**\* التوصيف المظهري والجزيئي لبكتريا *Streptococcus* *mutans* المعزولة من الفم وإختبار قدرتها على تكوين الأغشية الحيوية ومقاومتها للمضادات الحيوية**

 **تاريخ الاستلام 12/3/2014 تاريخ القبول 8/6/2014**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **وفاء عبد الواحد جحيل الكعبي** | **عدنان حمد الحمداني** | **ماجد كاظم عبود الشبلي** |
| **قسم علوم الحياة – كلية التربية جامعة القادسية****alkaaby@yahoo.com** | **فرع الأحياء المجهرية – كلية الطب جامعة القادسية** | **قسم علوم الحياة – كلية التربية جامعة القادسية** |

**الخلاصة:**

تم عزل 479 عزلة بكتيرية من 409 مسحة من سطوح الأسنان واللثة للمرضى المراجعين من كِلا الجنسين وبأعمارٍ مختلفة للمراكز التخصصية وعيادات الأسنان في مدينة الديوانية بعد أن شُخصوا سريرياً بإلتهابات الفم (الأسنان واللثة) من قِبل الأطباء المختصين للمدة من 1/11/2012م ولغاية 1/3/2013م.

شُخِّصت العزلات البكتيرية بإستخدام جهاز الفايتك إلى موجبة وسالبة لصبغة ﮔرام تصدرتها بكتريا المكورات السبحيَّة *Streptococcus* spp. بأعلى نسبة بلغت 31.52% تلتها بكتريا المكورات العنقودية *Staphylococcus* spp. بنسبة 20.45% وبكتريا عُصيات الحليب *Lactobacillus* spp. بنسبة 12.52% ثم خميرة *Candida* spp. بنسبة 10.64%, وتوالت بعدها بعض البكتريا التي أحرزت نسباً قليلةً مقارنةً بالبكتريا المذكورة, كما أحرزت بكتريا المكورات السـبحيَّة الغشائية *Streptococcus mutans* من بين الأنواع البكتيرية المعزولة من سطوح الأسنان واللثة أعلى تردداً في عدد العزلات (56 عزلة) واُختُبِرت قدرتها جميعها على تكوين الغشاء الحيوي؛ إذ كانت 44 عزلة (44.64%) عالية التكوين لهُ و 16 عزلة (28.57%) متوسطة التكوين و 15 عزلة (26.79%) عديمة التكوين للغشاء الحيوي. وظهرَ تأثير الكربوهيدرات واضحاً على عزلات *S. mutans* في تكوينها للغشاء الحيوي على وسط النمو؛ إذ بلغت نسبتها بوجود السكروز 35.71% تلاهُ الكلوكوز مع الفركتوز معاً في الوسط نفسه بنسبة 25.00% ثم الكلوكوز (16.07%) والفركتوز (12.50%), بينما بلغت نسبتها بغياب الكربوهيدرات في وسط النمو 10.71%.

اُختُبِرت الحساسية الدوائية لعزلات *S. mutans* تجاه 11 مضاداً حيوياً بإستخدام طريقة الإنتشار بالأقراص التي أوضحت أنَّ مقاومة العزلات للمضادات الحيوية كانت أعلى من حساسيتها لها إضافةً إلى أنها إزدادت بعد تكوينها للغشاء الحيوي؛ حيث بلغت مقاومة العزلات لمضاد الإرثرومايسين قبل وبعد تكوينها للغشاء الحيوي (98.21 و 94.64)% والأموكسيسيلين (85.71)% لِكلٍ منهما والأمبيسيلين (80.35 و 83.92)% وحامض الناليدسك (80.35 و 87.50)% والسيفوتاكسيم (69.64 و 75.00)% والكلورامفينيكول (69.64 و 89.28)% والأموكسيسيلين – حامض الكلافيولانك (58.92 و 76.78)% والجنتامايسين (57.14 و 78.57)% والتتراسايكلين (55.35 و 66.07)% لِكلٍ منهما على التوالي, فيما أظهرت حساسيتها العالية لِمضادي الأميكاسين (25.00 و 48.21)% والترايميثوبرايم سلفاميثاكسيل (7.14 و 19.64)% لِكلٍ منهما على التوالي.

إختُبِرت 12 عزلة منتخبة من 56 عزلة من *S. mutans*؛ بإعتبارها منتجةً للغشاء الحيوي وأكثر مقاومةً للمضادات الحيوية وإمتلاكها لمورثة *16S* rRNA التي تُمثّل المورثة التشخيصيّة لها بإستعمال تقنية تفاعل سلسلة إنزيم البلمرة (PCR), كما بيَّنت نتائج تتابع تسلسل الحامض النووي DNA للموَّرث المحافظ (*16S* rRNA) في عزلات *S. mutans* المكونة للأغشية الحيوي وبوساطة تحليل الشجرة الوراثية لذلك الموَّرث, ظهرَ تشابهً بين سلالة *S. mutans* المحلية مع السلالة القياسية الأسبانية (AJ554208.1) في الموقعين النيوكليوتيدين 14 و 15.

**Microbiology Classification QR1 -74.5**

كلمات مفتاحية: التوصيف المظهري, المكورات السبحية, الأغشية الحيوية, المضادات الحيوية, التوصيف الجزيئي

ـــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــ

\* البحث مستل من أطروحة دكتوراه للباحث الأول.

**المقدمة Introduction**

تقع بكتريا المكورات السبحيَّة *Streptococcus* *mutans* ضمن مجموعة البكتريا الموجبة لصبغة ﮔرام وهي من أبرز الأنواع البكتيرية المكوِّنة للأغشية الحيوية؛ إذ إنها تستوطن الفم خلال الأيام الأولى بعد الولادة وبمرور الوقت تتواجد أنواعاً أخرى مرافقة للسبحيَّات من البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة ﮔرام (1).

يُمثِّل الغشاء الحيوي Biofilm مجتمعاً بكتيرياً إرتبطت خلاياه بسطح نصف مغمور، وغُلِّفت بصورة أساسية بقالب من مواد بوليميرية خارج خلوية Exopolymeric substances (EPS) منتجةً من تلك الخلايا التي تظهر طرازاً مظهرياً مغايراً للخلايا عندما تكون حرة من ناحية نسبة النمو والتعبير الجيني (2). ويُسبب وجود الغشاء الحيوي في جسم الإنسان عدداً من الإصابات المرضية منها التليف الحوصلي وإلتهاب شغاف القلب الداخلي والأذن الوسطى والبروستات وإلتهاب ما حول السن وتسوس الأسنان وغيرها (3). ويُعتقد أيضاً أن التداخل ما بين الأنواع البكتيرية المتواجدة في الفم أثناء تكوين الغشاء الحيوي يؤدي إلى التصادم في ميكانيكية التحاور الجرثومي خلال الإشارات التي تطلقها لتكوين الغشاء الحيوي, ومن هذا المُنطلق يُمكن تُصوَّر التداخل بين المُجتمعات البكتيرية المُكوِّنة للأغشية الحيوية كالحرب والسِلمْ War and peace (4).

إنَّ الإستعمال المتكرر والمتزايد للمضادات الحيوية في علاج الحالات المرضية ولفتراتٍ طويلة أدى إلى ظهور تأثيرات جانبية تضر بصحة الفرد من جهة وظهور سلالات مقاومة للمضادات الحيوية من جهةٍ أخرى (5), لذا بدأ التفكير بإستعمال أو إيجاد بدائل أخرى متمثلةً بتغيير إستراتجية العلاج إلى ناحية تنظيم تواجد الجراثيم التعايشيَّة Commensal microbiota التي تؤثر على إستقرار بيئة الفم وتنظيمها من خلال تضادها مع الجراثيم المُمرضة, وبسبب مقاومة الغشاء الحيوي للمضادات الحيوية وجهاز المضيف المناعي والخصائص الفسلجية للكائنات المكونة لهُ إضافةً إلى إمتلاكها مورثات مقاومة؛ لذلك كان لابد من دراسة عوامل الضراوة لهذه الجراثيم من الناحية الوراثية الأمر الذي يؤدي إلى الإقتراب من تقليل تأثير هذه الجراثيم على أسنان الإنسان (6). كما أنَّ دراسة الوراثة الجزيئية Molecular genetics لبعض خصائص عـــوامل الضراوة لبكتريا *S. mutans* المرضية يمكن أن يقود ليس فقط إلى معرفة أو فهم الدور لتلك العوامل في نشوء التسوس وإنما يمكن أن يؤدي إلى الإقتراب من التقليل المتزايد لتأثير تلك العوامل على التسوس (7). وأنَّ التداخل ما بين الأنواع البكتيرية يلعب دوراً في ديناميكية المجتمعات البكتيرية؛ إذ إنَّ بعضها يُعزز تكوين الإسوداد وتطور أمراض أخرى منها تسوس الأسنان وإلتهاب ما حول السن لذلك فمن الأفضل فهم التداخل بين الخلايا البكتيرية المرضية الفموية والتعايشية وتأثير ذلك التداخل على التعبير الجيني لبعض عوامل الضراوة والإمراضية, ويُعتقد أن وجود أنواعاً من النبيت البكتيري يمكن أن تؤدي إلى الإختلاف في التأثير على تكوين الغشاء الحيوي والتعبير الجيني لعوامل الضراوة لبكتريا *S. mutans* (8).

**هدف الدراسة Aim of study** يتضمن الخطوات التالية:

1- عزل البكتريا المُسببة لحالات أخماج الفم وتشخيصها بالطرق الروتينية.

2- إختبار قدرة *S. mutans* على تكوين الغشاء الحيوي مختبرياً في مستويات وأنواع مختلفة من السكريات وتوكيد تشخيص *S. mutans* جزيئياً بإستخدام مورثة *16S* rRNA.

3- تحليل تسلسل نيوكلوتيدات الحامض النووي DNA المضخم لبكتريا *S. mutans* مع مورثة *16S* rRNA بإستعمال جهاز DNA sequencer.

**المواد وطرائق العمل Materials and Methods**

أولاً: جمع العينات Collection of samples

جُمِعت 479 عزلة بكتيرية من 409 مسحة من سطوح الأسنان واللثة للمرضى المصابين بأخماج الفم والأسنان الذين راجعوا المراكز التخصصية وعيادات الأسنان في مدينة الديوانية ومن كِلا الجنسين وبأعمارٍ مختلفةٍ لمدة أربعة أشهر إمتدت من (1/11/2012 م) حتى (1/3/2013م)؛ إذ أُخذت المسحات بإشراف الطبيب المختص وإستُخدمت المسحات القطنية الحاوية على وسط ناقل (Transport media swabs) في عملية جمع العينات لضمان حيوية العزلات.

ثانياً: العزل والتشخيص البكتيري Bacterial isolation and identification

أ- العزل Isolation

زُرعت عينات المسحات القطنية Swabs المأخوذة من أخماج الفم بعد أن تم حضنها بدرجة حرارة 37°م لمدة 24 ساعة لغرض تنشيط البكتريا بطريقة التخطيط على الأوساط الزرعية الإغنائية كوسط أﮔار الدم والماكونكي بطريقتي الزرع الهوائي واللاهوائي, وحُضنت الأطباق لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37°م وبعد إكتمال عملية الحضن أُجريت الفحوصات المظهرية والكيموحيوية.

ب- التشخيص بنظام الفايتك Vitek compact2 system diagnosis

يُعد نظــام الفايتك من الأنظمة التشخيصية الحديثة والسريعة في التشخيص البكتيري, إذ يعطي نتائج دقيقة تصل دقتها إلى 99%. ولغرض التأكد من العزلات البكتيرية إستُخدِمَ النظام أعلاه وحسب تعليمات الشركة المجهزة لهُ وفقاً لـ (9):

1- زُرعت العزلات البكتيرية على وسطي أﮔار الدم والماكونكي وحُضنت بدرجة حرارة 37°م لمدة 24 ساعة.

2- حُضِّرَ من المزروع الجرثومي عالقاً جرثومياً؛ وذلك بنقل مستعمرة واحدة من كل طبق إلى أنابيب إختبار حاوية على 3 مل من المحلول الملحي الفسلجي بتركيز 0.85 % ثم خُفِفت عكورة النمو للحصول على عالق كثافتهِ تتراوح بين (0.50 – 0.63) ملغم. مل-1 والذي يُكافئ 1.5 × 810 خلية. مل-1 بإستخدام جهاز المطياف الضوئي بطول موجي 230 نانومتر.

3- وُضِع ألـ Card cassette الخاص بتشخيص الأنواع البكتيرية في كل أنبوبة من أنابيب الإختبار الحاوية على العالق الجرثومي المُخفف ومن ثَمَ وُضِعت الأنابيب في جهاز الفايتك الذي يقوم بقراءة النتائج تلقائياً وتحديد نوع البكتريا الموجودة في العالق.

ثالثاً: حفظ وإدامة العزلات البكتيرية Preservation and maintenance of bacterial isolates

1- الحفظ قصير الأمد Short term storage: أُديمت العزلات البكتيرية لأسابيعٍ قليلة على وسط أﮔار الماكونكي. صُبَّ الوسط الزرعي بشكلٍ مائل (Slant) ولُقِحت الأطباق ثم لُفت جيداً بشريط بارافيلم (Parafilm) وحُفظِت بدرجة حرارة 4°م (10).

2- الحفظ طويل الأمد Long term storge: إستُخدِمَ وسط نقيع الدماغ والقلب بإضافة الكليسرين بتركيز 20% ووزع الوسط في قناني صغيرة محكمة الغلق وبحجم 10 مل لكل قنينة ثم عُقِمت بالموصدة ولُقحت بعدها بنسبة 0.01 مل من مزارع بكتريا *Sterptococcus* spp. ثم حُضِنت بدرجة حرارة 37°م لمدة 24 ساعة وحُفِظت بعدها بدرجة -20°م (11), إستُخدمت هذه الطريقة لحفظ المزارع البكتيرية لمدة طويلة تصل إلى ثلاثة أشهر.

رابعاً: تكوين الغشاء الحيوي Biofilm formation

إعتُمدت طريقة Christensen وجماعته (1985) التي يطلق عليها طريقة صفيحة الزرع النسيجي Tissue culture plate لتحديد تكوين الغشاء الحيوي والتي تتلخص بالخطوات التالية:

* في حالة تكوين الغشاء الحيوي من قِبل بكتريا *S. mutans* نقوم بتنميتها على وسط T.S.B. الحاوي على 1% كلوكوز وحضنها لمدة 18 ساعة بدرجة 37°م بعدها تُخفف إلى 100:1 بوسط T.S.B. خالي من الكلوكوز.
* تُحضَّر الصفيحة المعقمة الحاوية على 96 حفرة wells ويوضع داخل الحُفر الزرع البكتيري الحاوي على بكتريا *S. mutans* فقط وبواقع ثلاث مكررات, كذلك يوضع وسط سائل (T.S.B.) خالي من الكلوكوز يعتبر كسيطرة لعددٍ من الحفر.
* تُحضن الصفيحة لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37°م ثم تزال كل محتويات الحفر بعناية بوساطة قلب الصفيحة وبعد ذلك تُغسل الحفر لأربع مرات بمحلول Phosphate buffer salin (PBS) وبـ pH = 7.2 للتخلص من المحلول الطافي بالبكتريا غير الملتصقة.
* يتكون الغشاء الحيوي بوساطة إلتصاق البكتريا بالصفيحة وتُثبَّت بوساطة وضعها في الفرن بدرجة حرارة 37°م لمدة 30 دقيقة.
* تُصبَّغ الحفر بصبغة البنفسج البلوري Crystal violet 1% (و/ح) ثم تُغسل الحفر بالماء المقطر الخالي من الآيونات Deionize water ثم نتركها حتى تجف.
* يُضاف 150 مايكرولتر acetone:ethanol (20:80) (ح/ح) إلى الحفر ثم يتم وضع الصفيحة في جهاز ألـ Eliza reader لقراءة الإمتصاصية وكتابة النتائج وتحليلها حسب جدول (1):

|  |
| --- |
| **جدول (1): إلتصاقية وتكوين الغشاء الحيوي البكتيري بوساطة طريقة TCP بالإعتماد على (12).** |
| **الغشاء الحيوي المتكوِّن****Biofilm formatic** | **الإلتصاقية Adherence** | **معدل قيم الإمتصاصية للطول الموجي 630 نانومتر****Mean of OD value at 630nm** |
| لا توجد Non | لا توجد Non | 0.120> |
| متو سط Moderate | متو سط Moderate | 0.120 – 0.240 |
| عالي High | عالي High | 0.240< |

خامساً: تأثير بعض الكربوهيدرات على تكوين الغشاء الحيوي

تمَ إعادة الخطوات في الفقرة (رابعاً) بفرق أن تُنمَّى بكتريا *S. mutans* بوسط T.S.B. الحاوي على تركيز 1% من الكربوهيدرات (1% كلوكوز و 1% سكروز و 1% فركتوز وخليط من 0.5% كلوكوز و 0.5% فركتوز) ثم إكمال الخطوات الموضحة في الفقرة ذاتها.

سادساً: التحري عن الحساسية الدوائية لعزلات *S. mutans* تجاه عدداً من المضادات الحيوية

تمت زراعة (تنمية) بكتريا *S*. *mutans* في وسط (T.S.B.) لقياس حساسيتها للمضادات الحيوية قبل تكوين الأغشية الحيوية ثم تمَّ تنميتها على وسط (T.S.B.) الحاوي على 1% من الكلوكوز لفحص حساسيتها للمضادات الحيوية بعد تكوين الأغية الحيوية. وتضمَّنَ إختبار الحساسية الدوائية للعزلات البكتيرية بطريقة الأقراص بالإعتماد على طريقة (13) في الخطوات التالية:

1- غُمِّست المسحة القطنية في مرق تربتون الصويا المزروع واُزيل الفائض منها بضغطها على الجوانب الداخلية للأنبوبة.

2- نُشِرت العزلات البكتيرية على وسط مولر– هنتون الصلب بطريقة التخطيط لأكثر من مرتين وبإتجاهات مُختلفة لغرض التأكُد من نشر العزلات البكتيرية المراد إختبار حساسيتها بالتساوي، وتُركت الأطباق لمدة 15 دقيقة في درجة حرارة الغرفة لضمان إمتصاص الرطوبة.

3- وُضعت أقراص المضادات الحيوية بواقع خمسة أقراص في طبق قياسهُ 100 ملم و 12 قرصاً في طبق قياسهُ 150 ملم، والمسافة بين كل قرص وآخر 24 ملم (من مركز القرص الأول إلى مركز القرص الآخر).

4- حُضِنت الأطباق بدرجة حرارة 35°م لمدة (16 – 18) ساعة لجميع أنواع المضادات الحيوية، ثُم قيست أقطار التثبيط وقورنت مع القيم القياسية المذكورة في (14).

سابعاً: الفحوصات الجزيئية Molecular testes

1- إستخلاص الحامض النووي: العُدة المستعملة لإستخلاص ألـ DNA الكلي المُجهزة من شركة Bioneer (كوريا الجنوبية) والمتكونة من:

أ- ترسيب الخلايا Pellet cells

* نُبذ 1مل من المزروع الجرثومي لمدة 24 ساعة في درجة حرارة 35°م وعلى سرعة 1500 دورة. دقيقة-1.
* أُزيل الرائق وأُعيد تذويب الراسب بإضافة 480 مايكرولتر من محلول EDTA (50 ملي مولاري) ثم نُقل إلى أنبوبة أبندروف سعة 1.5 مل.
* أُضيف 120 مايكرولتر من اللايسوزايم.
* نُبِذَ المعلّق بسرعة 15000 دورة. دقيقة-1 لمدة دقيقتين وبعد ذلك أُزيل الرائق.

ب- تحليل الخلايا Lyse cell

* أُضيف 600 مايكرولتر من محلول Nuclei Lyses ووضع في الحمام المائي بدرجة حرارة 80°م لمدة دقيقتين ثُم بُرد في درجة حرارة الغرفة.
* أُضيف 3 مايكرولتر من محلول ألـ RNAase ومُزج جيداً وحُضر في درجة 37°م لمدة 60 دقيقة ثم بُرد في درجة حرارة الغرفة.

ج- ترسيب البروتين Protein precipitation

* أُضيف 200 مايكرولتر من المحلول المحلل للبروتين ومُزج بإستعمال المازج.
* حُضن المعلق في حمام ثلجي لمدة 5 دقائق ونُبذ بسرعة 15000 دورة. دقيقة-1 لمدة 3 دقائق.

د- ترسيب الدنا DNA precipitation

* نُقل الرائق إلى أنبوبة أبندروف جديدة ونظيفة تحتوي على 600 مايكرولتر من كحول الآيزوبروبانول في درجة حرارة الغرفة ومُزج جيداً.
* نُبذ المعلق بسرعة 15000 دورة. دقيقة-1 لمدة دقيقتين ثم أُزيل الرائق.
* أُضيف 600 مايكرولتر من الإيثانول بتركيز 70% ومُزج جيداً.
* نُبذ المعلق بسرعة 1500 دورة. دقيقة-1 لمدة دقيقتين.
* أُزيل الرائق وتُركت الأنبوبة بشكل مقلوب على ورق الترشيح لمدة 15 دقيقة.

ه- إعادة تذويب الدنا DNA rehydration

أُعيد تذويب راسب الدنا في 100 مايكرولتر من محلول تذويب (TE) في درجة حرارة 65°م لمدة ساعة كاملة أو في درجة حرارة 4°م لمدة 24 ساعة.

2- الترحيل الكهربائي على هلام الأﮔاروز Agarose gel

أُجريت عملية الترحيل الكهربائي للعزلات المدروسة لفصل مستخلص الدنا الكلي وفحصهِ على سطح هلام الأﮔاروز بالإعتماد على الطريقة التي ذكرها (10), وكالآتي:

* حُضر محلول T.B.E. buffer بتركيز (1X) بنسبة 10:1 بأخذ 10 مل من محلول T.B.E. (10X) وأُكمل الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر المعقم.
* حُضِّرَ هلام الأﮔاروز بإذابة 0.8 غم من مسحوق الأﮔاروز في 100 مل من محلول T.B.E. (1X) وعُقِّم بالموصدة وتُرك ليبرد في درجة حرارة 50°م ثم أُضيف إليه 15 مايكرولتر من محلول صبغة بروميد الأثيديوم.
* حُضِّر قالب صب الهلام (Tray) بإحاطة حافتيه المفتوحتين بشريط لاصق عريض مع تثبيت مشط تكوين الحفر Comb قرب إحدى نهايته وعلى بُعد 1سم من طرف القالب ثم صُبَّ الهلام بعناية لمنع تكوين فقاعات هوائية وروُعيَ وضع القالب في وضع أفقي لضمان تجانس سُمك الهلام وتُركَ ليتصلب مدة 30 دقيقة.
* رُفع المشط والشريط اللاصق بعناية ونُقل القالب إلى حوض جهاز الترحيل الكهربائي (Tank) الحاوي على دارئ T.B.E. buffer (1X) حيث غُمِرَ سطح الهلام الدارئ كلياً وإرتفع عنه ببُعد 1 ملم.
* حُضِّرت عينة الدنا لغرض إجراء عملية التحميل (Loading) وذلك بمزج 25 مايكرولتر من عينة الدنا مع 5 مايكرولتر من دارئ التحميل ثم نُقِلت العينة إلى إحدى حُفر الهلام.
* رُحِلت عينات الدنا بإمرار فرق جهد كهربائي قدَرهُ 80 فولت لمدة (1 – 2) ساعة.
* فُحِصت مواقع حزم الدنا المستخلص عند طول موجي 256 نانومتر بإستعمال جهاز الأشعة فوق البنفسجية.
* صُوِرَ الهلام لغرض توثيق النتائج.

3- تحضير مزيج تفاعل سلسلة إنزيم البلمرة PCR

حُضر مزيج ألـ PCR حسب تعليمات شركة Promega المُصنِّعة لهُ, وكالآتي:

* ذُوِّبَ المزيج الرئيس الأخضر في درجة حرارة الغرفة ووضعَ في المنبذة لكي تتجمع المكونات في قعر الأنبوب.
* أُعِدَّ مزيج التفاعل بالحجم المطلوب الذي يتلائم مع نوع التفاعل وكما موضح في جدول (2).
* نُبِذت مكونات المزيج في المنبذة المُبرِدة بسرعة 15000 دورة. دقيقة-1 لمدة 5 ثوانٍ.

|  |
| --- |
| **جدول (2): بادئا الدنا (DNA primers) وتسلسل قواعدهما النتروجينية وعددها المجهزان من شركة Bioneer – كوريا الجنوبية المستخدمين في فحص PCR.** |
| أسم البادئPrimer | تسلسل القواعد النتروجينيةDNA sequence | عدد القواعد (Bp) | المصدر Reference |
| *16s* rRNA | F | 5-AGCGTTGTCCGGATTTATTG-3 | 151 | صُممِت من قِبل الباحث بإستخدام برنامجDNA mfold program |
| R | 5-CATTTCACCGCTACACATGG-3 |

المكونات المذكورة في جدول (3) تم إضافتها إلى إنابيب PCR جاهزة تحتوي على بقية مكونات التفاعل Master mix بعدها مُزِجت المستويات في المازج ووضعت في جهاز ألـ PCR.

|  |
| --- |
| **جدول (3): مكونات وحجوم مزيج تفاعل سلسلة إنزيم البلمرة (PCR master mix).** |
| الحجم (مايكرولتر) | المكونات |
| 5 | DNA template |
| 1.5 | Forward primer | Primers |
| 1.5 | Reverse primer |
| 12 | PCR water |
| 20 | Total |

4- ضبط ظروف التفاعل لسلسلة إنزيم البلمرة (PCR):

ضُبطَ جهاز الـــــدورات الحــــــرارية للـ PCR على وفـــــــــــق نمــوذج Perkin Elmer Model (15). وتم تحوير النموذج ليتلائم مع مزيج مكونات عُدة ألـ Promega والبادئ الذي إقترحه لبكتريا *S. mutans*, وكما موضح في جدول (4).

|  |
| --- |
| **جدول (4): مراحل تفاعل سلسلة إنزيم البلمرة (PCR) في جهاز الدورات الحرارية.** |
| **ت** | **المرحلة** | **درجة الحرارة (°م)** | **الوقت (دقيقة)** | **عدد الدورات (دورة)** |
| 1 | المسخ الابتدائي Initial denaturation | 94 | 3 | 1 |
| 2 | المسخ Denaturation | 94 | 1 | 30 |
| 3 | الإرتباط Annealing | 65 | 1 |
| 4 | الإستطالة Extension | 72 | 1 |
| 5 | الإستطالة النهائية Final extension | 72 | 5 | 1 |

ثامناً: طريقة تسلسل الحمض النووي DNA sequencing method

أُجرِيت طريقة تسلسل الحمض النووي لبكتريا المكورات السبحيَّة *S*. *mutans* المكوِّنة للغشاء الحيوي, وذلك بتحديد تسلسل نتيجة تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل لموَّرث *16s* rRNA؛ إذ تم في البداية تنقية نتيجة تفاعل سلسلة إنزيم البلمرة البالغ طـــــولـه (151bp PCR product) من هلام الأكاروز بإستخـــــدام عدة تنقــية تُدعـــــى (EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction Kit, Biobasic. Canada). وأُجريت عملية التنقية بحسب طريقة عمل الشركة المجهزة لعدة التنقية كما في الخطوات التالية:

1- أُزيلت نتيجة تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل البالغ طولهُ (151bp PCR product) من هلام الأكاروز بوساطة شفرة جراحية مُعقمة ومن ثم نُقِل الناتج إلى أنبوبة معقمة حجم 1.5 مل.

2- أُضيفَ 400 مايكرولتر من محلول Binding buffer II لإذابة هلام الأكاروز, ومن ثم حُضِنت الأنابيب في درجة حرارة 60ºم لمدة 10 دقائق.

3- نُقِلَ المزيج إلى أنبوبة التنقية EZ-10 column وتُرِكَ لمدة دقيقتين ومن ثم وضعت الأنابيب في المنبذة بسرعة 10000 (دورة. دقيقة-1) لمدة دقيقتين وبعدها تم التخلص من الراسب.

4- أُضيفَ 750 مايكرولتر من محلول الغسل Wash solution لأنابيب التنقية وتُرِكَ لمدة دقيقتين ومن ثم وضعت الأنابيب في المنبذة بسرعة 10000 (دورة. دقيقة-1) لمدة دقيقة واحدة وبعدها تم التخلص من الراسب. بعد ذلك كُرِرت الخطوة ذاتها مرةً أُخرى.

5- أخيراً وضِعت أنابيب التنقية EZ-10 column في أنبوبة معقمة حجم 1.5 مل, ومن ثم أُضيفَ 30 مايكرولتر من محلول Elution buffer ثُم حضنت الأنابيب بدرجة حرارة الغرفة لمدة دقيقتين وبعدها نُبِذت الأنابيب بسرعة 10000 (دورة. دقيقة-1) لمدة دقيقتين لإستخراج (151bp PCR product) النقي.

أُرسِلَ ناتج تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل النقي إلى شركة Bioneer في كوريا الجنوبية لإجراء تسلسل الحمض النووي بإستخدام جهاز .(A.B. DNA sequencing system) كما حُلِّلت نتائج تسلسل الحامض النووي لمورث *16s*-rRNA بالإعتماد على موقع قاعدة البيانـات NCBI-Gene bank (Blast) لتحديد تتابع المورث (Alligment) وتمَّ كذلك تسلسل المورث بالإعتمـاد على الشجرة الوراثية Phylogenetic tree بإستعمال طريقة تحليل Neighbor–Joining Method وبإستخدام موقع multiple alligment sequencer (Clusta (W)).

**النتائج والمناقشةResults and Discussion**

أولاً: عزل وتشخيص الجراثيم المتوطِّنة في الفم

جُمِعَت 409 مُسحة من الأشخاص المصابين بأخماج الفم واللثة وتسوس الأسنان وحُصِلَ منها على 479 عزلة شُخِصت على أنها جراثيم موجبة وسالبة لصبغة ﮔرام بجهاز الفايتك؛ إذ أظهرت النتائج الواردة في جدول (5) سيادة بكتريا المكورات السبحيَّة *Streptococcus* spp. بتسجيلها أعلى نسبة مئوية بلغت 31.52% (151 عزلة) من مجموع نسب الجراثيم المعزولة من مناطق تسوس الأسنان تلتها بكتريا المكورات العنقودية *Staphylococcus* spp. بنسبة 20.45% (98 عزلة) ثمَّ عُصيات الحليب *Lactobacillus* spp. بنسبة 12.52% (60 عزلة). كما سجَّــلت خميرة *Candida* spp. نسبة عزل بلغت 10.64% (51عزلة) وبكتريا الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* نسبة 5.21% (25 عزلة) في حين إحتلت البكتريا (*Enterobacter* spp. و *Enterococcus* spp. و *Micrococcus* *feacalis* و *Corynbacterium* spp. و *Neisseria* spp. و *Shigella* spp. و *Escherichia coli* و *Proteus* spp. و *Klebsiella oxytoca*) النِسب المئوية الأقل في تواجدها في مناطق تسوس الأسنان بنسبة 4.17% (20 عزلة) و 3.34% (16 عزلة) و 2.92% (14 عزلة) و 2.50% (12 عزلة) و 2.08% (10 عزلة) و 1.67% (8 عزلات) و 1.25% (6 عزلات) و 0.83% (4 عزلات) و 0.83% (4 عزلات), على التوالي.

كـما يلاحظ من الجدول ذاته أن البكتريا العائدة لجنس المكورات السبحية *Streptococcus* spp. تُظهِر تفوّق بكتريا *S. mutans* على باقي أنواع المكورات السبحيَّة المعزولة من مناطق تسوس الأسنان بتسجيلها أعلى نسبة مئوية بلغت 37.09% (56 عزلة), بينما جاءت بكتريا *S. sangius* في المرتبة الثانية بنسبة 12.58% (19 عزلة) تلتها كُلٌ من بكتريا *S. mitis* و *S. intermedius* و *S. oralis* بنسبة 10.59% (16 عزلة) و 9.27% (14 عزلة) و 7.28% (14 عزلة), على التوالي. كما ظهــرت بكتريا *S. salivarius* بنسبة 6.62% (10 عـزلات) و *S.* *pneumoniae* بنسبة 5.96% (9 عزلات), أما أقـــل نسبة عزل فكــــانت من نصــيب بكتريا *S.* *pyogens* و *S. sorbinus* اللتان بلغت نسبة عزل كُلٌ منهما 4.63% (7 عزلات) و 3.97% (6 عزلات), على التوالي.

ويوضّح الجدول أيضاً أنَّ بكتريا *Staph. epidermidis* التابعة لجنس المكورات العنقودية *Staphylococcus* spp. أعطت أعلى نسبة مئوية بلغت 74.49% (73 عزلة) عند عزلها من مناطق تسوس الأسنان مقارنةً ببكتريا *Staph. aureus* البالغة نسبتها 25.51% (25 عزلة).

أما بكتريا *L. acidophilus* التابعة لجنس عُصيات الحليب *Lactobacillus* spp. فبلغت نسبتها المئوية 71.66% (43 عزلة) متفوقةً على بكتريا *L. casei* التابعة للجنس نفسه والبالغة نسبتها 28.33% (17 عزلة).

كما أظهرت الأنواع التابعة لخميرة المبيضات *Candida* spp. تفاوتاً في نسبة إصـــابتها, إذ تفـــــوَّق الـــــــنوع *C. albicans* بإحرازهِ أعلى نسبة مئوية بلغت 60.78% (31 عزلة) مقارنةً بكِلا النوعين *C. tropicalis* بنسبة 23.52% (12 عزلة) و *C. glabrata* بنسبة 15.68% (8 عزلات) على التوالي.

إنَّ سيادة بكتريا المكورات السبحية على بقية الجراثيم المعزولة في الدراسة الحالية تتفق مع نتائج (16) كونها المسبب الرئيس لآفات التسوس (Caries lesions). كما أنَّ سيادة النوع *S. mutans* على باقي الأنواع الأخرى يتفق مع ما وجدهُ (17) من سيادة بكتريا *S. mutans* على باقي الجراثيم المسببة لتسوس الأسنان. كما أن ظهور جراثيم المكورات العنقودية وخاصةً النوع *Staph*. *epidermidis* في محيط الفم يتفق مع ما وجدتهُ (18) من أن سبب إنتشار البكتريا هذه في محيط الفم قد يعود إلى كونها من الممرضات المهمة ذات القدرة على إحداث الأمراض الإنتهازية (Opportunistic infections) بسبب تواجدها الطبيعي على أجسام الحاملين (Carrier) على الجلد وفي أعلى الأنف والقناة الهضمية والتناسلية (19). أو بسبب إمتلاكها للعديد من المستضدات السطحية والإنزيمات التي تسـاعدها في عملية إختراق أنسجة الجسم (20).

|  |
| --- |
| **جدول (5): الجراثيم المعزولة من الفم ونسبها المئوية.** |
| ت | الجراثيم المعزولة من الفم | عدد العزلات | % | أنواعها | عدد العزلات | % |
| 1 | *Streptococcus* spp. | 151 | 31.52 | *S. mutans* | 56 | 37.09 |
| *S. sanguis* | 19 | 12.58 |
| *S. mitis* | 16 | 10.60 |
| *S. intermedius* | 14 | 9.27 |
| *S. oralis* | 14 | 9.27 |
| *S. salivarius* | 10 | 6.62 |
| *S. pneumoniae* | 9 | 5.96 |
| *S. pyogenes* | 7 | 4.63 |
| *S. sorbinus* | 6 | 3.97 |
| 2 | *Staphylococcus* spp. | 98 | 20.45 | *Staph. epidermidis* | 73 | 74.49 |
| *Staph. aureus* | 25 | 25.51 |
| 3 | *Lactobacillus* spp. | 60 | 12.52 | *L. acidophilus* | 43 | 71.66 |
| *L. casei* | 17 | 28.33 |
| 5 | *Candida* spp. | 51 | 10.64 | *C. albicans* | 31 | 60.78 |
| *C. tropicalis* | 12 | 23.52 |
| *C. glabrata* | 8 | 15.68 |
| 6 | *Pseudomonas aeruginosa* | 25 | 5.21 | ــــــــ |
| 7 | *Enterobacter* spp. | 20 | 4.17 | ــــــــ |
| 8 | *Enterococcus* spp. | 16 | 3.34 | ــــــــ |
| 9 | *Micrococcus feacalis* | 14 | 2.92 | ــــــــ |
| 10 | *Corynbacterium* spp. | 12 | 2.50 | ــــــــ |
| 11 | *Neisseria* spp. | 10 | 2.08 | ــــــــ |
| 12 | *Shigella* spp. | 8 | 1.67 | ــــــــ |
| 13 | *Escherichia coli* | 6 | 1.25 | ــــــــ |
| 14 | *Proteus* spp. | 4 | 0.83 | ــــــــ |
| 15 | *Klebsiella oxytoca* | 4 | 0.83 | ــــــــ |
| العدد الكلي للعزلات | 479 | 100 |  |

وفيما يخص عصيات الحليب المحبة للحموضة *L. acidophilus* فأن نتائج عزلها جاءت متوافقة مع

نتائج (21) في نسبة العزل. وأن سيادة خميرة المبيضات في الفم على باقي أنواع الخمائر الأخرى تتفق مع (18) إذ أن الإصابات الفطرية في المرضى الضعاف مناعياً تتضمن خميرة المبيضات دائماً؛ ذلك لإمكانيتها من إظهار قابليتها الإمراضية كممرضات حقيقية في بعض الظروف كإنتاجها لإنزيمات Proteinase و Uronidase و Collaginase و Neuroaminidase التي تساعدها في إختراق إنسجة وخلايا المضيف وإحداث الإمراضية (22). كما أن إختلاف نسب العزل للأنواع التابعة للعائلة المعوية (السالبة لصبغة ﮔرام) يعود إلى ندرة وجودها في محيط الفم, وهذا ما أكدتهُ دراسات كل من (17 و 18 و 23) من أن معظم البكتريا السالبة لصبغة ﮔرام تأتي من إلتهابات الجهاز التنفسي أو من القناة المعدية – المعوية وتظهر في الفم. وأوضحَ (24) أنَّ الإختلاف في نسب العزل يتغير تبعاً لتغير الإصابة, ووجد (25) أن نسب عزل البكتريا تزداد بإزدياد أعداد الأسنان المسوَّسة. كما يُعتقد أن لنوعية الوسط الزرعي المستعمل وطريقة العزل وعوامل أخرى غير معروفة تأثيراً كبيراً في إختلاف نسب العزل للجراثيم, إضافة إلى أن الإختلاف في مستوى الوعي الصحي والعناية المستمرة بتنظيف الأسنان وثقافة المجتمع لها تأثيراً كبيراً على ذلك.

ثانياً: تكوين بكتريا *S. mutans* للأغشية الحيوية

اُختُبِرَ تكوين الأغشية الحيوية في صفيحة الزرع (Micro titer plate) على وســط تربتون الصويا السائل مضافاً إليه 1% كلوكوز, وبالإعتماد على درجة الإمتصاصية Optical density (OD) بطول موجي 630 نانومتر كانت النتائج الظاهرة في شكل (1) كالآتي:

تكوين الأغشية الحيوية بدرجة عالية عندما تكون درجة الإمتصاصية أكبر من 0.240 نانومتر ومتوسطة عندما تكون ما بين (0.120 – 0.240) نانومتر, وأنَّ 25 عزلة (44.64%) من أصل 56 عزلة كانت عالية التكوين للغشاء الحيوي و 16 عزلة (28.57%) متوسطة التكوين في حين بلغ عدد العزلات التي لم تُحدِث أية إلتصاقية وتكوين للأغشية الحيوية هي 15 عزلة (26.79%) عند درجة إمتصاصية أقل من 0.120 نانومتر. وتتفق هذه النتائج مع نتائج (26 و 27). وتُبيِّن هذه النتائج أن العزلات المكوِّنة للأغشية الحيوية ذات قابلية تحمُل عالية لمستويات الحموضة في مناطة تسوس الأسنان إضافة لقدرتها على خفض pH الفم بسبب إستهلاكها للسكريات (الكلوكوز والفركتوز واللاكتوز) وإنتاجها لحامض اللاكتيك كمُنتج نهائي والمُسبب لحموضة الفم, وهذا متوقع بسبب إمتلاك هذه البكتريا لخاصيَّتي توليد الحموضة Acidogenesis وتحمُّض البول Acidouricity (28). كا أنَّ سبب عدم تكوين البعض من عـــزلات *S. mutans* للغشاء الحيوي قد يُعزى إلى أنَّ المُسحات التي أُخِذت من الفم كانت من أشخاص متعاطين للمضادات الحيوية أو مستخدمين نوعاً من المضمضات التي تحدْ من عوامل ضراوة بكتريا *S*. *mutans*.

****

**شكل (1): النسب المئوية لعزلات *S. mutans* المكوِّنة للغشاء الحيوي.**

ثالثاً: تأثير الكربوهيدرات على عزلات *S. mutans* المكوِّنة للأغشية الحيوية

يُبيِّن الشكل (2) أنَّ نسبة 35.71% (20 عزلة) من عزلات *S. mutans* (56 عزلة) كوَّنت الغشاء الحيوي بوجود السكروز Sucrose في الوسط, في حين بلغت نسبة العزلات المكوِّنة للغشاء الحيوي بوجود الكلوكوز Glucose والفركتوز Fructose معاً في الوسط 25.00% (14 عزلة). كما نلاحظ أنَّ 16.07% (9 عزلات) من العزلات كوَّنت الغشاء الحيوي بوجود الكلوكوز و 12.50% (7 عزلات) بوجود الفركتوز, بينما بلغت نسبة العزلات المكوِّنة للغشاء الحيوي بغياب السكريات Non sugar في الوسط 10.71% (6 عزلات). وجاءت نتائجنا متطابقة مع نتائج (29) ومتوافقة مع نتائج (30).

إنَّ قابلية البكتريا على تكوين الأغشية الحيوية وخاصةً *S. mutans* تزداد بوجود السكريات وخاصةً السكروز والكلوكوز (31) التي تساعدها على الإلتصاق على سطوح الأسنان من خلال آلية إفراز الإنزيمات خارج خلوية (Glucosyltransferases (GTFs) و Fructosyltransferases (FTFs)) والكـلوكان المرتبط بالبروتينات (Glucan-binding proteins (GBPs)), كل هذه العـوامل تُثبت الدور المرضي لبكتريا *S. mutans*, كما أن الكلوكان الذائب في الماء الذي تنتجه بكتريا *S. mutans* يمكن أن يتواجد عندما يقل تركيز الكالسيوم والفوسفات في اللعاب والذي هو سبباً آخــــر لبداية تنخر الأسنان وتكوين الأغشية الحيوية (32).

إنَّ إضافة السكريات في أوساط النمو للبكتريا السبحيِّة تؤثر إيجاباً في عملية تكوين الغشاء الحيوي على مختلف السطوح الحية (33) ذلك لأن تجويف الفم يحتوي على أنواعٍ عديدةٍ من البكتريا المختلفة التي بعضها ينمو ويتكاثر في بيئة مختلفة من الأغذية والمشروبات الحاوية على السكريات أو النشويات المطبوخة المعروفة بإسم الكربوهيدرات المخمرة (Fermented carbohydrates), وحين لا تتم إزالة هذه الكربوهيدرات بوساطة تنظيف الاسنان تقوم البكتريا بتحويلها إلى أحماضٍ في غضون 20 دقيقة متحولةً في ذلك البكتريا والأحماض وجزيئات الطعام واللعاب إلى لويحة سنيَّة (Dental plaque) عبارة عن طبقة لزجة تغطي الاسنان, وعند وضع اللسان على الأسنان يمكن إستشعار هذه اللويحة السنية بعد ساعاتٍ قليلة فقط من تنظيف الاسنان وتكون هذه اللويحة خشنة بعض الشــــــيء في منطقـــــــة الأســــــنان الطواحن (Molars) وخاصةً على طول خط اللثة (34).

كما أنَّ الأحماض التي تتكون في اللويحة السنية تهاجم المعادن الموجودة في الطبقة الصلبة من السن والمسماة بالمينا (Enamel) وهي الطبقة الخارجية التي تغطي السن ويؤدي تآكلها إلى حدوث ثقوب صغيرة فيها تسمى بتسوس الأسنان مُكسِبةً البكتريا والأحماض قدرة على الوصول إلى الطبقة الثانية (الوسطى) من السن المسماة بالعاج (Dentine) التي تكون أكثر ليونة وأقل قدرة على مقاومة الأحماض من الطبقة الأولى, وحين تصل عملية تسوس السن إلى هذه النقطة تزداد سرعة تعفن السن تدريجياً وتتقدم البكتريا والإحماض في طريقها إلى داخل الطبقات التي يتكون منها السن وصولاً إلى داخل طبقة اللب السني (Dental pulp) مما يؤدي إلى إنتفاخهـــا وتهيُّجها (35).

****

**شكل (2): النسب المئوية لعزلات *S. mutans* المكوَّنة للغشاء الحيوي بتأثير الكربوهيدرات.**

رابعاً: مقاومة عزلات *S. mutans* للمضادات الحيوية قبل وبعد تكوين الأغشية الحيوية

اُجـري إختبار فحص الحساسية الدوائية لجميع عزلات *S. mutans* الواردة في الدراسة والمُسببة لتسوس الأسنان (كونها المسبب الأول والأكثر تردداً وشيوعاً) إتجاه مجموعة من المضادات الحيوية ومقاومتها لها من خلال قياس قطر منطقة تثبيط النمو حول أقراص المضادات المستخدمة ومقارنتها بما ورد في (14).

يُبيِّن الشكلين (3) و (4) أنَّ جميع عزلات *S. mutans* المُسبِبة لتسوس الأسنان قاومت مضاد الإرثرومايسين (Erythromycin) قبل وبعد تكوين الغشاء الحيوي بنسبة 98.21% و 94.64% على التوالي والأموكسيسيلين (Amoxicillin) بنسبة 85.71% قبل وبعد التكوين على التوالي, كما قاومت مضاد الأمبيسيلين (Ampicillin) وحامض النالديسك (Nalidixic acid) بنسبة 80.35% قبل التكوين لكلٍ منهما و 83.92% و87.50% بعد التكوين لكلٍ منهما, على التوالي.

وأظهرت العزلات مقاومة إتجاه مضادات السيفوتاكسيم (Cefotaxime) والكلورامفينيكول (Chloramphenicol) والأموكسيسيلين – حامض الكلافيولانك والجنتامايسين (Gentamicin) والتتراسايكلين (Tetracycline) بنسبة (69.64 و 69.64 و 58.92 و 57.14 و 55.35)% قبل تكوين الغشاء الحيوي, على التوالي وبنسبة (75.00 و 89.28 و 76.78 و 78.57 و 66.07)% بعد تكوين الغشاء الحيوي, بالترتيب. في حين أظهرت العزلات ذاتها مقاومة ضعيفة وحساسية عالية تجاه مضادي الأميكاسين (Amikacin) والترايميثوبـــــرايم سلفاميثاكســــــــيل (Trimethoprim sulfamethaxale) بنسبة (25.00 و 7.14)% قبل تكوين الغشاء الحيوي و (48.21 و 19.64)% بعد التكوين, على التوالي.

**شكل (3): مقاومة عزلات *S. mutans* للمضادات الحيوية قبل تكوين الغشاء الحيوي.**

**شكل (4): مقاومة عزلات *S. mutans* للمضادات الحيوي بعد تكوين الغشاء الحيوي.**

كما نلاحظ من الشكلين أيضاً أن مقاومة العزلات للمضادات الحيوية إزدادت بعد تكوينها للغشاء الحيوي مما يدل على زيادة ضراوتها بعد تكوينها للغشاء الحيوي, وذلك يرجع إلى تركيبة الغشاء الحيوي والخصائص الفسلجية للكائنات المكونة لهُ والتي تتحكم بنسب دخول جزيئات المضاد الحيوي بوساطة جزيئات الكربوهيدرات خارج خلوية المكونة لذلك الغشاء والتي تعمل على عرقلة إنتقال المضادات الحيوية إلى داخل الغشاء أو من خلال إرتباطها بصورة آيونية مع جزيئات المضادات الأخرى (11). ومن الآليات الأخرى التي تكتسبها المستعمرات البكتيرية المتجمعة والمكونة للغشاء الحيوي هي القابلية البطيئة على أخذ المضادات الحيوية من قِبل البكتريا الواقعة في الطبقة السفلى العميقة من الغشاء الحيوي بسبب إنعدام الأوكسجين وقلة وصول المغذيات لها مُنحصراً بذلك على الطبقة العليا من الغشاء الحيوي التي تتأثر بالمضاد الحيوي فقط (3). كما أن الكثافة العالية التي تنتج من الزيادة في صفة التلامس للخلايا البكتيرية المكونة للغشاء الحيوي مع بعضها البعض تؤدي إلى إكسابها حالة من التغاير الوراثي والتي تُعتبر من الأسباب المهمة لمقاومة المضادات الحيوية عِبرَ البلازميدات الحاملة لجينات المقاومة فيما بينها (36). إضافة إلى ذلك فأن بقاء الغشاء الحيوي لمدة طويلة وإتخاذ بعض طبقاتهِ العليا (يُطلق عليها بالخلايا الدائمية) حالة من السكون عند تعرضها المستمر للمضادات الحيوية حتى وأن كانت بتراكيز عالية ذات تأثير قاتل فأن تلك البكتريا تمتلك خصائص مظهرية مغايرة لبقية الجراثيم الأخرى المكونة للطبقة العليا من الغشاء الحيوي مُكتسِبة بذلك مقاومة عالية للمضادات الحيوية ومُعوضة التالف من البكتريا التي تم القضاء عليها ببكتريا أخرى أعلى مقاومةً وضراوةً (37).

إنَّ من الشائع مقاومة بكتريا *S. mutans* لمركبات الماكروليدات (Macrolides) التي من ضمنها الإرثرومايسين؛ إذ تنشأ المقاومة من خلال إنتاج إنزيم RNA methylase المُشفَّر بوساطة مورثة *erm* (38), واُدرجَ الإرثرومايسين ضمن قائمة المضادات الحيوية التي تُجابه بمقاومة عالية من قِبل *S. mutans* حيث وصلت نسبة المقاومة في بعض السلالات إلى 100% (39) وهي مُقاربة من نسبة المقاومة لمركبات الماكروليدات في الدراسة الحالية.

كما أنَّ التباين الملحوظ الذي أظهرتهُ عزلات *S. mutans* في مقاومتها للمضادات الحيوية المُستخدمة قد يعود سببهُ إلى التنوع في آليات المقاومة من خلال إنتاج إنزيمات البيتالاكتام المُثبطة لهذه المضادات أو من خلال تغيير مواقع إرتباط البروتينات الرابطة للبنسلين Penicillin binding proteins (PBPs) (40). والسبب الآخر يعتمد على عوامل الضراوة للبكتريا ذاتها؛ إذ تُظهر بعض العُزلات مُقداراً من المقاومة أكثر من غيرها وأنَّ الإختلاف في ظروف الإختبارات ونوع التقنيات المُستخدمة في الدراسة كُل ذلك مُجتمعاً يُوجد إختلافاً في مستويات المقاومة (33).

وأكَّدَ (41) بأنَّ المقاومة لمركبات البنسلين (Penicillins) لا تشمل فقط إنتاج إنزيم البنسلين وإنزيمات البيتالاكتام بل يتعدى ذلك إلى إنتاج البروتينات الرابطة للبنسلين (PBPs) الواقعة في الغشاء السايتوبلازمي المرتبط بجدار الخلية, وتمتلك هذه البروتينات فعالية إنزيمية مثل Transpeptidases و Carboxypeptidases؛ إذ تُعد هذه البروتينات هدفاً لكلٍ من المضادات الحيوية (البنسلينات والسيفالوسبورينات) تعمل على تغيير الهدف لمضادات البيتالاكتام وبالتالي تنتُج المقاومة البكتيرية لتلك المضادات, وإنَّ معظم المقاومة التي تُبديها سلالات *S. mutans* تكون ذات منشأ بلازميدي؛ لِما للبلازميدات من دور في إنتاج إنزيمات البيتالاكتام ومسؤوليتها عن تشفير بعض البروتينات الرابطة للبنسلين (PBPs) (Fuda *et* *al*., 2006).

إنَّ مقاومة عزلاتنا لمضاد حامض الناليديسك تحدث بعد التعرض لهُ من خلال طفرات كروموسومية تؤدي إلى تغيير في موقع الهدف المتمثل بإنزيمDNA gyrase الذي يعمل على إلتفاف شـريط ألـ DNA (Poirel *et al*., 2006). كما أن سبب مقاومة مضاد الكلورامفينيكول ناتج عن تحطيم الــدواء من قِبل عزلات *S. mutans* بوساطة إنزيم Chloramphenicol acetyl transferase (Booth *et* *al*., 2001). وآلية مقاومة مضاد Amoxicillin – Clavulanic acid الذي هو من المضادات ذات التأثير التعاضدي والمُتميز بمقاومتهِ لإنزيمات البيتالاكتام لا تختلف عن آليات مقاومة المضادات الأخرى من خلال تغيير موقع الهدف لمضادات البيتالاكتام أو من خلال خفض نفاذية المضاد الحيوي عِبرَ غشاء الخلية البكتيرية (42).

أما سبب المقاومة التي أبدها العزلات البكتيرية إتجاه مضادي الجنتامايسين والتتراسايكلين فيُعزى إلى إستعمالهِ موضعياً أو إلى حدوث طفرة أثَّرت في نضوحية الغشاء الخارجي لهذا المضاد (43).

وفيمـــا يخص مضادَّي ألـ Amikacin و Trimethoprim sulfamethaxale فأن المقاومة الضعيفة والحساسية العالية التي أبدتها عزلاتنا لها يُمكِننا من إعتبار هذين المضادين من المضادات الحيوية ذات التأثيرات العلاجية المتوسطة؛ إذ يُمكن الإستفادة من هذه التأثيرات في علاج الأخماج الناتجة عن بكتريا *S. mutans* المُقاومة للعديد من المضادات الحيوية المختلفة.

خامساً: التوصيف الجزيئي التوكيدي لعزلات *S. mutans*

1- تفاعل سلسلة إنزيم البلمرة Polymerase chain reaction (PCR)

أظهرَ الشكل (5) إمتلاك جميع عزلات *S. mutans* (14 عزلة منتخبة من 56 عزلة؛ بإعتبارها منتجةً للغشاء الحيوي وأكثر مقاومة للمضادات الحيوية) المرحَّلة كهربائياً على هلام الأﮔاروز لمورثة *16S* ribosomal RNA التي تُمثّل المورثة التشخيصيّة لبكتريا *S. mutans* بطول 151 زوج قاعدي Base pairs (bp) مما يُثبت عائدية جميع العزلات (12 عزلة) لتلك البكتريا (44).

**شكل (5): الترحيل الكهربائي لمورثة *16S* ribosomal RNA (151 bp) المتضاعفة بإستخدام تقنية ألـ (PCR) لعزلات *S. mutans*.**

M = المَعلَم القياسي (1000 bp)

(1 – 12) عدد عزلات *S. mutans*

ظروف الترحيل: هلام الأكاروز (1%) , فرق الجهد (80 فولت) , الزمن (95 دقيقة)

2- الكشف عن تسلسل القواعد النتروجينية لمورثة *16S* rRNA في عزلات *S. mutans*

أُجريَّ الكشف عن تتابع تسلسل القواعد النتروجينية لمورثة *16S* rRNA في عزلات *S. mutans* لبيان أوجه التشابه والإختلاف مع عزلات *S. mutans* القياسية العالمية من خلال تحليل تتابع تسلسل المورث بوساطة الشجرة الوراثية Phylogentic tree analysis (شكل – 6) إذ أظهرت نتائج تحليل الشجرة الوراثية Phylogenetic tree analysis لمورثة *16S* rRNA في عــزلات *S. mutans* المحلية وجود تقارب مع العزلة القياســية الأسبانية Spain isolate (AJ554208.1) إضافةً إلى وجود تقارب بنسبة أقل عند مقارنتها بالعزلات القياسية الكورية (DQ677785.1) والأمريكية (AY188348.1) والكندية (DQ303189.1) والهندية (JX678701.1) واليابانية (AB294730.1) كما في شكل (7) وملاحقهُ (2 و 3 و 4 و 5 و 6) التي تُبيِّن التشابه ما بين العزلات المحلية مع العزلة الأسبانية في الموقعين النيوكليوتيدين (14 و 15) اللذان يمثِّلان (TT).

****

**شكل (6): تحليل العلاقة في الشجرة الوراثية لسلالة *S. mutans* المحلية مع الســــلالات العالمية منها (الإسبانية والهندية والكورية والأمريكية والكندية واليابانية) لتسلسل مورثة *16s* rRNA الأساسية.**

****

**شكل (7): الترتيب المتسلسل لجزء من مورثة *16s* rRNA في سلالة *S. mutans* المحلية والسلالات العالمية منها (الإسبانية والهندية والكورية والأمريكية والكندية واليابانية) ظاهراً التشابه الأكثر بين السلالة المحلية والسلالة العالمية الإسبانية في الموقعين النيوكليوتيدين 14 و 15.**

ويُبيِّن جدول (6) التشابه بين عزلتي *S*. *mutans* (1 و 5) المحلية مع العزلة الأسبانية بنسبة 90% بينما بلغت نسبة تشابه العزلة الأسبانية مع العزلات المحلية (2 و 3 و 4) 89% لكل واحدة بالتساوي. وفيما يتعلَّق بالعزلات القياسية اليابانية والكندية والهندية والكورية والأمريكية فأنها أعطت جميعاً نسبة تشابه متساوية فيما بينها لكل عزلة من عزلاتنا المحلية؛ إذ بلغت نسبة تشابه العزلة المحلية الأولى مع العزلات القياسية المذكورة 88% والعزلة الثانية 88% والثالثة 89% والرابعة 87% و الخامسة 88%, على التوالي.

إنَّ الغرض من ألـ DNA sequencer هو توكيد لعزلاتنا (*S*. *mutans*) بالإضافة إلى معرفة مع من يكون تشابهها من بين العزلات العالمية. وهذه النتائج تؤكد على صحة تشخيص عزلات *S*. *mutans* بعد مقارنتها مع عزلات قياسية عالمية لمعرفة تسلسل القواعد النتروجينية لمورثة *16s* rRNA التي تُمثِّل لمورثة المرجعية (Refrence gene) لتشخيص عزلات *S*. *mutans* (43). وإنَّ التشخيص الدقيق على المستوى الجزيئي المتمثل بمعرفة التشابه لـ DNA العزلات لهُ فائدة تشخيصية فضلاً عن إمكانية لإستخدام بعضاً من هذه العزلات في التطبيقات العملية كمُعززات حيوية أو دوائية أو في إستخدامها لدراسات الوراثة الجزيئية لا سيما أنهُ لا توجد دراسات سابقة حول تحليل تتابع القواعد النتروجينية لعزلات *S*. *mutans* في العراق وبالتالي الإستفادة منها في قاعدة البيانات ضمن موقع NCBI الخاص ببنك الجينات (Gene Banck).

|  |
| --- |
| **جدول (6): نِسب التقارب ما بين سلالات *S. mutans* المحلية والسلالات العالمية منها (الإسبانية والهندية والكورية والأمريكية والكندية واليابانية).** |
| **ت** | **Accession****Number** | **Name of the CEV****Sequences** | **Country** | **Homology sequence identity for local *S. mutans* isolates** |
| ***S. mutans*****(1)** | ***S. mutans*****(2)** | ***S. mutans*****(3)** | ***S. mutans*****(4)** | ***S. mutans*****(5)** |
| 1 | AJ554208.1 | *S. mutans* partial *16s* rRNA gene, strain CECT 4034 | Spain | 90% | 89% | 89% | 89% | 90% |
| 2 | AB294730.1 | *S. mutans* gene for *16s* rRNA, partial sequence | Japan | 88% | 88% | 89% | 87% | 88% |
| 3 | DQ303189.1 | *S.* *mutans* strain ATCC 25175 *16s* rRNA gene, partial sequence | Canada | 88% | 88% | 89% | 87% | 88% |
| 4 | JX678701.1 | *S. mutans* strain P34 *16s* rRNA gene, partial sequence | India | 88% | 88% | 89% | 87% | 88% |
| 5 | DQ677785.1 | *S. mutans* strain ChDC YM22 *16s* rRNA gene, partial sequence | Korea | 88% | 88% | 89% | 87% | 88% |
| 6 | AY188348.1 | *S. mutans* strain ATCC 25175 *16s* rRNA gene, complete sequence | USA | 88% | 88% | 89% | 87% | 88% |

**الإستنتاجات والتوصيات Conclusions and Recommendations**

أولاً: الإستنتاجات Conclusions

1. سيادة بكتريا *S. mutans* كمُسبب رئيس لأخماج الفم عند الإنسان وخاصةً تسوس الأسنان الذي لهُ دوراً كبيراً في زيادة إنتشار الجراثيم في الفم وتكوينها للأغشية الحيوية وخاصة عند توفر الكربوهيدرات.
2. قابلية عزلات *S. mutans* على إبداء مقاومة متعددة لعددٍ من المضادات الحيوية المدروسة لإمتلاكها مورثات عوامل الضراوة وتكوين الأغشية الحيوية.
3. وجود تشابه في الشجرة الوراثية للموَّرث المحافظ (*16S* rRNA) بين سلالة *S. mutans* المحلية والسلالة القياسية الإسبانية في الموقعين النيوكليوتيدين 14 و 15.

ثانياً: التوصيات Recommendations

1. إجراء الفحص الدوري للفم للتحري عن وجود المسببات المرضية تجنُباً لحدوث الإصابة اللاعرضية، والتي يمكن لها إن تتطور إلى إصابة عرضية تؤثر على حالة الفم.
2. الإمتناع عن إستخدام المضادات الحيوية بصورة مستمرة وبشكلٍ عشوائيٍ لتأثيرها السلبي على توازن التنوع الجرثومي داخل الجسم بشكلٍ عام والفم بشكلٍ خاص.

**المصادر References**

**1- Lamont, R. J. and Jenkinson, H. F. (2010).** “Oral Microbiology ata Glance” Wiley Blackwell. Singapore, Hong Kong.

**2- Donlan, R. M. (2002).** Biofilm microbial life on surface. J. Emer. Infect. Dis., 8(9): 881 – 890.

**3- Rogers, A. H. (2008).** Molecular Oral Microbiology. Caister Academic Press.

**4- Aas, J. A.; Paster, B. J.; Stockes, L. N.; Olsen, I. and Dewhirst, F. E. (2005).** Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. J. Clin. Microbiol., 43: 5721 – 5732.

**5- Roberts, M. C. (2002).** Antibiotic toxicity, interactions and resistance development. Periodontology, 28: 28 – 297.

**6- Ryder, M. A. (2005).** Cather-related infection it’s all about biofilm. Advanced Practice Nursing, 5(3) :1 – 15.

**7- Wen, Z. T.; Yates, D.; Ahn, S. – J. and Burne, R. A. (2010).** Biofilm formation and virulence expression by *Streptococcus mutans* are altered when grown in dual-species model. B.M.C. Microbiol., 10(111): 1 – 9.

**8- Han, T. K. (2005).** Development of a DNA vaccine against *Streptococcus mutans*: a novel approach to immunization against dental caries. Ph. D. Thesis, College of Arts and Sci., Univ. South Florida, USA.

**9- Fritsche, T. R.; Swoboda, S. E.; Olson, B. J.; Moore, F. M.; Meece, J. K. and Novicki, T. J. (2011).** Evaluation of The Sensititre ARIS2x and Vitek 2 Automated Systems for Identification of Bacterial Pathogens Recovered from Veterinary Specimens. Marshfield labs. Lacrosse Univ. Wisconsin. USA.

**10- Mainiatis, T.; Fritsch, E. F. and Sambrook, J. (1982).** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

**11- Lewis, K. (2001).** Riddle of biofilm resistance antimicrobial. Agents Chemother., 45: 999 – 1007.

**12- Mathur, T.; Singhal, S.; Khan, S.; Upadhyay, D. J.; Fatma, T. and Rattan, A. (2006).** Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: an elevation of three different screening methods. India J. Med. Microbiol., 24(1): 25 – 29.

**13- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) (2003).** Performance standards for disks susceptibility testing; approved standard, 6th ed. PP: 100-113, Wayne, Pennsylvania, USA.

**14- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (2013).** Performance standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 23th Information Supplement 33(1). Wayne, Pennsylvania, USA.

**15- Collee, J; Gerald, G.; Fraser, F.; Andrew, G.; Marmion, M.; Barrie, P.; Simmon, S. and Anthong, N. (1996).** Mackie and McCartney Practical Medical Microbiology. 14th ed., Churchill Livingstone, New York, PP: 131–150.

**16- Simon, L. (2007).** The role of *Streptococcus* *mutans* and oral ecology in the formation of dental caries. J. Microbiol., 2: 510 – 533.

**17- الزبيدي, أسامة فيصل كوكز (2010).** تأثير المعزز الحيوي (Probiotic) المُحضَّر من بكتريا *Lactobacillus acidophilus* على إلتصاقية البكتريا المعزولة من تسوس الأسنان. رسالة ماجستير. كلية العلوم. جامعة القادسية. العراق.

**18- الموسوي، علياء موسى علي (2006).** عزل وتشخيص بعض البكتريا والخمائر المرافقة لبعض أمراض الفم في مدينة الناصرية وإختبار حساسيتها الدوائية. رسالة ماجستير. كلية التربية. جامعة ذي قار. العراق.

**19- Landman, D. (2001).** Management of infections due to resistance *Staphylococcus* *aureus*. A. M. J. Infect., 30: 250 – 255.

**20- Fong, I. W. (2002).** Infections and their role in atherosclerotic vascular disease. J. A. M. Dent. Assoc., 133: 75 – 135.

**21- الحسيني, عدي متعب هادي (2002).** دراسة مايكروبايلوجية لمسببات تسوس الأسنان وإلتهاب اللثة وما حول السن والخراجات حول الجذر في محافظة النجف. رسالة ماجستير. كلية العلوم. جامعة الكوفة. العراق.

**22- Rouabhia, M. and Chmielewski, W. (2012).** Disease associated with oral poly microbial biofilms. The open Mycol. J., 6: 27 – 32.

**23- Waltimo, T. M. T.; Siren, E. K.; Torkko, H. L. K.; Olsen, I. and Hapaselo, M. P. P. (1997).** Fungi in therapy – resistant apical periodontitis. Int. Endod. J., 30: 96 – 101.

**24- AL – Aswad, J. D. (1999).** Prevalence and microbiology of oral mucosal lesion in a sample of complete denture wearers. M. SC. Thesis in Oral Medicine, College for Dentistry – University of Baghdad. Iraq.

**25- Sulaiman, A.** **W. (2000).** Quantitative measurement of urea content in saliva, acquired pellicle and dental caries susceptibility in human adults. M. SC. Thesis in Preventive Dentistry, College of Dentistry – University of Baghdad. Iraq.

**26- Duarte, S.; Klein, M. I.; Aires, C. P.; Cury, J. A.; Bowen, W. H. and Koo, H. (2008).** Influences of starch and sucrose on *Streptococcus* *mutans* biofilms. Oral Microbiol. Immunol., 23: 206 – 212.

**27- Bedran, T. B. L.; Azelmat, J.; Spolidorio, D. and Grenier, D. (2013).** Fibrinogen-induced *Streptococcus mutans* biofilm formation and adherence to endothelial cells. BioMed. Res. Int., 10: 1155 – 1163.

**28- Ghasempour, M.; Rajabnia, R.; Irannejad, A.; Hamzeh, M.; Ferdosi, E. and Bagheri, M. (2013).** Frequency, biofilm formation and acid susceptibility of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in saliva of preschool children with different levels of caries activity. Dent. Res. J., 10(4): 440 – 445.

**29- Tahmourespour, A.; Kermanshahi, R. K.; Salehi, R. and Pero, N. G. (2010).** Biofilm formation potential of oral streptococci in related to some carbohydrate substrates. Afric. J. Microbiol. Res., 4(11): 1051 – 1056.

**30- Leme, A. F. P.; Koo, H.; Bellato, C. M.; Bedi, G. and Curry, J. A. (2006).** The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation – new insight. J. Dent. Res., 85(10): 878 – 887.

**31- Caglar, E.; Kargul, B. and Tanbogaet, I. (2005).** Bacteriotherapy and probiotics role on oral health. J. Oral Dis., 11: 1 – 7.

**32- Shemesh, M.; Tam, A. and Steinberg, D. (2007).** Expression of biofilm – associated gene of *Streptococcus* *mutans* in response to glucose and sucrose. J. Med. Microbiol., 56: 1528 – 1535.

**33- Brown, T. A.; Ahn, S. J.; Frank, R. N.; Chen, Y. Y.; Lemos, J. A. and Burne, R. A. (2005).** A hypothetical protein of *Streptococcus* *mutans* is critical for biofilm formation. Infect. Immun. J., 73(5): 3147 – 3150.

**34- Li, Y. and Burne, R. A. (2013).** Regulation of the *gtfBC* and *ftf* genes of *Streptococcus mutans* in biofilms in response to pH and carbohydrate. Microbiol., 147: 2841 – 2848.

**35- Shemesh, M.; Tam, A.; Aharoni, R. and Steinberg, D. (2010).** Genetic adaptation of *Streptococcus* *mutans* during biofilm formation on different types of surfaces. B.M.C. Microbiol., 10(51): 1 – 10.

**36- Parsek, M. and Singh, P. (2003).** Bacterial biofilm can emerging link to disease pathogenesis. Annul. Rev. Microbiol., 45: 50 – 55.

**37- Keren, I.; Shah, D.; Spoering, A.; Kadalu, N. and Lewis, K. (2004).** Specialized per sister cells and the mechanism of multi drug tolerance in *E. coli* bacterial. 186: 8172 – 8180.

**38- Jorgensen, J. H.; Crwford, S. A.; McElmeel, M. L. and Fiebelkorn, K. R. (2004).** D–zone test clindamycin resistance of staphylocci in conjunction with performance of automatically detection. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 42: 1800–1802.

**39- Leclercq, R. and Courvalin, P. (1999).** Bacterial resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin antibiotics by target modification. Antimicrob. Agents Chemother., 35: 1267 – 1272.

**40- Hiramatsu, K.; Cui, L.; Kuroda, M. and Ito, T. (2001).** The emergence and evolution of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Trends. Microbiol., 9: 486–493.

**41- Fuda, C.; Suvorov, M.; Vakulenko, S. B.; and Mobashery, S. (2004).** The basis for resistance to beta – lactam antibiotics by penicillin binding protein 2a of methicillin – resistant *Staphylococcus aureus*. J. Biol. Chem., 279: 40802–40806.

**42- Fuda, C.; Hesek, D.; Lee, M.; Heilmayer, W.; Novak, R.; Vkulenko, S. B.; and Mobashery, S. (2006).** Mechanistic basis for the action of new cephalosporin antibiotics effective against methicillin and vancomycin resistant *Staphyloccocus aureus*. J. Biol. Chem. 281: 10035–10041.

**43- Lal, D.; Verma, M. and Lal, R. (2011).** Exploring internal features of *16S* rRNA gene for identification of clinically relevant species of the genus streptococcus. Annals Clin. Microbiol. Antimicrob., 10: 28 – 39.

**44- Kawamura, Y.; Hou, X. G.; Sultana, F.; Liu, S.; Yamamoto, H. and Ezaki, T. (1995).** Determination of *16S* rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus Streptococcus. Int. J. Syst. Bacteriol., 45: 406 – 408.

**\*Phenotypic and molecular characterization of *Streptococcus* *mutans* bacteria isolated from the mouth and test their ability to form biofilms and their resistance to antibiotics**

**Receved :12/3/2014 Accepted :8/6/2014**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Majed K. A. Al-Shebli** | **Adnan H. Al-Hamadani** | **Wafaa A. J. Al-Kaaby** |
| **Dept. Biology - College of Education****AL-Qadisiya Univ.** | **Dept. Microbiology - Medicine college****AL-Qadisiya Univ.** | **Dept. Biology - College of Education****AL-Qadisiya Univ.****alkaaby@yahoo.com** |

**Abstract:**

A total of 479 bacterial isolates were collect from 409 swabs from the teeth surfaces teeth and gingiva of the auditors admitted to the centers specialist and dental clinics in Al-Diwaniya city for different ages by specialist doctor on period from 1/11/2012 AC till 1/3/2013 AC.

Bacterial isolates diagnosed by Vitek compact 2 system to positive and negative gram stain head it *Streptococcus* spp. by highest percentage of 31.52%, followed by *Staphylococcus* spp. by 20.45% and *Lactobacillus* spp. by 12.52% and *Candida* spp. by 10.64%, and follow then some germs that made ​​a few percentages compared to the bacteria mentioned, also *S. mutans* obtain among microbial species isolated from teeth surfaces and gingiva frequency highest in the number of isolates (56 isolate) and tested their on biofilm formations; then 44 isolation (44.64%) high formations, 16 isolation (28.57%) medium formations and 15 isolation (26.79%) non biofilm formations. The impact of carbohydrates appear apparent on *S. mutans* isolates in biofilm formations on bio-growth medium; then amounted to the presence of sucrose 35.71%, followed by glucose with fructose together in the medium (25.00%) then glucose (16.07%) and fructose (12.50%), while the percentage of carbohydrates absence in the growth medium 10.71%.

The drug sensitivity of *S. mutans* isolates were tested trend 11 antibiotic by using disks diffusion method which showed that the resistance of isolates to antibiotics was higher than the sensitivity of her as well as they were increase after biofilm formations; where resistant isolates convey to Erythromycin before and after biofilm formations (98.21 and 94.64)%, Amoxicillin (85.71)% each for both, and Ampicillin (80.35 and 83.92)%, Nalidixic acid (80.35 and 87.50)%, Cefotaxime (69.64 and 75.00)%, Chloramphenicol (69.64 and 89.28)%, Amoxicillin-Clavulanic acid (58.92 and 76.78)%, Gentamicin (57.14 and 78.57)%, Tetracycline (55.35 and 66.07)% each respectively, while showed high sensitivity to Amikacin (25.00 and 48.21)% and Trimethoprim sulfamethaxale (7.14 and 19.64)% each, respectively. 12 isolates elected tested from the 56 isolates of *S. mutans*; as a biofilm producer and more resistant to antibiotics and were containing *16s* RNA gene was representing diagnostic gene for these bacteria using polymerase chain reaction (PCR) technique, results also showed DNA sequences of the conservative gene (*16s* rRNA) in isolates of *S. mutans* biofilm formations and by means of phylogenetic tree analysis for that gene, the similarity appeared between *S. mutans* local strain with Spain standard strain (AJ554208.1) in 14 and 15 nucleotide locations.

Key words: Phenotypic, *Streptococcus* *mutans*, Biofilms, Antibiotics, molecular characterization

ـــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــــ

\*The Research is a part of Ph. D. Dissertation in the case of first researcher.