DOI: http://dx.doi.org/10.21123/bsj.2016.13.3.0425

دراسة فعالية اوكسيد التيتانيوم TiO2 النانوية لوحدها او خلطها مع بعض المضادات الحيوية والمستخلصات النباتية على فعالية البكتريا السالبة لصبغة كرام.

رنا مجاهد عبدالله

قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة ابن الهيثم/جامعة بغداد

البريد الالكتروني :- dr.rana_alshwaikh@yahoo.com

استلام البحث 25/ 5/2015
قبول النشر 21/ 9/2015

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International Licens

الخلاصة :

استعملت مادة اوكسيد التيتانيوم النانوية TiO2 على نطاق واسع في تنظيف وتعقيم العديد من الأدوات الطبية ، ومنها الأدوات الصحية ، وأدوات مائدة الطعام والطهي ، والادوات التي تستعمل في المستشفيات وان مادة اوكسيد التيتانيوم النانوية TiO2 غير سمية وتتمايز بالاستقرارية الفيزيائية والكيميائية على المدى الطويل.وقد استعمل على نطاق واسع لتحلل المركبات العضوية والكائنات الميكروبية مثل الخلايا السرطانية ، والفيروسات ، والبكتيريا وكذلك إمكانية تطبيقها في تعقيم الأجهزة الطبية ومن هنا جاء هدف الدراسة لمعرفة تاثير مادة اوكسيد التيتانيوم النانوية TiO2 في بعض البكتريا السالبة لصبغة كرام ودراسة تاثيرها في بعض عوامل الضراوة و DNA الكروموسومي.

تم الحصول على كل من بكتريا *E. coli* ؛ *Proteus mirabilis* ؛ *Proteus vulgaris* ؛ *Pseudomonas aeruginosa* ؛ *Klebsiella pneumonia* ، *Acinetobacter baumannii* من مستشفى مدينة الامامين الكاظمين الطبية للمدة من 1 / 4 ولغاية 30 / 6 / 2014 . تمت دراسة فعالية المستخلصات النباتية والمضادات الحيوية لوحدها او خلطها مع مادة اوكسيد التيتانيوم النانوية TiO2 على نمو البكتريا. ودراسة تأثير مادة اوكسيد التيتانيوم النانوية TiO2 في طبقة البايوفلم وال DNA الكروموسومي .

اظهرت النتائج فعالية تأزرية للعديد من المستخلصات النباتية المائية والكحولية (المرمرية *Salvia officinalis* ؛ ارقطيون *Arctium minus* ، المردقوش *Origanum majorana* ، شنان *Anabasis syriaca*) لوحدها وعند خلطها مع مادة اوكسيد التيتانيوم النانوية TiO2 على انواع البكتريا السالبة لصبغة كرام.

اظهرت النتائج فعالية عالية عند خلط كل من مادة اوكسيد التيتانيوم النانوية TiO2 مع مضاد Ciprofloxacin لجميع العزلات السالبة لصبغة كرام ؛ واظهرت النتائج فعالية عالية عند خلط مادة اوكسيد التيتانيوم النانوية TiO2 مع مضاد Amikacin لجميع العزلات ماعدا بكتريا *Acinetobacter baumannii* وبكتريا *E. coli3* في حين كانت نتائج خلط مادة اوكسيد التيتانيوم النانوية TiO2 مع مضاد Cephalothin فعالية عالية لجميع العزلات ماعدا بكتريا *Pseudomonas aeruginosa*.

اظهرت اغلب المستخلصات النباتية (المرمرية *Salvia officinalis* ؛ ارقطيون *Arctium minus* ، المردقوش *Origanum majorana* ، شنان *Anabasis syriaca*) عند خلطها مع مادة اوكسيد التيتانيوم النانوية TiO2 فعاليتها في تحطيم DNA الكروموسومي لبكتريا *E. coli*.

اظهرت الدراسة قدرة مادة اوكسيد التيتانيوم النانوية TiO2 على تثبيط تكوين طبقة البايوفيلم من قبل عزلات البكتريا عند التركيزين (1 ، 1.5) مايكروغرام / مل.

نستنتج من ذلك انه يمكن استعمال مادة اوكسيد التيتانيوم النانوية TiO2 لقتل بعض انواع البكتريا.

الكلمات المفتاحية:- اوكسيد التيتانيوم TiO2 النانوية ؛ المقاومة للمضادات الحيوية ؛ DNA .

المقدمة :

تسبب الاحياء المجهرية العديد من الامراض التي تؤدي الى الوفاة ، لذلك اصبح من المهم جدا القضاء على هذه الكائنات المجهرية وان زيادة تطورمقاومة البكتريا المختلفة لانواع المضادات الحيوية والمواد

الاخرى التي تستعمل بالعلاج لذا اصبح لابد من البحث عن بدائل للقضاء على هذه البكتريا المقاومة[1] [2]. وفي الاونة الاخيرة استعملت بعض المواد النانوية وتطورت صناعتها وقد بذلت جهود كبيرة في تطويرهذه المواد التي وجد ان لها تأثيرا كبيرا في مكونات الخلايا [1]. اذ وجد ان المواد النانوية لها فعالية على كل من البكتريا ، والفايروسات ، والفطريات ، والطحالب ، وذلك لامتلاكها مدى واسع للفعالية المضادة لهذه الكائنات فضلا عن تاثيرها في الخلايا السرطانية [4,2,3]. وبينت الدراسات فشل البكتريا في مقاومتها للمواد النانوية مقارنة بالمضادات الحيوية التي تطورت مقاومتها لها في الاونة الاخيره مما ادى الى فشل العلاج[5]. وبينت الدراسات ان فعالية المواد النانوية تؤدي الى قتل 650 خلية مقارنة بالمضادات الحيوية التي يمكن ان تقتل 12 خلية [4] .

وقد استعملت العديد من المواد النانوية ضد الاحياء المجهرية ومنها النحاس ، والكوبلت ، والسلكون ، والزنك ، لفعاليتها العالية ضد الاحياء المجهرية فضلا عن فعالية اوكسيد التيتانيوم TiO_2 ضد انواع البكتريا المختلفة في العديد من الصناعات اذ استعملت مادة اوكسيد التيتانيوم النانوية TiO_2 في تصنيع الاسنان ومواد تنظيف الاسنان و وجد ان اوكسيد التيتانيوم TiO_2 النانوي له فعالية عالية ضد انواع من الفطريات Fungi ؛ الخمائر Yeast ؛ *Alternaria* و *Aspergillus* فضلا عن انواع البكتريا المختلفة ومنها *Streptococcus veillonella* و *Actinomyces* و *Neisseria* المسببة لتكلس الاسنان [6]. ووجد ان تأثيرالمادة النانوية في طلاء السطوح وخاصة جدران الغرف والمختبرات جعل من الممكن استعمال هذه المواد في الطلاء وبذلك تمنع من نمو البكتريا وبالاخص *P. aeruginosa* التي يكثر وجودها بالمستشفيات وتسبب Nosocomial infection ويمكن الحد من انتشارها.

استعملت مادة اوكسيد التيتانيوم النانوية TiO_2 ضمن نطاق واسع اذ دخلت في العديد من الصناعات ومنها في مجال معالجة المياه وفي تصنيع الخلايا الشمسية وصناعة الطلاء والدهانات والبلاستك والورق والاحبار؛ فضلا عن صناعة الاغذية والادوية وتستعمل في صناعة الكريمات الواقية من الشمس والاشعة فوق البنفسجية وفي صناعة معاجين الاسنان فضلا عن استعمالها في التنظيف وتنقية البيئة وتنقية المياه وازالة البكتريا والمواد العضوية الضارة من الماء والهواء وتنظيف السطوح في المراكز الطبية وفي صناعة الادوات الصحية وادوات الطعام والادوات السريرية وتستعمل في المستشفيات للتعقيم وتدخل في صناعة الالياف القطنية التي تستعمل في تضميد الجروح وتدخل في عملية صناعة الاسنان والعظام [1,4,7] ويتمايز اوكسيد التيتانيوم TiO_2 بقلة سميته وانخفاض التكلفة وهو ذو اكسدة قوية ويتفاعل مع الاوكسجين فضلا عن تاثيره في الخلايا بشكل واسع [1] يمكن استعمال الفضة النانوية والتيتانيوم النانوي بوصفهما مضادين لنمو الاحياء المجهرية المختلفة ومن دون تأثير سام في الخلايا المضيفة [8].

هدفت هذه الدراسة الى بيان تأثير مادة اوكسيد التيتانيوم النانوية TiO_2 في انواع مختلفة من البكتريا السالبة لصبغة كرام المقاومة للمضادات الحيوية ودراسة خلط المادة النانوية مع المضادات وبعض المستخلصات النباتية وتاثيرها في بعض عوامل الضراوة وفي DNA البكتيري.

المواد و طرائق العمل :

عزل البكتريا :- جمعت العينات من حالات مرضية مختلفة للمدة من 1/ 4/ 2014 ولغاية 30/ 6/ 2014 من مستشفى مدينة الامامين الكاظمين الطبية ؛ وتم تشخيص العزلات باستعمال الاوساط الزرعية التقليدية واستعملت الفحوصات البايوكيمائية IMViC وللتشخيص النهائي استعمل عدة التشخيص API 20 E [9].

فحص الحساسية للمضادات الحيوية:- اعتمدت طريقة Kirby baure المذكورة في [10] لاجراء فحص الحساسية للمضادات الحيوية وباستعمال وسط Muller Hinton agar واستعمل كل من مضادات Ciprofloxacin (CIP)؛ Norfloxacin (NOR) ؛ Gentamicine(CN) ؛ Amikacin (AK)؛ Aztreonam(ATM) ؛ Amoxicillin/Clavulanic(AMC) ؛ Carbenicillin (PY)؛ Cephalothin (KF) ؛ Meropenem(MEN)؛ Imipinem(IPM) وتمت مقارنة النتائج بالجداول القياسية المذكورة في [11] لتحديد قطرمنطقة التثبيط.

عزل DNA :- تم استعمال عدة استخلاص خاصة لاستخلاص DNA من عزلات البكتريا (Wizard® Genomic DNA Purification Kit , USA) وبحسب تعليمات الشركة المصنعة.

استخلاص النبات:- تم الحصول على النبات من الاسواق المحلية الذي تضمن النباتات (المرمرية *Salvia officinalis* ؛ ارقطيون *Arctium minus* ، المردقوش *Origanum majorana* ، شنان *Anabasis syriaca*)، تم طحنه بمطحنة كهربائية ووضع المسحوق في زجاجة نظيفة ومعقمه في الثلاجة بدرجة حرارة (4)م° الى حين الاستعمال. حضرالمستخلص المائي الحار والمستخلص الكحولي الحار باتباع طريقة [12] باستعمال جهازالاستخلاص Soxhlet apparatus بدرجة حرارة (60) م°، بعدها رشح المحلول باستعمال ورق ترشيح (Whatman (No. 1.

تحضيرالمحاليل النانوية لوحدها وخلطها مع المستخلصات النباتية والمضادات الحيوية:-
علقت المادة النانوية التي كانت بالمواصفات الاتية :- nanoshe titanium dioxide, M.W. 79.86, assay 99.7%, 50 nm, density 3.9 g/cm3, (made in USA) مع الماء المقطر ومستخلص النباتات الكحولية والمائية ومحاليل المضادات الحيوية بجهاز Ultrasonic cleaner (Lab. Tech. Model: LUC-40S/410/420) بقدره 40 KHZ لمدة 30 دقيقة وبدرجة حرارة 35-30 م°، وحضرت تراكيز 0.01 ، 0.5 ، 1 ، 1.5 مايكروغرام / مل [4] .

دراسة الفعالية التثبيطية باستعمال الحفر:- اتبعت طريقة الانتشار بالاكار بوساطة الحفر The agar Well Diffusion Method لدراسة تأثير المستخلصات والمادة النانوية [13].

التحري عن العزلات المنتجة للبايوفيلم Bioflim :- تم زرع العزلات على وسط Trypton soy broth وحضنت في درجة حرارة 37م° لمدة 48 ساعة وبعدها تم التخلص من المزرعة السائلة بحذر ثم تصبيغ الانابيب بصبغة الكرستال البنفسجي بتركيز 1% لمدة 30 دقيقة ثم تم غسل الانابيب بالماء المقطر وتركت بدرجة حرارة الغرفة ثم قورنت النتائج بالسيطرة السالبة (السيطرة السالبة هي انابيب Trypton soy broth من دون مزروع بكتيري تحضن مع الانابيب المزروعة وتصبغ بصبغة الكرستال البنفسجي) وملاحظة تكون طبقة البايوفيلم على سطح الانابيب الزجاجية بالعين المجردة واعتمدت على كثافة تكون البايوفيلم على الانبوبة كالاتي (+) طبقة كثافة قليلة ؛ (++) طبقة كثافة متوسطة ؛ (+++) طبقة كثافة كثيرة ؛ (-) عدم تكون طبقة البايوفلم [14].

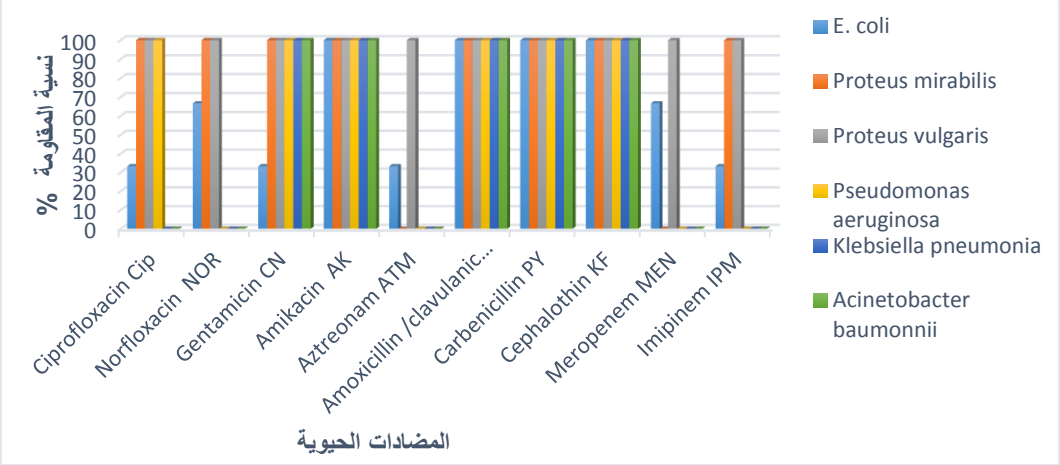
تأثيرالمادة النانوية في طبقة Bioflim:- تم زرع العزلات على وسط Trypton soy broth والمحضر باضافة تراكيز مختلفة من اوكسيد التيتانيوم TiO2 النانوي 0.01 ، 0.5 ، 1 ، 1.5 مايكروغرام / مل وحضنت في درجة حرارة 37 م° لمدة 48 ساعة وقيست النتائج كما في الفقرة السابقة.

تاثيرالمادة النانوية في الDNA الكروموسومي :-
تمت دراسة تأثير مادة اوكسيد التيتانيوم النانوي TiO2 لوحدها وخلطها مع كل من المستخلصات المائية والكحولية لمستخلص النباتات قيد الدراسة وذلك بخلط DNA المستخلص مسبقا مع كل من اوكسيد التيتانيوم TiO2 النانوي لوحده وخلطها مع المستخلصات الكحولية والمائية للنباتات قيد الدراسة وبنسبة 1:1 وحضنت بدرجة 37 م° لمدة ساعة واحدة وبعدها تمت عملية الترحيل الكهربائي باستعمال هلام الاكاروز.

الترحيل الكهربائي Electrophoresis:- تم ترحيل DNA المعامل مع اوكسيد التيتانيوم النانوي TiO2 النانوية والمستخلصات النباتية قيد الدراسة لوحدها وخلطها مع مادة اوكسيد التيتانيوم النانوية وخلطها مع Lodding dye وباستعمال الاكاروز بتركيز 1% الحاوي على 5 مايكروليتر من صبغة Eithidium bromide وبفرق جهد 75 فولت لمدة ساعة وتم التصور باستعمال UV light [15] .

النتائج والمناقشة :-

تم الحصول على كل من بكتريا *E. coli* ؛ *Proteus mirabilis* ؛ *Proteus vulgaris* ؛ *P. aeruginosa* ؛ *Klebsiella pneumonia* و *A. baumannii* واجريت التحليلات اللازمة لتشخيص البكتريا وبالاعتماد على [9] . اجري فحص الحساسية لجميع العزلات قيد الدراسة لعشرة مضادات حيوية واظهرت النتائج ان (100%) من العزلات كانت مقاومة لكل من مضاد Cephalothin ؛ Carbencillin ؛ Amikacin و Amoxicillin/clavulanic acid في حين كانت اغلب العزلات مقاومة لمضادات Gentamicin ولمضاد Ciprofloxacin ولمضاد Aztreonam واظهرت العزلات اقل مقاومة لكل من مضادات Impinem ؛ Meropenem و Norfloxacin وكما موضح بالشكل (1) نسبة المقاومة للمضادات الحيوية المختلفة من قبل بعض العزلات المستعملة في الدراسة واتفقت النتيجة مع [16] الذين بينوا ان عزلات *P. aeruginosa* وبكتريا *Proteus mirabilis* مقاومة لمضاد Ceftazidime وكانت النتائج مقاربة مع [17] الذين بينوا نسبة المقاومة لمضاد Aztreonam (29.3)% ولمضاد Gentamicin (44) % ولمضاد Imipenem (25.4)%. يعود سبب مقاومة البكتريا لمضادات البيتالاكتام الى امتلاك البكتريا لانزيمات البيتالاكتاميز β-lactamases واسعة الطيف ESBLs وانزيمات Carbapenemases التي تكون جيناتها محمولة اما على الكرموسومات واما على البلازميدات في العديد من انواع البكتريا. فضلا عن امتلاك البكتريا لانزيمات Aminoglycoside-modifying enzyme التي تجعلها مقاومة لمجموعة الامينوكلايكوسايد ؛ وان امتلاك البكتريا اليات اخرى للمقاومة منها قابلية البكتريا على تغيير نفاذية بروتينات الغشاء الخارجي وتغيير في موقع الهدف وقد يحصل تغيير في Penicillin (PBPs) Binding Proteins وانزيمات Topoisomerases ؛ فضلا عن امتلاكها لانظمة الدفق efflux pumps مما يجعلها مقاومة لانواع مختلفة من المضادات منها مضادات الكينولينات [18].



شكل (1) النسب المئوية لمقاومة البكتريا السالبة لصبغة كرام للمضادات الحيوية المختلفة.

اظهرت جميع العزلات قابليتها على انتاج Biofilm ماعدا عزلة واحدة هي *E. coli 2* وظهر ان مادة اوكسيد التيتانيوم TiO2 النانوية لها تاثير في تقليل طبقة Biofilm المتكونة من قبل البكتريا وبالاخص بالتركيزين (1 ؛1.5) مايكروغرام/ مل وكما موضح في الجدول (1). ان الأغشية الحيوية Biofilm لها تأثيركبيرفي الالتهابات البكتيرية الحادة والمزمنة وعلى الرغم من اهمية طبقة Biofilm في البكتريا وعلاقتها بامراضية البكتريا فأنها تقوم بدور مهم للبكتريا اذ تبطئ من عملية الأيض، وتحد من استهلاك الطاقة وتقوم بحماية خلايا البكتريا من العوامل البيئية الخارجية ومنها (مقاومة المضادات الحيوية ، المبيدات والجفاف) ان عملية السيطرة على هذه الأغشية الحيوية هي خطوة مهمة للتقليل من نشرالبكتريا والحد من امراضيتها [19]. وجاءت النتائج متفقة مع [6] الذي بين فعالية مادة اوكسيد التيتانيوم TiO2 النانوية في السيطرة على تكوين Biofilm في البكتريا المسببة لالتهابات الاسنان ومنها بكتريا *Streptococcus veillonella* و *Actinomyces* و *Neisseria*. وفي دراسة اخرى لبكتريا *P. aeruginosa* اظهر [7] ان ميكانيكية عمل مادة اوكسيد التيتانيوم النانوية على طبقة Biofilm غيرمعروفة ولكن عملية ارتباط المادة النانوية مع الايونات الضرورية لثبات طبقة Biofilm يؤدي الى تحطمها ومن تم موت الخلايا.

جدول (1) تاثير مادة اوكسيد التيتانيوم TiO2 النانوية في تكوين Biofilm لانواع البكتريا السالبة لصبغة كرام .

نوع البكتريا	Biofilm	تركيز اوكسيد التيتانوم TiO2 النانوية (مايكروغرام / مل)			
		0.01	0.5	1	1.5
E. coli 1	+++	+++	-/+	+	+
E. coli2	-	-	-	-	-
E. coli3	++	++	+	-	-
Proteus mirabilis	++	++	+	+	+
Proteus vulgaris	++	++	++	+	+
Pseudomonas aeruginosa	++	++	+	+	+
Klebsiella pneumonia	++	++	++	+	+
Acinetobacter baumannii	++	++	+	+	+

****(+++): تكون طبقة البايوفلم بكثافة كثيرة ؛ (++): تكون طبقة البايوفلم بكثافة متوسطة ؛ (+): تكون طبقة البايوفلم بكثافة قليلة ؛ (-): عدم تكون طبقة البايوفلم .**

اثبتت المادة النانوية قابليتها على القضاء على بكتريا *E. coli* وخاصة تلك المقاومة للمضادات الحيوية واسعة الطيف. ان المادة النانوية تعمل على تحطيم كل من الانزيمات الخلوية و DNA عن طريق الارتباط مع مجموعة الجزيئات الواهبة للالكترونات ومنها Thiols ؛ Carbohydrate ؛ Amides ؛ Indoles و Hydroxyls وتعمل على تكوين ثقوب في الجدار الخلوي البكتيري ويقود ذلك

الى زيادة نفاذية المواد داخل الخلية ومن ثم موت الخلية [4] .

اظهرت نتائج فعالية مستخلص الشنان المائي لوحده على انواع البكتريا المختلفة قيد الدراسة اذ بلغت اقطار منطقة التثبيط (7-10) ملم اما فعالية مستخلص الشنان الكحولي لوحده فقد اظهرالمستخلص فعالية ضد بكتريا *E. coli* فقط وكان قطرمنطقة التثبيط (8-12) ملم . واظهرت فعالية مستخلص الارقطيون المائي لوحده فعالية عالية لجميع العزلات قيد الدراسة اذ بلغت اقطار منطقة التثبيط (8-14) ملم ، في حين كانت فعالية مستخلص الارقطيون الكحولي لوحده ضد كل من بكتريا *Proteus mirabilis* و *Acinetobacter baumannii* فقط وبقطرمنطقة التثبيط (10) ملم لكل منهما وكما موضح في جدول(2) وقد بينت الدراسات ان فعالية النباتات الطبية على انواع البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام يعود الى احتوائها على العديد من المركبات الكيمائية مثل thiocynate و nitrate و chloride و sulphates التي تجعل من هذه النباتات فعالية مضادة ضد البكتريا antimicrobial [20]. وبين [21] ان فعالية مستخلص الارقطيون ضد البكتريا الموجبة لصبغة كرام *Staphylococcus aureus* و *Bacillus spp.* في حين كانت انواع البكتريا السالبة لصبغة كرام ومنها بكتريا *E. coli* و *Klebsiella pneumonia* اكثر مقاومة لهذا المستخلص.

بينت نتائج فعالية مستخلص المردقوش المائي لوحده فعالية عالية على جميع العزلات اذ بلغت اقطار منطقة التثبيط (7-8) ملم في حين كانت اقطارمنطقة التثبيط لمستخلص المردقوش الكحولي لوحده (6-7) ملم ، ولم يظهر هذا المستخلص اي فعالية ضد بكتريا *E. coli*. اما مستخلص المرمرية المائي لوحده فاظهر فعالية عالية على جميع العزلات اذ بلغت اقطارمنطقة التثبيط (7-14) ملم في حين كانت اقطار منطقة التثبيط لمستخلص المرمرية الكحولي لوحده (6-8) ملم ، ولم يظهر هذا المستخلص اي فعالية ضد كل من بكتريا *E. coli* و *proteus vulgaris* وكما موضح في الجدول (3) . واتفقت النتائج مع [20] الذي بين فعالية نبات المرمرية المعروف sage على بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* فضلا عن ما توصل اليه [22] الذي بين فعالية مستخلص المرمرية المائي والكحولي ضد كل من البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام وبين ان العديد من النباتات الطبية لها فعالية ضد العديد من البكتريا و تستعمل في علاج الحالات المرضية المختلفة.

اظهرت النتائج فعالية تأزرية للعديد من المستخلصات النباتية قيد الدراسة (الشنان، والارقطيون، والمردقوش، والمرمرية) المائي عند خلطها مع مادة اوكسيد التيتانيوم النانوي وكانت اقطار منطقة التثبيط تتراوح بين (8-16) ملم وكما موضح بالجدول (2) في حين اظهر (الشنان، والارقطيون، والمرمرية، والمردقوش) الكحولي فعالية تازرية عند خلطه مع مادة اوكسيد التيتانيوم النانوية مقارنة باستعماله لوحده وكانت اقطار منطقة التثبيط تتراوح بين (6-15) ملم وكما موضح بالجدول (3). اتفقت النتائج مع [1] الذي بين فعالية خلط المستخلصات النباتية مع المواد النانوية التي لها فعالية عالية على البكتريا وكما جاء في دراسة سابقة عند خلط كل من نبات *Bauhinia variegate* ومستخلص نبات *Tinospora cordifolia*مع مادة اوكسيد التيتانيوم النانوية ضد البكتريا السالبة لصبغة كرام ومنها بكتريا *E. coli* ولبكتريا *Enterococcus faecalis*.

جدول (2) :- تاثير مادة اوكسيد التيتانيوم النانوية TiO2 لوحدها وعند خلطها مع المستخلص النباتي الكحولي والمائي الحار لكل من مستخلص (شنان *Anabasis syriaca* وارقطيون *Arctium minus*)

البكتريا السالبة لصبغة كرام	لوحده TiO2*	قطر منطقة التثبيطInhibition zoneمقاسة بالملم							
		Anabasis syriaca مستخلص الشنان				*Arctium minus* مستخلص ارقطيون			
		شنان مائي لوحده	شنان مائي خلط مع TiO2*	شنان كحولي لوحده	شنان كحولي خلط مع TiO2*	ارقطيون مائي لوحده	ارقطيون مائي خلط مع TiO2*	ارقطيون كحولي لوحده	ارقطيون كحولي خلط مع TiO2*
E. coli 1	6	10	11	8	12	12	14	0	12
E. coli2	8	8	10	12	14	12	14	0	14
E. coli3	8	7	10	0	10	14	16	0	13
Proteus mirabilis	8	8	10	0	10	10	11	10	13
Proteus vulgaris	6	7	8	0	12	8	10	0	0
Pseudomonas aeruginosa	7	8	10	0	12	8	10	0	0
Klebsiella pneumonia	6	7	8	0	8	10	11	0	0
Acinetobacter baumannii	6	7	8	0	10	12	13	10	12

***تركيز اوكسيد التيتانيوم TiO2 1.5 مايكروغرام / مل**

وبينت دراسة [1] ان المواد النانوية تعمل على اكسدة الجدارالخلوي وتؤدي الى تدميرالغشاء الخلوي ويؤدي ذلك الى فقدان البروتينات والمعادن والمادة الوراثية ومن ثم موت الخلايا واثبتت هذه الدراسة انه يمكن استعمال المواد النانوية عند خلطها مع المستخلصات النباتية تعطي فعالية تازرية للقضاء على البكتريا ويمكن استعمالها بالمجال الطبي لعلاج اصابات البكتريا وبالاخص تلك المقاومة للمضادات الحيوية .

جدول (3) :- تاثير اوكسيد التيتانيوم النانوية TiO2 لوحدها وخلطها مع المستخلص النباتي الكحولي والمائي الحار لكل من (مردقوش *Origanum majorana* ومرمرية *Salvia officinalis*)

البكتريا السالبة لصبغة كرام	لوحده TiO2*	قطر منطقة التثبيط Inhibition zone مقاسة بالملم							
		Origanum majorana مستخلص مردقوش				*Salvia officinalis* مستخلص مرمرية			
		مردقوش مائي لوحده	مردقوش مائي خلط مع TiO2*	مردقوش كحولي لوحده	مردقوش كحولي خلط مع TiO2*	مرمرية مائي لوحده	مرمرية مائي خلط مع TiO2*	مرمرية كحولي لوحده	مرمرية كحولي خلط مع TiO2*
E. coli 1	6	7	10	0	7	12	14	6	10
E. coli2	8	8	12	0	8	14	15	0	9
E. coli3	8	8	12	0	8	10	12	0	9
Proteus mirabilis	8	8	12	6	8	10	11	8	9
Proteus vulgaris	6	7	11	6	6	8	10	0	8
Pseudomonas aeruginosa	7	7	11	7	7	12	13	7	8
Klebsiella pneumonia	6	7	15	7	6	8	10	6	8
Acinetobacter baumannii	6	7	14	7	6	9	7	6	8

***تركيز اوكسيد التيتانيوم TiO2 1.5 مايكروغرام / مل**

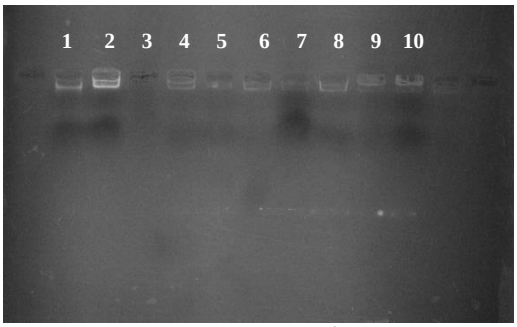
درست فعالية خلط مادة اوكسيد التيتانيوم النانوية TiO2 مع المضادات الحيوية التي قاومتها البكتريا وهي مضادات (Amikacin؛ Cephalothin ؛ Ciprofloxacin) واظهرت النتائج فعالية عالية عند خلط كل من مادة اوكسيد التيتانيوم النانويةTiO2 مع مضاد Ciprofloxacin لجميع العزلات السالبة لصبغة كرام مقارنة باستعمال هذه المادة لوحدها وبلغ قطر منطقة التثبيط (7-8) ملم ؛ واظهرت النتائج فعالية عالية عند خلط مادة اوكسيد التيتانيوم النانوية TiO2 مع مضاد Amikacin اذ بلغ قطر منطقة التثبيط (6-9) ملم لجميع العزلات ماعدا بكتريا *Acinetobacter baumannii* وبكتريا *E. coli3* ، في حين كانت نتائج خلط مادة اوكسيد التيتانيوم النانوية TiO2 مع مضاد Cephalothin فعالية عالية لجميع العزلات وبلغ قطر منطقة التثبيط (7-9) ملم ماعدا بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* التي لم تظهر اي فعالية ضد هذه البكتريا وكما موضح بالجدول (4). وبينت دراسة [5] ان فعالية خلط المادة النانوية مع مجموعة مضادات البيتالاكتام والسيفالوسبورينات والامينوكلايكوسايد ومجموعة Glycolpeptides و Erythromycin و Clindamycin و Tetracycline مع المواد النانوية يؤدي الى زيادة تاثيرالمضادات في البكتريا وان تفاعل المادة النانوية مع الجزيئات البيولوجية للبكتريا التي تحمل شحنة سالبة ومواد الاكاسيد التي تحمل شحنة موجبة وبهذا يخلق مجال كهرومغناطيسي يؤدي الى موت الخلايا فضلا عن ان اتحاد المواد النانوية مع مجموعة الثايول (-SH-) في البروتينات الموجودة في سطح الخلايا يؤدي الى تلف البروتين والتقليل من نفاذية الغشاء الخارجي ومن ثم يؤدي الى قتل البكتريا.

جدول (4) تاثير مادة اوكسيد التيتانيوم النانوية TiO2 لوحدها او خلطها مع بعض المضادات الحيوية.

البكتريا السالبة لصبغة كرام	قطر منطقة التثبيط Inhibition zone مقاسه بالملم								
	Cephalothin			Amikacin			Ciprofloxacin		
	المضاد لوحدة	اوكسيد التيتانيوم النانوي لوحدة	اوكسيد التيتانيوم النانوي خلط مع المضاد	المضاد لوحدة	اوكسيد التيتانيوم النانوي لوحدة	اوكسيد التيتانيوم النانوي خلط مع المضاد	المضاد لوحدة	اوكسيد التيتانيوم النانوي لوحدة	اوكسيد التيتانيوم النانوي خلط مع المضاد
E. coli 1	0	6	7	0	7	9	0	7	8
E. coli2	0	6	8	0	7	8	0	6	7
E. coli3	0	0	7	0	0	0	0	0	7
Proteus mirabilis	0	0	8	0	0	8	0	0	8
Proteus vulgaris	0	0	9	0	0	7	0	0	8
Pseudomonas aeruginosa	0	0	0	0	0	6	0	0	7
Klebsiella pneumonia	0	7	8	0	7	9	0	6	8
Acinetobacter baumannii	0	0	8	0	0	0	0	0	8

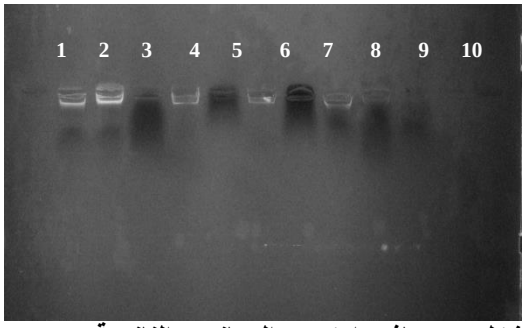
***تركيز اوكسيد التيتانيوم TiO2 1.5 مايكروغرام / مل**

اظهرت النتائج فعالية مادة اوكسيد التيتانيوم النانوية TiO2 لوحدها اوعند خلطها مع المستخلصات النباتية الكحولية في تحطيم DNA الكرموسومي لبكتريا *E. coli* مقارنة بمادة اوكسيد التيتانيوم النانوية TiO2 لوحدها والذي لم يظهرفعالية لتحطيم DNA الكرموسومي وكما موضح بالشكل (2) واظهرت فعالية كل من المستخلصات (المردقوش ؛ الشنان ؛ المرمرية وارقطيون) المائية لوحدها لتحطيم DNA الكرموسومي وعند خلط (المرمرية وارقطيون) مع مادة اوكسيد التيتانيوم النانوي TiO2 الذي اظهرفعالية في تحطيم DNA الكرموسومي للبكتريا في حين لم تظهر كل من مستخلصات (المردقوش والشنان) المائي والمخلوط مع اوكسيد التيتانيوم النانوي TiO2 اي فعالية في تحطيم ال DNA الكرموسومي وكما موضح في الشكل (3). واتفقت النتائج مع [23] الذي بين ان تاثير مادة التيتانيوم TiO2 النانوية ومادة ZnO عند خلطه مع مواد اخرى كالمستخلصات النباتية يعمل على تحطيم DNA في بكتريا *E. coli* الذي بين ان هذه المواد النانوية يمكن ان تعمل على سمية الخلية فضلا عن تاثيرها في الجينوم البكتيري وتاثيرها في الخلايا السرطانية ويمكن ان يصل الى السايتوبلازم وان سمية مادة التيتانيوم تعتمد على حجم ونوع الجسيمات النانوية [24].



شكل (2) تاثير مادة اوكسيد التيتانيوم النانوية TiO2 لوحدها وعند خلطها مع المستخلصات النباتية الكحولية في DNA الكرموسومي لبكتريا *E. coli*.

1. DNA + TE (Tris –EDTA buffer) : سيطرة موجبة
2. DNA + TiO2 لوحدة
3. DNA + مردقوش كحولي لوحدة
4. DNA +TiO2 + مردقوش كحولي
5. DNA + شنان كحولي لوحدة
6. DNA + TiO2 + شنان كحولي
7. DNA + ارقطيون كحولي لوحدة
8. DNA +TiO2 + ارقطيون كحولي
9. DNA + مرمرية كحولي لوحده
10. DNA + TiO2 + مرمرية كحولي



شكل (3) تاثير اوكسيد التيتانيوم النانوية TiO2 لوحدها وعند خلطها مع المستخلصات النباتية المائية في DNA الكرموسومي لبكتريا *E. coli*.

1. DNA + TE (Tris –EDTA buffer) : سيطرة موجبة
2. DNA + TiO2 لوحدة
3. DNA + مردقوش المائي لوحدة
4. DNA +TiO2 + مردقوش المائي
5. DNA + شنان المائي لوحدة
6. DNA + TiO2 + شنان المائي
7. DNA + ارقطيون المائي لوحدة
8. DNA + TiO2 + ارقطيون المائي
9. DNA + مرمرية المائي لوحده
10. DNA + TiO2 + مرمرية المائي

المصادر :

[1]Maurya, A.; Chauhan, P.; Mishra, A. and Pandey, A. K. 2012. Surface Functionalization of TiO2 with plant extracts and their combined Antimicrobial Activities against *E. faecalis* and *E. coli*. Journal of Research updates in polymer Science .1: 43-51.

[2]Yu, B.; Leung, K. M.; Guo, Q.; Lau, W. M. and Yang, J. 2011. Synthesis of Ag-TiO2 composite nano thin film for antimicrobial application. Nanotechnology. 23:1-9.

[3]Sungkaworn, T; Triampo, W.; Nalakarn, P.; Triampo, D.; Tang, I. M.; Lenbury, Y. and Picha, P. 2007. The effects of TiO2 nanoparticles on tumor cell colonies: Fractal dimension and morphological properties. International journal of Biological and Medical Sciences. 2, 1: 67-74.

[4]Haghi, M.; Hekmatafshar, M.; Janipour, M. B.; Gholizadeh, S. S.; Faraz, M. K.; Sayyadifar, F. and Ghaedi, M. 2012. Antibacterial effect of TiO2 nanoparticles on pathogenic strain of *E. coli*. International journal

Clinical and Laboratory Standards Institute.

[12] Sato, J.; Goto, K.; Nanjo, F.; Kowai, S. and Murata, K. 2000. Antifungal activity of plant extracts against *Arthrinium sacchari* and *Chaetomium funicola*. J.Biosci.Bioeng.90 (4):442-446.

[13] Jesline, A.; John, N. P.; Vani, C. and Nurugan, S. 2014. Antimicrobial activity of zinc and titanium dioxide nanoparticles against biofilm – producing methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Appl. Nanosci.13:1-6.

[14] Christensen, G. D.; Bisno, A. L.; Parisi, J. T.; McLaughlin, B.; Hesterm, M. G. and Luther, R. W. 1982. Nosocomial septicemia due to multiply antibiotic resistant *Staphylococcus epidermidis*. Ann Intern Med.96:1–10.

[15] Sambrook, J. and Russell, D. W. 2001. Molecular cloning in: A Laboratory manual cold Spring Harbor. New York, USA. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

[16] Feglo, P. and Opoku, S. 2014. AmpC beta-lactamase production among *Pseudomonas aeruginosa* and Proteus mirabilis isolates at the Komfo Anoke Teaching Hospital, Kumasi, Ghana. Journal of Microbiology and Antimicrobials. 6(1):13-20.

[17] Siqueira, V. L. D.; Cardosa, R. F.; Padua, R. A. F.; Caleffi-Ferracioli, K. R.; Helbel, C.; Santos, A. C. B.; Aoki, E. E. and Nakamura, C. V. 2013. High genetic diversity among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter spp*. Isolate in a public hospital in Brazil. Brazillin Journal of Pharmaceutical Sciences. 49(1):49-56.

[18] Aboulmagd, E. and Alsultan, A. A. 2014. Synergic bactericidal activity of novel antibiotic combination against extreme drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* of Advanced Biotechnology and Research. 3(3): 621-624.

[5] Roy, A. S.; Parveen, A.; Koppalkar, A. R.; Ambika Prasad, M.V. N. 2010. Effect of nano-titanium Dioxide with different antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology.1:37-41.

[6] Thomas, A.; Shailaja Raj, M. and Venkataramana, J. 2014. Antimicrobial activity of TiO2, Nanoparticles against microbial isolates causing dental plaques. International Journal of Bioassays. 3106-3110.

[7] Saadat., M. ; Mohammadi, S. R. and Eskandari, M. 2013. Evaluation of Antibacterial Activity of ZnO and TiO2 Nanoparticles on Planktonic and Biofilm Cells of *Pseudomonas aeruginosa*. Biosciences biotechnology Research Asia. 10 (2): 629-635.

[8] Martincz-Gutierrez, F.; Olive, P.; Banuelos, A.; Orrantia, E.; Nino, N.; Sanchez, E.; Ruiz, F.; Bach, H. and Av-Gay; Y. 2010. Synthesis, characterization, and evaluation of antimicrobial and cytotoxic effect of silver and titanium nanoparticles. Nano medicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. 6 (Issue 5): 681–688.

[9] Baron, E. J.; Finegold, S. M. and Peterson, I. L. R. 2007. Bailey and Scott‹s diagnostic microbiology 9th ed. Mosby Company. Missouri.

[10] Vandepitte, J.; Verhaegen, J.; Engbaek, K.; Rohner, P.; Piot, P. and Heuck, C. C. 2003. Basic laboratory procedures in clinical Bacteriology. 2nd ed. World Health Organization Geneva. PP. 109-120.

[11] CLSI 2012. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. CLSI document M 100-S22. Wayne, PA:

[22] Abu-Shanab, B.; Adwan, G.; Abu-Safiya, D.; Jarrar, N. and Adwan, K. 2004. Antibacterial Activities of Some Plant Extracts Utilized in Popular Medicine in Palestine. Turk J Biol. 28: 99-102.

[23] Zhu, R. R.; Wang, S. L.; Chao, J.; Shi, D. L. ; Zhang, R.; Sun, X. Y. and Yao, S. D. 2009. Bio-effects of Nano-TiO_2 on DNA and cellular ultrastructure with different polymorph and size. Materials Science and Engineering. 29 (Issue 3): 691–696.

[24] Kumar, A.; Pandey, A. K.; Singh, S. S.; Shanker, R. and Dhawan, A. 2011. Engineered ZnO and TiO_2 nanoparticles induce oxidative stress and DNA damage leading to reduced viability of *Escherichia coli*. Free Radical Biology and Medicine. 51(Issue 10):1872–1881.

baumannii. African Journal of Microbiology Research. 8(9):856-861.

[19] Ercan, U. E.; Joshi, S. S.; Yost, A.; Gogotsi, N.; OToole, S.; Paff, M.; Melchior, E. and Joshi, S. G. 2014. Inhibition of biofilms by non-thermal plasma treated novel solution. Advance in Microbiology. 4:1188-1196.

[20] EL Asial, Z. Y.; Ashour, A. and Kerrit, A. A. M. 2005. Antimicrobial activity of some medicinal plant extracts in Palestine. Pak. J. Med. Sci. 21 (2): 187-193.

[21] joshi, B.; Lekhak, S. and Sharma, A. 2009. Antibacterial Property of Different Medicinal Plants: *Ocimum sanctum*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Xanthoxylum armatum* and *Origanum majorana*. Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology. 5 (1): 143- 150.

A Study the Effect of TiO2 Nanoparticles Combination with Antibiotics and Plant extracts Against Some Gram Negative Bacteria

Rana Mujahid Abdullah

Department of Biology, College of Education for pure science Ibn-Al Haitham, University of Baghdad.

Received 25 /5 /2015
Accepted 21 /9 /2015

Abstract:

Titanium dioxide TiO2 has been widely utilized in cleaning and sterilizing material for many clinical tools sanitary ware, food tableware and cooking and items for use in hospitals. Titanium dioxide TiO2 non toxicity and long term physical and chemical stability. It has been widely used decomposition of organic compounds and microbial organisms such as cancer cell, viruses and bacteria as well as its potential application in sterilization of medical devices. The aim of the study the effect of titanium dioxide TiO2 on some Gram negative bacteria and study their effects on some virulence factors and chromosomal DNA.

In this study, we obtained (*E. coli* ، *Proteus mirabilis*، *Proteus vulgaris* ، *Pseudomonas aeruginosa* ، *Klebsiella pneumonia* and *Acinetobacter baumannii*) from Al-Emamain Al-Kadhemain Medical City Hospital in Baghdad. Samples collection were carried out from 1 April to 30 June 2014 .Study the effect of (plant extraction and Antibiotic) alone and combination with Titanium dioxide TiO2 on bacteria growth. And study the effect of Titanium dioxide TiO2 on biofilm layer and chromosomal DNA.

Combinations of TiO2 nanoparticle with water and alcohol extracts of plant (*Salvia officinalis*، *Arctium minus*, *Origanum majorana and Anabasis syriaca*) gave synergistic results against the gram negative bacterial isolates.

A Synergism effect was observed in combination of Ciprofloxacin with Titanium TiO2 nanoparticles toward all Gram negative bacteria. Also a high efficiency was observed when TiO2 nanoparticles mixed with Amikacin toward all isolates except *Acinetobacter baumannii* and *E. coli3*. While the results of mixing TiO2 nanoparticles with Cephalothin indicate highly efficiency toward all isolates except *Pseudomonas aeruginosa*.

The combination of plant extracts (*Salvia officinalis* ، *Arctium minus* ، Origanum *majorana* and *Anabasis syriaca*) with TiO2 nanoparticles was appear to be damaged to *E. coli* chromosomal DNA.

The study showed the ability of nanoparticles TiO2 to inhibition of the layer Biofilm to all isolates of bacteria at concentrations (1, 1.5) µg/ ml.

Conclude from this study we can be used TiO2 nanoparticles to kill some types of bacteria

Key word: TiO2 nanoparticle, Antibiotic resistance, DNA.