Detect the ability of bacteria isolated from gingivitis to form biofilm

الكشف عن قدرة البكتيريا المعزولة من التهابات اللثة على تكوين Biofilm

حامد جهاد المسعودي* , سند شامل الدوري, كوكب عبد الله السعدي
جامعة كربلاء / كلية العلوم / قسم علوم الحياة
hamidgehad@yahoo.com

الخلاصة

تم جمع 28 عزلة جرثومية من مجموع 25 مسحة من أشخاص مصابين بالتهاب اللثة ,وكانت هذه العزلات هي مجموعتين من الأحياء المجهرية البكتيريا والخمائر . بالنسبة للخمائرفقد ظهرت 5 عينات أهملت العزلات واقتصرت الدراسة فقط على البكتيريا . ظهرت مجموعتين من البكتيريا حسب صبغة غرام والتي شملت البكتيريا السالبة لصبغة غرام حيث ظهرت عزلتين تعودان للجنس *Compylobacter* و 4 عزلات تعود لجنس *Nisserosis* اما باقي العزلات فقد كانت من مجموعة البكتيريا الموجبة لصبغة غرام والتي ظهرت ثلاث أجناس مختلفة 10 تعود لجنس *Lactobacillus* و2 تعود لجنس *Streptococcus* و5 تعود لجنس *Staphylococcus* .

كذلك تم اختبار حساسية البكتيريا التي تم عزلها من الاسنان تجاه مجموعة من المضادات الحيوية المستخدمة محليا لعلاج العديد من الامراض . تم اختيار مجموعة من المضادات شملت التيتراسايكيلن ، الفانكومايسين ، الكلندامايسين ، الامبسلين والكلورامفينيكول حيث تم اتباع طريقة الانتشار في الاكار . واهم ما يمكن استنتاجه هو ان البكتيريا الموجبة لصبغة الكرام والمتمثلة بـ *Staphylococcus ,Lactobacillus, Streptococcus* كانت اكثر حساسية للمضادات الحيوية مقارنة بالبكتيريا السالبة لصبغة الكرام المتمثلة ببقية السلالات (*Nisserosis ,Compylobacter*), كذلك لوحظ ان اغلب العزلات البكتيرية ابدت مقاومة واضحة للامبسلين ويمكن تفسير هذه النتائج على اساس الاستخدام الواسع للمضاد الحيوي الامبسلين بحيث اصبحت قادرة على انتاج انزيم β-lactamase وتحويله الى مركب غير فعال.

واخيرا تم الكشف عن قدرة الاحياء المجهرية على تكوين الغشاء الحياتي (biofilm) باتباع طريقة الانبوب (Tube method) , حيث اظهرت النتائج ان اربعة عزلات من مجموعة 23 عينة لها القدرة على انتاج biofilm بشكل قوي واحدى عشرة عزلة كانت قدرتها متوسطة على انتاج ال biofilm وعزلة واحدة ضعيفة اما باقي العينات فليست لها القدرة على تكوين biofim .

Summary

In this study , it had been collected 28 swab from patient suffering a gingivitis , then a biochemical test for identification these isolates were performed according to Bergy's manual, 1994. The results showed appearance of two groups of microorganisms which were bacteria and yeast. The five samples of yeast were neglected in this study and depend just on bacteria, which appear two groups according to Gram's stain. A gram negative bacteria(2 isolates of *Campylobacter* and 4 isolates of *Nisserosis*) and gram positive bacteria(10 isolates of *Lactobacillus* , 2 isolates of *Streptococcus* and 5 isolates *Staphylococcus*). Also it had been performed an antibiotic sensitivity test of a local antibiotic used to treat the patient suffering from gingivitis ,these were (tetracycline, vancomycin, clindamycin, ampicillin and chloramphenicol) by following spread on agar method . The result showed that gram positive bacteria were more sensitive (*Lactobacillus* , *Streptococcus* and *Staphylococcus*) than gram egative bacteria (*Campylobacter* and *Nisserosis*) also it had been showed often isolates were resistance to ampicilline except the isolates no.(A5,A6,A8,A12,A13 and A20). Finally it had been detect the ability of these bacteria to form a biofilm according to tube method , which the results were 4 isolates out of 23 showed the ability to produce a strong biofilm, 11 isolates were moderate production of biofilm , 1 isolate was weak for production of biofilm while the rest did not have the ability to produce the biofilm.

المقدمة

يعتبر التسوس من أكثر الاضطرابات شيوعاً التي تصيب الاسنان .. ويحتل تسوس الأسنان المرتبة الثانية بعد نزلات البرد الشائعة من حيث الانتشار ، ويتكرر حدوث التسوس عند الأطفال والبالغين من الصغار في السن، ولكن كل وأي شخص في أي مرحلة عمرية عرضة لإصابة أسنانه بالتسوس . كذلك يعد التهاب اللثة gingivitis أو Oulitis (ulitis) مقدمة لحدوث التهاب بالنسيج المحيط بالاسنان، والذي يشيع تسميته بامراض اللثة.فالتهاب النسيج المحيط بالاسنان هو عبارة عن تدمير العظم والاربطة التي تدعم الاسنان .ان امراض اللثة هي أكثر الاسباب شيوعآ التي تؤدي إلى فقدان الاسنان بعد سن البلوغ. والمصطلح الانجليزي الذي يعني "التهاب النسيج المحيط بالاسنان" مشتق من الكلمة الإغريقية التي تعني "ما حول الاسنان"، وهو يشير إلى الاجزاء التي تدعم الاسنان وتثبتها، وتشمل الغمد العظمي الذي تنغرس فيه السن والمادة الملينة بالكولاجين والمسماه بالرابط المحيط بالاسنان والذي يربط بين جذر السن والعظم . من اهم العوامل التي تسبب التهاب اللثة هو تكون اللويحة الجرثومية والتي هي عبارة عن Biofilm والذي يمكن تعريفه على انه الطبقة المتكونة من السكريات الخارجية التكوين (exo polysaccharide), بروتينات و دنا الخلايا التي تحيط به نفسها اجناس مختلفة من الاحياء المجهرية الملتصقة مع بعضها على سطح معين والتي تتكون كاستجابة لمؤشرات بيئية معينة (1).

من العوامل التي تساعد على تكوين biofilm هو وجود سطح بروتيني للالتصاق , شد سطحي, بروتينات خارج خلوية , autolysin , adhesion واخيرا الغذاء. تنتج الكثير من الاحياء المجهرية biofilm لانه يعتبر كعامل من عوامل الضراوة في احداث الكثير من الامراض والتي تساعدها في مقاومة الكثير من المضادات الحيوية والمطهرات من خلال منع نفوذها من خلال هذه الطبقة الواقية , من اهم هذه البكتيريا هي *Staphylococcus, Streptococcus ,Bacillus subtilis, Nisserosis, Pseudomonas lactobacillus* وغيرها . لقد لوحظ ان تكون biofilm له علاقة في احداث الكثير من الامراض مثل التهاب المجاري البولية, التهاب الاذن الوسطى , تكون اللويحة الجرثومي في الاسنان , التهاب اللثة, التهاب شغاف القلب , التهاب الجيوب الانفية و التهاب القزحية المتسببة بواسطة العدسات اللاصقة (3,2) .

الميكانيكية التي تتبعها الخلايا في تكوين biofilm هي التصاق مبدئي على السطح المناسب , تكاثر الخلايا على السطح الملتصقة به و اخيرا انتاج الخلايا متعدد السكريد لتكوين biofilm. (4).

نظرا الى كثرة استخدام المضادات الحيوية وبشكل خاطيء قد انشىء حدوث مقاومة واضحة من قبل البكتيريا ضد الكثير من المضادات الحيوية والذي جعل من الصعوبة معالجة هذه الالتهابات بشكل صحيح. هذه العوامل مجتمعة ادت الحاجة الى الكشف عن اسباب مقاومة البكتيريا المتواجدة في الفم للكثير من المضادات الحيوية لذا كان الهدف من الدراسة هو :

1. عزل وتنقية وتشخيص الاحياء المجهرية من الاشخاص الذين يعانون من التهاب اللثة.
2. فحص حساسية هذه البكتيريا لمجموعة من المضادات الحيوية التي تستخدم محليا ضد الامراض التي تسببها هذه البكتيريا.
3. الكشف عن قدرة البكتيريا المعزولة من الاسنان على تكوين biofilm

المواد وطرق العمل

1 - جمع العينات

جمعت 25 مسحة باستخدام swab من عدة اشخاص مصابين بالتهاب اللثة المشخصين من قبل الطبيب الاختصاص . نقلت هذه المسحات الى المختبر وزرعت على الوسط المغذي الصلب وحضنت على درجة حرارة 37 درجة مئوية لمدة 24 ساعة لغرض التنقية والتشخيص.

2. تشخيص البكتيريا

لغرض تشخيص البكتيريا اجريت الاختبارات الاتية على وفق ما جاء به (5) . والتي شملت الخصائص المظهرية وبعض الفحوصات الكيموحيوية

3.اختبار مقاومة العزلات للمضادات الحيوية بطريقة الاقراص Disc method Kirby Bauer method (6)

اختبرت حساسية العزلات تجاه عدد من المضادات الحيوية والتي استعملت بشكل اقراص جاهزة. (التيتراسايكلين, الفانكومايسين, الكلندامايسن, الامبسيلين والكلورامفينيكول).

اذ لقح 5ml من المرق المغذي بمستعمرة واحدة من احدى العزلات البكتيرية وحضنت بدرجة حرارة 37 درجة مئوية لمدة 24 ساعة ثم نشر 0.1ml باستعمال الناشر الزجاجي على اطباق من وسط مولرهنتون الصلب ثم تركت الاطباق بدرجة حرارة الغرفة لتجف ثم وضعت اقراص المضادات الحيوية على سطح الوسط وتحت ظروف معقمة ثم حضنت الاطباق على درجة حرارة 37 درجة مئوية لمدة 24 ساعة . قيست اقطار مناطق التثبيط باستخدام المسطرة وسجلت النتائج وفق قطر الهالة (التي تعطي دلالة على منع النمو) اعتمادا على المسافات القياسية لقطر الهالة التي تتوافر في النشرات التي زودت من الشركة المنتجة لهذه المضادات. وقورنت مع مناطق التثبيط القياسية المثبتة من قبل (CLSI, 2010).

4.الكشف عن تكوين biofilm

اتبعت طريقة الانبوبة (tube method) الموصوفة من قبل (7) اذ تم تلقيح وسط تربتكيز صويا السائل (trypticase soya broth) المزود بـ 10% كلوكوز بمستعمرة بكتيرية منماة على الوسط المغذي الصلب بعمر 24 ساعة. حضنت انابيب الاختبار على درجة حرارة 37 درجة مئوية لمدة 24 ساعة.فرغت انابيب الاختبار من الوسط الحاوي على البكتيريا ثم غسلت بمحلول الداريء الفوسفاتي (pH 7.3) ثم تركت لتجف .بعدها صبغت بواسطة صبغة crystal violet بتركيز 0.1 % . بعدها غسلت الصبغة الزائدة بواسط الماء المقطر وتركت الانابيب بالشكل المقلوب لتجف.

النتيجة الموجبة لتكوين الbiofilm تحدد من خلال ملاحظة ظهور الصبغة على جدار وقعر انابيب الاختبار وتكون قراءة النتائج على النحو الاتي(قوي , وسط , ضعيف , لا يوجد)

النتائج والمناقشة

1 .الفحوصات التشخيصية والبايوكيميائية

تم تشخيص 28 عزلة من مجموع 25 مسحة لثة باستخدام swab من اشخاص مصابين بالتهاب اللثة , اجريت عليها الفحوصات التشخيصية بالاعتماد على (5) والتي شملت فحص شكل الخلية تحت ا لمجهر , صبغة الكرام , الكشف عن السبورات، النمو على وسط الماكونكي, النمو على وسط المانتول، فحص تحلل الدم وفحص الكاتاليز . حيث يوضح جدول رقم (1) نتيجة هذه الفحوصات ظهور مجموعتين من الاحياء المجهرية والتي هي البكتيريا والخمائر . بالنسبة للخمائرفقد ظهرت 5 عينات اهملت العزلات واقتصرت الدراسة فقط على البكتيريا . ظهرت مجموعتين من البكتيريا حسب صبغة الكرام والتي شملت البكتيريا السالبة لصبغة الكرام حيث ظهرت عزلتين تعود لجنس *Compylobacter* و 4 عزلات تعود لجنس *Nisserosis* اما باقي العزلات فقد كانت ضمن مجموعة البكتيريا الموجبة لصبغة الكرام والتي ظهرت ثلاث اجناس مختلفة 10 تعود لجنس *Lactobacillus* و2 تعود لجنس *Streptococcus* و5 تعود لجنس *Staphylococcus* .

لقد لوحظ من المسحات التي تم جمعها من الاشخاص المرضى ان هناك بعض المسحات عند زرعها على الوسط المغذي الصلب ظهور اجناس مختلفة تتراوح بين بكتيريا وخمائر وبعض الاشخاص اقتصرت فقط على البكتيريا السالبة والموجبة لصبغة الكرام وعدد قليل جدا اظهرت الاوساط الزرعية التي تم نشر المسحات عليها نمو عدد قليل جدا من البكتيريا الموجبة لصبغة الكرام . هذا السبب قد يعود على النظافة الشخصية للفرد من خلال التنظيف المستمر والعناية الدائمة بنظافة الاسنان وتجنب تراكم بقايا الاكل التي تساهم في توفير الظروف الملائمة لنمو الاحياء المجهرية عليها والتسبب في المشاكل التي يعاني منها الكثير من الاشخاص من التهابات اللثة.(9,8)

توافقت هذه النتائج مع دراسة اخرى اجريت من قبل (4) حيث عزل الاجناس الاتية من اللويحة الجرثومية في الاسنان(*S. mutans and S. sobrinus and lactobacilli*) .

جدول(1): الفحوصات التشخيصية والبايوكيميائية

رقم العينة	صبغة الكرام	شكل الخلية	الكشف عن السبورات	النمو على الماكونكي	النمو على المانيتول	فحص تحلل الدم	فحص الكاتاليز	نوع البكتيريا
A1	G^{-ve}	Rod		-	-			*Compylobacter*
A2	G^{+ve}	Rod	Non	-	-	+	-	*Lactobacillus*
A3	/	/	/	/	/	/	/	*Candida*
A4	G^{-ve}	Cocci		+مستعمرات وردية	-		+	*Nisserosis*
A5	G^{+ve}	Rod	Non	-	-	+	-	*Lactobacillus*
A6	G^{-ve}	Rod		-	-			*Campylobacter*
A7	G^{+ve}	Cocci		-	-	+	+	*Streptococcus*
A8	G^{-ve}	Cocci		+مستعمرات وردية	-		+	*Nisserosis*
A9	/	/	/	/	/	/	/	*Candida*
A10	/	/	/	/	/	/	/	*Candida*
A11	/	/	/	/	/	/	/	*Candida*
A12	G^{+ve}	Cocci		-	+	+	+	*Staphylococcus*
A13	G^{-ve}	Cocci		+مستعمرات وردية	-		+	*Nisserosis*
A14	G^{+ve}	Rod	Non	-	-	+	-	*Lactobacillus*
A15	G^{+ve}	Rod	Non	-	-	+	-	*Lactobacillus*
A16	G^{+ve}	Rod	Non	-	-	+	-	*Lactobacillus*
A17	G^{+ve}	Rod	Non	-	-	+	-	*Lactobacillus*
A18	G^{+ve}	Rod	Non	-	-	+	-	*Lactobacillus*
A19	G^{+ve}	Cocci	Non	-	+	+	+	*Staphylococcus*
A20	G^{+ve}	Cocci	Non	-	+	+	+	*Staphylococcus*
A21	G^{+ve}	Cocci		-	-	+	+	*Streptococcus*
A22	G^{+ve}	Cocci	Non	-	+	+	+	*Staphylococcus*
A23	G^{+ve}	Cocci	Non	-	+	+	+	*Staphylococcus*
A24	G^{-ve}	Cocci		+مستعمرات وردية	-		+	*Nisserosis*
A25	G^{+ve}	Rod	Non	-	-	+	-	*Lactobacillus*
A26	G^{+ve}	Rod	Non	-	-	+	-	*Lactobacillus*
A27	G^{+ve}	Rod	Non	-	-	+	-	*Lactobacillus*
A28	/	/	/	/	/	/	/	*Candida*

2. اختبار حساسية البكتيريا للمضادات الحيوية

لغرض اختبار حساسية البكتيريا التي تم عزلها من الاسنان تجاه مجموعة من المضادات الحيوية المستخدمة محليا لعلاج العديد من الامراض المتسببة بفعل تلك العزلات البكتيرية وفي ضوء ذلك تم اختبار مجموعة من المضادات شملت التيتراسايكيلن ، الفانكومايسين ، الكلندامايسين ، الامبسلين والكلورامفينيكول . حيث تم اتباع طريقة الانتشار في الاكار (6) وقد اثبتت هذه الطريقة كفاءتها العالية في التجربة حيث تم نشر البكتيريا بشكل متجانس على الوسط الزرعي وبكثافة محددة لان زيادة النمو يؤدي الى صغر قطر منطقة التثبيط (10) .

واهم ما يمكن استنتاجه من الجدول (2) هو ان البكتيريا الموجبة لصبغة الكرام والمتمثلة بـ *Staphylococcus* *Lactobacillus, Streptococcus*, اكثر حساسية للمضادات الحيوية مقارنة بالبكتيريا السالبة لصبغة الكرام المتمثلة ببقية السلالات(*Compylobacter*, *Nisseria*) وقد يعود سبب هذا الاختلاف الى اختلاف تركيب الغشاء الخارجي outer membrane الذي يكون نفاذا لمعظم المضادات الحيوية في البكتيريا الموجبة مقارنة بالبكتيريا السالبة (11)

كذلك لوحظ ان اغلب العزلات البكتيرية ابدت مقاومة واضحة للامبسلين باستثناء العزلات رقم (A5,A6,A8,A12,A13,A20) ويمكن تفسير هذه النتائج على اساس الاستخدام الواسع للمضاد الحيوي الامبسلين لانها اصبحت

قادرة على انتاج انزيم β-lactamase وتحويله الى مركب غير فعال(12). أما فيما يخص مقاومة البكتيريا السالبة لعدد من المضادات الحيوية فقد يعود السبب الى ان غشاءها الخارجي يمتلك حاجزا ذاتيا يتمثل بمعقد السكريد الشحمي lipopolysaccharide المشترك مع البروتينات المعقدة والتي بدورها تكون قادرة على منع مرور الكثير من المضادات الحيوية الى داخل الخلية او حدوث طفرات وراثية في الغشاء الخلوي تؤدي الى منع مرور المضادات الحيوية المؤثرة (13) . ومما تجدر الاشارة اليه الى انه قد تم اختيار وسط مولر هنتون الصلب في اختيار فحص الحساسية للمضادات الحيوية وذلك لسرعة نمو البكتيريا الممرضة المستخدمة في الدراسة وبدون اضافة مغذيات الى الوسط اضافة الى ثبوتية الرقم الهيدروجيني الذي لا يتداخل مع فحس الحساسية (10) .

وبالتالي يمكن ان نستنتج ان مشكلة ظهور سلالات بكتيرية مقاومة لفعل المضادات التقليدية سببها المعالجة الجزئية للامراض التي تسببها السلالات فهذه المعالجة تستغرق مدة طويلة دون ان يتلقى المرضى علاجا كاملا مما يسمح للجراثيم بالتحول بصورة جوهرية واكتساب مقاومة ضد العقاقير الطبية (14).

جدول(2): يوضح فحص الحساسية للعينات المشخصة

Chloramphenicol	Ampicilline	Clindamycine	Vancomycine	Tetracycline	رقم العينة
S	R	S	R	I	A1
S	R	S	R	R	A2
/	/	/	/	/	A3
R	R	R	R	R	A4
R	S	S	S	R	A5
R	S	S	S	S	A6
R	R	R	S	R	A7
R	S	R	S	S	A8
/	/	/	/	/	A9
/	/	/	/	/	A10
/	/	/	/	/	A11
S	S	S	S	I	A12
S	S	R	R	S	A13
R	R	R	S	R	A14
S	R	S	S	S	A15
R	R	R	I	R	A16
R	R	S	R	S	A17
S	R	S	I	S	A18
S	R	S	S	S	A19
S	S	S	S	S	A20
S	R	S	S	S	A21
R	R	R	R	R	A22
S	R	S	S	S	A23
R	R	R	R	S	A24
R	R	S	I	S	A25
S	R	S	S	S	A26
S	R	S	S	S	A27
/	/	/	/	/	A28

3 . قدرة البكتيريا على انتاج الـ Biofilm

تم الكشف عن قدرة الاحياء المجهرية على تكوين ال biofilm باتباع طريقة tube method , حيث اظهرت النتائج المبينة في الجدول (3) ان 4 عينات من مجموعة 23 عينة قدرتها على انتاج biofilm بشكل(قوي) و11 عينة كانت قدرتها متوسطة على انتاج الـ biofilm وعينة واحدة ضعيفة اما باقي العينات فليست لها القدرة على تكوين biofilm .

من جهة اخرى عند مقارنة هذه النتائج مع نتائج فحص الحساسية تجاه بعض المضادات الحيوية المستخدمة قيد الدراسة لوحظ ان هناك علاقة بين انتاج ال biofilm وحساسيتها تجاه هذه المضادات فقد لوحظ ان العينات التي اظهرت قوة في انتاج ال biofilm كانت العينات مقاومة للامبسلسن والفانكومايسن والتتراسايكلين بصورة عامة اما العينات التي اظهرت نتيجة وسط تجاه المضادات ايضا ابدت مقاومة واضحة تجاهها لكن بنسب اقل من السابق تقريبا. اما العينات التي لم تنتج biofilm فقد كانت حساسة لكل المضادات الحيوية المستخدمة تقريبا.

ان العلاقة التي تربط انتاج biofilm بالحساسية ضد المضادات الحيوية علاقة وثيقة حيث ترجع مقاومة البكتيريا لاغلب المضادات الحيوية الى هذا الغشاء الحيوي التي تحيط نفسها معظم البكتيريا المتواجدة في الفم وبشكل مجتمعات على صد نفوذ العقار من خلالها . هناك عوامل تزيد من احتمال تكون biofilm والتي تشمل ارتفاع الرقم الهيدروجيني , قلة انسياب اللعاب , ارتفاع سكر الدم , لذا من طرق تجنب تكون اللويحة الجرثومية والتي هي بطبيعة الحال تعتبر biofilm يكون من خلال النقاط الاتية (15) القضاء على اللويحة الجرثومية بتفريش الأسنان حيث ان مادة الفلورايد الموجودة في معاجين الاسنان لا يعمل فقط على حماية طبقة المينا في الاسنان وانما يعمل على تخفيض الرقم الهيدروجيني من خلال تثبيط وظيفة بعض الانزيمات المسؤولة عن glycolysis الناتج من تناول بعض الاطعمة التي تحتوي على سكريات., تنظيف مابين الأسنان بالخيط السني . عمل تدليك للثة كل فترة لتنشيط الدورة الدموية في اللثة وهناك أنواع gel خاصة لذلك كما يمكنك استخدام السواك الذي يفيد في تنشيط الدورة الدموية , إزالة العوامل المسببة للالتهاب اللثوي و الزيارة الدورية لطبيب الأسنان.(7and 17,16).

جدول (3) يوضح نتائج الكشف عن قدرة الاحياء المجهرية المعزولة من الاسنان على تكوين biofilm

رقم العينة	النتيجة
A1	قوي
A2	قوي
A3	/
A4	وسط
A5	وسط
A6	وسط
A7	وسط
A8	وسط
A9	/
A10	/
A11	/
A12	لا يوجد
A13’	قوي
A14	ضعيف
A15	لا يوجد
A16	وسط
A17	وسط
A18	وسط
A19	لا يوجد
A20	وسط
A21	قوي
A22	وسط
A23	لا يوجد
A24	وسط
A25	لا يوجد
A26	لا يوجد
A27	لا يوجد
A28	/

Refrences

1. **Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets.(2002) Periodontology. 28:12–55.**
2. **Gilbert P,Maira-Litran T,McBain AJ,Rickard AH,Whyte FW.The physiology and collective recalcitrance of microbial biofilm communities.(2002).Adv Microb Physiol. 46:203–255.**
3. **Donlan RM, Costerton W. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant Microorganisms.(2002) Clinical microbiological review. 15(2): 167-193.**
4. **Marsh P . Dental plaque as a biofilm and a microbial community – implications for health and disease .(2006) . BMC Oral Health. 6(Suppl 1): S14**
5. **Bergey's Manual of determinative bacteriology (1994) . 9th Williams and Wilkins,USA.**
6. **Egorove ,N.S. Antibiotic scientific approach .(1985). Mir publishers , Moscow.**
7. **Bradshaw DJ, McKee AS, Marsh PD. Effects of carbohydrate pulses and pH on population shifts within oral microbial communities in vitro.(1989). J Dent Res. 68:1298–1302**
8. **Bradshaw DJ, Marsh PD, Hodgson RJ, Visser JM. Effects of glucose and fluoride on competition and metabolism within in vitro dental bacterial communities and biofilms. (2002) .Caries Res. 36:81–86. [PubMed[**
9. **Marsh PD. Microbiologic aspects of dental plaque and dental caries.(1999). Dent Clin North Amer. 43:599–614.**
10. **Barry A. L. The antimicrobial susceptibility tests:principle and practices(1976). Lea and Febiger-Philadelphia.**
11. **Jawetz, E. ; Melnick , J.L. and Adelberg , E.A. Review of medical microbiology. (1987) 17th ed . Appleton and lang.**
12. **Goodman L.S. and Gillman ,S. The pharmacological basis of therapeutics, (1985). 5th ed . Macmillan publishing CO.Inc. New York , Collier Macmilan CANADA ltd Toronto, Bailliere Tindall, London.**
13. **Gilleland, H.E. and Murray, R.C. Adaptive alteration in the outer membrane of gram negative bacteriaduring human infection. .(1988). Can.J. Microbiol. 34:499-502.**
14. **Moor, R.A. ; Bares , N.C. and Han cock, R.E.W. Interaction of polycataionic antibiotic with *Pseudomonas aeruginosa* , lipopoly saccharide and studies by using dansyl polymexin, (1986). Antimicro. Agents chemther. 29(3):496-500.**
15. **Radshaw DJ, Marsh PD, Hodgson RJ, Visser JM. Effects ofglucose and fluoride on competition and metabolism within in vitro dental bacterial communities and biofilms. (2002) .Caries Res. 2002;36:81–86.**
16. **Bradshaw D.J, McKee AS, Marsh PD. Effects of carbohydrate pulses and pH on population shifts within oral microbial communities in vitro.(1989). J. Dent Res.**