P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703
2016,10 (3) :39-46

مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة (JUAPS)

Open Access

دراسة تأثير زيت الزنجبيل على المحتوى البلازميدي والغشاء الحيوي لبكتريا *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* المعزولة من الأسنان

فاطمة عبدالعزيز عواد   ليث مصلح نجيب

جامعة الأنبار – كلية العلوم

معلومات البحث:

تاريخ التسليم: 2013/00/00
تاريخ القبول: 2017/03/30
تاريخ النشر: 27 / 12 / 2017
DOI: 10.37652/juaps.2016.134881

الكلمات المفتاحية:

زيت الزنجبيل،
Staphylococcus aureus،
Escherichia coli،
الغشاء الحيوي،
البلازميد.

الخلاصة:

تضمنت الدراسة جمع 52 عينة سريرية من مرضى يعانون من خمج الاسنان، وأجريت الاختبارات المجهرية والكيموحيوية، واستخدمت الأوساط الانتقائية لتشخيص العزلات البكتيرية المعزولة من الأسنان، فأظهرت نتائج هذه الدراسة وجود بكتريا *Staphylococcus aureus* بنسبة 21.3% وبكتريا *Escherichia coli* بنسبة 10.7%. دُرس تأثير أربعة عشر مضاداً حيوياً على كافة العزلات البكتيرية المتحصل عليها، والبالغ عددها 48 عزلة بطريقة الانتشار حول الأقراص، وتم اختيار العزلتين الأكثر مقاومة للمضادات الحياتية حيث ظهر أنها تمتلك نمط المقاومة المتعددة تجاه 11- 12 مضاداً حيوياً من مجموع أربعة عشر مضاداً. تم التحري عن الغشاء الحيوي للبكتريا قيد الدراسة، وأوضحت النتائج قابلية النوعين البكتيريين على تكوينه. جُمع الزنجبيل وشُخص في معشب كلية العلوم/جامعة بغداد، وتم استخلاص الزيت وتقدير السمية الخلوية والدالة الحامضية والتركيز المثبط الأدنى(MIC) له تجاه البكتريا قيد الدراسة. أظهرت نتائج التحليل الاحصائي بأن العزلتين المنتخبتين قد فقدت قابليتهما على إنتاج الغشاء الحيوي، كما اختبرت قابلية زيت الزنجبيل على تحييد البلازميدات، فبينت النتائج قابليته على تحييدها.

المقدمة:

من المشاكل التي تواجه العالم اليوم، ما يسمى بالحرب غير المعلنة ما بين الجراثيم والمضادات الحياتية؛ فمعظم هذه الجراثيم تمتاز بمقاومتها العالية للمضادات الحياتية لامتلاكها العديد من عوامل الضراوة (1)، التي من ضمنها تكوين الغشاء الحيوي biofilm. إن الاستخدام المفرط للمضادات الحياتية أدى إلى مقاومة البكتريا لهذه المواد(2). وعلى الرغم من انتاج العديد من المضادات الحيوية واستعمالها في الصناعات الدوائية، فقد ظهرت الكثير من سلالات البكتريا المقاومة للمضادات؛ فكان لا بد من ايجاد بدائل؛ لذلك استخدمت العديد من المستخلصات النباتية في الوقت الحاضر لعلاج الامراض وبالأخص الإصابات البكتيرية (3,4).

* Corresponding author at: University of Anbar - College of Science
E-mail address:

اتجهت الدراسات العالمية الحديثة إلى استخدام المواد الطبيعية، ومنها الزيوت الطيارة للقضاء على البكتريا المسببة للأمراض لأسباب عدة أهمها وفرتها، سهولة الحصول عليها، وقلة كلفتها، والأهم من هذا كله هو انها اكثر أماناً لقلة تأثيراتها الجانبية (5).

يعد تجويف الفم بيئة صالحة لنمو الميكروبات؛ لكونها بيئة رطبة ومظلمة تحافظ على درجة حرارة ثابتة نسبياً (35 – 36) °م وأس هيدروجيني (6.75-7.25) وهي الدرجة المثلى لنمو العديد من الأحياء المجهرية، كما أن وجود المغذيات جعل الفم موطناً لمجموعة كبيرة ومتنوعة من البكتيريا، ويعد الغشاء الحيويّ أحد مصادر العدوى (6).

أُدرج الزنجبيل ضمن النباتات الطبية بمدى واسع من الاستخدامات العلاجية. وتشير التحاليل الكيمياوية الى احتواء الزنجبيل على مركبات فعالة ضد عدد من الأحياء المجهرية، وهذه المركبات هي gingerols،Zingiberol ،Linalool ،Camphene ،Eucalypyol وzingerone، كما يحتوي زيوت طيارة مكونة من المركبات sesquiphellandrene ،phenyl propanoid،sesqiterpenoids

bisabolene، farnesene، cineol (7). ولقد بين Bhargava وجماعته (2012) أن رايزومات الزنجبيل تحتوي على (1–4)% زيوت طيارة التي تتكون من الهيدروكاربونات السسكويتربينية (Sesqiterpene hydrocarbones) وهي المركبات المسؤولة عن الرائحة الاروماتية للزنجبيل، وتضم هذه المركبات مركب Zingberen ومركب ar-cucumenc ومركب sesquiphellandrene بالاضافة الى مركب B-basabolene كما تحتوي الزيوت الطيارة للزنجبيل على كحول والديهايدات، وهي المسؤولة عن الطعم المميز للزنجبيل، ويحوي الزنجبيل ايضاً على ماء وبروتينات ونشا ودهون وكالسيوم وفسفور وفيتامينات منها A، C والياف (8). كما أوضح Miloš وجماعته (2014) أن للزنجبيل فعالية كبيرة ضد أنواع من البكتريا منها *Escherichia coli*، *Staphylococcus aureus* و *Pseudomonas aeruginosa* (9).

هدفت الدراسة الحالية إلى عزل بكتريا *Staphylococcus aureus*وبكتريا *Escherichia coli* من الأسنان ودراسة حساسيتها تجاه مجموعة من المضادات الحياتية، والتحري عن تكوين الغشاء الحيوي للأنواع البكتيرية المقاومة لأغلب المضادات الحياتية، ودراسة دور زيت الزنجبيل في تثبيطه، كما تم التحري عن البلازميدات المسؤولة عن بعض صفات عوامل الضراوة، ودور زيت الزنجبيل في تحييدها.

المواد وطرائق العمل

عزل وتشخيص البكتريا

تم جمع 52 عينة من المرضى الذين يعانون من تسوس الأسنان من المركز الصحي التخصصي لطب الأسنان في العامرية في محافظة بغداد والمستشفى التعليمي لكلية طب الأسنان/ جامعة الأنبار في الموقع البديل/ ابو غريب للمدة ما بين 5/كانون الثاني/2016 ولغاية 25/ نيسان/ 2016.

استخدمت مسحات قطنية معقمة (Sterile swabs) لأخذ العينات، وزرعت على وسط الدم الصلب والماكونكي الصلب. حضنت الإطباق عند درجة حرارة 37°م لمدة 24 ساعة، ثم اختيرت المستعمرات المفردة من أوساط العزل الأولي، وأعيد زرعها مرة أخرى على أطباق جديدة من الوسط نفسه، فضلاً عن استخدام أوساط اختيارية مثل المانيتول الملحي الصلب إلى أن حصلنا على عزلات نقية من البكتريا، بعدها نقلت هذه المستعمرات إلى وسط الأكار المغذي المائل ثم حضنت بدرجة 37°م ولمدة 24 ساعة، ثم حفظت بدرجة (4) °م لحين إجراء الاختبارات مع مراعاة تجديدها شهرياً بالطريقة نفسها (10).

دُرست الصفات الزرعية والمجهرية للمستعمرات النامية على الأوساط الزرعية قيد الدراسة وكما جاء في طريقة Collee وجماعته (1996) (11). واجريت الاختبارات الكيموحيوية مثل الكتاليز والاوكسديز والاندول وأحمر المثيل والفوكس بروسكاور واستهلاك السترات واختبار الحركة وتخمر سكر اللاكتوز واختبار التنمية على وسط حديد ثلاثي السكر و انتاج انزيم التجلط وتخمر المانيتول (12) و(13).

اختبار الحساسية للمضادات الحياتية

استخدم 14 مضاداً حياتياً وذلك باتباع طريقة الانتشار بالأقراص Disk diffusion method بالاعتماد على طريقة Bauer وجماعته (1966) (14). اعتبرت البكتريا مقاومة اذا وصل قطر التثبيط حسب ما مؤشر في المواصفات القياسية الواردة في (2013) (CLSI) Clinical and Laboratory Standards Institute. وتم تشخيص البكتريا الأكثر ضراوةً ومقاومةً للمضادات الحياتية باستخدام جهاز الفايتك.

التحري عن انتاج الغشاء الحيوي للبكتريا قيد الدراسة

اعتمدت طريقة Christensen وجماعته (1982) (15) في الكشف عن قابلية العزلات البكتيرية لتكوين الغشاء الحيوي بطريقة الانابيب وطريقة Dheepa وجماعته (2011) (16) باستعمال اطباق المعايرة الدقيقة وتمت الحسابات وفق المعادلات المتبعة من قبل Kwiecinska-Piróg وجماعته (2014) (17).

تحضير زيت الزنجبيل

جُمع الزنجبيل المستعمل في هذه الدراسة من اسواق العامرية في بغداد، وغُسل بالماء لإزالة الاتربة، وجفف في المختبر لمدة 7-10 أيام مع مراعاة التقليب المستمر بين الحين والآخر لمنع حدوث التعفن، ثم طُحن بوساطة مطحنة كهربائية، وحفظ في أكياس بلاستيكية نظيفة جافة تحت درجة حرارة (4) م لحين الاستعمال. شُخص الزنجبيل في معشب جامعة بغداد في كلية العلوم.

استخلص الزيت بطريقة التقطير بالبخار باستخدام جهاز الـ (Clevenger) (18). حُضر المحلول القياسي الخزين Stock solution للمستخلص الخام بتركيز 0.2 مليلتر / مليلتر وذلك باضافة 2 مليلتر من الزيت في 10 مليلتر من Dimethyl

sulfoxide، وعقم المستخلص بمرشحات قطر فتحاتها 0.22 مايكرون.

اتبعت طريقة (Xin-gup, 1994) لتقدير السمية الخلوية لزيت الزنجبيل، وتم تقدير قيمة (pH) باستخدام جهاز pH- meter (19).

تحديد التركيز المثبط الادنى لزيت الزنجبيل (MIC)

استخدمت طريقة Resazurin based microtiter dilution assay (RMDA) مع بعض التحويرات لتحديد التركيز المثبط الأدنى لزيت الزنجبيل (21,20).

تنمية العزلات البكتيرية بالتركيز المثبط الأدنى لزيت الزنجبيل في وسط المرق المغذي واختبار قدرتها على انتاج الغشاء الحيوي الذي تم الكشف عنه سابقاً

أُضيف 100 مايكرو ليتر من التركيز المثبط الأدنى للزيت المستخدم إلى أنابيب تحوي 10 مل من وسط المرق المغذي، ولقحت الأنابيب بالعالق البكتيري بمقدار 100 مايكرو ليتر أيضاً، بعدها حضنت الأنابيب لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37°م وللعزلات الأربع واستخدمت الأنابيب المحضونة للتحري عن الغشاء الحيوي للعزلات البكتيرية بعد المعاملة بالزيت وبنفس الطرق المذكورة سابقاً، وملاحظة تأثير الزيت على قدرة البكتريا لإنتاج الغشاء الحيوي.

دور زيت الزنجبيل في تحييد البلازميد

تم استخلاص الدنا البلازميدي حسب طريقة التحلل القلوي alkaline lysis method قبل المعاملة بزيت الزنجبيل وبعدها، وأجريت عملية الترحيل الكهربائي لفصل خليط الدنا المستخلص وفحصه (22).

التحليل الإحصائي : تم إجراء التحليل الإحصائي باستخدام برنامج Statistical package of social sciences -Version-22 (SPSS) وفقاً للتصميم العشوائي لمعرفة وجود فرق معنوي ام لا، عند مستوى احتمالية أقل من 0.05 (P<0.05) لدراسة تأثير التركيز المثبط الأدنى لزيت الزنجبيل تجاه البكتريا المستخدمة في الدراسة ودوره في إمراضيتها.

النتائج :

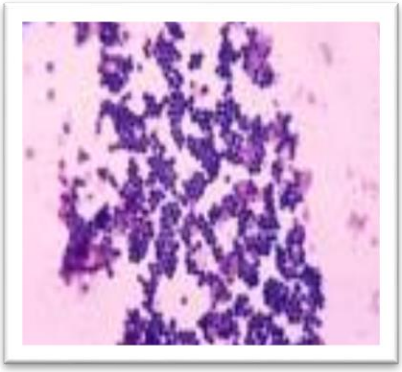
العزل والتشخيص

شُخصت العزلات بالاعتماد على نتائج الفحوصات البكتريولوجية والاختبارات الكيموحيوية واستخدام الأوساط الإنتقائية، إذ تم تشخيص 32 عزلة تعود لبكتريا *Staphylococcus aureus*، و16عزلة تعود لبكتريا *E.coli* وكما موضح في الجدول(1) .

ظهرت مستعمرات المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* ذات لون رمادي على وسط اكار الدم، أما على وسط المانيتول الملحي فقد كانت صفراء ذهبية نتيجة تخميرها لسكر المانيتول كما موضح في الشكل (1). أظهر الفحص المجهري للمستعمرات انها مكورات موجبة لصبغة كرام وكانت متجمعة على شكل عناقيد كما في الشكل (2). كما تميزت العزلات بإنتاجها لإنزيم مخثر البلازما coagulase. ظهرت مستعمرات بكتريا *Escherichia coli* على وسط المكونكي بلون وردي نتيجة تخميرها لسكر اللاكتوز، جافة، ومتوسطة الحجم، ومحدبة كما موضح في الشكل(3). أما النتائج الكيموحيوية الاخرى فيوضحها الجدول (2).

جدول (1): أعداد العزلات البكتيرية المعزولة ونسبها المئوية

الأجناس البكتيرية	عدد العزلات	النسبة المئوية%
Staphylococcus aureus	**32**	**21.3**
Escherichia coli	**16**	**10.7**
اخرى	**102**	**68**
المجموع	**150**	**100**

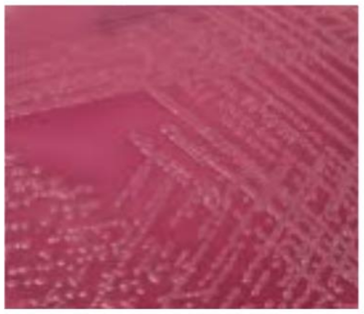


شكل (1) مستعمرات بكتريا *Staphylococcus aureus* على وسط المانيتول الملحي الصلب

شكل (2) بكتريا *Staphylococcus aureus* تحت المجهر الضوئي بالقوة (100 X)

P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703
2016,10 (3) :39-46

Open Access



شكل (3) بكتريا *Escherichia coli* على وسط المكونكي

جدول (2) نتائج الفحص المجهري والكيموحيوي للعزلات البكتيرية المعزولة من خمج الأسنان

الاختبار / اسم العزلة	Gram stain	Motility	Indol	Methyl red	Vogas proskaur	Citrate utilization	Catalase	Oxidase	H_2S	Co_2	Glucose	Lactose	Sucrose
Staph. aureus	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+
E. coli	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+

+ : النتيجة الموجبة   - : النتيجة السالبة

حساسية العزلات البكتيرية للمضادات الحياتية

تم اختبار حساسية العزلات البكتيرية لأربعة عشر مضاداً حيوياً، وصنفت العزلات مقاومة (R) أو متوسطة المقاومة (I) أو حساسة (S) اعتماداً على ما ورد في CLSI (2013)، وأظهرت النتائج أن هناك تفاوتاً في النسب المئوية للعزلات المقاومة لمضادات الحياة كما مبين بالجدول (3).

أظهرت عزلات بكتريا *Staphylococcus aureus* مقاومة عالية تجاه مضادات Methicillin، Lincomycin و Chloramphenicol وبنسبة (96.9%) و (93.7%) و (90.6%) على التوالي، تلاها مضادا Clarithromycin و Amoxicillin وبنسبة (87.5%) و (75%) على التوالي، ثم مضادا Clindamycin و Penicillin وبنسبة (18.7%) و (12.5%) على التوالي، أما مضادا Gentamycin و Erythromycin فقد تساوت نسبة مقاومة العزلات لهما فكانت (6.3%) لكل منهما، كما تساوت نسبة المقاومة تجاه كل من مضادات Ofloxacin، Tetracycline و Vancomycin فكانت (3.1%) لكل منهم، في حين كانت جميع العزلات حساسة للمضادين Levofloxacin و Norfloxacin.

سجّلت العزلات التابعة لبكتريا *E.coli* مقاومة عالية تجاه مضادات Methicillin، Clindamycin، Erythromycin، Penicillin، Lincomycin و Vancomycin وبنسبة (100%)، تليها مضادات Chloramphenicol، Clarithromycin و Amoxicillin بنسبة (12.5%) لكل منهم، في حين كانت جميع العزلات حساسة لكل من Gentamycin، Ofloxacin، Tetracycline، Levofloxacin و Norfloxacin .

تشخيص البكتريا الأكثر مقاومةً للمضادات الحياتية باستخدام جهاز الفايتك

أجري التشخيص التأكيدي للعزلتين الأكثر مقاومة للمضادات الحياتية وهي 19 *Staphylococcus aureus* و 11 *E.coli* باستخدام جهاز الفايتك، من أجل اكمال بقية الفحوصات والتجارب على تلك العزلتين، وقد جاءت نتائج هذا الفحص مطابقة لنتائج الفحوصات الكيموحيوية.

جدول (3) عدد العزلات قيد الدراسة والنسبة المئوية للعزلات المقاومة لمضادات الحياة

المضادات المستخدمة	عدد العزلات والنسبة المئوية للعزلات المقاومة %	
	S.aureus 32	*E.coli* 16
Amoxicillin	24 (75%)	2 (12.5%)
Chloramphenicol	29 (90.6%)	2 (12.5%)
Clarithromycin	22 (87.5%)	2 (12.5%)
Clindamycin	6 (18.7%)	16 (100%)
Erythromycin	2 (6.3%)	16 (100%)
Gentamycin	2 (6.3%)	0 (0%)
Levofloxacin	0 (0%)	0 (0%)
Lincomycin	30 (93.7%)	16 (100%)
Methicillin	31 (96.9%)	16 (100%)
Norfloxacin	0 (0%)	0 (0%)
Ofloxacin	1 (3.1%)	0 (0%)
Penicillin G	4 (12.5%)	16 (100%)
Tetracycline	1 (3.1%)	0 (0%)
Vancomycin	1 (3.1%)	16 (100%)

انتاج الغشاء الحيوي للبكتريا قيد الدراسة

تُعد طريقة أنابيب الاختبار Tube method (TM) تحليلاً نوعياً Qualitative assay للكشف عن قابلية تكوين الغشاء الحيوي ويعتمد سمك وشدة الغشاء الحيوي المرتبط بجدار الأنبوب الداخلي معياراً لكمية الغشاء المنتج، وبينت النتائج أن العزلتين كانت منتجة

للغشاء الحيوي. بينما تعد طريقة أطباق المعايرة الدقيقة Micro–titer plate (MTP) تحليلاً كمياً Quantitative assay للكشف عن قابلية تكوين الغشاء الحيوي؛ إذ يعطي قيمة رقمية للامتصاصية على طول موجي (630) نانوميتر باستعمال جهاز ELISA reader لتحديد كمية الأغشية الحية المتكونة من خلال التصاقها على سطوح أطباق المعايرة، وتمثل الامتصاصية سمك الأغشية الحية المتكونة من قبل العزلات (23).

بيّنت النتائج ان العزلتين كانتا منتجتين للغشاء الحيوي، وبنسبة 100% بالمقارنة مع السيطرة السالبة، حيث أظهرت بكتريا *Staphylococcus aureus* إنتاجية قوية strongly adherent، في حين كان انتاج بكتريا *E.coli* للغشاء الحيوي ضعيفاً Weakly adherent.

الدالة السمية والحامضية لزيت الزنجبيل

بيّنت النتائج عدم وجود سمية خلوية لزيت الزنجبيل وأنه يمتلك أس هيدروجيني (pH 6.5).

تحديد التركيز المثبط الادنى لزيت الزنجبيل MIC

أظهرت النتائج أن التركيز المثبط الأدنى لزيت الزنجبيل تجاه بكتريا *Staphylococcus aureus* هو 1/4 وتجاه بكتريا *Escherichia coli* هو 1/8.

تأثير زيت الزنجبيل على انتاج الغشاء الحيوي

استخدم التركيز المثبط الأدنى لزيت الزنجبيل في تثبيط انتاج الغشاء الحيوي لعزلتي *Staphylococcus aureus* و*Escherichia coli*، وقد تبين بعد اضافة التركيز المثبط الأدنى للزيت أنه مثبّطاً للغشاء الحيوي المنتج من قبل العزلتين. أظهر التحليل الإحصائي وجود فروقات معنوية واضحة بمستوى معنوية (P<0.05) في إنتاج الغشاء الحيوي قبل المعاملة بزيت الزنجبيل وبعد المعاملة، بحيث لم تكن هناك فروقات معنوية بين الكثافة الضوئية للعزلات بوجود الزيت وبين معامل السيطرة، كما موضح في الجدول (4).

جدول (4) مقارنة بين الكثافة الضوئية (OD) للتحري عن تكون الغشاء الحيوي للعزلات البكتيرية قبل وبعد المعاملة بزيت الزنجبيل

اسم العزلة	الكثافة الضوئية قبل المعاملة	الكثافة الضوئية بعد المعاملة	الكثافة الضوئية للسيطرة السالبة (control)
Staphylococcus aureus	a 1.026	b 0.1036	b 0.1006
Escherichia coli	a 0.591	b 0.116	b 0.1006

* تشير الحروف المتشابهة الى عدم وجود فرق معنوي والمختلفة الى وجود فرق معنوي عند مستوى احتمالية اقل من (0.05).
* بيانات الجدول : هي معدل لقراءة ثلاث مكررات قورنت بالكثافة الضوئية للسيطرة السالبة.

تأثير زيت الزنجبيل في تحييد بلازميد البكتريا

وُجد من الترحيل الكهربائي للدنا البلازميدي المعزول من العزلات البكتيرية قيد الدراسة ان كلاً منها تمتلك بلازميداً واحداً (شكل-4)، كما تمت دراسة تأثير زيت الزنجبيل في تحييد بلازميد بكتريا *Staphylococcus aureus* وبكتريا *E.coli* ، وذلك بمعاملة هذه العزلات بالتركيز المثبط الأدنى، والمؤثر في انتاج عوامل الضراوة قيد الدراسة للبكتريا، وقد بيّنت النتائج قابلية زيت الزنجبيل على تحييد البلازميدات من خلال الترحيل الكهربائي لدنا البلازميدي الصورة (7).

Plasmid DNA

شكل (4) الترحيل الكهربائي للدنا البلازميدي المستخلص من العزلات البكتيرية قيد الدراسة باستخدام هلام الاكاروز بتركيز 1% و 75 فولت لمدة ساعة ونصف (المسار3 : دنا بلازميدي لبكتريا *Staph.aureus* معامل بزيت الزنجبيل، المسار 4 : دنا بلازميدي لبكتريا *Staph.aureus* ، المسار 5 : دنا بلازميدي لبكتريا *E.coli* ، المسار 6 : دنا بلازميدي لبكتريا *E.coli* معامل بزيت الزنجبيل.

المناقشة

تمتلك أغلب العزلات قيد الدراسة ظاهرة تعدد المقاومة التي تعد من المشاكل الخطيرة التي تواجه علاج اصابات هذه البكتريا وتجعل عملية ايجاد علاج ملائم مسألة صعبة (22). وهذه المقاومة قد يكون سببها تغير الغشاء الخارجي للجرثومة عن طريق فقدان فتحات الغشاء الخارجي Outside membrane porins والذي يقوم بوظيفة نقل المضاد إلى داخل الخلية (24)، وهو ما يعرف بالضخ الخارجي أو الدفقefflux pump ، وهذا ما أكدهMims وجماعته (2004) أي نظام ضخ الدواء إلى الخارج، ويؤدي إلى تقليل تراكيز المضادات الحياتية في مواقع الهدف(25)، كما بين بعض الباحثين وجود تفاعل وتداخل بين إنزيمات البيتالاكتامز الكروموسومية واسعة الطيف،

ومضخات الدفق المتعددة للعقاقير Efflux system (26)، فضلا عن وجود جينات المقاومة المتعددة للمضادات لدى بعض الأنواع البكتيرية (27).

قد تكون مقاومة المضادات الحيوية محمولة على بلازميد يشفر لصفة المقاومة لأكثر من مضاد حيوي واحد، ومن ثم قد تنتقل المقاومة المتعددة بين البكتريا المرضية المختلفة، وقد اشار Mushtaq وجماعته (2004) إلى تطور وانتشار المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية المحمولة على بلازميد متحرك بين البكتريا المرضية (28)، كما ان المقاومة العالية تجاه هذه المجموعة من المضادات تعود الى الاستخدام غير الصحيح وبجرع غير صحيحة مما ولد مقاومة لدى البكتريا تجاه هذه المضادات، إذ وجد Askoura وجماعته (2011) أن ازدياد مقاومة البكتريا لعدد من المضادات تزداد بزيادة استهلاك هذه المضادات(29).

نستنتج مما سبق أن عزلتي *Staph.aureus* و *E.coli* يمكن ان تكون لديها اكثر من آلية مقاومة للمضادات الحيوية، كأن تكون قادرة على تكوين الغشاء الحيوي، ولديها حاجز نفاذية يمنع دخول جزيئات المضاد ، كذلك ممكن أن تكون منتجة لأنزيمات البيتالاكتاميز واسعة الطيف، أو قادرة على أنجاز أنظمة الدفق والتي تعمل على تقليل تركيز المضاد في الخلية، أو أنها تعمل على تغيير مواقع الهدف أو مواقع الارتباط بالبروتينات المرتبطة بالبنسلين، وبالتالي عدم تعرف المضاد على الموقع الهدف في الخلية البكتيرية. كل هذه ممكن أن تشكل أسباب مقاومة عزلاتنا لأكثر المضادات الحيوية.

إن ارتفاع النسبة المئوية لقابلية العزلات البكتيرية التي شملتها الدراسة الحالية على إنتاج الغشاء الحيوي، يفسر ارتفاع نسب المقاومة من قبل هذه العزلات تجاه جميع المضادات الحياتية المستعملة في اختبار مقاومة العزلات قيد الدراسة تجاه المضادات الحياتية، كون جميع العزلات تمتلك عامل الضراوة (القابلية على إنتاج الغشاء الحيوي)، إذ يلعب الغشاء الحيوي دوراً كبيراً في إمراضية البكتريا و مقاومتها للعديد من المضادات الحياتية ،لأنها تكون مغمورة في بروتينات المضيف، والطبقة المخاطية الميكروبية ، التي توفر بدورها مكاناً مناسباً لنمو البكتريا والكائنات الأخرى، مما يزيد من مقاومتها للعلاج، وهذا بدوره يؤدي إلى خلق مشكلة كبيرة (29,23)، كما وان تراكيز وجرع المضادات الحياتية اللازمة لمنع نمو الأنواع البكتيرية المنتجة للغشاء الحيوي أعلى بكثير من تلك اللازمة لمنع نمو الأنواع الاقل قدرة في الإنتاج، وغير المنتجة للغشاء الحيوي؛ لان التراكيز الاعتيادية للمضادات تؤدي الى قتل الخلايا المحيطة والمكونة للغشاء الحيوي ، بينما تبقى الخلايا الموجودة داخل حشوة عديد السكرايد محافظة على حيويتها، وتعمل كبؤرة لإعادة النمو وإعادة الإصابة بشكل دوري (23).

تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما وجده Miloš وجماعته (2014) من أن للزنجبيل تأثيراً على تكوين الغشاء الحيوي ضد أنواع من البكتريا منها *Escherichia coli* (9)، وقد تعود فعالية زيت الزنجبيل الى المركبات الفعالة الموجودة فيه وهي Shogaol و Zingerone و Linalool.

ونظرا للدور الذي تلعبه البلازميدات في إمراضية البكتريا –كون البلازميدات تحمل الجينات المشفرة لمقاومة العديد من مضادات الحياة والمواد الكيماوية، كما تحمل البلازميدات جينات مشفرة لعوامل ضراوة مهمة في البكتريا (31)– اهتمت العديد من الدراسات في ايجاد الإمكانية لتحييد البلازميد وهذا ما تم في الدراسة الحالية حيث كان زيت الزنجبيل محيداً للبلازميد البكتيري.

الاستنتاجات

- تختلف حساسية العزلات البكتيرية المسببة لخمج الأسنان تجاه المضادات الحياتية وكانت جميعها حساسة لمضادي Levofloxacin و Norfloxacin وبنسبة 100%.
- لوحظ أن المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية كانت شائعة بين العزلات قيد الدراسة وامتلكت القدرة على انتاج الغشاء الحيوي.
- فُقدت قابلية العزلات على انتاج الغشاء الحيوي بعد معاملتها بزيت الزنجبيل.
- قابلية زيت الزنجبيل على تحييد البلازميد بشكل فعال ضد بكتريا *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* الحاوية على بلازميد مما يساعد في استعماله كمساعد للمضادات الحيوية.

المصادر

1. Hansen, D. S. ; Aucken, H. M. ; Abiola, T. and Podschun,.(**2004**). Recommanded Test Panel For Differentiation Of *Klebsiella* Species on The Basis Of Trilateral Interlaboratory Evaluation Of 18 Biochemical Tests. J. *Clin. Microbiol.* 42(8):3665-3669.
2. Graham, J. P.; Price, L. B.; Evans, S. L.; Graczyk, T. K. and Silbergeld, E. K. (**2009**). Antibiotic resistant enterococci and staphylococci isolated from flies collected near confined poultry feeding

McGraw-Hill companies,United states of American.

13. Macfaddin, J.F.(**2000**). Biochemical Tests For Identification of Medical Bacteria. 3 rd ed. Lippincott , Williams And Wilkins. Philadelphia London.
14. Bauer, A. W.; Kirby, W. M.; Sherries, J. C. and Turck, M. (**1966**). Antibiotic Susceptibility Tests by A Standarized Single Disk Method. *Am. J. Clin. Path*. 45:493-496.
15. Christensen, G. D. ;Simson W. A. ;Bisno, A. L. and Beachey ,E. H. (**1982**). Adherence of slime-producing strains of Staphylococcus *epidermidis* to smoth surface. Infect.immun. 37:318-326.
16. Dheepa, M.; Rashme, L.; and Appalaraju, F. (**2011**). Comparision of biofilm production and multiple drug resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumanii* from atertiary care hospital in south India.*Int J. Pharm. Biomed. Sci*. 2(4): 103– 107.
17. Kwiecinska-Piróg, J.; Bogiel, T.; Skowron, K.; Wieckowska, E. and Gospodarek, E. (**2014**). *Proteus mirabilis* biofilm - Qualitative and quantitative colorimetric methods-based evaluation. *Brazilian Journal of Microbiology*. 45(4): 1423–1431.
18. Adeola, S.A.; Folorunso, O.S. and Amisu, K.O. (**2012**).Antimicrobial Activity of *Ocimum basilicum* and its Inhibition on the Characterized and Partially Purified Extracellular Protease of *Salmonella typhimurium*. *Research Journal of Biology*. 2: 138-144.
19. Shihata ,I.M.(**1951**).A pharmacological study of Anagallis arvensis. M, D. vet. thesis Cairo univ.
20. Chhillar,A. K.and Gahlaut, A. (**2013**). Evaluation of antibacterial potential of plant extracts using resazurin based microtiter dilution assay. *Int J Pharm Pharm Sci*. 5: 372-376.
21. Gallucci , N.; Oliva, M. ; Carezzano, E.; Zygadlo, J. and Demo, M. (**2010**). Terpenes antimicrobial activity against slime producing and non–producing *Staphylococci*. Molecular Medicinal Chemistry. 21: 132-136.
22. Saidani, M. ; Boutiba, I. ; Ghozzi, R. ; Kammoum, A. and Benredjebs, S. (**2006**). Bacteriological profile of bacteremia due to multi –drug resistant bacteria out Charles – Nicolle operations. Science of the total environment. 407(8): 2701-2710.

3. Dhanavade,M.J.; Jalkute,C.B.; Ghosh,J.S. and Sonawane, K.D.(**2011**).Study Antimicrobial Activity of Lemon(Citrus lemon L.) peel extract. *British Journal of pharmacology and Toxicology*.2 (3):119-122.
4. Kwakman, P. H. S.; De Boer, L. ; Ruyter-Spira, C. P. ;Creemers-Molenaar ,T. ; Helsper, J. P. F. G. ; Vandenbroucke-Graults , C. M. J. E. ; Zaat, S. A. J. and Te Velde A. A. (**2011**). Medical-Grade Honey Enriched with Antimicrobial Peptides has enhanced activity against antibiotic-resistant Pathogens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 30(2): 251 –257.
5. DeBoer, H.J.; Kool, A.; Broberg, W.R.; Mziray, I.; Hedberg and Levenfors, J.J. (**2005**). Antifungal and anti-bacterial activity of some herbal remedies from Tanzanias. J. *Ethnopharmacol*., 96: 461-469.
6. Marsh, P.D. (**2003**). Are dental diseases examples of ecological catastrophes? 149: 279-294.
7. Akram Riazur Rehman, M. ; Naveed Akhtar, Qaiser Jabeen; Tariq saeed, S. M.; Ali Shah; Khalil Ahmed; Ghazala Shaheen and H. M. Asif.(**2011**) Zingiber officinale Roscoe (pharmacological activity) *Journal of Medicinal Plants Research*. 5(3): 344- 348.
8. Bhargava, S. ; Dhabhai, K. ; Batra, A. ; Sharma, A. and Malhotra, B. (**2012**). *Zingiber Officinale* : Chemical and phytochemical screening and evaluation of its antimicrobial activities. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 4(1): 360-364.
9. Miloš Nikolić, Sava Vasić, Jelena Đurđević, Olgica Stefanović and Ljiljana Čomić (**2014**). antibacterial and anti-biofilm activity of ginger (Zingiber officinale (Roscoe)) ethanolic extract. *kragujevac j. sci*. 36 : 129-136.
10. Hawkey, M. and Lewis, A. (**1989**). Medical Bacteriology : APractical Approach. IRL Press. Oxford.
11. Collee, J.G. ; Marmion, B.P. ; Fraser, A.G. and Simman, A., (**1996**). Practical medical microbiology.4thed.produced by longman Singapore publishers (pte) LTD:385.
12. Brooks, G.F.; Carroll,K.C; Butel,J.S.; Mores,S.A. and Mietzner,T.A. (**2013**).Jawetz,Melnich and Adelbergs Medical Microbiology.25th ed.thr

aeruginosa invitro Activity against characterized isolates, Mutants and Transconjugants and resistance selection potential. J.*Antimicrob. Agents Chemother*. 48(8): 3086-3092.

28. Askoura, M.; Motttawea, W.; Abujamel, T. and Taher, I. (**2011**). Efflux pump inhibtors (EPls) as new antimierobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*. *Libyan J. Med*., 6: e5870.
29. Hsueh, P. P. ; Chen, W. H. and Luh, K. T. (**2005**). Relationships between antimicrobial use and antimicrobial resistance in Gram – Negative bacteria causing nosocomial infections from 1991 – 2003 at a University Hospital in Taiwan. *Int. J. Antimicro. Agents*. 26(6):463-472.
30. Hassan, A. ; Usman, J. ; Kaleem, F. ; Omair, M. ; Khalid, A. and Iqbal, M. (**2011**). Detection and antibiotic susceptibility pattern of biofilm producing gram positive and gram negative bacteria isolated from a tertiary care hospital of Pakistan. *Malaysian J. Microbiol*. 7(1): 57-60.
31. Martinez, J. L. and Baquero, F. (**2002**). Interactions among strategies associated with bacterial infections : Pathogenicity , epidemicity and antibiotic resistance. *C. M. R.* 15 (4) : 647 – 679.

hospital at Tunisia Med. Mal. Infect. 36(3):163-166.

23. Saxena, S.; Banerjee, G.; Garg, R. and Singh, M. (**2014**). Comparative Study of Biofilm Formation in Pseudomonas *aeruginosa* Isolates from Pationts of Lower Respiratory Tract infection. J. *Clin. and Dia. Res*. 8(5): 9-11.
24. Lambert, O.; Michea- Hamzehpour, M.; Kohler, T.; Chen, F.; Fanrisson, F.; Dautery, Y. And Pechere, J. (**2001**). Differential Selection of Multi-Drug Efflux Mutants by Trovafloxacin and Ciprofloxacin In An Experimental Model of *Pseudomonas* aeruginosa Acute Pneumonia In Rats. Antimicrobial Agents Chemotherapy. 44:571-576.
25. Mims, C. A.; Dockrell, H. M.; Goering, R. V.; Roitt, I. M.; Wakeling, D. and Zuckerman, M. (**2004**). Medical Microbiology. 3thed. Mosby Of Elsevier Limited.
26. Koren, J. and Vaculikova, A. (**2006**). Development of β-lactamase resistance in Enterobacteria , *Klin. Microbiol. Infect. Lek.* 12(3):103-107.
27. Mushtaq , S.; Ge, Y. and Livermore, D.M. (**2004**). Doripenem versus *Pseudomonas*

Study The Effect of Ginger Oil on Plasmid Content and Biofilm of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* That Isolated From The Teeth

Fatima. A. Awad **Laith. M. Najeeb**

E.mail:

Abstract

The study included collection of 52 clinical samples from patients suffering from teeth infections, Microscopic and biochemical tests was conducted and a selective media were used for the diagnosis of bacterial isolates that isolated from the teeth. The results of this study showed abacterial isolates *Staphylococcus aureus* arate 21.3%, while the *Escherichia coli* were 10.7%. The effect of fourteen antibiotic was studied on all bacterial isolates which were 48 isolates by disk diffusion method and two isolates were represented the most resistant to antibiotics that was possessed pattern of multiple drug resistance towards(11-12) antibiotic among fourteen counter. The biofilm formation of the two bacterial species was investigated, the results showed the ability of all isolates to formation abiofilm. The oil was extracted from the collected and diagnosed ginger cellular toxicity, ph and the minimum inhibitory concentration were be tested toward the bacteria. The results of the statistical analysis showed that the isolates lost the ability to produce biofilm. The ability of oil to neutralize plasmids was tested and results showed the ability of ginger oil to neutralize plasmids.