228	0.114	0.057	0.057	<i>E. coli 1</i>
0.053	0.056	0.056	False	False	False	0.228	0.114	0.057	0.055	<i>E. coli 2</i>
0.048	0.054	0.06	False	False	False	0.228	0.114	0.057	0.054	<i>E. coli 3</i>
0.057	0.064	0.06	False	False	True	0.228	0.114	0.057	0.060	<i>E.coli 4</i>
0.061	0.054	0.051	False	False	False	0.228	0.114	0.057	0.055	<i>E. coli 5</i>
0.046	0.06	0.05	False	False	False	0.228	0.114	0.057	0.052	<i>E. coli 6</i>
0.055	0.053	0.06	False	False	False	0.228	0.114	0.057	0.056	<i>Kl.Pneumoniae 1</i>
0.049	0.064	0.056	False	False	False	0.228	0.114	0.057	0.056	<i>Kl.Pneumoniae 2</i>
0.071	0.062	0.054	False	False	True	0.228	0.114	0.057	0.062	<i>Kl.Pneumoniae 3</i>
0.058	0.057	0.056	False	False	False	0.228	0.114	0.057	0.057	<i>Kl.Pneumoniae 4</i>
0.067	0.066	0.064	False	False	True	0.228	0.114	0.057	0.065	<i>Kl.Pneumoniae 5</i>
0.068	0.072	0.071	False	False	True	0.228	0.114	0.057	0.070	<i>Kl.Pneumoniae 6</i>
0.053	0.06	0.052	False	False	False	0.228	0.114	0.057	0.055	<i>Kl.Pneumoniae 7</i>
0.077	0.077	0.062	False	False	True	0.228	0.114	0.057	0.072	<i>Kl.Pneumoniae 8</i>
0.075	0.076	0.075	False	False	True	0.228	0.114	0.057	0.075	<i>Kl.Pneumoniae 9</i>
0.057	0.058	0.059	False	False	True	0.228	0.114	0.057	0.058	<i>P. aeruginosa 1</i>
0.065	0.071	0.074	False	False	True	0.228	0.114	0.057	0.07	<i>P. aeruginosa 2</i>
0.055	0.057	0.054	False	False	False	0.228	0.114	0.057	0.055	<i>P. aeruginosa 3</i>
0.073	0.064	0.063	False	False	True	0.228	0.114	0.057	0.066	<i>P. aeruginosa 4</i>
0.055	0.06	0.054	False	False	False	0.228	0.114	0.057	0.056	<i>P. aeruginosa 5</i>
0.054	0.057	0.059	False	False	False	0.228	0.114	0.057	0.056	<i>P. aeruginosa 6</i>
0.073	0.067	0.061	False	False	True	0.228	0.114	0.057	0.067	<i>P. aeruginosa 7</i>
0.061	0.069	0.063	False	False	True	0.228	0.114	0.057	0.064	<i>P. aeruginosa 8</i>
0.062	0.052	0.054	False	False	False	0.228	0.114	0.057	0.056	<i>P. aeruginosa 9</i>
0.068	0.065	0.072	False	False	True	0.228	0.114	0.057	0.068	<i>P.aeruginosa 10</i>

$at1 + at2 + at3 / 3 = 620nm$  = معدل قراءة الامتصاصية للعزلات عند الطول الموجي \*  
 \* ac = معدل قراءة الامتصاصية لعزلة الكونترول.

\* 2ac = ضعف معدل قراءة الامتصاصية لعزلة الكونترول.

\* 4ac = أربعة اضعاف معدل قراءة الامتصاصية لعزلة الكونترول.

\* at1 = القراءة للمكرر الاول

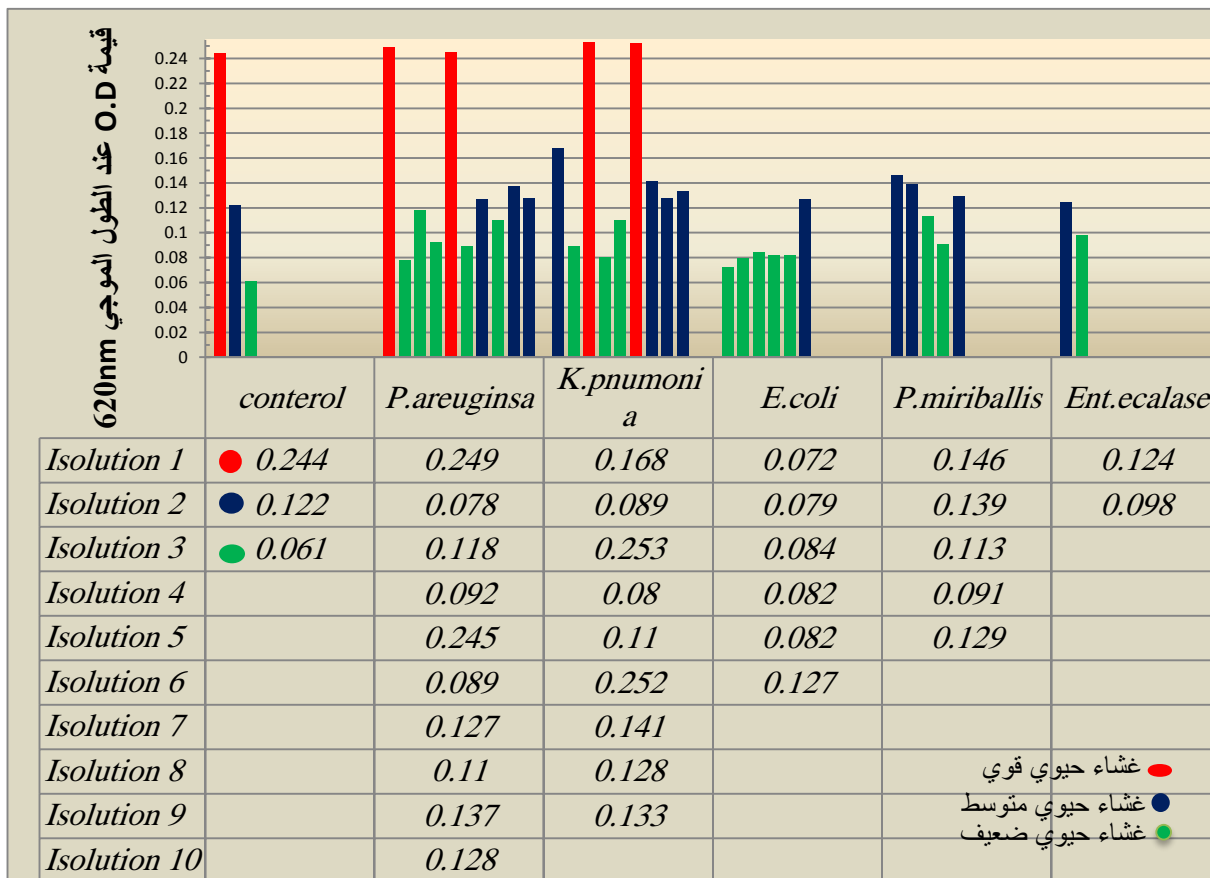
\* at2 = القراءة الثانية للمكرر

\* at3 = القراءة الثالثة للمكرر

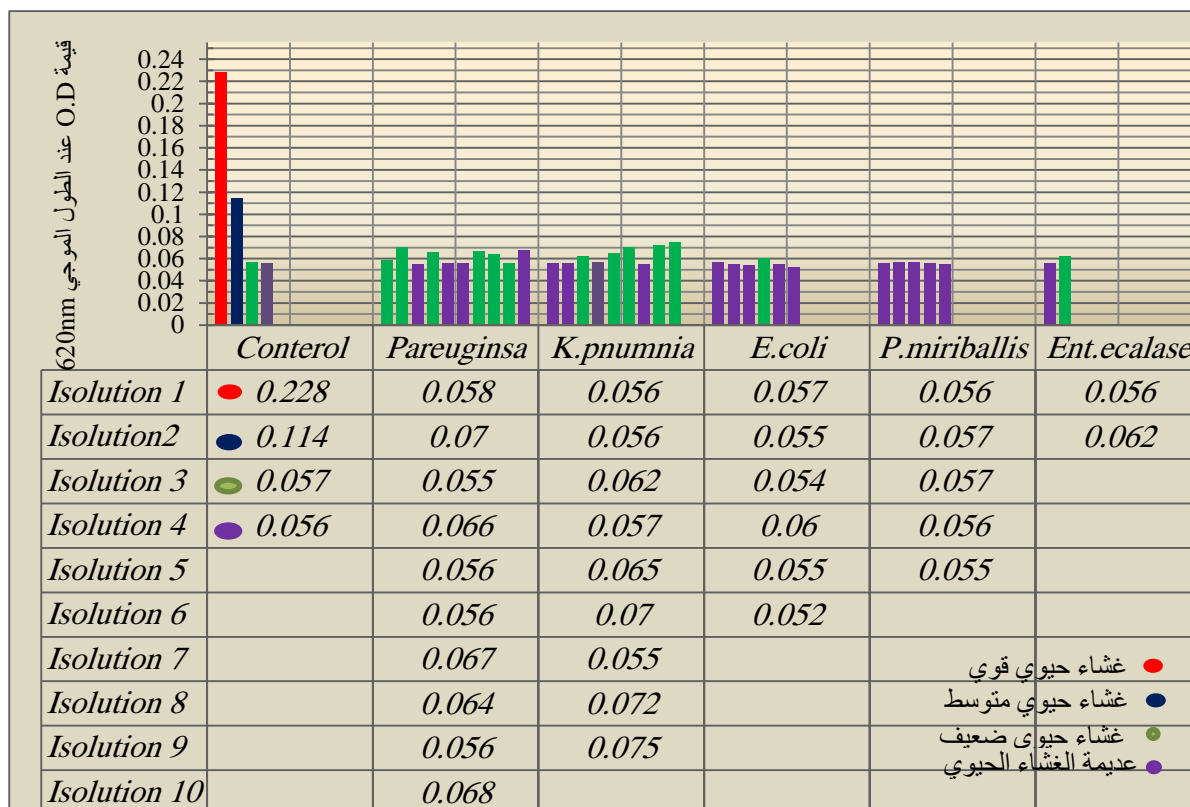
\* week = غشاء ضعيف

\* mid = غشاء متوسط

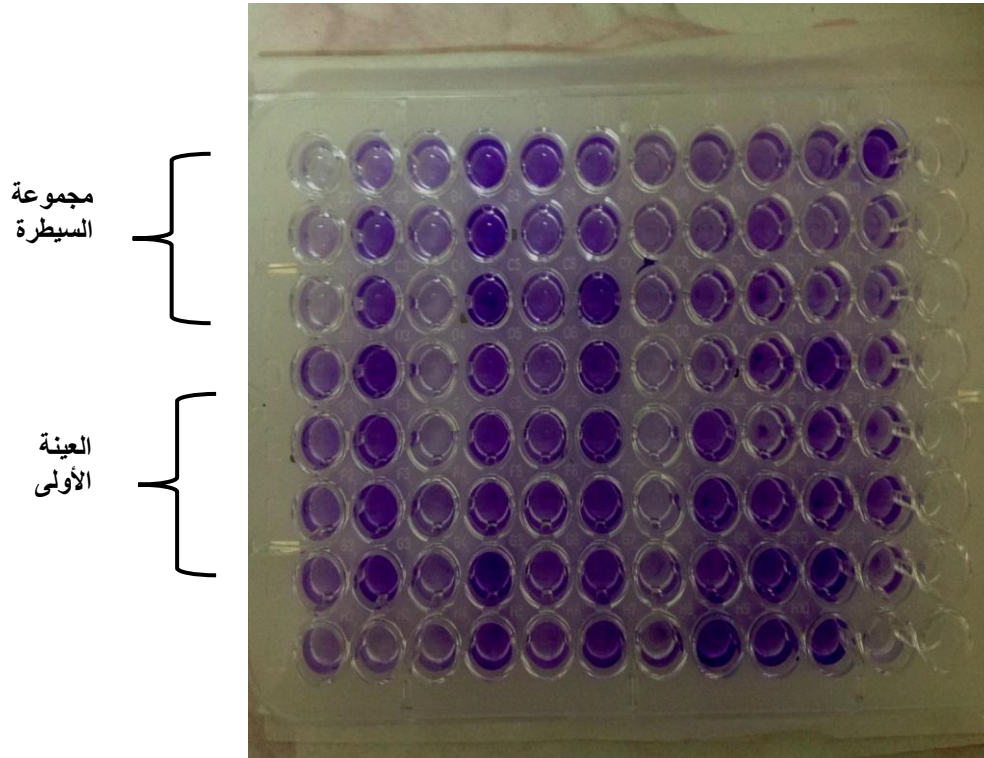
\* strong = غشاء قوي



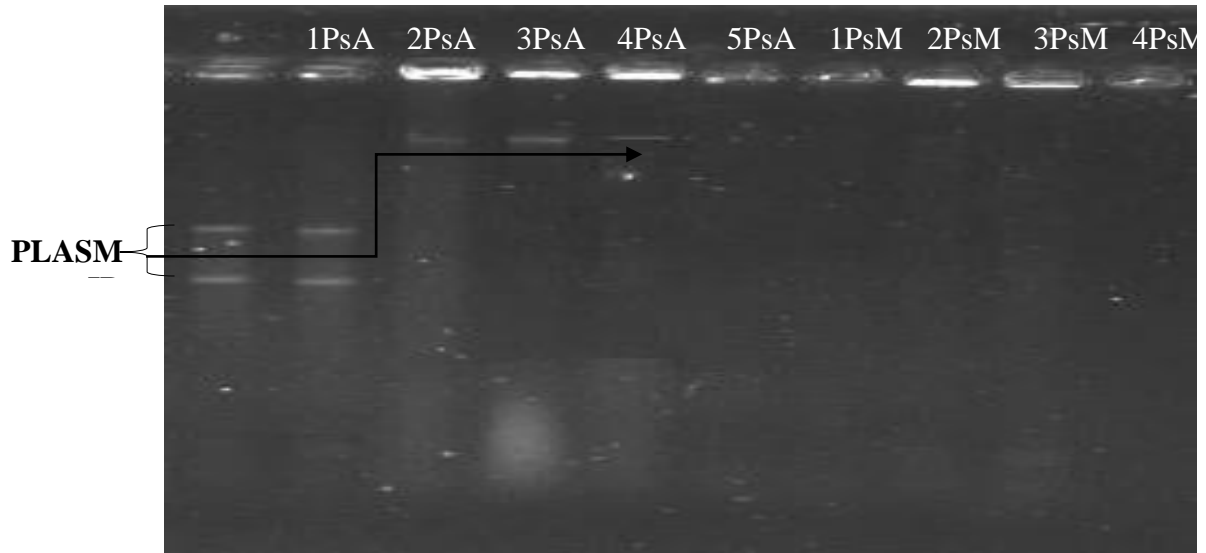
شكل (1) قيم الكثافة الضوئية للغشاء الحيوي قبل التثبيت



شكل (2) قيم الكثافة الضوئية للغشاء الحيوي بعد التثبيت



الصورة (1) البنفسج البلوري المرتبط بإنتاج الغشاء الحيوي للعزلات المنتخبة



صورة (2) الترحيل الكهربائي للـ DNA البلازميدي على هلام الاكاروز بتركيز 0.8% وفولتية 5 فولت / سم 1.5 ساعة لبكتيريا الـ *Ps. aregenosa* إذ يمثل المسار 1PsA, 2PsA, 3PsA, 4PsA, 5PsA العزلة الأولى والثانية والثالثة والرابعة والخامسة قبل التحديد وتمثل 1PsM, 2PsM, 3PsM, 4PsM, 5PsM العزلة الأولى والثانية والثالثة والرابعة والخامسة بعد التحديد.



# Determine the Biofilm Formed by Using ELISA Technology for Gram-Negative Bacteria Isolated from Wounds and Burns Infections, and the Study of the Production of the Biofilm Molecularly.

Omar Nama Flaih

Laith Musleh Najeb

Dept. Of Biology / College Of Science/ University Of Al-Anbar

Rana Kadhim Mohammad

Dept. Of Biotechnology / College Of Science/ University Of Baghdad

Received in :28/ March /2016 , Accepted in : 28 /December/ 2016

## Abstract

This study was designed to investigate the capability of gram-negative bacteria that isolated from wound and burn infection to production of Biofilm which included (32) isolates, which have multi – drug resistant to antibiotics. The isolates included (10) *Pseudomonas aeruginosa*, (9) *Klebsiella pneumoniae*, (6) *Escherichia coli*, (5) *Proteus mirabilis* and (2) *Enterobacter cloacae*. The method used method links the crystal violet with biofilm and reading by ELISA which was adopted on the values of optical density of violets that linked to the mass of biofilm at the wavelength of (620) nm, the test results showed variation of biofilm composition for all bacterial species depending on the optical density value while the most production of biofilm was product from bacterial isolated from diabetes patients wound. Agarose *gal* electrophoreses results show that all isolate have a different plasmid profile according to the (size and position), it was also that temperature used as a curing factor causes a high frequency loss the plasmid from all isolates and according to this reason the yield was different after the curing that maybe refers to the role of both plasmid and chromosome in regulating this phenomena.

**Keywords:** Gram Negative Bacteria, Biofilm, Crystal Violate, Plasmid