جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة القادسية/كلية التربية

قسم علوم الحياة

عزل وتشخيص البكتريا الهوائية من الاسنان

بحث تخرج مقدم إلى

مجلس كلية التربية/ جامعة القادسية وهو جزء من متطلبات نيل شهادة البكالوريوس في

علوم الحياة

بحث الطالب

عبدالحسين كاظم حزام

أشراف الدكتورة

دينا محمد رؤوف

٢٠١٩ م ١٤٤٠ هـ

بسم الله الرحمن الرحيم

﴿وَفَوْقَ كُلِّ ذِي عِلْمٍ عَلِيمٌ﴾

سورة يوسف (٧٦)

الاهـــــــداء

يامن احمل اسمك بكل فخر

يا من افتقدك منذ الصغر

يا من يرتعش قلبي لذكرك

يامن أودعتني لله اهديك هذا البحث

أبي

الى حكمتي ..... وعلمي

الى أدبي ..... وحلمي

الى طريقي ..... المستقيم

الى طريق ..... الهداية

الى ينبوع الصبر والتفاؤل والامل

الى كل من في الوجود بعد الله ورسوله أمي الغالية

الى سندي وقوتي وملاذي بعد الله

الى من اثروني على انفسهم

الى من علموني علم الحياة

الى من أظهروا لي ما هو اجمل من الحياة اخوتي

الى القلوب الطاهرة الرقيقة والنفوس البريئة الى رياحين حياتي اخواتي

الى الروح التي سكنت روحي فلان الان تفتح الاشرعة وترفع المرساة لتنطلق السفينة في عرض بحر واسع مظم وهو بحر الحياة وفي هذه الظلمة لا يضيئها الا قنديل الذكريات ذكرى الاخوة البعيدة الى الذين احببتهم واحبوني (أصدقائي)

(عبد الحسين)

الشكر والتقدير

في مثل هذه اللحظات يتوقف اليراع

ليفكر قبل ان يخط الحروف لجمعها

في كلمات ...تتبعثر الاحرف وعبثا أن

يحاول ان يجمعها في سطور

سطورا كثيرة تمر في الخيال ولا يبقى لنا في نهاية المطاف الا قليلا

من الذكريات وصور تجمعنا مع رفاق كانوا بجانبنا .....

فواجب علينا شكرهم ووداعهم ونحن نخطو

خطواتنا الأولى في غمار الحياة ونخص بالجزيل الشكر والعرفان الى

كل من اشعل شمعة في دروب عملنا

والى من وقف على المنابر وأعطى من حصيلة فكره لينير دربنا

الى الأساتذة الكرام في قسم علوم الحياة

وتوجه بالشكر الجزيل الى الدكتورة دينا محمد رؤوف

التي تفضلت بالأشراف على هذا البحث

فجزاها الله عني كل خير فلها مني كل التقدير والاحترام.

إقرار المشرف

اشهد ان مشروع البحث المعنون (عزل وتشخيص البكتريا الهوائية من الاسنان) اجري تحت اشرافي في قسم علوم الحياة /كلية التربية/ جامعة القادسية وهو جزء من متطلبات نيل شهادة البكالوريوس في علوم الحياة

التوقيع:-

الاسم:- دينا محمد رؤوف

اللقب العلمي :- استاذ

التاريخ:

Summary

Twenty oral sample, tooth surface ,gengivial oral cavity were collecled from persones (18-25) years from both gender male and female during November and December at 2018 and were isolated many aerobic bacteria from oral cavity which included *Streptococcus mutanus*

(35%) and *Staphylococcus aureus*

(20%) then *Staphylococcus epidermidis* (20%) then *E.coli* with (15%) and finally *Micrococcus spp*. (10%) all these isolates were dignosted and tested by culturing and biochemical test .

الخلاصـة

جمعة (20) عينة من التجويف الفموي شملت عينات من اللثة والاسنان والمنطقة المحيطة بها من اشخاص تراوحت أعمارهم من 18-25 سنة ومن كلا الجنسين خلال شهري تشرين الثاني وكانون الأول من عام 2018

وتم عزل الأنواع البكتيرية الهوائية المتواجدة في التجويف الفموي وكانت بكتريا *Streptococcus mutans* الأكثر شيوعا في الفم وبنسبة (35%) تليها بكتريا *Staphylococcus aureus* حيث كانت نسبة العزل (20%) وبكتريا *Staphylococcus epedermides* وبنسبة (20%) وبكتريا E.coli ونسبة (15%) وبكتريا .*Micrococcus spp* وبنسبة (10%)

وتم تشخيص هذه الأنواع بمختلف الاختبارات الزرعية والكيموحياتية.

الفصل الأول

المقدمة واستعراض المراجع

1-1المقدمة

يعد التجويف الفموي في الإنسان السليم معقما عند الولادة و تبدأ البكتيريا بالدخول إليه عن طريق التغذية بعد ٣–٥ايام من الولادة (Davis *et al*, 1990) حتى تصل بعد عدة أشهر إلى أكثر من مليون خلية بكتيرية التي يكون بعضها نبيت طبيعي للفم والبعض الأخر ممرض (Ted and Christine, 1995) تستوطن بعض هذه البكتريا الأسنان مكونة ما يعرف باللويحة السنية (plaque) التي وصفت عام ٢٠٠٢ من قبل Donlan و Costerton بانها عبارة عن غشاء حيوي رقيق ذا صفات وظيفية وتركيبية يصل سمكها إلى ٣٠٠ –٥٠٠ خلية بكتيرية(Davis *et al*, 1990) تضم مجتمع ميكروبي متنوع يبقى مستقر نسبيا ولكن بدخول بعض الأنواع الممرضة إليه يعاني من تغيرات مثل إنتاج الحامض العضوي و ينغمر هذا المجتمع الميكروبي في أرضية من السكريات المتعددة ذات المصدر البكتيري و بعض البوليمرات اللعابية. يسمح هذا الغشاء للبكتيريا بالنمو و يعمل كواقي يمنع دخول المضادات البكتيرية إليها وبذلك تقل فعالية علاج الالتهابات التي تصيب اللثة او الاسنان و يضمن لها زيادة الطاقة و انتقال المغذيات (Marsh, 2006 ; Leonard, 2002 ; Wirthlin *etal* , 2003).

بعد اكتمال تكون اللويحة السنية تكون غنية بالأنواع البكتيرية التي غالبا ما تنحسر تدريجيا مع سيادة أنواع قليلة لها القدرة على إنتاج حامض عضوي و خلق بيئة حامضية (PH ٥.٥) عن طريق تغيير تعبيرها الجيني لزيادة إنتاج الحامض و زيادة إنتاج بروتينات نوعية تحميها من هذه البيئة الحامضية (Loesche,1986 and Welkin *etal*,2003). عند هذه المرحلة يحدث عدم توازن بين المواد المكونة للسن و اللويحة السنية ينتج عنه فقدان العناصر المعدنية للسن (Brown *etal* , 2000 ; Marsh , 2006) . أشار Loesche في عام ١٩٧٦ إلى الأهمية الأمراضية للويحة السنية و صنفها إلى نوعية تعتمد على بعض الأنواع

الممرضة المتواجدة فيها وغير نوعية تعتمد على المنتجات الفاسدة التي تنتجها البكتيريا في اللويحة و تسبب التهاب اللثة و التهاب حول السن وتسوس الاسنان(Pratten *etal* , 1998) التي تعد من المشاكل المهمة التي تعاني منها الدول الصناعية الكبرى إذ تصيب الأطفال بنسبة ٦٠-٩٠% و نسبة كبيرة من البالغين (Brown *etal* , 2000) .

ذكر Li وجماعته(٢٠٠٧) إلى إن هناك تنوع بكتيري له القدرة على استيطان أسنان الأطفال و تكوين plaqueو أكد على عدم امكانية زرع كل الأنواع المتواجدة. تحدث الاصابة باللويحة السنية بصورة مبكرة عند الأطفال لعدة أسباب منها الأسنان الحساسة لأسباب وراثية أو إصابة الأم إثناء الحمل بالحمى او قلة التغذية او التدخين او من البكتيريا المنتقلة من ألام آو الأشخاص ذوى الصلة بالإضافة الى عدم تكامل الجهاز المناعي الموضعي (Anne, 2006)وبالتالي تسبب لهم تسوس مبكر و تنخر واضح بسبب الحامض العضوي المنتج منها الذي يذيب العناصر المعدنية من الأسنان ولهذا فان هذه الأسنان تكون حساسة و هشة عند الكبر و هي ظاهرة كثيرة الحدوث عند أطفال الأسر ذات الدخل المحدود (Harris *etal*2004 Kidd and Fejershov, 2004). يتكون المحتوى الميكروبي للويحة السنية من البكتيريا المنتجة للحامض و المتحملة له الموجبة لصبغة كرام مثل *Streptococcus* (*mutans , S.sanguis , S.salivarius ,S. S. mitis and S. mitior*) و *Lactobacillus*و *Enterococcus* التي تسبب إزالة سريعة للمينا عند الأطفال(Loesche,1986) والتي يكون مصدرها الأم أو الأشخاص ذوى الصلة و تكون سائدة في الأطفال (Ted and Christine, 1995 ; Noguchi *etal* 2005 ;Nogueira *etal* 2005) و بكتيريا *Staphylococcus aureus . Staphylococcus epidermides*بالإضافة لأنواع قليلة من البكتيريا السالبة لصبغة كرام مثل *E.coli , Enterobacter*(John and Lindsay 2006 و Wirthlin *etal* 2003)

2-1 تشريح السن

ان اقسام السن التاج او الجزء الظاهر من الضرس ويشمل على نتوءات تسمى شرفات وتمتد الجذور الى داخل عظم الفك. ويكون النسيج العاجي معظم الضرس . وتغطي طبقة المينا عاج التاج بينما يغطي الملاط عاج الجذر واللب داخل العاج يشمل حجرة اللب وقناة الجذر

حيث يتكون السن من اربع أنواع من الانسجة هي (١-لب السن ٢-عاج السن ٣- مينا السن ٤- الملاط)

كما يحيط النسيج الضام بجذر السن ويطلق على هذا النسيج الرابط حوالي السن وهو يثبت الجذور في النسيج داخل عظم الفك

تسمى الطبقة الخارجية لتيجان الاسنان بالمينا والطبقة الخارجية المغطية للجذر تدعى بالملاط اما الطبقة الوسطى فتسمى بالعاج و الطبقة الداخلية تسمى باللب السن ((The C.V. Mosby Company U.S1982

-المينا Emenel

تغطي العاج في منطقة تاج السن وتشكل الغطاء الخارجي له . وتعتبر المينا اصلب نسيج في الجسم وهو يمكن السن من تحمل الضغط الذي يقع عليه خلال عملية المضغ . وتتكون المينا من املاح معدنية وكمية قليلة من الماء وهي ذات لون ابيض او شفاف بحيث يمكن مشاهدة لون العاج الأصفر من خلال المينا لذى تظهر غالبية الاسنان باللون المصفر.

تعتبر المينا السنية اصلب نسيج عظمي في جسم الانسان . اذ تشكل نسبة المركبات المعدنية فيها حوالي ٩٦% من تركيبها و الباقي هو Hydroxylapatite المكون الأساسي للمينا السنية وله الصيغة الكيميائية ca5(po4)3Oh (The W.B.Sounders CompanyU.S.1988)

-العاج Dental

يشكل العاج كتلة السن الأساسية ويمتاز بالونه البني المصفر وهو نسيج حساس بمعنى ان أنكشافه على الوسط الفموي يسبب الم متفاوت في شدته حسب طبيعة المنبه وشدته

- الملاط cement

يغطي عاج السن ويلتقي الملاط والمينا في اغلب الحالات في منطقة انتهاء الجذر وبداية التاج . ومع زوال سطح السن يبدئ السن بالنمو خارج تجاويفها كاشفة الجذر

ويمكن بعد ذلك ان تصبح هذا المنطقة اكثر حساسية للسوائل الحارة والباردة وتعادل صلابة الملاط صلابة العظم ويتكون الملاط بصورة أساسية من املاح معدنية

-يشكل الملاط السني جزء من الجهاز حول السني الرابط للسن بالعظم السنخي المحيط به. اذ تنغمد ضمنه الياف خاصة تدعى الياف شاربي قادمة من العظم المحيط . حيث يقوم الجهاز الرابط حول السني بربط السن بالعظم المحيط ارتباطا مرنا يمكنه من تخميد الجهود الأطباقية الناجمة عن الفعالية المضغية للسن (Ash,Majjor M and Stanley. Nelson,2003)

- اللب Pulp

توجد على اطراف الحجر اللبية خلايا تسمى الخلايا المولدة للعاج odntoblasts وتفترض بعض النظريات الخاصة بالية الإحساس في العضو السني بان هذه الخلايا و التي تمتلك استطالات خلوية تدعى بألياف تومز toms fiber هي المسؤولة عن توليد الإحساس السني بالحارة والبرودة وغيرها من المثيرات الحسية وتمتد الاستطالات المذكورة الى قرب الالتقاء المينائي العاجي Amelo-dentino junction (Cate, A.R. Ten 1998)

-الرباط حوالي السن

يتكون من الياف صغيرة تمتد عبر الملاط والى داخل فجوة كبيرة يطلق عليها السنخ . الى جانب إرساء السن في السنخ يعمل الرباط حوالي السن بمثابة ماص للصدمات اثناء عملية المضغ (Neville, B.W.,D. Damm,C.Allen, J.Bouqut 2002)

(3-1) الأنواع البكتيرية الهوائية الموجودة بالتجويف الفموي

1-3-1 بكتريا *Streptococcus mutanus*

بكتريه العقدية مكورات لاهوائية اختيارية موجبة لصبغة كرام توجد عادة في تجويف الفم البشري وهي المساه الرئيسي في تسوس الاسنان نتيجة لاضمحلال ويمكن ان يؤثر بشكل كبير على الصحة العامة للفرد (Whiley 2013) وهذه البكتريا متوسطة درجة الحرارة حيث تنمو في درجة حرارة ما بين (40-18) وهي الكثر شيوعا لدى الأطفال والرضع ونقل المورثات هي المسؤولة عن نقل البكتريا من الأمهات الى الأطفال (Javed 2013)

النمو والتمثيل الغذائي العنقودية يغير الظروف البيئية للفلورة الفموية والتي تمكن الكائنات الحساسة للاستعمار وتسبب في تشكيل لوحة الاسنان العقدية ا، في الكائنات الحية الدقيقة التي تنتج لسطح الاسنان بيئة غروية بعد التمسك بالأسنان تبدا العقديات بالانقسام وإنتاج microcolonies ضمن طبقة الوصول وتبدا العقديات بالنمو وتوليف dextransucrase مع الانزيم ، ويحتوي الديكسران كبسولة التي تربط المينا وتكون glucanase مع الانزيم في رد فعل السكروز ، الكلكلوز مع الفواكه مع هذه المنتجات وكمصدر للطاقة لنمو البكترية بينم تبدا بلمرة الكلوكوز الى بوليمر ديكتران خارج الخلية ، وهذا امر مهم لان البولميز يعزز البكتريا في المينا والمواد النشوية يمكن ان يزيل البلمرة ويؤدي الى تسوس الاسنان(Todar. K)

1.1.3.1 الأمراضية

تعتبر المكورات العقدية جزء من الفلورا الطبيعية من فم الانسان لكن يمكن ان تنتقل من شخص لأخر عن طريق الانتقال الافقي او العمودي مسار انتقال العقدية هو استعمار المضيف البشري بين نفسه

المكورات العقدية يمكن تحديدها من خلال بقعة طباشيرية بيضاء على سطح الاسنان مما يشير الى مجال تنقية المينا الذي يشار اليه عادة باسم افة التسوس ، افة تظهر وهي اقرب تشخيص لتسوس الاسنان وبما ان demineralizes فيزيد من الضرر ، فيمكن ان يتحول الى اللون البني وسوف يؤدي الى تجويف في نهاية المطاف فيتم فقدان بنية الاسنان ولا يمكن تجديدها ، فهي افة يظهر اللون البني اللامع والظلام تشير ان الافة موجودة بالإضافة الى تشكيل تجويف العقدية السلالة البكترية ،كما تسبب رائحة الفم الكريهة وامراض اللثة(Spiller .M)

2.1.3.1 الاستجابة المناعية

المكورات العقدية اهو المرض الرئيسي لتسوس الاسنان بسبب القدرة على الالتزام والتراكم على سطح الاسنان ،الاستجابة المناعية والفطرية والتكيفية هما الجوانب الرئيسية للجهاز المناعي التي تستجيب للالتهابات مثل تسوس الاسنان

تدخل المكورات العقدية الى الفم والانسجة المخاطية المرتبطة لغدد خارجية الافراز والغدد اللعابية يساهم في انتاج تجويف الفم لان هذه المناطق مسؤولة عن تكوين مستضد يحتوي على الخلايا الداخلية والاجسام المضادة المددة للبكتريا عن طريق الفم ،فالأجسام المضادة افرازية مضادة ضد تسوس الاسنان ، والاستجابة المناعية هي الخلايا البلعمية التي يمكن انت تقتل البكتريا عن طريق عدة اليات (Web MD)

ان معالجة تسوس الاسنان يتوقف عل مدى تسوس الاسنان فقد يكون طفيفا يتم معالجة باستخدام الفلورايد، عندما يتم استهلاك السكر يقوم بمعالجتها.

البكتريا بالفم تتجمع لا نتاج السكر مع الacidthis فيؤدي الى تأكل مينا الاسنان ويستخدم الفلورايد لحماية الاسنان من الاضرار الناتجة عن الحامض فيقوم الفلورايد بتجميع المناطق المنزوعة من الاسنان وتقوية المينا في عملية تدعى إعادة التمعدن ، والفلورايد فعال في منع تسوس الاسنان وجعل الاسنان اقوى ولكن يكون اقل فعالية اذا شكلة التجاويف

اما في حالة تسوس الاسنان المكون للتجاويف سوف تحتاج تفيذ كاف اما ملء مركب او مزيج من اثنين (Web MD – Spiller M)

2-3-1 بكتريا *Staphylococcus ssp*

صنف جنس*Staphylococcus* ضمن عائلة Micrococaceaeوهي بكتريا موجبة لصبغة كرام غير متحركة وغير مكونة للسبورات والمحفظة (capsule) كروية الشكل مفرده او ثنائية او بشكل سلالات قصيرة او تجمع بشكل عناقيد Holden and Spratt B.G. et al 2004))تسبب العديد من الامراض منها التهاب ذات الرئة وتسمم الدم والتهاب شغاف القلب ونقي العظم واخماج الجرح بعد العمليات (Levinson ,W and Jawetz ,E 2002)

وتكون هذه البكتريا خطرة بالنسبة للإنسان لا نها حاوية على عوامل ضراوة عديدة .مثل احتوائها بعض أنواعها على المحفظة , حاوي على انزيم الهيمولايسن المحلل للدم .وهناك أنواع من المحللة للدم الفارزة للأنزيم قادرة على تكوين الغشاء الحيوي Bioflim ومنها *S.aureus* ومن خلال احتوائها على الغشاء تكون مقاومة للمضادات التي تستعمل ضدها (الناشي والمنصوري2016) كما انها حاوية على

عوامل التصاق مثل الاهلاب التي تجعلها ملتصقة بخلية المضيف(Carroll.et al.,2016) حيث تكون اخطر انوع البكتريا العنقودية هي الذهبية حيث تنتقل العدوى مباشرتا نت الشخص المصاب عن طريق الرذاذ المتطاير حيث يمكن ان تنتشر وتسبب إصابات عضوية او جلدية مختلفة(Mangram, 1999) ام *S.epidermidis*

تعد من الفلورا الطبيعية للجلد في الإنسان ولكن قد تتحول إلى Pathogen عند دخولها الجسم خلال العمليات الجراحية أو عن طريق الجروح والكدمات والخدوش او عن طريق الفم وغيرها (Brooks et al ,2006)

3-3-1 بكتريا *E.coli*

هي من اهم أنواع البكتريا التي تعيش في امعاء الثديات اكتشفها ثيدور ايشيرش وتعرف أيضا باسم جرثومة الأمعاء الغليظة*E.coli*بكترية سالبة لصبغة كرام gramتسكن الأمعاء الغليظة للإنسان وتولف نحو ٨٠%بنيتها flora الهوائية. علما ان الجراثيم اللاهوائية anaerobe هي الغالبة في امعائه.

وقد تكون لهذه البكترية التأثيرات الطبية الأساسية غير ممرضة وهي مصدر لفيتامين k لكن العديد من السلالات تسبب أنماط مختلفة من الاخماجات المعوية والبولية والفموية وغيرها وقد تسبب امراض أخرى مثل النزيف الداخلي بسبب *E.coli* (المعجم الطبي الموحد 2006)

4-3-1 بكتريا .*Micrococcus spp*

تعد هذه البكتريا من مجاميع البكتريا الموجبة لصبغة كرام خلاياها كروية الشكل تترتب بشكل ثنائيات , رباعيات , ثمانيات او بشكل عناقيد غير منتظمة بقطر 3.5-0.5 مايكروميتر غير متحركة هوائية اجبارية مستعمراتها مختلفة الألوان على الاكار المغذي الاعتيادي الحاوي 5.5% ملح الطعام وعلى اكار الدم بعد التحضين في درجة حرارة 37 ولمدة 24-48 ساعة (Atlas 1995 ,Holt et al ,1994)

تتواجد هذه البكتريا بصورة طبعية على جلد الثديات ومنها الانسان والمواشي والخيول وكذلك في التربة والهواء والغبار والماء العذب والمالح ومنتجات الالبان كما ان بعض أنواعها المنتشرة في الهواء لها القدرة على احداث حالات التحسس لدى الأشخاص ولاسيما في المناطق الرطبة والمغلقة وتسبب عدة إصابات ممرضة كإصابات الجلد والتقرحات وتجرثم الدم التهاب السحاية خاصة لدى المثبطين مناعيا او ضعيفي المناعة (Winn et al ,2006)

الفصل الثاني

المواد وطرق العمل

2- المواد وطرق العمل MATERIALS AND METHODS

2-1- المواد

2-1-1-الأجهزة Instruments

استخدمت الأجهزة والمعدات المختبرية الاتية:-

جدول (2-1) الأجهزة والمعدات المستخدمة

ت	اسم الجهاز	الشركة المنعة	المنشأ
1	حاضنةIncubator	Gllenkamp	إنكليزي England
2	Oven	Elektro,mag4420	تركي
3	Hood	Shinsueng	كوري
4	ميزان حساس Sensitive balance	Gallenkamp	انكليزيEngland
5	مصباح بنزن	Gallenkamp	إنكليزي England
6	Autoclave	Gallenkamp	إنكليزي England
7	Water bath	Gallenkamp	إنكليزي England
8	Centtrifuge	Kokusan H19F	ياباني
9	Microscope	Olympus	ياباني
10	ثلاجة لحفظ العينات	Beko	ياباني
11	الناقل الزرعي القياسي Standard	John Bolten	انكليزيEngland

	wire loop		
12	شرائح زجاجية وعطاء الشريحة Slide and cover slides	Superestar	India
13	اطباق بلاستيكية Disposable	Al-Hani	USA

2-1-2- المواد الكيميائية CHEMICAL MATERIALS

جدول (2-2) المواد الكيميائية والصبغات

ت	المواد الكيميائية	الشركة المصنعة	المنشأ
1	a-naphthol	BDH	England
2	KOH, 5HPO4, KH5PO4, NaCl	BDH	England
3	H2o2	BDH	England
4	كحول اميلي Amyl Alohol	BDH	England
5	يوريا Urea	BDH	England
6	مانيتول Mannitol	BDH	England
7	بروموثايمول الأزرق Bromo thymol blue	BDH	England
8	كلوكوز Glucose	BDH	England
9	احمر المثيل Meyhyl red	BDH	England

10	NaOH	BDH	England
11	صبغة البنفسج البلوري Crstalfiolet	BDH	England
12	صبغة السفرانين Safranine	BDH	England

جدول (2-3) الأوساط الزرعية

ت	الوسط الزرعي	الشركة المصنعة	المنشأ
1	Nutrient adar	Oxoid	Engiand
2	اكار المكونكي MacConky agar	Oxoid	Engiand
3	الاكار اليوريا Urea agar	Difco	U.S.A
4	الاكار المانيتول المملح Mannitol salt agar	Oxoid	Engiand
5	الاكار الدم الأساس Blood base agar	Difco	U.S.A
6	MR-VP Medium	Difco	U.S.A

2-1-3- الأوساط الزرعية Culture media

*الأوساط الزرعية Culture

حضرت الأوساط الزراعية وفق تعليمات الشركة المصنعة والمصدر العلمي (Maccfaddin,2000) وعقمت بالموصدة (Autoclave) بدرجة حرارة 121م وضغط 15 باوند\انج لمدة 15 دقيقة بعدها تركت لتبريد بدرجة حرار50-45م

و أستخدمت هذه الأوساط لتنمية البكتريا وتشخيصها وتمثلت هذه الأوساط بالتالي :

1-الوسط المغذي الصلب Nutrientagar

استخدم الوسط لغرض العزل الاولي ودراسة الخواص الزرعية المظهرية للبكتريا المعزولة .

2-Simmons citrate agar .

استخدم الوسط للكشف عن قابلية و البكتريا على استهلاك السترات كمصدر وحيد للكاربون .

3-MacConky agar .

استخدم الوسط لعزل البكتريا السالبة لصبغة الكرام وللكشف عن قابلية البكتريا على تخمير سكر اللاكتوز .

4-Blood agar medium .

حضر الوسط بإضافة5% من دم الانسان الى الوسط الأساس Blood base agar المعقم ب Autoclave والمبرد الى 50م , فضلا عن ذلك استخدم الوسط لعزل البكتريا ولتحري عن قابليتها على تحلل الدم لمعرفة نوع التحلل .

5-Urea agar medium .

حضر الوسط بإضافة 10 ملميتر من محلول اليوريا المحضر بتركيز 40% المعقم بالترشيح الى 100 مليلتر من الوسط الأساسي Urea agar medium المعقم Autoclave والمبرد الى 50م بعد مجانسة الوسط وزع في انابيب اختبار نظيفة ومعقمة وترك ليتصلب بشكل مائل واستخدم هذا الوسط للتحري عن قابلية البكتريا على انتاج انزيم اليوريز Urease

6-MR.VR.Medium .

حضر الوسط بإذابة 5 غرام ببتون و5 غرام K2HPO4 في لتر ماء مقطر وذوبة المكونات بواسطة الحمام المائي وعدل PHالى7,6وعقمت ب Autoclave برد الوسط الى 5م ثم اضيف الية 50 مليلتر من محلول 10% كلو كوز والذي عقم بالترشيح ووزع الوسط في انابيب اختبار نضيفه ومعقمة واستخدم هذا الوسط للكشف عن التحلل الكامل او الجزئي للسكريات الحامض او الاستيل مثيل كاربون .

. Pebton water Medium-7

حضر بإذابة5 غرام كلوريد الصوديوم و10 غرام من الببتون في لتر من الماء المقطر وضبطPH الى 7,4 ثم وزع على انابيب اختبار بمقدار5 مليلتر لكل انبوبة .

. Mannitil Motility Medium-8

حضر بإذابة 5 غرام من سكر المانيتول و4 غرام اكار في لتر من وسط المرق المغذي بعدها اضيف الية بضع قطرات من كاشف البروموثايمول الازق وضبط PHالى 7ثم وزع على انابيب اختبار بمقدار 5 مل لكل أنبوب ليكون جاهز للتعقيم

2-1-4-الكواشف المستخدمة REAGENTS

حضرت الكواشف التالية حسب ما ذكر في (Macfaddin,2000)

. Kovacs Reagents-1

اذيب 5غرام من مادة methyl amino benzyde في 75مل من كحول اثيلي ثم اضيف الية 25مل من حامضHCLالمركز وحفض في قنينة معتمة وفي الثلاجة لحين الاستعمال أستخدم للكشف على قابلية البكتريا على انتاج الاندول .

. Bromothymol blue reagent-2

حضر بإذابة 1غرام من بروموثايمول الأزرق في 25مل من NaoHاضيف الى 4,75مل من الماء المقطر، حفض في قنينة معتمة لحين الاستعمال .

. Methyl red reagent-3

حضر بإذابة 0,1غم من المثيل الأحمر في 300مل من الكحول الاميلي 95% ثم اكمل الحجم الى 500 مل بالماء المقطر، حفض في قنية معتمة في الثلاجة .

. Vogas-Prokauer reagent-4

تتضمن تحضير محلولين :

A-كاشف اومير OMeara reagent .

حضر بإذابة 40 غرام من KoH من 90 مل من ماء مقطر ثم اكمل الحجم الى 700 مل بالماء المقطر المعقم .

B- كاشف باريت Barrrit reagent .

المحلولان في قناني معتمة في الثلاجة لحين الاستعمال، ويستخدم في الكشف عن قابلية البكتريا على التحلل الجزئي

للسكريات .

5- كاشف الكتليز Cataase reagent .

حضر بتركيز 30% من بيروكسيد الهيدروجين H2O2 في قنينة معقمة .

6 – كاشف التجلط Coaglase reagent .

حضر بإضافة 0.5 من بلازما الدم في انبوبة بلاستيكية تحتوي على مادة EDAT وحفظ في الثلاجة .

7- كاشف الاوكسيديز Oxidase

حضر بإذابة 1 غم من paraphenyene dimine dihyro chloride Tetramethyl في 100 مل من الماء المقطر .

2-1-5- تحضير المحاليل :

تم تحضير المحاليل بحسب ما ذكر (Jawetz,1998)

محاليل صبغة كرام :

١- محلول الكرستال : تم اذابة 0.5 غم من الصبغة في 100 مل من الماء المقطر .
٢- محلول اليود: تم إضافة 1 غم من مسحوق اليود و9 غم من يوديد البوتاسيوم في جفنة وتم إذابته في 5 مل من الماء المقطر واكمل الحجم الى 100 مل وحفض في قنينة معتمة .
٣- القاصر Decolorizer : تم استعمال الكحول 95% .

٤- محلول السفرانين : تمت إذابته 0.5 غم من الصبغة في 10 مل من الكحول ثم اكمل الحجم الى 100 مل من الماء المقطر في قنينة معتمة .

2-1-6- التعقيم Sterilization

١- التعقيم الرطب Auto claving : تم تعقيم الأوساط الغذائية كافة والمحاليل بالموصدة عند درجة 121 م ولمدة(10-15) دقيقة .
٢- التعقيم الجاف Dry sterilization : استخدام الفرن الكهربائي لتعقيم الزجاجات عند درجة 180م لمدة ساعتين .

2-2- طرق العمل

١- جمع العينات Collection of Samples
جمعت (20) عينة من التجويف الفمي شملت عينات اللثة والاسنان والمنطقة المحيطة بها من اشخاص تراوحت أعمارهم من 18-25 سنة من كلا الجنسين خلال شهر ي تشرين الثاني / كانون الأول من عام 2018 حيث تم اخذ مسحة من سطح الاسنان واللثة بواسطة swab ثم زرعها على الوسط الزرعي بطريقة التخطيط
٢- زراعة العينات
لقحت الأوساط الغذائية Blood agar واكارالماكونكي MaCconkey agar بمساحات العينات بطريقة التخطيط Streaking ثم حضنت الاطباق بدرجة حرارة 37م لمدة (18-24) ساعة .
٣- تشخيص العزلات البكترية Identification of bacterialisolates
تم تشخيص العزلات من خلال ما يأتي :-

3-أ-الخصائص المظهرية للمستعمرات .

لوحظت الصفات المظهرية للمستعمرات النامية كأشكالها ولنها ،سطح المستعمرات ،وجود روائح مميزة لها ،قوامها، شفافيتها، نمط التحلل الدموي على اكار الدم ،تخمير اللاكتوز على وسط الماكونكي (MacFaddin,2000) .

3-ب-الفحص المجهري

فحصت العزلات البكترية مجهريا وذلك بأخذ مسحة من المستعمرات النامية على الاوساط الزرعية وتثبيتها وتصبيغها بصبغة كرام لملاحظة اشكال وترتيب الخلايا البكترية وتفاعلها مع الصيغة (MacFaddin,200) .

3-ج- الاختبارات الكيميو حيوية Biochemical .

أجريت اختبارات انزيم الكاتليز Catalase ، الاوكسيديز Oxidase ، انزيم urease ، الفوكس بروسكاور ، احمر المثيل Methyl red الاندول Indol ، استهلاك السترات citrate utilization ، انتاج غاز كبريت الهيدروجين H2S اختزال النترات Nitrite reduction الجيلاتينيز Gelatinase بالنسبة للبكتريا السالبة لصبغة كرام (MacFaddin) .

وأجريت اختبارات التحليل الدموي Hemolysis والكاتليز catalase والاوكسديز oxidase ،اختزال النترات nitrite reduction،الحركة Motility ،coagulase ،وتخمر الكلوكوز CLucose والمانيتول Manuiol بالنسبة للبكتريا الموجبة لصبغة كرام (MacFaddin,2000)

3-د- التشخيص باستخدام نضام API20E .

تم اجراء اختبارات كيمو حيوية أخرى باستخدام API20E لتأكيد تشخيص البكتريا السالبة لصبغة كرام وحسب تعليمات الشركة المصنعة .

الفصل الثالث

النتائج والمناقشة

النتاتج والمناقشة

تم اخذ ٢٠ عينة من التجويف الفمي شملت عينات من اللثة والاسنان والمنطقة المحيطة بها من اشخاص تراوحت أعمارهم من ١٨-٢٥سنة ومن كلا الجنسين خلال شهري تشرين الثاني وكانون الأول من عام ٢٠١٨ وتم زراعة هذه العينات بعد اخذها مباشرة على الأوساط الزرعية المحضرة مسبقا في المختبر مثل وسط Nutriat agar وBlood agar وحضنت هذه العينات في ظروف هوائية بدرجة حرارة ٣٧c ولمدة ٢٤-٤٨ ساعة. تم بعد تحديد الصفات المظهرية للأنواع البكتيرية وتحضير العزلات المناسبة للتصبيغ وخاصة الصبغات التفريقية كصبغة كرام لتحديد الأنواع البكتيرية الموجبة والسالبة حيث شملت الأنواع البكتيرية الاثية *Streptococcus mutanus* , *Staphylococcus aureus* , *Staphylococcus epidermidis* ,*E.coli* و*Micrococcus spp*

جدول(3-1)الانوع البكتريا المعزولة من الاسنان و التجويف الفمي

نوع البكتريا	عدد العزلات	النسبة المئوية
Streptococcus mutanus	7	35%
Staphylococcus aureus	4	20%
Staphylococcus epidermidis	4	20%
E.coli	3	15%
Micrococcus spp.	2	10%
Total	20	100%

*تبين من الجدول (1-1) سيادة بكتريا *Streptococcus mutanus* وبنسبة 35% وطابقه هذه النتيجة ما ورد في Desoet وجماعه (2000) ان النسب الكبيرة لهذه البكتريا تودي الى تكوين سريع للويحة السنية وتلف سريع للأسنان وتؤدي بقايا الغذاء الغنية بالسكريات القابلة للتخمر في الاسنان الى زيادة نسبة هذه البكتريا (Marsh,2006 and Tanner etal,2000) ويلاحظ ترافق وجود بكتريا*Lactobacillus* مع بكتريا *Streptococcus mutanus* في التجويف الفمي على الرغم من ان النوع البكتيري الأول هو بكتريا لاهوائية ويعود السبب الى المسار الايضي ماليت/لاكتيت والمعروف في النوعين *Streptococcus*

و*Lactobacillus* حيث يولد مسار تخمر سكر الماليت الى الاكتيت من خلال مسار تخمر حامض المالولاكتك(Maloloctic Fermentation Pathway)

تم تلتها كل من بكتريا *S.aureus* بنسبة 20% وبكتريا *S.epidermidis* بنسبة 20% أيضا . اذ أشار Hua وجماعة (2000) الى ان وجود هذه البكتريا مع *S.mutanus* التي تنتج كمية كبيرة من الحامض يسبب تلف وتنخر للأسنان والتهاب حول السن (Paesleme etal, 2006) كما تواجدت البكتريا السالبة لصبغة كرام بنسبة15% وبكتريا.*Micrococcus ssp* بنسبة 10% (Wirthlin etal ,2003) .

من خلال نتائج الجدول رقم(3-1) ان سبب ظهور هذه الأنواع والنسب لبكتريا *Staphyloccus aureus* وبكتريا *Staphyloccus epidermis* وذلك لاحتواء البكتريا على عوامل ضراوة مهمة تساعدها على البقاء والانتشار والاصابة من هذه العوامل امتلاكها المحفظة ومقاومتها للمضادة المستعملة ضدها وخصوصا البنسلين وتكون فارزة لا نزيم الهيمولايسين المحلل للدم بالوسط وسرعة انتقالها بين الأشخاص حيث تنتشر عن طريق الرذاذ المتطاير والاتصال المباشر حيث تكون تعايشيه على الجلد تجويف الفم وهي لاهوائية اجبارية لها القابلية على مقاومة الحموضة والحرارة وتنتج عدد من السموم والانزيمات واهم الانزيمات التي تنتجها هو انزيم Coagulase (Rateb, 2001)

الجدول(3-2) الاختبارات الكيموحيوية التشخيصية للعزلات البكترية الموجبة لصبغة كرام .

Mannitol	Glucose	Coagulase	Motility	Nitrate reduction	Oxidase	Catalase	Hemolysis	الاختبارات / الأنواع البكترية
+	+	-	-	+	+	-	+	*Stre.mutanus*
+	+	+	-	+	-	+	+	*S. aureus*
-	+	-	-	-	-	-	+	*S.epidermidis*

جدول(3-3) الاختبارات الكيموحيوية التشخيصية للعزلات البكتيرية السالبة لصبغة كرام .

الاختبارات / نوع البكتيرية	Catalase	Oxidase	Indol	V.P.	Simmon Citratr	M.R.	Motility	Urease	H2S	Gelatinase	Lactose
E.coli	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+
Micrococcus	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+

كما اثبتت الاختبارات الكيموحيوية وكما مبين في جدول (3-2) ان بكتريا *Streptococcus mutanus* محللة للدم عند تنميتها على وسط اكار الدم blood agar حيث تظهر حول المستعمرة منطقة شفافة نتيجة لانحلال الدم حيث يكون تحللها من نوع الفا (Collee,1996) كما تبين ان هذه البكتريا موجبة لل Oxidae , Nitrate reduction ,Glucose Mannitol وتكون سالبة Motility .Catalase,Coagulase,

اما الاختبارات الكيمو حيوية للبكتريا السالبة لصبغة كرام المبينة في جدول (3-3) تبين ان بكتريا *E.coli* تكون موجبة للاختبارات التالية Catalase ,Indol ,Simmon citrate ,Motility, Lactose, وتكون سالبة للاختبارات الاتيةGelatinase ,H2S,Urease M.R., V.P. ,Oxidase .

تبين من بعض الدراسات ان عداد البكتريا تزداد 200 مرة في الاسنان عند تناول الأغذية النشوية والسكرية ويساعد بذلك اهمال الاسنان وعدم الاعتناء بنظافتها مما يؤدي الى تسوسها ويعد هذا المرض اكثر شيوعا في عمر الطفولة.

(Harris etal, 2004 ;Ribeiro etal,2005) وذلك لكون مينا الاسنان والية الدفاع في الأطفال في حالة تكون مما يزيد من فرصة الاستعمار الجرثومي للأسنان وتكوين وبناء اللويحة السنية .

المصادر العربية

١-**المعجم الطبي الموحد** نسخة محفوظة 13 يونيو 2006 على موقع واي باك ميشن

٢-**الناشي , المنصوري** (2016) التحري عن الطراز المظهري والجزيئي لبكتريا المكورات العنقودية المحللة للدم –مجلة القادسية العلوم الصرفة المجلد 21 العدد3

المصادر الأجنبية

Anne, A. 2006. Early childhood caries: new knowledge has implications for breast feeding

Ash,Major M.and Stanley J.Nelson,2003 Wheeler,s Dental Anatomy, Physiology,and Occlusion 8th edition ISBN 0-7216-9382-2

Atlas R.M .(1995) Principles of Microbiology ,Von Hffmann Press;Mosby –year book Inc. USA ,PP.664-685

Blak ,P.N. and DiRusso, C.C. (2003).Transmembrane movement of exogenous long –chain fatty acids: proteins, enzymes ,and vectorial esterification Microbiology and Molecular Biology Reviews 67,454-472

Brown, L.J. ; Wall, T.P. and Lazar, V. 2000. Trends in untreated caries in primary teeth of children 2 to 10 years old. J. Am. Dent. Assoc.131: 93-100.

brushing.J.Am. Dent. Assoc.65:26-29.

Cate, A.R.Ten (1998) Oral Histology .development, Structure, and function .5th ed

Colle,J.G,foraser A.O., marmom ,BP, and simmon .A. (1996)

Davis, B.D.; Dulbecco, R. ; Eisen, H.N. and Ginsberg, S.H. 1990. Microbiology. 29th ed. Lippincott com. Philadelphia. USA.

Dental health and tooth fillings (Web MD)

Donlan, R.M. and Costerton, J.W. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin. Microbial. Rev.15(2): 167-193.

families. Leaven. 42(2): 27-31.

Harris, R.; Nicoll, A.D.; Adair, P.M. and Pine, C.M. 2004. Risk factors for dental caries in young children: a systematic review of the literature. Community Dent. Health.21:71-85.

Hein, J.W. 1962 Comparativw cleaning effecialy of manual and power

Holden,M.T.G.Feil,E.J; Lindsay, J.A;Enright, M.C. ,Hurst;L ; Atkin ;R. and Spratt, B.G.(2004)

Hua, X.; Cook, G.; Costerton , J.; Bruce, G.and Lamont, T. 2000.Intergeneric communication in dental plaque biofilms. J.;Bacteriol. 182(24):7067-7069.

J.R.PINKHAM, Pediatic Dentistry ;Infancy Through Adolescence (The W.B.Sounder Company, U.S 1988)

Javed M. transmission of streptococcus mutans from mother to child(2013)

John, G.T. and Lindsay, A.N. 2006. Managing the complexity of adynamic biofilm. J. Am.Dent. Assoc . 137(3): 10-15 .

Kidd, E.A. and Fejershor, O. 2004. What constitutes dental caries? Histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenic biofilms. J. Dent. Res. 83 :35-38.

Leonard, M.R. 2002. EM Evalution of bacterial biofilm and microorganisms on the apical external root surface of human teeth. JOE. 28: 12.

Levinson ,W. and Jawetz, E. (2002) Medical Microbiology and Immunology ;Examination and Board Review 7th edition The Mc Graw – Hill CO, USA . pp:77,96-98

Li, Y.; Ge, Y.; Saxena, D. and Caufield, P.W. 2007. Genetic profiling of the oral microbiota associated with severe early childhood caries. J. Clin. Microbiol. 45(1): 81-87.

Loesche, W.J. 1976. Chemotherapy of dental plaque infections. Oral Sci. Rev. 9: 65-107.

Loeshe,W.1986.Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay microbial Rev.50:353-380.

Macfaddin.J.F.(2000) Biochemical test for the identification of medical bacteria 3rd ed.,The Williams and Wilkins-Baltimor , U.S.A. Stellwagen ,E.and Stellwagen ,N.C.(2000)the free solution mobility of DNA in Tris acetate-EDTA buffer of different concentrations, With and without addedNaCl *Elecphoresis* ,23(12);1935-41.

Marsh, P.D. 2006. Dental plaque as a biofilm and microbial community. implications for health and disease. BMC Oral Health. 6(1): 14.

Neville, B.W.D. Damm, C.Allen,J.Bouquot,2002. Oral and Maxillofacial Pathology.Second .edition. ISBN 0-7216-9003-3

Noguchi, N.; Noiri, Y.; Narimatsu, M. and Ebisu, S. 2005. Identification and localization of extraradicular biofilm-forming bacteria associated with refractory endodontio pathogens . 71(12) : 8738-8743.

Nogueira, R.D.; Alve, A.C.; Napimoga, M.H. and Mattos-Graner, R.O. 2005. Characterization of salivary immunoglobulin A response to heavily exposed to the oral bacterium *Streptococcus mutans* specific antigen recognition in infection. Infect. Immun. 73(1): 5675- 5684.

Paesleme,A.F.;Koo,H.;Bellato,C.M.Bedi,G.and CurY,J.A.2006.The role Of Sucrose in cariogenic dental biofilm formation-New insight.Dent.Res.878-887

RAY E.STEWART,Pediatric Dentistry (The C.V.Moby Company,U.S.1982)

Ribero,C
Tabohoury ; biofilms. APPl. Microbiol.84:1149 -1155. -
, C;D ELBEL, A2005. Effect ofstarch on the
cariogenic potential of sucrose. Br JNutr.94:44-50
Quigley,G.A.and

Tanner, A;Milgrom, p;Kent, R.2002.Similarity of the oral microbiotaof pre-school children with that of their caregivers in Apopulation based study .Oral microbiolimmunol. 17:379-387

Ted, R.J.and Christine, L.C. 1995. Laboratory experiment in microbiology. 4th ed. Benjami /Cummings. California , USA.

Thomas ,R.Z.;Vandermei, H.C.; Vanderveen, M.H.; Desoet, J.J. and Huysmans, MC. 2008. Bacterial composition and red fluorescence of plague in relation toprimary and secondary carial next to composite: an in sitn study. Oral Microbioi. Lmmun.23:7- 13.

Welin, J; Wilkin,J;Beighton,D.2003.Effect of acid shock on protein expression by biofilm cells of *Streptococcus mutans*. FEMSmicrobiol let.227:289-293.

Winn W.C.; Allen; S.D .J .; Janda ,W.U.;Koneman , E.W. ; Procop, G.W., Schreckenbenberger,P.C.;Woods, G.L.(2006) Koneman,s Color Atlas and text Book of Diagnostic Microbiology . 6th ed,Lippincott Williams and Wilkins USA. PP. 643-661

Wirthlin , M.R.; Marshall, G.W. and Rowland, R.W. 2003. Formation and decontamination of biofilms in dental unit water lines. J. Periodentol. 74: 1595-1609.