

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

تاريخ القبول 2014/6/8

تاريخ الاستلام 2014/3/12

ماجد كاظم عبود الشبلي
قسم علوم الحياة – كلية التربية
جامعة القادسية

عدنان حمد الحمداني
فرع الأحياء المجهرية – كلية الطب
جامعة القادسية

وفاء عبد الواحد جحيل الكعبي
قسم علوم الحياة – كلية التربية
جامعة القادسية
alkaaby@yahoo.com

الخلاصة:

تم عزل 479 عزلة بكتيرية من 409 مسحة من سطوح الأسنان واللثة للمرضى المراجعين من كلا الجنسين وبأعمار مختلفة للمراكز التخصصية وعيادات الأسنان في مدينة الديوانية بعد أن شُخصوا سريريا بالتهابات الفم (الأسنان واللثة) من قبل الأطباء المختصين للمدة من 2012/11/1م ولغاية 2013/3/1م. شُخصت العزلات البكتيرية باستخدام جهاز الفايتهك إلى موجبة وسالبة لصبغة جرام تصدرتها بكتريا المكورات السحبية *Streptococcus spp.* بأعلى نسبة بلغت 31.52% تلتها بكتريا المكورات العنقودية *Staphylococcus spp.* بنسبة 20.45% وبكتريا غصيات الحليب *Lactobacillus spp.* بنسبة 12.52% ثم خميرة *Candida spp.* بنسبة 10.64%، وتوالت بعدها بعض البكتريا التي أحرزت نسباً قليلة مقارنةً بالبكتريا المذكورة، كما أحرزت بكتريا المكورات السحبية الغشائية *Streptococcus mutans* من بين الأنواع البكتيرية المعزولة من سطوح الأسنان واللثة أعلى تردداً في عدد العزلات (56 عزلة) وأختبرت قدرتها جميعها على تكوين الغشاء الحيوي؛ إذ كانت 44 عزلة (44.64%) عالية التكوين له و 16 عزلة (28.57%) متوسطة التكوين و 15 عزلة (26.79%) عديمة التكوين للغشاء الحيوي. وظهر تأثير الكربوهيدرات واضحاً على عزلات *S. mutans* في تكوينها للغشاء الحيوي على وسط النمو؛ إذ بلغت نسبتها بوجود السكر 35.71% تلاه الكلوكونز مع الفركتوز معاً في الوسط نفسه بنسبة 25.00% ثم الكلوكونز (16.07%) والفركتوز (12.50%)، بينما بلغت نسبتها بغياب الكربوهيدرات في وسط النمو 10.71%. أختبرت الحساسية الدوائية لعزلات *S. mutans* تجاه 11 مضاداً حيوياً باستخدام طريقة الانتشار بالأقراص التي أوضحت أن مقاومة العزلات للمضادات الحيوية كانت أعلى من حساسيتها لها إضافةً إلى أنها إزدادت بعد تكوينها للغشاء الحيوي؛ حيث بلغت مقاومة العزلات لمضاد الإرترومايسين قبل وبعد تكوينها للغشاء الحيوي (98.21 و 94.64%) والأموكسيسيلين (85.71%) لكل منهما والأميسيلين (80.35 و 83.92%) وحامض الناليدسك (80.35 و 87.50%) والسيفوتاكسيم (69.64 و 75.00%) والكلورامفينيكول (69.64 و 89.28%) والأموكسيسيلين – حامض الكلافولانك (58.92 و 76.78%) والجنتاميسين (57.14 و 78.57%) والتتراسايكلين (55.35 و 66.07%) لكلٍ منهما على التوالي، فيما أظهرت حساسيتها العالية لمضاد الأيكاسين (25.00 و 48.21%) والترايميثوبرايم سلفاميثاكيل (7.14 و 19.64%) لكلٍ منهما على التوالي. اختُبرت 12 عزلة منتخبة من 56 عزلة من *S. mutans*؛ باعتبارها منتجة للغشاء الحيوي وأكثر مقاومةً للمضادات الحيوية وإمتلاكها لمورثة 16S rRNA التي تُمثل المورثة التشخيصية لها باستعمال تقنية تفاعل سلسلة إنزيم البلمرة (PCR)، كما بيّنت نتائج تتابع تسلسل الحامض النووي DNA للمورث المحافظ (16S rRNA) في عزلات *S. mutans* المكونة للأغشية الحيوية وبوساطة تحليل الشجرة الوراثية لذلك المورث، ظهر تشابه بين سلالة *S. mutans* المحلية مع السلالة القياسية الأسبانية (AJ554208.1) في الموقعين النيوكليوتيديين 14 و 15.

Microbiology Classification QR₁ -74.5

كلمات مفتاحية: التوصيف المظهري، المكورات السحبية، الأغشية الحيوية، المضادات الحيوية، التوصيف الجزيئي

* البحث مستل من أطروحة دكتوراه للباحث الأول.

المقدمة Introduction

تقع بكتيريا المكورات السحائية *Streptococcus mutans* ضمن مجموعة البكتيريا الموجبة لصبغة غرام وهي من أبرز الأنواع البكتيرية المكونة للأغشية الحيوية؛ إذ إنها تستوطن الفم خلال الأيام الأولى بعد الولادة وبمرور الوقت تتواجد أنواعاً أخرى مرافقة للسبحيات من البكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة غرام⁽¹⁾.

يمثل الغشاء الحيوي Biofilm مجتمعاً بكتيرياً إرتبطت خلاياه بسطح نصف مغفور، وغُلقت بصورة أساسية بقالب من مواد بوليميرية خارج خلوية Exopolymers (EPS) substances منتجة من تلك الخلايا التي تظهر طرازاً مظهرياً مغايراً للخلايا عندما تكون حرة من ناحية نسبة النمو والتعبير الجيني⁽²⁾. ويُسبب وجود الغشاء الحيوي في جسم الإنسان عدداً من الإصابات المرضية منها التليف الحوصلي والتهاب شغاف القلب الداخلي والأذن الوسطى والبروستات والتهاب ما حول السن وتسوس الأسنان وغيرها⁽³⁾. ويُعتقد أيضاً أن التداخل ما بين الأنواع البكتيرية المتواجدة في الفم أثناء تكوين الغشاء الحيوي يؤدي إلى التصادم في ميكانيكية التناحر الجرثومي خلال الإشارات التي تطلقها لتكوين الغشاء الحيوي. ومن هذا المنطلق يُمكن تصوّر التداخل بين المجتمعات البكتيرية المكونة للأغشية الحيوية كالحرب والسلام War and peace⁽⁴⁾.

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

الغشاء الحيوي والتعبير الجيني لعوامل الضراوة لبكتيريا *S. mutans*⁽⁸⁾.

هدف الدراسة Aim of study

- 1- عزل البكتيريا المسببة لحالات أخماج الفم وتشخيصها بالطرق الروتينية.
- 2- إختبار قدرة *S. mutans* على تكوين الغشاء الحيوي مختبرياً في مستويات وأنواع مختلفة من السكريات وتوكيد تشخيص *S. mutans* جزيئياً بإستخدام مورثة 16S rRNA.
- 3- تحليل تسلسل نيوكليوتيدات الحامض النووي DNA المضخم لبكتيريا *S. mutans* مع مورثة 16S rRNA بإستعمال جهاز DNA sequencer.

المواد وطرائق العمل Materials and Methods

أولاً: جمع العينات Collection of samples
جُمعت 479 عذلة بكتيرية من 409 مسحة من سطوح الأسنان واللثة للمرضى المصابين بأخماج الفم والأسنان الذين راجعوا المراكز التخصصية وعيادات الأسنان في مدينة الديوانية ومن كلا الجنسين وبأعمار مختلفة لمدة أربعة أشهر إمتدت من (2012/11/1 م) حتى (2013/3/1 م)؛ إذ أخذت المسحات بإشراف الطبيب المختص وإستُخدمت المسحات القطنية الحاوية على وسط ناقل (Transport media swabs) في عملية جمع العينات لضمان حيوية العزلات.

ثانياً: العزل والتشخيص البكتيري Bacterial isolation and identification
أ- العزل Isolation

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

ب- التشخيص بنظام الفايترك Vitek compact2 system diagnosis

يُعد نظام الفايترك من الأنظمة التشخيصية الحديثة والسريعة في التشخيص البكتيري. إذ يعطي نتائج دقيقة تصل دقتها إلى 99%. ولغرض التأكد من العزلات البكتيرية إستُخدِم النظام أعلاه وحسب تعليمات الشركة المجهزة له وفقاً لـ⁽⁹⁾.

- 1- زُرعت العزلات البكتيرية على وسطي أگار الدم والماكونكي وحُضنت بدرجة حرارة 37°م لمدة 24 ساعة.
- 2- حُضِرَ من المزروع الجرثومي عالقاً جرثومياً؛ وذلك بنقل مستعمرة واحدة من كل طبق إلى أنابيب إختبار حاوية على 3 مل من المحلول الملحي الفسلجي بتركيز 0.85 % ثم حُففت عكورة النمو للحصول على عالق كثافته

culture plate لتحديد تكوين الغشاء الحيوي والتي تتلخص بالخطوات التالية:

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

جدول (1): إلتصاقية وتكوين الغشاء الحيوي البكتيري بوساطة طريقة TCP بالإعتماد على (12).

معدل قيم الإمتصاصية للطول الموجي 630 نانومتر Mean of OD value at 630nm	الإلتصاقية Adherence	الغشاء الحيوي المتكون Biofilm formatic
<0.120	Non لا توجد	Non لا توجد
0.120 – 0.240	Moderate متوسط	Moderate متوسط
>0.240	High عالي	High عالي

بعد تكوين الأغشية الحيوية. وتضمن إختبار الحساسية الدوائية للزلات البكتيرية بطريقة الأقراص بالإعتماد على طريقة (13) في الخطوات التالية:

- 1- عُُمِست المسحة القطنية في مرق تربتون الصويا المزروع وأزيل الفائض منها بضغطها على الجوانب الداخلية للأنبوبة.
- 2- نُشرت العزلات البكتيرية على وسط مولر- هنتون الصلب بطريقة التخطيط لأكثر من مرتين وبإتجاهات مختلفة لغرض التأكد من نشر العزلات البكتيرية المراد إختبار حساسيتها بالتساوي، وُتركت الأطباق لمدة 15 دقيقة في درجة حرارة الغرفة لضمان إمتصاص الرطوبة.
- 3- وُضعت أقراص المضادات الحيوية بواقع خمسة أقراص في طبق قياسه 100 ملم و 12 قرصاً في طبق قياسه

تتراوح بين (0.50 – 0.63) ملغم. مل⁻¹ والذي يُكافي 10 × 1.5⁸ خلية. مل⁻¹ بإستخدام جهاز المطياف الضوئي بطول موجي 230 نانومتر.

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

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

- 1- الحفظ قصير الأمد Short term storage: أُديمت العزلات البكتيرية لأسابيع قليلة على وسط أكار الماكونكي. صُلب الوسط الزرع بشكل مائل (Slant) ولُفحت الأطباق ثم لُفت جيداً بشريط بارافيلم (Parafilm) وحُفظت بدرجة حرارة 4°م (10).
- 2- الحفظ طويل الأمد Long term storage: إستخدم وسط نقيع الدماغ والقلب بإضافة الكليسرين بتركيز 20% ووزع الوسط في قناني صغيرة محكمة الغلق وبحجم 10 مل لكل قنينة ثم عُملت بالموصدة ولُفحت بعدها بنسبة 0.01 مل من مزارع بكتريا *Sterptococcus spp.* ثم حُضنت بدرجة حرارة 37°م لمدة 24 ساعة وحُفظت بعدها بدرجة 20°م (11)، إستخدمت هذه الطريقة لحفظ المزارع البكتيرية لمدة طويلة تصل إلى ثلاثة أشهر.

رابعاً: تكوين الغشاء الحيوي Biofilm formation
إعتمدت طريقة Christensen وجماعته (1985) التي يطلق عليها طريقة صفيحة الزرع النسيجي Tissue

خامساً: تأثير بعض الكربوهيدرات على تكوين الغشاء الحيوي

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

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

تمت زراعة (تنمية) بكتريا *S. mutans* في وسط (T.S.B.) لقياس حساسيتها للمضادات الحيوية قبل تكوين الأغشية الحيوية ثم تم تنميتها على وسط (T.S.B.) الحاوي على 1% من الكلوكوز لفحص حساسيتها للمضادات الحيوية

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

2- الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز Agarose gel أجريت عملية الترحيل الكهربائي للعزلات المدروسة لفصل مستخلص الدنا الكلي وفحصه على سطح هلام الأكاروز بالاعتماد على الطريقة التي ذكرها (10)، وكالاتي:

- خُصِر محلول T.B.E. buffer بتركيز (1X) بنسبة 10:1 بأخذ 10 مل من محلول T.B.E. (10X) وأكمل الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر المعقم.

- خُصِر هلام الأكاروز بإذابة 0.8 غم من مسحوق الأكاروز في 100 مل من محلول T.B.E. (1X) وُعُمِّ بالموصدة وتُرك ليبرد في درجة حرارة 50°م ثم أُضيف إليه 15 مايكرو لتر من محلول صبغة بروميد الأنثيديوم.

- خُصِر قالب صبب الهلام (Tray) بإحاطة حافتيه المفتوحتين بشريط لاصق عريض مع تثبيت مشط تكوين الحفر Comb قرب إحدى نهايته وعلى بُعد اسم من طرف القالب ثم صُبَّ الهلام بعناية لمنع تكوين فقاعات هوائية ورُوِّعِي وضع القالب في وضع أفقي لضمان تجانس سُمك الهلام وتُرك ليتصلب مدة 30 دقيقة.

- رُفِع المشط والشريط اللاصق بعناية ونُقل القالب إلى حوض جهاز الترحيل الكهربائي (Tank) الحاوي على دارئ T.B.E. buffer (1X) حيث غُمِر سطح الهلام الدارئ كلياً وإرتفع عنه ببعد 1 ملم.

- خُصِرَت عينة الدنا لغرض إجراء عملية التحميل (Loading) وذلك بمزج 25 مايكرو لتر من عينة الدنا مع 5 مايكرو لتر من دارئ التحميل ثم نُقلت العينة إلى إحدى حُفر الهلام.

- رُحِلت عينات الدنا بإمرار فرق جهد كهربائي قدره 80 فولت لمدة (1 – 2) ساعة.

- فُحِصَت مواقع حزم الدنا المستخلص عند طول موجي 256 نانومتر بإستعمال جهاز الأشعة فوق البنفسجية.

- صُوِّر الهلام لغرض توثيق النتائج.

3- تحضير مزيج تفاعل سلسلة إنزيم البلمرة PCR خُصِر مزيج أل PCR حسب تعليمات شركة Promega المُصنعة له، وكالاتي:

- دُوِب المزيج الرئيس الأخضر في درجة حرارة الغرفة ووضِع في المنبذة لكي تتجمع المكونات في قعر الأنبوب.

- أُعِدَّ مزيج التفاعل بالحجم المطلوب الذي يتلائم مع نوع التفاعل وكما موضح في جدول (2).

- نُبِذَت مكونات المزيج في المنبذة المُبردة بسرعة 15000 دورة، دقيقة¹ لمدة 5 ثوانٍ.

150 ملم، والمسافة بين كل قرص وآخر 24 ملم (من مركز القرص الأول إلى مركز القرص الآخر).

4- خُصِنَت الأطباق بدرجة حرارة 35°م لمدة (16 – 18) ساعة لجميع أنواع المضادات الحيوية، ثم قيسَت أقطار التنبيت وقورنت مع القيم القياسية المذكورة في (14).

سابعاً: الفحوصات الجزيئية Molecular testes

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

أ- ترسيب الخلايا Pellet cells

- نُبِذ 1مل من المزروع الجرثومي لمدة 24 ساعة في

- درجة حرارة 35°م وعلى سرعة 1500 دورة. دقيقة¹.

- أزيل الرائق وأُعيد تذويب الراسب بإضافة 480 مايكرو لتر من محلول EDTA (50 ملي مولاري) ثم نُقل إلى أنبوبة أبندروف سعة 1.5 مل.

- أُضيف 120 مايكرو لتر من اللايسوزايم.

- نُبِذ المعلق بسرعة 15000 دورة. دقيقة¹ لمدة دقيقتين وبعد ذلك أزيل الرائق.

ب- تحليل الخلايا Lyse cell

- أُضيف 600 مايكرو لتر من محلول Nuclei Lyses ووضِع في الحمام المائي بدرجة حرارة 80°م لمدة دقيقتين ثم بُرد في درجة حرارة الغرفة.

- أُضيف 3 مايكرو لتر من محلول أل RNAase ومُزج جيداً وخُصِر في درجة 37°م لمدة 60 دقيقة ثم بُرد في درجة حرارة الغرفة.

ج- ترسيب البروتين Protein precipitation

- أُضيف 200 مايكرو لتر من المحلول المحلل للبروتين ومُزج بإستعمال المازج.

- خُصِن المعلق في حمام ثلجي لمدة 5 دقائق ونُبِذ بسرعة 15000 دورة. دقيقة¹ لمدة 3 دقائق.

د- ترسيب الدنا DNA precipitation

- نُقل الرائق إلى أنبوبة أبندروف جديدة ونظيفة تحتوي على 600 مايكرو لتر من كحول الأيزوبروبانول في درجة حرارة الغرفة ومُزج جيداً.

- نُبِذ المعلق بسرعة 15000 دورة. دقيقة¹ لمدة دقيقتين ثم أزيل الرائق.

- أُضيف 600 مايكرو لتر من الإيثانول بتركيز 70% ومُزج جيداً.

- نُبِذ المعلق بسرعة 1500 دورة. دقيقة¹ لمدة دقيقتين.

- أزيل الرائق وتُركت الأنبوبة بشكل مقلوب على ورق الترشيح لمدة 15 دقيقة.

هـ- إعادة تذويب الدنا DNA rehydration

جدول (2): بادئا الدنا (DNA primers) وتسلسل قواعدهما النتروجينية وعددها المجهزان من شركة Bioneer – كوريا الجنوبية المستخدمين في فحص PCR.

المصدر Reference	عدد القواعد (Bp)	تسلسل القواعد النتروجينية DNA sequence	أسم البادئ Primer
صُممت من قبل الباحث باستخدام برنامج DNA mfold program	151	5-AGCGTTGTCCGGATTATTG-3	F
		5-CATTTTCACCGCTACACATGG-3	R

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

جدول (3): مكونات وحجوم مزيج تفاعل سلسلة إنزيم البلمرة (PCR master mix).

المكونات	الحجم (مايكرو لتر)
DNA template	5
Forward primer	1.5
Reverse primer	1.5
PCR water	12
Total	20

والبادئ الذي اقترحه ليكتريا *S. mutans*, وكما موضح في جدول (4).

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

ضبط جهاز الدورات الحرارية للـ PCR على وفق نموذج Perkin Elmer Model (15). وتم تحويل النموذج ليتلائم مع مزيج مكونات عُدّة الـ Promega

جدول (4): مراحل تفاعل سلسلة إنزيم البلمرة (PCR) في جهاز الدورات الحرارية.

ت	المرحلة	درجة الحرارة (م°)	الوقت (دقيقة)	عدد الدورات (دورة)
1	المسخ الابتدائي Initial denaturation	94	3	1
2	المسخ Denaturation	94	1	30
3	الإرتباط Annealing	65	1	
4	الإستطالة Extension	72	1	
5	الإستطالة النهائية Final extension	72	5	1

10000 (دورة. دقيقة¹) لمدة دقيقتين وبعدها تم التخلص من الراسب.

4- أُضيفَ 750 مايكرو لتر من محلول الغسل Wash solution لأنابيب التنقية وثرُك لمدة دقيقتين ومن ثم وضعت الأنابيب في المنبذة بسرعة 10000 (دورة. دقيقة¹) لمدة دقيقة واحدة وبعدها تم التخلص من الراسب. بعد ذلك كررت الخطوة ذاتها مرةً أخرى.

5- أخيراً وضعت أنابيب التنقية EZ-10 column في أنبوبة معقمة حجم 1.5 مل، ومن ثم أُضيفَ 30 مايكرو لتر من محلول Elution buffer ثم حضنت الأنابيب بدرجة حرارة الغرفة لمدة دقيقتين وبعدها نُبذت الأنابيب بسرعة 10000 (دورة. دقيقة¹) لمدة دقيقتين لإستخراج (151bp PCR product) النقي.

أرسل ناتج تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل النقي إلى شركة Bioneer في كوريا الجنوبية لإجراء تسلسل الحمض النووي باستخدام جهاز (A.B. DNA sequencing system) كما حُلّت نتائج تسلسل الحمض النووي لمورث NCBI-16s-rRNA بالإعتماد على موقع قاعدة البيانات (Alligment) Gene bank (Blast) لتحديد تتابع المورث وتم كذلك تسلسل المورث بالإعتماد على الشجرة الوراثية Neighbor-Phylogenetic tree بإستعمال طريقة تحليل

ثامناً: طريقة تسلسل الحمض النووي DNA sequencing method

أُجريت طريقة تسلسل الحمض النووي ليكتريا المكورات السحيجة *S. mutans* المكوّنة للغشاء الحيوي. وذلك بتحديد تسلسل نتيجة تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل لمورث 16s rRNA؛ إذ تم في البداية تنقية نتيجة تفاعل سلسلة إنزيم البلمرة البالغ طوله (151bp PCR product) من هلام الأكاروز بإستخدام عدة تنقية تُدعى (EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction Kit, Biobasic, Canada). وأُجريت عملية التنقية بحسب طريقة عمل الشركة المجهزة لعدة التنقية كما في الخطوات التالية:

- 1- أزيلت نتيجة تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل البالغ طوله (151bp PCR product) من هلام الأكاروز بوساطة شفرة جراحية معقمة ومن ثم نُقِل الناتج إلى أنبوبة معقمة حجم 1.5 مل.
- 2- أُضيفَ 400 مايكرو لتر من محلول Binding buffer II لإذابة هلام الأكاروز، ومن ثم حُصّنت الأنابيب في درجة حرارة 60م° لمدة 10 دقائق.
- 3- نُقِل المزيج إلى أنبوبة التنقية EZ-10 column وثرُك لمدة دقيقتين ومن ثم وضعت الأنابيب في المنبذة بسرعة

Joining Method وباستخدام موقع multiple alignment sequencer (Clusta (W))

النتائج والمناقشة Results and Discussion

أولاً: عزل وتشخيص الجراثيم المتوطنة في الفم
جُمِعَت 409 مُسْحَة من الأشخاص المصابين بأخماج الفم واللثة وتسوس الأسنان وحُصِلَ منها على 479 عزلة شُخصت على أنها جراثيم موجبة وسالبة لصبغة جرام بجهاز الفايتهك؛ إذ أظهرت النتائج الواردة في جدول (5) سيادة بكتيريا المكورات السبحية *Streptococcus spp.* بتسجيلها أعلى نسبة مئوية بلغت 31.52% (151 عزلة) من مجموع نسب الجراثيم المعزولة من مناطق تسوس الأسنان تلتها بكتيريا المكورات العنقودية *Staphylococcus spp.* بنسبة 20.45% (98 عزلة) ثم عُصيات الحليب *Lactobacillus spp.* بنسبة 12.52% (60 عزلة). كما سجّلت خميرة *Candida spp.* نسبة عزل بلغت 10.64% (51 عزلة) وبكتيريا الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* بنسبة 5.21% (25 عزلة) في حين إحتلت البكتيريا (*Enterococcus spp.* و *Enterobacter spp.* و *Corynebacterium spp.* و *Micrococcus feacalis* و *Escherichia* و *Shigella spp.* و *Neisseria spp.* و *coli* و *Proteus spp.* و *Klebsiella oxytoca*) النسب المئوية الأقل في تواريخها في مناطق تسوس الأسنان بنسبة 4.17% (20 عزلة) و 3.34% (16 عزلة) و 2.92% (14 عزلة) و 2.50% (12 عزلة) و 2.08% (10 عزلة) و 1.67% (8 عزلات) و 1.25% (6 عزلات) و 0.83% (4 عزلات) و 0.83% (4 عزلات). على التوالي.

كما يلاحظ من الجدول ذاته أن البكتيريا العائدة لجنس المكورات السبحية *Streptococcus spp.* تُظهر تفوق بكتيريا *S. mutans* على باقي أنواع المكورات السبحية المعزولة من مناطق تسوس الأسنان بتسجيلها أعلى نسبة مئوية بلغت 37.09% (56 عزلة). بينما جاءت بكتيريا *S. sangius* في المرتبة الثانية بنسبة 12.58% (19 عزلة) تلتها كل من بكتيريا *S. mitis* و *S. intermedius* و *S. oralis* بنسبة 10.59% (16 عزلة) و 9.27% (14 عزلة) و 7.28% (14 عزلة). على التوالي. كما ظهرت بكتيريا *S.*

salivarius بنسبة 6.62% (10 عزلات) و *S. pneumoniae* بنسبة 5.96% (9 عزلات). أما أقل نسبة عزل فكانت من نصيب بكتيريا *S. pyogens* و *S. sorbinus* اللتان بلغت نسبة عزل كل منهما 4.63% (7 عزلات) و 3.97% (6 عزلات). على التوالي.
ويوضّح الجدول أيضاً أنّ بكتيريا *Staph. epidermidis* التابعة لجنس المكورات العنقودية أعطت أعلى نسبة مئوية بلغت 74.49% (73 عزلة) عند عزلها من مناطق تسوس الأسنان مقارنةً ببكتيريا *Staph. aureus* البالغة نسبتها 25.51% (25 عزلة).

أما بكتيريا *L. acidophilus* التابعة لجنس عُصيات الحليب *Lactobacillus spp.* فبلغت نسبتها المئوية 71.66% (43 عزلة) متفوقةً على بكتيريا *L. casei* التابعة للجنس نفسه والبالغة نسبتها 28.33% (17 عزلة). كما أظهرت الأنواع التابعة لخميرة المبيضات *Candida spp.* تفوقاً في نسبة إصابتها، إذ تفوّق النوع *C. albicans* بإحرازه أعلى نسبة مئوية بلغت 60.78% (31 عزلة) مقارنةً بكلّ النوعين *C. tropicalis* بنسبة 23.52% (12 عزلة) و *C. glabrata* بنسبة 15.68% (8 عزلات) على التوالي.

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

جدول (5): الجراثيم المعزولة من الفم ونسبها المئوية.

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

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

للجراثيم، إضافة إلى أن الاختلاف في مستوى الوعي الصحي والعناية المستمرة بتنظيف الأسنان وثقافة المجتمع لها تأثيراً كبيراً على ذلك.

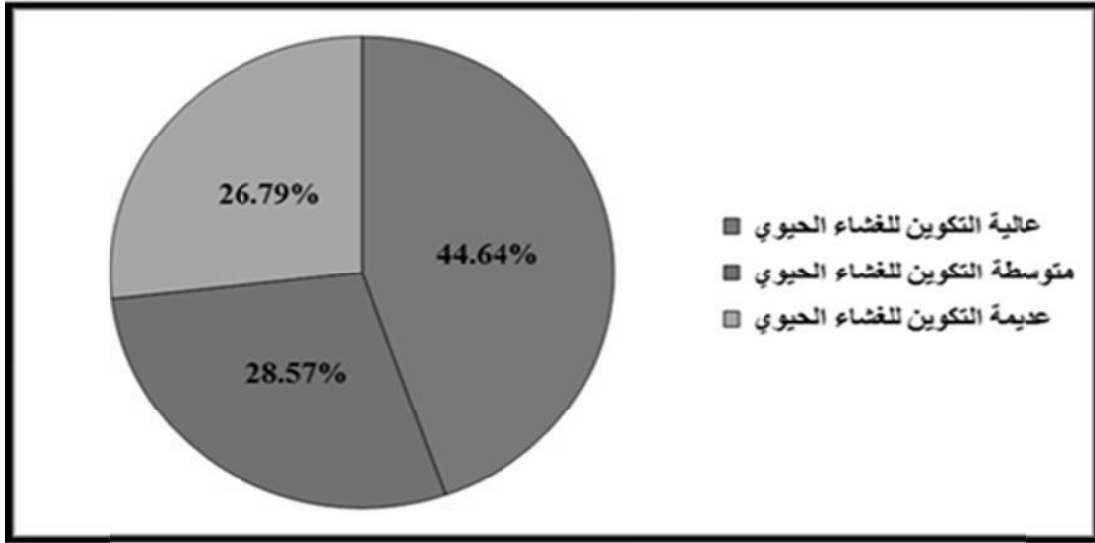
ثانياً: تكوين بكتريا *S. mutans* للأغشية الحيوية
أختبر تكوين الأغشية الحيوية في صفيحة الزرع (Micro titer plate) على وسط تربتون الصويا السائل مضافاً إليه 1% كلوكوز، وبالإعتماد على درجة الإمتصاصية (Optical density OD) بطول موجي 630 نانومتر كانت النتائج الظاهرة في شكل (1) كالآتي:

تكوين الأغشية الحيوية بدرجة عالية عندما تكون درجة الإمتصاصية أكبر من 0.240 نانومتر ومتوسطة عندما تكون ما بين (0.120 – 0.240) نانومتر، وأن 25 عزلة (44.64%) من أصل 56 عزلة كانت عالية التكوين للغشاء الحيوي و 16 عزلة (28.57%) متوسطة التكوين في حين

نتائج (21) في نسبة العزل. وأن سيادة خميرة المبيضات في الفم على باقي أنواع الخمائر الأخرى تتفق مع (18) إذ أن الإصابات الفطرية في المرضى الضعاف مناعياً تتضمن خميرة المبيضات دائماً؛ ذلك لإمكانيتها من إظهار قابليتها الإمرضية كمرضات حقيقية في بعض الظروف كإنتاجها لإنزيمات Proteinase و Uronidase و Collaginase و Neuroaminidase التي تساعدها في اختراق أنسجة وخلايا المضيف وإحداث الإمرضية (22). كما أن اختلاف نسب العزل للأنواع التابعة للعائلة المعوية (السالبة لصبغة جرام) يعود إلى ندرة وجودها في محيط الفم. وهذا ما أكدته دراسات كل من (17 و 18 و 23) من أن معظم البكتريا السالبة لصبغة جرام تأتي من التهابات الجهاز التنفسي أو من القناة المعوية – المعوية وتظهر في الفم. وأوضح (24) أن الاختلاف في نسب العزل يتغير تبعاً لتغير الإصابة، ووجد (25) أن نسب عزل البكتريا تزداد بازدياد أعداد الأسنان المسوسة. كما يُعتقد أن لنوعية الوسط الزراعي المستعمل وطريقة العزل وعوامل أخرى غير معروفة تأثيراً كبيراً في اختلاف نسب العزل

بسبب إمتلاك هذه البكتريا لخاصية توليد الحموضة Acidogenesis وتحمض البول Acidouricity⁽²⁸⁾. كما أنَّ سبب عدم تكوين البعس من عزلات *S. mutans* للغشاء الحيوي قد يُعزى إلى أنَّ المُسحات التي أُخذت من الفم كانت من أشخاص متعاطين للمضادات الحيوية أو مستخدمين نوعاً من المضمضات التي تحد من عوامل ضراوة بكتريا *S. mutans*.

بلغ عدد العزلات التي لم تُحدث أية التصاقية وتكوين للأغشية الحيوية هي 15 عزلة (26.79%) عند درجة إمتصاصية أقل من 0.120 نانومتر. وتتفق هذه النتائج مع نتائج^(26 و 27). وتُبين هذه النتائج أنَّ العزلات المكوّنة للأغشية الحيوية ذات قابلية تحمّل عالية لمستويات الحموضة في مناطة تسوس الأسنان إضافة لقدرتها على خفض pH الفم بسبب إستهلاكها للسكريات (الكلوكوز والفركتوز واللاكتوز) وإنتاجها لحمض اللاكتيك كمنتج نهائي والمُسبب لحموضة الفم، وهذا متوقع



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

بالبروتينات (Glucan-binding proteins (GBPs)). كل هذه العوامل تُثبت الدور المرضي لبكتريا *S. mutans*. كما أنَّ الكلوكان الذائب في الماء الذي تنتجه بكتريا *S. mutans* يمكن أن يتواجد عندما يقل تركيز الكالسيوم والفوسفات في اللعاب والذي هو سبباً آخر لبداية تنخر الأسنان وتكوين الأغشية الحيوية⁽³²⁾. إنَّ إضافة السكريات في أوساط النمو للبكتريا السبحية تؤثر إيجاباً في عملية تكوين الغشاء الحيوي على مختلف السطوح الحية⁽³³⁾ ذلك لأن تجويف الفم يحتوي على أنواع عديدة من البكتريا المختلفة التي بعضها ينمو ويتكاثر في بيئة مختلفة من الأغذية والمشروبات الحاوية على السكريات أو النشويات المطبوخة المعروفة بإسم الكربوهيدرات المخمرة (Fermented carbohydrates)، وحين لا تتم إزالة هذه الكربوهيدرات بواسطة تنظيف الأسنان تقوم البكتريا بتحويلها إلى أحماض في غضون 20 دقيقة متحوّلة في ذلك البكتريا والأحماض وجزيئات الطعام واللحباب إلى لويحة سنية (Dental plaque) عبارة عن طبقة لزجة تغطي الأسنان. وعند وضع اللسان على الأسنان يمكن إستشعار هذه اللويحة السنية بعد ساعات قليلة فقط من تنظيف الأسنان وتكون هذه

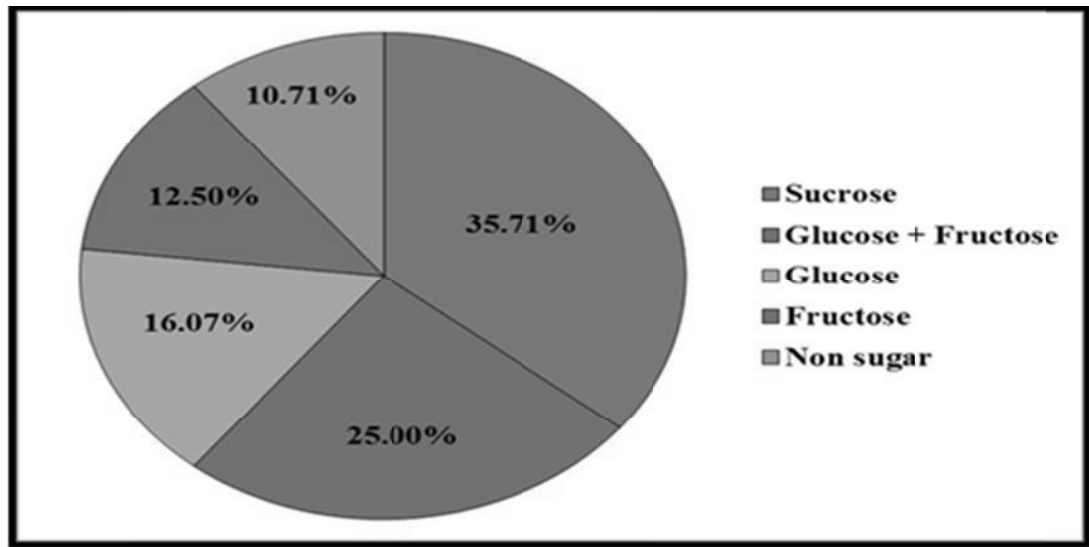
ثالثاً: تأثير الكربوهيدرات على عزلات *S. mutans* المكوّنة للأغشية الحيوية

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

إنَّ قابلية البكتريا على تكوين الأغشية الحيوية وخاصةً *S. mutans* تزداد بوجود السكريات وخاصةً السكر و الكلوكوز⁽³¹⁾ التي تساعد على الإلتصاق على سطوح الأسنان من خلال آلية إفراز الإنزيمات خارج خلوية (GTFs) Glucosyltransferases و (FTFs) Fructosyltransferases والكلوكان المرتبط

داخل طبقة اللب السني (Dental pulp) مما يؤدي إلى إنتفاخها وتهيجها⁽³⁵⁾.

اللوحة خشنة بعض الشيء في منطقة الأسنان الطواحن (Molars) وخاصة على طول خط اللثة⁽³⁴⁾. كما أنَّ الأحماض التي تتكون في اللوحة السنية تهاجم المعادن الموجودة في الطبقة الصلبة من السن والمسماة بالمينا (Enamel) وهي الطبقة الخارجية التي تغطي السن ويؤدي تآكلها إلى حدوث ثقب صغير فيها تسمى بتسوس الأسنان مُكسبة البكتيريا والأحماض قدرة على الوصول إلى الطبقة الثانية (الوسطى) من السن المسماة بالعاج (Dentine) التي تكون أكثر ليونة وأقل قدرة على مقاومة الأحماض من الطبقة الأولى، وحين تصل عملية تسوس السن إلى هذه النقطة تزداد سرعة تعفن السن تدريجياً وتتقدم البكتيريا والأحماض في طريقها إلى داخل الطبقات التي يتكون منها السن وصولاً إلى



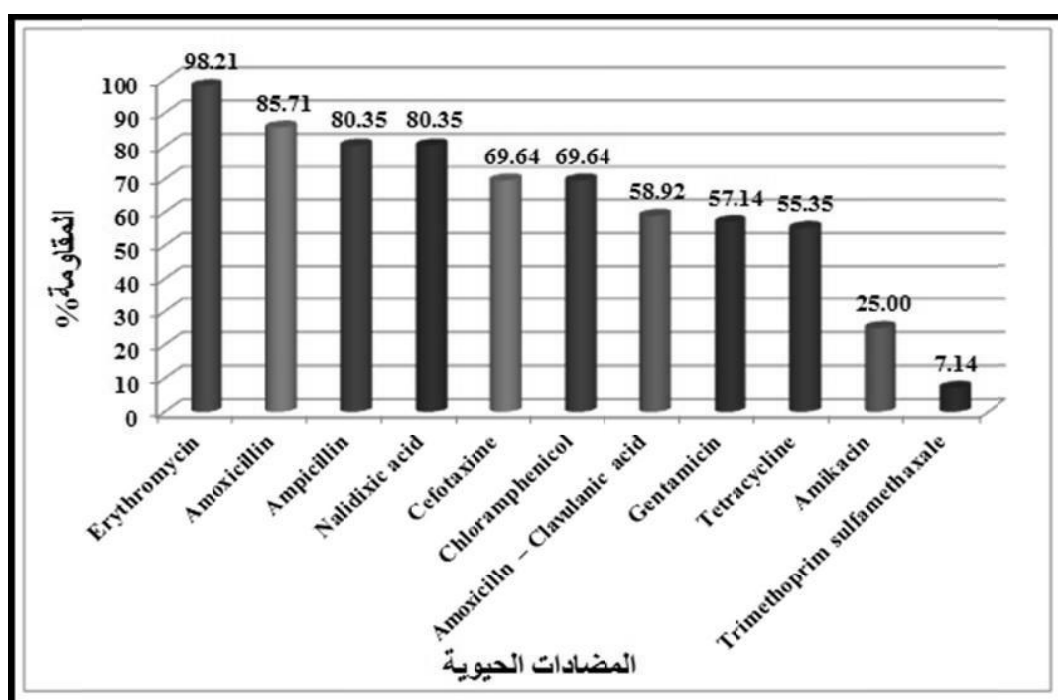
وحامض النالديسك (Nalidixic acid) بنسبة 80.35% قبل التكوين لكلٍ منهما و 83.92% و 87.50% بعد التكوين لكلٍ منهما على التوالي.

وأظهرت العزلات مقاومة إتجاه مضادات السيوفوتاكسيم (Cefotaxime) والكلورامفينيكول (Chloramphenicol) والأموكسيسيلين – حامض الكلافولانك والجنتاميسين (Gentamicin) والتتراسايكلين (Tetracycline) بنسبة (69.64 و 69.64 و 58.92 و 57.14 و 55.35) % قبل تكوين الغشاء الحيوي، على التوالي وبنسبة (75.00 و 89.28 و 76.78 و 78.57 و 66.07) % بعد تكوين الغشاء الحيوي، بالترتيب. في حين أظهرت العزلات ذاتها مقاومة ضعيفة وحساسية عالية تجاه مضاد الأيكاسين (Amikacin) والترايميثوبرايم سلفاميثاكيل (Trimethoprim sulfamethaxale) بنسبة (25.00 و 7.14) % قبل تكوين الغشاء الحيوي و (48.21 و 19.64) % بعد التكوين، على التوالي.

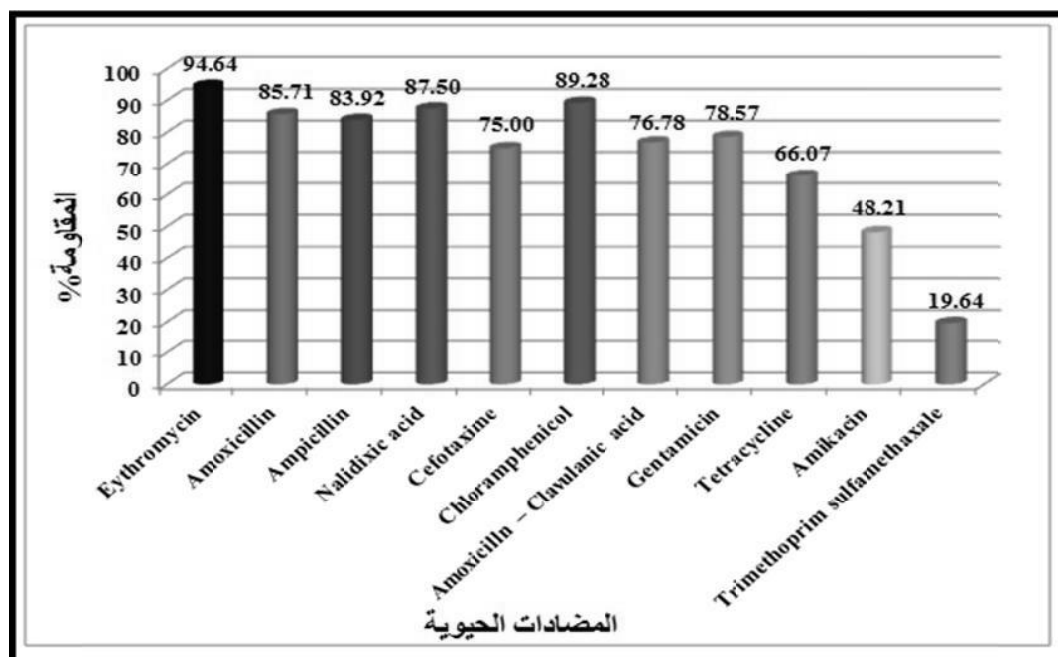
شكل (2): النسب المئوية لعزلات *S. mutans* المكوّنة للغشاء الحيوي بتأثير الكربوهيدرات.

رابعاً: مقاومة عزلات *S. mutans* للمضادات الحيوية قبل وبعد تكوين الأغشية الحيوية
أجري اختبار فحص الحساسية الدوائية لجميع عزلات *S. mutans* الواردة في الدراسة والمُسببة لتسوس الأسنان (كونها المسبب الأول والأكثر تردداً وشيوعاً) إتجاه مجموعة من المضادات الحيوية ومقاومتها لها من خلال قياس قطر منطقة تثبيط النمو حول أقراص المضادات المستخدمة ومقارنتها بما ورد في⁽¹⁴⁾.

يُبين الشكلين (3) و (4) أنَّ جميع عزلات *S. mutans* المُسببة لتسوس الأسنان قاومت مضاد الإريثرومايسين (Erythromycin) قبل وبعد تكوين الغشاء الحيوي بنسبة 98.21% و 94.64% على التوالي والأموكسيسيلين (Amoxicillin) بنسبة 85.71% قبل وبعد التكوين على التوالي، كما قاومت مضاد الأمبيسيلين (Ampicillin)



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



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

للكائنات المكونة له والتي تتحكم بنسب دخول جزيئات المضاد الحيوي بواسطة جزيئات الكربوهيدرات خارج خلوية المكونة لذلك الغشاء والتي تعمل على عرقلة إنتقال المضادات الحيوية إلى داخل الغشاء أو من خلال إرتباطها

كما نلاحظ من الشكلين أيضاً أن مقاومة العزلات للمضادات الحيوية إزدادت بعد تكوينها للغشاء الحيوي مما يدل على زيادة ضراوتها بعد تكوينها للغشاء الحيوي، وذلك يرجع إلى تركيبة الغشاء الحيوي والخصائص الفسلجية

بصورة أيونية مع جزيئات المضادات الأخرى⁽¹¹⁾. ومن الآليات الأخرى التي تكتسبها المستعمرات البكتيرية المتجمعة والمكونة للغشاء الحيوي هي القابلية البيئية على أخذ المضادات الحيوية من قبل البكتيريا الواقعة في الطبقة السفلى العميقة من الغشاء الحيوي بسبب إنعدام الأوكسجين وقلة وصول المغذيات لها مُنحصراً بذلك على الطبقة العليا من الغشاء الحيوي التي تتأثر بالمضاد الحيوي فقط⁽³⁾. كما أن الكثافة العالية التي تنتج من الزيادة في صفة التلامس للخلايا البكتيرية المكونة للغشاء الحيوي مع بعضها البعض تؤدي إلى إكسابها حالة من التغيرات الوراثي والتي تُعتبر من الأسباب المهمة لمقاومة المضادات الحيوية عبر البلازميدات الحاملة لجينات المقاومة فيما بينها⁽³⁶⁾. إضافة إلى ذلك فإن بقاء الغشاء الحيوي لمدة طويلة وإتخاذ بعض طبقاته العليا (يطلق عليها بالخلايا الدائمة) حالة من السكون عند تعرضها المستمر للمضادات الحيوية حتى وأن كانت بتركيز عالية ذات تأثير قاتل فإن تلك البكتيريا تمتلك خصائص مظهرية مغايرة لبقية الجراثيم الأخرى المكونة للطبقة العليا من الغشاء الحيوي مُكتسبة بذلك مقاومة عالية للمضادات الحيوية ومُعوضة التآلف من البكتيريا التي تم القضاء عليها ببكتيريا أخرى أعلى مقاومة وضراوة⁽³⁷⁾.

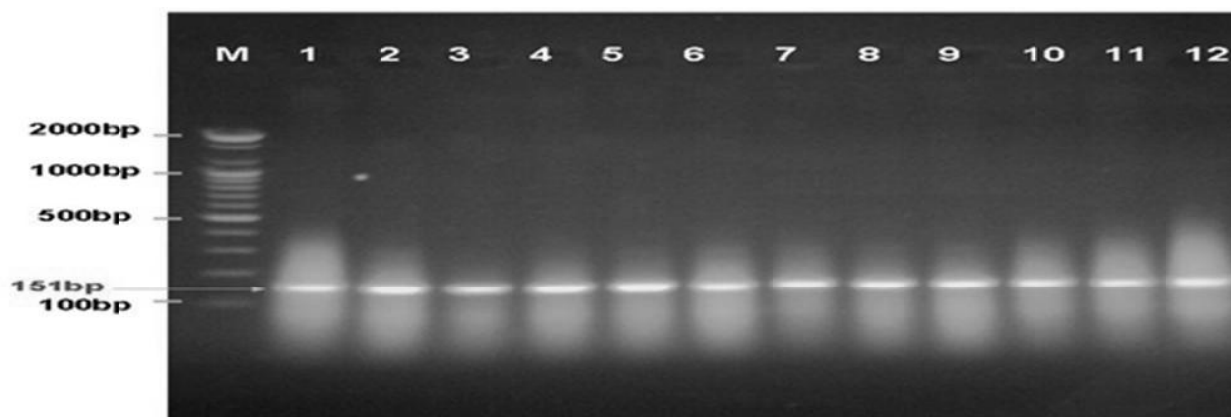
إن من الشائع مقاومة بكتيريا *S. mutans* لمركبات الماكروليدات (Macrolides) التي من ضمنها الإرترومايسين؛ إذ تنشأ المقاومة من خلال إنتاج إنزيم RNA methylase المُشفّر بواسطة مورثة *erm*⁽³⁸⁾، وأدرج الإرترومايسين ضمن قائمة المضادات الحيوية التي تُجابه بمقاومة عالية من قبل *S. mutans* حيث وصلت نسبة المقاومة في بعض السلالات إلى 100%⁽³⁹⁾ وهي مُقاربة من نسبة المقاومة لمركبات الماكروليدات في الدراسة الحالية. كما أن التباين الملحوظ الذي أظهرته عزلات *S. mutans* في مقاومتها للمضادات الحيوية المُستخدمة قد يعود سبباً إلى التنوع في آليات المقاومة من خلال إنتاج إنزيمات البيتا لكتام المُثبّطة لهذه المضادات أو من خلال تغيير مواقع ارتباط البروتينات الرابطة للبنسلين Penicillin binding proteins (PBPs)⁽⁴⁰⁾. والسبب الآخر يعتمد على عوامل الضراوة للبكتيريا ذاتها؛ إذ تُظهر بعض العزلات مُقداراً من المقاومة أكثر من غيرها وأن الاختلاف في ظروف الاختبارات ونوع التقنيات المُستخدمة في الدراسة كُُل ذلك مُجتمعاً يُوجد إختلافاً في مستويات المقاومة⁽³³⁾.

وأكد⁽⁴¹⁾ بأن المقاومة لمركبات البنسلين (Penicillins) لا تشمل فقط إنتاج إنزيم البنسلين وإنزيمات البيتا لكتام بل يتعدى ذلك إلى إنتاج البروتينات الرابطة للبنسلين (PBPs) الواقعة في الغشاء السايوبلازمي المرتبط بجدار الخلية، وتمتلك هذه البروتينات فعالية إنزيمية مثل

المضاد الحيوي عبر غشاء الخلية البكتيرية⁽⁴²⁾. أما سبب المقاومة التي أبدتها العزلات البكتيرية إتجاه مضادي الجنتاميسين والتتراسايكلين فيُعزى إلى إستعماله موضعياً أو إلى حدوث طفرة أثّرت في نضوحية الغشاء الخارجي لهذا المضاد⁽⁴³⁾. وفيما يخص مضادّي Amikacin و Trimethoprim sulfamethaxale فإن المقاومة الضعيفة والحساسية العالية التي أبدتها عزلاتنا لها يُمكننا من إعتبار هذين المضادين من المضادات الحيوية ذات التأثيرات العلاجية المتوسطة؛ إذ يُمكن الإستفادة من هذه التأثيرات في علاج الأخماج الناتجة عن بكتيريا *S. mutans* المُقاومة للعديد من المضادات الحيوية المختلفة.

خامساً: التوصيف الجزيئي التوكيدي لعزلات *S. mutans* 1- تفاعل سلسلة إنزيم البلمرة Polymerase chain reaction (PCR)

أظهر الشكل (5) إمتلاك جميع عزلات *S. mutans* (14) عزلة منتخبة من 56 عزلة؛ بإعتبارها منتجة للغشاء الحيوي وأكثر مقاومة للمضادات الحيوية) المرحّلة كهربائياً على هلام الأكاروز لمورثة 16S ribosomal RNA التي تُمثّل المورثة التشخيصية لبكتيريا *S. mutans* بطول 151 زوج قاعدي Base pairs (bp) مما يُثبت عاندية جميع العزلات (12 عزلة) لتلك البكتيريا⁽⁴⁴⁾.



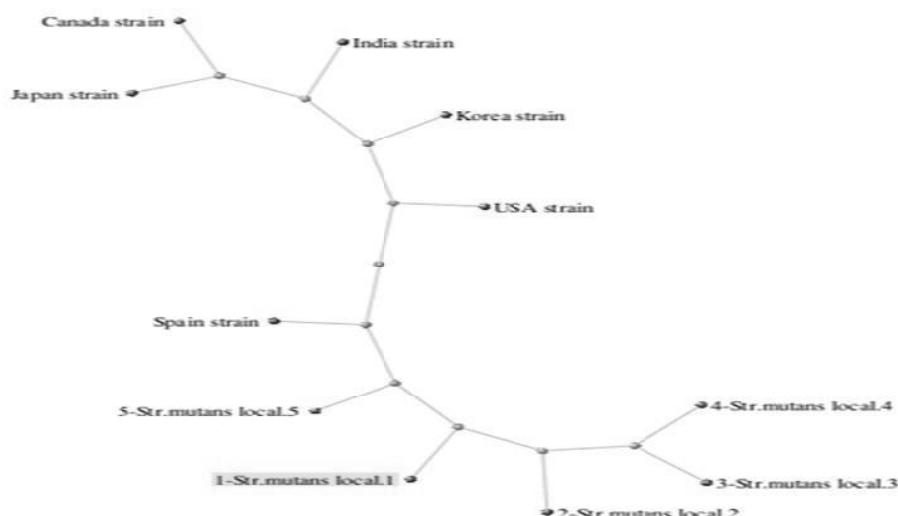
شكل (5): الترحيل الكهربائي لمورثة 16S ribosomal RNA (151 bp) المتضاعفة باستخدام تقنية ألد (PCR) لعزلات *S. mutans*.

M = المعلم القياسي (1000 bp)
(12 - 1) عدد عزلات *S. mutans*
ظروف الترحيل: هلام الاكاروز (1%) , فرق الجهد (80 فولت) , الزمن (95 دقيقة)

isolate (AJ554208.1) إضافة إلى وجود تقارب بنسبة أقل عند مقارنتها بالعزلات القياسية الكورية (DQ677785.1) والأمريكية (AY188348.1) والكندية (DQ303189.1) والهندية (JX678701.1) واليابانية (AB294730.1) كما في شكل (7) وملاحقة (2 و 3 و 4 و 5 و 6) التي تُبين التشابه ما بين العزلات المحلية مع العزلة الأسبانية في الموقعين النيوكليوتيديين (14 و 15) اللذان يمثلان (TT).

2- الكشف عن تسلسل القواعد النتروجينية لمورثة 16S

rRNA في عزلات *S. mutans*
أجري الكشف عن تتابع تسلسل القواعد النتروجينية لمورثة 16S rRNA في عزلات *S. mutans* لبيان أوجه التشابه والاختلاف مع عزلات *S. mutans* القياسية العالمية من خلال تحليل تتابع تسلسل المورث بواسطة الشجرة الوراثية Phylogenetic tree analysis (شكل - 6) إذ أظهرت نتائج تحليل الشجرة الوراثية Phylogenetic tree analysis لمورثة 16S rRNA في عزلات *S. mutans* المحلية وجود تقارب مع العزلة القياسية الأسبانية Spain



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

Japan	GTAATACGTAGGTCGCCAGCGTTGTCCGGATTATTTGGGCGTAAAGGGAGCGCAGGCCG-	587
India	GTAATACGTAGGTCGCCAGCGTTGTCCGGATTATTTGGGCGTAAAGGGAGCGCAGGCCG-	545
Korea	GTAATACGTAGGTCGCCAGCGTTGTCCGGATTATTTGGGCGTAAAGGGAGCGCAGGCCG-	596
USA	GTAATACGTAGGTCGCCAGCGTTGTCCGGATTATTTGGGCGTAAAGGGAGCGCAGGCCG-	598
Canada	GTAATACGTAGGTCGCCAGCGTTGTCCGGATTATTTGGGCGTAAAGGGAGCGCAGGCCG-	574
Spain	GTAATACGTAGGTCGCCAGCGTTGTCCGGATTATTTGGGCGTAAAGGGAGCGCAGGCCG-	410
4-Str.mutans	-----CGAACCCAGGCCG-	14
5-Str.mutans	-----CAACCC-9CGG-	11
2-Str.mutans	-----CAACCCCGCCG-	13
1-Str.mutans	-----CAACCC-OCG-	11
3-Str.mutans	-----CAACCCAAGCCG-	13
Japan	TCAGGAAAGTCTGGAGTAAAGGCTATGGCTCAACCATAGTGTGCTCTGGAAACTGTCTG	647
India	TCAGGAAAGTCTGGAGTAAAGGCTATGGCTCAACCATAGTGTGCTCTGGAAACTGTCTG	605
Korea	TCAGGAAAGTCTGGAGTAAAGGCTATGGCTCAACCATAGTGTGCTCTGGAAACTGTCTG	656
USA	TCAGGAAAGTCTGGAGTAAAGGCTATGGCTCAACCATAGTGTGCTCTGGAAACTGTCTG	658
Canada	TCAGGAAAGTCTGGAGTAAAGGCTATGGCTCAACCATAGTGTGCTCTGGAAACTGTCTG	634
Spain	TCAGGAAAGTCTGGAGTAAAGGCTATGGCTCAACCATAGTGTGCTCTGGAAACTGTCTG	470
4-Str.mutans	TTTAAAGTCTGAAGTTAAAGGCTATGGCTCAACCATAGTGTGCTCTGGAAACTGTCTG	73
5-Str.mutans	TTTAAAGTCTGAAGTTAAAGGCTATGGCTCAACCATAGTGTGCTCTGGAAACTGTCTG	71
2-Str.mutans	TTTAAAGTCTGAAGTTAAAGGCTATGGCTCAACCATAGTGTGCTCTGGAAACTGTCTG	72
1-Str.mutans	TTTAAAGTCTGAAGTTAAAGGCTATGGCTCAACCATAGTGTGCTCTGGAAACTGTCTG	71
3-Str.mutans	TTTAAAGTCTGAAGTTAAAGGCTATGGCTCAACCATAGTGTGCTCTGGAAACTGTCTG	72
Japan	ACTTGAGTGCAGAAAGGGGAGAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAT	707
India	ACTTGAGTGCAGAAAGGGGAGAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAT	665
Korea	ACTTGAGTGCAGAAAGGGGAGAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAT	716
USA	ACTTGAGTGCAGAAAGGGGAGAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAT	718
Canada	ACTTGAGTGCAGAAAGGGGAGAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAT	694
Spain	ACTTGAGTGCAGAAAGGGGAGAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAT	530
4-Str.mutans	ACTTGAGTGCAGAAAGGGGAGAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAAATG-----	122
5-Str.mutans	ACTTGAGTGCAGAAAGGGGAGAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAAATG-----	120
2-Str.mutans	ACTTGAGTGCAGAAAGGGGAGAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAAATG-----	121
1-Str.mutans	ACTTGAGTGCAGAAAGGGGAGAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAAATG-----	120
3-Str.mutans	ACTTGAGTGCAGAAAGGGGAGAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAAATG-----	121

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

تشابهها من بين العزلات العالمية. وهذه النتائج تؤكد على صحة تشخيص عزلات *S. mutans* بعد مقارنتها مع عزلات قياسية عالمية لمعرفة تسلسل القواعد النروجينية لمورثة 16s rRNA التي تمثل لمورثة المرجعية (Refrence gene) لتشخيص عزلات *S. mutans* (43). وإن التشخيص الدقيق على المستوى الجزيئي المتمثل بمعرفة التشابه لـ DNA العزلات له فائدة تشخيصية فضلاً عن إمكانية إستخدام بعضاً من هذه العزلات في التطبيقات العملية كمعزلات حيوية أو دوائية أو في إستخدامها لدراسات الوراثة الجزيئية لا سيما أنه لا توجد دراسات سابقة حول تحليل تتابع القواعد النروجينية لعزلات *S. mutans* في العراق وبالتالي الإستفادة منها في قاعدة البيانات ضمن موقع NCBI الخاص ببنك الجينات (Gene Banck).

جدول (6): نسب التقارب ما بين سلالات *S. mutans* المحلية والسلالات العالمية منها (الإسبانية والهندية والكورية والأمريكية والكندية واليابانية).

ت	Accession Number	Name of the CEV Sequences	Country	Homology sequence identity for local <i>S. mutans</i> isolates				
				<i>S. mutans</i> (1)	<i>S. mutans</i> (2)	<i>S. mutans</i> (3)	<i>S. mutans</i> (4)	<i>S. mutans</i> (5)
1	AJ554208.1	<i>S. mutans</i> partial 16s rRNA gene, strain CECT 4034	Spain	90%	89%	89%	89%	90%
2	AB294730.1	<i>S. mutans</i> gene for 16s rRNA, partial sequence	Japan	88%	88%	89%	87%	88%
3	DQ303189.1	<i>S. mutans</i> strain ATCC 25175 16s rRNA gene, partial sequence	Canada	88%	88%	89%	87%	88%
4	JX678701.1	<i>S. mutans</i> strain P34 16s rRNA gene, partial sequence	India	88%	88%	89%	87%	88%
5	DQ677785.1	<i>S. mutans</i> strain ChDC YM22 16s rRNA gene, partial sequence	Korea	88%	88%	89%	87%	88%
6	AY188348.1	<i>S. mutans</i> strain ATCC 25175 16s rRNA gene, complete sequence	USA	88%	88%	89%	87%	88%

3- وجود تشابه في الشجرة الوراثية للمورث المحافظ (*16S rRNA*) بين سلالة *S. mutans* المحلية والسلالة القياسية الإسبانية في الموقعين النيوكليوتيديين 14 و 15.

ثانياً: التوصيات Recommendations

1- إجراء الفحص الدوري للفم للتحري عن وجود المسببات المرضية تجنباً لحدوث الإصابة اللاعرضية، والتي يمكن لها أن تتطور إلى إصابة عرضية تؤثر على حالة الفم.

الاستنتاجات والتوصيات Conclusions and Recommendations

أولاً: الإستنتاجات Conclusions

- 1- سيادة بكتريا *S. mutans* كمسبب رئيس لأخماج الفم عند الإنسان وخاصة تسوس الأسنان الذي له دوراً كبيراً في زيادة إنتشار الجراثيم في الفم وتكوينها للأغشية الحيوية وخاصة عند توفر الكربوهيدرات.
- 2- قابلية عزلات *S. mutans* على إبداء مقاومة متعددة لعدد من المضادات الحيوية المدروسة لإمتلاكها مورثات عوامل الضراوة وتكوين الأغشية الحيوية.

- 11- Lewis, K. (2001). Riddle of biofilm resistance antimicrobial. Agents Chemother., 45: 999 – 1007.
- 12- Mathur, T.; Singhal, S.; Khan, S.; Upadhyay, D. J.; Fatma, T. and Rattan, A. (2006). Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: an elevation of three different screening methods. India J. Med. Microbiol., 24(1): 25 – 29.
- 13- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) (2003). Performance standards for disks susceptibility testing; approved standard, 6th ed. PP: 100-113, Wayne, Pennsylvania, USA.
- 14- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (2013). Performance standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 23th Information Supplement 33(1). Wayne, Pennsylvania, USA.
- 15- Collee, J; Gerald, G.; Fraser, F.; Andrew, G.; Marmion, M.; Barrie, P.; Simmon, S. and Anthong, N. (1996). Mackie and McCartney Practical Medical Microbiology. 14th ed., Churchill Livingstone, New York, PP: 131–150.
- 16- Simon, L. (2007). The role of *Streptococcus mutans* and oral ecology in the formation of dental caries. J. Microbiol., 2: 510 – 533.
- 17- الزبيدي, أسامة فيصل كوكز (2010). تأثير المعزز الحيوي (Probiotic) المحضّر من بكتريا *Lactobacillus acidophilus* على التصاقية البكتريا المعزولة من تسوس الأسنان. رسالة ماجستير. كلية العلوم. جامعة القادسية. العراق.
- 18- الموسوي, علياء موسى علي (2006). عزل وتشخيص بعض البكتريا والخمائر المرافقة لبعض أمراض الفم في مدينة الناصرية وإختبار حساسيتها الدوائية. رسالة ماجستير. كلية التربية. جامعة ذي قار. العراق.
- 19- Landman, D. (2001). Management of infections due to resistance *Staphylococcus aureus*. A. M. J. Infect., 30: 250 – 255.
- 20- Fong, I. W. (2002). Infections and their role in atherosclerotic vascular disease. J. A. M. Dent. Assoc., 133: 75 – 135.

2- الإمتناع عن إستخدام المضادات الحيوية بصورة مستمرة وبشكل عشوائي لتأثيرها السلبي على توازن التنوع الجرثومي داخل الجسم بشكل عام والفم بشكل خاص.

المصادر

- 1- Lamont, R. J. and Jenkinson, H. F. (2010). "Oral Microbiology ata Glance" Wiley Blackwell. Singapore, Hong Kong.
- 2- Donlan, R. M. (2002). Biofilm microbial life on surface. J. Emer. Infect. Dis., 8(9): 881 – 890.
- 3- Rogers, A. H. (2008). Molecular Oral Microbiology. Caister Academic Press.
- 4- Aas, J. A.; Paster, B. J.; Stockes, L. N.; Olsen, I. and Dewhirst, F. E. (2005). Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. J. Clin. Microbiol., 43: 5721 – 5732.
- 5- Roberts, M. C. (2002). Antibiotic toxicity, interactions and resistance development. Periodontology, 28: 28 – 297.
- 6- Ryder, M. A. (2005). Cather-related all about biofilm. Advanced infection it's Practice Nursing, 5(3) :1 – 15.
- 7- Wen, Z. T.; Yates, D.; Ahn, S. – J. and Burne, R. A. (2010). Biofilm formation and virulence expression by *Streptococcus mutans* are altered when grown in dual-species model. B.M.C. Microbiol., 10(111): 1 – 9.
- 8- Han, T. K. (2005). Development of a DNA vaccine against *Streptococcus mutans*: a novel approach to immunization against dental caries. Ph. D. Thesis, College of Arts and Sci., Univ. South Florida, USA.
- 9- Fritsche, T. R.; Swoboda, S. E.; Olson, B. J.; Moore, F. M.; Meece, J. K. and Novicki, T. J. (2011). Evaluation of The Sensititre ARIS2x and Vitek 2 Automated Systems for Identification of Bacterial Pathogens Recovered from Veterinary Specimens. Marshfield labs. Lacrosse Univ. Wisconsin. USA.
- 10- Mainiatis, T.; Fritsch, E. F. and Sambrook, J. (1982). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

- streptococci in related to some carbohydrate substrates. *Afric. J. Microbiol. Res.*, 4(11): 1051 – 1056.
- 30- Leme, A. F. P.; Koo, H.; Bellato, C. M.; Bedi, G. and Curry, J. A. (2006). The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation – new insight. *J. Dent. Res.*, 85(10): 878 – 887.
- 31- Caglar, E.; Kargul, B. and Tanbogaet, I. (2005). Bacteriotherapy and probiotics role on oral health. *J. Oral Dis.*, 11: 1 – 7.
- 32- Shemesh, M.; Tam, A. and Steinberg, D. (2007). Expression of biofilm – associated gene of *Streptococcus mutans* in response to glucose and sucrose. *J. Med. Microbiol.*, 56: 1528 – 1535.
- 33- Brown, T. A.; Ahn, S. J.; Frank, R. N.; Chen, Y. Y.; Lemos, J. A. and Burne, R. A. (2005). A hypothetical protein of *Streptococcus mutans* is critical for biofilm formation. *Infect. Immun. J.*, 73(5): 3147 – 3150.
- 34- Li, Y. and Burne, R. A. (2013). Regulation of the *gtfBC* and *fff* genes of *Streptococcus mutans* in biofilms in response to pH and carbohydrate. *Microbiol.*, 147: 2841 – 2848.
- 35- Shemesh, M.; Tam, A.; Aharoni, R. and Steinberg, D. (2010). Genetic adaptation of *Streptococcus mutans* during biofilm formation on different types of surfaces. *B.M.C. Microbiol.*, 10(51): 1 – 10.
- 36- Parsek, M. and Singh, P. (2003). Bacterial biofilm can emerging link to disease pathogenesis. *Annul. Rev. Microbiol.*, 45: 50 – 55.
- 37- Keren, I.; Shah, D.; Spoering, A.; Kadalu, N. and Lewis, K. (2004). Specialized per sister cells and the mechanism of multi drug tolerance in *E. coli* bacterial. 186: 8172 – 8180.
- 38- Jorgensen, J. H.; Crwford, S. A.; McElmeel, M. L. and Fiebelkorn, K. R. (2004). D-zone test clindamycin resistance of staphylococci in conjunction with performance of automatically detection. *J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 42: 1800–1802.
- 21- الحسيني, عدي متعب هادي (2002). دراسة مايكروبيولوجية لمسببات تسوس الأسنان والتهاب اللثة وما حول السن والخراجات حول الجذر في محافظة النجف. رسالة ماجستير. كلية العلوم. جامعة الكوفة. العراق.
- 22- Rouabhia, M. and Chmielewski, W. (2012). Disease associated with oral poly microbial biofilms. *The open Mycol. J.*, 6: 27 – 32.
- 23- Waltimo, T. M. T.; Siren, E. K.; Torkko, H. L. K.; Olsen, I. and Hapasele, M. P. P. (1997). Fungi in therapy – resistant apical periodontitis. *Int. Endod. J.*, 30: 96 – 101.
- 24- AL – Aswad, J. D. (1999). Prevalence and microbiology of oral mucosal lesion in a sample of complete denture wearers. M. SC. Thesis in Oral Medicine, College for Dentistry – University of Baghdad. Iraq.
- 25- Sulaiman, A. W. (2000). Quantitative measurement of urea content in saliva, acquired pellicle and dental caries susceptibility in human adults. M. SC. Thesis in Preventive Dentistry, College of Dentistry – University of Baghdad. Iraq.
- 26- Duarte, S.; Klein, M. I.; Aires, C. P.; Cury, J. A.; Bowen, W. H. and Koo, H. (2008). Influences of starch and sucrose on *Streptococcus mutans* biofilms. *Oral Microbiol. Immunol.*, 23: 206 – 212.
- 27- Bedran, T. B. L.; Azelmat, J.; Spolidorio, D. and Grenier, D. (2013). Fibrinogen-induced *Streptococcus mutans* biofilm formation and adherence to endothelial cells. *BioMed. Res. Int.*, 10: 1155 – 1163.
- 28- Ghasempour, M.; Rajabnia, R.; Irannejad, A.; Hamzeh, M.; Ferdosi, E. and Bagheri, M. (2013). Frequency, biofilm formation and acid susceptibility of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in saliva of preschool children with different levels of caries activity. *Dent. Res. J.*, 10(4): 440 – 445.
- 29- Tahmourespour, A.; Kermanshahi, R. K.; Salehi, R. and Pero, N. G. (2010). Biofilm formation potential of oral

Mechanistic basis for the action of new cephalosporin antibiotics effective against methicillin and vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*. J. Biol. Chem. 281: 10035–10041.

43- Lal, D.; Verma, M. and Lal, R. (2011).

Exploring internal features of 16S rRNA gene for identification of clinically relevant species of the genus streptococcus. Annals Clin. Microbiol. Antimicrob., 10: 28 – 39.

44- Kawamura, Y.; Hou, X. G.; Sultana, F.;

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

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

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

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

42- Fuda, C.; Hesek, D.; Lee, M.; Heilmayer, W.; Novak, R.; Vkulenko, S. B.; and Mobashery, S. (2006).

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

Received :12/3/2014

Accepted :8/6/2014

Wafaa A. J. Al-Kaaby

Adnan H. Al-Hamadani

Majed K. A. Al-Shebli

Dept. Biology - College of
Education
AL-Qadisiya Univ.
alkaaby@yahoo.com

Dept. Microbiology -
Medicine college
AL-Qadisiya Univ.

Dept. Biology - College of
Education
AL-Qadisiya Univ.

Abstract:

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

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

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

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

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