

تأثير دقائق الفضة النانوية المحضرة باستخدام أنواع من الستربتومايسس على بعض البكتيريا المرضية

حسين عبد الرزاق عبود¹، خليل إبراهيم بندر¹، صلاح سلمان زين العابدين²

¹قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة تكريت، تكريت، العراق

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

الملخص

تم الحصول على عزلتين من البكتيريا الخيطية من منطقة الحي الصناعي في مدينة كركوك وتمثلت بالنوعين *Streptomyces hygroscopicus* و *Streptomyces parvulus*. تم استخدام النوعين من البكتيريا الخيطية لدراسة قابليتها على تحضير دقائق الفضة النانوية وتبين أن محلول نترات الفضة في 1 mM يتبدل لونه من اللون الرمادي الفاتح الى اللون البني والذي يعتبر دليل أولي على تكوين دقائق الفضة النانوية. درست طيف امتصاص الأشعة البنفسجية والمرئية لمحلول جسيمات الفضة النانوية كخطوة ثانية في التأكد من تكوين الجسيمات وتبين أنها تقع على الطول الموجي (400) نانومتر لبكتيريا *Streptomyces parvulus* كما تبين أن قمم حيود الأشعة السينية كانت عند (111-200-311) وعند الزوايا (31.73 و 48.70 و 58.30). كما ظهرت الجسيمات بشكل دقائق واضحة في صور المجهر الإلكتروني الماسح أما بكتيريا *Streptomyces hygroscopicus* فقد كان الطول الموجي 280 نانومتر. تبين أن محلول جسيمات الفضة النانوية ذات تأثير تثبيطي واضح على نوعين من البكتيريا *Escherichia coli* و *Proteus mirabilis* ذات المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية والتي بلغت (27,27,29) ملم ضد البكتيريا *Escherichia coli* عند تركيز 100% وكانت (30,30,29) ملم عند التركيز 100% ضد *Proteus mirabilis*.

المقدمة

من نفاذية المضادات الحيوية وغيرها من الآليات الأخرى أو مكتسبة ناتجة من تغير في الجينات أو اكتساب جينات مقاومة إذ تصبح البكتيريا الحساسة مقاومة لها [7].

ومن هنا برزت الحاجة الى تصنيع دقائق نانوية بواسطة أحياء مجهرية مختلفة والتي تعتبر مصنع نانوني أحيائي Bionanofabrication بسبب قدرتها الهائلة على إنتاج الدقائق النانوية لأنواع مختلفة من المعادن ومنها الفضة والذهب وأكسيد الزنك وغيرها والتي أستخدمت في مجالات حيوية عديدة ومختلفة ووجد الجسيمات النانوية الفضية لها فعالية عالية مضادة لبكتيريا والفطريات المرضية [8] ونتيجة لما تقدم فقد هدفت الدراسة الى :-

عزل وتشخيص البكتيريا الخيطية من تربة منطقة الحي الصناعي في مدينة كركوك ثم اختبار قدرة هذه البكتيريا على إنتاج الدقائق النانوية Nanoparticles وذلك من خلال ملاحظة حدوث التغير اللوني وفحص الـ UV وأجراء فحص الـ X-Ray و SEM. والتحرري عن نسبة أنتشار الانواع البكتيرية المتعددة المقاومة للمضادات الحيوية والمسببة لأمراض عديدة من مصادر سريرية مختلفة إضافة الى دراسة تأثير الدقائق النانوية على البكتيريا المقاومة للمضادات الحيوية.

المواد وطرق العمل

تم جمع عينات مختلفة من التربة من منطقة الحي الصناعي من مدينة كركوك عوملت التربة مسبقاً بمادة كاربونات الكالسيوم CaCO_3 بنسبة 10 : 1 وزن/وزن وحضنت في الحاضنة بدرجة حرارة 37°م ولمدة 4 أيام لغرض التجفيف بعد انتهاء فترة التحضين تم عمل معلق من التربة باستعمال محلول رنجرالمعقم وحضر منه سلسلة من التخفيف العشرية الى حد 10^{-4} ثم اخذ 0.5 من التخفيف 10^{-3} و 10^{-4} ، ووضع في

يمكن القول أن المواد النانوية هي تلك الفئة المتميزة من المواد المتقدمة التي يمكن إنتاجها بحيث تتراوح مقاييس أبعادها أو أبعاد حبيباتها الداخلية بين 1 نانومتر و 100 نانومتر وقد أدى صغر هذه المواد أن تختلف صفاتها عن المواد الأكبر حجماً (أكبر من 100 نانومتر) وتعد هذه المواد ركن مهم من أركان علم التكنولوجيا. وتتوزع المواد النانوية من حيث المصدر وتختلف باختلاف نسبها كأن تكون مواد عضوية أو غير عضوية طبيعية أو مخلقة (مصنعة). وتتضمن تقنية النانو معالجة وأيجاد دقائق بمواصفات دقيقة يسمح أيضاً بإيجاد مواد مبتكرة تعمل بكفاءة أعلى وتجز مهام جديدة وهذا يعتمد على المواصفات النوعية التي تميز الدقائق النانوية على المواد الأكبر حجماً وذات نفس التركيب الكيميائي [1] و [2] ويمكن الحصول على الدقائق النانوية بالطرق الحيوية والكيميائية من بكتيريا وفطريات لها القدرة على إنتاج الدقائق نانوية معدنية ذات خصائص المضادة للحياة المجهرية [3] و [4]. تتميز الاكتينومييسيتات بأنها أحياء رمية وهي مسؤولة عن رائحة الأرض بسبب إنتاجها لمادة geosmin، وتعتبر التربة موطن تسكن فيه العديد من الأحياء المجهرية والتي تعتبر كجزء أساسي مكمل في التربة، ان اول موطن ممكن ان نجد فيه الاكتينومييسيتات هو التربة و توجد بمدى واسع في الطبيعة [5] و [6].

اثبتت الدراسات في الآونة الأخيرة من القرن العشرين قدرة البكتيريا على اكتساب صفة المقاومة للمضادات الحيوية وهذا مؤشر واضح عن تطوير البكتيريا آليات عدة مكنتها من المقاومة و أن الاستخدام المفرط للمضادات الحيوية وبشكل غير صحيح أدى الى زيادة مقاومة الجراثيم الى تلك المضادات والتي في سابق كانت حساسة لها مما أدى الى ظهور سلالات أمتازت بكونها متعددة المقاومة (Multiresistant) والمقاومة أما تكون طبيعياً كأمتلاكها غشاء خارجي يعمل كحاجز يقلل

التركيز الأول : يحوي على المحلول الاول المطلق بعد مزج الراشح البكتيري وأعتبر بتركيز 100 %.

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

التركيز الثالث : حضر بأضافة 3.5 مل من المحلول الاول في 6.5 مل من الماء المقطر المعقم وليصبح التركيز 35 %.

التركيز الرابع : حضر بأضافة 2.5 مل من المحلول الاول في 7.5 مل من الماء المقطر المعقم وليصبح التركيز 25 %.

جمع العينات السريرية

جمعت العينات السريرية من مستشفى ازادي التعليمي ومستشفى الاطفال والنسائية ومستشفى كركوك العام في مدينة كركوك من المرضى المراجعين والراقدن في المستشفيات المذكورة ومن ثم زرعت العينات على وسط اكارالدم (Blood Agar) ووسط أكارالماكونكي (MacConkey's Agar) وحضنت المزارع الجرثومية بدرجة حرارة (37) °م لمدة (18-24) ساعة، بعدها نقلت المستعمرات المعزولة والنقية إلى وسط الاكارالغذائي المائل (Nutrient Agar Slant) وبعد تحضينها حفظت بدرجة حرارة (4) °م لحين استخدامها لإجراء الاختبارات التشخيصية .

الفحوصات الكيموحيوية

لغرض تشخيص العزلات البكتيرية أجريت الفحوصات الكيموحيوية المختلفة مثل إختبارات الاوكسيديز Oxidase والكاتلاز Catalase وفحص قابلية البكتريا على الحركة وقابلية البكتريا لانتاج حلقة الاندول Indol production واختبار اليوريا وقابلية البكتريا على استهلاك السترات اختبار الميثيل الأحمر Methyl Red Test وأيضا تم تشخيص البكتريا باستخدام عدة التشخيص Api20E لغرض التشخيص النهائي استخدمت عدة التشخيص المجهزة من قبل شركة Biomerieux الفرنسية وهي تحتوي على 20 فحص كيموحيوي وهي معتمدة من قبل منظمة الصحة العالمية ،أجري هذا الاختبار حسب تعليمات الشركة المصنعة [14]و[15].

فحص الحساسية للمضادات الحيوية

أجري فحص اختبار حساسية بكتريا *Escherichia coli* و *Protus mirabilis* للمضادات الحيوية استخدمت طريقة أنتشار الأقراص (Disk diffusion test) وحسب ما جاء في [16] و [17] أظهرت حساسية الجراثيم لـ 14 نوع من المضادات الحيوية المجهزة من شركة Oxide، وذلك بتلقيح وسط المرق المغذي Nutrient broth بـ 4-5 مستعمرات نقية من الجراثيم قيد الدراسة، وحضنت المزارع الجرثومية بدرجة 37°م لمدة 14 - 18 ساعة، ثم خفف العالق الجرثومي باستخدام المحلول المحلي الفسلجي للمقارنة مع أنبوبة السيطرة القياسية (محلول ماكفرلاند) والذي يعادل 10^8 خلية / سم³ بعدها غمرت المسحة القطنية المعقمة (Cotton swab) في اللقاح ونشرت على سطح وسط مولر - هنتون ، تركت الأطباق بدرجة حرارة الغرفة لمدة 30 دقيقة، ثم ثبتت الأقراص الخاصة بالمضادات الحيوية المستخدمة بالدراسة بواسطة

أطباق زرع معقمة ثم اضيف لكل طبق 20 مل تقريبا من وسط آغار مستخلص الخميرة والكليسيروول (GYEA) الذائب في درجة 45 - 50°م ودورت الأطباق بهدوء لمزج المكونات وحضنت بالحاضنة في درجة حرارة 28 °م لمدة (7-14) يوم لحين ظهور نمو مستعمرات الاكتينومييسيتات، بعدها تم نقل المستعمرات المنتخبة والتي كانت ذات مظهر اما شمعي او طباشيري او جلدي من المجموع الزرعي الى اطباق حاوية على الوسط الزرعي آغار مستخلص الخميرة والكليسيروول (GYEA) ثم حضنت في درجة حرارة 28°م ولمدة 7 ايام وبعد الحصول على عزلات نقية تم الاحتفاظ بها لحين اجراء الاختبارات التشخيصية [9]و[10].

التشخيص

شخصت عزلات البكتريا الخيطية اعتماداً على شكل ولون وطبيعة المستعمرات وكذلك على الرائحة المميزة لها باستعمال تقنية الزرع على الشريحة الزجاجية slide وانتاج صبغة الميلانين على وسط (PYEIA) واجراء الاختبارات الكيموحيوية على العزلات الجرثومية كافة وحسب ما ذكره [11]و[12]

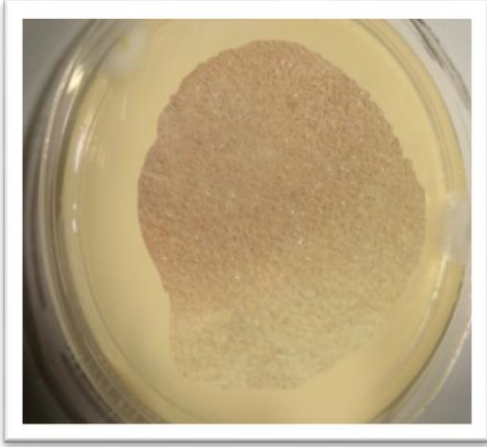
تحضير الكتلة الحيوية للبكتريا الخيطية وتكوين الجسيمات النانوية الفضية

تم تحضير كتلة للبكتريا الخيطية عن طريق تلقیح وسط MYPG السائل في ورق مخروطي حاوي 100مل بمستعمرات البكتريا الخيطية النقية النامية في الوسط الصلب باستخدام ثاقب فليني معقم بحجم 7ملم بعدها وضع في الحاضنة الهزازة بدرجة 25°م لمدة 3 ايام للحصول على الكتلة البكتيرية وبعد تكون الكتلة البكتيرية رشحت باستخدام ورق ترشيح معقمة وغسلت جيدا بالماء المقطر المعقم لإزالة بقايا الوسط بعدها وضعت الكتلة البكتيرية في ورق مخروطي حاوي على 100مل من الماء المقطر المعقم وتركت لمدة 24-72 ساعة في الحاضنة رشحت الكتلة البكتيرية مرة أخرى باستخدام ورق الترشيح المعقم بعد ذلك خلط 100مل محلول نترات الفضة AgNO₃ المحضرة بتركيز 1mM مع 50 ml من الراشح في ورق زجاجي سعة 500ml وضعت في الحاضنة في ظروف مظلمة تماما [13]. ثم بعد التغير اللوني للمحلول تم فحص تكون جزيئات AgNPs بجهاز لقياس طيف الأشعة فوق البنفسجية - المرئية (UV-visble spectrophotometer (JASCO في المركز الصحي في مدينة كركوك وطيف الأشعة السينية (shimadzu) X- Ray في مختبر قسم الفيزياء - كلية العلوم جامعة بغداد أضافة الى استخدام المجهر الالكتروني الماسح (Scanning Electron Microscopy) (TESCAN-VEGA) في الجامعة التكنولوجية مركز أبحاث النانو.

تحضير تخافيف من الجسيمات النانوية

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

يتغير شكل المستعمرة ولونها، تعد العزلات التابعة لهذه البكتريا ايضاً بطيئة النمو اذ تحتاج من 4 -14 يوم للنمو مما يؤدي الى انتشار بعض انواع البكتريا سريعة النمو الملوثة للاطباق مع البكتريا الخيطية، ان استخدام المضاد الحيوي الـ Nystatin مكنه من الحد من ظاهرة التلوث وهذا يتفق مع ماجاء به [20]و[21].



الصورة (1) بعض مستعمرات جنس الـ *Streptomyces* من العزل الاول
تبين من خلال الدراسة ان عدد من العزلات تنمو على اوساط مختلفة وبصفات مظهرية مختلفة و فمثلاً العزلة رقم 1 تنمو على وسط GYEA وتنمو ايضاً عند اعادة زرعها على نفس الوسط بينما العزلة 2 بطيئة النمو على هذا الوسط ولاحظنا ايضاً بان هناك تغيرات شكلية اثناء عزل وتشخيص هذه البكتريا وهذا يعود الى عدة عوامل منها نسبة الكوانين والساييتوسين العالية التي تبلغ 69-78% وكذلك كبر حجم المادة النووية ومن هنا تبرز الصعوبة في تشخيص الانواع وهذا ما اشار اليه الباحث [12] ، وكما موضح في الجدول (1).

الجدول (1) يبين قدرة نمو البكتريا الخيطية على اوساط متعددة ولون الكتلة السبورية

ت	الكائن	Yeast malt extract agar		Potato dextrose agar		Tyrosine agar		Trypton yeast extract agar		Glycerol Yeast Extract Agar	
		النمو	لون الكتلة السبورية	النمو	لون الكتلة السبورية	النمو	لون الكتلة السبورية	النمو	لون الكتلة السبورية	النمو	لون الكتلة السبورية
1	<i>Streptomyces</i>	+	حليبي	+	بنّي فاتح	++	ابيض	+	حليبي	++	بنّي فاتح
2	<i>Streptomyces</i>	++	رمادي	++	حليبي	+	رمادي مصفر	++	ابيض	+	رمادي فاتح

+ يمثل النمو بشكل قليل

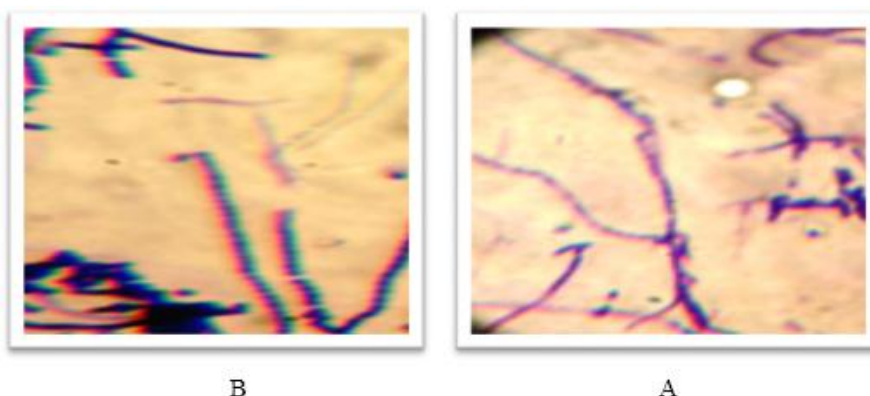
++ مثل النمو بشكل جيد جداً.

التشخيص المجهرى

كان لاستخدام هذه التقنية دوراً كبيراً ومهماً في التعرف على شكل الغزل الهوائي والارضي خاصة في العزلات التابعة الى جنس *Streptomyces*، ان افراد جنس *Streptomyces* هي كائنات هوائية موجبة لصبغة غرام وتتميز عن غيرها من الاجناس بعدم تكوينها للسبورات في الغزل الارضي [12] ان الغزل الارضي الذي

لاحظناه ومن خلال الفحص يتميز بكونه اقل سمكاً واكثر تفرعاً وشفافية من الغزل الهوائي وهذه الخلايا لا تكون السبورات في الغزل الارضي. وان نمو الغزل الارضي قد ينتج اما من خيوط متكسرة او من انبات السبورات ويسمى طور الانبات الخضري وهذا يتفق مع ماذكره [22]و[23]. فروع الغزل الارضي كانت اكثر شفافية من فروع الغزل الهوائي وان الاختلاف في تكوين الغزل الارضي والهوائي يعود

ذكره [24] وكما هو موضح في الصورة (2) وجدول (2).



الصورة (2) A- الشكل الخيطي لخلايا أنواع بكتريا الـ *Streptomyces* بقوة التكبير 40X B- الشكل الخيطي لخلايا أنواع بكتريا الـ *Streptomyces* بقوة التكبير 100X

جدول (2) بين الخصائص المجهرية لخلايا أنواع البكتريا الخيطية الـ *Streptomyces*

ت	الصفات المجهرية الكائن	Spore mass	Spore surface	Spore chain	Spore shape
1	<i>Streptomyces</i>	رمادي غامق	مشعر	حلزوني قصير	بيضوي
2	<i>Streptomyces</i>	رمادي	أملس	حلزوني طويل	اسطواني

لفحص الكتلايز وأنتاج أنزيم الليستينيز ومختزلة لنترات ولانتاج صبغة الميلانين أما عزلة *parvulus*. فكانت موجبة لفحص الاوكسيديز وأنتاج صبغة الميلانين وأختزال النترات ومستهلكة لسترات ومحلل لنشأ وأنتاج أنزيم الجيلاتينيز والليستينيز وسالب لفحص اليوريز والكتلايز وأنتاج لغاز كبريتيت الهيدروجين.

نتائج الاختبارات البايوكيميائية

وصفت العزلات فسلجيا من خلال عدد من الاختبارات الكيموحيوية كما هو موضح في الجدول (3) وكانت عزلة *S. hygroscopicus* موجبة لفحص اليوريز والاكسيديز وانزيم الجيلاتينيز ومحلل لنشأ ومستهلكة لسترات الصوديوم ومنتجة لغاز كبريتيت الهيدروجين وأيضا سالبة

جدول (3) يبين نتائج الاختبارات البايوكيميائية

ت	نتائج الاختبارات البايوكيميائية الكائن	Lecithinase	Gelatinase	Starch	Simon's citrate	Urease	Catalase	Oxidase	H ₂ S production	Nitrate reduction	Production of melanin pigment
1	<i>S. hygroscopicus</i>	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-
2	<i>S. parvulus</i>	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+

نتائج 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 دقائق الفضة النانوية AgNPs باستخدام بكتريا *S. parvulus* *hygroscopicus* الصورة (2) وذلك من خلال ملاحظة التغير اللوني الناتج عن اختزال نترات الفضة AgNO₃ باستخدام *Streptomyces* آذ أن هذا التغير اللوني ناتج عن إثارة سطح البلازمون (أساس هذا الاهتزاز هو لمجاميع توصيل الالكترون) في دقائق الفضة النانوية [25].

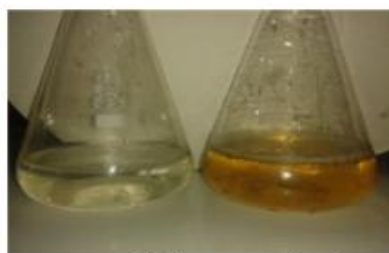
نتائج تكوين الجسيمات النانوية الفضية AgNPs

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

التغير اللوني Visual observation : أظهرت نتائج هذه الدراسة تكون دقائق الفضة النانوية AgNPs باستخدام بكتريا *S.*



(*S. parvulus*)

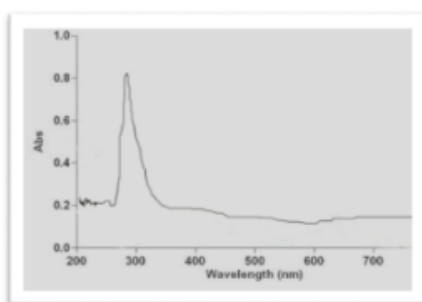


(*S. hygroscopicus*)

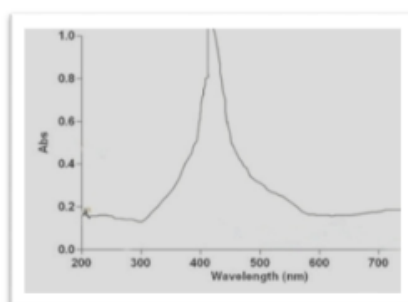
الصور (2) التغير اللوني لمحلول نترات الفضة بوجود البكتريا الخيطية المختلفة

راشح بكتريا *S. parvulus* كعامل مختزل ظهرت عند الطول الموجي 400 نانومتر كما موضحة في الشكل (1) وهذه القمة للامتصاص لوحظ أيضا من قبل باحثين آخرين أمثال [26] و [27] وعند استخدام راشح بكتريا *S. hygroscopicu* لوحظ أن قمة الامتصاص عند الطول الموجي 280 نانومتر والتي تمثل قمة الامتصاص وبما أن طيف امتصاص الاشعة البنفسجية - المرئية عند استخدام *S. parvulus* هو 400 نانومتر لذا استخدمت في التجارب اللاحقة.

طيف الامتصاصية للأشعة فوق البنفسجية والمرئية Absorption UV- light spectroscopy : اظهرت نتائج الدراسة الحالية قدرة البكتريا الخيطية على إنتاج الدقائق النانوية من خلال قياس طيف الامتصاصية للأشعة فوق البنفسجية والمرئية ضمن المدى 750- (200 نانومتر) لمحلول نترات الفضة $AgNO_3$ المستخدم لتحضير دقائق الفضة النانوية (AgNPs) والتي تعد من إحدى التقنيات المهمة لكشف التراكيب النانوية نتيجة تهيج الاهتزازات في البلازمون (الكثرون او فجوة) عند سطح المعدن ولوحظ أن قمة الامتصاص عند استخدام



S. hygroscopicus



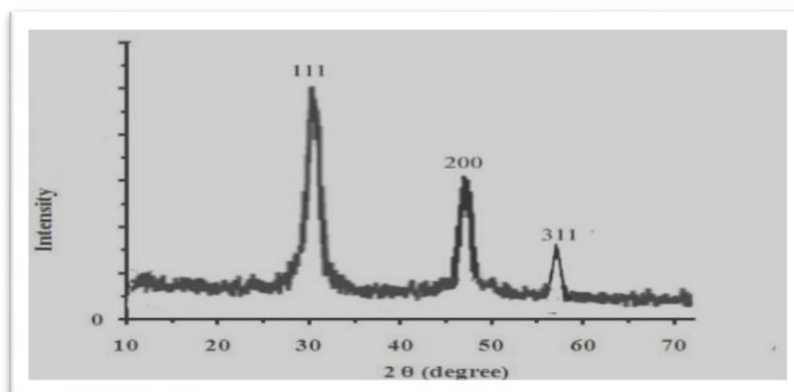
S. parvulus

الشكل (1) طيف امتصاص للأشعة فوق البنفسجية والمرئية

المذكورة مع بطاقة المركز الدولي لبيانات الحيود (JCPDS) يظهر التركيب متعدد التبلور من النوع مكعب متمركز الوجبة (FCC) ولقد وجد أن معدل حجم الدقائق النانوية باستخدام معادلة شيرر 5.5 نانومتر [26] و [28] .

حيود الأشعة السينية X-Ray Diffraction:

يبين الشكل (2) طيف حيود الاشعة السينية لجسيمات الفضة النانوية (AgNPs) المحضرة باستخدام راشح بكتريا *S. parvulus* ونلاحظ من الشكل قمم الحيود (111) و (200) و (311) عند الزوايا 31.73 و 48.70 و 58.30 على التوالي ووجد أن هذه الزوايا مقاربة للزوايا

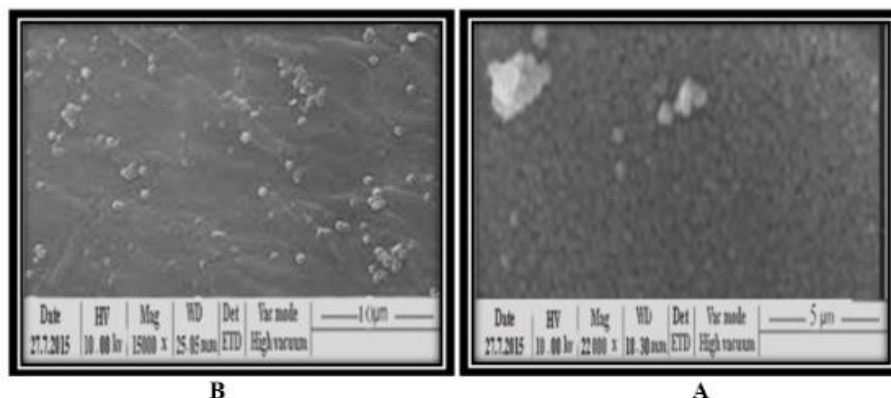


صناعي (*S. parvulus*)

الشكل (2) طيف حيود الأشعة السينية (XRD) المحضرة باستخدام راشح *S. parvulus*

الشكل (3) صور المجهر الالكتروني الماسح (SEM) لجسيمات الفضة النانوية المحضرة باستخدام بكتريا *S. parvulus* والتي أشار لاستخدامها العديد من الدراسات [28] و[29].

المجهر الالكتروني الماسح Scanning electron microscopy يمكن من خلال استخدام المجهر الالكتروني الماسح (SEM) معرفة شكل وحجم الجسيمات وتوزيعها بدقة عالية وبتكبيرات مختلفة. وتبين

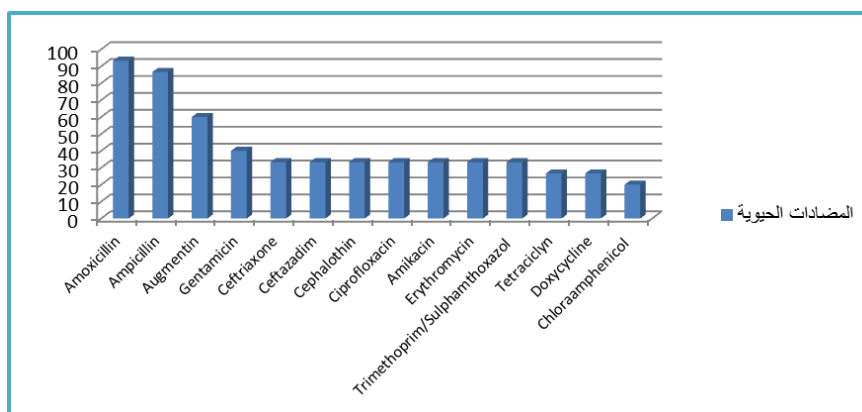


الصور (3) A - صورة المجهر الالكتروني الماسح لجسيمات الفضة النانوية (AgNPs) عند التكبير 22000X -B صورة المجهر الالكتروني الماسح لجسيمات الفضة النانوية (AgNPs) عند التكبير 15000X

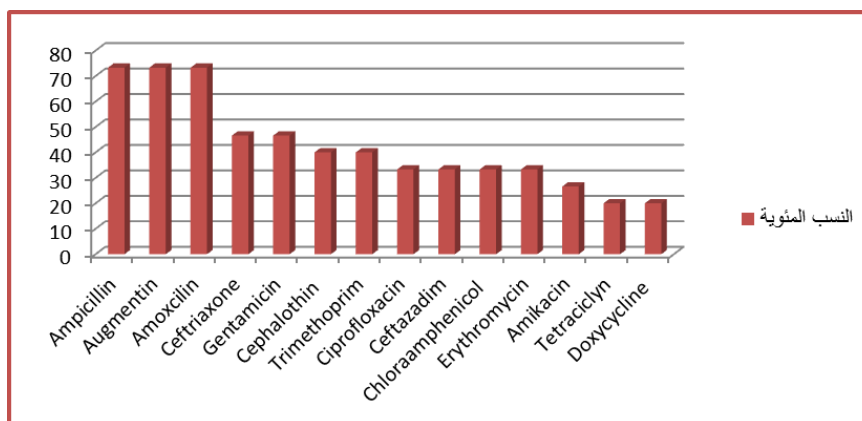
و Ampicillin و Augmentin والتي بلغت (93.3 و 86.6 و 60%) على التوالي في حين أن أقل مقاومة أظهرتها كانت تجاه المضادات الحيوية Tetracycline و Doxycycline و Chloramphenicol والتي بلغت (26.6 و 26.6 و 20%) على التوالي. في حين يتضح من الشكل (5) أن أعلى مقاومة أظهرها *Proteus mirabilis* كانت تجاه Ampicillin و Augmentin و Amoxicillin والتي بلغت 73% لكل منهم. في حين أن أقل مقاومة كانت تجاه Tetracycline و Doxycycline والتي بلغت 20% لكل منها وذلك عند مقارنة النتائج مع الجداول القياسية الواردة في [17]. أن سبب مقاومة الجراثيم لهذه المضادات الحيوية من الممكن أن يكون نتيجة التغير الحاصل في الجينات الموجودة على الكروموسومات أو نتيجة لحدوث طفرة تؤدي الى فقدان بروتينات الارتباط بالبنسلين *Penicillin Binding Proteins (PBPs)* أو فقدان النفاذية للمضادات الحيوية أو التغير *GyrA* الذي يعتبر من الوحدات الأساسية لانزيم *DNA gyrase* أو لانتاجها لانزيمات البيتا لكتاميز خاصة لمقاومة مجموعة مضادات البيتا لكتام [32] و[33] و[34].

أنواع البكتيرية 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. mirabilis* وتبينت بعد الفحص المجهرى والزرع المختبري والاختبارات البيوكيميائية ونظام API - 20E فقد كانت متطابقة كما ورد في انظمة التشخيص المعتمدة [30] و[31].

إختبار حساسية البكتريا للمضادات الحيوية بطريقة الأقراص اجري فحص الحساسية للمضادات الحيوية لعزلات جرثومة *E. coli* و *P. mirabilis* للمضادات الحيوية (Gentamicin 10 - Ciprofloxacin 5 - Amikacin 30 - Ampicillin 10 - Amoxicillin 25 - Augmentin 30 - Ceftazidim 10 - Chloramphenicol 130 - Doxycycline 10 - Cephalothin 30 - Ceftriaxone 10 Erythromycin 10 (Tetracycline 15 - Trimethoprim/Sulphamthoxazol (µg/disc) بطريقة الاقراص من خلال قياس منطقة قطر التثبيط ومقارنة النتائج مع الجداول القياسية الواردة في [17]. يبين الشكل (4) أعلى مقاومة أظهرتها *E. coli* كانت لكل من Amoxicillin



الشكل (4) يمثل النسب المئوية للمقاومة بكتريا *E. coli*



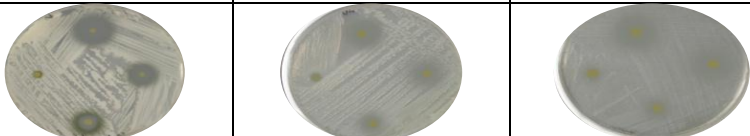
الشكل (5) يمثل النسب المئوية لمقاومة بكتريا *P. mirabilis* للمضادات الحيوية.

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 البكتريا وسطح الدقائق وأن الدقائق النانوية تطلق الايونات التي تتفاعل مع مجموعة الثايول (-SH) للبروتينات الناقلة للمواد الغذائية التي تبرز من غشاء الخلية البكتيرية مما يخفض نفاذية الغشاء وبالتالي موت الخلية [37]

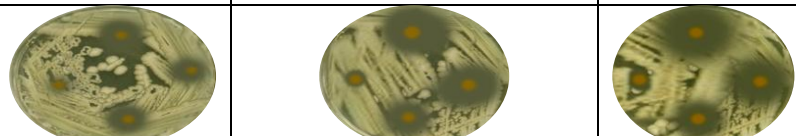
ان ميكانيكية تثبيط AgNPs لقابلية DNA على التضاعف والتعبير الجيني للبروتينات وكذلك مختلف البروتينات الخلوية والانزيمات الضرورية في انتاج ATP تؤدي الى أن تصبح غير فعالة [38] وتهاجم AgNPs سطح غشاء الخلية وتعطل عملية النفاذية ووظائف التنفس في الخلية أو تتداخل مع مكونات نظام النقل الالكتروني للبكتريا [39] و [40].

تأثير محلول الجسيمات النانوية الفضية AgNPs على بعض أنواع بكتريا المقاومة : لقد تبين من خلال الدراسة أن لجسيمات الفضة النانوية المنتجة من بكتريا *S. parvulus* فعالية عالية على البكتريا *E. coli* وكما موضح بالجدول رقم (6) اذ بلغ قطر التثبيط (29,27,27) ملم عند التركيز 100% وعند تخفيف الى 50 % كانت النتائج (22,22,24) ملم بينما عنده التخفيف 35 % بلغ قطر التثبيط (8,8,7) ملم وأيضا على بكتريا *P. mirabilis* وكما موضح في الجدول (7) اذ عند التركيز 100 % بلغ قطر التثبيط (30,29,29) ملم وعند التخفيف 50 % بلغ قطر التثبيط (26,25,27) ملم في حين عند التخفيف 35 % بلغ قطر التثبيط (8,8,8) ملم. أن لصغر حجم الدقائق النانوية ومساحتها السطحية الكبيرة (كلما صغر الحجم تجمعت بأعداد أكبر على سطح الخلايا ويؤدي الى زيادة سميتها للكائنات الدقيقة) تأثير على نفاذية الغشاء البلازمي للبكتريا وبالتالي موت الخلية [35] و [36].

الجدول (6) تأثير للجسيمات النانوية بتركيز مختلفة على *E. coli*

عزلات <i>E. coli</i> المقاومة			تركيز الجسيمات النانوية المنتج من أكتينومايس <i>S. parvulus</i> %
قطر منطقة التثبيط لعزلة رقم (mm) 9	قطر منطقة التثبيط لعزلة رقم (mm) 5	قطر منطقة التثبيط لعزلة رقم (mm) 3	
29	27	27	100
22	22	24	50
7	8	8	35
0	0	0	25
			التأثير التثبيطي لجسيمات الفضة النانوية المحضرة باستخدام <i>S. parvulus</i>

الجدول (7) تأثير للجسيمات النانوية بتركيز مختلفة على *P.mirbilis*

عزلات <i>P.mirbilis</i> المقاومة			تركيز الجسيمات النانوية المنتج
قطر منطقة التثبيط لعزلة رقم 13 (mm)	قطر منطقة التثبيط لعزلة رقم 11 (mm)	قطر منطقة التثبيط لعزلة رقم 4 (mm)	من أكتينومايس <i>S. parvulus</i> %
30	30	29	100
26	25	27	50
8	8	8	35
0	0	0	25
			التأثير التثبيطي لجسيمات الفضة النانوية المحضرة باستخدام <i>S. parvulus</i>

2- مقاومة العزلات البكتيرية المرضية *Escherichia coli* و

Protus mirabilis لمجاميع عديدة من المضادات الحيوية.

3- كفاءة جسيمات الفضة النانوية في التأثير على البكتيريا المقاومة للمضادات الحيوية.

الاستنتاجات

1- أظهرت العزلة البكتيرية *S. parvulus* المعزولة من التربة القابلة على إنتاج الدقائق النانوية الفضية AgNPs.

المصادر

[1] G. R. Tuttle. Size and Surface Area Dependent Toxicity of Silver Nanoparticles in Zebrafish Embryos (*Danio rerio*). Master of Science Oregon State University. (2013).
[2] M.Y. Wani, M.A. Hashim, F. Nabi and M. A. Malik, Nanotoxicity: Dimensional and Morphological concerns. Hindawi Publishing Corporation Advances in Physical Chemistry, (2011). Article ID 450912, 15 pages.
[3] N. Duran, P. D. Marcato, R. D. Conti, O. L. Alves, F. M. Costa, and 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.
[4] M. Abdul Hameed. Nanoparticles as Alternative to pesticides in Management Plant Disease-A Review. International Journal of Scientific and Research Publications. (2012). ISSN 2250-3153.
[5] T. D. Gurung, C. Sherp, V. P. Agrwal, and B. Lekhak,. "Isolation characterization of antibacterial actinomycetes from soil sample. Kalapatthar Mount Everest Region. Nepal J. Sci.Technol. (2009). 10: 173-182.
[6] O. O.Babalola,; M. B. Kirby,; Le Rose-Hill, M. Cook, A. E.; Cary, S. C.; Burton, S. G. and D. A Cowan .Phylo-genetic analysis of actinobacterial populations associated with Antarctic dry valley mineral soils. Environ.(2009).Microbiol.,11:566-576.
[7] K .Todar. *Pseudomonas aeruginosa* .J. of Bacterial, (2002).22 (6): 330-355
[8] S. Saha ; D. Chattopadhyay and K. Acharya.Preperation of silver nanoparticles by bio-reduction using *Nigrospora oryzae* culture filtrate and its antimicrobial activity.Digest Journal of nanomaterials and biostructures.(2011).6(4):1526-1535.

[9] N.Sahin, and A.Ugur,. "Investigation of antimicrobial activity of some *Streptomyces* isolates. Turk. (2003). J. Biol., 79-84.
[10] M .Oskay,; A. U. Tamer, and C. Azeri,. Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soil of Turkey. Afr. J. Biotech., (2004). 3: 411-446.
[11] سهى سليمان ايليا . عزل وتشخيص النوع *Streptomyces lavendulae* من التربة ودراسة الظروف المثلى لإنتاج المضادات الحيوية، رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة الموصل، العراق .
[12] S. T. Williams, M. Goodfellow, E. M .Wellington, P. H. Sneath, and M. J. Sackin,. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. Journal of Genetic Microbiology, (1983).129: 1743-1813.
[13] A. Zarina . Green Approach for Synthesis of Silver Nanoparticles from Marine *Streptomyces*- MS 26 and Their Antibiotic Efficacy .6(10). (2014) , 321-327.
[14] C.Monica. District Laboratory Practice in Tropical Countries .part 2.2th. (2009) P. 63-71.
[15] A. E Brown.. Benson`s Microbiological Applications Laboratory Manual in General Microbiology. 10thed., (2007) P. 102-263. McGraw-Hill comp. Inc., USA
[16] J.A. Morello ; H.E. Mizer; & Granato. Laboratory Manual and Workbook in Microbiology Applications to Patient Care.18th.ed. The McGraw-Hill Companies, Inc., New York: (2006). 95-99.
[17] CLSI, (Clinical & Laboratory Standards institute). Performance Standard for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty –first Informational Supplement. M100-S21.31 (2014) (1):1-163.

- [18] J. Vandepitte; K. Engback; P. Piot and G. Heuck. Basic laboratory procedures in clinical bacteriology. WHO Switzerland (1991).
- [19] J. C. Holt; N. R. Krieg, P.H. Sneath; J. T. Staley, and S. T Williams,. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th ed. Williams and Wilkins Co., Baltimore. (1994).
- [20] فرح خالد الفيل. (2012). عزل وتشخيص عزلات من الاكتينومايسيتات المنتجة للمضادات الحيوية ودراسة تأثيرها على بعض الفطريات. اطروحة دكتوراه ، كلية العلوم/ قسم علوم الحياة ، جامعة الموصل، العراق.
- [21] R. M. Traynor; D. Parratt, H. L. D. Duguid, and, I. C. Duncan. Isolation of actinomycetes from cervical specimens. J. Clin. Pathol., (1981) 34: 917-916.
- [22] Z. A. El-fiky, S. R Manson, Y. Zwhary, and S. Ismail,. DNA-finger print sand phylogenetic studies of some chitinolytic actinomycetes isolates. Biotech. (2003), 2 (2): 131-140.
- [23] K. B. Usde, S. Pathak, I. Jr. Mc Cullum; D. P. Jannat-Khah; S. V. Shadomy; C. A. Dykewicz; T. A. Klark; T. L. Smith, and J. M. Brown,. Antimicrobial resistant *Nocardia* isolates, United State, Clin. Infect. Dis., (2010) 51: 1445-1448.
- [24] L. M. Prescott, J. P. Harley, and D. A. Klein,. "Microbiology 6th ed., McGraw – Hill companies, USA (2005) pp:992.
- [25] V.C Verma ; Kharwar R.N; A.C. Gange. Biosynthesis of Antimicrobial silver nanoparticles by the endophytic fungus *Aspergillus clavatus*. Nanomedicine (2010).5,33-40.
- [26] N. Pavani and B.B. sangameswaran,. Synthesis of Lead Nanoparticles by *Aspergillus* species. (2012) 1, 61–63.
- [27] N. Vigneshwaran; N.M. Ashtaputr, P.V. Varadarajan, R.P. Nachane, K.M. Paralikar and R.H. Balasubramanya,. Biological synthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus !avus*. Materials Letters (2007) 61: 1413–1418.
- [28] V. Gopinath; P. Velusamy. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using *Bacillus* sp. GP-23 and evaluation of their antifungal activity towards *Fusariumoxysporum*. Spectrochim. Acta A (2013) 106:170-174.
- [29] N. Duran; P.D. Marcato ; O.L Alves ; G.IH .De souza; j Esposito, Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. J.Nanobiotechnol. (2005) 3,1-7.
- [30] W.Winn ; S. Allen; W. Janda; E. Koneman; G. Procop; P Schreckenberger,. and G .Woods. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. .(2006) 6th Ed., Lippincott, Williams& Wilkins.
- [31] J. Wilson,. Clinical Microbiology An introduction for Health ears Professionals. British, Journals and multimed in the health Science.,China(2004).
- [32] H .Hanaki . Epidemioogy and clinical effect against beta-lactam antibiotic induce .J. Antibiotic, (2004). 78 (8): 204-216.
- [33] A.C. Fluit; M.R. Visser; and F.J. Schmitz. Molecular detection of antimicrobial resistance. Clinical Microbiology Reviews. (2001).Oct.836-871.
- [34] W .Zimmermann and A . Rosselet . function of the outer membrane of *Escherichia colli* as a permeability barrier to beta-lactam antibiotic , Antimicrobial agents and chemotherapy : (1977). 12 (3).368-372.
- [35] X. Lin; J. Li; S. Ma; G. Liu, K. Yang. Toxicity of TiO₂Nanoparticles to *Escherichia coli*: Effects of Particle Size, Crystal Phase and Water Chemistry. (2014). PLOS ONE 9(10): e110247.
- [36] I. Sondi and B. Salopek-Sondi. Silver Nanoparticles as Antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. J Colloid Interface Sci., (2004). 275:177–182.7.
- [37] H. Zhang, and G. Chen,. 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.
- [38] M.K .Yamanaka; T. Hara, and J. Kudo. 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.
- [39] S. L .Percival; P. G. Bowler and D. Russell (2005): Bacterial resistance to silver in wound care. Journal of Hospital Infection, (2005) 60: 1.
- [40] V.K. Sharma; R.A. Yngard, and Y.L in.: Silver: Green synthesis and their antimicrobial activities. Advances in Colloid and Interface Science, (2009) 145:83.

Effect of silver nanoparticles prepared by *Streptomyces*. spp on some pathogenic bacteria

Hussain A. Abod¹, kalil I. Bander¹, Salah S. Zain-Al-Abdde²

¹ Department of Biology , College of Science , Tikrit University , Tikrit , Iraq

² Department of Biology , College of Science , Kirkuk university, Kirkuk , Iraq

Abstract

Tow species of *Streptomyces* isolated from the industrial district area in the Kirkuk city and two species represented *Streptomyces hygroscopicus* and *Streptomyces parvulus*. were used to detected their ability to prepare silver nanoparticles. The results showed change in color silver nitrate solution 1mM to dark brown, Studied the spectrum of absorption of UV, visible spectroscopy of the solution silver particles nano second step in making sure the formation of particles and found to be located on the wavelength of 400 nm to bacteria *Streptomyces parvulus* also show that the X-ray diffraction peaks were at (311-200-111) and at the angle (31.73 and 48.70 and 58.30). .Additinary the results showed clear images in the scanning electron microscope size and shape .the bacteria *Streptomyces hygroscopicus* was a wavelength of 280 nm .etbin that silver nano particles solution with inhibitory effect on the two types of multi-antibiotic resistance antibiotics bacteria *E.coli* and *P. mirabilis*, which amounted to (27,27,29) mm against the bacteria *Escherichia coli* at a concentration of 100% were (30,30,29) mm when the concentration 100% against *Proteus mirabilis*