دراسة تأثير العسل في بعض الصفات البايلوجية الخاصة ببكتريا *Klebsiella spp*

سارة عماد هجول
كلية العلوم/ جامعة الأنبار

الخلاصة

تضمنت الدراسة الكشف عن دور العسل في زيادة فعالية بعض المضـــادات Vancomycin (VA) 10 mg، Gentamycin (GN) 30 mg، Ciprofloxacin (F) 100 mg، Chloramphenicol (CL) 10mg تجاه العزلات *Klebsiella* المحلية والتي أثبتت الفحوصات الكيميائية والبايولوجية عائدة إلى *K. pneumonia* ذات الرقم المحلي 3 (kp3) بتراكيز مختلفة من العسل (2.5، 5، 7.5، 10)% كصـــفات لتقـــدير التغيـــرات الطارئة عليها. أظهرت النتائج ان العزلة المحلية ذات الرقم (6) (kp6) كانت حساسة تجاه تداخل العسل 10% بالوسط الزرعي ازدادت استجابة العزلة (kp3) المعرضة لهذا التركيـــز تجـــاه المضـــاد Imipenem (IPM) ليصبح قطر التثبيط 53 ملم بعدما كان 25 ملم بالوسط الخالي من العسل القياسي. أما النتائج الخاصـــة بتقـــدير المحتوى الكيمياوي والخلوي فقد أظهرت النتائج زيادة تراكيز للعسل في الوسط الزرعي يزيد من تركيز الدهون الثلاثية ويقل من كمية البروتينات مع انتقاء بعض الحزم البروتينية أما الكولستيرول فيزداد بزيادة تركيز العسل إلى حد ما (5%) ثم ينخفض بالتراكيز العالية من العسل.

Effect of Honey on some Biological characters of *Klebsiella spp*

S. E. Hijwal
College of Science/ University of Anbar

Abstract

This study included a test that revealed the role of honey in the process of increasing the activity of some antibiotics such as Vancomycin (VC) 10 mg, Gentamycin (GN) 30 mg, Ciprofloxacin (F) 100 mg and Chloramphenicol (CL) 10 mg towards local isolates *Klebsiella* which chemical and biological tests proved its belonging to *K. pneumonia* that issued the local number 3 (kp3) in different honey titre (2.5, 5, 7.5 and 10)% as characteristics to estimate potential changes that may happened to it. The results revealed that local isolate number 6 (kp6) was sensitive towards the interaction of honey 10% with implanted media. The isolate (kp3) reported an increment in its response when exposed to this titre with the antibiotic (IPM) that showed inhibition diameter of 53mm which were 52mm to the media without statured honey with respect to the results of chemical and cellular content an increment of TG associated with decrement in protein titres has been observed together with some of protein batches that vanishes. The cholesterol has been found to be increased according to the increment of honey titre of 5% to some extend and decreased in high titres of honey.

المقدمة

استعمل العسل الطبيعي ومنذ أزمنة بعيدة في مجالات مختلفة ســـواءً منهـــا غذائيـــة أو علاجيـــة أو فـــي الصناعات الغذائية المختلفة وهو أما أن يكون بشكل سائل أو نصف سائل حيث يشكل الماء نســـبة 15- 21% أما الجزء الصلب فهو خليط من الكاربوهيدرات متضمنة سكر الفركتوز والكلوكوز والمـــالتوز والســـكروز(1) إضافة إلى البروتينات والأحماض الأمينية والفيتامينات والأحماض العضـــوية والمعـــادن (2) يتـــراوح قيمـــة

الهايدروجين بين 3.2– 4.5 (3) وهو بأربعة أنواع وبحسب نوع المكان أو نوع المزروعات في ذلك المكان (Elgabaly, Nigella, Clover, Citrus) يمتلك فعالية علاجية عالية تعود بصورة أساسية للفعالية الضد مايكروبية إذ يثبط مدى واسع من أنواع البكتريا المرضية (4) وفسر (5) سبب هذه الفعالية إلى بعض خواصه كالازموزية العالية واحتواءه على بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) أو الحموضة العالية بينما فسر (6) هذه الفعالية إلى احتواء العسل على كمية عالية من الأحماض الأمينية وخصوصاً البرولين والتي تعمل على تغير بعض مسالك التمثيل للخلايا المايكروبية كمسالك التمثيل الحيوي للأحماض الدهنية والأمينية (7)؛ إضافة إلى احتواءه على أنزيمات مختلفة كالانفرتيز والأميليز والكتليز وغيرها(6).

أشارت دراسة (8) إلى ان العسل يمتلك تأثيراً مثبطاً لنمو أجناس عديدة ممرضة مثل *Proteus sp*، *Pseudomonas sp*، *Clostridum*، *E. coli*، *Staphylococcus aureus*. وتذكر المصادر ان استعمال العسل بتركيز 40% يؤدي إلى قتل اغلب الأجناس الميكروبية قيد الدراسة كعزلات *Heamophilus*، *Aeromonas*، *Micrococcus* و*Acinetobacter*، *E. coli*، *Enterobacter cloacae*، *Citrobacter freundii*، *Morganella Morgani*، *Staphylococcus aurens*، *Pseudomonas aeruginosa* بينما عزلات *Klebsiella pnenmonia* و*Proteus mirabilic* فلم تقتل إلا بتركيز 50% (9، 10). أشار العالم Mcinerny (11) إلى ان العسل يمتلك فعالية ضد مدى واسع من البكتريا داخل النسيج *In vivo* وخارجه *In vitro* وبالتالي فان العسل يمكن استعماله كمرهم خارجي Topical ضد النمو البكتيري لمعالجة الجروح والحروق وتقرحات الجلد. وعلى هذا الأساس جاءت هذه الدراسة لتوضيح بعض الخصائص البايلوجية الناتجة من استعمال العسل تجاه بعض عزلات بكتريا *Klebsiella*.

المواد وطرائق العمل

1. العزلات الميكروبية:

أخذت العزلات التسعة من مختبرات مستشفى النسائية والأطفال في مدينة الرمادي وتم التأكد من عائديتها للجنس *Klebsiella* بعد إجراء عدة اختبارات والتي تتضمن الصبغ بصبغة گرام وزراعتها على وسط الماكونكي الصلب (Mackonkey agar) إضافة إلى بعض الاختبارات البايوكيميائية كاختبار الاندول واختبار فوكاس بروس كاور (VP) واختبار اختزال السترات (12) بالإضافة إلى اختبار العزلة المحلية ذات الرقم 3 باستعمال جهاز vitek في مستشفى الفلوجة العام والذي أوضح عائديتها للنوع *Klebsiella pneumonia*.

2. اختبار حساسية نمو البكتريا تجاه تداخل العسل مع بعض المضادات الحيوية. تم نقل لقاح بكتيريا تابع للأنواع في الفقرة (1) وبتركيز لا يقل عن 10^5 c.f.u/ml إلى سطح مولر هنتون (Muller Henton agar) وبطريقة النشر تم زرع هذه الأطباق وضع أقراص المضادات الحيوية Vancomycin (VA) 10 mg، Gentamycin (GN) 30 mg، Ciprofloxacin (F) 100 mg، Chloramphenicol (CL) 10mg إضافة إلى وضع نفس هذه المضادات المستعملة بعد تشبيعها بكمية µl 50 من العسل المجموع من مناحل منطقة الصوفية والمزروعة بالبرسيم في منطقة الرمادي خلال شهر حزيران عام 2011؛ تم التأكد من خلوه من الميكروبات وذلك بترشيحه بمرشحات خاصة ثم زرع عينة منه على وسط الأكار المغذي (13).

3. اختبار تأثير تراكيز مختلفة من العسل في الوسط الزرعي:

- حساسية العزلة المحلية 3 *Klebsiella pneumonia* تجاه المضادات الحيوية نميت العزلة المحلية ذات الرقم المحلي 3 في المرق المغذي والحاوي على عسل بتراكيز مختلفة تتضمن (0، 2.5، 0.5، 7.5،

10)% لمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة 37 مْ ثم اختبرت حساسية نموها تجاه المضادات الحيوية والمتضمنة (IPM) Imipenem، (AMC) Amoxicillin/ Clavulauic acid/، Ampicillin/ (APX) Cloxacillin، (NA) Nalidixic acid، (AM) Amoxicillin، (RA) Rifadin بطريقة انتشار الأقراصDisk Diffusion على وسط مولر– هنتون.

- التركيب الكيمياوي الخلوي: رسبت الخلايا الناتجة من المعاملات في الفقرة السابقة وغسلت عدة مرات بالماء المقطر ثم سحقت بطريقة التجميد وبصورة متكررة، ثم تم تقدير محتوى الخلايا من الكولسترول (Cholesterol) والدهون الثلاثية Trigelicrid والبروتين الكلي Total protein بالطريقة المذكورة في (9) ثم هيء هلام متعدد الأكريلامايد حيث كان هلام الفصل بتركيز 10% وهلام الرص بتركيز 5% وتم ترحيل مستخلصات الخلايا كهربائياً؛ وصبغت بصبغة Coomasie Brilliant Blue–250^{R} كما ورد في (14).

النتائج

- **العزل والتشخيص:**

أظهرت نتائج زرع العزلات على وسط ماكونكي بان جميع العزلات تنمو بمستعمرات مرتفعة عن الوسط وذات قطر mm 5–7 وردية الشكل، مخاطية القوام، سالبة لاختبار الاندول وموجبة لفحص اليوريول والكتليز وموجبة لاختبار فوكاس بروس كاور. أما العزلة (kp3) فقد أظهر جهاز Vitek أنها تعود للنوع *K pneumonia*.

- **اختبار حساسية نمو بكتريا *Klebsiella pneumonia* تجاه تداخل العسل مع بعض المضادات الحيوية:**

أظهرت نتائج التحليل الإحصائي الخاصة باستجابة العزلات تجاه المضادات الحيوية وتداخل العسل مع المضادات ان هناك فرق معنوي عالي للمعاملات. من جانب آخر أظهر اختبار أقل فرق معنوي بين المتوسطات أن أفضل استجابة لتداخل العسل كانت مع المضاد الفانكومايسين إذ بلغ معدل قطر التثبيط لمجموع العزلات تجاه المضاد 9.8 ملم فقط في حين بلغ معدل قطر التثبيط لمجموع العزلات 15.5 ملم يتداخل المضاد مع العسل. وأظهرت العزلة السادسة حساسية واضحة تجاه العسل مع نفس المضاد إذ بلغ معدل قطر التثبيط لهذه العزلة (0 ملم) تجاه المضاد بينما يتداخل المضاد مع العسل بلغ معدل قطر التثبيط لهذه العزلة 11 ملم؛ وسلكت العزلة الثالثة سلوك مشابه لسلوك العزلة السادسة تجاه نفس المضاد تقريباً. أما تجاه المضاد F فقد أظهرت النتائج ان تداخل العسل مع هذا المضاد تزداد حساسية العزلة السادسة ليبلغ قطر التثبيط من 11 إلى 16 ملم والعزلة الأولى تجاه VA من 18 إلى 24 ملم (جدول 1).

جدول (1) حساسية العزلات تجاه تداخل بعض المضادات الحيوية مع العسل (معدل أقطار التثبيط ملم)

المضادات الحيوية								
CN*	CN	VA*	VA	C*	C	F*	F	العزلات
24	24	24	18	24	24	24	22	1
25	23	18	14	16	16	30	27	2
11	0	10	0	16	14	15	15	3
12	12	10	10	29	25	12	10	4
33	30	20	17	30	28	28	27	5
24	22	11	0	14	14	16	11	6
21.5	18.5	15.5	9.8	21.5	20.1	20.8	18.7	المعدل

***تعني المضاد مشبع بـــ µl 50 عسل.**

LSD للمضادات = 0.6.

LSD للمضادات والعزلات= 1.3.

- **تأثير العسل على بعض الصفات البايلوجية الخاصة بالعزلة *Klebsiella pneumonia*:**

- **حساسية بكتريا *Klebsiella pneumonia* (KP3) النامية بتراكيز مختلفة من العسل تجاه بعض المضادات الحيوية:**

أظهرت النتائج الخاصة بوجود تراكيز مختلفة من العسل في الوسط الزرعي (0.25، 0.5، 0.75، 1)% على استجابة العزلة تجاه بعض المضادات الحيوية ان هناك علاقة طردية لاستجابة العزلة حيث تزداد الاستجابة بزيادة النسبة المئوية للعسل وخصوصاً تجاه المضاد IPN فازداد معدل الاستجابة من 25 ملم بالوسط الخالي من العسل ليصبح 53 ملم بالوسط الحاوي على 10% من العسل. في حين تباينت حساسية العزلة النامية بالوسط الزرعي الحاوي على تراكيز مختلفة من العسل تجاه المضادات قيد الدراسة إذ أظهرت النتائج زيادة قطر التثبيط الخاصة بالعزلة النامية بالوسط الخالي من العسل من 9 ملم تجاه المضاد AMC و S ليبلغ 42 و28 على التوالي تجاه نفس العزلة النامية في وسط حاوي على 10% من العسل (جدول 2).

جدول (2) حساسية العزلة *Klebsiella pneumonia* النامية بتراكيز مختلفة من العسل تجاه بعض المضادات الحيوية

المضادات الحيوية						
APX	S	AM	AMC	NA	IPN	Con. of Honey %
9	9	12	9	12	25	Control
9	9	9	8	15	36	2.5
18	18	13	12	20	40	5
21	23	17	23	25	50	7.5
28	28	29	42	26	53	10

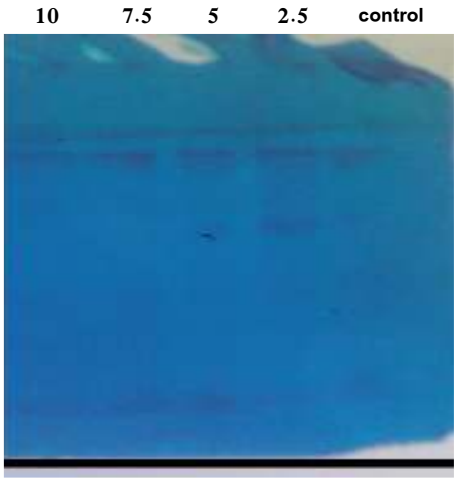
- **التركيب الكيميائي للعزلة *Klebsiella pneumonia* (KP) ذات الرقم المحلي 3 النامية بتراكيز مختلفة من العسل:**

أظهرت النتائج ان زيادة تركيز العسل بالوسط الزرعي الخاص بالعزلة KP تزداد الدهون الثلاثية وبشكل طردي ولغاية المعاملة الحاوية على تركيز عسل 7.5% ليبلغ أعلى مستوى له (170 ملغم/ 100 مل) بعد أن كان 90 ملغم/ 100 مل بالمعاملة القياسية (تركيز العسل 0%) على العكس من البروتين الكلي حيث ان المعاملة الحاوية على 10% كانت أقل كمية بروتين (1430) في حين سلك الكولسترول سلوك متباين تبعاً لزيادة التركيز (جدول 3).

جدول (3) التركيب الكيمياوي لعزلة *Klebsiella pneumonia* (KP) ذات الرقم المحلي 3 النامية بتراكيز مختلفة من العسل

بروتين كلي mg/dl	دهون ثلاثية mg/dl	كولسترول mg/dl	Con. of Honey %
1530	90	57	Control
1520	110	63	2.5
1480	111	66	5
1450	170	48	7.5
1430	170	48	10

أما النتائج الخاصة بالترحيل الكهربائي للبروتينات فأظهرت النتائج أن بزيادة تركيز العسل بالوسط الزرعي عن 2.5% تختفي بعض الحزم وتظهر حزم جديدة تبعاً للمعاملة (صورة 1).



صورة (1) تمثل الترحيل الكهربائي لبروتينات راسب خلايا بكتريا *Klebsiella pneumonia* النامية بتراكيز مختلفة من العسل (%)

المناقشة

أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن للعسل تأثيرات مختلفة على بعض الصفات الخاصة لبكتريا *Klebsiella* خصوصاً ان هناك فروقاً معنوية بحساسية العزلات تجاه تداخل العسل مع بعض المضادات الحيوية، وان هناك زيادة في حساسية البكتريا المنماة بوسط حاوي على تراكيز مختلفة من العسل تجاه المضادات الحيوية. وبنفس الوقت هناك اختلافاً في بعض الصفات الخاصة بالتركيب الكيمياوي أهمها زيادة الدهون الثلاثية بزيادة تركيز العسل بالوسط الزرعي وانخفاض الكولستيرول للمعاملة الحاوية على 7.5 و10% عسل مع اختفاء بعض الحزم البروتينية بزيادة تركيز العسل في الوسط الزرعي؛ فسر الباحث (15) ان السبب في ذلك يعود إلى احتواء العسل على عدة عوامل منها الحموضة، بيروكسيد الهيدروجين، ومواد كيميائية ضوئية Photochemical (Compound) إضافة إلى مواد أخرى غير معروفة، من جانب آخر أضاف (4) إلى احتواء العسل على كمية عالية من البرولين الذي يعمل على تغير بعض مسالك التمثيل الحيوي للأحماض الدهنية والأمينية مما يؤدي إلى تغير في كمية ونوعية الدهون أو البروتينات المكونة للجدران (6). أوضح (9) أن وجود العسل في الوسط الزرعي للخلايا البكتيرية يؤدي إلى انخفاض في كمية الدهون المكونة للجدار إضافة إلى تغير نوعي وكمي في أنواع الأحماض الدهنية والبروتينات إضافة إلى الأحماض الأمينية.

تتفق نتائج الدراسة مع (10) الذي بين ان العسل له فعالية ضد مايكروبية تجاه العديد من أجناس بكتريا *Klebsiella* وخصوصاً جنس *Klebsiella pneumonia* إضافة إلى العديد من الأجناس الأخرى مثل *E. coli*، *Enterobacter cloacae*، *Morganella Morgani*، *Staphylococcus aurens*، *Pseudomonas aeruginosa*، كما تتفق الدراسة مع نتائج دراسة (8) الذي أوضح أن للعسل فعالية ضد مايكروبية تجاه بعض الأنواع الميكروبية السالبة لصبغة گرام.

المصادر

1. Al-Jedah, J. H.; Martin, P. & Robinson, R. K. 2003. Composition differences between brands of honey on sale in Qatar. Appl. Biotech. Food Sci. Policy., 1: 1-5.
2. Caroli, S.; Forte, G.; Iamiceli, A. L. & Galoppi, B. 1999. Determination of essential and potentially toxic trace elements in honey by inductively coupled plasmabased techniques. Talanta, 50: 327- 336.

3. Shamala, T. R.; Tyothi, Y. P. & Saibaba, P. 2000. Antibacterial effect honey on the in vitro and in vivo growth of Escherichia Coli. World J. Mic. and Biotech., 18 (9): 863- 865.
4. Molan, P. C.; Cooper, R. A.; Tropical Doctor. 2000. Honey and sugar as addressing for wounds and ulcers. 30: 249- 250.
5. Weston, R. J.; Mitchell, K. R. & Allen K. L. 1999. Antibacterial phenolic components of New Zealand Manuka honey. Food Chemistry, 64 (3): 295- 301.
6. Kathleen, A.; Carrado, Argonne National abs. 2004. Honey, it's chemistry. The food network Alton Brown's good eats episode on honey. EAID13. kcarrado@anl.gov.
7. Gilmonr, R.; Messer, P.; Guffanti, A. A.; Kent, R.; Scheberl, A.; Kendrick, N. & Krulwich, T. A. 2000. Two- Dimentional Gel electrophoresis analyses of ph-depend protein expression in facultatively alkaliphlic *Bacillus pseudofirmus* OF4 lead to characterization of an S-layer protein with a role in alkaliphily. J. Bacteriol., 5969- 5981.
8. Hegazi, A. G.; Nagia, A.; Moharram, F. A.; Nour, M. S. & Khair, A. M. 2001. Antibacterial activity of different Egyptian honeys in relation to some bee product. Nat. Res. Center and Cairo Univ., Egypt., PP. 40- 45.
9. Hassanein, S. M.; Gebreel, H. M. & Hassan, A. 2010. Honey compared with some antibiotics against Bacteria isolated from Burn- Wound infections of patients in Ain Shams University Hospital. J. American Sci., 6: 301- 320.
10. النعيمي، نور محمد طاهر. 2012. دراسة تأثير تداخل بعض المواد الطبيعية والمضادات الحيوية في حساسية بعض العزلات البكتيرية المعزولة من خمج الجروح والحروق. رسالة ماجستير، كلية العلوم- جامعة الأنبار.
11.Mcinerny, R. J. 1990. Honey- a remedy rediscovered. J. R. Soc. Med., 83: 127- 132.
12. العاني، يوسف رافع؛ نجيب، ليث مصلح؛ حسين، عبد الوهاب بديوي؛ فياض، هديل محمد؛ عبد الرزاق، عاصف حسن وعلي، أيوب، إبراهيم. 2011. دراسة بعض التغيرات المناعية الناتجة عن تلقيح الأرانب المحلية ببكتريا *Klebsiella* المضعفة. مجلة الأنبار للعلوم البيطرية، 4 (2): 90- 95.
13. نجيب، ليث مصلح. 2011. دراسة دور بلازميدات بعض العزلات البكتيرية تجاه بعض المضادات الحيوية. مجلة جامعة الأنبار للعلوم الصرفة. 3(5): 1- 5.
14. نجيب، ليث مصلح. 2007. دراسة إنتاج وتنقية البكتريوسينات من بكتريا حامض اللبنيك وتحديد بعض خواصه. أطروحة دكتوراه، كلية العلوم- جامعة الأنبار.
15. Molan, P. C. 1999. The role of honey in the management of wounds. J. of Wound Care, 8: 415- 418.