تقييم انتاج المضادات الميكروبية لبكتيريا البروبيوتيك (حمض اللاكتيك) ضد السلالات البكتيرية الممرضة المقاومة للمضادات الحيوية

ياسمين فرج ابو شعالة[1،4] ، الطاهر احمد الشقمانى[2]

1. **وحدة الاحياء الدقيقة، المركز الصحي الاسواك، مصراته-ليبيا.**
2. **قسم المختبرات الطبية، كلية التقنية الطبية، مصراته-ليبيا.**

الملخص

يعد التطورالسريع للسلالات البكتيرية المقاومة للمضادات الحيوية مشكلة صحية كبيرة بسبب ارتفاع معدل حدوثها في جميع انحاء العالم، فالامراض المعدية هى اكبر مشكلة للانسان وتؤدى الى الامراضية وزيادة عدد الوفيات، ونتيجة لهذا الارتفاع في الوفيات اتجهت الدراسات الحديثة لعمل بدائل للمضادات الحيوية للوقاية من الامراض ومنها بكتيريا البروبيوتيك واعادة النظر لاستخدامها كبديل للمضاد الحيوى، وهدفت الدراسة على تقييم انتاجية المضادات الميكروبية لبكتيريا البروبيوتيك (حمض اللاكتيك) ضد السلالات البكتيرية الممرضة والمقاومة للعدد من المضادات الحيوية ، و استخدمت 25 عزلة بكتيرية للحالات المترددة على مستشفى الحكمة مصراتة شملت عينات من البول والجروح والبلغم وبعض العزلات كانت من الانواع البكتيرية المقاومة للمضادات الحيوية وشملت *Acintobacter spp*، *Staphylococcus aureus* ، *Streptococcus spp*، *Klebsiella spp* ، وانواع المضادات الحيوية المستخدمة Imipenem، Ceftriaxone، Amoxicillin clavulanic acid، Cefuroxime ، Cefotaxime ،Cefoxitin، ومن النتائج المتحصل وجد ان البكتيريا موجبة الجرام المثمتلة فى *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sp* كانت حساسة لكل المضادات الحيوية بنسبة 90%، بينما البكتيريا سالبة صبغة الجرام تمثل في *Acintobacte spp*، *Klebsiella spp*

واظهرت مقاومتها لاغلب المضادات الحيوية ، ومن خلال الكشف على قدرة بكتيريا بروبيوتيك على انتاج المضاد الحيوى ، وجدنا تاثيرها على البكتيريا موجبة الجرام افضل من البكتيريا سالبة لصبغة الجرام فتراوحت المسافة الثتبيطيه (2-10) مليمتر.

الكلمات المفتاحية: تقييم انتاج المضادات الميكروبية لبكتيريا البروبيوتيك ، انواع البكتيرية الممرضة ، مقاومة العديد من المضادات الحيوية.

Abstract

The rapid development of antibiotic-resistant bacterial strains is a major health problem due to the high rate of occurrence all over the world. Infectious diseases are the biggest problem for humans and lead to pathogenesis and an increase in the number of deaths. As a result of this rise in deaths, recent studies have tended to make alternatives to antibiotics to prevent diseases, including probiotic bacteria. And to reconsider its use as an alternative to antibiotics. The study aimed to evaluate the antimicrobial productivity of probiotic bacteria (lactic acid) against pathogenic bacterial

strains that are resistant to a number of antibiotics. Antibiotic-resistant bacterial species included *Acintobacter spp, Staphylococcus aureus, Streptococcus spp, Klebsiella spp,* and the types of antibiotics used: Imipenem, Ceftriaxone, Amoxicillin clavulanic acid, Cefuroxime, Cefotaxime, and Cefoxitin. tococcus sp was sensitive to all antibiotics by 90%, while Gram-negative bacteria were represented by *Acintobacte spp, Klebsiella spp.*

It showed resistance to most antibiotics, and by examining the ability of probiotic bacteria to produce the antibiotic, we found its effect on Gram-positive bacteria better than Gram-negative bacteria, so the inhibition distance ranged (2-10) mm.

Keywords: Evaluation of antimicrobial production of probiotic bacteria, pathogenic bacterial species, resistance to many antibiotics.

المقدمة

يعد التطورالسريع للسلالات البكتيرية المقاومة للمضادات الميكروبية من اهم مسببات الامراض التي تعيق عمل الاطباء والباحثين وخاصة تلك التى تتمتع بمقاومة للمضادات الحيوية الشائعة الاستعمال (Rouveix 2007). فالامراض التي تسببها هده البكتيريا من اكبر المشاكل للانسان وتؤدى الي زيادة مفرطه لتكاليف العلاج وحتى زيادة عدد الوفيات في جميع انحاء العالم (Culligan, Hill et al. 2009). وتقدر منظمة الصحة العالمية ان اكثر من 4 مليارات من امراض الاسهال تحدث سنويا، وتقدرحوالى 2.2 مليون حالة وفاة بسبب عدوى البكتيريا المعوية مما يجعلها من الاسباب الرئيسية للوفاة لجميع الاعمار وتشمل انواع االبكتيربة الشائعة المسببة للامراض,*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp*, *Proteus spp*, *Pseudomonas spp*, (Ballal and Shivananda 2002).

نتيجة لارتفاع وفيات العدوى البكتيرية وخاصة المقاومة للمضادات الحيوية منها، اتجه الباحثين لاستخدام بدائل اخرى مثل بكتيريا البروبيوتيك واعادة النظر لاستخدامها كبديل للمضاد الحيوى (Ahmed 2003). يعد استهلاك الطعام الذى يحتوى على الميكروبات الحية وهي من اقدم الطرق واكثرها استخداما لزيادة عدد الميكروبات المفيدة المسماة بربيوتيك في الامعاء (Lahtinen, Ouwehand et al. 2011)، حبث يعود تاريخ استخدامها للعصورالقديمة والتى تنشأ من الاطعمة المخمرة وكذلك منتجات لالبان وعادة تكون هده اليكروبات غير ممرضة (Tadesse, Ephraim et al. 2005). وبالبحث عن المكونات الغذائية ذات الخصائص الحيوية النشطة من البكتيريا مثل النشاط المضاد الميكروبي ضد الكائنات الدقيقة الاخرى لتشمل الممرضة منها، استخدمت البروبيوتيك كمادة حافظة للاغذية وعامل مضاد للميكروبات اكثرمن العوامل الكيميائية بسبب تاثيرات الكائنات المجهرية على الانسان وسلامة استخدامها (Ahmed14TP0F 2013).

فبكتيريا البروبيوتيك (حمض اللاكتيك) هى مجموعة من البكتيريا الموجبة الجرام التي تشمل اجناسا مثل *Lactobacillius Lactococcus spp*، *Leuconostoc spp.*، *Pediococcus spp*، *Streptococcus spp,* والوصف العام لهده الانواع البكتيرية انها موجبة لصبغة الجرام ومكونة للانواع وتكون كروية او عصوية، تنتج حمض اللاكتيك كمنتج نهائى رئيسى اثناء تخمرها للكربوهيدرات. وتشير المراجع التصنيفية الاخيرة ان بكتيريا حمض اللاكتيك هده تشمل على جنس *Enterococcus*

ايضا *(Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn 2010)*. وكما تلعب هده الانواع البكتيرية دورا هاما في انتاج بعض الاغذية والفيتامينات المفيدة للوقاية من بعض الامراض بالاضافة لتاثيرها المضاد للميكروبات (Ahmed14TP0F 2013)، وكدلك تمنح فائدة صحية للمضيف عند اعطائها عن طريق الفم بكميات كافية لتستخدم بشكل اساسي في التوازن الميكروبى في الامعاء خاصة (Giang, Viet et al. 2011). لذلك اجريت العديد من الابحاث للتحقق من نشاطها البروبيوتيك المضاد للامراض فى المختبر(Tonekabon 2013) ، واجريت الدراسة الحالية لتقييم قدرة انتاج البروبيوتيك للمواد المثبطه لنمو السلالات البكتيرية الممرضة والمقاومة لعدد من المضادات الحيوية.

المواد وطرائق العمل

العزلات البكتيرية المستخدمة في الدراسة

استخدمت 25 عزلة بكتيرية من عينات مختلفة (البول والجروح والبلغم)، تم الحصول عليها من المرضى المترددين على مستشفى الحكمة - مصراتة، كما موضح في جدول 1. بعض هده العزلات كانت لأنواع بكتيرية مقاومة لعدد من المضادات الحيوية الشائعة الاستعمال.

جدول (1): العزلات البكتيرية المستخدمة في هده الدراسة

نوع البكتيري	عدد العزلات	النسبة المئوية (%)
Klebsiella spp.	4	16
Streptococcus spp.	4	16
Staphylococcus aureus	11	44
Acintobacter spp.	6	24
المجموع	25	100

جدول (2): انواع المضادات الحيوية المستخدمة (شركة oxoid)

المضاد الحيوى		تركيز المضاد
Imipenem	IMP	10
Ceftriaxone	CRO	30
Cefoxitin	FOX	30
Amoxicillin/clavulanic acid	AMC	30
Cefuroxime	CXM	30
Cefotaxime	CTX	30

بكتيريا البروبيوتيك (حمض اللاكتيك) المستخدمة

استخدمت البكتيريا البروبيوتيك الجاهزة في الصيدليات (Lactobacillus LB, France) واضيفت لها 3 مل ماء مقطر معقم وحضنت فى درجة حرارة 37 لمدة 48 ساعة لتكون جاهزة للاختبار.

حساسية العزلات البكتيرية للمضادات الحيوية الشائعة الاستخدام

تم تحضير المعلق البكتيري وتم ضبطه عكارته بمحلول Mcfarland (0.5). بواسطة ماسحة قطنية وتم زرع طبق Mueller Hinton agar وترك الطبق لمدة 10 دقائق ليجف، وضعت أقراص المضادات الحيوية المذكوره في جدول (2) وحضنت في درجة 37مْ لمدة 24 ساعة (Wayne 2013).

طريقة الكشف عن قدرة بكتيريا بروبيوتيك على انتاج مضادات بكتيرية

تم استخدام طريقة الخطوط المتعامدة cross streak حيث زرعت بكتيريا بروبيوتيك المراد الكشف عن قدرتها على انتاج المضادات الحيوية بواسطة plastic loopعلى هيئة خط مستقيم في منتصف Mueller Hinton agar وحضن الطبق في درجة حرارة 37 لمدة 24 ساعة، وبعد انتهاء التحضين تم زراعة العزلات السريرية على شكل خطوط منفردة ومتعامدة على خط نمو عزلة بكتيريا البروبيوتيك بحيث يتم الزرع من الطرف البعيد وينتهى عند خط نمو البروبيوتيك، ثم تحضن الاطباق مرة اخرى في الحاضنة لمدة 24 ساعة (Usta, Demirkan et al. 2021).

النتائج والمناقشة

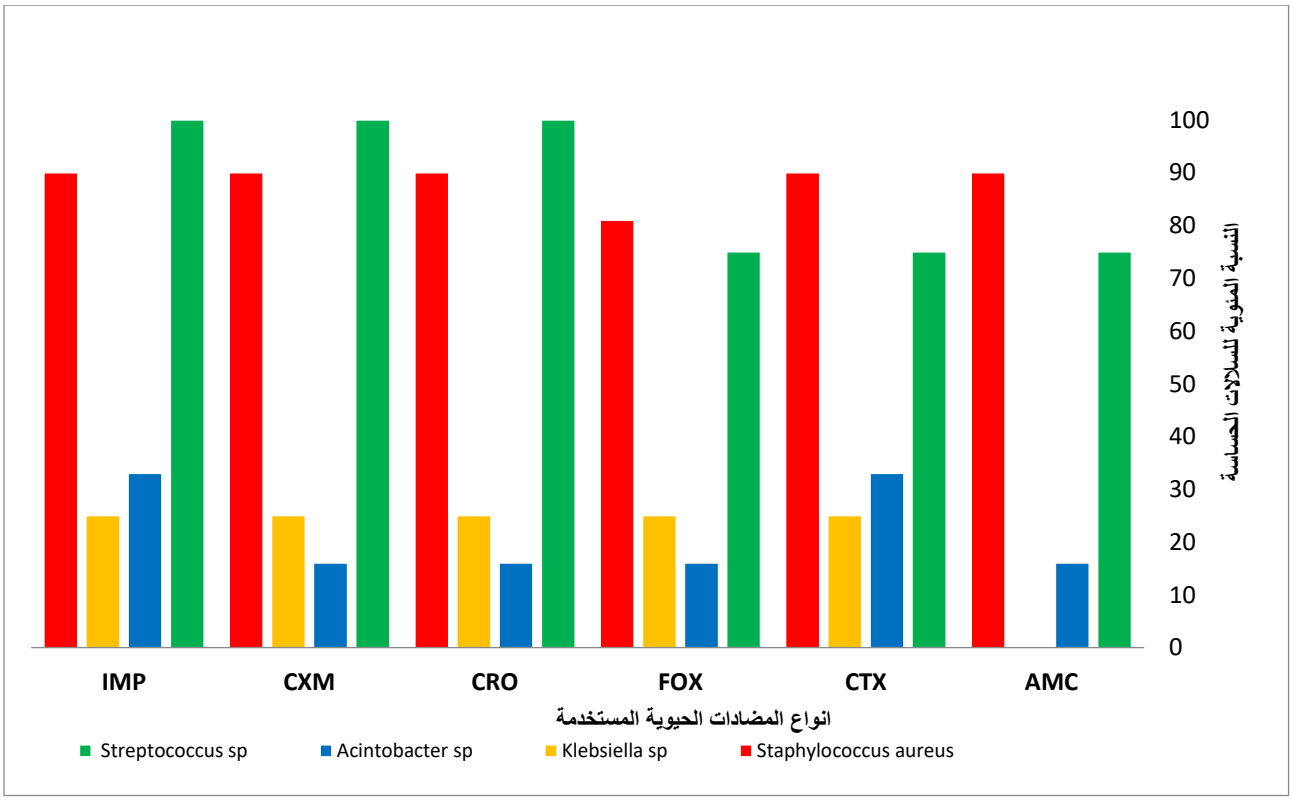
من خلال النتائج المتحصل عليها من هده الدراسة والتى استخدمت فيها 25 عزلة بكتيرية من 4 انواع بكتيرية مختلفة، نجد ان اغلب سلالات (90%) *Staphylococcus aureus* كانت حساسة لمعظم المضادات الحيوية الستخدمة في هده الدراسة، ايضا *Streptococcus spp.* اظهرت حساسيتها عالية للمضادات CRO، CXM، IMP بنسبة 100% في حين FOX، CTX، AMC بنسبة 75%، بينما سلالات البكتيريا السالبة الجرام كانت حساسيتها ضعيفة للمضادات الحيوية فنجد ان سلالات *Klebsiella spp.* حساسيتها للمضادات الحيوية IMP،CXM، CRO، FOX، CTX بلغت نسبتها 25% بينما لم تظهر أي حساسية للمضاد الحيوى AMC. وكانت حساسية *Acintobacter spp* للمضادات الحيوية AMC،CXM، CRO، FOX (16%)، بينما IMP، CTX (33%) وكما موضح في شكل (1). كان هناك تسع عزلات مقاومة للعديد من المضادات الحيوية MDR شملت عزلة *Staphylococcus aureus*، وثلاثة عزلات *Klebsiella spp* ، وخمسة عزلات من *Acintobacter spp.*، وتم الكشف على عزلتين من *Staphylococcus aureus* كانت مقاومة للميثاسلين MRSA.

من خلال تقييم القدرة التثبيطية لبكتيريا بروبيوتيك، اتضح ان البروبيوتيك لها قدرة ثبيطية لنمو الاجناس الموجبة الجرام فقط، حيث لوحظ فعاليتها على 6 اجناس (50%) من البكتيريا الموجبة الجرام *Staphylococcus aureus* فتراوحت مسافة تثبيط النمو من (2-10) مليمتر. وكما اظهرت فعاليتها على العزلة *Staphylococcus aureus* المقاومة للميثاسيلين بمسافة تثبيطيه 2 مليمترات، وبينما لم تكن لها فعالية على البكتيريا السالبة الجرام والمقاومة للعديد من المضادات الحيوية كما موضح شكل (2).هذه النتائج توافقت مع دراسة في تركيا والتى وجدت فعالية بكتيريا بروبيوتيك على البكتيريا الموجبة فقط (Usta, Demirkan et al. 2021)، وبينما اختلفت نتائج لدراسة في العراق والتى اظهرت تاثيرها على البكتيريا السالبة والموجبة لضبغة الجرام المثمتلة في *Staphylococcus aureus*، *Escherichia coli* ، *Pseudomonas spp* (Hussain and Conservation 2022)

الخلاصة

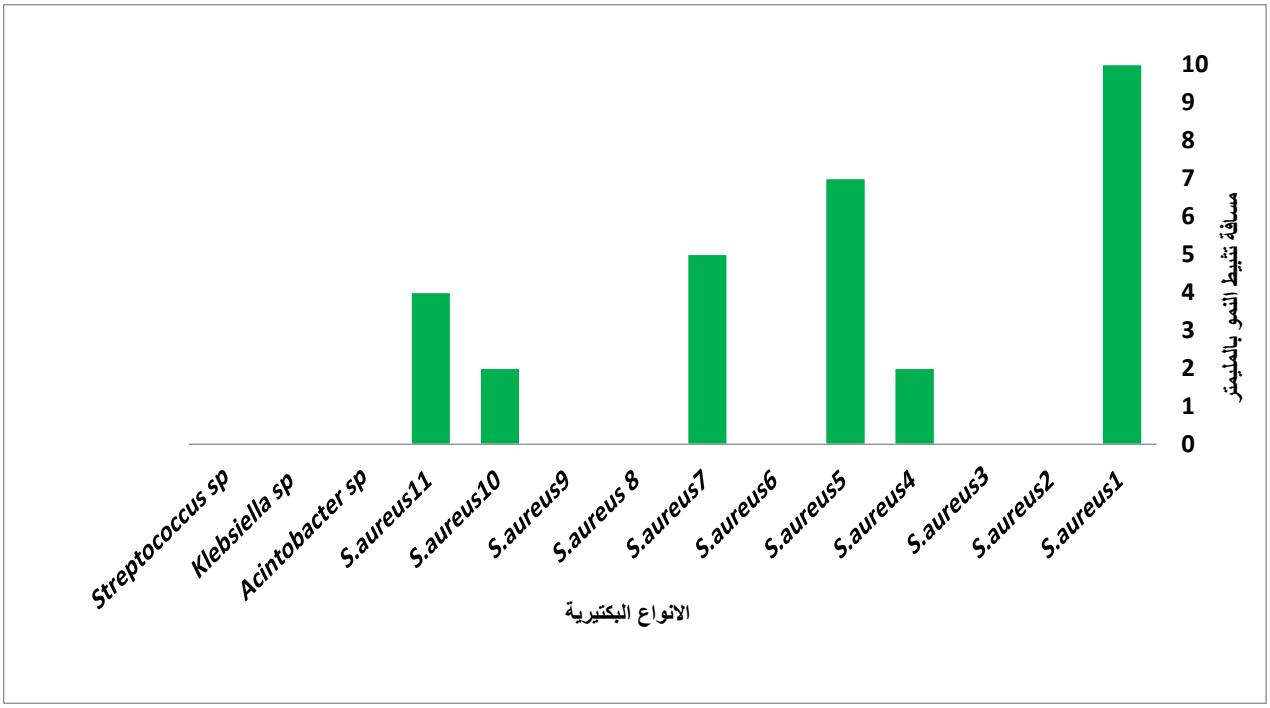
نستنتج من الدراسة الحالية ان لبكتيريا البروبيوتيك منتجات ذات فعالية تثبيطية على بعض البكتيريا وخاصة الموجبة لصبغة الجرام. وكما نامل في دراسات مستقبلية استخدام طرق حديثة لتنقية وتركيز المواد الفعالة المسؤولة عن النشاط المضاد للبكتيريا البروبيوتيك لاستخدامها بطريقة (The agar well diffusion) لضبط القطر التثبيطى ومقارنته بتاثير المضاد الحيوى الشائعة الاستخدام على نفس النوع البكتيري. وكما نتطلع لاستخدام انواع اخرى من بكتيريا البروبيوتيك ودراسة فعاليتها على البكتيريا الممرضة.

..



شكل (1): حساسية البكتيريا المستخدمة في هذه الدراس للمضادات الحيوية.

IMP Imipenem CRO Ceftriaxone FOX Cefoxitin CXM CefuroximeCTX Cefotaxime AMC Amoxicllin clavulanic acid



شكل (2): حساب التاثير المضاد بقياس المسافة بالمليمتر بين بكتيريا بروبيوتيك وبكتيريا الاختبار

الشكروالتقدير

الشكر والتقدير لكل من ساهم في وصول البحث بهذه الصورة واخص بالشكر لمركز الصحى الاسواك والى مستشفى الحكمة مصراتة.

المراجع

1. Ahmed14TP0F, A. A. J. J. J. o. B. S. (2013). "In vitro screening of Lactobacillus species from homemade yoghurt for antagonistic effects against common bacterial pathogens." **6**.(3)

2. Ahmed, F. E. J. T. i. b. (2003). "Genetically modified probiotics in foods." **21**(11): 491-497.

3. Ballal, M. and P. J. T. I. J. o. P. Shivananda (2002). "Rotavirus and enteric pathogens in infantile diarrhoea in Manipal, South India." **69**(5): 393-396.

4. Culligan, E. P., et al. (2009). "Probiotics and gastrointestinal disease :successes, problems and future prospects." **1**(1): 1-12.

5. Giang, H. H., et al. (2011). "Effects of supplementation of probiotics on the performance, nutrient digestibility and faecal in growing-finishing pigs." **24**(5): 655-661.

microflora

6. Hussain, M. A .J. J. o. G. and E. R. Conservation (2022). "Antibacterial effect of probiotic lactic acid bacteria on some pathogens." **10**(1): 1-6.

7. Lahtinen, S., et al. (2011). Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects, Crc Press.

8. Rattanachaikunsopon, P. and P. J. A. o. b. r. Phumkhachorn (2010). "Lactic acid bacteria: their antimicrobial compounds and their uses in food production." **1**(4): 218-228.

9. Rouveix, B. J. J. o. A. C. (2007). "Clinical implications of multiple drug resistance efflux pumps of pathogenic bacteria." **59**(6): 1208-1209.

10. Tadesse, G., et al. (2005). "Assessment of the antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Borde and Shamita, traditional Ethiopian fermented beverages, on some foodborne pathogens and effect of growth medium on the inhibitory activity." **5**: 13-20.

11. Tonekabon, I. J. A. S. B. (2013). "Evaluation of antimicrobial activity of three Lactobacillus spp. against antibiotic resistance Salmonella typhimurium." **5**(2): 61-70.

12. Usta, A., et al" .(2021) .The effect of growth parameters on the antibiotic activity and sporulation in Bacillus spp. isolated from soil." **2021**: 2310-2313.

13. Wayne, P. J. C. L. S. I. (2013). "Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI approved standard M100–S23." **33**: 118-156.