دراسة تأثير التراكيز المختلفة للاوزون المذاب في الماء في نوعين من البكتيريا الممرضة ونوعين من الفطريات الممرضة للجلد خارج الجسم الحي

ضحى سعد صالح*، خالد عبد الرزاق حبيب، ندى صباح رزوقي***

*قسم علوم الحياة ، كلية العلوم، جامعة بغداد. بغداد – العراق.

** قسم علوم الحياة ، كلية العلوم للبنات، جامعة بغداد. بغداد – العراق.

الخلاصة

أجريت هذه الدراسة الاولية بهدف التحري عن تأثير استخدام الاوزون المذاب في الماء بتراكيز مختلفة على الاحياء المجهرية (البكتريا والفطريات)التي تصيب الجلد والمرافقة للجروح والحروق.

أظهرت النتائج أن لهذه المادة تاثيراً مثبطاً ضد هذه الاحياء المجهرية خارج الجسم الحي ولكن بنسب متفاوتة حيث وجد ان عزلة الفطر *Trichophyton mentagrophytes* كانت الاكثر حساسية حيث بلغت نسب التثبيط فيها (25، 50 ، 65) % تلتها عزلة الخميرة *Candida albicans* بنسب تثبيط (10، 20 ،60) % ثم بكتريا *Staphylococcus aureus* بنسب تثبيط (10 ، 20 ، 40) % واخيراً بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* بنسب تثبيط (0 ، 15 ، 30) % وذلك عند استخدام الاوزون المذاب في الماء بالتراكيز (20 ، 40 ، 60) مايكروغرام / مل على التوالي . في حين ان اضافة حجوماً مختلفة (3, 6 ، 9 ، 12) مل من الماء الحاوي على الاوزون بتركيز60 مايكروغرام/ مل نتج عنه تثبيطاً تاما لنمو الاحياء المجهرية *S. aureus* و*P.aeruginosa* و *C.albicans* ، بينما كانت نسب التثبيط بالنسبة لعزلة الفطر *T.mentagrophytes* ما يقارب 95% على التوالي.

STUDY THE EFFECT OF DIFFERENT CONCENTRATION OF SOLUBLE OZONE IN TWO KIND OF PATHOGENIC BACTERIA & TWO KIND OF PATHOGENIC FUNGI ASSOCIATED WITH SKIN INFECTIONS IN VITRO

Duha S.Salih*, Khalid A.Habib*, Nada S.Rezoqe***

*Department of Biology, College of Science, University of Baghdad. Baghdad- Iraq.
**Department of Biology ,College of Science for women, University of Baghdad. Baghdad- Iraq

Abstract

This preliminary in vitro study was conducted to investigate the effect of ozonated water on certain microorganisms (Bacteria&fungi) associated with wound & burn infection by using different concentrations of ozonated water (20,40 and 60 µg/ml) on these microorganisms .

The results revealed that the percentages of inhibition were (10,20 &40%) for Staphylococcus aureus , (0,15&30%) for Pseudomonas aeruginosa and (25,50&65%) for Trichophyton mentagrophytes and finally (20,40 &60 %) for

Candida albicans . Results also indicated that the percentages of inhibition were increased when we using more volume of ozonated water at concentration 60 µg/ml , in which all the microorganisms in this study inhibited completely when the volume of ozonated water used was 12ml , While the percentages of inhibition for T.mentagrophytes reached 95% only even when the volume of ozonated water used was 12 ml at concentration 60 µg/ml.

* البحث مستل من اطروحة دكتوراه للباحثة .

المقدمة

تمثل أصابة الجروح والحروق التي تحدث للانسان نسبة كبيرة بين الامراض والاصابات الجرثومية وغير الجرثومية التي يتعرض لها خلال مسيرة حياته, وتنوع هذه الاصابات ما بين البكتيريةوالفطرية والتي يمكن ان تؤدي في المراحل المتقدمة من الاصابة الى حالات مرضية خطيرة ومستعصية كحالات التسمم الدموي Septicemia او تجرثم الدمBacteremia والتي قد تؤدي الى حالة الوفاة في المراحل المتقدمة من الاصابة.

هنالك عدد من العقاقير التي تستخدم لمعالجة الجروح والحروق ومنها المضادات الحياتية و بعض المواد الكيمياوية كالحوامض وبيروكسيد الهيدروجين,كما استخدمت بعض المستحضرات من اصل نباتي كالحرمل والثوم والآس والحناء(1، 2، 3) .

ان استخدام المستحضرات الكيمياوية كالمراهم Ointments والدهونCreams رغم فعاليتها المؤثرة الا ان هنالك بعض السلبيات التي ترافقها كاطالة مدة العلاج, الامتناع عن ملامسة الماء أثناء المعاملة بهذه المواد,هذا بالاضافة الى التاثيرات الجانبية ، أما بالنسبة للمضادات الحياتية فيؤدي كثرة استخدامها الى خفض مناعة الجسم أضافة الى حدوث المقاومة المتصاعدة للجراثيم لمعظم المضادات الحياتية (11) ،لذا يسعى الباحثون باستمرار الى أيجاد البدائل الامينة التي تعطي علاجا أنجح وتوفرحماية للجهاز المناعي للجسم.

وردت في السنوات الاخيرة اشارات الى أستخدام الاوزون كعلاج ناجح لعدد من الامراض وذلك بعد ان أثبتت فعاليته في مجال تعقيم المياه واجراء ات التطهير في المستشفيات ، بسبب فعاليته التثبيطية لمدى واسع من الاحياء المجهرية المرضية (4، 5، 6، 7، 8) .

ونظرا لقلة الدراسات التطبيقية حول المعاملة بالاوزون المذاب في الماء لعلاج الامراض الجرثومية المرافقة للجروح والحروق التي يتعرض لها الانسان ،ولعدم وجود دراسة محلية ضمن هذا الاطار ارتآينا أجراء هذه الدراسة الاولية والتي ربما تعتبر الاولى من نوعها على مستوى التطبيق المحلي من حيث التحري عن فعاليته التثبيطية ضد بعض المسببات المرضية الجلدية خارج الجسم الحي تمهيدا لامكانية استخدامه في مجال العلاج الطبي كأحد الوسائل العلاجية الحديثة .

المواد وطرائق العمل

1- مصادر الاحياء المجهرية

أستخدمت في هذه الدراسة 4 أنواع من الاحياء المجهرية الممرضة :

Staphylococcus aures , seudomonas aeruginosa Candida albicans, Trichophyton mentagrophytes

والتي تم عزلها من أصابات جلدية مختلفة ، شخصت هذه العزلات بالاعتماد على ما مذكور في (12,11,10,9) .

2- عينات الاوزون المذاب في الماء بتراكيز مختلفة

تم الحصول عليها من شركة الصفا لتنقية وتعقيم المياه المعدنية/بغداد وبتراكيز مختلفة (60,40,20) مايكروغرام/ مل .

3-أختبار الفعالية الضد مايكروبية للاوزون المذاب في الماء

لغرض دراسة الفعالية التضادية للاوزون المذاب في الماءضد الاحياء المجهرية الممرضة المعزولة قيد الدراسة وباستخدام اختبار العكورة (Turbidimeteric Method) أستخدمت الطريقة الموصوفة من قبل (13) مع أجراء بعض التحوير عليها وكالاتي:

حضرت سلسلة من التراكيز للاوزون المذاب في الماء وأضيف 1 مل من كل تركيز الى أنابيب تحوي على 8 مل من المرق المغذي المعقم Nutrient broth بالنسبة للعزلات البكتيرية في حين أستخدم وسط Sabouraud Dextrose broth عند دراسة عزلة الخميرة، لقحت هذه الانابيب باضافة 1 مل من المعلق البكتيري الحاوي على(1×10^8) خلية / مل بينما كان حجم اللقاح (1×10^6) خلية / مل بالنسبة لخلايا الخميرة وبثلاثة مكررات لكل تركيز. حضنت الانابيب عند درجة حرارة 37 مْ لمدة 18 ساعة للعزلات البكتيرية و24 ساعة للخميرة ، بعدها تم قياس العكورة باستخدام جهاز المطياف الضوئي على

طول موجي 595 نانوميتر للبكتيريا و530 نانوميتر للخميرة وقورنت النتائج مع عينات السيطرة (التي تحتوي على8 مل من الوسط المغذي الملقح بواسطة 1مل من المعلق الجرثومي مضافا اليه 1مل من الماء المقطر).

وبعد قراءة النتائج أعيد معاملة العزلات قيد الدراسة تجاه الفعل التضادي للاوزون المذاب في الماء بنفس الطريقة أعلاه مع ملاحظة أستخدام سلسلة من الحجوم المختلفة لهذه المادة والتي هي: (1، 3، 6، 9، 12 مل) من الماء الحاوي على الاوزون بتركيز 60 مايكروغرام / مل لدراسة فعاليته التثبيطية تجاه هذه المسببات المرضية خارج الجسم الحي .

4-أختبار تاثير الاوزون المذاب في الماء على الكتلة الحيوية (Biomass) للفطر *T.mentagrophytes*

أتبعت الطريقة الموصوفة سابقا (14) مع أجراء بعض التحوير عليها وكما يلي:

أضيف 1مل من التراكيز المختلفة للاوزون المذاب في الماء الى وسط السابروويد السائل بعد وضعه في أنابيب زجاجية وبحجم 10 مل ، لقح الوسط الغذائي باللقاح الفطري على شكل أقراص بقطر 5 ملم تم اخذها بوساطة الثاقب الفليني من مزرعة فطرية نامية لمدة أسبوع على وسط اغارالسابرويد الصلب ، حضنت عند درجة حرارة (25- 28) مْ لمدة أسبوع ، رشح بعدها الوسط بوساطة ورق الترشيح watman No.1 ثم وضعت أوراق الترشيح في فرن بدرجة حرارة 50 مْ لمدة 24 ساعة . تم قياس الوزن الجاف للفطر النامي من خلال وزن ورقة الترشيح مع النمو الفطري مطروحا منه وزن ورقة الترشيح مقاساً بالغرام .

أعيدت نفس الخطوات السابقة باضافة حجوم متسلسلة من الاوزون المذاب بتركيز 60 مايكروغرام /مل لدراسة تأثيره على الوزن الجاف للفطر الجلدي الممرض .

النتائج والمناقشة

اظهرت نتائج دراسة فعالية غاز الاوزون المذاب في الماء بتراكيز مختلفة تجاه المسببات المرضية قيد الدراسة ، ان لهذه المادة تأثيراً مثبطاً ضد هذه الاحياء المجهرية ولكن بنسب متفاوتة وكالآتي : بالنسبة لعزلة الفطر *T.mentagrophytes* كانت الاكثر حساسية حيث بلغت نسب التثبيط 25 ,50 ,65 % تلتها عزلة الخميرة *C.albicans* بنسب تثبيط 20, 40, 60 % ثم بكتيريا *S.aureus* بنسب تثبيط 10,20,40% واخيراً بكتيريا *P.aerugionsa* بنسب تثبيط 0,15,30% عند استخدام الاوزون المذاب في الماء بالتراكيز (20 , 40 , 60) مايكروغرام / مل على التوالي وكما موضح في الاشكال (1,2,3) .

وعند دراسة تاثير اضافة حجوم مختلفة بلغت (3,6,9,12) مل من الاوزون المذاب في الماء بتركيز 60 مايكروغرام / مل (الشكل 4) . اظهرت النتائج التي تم الحصول عليها زيادة نسب التثبيط بزيادة حجم الماء المضاف وصولا الى حصول التثبيط التام 100% عند اضافة حجما من الماء مقداره 12 مل لكل من *S.aureus* و *P.aerugionsa* و *C.albicans* وكما موضح في الاشكال (5،6) في حين كانت نسبة التثبيط 95% بالنسبة لعزلة الفطر *T.mentagrophytes* حتى عند اضافة نفس الحجم من الماء وكما موضح في الشكل (4) .

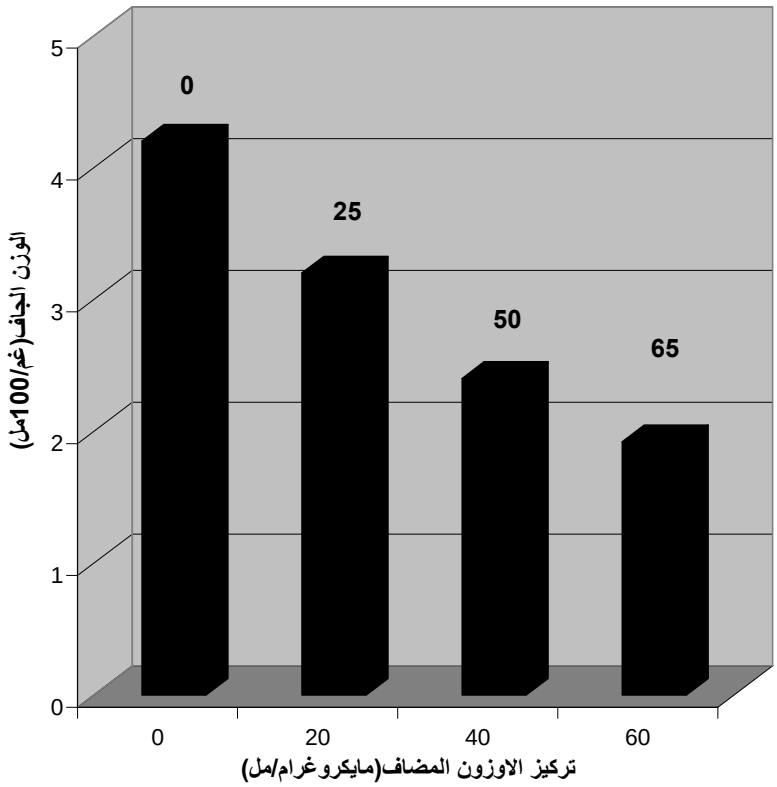
تتفق هذه النتائج مع ما ورد في العديد من الدراسات التي اشارت الى ان للاوزون فعل مثبط ضد العديد من الاحياء المجهرية الممرضة (15,16,17,18) والذي يعود الى كونه عامل مؤكسد قوي يمزق تكامل خلية الكائن المجهري مما ينتج عنه تغيير في نفاذية الخلية وتسرب محتوياتها للوسط المحيط (17,19,20,21,22,23) وهذا ما اكده بعض الباحثين في دراسة مماثلة لمسببات مرضية جلدية في محاولة تمهيدية لاستخدام الاوزون في علاج مثل هذه الاصابات الجلدية (15).

لم تشر البحوث الى ما يتعلق بالتأثير المقارن للاوزون المذاب في الماء على الاحياء المجهرية المختلفة على حد علم الباحثين والذين يعتقدوا ان الاختلاف في حساسية هذه الاحياء المجهرية الممرضة تجاه الفعل التثبيطي للاوزون المذاب في الماء قد يعود الى اختلاف زمن الجيل لكل واحد من الانواع الاربعة وماله من علاقة بعمر النصف(Half life)للاوزون المذاب في الماء, وهذا ما اكدته الدراسة التي قام بها الباحث Lezcano واخرون (20) والذي وجد ان بكتيريا *S.aureus* اظهرت مقاومة اعلى من خميرة *C.albicans* تجاه الفعل التثبيطي لغاز الاوزون عند دراسته للتاثير المضاد لغاز الاوزون المذاب في الماء على هذين المسببين المرضيين. والذي يتفق مع ما اشارت اليه بعض الدراسات من ان التراكيز المستخدمة من الاوزون واللازمة لتثبيط البكتيريا تختلف عن تلك اللازمة لتثبيط الفطريات (24).

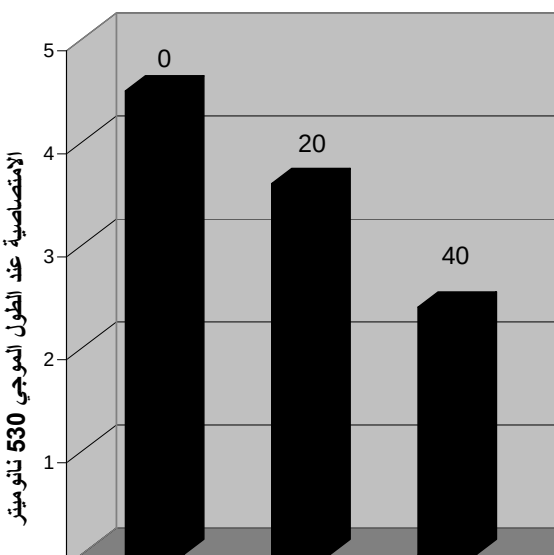
بينت النتائج كذلك اختلاف حساسية العزلات البكتيرية قيد الدراسة تجاه الفعل التثبيطي للاوزون المذاب في الماء حيث اظهرت بكتيريا *P.aeruginosa* مقاومة اعلى بالمقارنة مع

بكتيريا *S.aureus* ضد الفعل المؤكسد للاوزون والذي يتفق مع ما وجده (15،25) وربما يعود السبب الى كونها ذات معيشة هوائية مجبرة وبالتالي فهي تنتج انزيمي الاوكسيداز و الكاتلاز بكفاءة عالية مما يوفر لها حماية جزئية ضد الفعل المؤكسد والقاتل للاوزون (19,11) .

اما في ما يتعلق بخميرة *C.albicans* والعفن الجلدي *T.mentagrophytes* فقد ذكرت المصادر ذات العلاقة ان نمو هذه الخلايا يثبط بفعل الاوزون والذي يعتمد في فعله بشكل كبير على طور النمو (26) حيث ان الطور الخيطي (Mycelia) اكثر حساسية من الطور البوغي(Spores) (27,18) كما ان الخلايا المتبرعمة تكون اكثر حساسية للاوزون من الخلايا الساكنة (26) وهو ما لوحظ من خلال النتائج التي تم الحصول عليها حيث لم يحصل تثبيط تام للفطر *T.mentagrophytes* بسبب وجود مزرعة خليط من الابواغ والخيوط الفطرية حتى عند اضافة حجماً من الماء مقداره 12مل حاوياً على الاوزون بتركيز 60 مايكروغرام / مل مقارنة ببقية الكائنات الحية المدروسة : *S.aureus* ، *P.aeruginosa* و *C.albicans* والتي حصل لها تثبيطاً تاماً.

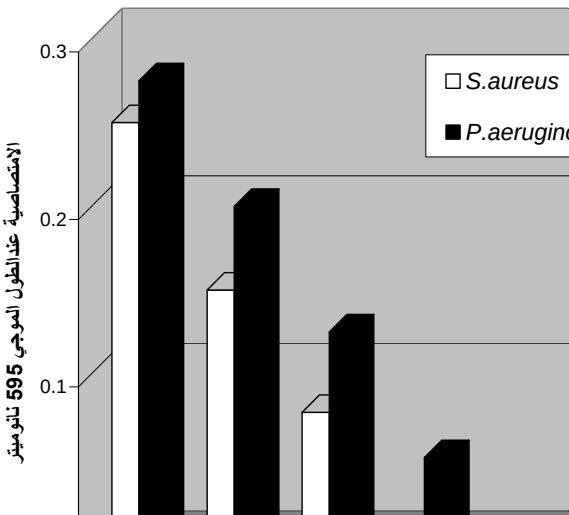


شكل 1: تأثير أضافة تراكيز مختلفة من الاوزون المذاب في الماء على الكتلة الحيوية للفطر *T.mentagrophytes*
***الارقام في اعلى الاعمدة تمثل النسبة المئوية للتثبيط.**


الامتصاصية عند الطول الموجي 530 نانوميتر
5
4
3
2
1
0
20
40

المصادر

1. العاملي ، زينة طارق عبد الوهاب، **2001**."*عزل وتشخيص بعض الفطريات المسببة للاصابات الجلدية في الحيوانات والعاملين عليها ومعالجتها باستخدام مستخلصات الحبة السوداء والثوم*" . رسالة ماجستير . كلية الطب البيطري . جامعة بغداد .
2. السماك ، ميثم احمد محمد، **2001**. "*دراسة تاثير المستخلص الزيتي للحبة السوداء المحلية Nigella sativa linn . في نمو بعض الاحياء المجهرية المرضية المعزولة من حالات مرضية سريرية*" . رسالة ماجستير . كلية الطب البيطري . جامعة بغداد .
3. العبادي , اسامة علي محسن ، **2003** ،" *دراسة مكونات اوراق الحناء المحلية Lawsonia inermis وتاثير مستخلصاتها ومركب اللوسون المعزول منها على بعض الفطريات الجلدية*،. رسالة ماجستير – معهد الهندسة الوراثيةوالتقنية الاحيائية – جامعة بغداد .
4. Sunnen , G. V. **2000**." *The utilization of ozone for external medical applications*" .Ozonics International J.,27:75-81.
5. Sorge , R.H**. 2004**. Introduction to ozone therapy . *Ozone Science and Engineering* **8**:47-55.
6. Null , G. **1995** . Ozone : A wide – spectrum Healer . *Ozone Science and Engineering*. **9**:65-72.
7. Hansler , R. **2003.** *The use of ozone in medicine , Mechanisms of action* . 2nd Ozone Congress , European cooperation of the Medical Ozone Societies , Munich , Germany.
8. Chow , P. **2001**. Healing ozone. *Canadian J. of Health and Nutrition*. **156**:26 – 27.
9. Macfaddin , J .F. **2000** . *Biochemical test for identification of Medical Bacteria*. 3rd ed. The Williams& wilkins-Baltimore , USA .
10. Delacretaz , J. ; Grigoriu ,D.& Ducel , G. **1976**.*Color Atlas of Medical mycology* . Hans Huber publishers . Bern Stuttgart . Vienna .
11. Forbes , B. A. , Sahm , D.F.& Weissfeld , A.S. **1998.** *Bailey & Scotts Diagnostic Microbiology*. 10th ed . Mosby Company , USA .
12. Baron, E . J . ; Peterson , L . R . & Finegold ,S.M. **1994**. *Bailey & scotts- Dia gnostic Microbiology* . 9th ed . , Mosby- year books , Inc . st . Louis , Missouri , U S A.
13. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).**1997** . *Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for Bacteria that grow aerobically*. Approved Standards M7-A4. National committee for clinical Laboratory Standards . wayne , PA . USA .
14. AL-Genaby, A.A.S.2004. Treatment of skin diseases caused by Dermatophytes by using Perparations container on some vehicles



Purine. PH.D. thesis. College of Science. Al_Nahreen University. (Arabic).
15. Lezcano , L. ; Contreras , R. ; Molerio , J. ; Regueiferos , M. ; Roura , G. & Diaz , W. **1997** . In vitro activity of oleozon against Bacterial Agents of skin infection. 2nd international symposia on ozone Applications ,ozone Research center , Havana , cuba . (Abstract) .
16. Dyas , A. ; Boughton , B. & Das , B. **1983**. Ozone Killing action against bacterial & Fungal species : Microbiological testing of a domestic ozone generator . *J. Clin . pathol* . **36**(10) : 1102 – 1104 (Abstract) .
17. Sad , M. ; Molla ,O.; Altenfelder , R. & Pacheco , A. **2004**." *Effects of different gases on bacterial growth , Experimental study in vitro*". 4th International symposia on ozone Applications . Havana , Cuba. (Abstarct).
18. Allen , B.; Wu, J. & Doan , H. **2003** Inactivation of fungi associated with barley grain by gaseous ozone . *J. Environ. Sci. Health B*. **38** (5) : 617 – 30 .
19. Shallenberger , F . **1983**. Primary Physiological effects of Ozone. Paper presented at the IOA 6th Ozone world Congress ,Wash .DC.,USA.
20. Lezcano , L. ; Rey , P. ; Gutierrez , M. ; Baluja , C. & Sanchez , E. **1999** .Ozone inactivation of Microorganisms in water . Gram positive Bacteria & yeast. 14th Ozone World Congress , Michigan , USA.
21. Nagayoshi,M.;Fukuizumi,T.;Kitamura,C.;Yano , J . ; Terashita , M . & Nishihara , T . **2004** . Efficacy of Ozone on Survival and permeability of Oral microorganisms . *Oral Microbiol . Immunol* . **19**: 240 -246.(Abstract).
22. Matus , V. K. ; Martynova , M. A. ; Skorynko , E. V. ; Melnikova , A. M. & Konev, S. V. **1999**. Different mode of ozone – induced lipid oxidation in Candida yeast cells & isolated membrane preparations . *Member.Cell Biol*. **13**(1) : 59 – 67 . (Abstract) .
23. Lynch , E. ; Silwood , C.J. ; Smith , C. & Grootyeld , M. **2002**. Oxidising actions of an Anti-Bacterial ozone – Generating Device towards Root caries Biomolecules. *J.Dent. Res*. **81**:138 . (Abstract) .
24. Fischer , E. **1982**. How long do dermatophytes survive in the water of indoor pools ? . Dermatologica. **165** (4) : 352 – 4. (Abstract) .
25. Novoa ,M.C.;Menendez ,S.; Gomez ,M.& Regueiferos ,M.**1990**. Study in vitro of antibacterial action of Ozonized Sunflower oil.1st Iberolatino american Congress on Ozone Applications. Havana ,Cuba .(Abstract).
26. Sunnen , G. V. **1988** .Ozone in Medicine : Overview & Future Directions . *Journal of Advancement in Medicine*. **1**(3):159-174.
27. Kuss , F.R. **2001.** Effect of ozone on fungus sporulation. M.Sc. thesis , College of life Science & Agriculture , New Hampshire University. Durham , U.K.