دراسة تأثير البنتونايت النانوي المصنع محليا في الحد من بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من الجروح والحروق.

الباحث شهباء حميد مجيد
قسم العلوم / كلية التربية الاساسية / الجامعة المستنصرية
Shalubidi@yahoo.com

مستخلص البحث:
تهدف هذه الدراسة لاختبار كفاءة طين البنتونايت النانوي المصنع محليا في تثبيط نمو بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* حيث تم الحصول على 40 عزلة موزعة بواقع 20 عزلة من الجروح و20 عزلة من الحروق، وتم الحصول عليها من قسم علوم الحياة/كلية العلوم/ الجامعة المستنصرية. بينت نتائج جميع العزلات قيد الدراسة قابليتها على انتاج الغشاء الحيوي وبنسبة 100% ولكن بدرجات متفاوتة من حيث شدة تكوين الغشاء الحيوي. واظهرت النتائج ان اضافة طين البنتونايت النانوي وبنسبة 1% و 2% و3% و4% ادى الى الحد من نمو البكتريا قيد الدراسة وبنسب مختلفة حيث كان اعلى قطر للتثبيط عند تركيز 4% وهو (19-22) ملم لعزلات الجروح وكان قطر التثبيط عند تركيز 4% هو (20-22)ملم لعزلات الحروق، بينما كان اقل قطر للتثبيط هو (3-5) ملم عند تركيز 1% من عزلات الجروح والحروق .

الكلمات المفتاحية: البنتونايت النانوي ، الغشاء الحيوي ، بكتريا *Pseudomonas aeruginosa*، قطر التثبيط

المقدمة:

ان بكتريا *pseudomonas aeruginosa* تعد من الانواع البكتيرية المهمة الواسعة الانتشار والمسببة للعديد من الامراض اذانها تسبب من 10 الى 20% من الاخماج المكتسبة من المستشفيات اذ وجد ان بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* سببا رئيسيا لاخماج الجروح والحروق والتي اودت بحياة الكثير من المرضى نتيجة تسمم الدم (1) حيث توجد هذه البكتريا على سطح الجلد مما يجعلها سهلة الاختراق عبر الجلد مسببة العديد من الالتهابات الجروح والحروق(2) وذلك لامتلاكها عوامل ضراوة متعددة منها انتاج السموم والانزيمات وتكوين الغشاء الحيوي (4,3) وتمتاز هذه البكتريا بمقاومتها للمضادات الحيوية والمطهرات وتسبب العديد من الالتهابات المرضية وذلك لقابليتها على تكوين الغشاء الحيوي (5) ولامتلاكها بلازميد المقاومة B- plasmid(6). يعد الغشاء الحيوي من عوامل الضراوة المهمة التي تمتلكها هذه لبكتريا مما يزيد في شدة إمراضيها ونظرا للاستعمال الواسع مضادات الحيوية في علاج البكتريا ادى الى احداث المقاومة للمضادات الحيوية وذلك عن طريق انتقال بلازميدات المقاومة بين الانواع البكتيرية المكونة للغشاء الحيوي بعملية الاستشعار بالنصاب (7)حيث يساعد البكتريا في البقاء حية في الظروف القاسية وتعد مسؤولة عن الاصابات المزمنة والمستعصية(8) وقد استخدمت طرق بيولوجية عديدة في الحد من انتشار هذه البكتريا ومقاومتها للمضادات الحيوية وتثبيط نموها بالأوساط الزرعية في المختبر حيث استخدم (9) البروبايتك في الحد من تكوين الغشاء الحيوي لدى بكتريا Pseudomonasالمعزولة من الجروح والحروق وقد اتجهت الدراسات الحديثة الى استخدام تقانة نانوية لما اثبتتها من فعالية كبيرة في تثبيط بعض المسببات المرضية بسبب الخصائص الفيزيائية والكيميائية المميزة لهذه الجزيئات والتي تؤدي الى زيادة مساحة التلامس مع المسببات المرضية والعمل على تثبيطها وعدم نموها (10و11) وقد عرف تقنية النانو

لأول مرة العالم الياباني Norio Taniguchi في عام 1974 على انها مجموعة من عمليات الفصل والتكوين والدمج للمواد على مستوى الذرات او الجزيئات (12)، تختلف المواد النانوية عن المواد العادية حيث ان نسبة المواد السطحية في المواد العادية تكون بنسبة 3% اما المواد النانوية فأنها تكون بين 5-50% (13) ،ويعرف البنتونايت بانه تربة معدنية مرنة وجدت عام 1890 في القشرة الارضية في منطقة بنتون ، تتصف حبيباته بانها ناعمة الملمس ولونها الرمادي المائل الى الصفرة كما يعتبر طين البنتونايت من الاطيان ذات الاصل البركاني من ضمن مجموعة المونتموريلينات، ويتكون من السليكا وبنسبة 60-70%، الالمنيوم 15-20% ونسبة قليلة من الحديد (14)ويطلق على البنتونايت (طين خاوة) وكان شائع الاستعمال منذ اكثر قرن والمستخدم في تنعيم الشعر للمرأة وتليين البشرة ايضا والبنتونايت مادة غير مهيجة وغير سامة لأنه يمتلك (LD50)/kg 0.52g =1v ,rat (15). وقد اثبتت الدراسات الحديثة كفاءته في تثبيط بعض الانواع البكتيرية الممرضة للإنسان والتي تسبب في التهابات الجلد (16) وذلك من خلال خصائصه الفيزيائية والكيميائية الفريدة التي يمتلكها هذا الطين ،ان اهمية هذا الطين النانوي مثيرة الاهتمام لأنها قد تكشف عن الية مضادة للبكتيريا يمكن ان توفر علاجا غير مكلف لهذا وغيره من الالتهابات الجلدية خاصة في المناطق العالمية ذات المستشفيات والموارد الطبية المحددة ، حيث تساهم خصائص الطين وخاصة التفاعلات المتعلقة بالأكسدة التي تحدث في جدار الخلية (17).

المواد وطرائق العمل :

1- العزلات البكتيرية:

تم الحصول على العزلات البكتيرية مشخصة من قسم علوم الحياة/ كلية العلوم/ الجامعة المستنصرية والمعزولة من حالات الاصابة بالجروح والحروق بواقع (20)عزلة من الجروح و(20) عزلة من الحروق.

2- الحصول على طين البنتونايت الكالسيومي العادي:

لقد تم الحصول على البنتونايت الكالسيومي العادي من دائرة المسح الجيولوجي، حيث تم استخراج خام البنتونايت من وادي بشيرة في شعبة الصحراء الغربية وانتاج بنتونايت كالسيومي مطحون ومكيس من شعبة البنتونايت في الفلوجة ويتم تجهيزه الى الجهات المستفيدة بشكل مطحون ومكيس وبمواصفات كيميائية معينة كما في جدول رقم (1).

جدول رقم (1) المواصفات الكيميائية لطين البنتونايت الكالسيومي العادي

Montmorillonite %	CEC Meq\ 100 gm	Pass from sieve 0.075 mm% by wetsieving
70 Min	65 Min	98Min

3- تحضير المادة النانوية (البنتونايت النانوي):

تم ارسال البنتونايت الكالسيومي الى ورش وزارة العلوم والتكنلوجيا دائرة المواد / لطحنها وتحويلها الى الحجم النانوي بواسطة مطحنة ماركة Retsch RS 200 المانية المنشأ ومطحنة كرات الكرانيت QM- ISPO4planetary Ball Mill كورية المنشأ، ومن ثم ارسلت للفحص في كلية العلوم/ جامعة بغداد /قسم الكيمياء/ الدكتور عبد الكريم محمد علي السامرائي، لقياس حجمها والتأكد من الوصول الى الحجم النانوي بواسطة مجهر القوة الذرية Angstrom Advanced INC , USA

AFM Contacriod SPM AA 300, وصلت حجوم حبيبات البنتونايت الى الحجم النانوي وحسب استمارات الفحص وحسب مواصفات المادة النانوية المصنعة.

4- الكشف عن فعالية البكتريا في تكوين الغشاء الحيوي:

تم الكشف عن قابلية العزلات البكتيرية على تكوين الغشاء الحيوي بطريقة الانابيب وذلك بزرع 5 ملليتر من وسط المرق المغذي Muller Hinton Agar بعزلات بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* وتحت درجة حرارة 37م لمدة 48 ساعة، وتم التخلص من محتويات الانبوبة بعناية واضافة صبغة البلور البنفسجي بتركيز 1% لمدة 7-10 دقائق بعدها لوحظ تكوين الغشاء الحيوي بشكل طبقة ملتصقة بالجدار الداخلي للأنبوبة بالعين المجردة وان سمك وشدة لون الغشاء يعتمد على كمية الغشاء الحيوي المنتج (18).

5- دراسة تأثير تراكيز البنتونايت النانوي في نمو العزلات البكتيرية:

استعملت طريقة الانتشار في الحفر Well diffusion Agar لاختبار حساسية البكتريا تجاه طين البنتونايت النانوي المصنع محليا وبالاعتماد على ما ورد في (19) وكما يأتي:

1- لقح سطح وسط اكار Muller Hinton بواسطة قطيلة معقمة من مزروع البكتريا الحاوي على(1.5×10^8)خلية/ ملليتر ثم تركت الاطباق لتجف بدرجة حرارة الغرفة لمدة 15 دقيقة.
2- عملت حفر بقطر 5 ملم في الوسط المزروع بوساطة الثاقب الفليني المعقم(Cork porer).
3- حضنت تراكيز متدرجة من التركيز الاصلي للبنتونايت باستعمال ماء مقطر بالنسب التالية (1%، 2%، 3%، 4%) ملغم/ ملليتر.
4- اضيف مقدار 0.1 ملليتر من التراكيز اعلاه لكل حفرة وبالتسلسل وعملت حفرة السيطرة المتمثلة بإضافة ماء مقطر ،حضنت الاطباق بدرجة 37م^0 لمدة 24 ساعة.
5- حددت فعالية كل تركيز من البنتونايت النانوي بقياس قطر التثبيط حول كل حفرة.

النتائج والمناقشة:

1- قابلية العزلات البكتيرية على انتاج الغشاء الحيوي.

اظهرت جميع عزلات بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* قابليتها على تكوين غشاء حيوي وبنسبة 100% ولكن بدرجات متفاوتة من حيث شدة تكوين الغشاء الحيوي حيث كانت (8) عزلات من البكتريا المعزولة من الجروح وبنسبة40% ذات انتاجية عالية للغشاء الحيوي في حين كانت (7) عزلات وبنسبة 35% ذات انتاجية متوسطة من الغشاء و(5) عزلات من البكتريا ذات انتاجية قليلة للغشاء الحيوي وبنسبة 25% مقارنة مع السيطرة كما مبين بالجدول(2). اما بالنسبة الى عزلات بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من الحروق فقد اظهرت 9 عزلات وبنسبة 45% انتاجية عالية لتكوين الغشاء الحيوي في حين كانت (7) عزلات وبنسبة 35% متوسطة الانتاج للغشاء (6) عزلات وبنسبة 30% ذات انتاجية قليلة للغشاء الحيوي مقارنة مع السيطرة ، كما مبين بالجدول (3)، وقد استعملت (4) عزلات من الجروح والحروق التي اثبتت قدرتها العالية على تكوين الغشاء الحيوي للتجارب القادمة.

جدول (2) شدة تكوين الغشاء الحيوي من قبل بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من الجروح

العزلات البكتيرية	شدة تكوين الغشاء الحيوي
8	+++
7	++
5	+
السيطرة	-

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

جدول (3) شدة تكوين الغشاء الحيوي من قبل بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من الحروق

العزلات البكتيرية	شدة تكوين الغشاء الحيوي
9	+++
7	++
6	+
السيطرة	-

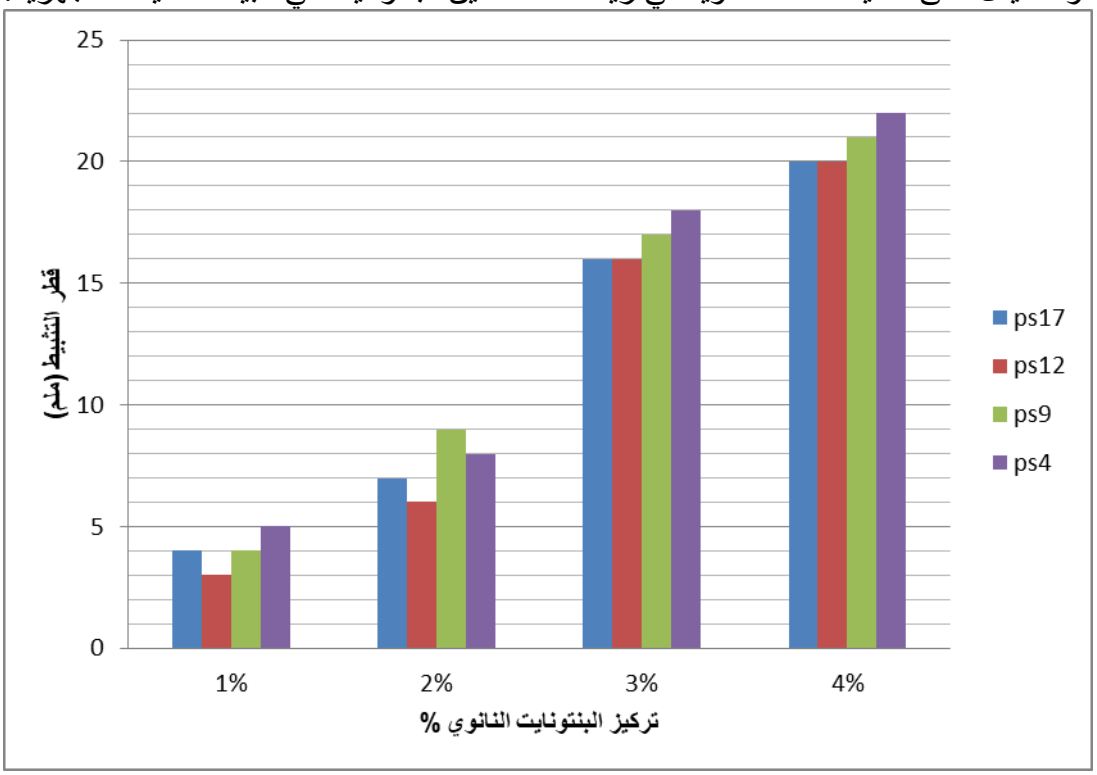
(+++) انتاجية عالية،(++) انتاجية متوسطة، (+) انتاجية قليلة، (-) سيطرة (وسط المرق المغذي).

ان انتاج الغشاء الحيوي يعتبر من عوامل الضراوة من قبل بعض الاحياء المجهرية المنتجة لها (20) .اذ يساهم الغشاء الحيوي دورا مهما في إمراضيه البكتريا لان البكتريا تكون مغمورة في بروتينات المضيف والطبقة المخاطية الميكروبية التي توفر بدورها مكان مناسب لنمو البكتريا والكائنات الاخرى مما يزيد من مقاومة البكتريا للمضادات الحياتية (21) حيث تتفق هذه النتائج مع ما جاء به (22) بان عزلات *Pseudomonas aeruginosa* المكونة للغشاء الحيوي كانت ذات مقاومة عالية للمضادات الحيوية.

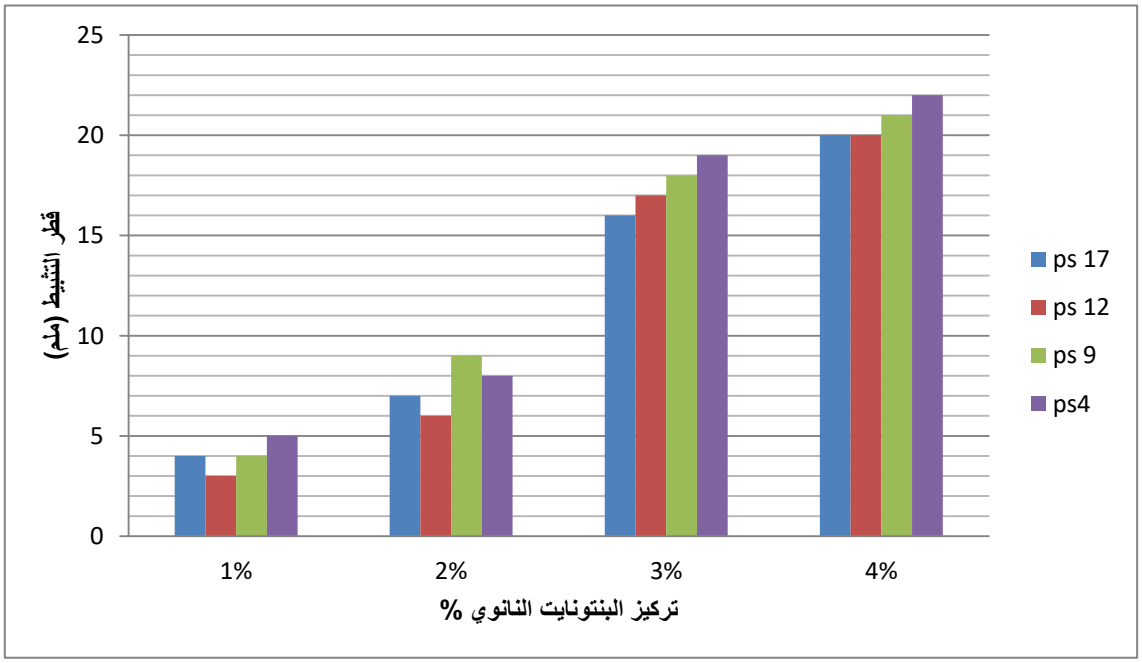
الفعالية التثبيطية للبنتونايت النانوي ضد بكتريا *Pseudomonas aeruginosa*.

بينت نتائج اضافة طين البنتونايت النانوي الى الوسط الزرعي مولر هنتون بطريقة الانتشار في الحفر وبتراكيز مختلفة حسب التراكيز المضافة الى الوسط، حيث اظهر اعلى نسبة للتثبيط عند تركيز 4% وكان اعلى قطر للتثبيط بمعدل(20-22) ملم في البكتريا قيد الدراسة المعزولة من الحروق في حين كان اعلى قطر للتثبيط بمعدل (19-22)ملم في البكتريا المعزولة من الجروح في حين كان اقل معدل للتثبيط عند تركيز1% وبقطر (3-5) ملم لكل من عزلات الجروح والحروق ،شكل (1 و 2) وهذا يتفق مع ما جاء به (23) حيث اظهرت البيانات ان طين البنتونايت المعدل بجسيمات الفضة النانوية يمكن ان يثبط بشكل فعال نمو مسببات الامراض الانتهازية مثل بكتريا *Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, E.coli, Candida albicans , Proteus spp* حيث تزيد المادة النانوية في فعالية طين البنتونايت في القضاء على هذه الاحياء من خلال تفاعل ايونات الطين النانوية المحضرة مع الغشاء الميكروبي لهذه البكتريا مما تسبب في حدوث تغيرات في نفاذية الغشاء الميكروبي او قد

تتفاعل مع الاحماض النووية المكونة للبكتريا وتمنع تكاثرها وبالتالي موت الخلية البكتيرية (24)، وهذا يدل على اهمية المادة النانوية في زيادة كفاءة طين البنتونايت في تثبيط الاحياء المجهرية.



شكل (1) الفعالية التثبيطية للبنتونايت النانوي تجاه عزلات بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من الجروح



شكل (2) الفعالية التثبيطية للبنتونايت النانوي تجاه عزلات بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من الحروق.

المصادر:

1-Rastegar,L.A.R.;Alaghehbandan,R. and Akhlaghi,L.(2005).Burn Wound infection and antimicrobial resistance in - 219 -ehran, Iran : an increasing problem. Annals of Burns and Fire Disaters.453(2):1-9.

2-Lipsky,B.;Anthony, R.;Berendt,B.;Cornia,G.;Davide,G.;Deery,H.; Warren,S.; Joseph, W.; Michael,S. and Pinzur , E.(2012). Infectious Diseases society of America Clinical practice foot Infection.J. Clin. Infect. Dis. 54(12): 1679-1684.

3- Zubair, M.;Malik,A.; Ahmad,J.;Rizvi,M.; Faroogui, K.; Rizvi, M.(2011). Astudy of biofilm production by gram-negative organisms isolated from diabetic foot ulcer patients. J.Bio. Med.3(2): 147-157.

4- Ong,Y.S.; Samule , M. and Song, C.(2006). Meta- analysis of early excision of burns. Burns. 32(2): 145-150.

5-Brooks, G.F.; Butel, J.S.and Morse,S.A.(2001). Jawetz Melinke & Adelberg,s Medical Microbiology (22nd ed).MCGraw-Hill. V.S.A.P. 197-202.

6-Levy, S.B.(2002). Active efflux common mechanism for biocide and antibiotic resistance J.App1-Microbiol.922655-715.

7-Hassan, A.Usman,J.;Kaleem,F. ;Omair M.; Khalid,A. and Iqbal,M.(2011).Detection and Antibiotic susceptibility pattern of

biofilm producing gram positive and gram negative isolated from atertiary care hospital of Pakistan.Malaysian. J.Microbial .7(1)57-60.
8- Khan F.,Shukla ;Rizvi , M.; Mansoor,T.;Sharma,S.C.(2011). Petection of biofilm formation in Staphylococcus aureus .Does it have arol in treatment of MRSA infestion. Trends in Med. Res. Academic.J.,6(2),116-123.
9- النعيمي، علا عبد الكريم كاظم.(2015). دراسة تاثير البروبايوتك في تكوين الغشاء الحيوي وانتاج انزيم البروتيز لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* المعزولة من اخماج الحروق والجروح. رسالة ماجستير. كلية التربية الاساسية. الجامعة المستنصرية.
10-
Kim,J.s.,Kuk,E.,Yu,K.N.,Kim,j.H.Park,S.J.,Lee,H.J.;Kim,S.H.,Park,Y.K.,Park,Y.H.Hwong,C.Y.etal,
(2007).Antimicrobial effects of silver nanoparticales .Nanomedicin, 3:95-101.
11-Puzyr AP., et al The absorption of aflatoxin B1 by detection synthesis nanodiamonds. Doklady Biochemistery and Biophsics 17.1.(2007):299-301.
12-C0rtez,J.E.;D.Vorobiva;I.Gralheira;L.Osorio;N.Soares;E.Vale;P.Pereira and R.F.Gomes.(2011). Bionanoconjugates of tyrosinase and peptide-derivatised gold nanparticles for biosensing of phenolic compounds.J.Nanopart.res.13:1101-1113.
13-AL-Hoshan,M.(2007). Noval Nanoarray structure formed by template based approach: characterization and electro chemistry . Phd thesis ,Minnesota Unversity.
14- شهاب، عمر حمد والنور، تغريد هاشم. 2017. استخدام الاطيان المحلية في العراق (طين خاوة) في صناعة الصابون وكريمات الوجه واصباغ الشعر. AL-Bahir Quarterly Refereed Journal for Natural and Engineering science.5(9): 17-25..
15- المصري، محمد علي، نعيم السيد، البنتونايت خواصه ووجوده واستعمالاته المنتظرة في العالم العربي، اتحاد المهندسين العرب، المؤتمر الهندسي العربي التاسع، بغداد (1964).
16 -Haydel SE ,Remenih CM, Williams LB.(2008).Broad- spectrum in vitro antibacterial activities of clay minerals against antibiotic- susceptible and antibiotic- resistant bacterial pathogens . Journal of Antimicrobial Chemotherapy.
17- Williams, L.B. and Haydel ,SH.E.(2010).Evaluation of the medicinal use of clay minerals as antibacterial agents. Int Geol Rev. (HHS Public Access). 52(7-8): 745-770.

18-Julian,S. Taurozzi, Vicent AS. Hackley and Mark, R. Wiesner.(2011). Ultrasonic dispersion of nanoparticles for environmental, health and safety assessment- issues and resommendations.
19-Murukami,Y.;Imai, M.;Nakamura,H. and Yoshimura,F.(2002).Seperation of the membranc
and identification of major outar membrane proteins from porphyomonas gingivalls. 110:
20-Chute,R. K.;Deogade, N. G. and Kawale, M.(2010).Antimicrobial activity of Indian honey against clinical isolates. Asiatic Journal of Biotechnology Resources.01: 35-38.
21-Santo,E.; Macedo, C. and Moacir, M.J.(2006).Virulance factor of bacteria from hospital in Ribeiroreto ,sau Paulo, Brazil. J.Rev.Ins.Med, Trop.S.Paulo.48(4):185-188.
22- Shaikh, I. and Musaddiq, M. (2010).Detection and analysis of Biofilm production and extracellular polymeric substance in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical specimens. Biosci. Biotech. Res. Comm.3(1): 74-78.
23- Bui Quang Cu .;Nguen Hoadi Chao; Vesentsev A.I.; Buhanov V.D.; Sokolovsky P.V. And Mihaylyukova.M.O.(2016). The antibacterial properties of modified bentonite deposit TAM BO.Research result: pharmacology and clinical pharmacology. Vol2 , N:3: 63-74.
24-Pouraboulghasem, H.; Ghorbanpour, M.; Shayegh, R. and Lotfiman, S.(2016). Synthesis, Characterization and antimicrobial activity of alkaline ion – exchanged ZnO/ bentonite Nanocomposites. J. Cent. South Univ. 23: 787- 792.

Study of the effect of locally manufactured Nanopentonite in reducing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from wounds and burns.

Shahbaa Hameed Majeed
Dept. of Science /College of Basic Education
Al- Moustansiriyah University.
shalubidi@yahoo.com

Abstract:
This study aims to test the efficiency of locally manufactured Nanopentonite clay in inhibiting the growth of *pseudomonas aeruginosa*, where 40 isolates were obtained, distributed by 20 isolates from wounds and 20 isolates from burns, and were obtained from the Department of biology/collage of science/Al-Mustansiriyah University .The result of all the isolates under study showed their ability to produce the biofilm at a rate of 100% but to varying degrees in terms of the severity of the biofilm formation, and the results showed that the addition of nanoparticle clay at the rates of 1%,2%,3% and 4% led to the limitation of bacterial growth. The study was of different proportions were the highest rate of inhibition was at a concentration of 4% and a rate of inhibition was at concentration of 4% (19-22)mm for wound isolates and a rate of (20-22)mm for burn isolates and the lowest rate of inhibition was at 1% and a diameter of (3-5)mm for isolates of wounds and burns.

Key words: Nanopentonite ,biofilm, *Pseudomonas aeruginosa* , Rate of inhibition