

دراسة خصائص العسل و عزل ببتيدات مضادة للميكروبات
من النحل البري والكرينولي بالمنطقة الوسطى للمملكة العربية
السعودية

**STUDY OF THE HONEY PROPERTIES AND
ISOLATION OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES FROM
WILD AND CARINOLIAN HONEYBEES IN THE
CENTRAL REGION OF SAUDI ARABIA**

1431 هـ -

2010

الطالبة: أمل مهنا المهنا



قال تعالى : { وَأَوْحَىٰ رَبُّكَ إِلَى النَّحْلِ أَنِ اتَّخِذِي مِنَ
 الْجِبَالِ بُيُوتًا وَمِنَ الشَّجَرِ وَمِمَّا يَعْرِشُونَ (٦٨) ثُمَّ
 كُلِي مِنَ كُلِّ الثَّمَرَاتِ فَاسْلُكِي سُبُلَ رَبِّكِ ذُلُلًا يَخْرُجُ
 مِنْ بُطُونِهَا شَرَابٌ مُّخْتَلِفٌ أَلْوَانُهُ فِيهِ شِفَاءٌ لِلنَّاسِ
 إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً لِّقَوْمٍ يَتَفَكَّرُونَ (٦٩)
 [سورة النحل] .

الوضع التصنيفي لنحل العسل



Kingdom : **Animalia**

Phylum : **Arthropoda**

Class : **Insecta**

Order : **Hymenoptera**

Family : **Apiidae**

Genus : **Apis**

Species : ***Apis mellifera***

تقسيم مملكة النحل



الملكة	الذكر	الشغالة	
كبير	وسط	صغير	الحجم النسبي
٢-٨ سنوات	٢١-٣١ يوم فى الربيع ٩٠ يوم فى الصيف ويموت فو تلقيحه للملكة، وتقوم الشغالات بالتخلص منه فى الشتاء	٢٠-٤٠ يوم فى الصيف ١٤٠ يوم فى الشتاء	العمر
أنثى أعضائها التناسلية مكتملة النضج.	ذكر	أنثى عقيمة	الجنس
* التلقيح من الذكر * وضع البيض. * تقوم بإفراز المادة الملكة للحفاظ على النظام داخل الطائفة...	تلقيح الملكة العذراء.	*تغذية الحضنة. *انتقال الغذاء بين الحشرات الكاملة *نظافة وتنظيف العش *التهوية *تنظيم درجة الحرارة *الدفاع عن الطائفة *جمع الرحيق *جمع حبوب اللقاح *جمع البروبوليس	الوظيفة



تقسيم مملكة النحل

Introduction

المقدمة

- نحل العسل من أهم الحشرات الاقتصادية التي عرفها الإنسان من قديم الزمان . و منتجات خلية النحل الستة الاساسية هي: العسل، غبار الطلع (حبوب اللقاح)، العكبر (البروبوليس - الدنج) الغذاء الملكي، شمع النحل ، سم النحل.
- فتربية النحل استغلال لثروة وطنية ، لا تقل في الأهمية عن استخراج الثروات المعدنية . حيث تعتمد شريحة من المجتمع السعودي على تربية النحل ومنتجاته كمصدر أساسي أو إضافي للدخل حيث يقدر عدد مربين النحل في المملكة بحوالي ٥٠٠٠ نحال .
- وهناك العديد من الجهات المهمة ذات صلة بصناعة النحل في المملكة و لها جهود مبذولة لتطويرها ، ومنها وحدة أبحاث النحل بجامعة الملك سعود ووزارة الزراعة وجمعية النحالين التعاونية بالمملكة العربية السعودية .

انطلاقاً من هذه المعطيات :

□ ويعتبر النحل من أهم الحشرات اللافقارية التي تتميز بالجهاز المناعي الفعال ضد الإصابات البكتيرية وهذا الجهاز يحاكي إلى حد كبير الجهاز المناعي الغريزي في الفقاريات الممثل بالخلايا الليمفاوية و الجلوبيولينات المناعية . و هذا الجهاز يضمن لها البقاء و المنافسة والتكاثر والانتشار السريع , وهذا ما يطلق عليه مناعة الحشرات الطبيعية أو الفطرية

(Innate or Natural Insects Immunity)

□ يرتكز الجهاز المناعي للنحل في آليته على نوعان رئيسيان من ردود الأفعال المناعية الطبيعية والتي تستحث عند الإصابة بالميكروبات المختلفة هما المناعة المصلية Humoral Immunity والمناعة الخلوية Hemocytic Immunity فالمناعة المصلية. تتمثل في تكوين الببتيدات المضادة للميكروبات Antimicrobial Peptides ومن أهمها Lysozymes بالإضافة الى تكوين الجليكوبروتينات (Lectins)

انطلاقاً من هذه المعطيات :

- يتم تحفيز تلك المناعة الفطرية لدى الحشرة من خلال عوامل منتشرة ومكونة رئيسية للغلاف الخلوي للكائنات الدقيقة التي تغزو جسم الحشرة.
- تتعرف الحشرة على تلك المكونات بمستقبلات بروتينية منتشرة على اسطح خلايا الدم المناعية .
- تلك المستقبلات تحفز مراحل المناعة الوسيطة في الحشرات التي تنتهي بتكون الببتيدات المضادة للميكروبات.

الهدف من الدراسة Aim of work

□ إن زيادة مقاومة الكائنات الحية للمضادات الحيوية الشائعة والمستخدمة بطرق عشوائية وغير موجهة قد أصبح من أهم المشكلات التي لها دويماً مسموعاً في الآونة الأخيرة.

□ كانت فكرة تطوير منهج علمي جديد باستحداث أنواع من مضادات الميكروبات الطبيعية مثل الببتيدات المضادة للميكروبات و التي تم عزلها وتنقيتها من السائل البلازمي لدم الطور البالغ لنحل العسل موضع الدراسة الحالية.

□ اذ اثبتت الدراسات السابقة ان الببتيدات المضادة للميكروبات لديها مقدره للتأثير على الخلية الميكروبية دون احداث ضرر او تأثير على الخلية الحيوانية وذلك نتيجة لآلية عملها .

الهدف من الدراسة Aim of work

□ تنقية احد الببتيدات المضادة للميكروبات (Lysozyme) من الطور البالغ لشغالات النحل .

□ استخدام (Lysozyme) المنقى في تثبيط نمو نوعين من البكتيريا القياسية المسببة لعدوى القناة البولية *E. coli* و *Kl. Pneumoniae*

الهدف من الدراسة Aim of work


□ تقييم المكونات الكيموفيزيائية لعشرة انواع من العسل تم تجميعها من مناطق برية و زراعية بالمنطقة الوسطى للمملكة و تتميز هذه المناطق بغطاء نباتي متنوع ممثل بنباتات موسمية و حولية و محاصيل زراعية من حيث مطابقتها للمواصفات القياسية السعودية والعالمية.

□ تقييم تأثيراتها الميكروبيولوجية لتنشيط نمو ستة أنواع من الميكروبات القياسية ممثلة بخمس أنواع من البكتيريا ونوع واحد من الفطريات.



المواد والطرق

Materials and Methods



تجميع النحل و العسل
المستهدف
بالدراسة

عينات العسل و مصادرها

الغطاء النباتي	الموقع	المصدر	رقم عينة
- أنواع الأكاشيا (الميموزية Mimosaceae) - سدر - عجري (السدرية Rhamnaceae) - عرفج (Asteraceae) - Pegamum harmala (الرطريطة)	الصمان (سهل)	نباتات مختلفة	١
- أنواع الأكاشيا (الميموزية)	حائل (سهل)	نبات أحادي	٢
- سدر عجري (السدرية)	القصيم (سهل)	نبات أحادي	٣
- أنواع الأكاشيا (الميموزية) - سدر عجري (السدرية)	حريملاء	نباتات مختلفة	٤
- قيصوم جبلي (المركبة) - سدر عجري (السدرية) - Neurada procumbens (Neuradaceae)- - أنواع الأكاشيا (الميموزية) - Pegamum harmala (الرطريطة) - عرفج (Asteraceae)	روضة التنتهاة (سهل)	نباتات مختلفة	٥
- شوكة بري أنواع الأكاشيا (الميموزية)	روضة الخشم (سهل)	نباتات مختلفة	٦
- شفلح بري أنواع الأكاشيا (الميموزية)	جبال طويق ، سدير	نباتات مختلفة	٧
- برسيم (Clover honey) محصول زراعي	الخرج	نبات أحادي	٨
- سدر عجري (السدرية) مكون رئيسي - أنواع الأكاشيا (الميموزية)	روضة الخشم في تمير (سهل)	نباتات مختلفة	٩
- أنواع الأكاشيا (الميموزية) مكون رئيسي - سدر عجري (السدرية)	شعيب حريملاء	نباتات مختلفة	١٠







الدراسات الكيموحيوية

مراحل تحضير عينات هيموليمف النحل المحفز مناعياً و تنقية الببتيدات المضادة للميكروبات ..

تقسيم العينات في مجموعات بعد التخدير

التخدير بالتبريد



تجميع الهيموليمف

الحقن



تنقية الببتيدات المضادة بالجهاز RP-HPLC



الدراسات الميكروبية

اختبار فاعلية **عينات العسل** و **البيتيدات** ضد الميكروبات بطريقة الانتشار في أطباق الآجار

ترك الآجار حتى يتصلب

صب الآجار بعد التلقيح بالميكروب



تدوين البيانات

عمل الثقوب في بيئة الآجار

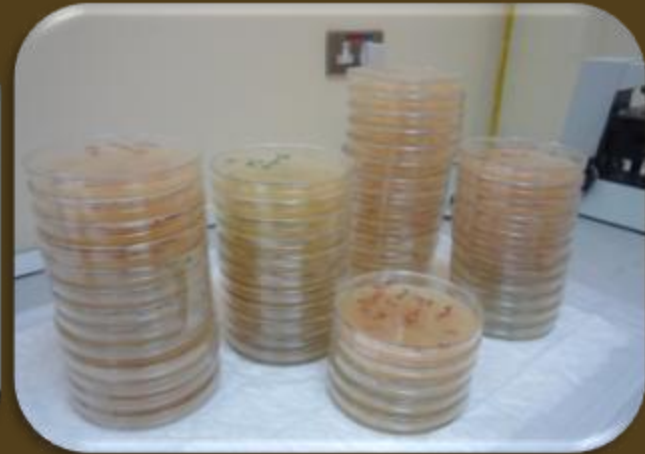


اضافة تراكيز (العسل او الببتيد)

التحضين عند درجة حرارة 37°C



الاطباق بعد التحضين و تسجيل النتائج



الدراسات الكيموفيزيائية

الدراسات الكيموفيزيائية لعينات العسل

■ تقدير الرطوبة

■ تقدير الرماد الكلي

■ تقدير السكريات

■ تقدير تركيز مادة هيدروكسي ميثايل فورفورال (HMF)

■ تقدير رقم إنزيم الدياستيز

التحليل الإحصائي

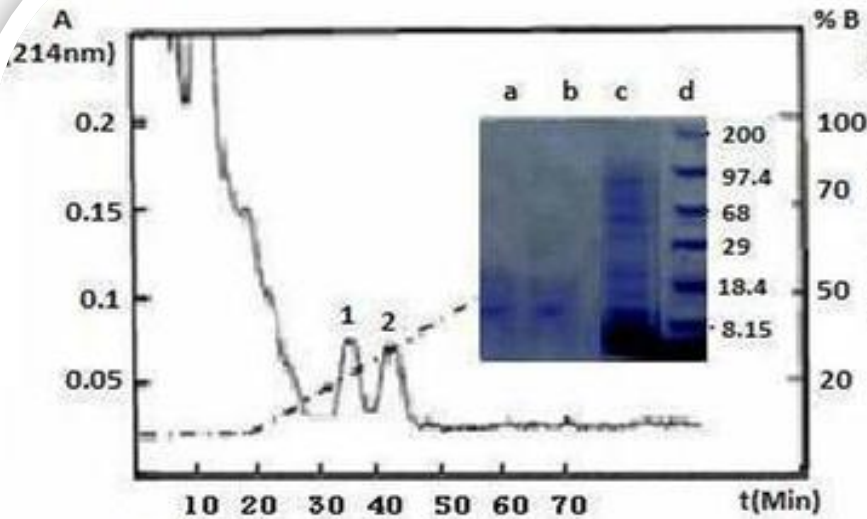
تم تسجيل النتائج التي تم الحصول عليها من هذه الدراسة في جداول وتم تحليلها إحصائياً باستخدام برنامج (SPSS) الإصدار رقم 12 وتم لمجموعتين منفصلتين واختبار تحليل التباين في اتجاه واحد (One-Way Analysis of Variance ANOVA) وذلك للمقارنة بين المجموعات حيث تعتبر النتائج ذو دلالة معنوية عالية كانت قيمة $P \leq 0.025$ أو $P \leq 0.05$ وذو دلالة غير معنوية إذا كانت القيمة $P \leq 0.025$ أو $P \leq 0.05$ وذلك عند المقارنة إحصائياً بين المجموعات.



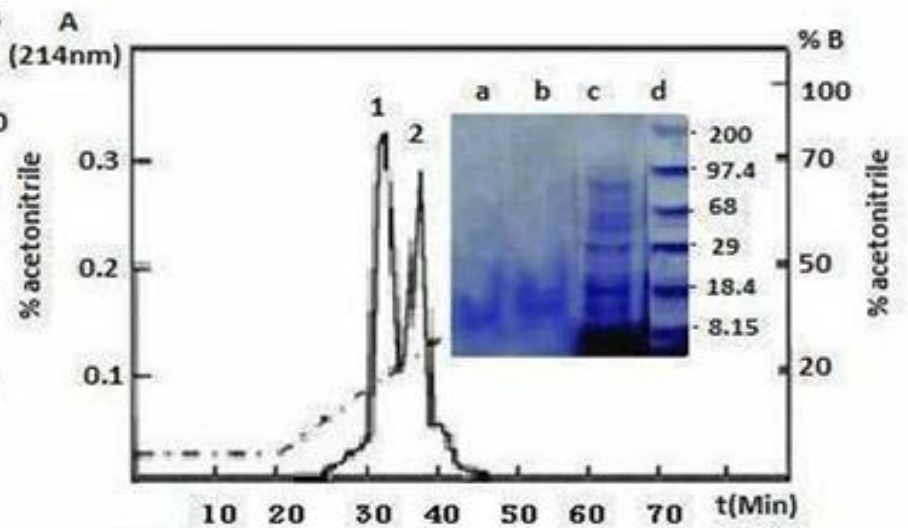
النتائج والمناقشة

Results and Discussion

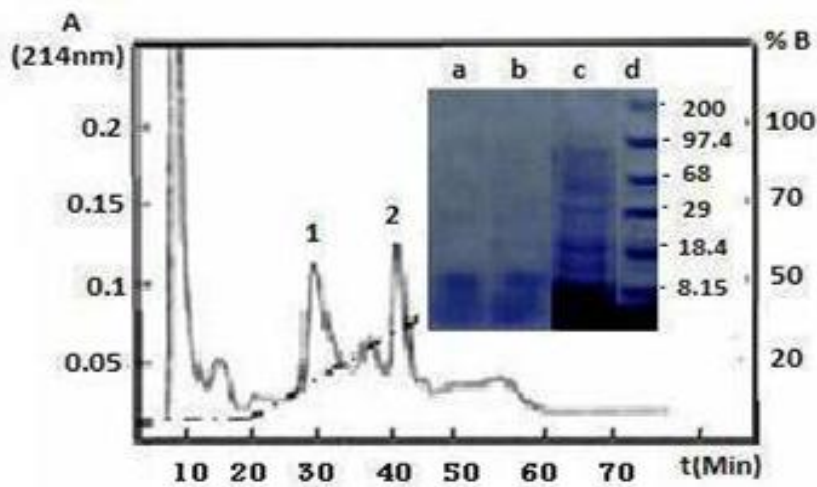
(A)



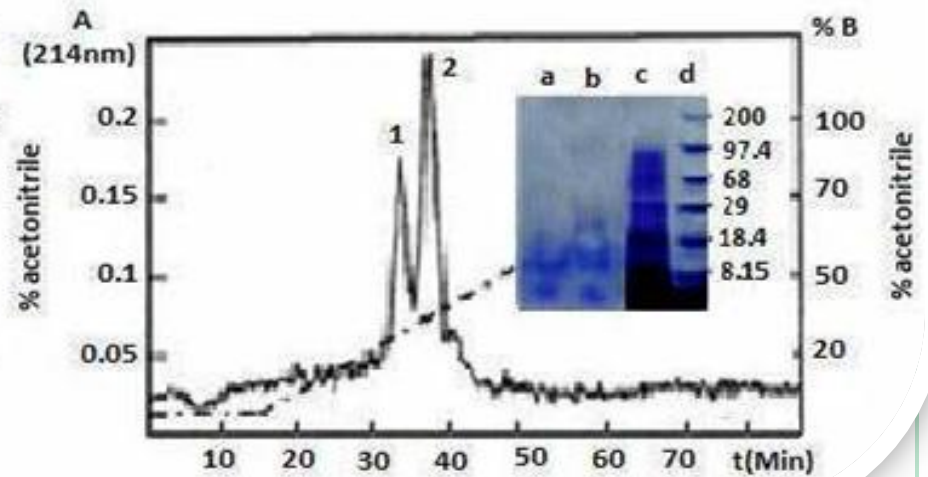
(B)



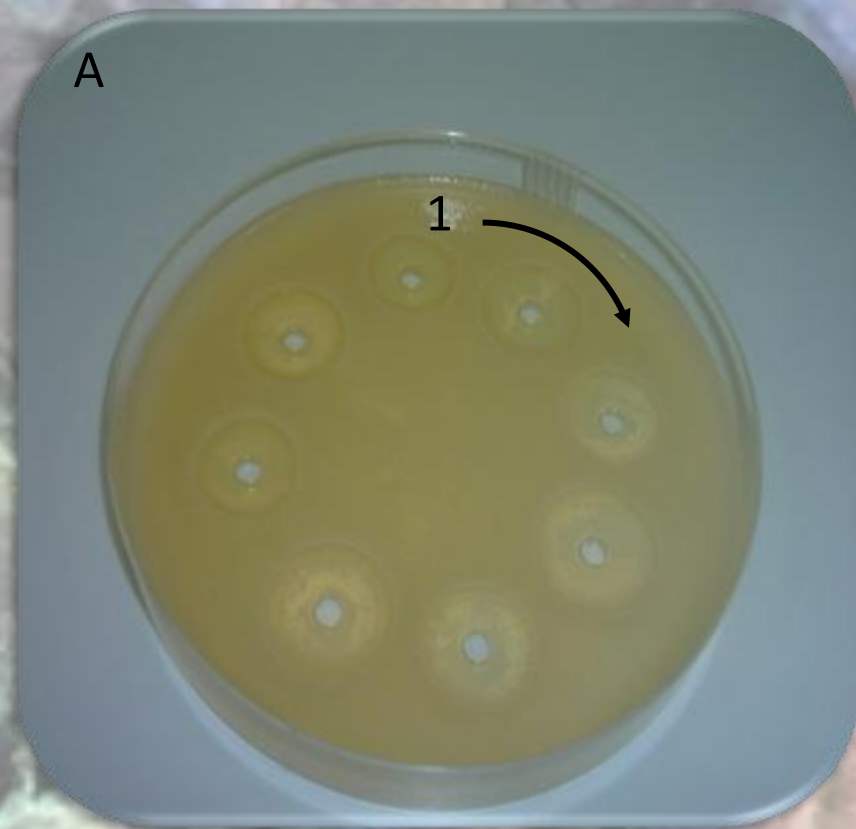
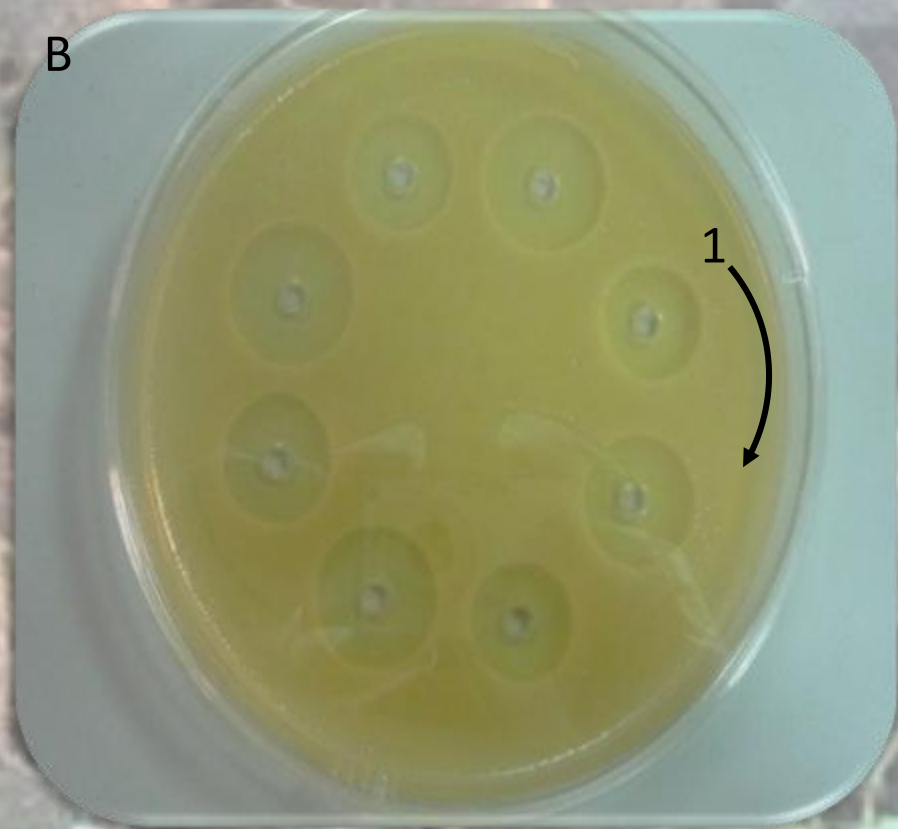
(C)



(D)



RP-HPLC purification and SDS-PAGE of antimicrobial polypeptides from wild and crinolian *Apis mellifera*.

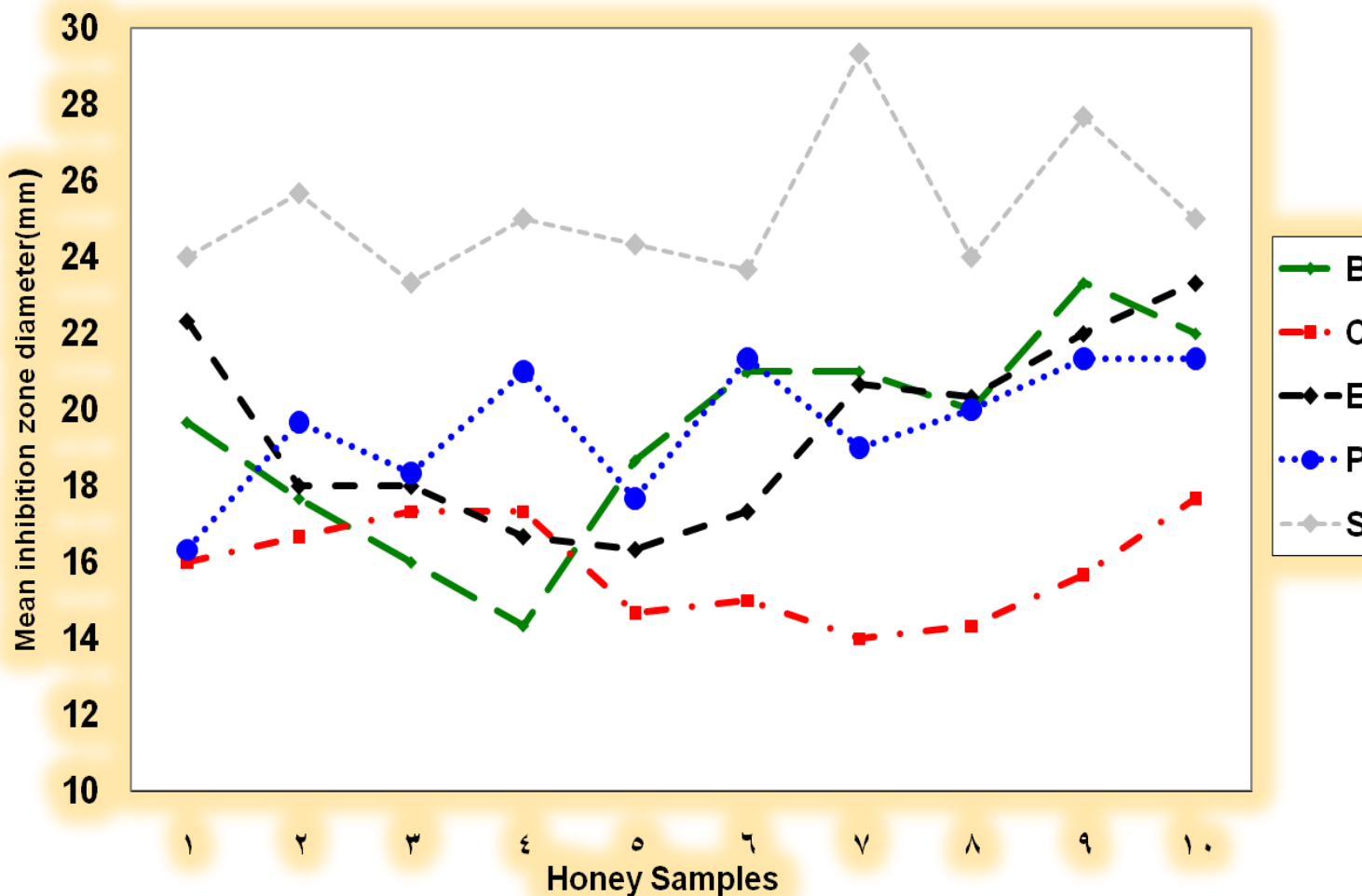


Inhibition zones of *Apis mellifera* purified lysozyme fractions against (A)*E.coli* and (B)*Kl.pneumoniae*,



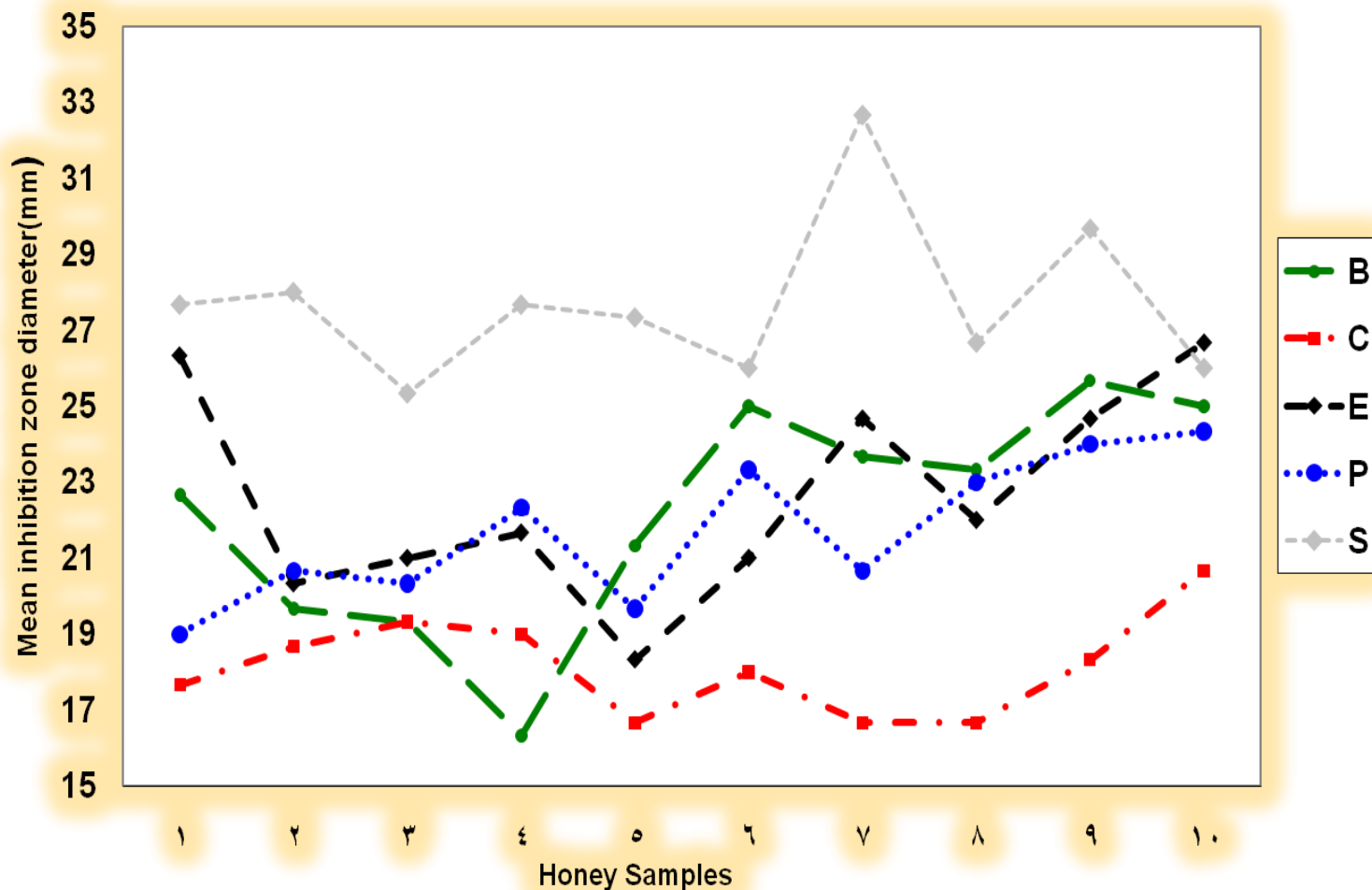
Inhibition zones of *Apis mellifera* purified fractions against *St. aureus*.

نتائج تثبيط نمو الميكروبات بتركيزات عينات العسل المدروسة



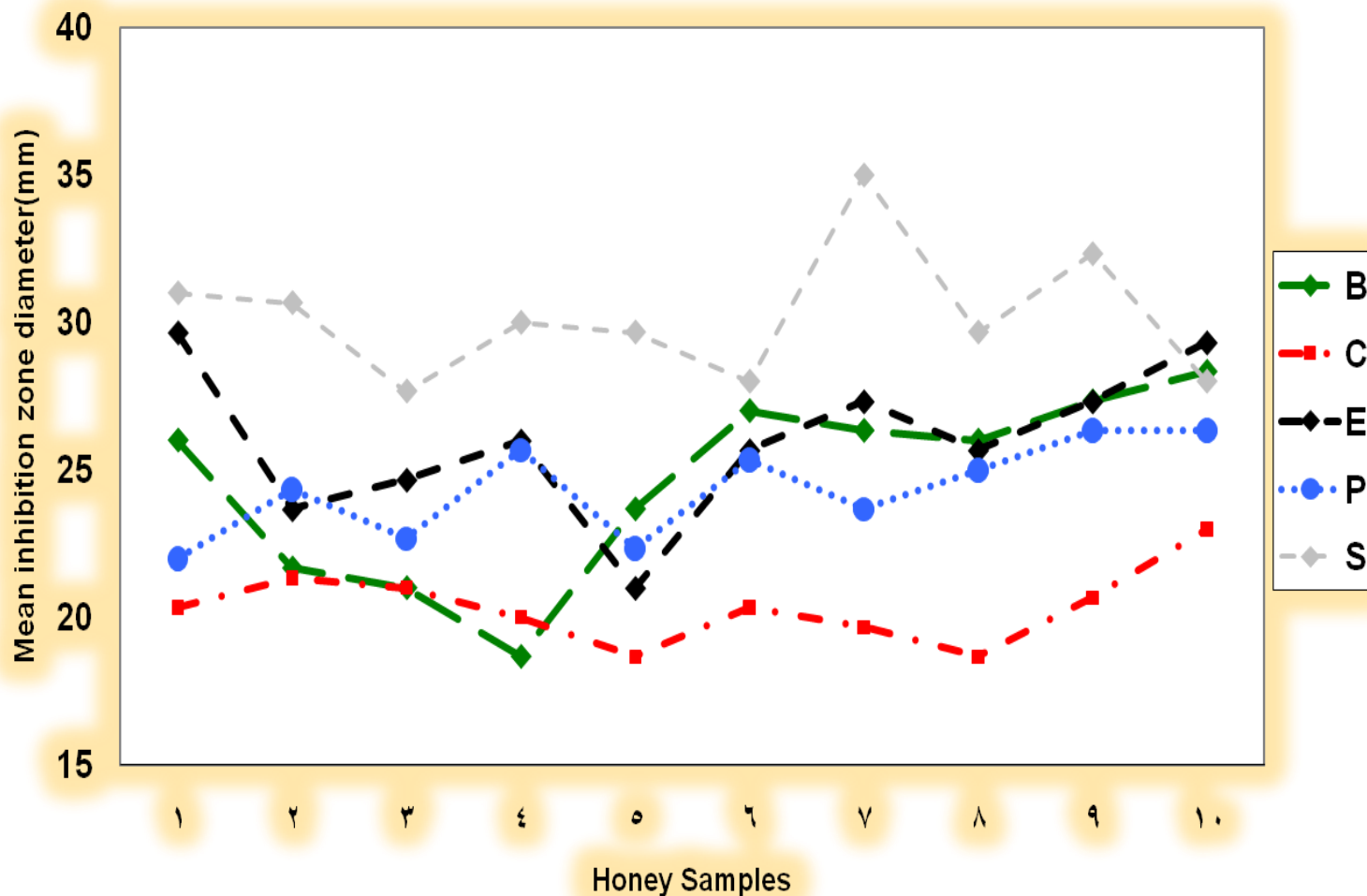
Mean of microbial inhibition growth by(mm) 30% concentrations of ten honey samples against five standard microorganisms (B :*B. subtilis*, C: *C. albicans*, E :*E. coli*, P :*P. aeruginosa* and S :*St. aureus*)

نتائج تثبيط نمو الميكروبات بتركيزات عينات العسل المدروسة



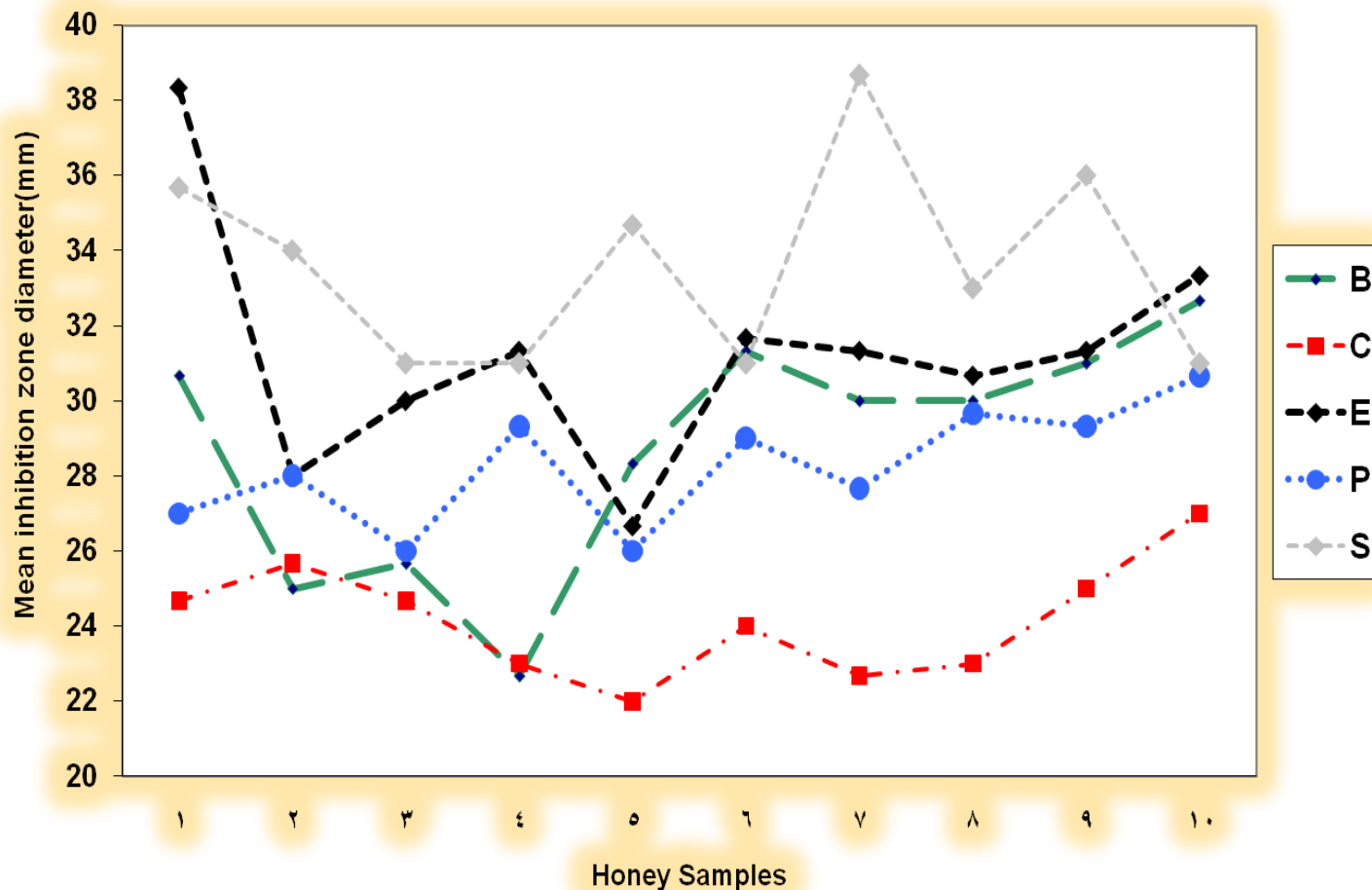
Mean of microbial inhibition growth by(mm) 50% concentrations of ten honey samples against five standard microorganisms (B : *B. subtilius*, C: *C. albicans*, E : *E.coli*, P : *P.aeruginosa* and S : *St. aureus*)

نتائج تثبيط نمو الميكروبات بتركيزات عينات العسل المدروسة



Mean of microbial inhibition growth by(mm) 70% concentrations of ten honey samples against five standard microorganisms (B :*B. subtilius*, C: *C. albicans*, E :*E.coli*, P :*P.aeruginosa* and S :*St. aureus*)

نتائج تثبيط نمو الميكروبات بتركيزات عينات العسل المدروسة



Mean of microbial inhibition growth by(mm) 100% concentrations of ten honey samples against five standard microorganisms (B :*B. subtilius*, C: *C. albicans*, E :*E.coli*, P :*P.aeruginosa* and S :*St. aureus*)

النتائج الكيموفيزيائية لعينات العسل

الانحراف المعياري	المتوسط Mean	المجال Range		التحليل Parameter
		الحد الأعلى Maximum	الحد الأدنى Minimum	
0.5057	12.99	13.26	12.57	الرطوبة (%)
ألا تزيد عن 21-23%				المواصفة القياسية الخليجية
	17.2	22.9	13.4	مواصفة الـ FAO
ألا تزيد عن 21%				مواصفة الـ Codex (CAC)
ألا تزيد عن 21%				مواصفة الـ EUC
ألا تزيد عن 20%				مواصفة الـ EOS

النسبة المئوية للرطوبة في عينات العسل (10 عينات).

النتائج الكيموفيزيائية لعينات العسل

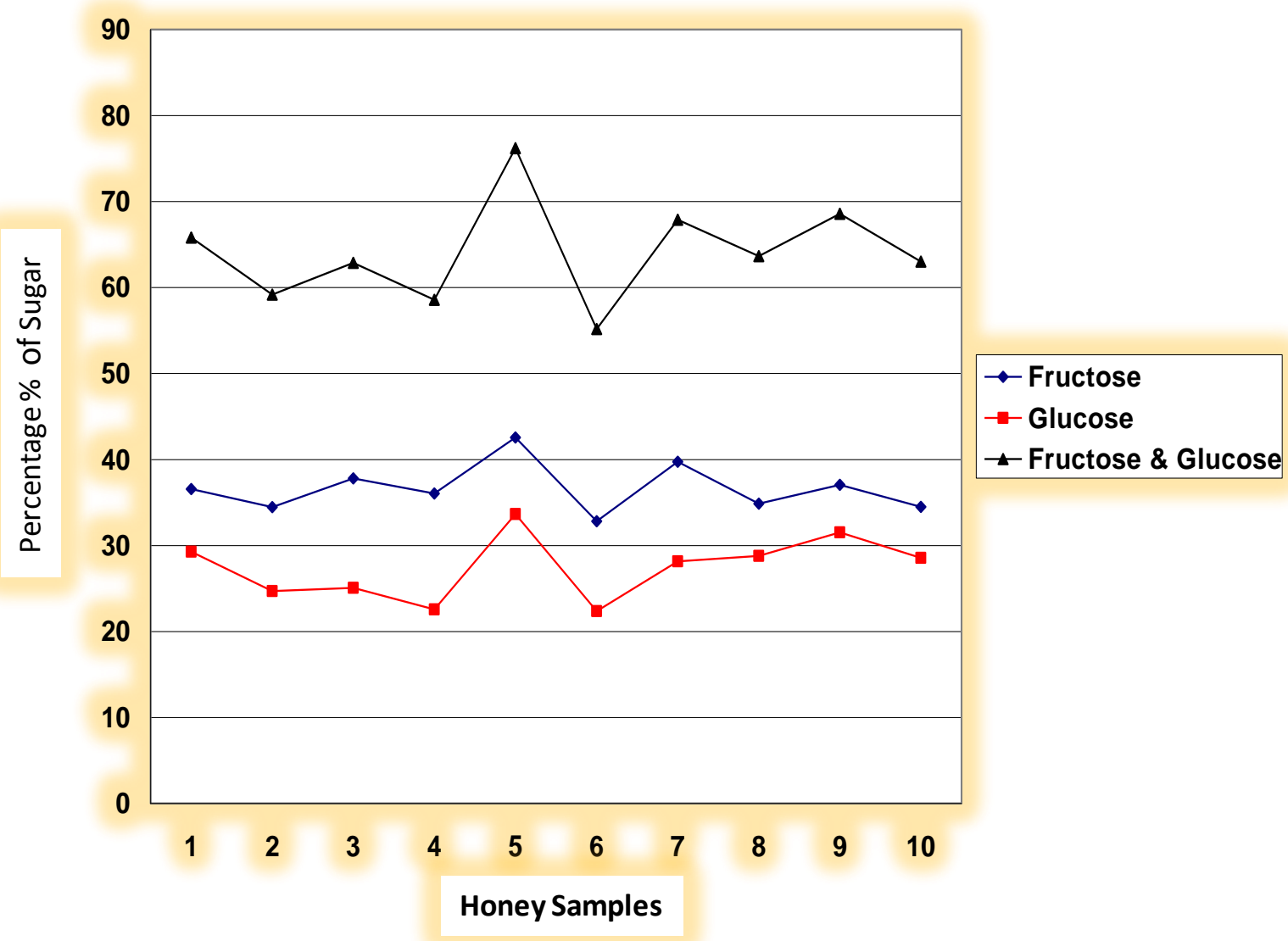
الانحراف المعياري SE	المتوسط Mean	المجال Range		التحليل Parameter
		الحد الأعلى Maximum	الحد الأدنى Minimum	
0.0425	0.597	0.91	0.11	الرماد (%) في عينات العسل
حد أقصى 1 %				المواصفة القياسية الخليجية
	0.169	1.128	0.100	مواصفة الـ FAO
لا تزيد عن 0.6 %				مواصفة الـ Codex (CAC)
لا تزيد عن 0.6 %				مواصفة الـ EUC
لا تزيد عن 0.4 %				مواصفة الـ EOS

قيم النسبة المئوية للرماد في عينات العسل (10 عينات).

النتائج الكيموفيزيائية لعينات العسل

الانحراف المعياري S E	المتوسط Mean	المجال Range		نوع التحاليل Parameters	
		الحد الأعلى Maximum	الحد الأدنى Minimum		
0.5854	64.08	86.98	54.79	عينات العسل المدروسة	الفركتوز + الجلوكوز
		الفركتوز+الجلوكوز لا تقل عن 65 %		المواصفة الخليجية	
-	-	-	-	مواصفة الـ FAO	
		لا يقل عن 65 % (Calculated as invert sugar)		مواصفة الـ Codex	
		لا تقل عن 65 %		مواصفة الـ EUC	
		لا تقل عن 70 %		مواصفة الـ EOS	
0.5057	36.63	42.98	32.69	العينات المدروسة	الفركتوز
		-		المواصفة الخليجية	
	38.19	44	27.25	مواصفة الـ FAO	
0.6651	27.45	33.85	22.10	العينات المدروسة	الجلوكوز
		-		المواصفة الخليجية	
	31.19	44.26	28.25	مواصفة الـ FAO	
0.035	2.12	2.18	2.06	العينات المدروسة	السكروز
		ألا تزيد عن 5-10 %		المواصفة الخليجية	
	1.31	7.57	0.25	مواصفة الـ FAO	
		ألا تزيد عن 5 %		مواصفة الـ Codex	
		ألا تزيد عن 10 %		مواصفة الـ EUC	
		ألا تزيد عن 5 %		مواصفة الـ EOS	

قيم متوسط الفركتوز و الجلوكوز و الفركتوز+الجلوكوز في عينات العسل (10 عينات).



النتائج الكيموفيزيائية لعينات العسل

الانحراف المعياري	المتوسط Mean	المجال Range		التحليل Parameter
		الحد الأعلى Maximum	الحد الأدنى Minimum	
0.438	21.7	26.70	14.97	(Gothe's scale) DN
لا تقل عن 8 وحدات				المواصفة القياسية الخليجية
	20.8	61.20	2.10	مواصفة الـ FAO
لا تقل عن 8 وحدات				مواصفة الـ (CAC)Codex
لا تقل عن 8 وحدات				مواصفة الـ EUC
لا تقل عن 8 وحدات				مواصفة الـ EOS

قيم إنزيم الدياستيز (Gothe's scale) DN في عينات العسل المحللة (10 عينات)

النتائج الكيموفيزيائية لعينات العسل

المعيار SD	المتوسط Mean	المجال Range		التحليل Parameter
		الحد الأعلى Maximum	الحد الأدنى Minimum	
0.079	2.2	6.10	1.7	(mg Kg ⁻¹) HMF
	ألا تزيد عن ٤٠			المواصفة القياسية الخليجية
	ألا تزيد عن ٤٠			مواصفة الـ FAO
	ألا تزيد عن ٨٠			مواصفة الـ (CAC) Codex
	ألا تزيد عن ٤٠			مواصفة الـ EUC
	ألا تزيد عن ٤٠			مواصفة الـ EOS

قيم الهيدروكسي ميثيل فورفورال HMF (mg Kg⁻¹) في عينات العسل (10 عينات)

Recommendations

التوصيات

□ بناء على ما تقدم من نتائج هذا البحث فإنه من الممكن استخدام عسل النحل و الببتيدات المفصولة (Lysozymes) من النحل المستحث مناعياً في علاج بعض الأمراض الميكروبية سريراً كبداًل طبيعية للمضادات الحيوية المعتادة التي عادة ما يكون لها أعراض جانبية ضارة من حيث مقاومة الكثير من الميكروبات لها.

□ يوصى بتطوير الأبحاث المستقبلية المتعلقة بتخليق تلك الببتيدات صناعياً حيث تعتبر أقل تكلفة وأكثر فاعلية ضد الميكروبات حفاظاً على تلك السلالة من النحل الفريد من الانقراض والتي لها دور في الحفاظ على التوازن البيئي الطبيعي.

Recommendations

التوصيات

□ أثبتت التجارب أن لعسل النحل ، AMPs المنتجة بواسطة نحل العسل *Apis mellifera* نشاطاً مضاداً للميكروبات حينما اختبرت خارجياً *in vitro* ضد الكائنات الحية الدقيقة القياسية . ومع ذلك ، يعتبر التقييم السريري والقياس الصيدلاني أمراً ضرورياً قبل استعمال عسل النحل كمقياس علاجي ووقائي للأمراض الشائعة ذات العلاقة بأنواع البكتيريا التي كانت تحت الاختبار .

□ بالرغم من جميع الحقائق الإيجابية والمرتبطة بالبيتيدات المضادة للميكروبات فإن هناك بعضاً من المشاكل ، أولاً : ندرة المعلومات المتوفرة عن سمية تلك البيتيدات خارجياً أو داخلياً . . ثانياً : لم يدرس تفصيلاً ثبات تركيب المكونات المصنعة داخلياً *in vivo* .. وأخيراً : تعتبر كلفة إنتاج تلك البيتيدات على نطاق واسع عقبة رئيسية لبعض الوقت .

Recommendations

التوصيات

- ما زال التعرف على ببتيدات جديدة وغير مألوفة مجالاً هاماً للبحوث وإعادة ترتيب الببتيدات المتوفرة حالياً للتخلص من سميتها وتطوير أساليب جديدة معدلة للحصول على إنتاج أكبر للببتيدات بكلفة أقل .
- استخدام التقنيات الحديثة من حيث اكتشاف التتابع النيوكليوتيدي للجينات المسؤولة عن إنتاج الببتيدات المضادة للميكروبات بعد استحداثها و محاولة استخدامها في تطوير صناعة تربية النحل المربي الذي ينتج عسل لديه مواصفات عالية الجودة من تلك الببتيدات.

شكر و عرفان



1431 هـ -

2010



الداعمون:

