مجلة تكريت للعلوم الصرفة، 22 (8) 2017
ISSN: 1813 – 1662 (Print)
E-ISSN: 2415 – 1726 (On Line)

دراسة الفعالية التضادية لبعض أنواع المعززات الحيوية تجاه بكتريا *P.mirabilis* المعزولة من حصى الكلى

أمين سليمان بدوي[1] ، عقيل حسين علي العاصي[2] ، هالة عبد الخالق عوض الحديثي[2]

[1] كلية الزراعة ، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق

[2] قسم علوم الحياة ، كلية العلوم ، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق

الملخص

تضمنت الدراسة الحالية جمع عينات (68) حصى كلى من المرضى الخاضعين لجراحة رفع الحصى في مستشفيات مدينة تكريت وللفترة من شهر نيسان 2012 الى شهر ايار 2013. ولقد أظهرت نتائج الدراسة أن نسبة المصابين الذكور (64.71%) بينما كانت نسبة المصابين من الإناث (35.29%) أي تفوق الذكور على الإناث نسبة (1.83:1)، أظهرت نتائج التشخيص واعتماداً على الاختبارات الكيموحيوية و API-20 system أن بكتريا *E.coli* و *Ps.aeruginosa* الأكثر تكراراً من بين الأنواع البكتيرية الأخرى وبنسبة عزل (30.76%) و (21.22%) على التوالي ، أما بكتريا *P.mirabilis* فقد أعطت نسبة عزل (15.38%)، وتلتها بكتريا *Kl.pneumoniae* و *Citrobacter freundii* بنسبة عزل (9.6%) و(5.67%) على التوالي، فيما أعطت بقية الأنواع البكتيرية (*Staph.aureus* ، *Acinetobacter freundii* ، *E.faecalis* ، *Serratia marscenes*) نسبة عزل متساوية (3.84%)، في حين كانت نسبة عزل بكتريا *Staph.epidermidis* (1.92%)، ولقد أختبرت الفعالية التضادية لستة أنواع من بكتريا المعززات الحيوية *Probiotics* تجاه عزلات بكتريا *P.mirabilis*، أظهرت النتائج امتلاك جميع أنواع المعززات الحيوية للفعالية التثبيطية ضد عزلات البكتريا وبأقطار تثبيط متباينة، والتي كشفت أن أعلى فعالية تثبيطية كانت لبكتريا المعزز الحيوي *L.delbruckii* وبمعدل قطر تثبيط (21.6) ملم فيما أظهرت بكتريا *L.acidophilus* أنها أقل أنواع المعززات الحيوية فعالية تجاه بكتريا *P.mirabilis* وبمعدل قطر تثبيط (15.1) ملم

المقدمة

مرض حصى الكلى Kidney stone disease أو التحصي الكلوي Nephrolithiasis مشكلة عالمية شائعة والتي تصيب حوالي (10 – 6% من مجموع السكان [1]، إن مرض حصى الكلى هو من أكثر الاضطرابات (الاختلالات) البولية شيوعاً والذي يصيب الرجال والنساء على حد سواء وينتشر بشكل عالي بين الرجال [2]، إذ إن أكثر من 5% من النساء الأمريكيات و12% من الرجال تتطور لديهم حصى الكلى خلال فترة معينة من حياتهم [3])، *Proteus mirabilis* وهي بكتريا عصوية الشكل سالبة كرام، تقع ضمن العائلة المعوية Enterobacteriaceae وهي ممرضات انتهازية ومعروفة جيداً بحركتها السطحية المتعددة الخلايا والتي يطلق عليها العج Swarming [4]. تتضمن المضاعفات الخطيرة التي تظهر من الإصابة بالتهاب المجاري البولية تكوين حصاة المثانة bladder والكلية kidney Stones، انسداد القسطرة بسبب تكوين الغشاء الحيوي Biofilms وتجرثم الدم bacteremia [5].

المعززات الحيوية هي كائنات مجهرية صديقة تمنح فائدة صحية للمضيف من خلال تحسين التوازن الميكروبي للأمعاء [6]، تستعمل عادة أنواع بكتريا حامض اللاكتيك Lactic acid bacteria (LAB) معززات حيوية probiotic لاسيما أنواع بكتريا *Lactobacillus* بسبب خصائصها المفيدة و دورها الهام في الحفاظ على البيئة المعوية وتحفيز النظام المناعي للمضيف[7].

إن المميزات النافعة للمعززات الحيوية كمقاومة للمضادات الحيوية هو قابليتها على البقاء حية خلال المعالجة بالمضادات الحيوية وتمنح فائدة كبيرة للمرضى الذين يعانون من انخفاض الفلورا الطبيعية للأمعاء الناجمة عن تناول المضادات الحيوية [8] أذ إن استخدام العقاقير ونظم الحمية لعلاج والوقاية من حصى الكلى حتى الآن لم تسفر عن الكثير من النجاح، وذلك لأسباب عديدة منها الطبيعة المتكررة لهذه الاخماج [9]، إضافة إلى أن العقاقير المستخدمة لعلاج حصى الكلى لها تأثيرات جانبية خطيرة والتي قد تؤدي إلى حدوث أذى في كل من الكلى والحالب، من ذلك دعت الحاجة إلى إيجاد بدائل علاجية لمرضى حصى الكلى، بدون استخدام العقاقير الدوائية أو الجراحة لذلك فان المعالجة ببكتريا المحللة للاوكزالات يمكن أن تكون خياراً علاجياً بديلاً لعلاج مرض حصى الكلى[10] وحيث أن 80 – 60% من الحصيات الكلوية هي مكونة من اوكزالات الكالسيوم [12,11].

المواد وطرائق العمل

تضمنت الدراسة جمع العينات من (68) مريض من المصابين بحصى الكلى الذين اخضعوا لجراحة رفع الحصى الكلوية في مستشفى تكريت التعليمي والمستشفيات الاهلية في مدينة تكريت للفترة من شهر نيسان 2012 الى شهر ايار 2013 واللذين تراوحت اعمارهم من 3–70 سنة، وقد نقلت الحصى من داخل صالة العمليات الجراحية بأستعمال أدوات نظيفة ومعقمة ثم وضعت في عبوات زجاجية او بلاستيكية نظيفة ومعقمة وبحجم مناسب للحصوة ، غسلت الحصاة بالماء المقطر المعقم (D. W) أربع مرات على الأقل لأزالة المخلفات الملتصقة بها من دم ومخاط وغيرها، تم أجراء الزرع البكتيرلوجي لمسحوق الحصاة

وذلك بأخذ جزء من المسحوق ثم تم وضعه في وسط مرق نقيع القلب والدماغ السائل Brain heart infusion broth، لغرض تنشيط نمو البكتريا في حالة وجودها، حضنت بعدها هوائيا بدرجة حرارة37مْ لمدة 24 ساعة بعد التحضين اخذ بوساطة عروة ناقل loup جزء من النمو وزرعت بطريقة التخطيط في وسط اكار الدم واكار ماكونكي ثم حضنت بعدها الاطباق هوائيا بدرجة حرارة 37مْ ولمدة 24 ساعة [15, 14,13].

عزل وتشخيص العزلات البكتيرية

Bacterial Isolation and Identification

تم تشخيص المستعمرات البكتيرية مبدئياً أعتماداً على صفاتها الشكلية والزرعية على الأوساط الزرعية والمتضمنة حجم ولون وحافات وأرتفاع المستعمرات وقدرتها على تخمير سكر اللاكتوز وقدرتها على أنتاج المادة المخاطية وأنتاج الهيمولايسين، كما تم التركيز على المستعمرات التي تميزت بظاهرة التموج (الانثيال) Swarming phenomenon على وسط اكار الدم التي تسببها انواع جراثيم المتقلبات، كما تم ملاحظة صفات الخلايا تحت المجهر بعد تصبيغها بملون كرام، ثم أجراء الأختبارات الكيموحيوية أعتماداً على مصنف بيركي [16]، وعلى وفق المخطط التشخيصي الذي يتضمنه [17] بعدها أستخدمت عدة التشخيص API E 20 System لغرض التشخيص النهائي للعزلات.

الاوساط الزرعية المستخدمة في الدراسة:

الاكار المغذي Nutrient Agar، المرق المغذي Nutrient broth، وسط أكار الدم الأساس Blood Agar base ، وسط أكار ماكونكي MacConkey Agar ، وسط اكار اليوريا Urea Agar ، وسط ماء الببتون Peptone Water Medium ، وسط سترات السايمون Simmon Citrate Medium، وسط اكار ثنائي السكريات مع الحديد Kligler Iron Agar ، وسط الايوسين أزرق المثيلين Eosine Methylene blue(EMB)، وسط MRS السائل MRS broth

دراسة الفعالية التضادية للمعززات الحيوية تجاه بكتريا *Proteus mirabilis* خارج الجسم الحي

تم دراسة الفعالية التضادية لستة انواع من بكتريا المعززات الحيوية(*Lactobacilli casie*، *Streptococcus thermophilus*، *Lactobacillus delbrueckii* ، *Lactobacillus acidophilus*، *Bifidobacterium bifidum*، *Bifidobacterium longum*) (التي تم الحصول عليها من جامعة عين الشمس/ مصر وكلية الزراعة – جامعة تكريت) تجاه بكتريا *Proteus mirabilis* قيد الدراسة بأستخدام طريقة الأنتشار في الحفر Well diffusion method [18] وكما يلي:-

1- زرعت عزلات بكتريا *P.mirabilis* في مرق Brain heart infusion broth وحضنت لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37 م.

2-لقح وسط MRS-broth بعزلات بكتريا المعززات الحيوية كلاً على حدى ثم حضنت لاهوائيا لمدة 48 ساعة بدرجة حرارة37مْ.

3-نبذت انابيب المزروع بالمنبذة بسرعة 6000 دورة / دقيقة ولمدة 20 دقيقة، أخذ الراشح الذي عقم بمرشحات غشائية Millipore filter (0.45) وأهمل الراسب.

4 – حضر عالق بكتيري من بكتريا *Proteus mirabilis* من المزروع وبتركيز 1.5×10 خلية بكتيرية /مل (قورنت عكورته مع عكورة محلول ماكفرلاند القياسي).

5-اخذ (0.1) مل من عالق بكتريا *Proteus mirabilis* (بتركيز 1.5× 10^8 خلية بكتيرية /مل)، ثم نشر على سطح اطباق مولر – هنتون Muller-Hinton agar بأستعمال مسحة قطنية معقمة Cotton Swab بثلاث أتجاهات مختلفة مع تدوير الطبق بزاوية 60 لكل أتجاه ، ثم تركت الأطباق لتجف بدرجة حرارة الغرفة لمدة 15 دقيقة .

6- أستخدم ثاقب فليني معقم لعمل حفر بقطر (5 × 5ملم قطر) على سطح أطباق المولر – هنتون المزروع ببكتريا الـ*Proteus mirabilis*.

7- تم اضافة (0.1) مل من راشح عزلات بكتريا المعززات الحيوية الى الحفر ثم حضنت الاطباق بدرجة حرارة 37مْ ولمدة 24 ساعة تحت ظروف قليلة التهوية Microanaerobic باستعمال Candle Jar.

8- سجلت النتائج وذلك بقياس قطر منطقة تثبيط النمو حول الحفر بالمليمتر مقارنة بحفرة معاملة السيطرة المضاف اليه وسط MRS broth فقط.

النتائج والمناقشة

تم في هذه الدراسة جمع العينات من (68) مريض من المصابين بحصى الكلى والذين أخضعوا لجراحة رفع الحصى الكلوية في مستشفى تكريت التعليمي والمستشفيات الأهلية في مدينة تكريت وللفترة من شهر نيسان 2012 إلى شهر آيار 2013 وقد توزع مرضى حصى الكلى بين 24 حالة لدى الإناث بنسبة (35.29)% و 44 حالة لدى الذكور بنسبة (64.71)% كما موضح في الشكل (1). مما يعني أن نسبة الإصابة بالحصاة في الذكور أكثر من الأناث وبمعدل 1.83:1.

الشكل (1) النسبة المئوية للمصابين بحصى الكلى حسب الجنس

وقد اتفقت نتائج دراستنا مع نتائج دراسات العديد من الباحثين، فقد كانت مطابقة لما توصل إليه فهد [19] والتي أظهر فيها أن عدد الذكور (128) مريض يفوق عدد الإناث (75) مريض وبنسبة (1.7%) كذلك أظهرت نتائج هذا البحث تطابقاً مع ماتوصل إليه [20] من نتائج والتي أشارت فيها أن نسبة إصابة الذكور بحصاة الكلية (64%) أعلى من نسبة إصابة الإناث بالمرض (36%) ، كذلك اتفقت هذه النتيجة مع نتائج Janakiram وجماعته 2014 [21] والتي ذكر فيها أن نسبة إصابة الذكور بالحصاة (65%) تفوق نسبة الإصابة عند الإناث والتي سجلت فيها إصابة تقدر ب(35 %)، كما أن النتائج التي توصلنا إليها مقاربة جداً إلى نتائج العديد من الدراسات والتي أظهرت أيضاً هذه الدراسات ارتفاع نسبة الإصابة بالمرض لدى الذكور مقارنة بنسبة الإصابة عند الإناث، وهذا ماوجد في دراسة [22] بنسبة (63 %) ذكور و (37%) إناث .حيث يمتلك الجنس تأثيراً على تكوين حصى الكلى اذ تؤثر الظروف على الرجال أكثر من النساء [23] والذي يعزى الى التشبع العالي للأدرار عند الرجال أكثر من النساء [24] ، كذلك قد تعزى الى كتلة العضلات الكبيرة للرجال مقارنة بالنساء حيث النشاط العالي للعضلات يؤدي الى زيادة المخلفات الأيضية والميل الى تكوين الحصاة ، ومن الاسباب الاخرى هو ان القناة البولية تكون أكثر تعقيدا في الذكور منها في القناة البولية للأناث [25].

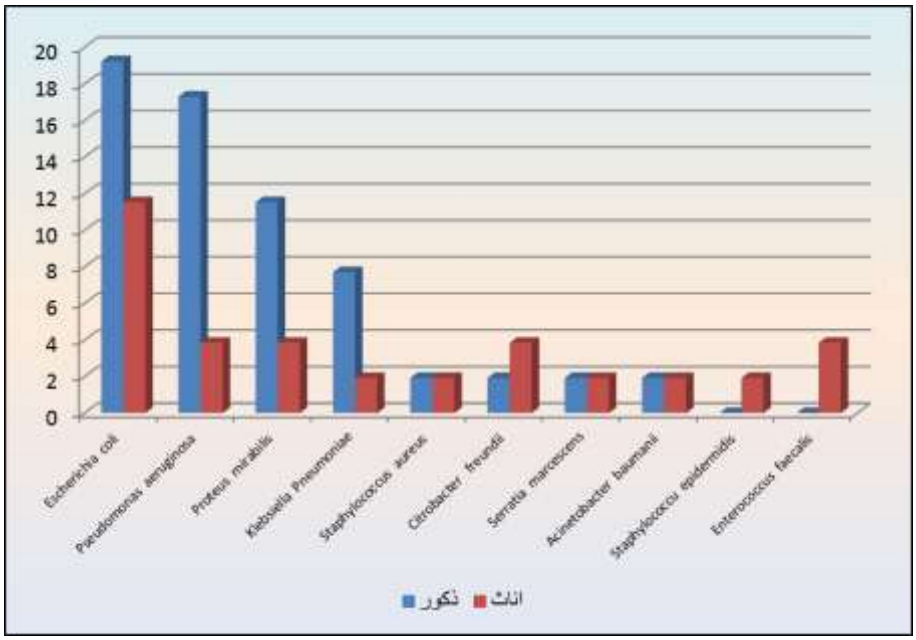
عزل وتشخيص البكتريا Isolation and identification of bacteria

تم تشخيص المستعمرات البكتيرية مبدئياً أستناداً إلى صفاتها الشكلية والزرعية على الأوساط الزرعية (وسط أكار الدم ، وسط أكار الماكونكي ، وسط أكار أيوسين أزرق المثيلين EMB)، والمتضمنة حجم ، شكل ولون المستعمرات ، قابليتها على تخمر سكر اللاكتوز على الوسط التفريقي أكار الماكونكي، قدرتها على إنتاج المادة المخاطية Mucous Colony ، إنتاج الهيمولايسين Hemolysin، وقد تم التأكيد على ظهور ظاهرة الأنثيال Swarming على وسط أكار الدم وكذلك رائحتها المميزة على هذا الوسط التي تشبه رائحة السمك (كونها من الخصائص المميزة لجنس المتقلبات) [27,26] ، كما استخدمت الاختبارات (الفحوصات) الكيموحيوية Biochemical test في تشخيص العزلات التي تم تشخيصها مظهرياً وعلى وفق ماجاء في المخطط التشخيصي الذي تضمنه [28,17,16].،كما استخدمت عدة التشخيص API –20E لتأكيد التشخيص.

وبينت نتائج عزل البكتريا من عينات الحصى الموجبة باعتماد الفحوصات الشكلية والكيموحيوية عزل كل من البكتريا الموجبة لليوريز (*K.pneumoniae, P.mirabilis, Ps.aeruginosa, Citrobacter. freundii, Staph.aureus, Staph. epidermidis*)، وأنواع من البكتريا السالبة اليوريز (*E.coli, S.macescens , Acinetobacter. Baumanii , E.faecalis*)، وبنسب عزل مختلفة وكما موضح في الشكل(2)، فقد أظهرت بكتريا *E.coli* بانها النوع البكتيري الأكثر عزلاً من الحصاة (16) عزلة وبنسبة عزل (30.76%) من مجموع العينات الكلي الموجبة الزرع البكتيري (52) عينة. تليها بكتريا *Pseudomonas .aeroginosa* بنسبة (21.22%) اي بعدد (11) عزلة ، وبكتريا *Proteus mirabilis*. بنسبة عزل (15.38)% بواقع (8) عزلات ومن ثم بكتريا *Klebsiella .pneumoniae* بنسبة عزل 9.5%. بعدد(5)، كما أظهرت بكتريا *Citrobacter .freundii* نسبة عزل 5.76% من مجموع عينات الموجبة الزرع البكتيري وبعدد(3) عزلات، فيما أظهرت كل من بكتريا *Staph .aureus* ، *S.macescens* ، *Acinetobacter. Baumanii , E.faecalis*، نسب عزل متساوية (3.84%) وبواقع (2.) عزلة لكل منها، كما أظهرت بكتريا *Staphylococcus aureus* بأنها أقل الأنواع البكتيرية عزلاً من الحصى وبنسبة عزل لاتتجاوز 1.92% ، ان هذه النتائج تتفق مع نتائج دراسة Janakiram والاخرون [21] الذي أظهر فيها أن بكتريا *E.coli* هي النوع البكتيري الأكثر عزلاً من الحصاة بنسبة (38.09%) تليها بكتريا *Pseudomonas .aeroginosa* بنسبة (33.3%) ومن ثم بكتريا *Proteus. mirabilis* بنسبة عزل *Klebsiella.pneumoniae* (11.9%) فيما بلغت نسبة عزل بكتريا (9.52%) كذلك أظهرت نتائج هذا البحث تقارباً مع نسبة عزل بكتريا *Enterococcus.facalis* (4.76%) ، كما اتفقت مع نتائج هذا البحث التي أظهرت أن بكتريا Coagulase Negative *Staphylococcus* بأنها النوع البكتيري الأقل عزلاً من الحصاة بنسبة (2.38%) ، كذلك اتفقت نتائج هذا البحث أيضاً مع الدراسة التي أجريت من قبل Alkadasi [29]، والتي احتلت فيها بكتريا *E.coli* نسبة عزل عالية (71%) مقارنة بنسب عزل الأنواع البكتيرية الأخرى من العائلة المعوية والتي عزلت فيها بكتريا *P.mirabilis* بنسبة (12%) تليها بكتريا *Klebsiella* بنسبة عزل 7%.

في حين كانت نتائج هذا البحث غير متفقة مع ماتوصل اليه Kore [30] من نتائج والتي أظهرت فيها بكتريا *Pseudomonas .aeroginosa*. نسبة عزل عالية (41.66%) مقارنة بنتائج هذا البحث ، في حين سجلت بكتريا *E.coli* نسبة عزل أقل بكثير مما توصلنا اليه من نتائج والتي ظهرت بنسبة (16.66%) في حين أظهرت نتائج الباحث نسبة عزل أعلى لبكتريا *Klebsiella .pneumoniae* (16.66%) ، أما في بكتريا *P.mirabilis* فقد عزلت بنسبة (8.33%) وهي أقل بكثير من نتائج هذا البحث، في حين أظهرت بكتريا *Citrobacter freundii* أنها ذات نسبة عزل أعلى بكثير من نتائج هذا البحث (8.33%) ، وهذا ينطبق أيضا على بكتريا Cougulase Negative *Staphylococcus* التي ظهرت بنفس نسبة العزل (8.33%) والتي لم تتفق مع نتائج هذا البحث التي اظهرت فيها نسبة عزل قليلة جدا لم تتجاوز (1.92%) ، كذلك لم تتفق النتائج التي حصل الباحث [19]، والتي أظهر فيها أن بكتريا *P.mirabilis* هي البكتريا ذات النسبة وجود الأعلى من باقي الأنواع

البكتيرية *Staphylococcus aureus* ، *E.coli* ، *P.mirabilis* ، *Citrobacter.freundii* ، *K.peumoniae* بنسب عزل متفاوتة (3.44، 2.95 , 2.46 , 2.46 , 0.98 على التوالي.



الشكل (2) النسبة المئوية للبكتريا المعزولة من الحصى حسب الجنس

4–الفعالية التضادية لأنواع المعززات الحيوية تجاه بكتريا *P.mirabilis*

إن انتشار الممرضات المقاومة للعقاقير هي واحدة من أكثر التهديدات خطورة لنجاح المعالجة للأمراض المايكروبية [31] ، حيث الاستخدام الواسع للمضادات الحيوية تساعد في تطور المقاومة للمضادات الحيوية ، وتعد بكتريا *P.mirabilis* من البكتريا الحساسة للمضادات الحيوية،ولكن الاستخدام العشوائي لمضادات البيتالاكتام والأمينوكلايكوسيدات aminoglycosides وغيرها من أنواع المضادات الحيوية الأخرى ، أدى الى ظهور سلالات مقاومة لهذه المضادات الحيوية ووفقاً لمنظمة الصحة العالمية (W.H.O)، فان غالبية سكان العالم تعتمد على الطب التقليدي للمعالجة الصحية الأولية [32] ، وتعرف العوامل ضد المايكروبية المنتجة من قبل حامض اللاكتيك بـ Lantibiotics [31]، لذا أختبرت في هذه الدراسة الفعالية التضادية لستة أنواع من المعززات الحيوية (*Casie* ، *Lctobacilli* *Streptococcus thermophilus*، *Lactobacillus delbrueckii* ، *Lactobacillus acidophilus* ، *Bifidobacterium bifidum* ، *Bifidobacterium longum*)، تجاه عزلات بكتريا *P.mirabilis* باستخدام طريقة الانتشار في الحفر Well diffusion method .

لقد أظهرت نتائج الدراسة والموضحة في الجدول (1) قابلية جميع أنواع المعززات الحيوية المستخدمة في الدراسة على إظهار فعالية تثبيطية تجاه عزلات بكتريا *P.mirabilis* ، وكذلك بينت النتائج أن هناك تباين في التأثير التثبيطي لأنواع المعززات الحيوية تجاه بكتريا *P.mirabilis*، حيث أظهرت بكتريا المعزز الحيوي *L.delbrueckii* أعلى فعالية تثبيطية تجاه بكتريا *P.mirabilis* و بقطر تثبيط (21.6) ملم . فيما أظهرت بكتريا المعزز الحيوي *L.acidophilus* أقل أنواع بكتريا المعزز الحيوي فعالية تجاه بكتريا *P.mirabilis* وبقطر تثبيط (15.1) ملم. ، فيما أظهرت المعززات الحيوية (*L.casei* , *S.thermophilus, Bifido, Bifidum,Bifido. Longum*) أقطار تثبيط (18.87,17.3, 17.8 , 15.6) ملم على التوالي ، كذلك كشفت النتائج الواردة في الجدول (1) أن بكتريا *L.acidophilus* أنتجت أعلى فعالية تثبيطية تجاه بكتريا *P.mirabilis* قياساً بالأنواع الأخرى للمعززات الحيوية وبقطر تثبيط يصل إلى (25) ملم .

بينما أظهرت سلالتين لبكتريا *P.mirabilis* مقاومة واضحة تجاه بكتريا *L.acidophilus* حيث لم يظهر أي تأثير تثبيطي للمعزز الحيوي تجاه العزلتين (4,5) من بكتريا *P.mirabilis*. وبمقارنة نتائج دراستنا مع دراسات العديد من الباحثين وجد أن هناك تطابقاً بين نتائج هذا البحث ونتائج الكثير من الدراسات، حيث اتفقت النتائج التي تم الحصول عليها مع ماتوصلت إليه الباحثة [33] من نتائج والتي أظهر فيها الفعالية التثبيطية للمعزز الحيوي *L.acidophilus* تجاه بكتريا *P.mirabilis* وبقطر تثبيط (13.5) ملم والتي أوضح فيها أن الفعالية التضادية لـ *L.acidophilus* يعود إلى إنتاجها acidophillin [33]، كما اتفقت نتائج الدراسة مع ما توصل إليه [36,35]، حول الفعالية التثبيطية للمعزز الحيوي على بكتريا *P.mirabilis* والتي ظهرت بقطر تثبيطي (18) ملم،(18.5) ملم على التوالي، والتي كانت مقاربة لنتائج دراستنا التي أظهرت أن البكتريا *L.acidophilus* ذات قطر تثبيطي (15.1) ملم تجاه بكتريا

P.mirabilis ، فيما أظهرت دراستنا أن الفعالية التضادية لـ *L.acidophilus* أقل بكثير مما توصل إليه [37]، والتي كشف فيها الفعالية التضادية العالية للمعزز الحيوي ضد بكتريا *P.mirabilis* ذات قطر تثبيط يصل إلى حوالي (25) ملم إذ أظهر المعزز الحيوي فعالية تثبيط بهذا القطر (25) تجاه عزلة واحدة فقط لبكتريا *P.mirabilis* [38] فقد وجد في الكثير من الدراسات أن قابلية تثبيط جراثيم العصيات اللبنية تختلف كفاءتها باختلاف نوع العزلة، وهذا يعود إلى الاختلاف في نواتج الأيض لهذه الجراثيم والتي لها الدور الرئيسي في تثبيط الجراثيم الممرضة [39]، كما أظهرت نتائج دراستنا حول التأثير التثبيطي للمعزز الحيوي *L.casei* تجاه بكتريا *P.mirabilis* تطابقاً مع ماتوصل إليه [40] ، من نتائج والتي أظهر فيها تأثيراً تثبيطياً مطابقاً لدراستنا وبقطر تثبيط يقدر بحوالي (18) ملم.، والتي فيها أظهرت نتائج هذا البحث أنها ذات قطر تثبيط (18.87) وهي أقل بكثير مما توصل إليه الباحث Ahmed [37] والتي أظهرت فيها بكتريا المعزز L.casei أنها ذات قابلية تثبيطية عالية تجاه البكتريا وبقطر تثبيط يصل إلى (28) ملم. كما كانت نتائج هذا البحث اعلى مما وصل اليه الباحثين Mobolaji and Wuraola من نتائج [38] ، حيث لم يتجاوز فيها قطر التثبيط للمعزز الحيوي تجاه البكتريا (13) ملم، كذلك أظهرت نتائج هذا البحث تطابقاً مع ما أكده [38] من نتائج والتي أشار فيها إلى امتلاك بكتريا *S.thermophilus* فعالية تثبيطية تجاه بكتريا *P.mirabilis* وبمعدل قطر تثبيط (17) ملم والتي أظهرت تطابقاً نتائج هذا البحث بقطر تثبيط يبلغ حوالي (17.3) ملم، وفيما يتعلق بتأثير بكتريا (*Bifido. Bifidum, Bifido. Longum*) تجاه بكتريا *P.mirabilis* فقد كانت نتائج هذا البحث التي أظهرت فعالية بقطر تثبيط (17.8)، (15.6) ملم على التوالي مقاربة مع ماتوصل إليه الباحث Salman [41] من نتائج والتي أكد فيها امتلاك جنس *Bifido. bacterium* للفعالية التثبيطية تجاه بكتريا *P.mirabilis* بقطر تثبيط يبلغ حوالي (15) ملم، فقد وجد أن عدة سلالات من بكتريا *Bifido bacterium* تنتج مركبات شبيهة بالبكتيريوسين bacteriocin-Like Compound وتكون سامة لكلا البكتريا الموجبة والسالبة لكرام [42]، وهذا يتوافق مع ماتوصل إليه الباحثين Meera and Devi [43] من أن البكتيريوسين Bacteriocin الذي تنتجه جنس *Lactobacillus Spp* تثبط نمو العديد من البكتريا المرضية بضمنها بكتريا *P.mirabilis* ، كذلك أظهرت العديد من الدراسات تطابقاً مع نتائج هذا البحث حول الفعالية التضادية لبكتريا حامض اللاكتيك تجاه بكتريا *P.mirabilis* ومنها دراسة الباحثين Umasankari and Sekar [44] حول الفعالية التضادية لبعض أنواع من بكتريا حامض اللاكتيك والتي أظهرت أقطار تثبيط مختلفة تجاه البكتريا يتراوح بين (8.8–12.1) ملم، وهذا أيضا ما أكده Dini وجماعته [45] من إمتلاك أنواع جنس *Lactobacilis* لفعالية تضادية تجاه البكتريا وبأقطار تثبيط مختلفة، كما كشف [46]، أن إنتاج المواد المثبطة من قبل LAB تعتمد على الوسط المستخدم للنمو، كذلك وجد أن 80 Tween يحث إنتاج البروتينات (bacteriocins) من خلال زيادة نشاط البكتريا. حيث أن قابلية بكتريا حامض اللاكتيك LAB على تثبيط نمو البكتريا معروفة ووفقاً لـ [47] ، فان *Lactobacillus* تتمكن من التنافس مع البكتريا الممرضة عندما تنمى سوياً ولكن درجة التثبيط تعتمد على السلالة البكتيرية.

حيث يعزى التأثير التثبيطي خارج الجسم in vitro للسلالات المتعددة المقاومة للعقاقير Multiple drug resistant strain من قبل سلالات المعززات الحيوية إلى إفراز هذه الأحماض العضوية وبشكل أساسي حامض اللاكتيك والذي يسبب خفض PH الوسط والذي يعد بيئة غير مفضلة لنمو البكتريا [48].وتعزى التأثيرات ضد المايكروبات من قبل بكتريا حامض اللاكتيك Lactic acid bacteria (LAB) إلى إنتاجها حامض اللاكتيك والأحماض العضوية التي تؤدي إلى خفض الـ PH الذي يعمل على إذابة الدهون ويجعلها قابلة للانتشار من خلال غشاء الخلية إلى السايتوبلازم [48]، كذلك أنتاجها لـ acetaldehyde ، بيروكسيد الهيدروجينH_2O_2 diacetaldehyde ,CO_2, متعدد السكريات polysaccharide[51,50,49]، وللبكتيريوسيات bacteriocins ومواد شبيهة بالبكتيريوسين bacteriocins-Like Substanse ومن المحتمل biosurfactants والتي تكون فعالة ضد ممرضات معينة وتنتج من قبل أنواع مختلفة من Lactobacillus [52] . ، حيث يعد البكتيريوسين المنتج من قبل بكتريا حامض اللاكتيك بروتينات فعالة حياتياً ، قاتلة للبكتريا bacteriocillus وتتفاعل مع مواقع ارتباط معينة على البكتريا الحساسة [40] ، فبالإضافة إلى منع الممرضات من الاستيطان فان المعززات الحيوية تخلق بيئة غير مفضلة للنمو من خلال إنتاج الأحماض الدهنية، حامض اللاكتيك والخليك وكذلك فان المعززات الحيوية تتفاعل مع التوكسينات والذيفانات) التي تنتجها الممرضات [53].

كما يظهر حامض اللاكتيك تأثيرات ضد الميكروبات من خلال التداخل مع ثباتية غشاء الخلية، تثبيط النقل الفعال ووظائف أيضية متنوعة [54]، وتكمن أهمية co_2 (الناتج الرئيسي لتخمر بكتريا حامض اللاكتيك المتغايرة التخمر) في كونه يسهم في الفعالية التضادية لبكتريا حامض اللاكتيك من خلال إيجاد بيئة لاهوائية ويعمل على تراكم Co_2 في أغشية الخلايا البكتيرية وبالتالي إحداث خلل في عملية التنافس [55]، حيث تشير الدراسات إلى أن هذه المعززات الحيوية يشتق منها مواد ضد البكتريا والتي تظهر تأثيرات أما لوحدها أو بشكل تآزري Synergistically لتثبيط نمو الممرضات[56]، فلقد لاحظ Faylo وجماعته التأثير التآزري Synergistic effect لحامض اللاكتيك الذي تفرزه سلالات بكتريا Non- Lactic acid على البكتريا السالبة كرام ،حيث يزيد حامض اللاكتيك من نفاذية

الغشاء الخارجي للممرضات السالبة كرام والذي يجعلها أكثر حساسية لنشاط الجزيئات ضد الميكروبية[57].

جدول (1) الفعالية التضادية لراشح بكتريا المعزلات الحيوية تجاه بكتريا *P.mirabilis* بقياس قطر منطقة التثبيط (ملم).

رقم عزلة بكتريا *P.mirabilis*	قطر منطقة التثبيط (ملم) بكتريا المعززات الحيوية					
	Lactobacilli Casie	***Streptococcus thermophilus***	***Lactobacillus delbrueckii***	***Lactobacillus acidophilus***	***Bifido. bifidum***	***Bifido .longum***
Pro 1	20	18	22	23	18	18
Pro 2	19	19	20	18	14	17
Pro 3	18	18	21	20	20	15
Pro 4	17	16	24	-	21	16
Pro 5	19	16	23	-	16	18
Pro 6	22	17	24	25	16	13
pro 7	17	16	19	17	18	14
Pro 8	20	19	20	18	20	14
معدل قطر التثبيط	18.87	17.3	21.6	15.1	17.8	15.6

المصادر

1-Mittal, R.D and Kumar, R. (2004).Gut-inhabiting bacterium *Oxalobacter formignes*: role in calcium oxalate urolithiasis. J. Endourol. **18:** 418-424.

2-Hoe, L.W . (2007). Identification of BioMarker and Development of Screening Method for Kidney stones Disease. Msc, thesis. Universiti Sains Malaysia.

3-Moe, O.W.(2006). Kidney stones: pathophysiology and medical management . Lancet , 367: 333-344.

4-Morgenstein, R. M., B. Szostek, and P. N. Rather.(2010). Regulation of gene expression during swarmer cell differentiation in Proteus mirabilis. Microbiology reviews 34:753-763.

5-Aquilini, E.(2012). Lipopolysaccharide (LPS) core biosynthesis in proteus mirabilis. Ph.D. University Barcelona

6-Reid, G., Sanders, M.E., Gaskins, H.R., Gibson, G.R., Mercenier, A., Rastall, R.A., Roberfroid, M.B., Rowland, I., Cherbut, C and Klaenhammer, T.R. (2003). New scientific paradigms for Probiotics and Prebiotics .J. Clin .Gastroenterol. 37:105-118.

7-Reid, G.(1999).The Scientific Basis for Probiotic Strains of Lactobacillus. Appl. Environ. Microbiol. 65:3763-3766.

8-Cebeci, A and Gürakan, C.2003. Properties of potential probiotic Lactobacillus plantarumstrains Food Microbiol . 20:511-518.

9-Magwira, C.A.(2008). Molecular diversity of faecal *Lactobacillus* species in stone-free black and white South African population groups and their possible role in kidney stone disease. Ph.D. University of Cape Town

10-Kabanda, S.M .(2010). Evaluation Oxalate – Degrading Lactobacillus Spp for their ability to be used as Probiotics in the treatment of kidney stone disease. Msc .Thesis. University of Cape Town.

11-Ruda JM, Hollenbeak CS, Stack BC Jr. (2005). A systematic review of the diagnosis and treatment of primary hyperparathyroidism from 1995 to 2003

12-Chattopadhyay N. (2006). Effects of calcium-sensing receptor on the secretion of parathyroid hormone – related peptide and its impact on humoral hypercalcemia of malignancy. Am. J.Physiol Endocrinol Metab ; 290(5): E761-770.

13-Gault, M. H; Longerich L. L; Crane G; Cooper R; Dow D; Best, L; Stockall, E; Brown, W. (1995). Bacteriology of urinary tract stones. J. Urol.; 153: 1164-1170.

14- **Dewan** B., Sharma M., Nayak N., and Sharma S. K. (1997). Upper urinary tract stones and ureaplasma urealyticum. J. Med. Res. 107: 15-21.

15-Bratell S., Brorson J. E., Grenabo L., Hedelin H., and Petterson S: Thebacteriology of operated renal stones. Eur. Urol., 1990; 17: 58-61.

16-Holt, J.G; Krieg, N .R, Sneath, P.H.A, Staley, J.T; Williams, S.T. (1994). Bergey^{s} manual of determinable bacteriology 9th ed. William and Wilkins, Baltimore.

17-Mahon, C; Manuselis, G. (2001). Text book of Diagnostic microbiology 2nd edition. W. B. Saunders Company.

18-Blomberg, L. A; Henriksson, M and Conway, P. L .(1993). Ihibition of adhesion of *E.coli* K88 to piglet ideal mucus by lactobacillus spp . App . Environ . Microbiol . 59:34- 39

19- فهد, حارث جبار . (2001). دراسة الجراثيم المرافقة لحصى الكلية. اطروحة دكتوراه، كلية العلوم، قسم علوم الحياة، جامعة بغداد/ العراق.

20- السعدون ، رشا نزار حسون عبد الله. (2005). دور جراثيم *Proteus* في تكوين الحصى الكلوية والتهابات المجاري البولية. رسالة ماجستير. كلية العلوم، جامعة الموصل / العراق.

21-Janakiram,B; SuniTha, T; BaBu, M,R; Swapna, G; Sekhar, B.C and Bondii. J.S. (2014). Etiology of Urolithiasis from South Indian population: correlation of Recurrence and antibiotic Resistance to Biofilm production capabilities of uropathgenic Microbes.

22-Gurau ,G., Dobre, M., Paula, P., Matei, M,N., Lupoae, M., Voinescu, D.C. (2014) .Evalution of the chemical composition of Renal Stones. Analele Universitais "Dunarea Dejos" Galati Medicina .(1) : 111-118.

23- Bergsland, K.J; Kinder, J.M; Asplin, J.R; Coe, B.J and Coe, F.L.(2002). Influence of gender and age on calcium oxalate crystal growth inhibition by urine from relatives of stone forming patients. J. Urol. 167: 2372-2376.

24-Parks, J.H; Coward, M and Coe, F.L.(1997). Correspondence between stone composition andurine supersaturation in Nephrolithiasis. Kidney Int. 51:894-900.

25-Ryall, R.L; Harnett, R.M; Hibberd, C. M; Mazzachliu , R.D .and Marshal,V. R .(1987).Urinary Risk Factors in Caox stone disease , Comparison of men and women .Br . J .Urol ., 55:480-488

26-Alexander, S.K and Srete, D. (2001). Microbiology "Aphotographic atlas for the laboratory" Benjamin Cummins, an imprint of Addison Welsey Longman , Inc.pp

27- Collee, J. G; Fraser AG, Marmion, B.P; Simmons, A. (1996). "Mackie and McCartney Practical Medical Microbiology". 14th ed., Churchill Livingstone, New York. p. 413-423.

28-Koneman, E; Allen, S; Tanda, W; Procop, G; Schreckenberger, P; Woods, G . (2006). Koneman's color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 6ed. Washington winn, Jr. United states of America.

29-Alkadasi, M,N., A- Ameri., G.A., Hansh, S., Ali, W.A.M., Naji, A.S. ,Saif, N.A., Alsami, A and Zaid, A.A. (2014). Incidence of rend stone disease among Urinary Tract infection Patients and antimicrobials Susceptibilty Pelagia Research Library .Adv. Appl. Sci Res., 5(3): 309-314 .

30- Kore, A.T., Singh, G and pawar, S.G. (2013). Bacteriological Profile of urine in Patients with Urinary Calcoli.3(8) : 600- 601.

31--Amdekar, S; Dwivedi, D; Roy, P; Kushwah, S and Singh, V. (2010). Probiotics: multifarious oral vaccine against infections traumas. Immunology and medical microbiology (59): 299-307.

32-Seenivasan, P; Manickkam, J and Savarimuthu, I. (2006). In vitro antibacterial activity of some plant essential oils . BMC Complementary and Alternative Medicine. 6,39.

33-Aziz, Z. Z. (2004). Using Lactic acid bacteria to encounter the pathological effect of *Proteus mirabilis* on the gastrointestinal tissue of mice. thesis, college of science, University of Al- Nahrain , Iraq .

34-Gilliland S, E and Speck, M. L.(1972). Interaction of food starter cultures and food born pathogens: Lactic Streptococci versus , Staphylococci sp and Salmonella spp. Miller food technol . 35 (5): 307-310

35-Al- Jeboury , G.H.A. (2010). In vitro and in vivo study of Probiotics Effect of Lactobacillus acidophilus on pathogenecity of *Proteus mirabilis* Isolated from urinary tract infection (uti). J. Bacteriology. Vol 4, 2: 53-63.

36-Al- Shebani, A.W.B. and Al-Jebouri, G. H.(2008). Using Lactobacillus as Probiotic to inhibit growth and adhesion of Proteus mirabilis causing urinary tract infection. Biotechnology Research center / Al –Nahrain University. 2: 19-31

37-Ahmed, A. A. (2013). In vitro screening of Lactobacillus species from Homemade Yoghurt for Antagonistic Effects against common bacterial pathogens . Jourdan Journal of Biological Sciences , 6 : 211-216.

38- Mobolaji, O. A and Wuraola, F. O. (2011). Assessment of the antimicrobial activity of Lactic acid bacteria Isolated from two fermented Maize products – ogi and Kunnu – Zaki . Malaysian Journal of Microbiology. 7(3): 124-128.

39-Falahee, M.B; Adams, M.R; Dale, J.W and Morris, B.A. (1990). An enzyme immune assay for nisin. Inter. J. food . Tech ; 25: 590-595.

40-Cadirci,. H. and Citak, S. (2005). Acomparison of two BMethods used for Measuring Antagonistic Activity of lactic acid bacteria. Pakistan. J. Nut. 4(4): 237-241

41-Salman, J.A.S. (2008). Synbiotics Effect of Probiotic (Bifidobacterium) and Prebiotics (Chicory and Inulin) against some pathogenic bacteria . Um – Salama Science Journal . 6(2): 354-360.

42- Collado , M. C; Hernandez, M and Sanz, Y. (2005). Production of bacteriocin like inhibitory compounds by Human fecal Bifidobacterium strains . J. Food . prot . 68: 1034-1040.

43-Meera, N. S and Devi, M. C. (2012). Partial characterization and optimization of parameters for Bacteriocin production by probiotic Lactic acid bacteria. J. Microbiol. Biotech . Res . 2(2): 357-365.

44-Umasankari, I and Sekar, C.(2015). Antagonistic Activity of Lactobacillus Against UTI pathogens. American Journal of Pharmacy and Health Research . 3(1): 284-291.

45-Dini, P; Amarloie, O. A; M oghadam, M.F and Moosakhani, F. (2012). The comparison of Antagonistic Effect of normal vaginal Lactobacilli and some commonly used Antibiotics on Isolated bacteria of uterine infections in Dairy cows. International Journal of Animal and veterinary Advances. 4(6): 358-362.

46-Garuer, K. I and Muriana, P.M. (1994). Purification and amino acid sequence curvaticin. Fs 47, aheat–stable Bacteriocin produced by Lactobacillus Fs 47 . Appl –environ . Microbiol . 60: 2191-2195.

47-Hua, W; Yang, X; Yonghua, X; Feng, X and Gengpin, L. (2007). Synergistic anti digestion effect of Lactobacillus rhamnosus and bovine colostrums in simulated gastrointestinal tract, (in vitro). Applied Microbiology and Biotechnology . 75, 619 -626.

48-Marianelli, C; Cifani, N; Pasquali. p .(2010). Evaluation of antimicrobial activity of Probiotic bacteria against Salmonrlla enterica subsp .enterica

serovar typhimurium 1344 in acommon medium under different environmental codition, Res Microbiol; 161(8): 673-680.
49-Rodríguez, E., J.L. Arqués, R. Rodríguez, M. Nuñez, M. Medina. 2003. Reuterin production by lactobacilli isolated from pig faeces and evaluation of probiotic traits. Lett. Appl. Microbiol. 37: 259-263
50-De Vuyst, L., B. Degeest. 1999. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. FEMSMicrobiol. Rev. 23, 153-177.
51-Caplice, E and Fitzgerald, G.F. (1999). *Int. J. Food Microbiol.*, , 50, 131-149.
52-Millete, M; Luquet, F. M. and L acroix, M . (2006). In vitro growth control of selected pathogens by Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus Casei – fermented milk . Letters in Applied Microbiology, 44, 314-319.
53-Turpin, W; Humblot, C; Thomas, M; Guyot , J. (2010). Lactobacilli as multifaceted Probiotics with poorly disclosed molecular mechanism. Int . J. Food. Microbiol , 143, 87-102
54--Ross , R.P ; Morgan, S; Hill, C. (2002). Int . J. Food microbial, 79: 3-16.
.Otolaryngol . Head Neck Surg ; 132(3): 359-72.
55-Eklund . T . (1984). The effect of carbon dioxide on bacterial groth and on uptake processes in the bacterial membrane vesicles . Int . J. Food Microbiol . 1:179-185.
56-Servin, A. L. (2006). Antagonistic activities of Lactobacilli and Bifidobacteria against microbial pathogen. FEMS. Microbiol , REV . 28: 405-440
57-Faylo– Messaoud, D; Berger, C.N; Co Connier – polter, M; Lievin-Le moal, V; Servin, A.L .(2005). PH-.Lactic acid, and non lactic acid – dependent activities of Probiotic Lactobacilli against Salmonella enterica serovar typhimurium. Appl, Environ, Microbiol; 7(10); 6008-6013

Studying of antagonistic activity of some probiotics against bacteria *P.mirabilis* isolated from kidney stones

Amin S.Badawy[1] , Akeel H. Al.Assie[2] , Halah A. A. Al-Hadithi[2]
[1] *College of Agriculture , Tikrit University , Tikrit , Iraq*
[2] *Biology Departement , College of sciences , Tikrit University , Tikrit , Iraq*

Abstract
This study Included (68) grit kidneys samples collected from patients undergoing surgeryl in hospitals in Tikrit city from period between April 2012 to May 2013.
The results showed that (64.71%) of males and (35.29 %) of females were infected, the propotion of males to females (1.83: 1).
Results of biochemical tests and API-20system showed that *E.coli* and *Ps.aeruginosa* were the most frequent bacterial isolates among other isolated bacterial species with percentage (30.76%) and (21.22%), respectively, while P. mirabilis was (15.38%) followed by bacteria and *Kl.pneumoniae Citrobacter. freundii* with isolation percentage (9.6%) and (5.67%) respectively. other species such as (*Staph. aureus,, Acinetobacter. freundii, E.faecalis Serratia. marscenes*) accounted (1.92%).
Antigonstic activity of six types of probiotics against *P. mirabilis* were studied. Results showed that all probiotics types showed inhibition activity against P.mirabilis isolates and diameter of inhibition zone was highest (21.6 ml), when probiotic L. delbruckii used, while L. acidophilus showed less inhibitory activity against P. mirabilis isolate, the diameter of inhibition zone was 15.1.