International Journal of Medical Sciences, May 2023;6(2):36-44;
ISSNe2522-7386; DOI: https://doi.org/10.32441/ijms.6.2.5

تأثير دقائق الفضة النانونية المحضرة بأستخدام المبيضات البيض في بعض البكتريا المرضية

حسين عبد الرزاق عبود، كلية التربية المفتوحة، مديرية التربية في محافظة كركوك، وزارة التربية، كركوك

Email: dr.hussenalsaadi@yahoo.com
ORCID: https://orcid.org/0009-0002-1355-0928
أكرم مظهر كريم، كلية التربوية المفتوحة، مديرية التربية في محافظة كركوك، وزارة التربية، كركوك.Email: akramaljubouri@uokirkuk.edu.iq

أستلم البحث: 2023/2/27 قبل البحث: 2023/4/11 طبع البحث: 2023/5/1

الخلاصة:

تم الحصول على عزلة من خميرة ***Candida albicans*** من مستشفى كركوك عام.وأستخدم لدراسة قابليتها على تحضير الجسيمات الفضة النانونية وتبين أن يتحول لون محلول نترات الفضة 1Mm إلى اللون البني، وهو دليل أولي على تكوين جزيئات الفضة النانوية. تمت دراسة أطياف الامتصاص المرئي والأشعة فوق البنفسجية لمحاليل الجسيمات النانوية الفضية كخطوة ثانية لتحديد تكوين الجسيمات ووجد أنها تقع عند الطول الموجي (430) نانومتر(31.77 و 46.11 و 57.21) على التوالي. كما ظهرت الجسيمات بشكل دقائق واضحة في صور المجهر الالكتروني الماسح .تبين أن محلول جسيمات الفضة النانونية ذات تأثير تثبيطي واضح على نوعين من البكتريا *E.coli* و*P. mirabilis* والتي بلغت (33,33,32) ملم ضد البكتريا *E.coli* عند تركيز100% و(5,6,5) ملم على ثلاث من عزلات *E.coli* وكانت (35,35,34) ملم عند التركيز 100% ضد *P. mirabilis*

الكلمات الدلالية: الجسيمات الفضية النانوية، Candida albicans, E. coli, P. mirabilis

المقدمة

علم النانو هو العلم الذي يدرس ويميز المواد ذات الأبعاد بين 10-100 نانومتر، ويحدد خواصها الكيميائية والفيزيائية والميكانيكية من خلال دراسة الظواهر المرتبطة بها الناشئة عن صغر حجمها (1) بينما يُعرف علم النانو أيضًا باسم علم المواد المحدودة في الصغر لأنه يدرس

المواد على المستوى الذري أو الجزيئي التي لها خصائص مختلفة بشكل كبير عن نفس المادة على نطاق أوسع. يمكن الحصول على الجسيمات النانوية بيولوجيًا وكيميائيًا من البكتيريا والفطريات التي تنتج جسيمات نانوية بخصائص مضادة للميكروبات.(2)(3)

المواد وطرق العمل

تحضير ألكتله الحيوية الفطرية وتكوين الجسيمات النانوية الفضية

تحضير المواد الفطرية عن طريق إزالة الأقراص من نمو المستعمرات الفطرية النقية باستخدام ثقب معقم 7 ملم من الفلين، حيث يتم ثقب حافة المستعمرة النامية على لوحة نمو فطرية وتوضع في مخروط يحتوي على 100 مل من MYPG السائل. ضع وسط الاستزراع في الزجاجة بهدوء وبعناية بحيث يكون القرص على سطح وسط الثقافة ويقلب. بعد استقرار الأقراص على سطح الوسط السائل لفترة من الوقت، ثم وضعها في حاضنة 26 درجة مئوية لمدة 5-7 أيام للحصول على حصائر فطرية بأوزان مختلفة (4) مرشح الكتلة الفطرية وغسلها جيدًا بالماء المقطر المعقم لإزالة بقايا وسط الاستزراع، ثم ضع الكتلة الفطرية في دورق مخروطي مملوء بالماء المقطر المعقم (100 مل)، وضعه في الحاضنة لمدة 24-72 ساعة، وقم بترشيحه مرة أخرى باستخدام ورق الترشيح، قم بتصفية الحبيبات لضمان إزالة جميع وسائط المكونات, بعدها جفف ورقة الترشيح في فرن كهربائي من نوعMemmert (Germany)عند درجة حرارة 50 م بعدها قم بقياس الوزن الجاف للفطر بفارق الوزنبين كتلةالورقة المجففة مع محتوياتها بعد الترشيح وكتلة ورقة الترشيح وهي مجففة قبل الترشيح . وزن 10غم من الكتلة الفطرية ثم وضعها في 100مل من محلول نترات الفضة $Ag\ NO_3$ المحضرة بتركيز 1mM ووضعها في الحاضنة في ظروف مظلمة تماما وبعد التغير اللوني تم فحص جزيئاتAgNPs بأستخدام مطياف الأشعة فوق البنفسجية المرئية UV-visble(JASCO) spectrophotometer في المركز الصحي في مدينة كركوك وطيف الأشعة السينية X-Ray (shimadzu) في مختبر في قسم الفيزياء – كلية العلوم جامعة بغداد كما تم (أستخدام المجهر الالكتروني الماسح SEM(Scaning Electron Microscopy) (TESCAN-VEGA) في الجامعه التكنلوجية مركز ابحاث النانو.

جمع العينات السريرية

تم الحصول على عينات البكتريا من النماذج السريرية المأخوذة من المراجعين والراقدين في مستشفيات مدينة كركوك .اذ زرعت العينات على وسطي أكار الدم وأكار الماكونكي وحضنت في 37مْ لمدة 18-24ساعة.بعدها نقل عدد من المستعمرات المفردة الى وسط الاكار

المغذي السائل وحضنت في 37مْ لمدة 18-24ساعة وبعد ظهور النمو حفظت في 4 مْ لحين الاستخدام.

الفحوصات الكيموحيوية

بهدف تشخيص العزلات البكتيرية تم أجراء عدد من الاختبارات البايوكيميائية المذكورة في مصادر التشخيص المعتمدة (6) (5) أضافة الى تأكيد التشخيص بأستخدام نظام Api20E المجهزة من شركة Biomeriex.

تحضير تخافيف من الجسيمات النانونية

استعمل محلول جسيمات الفضة بعد ترشيحه من الفطر باستخدام ورق الترشيح المعقمة (Whatman filter paper No 1) وتعقيمه بواسطة وحدة الترشيح الدقيق 0.22ملم وحضرت بالتراكيز الآتية:

التركيز الأول: يحوي 1mM من محلول AgNPs واصبح بتركيز100%.

التركيز الثاني: حضر بأضافة 5مل من المحلول الاولي في 5 مل من الماء المقطر المعقم ليصبح التركيز ليصبح التركيز 50%.

التركيز الثالث: حضر بأضافة 3.5 مل من المحلول الاولي وخفف في 6.5 مل من الماء المقطروليصبح بتركيز 35%.

التركيز الرابع: حضر بأضافة 2.5 مل من المحلول الاولي وخفف في 7.5مل من الماء المقطر ليصبح تركيز 25%.

دراسة تأثير الجسيمات النانوية على البكتريا المرضية

تم تحضير العالق البكتيري بالمقارنة مع محلول ماكفرلاند القياسي وأستخدمت القطيلة في نشر العالق البكتيري على سطح الوسط الزرعي مولر هنتون. وتركت لمدة 30 دقيقة في درجة الغرفة بعدها عمل حفر في الوسط الزرعي بأستخدام ثاقب الفليني بقياس 6 ملم بواقع 4 حفر في كل طبق ووضع في كل حفرة 60 مايكروليتر من تخافيف محلول جسيمات الفضة النانونية المحضرة مسبقا .ترك الاطباق في درجة حرارة الغرفة لفترة ثم حضنها في 37 م لمدة – 24) 18 ساعة). بعدها يتم قياس منطقة التثبيط حول الحفر بالمللميتر(7)

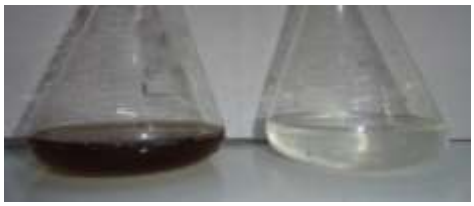
النتائج والمناقشة

تكوين الجسيمات النانوية الفضيةAgNPs

أن تكوين الجسيمات النانوية لوحظ من خلال عدد من المؤشرات وكما يلي:

التغير اللوني Visual observation

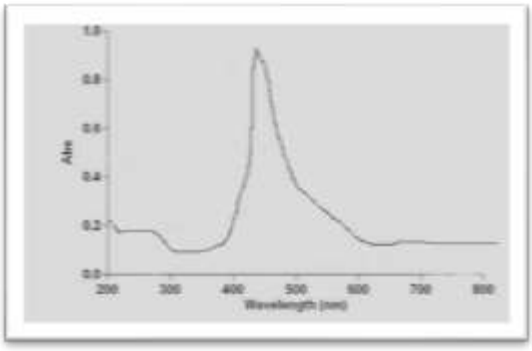
أظهرت نتائج هذه الدراسة تكون جسيمات الفضة النانوية AgNPs باستخدام خميرة *Candida albicans* الصورة (1) وذلك من خلال ملاحظة التغير اللوني الناتج عن اختزال نترات الفضة$AgNO_3$ آذ أن هذا التغير اللوني ناتج عن أثارة سطح البلازمون (أساس هذا الاهتزاز هو لمجاميع توصيل الالكترون) في جسيمات الفضة النانوية (8)



الصورة (1) التغير اللوني لمحلول نترات الفضة

طيف الامتصاصية للأشعة فوق البنفسجية والمرئية Absorption UV- light spectroscopy

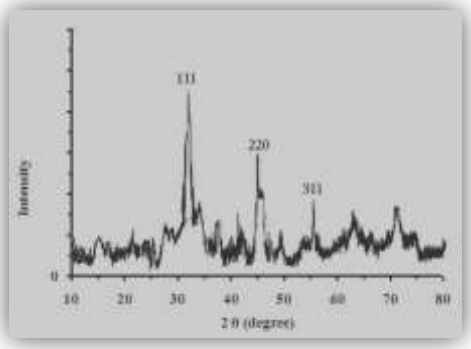
أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن قدرة الخميرة *Candida albicans* على إنتاج الجسيمات النانوية هي طريقة مهمة للكشف عن النانو إحدى التقنيات المهمة للهيكل، تظهر ذروة الامتصاص عند الطول الموجي 430 نانومتر، مما يمثل ذروة امتصاص الفضة.الشكل (1) وهذه تتفق مع باحثين اخرين (9) (10).



الشكل (1) طيف أمتصاص للأشعة فوق البنفسجية والمرئية

حيود الأشعة السينيةX-Ray Diffraction

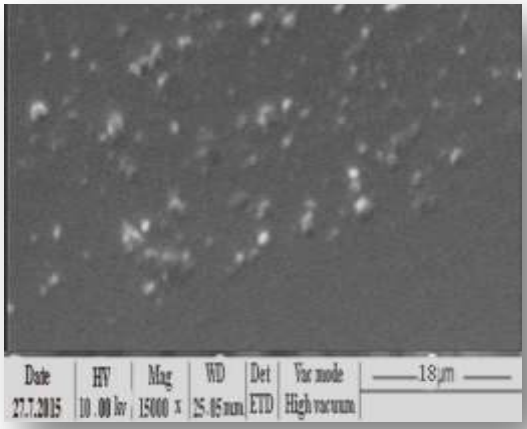
يوضح الشكل (2) طيف حيود الأشعة السينية لجسيمات الفضة النانوية (AgNPs) المحضرة باستخدام فطر*Aspergillus niger* المعزول من (المنطقة الصناعية) r، ونلاحظ قمم الحيود (111) و (220) و (311) عند الزوايا (32.20 و 47.34 و 55. 43) أن هذه الزوايا قريبة من تلك التي ذكرها المركز الدولي لبيانات الحيود (JCPDS) ، ومتوافقة مع الباحثين الاخرين(11)(10).

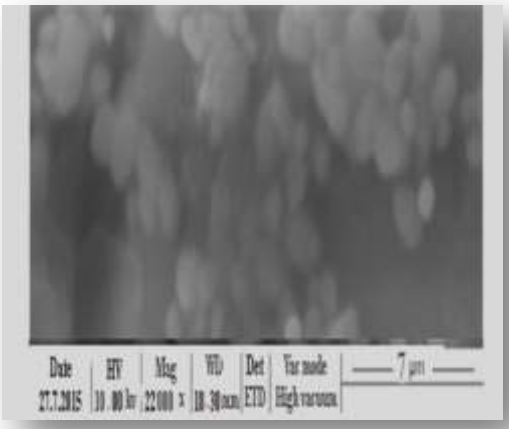


الشكل (2) طيف حيود الأشعة السينية (XRD) لجسيمات الفضة النانوية

المجهر الالكتروني الماسح Scanning electron microscopy

يبين الشكل (3) صور المجهر الاكتروني الماسح لجسيمات الفضة النانونية المتكونة بأستخدام خميرة *Candida albicans* والذي يظهر بشكل تجمعات والتي تثبت تكون جسيمات الفضة النانونية (11) (12).(3).





الشكل (3) المجهر الكتروني الماسح عند التكبير 15000X و22000X

أنواع البكترية المرضية المعزولة خلال الدراسة

أظهرت نتائج الدراسة المتعلقة بعزل البكتريا المرضية من المرضى الى تشخيص (30)عزلة وبواقع 15 عزلة لكل من *E.coli* و *P. mirabils* وتبينت بعد الفحص المجهري والزرع المختبري والاختبارات البيوكيميائية ونظام -20E API فقد كانت متطابقة كما ورد في انظمة الخصائص الجرثومية.

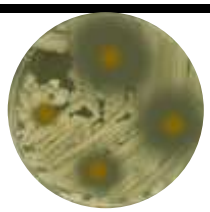
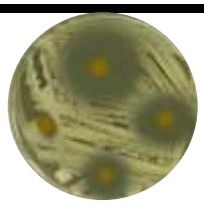
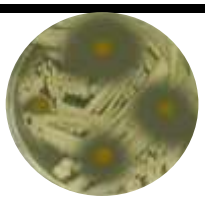
تأثيرجسيمات الفضة النانوية AgNPsعلى بعض البكتريا المرضية

تبين من خلال الدراسة أن لجسيمات الفضة النانوية المنتجة من الخميرة لها فعالية عالية على البكتريا *P. mirbilis* وكما موضح بالجدول (3) اذ عند التركيز100% بلغ قطر التثبيط (32,33,33,) ملم ضد الثلاث عزلات ذات المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية وعند تخفيف 50% بلغ قطر التثبيط (20,21,20,) ملم. في حين عنده تخفيف35% بلغ قطر التثبيط (5,6,5) وأيضا على بكتريا *E.coli* الجدول (4) اذ عند تخفيف 100% بلغ قطر التثبيط (35,35,34,و35) وعند تخفيف 50% بلغ قطر التثبيط (21,17,23,) من العزلات (3) و(5) و(9) على التوالي في حين عنده تخفيف35% بلغ قطر التثبيط (8,8,8) وأن لصغر حجم الدقائق النانونية ومساحتها السطحية الكبيرة حيث كلما صغر الحجم تجمعت بأعداد أكبر على سطح الخلايا مما يؤدي الى زيادة سميتها للكائنات الدقيقة من خلال تأثيرها على نفاذية الغشاء البلازمي للبكتريا وبالتالي موت الخلية(14) (13)

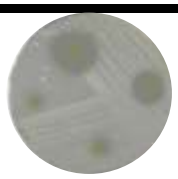
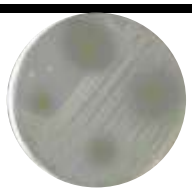
ان الالية التي يتم فيها تفاعل الدقائق النانونية مع الخلايا البكتيرية هي أن الكائنات الدقيقة تحمل شحنات سالبة بينما الاكاسيد المعدنية النانونية تحمل شحنة موجبة مما يخلق تجاذبا كهرومغناطيسيا بين البكتريا وسطح الدقائق وأن الدقائق النانونية تطلق الايونات التي تتفاعل مع مجموعة الثايول (-SH) للبروتينات الناقلة للمواد الغذائية التي تبرز من غشاء الخلية البكتيرية مما ويخفض نفاذية الغشاء وبالتالي موت الخلية (15).

ان ميكانيكية تثبيط AgNPs قابليةDNA على التضاعف والتعبير الجيني للبروتينات وكذلك مختلف البروتينات الخلوية والانزيمات الضرورية في انتاج ATP لذلك تصبح غير فعالة (16) وتهاجم AgNPs سطح غشاء الخلية وتعطل عملية النفاذية ووظائف التنفس في الخلية أو تتداخل مع مكونات نظام النقل الاكتروني للبكتريا (18)(*17*).

الجدول (3) تأثير للجسيمات النانونية بتراكيز مختلفة على *P. mirbilis*

تركيز اجسيمات النانونية المنتج من Candida albicans	عزلات *P.mirbilis* المقاومة		
	قطر منطقة التثبيط لعزلة رقم 4 (mm)	قطر منطقة التثبيط لعزلة رقم 11 (mm)	قطر منطقة التثبيط لعزلة رقم 13 (mm)
100	32	33	33
50	20	20	21
35	5	6	5
25	0	0	0
التأثير التثبيطي لجسيمات الفضة النانونية المحضرة بأستخدام Candida albicans			

الجدول (4)تأثير للجسيمات النانونية بتراكيز مختلفة على *E.coli*

تركيز اجسيمات النانونية المنتج من Candida albicans %	عزلات *E.coli* المقاومة		
	قطر منطقة التثبيط لعزلة رقم 3 (mm)	قطر منطقة التثبيط لعزلة رقم 5 (mm)	قطر منطقة التثبيط لعزلة رقم 9 (mm)
100	34	35	35
50	21	23	17
35	8	8	8
25	0	0	1
التأثير التثبيطي لجسيمات الفضة النانونية المحضرة بأستخدام Candida albicans			

المصادر

1. Buzea C, Pacheco I, Robbie K. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. Biointerphases, 2007;2(4): 17-71.
2. Abdul Hameed M. Nanoparticles as alternative to pesticides in management plant diseass- A review. Int J Sci Res Pub 2012;2(4):1-4.

3. Durán N, Marcato PD, Alves OL, Souza GI, Esposito E. Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. J Nanobiotechnology. 2005 Jul 13;3:8.

4. Karbasian M, Atyabi SM, Siyadat SD, Momen SB, Norouzian D. Optimizing Nano-silver Formation by *Fusarium oxisporum* PTCC 5115 Employing Response Surface Methodology. Am J Agri Biol Sci 2008;.3(1):433-437.

5- Monica C. District Laboratory Practice in Tropical Countries .part 2.2th. P. 63-71, 2009.

6- Brown AE. Benson`s Microbiological Applications Laboratory Manual in General Microbiology. 10th ed., P. 102-263. McGraw-Hill Comp. Inc., USA (2007).

7-Vandepitte J, Engback K, Piot P, Heuck G. Basic Laboratory Procedures in Clinical Bacteriology. WHO Switzerland (1991).

8- Verma VC, Kharwar RN, Gange AC. Biosynthesis of antimicrobial silver nanoparticles by the endophytic fungus *Aspergillus clavatus*. Nanomedicine 2010;5:33-40.

9- Vigneshwaran N, Ashtaputre NM, Varadarajan PV, Nachane RP, Paralikar KM, Balasubramanya RH. Biological synthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus flavus*. Materials Letters 2007;61: 1413–1418.

10- Pavani KV, Kumar NS, Sangameswaran BB. Synthesis of lead nanoparticles by Aspergillus species. Pol J Microbiol. 2012;61(1):61-3.

11- Gopinath V, Velusamy P. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using *Bacillus* sp. GP-23 and evaluation of their antifungal activity towards *Fusarium oxysporum*. Spectrochim. Acta A 106:170-174(2013)

12- Ashe B. A detail investigation to observe the effect zinc oxide and silver nanoparticales in biology system. M.Sci thesis. National Institute of Technology. India..(2011)

13- Lin X, Li J, Ma S, Liu G, Yang K, et al. Toxicity of TiO2 Nanoparticles to *Escherichia coli*: Effects of Particle Size, Crystal Phase and Water Chemistry. PLOS ONE 2014;9(10): e110247.

14- Sondi I, Salopek-Sondi B. Silver Nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. J Colloid Interface Sci, 2004;275:177–182.

15- Zhang H, Chen G. Potent Antibacterial Activities of Ag/TiO2 Nan composite Powders Synthesized by a One-Pot Sol-Gel Method. Environ Sci Technol, 2009;43(8): 2905-2910.
16- Yamanaka MK, Hara T, Kudo J. Bactericidal actions of a silver ion solution on *Escherichia coli* studied by energy filtering transmission electron microscopy and proteomic analysis. Applied and Environmental Microbiology, 2005;71:7589.
17- Percival SL, Bowler PG, Russell D. Bacterial resistance to silver in wound care. J Hospital Infect, 2005;60: 1.
18- Sharma VK, Yngard RA, Lin Y. Silver: Green synthesis and their antimicrobial activities. Adv Colloid Interface Sci 2009; 145:83.

Effect of Silver Nanoparticles Prepared by Using *Candida albicans* Yeast in Some Bacteria

Hussein Abdulrazaq Abod, Open Education College, Kirkuk Education Authority, Kirkuk, Iraq.
Email: dr.hussenalsaadi@yahoo.com
ORCID: https://orcid.org/0009-0002-1355-0928
Akram Mudhir Karim, Open Education College, Kirkuk Education Authority, Kirkuk, Iraq. Email: akramaljubouri@uokirkuk.edu.iq

Isolate of *Candida albicans* was obtained from Kirkuk General Hospital. It was used to study its ability to prepare silver nanoparticles, and it was found that the silver nitrate solution in 1 mm changed its color to brown, which is a preliminary evidence for the formation of silver nanoparticles. The absorption spectrum of ultraviolet and visible rays of a solution of silver nanoparticles was studied as a second step in ascertaining the formation of particles and it was found that they are located at the wavelength (430) nm. 31.77, 46.11, and 57.21), respectively. The particles also appeared as clear particles in the scanning electron microscope images. It was found that the solution of silver nanoparticles had a clear inhibitory effect on two types of bacteria, *E.coli* and *P. mirabilis*, which amounted to (33,33,32) mm against E.coli bacteria at a concentration of 100% and (5.6,5 mm) against three *E.coli* isolates and was (35,35,34) mm at a concentration of 100% against *P. Mirabilis*