جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة القادسية – كلية العلوم

قسم علوم الحياة

تقييم فعالية العسل ضد البكتيريا المقاومة للمضادات الحيوية والمعزولة من حالات سريرية مختلفة

بحث مقدم إلى مجلس قسم علوم الحياة / كلية العلوم

وهو من متطلبات نيل شهادة البكالوريوس / علوم الحياة

اعداد الطالبة

زينب علي حسين

بإشراف

م . د . غيداء جهادي محمد

١٤٣٩ هـ

٢١٠٨ م

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَٰنِ الرَّحِيمِ

﴿وَقُلِ اعْمَلُوا فَسَيَرَى اللَّهُ عَمَلَكُمْ

وَرَسُولُهُ وَالْمُؤْمِنُونَ﴾

صدق الله العلي العظيم

سورة التوبة الآية (١٠٥)

" الإهـــــــداء "

إلى رجل الكفاح .... إلى من زرع القيم والمبادئ الإسلامية .... إلى من أفنى زهرة شبابه في تربية أبنائه....

والدي العزيز....

إلى القلب النابض .... إلى المحبة والتسامح .... إلى من كانت دعواتها سر نجاحي ....

والدتي العزيزة....

إلى كل أفراد أسرتي من الأخوة والأخوات .... وإلى كل من ساندني وشجعني من صديقات المقربات

الذين كانوا برفقتي ومصاحبتي أثناء دراستي الجامعية....

إلى كل من لم يدخر جهداً في مساعدتي ولو بكلمة واحدة....

زينب

" الشكر والتقدير "

لا يسعني بعد الانتهاء من إعداد هذا البحث إلا أن أتقدم بجزيل الشكر والامتنان إلى أُستاذتي الفاضلة (د. غيداء جهادي) التي تفضلت بالإشراف على هذا البحث حيث قدمت لي كل النصح والإرشاد طيلة فترة الإعداد فلها مني جزيل الشكر والتقدير.

كما واتقدم بجزيل الشكر إلى عميد كلية العلوم (د. نبيل عبد عبد الرضا) وإلى رئاسة قسم علوم الحياة (د.حبيب وسيل شبر) الذي وقف معنا طيلة فترة المراحل الدراسية.

كما لا يفوتني أن أتقدم بالشكر إلى طالبة الماجستير الست (راوية) وذلك بتفضلها عليَّ بالتعليم أيضاً، مع توجيهات الدكتورة المشرفة عليَّ. وإلى كل من قدم لي كلمة معرفة خلال تقديم هذا البحث.

لكم مني جزيل الشكر والامتنان والتقدير.

زينب

الـخـلاصــة Abstract :

إن مقاومة المضادات المتعددة هي قضية صحية عالمية. وبالتالي فإن دمج الطب التقليدي مثل العسل والطب الحديث يمكن أن يكون الخيار الأفضل في علاج المرضى المصابين بالبكتيريا المقاومة للأدوية. على الرغم من وجود الأزهار العديدة والإنتاج الضخم للعسل في المنطقة، لا توجد دراسات لتقييم النشاط المضاد للعسل ضد البكتيريا المقاومة للأدوية المتعددة.

وقد تم استخدام العسل بتراكيز مختلفة لمعرفة التنشيط الذي ممكن أن يحدث لعزلات البكتيريا المعزولة من حالات سريرية مختلفة، حيث تم استخدام أنواع مختلفة من البكتيريا هي *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* و *Proteus mirabilis* و *Pseudomonas aeruginosa* و *Salmonella typhi* و *Leuconostoc mesenteroides* و *Serratia marcescens* ، التي شخصت باستخدام الفحوصات المختبرية لكل نوع ولوحظ تثبيط البكتيريا بتراكيز مختلفة من العسل. حيث يمكن استخدام العسل كمثبط لعمل أو إيقاف نشاط البكتيريا الممرضة وأيضاً تمت المقارنة من خلال البحث بين العسل والمضادات الحيوية باستخدام طريقة الانتشار في الأطباق (disk diffusion) لمعرفة البكتيريا المقاومة للمضادات الحيوية. حيث ظهرت *Pseudomonas aeruginosa* مقاومة عالية للمضادات الحياتية، وأيضاً مقاومة متوسطة للعسل حيث تم تثبيط البكتيريا بتركيز ($٢^{-٢}$) ($\frac{1}{4}$) وهو التركيز المثبط الأدنى القاتل للبكتيريا، وبكتيريا *Staphylococcus aureus* تم تثبيطها بتركيز ($\frac{1}{8}$) وهو الحد الأدنى القاتل للتثبيط.

الفصل الأول

" المقدمة Introduction "

المقدمة Introduction :

قد استخدمت مجموعة متنوعة من النباتات ومستخلصاتها للعلاج التي تتطلب النشاط المضاد للميكروبات، و واحدة من المواد المضادة للميكروبات الطبيعية الشعبية وصفها الطب القديم هو العسل (Mandal and Manadal, 2011).

العسل: هو مادة حلوة طبيعية يتم الحصول عليها من إفرازات الأجزاء الحية أو إفرازات النباتات التي يجمعها نحل العسل (*Apis mellifera*) تجمع وتخزن (Moore *et al.*, 2001). على الرغم من أن العسل يستخدم على نطاق واسع في الطب التقليدي، إلا أن استخدامه في الطب الحديث محدود (Geenwood, 1993). يستخدم العسل لعلاج العديد من الالتهابات، وتستخدم أيضاً بشكل فعال كضماد للجروح بما في ذلك الجروح الجراحية والحروق وقرحة الجلد. وذلك أساساً لأنه يسرع نمو الأنسجة الجديدة ويساعد على شفاء الجرح، ويقلل من الألم والرائحة بسرعة (Lusby *et al.*, 2002).

إن الطبيعة الأزموزية العالية ودرجة الحموضة المنخفضة بشكل طبيعي (٣,٢ – ٤,٥) (Kwakman and Zaat, 2012)، والقدرة على إنتاج بيروكسيد الهيدروجين، الذي يلعب دوراً رئيسياً في فعالية العسل المضادة للميكروبات (Kacaniova *et al.*, 2011) والعوامل النباتية الكيميائية مثل مشتقات التتراسيكلين، البيروكسيدات، الأميليز، الأحماض الدهنية، الفينولات، حمض الاسكوربيك، التربين، كحول البنزيل وحمض البنزويك (Shears, 2000) هي العوامل التي عزيت أن يكون لها نشاط قوي مثبط وقاتل ضد البكتيريا المسببة للأمراض.

وقد أظهرت الدراسات تأثير العسل المضاد للجراثيم واسع الطيف للعديد من البكتيريا بما في ذلك الهوائية واللاهوائية والسالبة والموجبة لصبغة كرام (Allen *et al.*, 2000; Kingsley, 2001; Cooper *et al.*, 2002; Al-Waili *et al.*, 2005). وقد وجد أن معظم البكتيريا المسببة للأمراض البشرية التي تسبب التهابات الجروح مثل المكورات العنقودية الذهبية والزائفة الزنجارية والإشريكية القولونية والعقدية المقيسة حساسة للعسل (Visavadia *et al.*, 2006). تركيز العسل المستخدم وطبيعة العزلة البكتيرية؛ أصل وطريقة معالجة العسل هي العوامل التي تؤثر على نشاط العسل المضاد للبكتيريا (Kacaniova *et al.*, 2011).

قد أوضحت دراسات أجريت من قِبَل كل من (Reinberg, S. and Joseph, 2008) أن العسل لهُ فعالية مضادة لما يعرف بأشكال Biofilm، فبعض أنواع مختلفة من البكتيريا المكونة لـ Biofilm وخصوصاً staph. aureus ps.aeruginosa التي تسبب التهاب الجيوب الأنفية والتي تقاوم المضادات الحياتية لأنها مكونة Biofilm الذي لا يسمح اختراق المضادات المستخدمة في العلاج، فعند استخدام العسل على هذه الأنواع من البكتيريا فقد وجد أن العسل ذو فعالية أكثر وأكبر في قتل هذه البكتيريا أكثر من المضادات الحياتية. كما ورد في القرآن الكريم وعلى لسان النبي محمد " صلى الله عليه واله وسلم" والتي أثبت العلم الحديث المتطور حيث وجد الباحث(Bogdanov, 1984) والباحث (El-Banby , 1987) أن العسل قد يقاوم جميع أنواع البكتيريا ويكون مضاد لها وقد يحل محل المضادات الحياتية. إن للعسل قدرة عالية وفائقة على التعقيم وأيضاً خواص مضادة للجراثيم ونقلاً عن عبد الله (٢٠٠٨) أن العسل له تأثير قاتل للبكتيريا وخاصة عند تطبيقه على الجروح والسطوح الملتهبة ، كما أن فائدته ونفعه من أكبر المطهرات.

وقد أدى الاستخدام العشوائي المضاد للمضادات الحيوية إلى ظهور سلالات بكتيرية مقاومة للأدوية المتعددة، وهي مشكلة صحية عالمية عامة (Mandal *et al.*, 2009; Kacaniova *et al.*,2011). ولحل هذا التحدي، أصبحت استراتيجيات مضادات الميكروبات البديلة مثل النباتات والمنتجات النباتية مثل العسل تحظى حالياً بقدر أكبر من الاهتمام (Mulu *et al.*, 2004; Basualdo *et al.*,2007).

إن هناك عدد قليل من الأبحاث التي أجريت فيما يتعلق بفعالية العسل المضادة للميكروبات (Mulu *et al.*, 2004; Getaneh *et al.*, 2013; Ahmed *et al.*, 2014).

الهدف من الدراسة:

تقييم فعالية العسل المضادة على بعض العزلات البكتيرية المرضية ذات المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية.

الفصل الثاني

" المواد وطرائق العمل Material and Methods

٢-١: المواد Materials :

أ- الأجهزة والمعدات Equipments and Instruments :

استخدمت الاجهزة والمعدات المختبرية الآتية:

جدول (٢ – ١) الأجهزة والمعدات المستخدمة

أسم الجهاز	الشركة المصنعة
١. فرن كهربائي Electric Oven	Eriotti (Italy)
٢. حاضنة Incubator	Gallen Kaamp (England)
٣. ثلاجة Refrigerateor	Concord (Lebanon)
٤. ميزان الكتروني حساس Sensitive Electronic Balance	Gallen Kaamp (England)
٥. أطباق بلاستيكية Disposable Petri Dishes	Al- Hani (USA)
٦. شرائح زجاجية وغطاء الشريحة Slides and cover slides	Supere star (India)
٧. دورق مخروطي Conical Flasks	BBL / USA
٨. Autoclave	Gallen Kaamp (England)
٩. كابينة الزرع المجهري Laminar Flow Cabint	(South Korea) (Labtech)
10.مسحة قطنية Swab	Guangdong, China

ب. المواد الكيمياوية والصبغات:

تم استخدام المواد الكيمياوية والصبغات الآتية:

جدول (٢-٢) المواد الكيمياوية والصبغات

ت	اسم المادة والصبغة
١.	ببتون Peptone
٢.	محلول أثيلي Ethanol
٣.	بيروكسيد الهيدروجين Hydrogen peroxide H_2O_2

٤.	كلوكوز Glucose
٥.	بلورات اليود Iodine crystal
٦.	Sucrose
٧.	مانتول Mannitol
٨.	لاكتوز Lactose
٩.	صبغة البنفسج البلوري Grystal violet
١٠.	صبغة السفرانين Safranine Dye

ج. الأوساط الزرعية Culture Media:

استخدام الأوساط الزرعية الآتية في عزل وتشخيص البكتيريا

جدول (٢ – ٣) الأوساط الزرعية

ت	اسم الوسط الزرعي	الغرض من الاستخدام
١.	Blood agar	عزل وتشخيص البكتيريا الموجبة لصبغة كرام والسالبة لصبغة كرام
٢.	MacConkey agar	لعزل البكتيريا السالبة لصبغة كرام وتمييز المخمرة للاكتوز عن غير المخمرة
٣.	Pepton water	للتحري عن قابلية البكتيريا على انتاج الاندول من الحامض الأميني التربتوفان
٤.	Mannitol – Salt agar	لعزل بكتيريا S. aureus من الأنواع الأخرى
٥.	Muller hinton agar	لاختبار فحص الحساسية للبكتيريا المعزولة
٦.	Methyl red– voges proskauer media	التحري على الاسيتون والأحماض العضوية
٧.	Triple Sugar Iron	يستعمل للتفريق بين البكتيريا المخمرة لأنواع مختلفة من السكريات وكشف البكتيريا المنتجة لغاز H2S
٨.	Simmon Citrate	اختبار قابلية البكتيريا على انتاج السترات
٩.	Nutrient agar	تنقية وتنمية العزلات

د. المحاليل والكواشف:

استخدمت المحاليل والكواشف الآتية :

جدول (٢ – ٤) المحاليل والكواشف المستخدمة.

ت	اسم المحلول أو الكاشف	الهدف من الاستخدام
١.	Gram stain solution	لغرض تصبيغ وتمييز الخلايا البكتيرية
٢.	Catalase reagent	التحري عن إنزيم الكاتاليز المنتج من قبل البكتيريا
٣.	Kovacs reagent	للكشف عن الاندول المنتج من قبل البكتيريا
٤.	Methyl red reagent	التحري على انتاج الاحماض العضوية نتيجة لتخمر سكر الكلوكوز من قبل البكتيريا
٥.	Voges – proskauer	معرفة قابلية البكتيريا على انتاج الاسيتون
٦.	Oxidase reagent	لتشخيص البكتيريا

هـ. المضادات الحياتية :

(**Erthromycine , Nitrofuranicin , Gentamycin , Cefotaxime , Doxycycline** , **Amoxicillin , Norfloxacin , Nitrofurantion , Ampicillin , Ceftriaxone**).

٢,٢.طريقة العمل Methods

أولاً: تحضير الأوساط الغذائية :

١. لقد تم تحضير الأوساط الغذائية الجاهزة حسب تعليمات الشركة المنتجة لها .

٢. وسط كري TSI (Triple Sugar Iron) حسب (Biochemical test, 2001).

ثانياً: تحضير الكواشف:

حضرت الكواشف التالية حسب ما ذكر في (Macfaddin, 2000):

١.كاشف كوفاكس Kovac´s reagent :

أذيب ٥ غم من P-dimethyl amino benzyladehyde في ٧٥ مل من Isoamyle alchohol وأضيف إليه ٢,٥ مل من حامض الهيدروكلوريك المركز بحذر وبشكل تدريجي.

٢.كاشف المثيل الأحمر Methyl red reagent:

تمت إذابة ٠,١ غم من صبغة أحمر المثيل في ٣٠٠ مل من الكحول الأثيلي بتركيز ٩٥% وأكمل الحجم إلى ٥٠٠ مل باستخدام الماء المقطر.

٣.كاشف الكاتاليز Catalase reagent:

حضر بتركيز ٣٠% من بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 في قنينة معقمة.

٤. كاشف فوكس بروسكاور Vogas proskauer reagent :

كاشف (A) حضر بإذابة ٥ غم من Naphthol في كمية قليلة من الكحول الأثيلي المطلق ثم أكمل الحجم إلى ١٠٠ مل من الكحول الأثيلي المطلق.

كاشف (B) تمت إذابة ٤٠ غم من هيدروكسيد البوتاسيوم KOH في ١٠٠ مل من الماء المقطر.

٥.كاشف التجلط Coaglase reagent :

تم تحضيره بإضافة ٠,٥ من بلازما الدم إلى أنبوبة بلاستيكية تحتوي على مادة EDTA وحفظ في الثلاجة.

٦. كاشف الأوكسيديز :

حضر بإذابة ١ غم من Tetramethyl paraphenyene – dimine dihydro chloride في ١٠٠ مل من الماء المقطر.

ثالثاً: تحضير المحاليل:

تم تحضير المحاليل بحسب ما ذكر في (Jawetz,1998) كالآتي:

محاليل الصبغة:

١. محلول الكريستال البنفسجي : تم إذابة ٠,٥ غم من الصبغة في ١٠٠ مل من الماء المقطر .

٢. محلول اليود : مسحوق ١ غم من اليود و٩ غم من يوديد البوتاسيوم في جفنه وتمت إذابته في ٥ مل من الماء المقطر وإكمال الحجم إلى ١٠٠ مل وحفظ في قنينة معتمة.

٣. القاصر Decolorizer : تمت باستعمال الكحول بتركيز ٩٥%.

٤. محلول السفرانين : تمت إذابة ٠,٥ غم من الصبغة في ١٠ مل من الكحول ثم إكمال الحجم إلى ١٠٠مل من الماء المقطر وحفظ في قنينة معتمة .

رابعاً: التعقيم Sterilization :

التعقيم الرطب Autoclaving تم تعقيم الأوساط الزرعية الغذائية كافة والمحاليل بالموصدة عند درجة حرارة ١٢١ مْ ولمدة ساعة كاملة.

رابعاً: أخذ العينات

لقد تم أخذ العينات من الأشخاص المصابين بحالات مرضية مختلفة ولكلا الجنسين ولمختلف الأعمار وتم أخذ العينات بواسطة Swab معقم استخدم لمرة واحدة فقط وبعد أخذها تم زرعها على الأوساط الزرعية الخاصة والتشخيص المجهري والاختبارات على التوالي (Kanin, 1996).

خامساً: زرع العينات:

لقد تم زرع العينات على وسط Blood agar إذ قمنا بتخطيط العينة المأخوذة من الشخص المصاب بواسطة Swab على الوسط الزرعي بالقرب من نار مصباح بنزن وبعد ذلك تم تلف الـ Swab ويحضن الطبق الملقح بالعينة في الحاضنة لمدة ٢٤ ساعة بدرجة حرارة ٣٧ مْ ويراقب النمو (Collee, 1996).

سادساً: تشخيص العزلات البكتيرية:

تم تشخيص العزلات من خلال :

١. خصائص المستعمرات المظهرية والمزرعية :

لوحظت الصفات المظهرية للمستعمرات النامية أشكالها ولونها – سطح المستعمرة – قوامها – شفافيتها – نمط التحلل على أكار الدم وتخمرها للسكريات في وسط Triple sugar Iron .

٢. الخصائص المجهرية:

تم عمل مسحات من المستعمرات النقية على شرائح زجاجية وصبغت بصبغة كرام وفحصت تحت المجهر بالقوى الكبرى في المجهر الضوئي المركزي ولاحظ أشكال الخلايا ونوع تركيبها واستجابتها لصبغة كرام سالبة أو موجبة.

٣. الاختبارات الكيموحيوية:

أ. البكتيريا السالبة لصبغة كرام:

١. اندول Indol test :

تم تلقيح وسط ماء الببتون Pepton water بالبكتيريا المراد اختبارها وحضنت عند درجة ٣٧ مْ لمدة ٤٨ ساعة أضيف ٠,٥ من الكاشف Kovac´s reagent إلى الأنبوبة الملقحة ورجت بلطف. إن ظهور حلقة حمراء دليل على إيجابية الاختبار (Collee, 1996).

٢. أحمر المثيل Methyl red test :

لقح وسط MR.VP بالبكتيريا وحضن عند درجة ٣٧ مْ لمدة ٤٨ ساعة واضيفت إلى الوسط ٥ قطرات من الكاشف أحمر المثيل وتغير لون الوسط إلى الأحمر يدل على التحلل الكامل للسكر وانتاج الحامض. أما إذا تغير اللون إلى الأصفر فهذا يدل على النتيجة السالبة للاختبار (Collee, 1996).

٣. الفوكس بروسكاور Vogus – proskaur test :

لقحت الأنابيب المحتوية على وسط MR.VP بالبكتيريا المراد اختبارها وحضنت بدرجة حرارة ٣٧ مْ لمدة ٢٤ ساعة. أضيفت قطرات من كاشف (A) وقطرتان من كاشف (B) إلى كل أنبوبة حاوية على وسط الملقح وقرأت النتيجة بعد ١٥ دقيقة. إن تغير اللون إلى الاحمر دلالة على التحلل الجزئي للسكر وإن النتيجة موجبة للاختبار. أما ظهور اللون الأصفر فيدل على النتيجة السالبة (Baron *et al.*, 1994).

٤. استهلاك السترات Citrate Utilization :

لقح وسط أكار السترات بالبكتيريا المراد اختبارها. ثم حضنت عند درجة حرارة ٣٧ مْ لمدة ٢٤ ساعة. إن تغير لون الكاشف من الأخضر إلى الأزرق يدل على إيجابية الاختبار أي استهلاك السترات كمصدر وحيد للكاربون.

ب. البكتيريا الموجبة لصبغة كرام:

١. النمو على الوسط Mannitol Salt agar :

أعيد زرع العينات الموجبة لصبغة كرام على وسط المانتول الملحي M.S.A لتميز العنقوديات الذهبية S. aureus المخمرة للمانتول عن تلك غير المخمرة. إذ تنمو المكورات الذهبية على هذا الوسط. وأما الغير مخمرة فإنها تنمو بدون تغير في لون الوسط.

٢. اختبار الكاتاليز Catalase test :

تم وضع كمية من مزرعة البكتيريا المراد اختبارها بعمر ٢٤ ساعة بواسطة ناقل زرعي معقم على شريحة زجاجية نظيفة بالقرب من مصباح بنزن. ثم وضعت قطرة من بيروكسيد الهيدروجين ٣٠% ظهور الفقاعات الغازية دلالة على النتيجة الموجبة للاختبار (Baron et al., 1994).

٣. إنزيم التخثر Slide Coagulase test :

وضعت قطرة من البلازما على شريحة زجاجية نظيفة قطرة من الماء المقطر على الطرف الآخر للشريحة كضابط Control بواسطة ناقل أخذت كمية من المستعمرة ومزجت مع كل قطرة. يعد التفاعل موجب إذا حصل تخثر خلال عشرين ثانية. يستعمل هذا الاختبار للكشف عن إنزيم التخثر (Coagulase) (Baron et al., 1994).

٤. تحلل الدم Hemolysis :

لقح وسط أكار الدم بالمزروع البكتيري النقي و حضن عند درجة ٣٧ مْ لمدة ٢٤ ساعة ظهور مناطق شفافة حول المستعمرات البكتيرية النامية يدل على قابلية البكتيريا على أفراز Hemolysis (Cowan, 1985).

سابعاً: اختبار فحص الحساسية:

نأخذ مزرعة نقية من بكتيريا مشخصة حيث نأخذ أنبوبة تحتوي على ٥ مل من (nutrient broth) ثم يضاف لهذه الأنبوبة ٥ مستعمرات معزولة نامية على الوسط Blood agar وتحضن بدرجة ٣٧ مْ لمدة ٢٤ ساعة حتى تظهر في الوسط . ثم يؤخذ جزء من الوسط السائل (N.B) بواسطة مسحة معقمة قطنية ويوضع بشكل متساوي بطريقة التخطيط على وسط (Mullar hinton agar) ثم بواسطة ملقط معدني توضع عدة أقراص على الوسط من المضادات الحيوية بحدود (٨ – ١٢) قرص مع ترك مساحة كافية بين الأقراص وتحضن بدرجة ٣٧ مْ لمدة ٢٤ ساعة ثم نلاحظ منطقة حول المستعمرات ثم يقاس حجم المستعمرة لتحديد المقاومة والحساسية للمضادات الحياتية حيث يقاس mg/ml (Macfaddin , 2000).

٢,٢.طريقة العمل Methods :

,١.٢,٢.عزل وتشخيص البكتيريا:

لقحت المسحات التي تم جمعها على وسط أكار الدم وأكار الماكونكي وأكار ملح المانيتول وحضنت هوائياً بدرجة ٣٧ مْ لمدة ١٨ – ٢٤ ساعة. بعدها شخصت العزلات النامية على أساس خصائص المستعمرة المظهرية ، تفاعل صبغة كرام ، والفحوصات الكيموحيوية متضمنة فحص الكاتليز ، فحص إنزيم التجلط Coagulase، فحوصات الـ IMViC، فحص اليوريز وفحص الحركة.

٢,٢,٢.تحديد العزلات البكتيرية ذات المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية:

تم إجراء أختبار الحساسية للمضادات الحيوية للبكتيريا المعزولة للتعرف على تلك المقاومة للأدوية المتعددة للدراسة التجريبية على أكار مولر – هينتون Muller – Hinton agar باستخدام طريقة الانتشار من الأقراص Disk diffusion method. ، ، الاريثرومسين Erythromycin(١٥ ميكرو غرام)، الجنتاميسين Gentamycin (١٠ ميكرو غرام)، ، النورفلوكساسينNorfloxacin (١٠ ميكرو غرام)، ، نتروفورانتوين Nitrofurantion (٣٠٠ ميكرو غرام)، دوكسي سيكلينDoxcycline (٣٠ ميكرو غرام)، ،سيفترياكسون Ceftraixone (٣٠ ميكرو غرام)، وأموكسيسيلين Amoxicillin(١٠ ميكرو غرام)،أمبيسلين Ampicillin (٢٥ ميكرو غرام)،أوكمنتين Augmentin(٣٠ ميكرو غرام)،سبروفلاكساسين Ciprofloxacin(5 مايكرو غرام) . استخدمت لاختبار نمط المقاومة (Magiorakos *et al*., 2012).

٣,٢,٢.تحضير العزلات البكتيرية:

تم أختبار ثلاثة إلى خمسة مستعمرات نقية من جميع العزلات ذات المقاومة المتعددة بحلقة السلك الملتوي Wire loop، ثم علقت في ٤ – ٥ مل من المرق المغذي Nutreint broth وحضنت بدرجة حرارة ٣٧ مْ لمدة ٢٤ ساعة. ثم تم تخفيف العالق البكتيري مع الماء المقطر المعقم حتى يطابق عكورة أنبوبة ماكفر لاند MacFar Land Standards ٠,٥ القياسية (Kacanioova *et al*., 2011).

٤,٢,٢.تحديد التركيز المثبط الأدنى MIC للعسل :

تم تحديد التركيز المثبط الأدنى للعسل باستخدام طريقة التخافيف المضاعفة وفقاً لطريقة (Kacaniova *et al*., 2011). باختصار، تم وضع عشرة أنابيب اختبار معقمة في رف Rack ، علمت الأنابيب من ١

إلى ٨. أيضاً تم تحضير أنبوبة سيطرة من (العسل) وأنبوبة سيطرة من الوسط المغذي استخدمت لغرض المقارنة. تم أضافة ١ مل من المرق المغذي Nutreint broth المعقم والمبرد إلى كل أنبوب. ثم تم إضافة ١ مل من محلول العسل غير المخفف (١٠٠%) لأنبوبة الاختبار رقم ١ وباستخدام ماصة دقيقة Micropipette معقمة والرؤوس الخاصة لأخذ العينة Tips. ثم أجري التخفيف التسلسلي المضاعف عن طريق نقل ١ مل من العسل غير المخفف إلى الأنبوب الثاني باستخدام رأس ماصة دقيقة جديد ومعقم ورجت ت الأنبوبة باستخدام الجهاز الهزاز Vortex لمجانسة المحلول. بعد المزج، تم نقل ١ مل مع رأس آخر للـ Micropipette من أنبوبة ٢ إلى الأنبوبة ٣ وأعيدت نفس الخطوات حتى الأنبوبة رقم ٨ وفي النهاية تم أخذ ١ مل من الأنبوبة رقم ٨ وتم التخلص منها.

وباستثناء أنبوبة العسل ، تم تلقيح كل أنبوب بـ ١ مل من الزرع البكتيري المحضر. ثم كررت الطريقة برمتها لجميع العزلات البكتيرية المختارة ، ثم حضنت الأنابيب بدرجة حرارة ٣٧ مْ لمدة ٢٤ – ٤٨ ساعة وبعد انتهاء فترة الحضن تم ملاحظة الأنابيب لوجود نمو (عكورة) أو غياب النمو.

٥,٢,٢.تحديد التركيز القاتل الأدنى MBC للعسل:

لتحديد التركيز القاتل الأدنى تم أخذ الأنابيب التي لم يظهر فيها نمو وزرعت بطريقة التخطيط على وسط المرق المغذي الصلب Nutreint agar وحضنت هوائياً بدرجة حرارة ٣٧ مْ لمدة ٢٤ ساعة. إن أقل تركيز من العسل الذي لم يظهر فيه نمو العزلات البكتيرية المفحوصة اعتبر هو التركيز القاتل الأدنى (Kacaniova *et al.*, 2011).

الفصل الثالث

" النتائج والمناقشة Results and Discussion "

٣.النتائج والمناقشة Results and Discussion :

التشخيص:

تم تشخيص البكتيريا على أساس الصفات المظهرية والاختبارات الكيموحيوية وكما موضح في الجدول (٣-١) وجدول(٣-٢).

جدول رقم (٣-١) فحوصات تشخيص البكتيريا السالبة لصبغة غرام

E.coli	***Proteus mirabilis***	***Leuconostoc Mesenteroides***	***Serratia marscens***	***Ps. aeroginosa***	**الاختبار**
G-ve short rode	G-ve short rode	G+ve cocci	G-ve Rod	G-ve Rod	Gram stain
+	+	-	+	+	Catalase
-	-	-	-	+	Oxidase
+	-	-	-	-	Indol
-	-	-	+	-	V.P.
+	+	-	+	-	Simmon citrate
-	-	-	-	+	M.R.
A / A	K / A	A/A	A/A	K / k	Growth on K/A
+	Swarning	-	+	-	Motility

الصفة التشخيصية المميزة للـ *Ps. aeroginosa* هي قدرتها على انتاج صبغة زرقاء مخضرة التي تعطي لون المزرعة أزرق مخضر. وأيضا الصفة التشخيصية لبكتريا *Serratia marscens* هو أنتاج صبغة حمراء.

جدول رقم (٣-٢) الصفات المظهرية والكيموحيوية التشخيصية للعزلات البكتيرية الموجبة لصبغة غرام.

الاختبار / البكتيريا	Gram stain	Catalase	Oxidase	Hemolysin	Coagulase	Grow on manitol	Motility
Staph.aureus	G+ve Cocci cluster	+	–	Beta	+	Colden	–
Streptococcus pyogenes	G+ve cocci	–	–	Beta	–ve	–	–

كذلك اجري اختبار فحص الحساسية للمضادات الحياتية بأستخدام طريقة الأنتشار من الأقراص Disk diffusion method والنتائج التي حصلنا عليها موضحة في جدول (٣-٣).

جدول (٣-٣) منطقة تثبيط أقراص المضادات الحياتية (ملم)

العزلات البكتيرية Bacterial Isolates	Antibiotics inhibition zone (mm)										
	APX	CRO	AX	NOR	DOX	GM	E	NI	DXT	CTX	AUG
Proteus mirabils	+21	11 mm	25 mm	29 mm	٣١ mm	40 mm	25 mm	–	–	–	–
Staph. aureus	–	–	–	28 mm	–	18 mm	–	–	–	–	–
Pseudo. auroginosa	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
E.coli	–	–	–	–	–	–	21 mm	11 mm	20 mm	10 mm	16 mm

AUG:Augmentin ,CTX:Ceftraixone, DXT:Doxcycline,NIT:Nitrofurantion :E: Erythromycin ,GM:Gentamycin ,DOX: Doxycycline,NOR:Norfloxacin, AX: Amoxicillin ,CRO:Ciprofloxacin ,AP:Ampicillin

من الجدول أعلاه نلاحظ بأن بكتريا *Pseudomonas areugenosa* أظهرت مقاومة عالية لجميع المضادات الحياتية المستخدمة وكما موضح أيضا في شكل (٣-١).

شكل (٣-١) مقاومة المضادات الحياتية من قبل *Ps.aeruginosa*

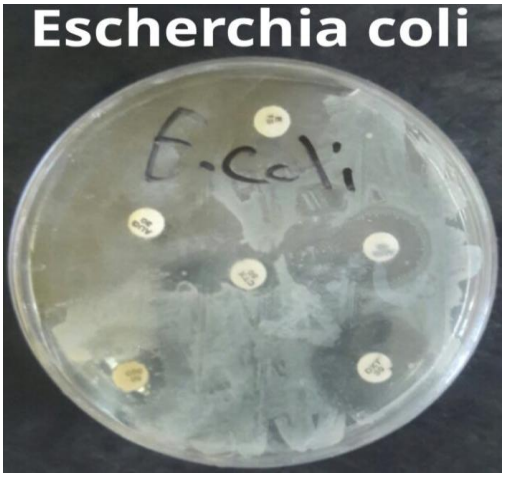
أن سبب المقاومة قد يعود الى أمتلاك البكتريا مقاومة ذاتية للعديد من المضادات الحيوية بالأضافة للمقاومة المكتسبة ،وقد عزى (James ,1999) أن سبب المقاومة هو أمتلاك بكتريا *P. aeruginosa* العديد من الآليات لمقاومة مختلف المضادات الحياتية من أهمها أحتواء الجدار الخارجي لها على بروتين خاص يتميز بقابلية عالية على تحرير مختلف المضادات الحياتية الى خارج الخلية البكتيرية بنفس سرعة دخولها الشيء الذي لايجعل من تركيز المضاد الحياتي داخل الخلية البكتيرية كافياً للقضاء عليها ، كما أن المقاومة قد تعزى الى وجود بلازميدات المقاومة R- Plasmid التي تلعب دوراً في منح صفة المقاومة للعديد من المضادات الحياتية. أيضا بكتريا *Pseudomonas areugenosa* تمتلك تركيب Biofilm الذي يزيد من مقاومة البكتيريا بحيث تكون شديدة مع بعضها البعض.

كما نلاحظ في الجدول أعلاه أن بكتريا *S. aureus* أظهرت مقاومة لأغلب المضادات الحياتية المستخدمة ماعدا الجنتامايسين والنورفلاكساسين وكما موضح في شكل (٣-٢)، وذلك ربما يعود لأنتاج هذه البكتريا أنزيم Beta-lactamase الذي يكسر حلقة Beta-lactam في المضاد الحياتي وبالتالي يكون غير فعال. أن مقاومة البكتريا للمضادات الحياتية الى طبيعة غشاء الخلية

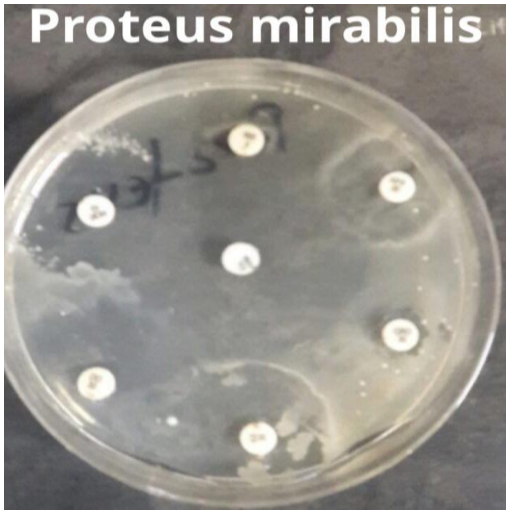
البكتيريـة حيـث يكـون قليـل النفاذيـة للمضـادات الحيويـة لهـذا سـيكون دخولهـا غيـر سـهل إلـى داخـل البكتيريـا وبالتالي زيادة المقاومة للمضادات الحياتية.

شكل (٣-٢) مقاومة المضادات الحياتية من قبل *S.aureus*

أما نتائج فحص الحساسية للمضادات الحياتية من قبل *E.coli* و *Proetus mirabilis* فقد كانت حساسة لأغلب المضادات المستخدمة وكما موضح في شكل (٣-٣)و (٣-٤) على التوالي.



شكل (٣-٣) مقاومة المضادات الحياتية من قبل *E.coli*



شكل (٣-٤) مقاومة المضادات الحياتية من قبل *Proteus mirabilis*

أما باقي العزلات البكتيرية (*Leuconostoc mesnteroides*, *Serratia marscens* , *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*) فقد خضعت فقط لفحص قابلية العسل على تثبيطها.

أما نتائج استخدام العسل لتثبيط أنواع مختلفة من البكتيريا المرضية(*Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus* و *Proteus mirabilis* و *Salmonella typhi* و*Serratia marscenes* و *Pseudomonas aeruginosa* و Leuconostoc mesenteroides) فقد أظهرت مدى تأثير العسل على هذه البكتيريا وتثبيطها. حيث تم تثبيط نمو بكتريا *E.coli* بتركيز (٤/١) ($^{-٢}$٢) وهذا يدل على فعالية العسل وتأثيره على البكتيريا المعوية وأيضاً ثبط نمو *Staph aureus* بتركيز (٨/١) ($^{-٢}$٣) هنا نلاحظ مقاومة البكتيريا ولكن فعالية العسل أقوى في تثبيطها. أما *Proteus mirabilis* تم تثبيطها في تركيز (٤/١) ($^{-٢}$٢) أما بكتيريا *Leconostoc mesenteroides* و *Seratia marscenes* و*Salmonella typhi* تم تثبيطها في التركيز الأول وهذا يدل على قوة وفعالية العسل في تثبيط نمو البكتيريا وهذه النتائج موضحة بشكل أكثر في جدول (٣-٤).

جدول (٣-٤) مقاومة العزلات البكترية لتراكيز مختلفة من العسل(g/ml)

Honey Concentration (g / ml)									العزلات البكتيرية
1/512	1/256	1/123	1/64	1/32	1/16	1/8	1/4	1/2	Bacterial Isolates
–	–	–	–	–	–	–	+	+	***Pr.mirabilis***
–	–	–	–	–	–	+	–	+	***S. aureus***
–	–	–	–	–	–	–	+	+	***Ps. areoginosa***
–	–	–	–	–	–	–	+	+	***E.coli***
–	–	–	–	–	–	–	–	–	***S. typhi***
–	–	–	–	–	–	–	–	–	***S. marscens***
–	–	–	–	–	–	–	–	+	***L.mesenteroides***

تصبح البكتيريا أسرع وأكثر خطراً على الإنسان حين تتكيف وتتطور في مقاومتها للمضادات الحياتية، وهذا يعني أنها لا تتأثر بهذه المضادات. إن الإنسان لا يتمكن من مقاومة هذه البكتيريا ونشاطها وتكاثرها، ولهذا ينصح بعدم الأفراط بتناول المضادات بصورة عشوائية. حيث أثبتت الدراسات والاختبارات حديثاً أن العسل قادر على التخلص والقضاء على البكتيريا التي تقاوم المضادات الحياتية. وأيضاً يلعب دوراً فعالاً في مكافحة الجراثيم.

ويدخل في تركيب العسل إنزيمات تساعد على تكوين ثنائي أوكسيد الهيدروجين وبيروكسيد الهيدروجين وأحماض عضوية متنوعة. وأيضاً يحتوي على مركبات الفلافونويد ونسبة من السكر واليوليفينول، وهذه المركبات تؤثر على خلايا البكتيريا. العسل يمتلك خواص تمكنه من مكافحة العدوى على مستويات عالية وهذا يمنع الأحياء المجهرية من التكاثر. وأيضاً له القدرة على التناضح الناتجة من أرتفاع السكر في العسل حيث تم امتصاص الماء من خلايا البكتيريا، وذلك يؤدي إلى جفاف البكتيريا وموتها.

References ..... المصادر

-Ahmed, M.; Sahile, S. and Subramanian, C. (2014). Evaluation of antibacterial potential of Honey against some common human pathogens in North Gondar zone of Ethiopia. Int J Pure Appl Zool.;2(4): 286 – 295.

-Allen, K.; Hutchinson, G. and Molan, P. (2000) The potential for using honey to treat wounds infected with MRSA and VRE. In : First world healing congress, Melbourne.

-AL-Waili, N.; Akmal, M.; AL-Waili, F.; Saloom, K. and Ali, A. (2005). The antimicrobial potential of honey from United Arab Emirates on some microbial isolates. Med Sci Monit. 11: 433 – 438.

-Baron, E. J.; Peterson, L. R. and Finegold, S. M. (1994). Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 9th ed., The C.V. Mosby Company , U.S.A.

-Basualdo, C.; Sgroy, V.; Finola, M.S. and Juam, M.(2007). Comparison of the antibacterial activity of honey from different provenance against bacteria usually isolated from skin wounds. Vet Microbial.;124:375-381.

-Collee, J. G. ;Fraser, A. G. ;Marmino, B. P. and Simons, A. (1996). Mackin and McCartney Practical Medical Microbiology .14th ed., The Churchill Livingstone, Inc. U. S. A.

-Cooper, R.A.; Molan, P.C. and Harding, K.G (1999).. Antibacterial activity of honey against strains of Staphylococcus aureus from infected wounds. J R Soc Med. 92: 283-285.

-Cowan, A. S. T.(1985).Cowan and steel's manual for identification medical bacteria .2nd ed. London , Cambridge University Press ,UK.

-Geenwood, D. (1993). Wound healing: honey for superficial wounds and ulcers. Lancet. 1993; 341:90-91.

-Getaneh, A.; Belyhun, Y.; Moges, F.; Anagaw, B.; Destaw, B. and Unakal, C. *et al.*(2013). In vitro assessment of the antimicrobial effect of Ethiopian multi-flora honey on methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. J Curr Res Rev.; 5 (11): 64 – 72.

-Jawetz, E.; Melnick, J.L. and Adelberg, E.A.(2004). Medical Appelton and Lang. U.S.A. Microobiology , 23th ed.

-Kacaniova, M.; Vukovic, N.; Bobkova, A.; Fikselova, M.; Rovna, K. and Hascik, P. *et al*. (2011). Antimicrobial and antiradical activity of Slovakian honeydew honey samples. J Microbiol Biotechnol Food. Sci.; 1 (3): 354 – 360.

-Kingsley, A. (2001). The use of honey in the treatment of infected wound. Br J Nurs 10 (22 Suppl) : S13 – 6, S18, S20.

-Kwakman, P. and Zaat, S. (2012) Antibacterial components of honey. IUBMB Life.; 64 (1) : 48 – 55.

-Lusby, P.E.; Coombes, A. and Wilkinson, J.M. (2002). Honey : a potent agent for wound healing. J Wound Ostomy Cont Nurs. 29 : 295 – 300.

-MacFaddin, J. F.(2000). Biochemical tests for the identification of medical bacteria 3rd ed., The Williams and Williams and Wilkins -Baltimor, U.S.A.Stellwagen, E. and Stellwagen, N.C. (2002). The free solution mobility of DNA in Tris-acetate-EDTA buffers of different concentrations, with and without added NaCl. *Electrophoresis*, 23(12): 1935-41.

-Magiorakos, A.P.; Srinivasan, A.; Carey, R.B.; Carmeli, Y. and Falagas, M.E. *et al*. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant

bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbial. Infect.; 18(3):268 – 281.

-Mandal, S.; Pal, N.K.; Chowdhury, I.H. and Debmandal, M. (2009). Antibacterial activity of ciprofloxacin and trimethoprim, alone and in combination, against Vibrio cholera O1 biotype E1 Tor serotype. Ogawa isolates. J Microbiol.; 58(1): 57 - 60.

-Mandal, M.D. and Mandal, S. (2011). Honey: its medicinal property and antibacterial activity. Asian Pac J Trop Biomed.; 1(2): 154-160.

-Moore, O.A.; Smith, L.A.; Campbell, F.; Seers, K.; McQuay, H.J. and Moore, R.A. (2001). Systematic review of the use of honey as wound dressing. BMC Complement Altern Med. 2001.

-Mulu, A.; Tessema, B. and Derbie, F. (2004). In vitro assessment of the antimicrobial potential of honey on common human pathogens. Ethiop J. Health Dev.; 18 (2): 107 – 111.

-Shears, P. (2000). Antimicrobial resistance in the tropics. Trop Doct.; 30(2): 114 – 116.

-Visavadia, B.; Honeysett, J. and Danford, M. (2006). Manuka honey dressing. An effective Treatment for chronic wound infections. Br J. Maxillofac Surg.; 44: 38-41.

University of Al-Qadisiyah

College of Science

Department of Biology

Evaluation the antibacterial activity of Honey against multi resistant bacteria isolated from different clinical cases

A research

Submitted to the council of Biology department–College of Science in Partial Fulfillment of the requirments for the degree of Bachelor in Biology

By

Zainb Ali Hussein

Supervised by

Dr.Ghaidaa Jihadi Mohammed

April 2018 Rajab 1439