MENOUFIA JOURNAL OF
AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY

https://mjab.journals.ekb.eg

Title of Thesis	**:**	Studies on promoting action of antibiotics using bio natural supplements against resistant pathogens.
Name of Applicant	**:**	Ahmed Abo Elkhear Mousa Mohamed
Scientific Degree	**:**	M. Sc.
Department	**:**	Agric. Botany
Field of study	**:**	Agric. Botany
Date of Conferment	**:**	Apr. 17, 2024

Supervision Committee:

- Dr. A. E. El-Beltagy : Prof. of Agriculture Microbiology, Fac. of Agric., Menoufia Univ.
- Dr. S. M. Abd El-Gawad: Prof. of Agriculture Biochemistry, Fac. of Agric., Menoufia Univ.
- Dr. S. F. F. Sheded : Prof. of Agriculture Microbiology, Fac. of Agric., Menoufia Univ.

Summary

Pathogenic resistance to antibiotics, used for treating diseases, became an increased phenomenon with increasing pathogens. This study was conducted on real samples taken from cases admitted to Urology department at El-Mansoura hospital and did not normally respond to treatments by regular used antibiotics. The primarily samples investigation concluded (642) urine samples collected from patients suffered from urinary tract infections (UTI), 458 samples showed pathogenic bacterial growth on nutrient agar, while 184 samples showed no growth and considered free from UTI pathogens. The Gram reaction for picked colonies belonging to these levels revealed that 170 isolated were G^{-ve}, resistant to 2 types of out of 12 used antibiotics. 19 cases were G^{+ve}, resistant to 3 types. severe infection with number of pus less than 500 cells per field were represented by 98 cases. The pathogenic bacteria isolated from these cases were 91 G^{-ve} and 7 were G^{-ve}, resp.

The biochemical characterization of the 485 UTI samples showed 373 cases were infected with *Escherichia coli*, 47 cases with *Klebsiella pneumonia*, 10 cases with *Staphylococcus saprophyticus*, 3 cases with *Enterobacter faecalis*, and 25 cases with other causes. However, *E.coli* bacteria is one of the most members of the enteric family that causes about 90% of UTI. Three *E.coli* strains were selected from the three infection levels named as: *E.coli* EMG03 (minor infection level), *E.coli* EMG04 (moderate) and *E.coli* EMG05, which represents the (severe level of infection). Two reference multi drug resistant strains were used: *E.coli* EMG01 is resistant to Ampicillin, Neomycin, and strain *E.coli* EMG02 is resistant to Ampicillin and Chloramphenicol.

In this study, the theme oil was used as natural additives to antibiotics. The minor (GC-Mass) component enclouded the phenolic compounds extracted from the thyme essential oil; 26 compounds were detected. Thymol, P-Cymene, and the other Terpinene represented the largest percentage of component by 32.3, 21.8 and 13.9%, resp. While Carvacrol, Cineol and Linalool represented the second important percentage of component by 5.1, 4.4 and 3.4%, respectively. The other important component like Camphor, β-Caryophyllene and other Terpen did not represent an detectible percentage. While the emulsification process was synthesized using highly purified thyme crude oil or thymol crystal substance.

The nano-emulsion forms were characterized, the main thyme nanoform was lie in sized 53,99 nm, the thymol nanoform was lie in 51,09 nm with total zeta average of 67.64 and 66.05 nm, resp.

The resistance to specific 12 antibiotics was measured using antibiotics resistance scale according to CLSI, (2017), which assigned three levels of resistance (resistant, intermediate, and susceptible). The used antibiotics were Ampicillin and Amoxicillin at a concentration of 10 µg that showed inhibition zones of 6.41 and 6.73 mm, respectively., and showed 100% resistance.

Cefoxitin at concentration of 30 µg showed inhibition zones of 15.96 mm and 98% resistance. Ten µg concentration of Imipenem showed inhibition zones of 15.92 mm and the strain was 98% resistant. Vancomycin at a concentration of 30 µg, showed average inhibition zones of 11.05 mm and the strain was 95% resistant, Erythromycin, Gentamycin, Streptomycin, and Neomycin with a concentration of 10 µg showed inhibition zones of 15.03, 13.31 14.64 and 16.81 mm, resp., and showed 85.4, 86.3, 78.7 mm and 82.6% resistance, resp. the Chloramphenicol of 30 µg revealed inhibition zone of 16.36 mm and the strains were 78.5% resistant. Ciprofloxacin 5 µg showed inhibition zone of 19.85 mm and strains were 56.5% resistant. Tetracycline at a concentration of 30 µg showed area of inhibition of 20.54 mm and the strains were 75.9% resistant. Also, the antibiotic susceptibility tests were conducted against the selected three *E.coli* strains under study compared with the reference strains. the three *E.coli* isolates were resistant to Ampicillin and amoxicillin as same as reference strains EMG01 and EMG02.

The isolates EMG04 and EMG05 were resistant to Cefoxitin, but EMG03 showed inhibition zone diameter (around 14.23 mm) similar to reference strains. All isolates as well as reference strains showed similar inhibition zone diameter (around 15.00 mm) to Imipenem. The isolate EMG05 was resistant to Vancomycin, but EMG03 and EMG04 was similar to EMG01 and EMG02 in their sensitivity to Vancomycin as showed inhibition zone ranged between 9.17-10.07 mm. The isolates EMG05 was resistant to Gentamycin, but EMG03 and EMG04 showed average inhibition zone of 12,5 mm similar to those of EMG01 and EMG02. All isolates as well as reference strains showed similar inhibition zone diameter (around 14 and 14.7 mm) Erythromycin and Streptomycin, respectively.

On other side, the effect of (1.5, 2 and 2.5%) concentrations of thyme and thymol either as emulsion or nano-emulsion on the growth of isolated UTI *E.coli* were estimated and showed slight inhibition zones around isolated and references strains. The differences in diameters of inhibition zones between 1.5, 2 and 2.5% concentrations were insignificant compared with reference strains.

While the increasing on the nano-emulsion of thyme oil concentrations caused significant increased inhibition zones when used against the three *E.coli* isolates, also they were significantly different from those of references strains. It was noticeable the significant differences among the used concentrations of nanocrystals against either isolated or reference *E.coli* strains. Moreover, uses of 2.5% concentrations of nan-form of crystal oil was the most effective among other concentrations as showed a significant inhibition zone against all isolated and reference strains.

Besides, the effect of 10 µg of Ampicillin, Amoxicillin, Erythromycin, 30 µg of Neomycin, Chloramphenicol and 5 µg of Ciprofloxacin were achieved when mixed with emulsion and nano-emulsion forms of both thyme oil and thymol crystal at three different concentrations 1.5%, 2.0%, and 2.5% on isolated *E.coli* UTI and reference strains. The use of emulsions forms did not show any significant differences in inhibition zone diameters between isolated and reference strains, while the use of nano-emulsion forms caused significant differences in inhibition zone diameters, the nano-emulsion of thyme crystals was the most effective.

For Ampicillin, the inhibition zones diameters were 6.45, 6.32, 6.25 for EMG03; 6.07, 6.32 and 6.25 for EMG04 and 6.04, 6.25, and 6.15 for EMG05, resp., compared with 6.27, 6.64 and 6.92 mm for EMG01 and 6.05, 6.17 and 6.25 for EMG02. The effect of nanocrystal form on isolated or reference strains was the effective, which were 8.35, 11.20 and 16.43 for EMG03; 8.23, 10.88 and 16.25 mm for EMG04 and 8.11, 10.52 and 16.08, compared with those of reference strains 7.82, 10.64 and 16.70 for EMG01 7.98, 10.72 and 16.54 mm for EMG02, resp.

The effect of Amoxicillin was 6.22, 6.55 and 7.63 mm for EMG03; 6.19, 6.41 and 7.23 mm for EMG04 and 6.15, 6.24 and 7.05 for EMG05, compared with those of references strains that recorded 6.89, 6.98 and 7.85 mm for EMG01 and 6.92, 6.95 and 7.91 for EMG02, respectively. The use of thymol nano-emulsion inhibited the growth of tested bacteria. The inhibition zones were 8.81, 12.82 and 19.87

for EMG03; 8.25, 12.33 and 19.22 for EMG04 and 8.10, 12.13 and 19.14 for EMG05, compared with reference strain that showed 8.92, 12.67 and 19.90 for EMG01 and 8.89, 12.72 and 19.76 for EMG02, resp.

For the Erythromycin, the inhibition zones were 15.45, 15.66 and 17.46 for EMG03; 15.04, 15.32 and 17.18 for EMG04 and 14.79, 15.03 and 16.78 mm for EMG05, compared with 15.68, 15.75 and17.63 for EMG01 and 15.26, 15.53 and 17.27 mm for EMG02, resp. In case of crystal nano-emulsion were 20.88, 24.87 and 29.86 for EMG03; 20.76, 24.66 and 29.32 for EMG04 and 20.35, 24.57 and 29.13 for EMG05, compared with 20.53 mm, 24.68 and 29.89 mm for EMG01 and 20.19, 24.26 mm and 29.73 mm for EMG02, resp.

Also, the effect of Neomycin showed inhibition zones of 16.93,17.31 and 18.02 for EMG03; 16.65,17.19 and 17.91 for EMG04 and 16.22, 17.98 and 17.86 for EMG05, Resp., compared with 11.83, 11.96 and 12.06 for EMG01 and 16.89, 1723 and 17.93 for EMG02, resp. Although the reference strain EMG01 was already resistant to Neomycin, it became slightly more sensitive with significant difference after the addition of emulsions or nano-emulsions, as significant differences in inhibition zone diameters were found between the rest of tested *E.coli* and reference strain EMG02. The inhibition zones diameters recorded for nano-emulsion of thymol crystals were 22.96, 27.04 and 30.25 for EMG03; 22.72, 26.81 and 29.94 for EMG04 and 22.53, 26.65 and 29.86 for EMG05 compared with 15.09, 17.01 and 19.53 for EMG01 and 22.83, 26.95 and 30.16 for EMG02, resp.

However, the effect of Chloramphenicol showed inhibition zones of 16.58, 17.13 and 17.80 for EMG03; 16.46, 16.98 and 17.72 for EMG04 and 16.01, 16.73 and 17.64 for EMG05, compared with 16.60, 16.71 and 16.44 for EMG01 and 11.65, 11.79 and 11.86 for EMG02, resp.

Although the reference strain EMG02 was already resistant to Chloramphenicol, it turned slightly sensitive to used treatments under used various concentrations, The differences in inhibition zone diameters were significant between all isolated strains treated with nanocrystal. The inhibition zones were 22.49, 26.78 and 30.02 for EMG03, 22.57, 26.58 and 29.79 for EMG04 and22.35 mm, 26.46 mm, and 29.65 mm for EMG05, compared with 22.31, 26.45 and 29.66 for EMG01 and 14.67 mm, 16.91 mm and 19.35 for EMG02, under used treatments, resp. Also, the effect of Ciprofloxacin under the nanocrystal treatments, the inhibition zone diameters were 21.09, 23.14 and 25.62 for EMG03, 21.73, 23.02 and 25.47 for EMG04 and 21.56 mm, 22.86 mm, and 25.35 mm, compared with 21.24, 23.21 and 25.79 for EMG01 and 20.93 mm, 23.06 mm, and 25.53 mm for EMG02, resp. Forth more, the increased inhibition zones after adding the nano-forms of oil or crystals are consistent with some evidence that components of essential oils interact synergistically with antibiotics by interfering with antibiotic resistance mechanisms.

On other side, the G^{-ve} pathogenic *K. pneumonia* which isolated from UTI patient was resistant to Ampicillin and Erythromycin 10 µg, however the addition of 2.5% concentration of thyme or thymol emulsion significantly affected differences between all oil forms (emulsion and nano-emulsion) in inhibition zone diameters. The antibiotics of Neomycin and Chloramphenicol 30 µg showed similar effects when used with emulsion of thyme oil or thymol crystals.

Also, nano-emulsions forms were similar in their effect, and it was noticeable the significant of nanoforms.

Also, G^{+ve} *S. saprophyticus* isolated from UTI patients showed resistance to Ampicillin (10 µg) and Ciprofloxacin (5 µg). However it became sensitive to these antibiotics after addition of emulsion or nano-emulsion of thyme oil or thymol crystals. But the inhibition zones were increased when nano-emulsion forms of were used, The same effect with the two antibiotics, Neomycin and Chloramphenicol 30 µg, while the use of Erythromycin with nano-emulsion always showed significant differences in inhibition zone diameters.

Moreover, the determination of the inhibition's zones was dramatically increased by increasing the natural additives concentrations, and it is normal to record the highest concentrations levels of minimal inhibitory concentrations and minimal inhibitory bacterial concentrations (MICs and MBC) which reached to 220 and 440 mg/ml, resp. with bactericidal efficiency (MBC/MIC) by 200% from the bacteriostatic effects.

It's clear to noted that, the nano-emulsion forms can sharply decrease the used amounts of thyme oil or thymol crystal to reach the MIC and MBC by 50%. The using of 180 to 220 mg/ml of nanoforms sufficient to reach MBCs for the G^{-ve} bacteria from the G^{+ve} UTI *E.coli* and *K. penumenae* genera, while 145 to 180 mg/ml of nanoforms sufficient to reach MBCs for the G^{+ve} UTI *S. saprophyticus*.

The Transmission electron microscopy was used to study the effect of oil on the shape and walls of UTI pathogenic *E. coli* and treated thymol nano-emulsion 2.5%. The images of the cells confirmed the change in the external shape of the *E. coli* cells, also showed the presence of damage to the cell walls resulting from the addition of the natural form of nano thymol, which allows the entry of the antibiotic into resistant bacteria and enhances its effect when used together as a step to break the ability of microbes to resist antibiotics.

Conclusion: The study concluded that adding a nanoemulsion of thyme oil at a concentration of 2.5% to antibiotic treatment for bacteria causing urinary tract infections increases the effectiveness and effect of antibiotics, strengthens their action, and reduces bacterial resistance to antibiotics, and thus reduces the doses used and the duration of treatment and economic cost.

Recommendations:

1- Using the active compounds (thymol and thyme oil) in nanometers form at a concentration of 2.5% to support antibiotics.

2- Including thyme flowers an leaves in therapeutic nutrition programs due to its important components of thymol, cavacrol, phenols, and carbohydrates, and its ability to resist pathogenic microorganisms .

عنوان الرسالة: دراسات على تدعيم عمل المضادات الحيوية باستخدام الاضافات الطبيعية الحيوية ضد مسببات الأمراض المقاومة

اسم الباحث : أحمد ابوالخير موسى

الدرجة العلمية: ماجستير الفلسفة فى العلوم الزراعية

القسم العلمى : النبات الزراعي

تاريخ موافقة مجلس الكلية : ٢٠٢٤/٤/١٧

لجنة الإشراف: أ.د. عادل السيد البلتاجي أستاذ الميكروبيولوجيا الزراعية، كلية الزراعة، جامعة المنوفية

أ.د. صلاح منصور عبدالجواد أستاذ الكيمياء الحيوية الزراعية، كلية الزراعة، جامعة المنوفية

أ.د. سامح فهيم فرج الله شديد أستاذ الميكروبيولوجيا الزراعية ، كلية الزراعة، جامعة المنوفية

الملخص العربي

أصبحت مقاومة الميكروبات المرضيه للمضادات الحيوية المستخدمة لعلاج الأمراض ظاهرة متزايدة مع تزايد مسببات الأمراض، فقد أجريت هذه الدراسة على عينات حقيقية مأخوذة من حالات أدخلت إلى قسم المسالك البولية بمستشفى المنصورة ولم تستجب للعلاج بالمضادات الحيوية المستخدمة بانتظام. وخلص الفحص ل ٦٤٢ عينة بول أولية تم جمعها من مرضى يعانون من التهابات المسالك البولية، حيث أظهرت ٤٥٨ عينة، نمو للبكتيريا المسببة للأمراض على بيئة الأجار المغذي، في حين لم تظهر ١٨٤ عينة أي نمو حيث اعتبرت خالية من مسببات أمراض المسالك البولية. تم تقسيم الحالات المرضيه بناءا على نسبه القيح الموجوده بعينات البول والتى فحصت بالميكروسكوب الى حالات بسيطه العدوى ومتوسطه وحالات شديده العدوى.كانت نتيجة الفحص بصبغة جرام للمستعمرات المختارة والتي تم عزلهامن الحالات البسيطه إلى أن ١٧٠ مستعمرة معزولة كانت من النوع السالب، ومقاومة لنوعين من المضادات الحيوية من أصل ١٢ مضادًا حيويًا مستخدمًا. وكذلك ١٩ حالة من النوع الموجب كانت مقاومة لـ ٣ أنواع من المضادات. أما حالات العدوى الشديدة التي يصل فيها عدد خلايا القيح إلى ٥٠٠ خلية في الحقل الميكرسكوبى فقد تمثلت بـ ٩٨ حالة. وكانت المسببات البكتيرية المعزولة من هذه الحالات تمثل ٩١ حالة سالبة لجرام.

وأظهر التوصيف البيوكيميائي لعينات التهابات المسالك البولية البالغ عددها ٤٥٨ عينة أن ٣٧٣ حالة أصيبت بالإيشريشيا كولاى ، و٤٧ حالة بالكليبسيلا، و١٠ حالات بالأستافيلوكوكس سابروفيتكس، و٣ حالات بالأنتيرباكتير فيكالس، و٢٥ حالة بمسببات أخرى. وتعتبر بكتيريا الأيشرشيا كولاي من أكثر أفراد العائلة المعوية التي تسبب حوالي ٩٠% من حالات التهاب المسالك البولية. حيث تم اختيار الثلاث سلالات من الإيشريشياكولاي من مستويات الإصابة الثلاثة والتي سميت: أي أم جي ٣ (مستوى الإصابة البسيط)، أي أم جي ٤ (مستوى الاصابه المتوسط) وأي أم جي ٥ والتي تمثل (مستوى الإصابة الشديد). كما تم أيضا استخدام سلالتين مرجعيتين مقاومتين لمضادات متعددة: أي أم جي ١ حيث كانت مقاومة للأمبيسيلين والنيومايسين، وسلالة أي أم جي ٢ مقاومة للأمبيسيلين والكلورامفينيكول.

فى هذه الدراسه، تم استخدام زيت الزعتر كاضافات للمضاد الحيوى، كما تم دراسه وتحديد المكونات الثانوية به باستخدام (GC–Mass) للتعرف على المركبات الفينولية الأساسية المستخرجة من الزيت ؛ حيث تم الكشف عن ٢٦ مركب. من بينها مركب الثيمول والبيتا سيمين وغيرها من تربينين والتي شكلت النسبة الأكبر من المكون الأساسي بنسبة ٣٢.٣ و٢١.٨ و١٣.٩%. في حين مثلت مركبات كارفاكرول وسينيول ولينالول النسبة المهمة الثانية من المكون بنسبة ٥.١ و٤.٤ و٣.٤% على التوالي. أما المكون الآخر المهم مثل الكامفور وبيتا كاريوفيلين وغيرها من التربينات فلم تمثل نسبة ملحوظة.

فى هذه الدراسه، تم تحويل الزيت الى الشكل المستحلب وكذلك على شكل جزيئات النانو، حيث تمت عملية الاستحلاب باستخدام زيت الزعتر الخام عالي النقاء وكذلك بلورات الثيمول النانومتريه النقية. وقد تم تشخيص المستحلب النانوميتري،

حيث كان حجم جزيئات مستحلب زيت الزعتر النانوميتري ٥٣.٩٩ نانومتر، وكان حجم مستحلب الثيمول النانوميتري ٥١.٠٩ نانومتر بمتوسط زيتاإجمالي ٦٧.٦٤ و٦٦.٠٥ نانومتر.

وقد تم قياس مدى مستويات مقاومة الميكروبات العزوله لعدد ١٢ مضاد حيوي باستخدام مقياس مقاومة المضادات الحيوية وفقا للمعايير المعمليه والمرضيه المحدده من خلال (CLSI, 2017) والذي حدد ثلاثة مستويات للبكتريا المقاومة (مقاوم، متوسط، حساس). حيث كانت المضادات الحيوية المستخدمة هي الأمبيسيلين والأموكسيسيلين بتركيز ١٠ ميكروغرام والتي أظهرت مناطق تثبيط ٦.٤١ و٦.٧٣ ملم على التوالي، وأظهرت مقاومة بنسبة ١٠٠٪. كما أظهر السيفوكسيتين بتركيز ٣٠ ميكروجرام مناطق تثبيط بلغت ١٥.٩٦ ملم ومقاومة ٩٨%. وأظهر تركيز الإيميبينيمين ١٠ ميكروجرام مناطق تثبيط تبلغ ١٥.٩٢ ملم وكانت السلالة مقاومة بنسبة ٩٨٪. وأظهر الفانكومايسين بتركيز ٣٠ ميكروغرام متوسط مناطق تثبيط ١١.٠٥ ملم وكانت السلالة مقاومة بنسبة ٩٥%، وأظهر الاريثروميسين والجنتاميسين والستربتوميسين والنيومايسين بتركيز ١٠ ميكروغرام مناطق تثبيط ١٥.٠٣ و١٣.٣١ و١٤.٦٤ و١٦.٨١ ملم على التوالي، وأظهر مقاومة ٨٥.٤، ٨٦.٣، ٧٨.٧ و٨٢.٦٪مقاومة،على التوالي. وأيضا أظهر الكلورامفينيكول بتركيز ٣٠ ميكروجرام منطقة تثبيط قدرها ١٦.٣٦ ملم وكانت السلالات مقاومة بنسبة ٧٨.٥%. أظهر السيبروفلوكساسين ٥ ميكروجرام منطقة تثبيط قدرها ١٩.٨٥ ملم وكانت السلالات مقاومة بنسبة ٥٦.٥%. وأيضا أظهر التتراسيكلين بتركيز ٣٠ ميكروجرام مساحة تثبيط قدرها ٢٠.٥٤ ملم وكانت السلالات مقاومة بنسبة ٧٥.٩%.

كما تم إجراء اختبارات الحساسية للمضادات الحيوية ضد ثلاث سلالات مختارة من الإيشريشيا كولاى قيد الدراسة مقارنة بالسلالات المرجعية. فكانت عزلات الإيشريشيا كولاى الثلاث مقاومة لمضادات الأمبيسيلين والأموكسيسيلين مثل السلالات المرجعية أي أم جي ١وأي أم جي ٢. كانت العزلات أي أم جي ٤ وأي أم جي ٥ مقاومة للسيفوكسيتين، لكن أي أم جي أظهرت قطر منطقة التثبيط (حوالي ١٤.٢٣ مم) مشابهًا للسلالات المرجعية. أظهرت جميع العزلات وكذلك السلالات المرجعية قطر منطقة تثبيط مماثل (حوالي ١٥.٠٠ ملم) للإيميبينيمين. كانت العزلة أي أم جي ٥ مقاومة للفانكومايسين، لكن أي أم جي ٣ وأي أم جي ٤ كانت مشابهة لـ أي أم جي ١ وأي أم جي ٢ في حساسيتها للفانكومايسين حيث تراوحت منطقة التثبيط بين ٩.١٧-١٠.٠٧ ملم. كانت العزلة أي أم جي ٥ مقاومة للجنتاميسين، لكن أي أم جي ٣ وأي أم جي ٤ أظهرت منطقة تثبيط متوسطة قدرها ١٢.٥ ملم مماثلة لتلك الخاصة بـ أي أم جي ١ وأي أم جي ٢. أظهرت جميع العزلات والسلالات المرجعية قطر تثبيط مماثل (حوالي ١٤ و١٤.٧ ملم) للاريثروميسين والستربتوميسين، على التوالي. من ناحية أخرى، تم تقدير تأثير تركيزات (١.٥، ٢، ٢.٥%) من الزيت والبلورات على حد سواء كمستحلب أو مستحلب نانوميتري على نمو بكتيريا الأيشرشيا كولاي المسببة لالتهاب المسالك والتي أظهرت مناطق تثبيط طفيفة حول السلالات المعزولة مقارنة بالسلالات المرجعية. بينما أدت الزيادة في تركيزات المستحلب النانوميتري لزيت الزعتر إلى زيادة معنوية في مناطق التثبيط عند استخدامها ضد العزلات الثلاث للأيشرشيا كولاي، إلا أنها كانت مختلفة معنوياً عن تلك الخاصة بالسلالات المرجعية.

وقد لوحظ أيضا وجود اختلافات معنوية بين تركيزات البلورات النانوميترية المستخدمة ضد السلالات المعزولة أو المرجعية.وكذلك، كان استخدام تراكيز ٢.٥% من الزيت البلوري النانوميتري هو الأكثر فعالية بين التركيزات الأخرى حيث أظهرت منطقة تثبيط معنوية ضد جميع السلالات المعزولة والمرجعية.

علاوة على ذلك، تم دراسة تأثير ١٠ ميكروغرام من أمبيسلين، أموكسيسيلين، إريثرومايسين، وكذلك ٣٠ ميكروغرام من نيومايسين، كلورامفينيكول و٥ ميكروغرام من سيبروفلوكساسين وذلك بخلطها مع صورللمستحلبات والمستحلبات النانوميترية لكل من زيت الزعتر وبلورات الثيمول بثلاثة تركيزات مختلفة ١.٥، ٢.٠ و٢.٥% على سلالات بكتيريا الأيشرشيا كولاي المسببة لالتهاب المسالك. كما لم يظهر استخدام صور المستحلبات أي فروق معنوية في أقطار مناطق التثبيط بين السلالات المعزولة والمرجعية، بينما وجدت فروق معنوية عند استخدام الصورالنانوميترية ، حيث كان المستحلب النانوميتري لبلورات الزعتر هي الأكثر فاعلية.

فبالنسبة للأمبيسيلين، كانت أقطار مناطق التثبيط ٦.٤٥، ٦.٣٢، ٦.٢٥ لـ أي أم جي ٣ ؛ ٦.٠٧ و٦.٣٢ و٦.٢٥ لـ وأي أم جي ٤ و٦.٠٤ و٦.٢٥ و٦.١٥ لـ وأي أم جي ٥، على التوالي، مقارنة بـ ٦.٢٧ و٦.٦٤ و٦.٩٢ لـ وأي أم جي ١ و٦.٠٥ و٦.١٧ و٦.٢٥ لـ وأي أم جي ٢. حيث كان تأثير الصورة النانوميترية للبلورات على السلالات المعزولة أو المرجعية هو الأكثر فاعلية، حيث كانت ٨.٣٥، ١١.٢٠ و١٦.٤٣ لـ أي أم جي ٣؛ ٨.٢٣ و١٠.٨٨و١٦.٢٥ لـ أي أم جي ٤و٨.١١ و١٠.٥٢و١٦.٠٨أي أم جي ٥، مقارنة بتلك السلالات المرجعية ٧.٨٢ و١٠.٦٤و١٦.٧٠و٧.٩٨و١٠.٧٢و١٦.٥٤ ملم لـ أي أم جي ١ و٢ على التوالي. وكان تأثير أموكسيسيلين ٦.٢٢، ٦.٥٥ و٧.٦٣ لـ أي أم جي ٣؛ ٦.١٩ و٦.٤١ و٧.٢٣ لـ أي أم جي ٤ و٦.١٥ و٦.٢٤ و٧.٠٥ لـ أي أم جي ٥، مقارنة مع تلك السلالات المرجعية التي سجلت ٦.٨٩ و٦.٩٨ و٧.٨٥ لـ أي أم جي١ و٦.٩٢ و٦.٩٥ و٧.٩١ لـ أي أم جي ٢، على التوالي. كما أدى استخدام مستحلب الثيمول النانوميتري إلى تثبيط نمو البكتيريا المختبرة. وكانت مناطق التثبيط ٨.٨١ و١٢.٨٢ و١٩.٨٧ لـ أي أم جي ٣؛ ٨.٢٥ و١٢.٣٣ و١٩.٢٢ لـ أي أم جي ٤ و٨.١٠ و١٢.١٣ و١٩.١٤ لـ أي أم جي ٥، مقارنة بالسلالة المرجعية ٨.٩٢ و١٢.٦٧ و١٩.٩٠ لـ أي أم جي ١ و٨.٨٩ و١٢.٧٢ و١٩.٧٦لـ أي أم جي ٢، على التوالي. وبالنسبة للإريثروميسين، كانت مناطق التثبيط ١٥.٤٥، ١٥.٦٦ و١٧.٤٦ بالنسبة لـ أي أم جي ٣؛ ١٥.٠٤ و١٥.٣٢ و١٧.١٨ لـ أي أم جي ٤ و١٤.٧٩ و١٥.٠٣ و١٦.٧٨ لأي أم جي ٥، مقارنة بـ ١٥.٦٨ و١٥.٧٥ و١٧.٦٣ لـ أي أم جي ١ و١٥.٢٦ و١٥.٥٣ و١٧.٢٧ لـ أي أم جي ٢، على التوالي.

وفي حالة المستحلب النانوميتري للثيمول البلوري كانت ٢٠.٨٨، ٢٤.٨٧ و٢٩.٨٦ لـ أي أم جي ٣؛ ٢٠.٧٦ و٢٤.٦٦ و٢٩.٣٢ لـ أي أم جي ٤ و٢٠.٣٥ و٢٤.٥٧ و٢٩.١٣ لـ أي أم جي ٥، مقارنة بـ ٢٠.٥٣ و٢٤.٦٨ و٢٩.٨٩ لـ أي أم جي ١ و٢٠.١٩ و٢٤.٢٦ ملم و٢٩.٧٣ ملم لـ أي أم جي ٢.كما أظهر تأثير النيومايسين مناطق تثبيط بلغت ١٦.٩٣،١٧.٣١ و١٨.٠٢ لل أي أم جي ٣؛ ١٦.٦٥،١٧.١٩ و١٧.٩١ لـ أي أم جي ٤ و١٦.٢٢ و١٧.٩٨ و١٧.٨٦ لـ أي أم جي ٥ مقارنة بـ ١١.٨٣ و١١.٩٦ و١٢.٠٦ لأي أم جي ١ و١٦.٨٩ و١٧٢٣ و١٧.٩٣ لـ أي أم جي ٢، على التوالي.

وعلى الرغم من أن السلالة المرجعية لـ أي أم جي ١ كانت بالفعل مقاومة للنيومايسين، إلا أنها أصبحت أكثر حساسية قليلاً والتي زادت مع وجود فرق معنوي كبير بعد إضافة المستحلبات أو المستحلبات النانوميترية، حيث تم العثور على اختلافات كبيرة في أقطار مناطق التثبيط بين بقية السلالات التي تم اختبارها وكذلك السلالة المرجعية لـ أي أم جي ٢. فكانت أقطار مناطق التثبيط المسجلة للمستحلب النانوميتري لبلورات الثيمول ٢٢.٩٦، ٢٧.٠٤ و٣٠.٢٥لـ أي أم جي ٣؛ ٢٢.٧٢ و٢٦.٨١ و٢٩.٩٤ لـ أي أم جي ٤ و٢٢.٥٣ و٢٦.٦٥ و٢٩.٨٦ لـ أي أم جي ٥ مقارنة بـ ١٥.٠٩ و١٧.٠١ و١٩.٥٣ لـ أي أم جي ١ و٢٢.٨٣ و٢٦.٩٥ و٣٠.١٦ لـ أي أم جي ٢، على التوالي.

بينما أظهر تأثير الكلورامفينيكول مناطق تثبيط بلغت ١٦.٥٨، ١٧.١٣ و١٧.٨٠ لـ أي أم جي ٣؛ ١٦.٤٦ و١٦.٩٨ و١٧.٧٢ لـ أي أم جي ٤ و١٦.٠١ و١٦.٧٣ و١٧.٦٤ لـ أي أم جي ٥، مقارنة بـ ١٦.٦٠ و١٦.٧١ و١٦.٤٤ لـ أي أم جي ١ و١١.٦٥ و١١.٧٩ و١١.٨٦ لـ أي أم جي ٢، على التوالي. على الرغم من أن السلالة المرجعية أي أم جي ٢ كانت بالفعل مقاومة للكلورامفينيكول، إلا أنها أصبحت حساسة قليلاً للمعاملات المستخدمة تحت التركيزات المستخدمة، وكانت الاختلافات في أقطار مناطق التثبيط كبيرة بين جميع السلالات المعزولة والمعالجة بالبلورات النانوميترية. حيث كانت مناطق التثبيط هي ٢٢.٤٩ و٢٦.٧٨ و٣٠.٠٢ لـ أي أم جي ٣ و٢٢.٥٧ و٢٦.٥٨ و٢٩.٧٩ لـ أي أم جي ٤ و٢٢.٣٥ و٢٦.٤٦ و٢٩.٦٥ لـ أي أم جي ٥، مقارنة بـ ٢٢.٣١ و٢٦.٤٥ و٢٩.٦٦ لـ أي أم جي ١ و١٤.٦٧ و١٦.٩١ و١٩.٣٥ لأي أم جي ٢، على التوالي.

كما أن تأثير السيبروفلوكساسين تحت معالجات البلورات النانوية كانت أقطار منطقة التثبيط ٢١.٠٩ و٢٣.١٤ و٢٥.٦٢ لـ أي أم جي ٣و٢١.٧٣ و٢٣.٠٢ و٢٥.٤٧ لـ أي أم جي ٤ و٢١.٥٦ و٢٢.٨٦ و٢٥.٣٥ أي أم جي ٥ مقارنة بـ ٢١.٢٤ و٢٣.٢١ و٢ ٥.٧٩ ل أي أم جي ١ و٢٠.٩٣ ، ٢٣.٠٦ ، و٢٥.٥٣ لـ أي أم جي ٢، على التوالي. علاوة على ذلك، فإن

مناطق التثبيط متزايدة بعد إضافة الصور النانوميترية من الزيت أو البلورات حيث تتفق مع بعض المراجع والأدلة على أن مكونات الزيوت العطرية تتفاعل بشكل تآزري مع المضادات الحيوية عن طريق التدخل في آليات مقاومة المضادات الحيوية.

على الجانب الآخر، كانت بكتريا الكليبسيلا بينومينيا الممرضة السالبة لجرام والمعزولة من مريض التهاب المسالك البولية مقاومًة للأمبيسيلين والإريثرومايسين بتركيز ١٠ ميكروجرام، إلا أن إضافة تركيز ٢.٥٪ من زيت الزعتر أو مستحلب الثيمول البلوري تأثيركبير على الفروق بين جميع الصور (المستحلب والنانو). فأظهرت المضادات الحيوية النيومايسين والكلورامفينيكول ٣٠ ميكروجرام تأثيرات مماثلة عند استخدامها مع مستحلب زيت الزعتر أو بلورات الثيمول. كما أن أشكال المستحلبات النانوميترية كانت متشابهة في تأثيرها، وكان من الملحوظ أهمية تأثيرات الأشكال النانوميترية. كما أظهرت السلالة الممرضة من الأستافيلوكوكس سابروفيتكس الموجبة لجرام مقاومة للأمبيسيلين (١٠ ميكروجرام) والسيبروفلوكساسين (٥ ميكروجرام). إلا أنها أصبحت حساسة لهذه المضادات الحيوية بعد إضافة المستحلب أو المستحلب النانوميتري من زيت الزعتر أو بلورات الثيمول، وكان نفس التأثير مع المضادين الحيويين نيومايسين وكلورامفينيكول ٣٠ ميكروجرام، بينما أظهر استخدام الاريثروميسين مع المستحلب النانوميتري دائماً اختلافات معنوية في أقطار مناطق التثبيط.

علاوة على ذلك، فقد لوحظ زيادة مناطق التثبيط بشكل كبير بزيادة تركيزات الإضافات الطبيعية السابقة، ومن الطبيعي تسجيل أعلى مستويات من التركيزات المثبطة الدنيا والحد الأدنى من التركيزات البكتيرية القاتلة (MICs وMBC) والتي وصلت إلى ٢٢٠ و٤٤٠ ملجم/ مل، على التوالي. مع كفاءة قتل (MBC/MIC) بنسبة ٢٠٠%. ومن الواضح أن صورالمستحلب النانوميتري يمكن أن تقلل بشكل واضح وكبير من الكميات المستخدمة من زيت الزعتر أو بلورات الثيمول للوصول إلى MIC وMBC بنسبة ٥٠%. كما أن استخدام ١٨٠ إلى ٢٢٠ ملجم/مل فى الصور النانوميترية كافية للوصول إلى الوصول للتركيز القاتل للبكتريا السالبة لجرام من أجناس الأيشرشيا كولاي والكليبسيلا بينمونيا. في حين أن ١٤٥ إلى ١٨٠ ملغم/مل في الصورة النانوميترية كافية للوصول إلى الخلايا كافية للوصول إلي التركيز القاتل للبكتريا الموجبة لجرام من الجنس الأستافيلوكوكس سابروفيتكس والمسببة لالتهاب المسالك البولية.

وقد تم استخدام الميكروسكوب الإلكتروني النافذ لدراسه تاثير كلا من المستحلب النانو لزيت الزعتر و المستحلب النانو لبلورات الثيمول على خلايا بكتيريا الأيشرشيا كولاي المسببة لالتهاب المسالك البولية والمعاملة بتركيز ٢.٥% منهما ، حيث لوحظ التأثير على شكل خلايا الإيشريشيا كولاى كما اظهرت وجود تلف فى جدر الخلايا البكتيرية الناتج عن إضافه المستحلب النانو للثيمول بشكل اكبر من مستحلب النانو لزيت الزعتر مما يسمح بدخول المضاد الحيوى للبكتريا المقاومه ويعزز من تاثيره عند استخدامهما معا كخطوة لكسر قدره الميكروبات على مقاومه المضادات الحيوية.

الخلاصة: خلصت نتائج الدراسة الى امكانية اضافه مستحلب النانو لزيت الزعتر بتركيز ٢.٥% الى العلاج بالمضادات الحيوية للبكتيريا المسببه لالتهابات المسالك البولية حيث يزيد من فاعلية وتأثير المضادات الحيوية المستخدمة ويقوى عملها ويقلل من مقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية مما يقلل من تأثيرها. فتقل الجرعات المستخدمة ومدة وتكلفة العلاج الاقتصادية.

أهم التوصيات:

١- استخدام المركبات الفعالة (الثيمول وزيت الزعتر) في شكل نانومتري بتركيز ٢.٥% لدعم المضادات الحيوية.

٢- إدخال أزهار وأوراق الزعتر في برامج التغذية العلاجية لما تحتويه من مكونات هامة من الثيمول والكافاكرول والفينولات والكربوهيدرات، وقدرتها على مقاومة الكائنات الحية الدقيقة المسببة للأمراض.