دراسة التأثير التثبيطي للعسل المحلي في نمو بعض البكتيريا المرضية في الوسط الزرعي(داخل الزجاج) وفي الحيوانات المختبرية (داخل الجسم الحي)

علي عبد الكاظم عبد العباس صفاء عباس عبد عباس عباس حسين نايف أل سعيد

وزارة العلوم والتكنولوجيا – قسم االانتاج الحيواني

تأريخ القبول 2010/4/26

الخلاصة

في دراسة لمعرفة التأثير التثبيطي للعسل المحلي في نمو بعض البكتيريا المرضية في الأوساط الزرعية (In vivo) وفي الحيوانات المختبرية (Invitro) تم استخدام أربعة أنواع من البكتيريا جلبت من مختبر الصحة المركزية –بغداد وهي *العصيات القولونية* *Escherichia coli* *والمكورات الذهبية* *Staphylococcus aureus* *والمكورات المسبحية* *Streptococcus pyogenus* *وجراثيم الباستوريلا* *Pasteurella hemolytica*. وتم أعادة دراسة خصائصها الزرعية و الكيموحيوية , وتم حساب أعداد الجراثيم للحصول على عدد من البكتريا بحدود (10^4 cfu / ml) وحدة تكوين مستعمرة /مل . واستخدم العسل المحلي لدراسة التأثير التثبيطي حيث عملت من العسل تخافيف باستخدام الماء المقطر المعقم (5% و 10% و 15 %) وبواقع حجم من العسل يخفف مع حجم من الماء المقطر (v/v) واستخدم الوسط الزرعي المغذي بعد الزرع البكتيري وتحميله بتراكيز العسل لقياس قطر هالة التثبيط بعد الحضن لمدة 24–48 ساعة. ولمعرفة التأثير التثبيطي للعسل في الحيوانات المختبرية استخدمت(12) مجموعة من الفئران المستنسلة محليا وبواقع (8)فئران للمجموعة الواحدة ولكل تخفيف من العسل واستخدمت (4) فئران كمجموعة سيطرة لكل نوع من الجراثيم وجرعت جميعها فمويا بجرعة واحدة من تخفيف الجرثومة مقدارها (10^4 cfu / ml) واستخدم العسل بالتراكيز المذكورة كمصدر وحيد لماء الشرب لمدة أسبوع باستثناء فئران السيطرة. وقد أظهرت الدراسة اختلاف درجة تثبيط العسل باختلاف نوع البكتيريا وكونها سالبة أم موجبة لصبغة كرام وان التأثير التثبيطي في الوسط المغذي يتناسب طرديا مع التركيز المستخدم من العسل وان النتائج في الحيوانات المختبرية اختلفت نوعا ما تبعا لضراوة البكتيريا،وهذا يدل على أن العسل المحلي ذو كفاءة جيدة في الحد من النمو البكتيري ربما يؤهله للاستخدام كعلاج داعم مع الأدوية وهذا ما يتوجب التوسع في دراسته مستقبلا.

Key word : عسل ,التاثير التثبيطي. البكتيريا ,حيوانات مختبرية

د. صفاء عباس عبد عباس البريد الاليكتروني saffaabed@yahoo.com

Inhibitory effect of local Honey on Bacteria in culture media and in laboratory animals

Ali,A.Abed Al-abbas Saffaa,A.A Abbas,H.N.Al-saeed

Department of Animal production, Ministry of science and technology

Summary

This study was carried out at the animal station agriculture and the food technology research center of Iraqi ministry of science & Technology. In a study to determine the inhibitory effect of honey in the local growth of some pathogenic bacteria in growth media (In vivo) and in laboratory animals (Invitro) was used four types of bacteria brought from the Central Health Laboratory - Baghdad, *Escherichia coli* , *Streptococcus pneumoniae* , *Staphylococcus aureus* , *Streptococcus pyogenus* and *Pasteurella hemolytica*, and their biochemical characteristics were re-examined.The study deals with studying the effect of local honey in the inhibition of the growth of these bacteria on environmental Nutrient Agar (Invitro) to measure the diameter of zone inhibition after incubator the culture media for a period of 24-48 hours, as for the study of the effect of honey in laboratory animals(mouse In vivo) 12 groups of local mice were used, in addition to four mice of each control group. Each group is given (cfu / ml 10^4) of specific bacteria once and then it is given Diluted honey of different concentrations (5%,10%,20%)with drinking water for one week to all groups except the control group.The study showed a different degree of inhibition of honey depending on the type of bacteria and whether the bacteria is negative or positive of the dye gram and the inhibitory effect of the honey in the nutrient broth increased according to the concentration of honey. The results in animals laboratory differed sometimes depending on the type of bacteria, this indicates that local honey is good in efficiency in reducing bacterial growth which might qualify for use as a treatment supporter with drugs and this is what must be expanded in future studies.

ألمقدمه

يعد العسل مادة سكرية وهو من المركبات واسعة الانتشار ولمختلف الإغراض الغذائية والدوائية ومستحضرات التجميل(10,9,1).وقد استخدمه إنسان العصر الحجري كعلاج قبل 8 ألاف سنة وهذا ما وجد في الصور الحجرية والمخطوطات والبرديات لقدماء المصريين والسومريين بالعراق وسوريا وفي الكتب القديمة للصينيين والهنود , وكان قدماء المصريين يستخدمونه في التحنيط (14,13)وورد ذكره في القران في سورتي (محمد 15)و(النحل 69). يستخدم العسل في علاج الحالات العديدة مثل الصلع والحروق والجروح والناسور وقرحة المعدة(17,12,5)، وهو مادة غذائية ذات قيمة غذائية مهمة لجسم الإنسان وصحته فهو يحتوي على السكريات والفيتامينات والأنزيمات والأحماض والبروتينات(3,1, 4) كذلك أثبتت الدراسات أن العسل مقوي ومحفز للجهاز المناعي للجسم (12,6) ،ومثبط لنمو عدد واسع من الجراثيم الموجبة والسالبة لصبغة كرام وقسم من الخمائر والفطريات (6,3) ولغرض التوسع في مفهوم التأثير التثبيطي للعسل للجراثيم المختلفة فقد صممت هذه التجربة لمعرفة التأثير المثبط للعسل لنمو الجراثيم مختبريا على بيئة الوسط المغذي Nutrient Agar وفي الحيوانات المختبرية (الفئران البيضاء).

المواد وطرائق العمل

1- العزلات الجرثومية

تم الحصول على بعض العزلات البكتيرية من مختبر الصحة المركزية –بغداد وكانت *العصيات القولونية* _ *Escherichia coli* *والمكورات الذهبية* *Staphylococcus aureus* *والمكورات المسبحية* *Streptococcus pyogenus* *وجراثيم الباستوريلا* *Pasteurella hemolytica* . وتم أعادة دراسة خصائصها الزرعية و

الكيموحيوية (جدول 1) وتم حساب أعداد الجراثيم للحصول على عدد من البكتريا بحدود (cfu / ml 10^4) وحدة تكوين مستعمرة /مل . (15.5.4) .

2- العسل المحلي

استخدم العسل المحلي المنتج في مزارع عراقية في محافظة بابل لها سمعتها العالية بنوعية عسلها وكانت فترة الإنتاج لا تتجاوز ثلاثة أشهر , ثم عملت من العسل تخافيف باستخدام الماء المقطر المعقم (5% و 10% و 15 %) وبواقع حجم من العسل يخفف مع حجم من الماء المقطر (v/v) وحسب المصادر العلمية (13,11).

3- تم أعداد الوسط الزرعي المغذي Nutrient agar المعقم وتم عمل حفرة كبيرة في وسط الطبق الزجاجي باستخدام الطرف العريض لماصة باستور الزجاجية المعقمة لتحميلها بالتراكيز المذكورة اعلاه من تخفيف العسل(7 . 8) .

4-زرعت مكررات الأطباق (ثلاثة أطباق لكل تخفيف ولكل نوع جرثومي)باستخدام طريقة التخطيط بعد تحميل الحفرة بالعسل المخفف وتم بعد حضنها لفترة 24 – 48 ساعة وفي درجة (37 درجة مئوية)وتم قياس قطر هالة التثبيط واستخدم طبق زرعي للسيطرة لكل نوع جرثومي يحتوي على حفرة وسطية محملة بالماء المقطر المعقم (11,7).

5- استخدمت 12 مجموعة من الفئران المستنسلة محليا وبواقع (8)فئران للمجموعة الواحدة ولكل تخفيف من العسل واستخدمت (4) فئران كمجموعة سيطرة لكل نوع من الجراثيم وجرعت جميعها فمويا بجرعة واحدة من تخفيف الجرثومة مقدارها (10^4 cfu / ml) واستخدم العسل بالتراكيز المذكورة كمصدر وحيد لماء الشرب لمدة أسبوع باستثناء فئران السيطرة.

6- استخدم التحليل الإحصائي ANOVA لتحليل أقطار هالة التثبيط وفحص X^2 للهلاكات وأعدادها (17.16).

النتائج

لقد أظهرت نتائج الفحوصات الكيموحيوية للبكتيريا الأربعة فروقات في فحوصا ت الحركة والكاتليز والاندول وفحص الجيلاتين وصبغة كرام والنمو على الأوساط الزرعية المختلفة وكما مبين في الجدولين (2,1).أما الجدول رقم (3)فيوضح مقدار قطر هالة التثبيط وعدد الهلاكات حسب نوع الجرثومة بعد24-48 ساعة من الزرع أو التجريع الجرثومي حيث أظهرت نتائج دراسة التأثير التثبيطي للعسل في بيئة الوسط المغذي أن قطر هالة التثبيط ازدادت بازدياد تركيز العسل مع تباينها حسب نوع الجرثومة مقارنة بمجموعة السيطرة . وكان قطر هالة التثبيط هو 8-15 مليمترا بشكل عام وللتركيزين 10% و20% فيما لم يتجاوز 2-3 مليمترا للتركيز 5% وهذا شكل فرقا إحصائيا معنويا عاليا (P<0.001) بين التراكيز الثلاثة, وكان العسل أكثر تثبيطا لبكتيريا الباستوريلا حيث كان قطر هالة التثبيط (8-15 مليمترا) ثم العصيات القولونية (10-12 مليمترا) والمكورات العنقودية (8-10 مليمترا) وأخيرا جراثيم المكورات المسبحية (6-12 مليمترا) مما شكل فروقا معنوية عالية (P< 0.001) مقارنة بمجموعة السيطرة وحتى التركيز الأقل للعسل (5%) أعطى درجة من التثبيط واعتبرت غير مهمة إحصائيا مقارنة مع بقية التراكيز ولكن من الناحية العملية كان التثبيط واضحا .

وعند تجربة التأثير الواقي للعسل المجرع فمويا إلى الفئران المخمجة بالبكتيريا تبين كما يوضح الجدول(3) أن معدل الهلاكات يتباين إحصائيا تحت مستوى (P <0.001) مقارنة بمجموعة السيطرة

التي هلكت جميع الفئران فيها بعد 24–48 ساعة من التجريع , فيما كانت الهلاكات من (0–1) فأر للتركيز 20% من العسل و(3–5) فأر للتركيز المنخفض (10%) و(7–8) فأر للتركيز (5%) وباختلاف معنوي على مستوى(P <0.05) وأيضا تباين ذلك حسب نوع البكتيريا المستخدمة حيث لوحظ أن اقل الهلاكات هي في معاملات مجموعة العصيات القولونية ثم المكورات العنقودية والمكورات المسبحية وشوهدت أعلى الهلاكات في بكتيريا الباستوريلا بخلاف نتائج الزرع في الوسط الزرعي وخصوصا لجراثيم الباستوريلا و المكورات المسبحية.

جدول (1) : الخصائص المميزة للعزلات البكتيرية المستخدمة في الدراسة .

نوع الجرثومة	فحص الحركة	Indol test اختبار الاندول	Catalse test اختبار الكاتيليز	Gelatin liquefaction test فحص تميع الجلاتين	Gram stain /الاستجابة لصبغة كرام وشكل البكتيريا
Staphylococcus aureus	–	–	+	+	G^+ دائرية Cocci
Streptococcus pyogenes	–	–	–	–	G^+ دائرية cocci
Escherichia coli	+	+	–	–	G^- عصياتBacilli
Pasturella hemolytica	–	–	–	–	G^- عصياتBacilli

جدول (2) : خصائص النمو للعزلات البكتيرية باستخدام أوساط زرعية مختلفة .

نوع الجرثومة	النمو على أجار الدم	النمو على أجار ايوزين –متلبين الأزرق Eosin methylen blue	النمو على الاجار وسط برلينت الاخضر Brilliant green	النمو على أجار وسط المكونكي MaCconky
Staphylococcus aureus	Beta hemolysis تحلل الدم نوع بيتا	– لا تنمو على هذا الوسط	– لا تنمو على هذا الوسط	مستعمرات البكتيريا وردية اللون صغيرة الحجم
Streptococcus pyogenes	Beta hemolysis تحلل الدم نوع بيتا البكتيريا على شكل قطرات زيت خضراء لامعة اللون	– لا تنمو على هذا الوسط	– لا تنمو على هذا الوسط	مستعمرات البكتيريا وردية اللون مخاطية على شكل رأس دبوس

Escherichia coli	Alfa hemolysis تحلل الدم نوع الفا البكتيريا على شكل مستعمرات عديمة اللون كبيرة الحجم	مستعمرات البكتيريا ذات لون اخضر وسماوي ومخاطية القوام	مستعمرات البكتيريا ذات لون بنفسجي	مستعمرات البكتيريا وردية اللون
Pasturella hemolytica	Beta hemolysis تحلل الدم نوع بيتا	– لا تنمو على هذا الوسط	– لا تنمو على هذا الوسط	مستعمرات البكتيريا وردية اللون

جدول (3) التأثير المثبط لثلاثة تراكيز من العسل في أربعة أنواع من البكتيريا مقدرة بطريقة قطر هالة التثبيط في الوسط الزرعي وبطريقة التجريع في الفئران.

نوع البكتيريا	تركيز العسل %	قطر هالة التثبيط(سم) M± SE او S.D± n	N:عدد الهلاكات من أصل 8 فئران(معدل ثلاث تكرارات)*
Escherichia coli	%5	2-3 (±1.5)	3
	%10	10-11(±2.5)	1
	%20	10-12(±2.6)	1
Staphylococcus aurous	%5	2-3 (±1.2)	5
	%10	8-9 (±2.2)	3
	%20	8-10 (±2.5)	1
Pasturella hemolytic	%5	1-2 (±0.44)	8
	%10	8-10 (±1.9)	6
	%20	12-15 (±2.29)	5
Pasturella hemolytic	%5	0-2 (±0.9)	4
	%10	6-8 (±1.8)	3
	%20	6-12 (±3.1)	3

* هلكت كل حيوانات السيطرة لجميع البكتيريا

المناقشة

لقد أظهرت الدراسة أن العسل يتميز بفعل مضاد للجراثيم السالبة والموجبة لصبغة كرام وأن التركيز العالية المتمثلة بتركيز (10%)و(20%) أعطى قطر تثبيط تراوح بين (8–15) ملليمتر و الآلية التي يمارس العسل فيها هذا الفعل غير معروفة ولكن قد تعود إلى الاسموزية (Osmotic prossec)ألمرتفعه للعسل أو لوجود الإنزيمات أو لوجود المواد المثبطة للنمو البكتيري في العسل نفسه(10,8,7 , 16) .أو قد يرجع فعل التثبيط إلى انخفاض الأس الهيدروجيني في العسل لاحتوائه عل الماء الاكسجيني (12 , 18)، أن هذه النتائج تتطابق مع ما ذكره مولان وجماعته (14.13) من كون العسل مادة مثبطة لنمو البكتيريا السالبة والموجبة لصبغة كرام . وبالرغم من كون الدراسة تؤكد على أن البكتيريا السالبة لصبغة كرام أكثر حساسية من البكتيريا موجبة كرام والتي تختلف مع ما جاء في (2.1) الذين أكدوا على أن الجراثيم الموجبة لصبغة كرام أكثر حساسية للتأثير التثبيطي للعسل من الجراثيم السالبة وان للجدار الخلوي دور في حساسية الجراثيم للتأثير المثبط للعسل .

لقد أكدت الدراسة أن أحسن تركيز للتثبيط هو (10%و20%) وهذا يتطابق مع ما ذكره (18,3,2) الذين أكدوا أن العسل يثبط البكتريا عند تركيز (20%) على نحو أفضل من باقي التراكيز وان أحسن تركيز ثاني يثبط النمو هو (10%). مع العلم أن أعلى تركيز مستخدم في تلك التجارب كان (20 %) . أما فيما يتعلق التأثير التثبيطي في الحيوانات المختبرية فقد تبين ندرة المصادر التي تتناول دراسة تأثير العسل بهذه الطريقة ومع ذلك فقد أوضحت النتائج أن دراسة التأثير الواقي للعسل في الفئران البيضاء قد اختلفت بعض الشيء عن نتائج التأثير التثبيطي للعسل في الوسط المغذي وخصوصا بكتيريا الباستوريلا والمكورات المسبحية حيث كانت الهلاكات من (0–1) فأر للتركيز(20%) من العسل و(3–5) فأر للتركيز (10%) و(7–8) فأر للتركيز (5%) وباختلاف معنوي عالي مستوى(P <0.05) و تباين ذلك حسب البكتيريا المستخدمة التي كانت اقل الهلاكات في معاملات مجموعة العصيات القولونية ثم المكورات العنقودية والمكورات المسبحية وأعلاها في حالة بكتيريا الباستوريلا . وهذه النتائج اختلفت عنها الوسط الزرعي وخصوصا لبكتيريا الباستوريلا و المكورات المسبحية وقد يعود ذلك إلى أن البكتيريا كانت أشدة ضراوة (Sever Virulence) نتيجة تنشيط البكتيريا بسبب الإصابة التجريبية في الفئران والتي أصبحت أكثر أمراضية مما في الأوساط الزرعية ( ) 19.14,7 ونستنتج من الدراسة اختلاف درجة تثبيط العسل باختلاف نوع البكتيريا وكونها سالبة أم موجبة لصبغة كرام وان التأثير التثبيطي في الوسط المغذي يتناسب طرديا مع التركيز المستخدم من العسل وان النتائج في الحيوانات المختبرية اختلفت نوعا ما تبعا لضراوة البكتيريا،وهذا يدل على أن العسل المحلي ذو كفاءة جيدة في الحد من النمو البكتيري ربما يؤهله للاستخدام كعلاج داعم مع الأدوية وهذا ما يتوجب التوسع في دراسته مستقبلا.

المصادر

1 –Abd-ELaal A M EL-Hadidy M R and EL-Mashad (2007). Antimicrobial effect of Bee honey in comparison to antibiotics on organism isolated from infected Burns. Annals of Burns and fire Diseases Vol 20N 2 june

2- AEl-Amri and S Ben-Gweirif (2003).Invitro study of antibacterial activities of some Libyan Honey Against Bacteria Isolated from Burans Vol 2 N4 Dece

3 - Allen KI (1991) .A survey of antibacterial activity of some New Zealand honey J Pharma 43(12) p 817 – 822

4 -Baggio A Gallina A Dainse A Manziaello C Mutinelli F Serra G Colombo R Carpano E Sabatini AG Wallner K Piro P Sangiorgi E (2005) . Gamma radiation A sanitating treatment of AFB – contaminated Bee keeping equipment, Gamma radiation sanitation in Bee keeping management. Apiacta Vol 40 p 22-27

5- Bangroo A K Ramji K Smita C (2005). Honey dressing in pediatric burns. J Ind Asso Paed Surg 10 p 172-5

6 - Brown AE Benson s (2005). Microbiological Application 9th ed McGraw Hill higher Education Pub USA

7 - Cooper RA Molan PC Harding KG (1999) . Antibacterial activity of honey against strains of *Staphylococcus aureus* from infected wound J Royal Soci Med Vol 92 p 283 – 285

8- Cooper R A Molan P C Harding K G (2002) . The sensitivity to honey of gram-positive cocci of clinical significance isolated from wounds J Appl Microb 93: 857-63.

9 - Efem SE Udoh KT Iwara CI (1999) . The antimicrobial spectrum of honey and its clinical significance Infectious 20 (4) : 227 – 229

10 - International Consultative Group on Food Irradiation (ICGFI) and International Food Information Council (IFIC)Foundation Food Irradiation Tool (2002) . A global food safety - Washington 236 USA

11- Jeddar A Kharsany A Ramsaroop U G Bhamjee A Maffejee I E (1985). The antibacterial action of honey. An *in vitro* study. Sciences animal medical journal 67: 257-8

12- Karayil S Deshpande S D Koppikar G V (1998) . Effect of honey on multi-drug resistant organisms and its synergistic action *with* three common antibiotics. J Post-Graduate Medicine 44: 93-96

13 – Molan P C (2006). The antibacterial activity of honey :1- Nature of the antibacterial activity Bee World 73(1)5-28

14 - Molan PC Allen KI (1996). The effects of gamma irradiation on the antibacterial activity of honey J Pharma 48 (11) : 1206-1209

15- Quinn PT Markey B Carter GR (2006) . Clinical Veterinary Microbiology 1st ed Elsevier Limited Mosby Pub Hous UK

16 - SAS institute (1994). SAS/STAT Guide for personal computer 11th ed SAS lusitute iuc. Cary N C

17 - Steel R G and Torrie J H (1980) .Principles and procedures of statistics McGraw Hill Book Co link New York

18- Subrahmanyam M Hemmad A R and Pawar S G (2001). The antibacterial activity of honey on bacterial from wounds., Annals of Burns and fire Disasters 14(1)198-201

19 – Trampuz A Piper KE Steckelberg JM Patel R (2006) .Effect of gamma irradiation on viability and DNA of *Staphylococcus epidermidis* and *Escherichia coli* J. Microb pp 1271 – 1275