

تأثير الدقائق النانوية للفضة واوكسيد الزنك على بعض من سلالات النوع *staphylococcus aureus* المتعددة المقاومة للمضادات الحيوية وملاحظتها بالمجهر الالكتروني الماسح

بيمان علي كريم¹ ، اسراء غانم السماك²

¹قسم صناعات الغذائية ، كلية الزراعة ، جامعة صلاح الدين ، اربيل ، العراق

²قسم علوم الحياة ، كلية العلوم ، جامعة الموصل ، الموصل ، العراق

الملخص

جمعت 156 عينة شملت: التهاب المجاري البولية، مسحات الجروح والقيح من المرضى الوافدين الى مستشفى رزكاري التعليمي وروزناوا في مدينة اربيل من اذار الى ايلول 2013، نقيت وأكد تشخيص (42) سلالة منها تعود للنوع *Staphylococcus aureus* ونسبة (26.9%) اعتماداً على الصفات الشكلية والزربية والأختبارات الكيموحيوية منها اختبار APi-staph. قدرت حساسية هذه السلالات تجاه 12 نوع من المضادات الحيوية. اعطت الانواع مقاومة عالية ضد Ampicillin بتركيز (AM/10µg) بنسبة (88%) وكانت نسبة مقاومته لمضاد Amoxicillin (AX/25µg) هي (81%) وسجلت اقل نسب مقاومة تجاه المضادات: (CIP/5µg) Ciprofloxacin، (NF/300µg) Nitrofurantoin، (GM/10µg) Gentamicin كالتالي (31,26,21,4)% على التوالي. اختيرت (10) سلالات ذات مقاومة عالية للمضادات وحدد التركيز المثبط الأدنى (MIC) تجاه المضادات قيد الدراسة اضافة الى نوعين من الدقائق النانوية هما دقائق الفضة النانوية و أوكسيد الزنك النانوي باحجام مختلفة (Ag20,90nm و ZnO20,30,50~150nm)، اظهرت النتائج بأن MIC للفضة بحجم 20nm بين (2600-650) مايكروغرام/ مل بينما للAg90nm بين (2600-325) مايكروغرام/ مل و MIC للZnO20nm بين (2600-325) مايكروغرام/ مل و MIC للZnO بحجمه 30nm بين (2600-162.5) مايكروغرام/ مل. كما تم التحري عن تأثير مزج المضادات الحيوية مع الدقائق النانوية، وأظهرت تأثير تآزري بينهما وفعالية جيدة في تثبيط النمو البكتيري خاصة للسلالات المقاومة للمضادات الحيوية. كما ظهر تغيير واستطالة في شكل الخلايا البكتيرية المعاملة بالدقائق النانوية من خلال ملاحظتها بالمجهر الضوئي والالكتروني الماسح كما حصل ضغط على سطح الخلية وتسرب محتويات الخلية البكتيرية الى الخارج.

الكلمات الدالة: *Staphylococcus aureus* ، المقاومة المتعددة تجاه المضادات ، دقائق الفضة النانوية، اوكسيد الزنك النانوي، المجهر الالكتروني الماسح.

المقدمة

تملك مواصفات كهربائية ومغناطيسية تختلف بدرجة مهمة عن الجسيمات كبيرة الحجم لنفس المركبات [3]. يمكن الحصول على الجسيمات النانوية المعدنية بالطرائق الحيوية والفيزيائية والكيميائية اذ أن هناك أنواع عدة من البكتيريا والفطريات لها القدرة على إنتاج الجسيمات النانوية المعدنية ذات خصائص ضد أحيائية مجهرية [4].

عرف منذ القدم أن للفضة ومركباتها تأثيرات مختلفة ضد الاحياء المجهرية والفايروسات ويعود ذلك لصغر حجم دقائقها التي تقل عن 5 نانومتر والتي تعمل على زيادة المساحة السطحية وبه يؤدي الى توليد نزعة للهجرة الى السطح الخارجي للدقائق النانوية وزيادة النشاط الكيميائي لها وزيادة انتاج الاوكسجين المتفاعل بضمنها تكوين الجذور الحرة free radicals [5,6] كما ان للدقائق الفضة النانوية قدرة على اجتياز الاغشية الحية كالجلد المصاب بالاكزيما والحرروق والوصول الى مجرى الدم مؤدية الى زيادة الجهد التأكسدي oxidative stress وانتاج السايوتوكينات cytokines والالتهاب واخيراً موت الخلية [7,8]. كما وتعد اكاسيد الزنك النانوية من أشهر أكاسيد المعادن التي تمتلك العديد من الخصائص واهمها خصائص شبه الموصل والنشاط المضاد للأحياء المجهرية والذي حاز على اهتمام كبير كعلاج [9].

تعد بكتريا المكورات العنقودية الذهبية من أهم مسببات المرضية الجهازية والموضعية، وأن السلالات المرضية الشائعة منها هي غالباً ما تكون مقاومة لمضاد الميثيسيلين، ولوحظ أن أغلب هذه السلالات هي أيضاً مقاومة لمضادات أخرى وذلك نظراً لامتلاكها بلازميدات مقاومة أو عناصر قافزة، وقد أمست هذه الجراثيم مشكلة أساسية في معالجة أمراض معدية وخاصة في الإنسان [1]. لذا أسترعى ذلك اهتمام الكثير من الباحثين في ايجاد طرق بديلة لمعالجة هذه الانواع البكتيرية منها استخدام الأجسام النانوية. وقد أشارت دراسات الى إن إضافة مضادات حيوية إلى هذه الجسيمات النانوية قد أظهر تأثيراً تآزري ضد البكتيريا، حيث أظهر استخدام الجسيمات لوحدها كبح لنمو 40% منها، و قد ارتفعت النسبة كثيراً مع إضافة المضادات الحيوية [2].

تعرف الدقائق النانوية Nanoparticles بأنها تلك الفئة المتميزة من المواد الدقيقة التي يمكن انتاجها بحيث تتراوح مقاييس أبعادها او ابعاد حبيباتها بين 1-100 نانومتر، وقد ادى صغر احجام ومقاييس تلك المواد الى ان تسلك سلوكاً مغايراً للمواد التقليدية كبيرة الحجم التي تزيد ابعادها على 100 نانومتر هذا يعني ان الجسيمات بالحجم النانوي

- اضيف للحفرة رقم 11 المرق والمعلق البكتيري فقط واعد سيطرة موجبة.
- الحفرة 12 اصبح سيطرة سالبة حاوي فقط على المرق والمضاد .
- اضيف الى الصف B مضاد اخر وهكذا بالنسبة للصفوف الاخرى.
- غطى الطبق وحضن في درجة (37)° لمدة (18-24) ساعة.
- فحص وجود النمو بالاعتماد على العين المجردة من خلال ملاحظة عكورة و صفو الوسط، وثم ملاحظة التركيز المثبط الأدنى للمضاد MIC.
- اما بالنسبة الى الدقائق النانوية استعملت نفس الطريقة السابقة باستخدام تركيز 5200 مايكروغرام / مل تركيز أولي تبدأ منه سلسلة التخفيف والذي تمت اضافته الى الحفرة رقم 1 من الصف A وبهذا نحصل على التراكيب التالية
(2600,1300,650,325,162.5,81.25,40.6,20.3,10.15,5.07 مايكروغرام/ مل).
- كما قدر التأثير التأزري لكل من دقائق الفضة و اوكسيد الزنك على مدى مع المضادات الحيوية وذلك بأضافة 50 مايكروليتر من الدقائق بتركيزها المثبط الأدنى الخاص بها مع 50 مايكروليتر من المضادات بتركيز المثبط الخاص بها الى الحفر وبقطر 5 ملم بعد تلقيح سطح الاطباق بالانواع النقية قيد الدراسة وحضنت الاطباق في درجة 37° لمدة 24 ساعة وقدر اقطار التثبيط حول الحفر مقاسة (بالملم) وكررت العملية مرتين واخذ المعدل [16].
- فحصت التغيرات الشكلية للخلايا البكتيرية باستخدام المجهر الضوئي باخذ قطرة من المعلق البكتيري المحضر من التراكيب المثبطة تحت الدنيا (SubMIC) لكل من جزئيات الفضة واوكسيد الزنك النانوية باحجامها المختلفة ونشرت على شريحة زجاجية نظيفة ومعقمة , تركت لتجف, ثبتت بالنار ثم صبغت بصبغة كرام وفحصت بالمجهر الضوئي [17] اما المجهر الالكتروني الماسح حيث اتبعت الطرق الاتية [18,19]:-
- 1. اخذت 100 مايكروليتر من المعلق البكتيري التي حضرت من التراكيب المثبطة تحت الدنيا (SubMIC) لكل من جزئيات الفضة واوكسيد الزنك النانوية باحجامها المختلفة حيث ثبتت ب 100 مايكروليتر من الفورمالين بتركيز 10% في محلول دارى فوسفات (PH7.4) لمدة 10 دقائق.
- 2. اخذ ملء لوب من الخليط السابق (الخطوة الاولى) ووضعت على شريحة الزجاجية وتركزت تجف لمدة 40 دقيقة.
- 3. غطت الشريحة بالذهب.
- 4. ثم وضعت على حامل للمجهر الالكتروني وبقوة تكبير العالي حيث فحصت في هيئة كوردستان للدراسات الاستراتيجية و البحوث العلمية / مدينة السلیمانیة والتقطت لها الصور .

أن هدف الدراسة الحالية هو التحري عن نسبة انتشار افراد النوع *Staphylococcus aureus* المتعددة المقاومة للمضادات الحيوية والمسببة للعديد من الامراض، وتقدير مدى تأثير الدقائق النانوية عليها واستخدامها كبداية او كمساعد للعلاج بالمضادات الحيوية ومتابعة التغيرات الشكلية الناجمة عن تعرض البكتيريا للدقائق النانوية باستخدام المجهر الالكتروني الماسح.

المواد وطرائق العمل

جمعت (156) عينة من المرضى الوافدين الى مستشفى زركاري وروزناوا في مدينة اربيل للفترة من آذار لغاية ايلول سنة 2013 اذ شملت العينات التهاب المجاري البولية ، مسحات الجروح و القيح. تم عزل وشخصت افراد النوع *staphylococcus aureus* من العينات المختلفة وفقا لما جاء في [10,11] اعتماداً على الصفات الشكلية والزرعية والكيموحيوية منها API staph المجهر من شركة BioMerieux وحسب مواصفاتها [12].

اجري فحص الحساسية باستخدام طريقة الانتشار بالاقراص للمضادات الحيوية اذ استخدم لذلك (12) نوعاً من المضادات الحيوية Ampicillin (AM/10µg), Amoxicillin (AX/25µg), Gentamicin (GM/10µg), Erythromycin (E/15µg), Ciprofloxacin (CIP/5µg), Chloramphenicol (C/30µg), Cefotaxime (CTX/30µg), Nitrofurantoin (NF/300µg), Co-Trimoxazole (COT/25µg), Cephalothin (KF/30µg), Doxycycline (DO/30µg), Ceftriaxone (CRO/30µg) وباستخدام وسط مولر-هنتون الصلب اذ حضنت الاوساط في درجة 37 °م ولمدة 18 ساعة. قورنت النتائج مع ما ورد من قياسات عالمية حسب ما جاء به [13].

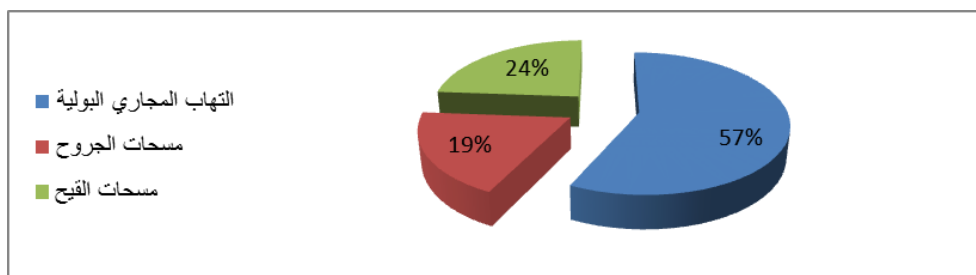
استخدمت طريقة التخفيف بالمرق للتقدير الكمي لتوضيح تأثير فعالية المضادات الحيوية والدقائق النانوية المجهزة بأحجامها المختلفة من شركة M K Impex Corp في كندا. حيث استعملت طريقة microtiter plate وباستخدام 96 حفرة، واجريت اعتماداً على طريقة [14,15] كالآتي:-

- اضيف 100 مايكروليتر من مرق هنتون الى كل حفرة.
- اضيف 100 مايكروليتر من المضاد المحضر مسبقاً بتركيز 1024 مايكروغرام لكل مل الى الحفرة رقم 1 من الصف A. مزج المضاد من خلال حركته الى اعلى واسفل 6-8 مرات وهذا جعل المخفف بتركيز ضعف اي يعادل 512 مايكرو غرام/ مل.
- نقل 100 مايكروليتر من الحفرة 1 الى الحفرة 2 ومزج بنفس الحركة وهكذا اصبح المخفف بتركيز 256 مايكروغرام/ مل.
- كررت العملية وصولاً الى الحفرة رقم 10 وبعدها سحب منه 100 مايكروليتر واهمل وبهذا نحصل على تراكيب (1,2,4,8,16,32,64,128,256,512) مايكروغرام/ مل.
- اضيف 5 مايكروليتر من المعلق البكتيري وبعمق (24) ساعة الى كل الحفر .

النتائج والمناقشة

المجاري البولية بنسبة (57.1%). اختلفت نسب العزل من دراسة إلى أخرى وقد يعود السبب في ذلك إلى الاختلاف في وقت جمع العينات وحسب موقع الإصابة.

يبين الشكل (1) النسبة المئوية للنوع *Staphylococcus aureus* المعزولة من مصادر سريرية مختلفة وسيادة 24 عزلة من التهاب



الشكل (1) يبين النسبة المئوية للنوع *Staphylococcus aureus* المعزولة من مصادر المختلفة

شخصت العزلات اعتماداً على بعض الصفات الشكلية والزرعية *Staph. aureus* والمبين في الجدول (1) وأكد التشخيص اعتماداً والأختبارات الكيموحيوية للمستعمرات الى (42) عزلة تابعة للنوع على API- Staph كما موضحة في الصورة (1).

الجدول (1) إختبارات التحري الاولى عن افراد النوع *Staphylococcus aureus* قيد الدراسة

Test	Result	%	Test	Result	%
Gram stain	+	100	Indole	+	100
Catalase	+	100	Manitol fermentation	+	97.6
Oxidase	-	100	Citrate	-	100
Coagulase	+	100	Urease	+	92.8
DNase	+	95.2	Voges proskour	-	95.2



الصورة (1) API-Staph لبكتريا *S.aureus*

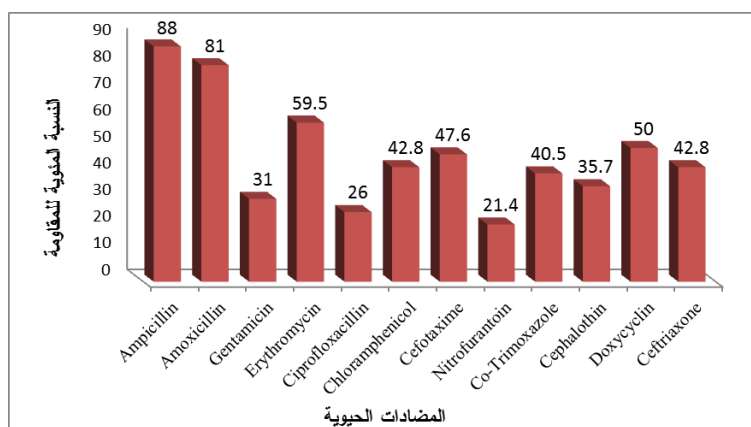
S.aureus المعزولة من مصادر سريرية مختلفة اذ اظهرت مقاومة عالية بلغت اكثر من 90%. اما بالنسبة لمضادات المجموعة الامينوكلايوسيدية Gentamicin فقد كانت نسبة الحساسية لها 31%. وقد يعزى سبب مقاومة البكتريا لمضادات الامينوكلايوسيدات الامينية غالباً الى انتاجها للأنزيمات المحورة للكلايوسيدات الامينية Amino glycosides Modifying Enzymes ويحدث التعطيل الأنزيمي للمضاد من خلال عمليات Adenylation, Phosphorylation, Acetylation او حدوث طفرة كروموسومية في الجين المشفر للبروتين الهدف في الوحدة الريبوسومية الثانوية 30S مسببة بذلك فقدان المضاد ألفته للارتباط بالبروتين الهدف وتقليل نفاذية الخلية البكتيرية للمضاد [23].

اما بالنسبة لمضادات مجموعة الماكروليدات المتمثلة بمضاد Erythromycin فقد أظهرت العزلات نسبة مقاومة 59.5%, والذي يكون تأثيره المثبط لنمو البكتريا من خلال تثبيط تخليق البروتين البكتيري من خلال ارتباطه ببروتينات الوحدة الريبوسومية 50S, إذ

درست حساسية البكتريا المعزولة تجاه 12 مضاداً من خلال قياس منطقة قطر التثبيط ومقارنة النتائج مع ما ورد في [13] أظهرت النتائج في الشكل (2) ان هناك تبايناً في مقاومة العزلات قيد الدراسة تجاه المضادات المستخدمة حيث اظهرت بكتريا *S.aureus* مقاومة عالية لكل من مضاد AM/10 µg, AX/25 µg اذ بلغت نسبة المقاومة 88%, 81% على التوالي. كما أظهرت مقاومة لمضادات السيفالوسبورينات أذ أعطت مقاومة منخفضة لمضاد Cephalothin بنسبة 35.7% كونه من مضادات الجيل الاول اما مضادي Cefotaxime, Ceftriaxone فقد وجدت نسبة مقاومة 47.6%, 42.8% على التوالي تجاههما اذ يمثلان الجيل الثالث , فقد اشار كل من [20,21] الى وجود ثلاث آليات مهمة تستطيع من خلالها بكتريا *S.aureus* مقاومة مضادات البيتا لآكتام فضلاً عن عملية انتاج البيتا لآكتاميز وتتفق هذه النتيجة مع نتائج العديد من الدراسات على هذه البكتريا التي اكدت مقاومتها للعديد من مضادات الحيوية منها دراسة اجريت من قبل [22] على عزلات بكتريا

الذي يعمل عليه هذا المضاد [25]، أما مضادات Fluoroquinolones التي تضم مضاد Ciprofloxacin بلغت مقاومة العزلات له بنسبة 26% الذي يعمل على تغيير في GyrA الذي يعد من الوحدات البنائية لانزيم DNA gyrase [26]. كما قاوم النوع *Staph.aureus* بنسبة 21.4% لمضاد Nitrofurantoin.

يعد هذا المضاد فعالاً ضد معظم البكتيريا الموجبة لصبغة كرام. فقد أظهر هذا المضاد فعالية كبيرة ضد بكتيريا *Staphylococci* [24]، أما مضاد Chloramphenicol فكانت العزلات مقاومة له بنسبة 42.8% نتيجة تحطيم الدواء بواسطة انزيم *acetyl transferase*. أما مقاومة لمضاد Co-Trimoxazole بنسبة 40.5% قد يكون سببه حدوث طفرات وراثية تؤثر في المسار الابيض



الشكل (2) نسب مقاومة عزلات النوع *Staph.aureus* تجاه المضادات الحيوية قيد الدراسة

16) مكغم/مل كما أظهرت (5) عزلات مقاومة ضد Chloramphenicol أذ تراوحت قيم MIC ما بين (32-64) مكغم/مل، في حين أظهرت (9) عزلات مقاومة ضد Ciprofloxacin أذ تراوحت قيم MIC ما بين (4-32) مكغم/مل. أما بالنسبة لمضاد Cefotaxime فقد استطاعت (4) عزلات من أصل 10 عزلات مقاومة المضاد بتركيز (512-64) مكغم/مل كما أظهرت (7) عزلات مقاومة ضد Cephalothin أذ تراوحت قيم MIC ما بين (32-256) مكغم/مل بينما أظهرت كل عزلات النوع *S.aureus* حساسية تجاه Nitrofurantoin و Ceftriaxone ماعدا عزلة واحدة أذ أظهرت المقاومة تجاه Ceftriaxone بتركيز 512 مكغم/مل.

تم تحديد التركيز المثبط الأدنى MIC للمضادات الحيوية المدروسة حيث اعتمدت نقطة التوقف (Break point) الموصوفة من قبل [13] كأساس لحساب الاستجابة والمقارنة مع *Staph.aureus* ATCC 25923. حيث أظهرت النتائج الموضحة في الجدول (2) بأن جميع عزلات النوع *Staph.aureus* قيد الدراسة أبدت مقاومة للـ Ampicillin، Amoxicillin، Co-Trimoxazole أذ تراوحت قيم MIC ما بين (8-512) مكغم/مل بينما أظهرت العزلات المقاومة للمضادات Erythromycin، Gentamicin قيم MIC ما بين (16-512) مكغم/مل. أما بالنسبة لمضاد Doxycycline فقد استطاعت 3 (عزلات من أصل 10 عزلات) مقاومة المضاد بتركيز (4-64)

الجدول (2) التركيز المثبط الأدنى MIC (مايكروغرام/مل) للمضادات الحيوية المختلفة ضد عزلات النوع *S.aureus*

Staph.aureus ATCC 25923	S10	S9	S8	S7	S6	S5	S4	S3	S2	S1	*نقاط التوقف ملغم/لتر	رقم العزلة
	(مايكروغرام/مل)											المضادات الحيوية
0.25	128	8	128	64	128	64	32	512	128	128	0.5≤	Ampicillin
0.25	32	16	256	128	512	32	64	64	128	512	0.5≤	Amoxicillin
0.25	16	16	32	256	128	32	32	64	64	512	16≤	Gentamicin
0.5	32	16	512	128	256	64	32	64	128	512	8≤	Erythromycin
0.5	32	32	4	4	16	32	4	2	16	8	4≤	Ciprofloxacin
1	32	1	1	8	32	8	32	32	8	64	32≤	Chloramphenicol
2	128	4	32	16	8	64	32	128	32	512	64≤	Cefotaxime
1	32	8	16	1	8	8	4	16	4	32	128≤	Nitrofurantoin
2	256	512	128	64	256	512	128	128	512	512	4≤	Co-Trimoxazole
2	256	32	128	16	32	128	32	64	8	16	32≤	Cephalothin
0.25	1	2	2	16	64	2	1	1	16	2	16≤	Doxycycline
0.5	4	4	2	8	16	4	8	2	32	512	64≤	Ceftriaxone

* معتمدة على CLSI, 2011

بالنسبة MIC لـ (ZnO-NP) ذوات الأحجام 30 nm 50~150 nm فكان بين (162.5-2600) مكغم/مل، إن تأثير أكسيد الزنك النانوية على بكتريا *S.aureus* يتم من خلال زيادة إنتاج الأوكسجين النشط مثل H_2O_2 بعد التصاقه بسطح الغشاء الخلوي مما يؤدي الى تغيير في السلسلة التنفسية وكما تتفاعل مع انزيمات السلسلة التنفسية للبكتريا وبالتالي موت الخلية [28]. وهذه النتائج تتفق مع ما ذكره كل من الباحث [29,30].

الجدول (3) يبين تحديد التركيز المثبط الأدنى MIC للدقائق النانوية أذ أعطت دقائق الفضة النانوية (Ag-NP) ذات حجم 20nm تركيزاً قيمتها النهائي بتركيز بين (2600-650) مكغم/مل اما (Ag-NP) ذات حجم 90nm أعطت قيم MIC تراوحت بين (2600-325) مكغم/مل، حيث أن الفعالية ضد أحيائية لدقائق الفضة النانوية ضد بكتريا *Staph.aureus* تتم من خلال زيادة إنتاج الاوكسجين المتفاعل بضمنها تكوين الجذور الحرة free radicals [27].

اما التركيز المثبط الأدنى MIC لدقائق اوكسيد الزنك النانوي (ZnO-NP) ذي الحجم 20nm فكان ما بين (2600-325) مكغم/مل أما

الجدول (3) التركيز المثبط الأدنى MIC للدقائق النانوية قيد الدراسة ضد عزلات النوع *Staph.aureus*

S10	S9	S8	S7	S6	S5	S4	S3	S2	S1	العزلات البكتيرية الدقائق النانوية	
										MIC (µg/ml)	
1300	1300	1300	650	650	2600	2600	2600	1300	650	20nm	Ag
1300	2600	1300	2600	2600	1300	650	2600	1300	325	90nm	Ag
1300	2600	650	1300	1300	325	650	650	1300	2600	20nm	ZnO
1300	2600	325	650	650	2600	1300	325	650	162.5	30nm	ZnO
2600	2600	162.5	1300	1300	2600	1300	650	325	650	50~150nm	ZnO

لصبغة الكرام. وذكر ايضا [32] في دراستهم زيادة فعالية كل من Chloramphenicol وGentamicin عند مزجهم مع الفضة النانوية ضد بكتريا (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli*). وفي الآونة الاخيرة ذكر [33] أن المضادات الحيوية أظهرت تأثيراً تآزرياً مع أوكسيد الزنك النانوي ضد البكتريا المقاومة لأنزيمات بيتا لاكتاميز الواسعة الطيف لأخماج المجاري البولية واقترحوا بأن الجمع بين اوكسيد الزنك النانوي والمضادات الحيوية يزيد من نفاذية الغشاء الخلوي البكتيري وبالتالي يؤدي الى تسرب البروتين عبر الغشاء.

يبين الجدول (4) تأثير العلاقة بين المضادات الحيوية المستخدمة قيد الدراسة والدقائق النانوية على بكتريا النوع *Staph.aureus* عند مزجها معاً بطريقة الحفر (well-diffusion method) حيث أظهرت النتائج بأن معدل قطر منطقة التثبيط ازدادت عند مزج المضادات مع الدقائق النانوية وباحجامها المختلفة بسبب زيادة نسبة السطح الى حجم الدقائق مما يسمح لها بالتفاعل مع المضادات الحيوية، وأشار [10] الى أن صغر حجم الدقائق تمكنها من اختراق الخلايا البكتيرية.

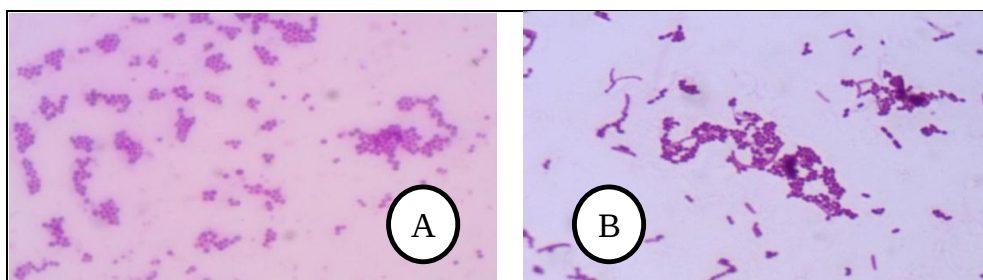
أكد [31] بأن نشاط Ampicillin و Amoxyclov يزيداد بزيادة تركيز الفضة النانوية ويؤدي الى تثبيط نمو البكتريا الموجبة والسالبة

الجدول(4) تأثير المزج بين المضادات الحيوية والدقائق النانوية على النوع *S.aureus*

تأثير الدقائق النانوية لوحدها (ملم)					تأثير المضاد مع الدقائق النانوية (ملم)					تأثير المضاد لوحده	المضادات الحيوية
ZnO50	ZnO30	ZnO20	Ag90	Ag20	المضاد + ZnO50	المضاد + ZnO30	المضاد + ZnO20	المضاد + Ag90	المضاد + Ag20		
10	8	11	0	8	15	13	14	12	13	0	Am
					12	12	13	9	10	0	AX
					15	17	19	16	18	12	GM
					22	21	20	22	20	0	E
					16	17	19	23	25	20	CIP
					17	16	17	16	17	10	C
					20	17	20	19	20	14	CTX
					15	18	18	17	20	15	NF
					12	10	10	11	12	0	COT
					20	22	23	18	20	11	KF
					11	18	15	16	15	13	DO
					18	20	20	13	15	12	CRO

الخلايا للبكتريا عند معاملتها بالدقائق النانوية حيث يظهر تغير في ترتيب الخلايا للنوع *Staph.aureus* بحيث اصبحت منفردة مع استئالة بعض الخلايا.

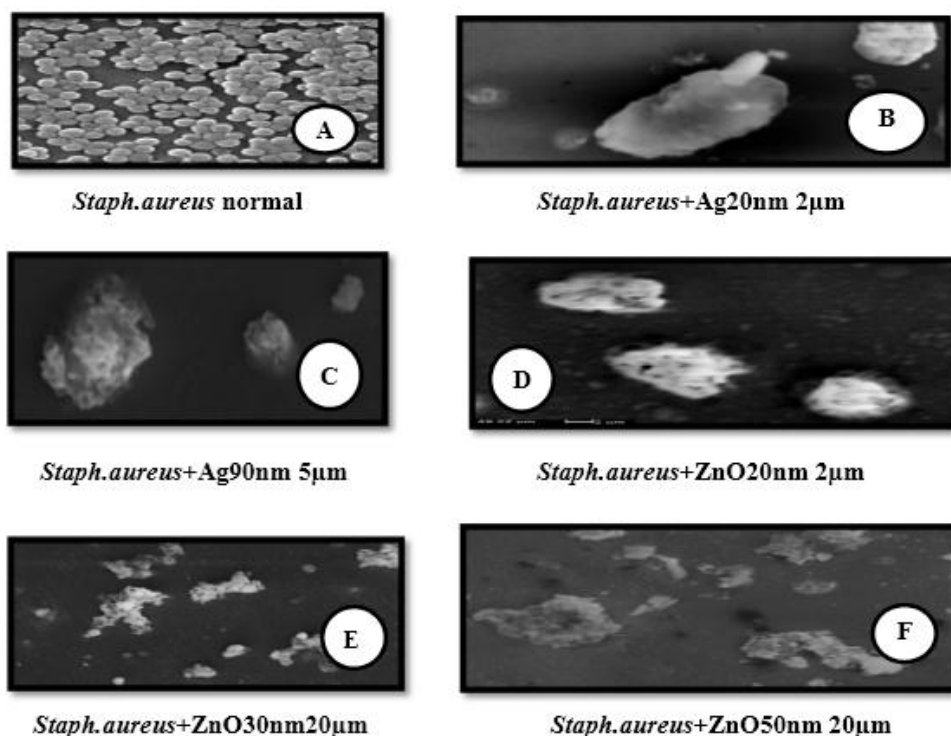
توضح الصورة (2-A) شكل الخلايا للبكتريا عند ملاحظتها بالمجهر الضوئي قبل معاملتها بالدقائق النانوية حيث تظهر خلايا النوع *Staph.aureus* كروية متجمعة بشكل عنقود أما (2-B) فتتمثل شكل



الصورة (2) A-شكل الخلايا للبكتريا بالمجهر الضوئي قبل معاملتها بالدقائق النانوية B - شكل الخلايا للبكتريا بالمجهر الضوئي بعد معاملتها بالدقائق النانوية.

سطح الخلية البكتيرية قد تعرض للضرر وتسرب المحتويات الخلوية للخارج وهذه النتائج تتفق مع ما ذكره كل من (34,27) .

الصورة (3) شكل الخلايا للنوع *S.aureus* قبل وبعد معاملتها بدقائق النانوية عند ملاحظتها بالمجهر الالكتروني الماسح حيث تبين ان



الصورة (3) التغيرات الشكلية للنوع *Staph.aureus* عند تعرضه للدقائق النانوية باستخدام المجهر الالكتروني الماسح (A) خلايا بكتريا الطبيعية (B) عند قوة التكبير 27314X، (C) عند 24839X، (D) عند 826671X، (E) عند 6119X، (F) عند 6238X .

الألكتروني في تأكيد التغيرات الشكلية الحاصلة للبكتريا والناجمة عن تأثير الدقائق النانوية على الخلايا البكتيرية بعد ملاحظتها بالمجهر الضوئي.

الاستنتاجات

كفاءة أكسيد الزنك النانوي في التأثير ضد ميكروبي على بكتريا *S. aureus* المقاومة للمضادات الحيوية مقارنة بالفضة النانوية المستخدمة في الدراسة. كما تشير الدراسة الى أهمية المجهر

المصادر

1. R. M. Atlase, A. E. Brown and L. C. Parks. Laboratory Manual of Experimental Microbiology. Mosby-Year Book, Inc., St. Louis. (1995).p:563.
2. A.M. Fayaz, K. Balaji, M. Girilal, R. Yadav, P.T. Kalaichelvan, R. Venketesan. Biogenic

synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria. Nanomedicine. (2010). vol. 6(1): 103–109.

3. A. Dowling, R. Clift, N. Grobert, D. Hutton, R. Oliver, O. O'Neill, J. Pethica, J. Porritt, J. Ryan, A. Seaton, S. Tendler, M. Welland and R. Whatmore. Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties. The Royal Society & the Royal Academy of Engineering, Latimer Trend Ltd, Plymouth, UK. (2004).pp (112).
4. N. Duran, P. Marcato, R. Conti, O. Alves, F. Costa, M. Brocchi. Potential use of silver nanoparticles on pathogenic bacteria, their toxicity and possible mechanisms of action. J. Braz. Chem. Soc. (2010). 21 (6):949-959.
5. S. Silver. Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. FEMS Microbial Rev., (2003) 27:341–353
6. C.N. Lok, C.M. Ho, R. Chen, Q.Y. He, W.Y. Yu, H. Sun, P.K. Tam, J.F. Chiu, C.M. Chen. Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. J. Proteome Res, (2006). 5:916–924
7. J.S. Kim, E. Kuk, K.N. Yu, J. Kim, S.J. Park, H.J. Lee, S.H. Kim, Y.K. Park, C.Y. Hwang, Y.K. Kim, Y. Lee, D.H. Jeong and M. Cho. Antibacterial effects of silver nanoparticles. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine, (2007) 3: 95-100.
8. اياد محمد علي فاضل العبيدي. التقنية الحياتية النانوية وتطبيقاتها المتقدمة في الطب والهندسة الوراثية وعلم الاحياء الجزيئي. الطبعة الاولى، دار الكتب والوثائق في بغداد. (2012) ص:224.
9. C. Wang, L. Liu, A. Zhang, P. Xie, J. Lu and X. Zou. Antibacterial effects of zinc oxide nanoparticles on *Escherichia coli* K88. African. Journal of Biotechnology, (2012). 11(44): 10248-10254.
10. S. H. Gillespie and P. M. Hawkey. Principles and Practice of Clinical Bacteriology. 2nd ed., John Wiley and Sons, Ltd. England. (2006).P:457.
11. W. Winn, S. Allen, W. Janda, E. Koneman, G. Procop and P. Schreckemberger *et al.* Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 6th ed., Lippincott Williams and Wilkins, U.S.A. (2006). pp.318-321.
12. L. C. Parks, A. E. Brown and R. M. Atlas. Laboratory Manual of Experimental Microbiology, Mosby-Year Book, Inc., U.S.A. (1995).
13. CLSI, (Clinical & Laboratory Standards institute). Performance Standard for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty -first Informational Supplement. M100-S21. (2011). 31 (1):1-163.
14. D. Amsterdam. Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media. In: Loman V., ed. Antibiotics in Laboratory Medicine, 4th ed. Williams and Wilkins, Baltimore, MD. (1996). p.52-111.
15. R. Saginur, M.S. Denis, W. Ferris, S.D. Aaron, F. Chan, C. Lee and K. Ramotar. Multiple combination bactericidal testing of *Staphylococcal* Biofilms from implant-associated infections. *Antimicrobial Agents Chemother*, (2006). 50(1): 55-61.
16. فاطمة إبراهيم سلطان الدليمي. التأثير التثبيطي لمستخلصات بعض النباتات الطبية والتأزر بين مكوناتها الفعالة والمضادات الحيوية *Staphylococcus aureus* و *Salmonella typhimurium* في جرثومتي *aureus* المعزولتين من حالات التسمم الغذائي (2006). رسالة ماجستير. كلية التربية. جامعة الموصل، العراق.
17. P. Liu, W. Duan, Q. Wang and X. Li. The Damage of outer membrane of *Escherichia coli* in the presence of TiO₂ combined with UV Light. *Colloids and Surfaces B: Bio interfaces* (2010) 78:171-176..
18. S. AL-Bahry, N. Sivakumar and M. AL-Khambashi. Effect of Nalidixic acid on the morphology and protein expression of *Pseudomonas aeruginosa*. *Asian pacific J. of typical Medicine*, (2012). 6: 265-269.
19. R.K.F. Al-Taesh and W.M. Ra'oof. Scanning electron microscope of disinfections exposed *Pseudomonas aeruginosa* isolated from different types of infections. *International Journal of Technical Research and Applications*, (2014). 2(3):75-79.
20. E. Jawetz, G.F. Brook, J.S. Butel and S.A. Mores. Jawetz, Melnick and Adelberg's Medical Microbiology. (2001) 22th.ed. Appelton and Land, New York.
21. K.J. Ryan and C. R. George. Sherris Medical Microbiology: an introduction to infectious disease. 4th Ed. The McGraw-Hill Companies. (2004). New York.
22. B. Bozodogan, L. Ednie, K. Credito, K. Kosowska and P.C. Appelbaum. Derivatives of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* strain isolated at Hershey medical center. *American Society for Microbiology*, (2004). 48 (12): 4762-4765.
23. W. Levinson and E. Jawetz. Medical Microbiology & Immunology. Examination & Board Review. (2000) 6th ed., McGraw–Hill, International Editions. Health Profession Series.
24. K. Todar. *Staphylococcus*. Todar's on line textbook of Bacteriology. Wisconsin University. U.S.A. (2005).
25. A. Reipert, K. Ehlert, T. Kast and G. Bierbaum. Morphological and genetic differences in two isogonic *Staphylococcus aureus* strains with decreased susceptibilities to vancomycin. *J. Antimicrob. Agents Chemother*. (2003). 47(2): 568-576.
26. A.C. Fluit, M.R. Visser and F.J. Schmitz. Molecular detection of antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews* (2001). Oct.836-871
27. S. Kim, H. Lee, D. Ryu, S. Choi and D. Lee. Antibacterial activity of Silver-nanoparticles against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Korean J. Microbial Biotechnology*, (2011) 39(1): 77–85.
28. C. Vani, G. K. Sergin and A. Annamalai. A Study on the effect of Zinc Oxide nanoparticles in *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, (2007). 2(4):326-335.
29. O. Yamamoto. Influence of particle size on the antibacterial activity of zinc oxide. *Int. J. Inorg. Mater*, (2001). 3: 643–646.

30. N. Jones, B. Ray, K.T. Ranjit and A.C. Manna. Antibacterial activity of ZnO Nanoparticles suspensions on a broad spectrum of microorganisms, *FEMS Microbiol Letters*, (2008). 279(1): 71-76.
31. N. Hari, T.K. Thomas and A.J. Nair .Comparative Study on the Synergistic Action of Garlic Synthesized and Citrate Capped Silver Nanoparticles with β -Penem Antibiotics. Hindawi Publishing Corporation, ISRN Nanotechnology, Article ID 792105, (2013). 6 pages.
32. S.P. Dhas, A. Mukherjee and N. Chandrasekaran. Synergistic effect of biogenic silver nanocolloid in combination with antibiotics: a potent therapeutic

agent. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, (2013). 5(1): 292–295.
33. R.M. Bhande, C.N. Khobragade, R.S. Mane, and S. Bhande. Enhanced synergism of antibiotics with zinc oxide nanoparticles against extended spectrum β -lactamase producers implicated in urinary tract infections. *J Nanoparticle Res.*, (2013). 15:1-13.
34. W. K. Jung, H. C. Koo, K. W. Kim, S. Shin, S. H. Kim, and Y. H. Park .Antibacterial activity and mechanism of action of the Silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* , (2008). 74(7), 2171-2178.

The Effect of silver and zinc oxide nanoparticles on *Staphylococcus aureus* isolates multi resistant to antibiotics and observed by Scanning electron microscopy

Payman A. Kareem¹, Essra Gh. Alsammak²

¹ Food Industry Department , College of Agriculture , Salahaddin University , Arbil , Iraq

² Dept. of Biology , College of Sciences , Mosul University , Mosul , Mosul , Iraq

Payman_ali2006@yahoo.com, essra_alsammak@yahoo.com

Abstract

One hundred fifty six samples collected included: inflammation of the urinary tract, swabs wounds and pus from patients coming to Rizgary Teaching Hospital and Rozhawa Hospital in Erbil city from March to September 2013, scrubbed and confirmed the diagnosis (42) strain which belongs to staphylococcus aureus and by (26.9%) based on cultural characteristics, microscopically features and biochemical tests in addition to the API Staph. These strains sensitivity to 12 types of antibiotics. It gave the species a high resistance against the Ampicillin (AM / 10 μ g) by 88% and resistant to Amoxicillin (AX / 25 μ g) by (81%) were less resistant to Nitrofurantoin (NF / 300 μ g), Ciprofloxacin (CIP / 5 μ g), Gentamicin (GM / 10 μ g) by (31,26,21.4%) respectively Ten isolates were selected according to their pattern of the highest resistance as these showing multi-drug resistances and tested to specify their minimum inhibitory concentration (MIC) for the antibiotics and two types of Nanoparticles include Silver in different sizes (20, 90)nm and Zinc Oxide in different sizes (20, 30, 50~150)nm. The results showed that the MIC for Ag 20 nm was between (650-2600) μ g/ml while Ag90nm was between (325 -2600) μ g/ml and the MIC for ZnO20nm between (325-2600) μ g/ml and MIC of ZnO 30, 50 ~ 150nm between (162.5-2600) μ g/ml. Synergism effect between the antibiotics and the Nanoparticles when they integrate increased their effect of *Staphylococcus aureus*. Morphological changes of bacteria found using light and scanning electron microscope (SEM) when treating with Nanoparticles. While there a pressure on the bacterial cell surface with losing of bacterial compound.

Key words: staphylococcus aureus, multi-resistant to antibiotics, silver nanoparticles, zinc oxide and scanning electron microscopy.