جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة ديالى
كلية التربية للعلوم الصرفة

عزل وتشخيص البكتريا المختزلة للكبريت في حالات تسوس الأسنان

رسالة مقدمة إلى

مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة – جامعة ديالى

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة – الأحياء المجهرية

من قبل

لقاء محمد خضير

بكالوريوس علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة ديالى 2003– 2004

بإشراف

أ.د. عدنان نعمة عبدالرضا العزاوي

ذي الحجة/1435هـ **تشرين الأول/**
2014م

الإهداء

إلى من تاقت نفسي لشفاعته واشتاقت روحي لرؤيته، محمد رسول الله خير خلق الله (صلى الله عليه وسلم).

إلى الدماء الطاهرة الزكية التي سالت على ارض العراق الحبيب.

إلى والدتي العزيزة... التي كنت في عينيها وفي رعاية كفيها مع دعاء يشق حجب السماء، ليبلغ رب السماء ، تدعو لي في الصباح والمساء، فنصرة الأم الدعاء.

الى الذي لم تكتحل عينياه برؤية ماجنيت (والدي العزيز) رحمه الله.

إلى من حرمتهما حق الطفولة وأخذت من وقتهما الكثيرفي أثناء دراستي فلذات كبدي (إسلام وآصال).

يقولون وراء كل رجل عظيم امرأة ... وأقول وراء كل مثابر رجل عظيم يذلل لها كل الصعاب ويتحمل معها المعاناة ويفتح لها آفاق الغد بحب واحترام وتضحية، زوجي بكل حب وتقدير وإجلال.

إلى تلك اليد البيضاء، التي دعت لي وساندتني كثيراً(أختي ورقاء).

إلى صاحب القلب الطيب والنوايا الصادقة(أخي بسام).

إلى رئيس لجنة المناقشة وأعضائها الذين تجشمواعناء قراءة هذا البحث لتقويم ما اعوج منه ما اشعر عن الوفاء ببعضه ما بقي الدهر.

بكل حب ووفاء ... أهدي هذا الجهد المتواضع.

إقرار المشرفين على الرسالة

نشهد أنّ إعداد هذه الرسالة قد جرى تحت إشرافنا في قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة / الأحياء المجهرية .

التوقيع :

المشرف : د. عدنان نعمة عبدالرضا العزاوي

اللقب العلمي : أستاذ

كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة ديالى

التاريخ : / / 2014

توصية رئيس قسم علوم الحياة

بناءً على التوصيات المتوافرة نرشح هذه الرسالة للمناقشة

التوقيع :

الأسم : د. نجم عبدالله الزبيدي

اللقب العلمي : أستاذ مساعد

رئيس لجنة الدراسات العليا – رئيس قسم علوم الحياة

التاريخ : / / 2014

بسم الله الرحمن الرحيم

إقرار الخبير اللغوي

أشهد أن هذه الرسالة الموسومة بـ **(عزل وتشخيص البكتريا المختزلة للكبريت في حالات تسوس الأسنان)** التي قدمتها طالبة الماجستير **(لقاء محمد خضير)** قد تمت مراجعتها من الناحية اللغوية وصحح ما ورد فيها من أخطاء لغوية وتعبيرية وبذلك أصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة بقدر تعلق الامر بسلامة الأسلوب وصحة ألتعبير.

التوقيع:

الاسم:ا.م.د باسم محمد ابراهيم

التأريخ:

بسم الله الرحمن الرحيم

إقرار المقوم العلمي

أشهد أن هذه الرسالة الموسومة بـ (**عزل وتشخيص البكتريا المختزلة للكبريت في حالات تسوس الأسنان**) التي قدمتها طالبة الماجستير(**لقاء محمد خضير**) قد تمت مراجعتها من الناحية العلمية وبذلك أصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة.

التوقيع:

الاسم:أ.م .د محمد خليفة خضير

التأريخ:

الشكر والتقدير

الحمد لله وحده، وأشكره على توفيقه وإحسانه، فهو الأكرم الذي علم بالقلم، علم الإنسان ما لم يعلم، والصلاة والسلام على من لا نبي بعده، وعلى اله وصحبه ومن دعا بدعوته، رب أوزعني أن اشكر نعمتك التي أنعمت على لإتمام هذا العمل ، فلك الحمد والشكر كما ينبغي لجلال وجهك ولعظيم سلطانك ومجدك.والشكر سمة المعترفين بالفضل امتثالاً لقوله عليه الصلاة و السلام (من لا يشكر الله لا يشكر الناس).

أتقدم بأخلص الشكر وأعمق التقدير والامتنان للأب الحنون أستاذي الدكتور عدنان نعمة عبد الرضا الذي وسعني وقته وبيته، وغمرني بفيض علمه، وشملني بوافر عطفه، ومنحني من جهده، ورعايته، وحسن توجيهه، وإرشاده، وصائب رأيه، وثاقب نظره، ما أضاء لي الطريق، وذلل لي صعابه، ولم يأل جهداً في مواكبة هذا البحث، ليخرج بشكله الحالي، حيث كان لملاحظاته الدقيقة و توجيهاته السديدة، الأثر الكبير في انجاز هذا البحث، فكان المقيل من العثرة، والباعث في النفس الهمة، الله أسأل أن يبارك في علمه، ويمد في عمره.

وان اللسان ليقف عن البيان، ولا يسعفه البنان، لأني مهما قلت، فأظل مكاني، ولن أبارح موقعي، في تقديم جزيل الشكر والعرفان إلى الأستاذ الدكتور عباس عبود فرحان .

والشكر موصول إلى عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة، والهيأة التدريسية في قسم علوم الحياة.كما يشرفني أن أتقدم بخالص الشكر والتقدير إلى الأستاذ الدكتور وسام مالك داود لتوجيهاته السديدة لطلبة الدراسات العليا خلال فترة الدراسة.ولا يسعني في هذا المقام إلا أن أتقدم بجزيل الشكر والعرفان إلى تلك الأيادي البيضاء التي ساندتني وأخص منهم بالذكر الدكتور عبد الحميد الطائي نقيب أطباء الأسنان والدكتور حيدر مهدي أخصائي أمراض الفم.كما وأزجي شكري إلى جميع زميلاتي من طلبة الدراسات العليا. ولله الفضل أولاً وأخيراً.

الباحث

الخلاصة

في الدراسة الحالية تم تشخيص البكتريا المختزلة للكبريت ولأول مرة في العراق (مدينة بعقوبة) من فم الأنسان، وتحديداً في الأسنان المتسوسة والجيوب اللثوية .جمعت 300عينة وتضمنت200 عينة من الأسنان المتسوسة، 100عينة من مسحات الجيوب اللثوية باستخدام (paper points حجم 30) إذ قسمت العينات بواقع 75عينة للأسنان المتسوسة و75 عينة للمسحات اللثوية معزولة من الأطفال الذين تتراوح أعمارهم (5-15) سنة و(125) عينة للأسنان المتسوسة و25 عينة للمسحات اللثوية معزولة من الأشخاص الذين تتراوح أعمارهم (20-60) سنة من الذكور والإناث وتحت الإشراف الطبي المختص في المجمع الطبي التخصصي في بعقوبة الجديدة وعيادات طب الأسنان وفي المدارس وبعض المتبرعين خلال الفترة بين18/ 10 / 2013 ولغاية 1 /2 / 2014 .شخصت 40 عزلة من البكتريا المختزلة للكبريت (Sulfate Reducing Bacteria)وبواقع 5 عزلة (%12.5)*Desulfovibrio vulgaris* و12 عزلة (%30) *Desulfovibrio desulfuricans* و 17 عزلة (42%) *Desulfotomaculum raminis* و 6عزلة(%15) *Desulfomicrobium* باستخدام طريقة العزل والتنقية تحت الظروف اللاهوائية الإجبارية باستخدام غاز النيتروجين وثاني اوكسيد الكاربون بنسبة20-80% وباستخدام وسط ApI الصلب .

تم التحري عن إنتاج عوامل الضراوة في العزلات قيد الدراسة إذ أظهرت النتائج تباينا للقدرةعلى انتاج الهيمولايسين وبواقع 3عزلة (%60)*Desulfovibrio vulgaris* و10 عزلة (% 83.33) *desulfuricans Desulfovibrio* و14 عزلة (82.35%) *Desulfotomaculum raminis* و 4عزلة (66.7%) *Desulfomicrobium* وعلى انتاج البكتريوسين وبواقع 3عزلة (60%)*Desulfovibrio vulgaris* و7 عزلة (58.3%) *Desulfovibrio desulfuricans* و10 عزلة (58.82%)*Desulfotomaculum raminis* و 4عزلة (66.7%) *Desulfomicrobium* وان جميع العزلات كانت موجبة لاختبار تكوين الجليدات واختبار المحفظة .

أما الغشاء الحيوي فقد تم الكشف عن قابلية العزلات على تكوينه بطريقتين هما احمر الكونغو وقد اظهرت 4عزلة (80 %)*Desulfovibrio vulgaris* و11 عزلة (91.7 %)

Desulfotomaculum raminis (% 94.11)و16عزلة *Desulfovibrio desulfuricans* و 5عزلة(83.33%) *Desulfomicrobium* . وبطريقة الأنابيب وقد اظهرت 3عزلة (60 %)*Desulfovibrio vulgaris* و10 عزلة (83.33 %) *Desulfovibrio desulfuricans* و 15 عزلة (88.2 %) *Desulfotomaculum raminis* و 5عزلة(83.33%) *Desulfomicrobium* نتيجة موجبة على تكوين الغشاء الحيوي .

أظهرت العزلات تبايناً في مقاومتها للمضادات الحيوية المختلفة قيد الدراسة فقد كانت جميع عزلات بكتريا *D.vulgaris* و *D.desulfricans* و*D. raminis* مقاومة لمضادAmpicillin وبنسبة(100%)و (100%) و (85.71**%**) على التوالي عند الاطفال. اما بالنسبة لمضاد Amoxicillin فقد تباينت نسبة المقاومة لجميع عزلات بكتريا *D. vulgaris* و *D.desulfricans* و*D. raminis* اذ كانت (50%) و(25%)و (85.71%)على التوالي .اما بالنسبة لمضادStreptomycin فقدا ظهرت العزلات مقاومة بنسبة(100%) و ((42.85)و75%)على التوالي.اما مضاد Clindamycin فقداظهرت العزلات مقاومة بنسبة (50%) و(50%) و (100%) على التوالي. وفيما يخص مضادAzithromycin فقد أظهرت العزلات مقاومة متباينة وضئيلة للمضاد وبنسبة (50%) و(25%) (28.57%) على التوالي. اوضحت الدراسة الحالية لجميع عزلات الأطفال بأنها أبدت أعلى مقاومة لمضاد Ampicillin واقل مقاومة لمضاد Azithromycin. اما بالنسبة للبالغين فان جميع عزلات بكتريا *D.vulgaris* و *D. ramini s D.desulfricans* و*Desulfomicrobium* اظهرت مقاومة لمضادAmpicillin وبنسبة (66.7%)و (87.5%)و (90%)و (100%)على التوالي . اما بالنسبة لمضاد Amoxicillin فقد تباينت نسبة المقاومة للعزلات بنسبة (33.3%)و (25%)و (90%)و (33.3%)على التوالي. اما بالنسبة مضادStreptomycin فقداظهرت العزلات مقاومة وبنسبة (66.7%),(87.5%),(20%),(83.3%)على التوالي.اما مضاد Clindamycin فقداظهرت العزلات مقاومة بنسبة(33.3%)و (25%)و (80%)و (33.3%)على التوالي. مضادAzithromycin فقد اظهرت العزلات مقاومة بنسبة(33.3%)و (12.5%)و (20%)و (16.66%) على التوالي. اوضحت الدراسة الحالية لجميع عزلات البالغين بأنها أبدت أعلى مقاومة لمضادAmpicillin واقل مقاومة لمضاد Azithromycin و Clindamycin .

اختبرت قابلية العزلات *Desulfotomaculum raminis* على الالتصاق على السطوح غير الحية المصنعة من مواد البلاستك والفولاذ والمسمى محلياً Stainless steel والبورسلين والسيراميك والزجاج والجلد، وذلك بوضع كمية محددة من العالق البكتري على تلك الأسطح ثم حضنها تحت درجات حرارية مختلفة وهي درجة حرارة (4، 25، 37) مْ ولمدة(3 ، 4 ، 5) أيام ومن ثم عمل مسحة لتلك الأسطح وزرعها على وسط (API) وحضنها لمدة (72) ساعة، تحت حرارة 37 مْ لملاحظة حيوية خلايا بكتريا*Desulfotomaculum raminis* .أو بعمل سلايد لسطح الزجاج وقد أظهرت هذه النتائج أن البكتريا تلتصق على السطوح غير الحية وبنسب متقاربة ما عدا البورسلين فقد أظهرت البكتريا التصاقاً ضعيفاعلى هذا السطح.

تم اختبار قابلية البكتريا على إحداث التآكل في المعادن والأسنان من خلال استخدام عينات من Stainless steel ولفترة84 يوماً .وأوضحت النتائج أن المزارع المختلطة احدثت أعلى نسبة تآكل إذ بلغ كمية الفقدان في الوزن خلال 84 يوماً (1.1488)غم فيما بلغت في المزارع النقية (0.1220)غم ولعينات السيطرة(0.0520)غم .كما اختبرت قابلية البكتريا على إحداث التآكل في الأسنان من خلال استخدام عينات الأسنان المعقمة بالكلور (القاصر) وزرعت لمدة 84يوماً تم قيست نسبة الفقدان بالوزن لهذه العينات وقورنت بتآكل المعادن للعينات النقية فأظهرت الدراسة ان التآكل في عينات الأسنان أقل من المعادن وكانت نسبة الفقدان بالوزن لعينات الأسنان النقية 0.1010غم.

فهرست المحتويات

التسلسل	الموضوع	رقم الصفحة
	الفصل الأول : المقدمة	
1-1	المقدمة.	1
2-1	أهداف الدراسة.	3
	الفصل الثاني : استعراض المراجع	
1-2	البكتريا المختزلة للكبريت Sulfate Reducing Bacteria	5-4
2-2	الوبائية Epidemiology	5
3-2	الامراضية Pathogenicity	7-6
4-2	أنواع البكتريا المختزلة للكبريت	7
5-2	المايكروبات المتواجدة في التجويف الفمي Microorganism Present in mouth cavity	8
6-2	عدوى تسوس الأسنان Dental caries infection	10-9
7-2	بعض عوامل الضراوة للأجناس والأنواع البكتيرية قيد الدراسة:	10
1-7-2	أنتاج الهيمولايسين Haemolysin Production	11-10
2-7-2	أنتاج البكتريوسين Bacteriocin	11
3-7-2	أختبار تكوين الجليدات	12-11
4-7-2	المحفظة Capsule	12
5-7-2	التآكل الحيوي Biocorrosion	13-14
6-7-2	القدرة على الإلتصاق Ability of Adhesion	14-15
7-7-2	الأغشية الحيوية للأسنان Dental biofilm	16-15
8-2	مراحل تكوين الغشاء الحيوي	18-16
9-2	المضادات الحيوية Antibiotics	18
10-2	آلية مقاومة الغشاء الحيوي للمضادات الحيوية	18
11-2	البنسلينات Penicillins	19
12-2	مجموعة المضادات الامينوكلايكوسيدية Aminoglycosides	19
13-2	اليات مقاومة البكتريا لمضادات الحياة	21-19
	الفصل الثالث: المواد وطرائق العمل	
1-3	المواد.	22

1-1-3	الأجهزة والمستلزمات.	23-22
2-1-3	المواد الكيميائية والبايولوجية .	25-24
3-1-3	الأوساط الزرعية ألمستخدمة.	26
4-1-3	الصبغات المستخدمة.	26
5-1-3	المضادات الحيوية.	27
1-5-1-3	اقراص المضادات الحيوية.	27
2-3	طرائق العمل . Methodology	27
1-2-3	طرائق التعقيم.	27
2-2-3	تحضير المحاليل.	28
1-2-2-3	تحضير محاليل العوامل المختزلة.	28
2-2-2-3	تحضير محاليل المعقمة بالترشيح .	28
3-2-2-3	تحضير محاليل صبغة كرام.	28
4-2-2-3	تحضير محلول صبغة النكروسين Nigrosin .	29-28
5-2-2-3	محاليل ضبط الرقم الهيدروجيني.	29
6-2-2-3	المحلول الملحي الفسلجي . Normal Saline	29
7-2-2-3	محلول دارئ الفوسفات الملحي Phosphate Buffer Saline(PBS) pH=(7.2) .	29
8-2-2-3	محلول ثابت العكرة القياسي Macfarland Standard	29-29
3-2-3	الأوساط الزرعية	29
1-3-2-3	الوسط الزرعي API المحور.	30
2-3-2-3	تحضير الاوساط الزرعية الجاهزة Culture Media	31
1-2-3-2-3	وسط أكار الدم. Blood base agar	31
2-2-3-2-3	وسط الكونكوريد اكار Congo-red agar medium	31
3-2-3-2-3	وسط التربتكيز صويا اكار **Trypticase Soy agar** (TSA)	31
4-2-3	جمع العينات Collection of Samples	32
5-2-3	الزرع باستخدام العوامل المختزلة والغازات	32
6-2-3	عزل وتنقية البكتريا المختزلة للكبريت	34-33
7-2-3	تشخيص البكتريا المختزلة للكبريت	35-34

8-2-3	اختبار قابلية البكتريا المختزلة للكبريت على تأكل المعادن	50-51
9-2-3	التحري عن بعض عوامل الضراوة في البكتريا	35-36
19-2-3	اختبار تكوين الجليدات Pellicle formation test	36
2-9-2-3	اختبار تكوين المحفظة (Capsul)	36
3-9-2-3	اختبار إنتاج الهيمولايسين Haemolysin Production	37
4-9-2-3	اختبار إنتاج البكتريوسين Bacteriocin	37
5-9-2-3	إختبار تكوين الغشاء الحيوي Biofilm	37
6-9-2-3	اختبارقدرة البكتريا على الالتصاق السطوح المختلفة	38-39
7-9-2-3	اختبار بقاء البكتريا على السطوح المختلفة .	39
10-2-3	فحص الحساسية للمضادات الحيوية Antibiotic suscepitibility test	39-40
	الفصل الرابع: النتائج والمناقشة	
1-4	عزل وتشخيص بعض أنواع البكتريا المختزلة للكبريت	41
1-1-4	العزل Isolation	42
2-1-4	التشخيص Identification	43
3-1-4	توزيع العزلات بحسب مصدر العزل	48
2-4	إنتاج الهيمولايسين Haemolysin Production	50
3-4	المحفظة (Capsule)	51
4-4	إنتاج البكتريوسين Bacteriocin production	51
5-4	اختبار تكوين الجليدات	53
6-4	اختبار قابلية البكتريا المختزلة للكبريت على تأكل المعادن(Stainless steel).	53-55
7-4	إختبار حساسية البكتريا لمضادات	55
8-4	اختبار إنتاج الغشاء الحيوي Biofilm production	58-60
9-4	اختبار قدرة البكتريا على الالتصاق على السطوح المختلفة:	61-66
	الاستنتاجات والتوصيات	
	الاستنتاجات .	67
	التوصيات .	68

	المصادر والمراجع	
	المصادر العربية .	69
	المصادر الأجنبية .	90-69

المصطلحات

Dental Caries	تسوس الأسنان
plaque	لويحة الأسنان
coronal pulp	لب الأسنان
Smooth tissuse	الأنسجة الناعمه
Cathodic reaction	التفاعلات الكاثودية .
Mouth	الفم
Virulence	ِ الضراوة
Slime layer	الطبقة اللزجة
Glycocalyx	الكنان السكري
Exopolymeric substances	مواد بوليمرية خارجية
Interfaces	الأسطح البينية
Quorum sensing	تحسس النصاب
Biofilm in dental	الغشاء الحيوي في الاسنان
Tooth	الأسنان
periodontal pockets	الجيوب اللثوية
Cathodic protection	الحماية الكاثودية .
Corrosion	التآكل .
Corrosion products	نواتج التآكل .
Anodic reaction	التفاعلات الانودية .
Anaerobic corrosion	التآكل اللاهوائي .
Biocorrosion	التآكل الحيوي .
Biofilm	الغشاء الحيوي .
Cathodic depolarization	إزالة الاستقطاب الكاثودي .

المختصرات

API	American petroleum Institute
ESP	Extracellular Slime Producers
EPS	Exopolysaccharide Substrances
MIC	Microbiology Influenced Corrosion
SRB	Sulfate Reducing Bacteria

قائمة الجداول

التسلسل	الموضوع	رقم الصفحة
1.1.3	الأجهزة والمستلزمات	23-22
3–1–2	المواد الكيميائية والبايولوجية	25-24
3–1–3	الأوساط الزرعية ألمستخدمة	26
3–1–4	الصبغات المستخدمة	26
1-5-1-3	أقراص المضادات الحيوية المستخدمة واقطار منطقة التثبيط	27
1-3-2-3	الوسط الزرعي API المحور	30
1-4	النسبة المئوية للعزلات الموجبة التابعة البكتريا المختزلة للكبريت من الأسنان المتسوسة ومسحات الجيوب اللثوية للاناث والذكور للبالغين والاطفال.	42
2-4	الصفات التشخيصية للبكتريا المختزلة للكبريت	45
3–4	توزيع العزلات بحسب مصدر العزل ونسبها	49
4–4	أعداد ونسب العزلات المنتجة للهيمولايسين	50
4- 5	قابليةعزلات البكترياعلى إنتاج البكتريوسين .	52
6–4	النسب المئوية لحساسية العزلات قيد الدراسة للمضادات الحيوية المختلفة.	57
7–4	النسبة المئوية لمقاومة العزلات قيد الدراسةعندالاطفال والبالغين للمضادات الحيوية المختلفة.	58
8- 4	قابلية العزلات على انتاج الغشاء الحيوي والنسب المئوية لكل نوع بكتيري	60-59
9-4	النموبدرجة حرارة الثلاجة 4 م	62
10-4	النمو بدرجة حرارة الغرفة 25 مْ	63
11-4	النمو بدرجة حرارة الحضن 37 مْ .	64

قائمة الأشكال

	الموضوع	رقم الصفحة
	الفصل الثالث : المواد وطرائق العمل	
1-3	جهاز تمرير الغازات الخاص بالعزل اللاهوائي.	
	الفصل الرابع : النتائج والمناقشة	
1-4	مراحل نمو المزارع النقية للـ (SRB) بعمر 3– 5أيام	46
2-4	نمو المزارع النقية ل(SRB) في الاطباق على وسط API الصلب	47
3-4	صبغة غرام مع السبورات لـ*Desulfotomaculum ramini* s	47

المقدمة

Introduction

استعراض المراجع

Literature Review

المواد وطرائق العمل

Materials & Methods

النتائج و المناقشة

Results& Discussion

الاستنتاجات والتوصيات

Conclusions

&

Recommendations

المصادر

References

المقدمـــة

1 المقدمـــة Introduction:

يعد التجويف الفموي في الإنسان السليم معقما عند الولادة و تبدأ البكتيريا بالدخول إليه عن طريق التغذية بعد 3-5أيام من الولادة (Davis وآخرون1990) حتى تصل بعد عدة أشهر إلى أكثر من مليون خلية بكتيرية التي يكون بعضها نبيت طبيعي للفم والبعض الآخرممرض (Ted وChristine ,1995). إن التجويف الفمي يتكون من العديد من السطوح بعضها مغلفة بعدد كبير من البكتريا داخل الغشاء الحيوي المثالي لنموها (Jørn وآخرون2005) .تطلق تسمية لويحات الأسنانplaque على الغشاء الحيوي المتشكل على سطوح الأسنان . ان تشكيلات الغشاء الحيوي (Biofilm) في الأنسجة الناعمة (Smooth tissuse) اكثر مماثلة لبعضها البعض اكثر من تلك الموجوده في لويحات اللثة العلوية واللثة السفلية والبكتريا التي تنمو في تجاويف اللثة تشكل المصدر والمسبب الرئيس والأساس للكثير من أمراض الأسنان واللثة , مثل تسوس الأسنان والتهاب اللثة والمناطق المحيطة بها ,وكذلك حول الأسنان والتراكيب الصناعية ,وقد تم اعتبار الغزو البكتري العامل الرئيسي لفشل زراعة الأسنان وتعتبر بكتريا الأغشية الحيوية مسؤولة عن حوالي 65% من الإمراض في الفم ومن ضمنها التهاب محيط الأسنان الصناعية والتهابات اللثه(2011, Sangeeta)

هناك أنواع متخصصة من البكتريا الفموية التي تشارك في العديد من الأمراض الجهازية مثل البكتريا المسببة لالتهاب الشغاف (1997,Berbari) ذات الرئه (1999,Scannapieco)التهاب نخاع العظم في الأطفال (2000, Dodman) ولادة أطفال ذوي وزن منخفض وقبل الموعد المحدد (2005, Buduneli) ومرض أوعية القلب (2000,Trevisan) .

هناك ما يزيد على 700 نوع من بكتريا النبيت الفموي (2009, Hojo) . تشكل مستعمرات لهذه الأنواع البكترية في الأسنان واللسان وغشاء تجويف الفم ومناطق نخر الأسنان والجيوب اللثوية .ان توزيع النبيت الطبيعي في تجويف الفم ليس عشوائيا .إذ تفضل بعض الأنواع البكترية بعض المناطق على غيرها لتوفير الظروف التي تلائمها مثل الظروف اللاهوائية التي توفرها جيوب اللثة (2006, Paster) .

تستوطن البكتريا الأسنان مكونة ما يعرف لويحات الأسنان التي وصفت عام 2002 من قبل Donlan و Costerton بأنها عبارة عن غشاء حيوي رقيق ذا صفات وظيفية وتركيبية يتراوح بين 500-300 خلية بكتيرية (Davis وآخرون 1990) تضم مجتمعا ميكروبيا متنوعا يبقى مستقرا نسبيا ولكن بدخول بعض الأنواع الممرضة إليه يعاني من تغيرات مثل إنتاج الحامض العضوي و ينغمر هذا المجتمع الميكروبي في بيئة من السكريات المتعددة ذات المصدر البكتيري و بعض البوليمرات اللعابية. يسمح هذا الغشاء للبكتيريا بالنمو و يعمل بوصفه واقيا يمنع دخول المضادات البكتيرية إليها وبذلك تقل فعالية علاج الالتهابات التي تصيب اللثة او الأسنان و يسهل لها انتقال المغذيات وزيادة الطاقة (Marsh, 2006) و (Wirthlin وآخرون2003) و(Leonard,2002) .

بعد اكتمال تكون لويحات الأسنان تكون غنية بالأنواع البكتيرية التي غالبا ماتنحسر تدريجيا مع سيادة أنواع قليلة لها القدرة على إنتاج حامض عضوي و خلق بيئة حامضية (pH5.5) عن طريق تغيير تعبيرها الجيني لزيادة إنتاج الحامض و زيادة إنتاج بروتينات نوعية تحميها من هذه البيئة الحامضية (Loesche,1986) (Welinوآخرون2003) . عند هذه المرحلة يحدث عدم توازن بين المواد المكونة للسن و اللويحة السنية ينتج عنه فقدان العناصر المعدنية للسن (2006,Marsh) .

أشار العديد من الباحثين إلى الأهمية الامراضية للويحات الأسنان و صنفها إلى نوعية تعتمد على بعض الأنواع الممرضة المتواجدة فيها وغير نوعية تعتمد على المنتجات الفاسدة التي تنتجها البكتيريا في لويحات الأسنان و تسبب التهاب اللثة و التهاب حول السن وتسوس الأسنان(Prattenوآخرون 1998) التي تعد من المشاكل المهمة التي تعاني منها الدول الصناعية الكبرى إذ تصيب الأطفال بنسبة 90-60% و نسبة كبيرة من البالغين (Brown وآخرون 2000) .

ذكر Li وجماعته(2007) إلى إن هناك تنوعا بكتيريا له القدرة على استيطان أسنان الأطفال و تكوين لويحات الأسنان و أكد على عدم إمكانية زرع كل الأنواع المتواجدة. تحدث إصابة لويحات الأسنان بصورة مبكرة عند الأطفال لأسباب عدة منها الأسنان الحساسة لأسباب وراثية أو إصابة الأم إثناء الحمل بالحمى او قلة التغذية أو التدخين او من البكتيريا المنتقلة من ألام آو الأشخاص ذوى الصلة بالإضافة إلى عدم تكامل الجهاز المناعي الموضعي (2006,Anne) وبالتالي تسبب لهم تسوسا مبكرا و تنخرا واضحا بسبب الحامض العضوي

المنتج منها الذي يذيب العناصر المعدنية من الأسنان ولهذا فان هذه الأسنان تكون حساسه و هشه عند الكبر و هي ظاهرة كثيرة الحدوث عند أطفال الأسر ذات الدخل المحدود (Kidd و Harris) (2004,Fejershov وآخرون 2004) . يتكون المحتوى الميكروبي المسبب لتسوس الأسنان من البكتريا المختزلة للكبريت Sulfate Reducing Bacteria(SRB)

Desulfovibrio desulfricans , Desulfovibrio vulgaris

Desulfotomaculum ramini s, Desulfomicrobium

نظرا لأهمية الدراسات الخاصة بتحديد نوعية الأجناس البكترية المسببة لتسوس الأسنان عند الصغار والبالغين

جاءت هذه الدراسة لتسلط الضوء على ما يأتي :

1. عزل وتشخيص البكتريا المختزلة للكبريت المسببة لتسوس الأسنان في الاعمار المختلفة.
2. دراسة عوامل الضراوة للبكتريا فضلا عن استجابتها لمضادات الحياة .
3. تأثير درجات الحرارة المختلفة على الالتصاق على السطوح المختلفة وقدرتها على البقاء.
4. اختبار قدرة البكتريا المختزلة للكبريت على تآكل معدن الحديد المستعمل في الحشوات.

استعراض المراجع

2- استعراض المراجع

2-1البكتريا المختزلة للكبريت Sulfate Reducing Bacteria(SRB)

تتصف البكتريا العائدة إلى هذه المجموعة بكون العديد منها ممرضات معوية (Intestinalpathogen)أو قد تكون تعايشية (Commensals)، وتنتج أنواعاً مختلفة من السموم (Brook وآخرون2007).

تمتاز هذه البكتريا بأنها عصيات مستقيمة ,أو منحنية وأحيانا كروية ,أو بيضوية ,أو حلزونية تتراوح أقطارها من 0.3-0.4مايكروميتر , وقد تتوافر بشكل خلايا مفردة ,أو أزواج وأحيانا تجمعات وبعضها تكون سلاسل خيطية ، وهي بكتريا سالبة لصبغة كرام , إلا إن بعض الأنواع تكون موجبة ، بعضها متحرك والبعض الآخر غير متحرك ، أما الحركة فتكون أما بوساطة اسواط قطبية, أو محيطية , أو حركة انزلاقية بعضها يكون السبورات والبعض الآخر لا يكون وهي كائنات حية دقيقة لا هوائية إجبارية متباينة في سلوكها تختزل الكبريت للحصول على الطاقة محررة كمية كبيرة من الكبريتات (1994, Holt).

تعد هذه البكتريا صعبة العزل, بسبب نموها البطيء إذ تظهر المستعمرات بعد أكثر من ثلاثة أيام من الحضن المستمر والتي غالبا لا تلاحظ ، وان عزلها يحتاج إلى أوساط زرعية إغنائية , أو اختيارية إذ أنها لا تنمو في الأوساط الزرعية الاعتيادية (Ghazy وآخرون2011).

أما صفاتها المزرعية فإنها تنمو بدرجة حرارة تتراوح بين (25-50) مº وبعض الأجناس تكون محبة للحرارة تنمو في أعلى من ذلك ، وكذلك تفضل النمو في رقم هيدروجيني يتراوح بين (7.2-7.5) ولا تنمو في ظروف متطرفة للأس الهيدروجيني وتكون هذه البكتريا كيميائية التغذية ويكون نموها بشكل مستعمرات دائرية ذات لون اسود خلال الأيام الأولى وبعد ذلك يتحول الوسط جميعا إلى اللون الأسود بالكامل(carignan وآخرون1994) (Hilnes وآخرون 1999).

تعد البكتريا المختزلة للكبريت المجموعة الفريدة من بدائية النواة التي لها القابلية على استخدام الكبريتات , ومكونات الكبريت المؤكسدة الأخرى بوصفها مستقبلاً نهائياً للالكترونات خلال التنفس اللاهوائي إذ يختزل الكبريتات إلى كبريتيد من المكونات العضوية البسيطة مثل اللاكتيت

، والاستيت ، والبايروفيت ، والماليت ، والايثانول ، والأحماض الأمينية والسكريات ، وتكون هذه البكتريا واسعة الانتشار على الأرض وتلعب دوراً مهماً ورئيسياً في الطبيعة بوساطة التفاعلات المتعددة ذات التأثير القوي والتي تشمل تلف الأغذية ، والتآكل الحيوي ، والمعالجة الحيوية (George وآخرون2008) و(Muyzer وSorokin ,2010).

2-2الوبائية Epidemiology:

تتواجد البكتريا المختزلة للكبريت (SRB) في القناة الهضمية (الفم والأمعاء) للإنسان والحيوانات. تلعب دورا في ظهور واستمرار الأمراض الالتهابية الامعائية (Loubinouxوآخرون 2002) واللثة(Loubinoux وآخرون2002) العديد من الأحياء المجهرية تكون تعايشية (Commensals) في التجويف الفمي وهي عادة بكتريا لاهوائية إجبارية .تتواجد بكتريا SRB في الجيوب اللثوية(Socransky وآخرون1998) إضافة الى تواجدها في الأنسجة المخاطية الفموية تتسبب (SRB) في تسوس الأسنان فضلا عن ذلك تشكيلها للغشاء الحيوي في اللهاة والأغشية المخاطية والسطح الظهري للسان (Fabianoوآخرون2013) اما علاقة SRB مع أنواع أخرى من البكتريا تكون واضحة , إذ ترتبط مع *Streptococcus* حيث شخصت في أسنان متسوسة مقلوعة , وجنس *Desulfovibrio* تكون واضحة في الإنسان من خلال تآكل اللثة مسببة لها أمراضا لثوية .فضلا عن ذلك علاقتها مع *Tannerella forythis,Treponema denticola* (Langendijketal وآخرون2001) .

هذه العلاقة واضحة بين التجمعات المايكروبية من خلال تشقق اللثة (Robichaux وآخرون 2003) .

تتواجد SRB كجزء من الأحياء المجهرية للأمعاء وفي الغائط للإنسان البالغ السليم (Fite وآخرون2004). و عزلت بكتريا *Desulfovibrio* أيضا من الخراجات في البطن والدماغ والدم والبول (Loubinouxوآخرون2000). تركز الدراسات الوبائية على الغشاء الحيوي لكونه مصدراً لكثير من الأمراض والالتهابات من خلال تجمع الخلايا البكتيرية(Costerton و Dalan,2002).

3-2الامراضية Pathogenicity

إن سبب امراضية البكتريا المختزلة للكبريت يعود الى امتلاكها للعديد من عوامل الامراضية, تتواجد بكتريا SRB في الجيوب اللثوية للأسنان وتعتمد في نشاط نموها على الاحياء المجهرية المعقدة لإنتاج بيئة مختزلة ,لمنتجات التخمير والكبريتات (1988, Widdel)(Langendijk ,2001). وهذا الاخير يمكن ان يتحرر من وحدات السكريات الثنائية للكلكوز أمينوكليكان الموجودة في البروتوكلايكان في القالب الخلوي – الخارجي للأنسجة الرابطة (Waddington وآخرون1994).

تنتج SRB كبريتيد الهيدروجين من dissmilatory(عملية مستخدمة في الميكروبات للحفاظ على الطاقة من خلال أكسدة المواد العضوية وغير العضوية المانحة للالكترونات واختزال المعادن او أشباه الفلزات). هذا المنتج (كبريتيد الهيدروجين)هو كاشف سمي قوي مما يتسبب في تلف الخلايا بطريقة مشابهة للسيانيد مع آثار قاتلة ربما يتسبب بتعطيل أكسدة Cytochrome(بروتينات مرتبطة بالأغشية الداخلية تحتوي على مجاميع حديد ومسؤولة عن أنتاج الطاقة الناتجة عن انتقال الالكترونات), وتم الكشف تحديدا عن تركيزات مرتفعة من كبريتيد الهيدروجين في الأنسجة الداعمة المرتبطة مع زيادة عمق الجيب (Viannaوآخرون 2008) (1992, Persson).

في الجيوب العميقة وصل تراكيز كبريتيد الهيدروجين الى اعلى مستوى للسمية (Langendijkوآخرون 2000) وتعتبر التراكيز العالية له كافية لتثبيط الاكسدة الخلوية cytochrome (1992,Persson) (2008,Vianna) . اضافة الى التأثيرات السامة المباشرة لأنسجة المضيف .الكبريتيد قد يؤثر على كريات الدم البيضاء عن طريق التداخل مع طهاية (الاستساغة) للبكتريا , ويؤدي ذلك الى قمع الدفاعية المناعية في الجيب اللثوي للأسنان (Granlundوآخرون1993).

تتراكم نواتج بكتريا التخمر اللاهوائية في جيوب اللثة لتسمح بتشكيل محطة للتحطيم النهائي للاستفادة من المركبات العضوية ذات الوزن الجزيئي المنخفض والهيدروجين يكون كواهب للالكترون في التنفس اللاهوائي (van der Hoeven وآخرون1995)(Loubinoux وآخرون,2002).

تراكم كبريتيد الهيدروجين يمكن ان يعمل بمثابة سموم ثانوية للالتهابات اللثوية عن طريق تفاعل مع روابط البروتين ثنائي الكبريتيد (Granlund وآخرون 1993) وبالتالي فان وجود SRB يكون مؤشرا لحالة مرضية .

ان التراكيز العالية للكبريت تسبب إجهادا وتأثيرا مثبطا على الأغشية المخاطية للأمعاء مؤدية الى نقصان في مستوى الطاقة ,عدم استقرار للجينوم وعجز او فشل في إصلاح الحامض النووي DNA (Attene وآخرون2007) . تلعب هذه البكتريا دورا مهما في نشوء الالتهابات اللثوية عند الإنسان نتيجة عوامل عدة تؤدي إلى بقائها وتزيد من أمراضيتها منها :

1. الارتباط والبقاء على السطوح الصلبة.
2. اكتساب الغذاء الأساسي لها من الأوساط البيئية المحيطة.
3. الالتصاق بالخلايا الظهارية .
4. أنتاج وإفراز الأنزيمات والمواد السامة التي تدمر أنسجة المضيف.

2-4أنواع البكتريا المختزلة للكبريت

هناك أنواع كثيرة من البكتريا المختزلة للكبريت , ولكن قد تم تمييزثلاثة أجناس منها هما جنس *Desulfovibrio* والذي يحتوي خمسة أنواع محبة للحرارة المعتدلة , وغير مكونة للسبورات وسالبة لصبغة غرام وهي كما جاء في (Postgate و 1966,Campbell) , (Vianna وآخرون2008) , (Pe¨rez وآخرون2001).

Desulfovibrio desulfricans , Desulfovibrio vulgaris

أما الجنس الثاني فهو *Desulfotomaculum* فيضم ثلاثة أنواع تكون محبة للحرارة المعتدلة , والحرارة العالية , ومكونة للسبورات وموجبة لصبغة غرام وهي كما جاء في(Postgate و Campbell, 1965)(Vianna وآخرون2008) (Jimenez وآخرون2000).

Desulfotomaculum raminis

أما الجنس الثالث فيضم ثلاثة أنواع تكون محبة للحرارة المعتدلة , وغير مكونة للسبورات وسالبة لصبغة غرام وهي كما جاء في (Langendijk وآخرون 2001).

Desulfomicrobium

5-2 المايكروبات المتواجدة في التجويف الفمي

Microorganism Present in Mouth Cavity

يعد الفم موطن لمجموعة واسعة من الكائنات الحية المجهرية (المايكروبات) يكوّن مستعمرات مميزة ومعقدة التي تنمو كغشاء حيوي متنوع على الأغشية المخاطية وسطوح الأسنان .هذه المايكروبات تتألف من الابتدائيات والخمائر والمايكوبلازما والاركية والبكتريا , فقط حوالي نصف هذه البكتريا في الوقت الحاضر يمكن زراعتها والأخرى تحتاج الى أوساط زرعية مدعمة لتشخيصها (Dewhirst وآخرون2010).

ان أفواه الأفراد تضم فقط حوالي 100نوع . تنتشر المايكروبات المتنوعة على سطوح مختلفة بسبب الظروف البيئية والفسلجية السائده في المناطق المنتشرة فيها, هذه المايكروبات تتمركز في المناطق المخاطية . ان الأغشية الحيوية تحتوي تراكيز عالية ومتنوعة من مايكروبات الأسنان التي تتواجد على سطوح حليمات اللسان هذه التغيرات بسبب كون هذه السطوح تحتوي الشقوق المتواجدة بين الحليمات التي تقلل من سيلان المواد المخاطية على سطوحها , والأسنان تسمح بتراكم اعداد كبيرة للكتل الحيوية في الفم .الأعداد الكبيرة والتنوع الكبير للكائنات المجهرية يوجد في المناطق الراكدة لتجويف الفم
(Thuy Do وآخرون2013).

يمكن العثور على المايكروبات في الشقوق والحفر وسطوح الشرفاة وجوانب التاج والمنطقة الواقعة بين الأسنان وشقوق اللثة او المنطقة المحيطة بعنق الأسنان . بذلك يسبب حالات مرضية للفكين والفم وتشمل التسوس, وأمراض اللثة, والتهاب العظم, وسوء الانطباق .(Jennifer,2003)

6-2 عدوى تسوس الأسنان Dental caries infection

يعد تسوس الأسنان واحد من الأمراض المزمنة المعدية الأكثر شيوعا في العالم (Yoo وآخرون2007) . ويبدأ تكوّنه من بكتريا الغشاء الحيوي التي تتراكم على سطوح الأسنان ويكون اصلها من الفلورا الفموية وتعد العامل الاولي لتسوس الأسنان . تتفاعل البكتريا المسببة للتسوس بواسطة طرق مميزه ومتنوعه ضمن تجمعات(Kolenbrander وآخرون 2006) يتم تبادل التمثيل الغذائي , واتصالات خلية بأخرى(Tang, 2002) وتبادل المادة الوراثية (Roberts وآخرون 2001)هذه الآليات تستفيد منها البكتريا للبقاء وتستطيع ان تجعل الأغشية الحيوية للأسنان صعبة العلاج لتستهدف أمراض الأسنان . تسوس الأسنان يسبب تدمير المينا ,العاج ,اوالملاط للأسنان بسبب الأنشطة البكترية (Dhruw وآخرون2012).

تسوس الأسنان لايزال مشكلة صحية عالمية في معظم البلدان الصناعية لانها تؤثر على 60%-90%من الأطفال في سن المدرسة , والغالبية العظمى من البالغين .ويرجع ذلك الى زيادة استهلاك السكر , وعدم كفاية التعرض للفلوريدات (Petersen, 2005).

يعد تسوس الأسنان غشاء حيوي يعتمد على أمراضية الفم والكاربوهيدرات الغذائية المخمرة وهي عوامل بيئية رئيسية لبداية تطورة .وينتج عن تفاعل بكتريا محدده مع مكونات النظام الغذائي ضمن الغشاء الحيوي ويعتبر السكروز اكثر الكاربوهيدرات الغذائية المسوسة لانها تتخمر وايضا تعمل كأساس للبناء الخلوي الخارجي والبناء الخلوي الداخلي للسكريات المتعددة في لويحة الأسنان (Bowen , 2002) (2007وآخرونLi).

التمزيق الثانوي للمينا السليمة ينتج عن طريق تخمر الغشاء الحيوي ويحدث التسوس على طول التداخلات بين الغشاء الحيوي للأسنان وسطح المينا (Ten Cate, 2006) التسوس يرتبط مع التعرض للسكروز ومع تركيزه (Aires وآخرون2006) .

يمثل تسوس الأسنان التدمير التدريجي لتركيب الأسنان بسبب تشكيل الاحماض البكترية حيث يبدأ التسوس بسطح المينا للتاج او في الاجزاء المكشوفة من العنق وعملها يبدأ من التاج الى تجويف اللب , وربما يبدأ التسوس ايضا في الجذور ويظهر بوساطة اللثة ,وأيضا يمكن تدمير التاج تماما وظهور التهابات صعبة اخرى مثل الخراج اذا تركت دون علاج ويؤدي بذلك الى تساقط الأسنان وغلق الاسناخ أضافة الى انتشار الالتهاب في العظام المحيطية (Caselitz, 1998)(2005 وآخرونNoguchi).

تظهر البكتريا المسببة للتسوس على سطح التاج أولا كبقعة مبهمة مجهرية في المينا .هذه البقعة قد تكون بيضاء او بنية اللون بعدها تصبح هذه البقعة كبيرة اما سطح المينا فيصبح خشنا وفي النهاية يظهر تجويف صغير,.ويستمر هذا التجويف بالنمو حتى يتم التعامل معه اذ يصل التجويف الى حجرة اللب والأنسجة الناعمة للتعرض للإصابة .هذا التعرض يمكن ان يؤدي الى التهاب ودمار العظام وخسارة الاسنان ومجموعة الالتهابات تتجمع وتشكل قيحا في المنطقة هذا القيح مقيد احيانا بجدار النسيج الليفي وبالتالي يشكل الخراج .اماغرفة اللب المحتوية على الالتهاب لفترة من الوقت في النهاية تؤدي الى قتل اللب مع تقدم الإصابة يمكن للعدوى ان تصل أسفل قناة الجذر في العظام ,والأنسجة الرابطـة (Jennifer,2003).

2-7بعض عوامل الضراوة للأجناس والأنواع البكتيرية قيد الدراسة:

الضراوة (Virulence) هي مقياس قدرة البكتريا على احداث المرض , دراسة بعض عوامل الضراوة لدى البكتريا المختزلة للكبريت(SRB) وهي أنتاج الهيمولايسين Haemolysin Production , البكتريوسين Bacteriocin ,المحفظة Capsule , تكوين الجليدات Pellicle Formation,التآكل Corrosion,الغشاء الحيويBiofilm ,القدرة على الالتصاق على السطوح المختلفةAbility of adhesion.

2-7-1أنتاج الهيمولايسين Haemolysin Production

يعد إنزيم الهيمولايسين ذا طبيعة بروتينية يفرز من أنواع عديدة من البكتريا السالبة والموجبة لملون غرام (Benz وآخرون1989). الهيمولايسين عبارة عن Toxin يقوم بتدميرالغشاء الخلوي لكريات الدم الحمراء مما يؤدي الى تحللها ويسبب بذلك تجرثم الدم Bacteremia (Liaw*et* وآخرون2000). ويصنف الهيمولايسين إعتماداً على قابليته لتحلل كريات الدم الحمر وإحداث الإمراضية، النوع الأول يحلل الأغشية ويطلق على هذا النوع من التحلل بالتحلل الدموي من نوع بيتا(β – haemolysis)،أما النوع الثاني فهو يكون الثقوب في الغشاء الخلوي، وتظهر منطقة ذات لون أخضر حول المستعمرة ويطلق على هذا النوع من التحلل بالتحلل الدموي من نوع الفا (α- Haemolysis). (Han وآخرون2010).

إن آلية عمل الهيمولايسين في إحداث الامراضية تكون إما بصورة مباشرة عن طريق تحليل كريات الدم الحمر وهذا يسبب تحرر الهيموكلوبين الذي يُعد مصدراً مهماً للنمو وتكاثر البكتريا او عن طريق التداخل مع العمليات الدفاعية داخل الجسم.يمتلك الهيمولايسين مدى واسعاً من

التاثيرات فهو يهاجم الخلايا المناعية للمضيف ولكن من دون ان يحفز تحللها ولكنه بالمقابل يمنعهامن اداء وظيفتها (Goni وOstolaza, 1998).

2-7-2 أنتاج البكتريوسينBacteriocin:

تُعرف البكتريوسينات بأنها مركبات ذات طبيعة بروتينية وتمتلك قابلية لإبادة العديد من أنواع البكتريا أو الحد من نموها (Luders وآخرون2003)،لاتعد البكتريوسينات عوامل ضراوة مباشرة وإنما تزيد من إمكانية التنافس لدى السلالات المنتجة (Kayaoglu و ,2004) . Qrsavik

تدخل هذه البروتينات الى داخل الخلية عن طريق مستقبلات خاصة موجودة على سطح الخلية الهدف وتقوم بعملية القتل عن طريق تكوين قناة ذات نفاذية للأيونات في الغشاء الخلوي، أو تثبيط بناء البروتينات أو تثبيط تصنيع طبقة الببتيدوكلايكان في جدار الخلية , هذه الصفات تمكّن البكتريوسين من القيام بالفعالية ضد الميكروبية (Scotland , 1999) .

إن تأثير البكتريوسين في الخلية البكتيرية الحساسة قد يكون مثبطاً للنمو (Bacteriostatic) (Sarikaet وآخرون2010) ، أو قد يكون قاتلاً (Bacteriocidal) (Al-Charrakh وآخرون2011) .

لاتعد البكتريوسينات من عوامل الضراوة المباشرة , وإنما تدعم نمو البكتريا وتكاثرها في البيئات التي تتواجد فيها كالأمعاء مثلاً (Riley, 1998). أُستخدمت في الدراسة الحالية الوسط الصلب TSA مضافا إليه خميرة بنسبة (1%) إذ أشار الباحثRileyوأخرون2003 أن إضافة خلاصة الخميرة يزيد من انتاج البكتريوسين.

2-7-3 اختبار تكوين الجليدات

أستخدم هذا الاختبار للكشف عن قدرة العزلات قيد الدراسة على أنتاج الطبقة الخلوية الخارجية المخاطية (EPS)(ExtracellularSlimeProducers) اذ تساهم في التأكل الحيوي بسبب توفيرها للبيئة الحامضية بواسطة أنخفاض pH وتحفيزها لنشكيل الظروف الحامضية التي تقود للتآكل الحيوي(Chongdar وآخرون2005).

فترتبط أيونات السطوح بالطبقة الخارجية المخاطية (EPS) مما تعمل كمحركات الكترونية وقد تؤدي الى تفاعلات أختزالية جديدة عن طريق تكوين الغشاء الحيوي (Sheng وآخرون 2008).

4-7-2 المحفظة Capsule:

تصنع العديد من انواع البكتريا كميات كبيرة من مواد خارج خلوية مؤلفة من متعدد السكريد ويطلق عليها مصطلح (Capsule) أو المادة المخاطية (Slime layer) وهي وحدات متكررة من متعدد السكريد تتكاثف بهيأة طبقة وثيقة الأرتباط وتحيط بالخلية البكتيرية (Brooks وأخرون2007) .

تحاط خلايا بعض البكتريا بطبقة مخاطية تتكون من عديد السكريات (Polysaccharide) ، التي تقع في البكتريا السالبة لصبغة غرام الى الخارج من الغشاء الخارجي وتسمى الكبسولة (المحفظة) (Boyce وAlder, 2000) .

التي لا يمكن ازالتها بالغسل عندما تكون منتظمة وملتصقة بالخلية . أما اذا كانت متكوّنة من مواد غير منتظمة ويمكن ازالتها بسهولة فتسمى الطبقة اللزجة (Slime layer) , أما Glycocalyx فهي شبكة من عديد السكريات خارجة من سطح الخلية, وممكن ان تحيط عدة خلايا في الوقت نفسه, وتغطي الكبسولة والطبقة اللزجة (Prescotوآخرون1990) ;(Atlas وآخرون) 1995) .

تتكون الكبسولة من وحدات متكررة مفردة من السكريات الاحادية (Monosaccharide) التي ترتبط بروابط كلايكوسيدية (Glycosidic linkage) وقد تكون السكريات متجانسة (Homo) او متغايرة (Heteropolymers) . وقد تستبدل بجزيئات عضوية أو لاعضوية . تختلف الكبسولة ليس فقط من حيث مكوناتها من وحدات السكريات الاحادية, ولكن أيضاً في ترتيبها وطريقة ارتباطها مع بعضها (Roberts , 1996).

تعمل الكبسولة على حماية الخلايا البكتيرية من الجفاف, ومن عملية البلعمة, والقتل الذي يتوسطه المتمم(Zhang وآخرون2003) (Loوآخرون 2001) (Boyce وAlder, 2000).

البكتيريا الموجبة لملون غرام المكونة للسبورات تحتوي طبقات سميكة من الأغلفة تحيط بغشاء الخلية للمحافظة على المحتويات من الداخل (المرجاني ,2012).

2-7-5التآكل الحيوي Biocorrosion

التاكل الحيوي :عملية كيميائية او كهرو كيميائية يعتمد التفاعل الكهروكيميائي أساسا على الاختلاف في الجهد الذي يسبب مرور التيار الكهربائي في محلول بين المناطق المختلفة من سطح المعدن فيؤثر علية,يتأين المعدن في مواقع مرور التيار من المعدن الى المحلول(الانود)وتدخل ايونات المعدن المحلول واما في مواقع مرور التيار من المحلول الى المعدن (الكاثود)فيتكون غاز الهيدروجين ويحيط بسطح المعدن مما يؤدي الى توقف عملية التآكل التي ينتج عنها فقدان في وزن المعدن أو مناطق معينة من سطح المعدن (Garciaوآخرون2012) .

يعرف التآكل الكيمياوي هو التلف الناتج عن تفاعل مادتين أو أكثر أو مكوناتها مع توافر وسط مساعد مثل الحرارة , والرطوبة ,أو أنه تلف المادة أو خواصها نتيجة تفاعلها مع مؤثرات خارجية أو داخلية (ALAgha ,2006). أما التآكل بتأثير الأحياء المجهرية Microbial Influenced Biocorrosion يعرف على انه التأثيرات التآكلية الناتجة عن الفعاليات الأيضية للأحياء المجهرية الهوائية , واللاهوائية به(نعمة وآخرون , 2010).

يعد توافر الكبريتات واحداً من الآليات الرئيسة للتآكل ,يحدث التآكل بتوافر البكتريا المختزلة للكبريت والتي تعد مجموعة واسعة من الأحياء المجهرية اللاهوائية والتي تلعب دوراً مهماً في الكثير من العمليات البايوكيميائية (Barton وHamilton ,2007)تكون الصفة الرئيسة لهذه المجموعة بأنها مجتمعات بكتيرية لاهوائية إجبارية تكون فعالة في استخدام الهيدروجين مستقبلاً نهائياً للالكترونات خلال التنفس اللاهوائي وتكون قادرة على توليدكبريتيد الهيدروجين من اختزال الكبريتات(Sahrani وأخرون2008) (Boetiusوأخرون2000) .

مما يؤدي الى ازالة الحماية الكاثودية للمعدن ويسهل هجرة ايوناته خارج السطح مكون كبريتيدات وهيدروكسيدات تلك المعادن مبينة فقدانه للصلادة والمتانة ويكون على شكل حفر(Ting وRajasekar,2011) .تحصل عملية التآكل الحيوي بوجود الغشاء الحيوي Biofilm الذي يحفزالتآكل الحيوي عن طريق توفير الظروف اللاهوائية لهذه البكتريا إذ يتكون الغشاء الحيوي الناضج من خلايا مايكروبية ومواد متعددة السكريد Exopolysaccharide Substances (EPS) والذي يمنع انتشار الأوكسجين إلى المنطقة الكاثودية وبالمقابل انتشار الايونات السالبة كالكلورايد إلى المنطقة الأنودية وحصول التآكل (Videla و Herrera ,2005).

ذكر (Coetser وCloete 2005) آلية حدوث التآكل الحيوي اللاهوائي بفعل البكتريا المختزلة للكبريت اذ تعتمد على آلية إزالة الاستقطاب الكاثودي في تكوين التآكل على سطح المعادن ،وفكرة هذه الآلية هي سحب أيون الهيدروجين من المناطق الكاثودية بمعدل محدود خلال عملية التآكل إذ تعمل هذه البكتريا على استهلاك الهيدروجين من خلال فعالية أنزيم الهيدروجينيز وإزالة الاستقطاب الكاثودي مؤديا إلى حدوث التآكل وكما موضح في المعادلات :

$8\ Fe \longrightarrow 4\ Fe^{+2} + 8e^{-}$ (anodic reaction)

$8H_2O \longrightarrow 8\ H^{+} + 8OH^{-}$ (dissociation of water)

$8\ H^{+} + 8e^{-} \longrightarrow 8\ H$ (cathodic reaction)

$SO_4^{-2} + 8\ H \longrightarrow S^{-2} + 4\ H_2O$ (cathodic depolarization)

$Fe^{+2} + S^{-2} \longrightarrow FeS$ (corrosion product)

$3\ Fe^{+2} + 6OH \longrightarrow 3\ Fe\ (OH)_2$ (corrosion product)

$4Fe + SO_4^{-2} + 4H_2O \longrightarrow 3\ Fe(OH)_2 + FeS + 2OH^{-}$ (overall reaction)

2-7-6القدرة على الالتصاق Ability of Adhesion :

تعتمد معظم البكتريا على قدرتها للإلتصاق بالسطوح المخاطية وتعد الخطوة الأولى لحدوث الإصابة (1997, Virella) .

تعد عملية التصاق البكتريا على السطوح ومنها سطوح الخلايا المستهدفة خطوة مهمة وأساس للتثبيت والاستمرار, لنمو البكتريا وأحداث الإصابة وفي حالة عدم استمرار البكتريا وارتباطها بسطوح أهدافها فإنها تزاح ويتم التخلص منها (Tomaras وآخرون2003).

ينتج عن الالتصاق البكتيري الإصابة بتسوس الأسنان, وتكوين الغشاء الحيوي و التلوث كما وجد ان مواد بوليمرية خارجية (Exopolymeric substances) والزوائد البروتينية كألاهداب (الخمل) Pili والاسواط Flagella هي المسؤولة عن التصاق البكتريا ، اذ تكون كالجسر بين الخلية وأي سطح تلتصق عليه البكتريا ومن ثم إحداث الإصابة (Ishii وآخرون 2004).

2-7-7 الأغشية الحيوية للأسنان Dental biofilms :

الغشاء الحيوي هو عبارة عن تجمع بكتيري (مكون من نوع واحد او عدة أنواع) مع بعضها البعض وتلتصق بالسطوح (الحيوية والجامدة) ويحاط بمادة لزجة مخاطية تسمى بوليميرية خارج خلوية مكونة من عديد السكريد وبعض البروتينات منتجة من نشاط تلك الخلايا (*M*adigan,)2006 و (Marsh , 2005). يأخذ هذا التجمع او التركيب شكلا ثلاثي الابعاد يشبه اشكاله "شكل المشروم " يحتاج الى وجود اسطح يلتصق بها خلويةالسطح الخلفي للسان وسطوح الأسنان ويكون هذا التجمع ، إما بعضها مع بعض بهيأة تجمعات(Aggregates) (Costertonو Donlan, 2002)

يوجد داخل الغشاء الحيوي قنوات بين النموات الجرثومية لإيصال الماء والغذاء للخلايا الداخلية (Kenneth,2004) والعديد من الأغشية الحيوية تكون مغمورة في السوائل مثل اللعاب المتدفق فوق لويحة الأسنان على سطح الأسنان(Geesey, 1994) وتختلف الأحياء المجهرية ضمن الغشاء الحيوي مظهريا عن أفرادها على الرغم من تماثلها وراثيا، وتستجيب الخلايا ضمن الغشاء الحيوي لمتدرج إنتشار المغذيات والنواتج الأيضية، وتوجه أيضها تبعا لموقعها الوظيفي ضمن مجتمع الغشاء الحيوي وتشترك في الإتصال الخلوي (Cell–cell communication) (Cvitkovitch وآخرون2003).

الغشاء الحيوي الناضج يتكون تقريبا من 5-25 %خلايا بكترية و 75-95% مادة glycocalyx (Geesey وآخرون1994), لقد اكتشف حديثا بان غالبية الامراض الخمجية المزمنة ترجع الى الاغشية الحيوية ومثالها التي تستعمر الاغشية المخاطية ,لسان ,اللهاة, الأسنان والجيوب اللثوية (Paster وآخرون2006) توجد علاقة وثيقة بين قدرة البكتريا على تكوين الغشاء الحيوي وقدرتها على إحداث المرض والتسبب بحدوث التهاب مزمن ، فالبكتريا المكونة للغشاء الحيوي لها قابلية أكبر على استعمار جسم المريض والاقامة فيه وتصبح اقل حساسية للعلاج بالمضادات الحيوية ، وتنتج البكتريا بروتينات مرتبطة بالغشاء الحيوي في اثناء الإصابة

(Biofilm -AassociatedProtiens "BAP"). إن وجود هذه البروتينات (BAP) يسهل تكوين الغشاء الحيوي المرتبط ببقاء الجرثومة مدة أطول في جسم المريض،ويقوم الجسم المصاب بالاستجابة مناعيا لهذه البروتينات فيلاحظ وجود أجسام مضادة لهذه البروتينات في مصل المريض(Cucarella وآخرون 2004).

فضلا عن حدوث تغيرات في الغشاء الحيوي للثه والمتصلة بالتغيرات الهرمونية أثناء فترة الحمل(*Emmatfy* وآخرون*2013*) .وكذلك الاستخدام المزمن للعقاقير او أنواع أخرى من العلاج تسهم أيضا الى تغيرات جذرية في النبيت الفموي . أثناء العلاج والاشعاع المؤين يمكن ان يؤثر على الغدد اللعابية والتسنين ممايؤدي الى العديد من الاثار الجانبية الضارة مثل التسوس وقلة تكوين اللعاب وجفاف الفم والتهاب الغشاء المخاطي وبذلك يؤثر الانخفاض الواضح في معدل تدفق اللعاب وتغير العادات الغذائية والاثار المباشرة للاشعاعات المؤينة في حدوث خلل في النظام البيئي للفم الذي بدورة يؤدي الى سوء الحالة الصحية (Tongetal,2003).

هناك عوامل عديدة لها تأثير بالتصاق البكتريا تتضمن سطح البكتريا البروتيني ومتعدد السكريدPolysaccharide،وخاصة متعدد السكريدالمحفظي (CPS)، والتفاعلات الفيزيوكيمياوية ووجود بروتينات المضيف (TuQuoc*et* وآخرون2007) .

2-8مراحل تكوين الغشاء الحيوي

1.تشكيل الجليد المكتسب Aquired Pellicle Formation

الغشاء الحيوي الفموي يكون مميزا بين الانواع المختلفة من الاغشية الحيوية مثل هذا النوع يتطلب مضيفا يحتوي بروتينات سكرية لعابية تساعد على الالتصاق أول خطوة في نشوء الغشاء الحيوي الفموي الالتصاق الى Aquired Pellicle حيث الية تشكيلة مستندة الى العديد من التفاعلات بين البروتينات السكرية المتنوعة والمركبات اللعابية الاخرى على سطح السن ,القوى لتلك التفاعلات يمكن ان تقسم الى ثلاثة انواع :(Hannig , 2009).

1. القوى البعيدة المدى (50-100nm) بين اثنين من المركبات المتفاعلة ,وتتضمن تفاعلات Coulomb وقوى فاندر ولس وتآثرات ثنائية القطب .

2. القوى المتوسطة المدى (5-10nm) وتتضمن تفاعلات هيدروجينية.

3. القوى القصيرة المدى اقل من (5nm) وتتضمن تآثرات آيونية ,وتفاعلات قاعدة لويس الحامضية. مع هذه القوى البروتينات تمتص وترتب ثانية وبعض التغيرات تحدث (2004 , Gray)وتشكلPellicle جديد جاهز للارتباط .

2.الالتصاق البدائي أوالانعكاسي Reversible Attachment

يكون مستند على تجاذبات الكترونية مستقرة والالتصاقات الفيزيائية (Characklis وآخرون1990)يلها قوى كيميائية ساندة وحالما تبدأ البكتريا بالالتصاق الى Pellicle اللعابي تبدأ بإفراز Eps التي تساعد البكتريا على الارتباط مع بعضهم والالتصاق حيث تلعب الاسواط دورا مهما في هذه المرحلة حيث تفيد حركة الخلايا بتقريب الخلايا من السطوح اللازمة والتصاقها بها ومن ثم تكوين نمو جرثومي احادي الطبقة ((Handley, 1990) إضافة الى قوى فاندر وتفاعلات هيدروفوبية وجسور الكالسيوم واواصر هيدروجينية وتفاعلات اساسية حامضية وتفاعلات مستقرة كهربائيا (Hannig , 2009) هذا الالتصاق الانعكاسي يساعد بعض الانواع على احتلال مساحات واكتساب فائدة في المنافسة مع الانواع الاخرى حيث يحمي الخلايا البكترية من تأثير ازالتها بثائير اللعاب والمواد المخاطية (Kreth وآخرون2005) .

3.الغشاء الحيوي الناضج Maturation of Biofilm

بعد التصاق البكتريا تبدأ بتثبيت نفسها والتكاثر وتكوين نموات متعددة الطبقات على شكل عناقيد وتحيط نفسها بالقالب وبذلك تشكل المستعمرات البكترية التي تزود بمواقع ارتباط متخصصة اما بصورة مباشرة اوخلال بروتينات اللعاب لترتبط بالكائنات اللاحقة وتحفز لتطوير الغشاء الحيوي ,فيما بعد تميز المستعمرات البكترية السكريات المتعددة او المستقبلات البروتينية على اسطح الخلايا تعتبر هذه المواد الملاط الذي يثبت البكتريا مع بعضها البعض وعلى السطح (Dige وآخرون2009).

4 .مرحلة الانفصال : Detachment

تبدأ الخلايا البكترية بالانفصال عن الأغشية الحيوية وتنتقل الى مكان جديد وتبدأ يتكوين الأغشية الحيوية الجديدة يتم ذلك تحت تأثير عوامل عدة (2010,Kaplan).

- نقص المغذيات وبالتالي نقص كمية المواد عديدة السكريات المحيطة .

- انسياب او جريان السوائل المختلفة فوق الغشاء الحيوي فتنفصل بعض الخلايا وتنقلها الى مكان اخر .
- اضافة الى عوامل بيئية اخرى .

2-9المضادات الحيوية Antibiotics:

مواد كيمياوية عضوية تنتج من قبل الاحياء المجهرية المختلفة او انها نواتج أيضية ثانوية محورة أو خاصة والتي تمتلك فعالية ضد مجاميع مختلفة من الاحياء المجهرية (Prescott وآخرون2005) . وهي ذات وزن جزيئي قليل يتراوح 150-500 دالتون (Brook وآخرون2007). يتم صنع المضادات بوساطة الكائنات المجهرية مثل البكتريا اذ وجد ان حوالي 90% من المضادات يتم صنعها بوساطة الفطريات fungi والاعفان molds والبكتريا bacteria, والبقية يتم انتاجها صناعيا (Davies,2006). إنّ السُّمية والانتقائية العالية بسبب التباين في التركيب الكيميائي من مواصفات المضادات الحيوية الجيدة إذ تعمل الجرعة الكافية التي تعطى عن طريق الفم او الحقن على تثبيط وقتل الميكروبات في اجزاء الجسم كافة دون ان تسبب ضرراً لخلايا المضيف (احمد, 2008).

2-10آلية مقاومة الغشاء الحيوي للمضادات الحيوية :

ان سلالة البكتريا الداخلة في الغشاء الحيوي تظهر مقاومة للمضادات الحيوية تبلغ ثلاثة أضعاف واكثر مقارنة بسلالة البكتريا نفسهاعندما تكون حره ,ويعود ذلك لأسباب عدة:(Rajiv و) 2013, Santosh.

- ضعف نفوذية المضادات الحيوية عبر الكنان السكري Glycocalyx .
- بطء معدل نمو الخلايا البكترية وبطءاستقلابها بشكل عام ,فضلا عن ذلك اختلاف معدل النمو بين أفراد الغشاء الحيوي واختلاف حساسيتها للمضاد الحيوي .
- ازدياد معدل الطفرات والتبادلات الوراثية كما يزيد التعبير عن مورثات مقاومة المضادات الحيوية بشكل عام .

11-2البنسلينات Penicillins :

تضم هذه المجموعة انواعاً عديدة من المضادات الحيوية غير السامة للإنسان اهمها البنسلين الذي ينتج طبيعيا من عفن البنسليوم , بعض السلالات الطافرة تكون مقاومة للبنسلين وذلك لإنتاجها انزيم البنسلينيز Penicillinase الذي يحول البنسلين الى مركب Penicilloic acid مما يؤدي الى الفشل بالعلاج بهذا العقار (Forbes وآخرون2007).

تقسم البنسلينات اعتماداً على نوعية السلسلة الجانبية والفعالية ضد الميكروبية إلى مجاميع عدة,اولهماالبنسيلينات الطبيعية Natural Penicillins وتشمل البنسلينات الطبيعية بنسلين جي (Penicillin G)، وبنسلين في (Penicillin V). ويكون الأول حساس للعصارة المعوية، بينما يتصف الثاني بمقاومته وثباته (المرجاني, 2011).

وثانيهما بنسيلينات واسعة الطيف Broad spectrum penicillins يطلق على هذه المحموعة من المضادات Aminopenicillin وتضم كل من Ampicillin و Amoxicillin فضلاً عن المشتقات الأخرى مثل Helacillin و Bacampicillin و Cyclacillin (Alwan وAbou , 1998) .

12-2 مجموعة المضادات الامينوكلايكوسيدية Aminoglycosides:

هي مجموعة من المضادات القاتلة للبكتريا (Bacteriocidal) تعمل على تثبيط عملية تصنيع البروتين داخل الخلية البكتيرية لقدرتها على الارتباط مع الوحدة الرايبوسومية الصغيرة (30S) بطريقة تتسبب في دخول تسلسلات خاطئة من الأحماض الأمينية مؤدية إلى إنتاج بروتينات غير طبيعية متراكمة داخل الخلية البكتيرية وبالتالي توقف نمو البكتريا (Heritage, 2003).تضم مجموعة من المضادات منها , Streptomycin, Neomycin, Amikacin Tobramycin, Gentamicin , Kanamycin, Sisomicin ,Netilmicinوهي تتشابه في الخواص الحركية والدوائية والتركيبية والسمية (2001,Katzung) (المرجاني,2011).

13-2اليات مقاومة البكتريا لمضادات الحياة:

من الآليات التي تستطيع من خلالها الأحياء المجهرية ان تظهر مقاومة لمضادات الحياة أهمها إنتاج الأنزيمات المثبطة لمضادات الحياة أذ تنتج الأحياء المجهرية أنزيمات تحطم العقار على

سبيل المثال تنتج بكتريا Staphylococci المقاومة لبنسلين G انزيم β-Lactamase الذي يحطم العقار وكذلك تنتج العصيات السالبة لملون غرام المقاومة لمجموعة Aminoglycosideأنزيمات مثبطة لهذه المجموعة وهي (Adenylating enzyme , Acetylating enzyme , Phosphorylating enzyme) (Brook وآخرون2001).اضافة الى التغيرات في حاجز النفاذية تمتلك البكتريا السالبة لملون غرام الغشاء الذي يعد حاجزاً قوياً محباً للماء (Brook وآخرون2001) ، ان التغير في التركيب الكيمياوي للغشاء أو الاختزال في عدد الثقوب الموجودة فيه يؤدي الى تغير في نفاذيته وبالتالي تصبح البكتريا مقاومة للمضاد(Jacoby و 1985,Sutton) فضلاً عن توافر بروتينات (Penicillin Binding Proteins (PBPs) الموجودة في الغشاء السايتوبلازمي ذات الطبيعة الانزيمية التي تدخل في البناء الحيوي للبيتيدوكلايكان والتي لها القابلية على الارتباط تساهمياً بمضادات البيتالاكتام.(Pfeifle وآخرون2000) .

التغيرات في موقع الهدف أي حدوث طفرة وراثية في موقع الهدف يؤدي إلى التقليل من أُلفة المضاد لهذا الهدف وبالتالي تتحول البكتريا من حساسة إلى مقاومة وهذا ما يحدث في المقاومة لمضاد الـ Erythromycin اذ يتم تغير الهدف وهو الوحدة الرايبوسومية (50S) وتغير الوحدة الرايبوسومية (30S) التي هي موقع الهدف للمجموعة Aminoglycosides (Levinson و , Jawetz 2000).

يشترك الارثرومايسين والكلندامايسين (مضادات مجموعة Macrolides) مع اللنكومايسين Lincomycin التابع لمضادات Lincomsides مع الستربتوغرامين B (Streptogramin B) أو مايعرف بمضادات MLS في القدرة على تثبيط انتاج البروتين من خلال ارتباطه بالوحدة 50 S للرايبوسوم وتحفيز فك الارتباط بين معقد peptide –tRNA والرايبوسوم(Roberts وآخرون1999).

تعد البكتريا السالبة لصبغة كرام اكثر مقاومة للمضادات الحياتية بالرغم من ان طبقة الببتيدوكلايكان ارق في جدارها مقارنة مع البكتريا الموجبة لصبغة كرام وذلك ؛لان جدار الخلية الإضافي غير نفاذ نسبيا (عدوس, 2005).

التغيرات في المسارات الايضية لبعض البكتريا تظهرلها مقاومة لعمل المضاد من خلال تغير في مسارها الكيموحياتي وكذلك تُطور انزيمات متغيرة تؤدي وظيفة ايضية واقل تأثراً بالعقار فأنزيم(Dihydrofolic acid reductase) الذي تنتجه البكتريا المقاومة لـ

Trimethoprimاقل تثبيطاً بـ Erimethoprim من البكتريا الحساسة لمضاد Trimethoprim(Brook وآخرون2001).

من الآليات المهمة الأخرى لمقاومة البكتريا للمضادات هو التحوير الكيمياوي في الأنزيم الذي يعمل عليه المضاد (Guilfoile وآخرون 2007).

تحدث المقاومة أيضا عن طريق أمتلاك البكتريا أنظمة الدفق Efflux pump system وهي عبارة عن بروتينات تنقل المضادات الحيوية من الخلية الى الخارج، وتكون غشاءً خاصاً يساعد الغشاء الداخلي والفسحة البلازمية على إحتجاز مضادات الحياة وقذفها خارج الخلية البكتيرية، وأن هذه الميكانيكية تلعب دورا مهما في منح المقاومة لمدى واسع من المضادات الحياتية وخاصة في البكتريا السالبة لصبغة كرام (Lambert (2009, Mendonca وآخرون2001).

ألمواد وطرائق العمل

3.المواد وطرائق العمل

3- 1 المواد :

3-1-1 الأجهزة والمستلزمات:

استعملت الأجهزة والمستلزمات المدرجة في القائمة أدناه:

الجهاز	الشركة المصنعة والمنشأ
الموصدة Autoclave	Human Lab (Korea)
ميزان حساس Sensitive balance	Kern (Germany)
حاضنة Incubator	Memmert (GERMANY)
فرن كهربائيElectric Oven	Memmert
مجهر ضوئي مركب Compound Light Microscope	Olympus (JAPAN)
مقياس الأس الهيدروجينيpH- meter	Walk Lab (Malaysia)
ثلاجة Refrigerator	Beko(turkey)
جهاز تقطير الماء Water Distillator	Lab tech(Korea)
ميزان Balance	Kern (Germany)
حمام مائي water bath	Julabo(Germany)
جهاز طرد مركزي centerfuge	Hettich(Germany)
جهاز تمرير الغازات مصنع محليا	صنع محليا
اسطوانات مدرجة Glass cylinder	AFMA

Qingdao Huanya	جهاز هزاز كهربائي Vibration
Millipore System (UK)	مرشحات دقيقة Millipor filter
AFMA(JORDAN)	دوارق باحجام مختلفة Glass flask
AFMA	Glass tube أنابيب اختبار زجاجية
AFMA	ماصات Pipette
Biomerieux(France)	ماصة باستور pasture pipette
AFMA	قناني زجاجية لزرع لأهوائي
Labcco (Germany)	Vortex دوارة
Sony (Japan)	Sony كاميرارقميةنوع
AFMA (Jordan)	Petri dish plastic أطباق بلاستيكية
AFMA	Plastic test tube أنابيب اختبار بلاستيكية
Samco(England)	Pyrix test tube أنابيب اختبار مقاومة للغليان
Germany	paper points
Sailbrand (China)	Slides شرائح زجاجية
Germany	Disposable Swabs مسحات معقمة
Difco([U.S.A)	Milipore filter(0.22µm أوراق ترشيح
AFMA	Glass bekear كؤوس زجاجية

3-1-2 المواد الكيميائية والبايولوجية:

المادة	الشركة المصنعة والمنشأ
حامض الخليك CH_3COOH	Sdfcl(india)
هيدروكسيد الصوديوم NaOH	B.D.H. (ENGLAND)
خلاصة الخميرة yeast extrate	Himedia(india)
كلوريد الصوديوم NaCl	Sdfcl
كبريتات المغنيسيوم المائية$MgSO_4.7H_2O$	Didactic
كبريتات الحديديك الامونياتية $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2$	Sdfcl
حامض الاسكوربك Ascorbic acid	S.C.R(Japan)
بيكاربونات الصوديوم $NaHCO_3$	S.C.R
حامض اللاكتيك$C_3H_6O_3$	GCC(U.K)
فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين KH_2PO_4	GCC
كحول اثيلي C_2H_5OH	Flammadle(lebanon)
صوديوم ثايو كلايكوليت	Riedal-deltoen
بارافلم	Bemis(USA)
سيستين $C_6H_{12}N_2O_4S_2$	GCC
زايلول	Merck(jermany)
برادة النحاس	carloerba
متعدد فيتامين	Pharco(Egypt)
اكار	Himedia(india)

زيت البارافين	GCC
محاليل صبغة كرام	GCC
صبغة الملكايت	GCC
حامض الهيدروكلوريك HCL	Himedia
حامض الخليك الثلجي	Himedia
كاشف الفينونفثالين	Sdfcl
خلات الصوديوم CH_3COONa	Scharlau(spain)
بنزوات الصوديوم $C_7H_5NaO_2$	Scharlau
اوكزالات الصوديوم $Na_2C_2O_4$	Scharlau
بروبونات الصوديوم $C_3H_5Na_2O$	Scharlau
بيوتارات الصوديوم	Scharlau
حامض الاديبك $HOOC(CH_2)_4COOH$	Scharlau
صبغة البنفسجي المتبلور Crystal violette stain	BDH
صبغة الكونكوريد Congo red stain	BDH
أسيتون Aceton	BDH
أحمرالمثيل Methyl red	BDH
كحول أثيلي Ethanol	BDH

3-1-3 الأوساط الزرعية ألمستخدمة:

الوسط	الشركة المجهزة والمنشأ
أكارالدم الاساس Blood base agar	Himedia
وسط مرق صويا تربتون Tryptone Soya broth	Oxoid (England)
أكارمولرهنتون Muller-Hinton agar	Oxoid
الوسط الزرعي API	

3-1-4الصبغات المستخدمة :

ت	اسم الصبغة	المنشأ
1	البلور البنفسجي (Crystal violet)	Himedia (India)
2	ايودين (Gram's Iodine)	Himedia
3	سفرانين (Safranin)	Himedia
4	صبغة النكروسين Nigrosin	Himedia
5	صبغة الملكايت الأخضر Malachite green	Himedia

3- 1- 5 المضادات الحيوية :

3-1-5-1:اقراص المضادات الحيوية المستخدمة .

المضاد الحيوي	الرمز	تركيز القرص (µg/disc)	المنشأ
Ampicillin	**APX**	**25\5**	**Bioanalyse(Turkey)**
Amoxicillin	**AX**	**25**	**Bioanalyse**
Streptomycin	**S**	**25**	**Bioanalyse**
Clindamycin	**DA**	**10**	**Bioanalyse**
Azithromycin	**AZM**	**15**	**Bioanalyse**

3-2 طرائق العمل Methodology

3-2-1 طرائق التعقيم

عقمت بعض مكونات الوسط الزرعي الخاص بعزل البكتريا المختزلة للكبريت وتشخيصها والتي تحتاج إلى تعقيم بجهاز الموصدة Autoclave تحت درجة حرارة (121)م° لمدة (15) دقيقة تحت ضغط (15) باوند /انج^2 , بينما تم تعقيم الجزء الآخر من مكونات الوسط بالمرشحات الدقيقة ذات قطر (0.45) مايكروميتر بسبب تعرضها للتلف في درجات الحرارة العالية مثل الفيتامينات والسكريات أما الزجاجيات المستخدمة في العمل عقمت بالفرن الكهربائي بدرجة حرارة (180)م° ولمدة ساعتين (Cowan and steels ,2004) .

2-2-3 تحضير المحاليل

1-2-2-3 تحضير محاليل العوامل المختزلة

أ- بيكاربونات الصوديوم 8% :- يحضر من إذابة 8 غرام في 100 مل من الماء المقطر ويعقم بالموصدة ويضاف منه 30 مل لكل 1000مل من الوسط الزرعي .

ب- L- cystein 3%:- يحضر من إذابة 28غرام في 1000مل من الماء المقطر بعد ذلك يعقم المحلول بالترشيح ثم يضاف 100مل من المحلول لكل 1000مل وسط زرعي في أثناء عملية الزرع .

ت- صوديوم ثايوكلايكوليت 1%:- يحضر من إذابة 10 غرامات في 1000 مل ماء مقطر ويعقم بالموصدة ويضاف 10مل من المحلول إلى 1000 مل وسط زرعي في أثناء عملية الزرع .

2-2-2-3 تحضير المحاليل المعقمة بالترشيح

أ- محلول كبريتات الحديديك الامونياتية 1% :- يحضر من إذابة 10 غرام في 1000مل من الماء المقطر ويعقم بالترشيح ويضاف 10مل من المحلول لكل 1000مل وسط زرعي في أثناء عملية الزرع .

ب- حامض الاسكوربك 1%:- يحضر من إذابة 10 غرام في 1000مل من الماء المقطر ويعقم بالترشيح ويضاف 10مل من المحلول لكل 1000مل وسط زرعي في أثناء عملية الزرع .

ت- محلول متعدد الفيتامين 0.1%:- يحضر من إضافة 100مل من متعدد فيتامين إلى 1000مل ماء مقطر ويعقم بالترشيح ويضاف 10مل من المحلول لكل 1000مل وسط زرعي .

3-2-2-3تحضير محاليل صبغة كرام

حضرت محاليل صبغة كرام وفق ما ورد في(**2004, steels Cowan**).

4-2-2-3 تحضير محلول صبغة النكروسين Nigrosin :

حُضرت الصبغة وفق (Atlas et al.,1995) كما يأتي:

أذيب 7 غم من النكروسين في 100 مليلتر من الماء المقطر ووضع في حمام مائي مغلي ثم برد المحلول وأضيف اليه 0.5مليلتر من الفورمالين ورشح خلال طبقتين من ورق الترشيح Whattman's filter paper No.1.

5-2-2-3 محاليل ضبط الرقم الهيدروجيني

أ- NaoH:- يحضر من إذابة (16) غراماً في 100 مل ماء مقطر وكما موضح في المعادلات علما إن الوزن المكافئ لهيدروكسيد الصوديوم =40 , وتركيزه 4 عياري .

ب- حامض HCL:- يحضر بتركيز 5% لغرض ضبط الأس الهيدروجيني (100:5)حامض HCL والماء المقطر على التوالي .

6-2-2-3 المحلول الملحي الفسلجي Normal Saline :

حضر المحلول الملحي الفسلجي بحسب ما جاء في (Forbes وآخرون2002) وذلك لاستعماله في نقل عينات الجيوب اللثوية بإذابة 0.85 غم من كلوريد الصوديوم في 90 مل ماء مقطر ثم اكمل الحجم الى 100مل ، عقم بالموصدة ، وحفظ بدرجة حرارة 4م° لحين الاستعمال.

7-2-2-3 محلول دارئ الفوسفات الملحي Phosphate Buffer Saline(PBS) pH=(7.2) .

تم تحضيره بإذابة المواد الآتية في لتر من الماء المقطر :

فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين KH2PO4 (0.2) **غم**, فوسفات الصوديوم احادية الهيدروجين Na2HPO4(0.9) غم , كلوريد الصوديومNaCl(8) غم , كلوريد البوتاسيومKCl (0.2) غم, وبعد ان ضبط pH وضع بقنينة محكمة السد, وعقم بالموصدة, ثم حفظ بدرجة حرارة (4) م لحين الاستعمال (Cruickshank وآخرون1975) .

8-2-2-3 محلول ثابت العكرة القياسي Macfarland Standard :

حضر المحلول حسب ما جاء في (*Baron* و *Finegold* 1994)كما يلي:

(محلول آ) :حامض الكبريتيك 1% حضر باضافة (1) مل من حامض الكبريتيك المركز الى كمية من الماء المقطر ثم اكمل الحجم بالماء المقطر الى (100) مل.

(محلـول ب) : محلـول كلوريـد البـاريوم. حضـر بأذابـة (1.175)غـم مـن كلوريـد البـاريوم فـي (100) مـل مـن المـاء المقطـر. مـزج (0.5) مـل مـن المحلـول (آ) مـع (99.5) مـل مـن المحلـول (ب) فـي انبوبـة نظيفـة وجافـة وذات غطـاء محكـم لمنـع التبخـر وتحفـظ بـالظلام. تمزج محتويات الأنبوبة جيدا قبل كل استعمال.

3-2-3الاوساط الزرعيةCulture Media :

1-3-2-3الوسط الزرعي API المحور

تم تحضير الوسط الزرعي API والمحور عن (1975,API) والذي يستخدم لعزل البكتريا المختزلة للكبريت وإنمائها وكما موضح في الجدول مكونات الوسط الزرعي

المادة	الكمية (غم لتر $^{-1}$)
خلاصة الخميرة	1
كبريتات المغنيسيوم المائية	0.2
كلوريد الصوديوم	1
فوسفات البوتاسيوم ثنائيه الهيدروجين	0.01
حامض اللاكتيك	4 مل
أكار	15

ثم أكمل الحجم إلى 1000مل وتم ضبط الرقم الهيدروجيني بين 7.2-7.5 ثم عقم بالموصدة ولمدة ربع ساعة ,وبعد التعقيم تم إضافة الفيتامينات المعقمة بالترشيح, أي في أثناء عملية الزرع وهي :

1- حامض الاسكوربك 10ml /L
2- كبريتات الحديديك الامونياتية 10ml /L
3- متعدد الفيتامين 10ml/L

ثم بعد ذلك تم إضافة المواد المختزلة في أثناء عملية الزرع إذ تشمل :

1- سيستين 10ml / L
2- بيكاربونات الصوديوم 30ml / L
3- صوديوم ثايوكلايكوليت 10ml / L

مع مراعاة إنقاص حجم المحاليل المضافة من الحجم الكلي للوسط المحضر.

2-3-2-3 تحضير الاوساط الزرعية الجاهزةCulture Media :

حضرت الاوساط الزرعية حسب تعليمات الشركة المصنعة والمثبتة على العبوات وضبط الاس الهيدروجني الى (7) ثم عقمت بالموصدة ، ومن ثم حضنت الاطباق عند درجة حرارة 37 م° ولمدة 24 ساعة للتأكد من عدم تلوثها بعدها حفظت في الثلاجة عند حرارة 4 م° لحين الاستعمال، فيما حضرت الأوساط التالية كما يأتي:-

3-2-3-2-1 وسط أكار الدم Blood base agar:

حضر وسط الدم الاساس بحسب التعليمات المذكورة على العلبة وعقمت بالموصدة، بعدها تركت لتبرد بدرجة حرارة 45-50 م° ثم اضيف صنف الدم AB بنسبة 5% ، ومزج جيداً بعدها تم توفير ظروف لاهوائية باستخدام الغازات ونشرت العزلةاسفل الطبق و صب الوسط فوق العينة ، وترك ليتصلب بدرجة حرارة الغرفة ثم غلف الطبق بشريط شمع البارافين أستخدم للعزل الاولي للبكتريا المنتجة لأنزيم Hemolysin الحال لكريات الدم الحمر.

3-2-3-2-2 وسط الكونكوريد اكار Congo-red agar medium

اذيب 37غم من وسط المرق المغذي و 50 غم سكروز و10 غم من وسط اكار في 900 مل من الماء المقطر , وعقم الوسط بالمؤصدة اما صبغة الكونكوريد فقد اذيب 0.8 غم منه في 100مل من الماء المقطر وعقمت بالمؤصدة ,وبعدها اضيفت الى الوسط بعد تبريده الى (55م°) وصبت في اطباق معقمة,مع مراعاة توفير الظروف لاهوائية سابقة الذكر,هذا الوسط يستخدم للكشف عن قابلية البكتريا في انتاج الطبقة المخاطية slime layar(Freeman وآخرون1989).

3-2-3-2-3 وسط التربتكيز صويا اكار Trypticase Soy agar (TSA):

حضر هذا الوسط بإذابة 19 غم من TSA في 500مل من الماء المقطر بحسب تعليمات الشركة المصنعة ,واضيف اليه 3 % من خلاصة الخميرة وعقمت بالمؤصدة , مع مراعاة توفير الظروف لاهوائية سابقة الذكر, استخدم هذا الوسط للتحري عن قابلية البكتريا على انتاج البكتريوسين (القصاب والخفاجي ,1992).

3-2-4 جمع العينات Collection of Samples

جمعت 300 عينة تحت الأشراف الطبي المختص من الإناث والذكور للبالغين والأطفال في المجمع الطبي التخصصي للأسنان في بعقوبة الجديدة وعيادات طب الأسنان ومن المدارس ومن بعض المتبرعين , وتضمنت 200عينة من الأسنان المتسوسة ,100 عينة من مسحات الجيوب اللثوية باستخدام Disposable Cotton Swabs و(paper points حجم 30) اذ قسمت العينات بواقع 75عينة للأسنان المتسوسة و 75 عينة للمسحات اللثوية معزولة من الأطفال الذين تتراوح أعمارهم (5- 15) سنة و(125)عينة للأسنان المتسوسة و(25)عينة للمسحات اللثوية معزولة من الأشخاص التي تتراوح أعمارهم (20-60) سنة من الذكور والإناث, وتم جمع العينات خلال الفترة بين 18/ 10 / 2013 ولغاية 1 /2 / 2014 إذ سجلت المعلومات المتعلقة بالمريض من المصدر والعمر وتاريخ أخذ العينة والموافقة على خضوعه لتجارب البحث وأمراض أخرى خاصة المتعلقة بمرض السكري في استمارة خاصة (ملحق 1)، زرعت النماذج مباشرة بعد أخذ العينة في قناني زجاجية تحوي وسطAPI السائل ونقلت مباشرة الى مختبر الدراسات العليا –في كلية التربية للعلوم الصرفة لغرض الحضن والتشخيص.

5-2-3 الزرع باستخدام العوامل المختزلة والغازات

تم الزرع بتوافر غازي النتروجين وثنائي اوكسيد الكاربون بنسبة 80:20 % (Badziongوآخرون1978) وصمم الجهاز الخاص بعملية الزرع المحور عن (Hardy,1981) وكما موضح في الشكل (3-2), لغرض توفير الظروف اللاهوائية الخاصة لنمو البكتريا المختزلة للكبريت والذي يتكون من أنابيب نحاسية, وبلاستيكية , وزجاجية ,إذ يمرر غاز ثنائي اوكسيد الكاربون من الاسطوانة خلال أنبوب بلاستيكي ويصل إلى الانبوبة الزجاجية المصممة بطريقة خاصة لغرض خلط الغازين مع بعضهما ,اما غاز النتروجين أيضا يمرر من الاسطوانة خلال أنابيب بلاستيكية ثم أنابيب نحاسية ملفوفة لفات عدة وذلك لزيادة المساحة السطحية المعرضة للحرارة وتتوافر داخل هذه الأنابيب برادة النحاس التي تعمل بمساعدة الحرارة على اختزال الأوكسجين والحصول على غاز النتروجين الخالي من الأوكسجين من الطرف الآخر للأنبوب النحاسي, وبعدها يوصل إلى الأنبوبة الزجاجية لغرض الخلط مع ثاني اوكسيد الكاربون وبحسب النسبة المذكورة أعلاه بعد

ذلك يمر خليط الغازات إلى قناني الزرع بوساطة حقنة معقمة بدون التعرض للتلوث إذ تتم كل عمليات الزرع, والتنقية, والتشخيص باستخدام هذه الطريقة مع إضافة العوامل المختزلة المذكورة سابقا .

شكل (3-1) جهاز تمرير الغازات الخاص بالعزل اللاهوائي

3-2-6 عزل البكتريا المختزلة للكبريت وتنقيتها

زرعت العينات للأسنان المتسوسة والمسحات المأخوذه من الجيب اللثوي للذكور والإناث على وسط API السائل في قناني زجاجية سعة 100 مل مباشرة بعد أخذها من المريض وغسل الأسنان المتسوسة بالمحلول الملحي الفسيلوجي المحضر للتخلص من الدم وما علق به أثناء القلع , تحتوي القناني على غطاء معدني محكم الغلق لمنع دخول الأوكسجين مع مراعاة وضع زيت البارافين قبل وضع غطاء القنينة ثم التغليف بورق الألمنيوم السميك لضمان توفير الظروف اللاهوائية بعد ذلك تحفظ القناني في الحاضنة الاعتيادية وعلى درجة حرارة (37)م°ولمدة3-5 أيام,وبعد ظهورالنمو الذي يظهربلون اسود اخذ(1) مل من النموباستخدام ماصة الباستور وزرعت على الوسط شبة الصلب للحصول على مستعمرات مفردة single colonies او متباعدة بعضها عن بعض الآخر إذ تم أتباع طريقة تدوير الأنابيب Roll tube method (Hungate ,1969) بأخذ (1) مل من المزرعه النامية وتحضير سلسلة من التخافيف العشرية باستخدام وسط API السائل المعقم يحوي مواد مختزلة وبعد ذلك يتم اخذ (0.1) مل من التخافيف وزرعت في قناني تحتوي على وسط API الشبه الصلب بدرجة حرارة (45)م°, بعدها يتم وضع البرافين السائل وتغلف الأنابيب بإحكام ثم تدور براحة اليد وتوضع بالثلاجة لفترة

قصيرة حتى تتصلب ثم تنقل الى الحاضنة الاعتيادية تحت درجة حرارة (37)م° ولمدة من 1-3 أيام .وبعد فترة الحضن يتم مراقبة النمو, وملاحظة المستعمرات النامية وبعد ذلك يتم اخذ هذه المستعمرة المفردة بوساطة ماصة باستور وتنقل إلى وسط API السائل لغرض التنشيط, ثم زرعت مرة أخرى على وسط ApI الصلب لإعادة تنقيتها مرة أخرى تحت الظروف نفسها للحصول على مزارع نقية ثم اخذ جزء من المزرعة وصبغت بصبغة كرام, ولفصل العزلات المكونة للسبورات عن تلك غير المكونة لها , وذلك باستخدام صبغة الملكايت الأخضر Malachite green لملاحظة السبورات ومواقعها.

3-2-7تشخيص البكتريا المختزلة للكبريت

سجلت الصفات المظهرية للمستعمرات النامية على وسط ApI الصلب من حيث الشكل والحجم واللون ,أما شكل البكتريا فقد حدد بتحضير مسحات جرثومية صبغت بصبغة كرام كما درست حركة البكتريا باستخدام القطرة المعلقة (Hanging drop) .

اختبرت قابلية البكتريا المختزلة للكبريت غير المكونة للسبورات , وشخصت الأنواع اعتمادا على الاختبارات الآتية :-

أ- أكسدة أملاح الحوامض العضوية :-

تم تحديد ناتج الأكسدة من خلال تحديد الناتج النهائي لفصل المجموعة التي تؤكسد المادة العضوية (لاكتات الصوديوم) أكسدة غير تامة إلى خلات عن المجموعة الأخرى التي تؤكسد المادة العضوية أكسدة تامة إلى ثنائي اوكسيد الكاربون وماء . إذ لقح وسط API السائل بالعزلات وحضنت بدرجة (37)م° وبعد ظهور النمو تم الكشف عن جذر الخلات بأخذ (1) مل من الراشح في أنبوبة اختبار وأضيف اليه (2) مل من محلول هيدروكسيد الصوديوم (20% باستخدام كحول اثيلي بتركيز 10% كمذيب) بعدها أضيفت قطرات من كاشف الفينولفثالين ظهور اللون الوردي , وضعف شدته واختفائه عند التسخين دل عن توافر الخلات **(نعمة وآخرون , 2009).**

ب- استهلاك أملاح الحوامض العضوية :-

تم اختبار قابلية البكتريا على استهلاك المصادر الكاربونية باستخدام وسط API السائل بعد استبدال المصدر الكاربوني لالكتات الصوديوم بالمصادر الكاربونية الآتية :

-خلات الصوديوم (1.1) غم لتر$^{-1}$

- بروبيونات الصوديوم (50.6) غم لتر$^{-1}$

- اوكزالات الصوديوم (7.5) غم لتر$^{-1}$

-حامض الاديبيك (0.25) غم لتر$^{-1}$

-بنزوات الصوديوم (7.2)غم لتر$^{-1}$

-بيوتارات الصوديوم (1.6)غم لتر$^{-1}$

وحددت درجة الحرارة المثلى للعزلات بإنمائها في درجات حرارة (25, 40 ,50, 60, 65) م° إذ لقح وسط API السائل بالعزلات وحضنت ثلاثة أيام , وحددت درجة حرارة النمو المثلى من خلال تحديد كثافة النمو باستخدام جهاز المطياف الضوئي عند طول موجي (580) نانوميتر **(نعمة وآخرون 2009,)** .

3-2-8 اختبار قابلية البكتريا المختزلة للكبريت على تآكل المعادن المستخدمة في عمل طبيب الأسنان

تم أجراء تجارب التآكل على مزارع مختلطة وأخرى نقية, ولفترات زمنية مختلفة لدراسة قابلية تلك البكتريا على القدرة على الالتصاق وتأكل المعادن الذي يستخدمها طبيب الأسنان خلال عمله وكما يلي :-

أ- التآكل في المزارع مختلطة :

نظفت عينات الحديد الخمس المصقولة بمادة الاسيتون لإزالة الشحوم , ثم وضعت في دورق حاوٍ على حامض الهيدروكلوريك (2N) مدة (30) دقيقة لإزالة الطبقات الواقية ولتصبح نظيفة ومهيأة تماما للتآكل ,ثم وزنت العينات بدقة بميزان حساس ,وعقمت بالحرق على لهب مصباح بنزن, ثم وضعت في قناني زجاجية تحتوي على 100 مل من الوسط الزرعي API السائل المعقم ,لقحت كل قنينة بـ (10) مل من مزرعة مختلطة منشطة (عمرها 3 أيام) غير مشخصة من البكتريا المختزلة للكبريت .

حضنت القناني على درجة حرارة 37 مº واستمرت التجربة 84 يوماً توزعت على الفترات الزمنية (28 ,42 , 56 , 70 , 84) يوما ,وفي الوقت نفسه حضرت عينات سيطرة باستخدام قناني زجاجية تحتوي على الوسط الزرعي والمعدن فقط, وتتم كل هذه العملية باستخدام الغازات للتخلص من الظروف الهوائية (Booth وWormwell , 1961).

ب- التآكل في المزارع النقية :

حضرت العينات بنفس الطريقة المذكورة سابقا ,إذ وزع الوسط الزرعي على قناني زجاجية (100) مل وشبع الوسط بغازي النتروجين وثنائي اوكسيد الكاربون , وأضيف إليه العوامل المختزلة ,ثم أضيفت العينات بعد حرقها باللهب ولقحت كل قنينة ب(10) مل من مزرعة نقية مشخصة حضنت القناني بدرجة حرارة (37)مº حسب الفترات الزمنية المذكورة سابقا وبنفس الوقت حضرت عينات سيطرة .

اتبعت طريقة (Lim وBell , 1981)لإزالة نواتج التآكل ,إذ غسلت العينات جيدا بماء ساخن ووضعت في دورق زجاجي يحتوي على حامض الخليك الثلجي مدة (30) دقيقة لإزالة نواتج التآكل بعدها غسلت بالماء المقطر, وجففت باستخدام ورق الترشيح .

استخدمت طريقة (Greeneو Fontana , 1978) في حساب التآكل على أساس فقدان الوزن.

3-2-9 التحري عن بعض عوامل الضراوة في البكتريا:

3-2-9-1 اختبار تكوين الجليدات Pellicle formation test

تم إجراء هذا الاختبار بتنمية العزلات البكترية في وسط Ap1 سائل في انابيب زجاجية معقمة ,حضنت الانابيب في درجة حرارة(37) م° لمدة (72) ساعة ,وتعد النتيجة موجبة بتكوين الجليدات على سطح الوسط (Snelling وآخرون 1996).

3-2-9-2 اختبار تكوين المحفظة (Capsul):

استخدمت طريقة التصبيغ السالب (Negative staining) وحسب ماجاء في (Atlas وآخرون1995).

مزجت كمية قليلة من النمو البكتيري المأخوذ من مستعمرة عمرها 24 ساعة مع قطرة من صبغة النكروسين فقرة 3-2-2-4 بعود خشبي (Stick). نشرت على شريحة بعمل مسحة بحافة شريحة زجاجية أخرى، وتركت الشريحة تجف في الهواء، وفحصت تحت المجهر. تظهر

المحفظة بشكل هالة بيضاء (غير مصطبغة) محيطة بالخلية البكتيرية في حال كون البكتريا مكونة لها.

3-9-2-3 اختبار إنتاج الهيمولايسين Haemolysin Production:

تم الكشف عن قابلية العزلات البكتيرية قيد الدراسة على إنتاج الهيمولايسين البكتيري بزرع هذه العزلات في وسط اكار الدم ، مع مراعاة توفير الظروف اللاهوائية سابقة الذكر, حضنت الاطباق بعد التلقيح في درجة حرارة 37م° ولمدة 24 ساعة (Atlas وأخرون1995).

3-9-2-4اختبار إنتاج البكتريوسين Bacteriocin :

استخدمت طريقة (القصاب والخفاجي،1992) للتحري عن العزلات المنتجة للبكتريوسين و العزلات الحساسة له إذ استخدمت العزلات كافة بوصفها عزلات منتجة كما استخدمت العزلات نفسها كعزلات حساسة وقد أجرى الاختبار كالآتي:

زرعت البكتريا المنماة مسبقا في وسط Ap1 لمدة (72) ساعة ونشر(2 مل) من المزروع في اسفل الطبق(Pour Plating method) ثم صب وسط اكار TSA المحضر في الفقرة (3-2-3-2-3) ثم حضنت الاطباق بدرجة (37) م° لمدة (24) ساعة. وبعدالحضن عملت اقراص بواسطة الثاقب الفليني في هذا الوسط ووضعت على سطح الاكار المغذي والمنشور عليه بالناشر مقدار (0,1) مل من مزروع كل من عزلات الاختبار البكتيرية المذكورة بعد مقارنتها مع محلول ماكفرلاند القياسي المحضر ثم حضنت الأطباق بدرجة (37)م° لمدة (24) ساعة لاهوائيا سجلت النتائج وهي توافر مناطق تثبيط حول قطعة الاكار الحاوي على السلالة المنتجة.

3-9-2-5 إختبار تكوين الغشاء الحيوي Biofilm :

أ- طريقة احمر الكونغو Congo-red Method

نقلت مستعمرة مفردة نقية النامية على وسط Ap1 الصلب لمدة (72) ساعة ولقح وسط الكونكوريد المحضر في الفقرة (3-2-3-2-2) ,مع مراعاة توفير الظروف اللاهوائية وحضنت الاطباق في درجة حرارة 37 م° ولمدة 24 -48 ساعة ،النتيجة موجبة عندما تظهر المستعمرات سوداء اللون مع كثافة بلورية جافة ,اما النتيجة السالبة فتبقى المستعمرات وردية اللون (Mathur وآخرون2006).

ب_طريقة الانابيب Tube Method

1- اخذ (0.1) مل من البكتريا النامية في وسط Ap1 لمدة (72) ساعة ,ثم وضع في انبوية اختبار مصنوعة من مادة البوليستايرين حاوية على 10 مل من وسط مرق تربتون صويا بالبكتريا المقارنة عكورتها مع ماكفرلاند 0,5 ووضعت في الحاضنة بدرجة حرارة (37°) م لمدة (24) ساعة مع مراعاة توفير الظروف اللاهوائية للوسط.

2-أزيل الوسط الموجود في الانابيب بالتفريغ ثم أضيف 10 مل صبغة السفرانين.

3-تفرغ صبغة السفرانين وتقلب الانابيب على قطعة شاش نظيفة الى ان تجف بدرجة حرارة الغرفة .

4- تعد النتيجة موجبة على اساس وجود تصبيغ في قعر الانبوب وعلى الجدران وتعد النتيجة خاطئة في حالة ظهور قطرات مائية اوهوائية ملتصقة على الجدار(Freeman وآخرون1989).

3-2-9-6 اختبار قدرة البكتريا على الالتصاق على السطوح المختلفة .

اجريت هذه التجارب حسب طريقة Gohl وآخرون (2006) وكالاتي :

- قشطت مستعمرة بكترية مفردة نامية على وسطAp1 الصلب لمدة (72) ساعة بدرجة حرارة (37) م لتحضير عالق خلوي، ثم علقت في محلول الفوسفات الملحي. نبذ العالق البكتري في جهاز النبذ المركزي بسرعة (3000) دورة / دقيقة لمدة (10) دقيقة وغسلت الخلايا مرتين بنفس المحلول.
- وضع (2)مل من العالق الخلوي المحضر أعلاه على السطوح السته بعد ان تم تعقيمهاووضعها داخل انابيب اختبار زجاجية معقمة تحوي على وسط Ap1 السائل لغرض توفير ظروف لاهوائية,وهي (البلاستيك (Plastic), (Stainless steel), البورسلين (Porcelain),السيراميك (ceramica), الزجاج (Glass),الجلد (Skin) ,ثم حضن بثلاث درجات حرارية وهي : درجة حرارة الثلاجة (4) م ، ودرجة حرارة الغرفة (25) م ، ودرجة حرارة الحضن (37) م, مع مراعاة عمل ثلاث مكررات لكل درجة حرارية , حضن الاول لمدة3ايام, وحضن الثاني لمدة اربعة ايام , وحضن الثالث لمدة خمسة ايام .

- غسلت الانابيب والقطع ثلاث مرات بعد مدة الحضن باستخدام (15)مل من محلول (PBS pH = 7.5), وذلك بتحريك الطبق أو القطعة بلطف لمدة دقيقة واحدة .
- تركت الانابيب والقطع لتجف, ثم صبغت بصبغة Crystal violet لمدة دقيقة واحدة ، بعدها غسلت بالماء المقطر لملاحظة وجود الغشاء الحيوي .

- وبعد جفاف الانابيب فحص بالمجهر الضوئي باستخدام العدسة الزيتية لملاحظة الخلايا البكتيرية الملتصقة (بالنسبة للزجاج).

- عملت مسحة من الأنابيب, وزرعت على وسطAp1 الصلب لمدة (72) ساعة بدرجة حرارة (37) م ، لملاحظة التصاق الخلايا البكتيرية الملتصقة . (بالنسبة لبقية الاسطح) .

3-2-9-7اختبار بقاء البكتريا على السطوح المختلفة .

- حضّر عالق بكتيري بكثافة مشابهة لكثافة أنبوبة مكفرلاند رقم (2) التي تقارب (6×10^8 خلية/ مللتر) ، وذلك بأخذ كمية من مزروع بكتيري من وسط ApI الصلب لمدة (72) ساعة بدرجة حرارة (37) م.
- وضع (2) مل من العالق الخلوي المحضر أعلاه على الاسطح الستة(بعد ان تم تعقيمهاووضعها داخل انابيب اختبار زجاجية معقمة تحوي على وسط Ap1 السائل لغرض توفير ظروف لاهوائية,وهي (البلاستيك (Plastic), (Stainless steel), البورسلين (Porcelain),السيراميك (ceramica), الزجاج (Glass),الجلد (Skin ثم حضن بثلاث درجات حرارية وهي : درجة حرارة الثلاجة (4) م ، درجة حرارة الغرفة (25) م ، ودرجة حرارة الحضن (37) م لمدة(72) ساعة .
- سحب العالق الخلوي بوساطة الماصة, ووضع في أنابيب اختبار زجاجية لمقارنتها مع محلول مكفرلاند .

10-2-3 فحص الحساسية للمضادات الحيوية Antibiotic suscepitibility test

أستخدمت طريقة Bauer & Kerby القياسية لاختبار حساسية البكتريا للمضادات الحيوية (Vandepitte وآخرون1 199) وكالاتي :

- نقل 0.1 مل من العالق البكتيري النامي في وسط Ap1 لمدة (72) ساعة ونشر في اسفل الطبق ثم صب وسط اكار مولر هنتون ليغمر العينة،مع مراعاة توفير ظروف لاهوائية باستخدام الغازات السابقة الذكر للوسط ترك الطبق لمدة 5 دقائق بدرجة حرارة الغرفة لحين جفاف المزروع .
- نقلت أقراص المضادات الحيوية الى سطح الوسط الزرعي بوساطة ملقط معقم بمعدل 5 أقراص لكل طبق .

حضنت الاطباق بدرجة 37 م° لمدة 18-24 ساعة قيست بعدها أقطار مناطق التثبيط حول كل قرص،عدت البكتيريا حساسة (S) او مقاومة (R).

4.النتائج والمناقشة

4-1 عزل بعض أنواع البكتريا المختزلة للكبريت وتشخيصها

Isolation and Identification of Some (SRB) .

4-1-1 العزل Isolation

تم الحصول على (40) عزلة من أنواع البكتريا المختزلة للكبريت من مجموع (180) عينة أظهرت نمواً موجباً للزرع البكتيري من الأسنان المتسوسة ومسحات الجيوب اللثوية للإناث والذكور للبالغين والأطفال وتضمنت 200عينة من الأسنان المتسوسة ,100 عينة من مسحات الجيوب اللثوية باستخدام Disposable Cotton Swabs و(paper points حجم 30) إذ قسمت العينات بواقع 75عينة للأسنان المتسوسة و 75 عينة للمسحات اللثوية معزولة من الأطفال الذين تتراوح أعمارهم (5- 15) سنة و(125)عينة للأسنان المتسوسة و(25) عينة للمسحات اللثوية معزولة من الأشخاص التي تتراوح أعمارهم (20-60) سنة من الذكور والإناث وتوزعت العزلات وفق ماذكر في الجدول(4-1). بلغ العدد الإجمالي للعينات 300 عينة، أظهرت 120 عينة (40%) نموا سالبا للزرع البكتيري و180عينة (60%) نمواً موجباً للزرع البكتيري.جمعت من مراجعي المجمع الطبي التخصصي للأسنان في بعقوبة الجديدة وعيادات طب الأسنان ومن المدارس ومن بعض المتبرعين للفترة بين18/ 10 / 2013 ولغاية 1 /2 / 2014 .

جدول (4-1) النسبة المئوية للعزلات الموجبة التابعة للبكتريا المختزلة للكبريت من الأسنان المتسوسة ومسحات الجيوب اللثوية للإناث والذكور للبالغين والأطفال.

مصدر العزل	عدد العزلات الكلية	العزلات الموجبة والتابعة لSRB	النسبة المئوية %
اسنان متسوسة من الاطفال- ذكور	25	3	12%
اسنان متسوسة من الاطفال- الإناث	37	5	13.5%
اسنان متسوسة من البالغين- ذكور	62	4	6.4%
اسنان متسوسة من البالغين- الإناث	90	14	15.5%
مسحة لثوية من الاطفال - ذكور	18	2	11.11%
مسحة لثوية من الاطفال- الإناث	23	3	13.0%
مسحة لثوية من البالغين- ذكور	20	3	15%
مسحة لثوية من البالغين- الإناث	25	6	24%
المجموع الكلي	300	40	13.33%

4-1-2 التشخيص Identification:

تم تشخيص البكتريا المختزلة للكبريت لأول مرة في العراق (مدينة بعقوبة) من فم الإنسان وتحديدا في الأسنان المتسوسة والجيوب اللثوية اذ اتبعت طريقة العزل والتنقية تحت الظروف اللاهوائية باستخدام غازي النتروجين وثنائي اوكسيد الكاربون بنسبة 80:20 % وباستخدام وسط API الصلب مع إضافة العوامل المختزلة للأوكسجين إذ ظهرت مستعمرات سوداء دلالة على نمو تلك البكتريا بعد 1-3 أيام من الحضن المستمر تحت درجة حرارة 37 م°. ظهرت المستعمرات بشكل دائري منتظم الحواف ويزداد حجمها مع زيادة فترة الحضن إذ يتحول الوسط الزرعي الذي تنمو علية إلى اللون الأسود بصورة كاملة بعد 3-5 أيام من الحضن, إن احتواء الوسط الزرعي على الحديد الذي يتحد مع الكبريت الناتج من اختزال الكبريتات يؤدي إلى تكوين كبريتيد الحديدوز الأسود الذي يعد مؤشرا لنمو مختزلات الكبريت (Fabianoوآخرون 2013).

إن استخدام وسط API في عزل البكتريا المختزلة للكبريت وتنقيتها المحتوي على اللاكتيت يعد مصدراً للطاقة لنمو ما يقارب 80 % من تلك البكتريا,بالاضافةالى احتواء الوسط على مصادر الكبريتات الضرورية لنمو البكتريا مثل كبريتات الحديديك الامونياتية, وكبريتات المغنسيوم (Mahmoad وآخرون 2008).

كما يحتوي الوسط على العوامل المختزلة للأوكسجين, واستخدام محلول بيكاربونات الصوديوم كمصدر لغاز ثنائي اوكسيد الكاربون فضلا عن تزويد الوسط بالكبريت من العوامل المختزلة مما جعل خصائص الوسط انتقائية لعزل البكتريا المختزلة للكبريت فضلا عن تقليل فترة الحضن (الفترة الزمنية اللازمة للنمو) إذ إن هذه البكتريا تحتاج في أثناء نموها إلى ظروف اختزالية وجهد اختزالي يصل إلى (100-) ملي فولت (التميمي , 2001).
تم تشخيص ثلاثة أجناس من البكتريا المختزلة للكبريت

Desulfovibrio vulgaris , *Desulfovibrio desulfricans*

Desulfotomaculum ramini s, *Desulfomicrobium*

اعتمادا على ما ذكره (Postgate وCampbell ,1965)(Vianna وآخرون 2008) (Jimenez وآخرون 2000)(Pe¨rez وآخرون2001).

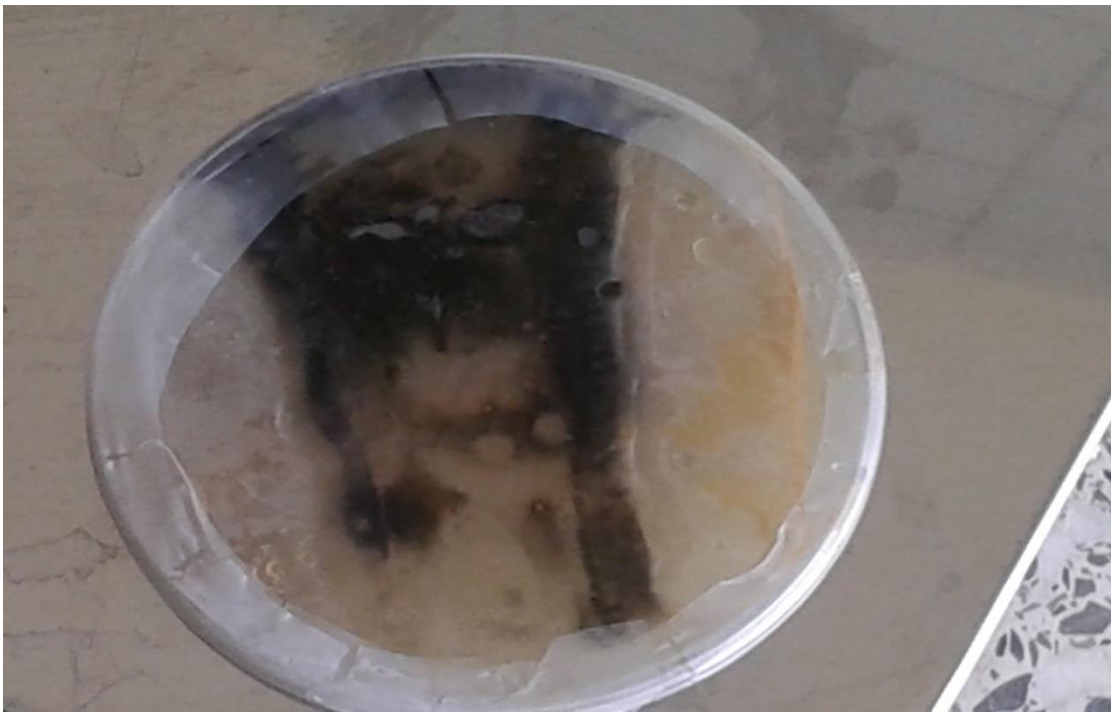
اعتمد التشخيص على قابلية البكتريا على استهلاك المصادر الكاربونية المختلفة , وكذلك أكسدة المادة العضوية وعلى درجة الحرارة المثلى للنمو فضلا عن الصفات المجهرية والحركة والتصبيغ بصبغة كرام إذ ظهرت ثلاثة انواع سالبة لصبغة كرام وهي:

Desulfovibrio desulfricans , *Desulfovibrio vulgaris* , *Desulfomicrobium* ونوع واحد موجب لصبغة كرام وهو *Desulfotomaculum raminis* ويوضح الجدول (2-4) الصفات التشخيصية للعزلات .

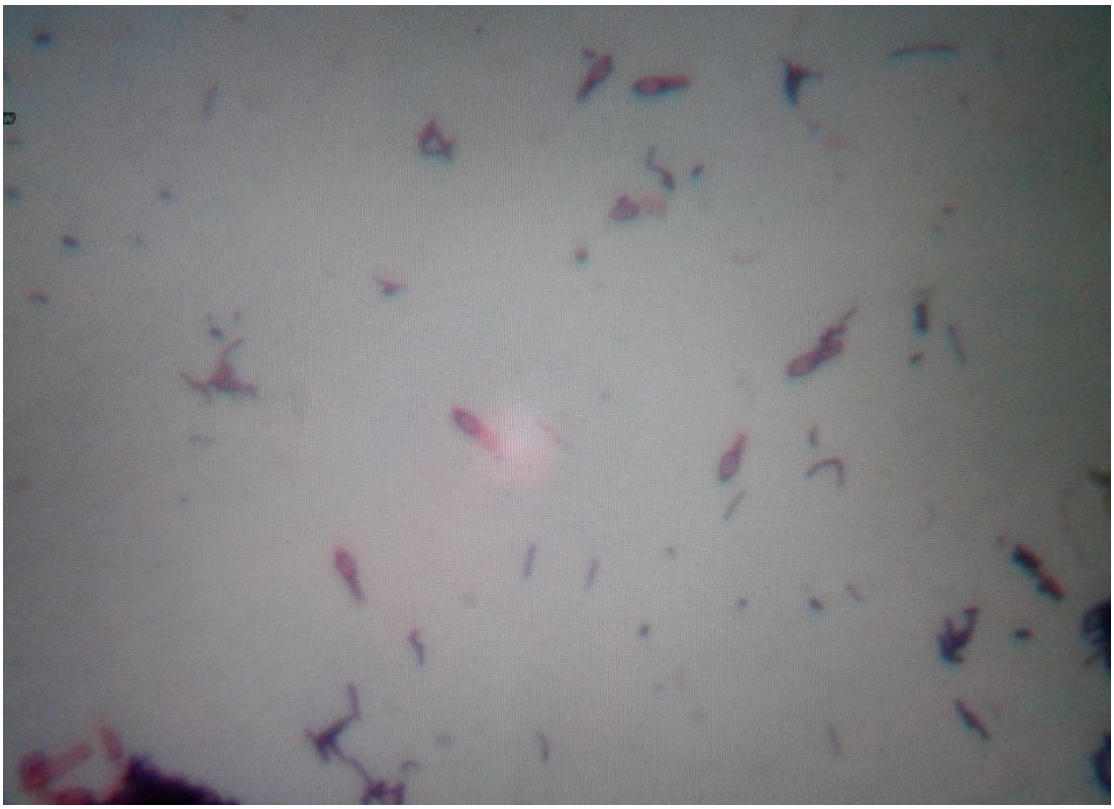
جدول(4-2)الصفات التشخيصية للبكتريا المختزلة للكبريت

الصفات	*Desulfovibrio*		*Desulfotomaculum raminis*	*Desulfomicrobium*
	D.vulgaris	*D.desulfuricans*		
شكل الخلية وأبعادها	عصيات منحنية	عصيات منحنية	عصوية نهايتها مستديرة	عصوية
السبورات	غير مكونة	غير مكونة	مكونة وموقعها نهائي	غير مكونة
الحركة	متحركة	متحركة	متحركة	متحركة –غير متحركة
أكسدة المادة العضوية أكسدة تامة إلى CO_2	تامة	غير تامة	تامة	غير تامة
أيض المصادر الكاربونية				
لاكتات الصوديوم	+	+	+	+
خلات الصوديوم	+	+	+	+
بروبونات الصوديوم	–	+	لم يجري الاختبار	لم يجري الاختبار
بيوتارات الصوديوم	–	+	لم يجري الاختبار	لم يجري الاختبار
بنزوات الصوديوم	–	–	+	–
اوكزالات الصوديوم	+	+	–	–
حامض الاديبك	–	–	–	
درجة الحرارة المثلى للنمو	25–40م°	25–40م°	37–48 م°	25–39 م°

شكل (4-1) مراحل نمو المزارع النقية للـ (SRB) بعمر3-5 أيام



شكل (4-2) نمو المزارع النقية ل(SRB) في الاطباق على وسط API الصلب تحت ظروف لاهوائية وبعمر27ساعة.



شكل (4-3)صبغة غرام مع السبورات لـــــ *Desulfotomaculum raminis* .

4-1-3 توزيع العزلات بحسب مصدر العزل :

Distribution of isolates according to source of isolation

تضمنت العزلات الموجبة التابعة البكتريا المختزلة للكبريت والمعزولة من أسنان متسوسة ومن الجيوب اللثوية من البالغين والأطفال 40عزلة موزعة على أنواع البكتريا المختزلة للكبريت ونسبها وكما موضح بالجدول (4-3).

بينت النتائج كثرة تواجد(SRB) في الإناث اكثر من الذكور بالنسبة للبالغين, اما بالنسبة للأطفال بينت النتائج ان تواجد SRB يكون بنسب متساوية تقريبا(Fabiano وآخرون 2013).

إما بالنسبة لعزلها من الأسنان المتسوسة والجيوب اللثوية فقد أوضحت النتائج ان تواجدها في الجيوب اللثوية أكثر من الأسنان المتسوسة بسبب حاجتها الى ظروف لاهوائية إضافة الى ان السائل اللثوي يحتوي على الكلايكوامينوكلايكان وأحماض الكبريت الامينية التي تكون مصدرالكبريتيد ل(SRB) (Boopathyوآخرون2002).

اذ ان البكتريا المختزلة للكبريت لها القدرة على التكيف مع البيئات القاسية مثل pH وتغيرات تركيز الاوكسجين(Ehrlich HL Newman, 2009).

الجدول (4-3) يوضح توزيع العزلات بحسب مصدر العزل ونسبها:

مصدر العزل	العزلات الموجبة والتابعة لSRB	النسبة المئوية %	*D.vulgaris* العزلات الموجبة ونسبها	*D.desulfuricans* العزلات الموجبة ونسبها	*Desulfotomaculum raminis* العزلات الموجبة ونسبها	*Desulfomicrobium* العزلات الموجبة ونسبها
اسنان متسوسة من الاطفال- ذكور	3	%12	1 (33.3%)	0	2 (%66.6)	0
اسنان متسوسة من الاطفال- الإناث	5	%13.5	1 (20%)	1(%20)	3 (%60)	0
اسنان متسوسة من *البالغين*- ذكور	4	%6.4	0	2 (%50)	2 (%50)	0
اسنان متسوسة من *البالغين*- *الإناث*	14	%15.5	2 (%14.2)	3 (%21.4)	5 (%35.7)	4 (%28.5)
مسحة لثوية من الاطفال - ذكور	2	%5.5	0	2 (%100)	0	0
مسحة لثوية من الاطفال- الإناث	3	%13.0	0	1(%33.3)	2 (%66.6)	0
مسحة لثوية من البالغين- ذكور	3	%15	0	1(%33.3)	2 (% 66.6)	0
مسحة لثوية من البالغين– الإناث	6	%24	1(%16.66)	2(%33.3)	1 (%16.66)	2 (%33.3)

إن قابلية البكتريا على إحداث الخمج يعود لامتلاكها عدداً من عوامل الضراوة ، بعضها يلعب دوراً مباشراً والبعض الاخر له دور غير مباشر فإذا ما اجتمعت هذه العوامل فإنها ستكون المسؤولة عن إحداث الضرر في جسم المضيف ، أخضعت جميع العزلات البالغة(40) عزلة لدراسة هذه العوامل وقد كانت النتائج كما يأتي :

4-2إنتاج الهيمولايسين Haemolysin Production

أظهرت النتائج الموضحة في جدول (4-4) أعداد ونسب العزلات المنتجة للهيمولايسين. وقد يعزى سبب عدم إلافراز التام للهيمولايسين لبعض العزلات إنها تمتلك أنظمة خاصة لسحب الحديد وتمثيله في الأنسجة ويسمى هذا النظام Aerobactin إذ يعد إنتاج الهيمولايسين المسار البديل عند غياب جينات الـ Aerobactin) (Opalوآخرون1990) .او أن فعالية الهيمولايسين يحمكهااوبيرون يتكون من 4 جينات تشترك هذه الجينات معا في التعبير عن إنتاج الهيمولايسين، وقد يوجد بينها جين واحد غير فاعل في التعبير عن هذا الإنتاج مما يؤدي بالتالي الى عدم قدرة البكتريا على إنتاج الهيمولايسين, يعد توافره عاملاً مهما لتزويد البكتريا بالحديد فضلا عن قابليته في الحث على افراز الهستامين, وكذلك له القدرة على تدمير الخلايا لا سيما كريات الدم البيضاء (الزعاك,1994). ويعدالهيمولايسين من عوامل الضراوة المهمة لمجموعة واسعة من البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام ويساهم في حدوث الأمراضية.

جدول (4-4) أعداد العزلات المنتجة للهيمولايسين ونسبها

نوع العزلات	عدد العزلات	عدد العزلات الموجبة المنتجة للهيمولايسين	النسبة المئويةللعزلات المنتجة للهيمولايسين
D.vulgaris	5	3	60%
D.desulfuricans	12	10	83.33%
Desulfotomaculum raminis	17	14	82.35%
Desulfomicrobium	6	4	66.7%
المجموع	40	31	77.5%

4-3المحفظة (Capsule) :

ظهرت جميع العزلات بشكل خلايا محاطة بهالة، وبين الفحص المختبري أن جميع العزلات تحتوي على المحفظة وكما موضح بالشكل(4-7).تكون المحفظة عبارة عن تركيب هلامي ذي وزن جزيئي عال توجد حول السطح الخارجي لجدار بعض الخلايا البكترية تتكون مباشرة عند نمو البكتريا في انسجة المضيف وتفقدها الخلية البكترية اذا نقلت خارج الجسم(المرجاني وآخرون ,2012), وتعد المحفظة الخط الدفاعي الاول للبكتريا اذ تتكون من حامض الهياليورنيك Hyaluronic acid وتمنح المحفظة حماية للخلية البكترية من عملية البلعمة Phagocytosis ومن الظروف غير الملائمة وتساعد الخلايا البكترية على الاختراق و الالتصاق بالسطوح الملامسة لها Adherence and invasion (Wessels,2006).

4-4 إنتاج البكتريوسين Bacteriocin production :

أظهرت العزلات قيد الدراسة نتائج متباينه لقدرتها على إنتاج البكتريوسين وبواقع 3عزلة *Desulfovibrio vulgaris*(%60) و7 عزلة *Desulfovibrio desulfuricans*(%58.3) و 10 عزلة *Desulfotomaculum raminis* (%58.82) و 4عزلة(%66.7) . *Desulfomicrobium*

إن البكتريوسينات مواد بروتينية تنتجها بعض أنواع البكتريا ذات وزن جزيئي عالٍ لها القابلية على قتل أو تثبيط الأجناس والأنواع القريبة منها (Pils و 1995,Braun) أحيانا تمتلك هذه البكتريوسينات فعالية واسعة الطيف ضد الأنواع المختلفة من البكتريا الموجبة أوالسالبة لملون غرام (Sarikaوآخرون2010) . تختلف تسمية البكتريوسين تبعاً للبكتريا المنتجة لها (Hammami وآخرون 2010).

جدول(4- 5) قابليةعزلات البكترياعلى إنتاج البكتريوسين .

نوع العزلة	قطرالتثبيط /(ملم)2	نوع العزلة	قطرالتثبيط / (ملم)2
A 11	(15)ملم	C 23	(16)ملم
A 22	(12)ملم	C 26	(11)ملم
A 25	-	C 8	-
A 17	(11)ملم	C 27	(14)ملم
A 3	-	C 9	_
النسبة المئوية	%60	C 5	(10)ملم
B 16	(8)ملم	C 12	_
B 28	-	C 22	(18)ملم
B 32	-	C 15	-
B 36	(12)ملم	C 25	(8)ملم
B 2	-	C 39	(8)ملم
B 4	(6)ملم	C 7	(6)ملم
B 30	(14)ملم	C 14	-
B10	-	النسبة المئوية	%58.82
B19	(20)ملم	D 33	(20)ملم
B 6	(18)ملم	D 17	(22)ملم
B 40	_	D 3	-
B29	(15)ملم	D 11	(15)ملم
النسبة المئوية	%58.3	D 37	-
C 35	_	D 34	(14)ملم
C 1	(6)ملم	النسبة المئوية	% 66.7
C 31	(12)ملم		
C 24	-		

(A) Desulfovibrio vulgaris, (B) D.desulfuricans

(C) *Desulfotomaculum ramini s* *,(D) Desulfomicrobium*

4-5اختبار تكوين الجليدات :

تم اختبار تكوين الجليدات ل(40) عزلة من البكتريا المختزلة للكبريت وقد بينت النتائج ان العزلات جميعها مكونة لهذا الغشاء الرقيق بعد مرور (72) ساعة من تنميتها في وسط AP I , واستخدمت بكتريا *Shigella flexneri* كسيطرة سالبة لعدم قابليتها على تكوين الجليدات (Snellingوآخرون 1996).

يساعد هذا الالتصاق بعض الأنواع على احتلال مساحات واكتساب فائدة في المنافسة مع الأنواع الأخرى حيث يحمي الخلايا البكترية من تاثير ازالتها بثائير اللعاب والمواد المخاطية (Kreth وآخرون2005) .

تتسبب (SRB) في تسوس الأسنان إضافة الى تشكيلها للغشاء الحيوي في اللهاة والاغشية المخاطية والسطح الظهري للسان(Fabianoوآخرون 2013). أذ يمثل تسوس الأسنان التدمير التدريجي لتركيب الأسنان بسبب تشكيل الأحماض البكترية(Caselitz وآخرون 1998).

4-6 اختبار قابلية البكتريا المختزلة للكبريت على تأكل المعادن (Stainless steel).

أظهرت النتائج أن سرعة التآكل في الطريقة الوزنية تتناسب طردياً مع الفترة الزمنية للتعرض إذ أحدثت المزارع الخلطية أعلى فقدان بالوزن مقداره1.1488 غم خلال 84 يوماً بالمقارنة مع المزارع النقية التي أحدثت فقدان مقداره0.1220 غم, وجاء هذا بالمقارنة مع عينات السيطرة الذي بلغ فقدان مقداره0.0520 غم, إن سرعة التآكل تزداد مع زيادة الزمن , كما اختبرت قابلية البكتريا على إحداث التآكل في الأسنان من خلال استخدام عينات الأسنان المعقمة بالكلور (القاصر) وزرعت لمدة 84 يوماً ثم قيست نسبة الفقدان بالوزن لهذه العينات وقورنت بتآكل المعادن للعينات النقية فأظهرت الدراسة ان التآكل في عينات الأسنان أقل من المعادن وكانت نسبة الفقدان بالوزن لهذه العينات النقية 0.1010غم.

أن عينات المعادن الطبية تخضع لسلسة من التفاعلات البايلوجية غير العضوية عند غمرها في أوساط محتوية على البكتريا المختزلة للكبريت مؤدية إلى تكوين تأكل حيوي (Linو 2012Ballim)في عملية التآكل يحدث نوعان من التفاعل اولهما تفاعل الأنود وفيه ينتقل المعدن الى الماء نتيجة الأكسدة الحاصلة في المعدن فيما لو غمس المعدن في محلول مائي يستمر التفاعل الى ان تصبح حالة توازن, وثانيها : تفاعل الكاثود , وفيه تتجه الألكترونات خلال هذا التفاعل الى الكاثود وتنتهي بصورة مختلفة , في المحاليل المتعادلة تفقد هذه الالكترونات بطريقتين رئيسيتين تبعا لتوفر الأوكسجين فبوجوده يتكون الهيدروكسيد وبعدمه يتكون الهيدروجين, تتفاعل الهيدروكسيدات الناتجة من كلتا الحالتين مع ايونات المعدن المتحررة من الأنود أما الهيدروجين الناتج على الكاثود في المحاليل المتعادلة وفي ظروف عدم توفر الأوكسجين فانه يمتز على الكاثود ويؤدي الى تجمع هيدروجين والى استقطاب الكاثود وتوقف انتقال الألكترونات ونتيجة لذلك يتوقف التأكل, أما في المحاليل الحامضية عندما يكون تركيز أيونات الهيدروجين عالياً فان التفاعل ادناه هو السائد في حالة توفر الأوكسجن أو بعدمه$2H^{+}+4e \longrightarrow 2H$ (Chongdar وآخرون2005).

يعود سبب التناقص في معدل تلك التفاعلات إلى نفاذ المادة الغذائية والى الغشاء الحيوي إذ إن الغشاء الحيوي الفتي يكون أكثر تأثيراً في إحداث التآكل من الغشاء الحيوي الناضج, إضافة إلى منتجات التآكل تعد جزءاً من الغشاء الحيوي, والذي يشكل مع منتجات التآكل طبقة حماية مما يؤدي إلى تباطؤ عملية انتقال أللالكترونات (Dong وآخرون 2011).

أما حصول التآكل في عينات السيطرة يعود إلى التآكل الكيميائي.(نعمة وآخرون 2010)أما التآكل في المزارع المختلطة فيكون أكثر فعالية في إحداث التآكل من المزارع النقية, والسبب في ذلك يعود إلى وجود أكثر من نوع من البكتريا المختزلة للكبريت في المزرعة الخلطية, وأن فعالية كل نوع مختلفة في إزالة ألاستقطاب اعتماداً على فعالية أنزيم الهيدروجنيز(Beech وSunner,2004).

إن المواد الأساسية المستخدمة من قبل البكتريا المختزلة للكبريت والمنتجات الناتجة عن الفعاليات ألأيضية تدخل في آليات حدوث التآكل الحيوي, وان الزيادة في نسبة التآكل تعود إلى تعرض المعدن للكبريتيد الذي يؤدي الى تكون غشاء الكبريتيد على سطح المعدن, مما يعيق تكون جزيئات

الهيدروجين على سطحه, يؤثر على عملية التآكل عوامل عديدة : عوامل داخلية, ومنها الطبيعة الكيميائية للمعدن وتركيبته,التغيرات الحاصلة في المعدن .عوامل خارجية, ومنها طبيعة الوسط ومكوناته الكيميائية, وجود مواد في المحلول تسرع أو تثبط من عملية التآكل, إضافة الى عوامل أقل أهمية, ومنها حركة المحلول, درجة الحرارة, الضغط, والضوء (Gerard وآخرون2008) .

7-4 إختبار حساسية البكتريا لمضادات الحياة بطريقة الأقراص Bauer–Kirby

اختبرت حساسية العزلات قيد الدراسة لـ 5 مضادات توزعت ما بين مضادات مجموعة البيتالاكتام للبنسلينات واسعة الطيف التي شملت Ampicillin و Amoxicillin ومن مجموعة الامينوكلايكوسيدية Streptomycin ومن مجموعة مضادات الكلاندومايسين (Lincomsides) Clindamycin ومن مجموعةMacrolides مضاد Azithromycin, واعتمد على قياس قطر منطقة التثبيط , لقد أظهرت النتائج تباين واضح في مدى أستجابة العزلات قيد الدراسة للمضادات المستعملة جدول (4–6) . ان جميع عزلات بكتريا *D.vulgaris*و *D.desulfricans* و *D. ramini s* اظهرت مقاومة لمضادAmpicillin وبنسبة(100%),(100%) (85.71**%**) على التوالي عند الاطفال. ويعود سبب المقاومة لان البكتريا التي تدخل الخلايا الطلائية تشكل خزين بكتيري لاعادة الاصابة لأنها في مأمن من اليات دفاع العائل ومن تأثير البنسلين لعدم قدرته على اختراق الخلايا(Neeman) وآخرون (1998). اما بالنسبة لمضاد Amoxicillin فقد تباينت نسبة المقاومة لجميع عزلات بكتريا *D. vulgaris* و *D.desulfricans* و *D. ramini s* (50%) ,(25%),(85.71%)على التوالي. اما بالنسبة لمضادات المجموعة الامينوكلايكوسيدية Streptomycin فقداظهرت العزلات مقاومة بنسبة(100%),(75%)(42.85)على التوالي. ومن مجموعة مضادات الكلاندومايسين Clindamycin مضاد Lincomsides فقداظهرت العزلات مقاومة بنسبة(50%),(50%) (100%) على التوالي.ومن مجموعة Macrolides مضادAzithromycin فقد اظهرت العزلات مقاومة متباينة وضئيلة للمضاد وبنسبة (50%)(25%)(28.57%) على التوالي.اذ اوضحت الدراسة الحالية لجميع عزلات الأطفال بأنها أبدت أعلى مقاومة لمضاد

Ampicillin واقل مقاومة لمضاد Azithromycin , وقد يعزى ذلك الى ان البكتيريا السالبة لملون غرام يحتوي غشاءها الخارجي على قنوات بروتينية تدعى البورين التي تعمل على منع دخول المضادات الى داخل الخلية البكتيرية ((Spanuوآخرون2002) .

اما بالنسبة للبالغين فان جميع عزلات بكتريا *D.vulgaris* و *D.desulfricans*

D. raminis و *Desulfomicrobium* اظهرت مقاومة لمضادAmpicillin وبنسبة (66.7%),(87.5%),(90%),(100%)على التوالي . اما بالنسبة لمضاد Amoxicillin فقد تباينت نسبة المقاومة لجميع عزلات بكتريا(33.3%),(25 %),(90%),(33.3%)على التوالي. التوالي. اما بالنسبة لمضادات المجموعة الامينوكلايكوسيديةStreptomycin فقداظهرت العزلات مقاومة وبنسبة (66.7%),(87.5%),(20%),(83.3%)على التوالي . ومن مجموعة مضادات الكلاندومايسين Clindamycin مضاد Lincomsides فقداظهرت العزلات مقاومة بنسبة(33.3%),(25%),(80%),(33.3%)على التوالي . ومن مجموعة Macrolides مضاد Azithromycin فقد اظهرت العزلات مقاومة بنسبة(33.3%),(12.5%),(20%),(16.66%) على التوالي. اذ اوضحت الدراسة الحالية لجميع عزلات البالغين بأنها أبدت أعلى مقاومة لمضاد Ampicillin واقل مقاومة لمضاد Azithromycinو Clindamycin . يتصف مضاد Clindamycin بتأثير اطول ولا يتاثر بكثافة البكتريا ولا بمرحلة نموها وله القدرة على تثبيط انتاج السموم ، وتثبيط انتاج البكتريا لمتعدد السكريد الدهني الذي يمتلك القدرة الجيدة على الاختراق(Stevens و Kaplan,2000). ان النسبة العالية لمقاومة مضادات البنسلينات تعود لأحدى هذه الآليات وهي فشل المضاد في الاختراق والوصول الى موقع الهدف (penicillin binding protein PBPs). المستهدفة , او خفض ألفة ارتباط المضاد بالـ(PBPs) (Mandellوآخرون 1995) .

كانت نسبة العزلات الحساسة 100% نستنتج من ذلك وجود مقاومة متزايدة للمضادات الشائعة الاستخدام في العلاج ولذا يجب أجراء فحص الحساسية للمضادات الحياتية قبل وصف اي دواء لضمان العلاج المناسب وعدم تطور المقاومة للبكتريا والتي تعزى الى انتقال الجينات المسؤولة عن ظهور صفة المقاومة لتلك المضادات والمتواجدة اما على بلازميد او كروموسوم

البكتريا المقاومة وانتقالها الى الحساسة وبالتالي تحولها الى بكتريا مقاومة للمضادات الحياتية المذكورة (Cornaglia وآخرون 1996).

الجدول (4-6) النسب المئوية لحساسية العزلات قيد الدراسة للمضادات الحيوية المختلفة.

Desulfomicrobium		*D. ramini s*		*D.desulfricans*		*D. vulgaris*		للاطفال عدد العزلات 13
R	S	R	S	R	S	R	S	المضادات
		85.71 %	%14.28.	%100	0	%100	0	**Ampicillin**
		85.71 %	%14.28	%25	75 %	%50	%50	**Amoxicillin**
		42.85 %	%57.14	%75	25 %	%100	0	**Streptomycin**
		%100	0	%50	%50	%50	%50	**Clindamycin**
		28.57 %	%71.42	%25	75 %	%50	%50	**Azithromycin**
R	S	R	S	R	S	R	S	**للبالغين عدد العزلات 27**
%100	0	%90	%10	87.5%	12.5%	66.7 %	33.3 %	**Ampicillin**
%33.3	66.7 %	%90	%10	%25	75 %	33.3%	66.7 %	**Amoxicillin**
%83.3	16.66 %	%20	%80	%87.5	12.5%	66.7 %	33.3 %	**Streptomycin**
%33.3	66.7 %	%80	%20	%25	75 %	33.3%	66.7 %	**Clindamycin**
16.66%	83.3 %	%20	% 80	%12.5	87.5 %	33.3%	66.7 %	**Azithromycin**

الجدول (4-7)النسبة المئوية لمقاومة العزلات قيد الدراسةعندالاطفال والبالغين للمضادات الحيوية المختلفة.

المضادات	عدد العزلات المقاومةعند الاطفال	النسبة المئوية لمقاومةالعزلات	عدد العزلات المقاومةعند البالغين	النسبة المئوية لمقاومةالعزلات
Ampicillin	12	%92.30	24	%88.88
Amoxicillin	8	%61.58	14	%51.85
Streptomycin	8	%61.58	16	%59.25
Clindamycin	10	%76.92	13	%48.14
Azithromycin	4	%30.76	5	%18.51

4-8 اختبار إنتاج الغشاء الحيوي (Biofilm production):

تم التحري عن انتاج المادة المخاطية بطريقتين وهي استخدام وسط احمر الكونغو(CRA) وطريقة التصاق بالانابيب كما موضح في الشكل (4-7) واظهرت النتائج بان طريقة احمر الكونغو هي افضل الطرائق في الكشف عن الغشاء الحيوي. كان عدد العزلات الموجبة بطريقة احمر الكونغو 36 عزلة بنسبة(90%) ومن ثم طريقة الالتصاق بالانابيب كانت عدد العزلات الموجبة 33عزلة وبنسبة (82.5%) وجاءت هذه الدراسة لتبين بان طريقة احمر الكونغو اكثر حساسية في التحري عن انتاج المادة المخاطية وسهولة في الكشف عن تكوين الغشاء الحيوي وان الكشف عن إنتاج المادة المخاطية يعتمد على عوامل عديدة مثل طريقة التحري المستخدمة، نوع الوسط المستخدم وظروف التحضين , إذ ظهرت جميع المستعمرات سوداء اللون مع كثافة بلورية جافة وهذه هي النتيجة الموجبة بطريقة احمر الكونغو , توصلت الدراسة الى ان معظم عزلات البكتريا المختزلة للكبريت كانت قادرة على تكوين الغشاء الحيوي .ويعد تكوين الغشاء الحيوي من قبل البكتريا المختزلة للكبريت حماية لها من الظروف البيئية المحيطة بها ,مما يساعد على بقائها والتسبب بأمراض لثوية التي تؤدي الى

خسارة الأسنان اذا لم تعالج اذ تساهم الأمراض اللثوية في تشكيل عوامل الضراوة والى تطوير الأمراض الجهازية مثل التهاب الشغاف وزيادة ضربات القلب(Vianna وآخرون2008) , وفي هذه الحالة التجويف الفموي يمكن ان يكون خزان ل البكتريا المختزلة للكبريت ويمكن ان تصيب المنطقة المعوية مسببة التهابات واضطرابات معوية(Lamontو Demuth 2006) ان تكوين الغشاء الحيوي هو نتيجة تجمع كثيف للمايكروبات على الجانب اوالقعر للأسنان والجيوب اللثوية مهيئة لها بيئة لاهوائية.

جدول (4- 8)قابلية العزلات على انتاج الغشاء الحيوي والنسب المئوية لكل نوع بكتيري

نوع العزلة / رقم العزلة	انتاج الغشاءالحيوي بطريقة Congo_red	انتاج الغشاء الحيوي بطريقة Tube methode
A 11	+	+
A 22	+	-
A 25	-	-
A 17	+	+
A 3	+	+
النسبة المئوية	% 80	% 60
B 16	+	+
B 28	+	+
B 32	+	+
B 36	+	+
B 2	+	+
B 4	+	+
B 30	+	+
B10	-	-
B19	+	+
B 6	+	-
B 40	+	+
B29	+	+
النسبة المئوية	% 91.7	83.33%
C 35	+	+
C 1	_	+
C 31	+	+
C 24	+	+

+	+	C 23
+	+	C 26
+	+	C 8
-	+	C 27
+	+	C 9
-	+	C 5
+	+	C 12
+	+	C 22
+	+	C 15
+	+	C 25
+	+	C 39
+	+	C 7
+	+	C 14
% 88.2	% 94.11	النسبة المئوية
+	+	D 33
+	+	D 17
+	-	D 3
+	+	D 11
+	+	D 37
-	+	D 34
% 83.33	% 83.33	النسبة المئوية

(A) Desulfovibrio vulgaris, (B) D.desulfuricans

(C) *Desulfotomaculum ramini s* *,(D) Desulfomicrobium*

4-9 اختبارقدرة بكتريا *Desulfotomaculum raminis* على الالتصاق على السطوح المختلفة:

تم اختيار الوسط الزرعي المناسب كخطوة أولى ومهمة في تهيئة البكتريا للبقاء والالتصاق ,اذ وجد ان استخدام وسط AP I مناسب جدا لاحتوائه على المواد الاغنائية التي تشجع نمو البكتريا , والقيام بكل الفعاليات الحيوية , وإنتاج عوامل الضراوة , والالتصاق بشكل طبيعي ,لذلك يعد وسطا ملائما لتنمية هذا النوع من البكتريا عند التحري عن بقائها على السطوح المختلفة , وكان لمدة الحضن (72) ساعة وبدرجة حرارة (37)م اثر في زيادة النمو . اما دورات النبذ المركزي المكررة فكان لها الدور الكبير في غسل بقايا الوسط الزرعي العالقة بالخلايا البكترية .

أوضحت نتائج التصاق البكتريا وتكوينها للغشاء الحيوي على السطوح الستة (البلاستك, البورسلين, (Stainlesssteel), السيراميك, ,الزجاج , ,الجلد الشكل (4-14).

يمكن الاستدلال من النتائج على ان البكتريا تستطيع الالتصاق على السطوح الملساء , ويمكنها البقاء , وربما النمو أكثر مما على السطوح غير الملساء , وبدرجات حرارة مختلفة بدءا من درجة حرارة الثلاجة (4) مكما موضح في الجدول (4-9) ودرجة حرارة الغرفة (25) م كما موضح في الجدول (4-10) ، ودرجة حرارة الحضن (37) م كما موضح في الجدول (4-11) حيث استخدمت فترات حضن مختلفة لمعرفة مدى بقاء البكتريا .

جدول (4-9) النمو بدرجة حرارة الثلاجة 4 م

مدة الحضن / سطح الالتصاق	3 أيام	4 أيام	5أيام
البلاستك	+ + +	+ + +	+ + +
Stainless steel	+ + +	+ + +	+ + +
البورسلين	–	–	–
الجلد	–	–	–
السيراميك	++	++	++
الزجاج	–	+	++

* +++نمو كثيف, ++ نموضعيف , - انعدام النمو.

بينت النتائج اعلاه ان البكتريا تستطيع الالتصاق والبقاء حية على البلاستك و Stainless steelحتى مدة 5أيام تحت درجة حرارة4 م اما على السيراميك فيظهر بشكل نمو ضعيف حتى مدة 5أيام مما يدل البكتريا لاتستطيع المحافظة على حيويتها على سطح السيراميك وليس لها القابلية على الالتصاق على سطحي البورسلين والجلد عند تحت درجة حرارة (4) م حسب نتائج هذه الدراسة .

اما على الزجاج فقد تمت قراءة النتيجة بواسطة عمل سلايدات ورؤيتة بالعدسة الزيتية ,وقد بينت النتائج قدرة بكتريا على البقاء حية والمحافظة على قدرتها على الالتصاق كما تبين صورة الحقل المجهري ,ان البكتريا المكونة للغشاء الحيوي يمكنها الالتصاق

على سطح الزجاج وان الالتصاق على الموادالبلاستيكية هو من نوع الكارة للماء Hydrophobic وعلى الزجاج من النوع المحب للماءHydrophilic (Davey و O'Toole,2000)

جدول (4-10) النمو بدرجة حرارة الغرفة 25 مْ

مدة الحضن / سطح الالتصاق	3 أيام	4 أيام	5أيام
البلاستك	+ + +	+ + +	+ + +
Stainless steel	+ + +	+ + +	+ +
البورسلين	++	++	++
الجلد	+++	+++	+++
السيراميك	+++	+++	+++
الزجاج	+++	+++	+++

+++نمو كثيف, ++ نمو ضعيف.

بينت النتائج ان بكتريا تظهر نمو جيدا ولها القدرة على المحافظة على حيويتها على سطح البلاستك, Stainless steel , السيراميك , الجلد بعد مدة حضن 3 ,4,5أيام تحت درجة حرارة 25 مْ .

كما تظهر النتائج ان هذه البكتريا لها القدرة على النمو والمحافظة على حيويتها سطح الفولاذ بعد مدة الحضن 3 ,4 ايام وبدرجة حرارة 25 مْ . اما بعد 5ايام فقد قلت مستعمرات البكتريا. واظهر سطح البورسلين نموا ضعيف بعد 3 ايام وبدرجة حرارة 25 مْ فقط .

اما على الزجاج فقد قرئت النتائج بواسطة العدسة الزيتية بالمجهر الضوئي ,واظهرت البكتريا. نموا جيدا بعد مدد الحضن الثلاث 3 ,4,5 أيام ,مما يدل على قدرة البكتريا على الالتصاق والمحافظة على حيويتها على الزجاج .

جدول (4-11) النمو بدرجة حرارة الحضن 37 مْ .

مدة الحضن / سطح الالتصاق	3 أيام	4 أيام	5أيام
البلاستك	+ + +	+ + +	+ +
Stainless steel	+ + +	+ + +	+ +
البورسلين	++	++	++
الجلد	+++	+++	+++
السيراميك	+++	+++	+++
الزجاج	+++	+++	++

+++نمو كثيف, ++ نموضعيف , + مستعمرات منفردة, – انعدام النمو.

اظهرت نتائج التجربة ان بكتريا تظهرا نموا والتصاقا جيدا على البلاستك و Stainless steel بعد 3 ,4 أيام تحت درجة حرارة 37 مْ.ثم يقل ليصبح نموا قليلا بعد 5أيام ,اما على السيراميك و الجلد فان البكتريا اظهرت نموا والتصاقا جيدا بعد5,4,3أيام تحت درجة حرارة 37 مْ,اما على البورسلين فقد نمت بكتريا نموا قليلا (مستعمرات صغيرة متقاربة بعد 5,4,3أيام تحت درجة حرارة 37 مْ,قرئت النتائج على الزجاج بوساطة المجهر الضوئي, و قد

أظهرت نموا كثيفا بعد 4,3 أيام تحت درجة حرارة 37 مْ.ثم يقل ويصبح منتظما بعد 5 أيام ليصبح خلايا متباعدة في الحقل المجهري .

تتمكن هذه البكتريا أن تبقى حية لمدة طويلة متحملة الظروف الجافة والبقاء حية على أسطح المعدات الطبية كمحاقن الهواء والماء وأنابيب توصيل الماء لها والمستلزمات الطبية الأخرى التي يستخدمها إثناء قلع الأسنان اوالعلاج كمحاقن التخدير, استعمار البكتريا لأيدي الكادر الطبي يساهمان في انتقال هذه البكتريا الى المرضى, وقد يكون من الصعب ايجاد مصدر الإصابة بسبب انتشار أفراد هذه البكتريا على أسطح متعددة إضافة إلى تواجدها في الترسبات المائية, مما سبب صعوبة السيطرة على انتقال الإصابة (Nihal وآخرون 2012).

هنالك أسطح فيزيائية مكونة من مواد تستطيع الاحتفاظ بكمية عالية من الرطوبة التي تسد حاجة البكتريا من الماء لغرض البقاء والمحافظة على الخلايا البكتيرية حية, بينما قد توجد على أسطح متكونة من مواد ذات طبيعة ماصة للرطوبة , وهذا انعكس على نتائج نمو البكتريا على الأسطح غير الحية المختلفة, الطبيعة الفيزيائية للمواد المكّونة للأسطح غير الحية تلعب دور كبير في بقاء و نمو البكتريا (Gohlوآخرون 2006).

يعود سبب مقاومة البكتريا للجفاف الى قدرتها على تكوين التجمعات البكتيرية المتراصة والغشاء الحيوي مع بعضها البعض أو مع غيرها من الأنواع البكتيرية, وان هذه التجمعات تقلل من امتصاص الأشعة فوق البنفسجية من قبل مكونات الخلايا البكتيرية لاسيما الأحماض النووية

(Thuy Do وآخرون 2013).

الخصائص السطحية للمواد تتبدل بسبب امتصاص المواد العضوية للسطح ويسمى ذلك بغشاء التكيف هذا الغشاء ألتكيفي فيما بعد يتسبب في التصاق البكتريا على السطح, ولذا تميل البكتريا للنمو في مساحات غزيرة بالمغذيات, لذلك في نقص المغذيات السائلة البكتريا سوف تميل إلى الالتصاق على السطوح الصلبة بسبب قدرتها على امتصاص المواد الصلبة من المغذيات ويحدث الالتصاق على السطوح الصلبة في الظروف القليلة التغذية وفي الظروف الذاتية التغذية, وفي الظروف القلية التغذية البكتريا تتجه لإنتاج (

EPS) التي تحفز تفاعلات كارهة للماء(Hydrophobic) وتزيد التصاق المغذيات بالسطوح (Sheng وآخرون 2008).

وهذه المواد كالمعادن تسمح بالتصاق البكتريا على السطح وتظهر بشكل ارتباطات وتعشقات مع ايونات الحديد مع ألفة قوية (Chongdar وآخرون2005). هذه التفاعلات بين (EPS) وايونات المعدن تحدث بسبب ضعف التفاعلات الالكترونية المستقرة بين مجموعة الهيدروكسيل كلفوسفيت والبيروفيت في البوليمرات الطبيعية او تشكيل جسور ملحية بين مجموعة الكاربوكسيل في البوليمرات الحامضية (Lin و Ballim, 2012) ,(Sheng وآخرون 2008).

لذا المناطق المتآكلة مغطاة بـ(EPS) وتتكون لها جسور رابطة تحدث بين السكريات المتعددة لـ(EPS) وايونات السطوح كالمعادن يليها توازن بين المعدن وايونات المعدن ويؤدي الى تسارع التآكل (Lewanandowski وBeyenal,2008).

الاستنتاجات والتوصيات Conclusions and Recommendations

الاستنتاجات Conclusions

1- تم تشخيص البكتريا المختزلة للكبريت SRB ولأول مرة في العراق (مدينة بعقوبة) في فم الإنسان وتحديداً في الأسنان المتسوسة والجيوب اللثوية.

2- قدرة البكتريا المختزلة للكبريت على إنتاج عوامل الضراوة حيث أظهرت تبايناً لقدرتها على إنتاج الهيمولايسين والبكتريوسين وأظهرت جميع العزلات قدرتها على تكوين الجليدات والمحفظة.

3- قدرة البكتريا المختزلة للكبريت على تكوين الغشاء الحيوي في الأسنان والذي يؤدي الى تشكيل بيئة لاهوائية أجبارية مناسبة لنموها وبالتالي تسبب في تسوس الأسنان.

4- أوضحت الدراسة الحالية لجميع عزلات الأطفال بأنها تبدي أعلى مقاومة لمضادAmpicillin وأقل مقاومة لمضادAzithromycin , أما عزلات البالغين فإنها تبدي أعلى مقاومة لمضادAmpicillin وأقل مقاومة لمضادAzithromycin, Clindamycin .

5- إن البكتريا المختزلة للكبريت لها القدرة على الالتصاق على السطوح غير الحية المصنعة من البلاستك والفولاذ والبورسلين والسيراميك والزجاج والجلد.

6- إن البكتريا المختزلة للكبريت لها تأثيراً عالياً على إحداث التآكل في المعادن الطبية المستخدمة في عمل طبيب الأسنان ويكمن ذلك في قدرتها على تكوين الغشاء الحيوي.

التوصيات Recommendations

1- استخدام الطرائق الوراثية في دراسة البكتريا المختزلة للكبريت SRB وتشخيص سبب أحداثها لتسوس الأسنان وراثياً.

2- دراسة أنواع البكتريا المختزلة للكبريت في الغائط للتعرف على أسباب أحداثها الالتهابات والخراجات المعوية وخراجات الكبد للإنسان.

3- دراسة المعالجة للتآكل الحيوي في المعادن من خلال استخدام مثبطات التآكل .

المصادر والمراجع العربية

القران الكريم

احمد, سيلدا سعيد ياسين.(2008). عزل وتشخيص مسببات أخماج الجروح ودراسة حساسيتها للمضادات الحيوية و المطهرات في مستشفى مدينة كركوك العام. رسالة ماجستير. جامعة تكريت / كلية التربية.

ألحديثي ، هديل توفيق . (1983) .الكتاب العملي في أساسيات علم البكتريا . كلية العلوم, جامعة البصرة .

التميمي، وجدان حسين. (2001). عزل وتشخيص بعض الجراثيم المختزلة للكبريت من أنظمة تبريد الشركة العامة للأسمدة الكيمياوية الجنوبية ودراسة تأثيرها التأكلي على المعادن مختبريا . رسالة ماجستير – كلية العلوم – جامعة البصرة .

الزعاك، علي (1994)، البايولوجي الجزيئي لضراوة البكتريا، الطبعة الأولى، جامعة بغداد.

عدوس, سلمان عزيز.(2005). دراسة الاستجابة المناعية في المرضى المصابين بالتهاب الاذن الوسطى البكتيري المزمن. اطروحة دكتوراه. جامعة بابل / كلية العلوم.

المرجاني, محمد فرج وعبد الهادي,علي حيدر وسلمان , جيهان عبد الستار.(2012). السموم البكترية.الذاكرة للنشر والتوزيع الطبعة الاولى ,بغداد.

المرجاني، محمد فرج . (2011) . المضادات الحيوية: المقاومة البكتيرية للمضادات الحيوية. عمان: دار دجلة .

نعمة ، عدنان ; فليح , عبد الكريم ; ألحديثي ، هديل توفيق ; خلف ، علاء سامي وحسين ،وجدان . (2010) . التأثير التاكلي للجراثيم المختزلة للكبريت المعزولة من أنظمة تبريد الشركة العامة للأسمدة الكيمياوية الجنوبية . مجلة ديالى للعلوم الإنسانية ، (42) : 250 – 272 .

نعمة ، عدنان ; فليح ، عبد الكريم وحسين ، وجدان . (2009) . عزل وتشخيص البكتريا المختزلة للكبريت من أنظمة التبريد للشركة العامة للأسمدة الكيمياوية والمسببة للتآكل . مجلة ديالى للعلوم الإنسانية ، (39) : 261 – 279.

المصادر الاجنبية:

A

Aires C. P., Tabchoury C. P., Del Bel Cury A. A., Koo H.and. Cury J. A,. (2006) .“Effect of Sucrose Concentration on Den-tal Biofilm Formed *In Situ* and on Enamel Demineraliza-tion,” *Caries Research*, Vol. 40, No. 1, , pp. 28-32 .

Al Agha,O.M.(2006). Corrosion In Structures.J.AL-Agsa Unv.,10(S.E.):122-144.

Al-Charrakh[a],A .H .; Yousif ,S .Y .and Al- Janabi ,H .S.(2011). Antimicrobial spectrum of the action of bacteriocins from *Klebsiella* isolates from Hilla/Iraq**.** J.Microbial .Vol . 2,Nu .5,:1-11.

Alwan, A.A.S and Abou, Y.Z. (1998). Guide to chemotherapy and chemoprophylaxis in bacterial infection. W.H.O. regional publications, Eastern Mediterranean series.

American Petroleum Institute (API) (1975). Recommended Practice For Biological Analysis Of Subsurface Injection Water. C. B.; Bell, R.G. and Lim, C. (1981). Corrosion Of Mild And Stainless Steel. J. Cand Microbial. 27: 242-245.

Anne, A. 2006. Early childhood caries: new knowledge has implications for breast feeding families. Leaven. 42(2): 27-31.

Atlas, R.M. ;Parks, L.C.and Brown, A.E.(1995). Laboratory Manual Experimental Microbiology .,Mosby.U.S.A.

Atlas,R.M.; Brown,A.E.; and Parks,L.C.(1995).Laboratory Manual Experimental Microbiology. 1th ed. ***Mosby Yearbook***, Inc. pp: 888.

Attene-Ramos MS, Wagner ED, Gaskins HR,and Plewa MJ. (2007) Hydrogen sulfide induces direct radical-associated DNA damage. Mol Cancer Res;5:455–9.

B

Badziong, W.; Tauer, R.K. and Zeikus,J.G. (1978). Isolation and Characterization Of Desulfovibrio Growing on hydrogen Plus Sulfate as The sole energy source. arch. Microbial , 116: 41-49.

Baron, E.J. & Finegold, S.M. (1994). Microorganisms Encountered In Urinary Tract in Baily & Scott's Diagnostic Microbiology. (9^{th}) ed. Mosby Company U.S.A.

Barton ,L.L. and Hamilton ,W.A. (2007). Sulphate-Reducing Bacteria Environment, and Engineered System. Cambridge University Press PP: 558.

Bassler BL. (2002).Small talk: Cell-to-cell communication in bacteria. Cell; 109:421-444.

Beech lB,Sunner J (2004).Biocorrosion : towards understanding interactions between bioflim and metals .Curr. opin .Biotechnol.15:181-186.

Benz, R. ;Schmid ,A. and Dihanich, M. (1989). Pores from mitochondrial outer membranes of yeast and a porin-deficient yeast mutant: a comparison. ***J Bioenerg Biomembr*** **21: pp.**439-450.

Berbari, E. F., F. R. Cockerill III, and J. M. Steckelberg**. (**1997). Infective endocarditis due to unusual or fastidious microorganisms. Mayo Clin. Proc. **72:**532–542.

Boetius, A. ;Raven Schlag , K. ; Schubert , C.J. ; Ricket , D. ; Widdel , F. Gieseke , A. ; Amann , R. ; Jorgensen , B. B. ; Witte , U. and Pfannkuche O. (2000) Amarine Microbial Consortium Apparently Mediationg Anaerobic Oxidation Of Methane . Letters To Nature , 407 : 623 – 626.

Boopathy R, Robichaux M, La font D, Howell M.(2002). Activity of sulfate-reducing bacteria in human periodontal pocket. Can J Microbiol;48:1099–103.

Booth, G.H. and Wormwell, F. (1961). Corrosion of mild steal by sulfate reducing bacteria. Effect of different strain of organisms. Cited by Starr, M.P.; Slop, H.; Truper, H.G.; Balows, A. and schegl., H.G. (ed). The Prokaryotes, a handbook of habitates, isolation and identification of bacteria. Vol. 2. Berlin. Springer-verlage.

Bowen W. H,. (2002). "Do We Need to Be Concerned about Dental Caries in the Coming Millennium?" *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, Vol. 13, No. 2, , pp. 126-131.

Boyce,J.D.and Alder, B.(2000). The Capsule is a Virulence determinant in the pathogenesis of *Pasteurella multicida* M1404(B:2). Infec.Immun.68:3463-3468.

Brooks , G. F.; Butel , J. S.;Carroll, K. C. and Morse, S. A. (2007) Jawetz , Melinick , J.L. and Adlebergs Medical Microbiology , 24th ed. A lange medical book.

Brooks, G. F., Butel, J.S. and Morse, S.A. (2001). Jawetz, Melnick and Adelberg's Medical Microbiology (22nd ed). McGraw- Hill. U.S.A. pp. 197-202.

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.

Buduneli, N., H. Baylas, E. Buduneli, O. Turkoglu, T. Kose, and G. Dahlen. 2005. Periodontal infections and pre-term low birth weight: a case-control study. J. Clin. Periodontol. **32:**174–181.

C

Carignan, R.S.; Fukui, M.;Wilkes, H. and widdel, F. (1994). Use Of Diffusion Samples In Oligotrophic Lake Sediments –Effects of Free Oxygen In Sampler Material. Limnol. Oceanogr., 39 : 468-474.

Caselitz, Peter Fundamentals, Limits, and Prospects, ed. Kurt Alt, Friedrich W. Rösing, Maria(1998) Caries: Ancient Plague of Humankind. In *Dental Anthropology:* Teschler-Nicola, pp 203-225.

Characklis WG, and Marshall KC, eds. (1990).Biofilms, John Wiley & Sons, Inc. New York.

Chongdar S,Gunasekaran G,andKumar P (2005).Corrosion inhibition of mild steel by aerobic biofilm Acta Electrochimica 50:4655-4665.

Coetser , S. E. and Cloete T. E. (2005). Biofouling and Biocorrosion In Industrial Water Systems . Critical Reviews In Microbiology, 31:213–232

Cornaglia , G , Ligozzi , M , Mazzariol , A , Valentitini , M , Orefici, G. and Fontana, R.(1996). The Italian surveillance group for antimicrobial resistance. Rapid increase of resistance to erythromycin and clindamycin in *Streptococcus pyogenes* in Italy, 1993–1995 . Emerg. Infect. Dis , 2: 339–342.

Cowan and steels**. (**2004). Manual for the Identification of medical Bacteria ,3rd Edition.

Cruickshank, R. ;Duguid, J.p. ;Mormion, B.P. and Swain, R.H. (1975). Medical Microbiology . Vol . 2,12th ed. Edinburgh . Churchil . Livingstone.

Cvitkovitch, D.G. ; Li, Y.H. and Ellen, R.P. (2003). Quorum Sensing and Biofilm Formation in *Streptococcal Infections*. J.Clin. Invest. 112:1626-1632.

D

Dalan, R.M. and Costerton, J.W. (2002). Biofilm survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin. Microbiol. Rev.15:167-193.

Dalhoff, A.; Nasu, T. and Okamoto, K. (2003). Beta-lactamase stability of faropenem. Chemotherapy. Sep. Vol .49, No. 5 :pp. 229-36.

Davey, M.E. and O'toole, G.A.(2000). Microbiol biofilms from ecology to molecular genetics. Microbiol. Mole. Bio. Rev.64:847-867.

Davies , I . (2006) . Staphylococcus resistance of Antibiotic Microbiology and Biotechnology Journal , 34:386-390.

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

Demuth DR, Lamont RJ (2006). Bacterial cell-to-cell communication role in virulence and pathogenesis. New York: Cambridge University Press.

Dewhirst F,Chen T ,and lzard J .(2010).The human oral microbiome JBacteriol;192(19) :5002-5017.

Dhruw Chandrabhan, Rajmani Hemlata, Bhatt Renu, Verma Pradeep.(2012). Isolation of Dental Caries Bacteria from Dental Plaque and Effect of Tooth Pastes on Acidogenic Bacteria. J. M. Microbiol,vol.No 65-69.

Dige I, Nyengaard JR, Kilian M,and Nyvad B. (2009).Application of stereological principles for quantification of bacteria in intact dental biofilms. Oral Microbiol Immunol; 24:69-75.

Dobell C. (1958).The first observations on entozoic protozoa and bacteria. Antony Van Leeuwenhoek and His 'Little Animals'. New York: Russell and Russell, Inc.; 236-56.

Dodman, T., J. Robson, and D. Pincus**. (**2000). *Kingella kingae* infections in children. J. Paediatr. Child. Health 36:87–90.

Dong , Z. H. ; Shi , W. ; Ruan , H. M. and Zhang , G.A. (2011). Hetero Geneous Corrosion Of Mild Steel Under SRB-Biofilm Characterised By Electrochemical Mapping Technique. Corrosion Science , 53 : 2978 – 2987.

Donlan ,R.M. And Costerton , J.W. (2002) . Biofilm : Survival Mechanism of Chni Cally Relevant Microorganism. Clin Microbid Rev., 15: 167-193.

Ehrlich HL, Newman DK. ;(2009).Geomicrobiology. 5rd edn. New York: CRC Press .

Emmatty R,Mathew JJ,and Kuruvilla J. (2013Comparative evaluation of Subgingival Plaque microflora in pregnant and non –pregnant women : Aclinical and microbiology study . J lndian So periodontal); 17(1):47-51.

F

Fabiano luiz heggendorn, lucio souza gonçalves, eliane pedra dias, arley silva junior1, mariana machado galvão5 & márcia t. s. lutterbach5.(2013). Detection of sulphate-reducing bacteria in human saliva.Informa Healthcare_ print/ISSN 1502-3850 .

Fite A, Macfarlene GT, Cummings JH, Hopkins MJ, Kong SC, Furrie E,. Forbes, B. A. ;Sahm, D. F. and Wessifeld, A. S. (2002) . Bailey and Scotts' diagnostic microbiology . 9th ed . Mosby . U.S.A. Vol.1:509.

Fite A, Macfarlene GT, Cummings JH, Hopkins MJ, Kong SC, Furrie E,. (2004).Identification and quantitation of mucosal and faecal desulfovibrios using real time polymerase chain reaction. 53:523–9.

Forbes, B.A. , Sahm, D.F. and Wessifeld, A.S.(2007).Diagnostic Microbiology.12thed.Elsevier.Pheladelphia.USA:276-216.

Forbes, B. A. ;Sahm, D. F. and Wessifeld, A. S. (2002) . Bailey and Scotts' diagnostic microbiology . 9th ed . Mosby . U.S.A. Vol.1:509.

Forrest, A.; Weir, M.; and Plaisance, I.K. (1988). Relation between renal function and disposition of oral ciprofloxacin. ***J.*** Antimicrob. Agents Chemother.:pp. 1537-1540.

Freeman, D.J., Falkiner,F.R. and Keane,C.T. (1989). New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci***. J. Clin. Pathol***. 42:pp.872-874.

Fuqua WC,and Winans SC, Greenberg EP(1994). Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell densityresponsive transcriptional regulators. J Bacteriol; 176:269-75.

G

Garcia F,Lopez ALR, Guille Jc ,Sandoval LH,Gonzalez CR,Castanov(2012).Corrosion inhibition in copper by isolated bacteria .Antcorros .Method Mater .59:10-17.

Geesey GG, Lewandowski Z,and Flemming HC eds. (1994).Biofouling and Biocorrosion in Industrial Water Systems, Lewis Publishers, Ann Arbor.

George ,J. ;purushoThaman , J.G. and Shouche , R.S(2008) . Isolation and characterization of sulphate-reducing bacteria *Desulfovibrio vulgaris* from Vajreshwari thermal springs in Maharashtra, India. World Microbiol Biotechool , 24:681-685.

Gerard, M. and Alfons J. M..(2008). The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *J .Microbiol*, vol.9, pp. 441- 451.

Ghazy ,E.A. ;Mohmond ,M.G. ;Asker , M.S. ;Mahmoud , M.N. ;Abo Elsoud , M.M. and Abdel Sami , M.E. (2011) . Cultivation Of Sulfate Reduacing Bacteria (SRB) In Jea Wuter. Journal Of American science, 7(2):604-608.

Gillor ,O., Nigro,L.M. and Riley, M .A .(2005). Genetically Engineered Bacteriocins and their Potential as the Next

Generation of Antimicrobials .Genetically Engineered Bacteriocins . Vol .15:1-9 .

Gohl, O.;Friedrich, A.; Hoppert, M.and Averhoff, B.(2006). The thin pili of Acinetobacter sp. Strain. Appl. Env. Microbiol. 72:1394-1401.

Goni ,F.M. and Ostolaza,H.(1998).*E.coli* alpha hemolysin :a membrane-active protein toxin .Brazilian *J.Med.Biological.Res*.,31:pp.1019-1034.

Granlund-Edstedt, M., Johansson, E., Claesson, R. & Carlsson, J. (1993) Effect of anaerobiosis and sulfide on killing of bacteria by polymorphonuclear leukocytes. Journal of Periodontal Research 28, 346-353.

Gray JJ. (2004).The interaction of proteins with solid surfaces. Current Opinion in Structural Biololy; 14:110-5.

Greene, N.D**.** and Fontana, M.G. (1978). Materials Sicence And Engineering Series. United States of America, Pp.47-67.

Guilfoile, P. G. , Alcamo, E. and Heymann, D. (2007) ; Antibiotic – Resistance bacteria. Chelsea House Publishers. pp. 53-62.

H

Hammami , R.; Zouhir, A ;Lay, Ch . Le . ; Hamida ,J . B .and Flis I (2010) . BACTIBASE second release: a database and tool platform for bacteriocin characterization. BMC Microbiology.

Han, J. S. , Jang, I-Y. , Ryu, H-S.and Kim, W-Y.(2010). Similarity with the *Yersinia pestis* Plasmid pCRY and Integrative Conjugative Elements. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.pp. 401-406.

Handley PS. (1990).Structure, composition and functions of surface structures on oral bacteria. Biofouling; 2:239-64.

Hannig C, and Hannig M. (2009).The oral cavity—a key system to understand substratum-dependent bioadhesion on solid surfaces in man. Clinical Oral Investigations13:123-39.

Hardy, J.A. (1981). The enumeration isolation and characterization of sulfate- reducing bacteria from north sea water. AOOI. Bacteriol. 51: 505-516.

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.

Henke JM,and Bassler BL. 2004.Three parallel quorum-sensing systems regulate gene expression in *Vibrio harveyi*. J Bacteriol; 186:6902-14.

Hillson, Simon (1986) Teeth. New York: Camvridge University Press.

Hilnes, M.E., Evans, R.S., Genthner, B.R.,Willis, S.G., Friedman, S., Rooney-Varga, J.N. and Devereux, R. (1999) .Molecular Phylogenetic and biogeochemical Studies Of Sulfate -Reducing Bacteria In The Rhizospher Of spartina Alterniflora. Appl. Environ.Microbiol., 65 : 2209-2216.

Hojo K, Nagaoka S, Ohshima T, Maeda N. (2009).Bacterial interactions in dental biofilm development. J Dent Res; 88:982-90.

Holt, J.G.; Krieg, N.R.; Sneth, P.H.; Staley, J.T and Williams, S.T. (eds). (1994). Bergeys Manual of determinative Bacteriology. 9th ed. Williams and Wikins.

Hungate, R.E. (1969).A role tube method for cultivation of strict anaerobes. In: Norris, J.R.; Ribbons, D.W. (eds). Method in Microbiology. Vol. 313. London, New York, Academic press.

I

Ishii, S.I.; KoKi, J.; Unno, H. and Hori, K. (2004). Two morphological types of cell appendages on a strongly adhesive bacterium, *Acinetobacter* sp. strain To 15. Appl. Env. Microbiol. , 7:5026-5029.

J

Jacoby, G.A. & Sutton, L. (1985). β -Lactamases and β-Lactam resistance in *E . coli* Antimicrob. Agents. Chemother, 28(5): 703-705.

Jennifer Gail Hopper.(2003**).** Forensic dentistry: dental indicators for identification**.** Master of Arts in The Department of Geography and Anthropology**.** University of Memphis.

Jørn A. Aas, Bruce J. Paster, Lauren N. Stokes, Ingar Olsen, and Floyd E. Dewhirst**. (**2005).Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity **.** J. OF clinical microbiol, Nov., p. 5721–5732.

K

Kaplan JB.(2010).Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications and potential therapeutic uses. J Dent Res; 89:205-18.

Karatan E,and Watnick P.(2009).Signals, regulatory networks and materials that build and break bacterial biofilms. Microbiol Mol Biol Rev; 73:310-47.

Katzung , B.G. (2004) . Chemotherapeutic drug . basic and clinical pharmacology . 9th ed : pp.733 –81 .

Katzung, B.G. (2001). Basic and Clinical Pharmacology. (8th) ed. Lange Medical Books. McGraw-Hill. New York.

Kayaoglu, G. &Qrstavik, D. (2004). Virulence factors of *Enterococcus faecalis*. Relationship to Endodontic disease**.** ***Rev. Oral. Biol. Med***. ,15(5) : 308–342**.**

Kenneth J, Ryan C,and Ray G. (2004).Sherris' medical microbiology[M]. New York: McGraw Hill Medical Pub Division; 4:141-9.

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.

Kolenbrander P. E,. Palmer R. J., Rickard A. H., Jakubovics N. S.,. Chalmers N. I and. Diaz P. I, (2006) "Bacterial In- teractions and Successions during Plaque Development," Periodontology, Vol. 42, No. 1, , pp. 47-79.

Kolenbrander PE, London J. 1992.Ecological significance of coaggregation among oral bacteria. Advances in Microbial Ecology; 12:183-217.

Kreth J, Merritt J, Shi W,and Qi F. (2005).Competition and coexistence between *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* in the dental biofilm. J Bacteriol; 187:7193-203.

L

Lambert,O.; Michea-Hamzehpour, M.; Kohler, T.; Chau,F.; Fanrisson, F.; Dautrey, S.; and Pechere, J. (2001) Differential selection of multidrug efflux mutants by travafloxacin and ciprofloxacin in an Experimental model of *Pseudomonas aeruginosa* acute pneumonia in rats. Antimicrob. AgentsChemother**.** 44: 571 — 576.

Langendijk, P. S., E. M. Kulik, H. Sandmeier, J. Meyer, and J. S. van der Hoeven**. (**2001). Isolation of Desulfomicrobium orale sp nov and Desulfovibrio strain NY682, oral sulfate-reducing bacteria involved in human periodontal disease. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **51:**1035–1044..

Langendijk, P. S., J. T. Hanssen, and J. S. van der Hoeven**. (**2000). Sulfatereducing bacteria in association with human periodontitis. J. Clin. Periodontol. **27:**943–950.

Langendijk-Genevaux PS, Grimm WD, Van der Hoeven JS. (2001).Sulfate-reducing bacteria in relation with other potential periodontal pathogens. J Clin Periodontol;28:1151–7.

Laurence,D.R. ; Bennett, P.N. and Brown, M.J. (1997). "Clinical Pharmacology".8th ed. Churchill Livingstone,. London

Leonard, M.R. (2002). EM Evalution of bacterial biofilm and micro org-

anisms on the apical external root surface of human teeth. JOE. 28: 12.

Levinson ,W. and Jawetz ,E . (2000) . Medical Microbiology and Immunology examination and board review . Appleton and lange U.S.A .

Lewandowski Z,Beyenal H (2008).Mechanisms of microbially influenced corrosion. Springer Series on Biofilms,doi :10.1007\7142_2008_8.pp1-2.

Li Y, Hanna MN, Svens**ä**ter G, Ellen RP, andCvitkovitch DG. (2001).Cell density modulates acid adaptation in *Streptococcus mutans*: implications for survival in biofilms J Bacteriol; 183:6875-84.

Li Y. H,. Tang N,. Aspiras M. B,. Lau P. C,. Lee J. H, Ellen R. P.and. Cvitkovitch D. G**,. (**2002). "A Quorum-Sensing Sig-naling System Essential for Genetic Competence in *Streptococcus mutans* is Involved in Biofilm Formation," Jour- nal of Bacteriology, Vol. 184, No. 10, pp. 2699- 2708.

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.

Liaw, S.J.; Lai, H.C.; Ho, S.W.; Luh, K.T.& Wang, W.B.(2000). Characterization of *p*-nitrophenylglycerol-resistant *Proteus mirabilis* super-swarming mutants. J. Med. Microbiology. 50:pp. 1039-48.

Lin, J. and Ballim, R.(2012) Biocorrosion Control: Current Strategies And Promising Alternatives . African Journal Of Biotechnology, 11(91):15736-15747.

Lo, R.Y.C.;Mckerral, L.J.;Hills, T.L.and Kostrzynka, M.(2001). Analysis of the capsule biosynthetic locus of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* A1 and proposal of a nomenclature system . Infec. Immun. 69:4458-4464.

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

Loubinoux, J., C. Bisson-Boutelliez, N. Miller, and A. E. Le Faou**. (**2002). Isolation of the provisionally named *Desulfovibrio fairfieldensis* from human periodontal pockets. Oral Microbiol. Immunol. **17:**321–323.

Loubinoux, J., F. Mory, I. A. C. Pereira, and A. E. Le Faou. (2000). Bacteremia caused by a strain of *Desulfovibrio* related to the provisionally named *Desulfovibrio fairfieldensis*. J. Clin. Microbiol. 38:931–934.

Loubinoux, J., J.-P. Bronowicki, I. A. C. Pereira, J.-L. Mougenel, and A. E. Le Faou**. (**2002). Sulfate-reducing bacteria in human feces and their association with inflammatory bowel diseases. FEMS Microbiol. Ecol. 40**:**107–112.

Luders,T.;Birkemo,G.A.;Fimland,G.;Nissen-meyer, J.&Nes,L.F (2003). Strong synergy between eukaryotic antibacterial peptide and bacteriocins from lactic acid bacteria **.**Appl.Environ.Microbiol.,69(3):1797-1799.

M

Madigan MT,and Martinko JM, Eds. (2006).Brock Biology of microorganisms, Prentice Hall, Inc. Upper Saddle River; 617:618**.**

Mahmoad, M. N.; Abdel- Samie, M.E.; El-Mokadem, M.T.; Abdel-Raheim, S.S. and Ghazy, E.A.(2008) . Development Of Biofilm (Bf) On Mild Steel Surfaces Immersed In Suez Gulf Sea Water. J. Of. APPI.Sc.Res., 4: 1799-1804.

Mandell, G.L.; Bennet, J.E.; and Dolim. R.(1995). Principles and practice of infections disease. 4th ed. Charchill. Living stone. Int.

Marsh PD. (2005).Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. Journal of Clinical Periodontology; 32:7-15.

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

Mathur, T.; S. Singhal; S. Khan; D.J. Upadhyay; T. Fatma; and A. Rattan. (2006). Detection of Biofilm Formation among The Clinical Isolates of Staphylococci: An Evaluation of Three Different Screening Methods**.** Indian J. Med. Microbiol. Vol .24,No. 1 :pp.25-29.

Mendonça,N.R.F.D. (2009) : Molecular diversity of *bla*genes in *Klebsiella pneumonia* and *Escherichia coli* isolates, Chapter 1.

Miles, A. E. W. (1963) The Dentition in the Assessment of Individual Age in Skeletal Material. In Dental Anthropology, ed. D. R. Brothwell, pp 191. New York: The Macmillan Company.

N

Nadell CD, Xavier JB, Levin SA,and Foster KR. 2008.The evolution of quorum sensing in bacterial biofilms. PLoS Biol; 6:171-9.

Nagler RM. 2002.The enigmatic mechanism of irradiation –induced to major salivary gland. Oral Dis ;8:141-146.

Neeman, R, Keller, N, Barzilai, A, Korenman, Z. and Sela, S. (1998). Prevalence of the internalization-associated gene, prtF1, among persisting group A streptococcus strains isolated from asymptomatic carriers. ***Lancet*** 352:1974-1977.

Nihal Dogruöz , Esra Ilhan-Sungur ,Duygu Göksay , Irfan Türetgen (2012). Evaluation of microbial contamination and distribution of sulphate-reducing bacteria in dental units. © Springer Science+Business Media B.V. 184:133–139.

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.

Novick RP,and Geisinger E. (2008) Quorum sensing in staphylococci. Annu Rev Genet; 42:541-64.

O

Opal, S.M; Cross, A.S; Genski, P. and Lyhte, L.W.(1990) . Aerobactin and hemolysin as virulence determinants in *Eschericha coli* Isoated from human blood, Urine and stool**.** J. Infect , Dis. 161 : pp.794-796.

P

Paster BJ, Olsen I, Aas JA,and Dewhirst FE. 2006The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. Periodontol 2000; 42:80-7.

Pe¨rez. J.R -Jime¨nez,. Young L.Y, Kerkhof L.J.. (2001) Molecular characterization of sulfate-reducing bacteria in anaerobic hydrocarbon-degrading consortia and pure cultures using the dissimilatory sulfate reductase (dsrAB) genes. FEMS Microbiology Ecology 35 145-150.

Persson, S. (1992) Hydrogen sulfide and methyl mercaptan in periodontal pockets. Oral Microbiology and Immunology **7**, 378-379.

Petersen P. E,. Bourgeois D,. Ogawa H,. Estupinan- Day S and Ndiaye C.,.(2005). "The Global Burden of Oral Diseases and Risks to Oral Health," *Bulletin of the World Health Organization*, Vol. 83, No. 9, pp. 661-669.

Pfeifle , D. ; Janas , E. and Wiedemann , B. (2000).Role of penicillin – binding proteins in the initation of the Ampc –β– lactamase expression in *Enterobacter cloaceae* . J. Antimicrob . Agent . Chemother . 44: pp.169- 172.

Pils.H.;andBroun,V.(1995).Evidence that the Immunity protein inactivates colicin 5 immediately prior to the formation of the transmembrane channel. J. Bacteriol. Vol. 177,No. 12 :pp. 6966 – 697

Postgate ,J.R. and Campbell ,L.L. (1965). Classifi Cation Of The Sporeforming Sulfate – Reducing Bacteria. Bacteriological Reviews ,29(3):359-363.

Postgate ,J.R. and Campbell ,L.L. (1966). Classification of DesulfoVibrio Species, The Nonsporulation Sulfate reducing Bacteria. Bacteriological Review ,30(4) : 732-738.

Postgate, J. R. (1984) The sulphate-reducing bacteria. 2nd edition, Cambridge: Cambridge University Press

Pratten , J.; Wills, K.; Barnett, P. and Wilson, M.(1998). In vivo studies of the effect of antiseptic-containing mouth washes on the formation and viability of *streptococcus* biofilms. Appl. Microbiol. 84: 1149-1155.

Prescott, L. M.; Harley, J. P. and Klein, D. A. (2005). Microbiology. 6th ed. McGraw. Hill companies Inc. New York.

Prescott, L.M.;Harleg, J.P.and Klein, P.A.(1990). Microbiology .WM. C. Brown publisher .

R

Rajasekar AB,Ting YP (2011).Role of inorganic and organic medium in the corrosion behavior of *Bacillus megaterium* and *pseudomonas sp*.in stainless steel SS 304.lnd Eng.Chem.Res.50:12534-12541.

Rajiv Saini,Santosh Saini, sugandha. (2013).Adental microbial infection. journal of Science Ip:212.126.123.202.

Riley ,M .A .; Goldstone , C .M ; Wertz ,.J .E and Gordon .D.(2003). A phylogenetic approach to assessing the targets of microbial warfare. ***J. Evol.Biol***.16:pp.690-697.

Riley, M.A. (1998). Molecular mechanisms of bacteriocin evolution. Annu. Rev.Genet. 32 :pp. 255–278.

Roberts A. P, Cheah G.,. Ready. Pratten D, J,. Wilson M and Mullany P., (2001) "Transfer of TN916-Like Elements in Microcosm Dental Plaques," Antimicrobial Agents Chemo- therapy, Vol. 45, No. 10, , pp. 2943-2946.

Roberts, M. C, Sutcliffe, J, Courvalin, P, Jensen, L. B, Rood, J. and Seppala, H. (1999). Nomenclature for macrolide and macrolide – lincosamide – streptogramin B resistance determinants. Antimicrob. Agents Chemother , 43: 2823–2830.

Robichaux M, Howell M, Boopathy R. Growth and activities of sulfate-reducing and methanogenic bacteria in oral cavity. Curr Microbiol 2003;47:12–16.

Ruijie Huang, Mingyun Li, and Richard L. Gregory. (2011)Bacterial interactions in dental biofilm. Virulence ; 2:5, 435-444.

S

Sahrani , F.K. ; Ibrahim , Z. ; Yanya , A. and Aziz , M. (2008). Isolation and Indentification of Marine Sulphate – Reducing Bacteria , Desulfovibrio Spp. and *Citrobacter Freundii* From Pasir Gudang , Malaysia , Science. , 47 : 265 – 371.

Sangeeta Dhir . 2013.Biofilm and dental implant: The microbial link **.** Journal of Indian Society of Periodontology . Jan-Feb; 17(1): 5–11.

Sarika,A.R. ; Lipton ,A .P .and Aishwarya ,M .S.(2010). Bacteriocin Production by a New Isolate of *Lactobacillus rhamnosus*GP1 under Different Culture Conditions .J. Food Science and Technology .2(5):291-297

Sarika,A.R.; Lipton ,A .P .and Aishwarya ,M .S.(2010). Bacteriocin Production by a New Isolate of *Lactobacillus rhamnosus*GP1 under Different Culture Conditions .J. Food *Science and Technology* . Vol .2,No. 5 :pp.291-297.

Scannapieco, F. A. (1999). Role of oral bacteria in respiratory infection. J. Periodontol. **70:**793–802

Scotland , S. M. (1999). Toxin . J. Appl. Bacteriol. , 57 :109-129.

Sheng X, Ting YP, and pehkonen So (2008).The influence of ionic strength ,nutrients and pH on bacterial adhesion to metals .J.Colloid lnterface Sci. 321:256-264.

Snelling , A.M.; Smidet , P.G. ; Hawkey , P.M. ; Heritage , J. ; Parnell , C. ; Bodenham , A.R. and Inglis , T.(1996). Validation of use of whole-cell repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR (REP-PCR) for typing strains belonging to the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex and application of the method to the investigation of a hospital outbreak . J.Clin. Microbiol. 34 : 1193 1202.

Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C. & Kent Jr., R. L. (1998) Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology* **25**, 134-144.

Sorokin ,D. Y. and Muyzer , G. (2010). Desulfurispira natronophila gen. nov. sp. nov.: an obligately anaerobic dissimilatory sulfur-reducing bacterium from soda lakes. Extremophiles , 14:349–355.

Spanu, T.; Luzzaro, F.; Perilli, M.; Amicosanti, G.; Toniolo, A.; Fadda, G. and the Italian ESBL study group .(2002). Occurance of extended-spectrum-B. lactamas and other antimicrobial drug. Antimicrobial Agent and Chemotherapy. Jun. Vol .46 ,No. 1 :pp. 196-202.

Stevens, D. L. and Kaplan, E .L. (2000). Streptococcal Infections: Clinical Aspects, Microbiology, and Molecular Pathogenesis. Oxford University Press. New York.

T

Taskris, A.;Ikonomidis, A.;Pournaras, S.;Tzouvelekis , L.S.; Sofianou, D.;legakis, N.J. and Maniatis, A.N.(2006). VIM-1 Metallo-β-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. Emerging Infec. Dis.12.

Ted, R.J.and Christine, L.C. (1995). Lab. experiment in microbiol. 4th ed Benjami /Cummings. California , USA.

Ten Cate J. M,. (2006) ."Biofilms, a New Approach to the Micro-biology of Dental Plaque," *Odontology,* Vol. 94, No. 1, , pp. 1-9.

Thuy Do, Deirdre Devine,and philip d marsh. (2013). Oral biofilms: molecular analysis, challenges, and future prospects in dental diagnostics. Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry:5 11–19.

Tierney, L.M.Jr.; Mcphee, S.J. and Papadakis, M.A. (1999). Current medical diagnosis and treatment. (38th) ed. Appleton & Lange U.S.A.

Tong HC ,Gao XJ ,and Dong XZ . 2003.Non –mutans Streptococci in patients receiving radiotherapy in the head and neck area.Caries Res; 37 :261-266.

TuQuoc, P.H.; P. Genevaux; M. Pajunen; H. Savilahti; C. Georgopoulos; J. Schrenzel; and W.L. Kelley. (2007). Isolation and Characterization of Biofilm Formation-Defective Mutants of *Staphylococcus aureus*. Infect. *Immun.* 75(3):1079-1088.

Türp, Jens C. and Kurt W. Alt (1998) Anatomy and Morphology of Human Teeth. In *Dental Anthropology: Fundamentals, Limits, and Prospects*, ed. Kurt W. Alt, Friedrich W. Rösing, and Maria Teschler-Nicola, pp 71-91. New York: Springer- Verlag/Wien.

U

Ueda, Y. & Sunagawa, M.(2003). In vitro and in vivo activity of novel 2-(thiazol-2-ylthio)-1-beta-methylcarbapenemeswith potent activity against multiresistant gram-positive bacteria. Antimicrob. Agents Chemother. Aug. Vol .47 ,No.(8): pp.2471-8.

V

van der Hoeven, J. S., van den Kieboom, C. W. A. & Schaeken, M. J. M. (1995). Sulfatereducing bacteria in the periodontal pocket. Oral Microbiology and Immunology 10, 288-290.

Vandepitte, J.; Engback, K.; Piot, P. and Heuck, G. (1991). Basic laboratory procedures in clinical bacteriology. WHO Switzerland.

Vianna M. E, S. Holtgraewe, I. Seyfarth, G. Conrads, and H. P. Horz1. (2008).Quantitative Analysis of Three Hydrogenotrophic Microbial Groups, Methanogenic Archaea, Sulfate-Reducing Bacteria, and Acetogenic Bacteria, within Plaque Biofilms Associated with Human Periodontal disease_journal of bacteriology, May, p. 3779–3785.

Videla , H. A. ;and Herrera , L. K. (2005). Microbiologically Influenced Corrosion: Looking To The Future. International Microbiology , 8 : 169 – 180.

Villar, J.; Lydon, R.; Gulmezoglu.(2000) Duration of treatment for asymptomatic bacteriuria during pregnancy, Cochrane — database.

W

Waddington, R. J., Embery, G., & Samuels, R. H. A. (1994) Characterization of proteoglycan metabolites in human gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement. *Archives of Oral Biology* **39**, 361-368.

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.

Wessels, M.R. (2006).Capsular polysaccharide of group A streptococci inifischetti , Novick, R.P ,Ferrrti, J.J , Portony, D.A .and Rood, J.I Gram positive paythogenes .2nded ASM press.

Widdel, F. (1988) Microbiology and ecology of sulfate-and sulfur-reducing bacteria. In Biology of anaerobic microorganisms, ed. Zehnder, A. B. J., pp. 469-585. New York: John Wiley & Sons.

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.

Wu, T., M. Trevisan, R. J. Genco, J. P. Dorn, K. L. Falkner, and C. T**.** Sempos**. (**2000). Periodontal disease and risk of cerebrovascular disease: the first national health and nutrition examination survey and its follow-up study. Arch. Intern. Med. 160**:**2749–2755.

Yoo S. Y.,. Park S. J,. Jeing D. k,. Kim K. W,. Lim S. H,. Lee S. H,. Choe S. J,. Chang Y. H,. Park I. S and. Kook J. K, .(2007). "Isolation and Characterization of the Mutans *Streptococci* from the Dental Plaques in Koreans," The Journal of Microbiology, Vol. 45, No. 3, , pp. 246-255.

Z

Zhang K, Ou M, Wang W,and Ling J. (2009).Effects of quorum sensing on cell viability in *Streptococcus mutans* biofilm formation. Biochem Biophys Res Commun; 379:933-8.

Zhang, Y.L.;Lau, Y.L.;Arakawa, E.and leung, K.Y .(2003). Detection and genetic analysis of group II Capsule in *Aeromonas hydrophila*.Microbiology .149:1051-1060.

a

summary:-

The study deals is the first to describe the occurrence of sulfate reducing bacteria in the humen mouth. collection 300 samples from dental caries and periodontal pockets, sulfate reducing bacteria isolated and detecte in 40 sample sulfate reducing bacteria 5(%12.5) *Desulfovibrio vulgaris* ,12(%30) *Desulfovibrio desulfuricans ,17 (% 24) Desulfotomaculum raminis Desulfomicrobium 6(%15)* of individuals *age(5-60)* from hospitals dental of Baquba Now city for the period from 18/10/2013 to 1/2/2014. Isolated under the circumstances anaerobic by using gaseous nitrogen and carbon dioxide by 80:20 % respectively

Using API culture.

The results of the investigation of some virulence factors showed the isolates *Desulfovibrio vulgaris, Desulfovibrio desulfuricans , Desulfotomaculum raminis,Desulfomicrobium* produce of haemolysin withpercentage *(%60),* (%83.33) ,(%66.7) and (%60) Respectively.

Results of bacteriocin production refer to isolates*Desulfovibrio vulgaris, Desulfovibrio desulfuricans , Desulfotomaculum raminis, ,Desulfomicrobium* produce bacteriocin with percentage(%60),(% 58.3), (%58.82)and (%66.7) respectively.

The results showed that all isolates *Desulfovibrio vulgaris, Desulfovibrio desulfuricans, Desulfotomaculum raminis, ,Desulfomicrobium* showed ability to producesPellicle and capsul with percentage(%100).

The production of biofilm by local isolates were detected in two ways,

isolates of *Desulfovibrio vulgaris, Desulfovibrio desulfuricans, Desulfotomaculum raminis, Desulfomicrobium* has shown its ability to produce biofilm by(%80),(% 91.7),(% 94.11),((%83.33) respectively in Congo–red way while adhesion surface way by(%60),(% 83.33),(% 88.2), (%83.33) respectively.

The results showed a variance as far as their resistance to these antibiotics Isolates of *Desulfovibrio vulgaris, Desulfovibrio desulfuricans, Desulfotomaculum raminis* showed highest resistanceAmpicillin

rate(%100),(% 100),(% 85.71)) respectively in children. Resistance to Amoxicillin rate(%50)(% 25)(% 85.71) respectively. resistance toantibiotic Streptomycin rate(%100),(%75),(%42.85) respectively. resistance to antibiotic Lincomsides rate(%50),(%50),(%100) respectively. resistance to antibiotic Azithromycin rate (%50),(%25),(%28.57) respectively. The results showed their resistance to these antibiotics Isolates of *Desulfovibrio vulgaris, Desulfovibrio desulfuricans, Desulfotomaculum raminis, Desulfomicrobium* from adult to antibiotic Amoxicillin rate (%66.7)(% 87.5), 90),(%100) respectively. . Resistance to Amoxicillin rate(%33.3), (%25),(%90), (%33.3) respectively. . Resistance to antibiotic Streptomycin rate(%66.7),(% 87.5),(% 20),(% 83.3) respectively. Resistance to antibiotic Lincomsides rate(%33.3),(%25),(% 80),(% 33.3) respectively. resistance to antibiotic Azithromycin rate (%33.3)(%12.5), 20) (%16.66) respectively.

Detection of adhering and forming (biofilm) for the isolates *Desulfotomaculum raminis* on abiotic surfaces made up of different materials (Plastic , Stainless steel , Porcelain, Glass ,skin,cerimic) by using limited amount of suspension on those surfaces and then incubate them under different temperatures such as fridge temp. 4C$^{\circ}$, room temp. (20 – 25)C$^{\circ}$, and 37C$^{\circ}$ for different durations (3,4,5) day, then making swab for those surfaces and culture them on API solid media for 72 hours under 37C$^{\circ}$ temperature to see the activity of *Desulfotomaculum raminis* cells , or by making slides for glass surfaces . The results showed that this bacteria adhere on abiotic surfaces at close ratios except on Porcelain which had a weak adhering . The results showed that the study test the ability of sulfur reducing bacteria to cause corrosion in the metals , the mix culture brought the highest percentage of the corrosion , they reached much of loss in weight during the 84 days1.1488g pure culture , reaching 0.1220g The samples control , reaching 0.0520g.

Repuplic of Iraq
Ministry of Higher Education
and Scientific Research
Diyala University
College of Education for Pure Sciences

Isolation and Identification Sulfate Reducing Bacteria in cases Dental caries

Thesis

submitted to the College of Education for Pure Sciences

Diyala University In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science In Biology / Microbiology

By

Leqa'a Mahammed Khudir

Supervised by

Dr.Adnan Neama Al Azawy

Professor

1435 **2014**