MENOUFIA JOURNAL OF
AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY

https://mjab.journals.ekb.eg

Title of thesis : Effect of some nano-particles elements on reducing antibiotics resistance.

Name of Applicant : Ameen Hussein Ameen Mohamed

Scientific Degree : M.Sc.

Department : Biotechnology

Field of study : Microbiology

Date of Conferment : Jul. 20 , 2025

Supervision Committee:

- Dr. A. E. Elbeltagy : Prof. of Agriculture Microbiology, Fac. of Agric., Menoufia Univ.
- Dr. S. M. Abd El-Gawad: Prof. of Biochemistry, Fac. of Agric., Menoufia Univ.

SUMMARY

The current study aimed to isolate and diagnose multiple antibiotic-resistant S. aureus (SA), especially ORSA, MRSA (Oxacillin or Methicillin Resistant SA), and VISA, VRSA (Vancomycin-intermediate or Resistant SA) from different diabetic foot ulcers. In addition to studying the prevalence of resistance to treatments with the presence of various types of zinc nano-particles among the resistant bacterial isolates and determining the minimum inhibitory concentration (MIC) of specific antibiotics, zinc oxide, and peroxide in nano-sizes, and the synergistic effect of selected antibiotics as a protocol procedure of treatment with routine antibiotics.

The obtained results can be summarized in the following points:

1. isolation and identification of MDR *S. aureus* isolates.

The DFU clinical samples (108) were enumerated in MSA and/or ORSAB culture media; the total positive samples (87) were obtained from the pus, wounds, and the infected skin surface. All isolates were identified as *Staphylococcus* species. However, the MDR species of *S. aureus* was represented at 21.3% among all other staphylococcal DFU causes. The heterogonous $_{H}$ORSA, MRSA, and VISA S. aureus represent percentages of 14.81, 4.63, and 1.85%, respectively. While no evidence exists to detect each VRSA or LRSA S. aureus phenotype. Otherwise, the (23) MDR *S. aureus* isolates were (16) $_{H}$ORSA, (5) MRSA, and (2) VISA. These isolates were given lab code names by SMG $_{HORSA}$ (1-16), SMG $_{MRSA}$ (17-21), and SMG $_{VISA}$ (22-23).

2. Characterization of ZnO and ZnO_2-nano-particles

The XRD peaks were consistent with ZnO or ZnO_2 crystallites; each peak has been indexed to the standard hexagonal wurtzite structure of ZnO or the standard cubic ZnO_2 crystal structure. The obtained FTIR spectrum of synthetic Zinc-NP samples confirmed the product purity. However, Transmission Electron Microscopy TEM is used to analyze the crystal structure. It was observed that the morphology of ZnO-NPs has grown in a near-hexagonal shape, and the powder consists of quasi-spherical nano-particles. The majority of ZnO-NPs measured fell in the range of 30-50 nm with an average size of 40 nm. Also, the TEM images of synthetic ZnO_2-NPs demonstrate the possibility of precise determination of spherical nano-particles with average sizes in the range of 20-40 nm, with an average size of 30 nm.

3. Determination of MIC and syn-MIC for MDR *S. aureus* isolates.

Zinc-NP treatment inhibited the growth of ORSA, MRSA, and VISA phenotypes, with ZnO-NPs and ZnO_2-NPs having individual MIC averages of 5.21 and 6.34 mM/ml, respectively. They provide MIC averages of 3.49, 2.6, 2.99, and 1.99 µg/ml for individual antibiotics (OX, FOX, VA, and LN). Using MIC µg/ml antibiotics with mM/ml Zinc-NPs (1: 1) resulted in decreased syn-MIC inhibition values, with

synergistic effect percentages of 309, 441, 299, and 316%, respectively, for supported antibiotics with ZnO-NPs. Furthermore, antibiotics supported by ZnO_2-NPs have a synergistic effect, with percentage values of 237, 260, 243, and 219%, respectively. In addition, the individual minimal bactericidal concentrations (MBCs) for ZnO-NPs and ZnO_2-NPs were determined, with averages ranging from 10.32 to 11.08 and 12.54 to 13.28 mM/ml, respectively.

4. The toxicity effect of zinc nano-particles and Bioassays.

The effects of zinc-nano-particle types on adult male Wistar rats were determined by liver function biochemical assays and histopathological features. The data observed an abnormal increase in serum ALT concentrations compared to the control mice as a result of being treated with 400 mg/kg of zinc or its peroxides nano-particles, which may suggest liver hepatotoxicity. The main observation was that the group treated with ZnO-NPs clearly showed unfocal porto-portal and porto-central fibrosis. So, a clinical dose of Zn or Zinc-NPs might produce adverse effects, as Zn^{+2} ions accumulate in the liver and decrease the elimination rate, leading to their accumulation and associated with toxic side effects.

5. Conclusion.

The present data support the efficiency of Zinc-NPs as an antimicrobial agent in the treatment of MDR *S. aureus* infections. Although we did not observe any resistance to Vancomycin or Linezolid among the MDR isolates, we should carefully monitor the antibiotic selection pressure and creeping MIC to aid in early detection of the emergence of resistance. Also, this study highlights the restricted use of non-suitable antibiotics for Methicillin susceptible or Vancomycin-Linezolid only for ORSA, MRSA, and VISA *S. aureus* isolates. One should also explore alternative therapeutic options, such as synergism with nano-particles, especially ZnO2-NPs, for less severe MDR infections, thereby preserving Vancomycin-Linezolid for life-threatening severe infections. Continuous monitoring of the MIC shifts, even in the susceptible range, may facilitate the early recognition of the emergence of resistant bacterial isolates from DFU patients. This study also highlights the fact that ORSA, MRSA, and VISA infections need to be controlled rather than treated, as there is always a threat of the development of resistance by new mechanisms.

Recommendations:

This study recommends incorporating ZnO_2-NPs as an adjuvant with other antibiotics targeting MDR S. aureus, based on the promising findings obtained herein, to control DFU infection with this pathogen. This finding indicates a synergistic effect of the combination of various Zn-NPs and tested antibiotics, so we are suggesting that the ZnO_2-NPs are promising nano-metal super oxides that are potentially valued for safe biomedical treatment of diabetic foot ulcers by reducing the resistant associated bacterial phenotypes.

عنوان الرسالة: تأثير الجزيئات النانوميترية لبعض العناصر على تقليل مقاومة المضادات الحيوية

اسم الباحث: أمين حسين أمين محمد

الدرجة العلمية: الماجستر فى العلوم الزراعية

القسم العلمي: النبات الزراعى (الميكروبيولوجيا الزراعية)

تاريخ موافقة مجلس الكلية: ٢٠٢٥/٧/٢٠

لجنة الإشراف: أ.د. عادل السيد البلتاجي أستاذ الميكروبيولوجيا الزراعية، كلية الزراعة، جامعة المنوفية

أ.د. صلاح منصور عبد الجواد أستاذ الكيمياء الحيوية الزراعية، كلية الزراعة، جامعة المنوفية

الملخص العربي

تهدف الدراسة الحالية إلى عزل وتشخيص البكتيريا العنقودية الذهبية متعددة المقاومة للمضادات الحيوية، وخاصة المقاومة منها للأوكسيسلين ORSA والميثيسلين MRSA ومن ثم المتوسطة والمقاومة للفانكومايسين VISA وVRSA والمتلازمة لقرح القدم السكري المختلفة. بالإضافة إلى دراسة الحد من انتشار مقاومة العلاجات بالمضادات الحيوية باستخدام أنواع مختلفة من جزيئات الزنك النانوميترية بين العزلات البكتيرية المقاومة وكذلك تحديد الحد الأدنى للتركيز المثبط للمضادات الحيوية وكذلك أكسيد الزنك ZnO وصورة أخري مثل بيروكسيد الزنك ZnO_2 بأحجامهم النانوميترية ودراسة التأثير التآزري للمضادات الحيوية المستخدمة كإجراء بروتوكولي للعلاج بالمضادات الحيوية الروتينية.

وهكذا يمكن تلخيص النتائج التي تم الحصول عليها في النقاط التالية :

١. عزل وتعريف عزلات المكورات العنقودية الذهبية متعددة المقاومة للمضادات الحيوية.

تم تنمية العينات المرضية لـ (١٠٨) عينة من عينات قرح القدم السكري علي بيئات الزراعة MSA و/أو ORSAB، فكانت إجمالي العينات الإيجابية المعزولة (٨٧) عزلة والتي تم أخذها من الصديد والجروح وسطح الجلد المصاب. حيث تم تعريف جميع العزلات على أنها من أنواع المكورات العنقودية الذهبية. وقد مثلت الأنواع متعددة المقاومة للمضادات الحيوية لـ *S. aureus* نسبة ٢١,٣٪ بين جميع المسببات العنقودية الذهبية الأخرى. وقد مثلت المكورات العنقودية الذهبية غير المتجانسة HORSA وMRSA وVISA نسبًا مئوية قدرها ١٤,٨١ و٤,٦٣ و١,٨٥٪ على التوالي. في حين لا يشير أي دليل إلى وجود كل من النمط الظاهري VRSA أو LRSA لـ *S. aureus*. بخلاف ذلك، كانت الـ (٢٣) عزلة من المكورات العنقودية الذهبية متعددة المقاومة للمضادات الحيوية هي كالتالي (١٦) $_H$ORSA، MRSA (5) و(٢) VISA، وقد أعطيت هذه العزلات أكواد معملية (1-16) SMG_{HORSA}، SMG_{MRSA} (١٧-٢١) وSMG_{VISA} (٢٢-٢٣).

٢. توصيف جزيئات أكسيد الزنك وبيروكسيد الزنك النانوميترية.

كانت المنحنيات المقدرة بأشعة أكس XRD متوافقة مع نموذج بلورات ZnO أو ZnO_2، وقد تم إرجاع كل قمة إلى بنية wurtzite السداسية القياسية لـ ZnO أو بنية بلورة ZnO_2 المكعبة القياسية. في حين أكد طيف الأشعة تحت الحمراء FTIR والذي تم الحصول عليه من عينات Zinc-NPs المخلقة نقاء المنتج. وكذلك، تم استخدام المجهر الإلكتروني النافذ TEM لتحليل البنية البلورية، وقد لوحظ أن مورفولوجيا ZnO-NPs قد تشكلت في شكل شبه سداسي، حيث تكون المسحوق من جسيمات نانوية شبه كروية. وقدرت غالبية ZnO-NPs المقاسة في نطاق ٣٠-٥٠ نانومتر بمتوسط حجم ٤٠ نانومتر. أيضًا، وضحت صور المجهر الإلكتروني النافذ لجسيمات ZnO_2-NPs المخلقة إمكانية التشكل في جسيمات نانومتريه كروية ذات أحجام متوسطة تتراوح في نطاق ٢٠-٤٠ نانومتر بمتوسط حجم ٣٠ نانومتر.

٣. تقدير قيم أقل تأثير مثبط MIC وأقل تأثير تآزري syn-MIC لعزلات *S. aureus* المقاومة.

أدى العلاج باستخدام جسيمات الزنك النانوية إلى تثبيط نمو النمط الظاهري ORSA وMRSA وVISA بمتوسط MIC فردي قدره ٥,٢١ و٦,٣٤ مللي مول / مل لجسيمات ZnO-NP وجسيمات ZnO_2-NP على التوالي. في حين أنها أعطت متوسطات MIC قدرها ٣,٤٩ و٢,٦ و٢,٩٩ و١,٩٩ ميكروجرام / مل للمضادات الحيوية الفردية (OX وFOX وVA وLN) على التوالي. وفي نفس الجانب، أدى استخدام قيم MIC للمضادات الحيوية المدعومة بقيم MIC لنوعين من جسيمات الزنك النانوية بنسبة (١: ١) إلى انخفاض في قيم التثبيط MICs التآزري مع نسبة تأثير بلغت ٣٠٩ و٤٤١ و٢٩٩ و٣١٦٪ على التوالي للمضادات الحيوية المدعومة بـ ZnO-NPs. كما أن المضادات الحيوية المدعمة بجسيمات نانوية من نوع ZnO_2 كان لها نسبة تأثير تآزري بلغت ٢٣٧ و٢٦٠ و٢٤٣ و٢١٩% على التوالي. بالإضافة إلى ذلك، تم تحديد قيم التركيزات القاتلة الدنيا الفردية MBCs، والتي كانت في المتوسط من ١٠,٣٢ إلى ١١,٠٨ ومن ١٢,٥٤ إلى ١٣,٢٨ مللي مول/ مل للجسيمات النانوية من النوع ZnO والجسيمات النانوية من النوع ZnO_2 على التوالي.

٤. التأثير السمي والاختبارات الحيوية لجسيمات الزنك النانوميترية .

تم تحديد التأثيرات الحيوية لأنواع جزيئات الزنك النانوية على مجموعات ذكور الفئران من النوع ويستار البالغين من خلال اختبارات وظائف الكبد البيوكيميائية وكذلك السمات النسيجية المرضية. حيث سجلت المؤشرات زيادة غير طبيعية في تركيزات ALT في المصل مقارنة بمجموعة الفئران الكنترول كنتيجة للعلاج بـ ٤٠٠ مجم / كجم من جزيئات أكسيد الزنك أو بيرو كسيداته النانوميترية، مما قد يشير إلى حدوث سمية بالكبد. وكانت الملاحظة الرئيسية علي المجموعة المعالجة بجسيمات أكسيد الزنك النانوميترية والتي أظهرت بوضوح تليفًا غير بؤري في البوابات الكبدية والبوابة الكبدية المركزية. وهكذا لوحظ أن المعاملات بجرعات من عنصر الزنك أو جزيئات الزنك النانوية بتفاوت قد تنتج آثارًا ضارة، حيث تتراكم أيونات الزنك $^{+2}$ في خلايا الكبد وتقلل من معدل التخلص الطبيعي، مما يؤدي إلى تراكمها ويصاحبها آثار جانبية سامة.

٥- التوصيات:

حيث جاءت أهم التوصيات بالدراسة علي دمج جسيمات أكسيد الزنك النانوية كمواد مساعدة مع المضادات الحيوية الأخرى التي تستهدف المكورات العنقودية الذهبية للمضادات الحيوية بناءً على النتائج الواعدة التي تم الحصول عليها من أجل السيطرة على عدوى قرح القدم السكري حيث أشارت النتائج إلى تأثير تآزري واضح عند الجمع بين جسيمات أكسيد الزنك النانوية المختلفة والمضادات الحيوية المختبرة، لذلك نقترح أن جسيمات الزنك النانوميترية هي أكاسيد معدنية نانوية واعدة يمكن وصفها لعلاج قرح القدم السكري بأمان عن طريق تقليل النمط الظاهري للبكتيريا المقاومة المرتبطة.