نشریه آموزشی- پژوهشی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور

فصلنامه تحقیقات کاربردی در علوم دامی

شماره ۱۵، تابستان ۱۳۹٤

ص‌ص: ۷۳~۸۰

بررسی اسیدیته و زمان مناسب جذب باکتری استافیلوکوکوس اورئوس توسط بنتونیت سدیم در شرایط برون‌تنی

- **نرگس واسجی** (نویسنده مسئول)

عضو هیات علمی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور

- **ناهید مژگانی**

عضو هیئت علمی موسسه تحقیقات واکسن و سرمسازی رازی

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۲۶۳۴۴۳۰۰۱۰

Email:vaseji111@gmail.com

چکیده:

بنتونیت، به عنوان یک عامل دارای خاصیت جذب بسیار بالا و مؤثر در جداسازی و اتصال به فلزات سنگین، داروها، باکتری‌ها و سایر توکسین‌ها از بدن شناخته شده است. دراین تحقیق، تاثیر تغییرات pH (۳ ، ٤ و ۵) بر جذب و واجذب باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به بنتونیت سدیم مورد بررسی قرار گرفت. علاوه براین، با مجاور کردن باکتری استافیلوکوکوس اورئوس با بنتونیت سدیم در زمان‌های مختلف (۰، ۳۰، ٦۰ و ۹۰ دقیقه) و کشت مستقیم و شمارش باکتری، کاهش میزان باکتری در حضور بنتونیت در زمان‌های مختلف بررسی و در هر مرحله تغییرات ثبت گردیدند. نتایج نشان دادند، ارتباط اسیدیته با جذب باکتری به بنتونیت تنها در pH = ۵ معنی دار بود. روند کاهش جذب باکتری به بنتونیت با افزایش pH ، به صورت خطی بود. بین pH و زمان ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد. مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن نیز نشان داد که بین زمان های ۳۰ و ٦۰ دقیقه پس از مجاورت بنتونیت و باکتری، از نظر تاثیر بنتونیت بر حذف باکتری‌ها، تفاوت معنی داری وجود ندارد ولی در زمان ۹۰ دقیقه، تعداد کلنی‌ها و باکتری‌ها در مقایسه با دو زمان قبلی، معنی‌دار بود یعنی تعداد کلنی‌ها و باکتری‌ها به طور معنی‌داری کاهش یافته و تقریبا به صفر رسیدند (مهار کامل رشد باکتری‌ها) .

واژه‌های کلیدی: بنتونیت- استافیلوکوکوس اورئوس- اسیدیته –زمان- جذب.

Applied Animal Science Research Journal No 15 pp: 73-80

Evaluation of Optimal Time and Acidity for Absorption of Staphylococcus aureus by Sodium Bentonite *in Vitro* Conditions

By: *Vaseji, N., Member of Scientific Board, Dept. of Biotechnology, Animal Science Research Institute of Iran (ASRI),
Mojgani, N., Member of Scientific Board, Dept. of Biotechnology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, IR Iran.
*(Tel: +982634430010, E-mail: vaseji111@gmail.com).

Bentonite is well known as an absorbent and is an effective agent in separating and binding heavy metals, drugs, bacteria and other toxins from the body. In this study, the effect of pH changes (pH 3, 4 and 5) on the absorption and desorption of *Staphylococcus aureus* to sodium bentonite was investigated. In addition, by mixing sodium bentonite with *S. aureus* the bacterial count reduction at different time intervals (0, 30, 60 and 90 minutes) was recorded by direct culture and determining CFU/ml. At each mentioned time interval the changes were recorded. The relation between pH and bacterial absorption to bentonite appeared significant only at pH=5 **.** The reduced absorption of bacteria to bentonite with increasing pH was a linear diagram. There was no significant correlation between pH and time. As well as, average multiple comparisons with Duncan's test showed that, no significant bacterial count reduction occurs after 30 and 60 minutes while after 90 minutes this reduction is highly significant reaching almost zero and complete inhibition of bacterial growth

Key words: Bentonite, Staphylococcus aureus , Acidity ,Time , Absorption

مقدمه

بنتونیت، از تغییر سیلیس مواد آتشفشانی یا هوازدگی سنگ های آذرین تشکیل شده و ترکیبات فیلوسیلیکاتی طبیعی هستند که ساختار کریستالی لایه‌ای داشته و عمدتاً از مونت موریلونیت (کانی های گروه اسمکتیت) تشکیل شده اند(۱۱).

بنتونیت به علت دارا بودن بار الکتریکی منفی جاذب سموم، باکتری ها و بخصوص مایکوتوکسین ها می باشد(۱۰) و دردرمان زخم های باز، کولیت، اسهال، هموروویید، زخم معده، جوش صورت، کم خونی و انواع بیماری هایی که به سلامت بافت ها مربوط است، کاربردهای موفقیت آمیزی داشته است(۷) . جهت درمان موثر بیماری‌های مزمن ناشی از تجمع طولانی مدت فلزات سنگین در بدن که عوارض جانبی نامطلوب و غیر قابل پیش بینی ایجاد می نمایند، استفاده از بنتونیت طبیعی و هر نوع سیلیکات آبدار و کلینوپتیلولیت، جایگزین موثر و بی خطری محسوب می گردد(۲).در تعلیق آبی، ذرات منحصر به فرد بنتونیت دارای شارژ منفی بوده که منجر به جاذبه قوی برای ذرات با بار مثبت می شوند . تقریبا در هر مشکل مزمن، تجمعی از مواد زائد طبیعی بدن که حاوی بسیاری از میکروب هاست، مشاهده می‌شوندکه با ترکیبات داروئی بنتونیت قابل درمان می باشند. هنگامی که بنتونیت به فرم ژل استفاده می شود، در تخلیه روده نقش موثری دارد (۱۲).

بنتونیت سدیمی توانایی بالایی برای جذب سموم قارچی به ویژه آفلاتوکسین‌ها را دارد. در تغذیه دام و طیور و آبزیان، بنتونیت‌ها به عنوان محافظ دستگاه گوارش عمل می‌کنند زیرا به مایکوتوکسین‌ها و به ویژه آفلاتوکسین‌های موجود در خوراک به صورت فیزیکی متصل شده و جذب آن‌ها را در دستگاه گوارش حیوان، کاهش می‌دهند(۴ و ۱۰). با این عمل، تاثیر آفلاتوکسین‌ها بر عملکرد و نقش کبد کاهش یافته و تاثیرات منفی سموم قارچی بر رشد و نمو و سلامتی حیوان کاهش می‌یابد، بدون آن که مشکلی در متابولیسم مواد معدنی بوجود آید (۹). مطالعات مختلف، کاهش میزان باکتری یا محصولات میکروارگانیسمی(مثل آفلاتوکسین) را در حضور بنتونیت نشان دادند (۸). علاوه بر

این، کاهش سموم در دام نیز نشان داده شده است. وقتی بنتونیت سدیم به رژیم غذایی حیوانات مزرعه افزوده شد (در دو دوره تولید مثل و پرورش پوست) هیچ استرپتوکوکوس همولیز کننده و سالمونلای میله ای در نمونه های خوراک پس از مجاور شدن با بنتونیت مشاهده نشد و این نشان دهنده سلامت بهداشتی مواد غذائی مورد مطالعه بود (۶). در سال ۲۰۰۹ نیزگروهی از محققین تاثیر پلت کردن غذای گوساله‌ای که با بنتونیت غنی شده بود را بر روی خواص میکروبیولوژیکی و مایکوتوکسیکولوژی مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان دادند که مراحل بیوتکنولوژی عملی پلتینگ با بنتونیت، تاثیر مثبتی روی اصلاح خواص میکروبیولوژیکی و توکسیکولوژیکی مخلوط داشت (۱). از آنجائی که بنتونیت نقش مهمی در جذب باکتری ها دارد، در این مطالعه تاثیرآن بر روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

در این پروژه با دو روش، کاهش باکتری استافیلوکوکوس اورئوس(RITCC 2411) تهیه شده از موسسه رازی، در مجاورت بنتونیت سدیم (تهیه شده از موسسه تحقیقات علوم دامی) مورد مطالعه قرار گرفت. در روش اول اثر pH مشخص بر این کاهش تعیین و در روش دوم با کشت مستقیم و شمارش باکتری، این کاهش، در زمان های مختلف مشخص شدند.

آماده سازی نمونه باکتری

ابتدا باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در محیط کشت برین هارت اینفیوژن براوث[1] (Merck)کشت و پس از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری (در انکوباتورساخت شرکت Memmertآلمان)، سانتریفیوژ گردید. رسوب حاصله با بافر فسفات نمکی[2](Merck) شستشو و جمع آوری شد . یک میلی لیتر از نمونه‌های باکتری جمع آوری شده به ۱۰ میلی لیتر بافر فسفات نمکی افزوده شد(رقت ۱/۱۰ اولیه). سپس، میزان ۱۰۰ میکرولیتر از رقت ۱/۱۰ اولیه برداشت کرده ودوباره به ۱۰ میلی لیتر بافر فسفات نمکی افزوده شده و میزان جذب اولیه نمونه باکتری حاصل در طول موج ۶۰۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر (Biorad آمریکا) قرائت شد(۰/۲۵۶ = چگالی نوری[3]).

بررسی اثر اسیدیته

نه لوله، به سه دسته سه لوله‌ای تقسیم شدند. دسته اول برای کشت های ۳۰ دقیقه‌ای در نظر گرفته شدند و روی هر یک از آن‌ها به ترتیب pH های ۳، ۴ و۵ نوشته شد. دسته دوم و سوم نیز به همین ترتیب برای کشت های ۶۰ و ۹۰ دقیقه ای با همان pH ها در نظر گرفته شدند. در هر لوله، یک میلی لیتر از رقت تهیه شده باکتری ریخته و به هر لوله دو میلی لیتر آب دو بار تقطیر اضافه شد. سپس pH هر یک از لوله ها، با استفاده از NaOH و HCl(۰/۱ مولار) (Merck) تنظیم شدند. از طرف دیگر، ۶۰ گرم بنتونیت در ۳۰۰ میلی لیتر آب مقطر ریخته به مدت سه روز خیسانده شده و سپس با پارچه تنظیف صاف گردید. محلول صاف شده بنتونیت در نه ارلن ریخته شد(در هر ارلن به میزان ۳۰ میلی لیتر). ارلن هابه مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شدند. پس از اتوکلاو کردن ارلن های حاوی بنتونیت و سرد شدن، pH محلول‌های بنتونیت نیز مطابق با لوله‌های آماده شده توسط NaOH و HCl(۰/۱ مولار) واستریل شده توسط صافی‌های میلی پور، تنظیم گردید. سپس۱۰۰ میکرولیتر از محتوای لوله‌های هر pH ، به داخل بنتونیت استریل شده افزوده شد. ارلن ها برروی شیکر ارلن در زمان‌های مربوطه قرار داده شدند.

پس از گذشت زمان های مربوطه، محتوای ارلن ها با دور ۳۰۰۰[4]rpm به مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ شده سپس مایع روئی آن ها جدا شد. در این حالت بیشتر باکتری، جذب بنتونیت شده و مقادیر جذب نشده در مایع روئی باقی می ماند. چگالی نوری مایعات روئی جدا شده در دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر ثبت گردید. پس از آن، رسوب حاصل از سانتریفیوژ را دو بار با آب مقطر شستشو داده پس از این مرحله جهت بررسی میزان باکتری متصل شده به بنتونیت از روش واجذب استفاده شد. به این ترتیب که pH بنتونیت با استفاده از اسید فسفریک ۵٪ به

---

[1] -Brain Heart Infusion Broth(BHI)

[2] -phosphate buffer saline(PBS)

[3] -Optical Density(OD)

[4] -revolutions per minute (rpm)

۲/۵ رسانده شد، بعد از آن به مدت پنج دقیقه در ۹۰ درجه سانتیگراد حرارت داده شد. در این حالت سوسپانسیون، حاوی باکتری های جدا شده از بنتونیت خواهد بود. سپس لوله ها بادور ۳۰۰۰ به مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ شدند. در این حالت نیز مایع روئی جدا و جهت قرائت چگالی نوری به دستگاه اسپکتروفتومتر انتقال داده شد. این آزمایش در چهار تکرار انجام شد.

جهت انجام آزمایشات تکمیلی و تائید نهائی تاثیر مثبت بنتونیت بر حذف باکتری، آزمایش دیگری نیز به شرح زیر انجام شد:

بررسی اثر زمان

جهت تعیین اثر زمان بر جذب بنتونیت، پانصد میلی لیتر بنتونیت هیدراته(خیسانده و صاف شده طبق روش ذکر شده) در دو ارلن ۵۰۰ میلی لیتری تقسیم شدند. سپس ارلن ها روی شیکر (در دمای اتاق) قرار داده شدند. از یک کشت پنج ساعته استافیلوکوکوس اورئوس جهت انجام توتال کانت به میزان یک میلی لیتر به یک پلیت استریل افزوده (کنترل) و سپس، یک میلی لیتر دیگر به بنتونیت آماده سازی شده افزوده شده و روی شیکر قرار گرفت. پس از پنج دقیقه به هم خوردن، یک میلی لیتر از سوسپانسیون بنتونیت از کشت خارج و جهت شمارش میکروارگانیسم ها، به پلیت استریل منتقل شد و سپس به آن، محیط پلیت کانت آگار با دمای ۴۰ درجه سانتیگراد افزوده در جهت و خلاف جهت عقربه های ساعت تکان داده سپس محیط جهت سرد و جامد شدن به حال خود قرار داده شد(زمان صفر). به مابقی محتوای داخل ارلن طبق روش هاوارد، یک سیلندر مشبک حاوی گلوله‌های NaOH افزوده و روی شیکر قرار داده شد. پس از گذشت ۳۰ دقیقه سیلندر خارج شده، ژل اطراف سیلندر با آب شسته شده و دوباره همراه با گلوله‌های NaOH داخل ارلن گذاشته شدند(۵). مجددا ، یک میلی لیتر از کشت ۳۰ دقیقه‌ای برداشته و جهت انجام توتال کانت به پلیت استریل دیگر انتقال داده شدند(زمان ۳۰). به همین ترتیب مراحل قبل برای زمان های ۶۰ و ۹۰ دقیقه نیز انجام شد . پس از جامد شدن محیط، پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد قرارداده شدند. پس از این مدت شمارش کلنی و ثبت آن ها انجام گرفت (جدول ۳). آنالیز آماری به روش آنالیز واریانس و با نرم افزار SAS 9.2 و رویه GLM (مدل خطی تعمیم یافته) انجام شد.

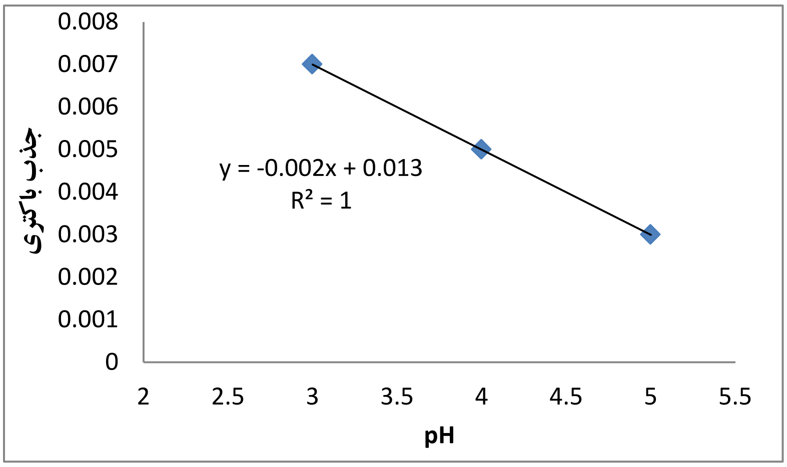
مقایسه میانگین تیمارها با آزمون دانکن انجام شد. صحت برآوردهای انجام شده با آماره کای مربع سنجیده شد.

نتایج

نتایج نشان دادند که تا pH= ۴ جذب باکتری به بنتونیت معنی دار نبوده ولی در pH= ۵ معنی دار است. این آزمایش جهت بررسی تاثیر اسیدیته محیط بر اتصال بنتونیت به باکتری انجام گرفت و مشخص شد که با افزایش pH ، جذب به طور معنی داری کاهش داشته است. تجزیه به مولفه های خطی طی افزایش pH نشان داد که فقط جزء خطی معنی دار بوده و به عبارت دیگر روند کاهش جذب باکتری با افزایش pH به صورت خطی بوده و از یک تابع درجه اول تبعیت می کند (نمودار ۱).

از طرفی، واجذب تا رسیدن به pH = ۵ کاهش معنی داری نداشت. مقایسه میانگین‌های جذب و واجذب باکتری استافیلوکوکوس در زمان های مختلف آزمایش نشان داد که بین جذب و واجذب باکتری و زمان‌های مختلف آزمایش، اختلاف معنی‌داری وجود ندارد(جدول ۱)

مقایسه ترکیبی زمان و pH برای میانگین های جذب، اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف نشان نداد ولی بین میانگین جذب در pH= ۳ و زمان ۶۰ دقیقه و pH = ۳ و زمان ۹۰ دقیقه با میانگین جذب در pH = ۵ و زمان ۹۰دقیقه اختلاف معنی‌داری وجود دارد($P<$۰/۰۵) . سایر تیمارها از نظر جذب باکتری به بنتونیت اختلاف معنی‌داری نداشتند(جدول ۲).



نمودار ۱- نمودار خطی جذب باکتری به بنتونیت(چگالی نوری قرائت شده با اسپکتروفتومتر) در pH های مختلف

جدول ۱- مقایسه میانگین‌های جذب و واجذب باکتری استافیلوکوکوس در زمان های مختلف آزمایش

زمان	میانگین ها	
	OD1	OD2
۳۰دقیقه	۰/۰۰۵^{b}	۰/۰۹۵^{a}
۶۰دقیقه	۰/۰۰۵^{b}	۰/۰۸۴^{a}
۹۰دقیقه	۰/۰۰۵^{b}	۰/۰۷۷^{a}
SEM	۰/۰۰۱	۰/۰۲۱

OD1 : میزان جذب باکتری به بنتونیت(قرائت شده توسط اسپکتروفتومتر) SEM : خطای استاندارد میانگین

OD2 : میزان واجذب باکتری از بنتونیت(قرائت شده توسط اسپکتروفتومتر) حروف غیرمشابه a، b، ... در یک سطر نشاندهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $P<۰/۰۵$ می باشند

جدول ۲- مقایسه ترکیبی زمان و pH برای میانگین های جذب و واجذب

تیمار	میانگین ها	
	OD1	OD2
pH= 3 30min	۰/۰۰۶^{ab}	۰/۱۳۷^{a}
pH= 4 30min	۰/۰۰۶^{ab}	۰/۰۶۵^{a}
pH= 5 30min	۰/۰۰۳^{ab}	۰/۰۸۴^{a}
pH= 3 60min	۰/۰۰۸^{a}	۰/۰۹۱^{a}
pH= 4 60min	۰/۰۰۵^{ab}	۰/۰۶۵^{a}
pH= 5 60min	۰/۰۰۳^{ab}	۰/۰۹۶^{a}
pH= 3 90min	۰/۰۰۸^{a}	۰/۱۲۳^{a}
pH= 4 90min	۰/۰۰۵^{ab}	۰/۰۴۹^{a}
pH=5 90min	۰/۰۰۳^{b}	۰/۰۵۷^{a}
SEM	۰/۰۲۹	۰/۰۳۶

OD1: میزان جذب باکتری به بنتونیت(قرائت شده توسط اسپکتروفتومتر) SEM : خطای استاندارد میانگین

OD2 : میزان واجذب باکتری از بنتونیت(قرائت شده توسط اسپکتروفتومتر) حروف غیرمشابه a، b، ... در یک سطر نشاندهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $P<۰/۰۵$ می باشند

جدول۳، تعداد کلنی های شمارش شده در زمان‌های مختلف را نشان می دهد. به طوری که ملاحظه می شود، زمانی که باکتری به طور خالص کشت داده شد(کنترل) و نیز زمانی که باکتری و بنتونیت مجاور شدند(زمان صفر) نمونه های کشت شده غیر قابل شمارش گزارش شدند. این به آن معنی است که در زمان اولیه، هنوز اتصال فیزیکی بین باکتری و بنتونیت ایجاد نشده و بنابراین حذف باکتری از محیط توسط بنتونیت صورت نگرفته است. بعد از گذشت ۳۰ دقیقه، میزان باکتری ها به طور قابل ملاحظه‌ای نسبت به زمان صفر کاهش یافتند و پس از آن در نهایت در زمان ۹۰ دقیقه تقریبا به صفر نزدیک شدند. در زمان صفر، باکتری‌ها به طور غیر قابل شمارش در محیط کشت وجود داشتند . در زمان ۶۰ نسبت به ۳۰ افزایش نسبی کلنی (در هر چهار تکرار) مشاهده شد و در نهایت در زمان ۹۰ تقریبا پلیت عاری از کلنی مشاهده گردید.

جدول ۳ - شمارش کلی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس(تعداد کلنی و تعداد باکتری) در زمان های ۰، ۳۰ ، ۶۰ و ۹۰ دقیقه در چهار تکرار

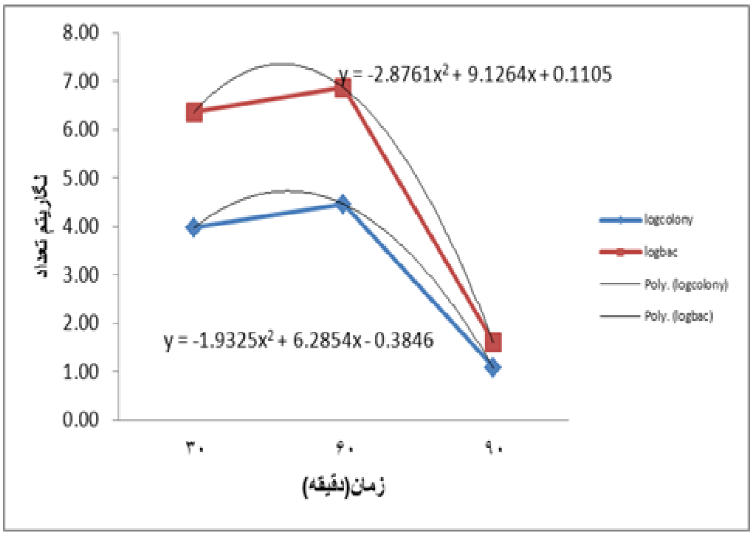
زمان	شمارش میکروبی/ میلی لیتر(۱)	شمارش میکروبی/ میلی لیتر (۲)	شمارش میکروبی/ میلی لیتر (۳)	شمارش میکروبی/ میلی لیتر (۴)
کنترل	غیر قابل شمارش	غیر قابل شمارش	غیر قابل شمارش	غیر قابل شمارش
۰	غیر قابل شمارش	غیر قابل شمارش	غیر قابل شمارش	غیر قابل شمارش
۳۰ دقیقه	۴۳۲۵۰*	۳۰۰۰	۱۵۲۵۰	۳۷۵۰
	(۱۱× ۱۰^{۶})**	(۷× ۱۰^{۵})	(۴× ۱۰^{۶})	(۹× ۱۰^{۵})
۶۰ دقیقه	۶۹۵۰۰	۱۷۰۰۰	۳۹۰۰۰	۱۴۵۰۰
	(۱۷× ۱۰^{۶})	(۴× ۱۰^{۶})	(۱× ۱۰^{۷})	(۴× ۱۰^{۶})
۹۰ دقیقه	۰	۳	۶	۰
		(۱× ۱۰^{۳})	(۲× ۱۰^{۳})	

*: تعداد کلنی

: تعداد باکتری

تجزیه واریانس با استفاده از اجزاء خطی و انحراف از خط صورت گرفت و نتایج نشان دادند که برای میزان باکتری و کلنی‌ها جزء خطی و انحراف از خط معنی‌دار است. به عبارت دیگر، تابع تعداد باکتری و تعداد کلنی طی زمان، یک تابع درجه ۲ می باشد(نمودار ۲).

مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن نشان داد که در زمان ۹۰ تعداد کلنی‌ها و باکتری‌ها به طور معنی‌داری کاهش یافته‌اند . در زمان ۶۰ تعداد باکتری بیشتر از زمان ۳۰ می باشد ولی این افزایش معنی‌دار نیست.



نمودار۲-کاهش میزان حذف باکتری توسط بنتونیت در طول زمان های ۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه

مقایسه چندگانه میانگین با آزمون دانکن نشان داد که بین زمان های ۳۰ و ۶۰ دقیقه از نظر تاثیر بنتونیت بر حذف باکتری ها تفاوت معنی دار نبود ولی بین زمان ۹۰ دقیقه بعد از مجاورت با بنتونیت و دوزهای دیگر تفاوت معنی دار بود($P<۰/۰۵$).

به طوری که نمودار۲ نشان می دهد، کاهش میزان حذف باکتری توسط بنتونیت در طول زمان های ۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه خطی نبوده و ابتدا در زمان ۶۰ افزایش نسبی نشان داده و در نهایت تا زمان ۹۰ دقیقه کاهش پیدا می کند.

بحث

مطالعات ما نشان دادند که روند کاهش جذب باکتری با افزایش pH به صورت خطی بوده است (نمودار ۱) . ولد در سال ۱۹۹۲، نشان داد که pH محیطی که بنتونیت در آن قرار می‌گیرد بر میزان جذب ترکیبات موثر است. در pH پایین‌تر، ترکیبات دارای بار مثبت راحت‌تر جذب بنتونیت می شوند. در خصوص برخی ترکیبات نیز حداکثر جذب آن توسط بنتونیت درpH بین ۵/۲ تا ۶/۱ اتفاق می افتد (۱۳).

در آزمایشی که گالیندو و همکاران در سال ۱۹۸۴ انجام دادند، با اضافه کردن یک درصد زئولیت، رشد باکتری‌های هضم کننده سلولز افزایش پیدا کرد. از جمله دلایل این امر، افزایش فعالیت این باکتری‌ها به واسطه افزایش یون‌های Ca^{2+} و Mg^{2+} وثبات pH شکمبه(حدود ۶) ذکر شد(۳).

از طرفی، زمان مناسب جهت حذف باکتری توسط بنتونیت در شرایط آزمایشگاهی ۹۰ دقیقه می باشد. در همان زمان اولیه تماس باکتری با بنتونیت، حذف باکتری از محیط صورت نمی گیرد بلکه این کار به مرور زمان و به تدریج انجام می شود. در آزمایشی مشابه، دکتر لیند در سال ۱۹۶۱، آزمایش فوق را با باکتری‌های مختلف گرم مثبت و منفی انجام داد(۵). در مورد استافیلوکوکوس اورئوس نتایج آزمایش او نشان داد که افزودن۲۰-۳۰٪ بنتونیت، ۳۳ درصد از کل باکتری ها را از محیط حذف می کند. در این مورد مشاهده شد که از زمان ۳۰ به ۶۰دقیقه تعداد کلنی شمارش شده افزایش یافت. در مطالعه ما نیزدر زمان ۶۰ دقیقه افزایش نسبی در تعداد کلنی مشاهده شد(به عنوان مثال در تکرار اول از ۴۳۲۵۰ کلنی در ۳۰ دقیقه به ۶۹۵۰۰ کلنی در ۶۰ دقیقه افزایش یافت) که نشان می‌دهد در غلظت‌های پایین‌تر باکتری، جذب انتخابی وجود دارد. به طوری که وقتی جمعیت میکروارگانیسم در زمان ۳۰ دقیقه کمتر می شود و غلظت بنتونیت ثابت باقی می ماند، مثل همان زمانی که ارگانیسم‌های تنها مورد استفاده قرار گرفتند، هیچ انتخابی در جذب انجام نمی شود. بنابراین برای انتخاب و جذب میکروارگانیسم ها در ۶۰ دقیقه، نیاز به استفاده از مقدار بنتونیت به میزان بیشتر می‌باشد.

علاوه بر این در آزمایش دکترلیند، تعداد باکتری اشریشیا کولای بعد از ۶۰ تا ۹۰ دقیقه و با افزودن ۲۰٪ بنتونیت، کاهش یافت. به همین ترتیب کاهش تعداد دیگری باکتری به مرور زمان توسط آزمایشات وی تائید گردید (۵).

در تحقیق حاضر نشان داده شد که حذف باکتری استافیلو کوکوس اورئوس توسط بنتونیت در شرایط آزمایشگاهی اجتناب ناپذیر است . با توجه به این که بنتونیت از طریق حذف فیزیکی باکتری را از محیط خارج می سازد، با ساخت داروهای بنتونیتی جایگزین داروهای شیمیائی که اکثرا دارای عوارض جانبی نیز می باشند می توان در مقابله با بسیاری از بیماری‌های میکروبی راهکارهای جدیدی ارائه نمود.

تقدیر و تشکر

بر خود وظیفه می دانم تا از راهنمائی ها ، تلاش های صمیمانه و حمایت های ارزنده آقایان مهندس محمد حسین شکوه زنگنه، دکتر سید احمد میرهادی، دکتر سیروس امیری نیا، مهندس محمد حسین بنابازی ، دکتر سید عبداله حسینی و سرکار خانم ها مهندس ژاله میرعبدالباقی ، خدیجه فرهنگ، منصوره عاملی، مرجان برازجانی و فاطمه طالبلو، سپاسگزاری و قدردانی نمایم.

منابع

1-Adamovic´ M. J, B.-S. A. S., Pantic´ V. R, Radivojevic´ M. A, Adamovic´ I. D,Stojanovic´ B. D. 2009. Influence of pelleting on microbiological and mycotoxical of feed mixtures with bentonite supplement. *Matica Srpska Proceedings for Natural Sciences*. 116(17), 113-119

2-Flowers J, L. Lonky S, A. Deitsch E,J.2009. Clinical evidence supporting the use of an activated clinoptilolite suspension as an agent to increase urinary excretion of toxic heavy metals. Dovepress Journal. (1) ,. 11 – 18 .

3-Galindo J. Cardero E, A. 1984. The effect of zeolite on rumen microbial population of cow consuming silage. *Cub. J. Agric. Sci*. 18, 57-65.

4- Grant P. G, Phillips T. D. 1998. Isothermal adsorption of aflatoxin B1 on HSCAS clay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46, 599-605.

5- Howard E. Lind, e. a. 1961. Changes in bacterial counts of seratia marcescens, staphylococcus aureus, proteus mirabilis, E. coli in presence of bentonite. Laboratory experiments on hydrated bentonite.

6- Nowakowicz-Debek B, W. t.2011. Effect of dietary sodium bentonite supplement on microbial contamination of mink feed. *Polish Journal of Environmental Studies*. 20(4), 1103-1106.

7- Rodrigues-Fuentes,G. Barrios ,M.A. Iraizoz ,A. Perdomo ,I. Cedre B.1997. Enterex: anti-diarrheic drug based on purified natural clinoptilolite (PDF). Elsevier Science Inc, 19(441–448).

8-Rosa C. A. R, M. R., Magnoli C , Salvano M, Chiacchiera S. M, Ferrero S. 2001. *Poultry Science* Association, Savoy, USA. Evaluation of the efficacy of bentonite from the south of Argentina to ameliorate the toxic effects of aflatoxin in broilers. Poultry Science. 80(2), 139-144.

9- Santurio J. M, M. C. A., Rosa A. P, Appel G, Heer, A, Dageförde S, Böttcher M. 1999. Effect of sodium bentonite on the performance and blood variables of broiler chickens intoxicated with aflatoxins. *British Poultry Science*. 40(1), 115-119.

10- Timothy D.phillips .1999. Dietary clay in the chemoprevention of aflatoxin-induced disease. Toxicological Sciences,. 52, 118-126.

11- Trckova M, M. L., Dvorska L, Pavlik I, Kaolin. 2004. Bentonite and zeolite as feed supplements for animals: health advantages and risks. Vet Med Czech. 49(10), 389-399.

12- Tymczyna L, M. T., Podgorski W, Polonis A.1995. Effect of adding natural aluminosilicate (bentonite) on sanitary conditions and growth of broiler chickens,. 22(2), 371-381.

13- Velde,B. Chapman and Hall.1992. Introduction to Clay Minerals - Chemistry, Origins, Uses and Environmental Significance, London,. 29(4),385-386

* * *