الفاعلية التثبيطية لخميرة *Saccharomyces boulardii* و بكتيريا *Lactobacillus acidophilus* ضد البكتيريا الممرضة *E.coli* المعزولة من أخماج المجرى البولي المتكررة لدى النساء العراقيات خارج الجسم الحي

*ندى صباح رزوقي**   *فرح قحطان يونس**

استلام البحث 7، ايار، 2013
قبول النشر 13، اب، 2013

الخلاصة :

هدفت الدراسة إلى الكشف عن التأثير التثبيطي لكل من خميرة *Saccharomyces boulardii* وبكتريا *Lactobacillus acidophilus* في بكتريا *Escherichia coli* المعزولة من أخماج المجرى البولي المتكررة عند النساء والسائدة مقارنة بالمسببات المرضية الأخرى . درست الحساسية للمضادات الحياتية لبكتيريا *E.coli* وانتخبت العزلات الأكثر مقاومة للمضادات الحياتية . أستعملت طريقة أقراص الآكار على وسطي الآكار المغذي ، والمولر- هنتون للتحري عن الفاعلية التثبيطية لكل من خميرة *S.boulardii* بعد تنميتها على وسط YEGP ، وبكيتريا *L.acidophilus* بعد تنميتها على وسط MRS الصلب .أظهرت النتائج إن الفاعلية التثبيطية لكل منهما كانت أعلى على وسط آكار المولر- هنتون من فاعليتهما على وسط الآكار المغذي . كذلك تمت معالجة قابلية الألتصاق لبكتيريا *E.coli* لكل من خميرة *S.boulardii* (1×10^{9})خلية\مل وبكتيريا *L.acidophilus* بتركيز (1×10^{6}) خلية\مل إذ ثبطت بكتيريا *E.coli* بنسبة 72.73% و64.91 %على التوالي.إستعمل هذان التركيزان لقياس فاعلية البكتيريوسين المنتج بكتيريا *L.acidophilus* والمواد المثبطة المنتجة من خميرة *S.boulardii* على نمو بكتيريا *E.coli* وأوضحت النتائج إنعدام مستعمرات البكتيريا (48) ساعة على الحضن.

الكلمات المفتاحية : اخماج المجرى البولي المتكررة ، *Saccharomyces boulardii* ، *Lactobacillus acidophilus*

المقدمة:

تعد أخماج المجرى البولي (Urinary tract infections - UTIS) أحد أهم الأمراض الشائعة الحدوث عند النساء ويقدر معدل تطور الأصابة بنحو (60 – 40)% في مختلف الأعمار ، و نتيجة التغيرات الهرمونية المتكررة وكذلك قصر الاحليل عندهن [1] .تعرف أخماج المجري البولي المتكررة (Recurrent UTI) بأنها تكرار الاصابة بأخماج المجري البولي لمرتين او اكثر خلال مدة ستة شهور والناتجة عن مقاومة الجراثيم للعلاج او بسبب المعالجة غير الصحيحة وقد يكون تكرار حدوث الإصابة بالمسبب المرضي نفسه أو بمسبب مرضي أخر[2].تعد *Escherichia coli* من اهم الانواع الجرثومية المهمة والسائدة في احداث الاصابة باخماج المجرى البولي عند النساء وتشكل نسبة اكثر من 80% من المسببات المرضية كونها من النبيت الطبيعي داخل جسم الأنسان،تمتلك بكتيريا *E.coli* المسببة لإخماج المجرى البولي العديد من عوامل الفوعة أهمها وجود الأهلاب (fimbria) التي تمكنها من الألتصاق في البطانة الطلائية للقناة البولية ، و تمتلك هذه البكتيريا القدرة على البقاء والتجمع لمدة طويلة داخل القناة البولية للمضيف لتتمكن من تجنب الإستجابة المناعية للجسم ومقاومة المضادات الحياتية وتجعلها قادرة على احداث إصابات متكررة بأخماج المجرى البولي [3].

أدى الإستعمال الواسع للمضادات الحياتية إلى ظهور سلالات بكتيرية مقاومة مما ادى إلى صعوبة علاج العديد من الإصابات وتعد بكتريا *E.coli* واحدة من اكثر الأنواع مقاومة للمضادات الحياتية و بعد ان اصبحت مشكلة المقاومة المتعددة للمضادات الحياتية شائعة شرع الباحثون التحري عن بدائل جديدة للعلاج ، واحد اهم البدائل العلاجية هو إستعمال الأحياء العلاجية (Probiotics) للمحافظة على التوازن الجرثومي الطبيعي داخل جسم المضيف والأسراع في احداث الإستجابة المناعية [4].

تعرف الأحياء العلاجية على انها "كائنات مجهرية تساعد على عملية الهضم عندما توجد بكميات كافية داخل جسم المضيف وتعود بالفائدة على صحته [5]، أن خميرة *Saccharomyces boulardii* احد أنواع العوامل العلاجية الحية (Probiotics) كونها لا تستعمر القناة الهضمية و قد أستعملت *S.boulardii* في علاج عدد من حالات الإسهال الحاد عند الأطفال إذ تعمل على تحرير الامينات

*قسم علوم الحياة \ كلية العلوم للبنات \ جامعة بغداد

المتعددة (polyamines) التي تساعد على إصلاح الغشاء المخاطي و الخلايا المعوية و الطبقة المخاطية وفي علاج الإصابة ببكتيريا *Clostridium difficile*، و قلة خطر تكرار الإصابة مرة أخرى عند الأشخاص المصابين سابقا ، نتيجة لقابلية هذه الأنواع على البقاء حية في الحوامض المعدية وعدم تأثرها بالمضادات الحياتية و ظهور أي تأثير مضاد للنبيت الطبيعي الموجود في القناة المعوية المعدية (Gastro Intestinal Tract (GIT لذلك تم إستعمالها في العديد من المجالات العلاجية [6].

إن بكتيريا حامض اللاكتيك *Lactobacillus acidophillus* عصيات واسعة الانتشار في بيئات عديدة ومنها جسم الانسان مثل القناة الهضمية والبولية والتناسلية ، كما ان هذه الجراثيم اثبتت قابليتهاعلى تثبيط نمو بعض الاحياء المجهرية ويعزى ذلك الى افرازها لبعض المواد البروتينية التي يطلق عليها بكتيروسينات[7] ، وقد اشارت عدة دراسات الى ان استهلاك اللبن يؤدي الى تقليل مستويات الكولسترول في دم الانسان والحيوان ، وتعمل على الابعاد التنافسي من خلال منافسة الاحياء المجهرية الممرضة على المغذيات المحدودة اوالتنافس على العدد المحدود من مستقبلات الالتصاق على سطوح الخلايا الطلائية للقناة البولية وتحفيز الاستجابة المناعية ، فقد وجد ان تناول بكتيريا *Lactobacillus* يحسن مناعة الجسم بتحفيزها انتاج الاجسام المضادة (Antibodies) [8].

وهدفت الدراسة الحالية معرفة إلى الفعالية التثبيطية لكل من خميرة *S.boulardii* وبكتريا *L.acidophilus* ضد بعض عوامل الضراوة مثل القدرة على الإلتصاق لدى بكتريا *E.coli* المعزولة من أخماج المجرى البولي المتكررة لدى النساء العراقيات خارج الجسم الحي .

المــواد و طــرائــق العمل:

جمع عينات الإدرار

جمعت (169) عينة إدرار من نساء مصابات بإلتهابات المجرى البولي المتكررة وبأعمار مختلفة من مستشفى سامراء العام ، ومستشفى المحمودية العام للمدة من 4 \ 9 \2011 لغاية 23\ 1 \2012.

زُرعت عينات الادرار على وسط اكار الدم الاغنائي ووسط الماكونكي التفريقي بوساطة ناقل زرعي معقم وحضنت الأطباق عند 37 مْ لمدة 24 ساعة للعزل الأولي . بعدها اجريت عدد من الفحوصات التشخيصية المجهرية والزرعية والكيموحياتية لتشخيص البكتريا المسببة للإصابة ، ثم تم تأكيد التشخيص بإستعمال نظام API 25. ولعزل بكتريا *L.acidophilus* تم جمع 4 عينات من مصادر مختلفة تضمنت حليب الأُم، لبن رائب، خل ومسحة من المهبل، زرعتْ كل عينة على وسط أكار MRS بطريقة النشر، حضنت لمدة 48 - 72 ساعة عند ظروف لاهوائية في 37 مْ ، ثم عزلت مستعمرات بكتيريا *Lactobacillus* النامية لغرض تشخيص كل منها عن طريق شكل البكتريا العصوي ، وتخمير السكريات ، سلبية اختبار الكاتليز. فيما تم الحصول على عزلة جاهزة من خميرة *S.boulardii* من شركة Bioflor الفرنسية.

حساسية العزلات البكتيرية المعزولة للمضادات الحياتية Antibiotics Senitivity Test

أختبرت حساسية العزلات البكتيرية تجاه 11 مضاداً حياتياً: Amikacin: (30) ، (5 (Cefixime، (30) Cefotaxime ، (10) Ceftriaxone ، (10) Ciprofloxacin ، (25) Co-Trimetaxazol Trimthprim ، (10) Imipenem ، (30) Gentamicin Nitrofurantion ، (30) Nalidixic acid (300) وNorfloxacin (10) ملغم\قرص ، و بحسب طريقة Kirby , Bauer [9] وبإستعمال الوسط الزرعي المولر- هنتون (Muller-Hinton Agar) الذي نشر عليه المزروع البكتيري بعمر 18 - 24 ساعة ، بعد ان قيست عكورة نموالمزروع مع عكورة محلول ثابت العكرة القياسي (انبوب 0.5) ، تركت الاطباق بعد النشر لمدة 15-20 دقيقة ليجف سطحها، ثم وزعت اقراص المضادات الحياتية على سطح الطبق الزرعي ،حضنت الاطباق عند 37 مْ لمدة 24 ساعة ،بعدها تم قياس مناطق التثبيط بالمليميتر حول الاقراص بإستعمال المسطرة الاعتيادية وقورنت النتائج على وفق ما ورد من قياسات عالمية [10] .

إختبار الفاعلية التثبيطية لخميرة *S. boulardii* و بكتيريا *L. acidophilus* ضد بكتيريا *E.coli*

تقديرالفاعلية التثبيطية لبكتريا *L.acidophillus* في الوسط الصلب (أقراص الآكار):

أتبعت الطريقة المذكورة من Paluszak و جماعته [11] كالآتي :

زرعت البكتريا المرضية والمعزولة في الوسط المغذي السائل وحضنت عند 37مْ لمدة 3 ساعات ،ثم نقل جزء من العالق البكتيري على وسط الآكار المغذي الصلب وذلك بنشر 0.1 مل منه بوساطة ناشر ، ثم تركت الأطباق لتجفف بالحاضنة عند 37 مْ لمدة 15 دقيقة و زُرعت بكتيريا *L.acidophilus* المنماة مسبقاً في وسط مرق MRS بعمر (24) ساعة بتركيز (1×10^8)خلية\مل بطريقة التخطيط المتعامد على وسط آكار MRS الصلب ،حضنت الأطباق بظروف لاهوائية عند (37)م لمدة (48) ساعة ،ثم عملت منها أقراص بقطر (5) ملم من هذا الوسط بوساطة ثاقب فليني معقم مع اقراص سيطرة عملت

من وسط آكار MRS الصلب الخالي من أي نمو بكتيري (ثلاثة مكررات لكل قرص) ،وضعت على سطح الآكار المغذي المنشور عليه معلق العزلات البكتيرية الممرضة المعزولة ،ثم حضنت الأطباق في (37) مْ لمدة (24) ساعة ،بعدها قيست اقطار مناطق التثبيط وسجلت النتائج .

تقدير الفاعلية التثبيطية لخميرة *S.boulardii* في الوسط الصلب بإستعمال الأقراص :

اجريت هذه الطريقة وفقاً لطريقة Sgouras وجماعته [12] :

زرعت خميرة *S.boulardii* على وسط YEGP لمدة 48 ساعة في 37 مْ ثم عملت ثقوب بقطر 5 ملم بوساطة ثاقب فليني وبواقع 3-4 أقراص للطبق الواحد مع أقراص سيطرة عملت من وسط YEGP الخالي من أي نمو جرثومي (ثلاثة مكررات لكل قرص) ،و وضعت الاقراص على سطح الآكار المغذي المنشور عليه معلق العزلات البكتيرية الممرضة المعزولة وبعد حضن الاطباق في 37 مْ لمدة 24 ساعة تم تسجيل النتائج بقياس قطر مناطق التثبيط.

تأثير البكتريوسين المنتج من بكتيريا *L. acidophilus* والمواد المثبطة المنتجة من قبل خميرة *S.boulardii* في نمو العزلات الممرضة في الوسط السائل :

أستعملت الطريقة المعتمدة من Kumar and Murugalatha [13] و كالأتي :

لُقح وسط السابرويد السائل بخميرة *S.boulardii* وحضن لمدة 24 ساعة في 37 مْ، فيما لُقح وسط MRS السائل ببكتريا *L. acidophilus* وحضن لمدة 48 ساعة في 37 مْ وعند ظروف لاهوائية ، ثم نُميت البكتريا الحساسة للبكتريوسين (*E.coli*) في الوسط المغذي السائل لمدة 3 ساعات 37 مْ و اضيف 100 مايكروليتر من عالق البكتريا الحساسة إلى أنابيب حاوية على 5 مل من البكتريا والخميرة و بالترتيب. حُضن المزروع 37 مْ عند ظروف هوائية ،و بعد مدة 0 , 6 , 24 , 48 ساعة وبواقع 3 مكررات جُمع المزروع وزُرع على وسط الآكار المغذي وحضن عند 37مْ لمدة 24 ساعة ، بعد الحضن تم حساب عدد المستعمرات النامية ومقارنتها بمعاملة السيطرة المتضمنة بكتيريا *E.coli* النامية على الوسط المغذي خلال مدة الحضن نفسها .

اختبار تثبيط خميرة *S.boulardii* و *L. acidophilus*لإلتصاق بكتريا *E.coli* على الخلايا الظهارية للإنسان

تم إجراء هذا الإختبار على وفق طريقة Rezooqeوجماعتها [14] و على وفق الآتي :

- **تحضير عالق الخميرة والبكتيريا:**

نُميت البكتيريا *E.coli*على وسط مرق نقيع القلب والدماغ Brain–Heart Infusion Broth عند 37 مْ لمدة 18 ساعة ،فيما نُميت بكتيريا *L.acidophilus* في مرق MRS وخميرة *S.boulardii* على وسط YEGP عند 37 مْ لمدة 24 ساعة. فُصلت الخلايا بإستعمال جهاز الطرد المركزي بسرعة 3000 دورة /دقيقة لمدة 10 دقائق وغسل الراسب مرتين بإستعمال محلول دارئ الفوسفات الملحي ثم ضبط عدد خلايا بكتيريا *E.coli* الى 1×10^8،وبكتيريا *L.acidophilus* إلى 1×10^6خلية\مل ، وخميرة *S.boulardi* إلى 1×10^9 خلية\مل.

- **تحضير الخلايا الظهارية:**

اخذت عينة لإمرأة سليمة غير مصابة بإلتهاب المجري البولي ونبذت مركزياً بجهاز الطرد المركزي بسرعة 2000 دورة \ دقيقة لمدة 5 دقائق ،كررت العملية من ثلاث الى اربع مرات ثم أُعيد تعليق الخلايا بدارئ الفوسفات الملحي PBS للحصول على تركيز1×10^5خلية ظهارية\ مل بإستعمال شريحة العد لكريات الدم (Counting chamber).

- **إختبار قدرة خميرة *S.boulardii* وبكتيريا *L.acidophilus* و *E.coli* على الإلتصاق بالخلايا الظهارية:**

تم نقل (0.5) من كل من عالق خميرة *S.boulardii* وبكتيريا *L.acidophilus* و *E.coli* إلى أنابيب إختبار كُلاً على حِدة ، والحاوية على (0.5) مل من عالق الخلايا الظهارية ،حُضنت الأنابيب عند 37 م لمدة 60 دقيقة في حاضنة هزازة بمعدل إهتزاز (70) دورة \ الدقيقة. نُبذت الأنابيب مركزياً بجهاز الطرد المركزي بسرعة 2000 دورة/دقيقة لمدة 5 دقائق ، وغسل الراسب بإستعمال محلول دارئ الفوسفات الملحي ، كررت العملية من ثلاث إلى أربع مرات للتخلص من الخلايا غير الملتصقة ،ثم عُلق الراسب بقطرة من محلول دارئ الفوسفات الملحي ونقل بماصة دقيقة ووضع على شريحة زجاجية وترك ليجف في الهواء ثم صبغت الشرائح بصبغة Crystal violet لتحديد نسبة الإلتصاق.فُحصت الشرائح الزجاجية بإستعمال العدسة الزيتية وعُدت الخلايا الملتصقة على 20 خلية ظهارية وتم تسجيل معدل الإلتصاق.

- **إختبار قدرة خميرة *S.boulardii* وبكتيريا *L.acidophilus* على تثبيط التصاق بكتيريا *E.coli***

تمت اضافة 1 مل من عالق البكتريا إلى أنابيب اختبار تحوي 1 مل من الخلايا الظهارية المأخوذة من إدرار إمرأة سليمة غير مصابة بخمج المجرى البولي والمعاملة مع تراكيز مختلفة من كل عالق الخميرة 1×10^9 خلية\مل والبكتيريا 1×10^6خلية\مل ، حضنت الانابيب في 37 مْ لمدة 60

دقيقة في حاضنة هزازة وبمعدل اهتزاز 70 دورة /دقيقة ، ثم نبذت الانابيب بوساطة جهاز الطرد المركزي بسرعة (3000) دورة /دقيقة لمدة (5) دقائق وغسل الراسب بإستعمال محلول الملح الفسيولوجي (كررت هذه العملية من ثلاث الى اربع مرات للتخلص من البكتريا غير الملتصقة) ، علق الراسب بقطرة من محلول دارئ الفوسفات الملحي ونقل بماصة دقيقة ووضع على شريحة زجاجية وترك ليجف في الهواء ثم صبغت الشرائح بصبغة Crystal violet وفحصت لتحديد نسبة الإلتصاق.

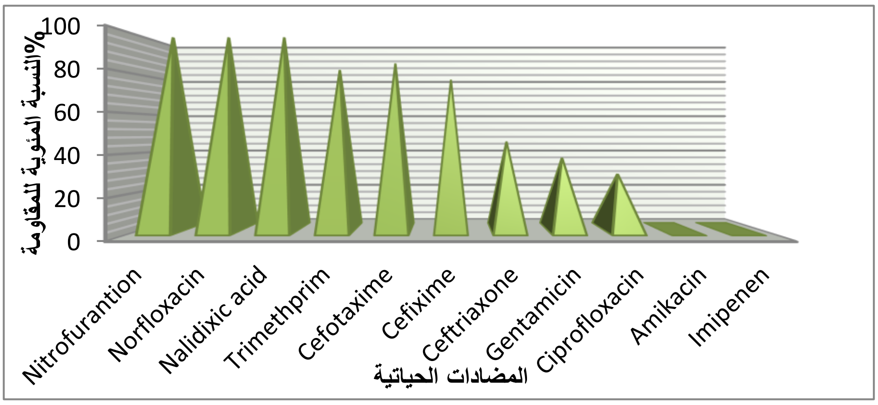
تم حساب نسبة التثبيط بإستعمال القانون الآتي:

نسبة التثبيط = معدل التصاق البكتريا – معدل التصاق البكتريا بوجودالخميرة ×100
معدل التصاق البكتريا

النتائج والمناقشة :

العزل :

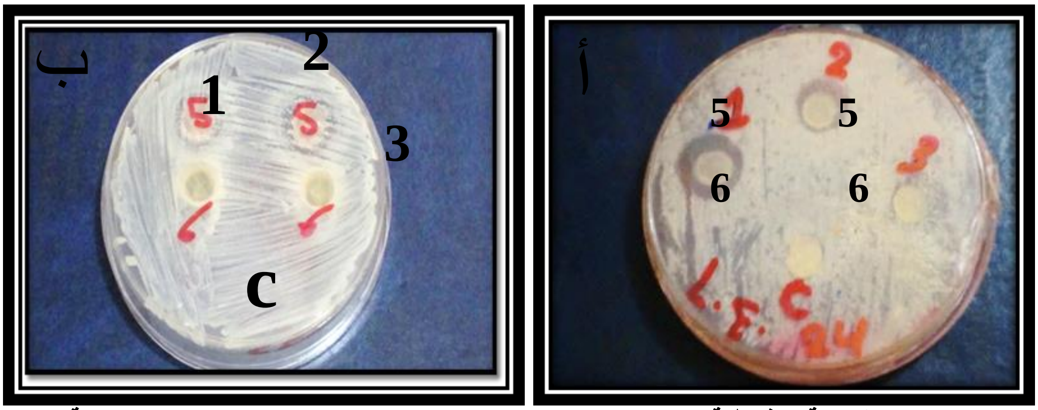
تم الحصول على 100 عينة موجبة للزرع البكتيري شكلت بكتريا *E.coli* مانسبته 59% من العينات وهي المسبب الرئيس لإصابات المجرى البولي لدى النساء وهذا يتوافق مع ماجاء به [15] Abdel Rahman إذ كانت نسبة ظهور بكتيريا *E.coli* 62%. أظهرت البكتيريا مقاومة للمضادت الحياتية وخاصة Norfloxacin و Nalidixic acid و Nitrofurantion بنسبة 100%وكانت هذه النتائج متوافقة مع ماجاء به Ahmed [16] إذ بلغت نسبة المقاومة للمضاد Nalidixic acid 100 % إلا انها اختلفت عن ما جاء به El-Hemidawi [17] إذ ذكر إن نسبة المقاومة لكل من Nalidixic acid و Norfloxacin كانت 5.1 % و 9.8 % على التوالي فيما كانت حساسة جدا لكل من المضادين Amikacin و Imipenem وكما في الشكل 1.



شكل (1) النسبة المئوية لمقاومة العزلات المرضية لبكتريا *E.coli* المعزولة من أخماج المجرى البولي المتكررة لعدد من المضادات الحياتية

تقدير الفعالية التثبيطية لبكتريا *L.acidophillus* في الوسط الصلب (أقراص الآكار):

تعد طريقة إستعمال وسط آكار MRS الصلب لدراسة قابلية عزلات عصيات حامض اللاكتيك على انتاج مواد مثبطة لنمو عزلات الاختبار من الطرائق الجيدة التي تعطي نتائج واضحة وملموسة من ناحية قدرة عزلات بكتريا *Lactobacillus* على التأثير التثبيطي ضد بعض العزلات الممرضة قيد الدراسة فقد تم إستعمال البكتريا التي تم الحصول عليها من اللبن ومسحة المهبل واختبار فاعليتها التثبيطية إذ كانت اقطار مناطق التثبيط بمعدل 16 ملم للبكتريا المعزولة من المهبل و 22 ملم للبكتريا المعزولة من اللبن والتي كانت تتملك الفاعلية التثبيطية الأعلى . وتم اختبار الفاعلية التثبيطية للبكيتريا على وسط الآكار المغذي الصلب ووسط المولر- هنتون كانت البكتيريا اكثر فاعلية على وسط المولر - هنتون وعند مدة حضن 24_36 ساعة عند 37 مْ إذ كان معدل مناطق التثبيط لبكتريا *E.coli* 17 ملم مقارنة بفاعليتها على وسط الآكار المغذي إذ كان معدل مناطق التثبيط 12 ملم ،توافقت هذه النتائج مع ما اشار إليه كل من Paluszak وجماعته [11] وAl.jebouri [18]وبالقدرة العالية لبكتيريا *L.acidophilus* على تثبيط البكتيريا الممرضة بعد مدة حضن تتراوح بين 24-36 ساعة،كما في شكل 2.



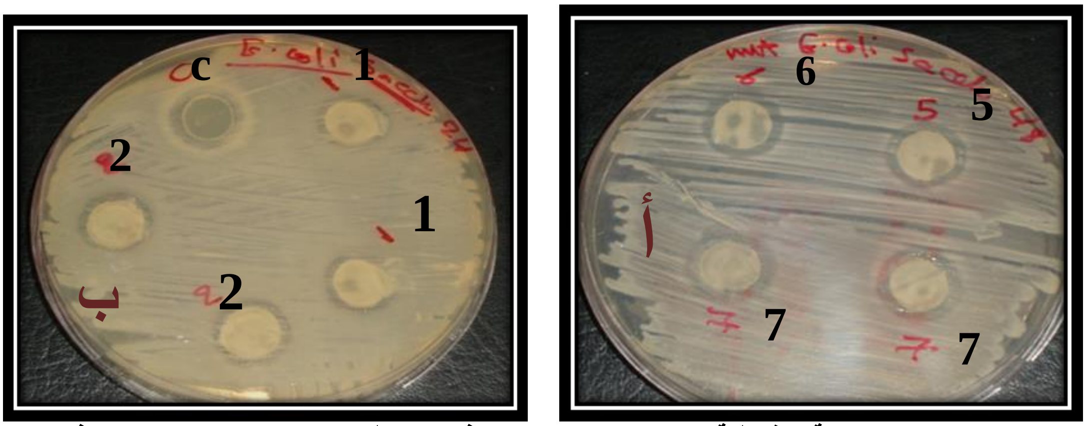
شكل(2) يوضح الفاعلية التثبيطية لبكتريا *L. acidophilus* ضد بكتريا *E.coli* بعد (24) ساعة من الحضن في (37)مْ من خلال قياس مناطق التثبيط بالملم.

(أ) على وسط الأكار المغذي (ب) على وسط المولر- هنتون

***1، 2 ، 3 ،5 ، 6=أرقام العزلات C= سيطرة**

تقدير الفاعلية التثبيطية لخميرة *S.boulardii* في الوسط الصلب بطريقة الأقراص :

تم قياس الفاعلية التثبيطية لخميرة *S.boulardii* ضد بكتريا *E.coli* إذ نُميت الخميرة على وسط آكار السابرويد.وأختبرت الفاعلية التثبيطية للخميرة ضد البكتيريا على وسط المولر - هنتون والوسط المغذي الصلب ،تمت قراءة النتائج بعد24- 48 ساعة من الحضن .و أظهرت النتائج ان مدة الحضن 48 ساعة على وسط آكار المغذي الصلب هي الأمثل لإظهار الفاعلية التثبيطية للخميرة ضد البكتريا وإعطاء منطقة تثبيط قطرها 15 ملم. شكل 3-أ، فيما كانت مناطق التثبيط بعد مدة الحضن 24 ساعة أقل بقطر منطقة تثبيط تبلغ 9 ملم كما موضح في الشكل 3- ب وهذه النتائج كانت مقاربة لما توصل اليه Al-Gosha'a [19]إذ كان معدل اقطار مناطق التثبيط مابين 10-12 ملم ، بينما لم تظهر مناطق واضحة للتثبيط على وسط المولر- هنتون وعلى اختلاف مدتي الحضن.إن إنتشار إستعمال هذه الخميرة يعود إلى ميكانيكيات عملها داخل الجسم الحي و خارجه وكفاءتها التثبيطية العالية ضد العديد من المسببات البكتيرية الموجبة والسالبة لصبغة غرام وبالأخص الأنواع البكتيرية التابعة للعائلة المعوية *Enterobacteriaceae* وذلك من خلال إنتاجها لعدد من المواد المضادة التي يصاحبها إحداث ثقوب في جدران الخلايا الحساسة لها مما يؤدي إلى فقدان الأيونات وتحطيم الغشاء البلازمي ،فضلاً عن قابليتها على إنتاج بروتيز – السيرين (Serine Protease) الذي ثبت فعله في تحلل المستلمات على سطوح الخلايا والذي يمكن ان يؤثر في البروتينات العاملة على الحدود الخارجية للخلايا مثل أنظمة النقل[20][21].



شكل 3: يوضح الفاعلية التثبيطية لخميرة *S.boulardii* في الوسط الصلب ضد بكتريا *E.coli* في 37مْ.

(أ) بعد 48 ساعة من الحضن (ب) بعد ساعة (24)من الحضن

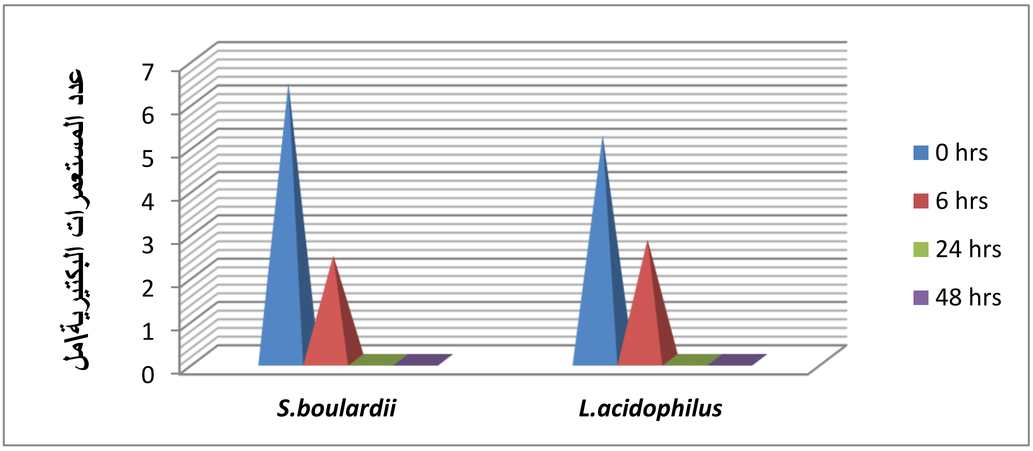
*** 1 ،2 ، 5 ، 6 ، 7 =أرقام العزلات ،C = سيطرة .**

تأثيرالبكتريوسين المنتج من بكتيريا *L.acidophillus* والمواد المثبطة المنتجة من خميرة *S.boulardii* في نمو العزلات الممرضة:

تم إختبار فاعلية البكتيريوسين المنتج من بكتيريا *L.acidophilus* والمواد المثبطة المنتجة من خميرة *S.boulardii* على نمو بكتيريا *E.coli* في الوسط السائل إذ تم حساب المستعمرات النامية بعد اربعة أوقات للحضن (48,24,6,0) ساعة بتركيز 1×10^6خلية\مل بالنسبة لبكتيريا *L.acidophilus* وتركيز 1×10^9خلية \مل بالنسبة لخميرة *S.boulrdii*. اظهرت النتائج انخفاض عدد المستعمرات النامية بعد 6 ساعات من الحضن لبكتيريا *E.coli* التي إنخفض عدد مستعمراتها عند مدة الحضن (6) ساعات من (6.49×10^7)خلية بكتيرية\مل إلى (2.41×10^7)خلية بكتيرية\مل وبفارق معنوي مع معاملة السيطرة خلال مدة الحضن نفسها ، فيما لوحظ إنخفاض المستعمرات إلى (0.0038×10^7) خلية بكتيرية\ مل بعد مدة حضن 24 ساعة بالنسبة لخميرة *S.boulardii* إما بالنسبة لبكتيريا *E.coli* المعاملة بعالق بكتريا *L.acidophilus*فقد إنخفض عدد المستعمرات عند مدة حضن (6)ساعات من (5.82×10^7) خلية بكتيرية\ مل إلى (2.78×10^7) خلية بكتيرية \ مل وبفارق معنوي عن معاملة السيطرة التي بلغت (6.12×10^7) خلال مدة الحضن نفسها وانعدمت مستعمرات بكتيريا *E.coli* لكلتا المعاملتين عند مدة حضن 48 ساعة وكما موضح في جدول (1) والشكل 4. أكد Al-Gosha'a [19] إن لخميرة *S.boulardii* التأثير الملحوظ في نمو العزلات البكتيرية الممرضة من خلال تثبيط قدرتها على إنتاج البكتيروسين فيما أشار Zbinden وجماعته [20] إلى ان الخميرة لها القدرة على التاثير في إنتاج وعمل البروتينات الميكروبية فيما ذكر [22] أن خميرة *S.boulardii* لها القدرة على التثبيط المباشر لبكتيريا *E. coli* من خلال إنتاج إنزيم Phosphotase الذي يعمل على إيقاف عملية الفسفرة للسموم الداخلية وتثبيط تأثيراتها السمية فضلاً عن قابليتها على إيقاف نمو البكتيريا من خلال إحداث تحوير في نفاذية أغشية الخلايا.كما اشار كل من Kumar and Murugalatha [13]و Al.Wendawi [23] إلى ان البكتيريوسين المنتج من بكتيريا *L.acidophilus* ومن خلال حساب أعداد المستعمرات عمل بوصفه مادة قاتلة للأحياء ألمجهرية الممرضة و إن ميكانيكية عمل البكتيريوسين تتضمن قتل البكتيريا الممرضة من إحداث ثقوب في الجدار الخلوي مؤدياً إلى فقدان أيونات الجدار فضلاً عن نضوب الـ ATP ،و تمتلك البكتيروسينات قدرة كبيرة على تثبيط البكتيريا الممرضة من غير أن تؤثر في النبيت الطبيعي (Normal flora) للجسم مقارنة بالمضادات الحياتية

جدول (1) يوضح تأثير المواد المثبطة المنتجة من خميرة *S.boulardii* و البكتيريوسين المنتج من بكتيريا *L.acidophilus* في أعداد المستعمرات البكتيرية لـ *E.coli* ($\times10^7$) وخلال مدة حضن (0،6،24، 48)ساعة.

LSD Value	*E.coli*		
	L.acidophlus (مستعمرة\ مل)	*S.boulardii* (مستعمرة\ مل)	السيطرة (مستعمرة\ مل)
0.523	0.32 ± 5.82	1.38 ± 6.49	0.49 ± 5.58
1.768 *	0.72 ± 2.78	0.42 ± 2.41	0.44 ± 6.12
8.354 *	± 0.0021 0.001	± 0.0038 0.001	13.36 ±161.70
13.208 *	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	21.34 ± 509.16
---	1.66 *	1.89 *	17.54 *

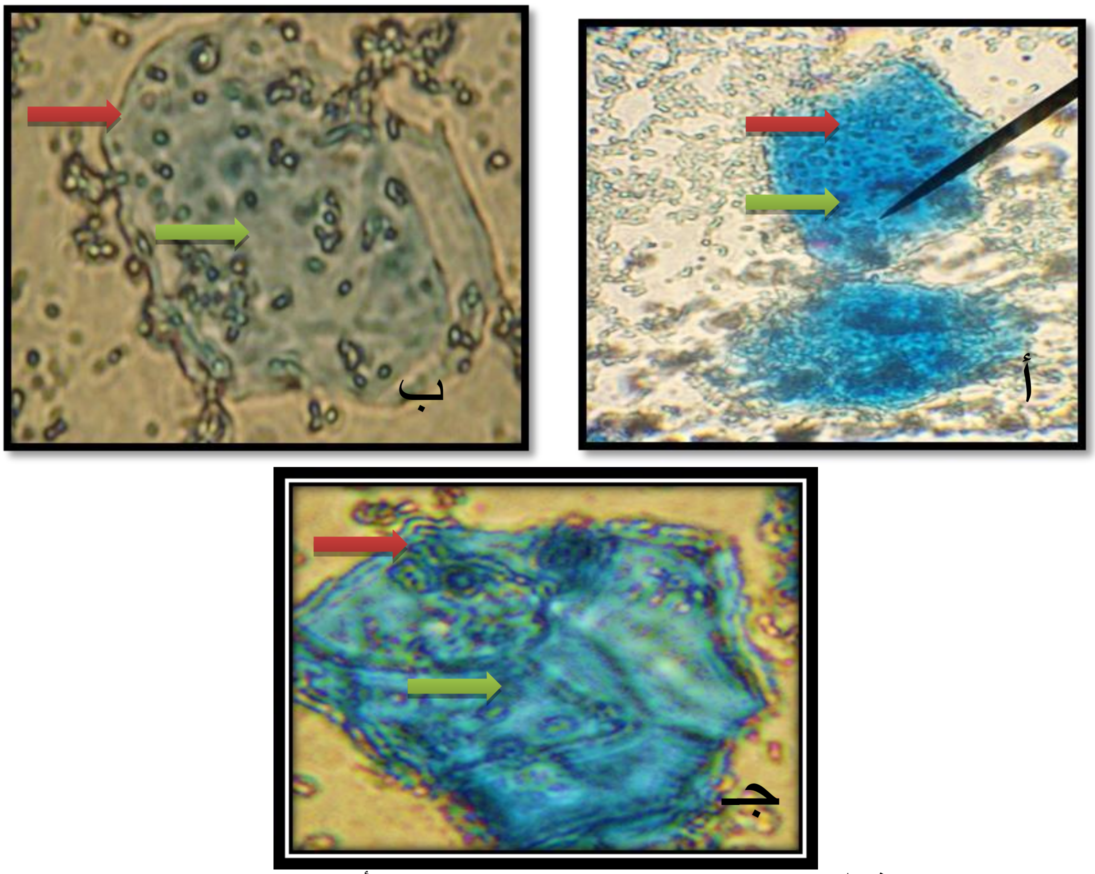


شكل (4) تأثيرالبكتريوسين المنتج من بكتيريا *L. acidophilus* والمواد المثبطة المنتجة من خميرة *S.boulardii* في عدد المستعمرات البكتيرية لعزلة *E.coli* المرضة خلال اربعة أوقات للحضن (48,24,6,0) ساعة

اختبار تثبيط خميرة *S.boulardii* وبكتريا *L.acidophilus* لإلتصاق بكتريا *E.coli* على الخلايا الظهارية للإنسان:

يعد الإلتصاق واحداً من الإستراتيجيات المهمة المستعملة من أنواع عديدة من الكائنات المجهرية لكي تحافظ على مكانها واعدادها ومستعمراتها في مختلف البيئات إذ أشارت العديد من الدراسات إلى إن القدرة العالية على الإلتصاق يعد مؤشراً على قابلية تلك الكائنات للتنافس على المواد الغذائية وبكفاءة عالية مقارنة بتلك الأنواع التي لاتمتلك القدرة على الإلتصاق ،لذلك فأن قدرة الخميرة والبكتريا على تثبيط التصاق الممرضات تعد من الصفات المهمة الواجب توافرها لإستعمالها أحياء علاجية والوقاية من الاصابات المتكررة للجهاز البولي لدى النساء[24]. وكان معدل الخلايا البكتيرية الملتصقة 44.75خلية بكتيرية/خلية ظهارية بالنسبة لمعاملة السيطرة الشكل (5- أ).

وتمت الطريقة بقياس النسبة المئوية لتثبيط التصاق بكتريا *E.coli* على الخلايا الظهارية بوجود عزلة بكتريا *L.acidophilus* وخميرة *S . boulardii* كلاً على حدة. وقد بينت نتائج الدراسة الحالية ظهور فروقات معنوية بين المعاملتين عند المستوى ($P<0.05$) إذ كان معدل بكتريا *E.coli* الملتصقة على الخلايا الظهارية بوجود بكتريا *L. acidophilus* هو 15.7 خلية بكتيرية/الخلايا الظهارية الشكل 5 - ب وجاءت هذه النتائج مقاربة لما ذكرته كل من Al.jeboury [18] وAl- Nasir [25]، فيما كان معدل بكتيريا *E.coli* الملتصقة على الخلايا الظهارية بوجود خميرة *S.boulardii* هو 12.2خلية بكتيرية/ خلية ظهارية الشكل (5 – ج)، فيما يوضح الشكل (6) النسب المئوية لتثبيط كل من خميرة *S.boulardii* وبكتيريا *L.acidophilus* لإلتصاق بكتيريا *E.coli* بالخلايا الظهارية والتي كانت 72.73% و 62.91%على التوالي. إن خمائر الأحياء العلاجية تمارس دورها العلاجي من خلال حصر البكتيريا الممرضة وإجبارها على الإلتصاق بجدارها وفك الإرتباط بالخلايا الطلائية فضلاً عن إنتاجها لعوامل مضادة تعادل فعل السموم البكتيرية المنتجة مثل إنتاجها العديد من الإنزيمات التي تعمل على تثبيط السموم البيكتيرية مثل إنزيم Protase وانزيم Hydrolase فضلاً عن فعلها في تحفيز الإستجابة المناعية قبل حدوث ألإصابة وعملها في خفض أعداد الخلايا البكتيرية الممرضة للمستوى الذي لايجعلها تصل إلى الحد المحدث للإصابة[24]. إن التداخل بين بكتيريا *Lactobacillus* والخلايا الطلائية للمجرى البولي يعتقد إنه من أساسيات وجودها كونها من النبيت الطبيعي الموجود في القناة البولية التناسلية لذلك فأن إستيطانها وبنسب عالية يعمل على تقليل خطر تكرار الإصابات المتكررة بالمجرى البولي إن هذه الفرضية يمكن أن تفسر تأثير وجود الأحياء العلاجية عند حدوث الإصابات إذ تعمل على منع الإشارات التي تؤدي إلى إلتصاق البكتيريا الممرضة فضلاً عن تثبيط إنتقالها لمكان أخر[26]



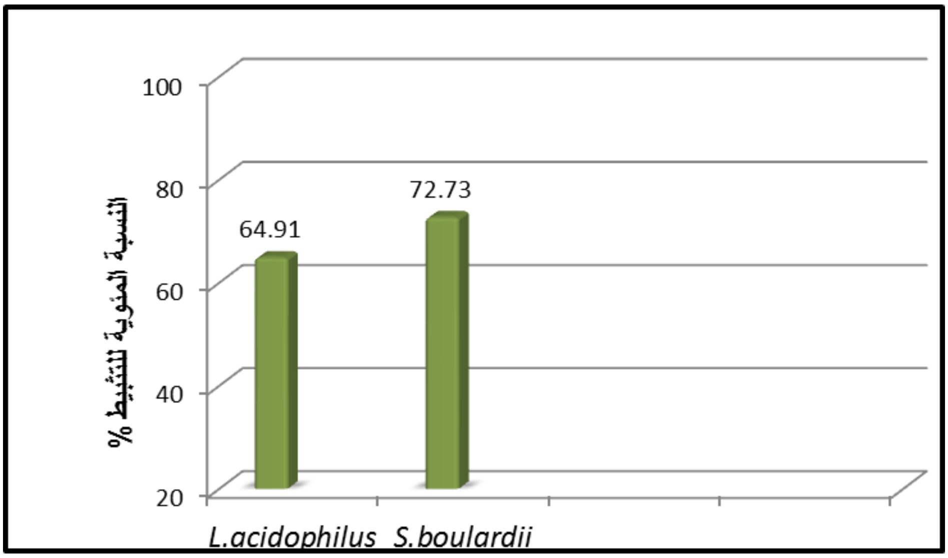
شكل (5) إختبار تثبيط الـــ *L.acidophilus* و الـــ *S. boulardii* لألتصاق بكتريا *E.coli*على الخلايا الظهارية عند قوة تكبير (x 1000).

أ : إلتصاق بكتريا *E.coli* على الخلايا الظهارية

ب: إلتصاق بكتريا *E.coli* على الخلايا الظهارية بوجود بكتيريا *L.acidophilus*

جـ: إلتصاق بكتريا*E.coli* على الخلايا الظهارية بوجود خميرة *S. boulardii*

*( ): خلايا ظهارية ، ( ): خلايا بكتيريا *E.coli*



شكل (6) النسب المئوية لتثبيط إلتصاق بكتيريا *E.coli* على الخلايا الظهارية للإنسان بوساطة كل من خميرة *S.boulardii* وبكتيريا *L.acidophilus*

المصادر:

1. Salvatore ،S.; , Salvatore ,S.; Cattoni ,E.; Siesto ,G.; Serati ,M.; Sorice ,P,and Torella ,M.2011. Urinary tract infections in women. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, 156: 131–136.
2. O'Dell, K. 2011. Pharmacologic Management of Asymptomatic Bacteriuria and Urinary Tract Infections in Women. Journal of Midwifery &Women's Health 56.(3):248-265.
3. SOGC Clinical Practice Guideline. 2010. Recurrent Urinary Tract Infection. J. Obstet . Gynaecol. Can;32(11):1082–1090.
4. Rayes ,N . seehofer, D :, Muller, A.R ,Hansen S:, Bengmark S and Neuhaus P. 2002. Influence of probiotics and fibre on the incidence of bacterial infections following major abdominal surgery .Z Gastroenterol. 40 : 869_76.
5. FAO/WHO. 2001. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Cordoba, Argentina: Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report.
6. McFarland , L.V and Bernasconis, P.1993. *Saccharomyces boulardii*:A review of an innovative biotherapeutic agent. Microbial ecology in health and disease.6:157-171.
7. Holzapfel, W.H. and Schillinger , U. 2002. Introduction to pre – and probiotics . Food Research Intern ., 35 : 109 – 116.
8. Ross , N.M. and Katan , M.B. 2000. Effect of probiotic bacteria on diarrhea , lipid metabolism , and carcinogenesis : a review of papers published between 1988 – 1998 . American. J.Clin. Nutr., 71(20):405-411.
9. Vandepitte , J.; Engbaek , K.; Piot , P. and Henck , C.L. 1991 . Basic Laboratory Procedures in Clinical Bacteriology . W.H.O.
10. National Committee For Clinical Laboratory Standareds. 2002. Perfomance Standared For Antibiotic Susceptibility Testing NCCLS. 12th informational supplement., 22(1): 1-133.
11. Paluszak,Z.;Kaszewska,J.E. and Szala ,B. 2006. inhibitory effect of lactic acid bacteria of genus *lactobacillus* on the survival of *proteus* and *Shigella* Rods in Mixed Culture. Bull Vet Inst Pulawy. 50: 335-340.
12. Sgouras,D; Maragkoudakis, P.; Petraki, K.; Martinez. Gonzalez, B.; Erioton , E.; Zopoules, G; Tsalcalidon , E.and Mentis ,A. 2004 . *In vitro* and *in vivo* inhibtion *Helicobacter pylori* by *lactobacillus casei* strain *shirota* App , Environ . Microbiol. 790(19) : 518- 526.
13. Kumar,A.M and Murugalatha ,N .2011. Bacteriocin assay and curing of plasmid in *Lactobacillus* species isolated from raw cattle milk. International Journal of Research in Pure and Applied Microbiology. 1(1): 1-8.
14. Rezooqe , N.S.; Kadham ,S.I . and Al Sadik ,S.M .2011. Antifungal effeciency of Miswak and Cardomom extract on some virulance factor of *Candida albicans* as oral pathogen.Journal of Al-Kufa University for biology.,3 (2) : 305-311.
15. Abdel Rahman, M.I .I.2006. Study of Some Bacteriological and Immunological Parameters in Chronic Urinary Tract Infection.PhD thesis. College of Science. Al- Mustansiriya University.
16. Ahmed, A.M.2008. Effect of *L. acidophilus* on *E. coli* causing

Urinary tract infections *in Vivo* and *in Vitro* .Msc thesis. College of Science. University of Baghdad.

17. El-Hemidawi, T.F.H. 2005. Hemolytic Activity of *Escherichia coli* Isolated from Urinary Tract Infectios and its Resistance to Antibiotics. PhD Thesis. College of Science. Al-Mustansyria University.

18. Al.jeboury ,G.H.A.2010. In vivo and in vitro study of probiotic of *lactobacillus acidophilus* on pathogenicity of *Proteus mirabilis* isolated from urinary tract infection. Journal of Biotechnology research center.4:2,53-63.

19. Al-Gosha'a,F.A.S. (2005).Studying the effect of inhibitory substances produced by *Saaccharomyces boulardii* on virualence factor of some enteric bacteria. PhD thesis. College of Science. Al- Mustansiriya University.

20. Zbinden , R.; Gonczi , E .E and Altwegg , M.1999. Inhibition of *Saaccharomyces boulardii* (nom . inval.) on cell invasion of *Salmonella typhimurium* and *Yersinia enterocolitica* . Microb. Ecol. In Health . Dis., 11; 158 -162 .

21. Kelesidis ,T. and Pothoulakis ,C .2012. Efficacy and safety of the probiotic *Saccharomyces boulardii* for the prevention and therapy of gastrointestinal disorders. Therapeutic Advances in Gastroenterology., 5:(2) 111–125.

22. Canani , R .; Berni, S .;Cucchiara, R.; Cumom, F. and Papale,P. F.2011. *Saccharomyces boulardii*: a summary of the evidence for gastroenterology clinical practice in adults and children. European Review for Medical and Pharmacological Sciences. 15: 809-822.

23. Al.Wendawi .S,A.2011. Production of bacteriocin from infant lactobacillus spp active against *Lisreria monocytogenes* .Journal of AL-Kufa university for biology .3:2(236-245).

24. Schillinger. U, Guigas.C and Holzapfel.W,H.2005. In vitro adherence and other properties of *lactobacilli* used in probiotic yoghurt-like products. International Dairy Journal 15 ,1289–1297.

25. Al-Nasir,W.A.H.2007.Studying the adhision of *Lactobacillus acidophilus* to uroepithelial cell and interference with some pathogens of urogential tract. Msc thesis. College of Science. University of Baghdad.

26. Henriksson, A .;Szewzyk ,Z .and Conway, P .1991. Characteristics of adhesive determinants of *lactobacillus fermentum* 104. Applied and Environ .,57(2):499 - 502.

Inhibition activity of *Saccharomyces boulardii* and *Lactobacillus acidophilus* against pathogenic *E.coli* isolates from Recurrent Urinary Tract Infection in women *In Vitro*

Nada S. Rezuqi* ***Farah Q. Younis****

*Department of Biology , College of Science for women , University of Baghdad

Abstract

The aims of study is to detect the inhibitory effect of *Saccharomyces boulardii* and *Lactobacillus acidophilus* on *Escherichia coli* that has been isolated from recurrent urinary tract infection in women. The sensitivity of *E.coli* isolates to antibiotics had been studied and the most resistant *E.coli* isolate to antibiotics had been studied .The cup assay was used on nutrient agar and Muller-Hinton agar to detect the inhibitory activity for each *S.boulardii* yeast grown on YEGP media and *L.acidophilus* grown on MRS media in which the result showed a high inhibition activity for each of them .Also in this study the adhesion property of *E.coli* had been evaluated in the presence of *S.boulardii* at concentration of 1×10^9 and *L.acidophilus* at concentration of 1×10^6. Result revelead that both of them inhibit the adhesion of *E.coli* at 72.73% and 64.91% , respecherely these concentrations was used to measure the bacteriocin activity produced by *L.acidophilus* and inhibitory compounds produced by *S.boulardii*.The result showed there were no growth for *E.coli* colonies after 48 hrs of incubation.