الآيـــــــــه

قال تعالى:

(وَأَوْحى رَبُّكَ إِلَى النَّحْلِ أَنِ اتَّخِذِي مِنَ الْجِبالِ بُيُوتًا وَمِنَ الشَّجَرِ وَمِمَّا يَعْرِشُونَ (68) ثُمَّ كُلِي مِنْ كُلِّ الثَّمَراتِ فَاسْلُكِي سُبُلَ رَبِّكِ ذُلُلًا يَخْرُجُ مِنْ بُطُونِها شَرابٌ مُخْتَلِفٌ أَلْوانُهُ فِيهِ شِفاء لِلنَّاسِ إِنَّ فِي ذلِكَ لَآيَةً لِقَوْمٍ يَتَفَكَّرُونَ (69))

صدق الله العظيم

سورة النحل الآيتان (68-69)

Dedication

I dedicate this research to

Our teacher prophet Mohammed (peace be upon him)

My dear father

My lovely mother

My husband and son

My sweet sisters

My aunts and uncles

My friends and colleagues

And

Everyone who facilitated this work

Acknowledgement

First of all, thanks for Allah Almighty for helping me to complete this work. Thanks to my dear supervisor Dr. Hisham Nouraldayem. Special thanks and great appreciation to Dr. Ahmed Ibrahim and my friends whom gave help to me during the preparation of this work. And for all the people from whom the swab samples have been collected.

Abstract

Bee Honey as an alternative antimicrobial has been explored in the treatment of infections and as a result of its antimicrobial effects had been widely investigated on various microorganisms including biofilms. The formation of biofilm in wounds by pathogenic organisms has been associated with impairment of healing processes due to combined effects of the virulence of organisms within the biofilm. The effect of attenuation of the organism through inhibition of biofilm and quorum sensing (QS) signaling molecules by bee honey will allow the body defense system of the hosts "patients" to easily eliminate the organism from the site of infection. This study was aiming to detect the antibacterial activity of two concentrations of *Acacia* honey from two different sources on biofilms forming *Staphylococcus aureus* isolated from wound swabs. The samples were collected from Soba teaching hospital in Khartoum state in the period between June to August 2017. The practical was done in Sudan University of Science and Technology research laboratory on fifty-five *Staphylococcus aureus* isolated from wound swabs, *S.aureus* ATCC 29213 and *MRSA* ATCC 43300. After bacterial isolation the antibacterial activity of benzyl penicillin antibiotic was measured using Kirby Bauer disc diffusion technique. Out of 57 *S. aureus* 37 (64.9%) isolates sensitive to penicillin, 4 (7%) intermediate and 16 (28.1%) resistant. Activity of Oxacillin disc was measured to detect methicillin sensitivity and there were 51 (89.5%) *MSSA* and 6 (10.5%) *MRSA.* The antibacterial activity of bee honey was measured using micro-broth dilution method in 96 well microtiter plate. The two different concentrations of *Acacia* bee honey 25%, 75% (v/v) and the antibiotics were added and incubated at 37 ^{o} C for 24 hours which showed that 25% honey had significant effect in inhibiting *S.aureus* biofilms (*p*. value= 0.000) unlike the 75% honey (*p*. value= 0.075), the benzyl penicillin (*p*. value= 0.658) and the ceftriaxone (*p*. value= 0.097) which showed lower effect on biofilm formation. This study concluded that the concentration of *Acacia* bee honey that affected *S.aureus* biofilms forming invitro was 25% (v/v). Further studies are needed to evaluate the antimicrobial activity of bee honey.

مستخلص البحث

تم استكشاف عسل النحل باعتباره بديلًا لمضادات الميكروبات في علاج الالتهابات ونتيجةً لآثاره المضادة للميكروبات تم التحقق على نطاق واسع في الكائنات الحية الدقيقة المختلفة بما في ذلك الأغشية الحيوية. إرتباط تكوين الغشاء الحيوي في الجروح بواسطة الكائنات المسببة للأمراض يضعف عمليات الشفاء بسبب التأثيرات الممرضة للكائنات الحية داخل الغشاء الحيوي. إن تأثير تضعيف الكائن الحي من خلال تثبيط جزيئات الإتصال (إدراك النصاب) للأغشية الحيوية بواسطة عسل النحل الذي سيسمح لنظام الدفاع عن الجسم للمضيف (المريض) بالقضاء بسهولة على الكائن الحي من موقع الإصابة. تهدف هذه الدراسة إلى الكشف عن النشاط المضاد للبكتيريا لتركيزين من عسل الأكاسيا من مصدرين مختلفين على الأغشية الحيوية التي تشكلها المكورات العنقودية الذهبية المعزولة من مسحات الجروح. تم جمع العينات من مستشفى سوبا التعليمي في ولاية الخرطوم في الفترة ما بين يونيو إلى أغسطس ٢٠١٧. وقد تم إجراء البحث في مختبر أبحاث جامعة السودان للعلوم والتكنولوجيا على خمسة وخمسين من المكورات العنقودية الذهبية المعزولة من مسحات الجرح، زائد عينتين هما بكتيريا المكورات الذهبية المرجعية ٢٩٢١٣ والمكورات الذهبية المرجعية المضادة للميثيسلين ٤٣٣٠٠. بعد عزل البكتيريا، تم قياس النشاط المضاد للبكتيريا للبنزيل بنسلين باستخدام تقنية نشر قرص كيربي باور. من أصل ٥٧ عينه كانت هناك ٣٧ (٦٤,٩٪) بكتيريا معزولة من المكورات الذهبية حساسة للبنسلين، ٤ (٧٪) وسيطة و١٦ (٢٨,١٪) مقاومة. تم قياس نشاط حساسية الميثيسيلين وكانت هناك ٥١ (٨٩,٥ ٪) من المكورات الذهبية حساسة للمثيسلين و٦ (١٠,٥٪) مقاومة للمثيسلين. تم قياس النشاط المضاد للبكتيريا للعسل باستخدام طريقة التخفيف الجزئي في ميكروتيتربليت والتي فيها ٩٦حقل حيث تمت إضافة تركيزات مختلفة من عسل النحل أكاسيا ٢٥٪، ٧٥٪ (ح / ح) والمضادات الحيوية وحضنت في ٣٧ درجة مئوية لمدة ٢٤ساعة والتي أظهرت أن ٢٥٪ من العسل كان له تأثير كبير في تثبيط الأغشية الحيوية لمجتمع المكورات الذهبية (قيمة الإحتماليه = ٠,٠٠٠) على عكس ٧٥٪ من العسل (قيمة الإحتماليه = ٠,٠٧٥) ، بنزيل البنسلين (قيمة الإحتماليه = ٠,٦٥٨) والسيفترياكسون (قيمة الإحتماليه =٠,٠٩٧) مما أظهر تأثيرًا أقل على تكوين الغشاء الحيوي. وخلصت هذه الدراسة إلى أن تركيز عسل النحل أكاسيا الذي أثر على الأغشية الحيوية للمكورات العنقودية الذهبية كان 25 ٪ (ح / ح). هناك حاجة إلى مزيد من الدراسات لتقييم نشاط المضاد للميكروبات لعسل النحل.

List of contents

Number	Tittle	Page
	الآيـــة	I
	Dedication	II
	Acknowledgement	III
	Abstract	IV
	مستخلص البحث	VI
	List of contents	VII
	List of tables	IX
	List of figures	X
	List of abbreviations	XI
Chapter one : Introduction		
1.1	Introduction	1
1.2	Rationale	3
1.3	Objectives	4
Chapter two : Literature review		
2.	Literature Review	5
2.1	Definition of biofilm	5
2.2	Biofilm formation	5
2.2.1	Attachment	5
2.2.2	Formation of microcolonies	6
2.2.3	Detachment and dispersal	6
2.3	Biofilm physiology	7
2.4	Quorum sensing	9
2.5	Resistance of biofilm to immune system and antimicrobial agents	9
2.6	Biofilm detection methods	11
2.6.1	Light microscopic examination of stained cultures and tissue samples	11
2.6.2	Confocal laser scanning electron microscopic examination of biofilm	11
2.6.3	Atomic force microscopy (AFM) of biofilm	11
2.6.4	Scanning electron microscopic examination of tissue samples (SEM)	11
2.6.5	Epifluorescent microscopy	12
2.6.6	Fluorescent in situ hybridization (FISH) or Peptide nucleic acid-based fluorescence	12

2.6.7	Sonication or vortex mixing and estimation of colony forming units (cfu)	12
2.6.8	Detection of QS molecules	12
2.6.9	Detection of EPS components	12
2.6.10	Biofilm adherence assay (in microtitre plate or on slides)	13
2.7	Medical importance of biofilms	13
2.8	*Staphylococcus aureus*	15
2.8.1	The antigenic structures of *S. aureus*	15
2.8.2	Staphylococcal Diseases	16
2.8.3	Morphology and identification	16
2.8.4	Laboratory diagnosis	17
2.8.4.1	Specimen	17
2.8.4.2	Direct microscopy	17
2.8.4.3	Culture	17
2.8.4.4	Biochemical reactions	18
2.8.4.5	Bacteriophage typing	18
2.8.4.6	Serological tests	19
2.8.4.7	Antibiotic sensitivity tests	19
2.8.5	Treatment	20
2.9	Bee honey	20
2.9.1	Physiochemical properties of Bee honey	23
2.9.2	Medical importance of Bee honey	24
2.9.3	Application of Bee honey in wound treatment	24
Chapter three : Materials and Methods		
3.	Materials and methods	26
3.1	Study design	26
3.2	Study area	26
3.3	Study duration	26
3.4	Sample size	26
3.5	Study samples	26
3.6	Data collection	26
3.7	Sample collection	26
3.8	Ethical consideration	26
3.9	Data analysis	27
3.10	Methods	27
3.10.1	Identification of clinical isolates	27
3.10.2	Preparation of nutrient agar and broth	28
3.10.3	Bee honey types preparation	28
3.10.4	Preparation of control antibiotic solutions	30
3.10.5	Testing of antibacterial activity of bee honey and antibiotics on biofilms	30
3.10.6	Disposal of cultures	32

Chapter four : Results		
4	Result	33
4.1	Susceptibility of clinical isolates to penicillin	33
4.2	Susceptibility of clinical isolates to oxacillin antibiotic	34
4.3	Susceptibility of clinical isolates biofilms to bee honey and antibiotics	35
Chapter five : Discussion		
5.1	Discussion	37
5.2	Conclusion	39
5.3	Recommendations	40
5.4	References	41
5.5	Appendices	52

List of Tables

Table	Title	Page
2.1	Bee Honey composition	22
3.2	Physicochemical properties of the bee honey used	29
4.3	The effect of Antimicrobials on biofilm formation	35
4.4	shows mean ± standard deviation for the bacterial biofilm biomass, inhibition of *S. aureus* biofilm by *Acacia* bee honey and antibiotics	36

List of figures

Figure	Title	Page
2.1	The stages of biofilm formation	7
4.3	Frequency of penicillin sensitivity of *S. aureus* isolates; sensitive, intermediate and resistant	33
4.4	Frequency of methicillin sensitivity among *S. aureus* isolates	34
I	Addition of diluted honey to microtiter plates	52
II	The biofilm adhering to the wells	53
III	the biofilm biomass after staining and addition of acetic acid	54

List of Abbreviations

Abbreviation	Full text
DNA	deoxyribonucleic acid
EPS	extracellular polymeric matrix
MIC	minimum inhibitory concentration
MBC	minimum biofilm eliminating concentration
MV	membrane vesicle
MRSA	methicillin resistant *Staphylococcus aureus*
MSSA	methicillin sensitive *Staphylococcus aureus*
MSA	mannitol salt agar
OD	optical density
PV	Panton Valentine
PCR	polymerase chain reaction
QS	quorum sensing
SEM	scanning electron microscope
SSSS	staphylococcal scalded skin syndrome
TSS	toxic shock syndrome
TSST	toxic shock syndrome toxin