تأثير تراكيز مختلفة من العسل في تكوين الغشاء الحيوي لبعض عزلات *Pseudomonas aeruginosa*

علي عدنان عبد [1] احمد محمد تركي [2] علي حازم عبد الكريم [2] ادهام علي عبد [3]
[1] مديرية تربية الانبار
[2] كلية العلوم/ جامعة الانبار
[3] كلية الزراعة/ جامعة الانبار

الخلاصة

أجريت هذه الدراسة للتحري عن قدرة خمسة عزلات من بكتيريا ***Pseudomonas aeruginosa*** على تكوين الغشاء الحيوي ، واختبار تاثير استعمال تراكيز مختلفة من العسل 10 و20 و30 و40% في تثبيط نمو العزلات وتكوين الغشاء الحيوي ، وبينت النتائج ان عملية استخدام العسل ادى الى تثبيط النمو وعدم تطوين الغشاء الحيوي للعزلات المحلية الخمسة وعند استعمال تراكيز من العسل بلغت 20 و30 و 40%.

Effect of different concentration of honey in configuring dynamic membrane for some Isolate *Pseudomonas aeruginosa*

Ali A. Abdul Ahmed [1] A. M. Turki [2] A. H. Abdel Karim [2] I. A. Abed [3]
[1] Anbar husbandry Directorate
[2] College of Sci. / AL-Anbar Univ.
[3] Agri. College / AL-Anbar Unvi.

Abstract

The present study is conducted to tested the ability of five isolate from bacteria *Pseudomonas aeruginosa* to form the biofilms and its inhibitory to honey has been examined to waward , by the use of spread method on the disks and the impact of different concentrations 10,20,30 and 40% of honey in the growth of isolates and the formation of the biofilm in the liquiod culture media . The results shown the process of using honey leadsto the inhabitation of growth and the lack of forming the biofilms to the five local isolates at concentrations 20, 30, and 40%.

المقدمة

استخدم العسل منذ القرن السابع عشر قبل الميلاد من خلال الكتابات التي تعود الى تلك الحقبة الزمنية واشارت الى استخدامه كعلاج لتضميد الجروح ، واستخدم ايضا أثناء الحرب العالمية الاولى والثانية، ولكنه انخفض مع بداية ظهور المضادات الحيوية في عام 1940، ويساعد العسل في علاج الجروح وتقرح القدم السكري وتقرحات الشرايين والحروق من الدرجة الثانية وغيرها، حيث ان العسل ينظف الجرح ويساعد على التئام النسيج بسرعة وذلك من خلال منع حدوث الاصابات الغازية والقضاء على الاستيطان البكتيري (1).

ارتبطت بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* بالتهابات الجروح المزمنة وذلك من خلال تكوينها الاغشية الحيوية التي تحمي هذه البكتريا من تأثير تراكيز المضادات الحيوية وقد استخدم (2) تراكيز مختلفة

من العسل ودرس تأثيرها على الاغشية الحيوية لمدة 24 ساعة ولاحظ عند تعرضها لعدة تراكيز من العسل ادى الى انخفاض الاغشية الحيوية للزوائف الزنجارية وبالتالي القضاء عليها وبشكل نهائي وبمساعدة مضادات الحيوية التي كانت تقاومها هذه الاغشية في السابق . في حين بين (3) أن استخدام العسل ادى الى الحفاظ على مخزون مضادات الحيوية من خلال تأثير العسل المستخدم على نمو البكتريا وتشكيل الغشاء الحيوي في اصابات الجروح وذلك من خلال اختراق هذه المواد القاتلة للحياة في العسل للسلالات البكتيرية المسببة لالتهابات الجروح . وذكر (4) أن العسل الذي هو نتاج طبيعي فعال في قتل الأغشية الحيوية الجرثومية من خلال عمله كأداة فعالة ضد مقاومة الجراثيم لمضادات الحيوية حيث يعمل كمضادات للجراثيم الموضعية وتفكيك الأغشية الحيوية التي تشكلها والسماح لمضادات الحيوية التي كانت تقاومها هذه البكتريا بالقضاء عليها.

بينما وجد (5) أن بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* أظهرت حساسية عالية تجاه العسل المستخدم في تراكيز مختلفة وخاصة عند تركيز 25% و 39% بينما أبدت هذه البكتريا مقاومة بتركيز 10% . وذكر (6) أن العسل يعزز من التئام الجروح والقروح لكونه يكون مضادا لنمو البكتريا وعزى هذه الفعالية للعسل ضد البكتريا كون العسل ينتج من مصادر نباتية كثيرة ولذلك يكون نشاطه المضاد للبكتريا مختلف . في حين وجد (7) انخفاض مستوى النمو مع زيادة تراكيز العسل ومنع النمو عند تركيز 30% المنماة في درجة حرارة 56 م° مقارنة مع معاملة السيطرة . ودرس (8) أمكانية استخدام العسل في منع سلالات الزوائف الزنجارية من إصابة الحروق والجروح . و ذكر (9) أن ارتفاع مقاومة بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* لمضادات الحيوية أصبح أكثر شيوعا ويزداد يوما بعد يوم فكان لابد من البحث عن مواد اكثر فعالية تثبيطية في نمو هذه البكتريا وخاصة في إصابات الحروق والجروح وقد اقترح استخدام العسل من اجل تعزيز التئام الجروح والحروق وبالتالي تعزيز دور المضادات وتقليل المقاومة اتجاهها .

تختلف مكونات العسل اعتمادا على مصدر الرحيق حيث تختلف الزهور المتكونة في النباتات والتي تحدد لون ونكهة العسل، وهناك أيضا عوامل أخرى عديدة تؤثر على مكونات العسل مثل الموسم والظروف الجوية والبيئية. كما أن بعض أنواع العسل تحتوي على مواد فريدة من نوعها لا توجد في بعض أنواع العسل الاخرى مثل عسل البرتقال الذي يحتوي على مادة تسمى methyl anthranilatela وهذه المادة غير موجودة في أي نوع آخر من العسل وتعطي عسل البرتقال رائحة مميزة. وبشكل عام فان المكونات الرئيسية للعسل هي سكر الفواكه ، الكلوكوز والماء . غير أن العسل يحتوي على مجموعة واسعة من الفيتامينات والمعادن مثل (الكالسيوم و البوتاسيوم و الصوديوم و الفسفور و المنغنيز) كما أن العسل يكون غنياً أيضا بالأحماض الأمينية الأساسية, إضافة إلى مكونات أخرى من العسل تشمل الأصباغ مثل (carotion ، xanthophylls ، anthocyanin ، tannin) فضلا عن العديد من الأنزيمات القيمة مثل (catalase ، oxidase ، diastase ، amylase) حيث إن إنزيم أوكسيديز الكلوكوز يحفز تكوين بيروكسيد الهيدروجين الذي يساعد على تحقيق الاستقرار في العسل ضد الميكروبات.وبشكل عام تكون النسبة المؤية لهذه المكونات هي (18 – 20) % ماء و 54.1 سكريات و 21.7 معادن أما النسبة المتبقية فهي المكونات الأخرى من العسل (10).لذا كان الهدف من الدراسة معرفة تاثير استعمال العسل في تثبيط نمو العزلات ومنع تكوين الغشاء الحيوي وتحديد التركيز المناسب لتثبيط النمو وتقييم العسل كمضاد حيوي جديد.

المواد وطرائق العمل

استخدمت خمسة عزلات محلية *Pseudomonas aeruginosa* تحمل الارقام المحلية 6 و 49 و 69 و 81 و 94 منتجة للاغشية الحيوية معزولة من قبل (11) واستعملت مادة العسل المنتجة محليا من احد المزارعين في مدينة الرمادي، وذلك لمعرفة امكانية السيطرة على تكون او تثبيط تكوين الأغشية الحيوية للعزلات حيث اجري الاختبار بطريقتين:-

1- استخدام طريقة الحفر في الوسط الصلب

حضر وسط زرعي مولر هنتون في أطباق بلاستيكيه معقمة ولقحت من العزلات البكتيرية الخمسة المنتخبة ثم تم عمل حفر في الوسط الزرعي وملئت من العسل بنسب مخففة بالماء المقطر (10 و 20 و 30 و 40) % حيث حضرت كل معاملة بثلاثة مكررات، وحضنت في الحاضنة بدرجة حرارة 37 م° ولمدة (18-24) ساعة. سجلت بعدها أقطار التثبيط (11).

2- استخدام الوسط السائل

لغرض تحديد التركيز الأفضل في تثبيط تكوين الغشاء الحيوي والسيطرة على نمو البكتريا ، استخدم العسل بتراكيز مختلفة (10 و 20 و 30 و 40)% حيث اضيفت إلى الوسط الزرعي السائل بعد حساب نسبه العسل بطريقة حجم / حجم، ولقح الوسط الزرعي المضاف إليه العسل من العزلات البكتيرية الخمسة وبمعدل ثلاثة مكررات لكل معاملة، وحضنت الأنابيب في الحاضنة بدرجة حرارة 37 م° ولمدد زمنية (6 و 12 و 18 و 24) ساعة ثم حسب العدد الكلي للبكتريا النامية وتم قياس سمك الغشاء الحيوي المتكون حسب ما اورده (11) .

النتائج والمناقشة

تأثير تراكيز العسل في الكثافة العددية لنمو الخلايا

أظهرت النتائج المبينة في جدول 1 أن العزلات المحلية الخمسة نمت بشكل جيد ومتفوق معنوي عند استعمال تركيز من العسل بنسبة 10% في حين انخفض معدل النمو بشكل معنوي عند استعمال تراكيز من العسل بنسب (20 و 30 و 40)%. كما أظهرت النتائج أن اعلى معدل للنمو حصل للعزلة *P.aeruginosa81* مع استعمال تركيز 10% من العسل بكثافة عددية بلغت 11.67 Logcfu/ml ، و حققت جميع العزلات الأخرى أعلى معدل للكثافة العددية عند استعمال تركيز 10% ايضا وبلغ معدل الكثافة العددية 10.05 Log cfu/ml (جدول 1). بينما حصل انخفاض نمو العزلات مع زيادة تركيز العسل ليصل إلى اقل معدل كثافة عددية عند استعمال تركيز 40% من العسل ، إذ بلغت 1.17 Logcfu/ml. بينما كانت أفضل مدة زمنية لتثبيط نمو العزلات المحلية معنويا هي 24 ساعة إذ سجلت أقل كثافة عددية لها عند هذا الزمن وبلغت 4.81 Logcfu/ml.

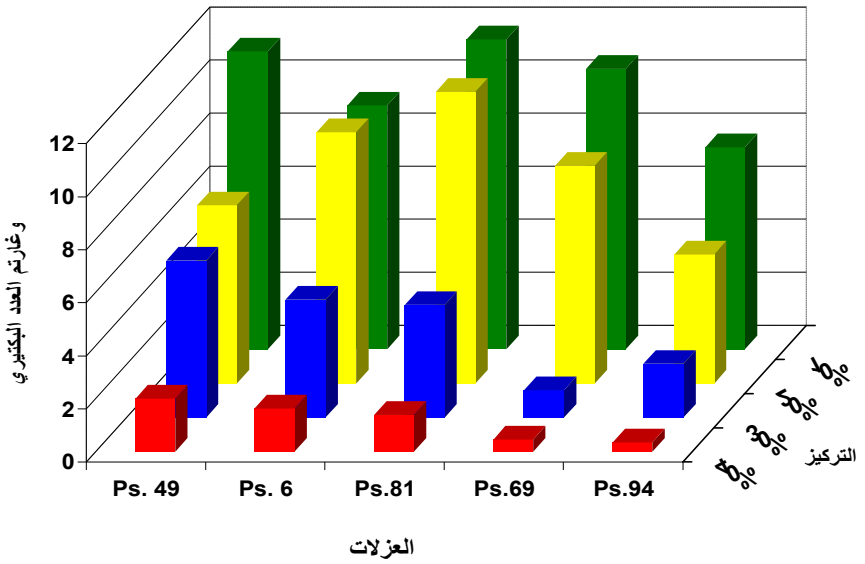
جدول 1. تأثير تراكيز العسل المختلفة على نمو العزلات المحلية للبكتريا *P. aeruginos*

تركيز العسل %	الوقت ساعة	الكثافة العددية لنمو العزلات (لوغارتم)					معدل نمو العزلات
		49	6	81	69	94	
10	6	10.338	11.368	10.694	8.113	7.159	10.051

	7.379	10.412	11.506	9.238	10.828	12	
	7.772	11.381	12.133	8.431	11.439	18	
	8.137	12.375	12.356	7.697	12.268	24	
	7.61	10.57	11.67	9.18	11.22	المعدل	
8.042	7.354	7.403	10.380	12.613	7.868	6	20
	4.395	7.894	10.906	10.047	6.816	12	
	4.297	8.259	11.151	9.238	6.617	18	
	3.367	9.262	11.494	5.962	5.518	24	
	4.85	8.20	10.98	9.47	6.70	المعدل	
3.530	7.403	1.717	7.477	8.357	6.572	6	30
	0.677	1.165	4.838	7.036	6.058	12	
	0.000	0.796	3.612	1.264	5.691	18	
	0.000	0.433	1.042	1.117	5.349	24	
	2.03	1.03	4.24	4.44	5.92	المعدل	
1.170	1.410	1.557	5.080	6.523	5.717	6	40
	0.000	0.312	0.493	0.000	1.656	12	
	0.000	0.000	0.000	0.000	0.652	18	
	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	24	
	0.35	0.47	1.39	1.63	2.01	المعدل	
	3.709	5.067	7.073	6.181	6.462	معدل نمو العزلات	
L.S.D0.05 ISOL= 0.080 ,CONC= 0.071							

من جانب آخر أظهرت النتائج أن للمدد الزمنية تأثيراً معنويا في نمو العزلة المحلية *P. aeruginosa 69* ، إذ كلما زاد زمن مدة الحضن قل عدد الخلايا لهذه العزلة عند استعمال نسبة 30% حيث بلغ 1.717 logcfu/ml عند زمن حضن 6 ساعة وانخفض الى 0.433 logcfu/ml عند زمن حضن 24 ساعة وكذلك مع استعمال تركيز40% حيث اختفى ظهور النمو تماما مع زمن حضن 18 ساعة ، وعلى عكس ما حصل عند استعمال نسبة 10 و 20% إذ وجد مع زيادة مدة الحضن زاد عدد الخلايا (جدول 1). بينما حققت العزلة المحلية *P. aeruginosa49* اعلى معدل نمو 10.33 logcfu/ml عند تركيز 10% والذي ازداد معه كثافة الخلايا ليصل 12.26 logcfu/ml مع زيادة مدة الحضن24 ساعة. أما عند استعمال نسب 20 و 30 و 40% فقد انخفض معدل النمو لهذه العزلة مع زيادة مدة الحضن. في حين وجد أن العزلة المحلية *P. aeruginosa6* قد انخفض نموها مع زيادة مدة الحضن ولجميع التراكيز المستعملة وقد اختفى نمو الخلايا مع استعمال تركيز 40% بعد زمن حضن 12 ساعة. وتمكنت العزلتين *P.aeruginosa81* و *P. aeruginosa94* من تحقيق اعى معدل نمو لهما 10.69 و 7.15 logcfu/ml على التتابع عند تركيز 10% والذي زاد الى 12.35 و8,13 logcfu/ml مع زيادة مدة الحضن الى 24 ساعة. بينما انخفض نمو العزلتين مع زيادة مدة الحضن عند استعمال نسبة (20 و 30 و 40)% .

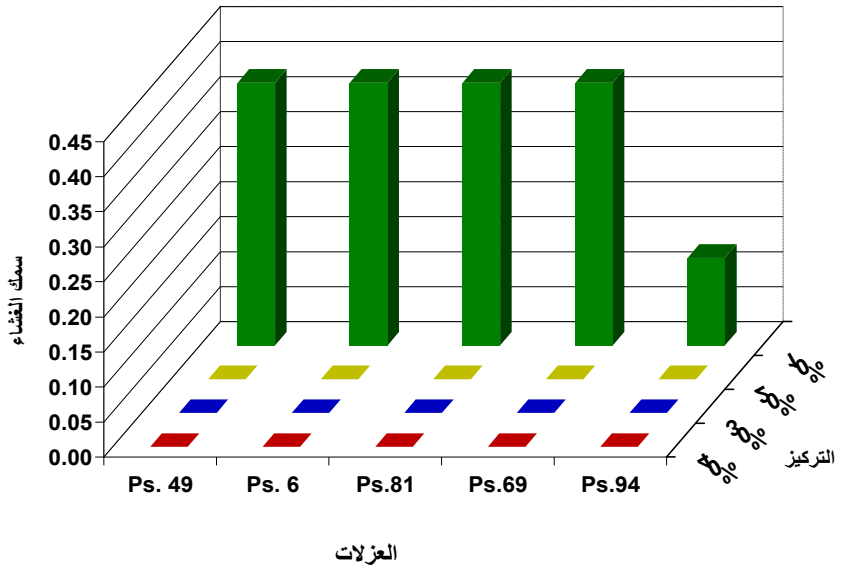
من خلال ملاحظة تأثير تراكيز العسل على نمو العزلات المحلية الخمسة وجد أن أفضل تركيز للعسل استطاعت العزلات عنده تحقيق اعلى معدلات نمو هو 10% و وتفوقت العزلة المحلية *P. Aeruginosa81* معنويا بأفضل نمو (شكل 1) .



شكل (1) تأثير تراكيز العسل في نمو العزلات المحلية *p.aeruginosa*

تأثير تراكيز العسل في الغشاء الحيوي للخلايا

أظهرت النتائج الموضحة في شكل (2) أن جميع العزلات المحلية كونت الغشاء الحيوي عند تركيز 10% في حين لم تستطيع العزلات المحلية المستعملة من تكوين الغشاء الحيوي عند استعمال بقية التراكيز 20 و30 و40% .



شكل 2 تأثير تراكيز العسل في تكوين الغشاء الحيوي لعزلات *P. aeruginosa*

وأظهرت النتائج أن العزلات *P.aeruginosa49* و *P.aeruginosa6* و *P.aeruginosa6* و *P. aeruginosa81* استطاعت تكوين الغشاء الحيوي بمعدل 0.35 ملم عند استعمال تركيز 10% وخلال مدة حضن (18 – 24) ساعة حيث زاد سمك الغشاء المتكون مع زيادة مدة الحضن . بينما

كونت العزلة المحلية *P. aeruginosa94* الغشاء الحيوي عند زيادة التركيز عن 10% بمعدل 0.1 ملم قبل مدة الحضن 12 ساعة واختفى مع مدة حضن 18 ساعة.

تأثير تراكيز العسل في اقطار تثبيط نمو الخلايا

أظهرت النتائج الموضحة في الجدول (2) زيادة معدل أقطار تثبيط العزلات مع زيادة نسبة تركيز العسل المستعمل إذ وجد أن العزلة *P. aeruginosa6* كانت اكثر حساسية لزيادة تركيز العسل في الأوساط . بينما تم تثبيط نمو العزلة المحلية *P. aeruginosa49* باعلى قطر تثبيط عند مختلف تراكيز العسل الأربعة وبلغ معدل ل قطر التثبيط 20.5 ملم . وقد حقق استعمال تركيز بنسبة 40% اعلى معدل في أقطار التثبيط بلغ 30.40 ملم.

جدول 2.اقطار تثبيط العزلات المحلية *P. aeruginosa* تحت تأثير تراكيز العسل المختلفة

رقم العزلة	أقطار التثبيط (ملم)				
	تركيز العسل				**معدل قطر تثبيط**
	10%	20%	30%	40%	
P. aeruginosa 49	0	16	28	38	20.5
P. aeruginosa 6	7	12	22	32	18.25
P. aeruginosa 81	0	0	20	28	12
P. aeruginosa 69	0	0	18	22	10
P. aeruginosa 94	0	12	18	32	15.5
المعدل اقطار الثبيط	1.4	8	21.2	30.4	
L.S.D 0.05	3.852				
L.S.D. 0.05 ISOL = 1.926 , L.S.D CONC. = 1.723					

نستنتج من النتائج المعروضة كلما زاد تركيز العسل المستعمل ضمن التجربة، يكون مؤثرا في نمو البكتريا من خلال تثبيط النمو ومنع تكوين الأغشية الحيوية. ويمكن أن يكون العسل مضاد حيوي ، كما يمكن أن يكون العسل سلاحاً فعالاً في كسر دفاعات الميكروبات وخاصة الأغشية الحيوية ، إذ إن البكتريا تتضاعف بما يكفي لتشكيل الغشاء الحيوي وتكون أقل حساسية للمضادات الحيوية والمطهرات ، وان الأطباء الذين يعالجون المصابين بإصابات خطيرة في حاجة ماسة إلى إزالة هذه الأغشية الحيوية حتى يتمكنوا من معالجة المرضى بأمان ومنع انتشار البكتريا المقاومة اضافة الى أن العسل لا تعرف له آثار جانبية ضارة .

تتفق نتائجنا مع ما ذكره (7) بأن استخدام العسل بتركيز 25% و 39% لتثبيط *P. aeruginosa* المعزولة من المصابين بالحروق والمقاومة للأدوية المتعددة قد أثر بشكل كبير وأظهرت حساسية عالية ، في حين أبدت مقاومة عند تركيز (10 و 15)% من العسل. كما تقاربت نتائجنا مع ما ذكره (2) من أن استعمال تركيز العسل أقل من 10% لا يؤثر على تكوين في تكوين الأغشية الحيوية في بكتريا *P. aeruginosa* ولكن عند استعماله بتركيز (20 و 40)% وحضن مدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37 م° ادى إلى

منع تكون الأغشية الحيوية لبكتريا *P. aeruginosa* المعزولة من الجروح وهذه النتائج كانت أشد وضوحا بعد (9 – 11) ساعة من الحضن بعد معاملة المزروع بالعسل . قد يكون للمستوى المرتفع من تركيز العسل تأثير مثبط لنمو العزلات البكتيرية المكونة للأغشية الحيوية، إذ ذكر (3) أن زيادة تركيز العسل إلى حد معين يؤدي إلى القضاء على بكتريا *Kl. pneumonia* و *P. aeruginosa* . كذلك وجد (12) أن استخدام العسل كان فعال في القتل بنسبة 100% من العزلات البكتيرية المختبرة والتي كانت مقاومة لمضادات الحيوية إذ تم القضاء على بكتريا *Staph . aureus* و *P. aeruginosa* المكونة للأغشية الحيوية خلال (11) ساعة. ونتيجة لذلك فأنه الآن يستخدم العسل للأغراض الطبية في علاج الأمراض مثل القرحة والجروح والحروق والأكزمة والالتهابات الفطرية والبكتيرية بالإضافة إلى تأثير العسل المضاد للبكتريا وغيرها من الفوائد الصحية فأن العسل يعزز الجهاز المناعي عن طريق تنشيط الخلايا اللمفاوية وبالتالي تقليل الالتهابات وتنشيط نمو الخلايا (13).

المصادر

1.Faye Jones (2004) honey could be the new antibiotic, the society for General Microbiology's , 155 th meeting at Trinity Collge Dublin .

2.Okhiria , O.A. ; Henriques , A.F.M. ; Burton , N.F. ; Peters, A. ; Cooper , R.A. (2009) . Heney modulates biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* atime and dose dependent manner . Journal of Apiproducat and Apimedical 1(1) 6 – 10 .

3.Patricia Merckoll ; Tom Ystein Jonassen ; Marie Elisabeth Vad ; Stig L. Jeansson and Kjetil , K. Melby . (2009) Bacteria biofilm and honey : A study of the effects of honey on planktonic and biofilm – embedded chronic wound bacteria , Scandinavian Journal of infections Diseases . 41(5) 341 – 347 .

4.Permissions , and Reprints . (2009) Effectiveness of honey on *Staphylococcus aureas* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm . J. otohns . doi :10 . 1016.

5.Cooper, R.A. and Hakas Molan , P.C. (2002) . The efficacy of honey in inhibiting strains of *Pseudomonas aeruginosa* from infected burns . J. Burn care Rehabil . 23 : 366 – 70 .

6.Subrahmanyam , M. ; Hemmady , A. and Pawar , S.G. (2001) . Antibacterial activity of honey on bacteria isolated from wound . Ann . Burns and Fire Disasters , 14 : 22 – 4 .

7.Subrahmanyam , M. ; Hemmady , A.R. and Pawar , S.G. (2003). The sensitivity to honey of mul TIDRUG – RESISTANCE *Pseudomonas aeruginosa* from INFECTED BURNS Annals of Burns and Fire Disasters , XVI(2).

8.Subrahmanyam , M. ; Shahapure, A.G. and Nagne , N.S.(2001) . Effects of topical application of honey on burn wound healing . Ann. Burns and Fire Disasters , 14 : 143 – 5 .

9.Torreqrossa , M.V. ; Valention , L. and Cucchiara , P . (2000) . Prevention of hospital – acquired infections in the Palermo burn center , Ann. Burns and Fire Disasters , 13 : 143 – 7 .

10. Sabine adamczyk ; Regina Lazaro ; Consuelo Perez arquillue ; pilar Conchello and Antonio Herrera . (2005) . Evaluation of Residues of Essential Oil Components in Honey after Different Anti – Varroa Treatments . J . Agricultural and food Chemistry .53 (26) . P. 10085 – 10090.

11 العيثاوي ،علي عدنان عبد منديل (2010) العوامل المؤثرة في قدرة عزلات الزوائف الزنجارية المعزولة من مصادر بيئية مختلفة في تكوين الغشاء الحيوي .رسالة ماجستير ، قسم علوم الحياة ، كلية العلوم، جامعة الانبار .

12.Talal alanddejan , MD, joseph marsan, MD, frcsc , wendy ferris ,BSc, MLT, MSc, Robert slinger ,MD, frcpc and frank chan , MSc , phd (2009) effectiveness of honey on Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa biofilm otolaryngology – head. 141 , 114 – 118.