

تأثير دقائق الفضة النانوية المحضرة باستخدام 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 التربية 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 النانوية 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 الإلكتروني الماسح. تبين أن محلول جسيمات الفضة النانوية ذات تأثير تثبيطي واضح على نوعين من البكتريا *E.coli* و *P. mirabilis* والتي بلغت (33,33,32) ملم ضد البكتريا *E.coli* عند تركيز 100% 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 أيضاً 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 أكتله 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 الزجاج بهدوء وبناية 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 ورق 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 نوع Memmert (Germany) عند درجة حرارة 50 م بعدها قم بقياس الوزن الجاف للفطر بفارق الوزنين كتلة الورقة المجففة مع محتوياتها بعد الترشيح وكتلة ورقة الترشيح وهي مجففة قبل الترشيح. وزن 10 غم من الكتلة الفطرية ثم وضعها في 100 مل من محلول نترات الفضة $AgNO_3$ المحضرة بتركيز 1mM ووضعها في الحاضنة في ظروف مظلمة تمامًا وبعد التغير اللوني تم فحص جزيئات AgNPs باستخدام 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 الإلكتروني الماسح -TESCAN) SEM(Scanning Electron Microscopy) (VEGA) في الجامعة التكنولوجية مركز أبحاث النانو.

جمع العينات السريرية

تم الحصول على عينات البكتيريا من النماذج السريرية المأخوذة من المراجعين والراقدين في مستشفيات مدينة كركوك. إذ زرعت العينات على وسطي أكار الدم وأكار الماكونكي وحضنت في 37°م لمدة 18-24 ساعة. بعدها نقل عدد من المستعمرات المفردة إلى وسط الأكار

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

الفحوصات الكيموحيوية

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

تحضير تخافيف من الجسيمات النانوية

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 بتركيز 100%.

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 7.5 مل من الماء المقطر ليصبح تركيز 25%.

دراسة تأثير الجسيمات النانوية على البكتريا المرضية

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

النتائج والمناقشة

تكوين الجسيمات النانوية الفضية AgNPs

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

التغير اللوني Visual observation

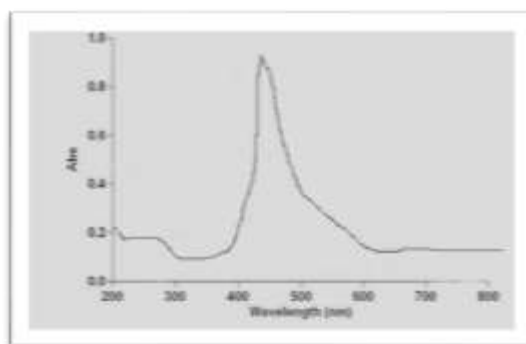
أظهرت نتائج هذه الدراسة تكون جسيمات الفضة النانوية AgNPs باستخدام خميرة *Candida albicans* الصورة (1) وذلك من خلال ملاحظة التغير اللوني الناتج عن اختزال نترات الفضة $AgNO_3$ إذ أن هذا التغير اللوني ناتج عن إثارة سطح البلازمون (أساس هذا الاهتزاز هو لمجاميع توصيل الالكترون) في جسيمات الفضة النانوية (8)



الصورة (1) التغير اللوني لمحلول نترات الفضة

طيف الامتصاصية للأشعة فوق البنفسجية والمرئية Absorption UV- light spectroscopy

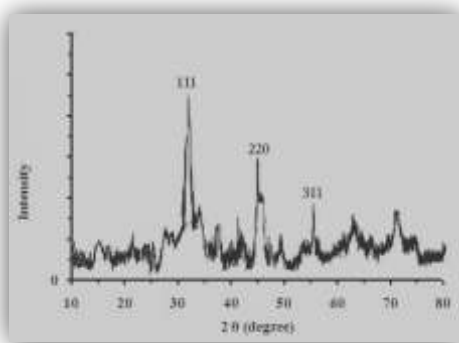
أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن قدرة الخميرة *Candida albicans* على إنتاج الجسيمات النانوية هي طريقة مهمة للكشف عن النانو إحدى التقنيات المهمة للهيكلة، تظهر ذروة الامتصاص عند الطول الموجي 430 نانومتر، مما يمثل ذروة امتصاص الفضة. الشكل (1) وهذه تتفق مع باحثين آخرين (9) (10).



الشكل (1) طيف امتصاص للأشعة فوق البنفسجية والمرئية

حيود الأشعة السينية X-Ray Diffraction

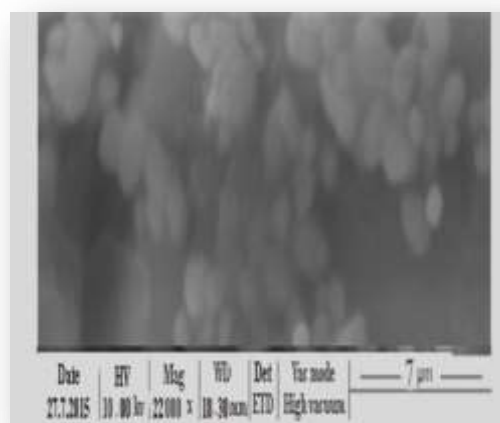
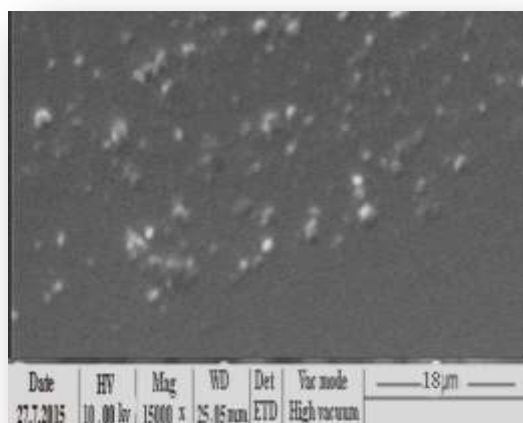
يوضح الشكل (2) طيف حيود الأشعة السينية لجسيمات الفضة النانوية (AgNPs) المحضرة باستخدام فطر *Aspergillus niger* المعزول من (المنطقة الصناعية) r، ونلاحظ قمم الحيود (111) و (220) و (311) عند الزوايا (32.20 و 47.34 و 43.55) أن هذه الزوايا قريبة من تلك التي ذكرها المركز الدولي لبيانات الحيود (JCPDS)، ومتوافقة مع الباحثين الآخرين (11)(10).



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

المجهر الالكتروني الماسح Scanning electron microscopy

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



الشكل (3) المجهر الالكتروني الماسح عند التكبير 15000X و 22000X

أنواع البكتيرية المرضية المعزولة خلال الدراسة

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

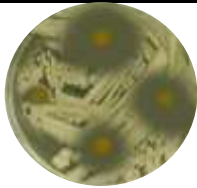
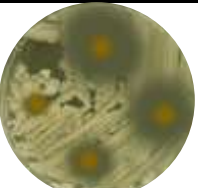
تأثير جسيمات الفضة النانوية AgNPs على بعض البكتيريا المرضية

تبين من الدراسة أن لجسيمات الفضة النانوية المنتجة من الخميرة لها فعالية عالية على البكتيريا *P. mirabilis* وكما موضح بالجدول (3) اذ عند التركيز 100% 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 تخفيف 35% بلغ قطر التثبيط (5,6,5) وأيضا على بكتيريا *E.coli* الجدول (4) اذ عند تخفيف 100% بلغ قطر التثبيط (35,35,34) وعند تخفيف 50% بلغ قطر التثبيط (21,17,23,) من العزلات (3) و(5) و(9) على التوالي في حين عنده تخفيف 35% بلغ قطر التثبيط (8,8,8) وأن لصغر حجم الدقائق النانوية 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 للبكتيريا وبالتالي موت الخلية (14) (13)

ان الآلية التي يتم فيها تفاعل الدقائق النانوية مع الخلايا البكتيرية هي أن الكائنات الدقيقة تحمل شحنات سالبة بينما الاكاسيد المعدنية النانوية تحمل شحنة موجبة مما يخلق تجاذبا كهرومغناطيسيا بين البكتيريا و سطح الدقائق وأن الدقائق النانوية 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 قابلية DNA 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 الالكتروني للبكتيريا (18)(17).

الجدول (3) تأثير للجسيمات النانوية بتركيز مختلفة على *P. mirabilis*

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

الجدول (4) تأثير للجسيمات النانوية بتركيز مختلفة على *E.coli*

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

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 disease- 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 oxysporum* 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, Paralikal 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 Nanocomposite 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.