المجلة العراقية للبحوث الانسانية والاجتماعية والعلمية
Iraqi Journal of Humanitarian, Social and Scientific Research
Print ISSN 2710-0952 Electronic ISSN 2790-1254
العدد 12 A آذار 2024
No.12A March 2024

تأثير عسل المانوكا على بكتريا المكورات الرئوية المعزولة من مرضى الجيوب الانفية

محمد حسين علي[1] ونهان بهاءالدين جعفر[2]

جامعة كركوك/كلية العلوم[1,2]

الخلاصة:

أجريت هذه الدراسة للفترة من شهر كانون الاول 2021 ولغاية تموز 2022 في مختبر الاحياء المجهرية للدراسات العليا في كلية العلوم جامعة كركوك لعزل وتشخيص بكتريا *Streptococcus pneumonia* *المسببة* لالتهاب الجيوب الانفية وتأثير بعض العوامل على نسبة الاصابة، والكشف عن الحساسية للمضادات الحيوية للعزلات كما تم دراسة التأثير التثبيطي لعسل المانوكا على نمو البكتريا ودراسة بعض عوامل الضراوة والكشف عنها. كما بينت الدراسة ارتفاع نسبة الحساسية للمضاد الحيوي , levofloxacin من 53% الى 82 % عند استخدام 10% من عسل المانوكا كما بينت الدراسة انخفاض في قيم ال MIC للمضاد أعلاه حيث انخفض من 4µg الى 2 µg عند استخدام 10% من مادة عسل المانوكا بشكل تأزري مع المضاد الحيوي. كما بينت الدراسة قدرة بكتريا المكورات السبحية على تكوين الاغشية الحيوية بواقع 6 عزلات شديدة التكوين للأغشية الحيوية في حين كانت 4 عزلات متوسطة التكوين للأغشية الحيوية و3 عزلات ضعيفة التكوين للأغشية الحيوية بينما كانت أربع عزل غير مكونة للأغشية الحيوية. تضمنت الدراسة اختبار الفعالية التثبيطية لمادة عسل المانوكا باستخدام طريقة الحفر اذ تم تحضير أربع تراكيز (100،75،50،25) حجم لحجم (v/v) ومقارنة القدرة التثبيطية على أربع عزل اذ تراوح المعدل التثبيطي للتراكيز الأعلى (30،21) ملم على التوالي في حين سجلت التراكيز الأدنى قطر تثبيطي بمعدل (16،13) ملم على التوالي كما تم تحديد التركيز المثبط الأدنى (MIC) باستخدام الشريحة المعيارية 15% v/v كما تم تحديد قيمة (MBC) بتركيز (17%). بينت الدراسة قدرة مادة عسل المانوكا وبتركيز 10 % على اضعاف تكوين الاغشية حيث لوحظ انخفاض في الكتلة الحيوية للأغشية الحيوية بينما أوقف التركيز 20% تكوين الاغشية الحيوية. بينت الدراسة ان مادة عسل المانوكا لها القدرة التثبيطية على نمو المكورات السبحية الرئوية وبتركيز 15% وهذا يأخذنا الى إمكانية الاستفادة من هذه المادة في عمل غسولات انفية بعد اجراء دراسة ادق تفصيلاً لتحديد التركيز المثبط الادنى، وتحديد التركيز الامن، واعراضها الجانبية كما ان من مميزاتها هي سهولة الحصول عليها ورخص ثمنها.

كلمات مفتاحية : عسل المانوكا ، بكتريا المكورات

The effect of Manuka honey on pneumococcal bacteria isolated from sinus patients

Muhammad Hussein Ali1 Wanhan Bahaa Al-Din Jaafar2

Kirkuk University/College of Science 1,2

Conclusion:

This study was conducted for the period from December 2021 to July 2022 in the microbiology laboratory for postgraduate studies at the College of Science, University of Kirkuk, to isolate and diagnose the Streptococcus pneumonia bacteria that cause sinusitis, the effect of some factors on the infection rate, and to detect the sensitivity to antibiotics of the isolates. The inhibitory effect of honey was also studied. Manuka on bacterial growth and studying and detecting some virulence factors. The study also showed an increase in the rate of sensitivity to the antibiotic levofloxacin, from 53% to 82% when using 10% Manuka honey. The study also showed a decrease in the MIC values for the above antibiotic, as it decreased from 4µg to 2µg when using 10% Manuka honey synergistically. With

antibiotic. The study also showed the ability of Streptococcus bacteria to form biofilms, with 6 isolates being highly biofilm-forming, while 4 isolates were moderately biofilm-forming, 3 isolates were weakly biofilm-forming, and four isolates were non-biofilm-forming. The study included testing the inhibitory effectiveness of Manuka honey using the etching method, where four concentrations (100, 75, 50, 25) volume by volume (v/v) were prepared and the inhibitory capacity of four isolates was compared, as the inhibitory rate ranged for the highest concentrations (30, 21) mm. Respectively, while the minimum concentrations recorded an inhibitory diameter of (16,13) mm, respectively, the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined using the standard slide of 15% v/v, and the (MBC) value was determined at a concentration of (17%). The study showed the ability of Manuka honey at a concentration of 10% to weaken the formation of biofilms, as a decrease in the biomass of biofilms was observed, while a concentration of 20% stopped the formation of biofilms. The study showed that Manuka honey has the ability to inhibit the growth of Streptococcus pneumoniae at a concentration of 15%. This leads us to the possibility of benefiting from this substance in making nasal washes after conducting a more detailed study to determine the minimum inhibitory concentration, determine the safe concentration, and its side effects. Among its advantages are: Easy to obtain and cheap.

Keywords: Manuka honey, cocci bacteria

1-المقدمة:

1-1 الجيوب الانفية

تعرف الجيوب الأنفية على انها تجاويف صغيرة في عظام الوجه حول الأنف. تعتبر ممرات لمرور الهواء من خلالها حيث تتميز بكونها غنية بالأوعية الدموية الشعرية الاعصاب والخلايا الطلائية الكأسية المفرزة للمخاط اذ تشكل نظاما معقدا من التجاويف والاخاديد والقنوات حيث تلعب دورا مهما في تميز الروائح والحد من دخول الاحياء المجهرية..(Netter 2014)

تقسم الجيوب الانفية في الانسان الى أربعة اقسام رئيسية .(Snell 2019)

1. **الجيوب الانفية العليا او الجيوب الغربالية (Ethmoidal Sinuses)** تقع في الجزء العلوي من الانف بين العينين تتكون من عدة تجاويف هوائية مكونة من الخلايا الهوائية الإثمودية. تحتوي على غشاء مخاطي يفرز المخاط لترطيب وتنظيف الجهاز التنفسي
2. **الجيوب الانفية الجانبية او الجيوب الصدغية (Maxillary Sinuses)** تقع في الجزء الجانبي العلوي من الوجه أسفل العينين تعتبر أكبر الجيوب الأنفية وأكثرها تطورًا ترتبط بالتجويف الأنفي من خلال فتحة تسمى فتحة الجيوب الأنفية الجانبية. تعمل على تسخين الهواء وترطيبه قبل دخوله إلى الجهاز التنفسي.
3. **الجيوب الانفية الامامية او الجيوب الجبهية (Frontal Sinuses)** تقع في الجزء العلوي من الجمجمة في الجبهة قد تكون متواجدة في الجانبين الأيمن والأيسر من الجبه. تتصل بالتجويف الأنفي من خلال فتحة تسمى فتحة الجيوب الأنفية الأمامية.
4. **الجيوب الانفية السفلية او الجيوب الوتدية (Sphenoidal Sinuses)** تقع خلف الانف وفوق التجويف الانفي وفوق الحجرة الجمجمية تشكل زوجًا من التجاويف الهوائية ذات الشكل المخروطي ترتبط بالتجويف الأنفي من خلال فتحة تسمى فتحة الجيوب الأنفية السفلية.

5. وبائية المرض

نظراً لأهمية الجانب الوبائي لهذا المرض فقد اجريت دراسات عدة بهذا الصدد بهدف القاء الضوء على بعض العوامل المؤثرة على انتشار المرض ومن هذه الدراسات التي قام بها صبحي وشاكر 2011 في مدينة الموصل حيث عزلوا مجموعة من المسببات المرضية لالتهاب الجيوب من مستشفيات السلام والزهاوي وتوصلوا ان نسب الاناث المصابة اعلى من الذكور حيث بلغت النسبة (56%) في الاناث و (44%) في الذكور .

2-1 بكتريا المكورات السبحية الرئوية *streptococcus pneumonia*

ان اول من اعطى الوصف العام لبكتيريا السلالة الرئوية العقدية بشكل مرجعي هما كل من كليبس في عام 1875 وإيبرث وماتراي في عام 1880 بعد ذلك استخدموا مصطلح "Pneumococci" لاكتشافاتهم استنادًا على ملاحظاتهم القائمة على الفحص المجهري للبصاق وسائل الرئة لمرضى الالتهاب الرئوي (White *et al*.1938)، ومع ذلك، يُعزى اكتشاف بكتيريا السلالة الرئوية العقدية إلى عالمين، جورج إم. ستيرنبرغ في الولايات المتحدة ولويس باستور في فرنسا، حيث اكتشف كلاهما الكائن في وقت واحد في عام 1881.اذ قام كل من هما بحقن اللعاب البشري في الأرانب، استخدم ستيرنبرغ لعابه، بينما حقن باستور لعاب طفل توفي بسبب داء الكلب (White *et al*1938)، اكتشف كلاهما وعزل (Diplococci) من دم الأرانب في عام 1886، أطلق على البكتريا اسم "البكتيريا الرئوية العقدية" بواسطة فرينكل (1886) وذلك لكونها المسبب الرئيسي للإصابات الرئوية.

3-1 عسل المانوكا

العسل هو منتج طبيعي حلو وذو نكهة، يستهلك بسبب قيمته الغذائية العالية وتأثيره على صحة الإنسان، ويتمتع بخصائص مضادة للأكسدة ومثبطة للبكتيريا ومضاد للالتهابات ومضاد للميكروبات، بالإضافة إلى قدرته على شفاء الجروح وحروق الشمس (Alvarez-Suarez *et al* .2013). يتم إنتاج العسل من قبل النحل من رحيق النباتات وإفرازاتها وفضلات حشرات التي تمتص عصير النباتات. اما من ناحية محتواه الغذائي، يُعد العسل مصدرًا مثيرًا للاهتمام من ناحية محتواه الغذائي اذ يعد مصدرا للعناصر الغذائية الكبرى والصغرى الطبيعية، ويتكون العسل من محلول مشبع من السكريات، حيث يشكل الفركتوز والجلوكوز عنصران رئيسيان، بالإضافة إلى مجموعة واسعة من المكونات الثانوية، وخاصة المركبات الفينولية (Bogdanov *et al*.2008). تختلف تركيبة العسل بشكل كبير من نوع الى اخر وتعتمد في المقام الأول على مصدره النباتي؛ كما يمكن أن تؤثر العوامل الموسمية والبيئية أيضًا على تركيبه وتأثيراته البيولوجية. أظهرت العديد من الدراسات أن القدرة المضادة للأكسدة للعسل ترتبط بشكل قوي ليس فقط بتركيز المركبات الفينولية الكلية الموجودة، ولكن أيضًا باللون، حيث تشير التقارير إلى أن العسل ذو الألوان الداكنة يحتوي على محتوى فينولي كلي أعلى وبالتالي قدرة مضادة للأكسدة أعلى(Alvarez-Suarez *et al*.2010)

وفقًا للأصل، يمكن تصنيف العسل في فئات مختلفة على النحو التالي:

1. عسل الزهور، الذي يتم الحصول عليه أساسًا من رحيق الزهور (على عكس عسل رحيق الندى)
2. عسل رحيق الندى، الذي يتم إنتاجه بواسطة النحل بعد جمعهم "رحيق الندى" (إفرازات حشرات تنتمي إلى جنس Rhynchota، التي تعمل على اختراق انسجة النبات واستهلاك عصير النبات ثم إعادة افرازه مرة أخرى).
3. العسل احادي الزهور او احادي النبات، الذي يتغذى النحل فيه بشكل أساسي على نوع واحد من النباتات ويتم تسميته وفقًا للنبات
4. العسل متعدد النباتات (المعروف أيضًا باسم العسل متعدد الأزهار) والذي يحتوي على عدة مصادر نباتية، دون أن يكون أي منها غالبًا، مثل عسل زهور المروج وعسل الغابات. وقد اقترح أن العديد من

الخصائص العلاجية للنباتات يمكن نقلها من خلال العسل، بحيث يمكن استخدام العسل كوسيلة لنقل خصائص النبات العلاجية. (Alvarez-Suarez *et al* .2012)

فيما يتعلق بالعسل احادي الزهور، فإن عسل المانوكا يعتبر من انواع العسل الداكنة، لفت انتباه المجتمع العلمي الدولي بشكل كبير بسبب خصائصه البيولوجية، خاصة قدرته المضادة للميكروبات والمضادة للأكسدة. يتم الحصول على هذا العسل من شجرة المانوكا ***Leptospermum scoparium*** وهي عبارة عن شجيرة مزهرة تمتاز دائمًا بإنتاجها الغزير، وكذلك تُعْرَف بصلابة أخشابها. تُشْبِه المكنسة، وهي شجرة تتبع الفصيلة الوردية، والتي تنمو كشجيرة أو شجرة صغيرة في جميع أنحاء نيوزيلندا وشرق أستراليا(Kato Umeda *et al*2008) . في الطب الشعبي، يتم استخدام مستخلصات مختلفة من شجرة المانوكا كمهدئات وعلاجات لشفاء الجروح. وعلاوة على ذلك، تم استخدام عسل المانوكا نفسه منذ فترة طويلة للتخلص من العدوى البكتيرية، بما في ذلك الخراجات والجروح الناجمة عن الإصابات والحروق والقرح ذات الأصول المختلفة (Patel Cichello.2013) حالياً، يتم دراسة المركبات الحيوية الرئيسية في عسل المانوكا والآليات المسؤولة عن أنشطتها البيولوجية. ستدعم هذه الدراسات زيادة استخدام عسل المانوكا في طب الجلد، ويمكن أن تكون أساسًا لعزل وتنقية المركبات لتطوير منتجات صيدلانية حيوية ذات خصائص مضادة للميكروبات وخواص شفاء الجروح؛ يمكن أن تمثل هذه الاكتشافات الجديدة قيمة اقتصادية إضافية يمكن أن تعود بالفائدة أيضًا على مربي النحل في إنتاجاتهم.

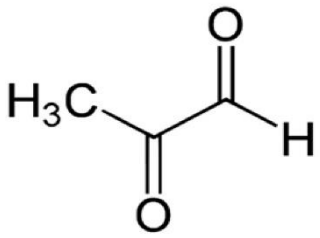
1-3-1 التركيب الكيميائي للمركبات النشطة في عسل المانوكا

تمت دراسة تركيب العسل من خلال توصيف أنواع مركبات البوليفينولات وثبت أنها مناسبة للاستدلال عن الأصل الزهري للعسل (Anklam.1998)، وبالتالي، يمكن أن تمثل الفلافونويدات علامة نباتية صحيحة للعسل من ناحية كونه نقي او مغشوش (Tomas,Barberan.1993)، حيث ترتبط ارتباطًا وثيقًا بقدرته المضادة للأكسدة حيث تعمل على محاربة الجذور الحرة والاجهاد التأكسدي. توجد اختلافات نوعية وكمية في محتوى الفلافونويدات في عسل المانوكا حيث يرجع السبب الى اختلاف مصادر الازهار بالإضافة الى اختلاف طرق الاستخراج والحصاد للعسل والعوامل الموسمية والبيئية أظهرت العديد من الدراسات أن الفلافونويدات الرئيسية في عسل المانوكا هي: البينوبانكسين والبينوسيمبرين والكريسين، بينما تم تحديد اللوتيولين والكويرسيتين والميثوكسيكامبفيرول والإيسورامنتين والكامبفيرو والجالانجين أيضًا بتركيزات أقل. حيث تعمل المواد اعلاه كعلامة كيميائية جيدة لنقاء عسل المانوكا(Yaoa,Jiang *et al*.2005).

تعتبر مادة ميثيل جليوكسال (MGO) اهم مادة اذ يتكون هذه المركب عادة أثناء تفاعلات التكرمل المرافقة لعملية تكوين العسل كمنتجات ناتجة عن تحلل من الكربوهيدرات ، وتم تحديدها كمساهم اساسي في النشاط المضاد للبكتيريا غير المعتمد على بيروكسيد الهيدروجين(Chan,Deadman *et al*. 2013)

الميثيل غلايوكسال (Methylglyoxal) هو مركب عضوي ينتمي إلى عائلة الألدهايدات (Aldehydes).يتكون من ثلاثة ذرات كربون وأربع ذرات هيدروجين واثنتين من ذرات الأكسجين. صيغته الكيميائية هي $C_3H_4O_2$. يُعرف أيضًا باسم بروبانونال ألدهايد (Propanonaldehyde) أو 2-أوكسوبروبانال(2-Oxopropanal

تتكون بنية مثيل كلايوكسال من مجموعة كيتون (باستبدال ذرة الأكسجين بذرة كربون) ومجموعة الألدهايد (ذرة كربون مزدوجة مرتبطة بذرة هيدروجين وأخرى مزدوجة مرتبطة بذرة أكسجين).



شكل 1-1 التركيب الكيميائي لمركب MGO

يتم تشكيل هذا المركب بشكل طبيعي في العديد من العمليات الحيوية والكيميائية في الكائنات الحية، ويمكن أن يكون له تأثيرات متعددة على النظام الحي (Tuberoso.*et al*.2009)

يشتق مركب MGO من تفاعل الجلوكوز أو الفركتوز في عملية تعرف باسم انحلال الألدوز (Aldose degradation).يتم تكوين الميثيل غلايوكسال كمنتج بيني من تفاعلات الألدوز مع الأحماض الأمينية، وبشكل خاص الجليسين .(Glycine) يمكن أيضًا أن يتم تكوين الميثيل غلايوكسال عن طريق تفاعل الجلوكوز مع الأحماض الأمينية الأخرى مثل (Alanine)و.(Serine)

يمكن تلخيص عملية البناء بخطوات أساسية للمسار الأيضي لتكوين الميثيل غلايوكسال et , Stephens (al.2010)

- تفاعل الجلوكوز مع امينات الأحماض الأمينية لتكوين الجلوكوزامين (Glucosamine) والألدوليزين (Aldolysine).
- يخضع الجلوكوزامين والألدوليزين للتفكك الأولي لتكوين المركب المتوسط المسمى الألدوليزين النهائي (Final Aldolysine).
- يخضع الألدوليزين النهائي لتفكك إضافي لتكوين المركب النهائي المعروف باسم الميثيل غلايوكسال.

يعتبر الميثيل غلايوكسال مركبًا ذو نشاط بيولوجي مهم. حيث يلعب دورًا في العديد من العمليات الحيوية مثل التأثير على نشاط الإنزيمات والإشارات الخلوية والتهابات الجسم. كما أن الميثيل غلايوكسال له خصائص مضادة للميكروبات، اذ تعمل مادة الميثيل غلايوكسال على تثبيط نمو البكتيريا وقتلها عن طريق عدة آليات تشمل(Mavric *et al* 2008)

2-المواد وطرق العمل

2-1 جمع العينات

تم جمع 120 عينة من المرضى المصابين بالتهاب الجيوب الانفية من خلال العيادات الاستشارية لكل من مستشفى كركوك العام ومستشفى ازادي التعليمي والعيادة التخصصية للفترة من كانون الاول 2021 ولغاية تموز 2022.

كما تم جمع 50 عينة سيطرة (control) من الأشخاص الذين لم تظهر عليهم اعراض مرضية لغرض المقارنة من مناطق مختلفة من محافظة كركوك.

وسجلت المعلومات الخاصة بالمريض من حيث العمر والجنس والمهنة وهل الشخص مدخن وفي حالة كونه غير مدخن هل يوجد شخص مدخن في العائلة والبيت ومكان العمل وتشخيص الطبيب للحالة من حيث نوع الإصابة (Acute, sub-acute, chronic) وإذا ما كان المريض يعاني من إصابات في البلعوم واللوزتين والاذن الوسطى.

تم اخذ العينات بوساطة المسحات الحاوية على وسط ناقل swab with media باستخدام Vienna speculum, nasalوفي حالة المسحات العادية التي لا تحوي وسط ناقل توضع المسحة في انبوب حاوي على وسط ناقل (transport media) لحين نقلها الى المختبر لأجراء عملية زرع المسحات على الوسط الغذائي المناسب واجراء الاختبارات التشخيصية.

2-2 زرع العينات Cultivation of samples

تم زرع العينات مباشرة فور وصولها للمختبر على وسط اغار الدم blood agarالمحضر في فقرة 3-2-1-1تحت ظروف معقمة وحضنت في candle gar بدرجة $37c^0$ لمدة 48ساعة مع توفير غاز ثاني أوكسيد الكاربون CO_2 وبعد دراسة النمو ونوع تحلل الدم يتم زراعتها على وسط Streptococcus selective agar.

2-2-1تشخيص العزلات البكتيرية

2-2-2 التشخيص المجهري Microscopic Examination

حال وصول العينات الى المختبر وبعد اكمال زرع المسحات على الاطباق تم عمل شرائح وصبغها بصبغة كرام للتحري عن وجود البكتريا وكذألك تم تصبيغها بصبغة الحبر الهندي للتحري عن وجود الكبسولة.

بعد التحضين لمدة 48 ساعة اخذت عدد من المستعمرات البكتيرية النامية على وسط (blood agar) ووسط (Streptococcus S. A) ووضعت على شريحة زجاجية حاوية على قطرة من محلول Normal salineمع النشر بواسطة اللوب وتركت لتجف وبعدها تم تثبيت بوساطة الحرارة عن طريق امرارها بسرعة على اللهب مرتين او ثلاث مرات ثم صبغت بملون غرام وفحصت تحت المجهر لملاحظة لون وشكل تجمعات البكتريا.

2-2-3 تحضير المحلول الأساسي لمادة عسل المانوكا

تم اخذ كمية واحد مل من مادة العسل لكل تركيز وعمل أربع تراكيز 25%،50%،75%،100 باستخدام الماء المقطر المعقم وتم امرار الأربعة تراكيز على جهاز vortex mixer لضمان المزج بصورة جيدة ثم مررت التراكيز المختلفة من خلال المرشحات الدقيقة Millipore filter بقطر 0.22 µm لغرض تعقيمها من الميكروبات والشوائب وخزنت بأنابيب اختبار معقمة ومحكمة الغلق وخزنت في الثلاجة لحين الاستعمال

2-2-4 تأثير العسل على نمو بكتريا *S. pneumonia* المعزولة من اصابات التهاب الجيوب الانفية

تم دراسة تأثير عسل المانوكا التثبيطي باستخدام طريقة الانتشار خلال الحفر وحسب الخطوات التالية

1. تم تنشيط عزلات بكتريا *S. pneumonia* النقية وذلك قبل اجراء الكشف عن الفعالية التضادية عليها على وسط اغار الدم وحضنت لمدة 18-20 ساعة مع توفير غاز CO_2 وبدرجة حرارة $35c^0$.
2. تم تحضير اللقاح البكتيري بنقل عدد من المستعمرات البكتيرية المستخدمة في التجربة وتحت ظروف معقمة الى انبوبة اختبار تحتوي على-5 مل من الوسط الغذائي Brain Heart Infusion broth لإعطاء عكوره 0.5 McFarland Standard ما يعادل $1.5*10^8$
3. لقحت الاطباق الحاوية عل وسط Muller Hinton agar المحور المحضر في الفقرة (6-1-2-3) المضاف له 5% من الدم لدعم احتياجات النمو الخاصة بالبكتريا بوساطة نشر حجم مقداره 100µl من العالق البكتيري بواسطة L shaped spreader وتركت الاطباق بدرجة حرارة الغرفة لمدة 15 دقيقة وذلك لغرض امتصاص اللقاح.
4. تم عمل حفر (Wells) في الوسط الغذائي الملقح بالبكتريا بوساطة ثاقب فليني بقطر 8ملم معقم بواسطة الكحول واللهب مع تعليم الحفر بكتابة التركيز على وجه الطبق.
5. نقل 200-مايكرو ليتر من المحلول الاساسي بوساطة ماصة دقيقة من كل تركيز من التراكيز المختلفة (25, 50, 75,100)الى داخل الحفر.
6. عمل أطباق سيطرة (Control) وذلك بوضع 100 مايكرولتر من الماء المقطر المعقم في الحفرة بدلاً من المادة الأساس.
7. حضنت الاطباق بدرجة حرارة $37c^0$ لمدة-48 ساعة، ثم قرأت النتائج بقياس قطر منطقة التثبيط والتي تمثل منطقة عدم النمو البكتيري المحيطة بالحفرة(Tepsorn, 2009.)
8. مقارنة اقطار التثبيط لمادة العسل مع أقطار التثبيط للمضادات الحيوية المستخدمة.

5-2-2 تقدير قيمة التركيز المثبط الأدنى (MIC) والتركيز القاتل (MBC)

تم عمل سلسلة من التخافيف باستخدام وسط (BHI) حيث تم تحضير تركيز 10% من مادة عسل المانوكا من خلال إضافة 1مل من مادة عسل المانوكا المعقمة من خلال المرشحات الدقيقة الى 9 مل من وسط (BHI) كما تم عمل تركيز 20% من خلال إضافة 2 مل من مادة عسل المانوكا الى 8 مل من الوسط الغذائي أعلاه وهكذا مع بقية التراكيز (30%و40%) ثم مزجت جيدا بواسطة جهاز Vortex مع عمل انابيب سيطرة سالبة ثم لقحت كل انبوبة بمستعمرة بعمر 24 ساعة منماة على وسط اغار الدم ثم حضنت الانابيب بدرجة حرارة 35-37% لمدة 48 ساعة ثم سجلت النتائج ان ضهور العكورة دليل على وجود نمو بكتيري وان التركيز المستخدم غير مثبط للنمو البكتيري في حين عدم ظهور عكوره دلالة على تثبيط النمو البكتيري كما تم اخذ حجم حلقة لوب من كل تركيز وزراعتها على وسط اغار الدم لتحديد التركيز القاتل .

6-2-2 تأثير العسل على تكوين الاغشية الحيوية

تم استخدام طريقة MTP لدراسة تا ثير الاغشية الحيوية مع اجراء بعض التحويرات البسيطة حيث تم إضافة 150 µl من وسط المرق المغذي الملقح ببكتريا المكورات الرئوية وبعد التحضين لمدة 48 ساعة تم إضافة 50µl من مادة عسل المانوكا بتركيز 40% (المحضر من خلال تخفيف العسل بإضافة 4 مل من مادة العسل الى 6 مل من وسط BHI) حيث ضبط التركيز النهائي لمادة العسل الى 10% ثم مزجت جيدا بواسطة الماصة بعدها حضنت الصفيحة لمدة 24 ساعة بنفس الظروف وتم اكمال بقية الخطوات حسب التسلسل في الفقرة 3-2-10 وتم اخذ القراءات وتسجيل النتائج (Alkafaween.2021)

حيث استخدمت المعادلة التالية لتقدير القيمة التثبيطية

$$GROTH\ INHIBITION = \frac{OD\ OF\ BACTERIAL\ GROTH\ CONTROLE - OD\ OF\ THE\ TEST\ WELL * 100}{OD\ OF\ BACTERIAL\ GROTH\ CONTROLE}$$

3-النتائج والمناقشة Result and Discussion

3-1العزل Isolation

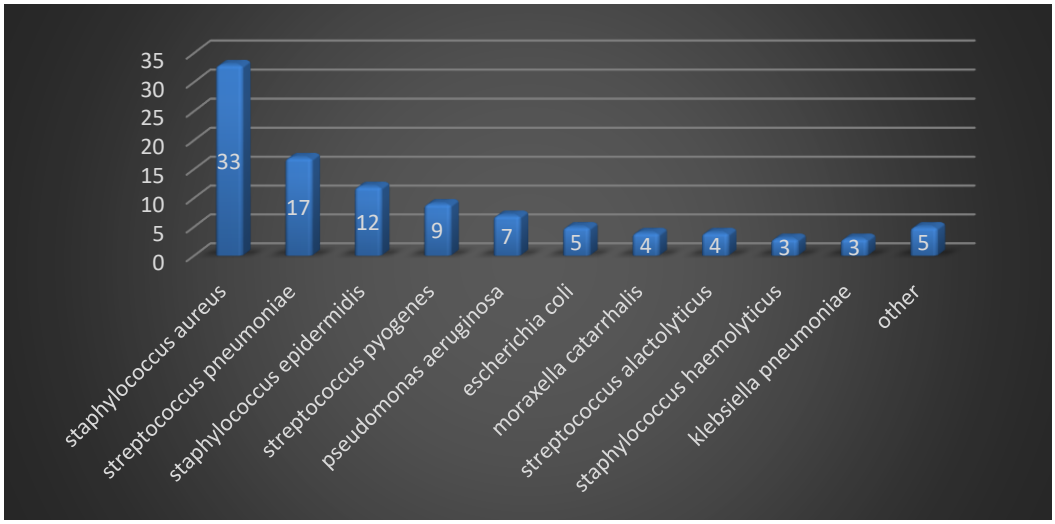
تم جمع 120 مسحة انفية nasal swab من الأشخاص المصابين بالاتهاب الجيوب الانفية ممن راجعو العيادات الاستشارية الخاصة بالأنف والاذن والحنجرة (**E.N.T**) لمستشفى ازادي التعليمي ومستشفى كركوك العام والعيادة التخصصية في طريق بغداد وبعض العيادات الخاصة بهدف عزل وتشخيص بكتريا المكورات الرئوية Pneumococci حيث زرعت المسحات على وسط S. Streptococcus. Agar بهدف العزل الاولي حيث يعمل هذا الوسط على كبح نمو بقية انواع المكورات مثل Staphylococcus بأنواعها والحمولة الطبيعية الموجودة في التجويف الانفي كما زرعت على الأوساط الغنية (Blood agar, chocolate agar) لدعم متطلبات النمو الخاصة بها.

اظهرت نتائج العزل ان 106 عزلة فقط اعطت نموا بكتيريا وبنسبة (88.3%)بينما اعطت 5 عزلات نموا فطريا بنسبة (4.2%)اما التسع عزلات المتبقية لم تظهر اي نموا على الاطلاق وبنسبة (7.5%) من المجموع الكلي للمسحات.

أظهرت نتائج التشخيص ان 32 عزلة فقط وبنسبة (30.2%) كانت تنتمي للبكتريا السبحية streptococcus والتي اظهرت نموا على وسط Selective streptococcus agar فيما شكلت 74 عزلة أنواع مختلفة من البكتريا (non- streptococci)التي لم تظهر نموا على وسط المكورات السبحية الانتقائي وبنسبة (69.2%) من المجموع الكلي للعينات التي اعطت نموا بكتيريا.

أظهرت نتائج العزل والتشخيص ان 17 عزلة فقط تنتمي لجنس المكورات الرئوية وبنسبة (16%) من المجموع الكلي للعزلات وبنسبة (53.13%) من المجموع الكلي للبكتريا السبحية.

كما في الشكل (1-4).



الشكل (1-2) يوضح التوزيع الكلي للعزلات من المرضى المصابين بالاتهاب الجيوب الانفية والنسبه المئوية لكل نوع

كانت نتائج العزل من عينات السيطرة (Control) للأشخاص الاصحاء ممن لم تظهر عليهم اعراض مرضية حيث تم جمع 50 عينة من مناطق مختلفة في محافظة كركوك من الأشخاص الاصحاء اذ تم عزل 12 عزلة لبكتريا و ***staphylococcus epidermidis*** و8 عزلات **coagulase negative** ***staphylococcus*** و5عزلات ***staphylococcus aureus*** و4 عزلات لبكتريا ***streptococcus***

pyogenesوعزلتين فطرية و3 عزل ***bacillus cereus*** وعزلة ***E. coli*** وعزلة ***proteus*** فيما لم تعطي 14 مسحة أي نمو.

تشخيص بكتريا المكورات الرئوية

1-2-3 الصفات الزرعية Cultivation characters

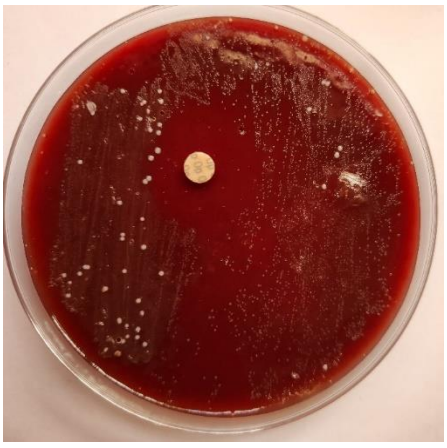
1-1-2-3النمو على وسط Streptococcus Selection agar

اظهرت العزلات النامية على وسط Selective streptococcus agar الصلب بعد تحضينها لمدة 48 ساعة بدرجة حرارة c^0 35-37 مع توفير غاز CO_2 لدعم النمو مستعمرات ذات لون كريمي صغيرة تشبه القطرات او الخرز تتراوح اقطارها بحدود 1 ملم وأحيانا تصطبغ بلون بنفسجي فاتح حيث تأخذ لون صبغة الكريستال البنفسجي كما في الشكل (1-4)

الشكل (1-3) يوضح نمو بكتريا pneumococci على وسط streptococcus selection agar بطريقة التخطيط واشكال وحجم ولون المستعمرات

2-1-2-3 النمو على وسط ال Blood agar

اظهرت العزلات النامية على وسط اكار الدم بعد تحضينها في candle jar لتوفير محيط من ثاني أوكسيد الكاربون بتركيز يتراوح بين (5%-10%) لمدة 48 ساعة وبدرجة حرارة c^0 35-37 مستعمرات صغيرة الحجم رمادية الى بنية اللون محللة للدم من نوع الفا (α hemolytic) كما في الشكل (3-4) وقد تباينت العزلات النامية بين المخاطية والصلبة (Cheesbrough.M,2009)



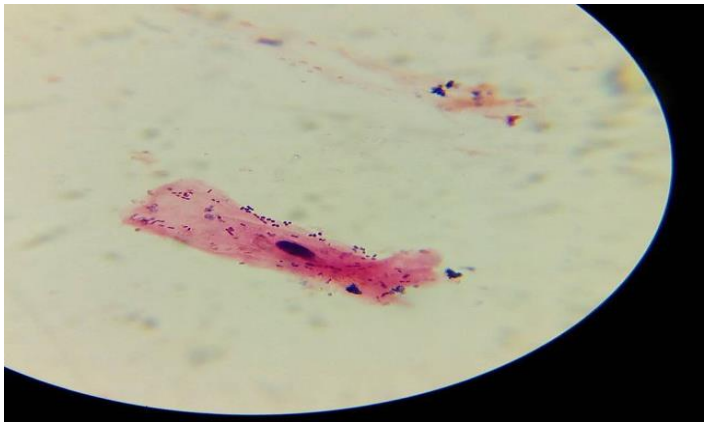
الشكل (1-4) يوضح اشكال المستعمرات لبكتريا المكورات الرئوية على وسط اغار الدم المعزولة من مرضى التهاب الجيوب الانفية (ملاحظة: العزل الاولي يظهر مستعمرات مختلطة لعدة أنواع بكتيرية)

2-2-3 الفحص المجهري Microscopic examination

تم اجراء الفحص المجهري الاولي حال وصول المسحات الى المختبر حيث تم عمل شرائح مباشرة من المسحات بعد الانتهاء من الزرع وصبغها بملون غرام وفحصها تحت المجهر حيث لوحظ تجمعات من البكتريا

موجبة لصبغة غرام بشكل ازواج منفردة مع تجمعات للخلايا الطلائية (epithelial cells) التي اصطبغت بصبغة السفرانين بلون وردي باهت كما في الشكل (1-6)

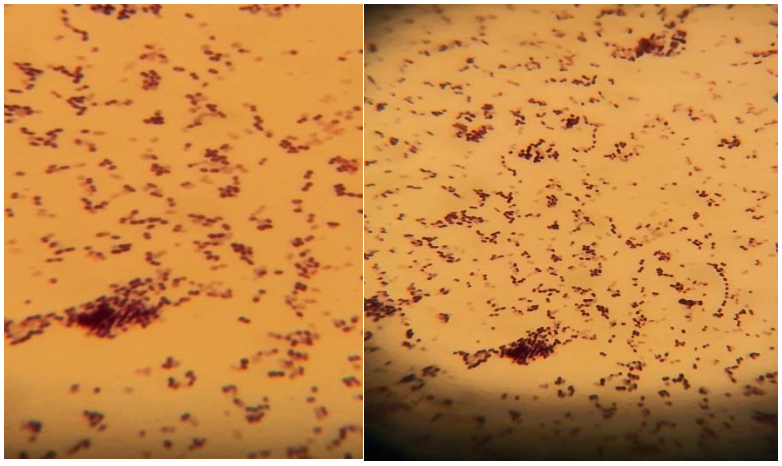
كما تم عمل شرائح وتصبيغها بصبغة الحبر الهندي للكشف عن وجود الكبسولة حيث ظهرت بشكل هالة ملونة تحيط بالخلية البكتيريا فيما كانت بعض المسحات خالية من الكبسولة.



الشكل (1-5) يوضح بكتريا pneumococciباللون البنفسجي مع الخلايا الطلائية للتجويف الانفي المصطبغة باللون الوردي لصبغة السفرانين تم تحضير الشريحة مباشرة من المسحة المأخوذة من خراج انفي لمريض ذكر بعمر 30 عام في مستشفى كركوك التعليمي. (تكبيرx1000)

اظهرت نتائج التصبيغ بصبغة غرام للشرائح الجافة المثبتة حراريا والمحضرة من المستعمرات النامية على وسط اغار الدم بكتريا موجبة لصبغة غرام بشكل ازواج (Diplococci) معطية مظهرا مشابه لإبرة الوخز (lancet shape) حيث يكون الطرف المستدير متلاصقا والطرف المدبب الى الخارج للزوج البكتيري (Jawetz, Melnick, & Adelberg, 2021) كما في الشكل (4-5)

في حين ظهرت الشرائح المحضرة من البكتريا النامية على وسط BHI broth والمصبغة بملون غرام بكتريا سبحية بشكل سلاسل طويلة مستمرة تتراوح فيما بين 10 الى 25 خلية بكتيرية او أكثر أحيانا



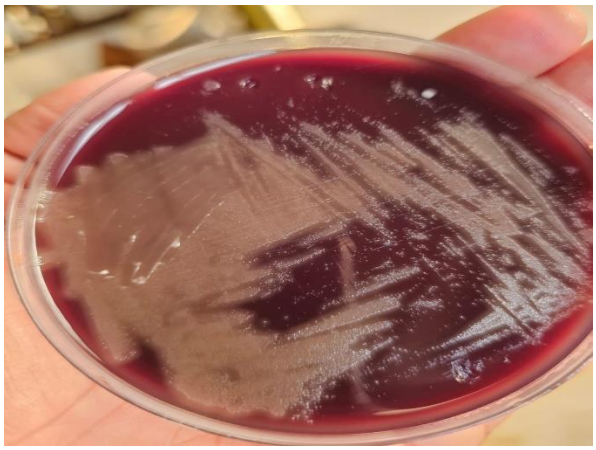
الشكل (1-6) لبكتريا المكورات السبحية الرئوية معزولة من امراه من مستشفى كركوك العام تعاني من خراج انفي تحت المجهر بعد تنميتها على وسط ال blood agar قوة التكبير (1000x)

3-2-3 نتائج الفحوصات الكيموحيوية Biochemical test

تبين من نتائج الفحوصات الكيموحيوية التي تم اجرائها على 17 عزلة بكتيرية ان جميع العزلات كانت سالبة لفحص الكاتليز catalase testوالاوكسيديز oxidase testو coagulase

1-3-2-3 فحص تحلل الدم blood hemolysis

كانت جميع العزلات السبعة عشر محللة للدم بشكل جزئي من نوع الفا (α hemolysis) بشكل هالة خضراء تحيط بالمستعمرات كما في الشكل (1-9)



الشكل (1-7) تحلل الدم الجزئي من نوع α

3-3 تأثير عسل المانوكا

1-3-3 دراسة التأثير التثبيطي لعسل المانوكا على بكتريا المكورات الرئوية

أجريت الدراسة بصدد معرفة تأثير عسل المانوكا(MGO 900) على بكتريا المكورات الرئوية المعزولة من المصابين بالتهاب الجيوب الانفية وقابليته التثبيطية لنمو البكتريا أعلاه بطريقة الانتشار عبر الحفر (well diffusion method) اذ تم قراءة وتسجيل النتائج بعد 48 ساعة من الحضن وذألك بقياس اقطار المنطقة المثبطة بالملمتر (mm).

تم دراسة تأثير عسل المانوكا على أربعة عزل التي اظهرت مقاومة عالية للمضادات الحيوية ولأكثر من مضاد حيوي في نفس الوقت (multi drug resistance pathogen) وهي العزل (3،7،8،15).

أظهرت النتائج ان التركيزين (100% ،75%) كانا الأكثر تأثيرا من بقية التراكيز حيث سجلت اقطار التثبيط للعزل (3،7،8،15) للتركيز (100%) من عسل المانوكا (31,27,29,34) ملم على التوالي فيما سجل التركيز 75% اقطار تثبيطيه للعزل أعلاه (22,19,20.23) ملم على التوالي

اما التركيز المتوسط 50% فقد كانت القيم التثبيطية لنفس العزلات (17,15,16,19) ملم على التوالي في حين كانت القيم التثبيطية للتركيز الواطئ 25% (13,12,12,14) ملم على التوالي كما في الشكل (4-15) كما تم تسجيل الفعالية التثبيطية للتراكيز الأقل من 25% اذ اعطى التركيز 20% اقطارا تثبيطيه (11,10,10,12) ملم على التوالي فيما لم يعطي التركيز 10% أي تثبيط اذ كانت البكتريا مقاومة حسب طريقة الحفر.

شكل (1-10) طريقة الانتشار خلال الحفر تظهر مناطق التثبيط حول الحفر لبكتريا المكورات الرئوية

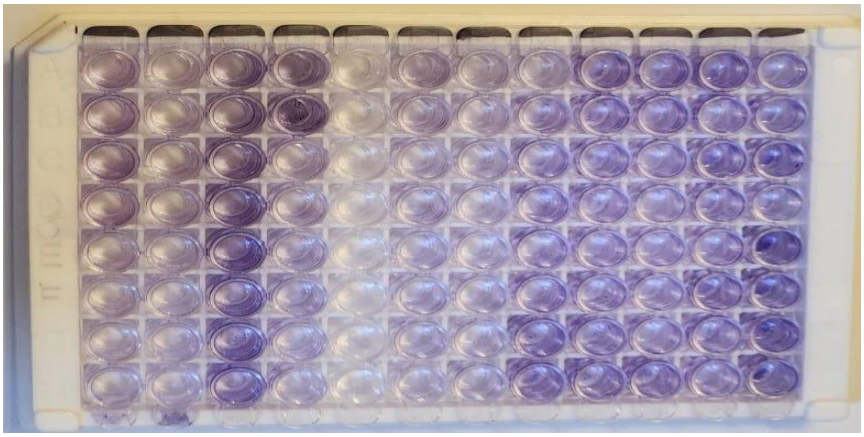
2-3-3 تأثير العسل على تكوين الاغشية الحيوية

بعد اخذ القراءات وتسجيل النتائج وجد ان تركيز 10% لمادة عسل المانوكا له تأثير كبير في خفض الكتلة الحيوية للأغشية الحيوية بمقدار 50% شكل (1-11) في حين أوقف التركيز 20% قدرة البكتريا على تكوين الاغشية الحيوية حيث جاءت النتائج كما في الجدول 1-1

نوع الاغشية الحيوية	العزلات	النسبة المئوية	الامتصاصية	الامتصاصية بعد المعاملة بالعسل تركيز 10%
Strong positive	3	%17.6	0.627-300	334-161
Moderate positive	5	%29.4	299-206	157-110
Week Positive	4	%23.6	199-122	108-81
Non or negative	5	%29.4	108-65	62-55

الجدول (1-1) القراءات للشريحة المعيارية بعد المعاملة بالعسل

اذ جاءت النتائج مقاربة لما قدمه (Al-kafaween *et al.*2021) الذي درس الفعالية التثبيطية للعسل ضد بكتريا المكورات الرئوية وتحديد قيم MICودراسة تأثير العسل على الغشاء الحيوي في ماليزيا



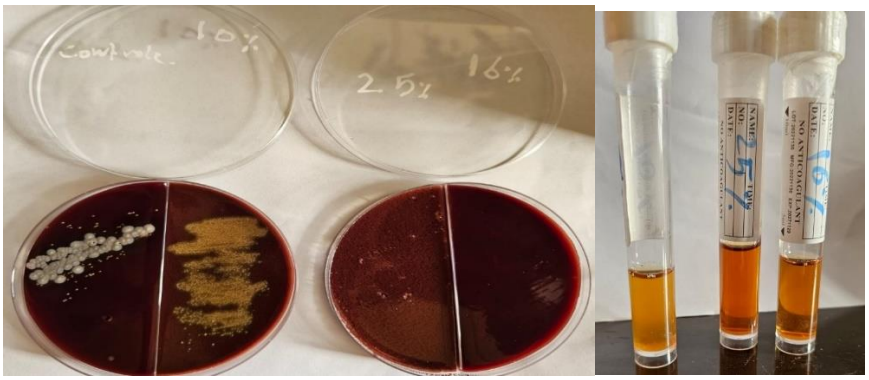
شكل (1-11) صفيحة MTP بعد معاملتها 10% من مادة عسل المانوكا.

3-3-3 تحديد قيم ال MIC وال MBC

اظهرت النتائج التي تم اجرائها على أربع عزل باستخدام طريقة الانابيب والتخافيف ان قيمة التركيز المثبط الأدنى كانت 15% حيث لم يظهر الاختبار الحاوي على وسط المرق المغذي أي نموا بدليل عدم وجود عكوره وتم مقارنة الانبوب مع أنبوب السيطرة في حين كانت قيم التركيز القاتل المأخوذ من الانابيب والمزروعة على طبق اغار الدم التي لم تعطي نموا هي 16% للعزلات الأربع

كما تم تحديد قيمة التركيز المثبط الأدنى التي جاءت مطابقة لطريقة الانابيب باستخدام طريقة الشريحة المعيارية micro dilution وتم قرائه الامتصاصية على طول موجي 590 nm ومقارنته مع قيم الامتصاصية للسيطرة كما في الشكل (1-12)

جاءت النتائج مطابقة مع ما قدمه (Cooper *et al*.2011) في ليفربول اذ تم دراسة تأثير عدة أنواع من العسل من ضمنها عسل المانوكا على عدة أنواع من البكتريا السبحية وكان الأكثر فعالية تثبيطيه بقيم MIC اقل من بقية الأنواع اذ تراوحت فيما بين 10-12% كذألك كانت التراكيز القاتلة(MBC) مطابقة لما قدمه (Qamar *et al*.2017) الذي درس الفعالية التثبيطية لعسل المانوكا على مجموعة من البكتريا المنتجة للبيتالاكتميز من ضمنها الزائفة الزنجارية (*pseudomonads aeruginosa*) اذ توصل ان التركيز 25% قاتل للبكتريا (bactericidal) في حين ان التركيز 20% كان قاتل لبكتريا *K. penumoniae*.



شكل (1-12) يوضح تركيز MICلمادة عسل المانوكا (لاحظ الانبوبة اليمنى تركيز 16% ذات لون رائق خالي من العكورة بينما الانبوبة اليسرى تمتلك عكوره واضحة)، الصورة اليسرى تأكيد النتائج من خلال الزرع على الاطباق

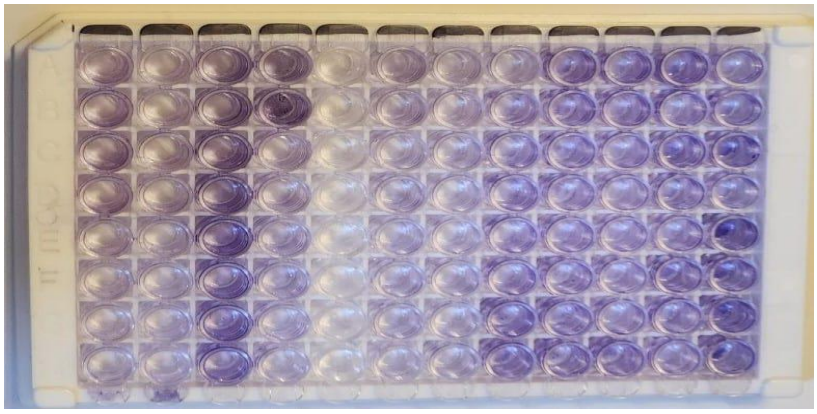
4-3-4 تأثير العسل على تكوين الاغشية الحيوية

بعد اخذ القراءات وتسجيل النتائج وجد ان تركيز 10% لمادة عسل المانوكا له تأثير كبير في خفض الكتلة الحيوية للأغشية الحيوية بمقدار 50% شكل (1-12) في حين أوقف التركيز 20% قدرة البكتريا على تكوين الاغشية الحيوية حيث جاءت النتائج كما في الجدول 4-4

نوع الاغشية الحيوية	العزلات	النسبة المئوية	الامتصاصية	الامتصاصية بعد المعاملة بالعسل تركيز 10%
Strong positive	3	%17.6	0.627-300	334-161
Moderate positive	5	%29.4	299-206	157-110
Week Positive	4	%23.6	199-122	108-81
Non or negative	5	%29.4	108-65	62-55

الجدول (1-1) القراءات للشريحة المعيارية بعد المعاملة بالعسل

اذ جاءت النتائج مقاربة لما قدمه (Al-kafaween *et al.*2021) الذي درس الفعالية التثبيطية للعسل ضد بكتريا المكورات الرئوية وتحديد قيم MICودراسة تأثير العسل على الغشاء الحيوي في ماليزيا



شكل (1-13) صفيحة MTP بعد معاملتها 10% من مادة عسل المانوكا.

Referance

- **Al-kafaween, M. A., Al-Jamal, H. A. N., & Mohd Hilmi, A. B. (2021).** Evaluation of antimicrobial and antibiofilm activities of stingless bee Trigona honey (Malaysia) against Streptococcus pneumoniae. The International Arabic Journal of Antimicrobial Agents, [11], [1;2].

- **Alvarez-Suarez, J.M.; Giampieri, F.; Battino(2013)**, M. Honey as a source of dietary antioxidants: Structures, bioavailability and evidence of protective effects against human chronic diseases. *Curr. Med. Chem.* **2013**, *20*, 621–638.
- **Alvarez-Suarez, J.M.; Tulipani, S.; Díaz, D.; Estevez, Y.; Romandini, S.; Giampieri, F.; Damiani, E.; Astolfi, P.; Bompadre, S.; Battino.(2010),** M.

Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. Food Chem. Toxicol. , 48, 2490–2499

- **Alvarez-Suarez, J.M.; Tulipani, S.; Romandini, S.; Bertoli, E.; Battino, M.(2010)**. Contribution of honey in nutrition and human health: A review. *Mediterr. J. Nutr. Metab.* **2010**, *3*, 15–23.

- **Anklam, E. A** (**1998**)review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chem.* **1998**, *63*, 549–562

- **Bogdanov, S.; Jurendic, T.; Sieber, R.; Gallmann(2008)**, P. Honey for nutrition and health: A review. Am. J. Coll. Nutr. , 27, 677–689.
- **Chan, C.W.; Deadman, B.J.; Manley-Harris, M.; Wilkins, A.L.; Alber, D.G.; Harry, E.(2013).** Analysis of the flavonoid component of bioactive New Zealand manuka (*Leptospermum scoparium*) honey and the isolation, characterisation and synthesis of an unusual pyrrole. *Food Chem.* 2013, *141*, 1772–1781**.**
- **Cheesbrough, M. (2009).** District laboratory practice in tropical countries, part 1. Cambridge University Press.
- **Cheesbrough, M. (2009).** District laboratory practice in tropical countries, part 2. Cambridge University Press
- **Cooper, R. A., Lindsay, E., & Molan, P. C. (2011).** Testing the susceptibility to manuka honey of streptococci isolated from wound swabs. (ApiProduct and ApiMedical Science), [3](117-122), Page Range. DOI: 10.3896
- **Jawetz, M. A, Melnick, J. L, & Adelberg, E. A. (2021).** Medical Microbiology (28th ed.). New York, NY: McGraw-Hill Education.
- **Kato, Y.; Umeda, N.; Maeda, A.; Matsumoto, D.; Kitamoto, N.; Kikuzaki, H.** (**2012**)Identification of a novel glycoside, leptosin,as a chemical marker of manuka.honey. J.Agric.FoodChem. **2012**, 60, 3418–3423
- **Mavric, E.; Wittmann, S.; Barth, G.; Henle, T.(2008).** Identification and quantification of methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of manuka (*Leptospermum scoparium*) honey from New Zealand. *Mol. Nutr. Food Res.* **2008**, *52*, 483–489
- **Netter, F. H. (2014).** Atlas of Human Anatomy (6th ed.). Elsevier Health Sciences
- **Patel, S.; Cichello, S. (2013**)Manuka honey: An emerging natural food with medicinal use. *Nat. Prod. Bioprospect.* , *3*, 121–128.
- **Qamar, Muhammad Usman & Saleem, Sidrah & Arshad, Usman & Rasheed, Farhan & Ejaz, Hasan & Shahzad, Naveed & Malik, Shah Jahan. (2017).** Antibacterial Efficacy of Manuka Honey against New Delhi Metallo-²خ-Lactamase Producing Gram Negative Bacteria Isolated from Blood Cultures. Pakistan Journal of Zoology. 49. 10.17582/journal.pjz/2017.49.6.1997.2003.
- **Snell, R. S. (2019).** Clinical Anatomy by Regions. LWW.

- **Tomas-Barberan, F.A.; Ferreres, F.; Garcia-Viguera, C.; Tomas-Lorente, F(1993**). Flavonoids in honey of different geographical origin. Z. Lebensm. Unters. Forsch. , 196, 38–44
- **White B, Robinson ES, and Barnes LA.(1938).**The Biology of Pneumococcus. New York: Commonwealth Fund
- **Yaoa, L.; Jiang, Y.; Singanusong, R.; Datta, N.; Raymont, K.** Phenolic acids in Australian Melaleuca, Guioa, Laphostemon, Banksia and Helianthus honeys and their potential for floral authentication. Food Res. Internat. 2005, 38, 651–658