دراسة تأثير الكايتوسان النانوي في تثبيط بكتريا *Staphylococcus aureus* المعزولة من الجروح

شهباء حميد مجيد
قسم العلوم ـ كلية التربية الاساسية ـ الجامعة المستنصرية

مستخلص البحث:
هدفت هذه الدراسة اختبار كفاءه الكايتوسان النانوي في تثبيط نمو بكتيريا *Staphylococcus aureus* حيث تم الحصول على 25 عزله من حالات الإصابة بالجروح، وتم الحصول عليها من قسم علوم الحياه كلية العلوم الجامعة المستنصرية حيث بينت النتائج ان جميع العزلات البكتيرية قيد الدراسة قابليتها على انتاج الغشاء الحيوي وبنسبه 100% ولكن بدرجات متفاوتة من حيث شده تكوين الغشاء الحيوي. اظهرت النتائج ان اضافة الكايتوسان النانوي وبنسبه 2% و4% و6% الى الحد من نمو البكتيريا قيد الدراسة وبنسب مختلفة، اذ بلغ اعلى قطر للتثبيط عند تركيز 6% هو (18 - 21)ملم، وكان قطر التثبيط عند تركيز 4% هو(15 - 20)ملم، بينما كان اقل قطر للتثبيط هو (3 - 5)ملم عند تركيز 2%.

الكلمات المفتاحية: الكايتوسان النانوي، بكتريا *Staphylococcus aureus*، الغشاء الحيوي، قطر التثبيط.

المقدمة:
يعد الكايتوسان من البوليمرات الحيوية متعدد السكريات ويتكون من وحدات من الجلوكوز امين المرتبطة مع بعضها بأواصر كلايكوسيدية من نوع (1)، (El Amerany, F واخرون، 2020). حيث يمتلك الكايتوسان ثلاثة مجاميع وظيفية فعاله وهي مجموعه الامين ومجموعتي كاربوكسيل الأولية و الثانوية في موقع ذرات الكربون (C-2، C-3، C-6) على التوالي اذ تضفي هذه المجاميع للكايتوسان خواصا يمكن الاستفادة منها في مختلف المجالات التطبيقية الطبية و الصيدلانية وفي تصنيع الأغذية (Shahidi, F واخرون، 1999) لقد وجد الاهتمام الكبير بالمواد القائمة على الكايتوسان اذ يرجع الطلب في زيادة استعمال الكايتوسان بدلا من الكيتين الى الفعالية الكبيرة في سلسله البوليميرية التي يكونها ومنها قابليه ذوبان الكايتوسان في المحاليل الحامضية الضعيفة (Rinaudo, M، 2006). ويتم الحصول عليه عن طريق ازاله القلويات من الكايتين وهو احد اكثر البوليمرات الطبيعية وفره. والتي يتم استخراجه من الهيكل الخارجي للقشريات والاصداف والمحار وكذلك جدران الروبيان وجدران الخلايا لبعض الفطريات مثل: Mucor (Sathiyabama, M، 2014). ان بكتيريا المكورات العنقوديه *Staphylococcus aureus* من انواع البكتيريا الموجبة لصبغه كرام و المهمة و الواسعة الانتشار ويمكن ان تسبب انواع مختلفة من الامراض في اجزاء مختلفة من الجسم، وهي بكتيريا كرويه الشكل وتسبب عدوى جلدية ويمكن ان تسبب التهاب رئوي وعدوى صمامات القلب وحالات عدوى العظام (Yang, M، 2022). وغيرها كما تمتاز هذه البكتيريا بمقاومتها العالية اتجاه المضادات الحيوية ويعود ذلك الى

تكون سلالات جديده من هذه الانواع من البكتيريا المقاومة او بسبب نوع المضاد الحيوي التي تقاومها، وخاصة في اماكن العمل بالمستشفيات و المراكز الصحية ولان المضادات تستخدم على نطاق واسع في المستشفيات، وكذلك بسبب امتلاكها لعوامل الضراوة و العديدة منها الغشاء الحيوي والذي يزيد من شده إمراضيها (Arunachalam, K، واخرون 2023). وكثره استخدام المضادات الحيوية في علاج البكتيريا ادى الى احداث هذه المقاومة للمضادات الحيوية وذلك عن طريق انتقال بلازميدات المقاومة بين الانواع البكتيريا المكونة للغشاء الحيوي بعمليه الاستشعار بالنصاب (Mudgil, P. و Nikolic, P ،2023) حيث ساعدت البكتيريا على بقائها في ظروف قاسيه (Arunachalam, K، واخرون 2023).لقد استخدمت عده طرق بيولوجية جديده في الحد من انتشار هذه البكتيريا ومقاومتها للمضادات الحيوية وتثبيط نموها حيث اتجهت الدراسات الجديدة الى استخدام التقنية النانوية بما اثبتت من فعالية كبيره في تثبيط بعض المسببات المرضية في الاحياء المجهرية (Quiterio-Gutiérrez, T واخرون،219) وذلك بسبب الخصائص الكيميائية و الفيزيائية مميزه لهذه الجزيئات النانوية والتي تؤدي الى زياده مساحه التلامس مع المسببات المرضية بالتالي تثبيطها وعدم نموها (Van, S. N و اخرون 2013 ، Taurozzi, J. S و اخرون،2011).

حيث ساعدت المواد النانوية على نطاق (الكايتوسان النانوي) واسع كعوامل مضادة للبكتيريا في الصناعات الصحية وتخزين الأغذية وتثبيت نشاط الفطريات المسبب للأمراض النباتية وعدد من التطبيقات الطبية مثل تعزيز التئام الجروح والنشاط المضاد للعدوى و الأنشطة المضادة للحموضة و القرحة التي تمنع او تضعف تهيج المعدة الناجم عن الأدوية و تأثيراتها (Pan, W. A واخرون، 2009، Singh,A. واخرون ،2021).

المواد و طرائق العمل:

1- العزلات البكتيرية: تم الحصول على العزلات البكتيرية مشخصة من قبل قسم علوم الحياة/ كليه العلوم/ الجامعة المستنصرية و المعزولة من حالات الإصابة بالجروح بواقع 25 عزلة.

2- الكايتوسان النانوي:

تم الحصول على الكايتوسان النانوي من مكتب الدكتور زهير شفيق الطائي/ مكتب البشير باب/ المعظم ثم ارسلت للفحص في كلية العلوم/ جامعة بغداد قسم الكيمياء/ الدكتور عبد الكريم علي السامرائي لقياس حجمها و التأكد من الوصول الى الحجم النانوي بواسطه مجهر القوه الذرية (Angstrom advanced INC- USA AFM Contactriod SPM AA3000)وكان مصدر الكايتوسان النانوي المستعمل مستخرج من جدار الروبيان.

3- الكشف عن فعالية البكتيريا في تكوين الغشاء الحيوي:

تم الكشف عن قابليه العزلات البكتيرية على تكوين الغشاء الحيوي بطريقه الانابيب وذلك بزرع 5 ملليمتر من وسط المرق المغذي Mueller–Hinton agar بعزلات بكتيريا *Staphylococcus aureus* وتحت درجه حراره 37م لمده 48 ساعة، وتم التخلص من محتويات الأنبوبة بعناية واضافة صبغة البلور البنفسجي بتركيز 1% لمده 7 – 10 دقائق بعدها لوحظ تكون الغشاء الحيوي بشكل طبقه ملتصقة بالجدار الداخلي للأنبوبة بالعين المجردة وان سمك وشده لون الغشاء يعتمد على كميه الغشاء الحيوي المنتج (Taurozzi, J. S واخرون،2011).

4- دراسة تأثير تراكيز الكايتوسان النانوي في نمو العزلات البكتيرية:

استعملت طريقه الانتشار في الحفر Well diffusion Agar لأختبار حساسية البكتيريا اتجاه الكايتوسان النانوي وبالاعتماد على ما ورد في (Murakami, Y واخرون،2002) كما يلي:

1- لقح سطح وسط اكار مولر هنتون (Mueller–Hinton agar) بواسطه قطيلة معقمه من مزروع البكتيريا الحاوي على (1.5 $\times 10^8$) خلية/ ملليتر ثم تركت الاطباق لتجف بدرجة حرارة الغرفة لمده 15 دقيقه.

2- عملت حفر بقطر 5 ملم في الوسط المزروع بواسطة الثاقب الفليني المعقم (Cork porer).

3- حضنت تراكيز متدرجة من التركيز الاصلي للكايتوسان النانوي باستعمال ماء مقطر بالنسب التالية (2%، 4%، 6%) ملغم/ملليتر.

4- أضيف مقدار 0.1 ملليتر من التراكيز اعلاه لكل حفره وبالتسلسل وعملت حفرة السيطرة المتمثلة بإضافة ماء مقطر حضنت الاطباق بدرجه حراره 37م لمده 24 ساعة.

5- حددت فعالية كل تركيز من الكايتوسان النانوي لقياس قطر التثبيط حول كل حفرة.

النتائج و المناقشة:

بينت نتائج جميع العزلات البكتيرية قابليتها على تكوين غشاء حيوي وبنسبه 100% ولكن بدرجات متفاوتة من حيث شدة تكوين الغشاء الحيوي حيث كانت (10) عزلات من البكتيريا ذات انتاجية عالية للغشاء الحيوي وبنسبه (40%)، في حين كانت (7) عزلات وبنسبة 28(%) ذات انتاجيه متوسطة من الغشاء فيما اظهرت (8) عزلات من البكتيريا ذات انتاجية قليلة للغشاء الحيوي وبنسبه (32%) مقارنة مع السيطرة، و كما مبين بالجدول (1).

وقد استعملت ثلاثة عزلات من البكتيريا التي اثبتت قدرتها العالية على تكوين الغشاء الحيوي للتجارب القادمة.

جدول(1) شدة تكوين الغشاء الحيوي من قبل بكتيريا *Staphylococcus aureus* المعزولة من الجروح

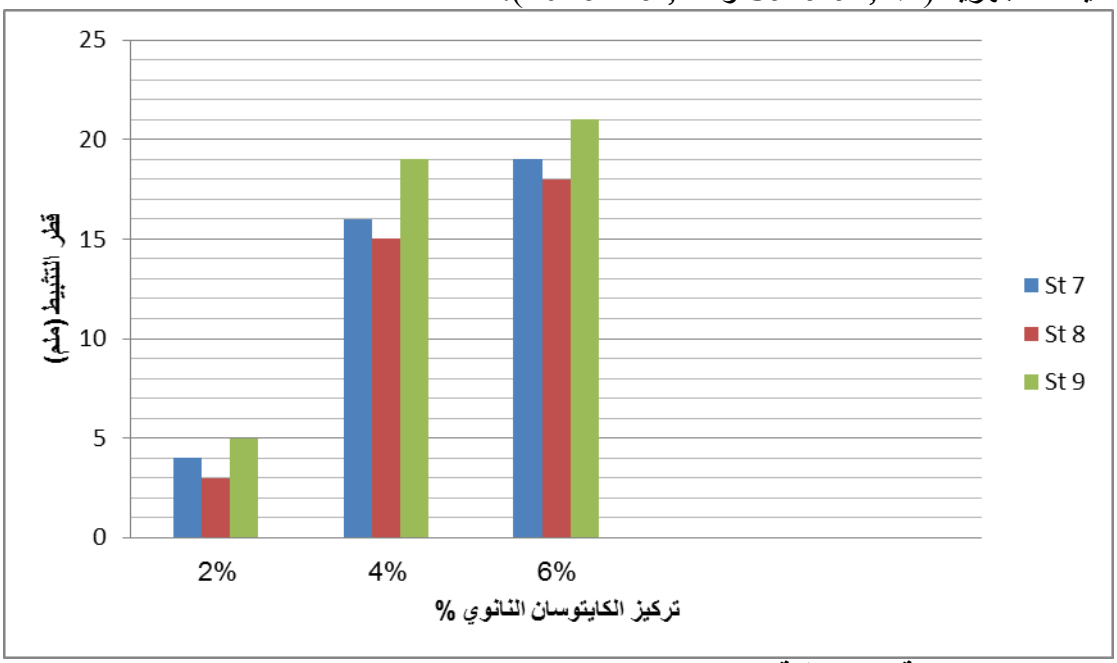
العزلات	شدة تكوين الغشاء الحيوي
10	+++
7	++
8	+
السيطرة	-

(+++) إنتاجية عالية، (++) إنتاجية متوسطة، (+) إنتاجية قليلة (-) سيطرة (وسط المرق المغذي)

ان تكوين الغشاء الحيوي وانتاجه يعد من عوامل الضراوة من قبل بعض الاحياء المجهرية المنتجة لها اذ يساهم الغشاء دورا مهما في امراضية البكتيريا لان البكتيريا تكون مغمورة في بروتينات المضيف والطبق المخاطية الميكروبية التي توفر بدورها مكان مناسب لنمو البكتيريا والكائنات الاخرى مما يزيد من مقاومة البكتيريا للمضادات الحياتية (Santo, E واخرون،2006).

الفعالية التثبيطية للكايتوسان النانوي ضد بكتريا *Staphylococcus aureus*:

اظهرت نتائج اضافة الكايتوسان النانوي الى الوسط الزرعي مولر هنتون بطريقة الانتشار في الحفر و بتراكيز مختلفة حسب التراكيز المضافة الى الوسط حيث سجلت اعلى نسبه للتثبيط عند تركيز 6% وكان اعلى قطر للتثبيط بمعدل (18 – 21)ملم في البكتيريا قيد الدراسة و المعزولة من الجروح، في حين كان اعلى قطر للتثبيط بمعدل (15 – 20)ملم من البكتيريا وعند تركيز 4%، في حين كان اقل معدل للتثبيط عند تركيز 2% وبقطر (3 - 5)ملم للعزلات البكتيرية قيد الدراسة كما في الشكل (1). وهذا يتفق ما جاء به (ال منهل،2013). حيث اظهرت البيانات ان الكايتوسان النانوي يمكن ان يثبط بشكل فعال في نمو مسببات الامراض الانتهازية مثل بكتيريا *Staphylococcus aureus*، حيث ان الجسيمات النانوية من الكايتوسان اظهرت نشاطا مضادا للأحياء المجهرية(Al-Zahrani,S. واخرون,2021) ، من خلال تفاعل هذه الايونات النانوية المحضرة مع الغشاء الميكروبي لهذه البكتيريا مما تسبب في حدوث تغيرات في نفاذية الغشاء الحيوي من خلال التأثير على وظيفة الانزيمات المرتبطة بالغشاء (Qin, C واخرون، 2006) حيث يعمل على غلق القنوات على سطح الخلية وبالتالي منع نقل العناصر الغذائية الأساسية التي تعتبر ضرورية لبقاء الخلايا الميكروبية او قد تتفاعل مع الاحماض النووية المكونة للبكتيريا وتمنع تكاثرها وبالتالي موت الخلية البكتيرية (Yien, L واخرون،2012).وهذا يدل على اهمية المادة النانوية في زيادة كفاءة مادة الكايتوسان في تثبيط نمو الاحياء المجهرية (Saharan, V و Pal, A، 2016).



شكل (1) الفعالية التثبيطية للكايتوسان النانوي تجاه عزلات بكتيريا *Staphylococcus aureus* المعزولة من الجروح .

المصادر:

- **Al-Zahrani**, S. S., Bora, R. S., & Al-Garni, S. M. (2021). Antimicrobial activity of chitosan nanoparticles. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 35(1), 1874-1880.
- **ال منهل،** علاء جبار عبد.(2013). دراسة امكانية زيادة القابلية الخزنية للحوم باستعمال الكايتوسان. مجلة ابحاث البصرة (العلميات).العدد39. الجزء B1.
- **Arunachalam**, K., Pandurangan, P., Shi, C., & Lagoa, R. (2023). Regulation of Staphylococcus aureus virulence and application of nanotherapeutics to eradicate s. aureus infection. *Pharmaceutics*, *15*(2), 310.
- **El Amerany**, F., Rhazi, M., Wahbi, S., Taourirte, M., & Meddich, A. (2020). The effect of chitosan, arbuscular mycorrhizal fungi, and compost applied individually or in combination on growth, nutrient uptake, and stem anatomy of tomato. *Scientia Horticulturae*, *261*, 109015.
- **Murakami**, Y., Imai, M., Nakamura, H., & Yoshimura, F. (2002). Separation of the outer membrane and identification of major outer membrane proteins from Porphyromonas gingivalis. *European journal of oral sciences*, *110*(2), 157-162.
- **Nikolic**, P., & Mudgil, P. (2023). The Cell Wall, Cell Membrane and Virulence Factors of Staphylococcus aureus and Their Role in Antibiotic Resistance. *Microorganisms*, *11*(2), 259.
- **Pan**, W. A., Wu, B. B., & Wu, M. J. (2009). Chitosan nanoparticles cross-linked by glycidoxypropyltrimethoxysilane for pH triggered release of protein. Chinese Chemical Letters, 79-83.
- **Qin**, C., Li, H., Xiao, Q., Liu, Y., Zhu, J., & Du, Y. (2006). Water-solubility of chitosan and its antimicrobial activity. Carbohydrate polymers, 63(3), 367-374.
- **Quiterio**-Gutiérrez, T., Ortega-Ortiz, H., Cadenas-Pliego, G., Hernández-Fuentes,A. D., Sandoval-Rangel, A., Benavides-Mendoza, A., et al. (2019). The applicationof fselenium and copper nanoparticles modifies the biochemical responses oftomato plants under stress by Alternaria solani. Int. J. Mol. Sci. 20, 1950.doi:
- **Rinaudo, M.** (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in polymer science*, *31*(7), 603-632.
- **Saharan**, V., & Pal, A. (2016). *Chitosan based nanomaterials in plant growth and protection* (pp. 33-41). New Delhi, India:: Springer.

- **Santo**, E., Macedo, C., & Marin, J. M. (2006). Virulence factors of uropathogenic Escherichia coli from a university hospital in Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 48, 185-188.
- **Sathiyabama**, M., Akila, G., & Charles, R. E. (2014). Chitosan-induced defence responses in tomato plants against early blight disease caused by Alternaria solani (Ellis and Martin) Sorauer. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, *47*(16), 1963-1973.
- **Shahidi, F**., Arachchi, J. K. V., & Jeon, Y. J. (1999). Food applications of chitin and chitosans. *Trends in food science & technology*, *10*(2), 37-51.
- **Singh**, A., Mittal, A., & Benjakul, S. (2021). Chitosan nanoparticles: Preparation, food applications and health benefits. Sci. Asia, 47(2021), 1-10.
- **Taurozzi**, J. S., Hackley, V. A., & Wiesner, M. R. (2011). Ultrasonic dispersion of nanoparticles for environmental, health and safety assessment–issues and recommendations. *Nanotoxicology*, *5*(4), 711-729.
- **Van**, S. N., Minh, H. D., & Anh, D. N. (2013). Study on chitosan nanoparticles on biophysical characteristics and growth of Robusta coffee in green house. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *2*(4), 289-294.
- **Yang**, M., Zhang, J., Wei, Y., Zhang, J., & Tao, C. (2022). Recent advances in metal-organic framework-based materials for anti-staphylococcus aureus infection. *Nano research*, *15*(7), 6220-6242.
- **Yien**, L., Zin, N. M., Sarwar, A., & Katas, H. (2012). Antifungal activity of chitosan nanoparticles and correlation with their physical properties. *International journal of Biomaterials*, *2012*.

Studying The Effect Of Nano-Chitosan On Inhibiting *Staphylococcus Aureus* Bacteria Isolated From Wounds.

Sh.H.Majeed
College of Basic Education- AL-Mustansiriyah University
Dept .Of Science

Abstract:

This study were aiming to test the efficiency of Nano-chitosan in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* bacteria, where 25 isolates were obtained from cases of wound infection, and they were obtained from the Department of Life Sciences, College of Science, Al- Mustansiriyah University, where the results showed that all bacterial isolates under study had the ability to produce biofilm and the percentage 100%, but to varying degrees in terms of the intensity of biofilm formation. The results showed that adding Nano-chitosan at rates of 2%, 04%, and 6% reduced the growth of the bacteria under study at different rates, as the highest diameter of inhibition at a concentration of 6% was (18 - 21) mm, and the diameter of inhibition at a concentration of 4% was (15 – 20) mm, while the minimum diameter of inhibition was (3-5) mm at a concentration of 2%.