**جمهورية العراق**

**وزارة التعليم العالي والبحث العلمي**

**جامعة كربلاء**

**كلية التربية للعلوم الصرفة**

**قسم علوم الحياة**

# تأثيرالمستخلص الكحولي لنبات الزنجبيل على تكوين الغشاء الحيوي لبكتريا *Streptococcus mutans* المعزولة من مرضى تسوس الاسنان

**رسالة مقدمة**

الى مجلس كلية التربية- جامعة كربلاء وهي جزء

من متطلبات نيل درجة الماجستيرفي علوم الحياة/علم الحيوان

من قبل

الطالبة **ازهار راقب كاظم الفتلاوي**

بكالوريوس علوم حياة / جامعة كربلاء 2012

بأشراف

**أ.م.د هيام عبد الرضا كريم العواد**

ذو الحجة 1437 ايلول 2016

بسم الله الرحمن الرحيم

(وَيسأَلوُنَكَ عَنِ الرُوحِ قُلِ
الروُحُ مِن أَمِر رَبِي
وَمَآ أُوتِيتُم مِنَ العِلمِ إلآ
قلَيِلاً)

صدق الله العلي العظيم

سورة الاسراء (الاية ٨٥)

# ا لا هـد ا ء

**الى خير مولود..واحسن موجود..والحوض المورود..والشفيع في اليوم المشهود... الى النبي محمدصلى الله عليه و اله اولي المكارم والجود**

**الى الارواح التقية ..والقلوب النقية..و الدماء الوفية التي سالت على ارض العراق الحبيب..الى شهدائنا الابرار**

**الى من اثقلت الجفون سهرا..وحملت الفؤاد هما..وجاهدت الايام صبرا..وايقنت بالله املا.. . الى والدتي الحبيبة**

**الى من هم اغلى من نفسي..قرة عيني..وثمرة فؤادي..واملي في الحياة... ابني وابنتي**

**الى من اشد بهم أزري..سندي في حياتي..احبائي واعزائي ... اخوتي واخواتي**

**الى كل قلب خفق لي حبا ووفاءا..اهدي جهدي المتواضع**

**أ ز هـا ر**

# شكر وتقدير

الحمد لله حمدا كثيرا كما أمر، الحمد لله الذي تتم الصالحات بنعمته والصلاة والسلام على خير خلقه نبينامحمدٍ وعلى أله الطيبين الطاهرين وبعد ...

فالواجب يحتم علي ان أتقدم بخالص شكري وامتناني إلى استاذتي الفاضلة الدكتورة هيام عبدالرضا العواد لاقتراحها مشروع البحث ولمواقفها العلمية وآرائها السديدة التي غمرتني في أثناء مدة دراستي فكانت ينبوعا من العلم والمعرفة التي كان لها الأثر الأكبر في إكمال هذا العمل فجزاها الله عني خير الجزاء.

وكذا أتقدم بجزيل شكري وتقديري إلى قسم علوم الحياة وعمادة كلية التربية للعلوم الصرفة ورئاسة جامعة كربلاء لما قدموه لي من مساعدة في تسهيل اكمال دراستي.

ولا يفوتني ان أتقدم بالشكر والامتنان الى الدكتور علاء الدعمي جامعة كربلاء والدكتورة زهراء المنتسبة الى مستوصف حي الحر والى منتسبي مستشفى طب الاسنان التعليمي في جامعة كربلاء لما ابدوه لي من مساعدة في البحث.

ولاتفي كلمات الشكر والعرفان بحق من كانت خير عون وسند لاتمام دراستي (والدتي الحبيبة).

خالص شكري وتقديري الى لجنة المناقشة والخبيرين العلمي واللغوي والى كل من مد يد عون او مساعدة او نصيحة لي خلال فترة البحث والدراسة وفاتني ذكر اسمه.....والله ولي التوفيق

أزهار

# الخلاصة

هدفت هذه الدراسةالى عزل بكتريا *Streptococcus mutans*وتشخيصها من منطقة الفم وماحول الاسنان وتقييم الفعالية التثبيطية للمستخلص الكحولي المثيلي لنبات الزنجبيل ضد خلايا بكتريا *S.mutans* وضد تكوين طبقة الغشاء الحيوي، اذ تضمنت الدراسة محورين: المحور الاول:عزل وتشخيص بكتريا *S.mutans* من المرضى المصابين بأمراض الفم وماحول الاسنان الذين راجعوا المستوصف الصحي لحي الحر والمستشفى التعليمي لطب الاسنان في جامعة كربلاء وزرعت العينات على وسط اكار الدم والاوساط الانتخابية Mitis- salivarius Bacitracin agar (MSB)و Trypone yeast extract cysteine sucrose bacitracin agar(TYCSB)واعتمادا على الصفات الزرعية والفحوصات المجهرية للخلايا المصبغة وبعد اجراء الفحوصات الكيموحيوية امكن عزل وتشخيص18عزلة من بكتريا *S.mutans*.

المحور الثاني تضمن تقييم الفعالية التثبيطية للمستخلص الكحولي لنبات الزنجبيل وبالتراكيزالاتية (12.5،25،50 ،100،150) ملغم/ملواوضحت النتائج حساسية البكتريا تجاه المستخلص اذ اظهر التركيز 150 اعلى قطر تثبيط (23)ملم وتراوحت مناطق التثبيط مابين (7.6-23)ملم ، وكذا تم حساب التركيز المثبط الادنى MIC حيث بلغت قيمته 12.5% .

وبعد ذلك تم اختبار قابلية البكتريا على تكوين الغشاء الحيوي بأستخدام طريقة Congored agar واوضحت النتائج ان 72.2 % من العزلات البكتيرية كانت منتجة له بينما كانت نسبة العزلات التي اعطت انتاج بكمية متوسطة11.1% و16.6% لم تكن منتجة للغشاء الحيوي.

تم اختبار الفعالية التثبيطية لنبات الزنجبيل ضد تكوين الغشاء الحيوي Biofilmمن خلال تقدير الكمية التعبيرية لجين *gtfB* قبل استخدام المستخلص الكحولي لنبات الزنجبيل وبعده وبينت النتائج الفعالية التثبيطة العالية للمستخلص ضد تكوين الغشاء الحيوي اذ اظهرت التراكيز ( 25 ،50 ،100) %معدلات تثبيط واضحة بينما لم يظهر التركيز 12.5% تثبيطا ملحوظا واظهر التركيز 100% اعلى معدل تثبيط ثم تلاه التركيزان (25،50) % على التوالي.

وفي ضوء ماقدمته الدراسة نستنتج ان للزنجبيل فعالية تثبيطية عالية ضد البكتريا وضد تكوين الغشاء الحيوي مما يجعل منه علاجا فعالا لامراض الفم وماحول الاسنان.

# المحتويات


| الرقم | المحتويات | الصفحة |
|---|---|---|
| | **الخلاصة** | a |
| | **المحتويات** | I-IV |
| | **قائمة الجداول** | V |
| | **قائمة الاشكال** | V |
| | **قائمة المختصرات** | VI |
| | **الفصل الأول** | |
| 1 | المقدمة | 1-2 |
| | **الفصل الثاني** | |
| 2 | استعراض المراجع | |
| 1-2 | **امراض الفم** | 3 |
| 2-2 | **مسببات التسوس** | 5 |
| 3-2 | **بكتريا *Streptococcus mutans*** | 6 |
| 4-2 | **امراضية بكتريا *Streptococcus mutans*** | 7 |
| 5-2 | **عوامل الضراوة** | 8 |
| 1-5-2 | **القدرة على انتاج الحامض وتحمل الظروف الحامضية** | 9 |
| 2-5-2 | **Bacteriocin(Mutacin)** | 9 |
| 3-5-2 | **انزيم الهيمولاسين** | 9 |
| 4-5-2 | **الالتصاق** | 10 |
| 6-2 | **طبقة الغشاء الحيوي** | 10 |
| 1-6-2 | **تكوين الغشاء التكيفي** | 10 |
| 2-6-2 | **الالتصاق الانعكاسي** | 11 |
| 3-6-2 | **الالتصاق الاضافي** | 11 |
| 4-6-2 | **الغشاء الحيوي الناضج** | 11 |
| 5-6-2 | **مرحلة الانفصال** | 12 |
| 7-2 | **جينات بكتريا *S.mutans*** | 12 |
| 8-2 | **علاج تسوس الاسنان** | 13 |
| 9-2 | **نبات الزنجبيل** | 14 |
| 1-9-2 | **الفائدة الطبية للزنجبيل** | 15 |

# المحتويات


| | | |
|---|---|---|
| 2-9-2 | فعالية الزنجبيل التثبيطية للجراثيم | 16 |
| | **الفصل الثالث** | |
| | **المواد وطرائق العمل** | |
| 1-3 | **المواد** | |
| 1-1-3 | **الاجهزة والادوات المستخدمة** | 18 |
| 2-1-3 | **العدد kits** | 20 |
| 3-1-3 | **البادئات** | 21 |
| 4-1-3 | **المواد الكيميائية المستخدمة** | 21 |
| 5-1-3 | **الاوساط الزرعية المستخدمة** | 23 |
| 6-1-3 | **تحضير الاوساط الزرعية** | 23 |
| 7-1-3 | **الكواشف والمحاليل** | 24 |
| 1-7-1-3 | **كاشف الكتاليز** | 24 |
| 2-7-1-3 | **المحلول الفسيولوجي 0.85 %** | 24 |
| 3-7-1-3 | **محلول ملون غرام** | 24 |
| 4-7-1-3 | **انابيب ماكفرلاند القياسية 0.5** | 24 |
| 2-3 | **طرائق العمل** | |
| 1-2-3 | **جمع العينات** | 24 |
| 2-2-3 | **الزرع على الاوساط الصلبة** | 25 |
| 3-2-3 | **الفحص المجهري** | 25 |
| 4-2-3 | **اختبار الكشف عن انزيم الكتاليز** | 25 |
| 5-2-3 | **اختبار تحلل الدم** | 25 |
| 6-2-3 | **اختبار الحساسية للمضادات الحيوية** | 25 |
| 7-2-3 | **اختبار انتاج الدكستران** | 26 |
| 8-2-3 | **اختبار تحمل كلوريد الصوديوم بتركيز 4%** | 26 |
| 9-2-3 | **اختبار قدرة البكتريا على تخمير الكاربوهيدرات** | 26 |

# المحتويات


| | | |
|---|---|---|
| 10-2-3 | المستخلص الكحولي لنبات الزنجبيل | 27 |
| 11-2-3 | تحضير التراكيز اللازمة للكشف عن الفعالية التثبيطية للزنجبيل | 27 |
| 12-2-3 | اختبار الفعالية التثبيطية | 28 |
| 1-12-2-3 | طريقة الانتشار بالحفر | 28 |
| 2-12-2-3 | طريقة الصفائح الدقيقة | 28 |
| 13-2-3 | اختبار تكوين الغشاء الحيوي | 29 |
| 14-2-3 | تأثير المستخلص الكحولي لنبات الزنجبيل على تكوين الغشاء الحيوي | 29 |
| 15-2-3 | فحص تفاعل سلسلة البلمرة في الوقت الحقيقي الكمي | 30 |
| 1-15-2-3 | استخلاص الحامض النووي الكلي | 30 |
| 2-15-2-3 | قياس تركيز ونقاوة الحامض النووي RNA | 31 |
| 3-15-2-3 | المعاملة بأنزيم DNase I | 32 |
| 4-15-2-3 | طريقة تصنيع cDNA | 32 |
| 5-15-2-3 | فحص Quantitative Real-Time PCR | 33 |
| 6-15-2-3 | طريقة تحليل البيانات | 36 |
| 16-2-3 | التحليل الاحصائي | 37 |
| | **الفصل الرابع** | |
| | **النتائج والمناقشة** | |
| 1-4 | العزل والتشخيص | 38 |
| 2-4 | الفحوصات المظهرية والكيموحيوية | 38 |
| 3-4 | اختبار قدرة البكتريا على تخمير الكاربوهيدرات | 40 |
| 4-4 | اختبار الحساسية للمضادات الحيوية | 42 |
| 5-4 | تقدير الفعالية التثبيطية لمستخلص نبات الزنجبيل | 44 |
| 1-5-4 | طريقة الانتشار الحفر | 44 |
| 2-5-4 | طريقة صفائح المعايرة الدقيقة | 46 |

# المحتويات


| | | |
|---|---|---|
| 6-4 | اختبار تكوين الغشاء الحيوي بطريقة congoredagar | 47 |
| 7-4 | اختبار تأثير نبات الزنجبيل على تكوين الغشاء الحيوي | 49 |
| | **الاستنتاجات والتوصيات** | |
| | **الاستنتاجات** | 54 |
| | **التوصيات** | 55 |
| | **المصادر** | |
| | **المصادر العربية** | 56 |
| | **المصادر الاجنبية** | 57 |

# قائمة الجداول


| ت | الموضوع | ص |
|---|---|---|
| 1-3 | الاجهزة والادوات المستخدمة | 18 |
| 2-3 | العُدد Kits | 20 |
| 3-3 | البادئات Primers | 21 |
| 4-3 | المواد الكيمائية المستخدمة | 21 |
| 5-3 | الاوساط الزرعية المستخدمة | 23 |
| 6-3 | طريقة عمل عدة انزيم DNase I | 32 |
| 7-3 | طريقة عمل العدة كاما | 33 |
| 8-3 | الظروف الحرارية المثلى لعملية تصنييع cDNA | 33 |
| 9-3 | مكونات مزيج تفاعل qPCR لجين *gtfB* | 34 |
| 10-3 | مكونات مزيج تفاعل qPCR للجين القياسي *16SrRAN* | 35 |
| 11-3 | الظروف الحرارية المثلى لمراحل qPCR للجينات *gtfB* و 16SrRNA | 36 |
| 1-4 | الاختبارات الشكلية والكيموحيوية للجرثومة السبحية | 39 |
| 2-4 | قابلية العزلات البكتيرية على تخمير الكاربوهيدرات | 41 |
| 3-4 | اختبار الحساسية للمضادات الحيوية للجرثومة السبحية *S.mutans* | 43 |
| 4-4 | اقطارمناطق التثبيط للمستخلص الكحولي لنبات الزنجبيل ضد الجرثومة السبحية *S.mutans* | 45 |
| 5-4 | التركيز المثبط الادنى بطريقة Microtiter plate | 46 |
| 6-4 | قدرة العزلات البكتيرية على تكوين الغشاء الحيوي | 48 |
| 7-4 | نتائج التعبير الجيني لجين gtfB لبكتريا *S.mutans* | 50 |


# قائمة الاشكال


| ت | الموضوع | ص |
|---|---|---|
| 1-2 | رايزومات نبات الزنجبيل | 14 |
| 1-4 | مستعمرات *S.mutans* على وسط TYCSB | 38 |
| 2-4 | انتاج الدكستران لبكتريا *S. mutans* | 40 |
| 3-4 | قدرة بكتريا *S. mutans* على تخمير الكاربوهيدرات | 42 |
| 4-4 | حساسية بكتريا *S.mutans* للمضاد الحيوي Vancomycin | 44 |
| 5-4 | تثبيط المستخلص الكحولي لنبات الزنجبيل ضد بكتريا *S.mutans* | 46 |
| 6-4 | قدرة بكتريا Strep.mutansعلى تكوين الغشاء الحيوي بطريقةCRA | 49 |

# قائمة المختصرات

# List of Abbreviations

| Terms المصطلح | Symbol المختص |
|---|---|
| Complement DNA | cDNA |
| Congo red agar | CRA |
| *Escherechia coli* | E.coli |
| Exopolysaccharide | EPS |
| Glucotransferase | *gtfB* |
| Glucosyltransferase-insoluble product | GTF-I |
| Glucosyltransferases | GTFs |
| Glucosyltransferase-soluble product | GTF-S |
| Glucosyltransferase-soluble, insoluble product | GTF-SI |
| *Helicobacter pylori* | H.pylori |
| Hydrogen peroxide | $H_2o_2$ |
| Human colorectal cancer cell | HCT116 |
| Human tumar cell | HT29 |
| Interperitoneum | IP |
| Intrapolysaccharide | IPS |
| Minimum inhibitory concentration | MIC |
| Mutans streptococci | MS |
| Prostaglandin E2 | PGE2 |
| Proton-translocating ATPase | $H^+$-ATPase |
| Quantitative PCR | qPCR |
| Real-Time PCR | RT-PCR |
| *Streptococcus mutans* | *S.mutans* |
| Thromboxane B2 | TXB2 |
| Trypone yeast extract sucrose bacetracin | TYCSB |
| *Zingiber officinale* | Z. officinale |

# الفصل الاول

# المقدمة

# Introduction

## المقدمة Introduction

يعد مرض تسوس الاسنان Dental caries من الامراض الشائعة وهو مرض التهابي يؤدي الى تلف الهيكل الصلب للاسنان وتحطيم موضعي لطبقتي المينا والعاج (Toder,2008).

وقد أشارت الاحصائيات العالمية الى ان حوالي 60-90%من اطفال المدارس ومعظم البالغين يعانون من هذا المرض الذي يعد مرضا شائعا في اقطار اسيا وامريكا اللاتينية (Brown*etal.*,2000)،وتعد الاحياء المجهرية وبالاخص البكتريا جزءا اساسيا من مكونات النبيت الطبيعي لتجويف الفم الا انها تصبح مرضية عند توافر ظروف معينة مثل *Streptococcus,Actinomyces ,Staphylococcus ,Veillonella ,Prevotella Neisserina*, وغيرها.

واشار(Samaranayake,(2006الى ان من اكثر الانواع ارتباطا بتسوس الاسنان بكتريا العقدية الطافرة *Streptococcus mutans* ويكمن دورها في احداث التسوس في المراحل الاولى لنشوئه بالاضافة الى كونها مصدرا لاصابات بطانة القلب الداخلية endocarditis الى امتلاكها للعديد من عوامل الضراوة التي تشمل قدرتها على تكوين الغشاء الحيوي biofilmوقابليتهاعلى تصنيع عديد السكريد الخارجي (glucan) من انزيمات (GTFs)*glucosyltransferases*، بالاضافةالى انتاج الحامض acid production وتحمل ذلك الحامض acid tolerance.(Islam *etal*.2012).

إن وجود السكروزفي الفم يعمل على اختلال التوازن في النبيت الطبيعي مما يؤدي الى تحفيز انواع بكتيرية معينة مثل *S.mutans* و*Actinomyces* و*Lactobacillus*، إذ تتفاعل هذه الانواع وترتبط مع بعضها وتفرز مواد خارج خلوية مثل الكلوكان ،بروتينات واحماض نووية تحفز التصاق وتماسك البكتريا المكونة لها مما يؤدي الى تكوين طبقة قوية ومتماسكة تدعى الغشاءالحيوي (Biofilm)((Selvan*etal*.,2011) ، وتعد انزيمات GTFsglucosyltransferasesالمسؤولة بصورة رئيسية عن عملية تكوين الغشاء الحيوي من خلال انتاج مادة الكلوكان المسؤول عن التصاق البكتريا على سطوح الاسنان ونفوذ المواد خلال الغشاء الحيوي ويعد احتياطياً للطاقة ويعطي حماية للخلية .(Koo *etal*.,2010).

عادة ماتستخدم معاجين الاسنان وغسولات الفم الحاوية على الفلورايد والمضاد الحيوي Chlorohexidines لمنع التسوس الا انه لوحظ ان لهذه المواد بعض الاثار السلبية مثل احتوائها على مواد سمية او انها تكون سببا في حدوث بعض الامراض مثل الحساسية وهشاشة العظام بالاضافة الى الاضرار العصبية (Selvan *etal*.2011).

لجأت الكثير من الدراسات الحديثة الى استخدام النباتات ذات الفائدة الطبية بوصفها منتجات بديلة للوقاية من تسوس الاسنان والقضاء على البكتريا المسببة له ومن هذه النباتات نبات الزنجبيل *Zingber officinale*وقد عرف نبات الزنجبيل بفعاليته العلاجية منذ القدم فهو

مضاد للاكسدة ، ومضاد للالتهابات، وذو تأثير على الخلايا السرطانية ومضاد للاحياء المجهرية ، إذ يحتوي على العديد من المركبات الفعالة مثل gingerols ، shagaols وزيوت طيارة.

لذلك جاءت هذه الدراسة بهدف تقييم فعالية نبات الزنجبيل ضد تكوين طبقة الغشاء الحيوي لبكتريا العقدية الطافرة *S.mutans* من خلال المحاور الآتية:

1.عزل البكتريا من منطقة الفم والاسنان وتشخيصها .

2.اختبار قابليتها على تكوين طبقة الغشاء الحيوي biofilm.

3.تقدير الكمية التعبيرية لجين*gtfB* من خلال تقنية RT-PCR قبل استخدام المستخلص الكحولي لنبات الزنجبيل وبعدها.

# الفصل الثاني

# استعراض المراجع

# Literatures Review

**2-1امراض الفم Oral diseases**

تشمل امراض الفم العديد من الحالات المرضية منها تسوس الاسنان(dental caries) والتهابات ماحول السن (periodontitis) وامراض ماحول الاسنان امراض تصيب الانسجة والاجزاء العظمية المحيطة بالاسنان التي تتميز بحدوث نزف وفقدان الاربطة مابين الاسنان والنسيج ،ويمكن تصنيف أمراض ما حول السن إلى قسمين رئيسيين هما التهاب اللثة Gingivitisوالتهاب ما حول السن Periodontitis ، وقد صنفت هذه الأمراض إلى أقسام أخرى Subdivisions. ويمكن تصنيفها إلى حالات مزمنةChronic وشديدة Aggressiveاو حالات موضعيةLocalized. واخرى عامة Generalized مؤدية إلى سقوط الأسنان.
. (Pihlström*et al.*, 2005)

وتحدث هذه الامراض في اغلب الاحيان نتيجة لاصابات بكتيرية ( Bhatavadekar and Williams,2009) ، خاصة الانواع البكتيرية المتواجدة في اللويحة الجرثومية ( dental plaque)والتي تؤثر على الانسجة المحيطة والداعمة للسن (Loesche,2000)، إذ تنتشر البكتريا في شقوق اللثة التي تكون اكثر التهابا وانتفاخا عند بعض الاشخاص الذين يعانون من اضطرابات هرمونية في فترة الحمل والبلوغ (Marsh and Martin,2009). واشار(2007), Darlingالى ان بعض الانواع البكتيرية غير الضارة تتحول الى مسببات مرضية بسبب عاملين مهمين هما التغير الكلي في التوازن البكتيري وزيادة نسبة البكتريا السالبة لصبغة غرام اللاهوائية ، الا ان البكتريا ليست المسؤولة الوحيدة والمباشرة عن تلف انسجة ما حول السن، فقد يرجعذلك نتيجة فعالية الميكانيكيات الوقائية والدفاعية للمضيف مثل الإنزيمات والحركيات الخلويةالتي يمكن أن تؤدي إلى تلف أنسجة المضيف. (Graves*et al.*, 2008 ; Van Dyke, 2007) لذلك فان نشوء المرض يبدا من تكوين البكتريا للغشاء الحيوي (Biofilm)الذي يؤدي الى تحفيز دفاعات المضيف مؤديا الى تنشيط الخلايا الالتهابية التي تنتج الوسائط الالتهابية كالحركيات الخلويةوالبروستكلانديناتوالانزيمات الحالة للبروتين التي تساهم بشكل متكامل في تدمير الانسجة الرابطة وفقدان العظم. (Blackwell *et al.*, 2010).وإنَ أمراض ما حول السن تعمل على حدوث التهاب يمتد حتى يصل إلى عمق التراكيب المحيطة بالسن حيث تؤدي إلى تكوين جيوب Pockets في المنطقة المحيطة بالسن فيحصل فقدان في العظم السني ويتحرك السن من مكانه، وتعمل هذه الالتهابات أيضاً على زيادة عمق الأخدود المحيط بالسن Gingival Sulcusوهذه من الصفات السريرية والمهمة التي تعدّ المفتاح

لتشخيص إصابات ما حول السن (Newman *et al*., 2001; Nisengard and Newman, 1994).

يوصف التهاب اللثة طبياً بأنه مجموعة من التغيرات الحاصلة في اللثة مثل تغير اللون ، والتكوين والمظهر العام لسطح اللثة من دون أن يرافقه فقدان للأنسجة الرابطة حيث تصبح اللثة ملتهبة وحمراء ومتورمة ويحصل نزف في شق اللثةGingival Crevice أثناء تنظيف الأسنان بالفرشاة (Jordan, 2004 ; Tortora*et al*., 1998) أن الصفيحة السنية Dental plaque المتكونةعلى الأسنان وبقية السطوح داخل التجويف الفموي تحث على الإصابة بالتهاب اللثةوغالبا ما تكون الصفيحة السنية عند المدخنين أكثر وجوداً مما هو في غيرهم (Baljoon, 2003) ويعدّ التهاب اللثة المشترك مع تكوين الصفيحة السنية من اكثر أمراض اللثة شيوعا (Newman *et al*., 2001).

يؤدي التهاب اللثة اذا لم يعالج إلى إصابة أخرى أكثر تطوراً من جهة الإمراضية وهي حالة التهاب ما حول السن ويعرف بأنه مرض التهابي يصيب الأنسجة الداعمة للسن ويؤثر بشكل بالغ على صحة الفم للبالغين حول العالم (Dye, 2012). وتحدث بسبب العلاقة المعقدة بين البكتريا السالبة لملون غرام اللاهوائية اختياريا ودفاعات الجسم Host defenses.تعمل هذه الحالة المرضية على حدوث نزف في اللثة وكذا تؤدي إلى تكوين جيوب التهابية في المنطقة المحيطة بالسن وإذا ما استمرت الحالة فإنها تصل إلى جذر السن ، وتعمل على تلف الأنسجة المحيطة بالسن . (Cafiero and Matarasso,2013 ; Darveau, 2010 ).

وقد تتحول الإصابة بالتهاب ما حول السن إلى حالة مزمنة تسمى بالتهاب ما حول السن المزمن Chronic Periodontitis وهي حالة شائعة تصيب الكبار ومن الممكن مشاهدته في الأطفال أيضاً ، وبصورة عامة تصيب الأعمار فوق سن الخامسة والثلاثين وتشترك هذه الحالة مع حالة تراكم الصفيحة السنية والكلس Calculus، إذ إن تراكمها يساعد على حدوث المرض وتطوره، وحالة أخرى تسمى بالتهاب ما حول السن الشديدAggressive Periodontitis وهي تختلف عن السابقة بسرعة تطور المرض وحصول نزف وألم مصحوبين بأرتفاع في درجة حرارة جسم الانسان وسقوط الاسنان مبكرا)، كما تؤدي الإصابة بالتهاب ما حول السن إلى تكوين جيوب ملتهبة في المنطقة المحيطة بالسن وتعرف هذه الجيوب بأنها زيادة مرضية في عمق الأخدود المحيط بالسن Gingival Sulcus وهي من الصفات السريرية المهمة لأمراض ما حول السن (Newman *etal*.,2001).

اما مرض تسوس الاسنان فيعدُ من أهم الحالات المرضية التي تصيب الفم ويعرف على أنهُ تحطيم لنسيج السن بفعل المركبات الحامضية الناتجة عن الايض البكتيري خاصة عملية التخمر السكري، وتعد طبيعة الاسنان واللعاب عاملين مهمين يساعدان في تحفيز هذه العملية وقد تحدث عملية التسوس عندما يكون محيط اللثة غير متوازن مما يؤدي الى توافرالظروف الملائمة لانتشار انواع بكتيرية منتجة للحامض مثل *S.mutans* و*Lactobacillus*على حساب الانواع البكتيرية الاخرى(Li *etal*.,2010)، وتعد بكتريا *S.mutans*العامل الرئيسي في احداث التسوس (Tanzer *etal*.,2001) إذ تلتصق بسطح السن بسبب انتاجها لمحفظة من الكلوكان التي تصنع بوساطة انزيمات توجد على الغشاء السايتوبلازمي ثم تنتقل الى خارج الخلية (Samaranayake,2006).

اشار(Tanzer *etal*.,2001)الى أنَ بكتريا العصيات اللبنية *Lactobacillus*تأتي بالدرجة الثانية من الاهمية في عملية التسوس ،إذ تتواجد بنسبة قليلة في الحالات الطبيعية الا انها تزداد بزيادة نسبة الحموضة في الفم، فعند هضم السكريات يتحول السكر الى حامض بعملية التخمرالسكري بفعل بكتريا الفم الذي يوافر بيئة مناسبة لنمو وتكاثر العصيات اللبنية التي تكون لها القدرة على انتاج الحامض وتحمله ممايؤدي الى سحب الكالسيوم والفوسفات من مينا السن وتكوين التجاويف فيها (Winston *etal*.,1998).

تضم اللويحة السنية مجتمعا ميكروبيا متنوعا وينغمر هذا المجتمع في ارضية من السكريات المتعددة ذات المصدر البكتيري وبعض البوليمرات اللعابية وتسمح هذه اللويحة للبكتريا بالنمو وتعمل كواقي يمنع دخول المضادات البكتيرية اليها وبذلك تقل فعالية علاج الالتهابات التي تصيب اللثة او الاسنان (Rajivt *et al.* ,2013).

### 2-2مسببات التسوسCauses of dental caries

يعدُ الفم موطنا لمجموعة واسعة من الكائنات الحية المجهرية التي تنمو على شكل غشاء حيوي متنوع على الاغشية المخاطية وسطوح الاسنان ، هذه الكائنات تتألف من الابتدائيات والخمائر والمايكوبلازما والبكتريا (Dewhirst *etal.,*2010) التي تتراكم في الشقوق والحفر وجوانب التاج والمنطقة الواقعة بين الاسنان وشقوق اللثة او المنطقة المحيطة بعنق الاسنان مسببة حالات مرضية للفكين والفم مثل التسوس وامراض اللثة والتهاب العظم (Jennifer,2003).

تظهر البكتريا المسببة للتسوس على سطح التاج اولا كبقعة مجهرية مبهمة في المينا وهذه البقعة قد تكون بيضاء او بنية اللون وتزداد بعدها بالحجم اما سطح المينا فيصبح خشنا وفي النهاية يظهر تجويف صغير ويستمر هذا التجويف بالنمو حتى يتم التعامل معه اذ يصل الى حجرة اللب والانسجة الناعمة المتعرضة للاصابة وهذا التعرض ممكن ان يؤدي الى التهاب ودمار العظام وخسارة الاسنان ومجموعة الالتهابات تتجمع وتشكل قيحا في المنطقة وهذا القيح مقيد احيانا بجدار النسيج الليفي ومن ثمَ يشكل الخراج ،اما غرفة اللب المحتوية على الالتهاب لمدة من الوقت في النهاية تؤدي الى قتل اللب ومع تقدم الاصابة يمكن للعدوى أنَ تصل اسفل قناة الجذر في العظام والانسجة الرابطة (Jennnifer ,2003).

تتفاعل البكتريا المسببة للتسوس بوساطة طرائق مميزة ومتنوعة ضمن تجمعات يتم من خلالها التمثيل الغذائي واتصالات خلية بأخرى وتبادل المادة الوراثية (Robert *etal*.,2001) وتستفيد البكتريا من هذه الاليات للبقاء ولمنح الاغشية الحيوية المقاومة للمضادات الحيوية مما يجعلها صعبة العلاج.(Kolenbrander *etal.* 2006 )، ويتكون المجتمع المكروبي للويحة السنية من البكتريا المنتجة للحامض والمتحملة له الموجبة لصبغة غرام مثل *Streptococcus* ( *S.mutans* ، *S.mitis* ، *S.salivarius* ، *S.sanguis* ، *S.mitior*) و *Lactobacillus* و *Entrococcus* التي تسبب ازالة سريعة للمينا (Loesche,1986) وبكتريا *Staphylococcus aureus* و *Staphylococcus epidermides* بالاضافة الى انواع قليلة من البكتريا السالبة لصبغة غرام مثل *Entrobacter* ، *Eschereichia coli* ( Jone and Lindsay,2006).

وتعد بكتريا *S.mutans* و *Lactobacillus* مسببات مهمة لامراض الاسنان بالاضافة الى اشتراك الجراثيم الخيطية *Actinomycetes* في تفشي مرض تسوس الجذر( Quirynen *etal.*,1999) وبعض الخمائر مثل *Candida albicans* (Thronton and Terry,1994).

**3-2بكتريا Streptococcus mutans**

تعد بكتريا *S.mutans* المسبب الاول في حدوث عملية التسوس مقارنة بالنبيت الطبيعي المتواجد في التجويف الفميوذلك بسبب قدرتها على انتاج الحامض وتحمل ذلك الحامض ، ولها علاقة ايضا بتقرحات وامراض اخرى في مناطق مختلفة منها القلب والمفاصل والجلد والعضلات والجهاز العصبي المركزي (Forssten*et.al* .,2010).

تنتمي بكتريا *S.mutans*الى مجموعة*Mutans* groupالتي تضم بـــكـــتريــــــا*S.muants* و *S.* sobrinus و *S.* cricetusو*S. rattu* و*S.downeii*و*S.macacae* ، وإنَ التميز بين أفراد هذه المجموعة يعتمد على الاختلافات في التفاعلات الكيموحيوية وخصائص الســطح الفيزيـوكميــائيــة ( physiochemical surface properties ) فضـــلا عن اســـتخدام التقنيـــات الجزيئـــية(Whiley and Beighton,1998) .

تكون الخلايا بيضوية الى كروية بأقطار تتراوح بين (0.5-1)مايكروميتر تترتب كأزواج اوسلاسل وموجبة لصبغة غرام وغير متحركة non-motile وغير مكونة للابواغ-non sporing ولاهوائية اختياريةfacultative تتطلب وجود ثاني اوكسيد الكاربون$CO_2$ لنموها وبنسبة 5% وغير منتجة للكتاليز(Gronros,2000)، وتتميز هذه المجموعة عن بقية المكورات الفموية بكونها تخمر المانيتول والسوربيتول وهي تلتصق بالسطوح الرقيقة (Linke,1977) وقد تكون عصيات قصيرة يتراوح طولها من (1.5-3.0) مايكروميترعند الظروف الحامضية في الاوساط السائلة والصلبة ،وكذا يمكن ملاحظة الشكل العصوي في العزلات الحديثة في العينات الفموية.

عادة ماتتواجد بكتريا *S.mutans* على سطوح الاسنان وعزلت لاول مرة من لدن العالم J.K.Clarke عام ١٩٢٤ وتتميز بكونها تمتلك القدرة على تخميرالمانيتول بالاضافة الى العديد من السكريات مثل الكلوكوز ، لاكتوز ، رافينوز ، انيولين ، سالسين ، إذ تكون عملية الايض تخمرية ومنتجة لحامض اللاكتيك (Lactic acid) من دون انتاج غاز وكذا تتمكن من مهاجمة كريات الدم محللة اياها جزئيا (α-hemolysis) ودرجة الحرارة المثلى لنموها هي 37C° (Gronross,2000).

اشار Samaranayake,(2002) الى ان البكتريا *S.mutans* تمتلك ثلاثة اشكال مصلية serotype وهي ( c ، e ، f )وتتميز بقدرتها على الالتصاق على سطوح الاسنان بوجود السكروز وبأستخدام عدة ميكانيكات منها تكوين عديد السكريد الخارجي (EPS) وتداخلات cell-to-cell (Shakair *et.al*.,1974;Syed and Loesche,1973).

**2-4امراضية بكتريا *Streptococcus mutans***

إنَ القابلية على تكوين التسوس ترتبط بعملية ايض السكرالتي تقوم بها بعض انواع بكتريا الفم وبقدرتها على الالتصاق على سطح الاسنان ،إنَ سلالات *S.mutans*التي تعاني من خلل في بناء الكلوكان غير الذائب في الماء تكون غير قادرة على الالتصاق واستعمار الاسنان بفعالية مثل السلالات الابوية .

تتمكن بكتريا *S.mutans* من القيام بفعالياتها حتى بغياب الغذاء الكاربوهيدراتي بسبب قدرتها على بناء عدد السكريد الداخلي Intrapolysaccharide(IPS) الذي تستخدمه مصدرا داخليا للكاربوهيدرات التي تتأيض لاعطاء الحموضة ، وتعود ضراوة هذه البكتريا الى امتلاكها عدة خصائص تميزها عن باقي الانواع البكتيرية التي تشمل قابليتها على نقل السكريات بصورة سريعة عندما تتنافس مع بكتريا التسوس الاخرى وسرعة تحويل السكريات الى حامض وكذلك القدرة على المحافظة على نموها وفعالياتها حتى في الظروف البيئية الصعبة مثل انخفاض الاس الهيدروجيني (pH).

القليل من البكتريا الفموية تكون قادرة على تحمل الظروف الحامضية لمدة طويلة إلا أنَ اغلب المسبحيات العقدية *Mutans streptococci* والعصيات اللبنية *Lactobacilli* لاتستطيع فقط أنَ تعيش تحت ظروف حامضية بل تتمكن ايضا من الاستمرار بالقيام بالانقسام والعمليات الايضية وذلك من خلال قدرتها على الحفاظ على التوازن الحامضي المناسب داخل الخلية على الرغم من التقلبات الحادة للاس الهيدروجيني خارج الخلية.(Marsh and Martin ,2009).

**2-5عوامل الضراوة Virulence factors**

تمتلك بكتريا *S.mutans* عددا من عوامل الضراوة منها:

**2-5-1القدرة على انتاج الحامض وتحمل الظروف الحامضية**

تعد القدرة على انتاج الحامض احدى عوامل الضراوة لبكتريا *S.mutans* إذ تعد اكثر الانواع البكتيرية الموجودة في منطقة التسوس قدرة على انتاج الحامض بسبب قابليتها على تخمير مدى واسع من الكاربوهيدرات ورفع الحامضية بمعدل عالٍ (De soet *etal*.,2000).

يمتلك هذا العامل اهمية كبيرة في احداث عملية التسوس حيث تمتلك S.*mutans* عدة ستراتيجيات تمكنها من مقاومة الاجهاد الحامضي واكدت الدراسات الحديثة على دور proton-translocating ATPase ($H^+$-ATPase) كعامل رئيسي يساهم في هذه العملية إذ يعمل على تنظيم ايونات $H^+$داخل الخلية ممايؤدي الى التوازن الحامضي الداخلي( Hassan *et al*.,2014).

**2-5-2Bacteriocin (Mutacin)**

تمتلك بكتريا *S.mutans* القدرة على انتاج Mutacin وهي مركبات بروتينية لها القابلية على ابادة او تثبيط البكتريا الموجبة لصبغة غرام خصوصا المسبحيات وبعض الانواع السالبة لصبغة غرام ، وتزيد البكتريوسينات من امكانية البكتريا المنتجة لهاعلى التنافس مع الانواع الاخربعلى المغذيات الموجودة في محيطها (Kayaoglu and Qrsavik,2004) ، وتكمن قدرتها على الابادة والتثبيط من خلال دورها في تثبيط بناء البروتينات اوتصنيع طبقة الببتيدوكلايكان اوعن طريق تكوين قناة ذات نفاذية للايونات في الغشاء الخلوي( Scotland ,1999).

**2-5-3انزيم الهيمولايسين Heamolysin enzyme**

وهو بروتين سمي (Toxin)يفرز من البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة غرام ( Benz *etal*.,1989**)** ويقوم بتدمير الغشاء الخلوي لكريات الدم الحمراء (RBC) وذلك للحصول على الهيموكلوبين الضروري للنمو والتكاثر مما يؤدي الى تحللها وتجرثم الدم Bacteremia (Liaw*etal*.,2000) ، والتحلل إما أنَ يكون من نوع بيتا Beta ويكون التدمير كامل لغشاء كرية الدم الحمراء او من نوع الفا Alpha يكوُن ثقوبا في الجدار الخلوي (Han *etal*.,2010)

.

### 2-5-4الالتصاق Adhesion

تعد القابلية على الالتصاق على سطوح الاسنان احدى عوامل الضراوة المهمة لبكتريا *S.mutans*إذ تحدث هذه العملية بصورة اولية عن طريق تفاعل بروتيناتتوجد على سطح الخلية البكتيرية مع بروتينات اللعاب التي تحصل لها عملية ادمصاص منمينا السن مكونة مايسمى بالغشاء التكيفي(Marsh and Martin ,2009) ومن هذه البروتينات بروتينات حامضية غنية بالبرولين التي تحفز التصاق بعض سلالات بكتريا *S.mutans* بينما يتفاعل agglutinin (وهو بروتين كلايكوجيني ذو وزن جزيئي عال ) مع P1(وهي ببتيدات متعددة توجد على سطح معظم المسبحيات الفموية ) الموجود على سطح الخلية البكتيرية ، هذا بالاضافة الى أنَ طبقة الغشاء التكيفي تحتوي على انزيمات مثل glucosyltransferases(GTFs) التي تبقى قادرة على انتاج الكلوكان الذي يعد عامل التصاق مهما يرتبط مع بروتينات موجودة على سطح *Mutansstreptococci* الاخرى مما يزيد من قابليتها على الاستعمار(Marsh and Martin ,2009).

### 2-6طبقة الغشاء الحيوي Biofilm

هي عبارة عن طبقة متكونة من انواع بكتيرية متعددة تتجمع على الاسنان واللسان والنسيج الطلائي في التجويف الفمي (Madigan and Martinko,2006)وتكون المستعمرات البكتيرية ذات احجام واشكال مختلفة مع طبقة خارج خلوية شبه مسامية(Kenneth,2004).

يعتقد ان الارتباط بين الانواع البكتيرية المختلفة ينظم من خلال قدرتها على الالتصاق وقابليتها على النمو تحت ظروف استثنائية ، وتمرعملية تكوين الغشاء الحيوي بعدة مراحل تتمثل بأدمصاص سطح السن للمواد اللعابية والنقل السلبي لبكتريا الفم الى سطح السن والتصاق انواع بكتيرية وارتباطها مع بعضها وتكاثر الاحياء المجهرية المرتبطة ( Marsh and Martin ,2009).

### 2-6-1تكوين الغشاء التكيفيCondtioing membrane formatiom

يعد الغشاء الحيوي الفموي غشاء مميزا بين الانواع المختلفة من الاغشية الحيوية إذ انه يتطلب بروتينات سكرية لعابية تسهل عملية الالتصاق التي تعد اول خطوة في تكوينه (Hanning,2009) ، في هذه المرحلة يحصل ادمصاص لبروتينات لعابية وبروتينات

كلايكوجينية من مينا السن مكونة غشاء سطحيا ،وتكون المكونات الرئيسية للغشاء عبارة عن بروتينات كلايكوجينية لعابيةوبروتينات فوسفاتية ولبيداتومكونات دفاعية للمضيف ومكونات بكتيرية مثل GTFs وكلوكان التي تلعب دورا مهما في عملية الالتصاق البكتيري ، عندما ترتبط بروتينات اللعاب بسطح السن تخضع لتغيرات جزيئية وهذا يؤدي الى تكوين مستقبلات خاصة لارتباط البكتريا وقد يحصل تغيير في فعالية GTFs لبناء تركيب محور لمادة الكلوكان لتسهيل عملية الالتصاق.(Marsh and Martin,2009).

**2-6-2الالتصاق الانعكاسي Reversible adhesion**

تنتقل الاحياء المجهرية الى الغشاء التكيفي عن طريق عملية النقل السلبي passive transport وتلتصق بها بفعل القوى الفيزيائية والكيميائية التي تتولد في هذه الطبقة ( Marsh and Martin,2009)، وحالما يبدأ الالتصاق تبدأ البكتريا بأفراز مواد سكرية خارج خلوية Exopolysaccharide (EPS) التي تساعد البكتريا على الالتصاق والارتباط مع بعضها البعض ومن ثم تكوين نمو جرثومي احادي الطبقة (Handley,1990).

**3-6-2 الالتصاق الاضافي Co-adhesion**

بعض الاحياء المجهرية التي لاتستطيع الارتباط بطبقة الغشاء التكيفي تتمكن من الارتباط بالطبقة الاولية من البكتريا من خلال تفاعلات مستقبلات خاصة بالالتصاق فيما بينها بالاضافة الى عمليات الايض التي تمارسها البكتريا الاولية تغير من البيئة المحيطة بها لتوافر ظروف مناسبة لنمو البكتريا الصعبة الانماء إذ تولد هذه العمليات مغذيات ونواتج عمليات تخمر التي تستخدم من باقي الاحياء المجهرية كمصدر غذائي اولي وبأستمرار هذه العملية تتكون عدة طبقات من انواع مختلفة من الاحياء المجهرية.(Marsh and Martin,2009)

**4-6-2 الغشاء الحيوي الناضج Mature biofilm**

بعد التصاق البكتريا مع بعضها تبدأ بالانقسام والتكاثر وتكوين نموات ذات طبقات متعددةعلى شكل عناقيد بالاضافة الى افراز مواد سكرية خارج خلوية (EPS) وتعد هذه المواد المادة الاساس التي تثبت البكتريا على السطح مع بعضها (Dige *et.al.*,2009).

### 5-6-2 مرحلة الانفصال Detachment

تبدأ الخلايا البكتيرية بالانفصال عن الاغشية الحيوية وتنتقل الى مكان جديد وتبدأ بتكوين الاغشية الحيوية الجديدة ويتم ذلك تحت تأثير عوامل عدة منها نقص المغذيات ومن ثمَ نقص كمية المواد عديدة السكريات المحيطة وانسياب او جريان السوائل المختلفة فوق الغشاء الحيوي فتنفصل بعض الخلايا وتنقلها الى مكان اخر بالاضافة الى عوامل بيئية اخرى.(Kaplan,2010).

## 7-2جينات بكتريا *S.mutans* *Streptococcus mutans* genes

اشار Watnick and Kolter,(2000) الى أنَ بكتريا العقدية الطافرة ترتبط بسطح السن كجزء من الغشاء الحيوي وتعرض نمطا متميزا من النمو يختلف عن باقي انواع الخلايا البكتيرية وهذا النمط يتميز بالمقاومة للمضادات الحيوية وتتزايد هذه المقاومة بصورة مستمرة وذلك بوساطة عمليات التعبير الجيني المختلفة (هي عمليات يتم من خلالها تحويل المعلومات من الجينات في تركيب منتج الجينات الوظيفية وهذه المنتجات غالبا ماتكون بروتينات ) (Weiner,2004).

تمتلك العقدية الطافرة عامل فوعة مهما في عملية تكوين الغشاء الحيوي وهو انزيمات glucosyletransferases(GTFs)وهي بروتينات طويلة جدا تتكون من حوالي ١٣٠٠-١٧٠٠حامض اميني (Devuiapaiie *etal*.,1997)،وتمتلك طرفين الاول يسمى الجزء الطرفي الاميني aminoterminal portion وهو مسؤول عن انشطار السكروز والطرف الاخر هو الجزء الكاربوكسيلي carboxlic terminal portion المسؤول عن ارتباط الكلوكان (Colby andRussell,1997).

تعمل انزيمات GTFs على بناء عديد السكريد الخارجي من السكروز حيث يعد عامل فوعة مهماومسؤولا عن عملية تحفيز عملية تسوس الاسنان(Loesche,1986) وتقوم العقدية الطافرة بتكوين بوليمرات الكلوكان α-(1-3) ،α-(1-6) من خلال تظافر ادوار ثلاثة جينات هي *gtfB*،*gtfC*،*gtfD*التي تشفر انزيماتGTFs.

الجينات *gtfB*،*gtfC* تشفر الانزيمات GTF-I ، GTF-SI على التوالي والمسؤولة عن بناء الكلوكان α-(1-3) غير الذائب في الماء ( Aoki etal.,1986;Hanada and

Kuramitsu,1988)اما الجين *gtfD*يشفرGTF-S المسؤول عن بناء الكلوكان (1-6)-α الذائب في الماء (Hanada and Kuramitsu,1989).

**2-8علاج تسوس الاسنان Dental caries treatment**

استخدمت عدة علاجات كيميائية لعلاج امراض الفم ومن هذه العلاجات المضادات الحيوية مثل Penicillin ، Erythromycin، Cephalosporin ، Tetracycline (Bidault*et.al*.,2007) إذ تعمل هذه المضادات على تثبيط وقتل الجراثيم في التجويف الفمي لكنها بالمقابل لاتخلو من الاثار الجانبية التي ممكن ان تؤثر سلبا على صحة الفرد مثل التقيؤ والاسهال بالاضافة الى انها تسبب تصبغ الاسنان (Park *etal*.,2003)، وتستخدم كذلك معاجين الاسنان وغسولات الفم التي تحتوي على عدة مركبات كيميائية منها فلوريد الصوديوم والكلوروهكسدين لمكافحة التسوس والقضاء على البكتريا المسببة له (Stookey,1995) ويستخدم الكلوروهكسدين بوصفه مضمضة للفم الذي يقوم بأختزال اللويحة الجرثومية بوصفه مضادا لالتهابات اللثة لكونه يعمل ضد مدى واسع من البكتريا والفطريات ويتداخل مع التصاق البكتريا بالاسنان ويرتبط الكلوروهكسدين بسطح الفم ويفرز ببطئ الى اللعاب إلا أنَه اكتشف مؤخرا ظهور بعض الاثار السلبية لهذه المواد وذلك لاحتوائها على مواد سمية تسبب امراضا مثل الحساسية وهشاشة العظام وغيرها(Samaranayake,2006).

لذلك اشار كثير من الباحثين في مجال المضادات الطبيعية للاحياء المجهرية الى استخدام المستخلصات النباتية لاسباب عديدة منها وفرتها وسهولة الحصول عليها وقلة كلفتها والاهم من ذلك هو انها اكثر امانا لقلة تأثيراتها الجانبية (DeBoer *et.al*.,2005).

اشارت الدراسات الى أنَ مستخلص العكبر *Propolis* يعمل على تثبيط بكتريا *S.mutans*والتي تعد المسبب الاول لتسوس الاسنان وذلك من خلال تأثيره على عملية انقسام الخلايا وان غسولات الفم مع *Propolis* تقلل من تكوين الصفيحة السنية والكلوكان غير الذائب في الماء(Duailibe*etal* 2007) ، ووجد ايضا أنَ هناك تأثيرا للعديد من المستخلصات النباتية الاخرى على بكتريا *S.mutans* مثل الشاي ومستخلص العنب الاحمر والاخضر والكاكاو بسبب احتوائها على المركبات الفينولية المعروفة بفعاليتها المضادة للبكتريا ويمتلك العسل ايضا فعلا مضادا لبكتريا *S.mutans*بسبب احتوائه على الفلافونيدات وبيروكسيد الهيدروجين والازموزية العالية نتيجة التركيز العالي للسكريات (Loesche,1986) التي

تحفز plasmolysis وهي عملية سحب الماء من البكتريا ومن ثمَ تثبيط نموها ( Anyanwu CU.,2011).

وجد أنَ للزنجبيل تأثيرا مضادا للعديد من الاحياء المجهرية ومن ضمنها بكتريا ***S.mutans*** إذ اشار(Sadaf *et.al.*,(2015 الى تأثيره على انزيمات GTFs التي تحفز تكوين الكلوكان غير الذائب الذي يؤدي وظيفة مهمة في التصاق بكتريا ***S.mutans*** على سطوح الاسنان وذلك من خلال تأثيره على حموضة السايتوبلازم ومن ثمَ اعاقة العمليات الفسيولوجية داخل الخلية البكتيرية.

**9-2 نبات الزنجبيل *Zingiber officinale***

يعود الزنجبيل الى العائلة الزنجبيلية *Zingiberaceae*التي سميت بأسمه نظرا لأهميته وهو نبات حولي معمر ذو ازهار خضراء مصفرة وجذور درنية وسيقان منتصبة القامة وتكثر زراعته في الصين والهند وجنوب شرق اسيا وغرب افريقيا ( McGee and Harold,2004)، ويختلف الزنجبيل بحسب المناطق التي يزرع بها فالزنجبيل في نيجيريا غامق اللون صغير الحجم وذو طعم لاذع وزنجبيل افريقيا غامق اللون وذو طعم لاذع اكثر، واقل نكهة من زنجبيل جامايكا ، ويتكاثر الزنجبيل بطريقة التبرعم إذ تقطع البراعم وتزرع في تربة طينية غزيرة السقي ويحتاج الى مناخ دافئ ورطب لنموه (Ali,1998).

للنباتات الطبية أثر واضح في علاج العديد من الامراض وتكمن الفائدة الطبية لهذه النباتات في بعض مكوناتها الكيميائية التي تؤدي وظيفة فسلجية في جسم الانسان ويعد الزنجبيل احدها(Kumar *etal.*,2011)، ويعد العالم Linnaeus اول من وصف هذا الجنس ووضع له إسما وصنَفه الى 85 نوعا ، ويعد النوع *Z.officinale* اشهرها واكثرها استعمالا أما العالم William Roscoe وصف هذا النوع عام 1807 واعطاه الاسم الذي بات يعرف به لحد الان ( Fosster,2000).

يتكون الزنجبيل من مجموعتين متميزتين من المركبات الكيميائية وهي الزيوت الطيارة Volite oilsالتي تتألف من Zingiberene ، Curcumene ، Farmesene ، beta-phellanderene ، mono and sesquiterperes ، camphene ، cineole ، geranylacetate ، terphineol ، terpenes ، borneol ، geraniol ، limonine ، beta-sesquiphellanderen ، beta-bisabolene (Mustafa *et.al.*,1993)

اما المركبات غير الطيارة Non-volite compoundsفتشمل gingerols ، shogaols ، paradols و zingeroneالتي تعطي الطعم اللاذع ، بالاضافة الى ماسبق يحتوي الزنجبيل ايضا على دهون وبروتينات والياف وشموع وماء وكاربوهيدرات وفيتامينات ومعادن وانزيم zingibain (Ghosh *et.al.*,2011) وامتلاك الزنجبيل لهذه المكونات جعلت منه ذا فائدة علاجية مهمة لامراض كثيرة .

**شكل (2-1) رايزومات نبات الزنجبيل**

**2-9-1 الفائدة الطبية للزنجبيل**

عرفت الفائدة الطبية للزنجبيل قبل اكثر من ٢٠٠٠سنة حيث استخدمه الصينيون واليونانيون والهنود في علاج العديد من الامراض ، ويستخدم الزنجبيل في علاج مشاكل القلب لما له من تأثير محفز لعضلة القلب ولدوران الدم في الجسم مما يزيد من الفعالية الايضية الخلوية التي تساعد على التقليل من التوتر والتشنجات وضغط الدم والاجهاد القلبي ( Tanabe *etal.*,1993).

واشار(2001) Afzal *et.al.*, الى أنَ للزنجبيل تأثيرا مباشار وغير مباشر على ضغط الدم ونبض القلب ووجد ان جرعات معينة من الزنجبيل يؤدي الى خفض ضغط الدم الشرياني فضلا عن أنَ له فعالية ضد isoproterenol الذي يستحث اصابة العضلة القلبية بالاجهاد التأكسدي في الفئران (Ansari *et.al.*,2006) ، ويعود الفعل المضاد للأكسدة للعديد من المركبات الكيميائية مثل الفينولات والفلافونيدات الى تركيبهاالكيميائي الذي يحتوي على المجاميع الهيدروكسيلية التي تقوم بمنح ذرة هيدروجين الى الجذور الحرة وتجعلها مركبات قليلة الفعالية بالاضافة الى قابلية المركبات الفلافونيدية الى تقييد الايونات الحرة مثل $Cu^{+2}$ و $Fe^{+2}$ المحفزة على نشوء انواع جديدة من الجذور الحرة عند تفاعلها مع جذر فوق الاوكسجين السالب ، وبذلك

تكون قادرة على كسر سلسلة تفاعلات الاكسدة للجذور الحرة ، اذ تتراوح فعالية الفلافونيدات المضادة للاكسدة بما يعادل 4 او 5 مرات من فعالية فيتامين C و E على التوالي ( Shi *et.al* .(2003;Roback *et.al*.,2004

اشار Stewart *etal*.,(1991) الى استخدام الزنجبيل ايضا في علاج مشاكل القناة الهضمية من خلال تحفيزه لعملية الهضم والامتصاص والتخفيف من الامساك والانتفاخ عن طريق زيادة الفعالية العضلية للقناة الهضمية ويقلل من الغثيان والتقيؤ ويحمي الكبد من السمية التي قد تنتج بسبب فعالياته الايضية (El-Sharaky *etal*.,2009 )، ويفيد الزنجبيل في علاج الالتهابات والروماتزم من خلال تثبيط البناء الحيوي لليوكوترين Leukotriene والبروستاكلاندين Prostaglandin(Kiuchi etal.,1990) ،واشار Thomson *et.al*.,(2002) الى أنَ الجرع العالية من الزنجبيل تعمل على تخفيض مستوى Prostaglandin E2 في المصل الى حد كبيرعندما يؤخذ فمويا او عن طريق .I.Pوكذلك يعمل على تخفيض Thromboxane(TXB2) وبذلك فهويمتلك دورا مضادا للتخثر، ويمتلك الزنجبيل ايضا فعالية تثبيطية للخلايا السرطانية إذ يحد من نموها ويمنعها من الاستمرار في النمو ومن ثمَ فهو يمنع انتشارها ، واشار Abdullah *etal*.,(2010) الى أنَ الزنجبيل يحصر خلايا (HT29) و(HCT116) Human colorectal cancer cellفي اطوار G2/Mفي سرطان القولون إذ يقمع نمو الخلايا السرطانية ويعطل طور G0/G1 phase ويقلل من بناء DNA ويستحث الموت المبرمج للخلايا apoptosis.

اشار Kato *etal* .,(2006)الى دور الزنجبيل في تخفيض مستويات الفركتوز التي يؤدي ارتفاعها الى ارتفاع مستويات الدهون في الدم وذلك بسبب احتوائه غلى مثبطات aldose reductase.

**2-9-2فعالية الزنجبيل التثبيطية للجراثيم Inhibition activity of zingiber**

يمتلك الزنجبيل مدى تثبيطيا واسعا ضد الاحياء المجهرية خاصة البكتريا السالبة والموجبة لصبغة غرام واثبتت الدراسات التي اجريت على البكتريا خارج جسم إلكائن الحي *in vitro* تأثيره في تثبيط نمو العنقوديات *Staphylococci* والمسبحيات *Streptococci* والسالمونيلا *Salmonella* (White,2007) وبكتريا القولون *E.coli* ويكمن تأثيره اما على انقسام الخلايا او على الغشاءالخلوي ، واشار Masniari,(2011) الى أنَgingerols و shogaols هي

المسؤولة عن الفعالية التثبيطية للبكتريا إذ تعمل على احداث ثقوب في الغشاء الخلوي ممايؤدي الى فقدان فعاليته وخروج المواد الخلوية .

بينت التجارب التي اجريت على بكتريا القولون *E.coli* تأثير الزنجبيل على عملية الانقسام الخلوي لهذه البكتريا ، وتعمل بكتريا القولون على تخمير الكاربوهيدرات غير المهضومة التي تسبب انتفاخ البطن ومن ثمَ فأن توقف الانقسام يؤدي الى توقف هذه العملية ( Gupta and Ravishankar,2005)، واشار Adeshina *et.al*.,(2011) الى ان عصير الزنجبيل الطازج لايمتلك اي فعالية تثبيطية تجاه *Prophyromonasaeruginosa* و *S. aureus* و *E.coli* بينما اشار Azu *etal*.,(2007) الى كفاءة المستخلص الايثانولي ضد *P.aeruginosa* و *S.aureus*مشيرا الى أنَ المركبات الفعالة في الزنجبيل تذوب وتتركز بسهولة اكبرفي المذيبات العضوية مقارنة بالماء المقطر.

إنَ العامل الرئيسي المسبب للقرح المعدية هي بكتريا *Helicobacterpylori*(*HP*)Mahady (*etal*.,2005) ، واثبت Nanjundaiah *etal*.,(2009) ذلك من خلال التجارب التي اجراها على الجرذان بعد استحداث القرحة فيها من خلال اصابتها ببكتريا *H.pylori* ومن ثم معالجتها فمويا بالمستخلص المائي للزنجبيل ، واستنتج أنَ مستخلص الزنجبيل المائي يمتلك القدرة على تثبيط افراز الحامض المعدي وتثبيط نمو *H.pylori* ويوفرحماية مضادة للاكسدة من خلال حماية الغشاء المخاطي المعدي من الاجهاد التأكسدي الذي يسبب تقرحها وتلفها.

اشار Siqueira*etal*.,2012 الى ان مستخلصات نبات الزنجبيل تمتلك دورا تثبيطيا ضد بكتريا *S.mutans* من خلال دورالفلافونيدات والفلافونات التي تؤثر وبصورة عالية على فعالية انزيمات glucosyltransferases(GTFs) المسؤولة عن انتاج الكلوكونات التي تساعد البكتريا على الالتصاق على سطوح الاسنان ومن ثمَ احداث عملية التسوس، وبالاضافة الى دورgingerols في التأثير على الغشاء الخلوي للبكتريا الذي يؤدي مباشرة الى تثبيطها(Badreldin *et.al*.,2008) ، وللزنجبيل القدرة ايضا على تثبيط بعض انواع الفطريات مثل *Fusarium oxysporum* و *Alternaria alternate*و*Aspergillus*الذي ينتج السموم الفطرية aflatoxin و carcinogen، وكذا استخدم ضد الطفيليات ومنها الاسكارس *Ascaris*التي تصيب الانسان(Kalesaraj,1975;Fawzi *et.al*.,2009).

# الفصل الثالث

# المواد وطرائق العمل

# Materials and Methods

# المواد وطرائق العمل Materials and Methods

## 1-3 المواد والاجهزة المستخدمة Materials and Devices

### 1-1-3الاجهزة والادوات المختبرية المستخدمة

**جدول (1-3) الاجهزة والادوات المختبرية**

| ت | الأجهزة والأدوات | الشركة المصنعة والمنشأ |
|---|---|---|
| ١ | أطباق بتري بلاستيكي Plastic Pitridish | Sterilin, England |
| ٢ | أنابيب بلاستيكية معقمة Plastic Tubes | AFMA-Dispo. |
| ٣ | انبوبة اختبار Eppendrof tubes | Biobasi-Canada |
| ٤ | الثلاجة Refrigerator | Ishtar, Iraq |
| ٥ | جهاز تقطير الماء Distiller | Ogawa, Japan |
| ٦ | جهاز الطرد Exispin vortex centerfuge المركزي المازج | Bioneer-Korea |
| ٧ | جهاز Miniopticon Real-Time PCR | BioRad-USA |
| ٨ | Nanadrop جهاز spectrophptometer | Thermo-U.K |
| ٩ | جهاز الدورات الحرارية Thermocycler apparatus(PCR) | Bioneer-Korea |
| ١٠ | حاضنة Incubator | Gallen Kamp, England |
| ١١ | حاوية لا هوائية Anaerobic Jar | BBL, England |
| ١٢ | حمام مائي Water Bath | Memmert, Germany |
| ١٣ | دورق مخروطي Conical flasks | BBL-USA |
| ١٤ | شرائح زجاجية وأغطية Slides and Covers | Meheco-China. |
| ١٥ | شريط شمعي لاصق Para Film | BDH (England) |

| | | |
|---|---|---|
| ١٦ | صفيحة ساخنة Hote plate | Labtech-Korea |
| ١٧ | عروة ناقلة Loop | Loop Rhndon, England |
| ١٨ | فرن كهربائي Oven | Gallen Kamp, England |
| ١٩ | كابينة بايلوجي Laminar flow capinate | Jeio-Tech-Korea |
| ٢٠ | مازج Vortex | CYAN-China |
| ٢١ | مازج Vortex Mixer | Barnstead – USA |
| ٢٢ | ماصات دقيقة Micropipetes | Human-Germany |
| ٢٣ | مجهر ضوئي مركب Compound Light Microscope | Motic - Germany |
| ٢٤ | محاقن مختلفة الأحجامSyringes | Meheco-China. |
| ٢٥ | مرشحات دقيقة filter millipore | Himedia-India |
| ٢٦ | مسحات قطنية ناقلة Transport Cotton Swab | ATACO-Brand |
| ٢٧ | مصباح بنزن BenzeneBurnner | Shndon, England |
| ٢٨ | مطحنة كهربائية | Maximan-PRS |
| ٢٩ | مؤصدة Autoclave | LabTech _Korea |
| ٣٠ | ميزان حساس Sensitive balance | Sartarius_ Japan |
| ٣١ | نابذ مركزي عالي التبريد-Cool ultra Centrifuge | Hettich – Germany |
| ٣٢ | نابذ مركزيCentrifuge | Hettich – Germany |
| ٣٣ | هزاز الأطباق المناعية Shaker | Biotek _USA |

**3-1-2العُدد Kits .**

**جدول(3-2) العدد الكيميائية المستخدمة**

| ت | اسم العدة | مكوناته | الشركة وبلد المنشأ |
|---|---|---|---|
| ١ | AccuZol™ Total RNA Kit Extraction | Trizol Reagent 100ml | Bioneer (Korea) |
| ٢ | AccuPower® RocktScript RT PreMix | - RocketScript Reverse Transcriptase (200 u) | Bioneer (Korea) |
| | | - 5× Reaction Buffer (1×) | |
| | | - DTT (0.25 mM) | |
| | | - dNTP (250 µM each) | |
| | | - RNase Inhibitor (1 u) | |
| 3 | AccuPower® 2× Greenstar Master Mix qPCR | 2× Greenstar Master mix | Bioneer (Korea) |
| | | -8 Well strips × 12 each | |
| | | -DEPC – D.W. 1.8 ml × 4 Tubes | |
| 4 | DNase I enzyme set kit | DNase I enzyme | BioBasic (Canada) |
| | | 10X buffer | |
| | | Free nuclase water | |

### 3-1-3 البادئات Primers

تم تصميم هذا البادئات في هذه الدراسة وذلك باستخدام موقع NCBI GenBank Data وباستخدام برنامج تصميم البادئات Primer3 plus . وقد تم تجهيز هذا البادئات من قبل شركة بايونير الكورية.جدول(3-3)

**جدول (3-3) البادئات المستخدمة في الدراسة**

| البادئات | التسلسل | | الحجم |
|---|---|---|---|
| GtfB | F | CCGAAGCGACATCTAAGCAAG | 142bp |
| | R | TCACCATTAGAAGCTGTTTCCC | |
| 16SrRNA | F | TTCGAAGCAACGCGAAGAAC | 132bp |
| | R | AACCCAACATCTCACGACAC | |

### 4-1-3المواد الكيميائية المستخدمة Chemical material

**جدول(3-4) المواد الكيميائية والحياتية المستخدمة**

| المادة | المنشأ والشركة المصنعة |
|---|---|
| Bacetracin 10ug | Himedia-India |
| DEPC water | Bioneer/ Korea |
| Free nuclease water | Bioneer/ Korea |
| Isopropanol | BDH (England) |

| | |
|---|---|
| Himedia-India | Optochin 5ug |
| Himedia-India | Vancomycin 30ug |
| Ajax (Australia) | اسيتون acetone |
| Fluka (Switzerland) | الأيودين Iodine |
| Fluka (Switzerland) | البنفسج البلوريCrystal violet |
| Fluka (Switzerland) | بيروكسـيد الهيـدروجين $(H_2O_2)$Hydrogen peroxide |
| Himedia-India | رافينوزraffinose |
| Fluka (Switzerland) | سفرانين Safranin |
| Himedia-India | سكروز sucrose |
| Himedia-India | سوربيتولsorbitol |
| Fluka (Switzerland) | صبغة احمر الفينول phenol red |
| Fluka (Switzerland) | صبغة الكونغو الحمراء congored |
| Ajax (Australia) | كحول اثيلي Ethanol |
| BDH (England) | كليسيرول Glycerol |
| Himedia-India | مانيتولmannitol |
| Fluka (Switzerland) | محلول القصر Decolerizer |
| Ajax (Australia) | ميثانول Methanol |

### 5-1-3 الاوساط الزرعية المستخدمة Culture media

**جدول (3-5 ) انواع الاوساط الزرعية المستخدمة**

| الاوساط الزرعية | الشركة المصنعة والمنشأ | الغرض منه |
|---|---|---|
| Mitis- salivarius Bacitracin agar | Himedia-India | عزل بكتريا *S.mutans* |
| Trypone yeast (TYCSB) extract cysteine sucrose bacitracin agar | تحضيري | عزل بكتريا *S.mutans* |
| اكار الدم Blood agar | Himedia-India | اختبار قابلية البكتريا على تحليل الدم |
| اكار الكونغو الاحمر Congo red | تحضيري | اختبار قابلية العزلات على تكوين طبقة الغشاء الحيوي |
| المرق المغذي Nutrient broth | Himedia-India | حفظ العينات بعد اضافة الكليسيرول بنسبة 20% |
| مرق Tryptic soy (TSB) | Himedia-India | تنمية الغشاء الحيوي |
| مرق مولر-هنتون Muller-Hinton broth | Himedia-India | اختبار حساسية العزلات البكتيرية للمستخلص الكحولي |
| مرق نقيع القلب والدماغ Heart-Brian infision broth | Himedia-India | تنشيط العزلات البكتيرية |
| وسط اكار نقيع القلب والدماغ Heart-Brian infusion agar | Himedia-India | تنمية وحفظ العزلات البكتيرية |
| وسط الاكار المغذي Nutrient agar | Himedia-India | تنمية العزلات البكتيرية |
| وسط مولر-هنتون Muller-Hinton agar | Himedia-India | اختبار حساسية العزلات البكتيرية للمضادات الحيوية والمستخلص الكحولي |

### 6-1-3 تحضيرالأوساط الزرعية Culture media

حضرت الأوساط الـزراعية حسب تعليمات الشركات المصنعة وعقمت بالمؤصدة بدرجـة حـرارة ١٢١°م تحت ضغط ١٥باوند / انج ² ولمدة 15دقيقة.

## 3-1-7 الكواشف والمحاليل

### 3-1-7-1 كاشف الكتاليز

حضر الكاشف بتركيز 3% من بيروكسيد الهيدروجين في قنينة معتمة واستعمل هذا الكاشف لمعرفة قابلية البكتريا على انتاج انزيم الكتاليز (Macfaddin,2000 )

### 3-1-7-2 المحلول الفسيولوجي 0.85%

استعمل هذا المحلول لاغراض التخفيف وحضر بأذابة 0.85غم من كلوريد الصوديوم في 100مل من الماء المقطر.

### 3-1-7-3عدة صبغة غرام (Lennette *et.al*.,1985 )

تتكون هذه الصبغة من :

- صبغة الكريستال البنفسجية Crystal violete
- محلول الايودين Iodin solution
- محلول القصر(Decolarizer)
- صبغة السفرانين

### 3-1-7-4انابيب ماكفرلاند القياسية انبوبة رقم (5)

استعملت هذه الانابيب بأعتبارها وحدات مقارنة لكثافة البكتريا في المحلول الملحي الفسيولوجي واستعملت ايضا في اختبار الحساسية للعوامل المضادة للبكتريا.

## 3-2 طرائق العمل Methods

### 3-2-1جمع العينات Sample collection

جمعت 75عينة من التجويف الفمي للمرضى المصابين بتسوس الاسنان وماحول الاسنان من المراجعين للمستوصف الصحي في حي الحر والمستشفى التعليمي لطب الاسنان في جامعة كربلاء للمدة من ٢٠١٥/١٠/١ ولغاية ٢٠١٥/٢/١ وتراوحت اعمار المرضى (٦-٧٠) سنة واخذت العينات من منطقة التسوس وماحول السن بمسحات قطنية معقمة وبأشراف طبيب اسنان مختص ثم نقلت العينات الى المختبر وزرعت على الاوساط الزرعية الصلبة وحضنت في حاوية مع توفير $CO_2$ بنسبة 5% وفي درجة حرارة 37C° ولمدة 48 ساعة ونقلت المستعمرات التي تمتلك صفات *S.mutans* الى الاوساط الزرعية الانتخابية لتأكيد التشخيص ثم نقلت الى وسط نقيع القلب والدماغ وحفظت بدرجة 4C°.

**2-2-3 الزرع على الاوساط الصلبة**

زرعت العينات على وسط اكار الدم blood agar وحضنت بدرجة حرارة 37Cº ولمدة 48 ساعة مع توفير $CO_2$ بنسبة 5% ثم نقلت المستعمرات التي تمتلك صفات العقدية الطافرة الى الاوساط الانتخابية Mitis saluvaris bacitracin agar(MSB) مع إضافة 0.2 /ml unit من المضاد الحيوي Bacitracin و20% سكروز وTYCSB لتأكيد التشخيص .

**3-2-3 الفحص المجهري**

أُخذ جزء من مستعمرة نامية على وسط نقيع القلب والدماغ بوساطة ناقل ثم عمل منه مسحة صبغت بصبغة غرام ثم فحصت مجهريا.

**4-2-3 اختبار الكشف عن انزيم الكتاليز**

نقلت مستعمرة من بكتريا العقدية الطافرة بوساطة الناقل الى شريحة زجاجية نظيفة ثم اضيف لها قطرة من محلول بيروكسيد الهيدروجين (3%) ، ان ظهور الفقاعات دليل على النتيجة الموجبة ، ويستعمل هذا الكشف لمعرفة قابلية البكتريا على انتاج انزيم الكتاليز الذي يحلل بيروكسيد الهيدروجين $H_2O_2$ الى اوكسجين وماء(Baron *et.al*.,1994)

**5-2-3 اختبار تحلل الدم**

حضر وسط اكار الدم بأضافة 5% دم ثم لقح بالعزلات البكتيرية وحضنت بدرجة 37Cº لمدة 24ساعة ثم لوحظ تكون هالة خضراء اللون حول المستعمرات البكتيرية التي تمثل دليلا على قدرة هذه البكتريا على تحليل الدم (Cowan,1985)

**6-2-3 اختبار الحساسية للمضادات الحيوية**

اجري هذا الاختبار للتحري عن حساسية بكتريا *S.mutans* للمضادات الحيوية بأستخدام وسط اكار مولر-هنتون واضيف له دم بنسبة 5% (Baron *etal*.,1994).

حضر المعلق البكتيري بنقل مستعمرة او مستعمرتين الى المحلول الفسيولوجي وتم ضبط عكورته مع انبوبة ماكفرلاند القياسية (5) ثم نشر العالق البكتيري بحجم (100مايكروليتر) على سطح الوسط المحضرفي اطباق بتري بأستخدام مسحة قطنية معقمة ثم تركت الاطباق لمدة 15دقيقة لغرض الامتصاص وثبتت اقراص المضادات الحيوية بأستخدام ملقط معقم وحضنت

الاطباق بدرجة حرارة 37Cºولمدة 24 ساعة وبعد الحضن تم قياس قطر التثبيط حول كل قرص بوساطة مسطرة.

**3-2-7 اختبار انتاج الدكستران**

استخدم هذا الاختبار لمعرفة قدرة البكتريا على انتاج مادة الدكستران (Guthof,1970) إذ نقلت مستعمرة اومستعمرتين من بكتريا العقدية الطافرة *S.mutans* الى (2ml) من المرق المغذي وحضنت بدرجة 37Cºلمدة 48ساعة ، رج المزروع البكتيري بوساطة جهاز النبذ المركزي بمعدل (3000دورة/دقيقة ) لمدة عشر دقائق ثم سحب 0.1 ml من العالق البكتيري الى ثلاثة انابيب حاوية على 0.3ml من اسيتات الصوديوم (10%)ومزجت جيدا
اضيف0.8ml من الاسيتون الى الانبوب الاول ، 1.2ml من الايثانول للانبوب الثاني ، 1.5ml من الميثانول الى الانبوب الثالث .رجت الانابيب لمدة ثلاث دقائق ، وكانت عملية التكتل في جوانب وقعر الانابيب الثلاثة او في انبوب الاسيتون والعكورة في الكحول دليلا على انتاج الدكستران.

**3-2-8 اختبار تحمل كلوريد الصوديوم بتركيز(4%)**

زرعت العزلات البكتيرية في وسط نقيع القلب والدماغ HBI broth حاوي على كلوريد الصوديوم بتركيز4% وموزع في انابيب بواقع 10mlلكل انبوب بالاضافة الى انبوب سيطرة يحتوي على كلوريد الصوديوم بدون بكتريا وحضنت الانابيب بدرجة حرارة37Cº ولمدة 48ساعة وقيست العكورة مقارنة مع انبوب السيطرة،كان حدوث العكورة دليلا على قدرة هذه البكتريا على النمو وتحمل التراكيزالعالية من كلوريد الصوديوم.(Essam *et al*.,2014)

**3-2-9 اختبار قدرة البكتريا على تخمير الكاربوهيدرات**

اضيفت اربعة انواع من السكريات وهي (السكروز،رافينوز،سوربيتول،مانيتول) بعد التعقيم بالترشيح وبنسبة 1% الى وسط نقيع القلب والدماغ HBI broth الحاوي على صبغة احمر الفينول phenol red واستخدم السكروز بوصفه سيطرة موجبة ووسط نقيع القلب والدماغ الخالي من المحلول السكري بوصفه سيطرة سالبة .

وزع الوسط HBI broth والحاوي على المحلول السكري في انابيب زجاجية معقمة بواقع 4ml لكل انبوب ثم لقحت 3-2 قطرة من العزلات البكتيرية وحضنت بدرجة حرارة

37Cº ولمدة 72 ساعة ،وكان تغير اللون من الاحمر الى اللون الصفر دليلا على النتيجة الموجبة وقدرة هذه البكتريا على تخمير السكريات.(Fingold and Baron,1986)

**3-2-10المستخلص الكحولي لنبات الزنجبيل**

حضر المستخلص بأذابة (200)غم من رايزومات نبات الزنجبيل في (1000)مل من كحول الميثانول بتركيز 95% لاختبار حساسية العزلات البكتيرية وكذلك تأثيره على تكوين الغشاءالحيوي (Biofilm).

نقع الزنجبيل بالميثانول لمدة 24ساعة وفي اليوم التالي نقل المنقوع الى حاويات زجاجية معقمة ووضعت في حاضنة هزازة بدرجة حرارة الغرفة لمدة24ساعة وبمعدل 150دورة/دقيقة ،وقد رشح المستخلص بواسطة عدة طبقات من الشاش الطبي المعقم ثم بأوراق ترشيح Whatman No.1 وصب في اطباق زجاجية معقمة وترك بدرجة حرارة الغرفة ليجف .(Nelson and Reginald,2007)

**3-2-11تحضير التراكيز اللازمة للكشف عن التركيز المثبط الادنى**

وزن 1.5 غم من مستخلص الزنجبيل (الباودر) واضيف له 10 مل من كحول الميثانول 95% فتم الحصول على 150ملغم/مل من المحلول الخزين Stock solution ثم عبئ في قناني معتمة بدرجة 4Cº .

حضرت التخافيف التضاعفية اللازمة لأختبار الفعالية التثبيطية للمستخلص الكحولي للزنجبيل من المحلول الخزين والتي عقمت بالمرشحات الغشائية الدقيقة 0.22 وبالتراكيز الاتية (12.5, 25 , 50 , 100 , 150) ملغم\مل (الدعمي ،2014) وكما يلي:

1.سحب (3ml)من المحلول الخزين لتحضير تركيز( 150 mg/ml)

2.سحب (2ml)من المحلول الخزين واضيف له (1ml)من كحول الميثانول 95% لتحضير تركيز (100mg/ml).

3.سحب (1ml)من المحلول الخزين واضيف له (2ml) من كحول الميثانول 95% لتحضير تركيز (50 mg/ml).

4.سحب (0.5ml) من المحلول الخزين واضيف له (2.5ml) من كحول الميثانول 95% لتحضير تركيز(25 mg/ml).

5.سحب (0.25 ml) من المحلول الخزين واضيف له (2.75ml) من كحول الميثانول 95% لتحضيرتركيز(12.5mg/ml).

6.سحب (0.125ml) من المحلول الخزين واضيف له (3ml) من كحول الميثانول 95% لتحضير تركيز (6.25mg/ml).

### 12-2-3اختبار الفعالية التثبيطيةInhibition activity test

استخدمت طريقتان لاختبار التأثير التثبيطي لمستخلص الزنجبيل على خلايا بكتريا *S.mutans* :

### 1-12-2-3 طريقة الانتشار بالحفرWell diffusion

استخدمت طريقة الانتشار بالحفر للكشف عن الفعالية التثبيطية للمستخلص الكحولي لنبات الزنجبيل ضد بكتريا العقدية الطافرة *S.mutans* .

1.خففت العزلات بالمحلول الفسلجي للوصول الى عكورة انبوبة ماكفرلاند القياسية( 5)

2.نشرت بواقع( 100مايكروليتر) لكل طبق بوساطة مسحات قطنية معقمة وتركت 15دقيقة لغرض الامتصاص.

3.استخدم ثاقب فليني لعمل ثقوب قطرها (6 ملم) على سطح الاكارالمزروع ثم ملئت كل حفرة بواقع (50مايكروليتر)من كل تركيز من التراكيزالآتية ( 25,12.5 , 50 , 100 , 150 ) وبمعدل حفرة لكل تركيز مع حفرة للمضاد الحيوي32% Ampicillin بوصفها سيطرة موجبة وحفرة لكحول الميثانول 95% بوصفها سيطرة سالبة ولمدة 24 ساعة وحضر بمعدل ثلاث مكررات لكل تركيز.

4.حضنت الاطباق بدرجة حرارة 37Cº ولمدة 24 ساعة .

5.قيست مناطق التثبيط حول الحفر وقورنت مع معامل السيطرة الحاوي على كحول الميثانول95%.(Perez C. *et.al*.,1990;Chessbrough,2000).

### 2-12-2-3 طريقة صفائح المعايرة الدقيقة Microtiter plate

1-عدلت عكورة العالق البكتيري بالمقارنة مع انبوبة ماكفرلاند القياسية( 5)

2- حضرت التراكيز الآتية من مستخلص الزنجبيل (6.25 ،12.5، 25 ، 50 ، 100، 150) وتم تعقيم كل منها بالمرشحات الغشائية الدقيقة بقطر 0.45 مايكرون.

3- وضع (180مايكروليتر) من Muller Hinton broth في كل حفرة ثم وضع (10مايكروليتر)من المستخلص و(10مايكروليتر) من العالق البكتيري وحضنت الصفيحة لمدة 24ساعة بدرجة حرارة 37Cº وحضر بمعدل مكررين لكل تركيز مع استخدام المضاد الحيوي

Ampicillin 32% كمعاملة سيطرة موجبة وكحول الميثانول95% كمعاملة سيطرة سالبة (Christenfen *etal*.,1985).

**3-2-13اختبار تكوين الغشاءالحيوي (Biofilm)**

اختبرت قابلية العزلات البكتيرية على تكوين الغشاء الحيوي بأستخدام طريقة Congo red agar الذي حضر من المكونات الآتية:

HBI broth (37 )غم ،سكروز (50) غم،اكار رقم 1 (10)غم،صبغة الكونغو الحمراء (8)غم وحضرت الصبغة وعقمت بصورة منفصلة عن باقي المكونات ، لقحت الاطباق بمعدل (100مايكروليتر) من العالق البكتيري وحضنت هوائيا بدرجة حرارة 37Cº لمدة 24 ساعة ، وكان ظهور المستعمرات السوداء دليلا على قدرة هذه البكتريا على تكوين الغشاء الحيوي.(Freeman *etal*.,1989).

**3-2-14 تأثير المستخلص الكحولي لنبات الزنجبيل على تكوين الغشاء الحيوي(Biofilm)**

تم اختيار خمس عزلات بكتيرية وقد اعطت نتائج ايجابية بتكوين الغشاءالحيوي بحسب اختبارالكشف عن الغشاء الحيوي بطريقة Congo red agar ، واستخدمت طريقة تنمية الغشاءالحيوي بوساطة اطباق بتري طبقا لطريقة (Chandra *etal*.,2001)وهذه الطريقة مطابقة لطريقة Microtiter plate.

1. خففت العزلات بتركيز (100:1) لتكون مطابقة لعكورة انبوبة ماكفرلاند القياسية (5) .
2. اضيف (1ml) من العالق البكتيري الى (9ml) من مرق Tryptic soy broth(TSB) في اطباق بتري حجم (6) سم وبمعدل اربعة اطباق لكل عينة مع طبق سيطرة.
3. احيطت الاطباق بشريط Barafilm وحضنت بدرجة حرارة 37Cº لمدة 24 ساعة .
4. تم التخلص من محتويات الاطباق (ماعدا طبق السيطرة إذ حضن 48ساعة) وغسلت بالمحلول الفسلجي الطبيعي ثلاث مرات .
5. اضيف (5ml) من المستخلص الكحولي لنبات الزنجبيل الى الاطباق الحاوية على الغشاء الحيوي النامي وبمعدل تركيز لكل طبق من التراكيز الآتية (100,50,25,12.5) mg/ml .
6. حضنت الاطباق لاهوائيا لمدة 48 ساعة وبدرجة حرارة 37Cº
7. سكبت محتويات الاطباق مرة اخرى وغسلت بالمحلول الفسلجي الطبيعي ثم اضيف (1ml) من مرق TSB الى الاطباق بالاضافة الى طبق السيطرة وعمل لها قشط بأداة نظيفة معقمة.

8.نقلت الى انابيب ابندروف معقمة وعرضت للنبذ المركزي بمعدل(3000 دورة/دقيقة) لمدة 10 دقائق وحفظت بدرجة (20-).

### 15-2-3 فحص تفاعل سلسلة البلمرة في الوقت الحقيقي الكمي (الاستنساخ العكسي)

### Quantitative Reverse Transcription Real-Time PCR (RT-qPCR)

اجري فحص تفاعل سلسلة البلمره في الوقت الحقيقي الكمي (الاستنساخ العكسي) وذلك لقياس المستويات الكمية الحمض النووي المرسل (mRNA) للدلالة على مقدار التعبير الجيني لجين gene (*gtfB*) glucosyltransferase( في جرثومة *Streptococcus mutans* وكذلك استخدام جين (16SrRNA gene) بوصفه جينا منظما قياسيا لحساب التعبير الجيني،واجري هذا الفحص حسب طريقة .(Klein *et al.*,2010) كما في الخطوات الآتية:

#### 1-15-2-3 استخلاص الحامض النووي الرايبوزي الكلي Total RNA extraction

استخلص الحامض النووي Total RNA وذلك باستخدام عدة ال Trizol kit المجهز من شركة Bioneer-korea ولقد تم العمل بهذا العدة حسب تعليمات الشركة المصنعة كما في الخطوات الآتية:

1- اخذ 1ml من العالق ووضع في انبوبة ابندروف ومن ثم نقل الى جهاز الطرد المركزي بسرعه 10000 دورة \دقيقة لمدة دقيقة واحدة.

2- تم التخلص من الطافي واخذ المترسب(Pellet ) واضيف له 1ml من محلول (Trizol) والذي يعمل على تحطيم الخلايا وعمل له رج مستمر باستخدام الvortex لمدة 1 دقيقة.

3- اضيف 200 مايكروليتر من كحول الchloroform لكل عينة للتأكيد على تحطيم الخلايا بشكل كامل وعمل لها رج لمدة 15 دقيقة بوساطة vortex .

4-حضن الخليط في الثلج لمدة 10 دقائق.

5-وضعت العينات في جهاز الطرد المركزي لمدة 10 دقائق بسرعة 12000دورة/دقيقة.

6-نقلت الطبقة العليا (الشفافة) الى انبوبة ابندروف جديدة بوساطة micropipette واضيف اليها كمية متساوية منisopropanol لغرض ترسيب RNA وقلبت الانبوبة 4-5 مرات باليد.

7-حضنت العينات بدرجة حرارة -20مْ لمدة 10 دقائق .

8-وضعت العينات في جهاز الطرد المركزي12000 دورة\دقيقة لمدة 10 دقيقة ثم تم التخلص من الطافي وأخذ المترسب pellet.

9- اضيف للمترسب 1ml من ethanol alcohol بتركيز80% وعمل له رج مستمر بجهاز vortex ثم وضع الخليط بجهاز الطرد المركزي بسرعة 12000دورة\دقيقة لمدة 5 دقيقة وتم التخلص من الطافي واخذ المترسب pellet.

10–جفف المترسب بتركه بدرجة حرارة الغرفة (25) مْ ولمدة 10 دقيقة ثم اضيف 50 ميكروليتر من DEPC water ووضع في حمام مائي لمدة 10دقائق بعد ذلك حفظ الحامض النووي RNA المستخلص في درجه حرارة -70 مْ.

### 3-2-15-2 قياس تركيز ونقاوة الحامض النووي RNA

### Assessing RNA yield and quality

كشف عن الحمض النووي RNA المستخلص من خلال استخدام جهاز خاص Nanodrop spectrophotometer وذلك من تحديد تركيز الحامض النووي ng\µl RNA و قياس نقاوة الحامض النووي RNA من خلال قراءة الامتصاصية بدرجة (260/280 nm) على النحو الآتي :

1-بعد تشغيل جهازNanodrop spectrophotometer تم اختيار برنامج قياس الحمض النووي نوع RNA.

2-صفر الجهاز وذلك بوضع 2 مايكروليتر من(Free nuclease water) باستخدام ماصة دقيقةMicropipete معقمة على سطح ركيزة المقياس وإجراء التصفير ثم نظفت الركيزة باستخدام أوراق تنشيف لقياس العينات.

3-تم قياس تركيز الحامض النووي RNA وذلك باستخدام 1 مايكروليتر من كل عينة من الحامض النووي RNA المستخلص ومن ثم نظفت ركيزة المقياس الجهاز مرة اخرى لقياس العينة الاخرى.

4-حددت نقاوة عينات ال RNA المستخلص بقراءة الامتصاصية جهاز Nanodrop Spectrophotometer على طولين موجيين (260/280 nm) إذ ان الحمض النووي RNA المستخلص يعد نقيا عندما تكون نسبة الامتصاصية هي (1.8).

### 3-15-2-3 معاملة بانزيم DNase I Treatment

عومل الحامض النووي الريبوسومي RNA باستخدام Dnase I treatment وذلك لتخلص من بقايا الحمض النووي DNA في عملية الاستخلاص من خلال الاعتماد على طريقة عمل عدة الأنزيم وكما يلي :

1.اخذ 10 مايكروليتر من الحامض النووي الرايبوسومي RNA لكل عينة ووضع في انبوبة ابندروف.

.أضيف 1 مايكروليتر من DNase enzyme و5 مايكروليتر من DEPC water و4 مايكروليتر من المحلول الدارئ (buffer) على التوالي الى الحامض النووي الرايبوسومي RNA.

3.حضن المزيج في الحاضنة بدرجة حرارة 37 م«لمدة 30 دقيقة .

4.اضيف 1 مايكروليتر من EDTA وحضن المزيج بالحمام المائي بدرجة حرارة 65 م« لمدة 10 دقائق وذلك لتثبيط فعل الانزيم .

### 4-15-2-3 طريقة تصنيع Complementary DNA synthesis cDNA

استخدامت طريقة تصنيع الحامض النووي cDNA المكمل DNA من عينات الحامض النووي ال RNA المستخلص باستخدام عدة Accupower Rockscript RT Premix kit المجهزة من شركة Bioneer-Korea. واجريت العملية حسب طريقة عمل العدة كاما وكما يلي:

1.اخذ 10مايكروليتر من الحامض النووي الرايبوسومي RNA لكل عينة الى انابيب عدة cDNA synthesis الحاوية على انزيم الاستنساخ العكسي Transcriptase.

2.اضيف 4 مايكروليترمن مادة DTT و1 مايكروليترمن Random primer(dNTP) و4 مايكروليترمن المحلول الدارئ buffer و1 مايكروليترمن RNase inhibitor على التوالي الى انابيب العدة .

3.اضيف 9 مايكروليترمن مادة DEPC water الى انابيب العدة إذ تعمل كمادة حافظة للحامض النووي .

4.وضعت جميع الانابيب الى جهازالطرد المركزي المازج centrifuge(Exispin) بسرعة 3000 rpm لمدة 3 دقائق .

5.نقلت الانابيب الى جهاز الدوار الحراري Thermocycler وطبقت الظروف الحرارية لعملية تصنيع cDNA .

6.حفظت العينات بدرجة -20 م«لحين استخدامها لفحص Real Time PCR.جدول(3-8)

**جدول (3-8) الظروف الحرارية المثلى لعملية تصنيع cDNA**

| Step | Temperature | Time |
|---|---|---|
| cDNA synthesis (RT step) | 50 °C | 1 hour |
| Heat inactivation | 95 °C | 5 minutes |

### 3-2-15-5 فحص Quantitative Real-Time PCR (qPCR)

اجري فحص ال qPCR لعينات cDNA لمجاميع التجربة وذلك باستخدام عدة Accupower 2x Green Star qPCR kit المجهزة من شركة بايونير الكورية، لاجراء هذا الفحص والحاوي على صبغة السايبر الخضراء التي تتفاعل مع الجينات المتضخمة في جهاز Real-Time PCR كما ياتي:

**أ)- تحضير مزيج تفاعل qPCR للجين الهدف ( *gtfB*) حسب جدول(3-9)**

**جدول (3-9)مكونات مزيج تفاعل qPCR للجين *gtfB***

| qPCR master mix | Volume |
|---|---|
| cDNA template | 5µL |
| gtfB gene Forward primer (10pmol) | 1µL |
| gtfB gene Reverse primer (10pmol) | 1µL |
| 2x green star qPCR master mix | 12.5 µL |
| DEPC water | 5.5 µL |
| Total | 25 µL |

**ب)- تحضير مزيج تفاعل qPCR للجين القياسي *16SrRNA* حسب جدول(3-10)**

**جدول (3-10)مكونات مزيج تفاعل qPCR للجين *16SrRNA***

| qPCR master mix | Volume |
|---|---|
| cDNA template | 5µL |
| 16SrRNA gene Forward primer (10pmol) | 1µL |
| 16SrRNA gene Reverse primer (10pmol) | 1µL |
| 2x green star qPCR master mix | 12.5 µL |
| DEPC water | 5.5 µL |
| Total | 25 µL |

ثم اضيفت المكونات التي ذكرت في الجداول اعلاه الى انابيب qPCR الخاصة ثم وضعت جميع الانابيب في جهز الطرد المركزي المازج (Exispin) vortex centrifuge بسرعة 3000rpm لمدة ثلاث دقائق. وبعدها نقلت صفيحة الى جهاز . (Miniopticon Real-Time PCR BioRad.USA) وطبقت الظروف الحرارية qPCR Thermocycler conditions لكل الجينات حسب طريقة عمل العدة كما في الجدول (3-8).

**جدول (3-8)الظروف الحرارية المثلى لمراحل qPCR للجينات *gtfB* و*16SrRNA* المقاسة حسب طريقة عمل العدة**

| qPCR step | Temperature | Time | Repeat cycle |
|---|---|---|---|
| Initial Denaturation | 95 °C | 3 min | 1 |
| Denaturation | 95 °C | 20 sec | 45 |
| Annealing\Extension Detection(scan) | 58 °C | 30 sec | |
| Melting | 60-95°C | 0.5 sec | 1 |

### 6-15-2-3 طريقة تحليل بيانات Real-Time PCR data analysis

حللت البيانات الناتجه من تفاعل السلسلة المتبلمر في الوقت الحقيقي الكمي من خلال استخدام طريقة livak method التي وضعت من ( Livak and schmittgen, 2001) والتي تعتمد على استخراج الكمية النسبية Relative Quantitive والكميه المطلقةAbsolute Quantitive من خلال عملية تصحيح ومعادلة الجينات الهدف مع عينات السيطرة حتى تكون النتائج ذات معنى بايولوجي كل عينة من عينات الهدف تصحح مع عينة السيطرة لينتج مستوى محدد من التعبير النسبي وتتطلب هذه الطريقة وجود جين هدف target gene وتمثل بهذه الدراسة الجين *gtfB* glucotransferase الخاص ببكتريا *S.mutans* وايضا الى جين منظم قياسي House keeping gene وتمثل بالجين *16SrRNA* لحساب التعبير الجيني وتشمل طريقة Livak الخطوات التالية:

$\Delta$CT (test)=CT(target,test)-CT (ref,test)

$\Delta$CT (control)=CT (target,control)-CT(ref,control)

CT(target,test) : يشيرالى عتبة الدورة ( للجين الهدف ، العينة المعاملة)

CT (ref,test) : يشير الى عتبة الدورة (للجين المحافظ ،العينة المعاملة)

CT(target,control) : يشير الى عتبة الدورة ( للجين الهدف،عينة السيطرة)

CT(ref,control) : يشير الى عتبة الدورة (للجين المحافظ ،عينة السيطرة)

2- معادلة ΔCT للعينة المعاملة بالنسبة الى ΔCT لعينة السيطرة بأستخدام القانون الاتي:

$$\Delta\Delta CT=\Delta CT(test)-\Delta CT(control)$$

3- ايجاد نسبة التعبيرالجيني (fold change) بأستخدام القانون الاتي:

$$\text{Gene expression Ratio}=2^{\Delta\Delta CT}$$

**3-2-16التحليل الاحصائي Statistical analysis**

تم تحليل النتائج باستخدام اختبارتحليل التباين بأتجاه واحد One way ANOVA واقل فرق معنوي Least Significant Defference L.S.D على مستوى احتمالية 0.05 برنامج SPSS .(الامام 2007)

# الفصل الرابع

# النتائج و المناقشة

# Results and Discussion

# النتائج والمناقشة

# *Results & Discussion*

## 1-4 العزل والتشخيص

تم الحصول على18 عزلة من الجرثومة السبحية *S.mutans*من 75 عينة للمرضى المصابين بمرض تسوس الاسنان والتهابات ماحول الاسنان وكانت نسبة الاصابة 24%وتعد هذه النسبة مقاربة لماحصل عليه الباحث( Thomas *etal*,(2008 حيث ذكر بأن 17.2% من المرضى المصابين بتسوس الاسنان يحملون الجرثومة السبحية *S.mutans* ومقاربة لما حصل عليه Desoet *etal* (2000) الذي ذكر ان 25% من الاطفال المصابين بتسوس الاسنان لديهم بكتريا *S. mutans*،وكانتالمستعمرات النامية على وسطي Mitis-salivarius bacitracin agar( MSB) و TYCSB agarدائرية صغيرة شبه شفافة غير منتظمة الشكل مرتفعة عن سطح الاكار ومتماسكة القوام وذات مظهر حبيبي (Loesche,1986) .

## 2-4 الفحوصات المظهريةوالكيموحيوية

من خلال الفحوصات المظهريةوالكيموحيوية تبين ان جميع عزلات الجرثومة السبحية *S.mutans* ظهرتبشكل خلايا دائرية الى بيضوية الشكل موجبة لصبغة غرام ومرتبة بشكل ازواج او سلاسل ،وأنَها سالبة لانزيم الكتاليز الذي يعمل على اكسدة بيروكسيد الهيدروجين $H_2O_2$ الى اوكسجينO وماء$H_2O$ وذلك للتخلص من تأثيره السام على الخلية البكتيرية.الجدول (1-4)

**جدول (4-1)يوضح الاختبارات الشكلية والكيموحيوية لبكتريا *S.mutans***

| ت | الاختبار | النتيجة |
|---|---|---|
| 1 | تفاعل صبغة غرام | + |
| 2 | احتياجات النمو | اختيارية التهوية |
| 3 | اختبار الكتاليز | - |
| 4 | تحلل الدم | الفا ، كاما |
| 5 | انتاج الدكستران | + |
| 6 | النموفي Nacl 4% | + |
| 7 | Mitis-salivarius agar | + |
| 8 | TYCSB agar | + |

واظهرت النتائج إنَ العزلات البكتيرية اعطت نوعين من التحلل،تحلل من نوع الفا وتحلل من نوع كاما وهذا يتفق مع ماذكره (Facklam,1977) ويعد انزيم الهيمولايسن ذو طبيعية بروتنية يفرز من انواع عديدة من البكتريا السالبة والموجبة لصبغة غرام (Benz *etal.*,1989) ،وان الية عمل الهيمولايسين في احداث الامراضية تكون اما بصورة مباشرة عن طريق تحليل كريات الدم الحمراء وهذا يسبب تحرر الهيموكلوبين الذي يعد مصدرا مهما لنمو وتكاثر البكتريا او عن طريق التداخل مع العمليات الدفاعية داخل جسم المضيف حيث يمتلك الهيمولايسين مدى واسعا من التأثيرات فهو يهاجم الخلايا المناعية ولكن دون أنَ يحفز تحللها لكنه بالمقابل يمنعها من اداء وظيفتها (Goni and Ostolaza,1998).

اظهرت النتائج أنَ جميع العزلات البكتيرية تمتلك القدرة على انتاج مادة الدكستران ولكن بنسب متفاوتة تراوحت مابين كمية واضحة ملتصقة على قعر وجدران انبوبة الاختباروبين كمية قليلة وفي بعض العزلات البكتيرية اقتصر وجود مادة الدكستران في انبوب الاختبار الحاوي على الاسيتون مع وجود عكورة في الميثانول والايثانول ،ولوحظ حدوث تفاعل عند خلط العزلات البكتيرية مع الاسيتون والميثانول والايثانول مما يدل على النتيجة الموجبة،ويعزى حدوث العكورة في انابيب الاختبارالحاوية على الميثانول والايثانول الى انزيم dextransucrase

الذي يقوم بتكوين كمياتمن الكلوكان غير الذائب في الماء إذ إنَ السكريات تتحلل الى مواد ذائبة في الكحول ثم تتحول لاحقا الى كلوكان غير ذائب وهذا يتفق مع ماذكره (1970),Guthof.

شكل (4-2)انتاج الدكستران لبكتريا *S. mutans*

اظهرت العزلات البكتيرية نسب متفاوتة من النمو تراوحت مابين نمو جيد الى نمو متوسط في وسط BHI broth مزود بكلوريد الصوديوم بنسبة 4% وتعد القدرة على النمو في تركيز4%من كلوريد الصوديوم من الصفات المميزة *Streptococcus mutans*(Holt *et.al.*,1994)،إذ إنَ التركيز الملحي احد العوامل التي تؤثر بصورة واضحة على تكوين الكلوكان غير الذائب في الماء ويزيد من سرعة بناء الكلوكان ويحول الكلوكان الذائب في الماء الى غير الذائب ويحفز فعالية Glucosyltransferases(GTFs) (Mukasa *et.al.*,1982)

**4-3اختبار قدرة البكتريا على تخمير الكاربوهيدراتCarbohydrate fermentation test**

بينت النتائج الموضحة في الجدول(4-2) أنَ61.1% من العزلات البكتيرية تمتلك القدرة على تخمير سكرالرافينوز Raffinose وعلى تخمير المانيتول Mannitolوالسوربيتول Sorbitol بنسبة100%.

**جدول (4-2) قابلية العزلات البكتيرية على تخمير الكاربوهيدرات**

| العزلات | الرافينوز | المانيتول | السوربيتول | السكروز |
|---|---|---|---|---|
| الموجبة | %61.1 | % 100 | % 100 | % 100 |
| السالبة | %11.1 | | | |
| المتأخرة | %27.8 | | | |

استخدم السكروز كسيطرة موجبةوذلك لان السكروز يتحول بسرعة الى حامض مسببا انخفاضا سريعا في الاس الهيدروجيني pHمما يؤدي الى تغيراللون من الاحمر الى الاصفر ويعد السكروز وبالدرجة الاولى الغذاء الكاربوهيدراتي المحفز لعملية التسوس بسبب قابليته التخمرية بالاضافة الى أنَه يستخدم كمادة اساس في بناء عديد السكريد الخارجي (EPS) وعديد السكريد الداخلي (IPS) في اللويحة السنية (Bowen ,2002) ، واشار PaseLeme *et.al.*,(2004) الى ان السكروز يخفض من تركيز الكالسيوم والفسفور غير العضوي والفلورايد في الغشاء الحيوي في الاسنان ويعد انتاج الكلوكان وحامض اللاكتيك عن طريق تخمير الكاربوهيدرات عامل ضراوة اساسيا في حدوث تسوس الاسنان .

شكل (4-3) قدرة بكتريا *S. mutans* على تخمير الكاربوهيدرات

**4-4اختبار الحساسية للمضادات الحيوية Antibiotic sensitivity test**

استخدمت ثلاثة انواع من المضادات الحيوية في تشخيص الجرثومة السبحية *S.mutans* كما هي مبينة في الجدول(4-3).

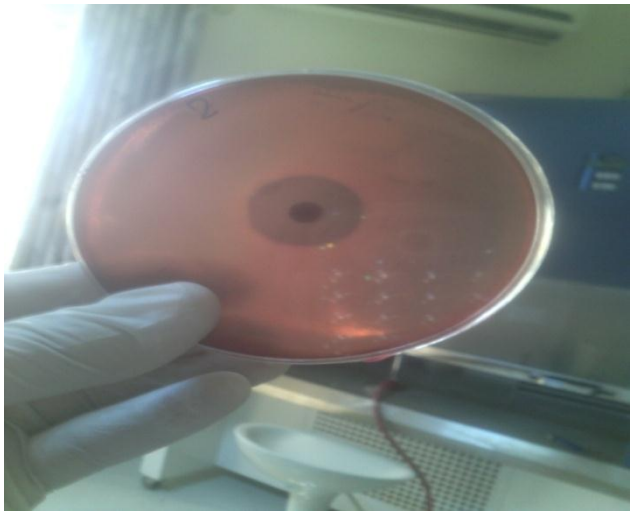
بينت النتائج أنَ جميع العزلات البكتيرية مقاومة للمضادين Bacitracin ، Optochin بنسبة 100% وحساسة للمضاد الحيوي Vancomycin بنسبة 100% واعتمدعلىقياسقطرمنطقةالتثبيط ومقارنة ذلك مع ماورد في NCCLS 2014، واشار Whiely and Beighton , (1998) الى أنَ كل *Mutans streptococci* المعزولة من الانسان تمتلك المقاومة للمضاد الحيويBacitracin حيث يعد ميزة تفريقية لهذه المجموعة عن باقي المجاميع الاخرى لذلك يضاف هذا المضاد الىMS agar لعزلالجرثومة السبحية وتشخيصها ، اما المضاد الحيوي Optochin فهو يميز *S. Mutans* عن *S.pneumonia* حيث تكون الاخيرة حساسة له ( William and Wilkins ,2013) وتعد الحساسية للمضاد الفانكومايسين ميزة تفريقية اخرى تميز الجرثومة السبحية عن باقي المسبحيات الاخرى (Baron *etal*.,1994).

**جدول (4-3) يوضح اختبار الحساسية للمضادات الحيوية للجرثومة السبحية *S.mutans***

| ت | المضاد الحيوي | الرمز | التركيز مايكروغرام/قرص | الحساسية |
|---|---|---|---|---|
| 1 | Vancomycin | VA | 30 | S |
| 2 | Bacitracin | B | 10 | R |
| 3 | Optochin | OP | 5 | R |

S ; sensetive ، R ; resistant

يؤثر المضاد الحيوي على البكتريا بطريقتين فهو اما ان يكون قاتلا (bacteriocidal) او مثبطا (bacteriostatic) إذ إنَ البكتريا قد تتمكن من اعادة نشاطها اذا ازيل هذا المضاد لاي سبب من الاسباب ،ويؤثر المضاد الحيوي اما على بناء بروتينات الجدار الخلوي او على بناء الحامض النووي او على بناء الجزيئات الايضية ، وتستخدم البكتريا طريقتين لتجنب او مقاومة تأثير المضادات الحيوية وهي تحطيم او الغاء تفعيل المضاد الحيوي عن طريق افراز الانزيمات المثبطة (Brook *etal*.,2001) اومنع حدوث ثقوب في المكان الذي يستهدفه المضاد(Jacoby and Sutton ,1985) فضلا عن ان حدوث طفرة او تغيير في المكان المستهدف يمكن البكتريا من مقاومة ذلك المضاد(Levinson and Jawetz,2000).



شكل(4-4) حساسية بكتريا *S.mutans*للمضاد الحيوي Vancomycin

اما الاغشية الحيوية فأنها تظهر درجة عالية من المقاومة للعوامل المضادة وجهاز مناعة المضيف (Dallawala *etal.*,2010)وتكون بمعدل اعلى من المقاومة في البكتريا حرة المعيشة اذ تزداد الى 1000 ضعف ويعود السبب في ذلك الى أنَ اكثر من 20% من جينات البكتريا في الغشاء الحيوي يتم تعبيرها بصورة مختلفة الذي قد ينتج عنه حماية اكبرضد خلايا البلعم الكبير وكذا أنَ البكتريا تنمو ببطئ وتكون فعالياتها الايضية بطيئة ومن ثمَ فأن معدل تعرضها للمضادات يكون قليلا وتنتج البكتريا كذلك مركبات ضمن الغشاء الحيوي تعادل تأثير المضادات ،فضلا عن أنَ الطبقة اللزجة Exopolysaccharide(EPS)تعمل كحاجز يحمي البكتريا من فعل المضادات الحيوية وتمنع نفاذية المضاد( Estrela and Abraham,2010;Hassan *et.al*.,2011).

## 4-5 تقدير الفعالية التثبيطية لمستخلص نبات الزنجبيل

### 4-5-1طريقة الانتشاربالحفرwell diffusion

يوضح الجدول (4-4) مناطق التثبيط للمستخلص الكحولي لنبات الزنجبيل ضد الجرثومة السبحية *S.mutans* وقد اعطت السيطرة الموجبة المتمثلة بالمضاد الحيوي Ampicillin 32% منطقة تثبيط (17)ملم بينما اعطت السيطرة السالبة المتمثلة بالميثانول 95% (1.3)ملمالذي لايعد تثبيطا ملحوظا واظهرت النتائج أنَ مناطق التثبيط تراوحت مابين (-23 7.6) ملم ممايدل على انخفاض معنوي فياعداد البكتريا وهذا يشير الى أنَ جميع العزلات حساسة للمستخلص الكحولي لنبات الزنجبيل.

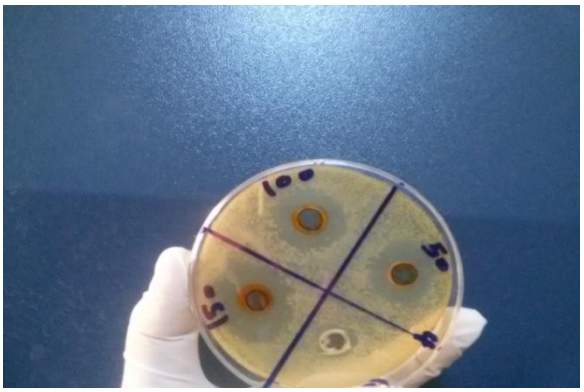
**جدول (4-4) اقطارمناطق التثبيط للمستخلص الكحولي لنبات الزنجبيل ضد الجرثومة السبحية *S.mutans*.**

| التراكيز(ملغم\مل) | قطرمناطق التثبيط(ملم) |
|---|---|
| 150 | 23 |
| 100 | 19 |
| 50 | 15.3 |
| 25 | 13.3 |
| 12.5 | 7.6 |
| Control- | 1.3 |
| Control+ | 17 |
| قيمةL.S.D (0.05) | 1.7924 |

اعطت التراكيز ( 150، 100، 50 ، 25، 12.5) مناطق تثبيط (23 ، 19، 15.3، 13.3، 7.6) على التتالي ممايدل على ان الفعالية التثبيطية للمستخلص الكحولي تزداد بزيادة التركيزإذ كلما زاد التركيز زادت نسبة المواد الفعالة فيه ومن ثمَ فأن قابلية المستخلص على تثبيط او ابادة الجراثيم تكون اكبر وهذا يتفق مع (Al-Bayati and Sulaiman,2008;Eid *et.al*.,1990) في حين يخالف ماذكره الباحث(Almas,2001) الذي لم يجد تأثيرا للمستخلص الكحولي لنبات الزنجبيل على البكتريا الموجبة لصبغة غرام والذي عزى ذلك الى أنَ المستخلص فقد فعاليته بسبب استخدامه بعد شهر من تحضيره.

ان تأثير المستخلص قد يعود سببه الى التركيب البنائي لجدار البكتريا الموجبة لصبغة غرام اذ تفتقر الى طبقة من الاغشية الخارجية تجعل نفاذية المواد الى داخل الخلية اكبر، ومن خلال النتائج يعد النبات فعالا ضد البكتريا الموجبة لصبغة غرام وهذا مايتفق مع الباحثين (Cowan,1999 ) و(Tyler *etal*.,1988) وذلك بتثبيط تكوين جدارخلية الكائن المجهري اوتثبيط تخليق بعض البروتينات الاساسية فيه وتكوين معقدات مع الجدار الخلوي تعيق انتظام

النفاذية وتثبيط بعض الانزيمات ذات الدور الايضي المهم في النمو والتكاثر وتمزيق الاغشية الخلوية اوتغيير وظيفتها.



صورة (4-5) تثبيط المستخلص الكحولي لنبات الزنجبيل ضد بكتريا *S.mutans*

## 4-5-2طريقة صفائح المعايرة الدقيقة Microtiter plate

استخدمت مجموعة التراكيز(100,50,25,12.5,6.25) في اختبارMIC بطريقة Microtiter plateواوضح الاختبار أنَ التركيز المثبط الادنى كان عند التركيز (12.5) إذ لم يلاحظ نمو للجرثومة السبحية *S.mutans*.(جدول 4-5)

**جدول (4-5) التركيز المثبط الادنى بطريقة Microtiter plate**

| التركيز | النمو |
|---|---|
| 100 | - |
| 50 | - |
| 25 | - |
| 12.5 | - |
| 6.25 | + |
| Control+ | - |
| Control- | + |

من المعروف أنَ نوعية المذيب تؤثر على درجة الفعالية التثبيطية للمستخلص وبما أنَ الميثانول مذيب عضوي لذلك فهومذيب كفؤ في اذابة المركبات العضوية الموجودة في النبات الطبي ومن ثمَ فأنه يركز المواد الفعالة المطلوبة لأبادة الجراثيم (Ekwenye and Elegalam,2005)،من المواد الفعالة في نبات الزنجبيل Zingerone،gingerols،shogaoles، volite sesquiterpenes،monoterpenoidsالتي تعد هي المسؤولة عن ابادة الجراثيم (Bensky and Gamble,1993)، إذ إنَgingerols وهو احد المركبات الفينولية يعمل على خفض الشد السطحي لجدار الخلية البكتيرية لذلك فأن gingerols وبقية المركبات الفينولية الاخرى تمزق الجدار الخارجي للخلية ونتيجة لذلك يحدث فقدان الخاصية التنافذية للغشاء وبالتالي فقدان السيطرة على التنافذ وتسرب محتويات السايتوبلازم بما في ذلك الاحماض النووية ونواتج الايض والايونات ، فضلا عن أنَ التربينات مسؤولة عن تمزيق الغشاء البلازمي وتلف محتويات الخلية وكذلك تأثير حامض الخليك في خفض الاس الهيدروجيني داخل الخلية مما يسبب تحلل البروتينات وفقدان الطاقة وترسيب محتويات الخلية (Oonmetta-Aree,2006)وهذا يتفق مع ماتوصل اليه (Masniari,2011) الذي اشار الى امتلاك المستخلص الكحولي لنبات الزنجبيل فعالية عالية في تثبيط البكتريا الموجبة لصبغة غرام.

## 4-6اختبارتكوين الغشاء الحيوي بطريقة Congored agar(CRA)

اختبرت قدرة العزلات البكتيرية على تكوين الغشاء الحيوي بأستخدام طريقة CRA، حيث اعطت العزلات نتائج ايجابية بنسبة (72.2)% في تكوين الغشاء الحيوي عن طريق تكوين مستعمرات سوداء اللون ذات مظهر كريستالي ، اما العزلات التي اعطت نتائج متوسطة كانت بنسبة (11.1)% حيث بدت العزلات ذات لون بني داكن بينما اعطت (16.6)%من العزلات نتائج سلبية (الجدول 4-6) وهذا مطابق لما ذكره العديد من الباحثين من أنَعزلات الجراثيم المكونة للاغشية الحيوية تبدو بمظهر اسود جاف اوبراق فيما وصفت الجراثيم غير المكونة للاغشية الحيوية بلون وردي او احمربأستخدام الطريقة نفسها .

إنَ التغير في اللون بطريقة اكار احمر الكونغو يحدث في المراحل الاخيرة من عملية الحضن نتيجة وجود نواتج ايضية ثانوية وإنَ استخدام السكروز او الكلوكوز بنسبة 5% اعطى نتائج متشابهة بوصفه عاملا اساسيا لتحديد انتاج السكريات الخارجية بأستخدام طريقة احمر الكونغو(Oliveria and Cunha,2010).

**جدول (4-6) قدرة العزلات البكتيرية على تكوين الغشاء الحيوي**

| ت | العزلات | النتيجة |
|---|---|---|
| 1 | 2 | I |
| 2 | 3 | W |
| 3 | 4 | S |
| 4 | 8 | W |
| 5 | 9 | S |
| 6 | 15 | S |
| 7 | 17 | S |
| 8 | 18 | S |
| 9 | 19 | S |
| 10 | 22 | S |
| 11 | 34 | S |
| 12 | 35 | S |
| 13 | 38 | W |
| 14 | 41 | S |
| 15 | 67 | I |
| 16 | 71 | S |
| 17 | 26 | S |
| 18 | 44 | S |

S : strong ، weakW : ، I : Intermediate

واشار Sharavari and Chitra,(2012) الى أنَ طريقة CRA هي الاسرع والاسهل من بين الطرق الاخرى المستخدمة في الكشف عن الغشاء الحيوي حيث يمكن من خلال هذه الطريقة الكشف عن الاحياء المجهرية التي تمتلك القدرة على تكوين الغشاء الحيوي، ويتكون الغشاء الحيوي في هذه الطريقة من خلال تفاعل احمر الكونغو مع السكريات مكونة معقدات ملونة .(Hassan *etal*.,2011)

شكل (4-6)قدرة بكتريا *S.mutans*على تكوين الغشاء الحيوي بطريقةCRA

## 4-7اختبارتأثير الزنجبيل على تكوين الغشاء الحيوي(Biofilm)

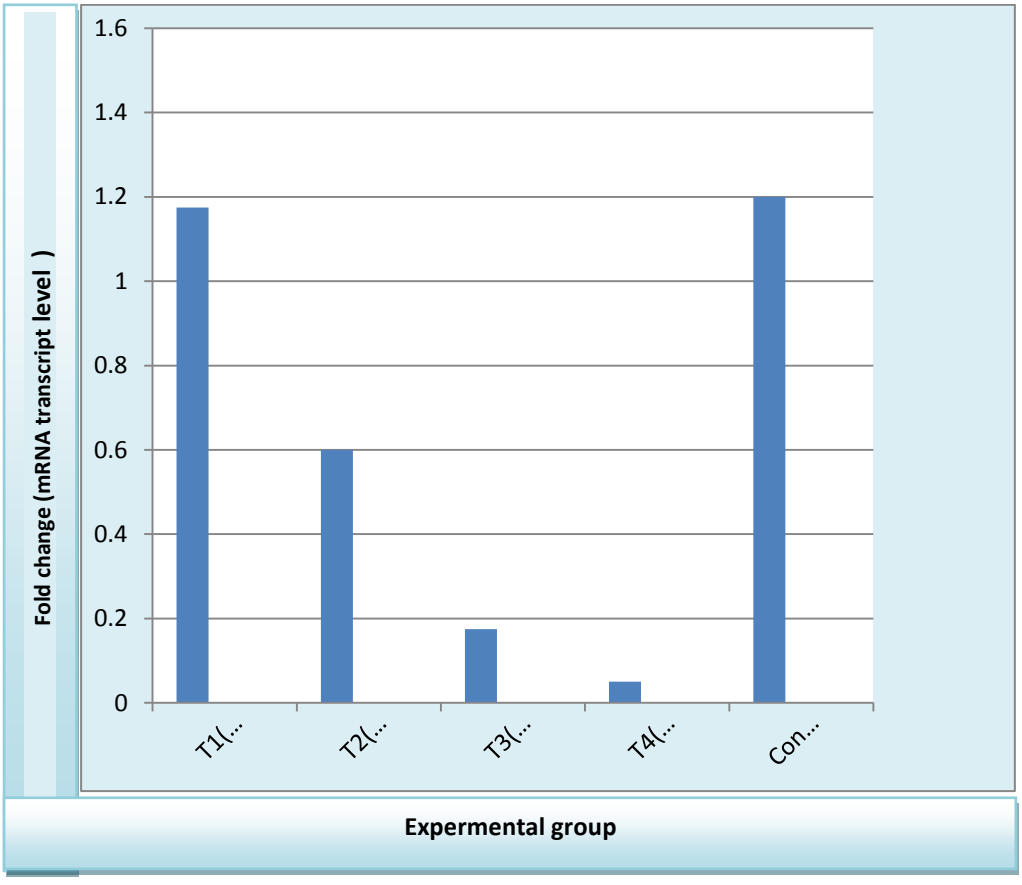
من خلال النتائج يتضح أنَ مستخلص الزنجبيل اظهر فعلا مضادا للتسوس من خلال تثبيط تكوين الغشاء الحيوي بطريقة تعتمد على التراكيز،فالتركيز150 اعطى اعلى معدل تثبيط وتلاه التركيز 100 ومن ثم باقي التراكيز(25,50) على التوالي مما يدل على أنَ المواد الفعالة تزداد بزيادة التركيز وهذا يتفق مع (Al-bayati and Sulaiman,2008).

جدول(4-7) نتائج التعبير الجيني لجين *gtfB* لبكتريا *S.mutans* بطريقة(Livak (CT$^{-\Delta\Delta}$2

| Mean | Fold change ($2^{-\Delta\Delta}$CT) | ΔΔCT | ΔCT control | ΔCT Test | CT 16SrRNA | CT gtfB | التراكيز (mg/ml) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1.00±0.21 | 1.45 | -0.54 | -0.93 | -1.47 | 33.31 | 31.84 | (12.5)T1 |
| | 1.16 | -0.21 | -0.93 | -1.14 | 33.77 | 32.63 | (12.5)T1 |
| | 0.55 | 0.87 | -0.93 | -0.06 | 33.85 | 33.79 | (12.5)T1 |
| | 0.94 | 0.09 | -0.93 | -0.84 | 33.98 | 33.14 | (12.5)T1 |
| | 0.90 | 0.15 | -0.93 | -0.78 | 33.29 | 32.51 | (12.5)T1 |
| 0.48±0.23 | 1.09 | -0.13 | -0.93 | -1.06 | 34.89 | 33.83 | (25)T2 |
| | 0.23 | 2.13 | -0.93 | 1.20 | 33.02 | 34.22 | (25)T2 |
| | 0.52 | 0.95 | -0.93 | 0.02 | 34.22 | 34.24 | (25)T2 |
| | 0.25 | 2.01 | -0.93 | 1.08 | 33.46 | 34.54 | (25)T2 |
| | 0.31 | 1.71 | -0.93 | 0.78 | 33.55 | 34.33 | (25)T2 |
| 0.118±0.01 | 0.11 | 3.13 | -0.93 | 2.2 | 33.58 | 35.78 | (50)T3 |
| | 0.11 | 3.25 | -0.93 | 2.32 | 33.59 | 35.91 | (50)T3 |
| | 0.08 | 3.58 | -0.93 | 2.65 | 33.863 | 36.51 | (50)T3 |
| | 0.14 | 2.79 | -0.93 | 1.86 | 33.48 | 35.34 | (50)T3 |
| | 0.15 | 2.75 | -0.93 | 1.82 | 33.63 | 35.45 | (50)T3 |
| 0.062±0.00 | 0.06 | 4.01 | -0.93 | 3.08 | 33.59 | 36.67 | (100)T4 |
| 9 | 0.09 | 3.4 | -0.93 | 2.47 | 34.14 | 36.61 | (100)T4 |
| | 0.07 | 3.93 | -0.93 | 3.00 | 33.51 | 36.51 | (100)T4 |
| | 0.06 | 4.17 | -0.93 | 3.24 | 34.20 | 37.44 | (100)T4 |
| | 0.03 | 4.92 | -0.93 | 3.99 | 33.26 | 37.25 | (100)T4 |
| 1.132±0.30 | 1.14 | -0.19 | -0.93 | -1.12 | 34.16 | 33.04 | Control |
| | O.58 | 0.78 | -0.93 | -0.15 | 33.34 | 33.19 | Control |
| | 2.04 | -1.03 | -0.93 | -1.96 | 34.74 | 32.78 | Control |
| | 0.39 | 1.37 | -0.93 | 0.44 | 33.44 | 33.88 | Control |
| | 1.51 | -0.59 | -0.93 | -1.52 | 34.55 | 33.03 | control |

اظهرت نتائج التعبير الجيني للجين *gtfB* في المعاملة الثانية T2(25mg/ml) انخفاضا بمقدار(0.48±0.238117618)وانخفضت المعاملة الثالثةT3(50mg/ml) بمقدار (0.118±0.012409674) اما المعاملة الرابعة T4(100mg/ml) انخفضت بمقدار (0.062±0.00969536) بالمقارنة مع عينة السيطرة التي كان مستوى التعبير الجيني للجين *gtfB* مرتفع بمقدار(1.132±0.301884084) ، ونلاحظ ان التعبير الجيني للجين *gtfB* في المعاملة الاولى T1 لايدل على وجود فرق معنوي بالمقارنة مع مستوى التعبير الجيني لعينة السيطرة.

يظهر الشكل البياني (4-8) للتعبير الجيني للجين *gtfB* وجود فرق معنوي بين معاملات التجربة (T1 ,T2 ,T3 ,T4) ومجموعة السيطرة عند مستوى احتمال P≤0.05 في حين اشار الى عدم وجود فرق معنوي بين المعاملة الاولى T1 ومجموعة السيطرة عند مستوى احتمال P≤0.05.




**شكل (4-8) التعبير الجيني النسبي للجين *gtfB* في معاملات التجربة ومجموعة السيطرة**

اشار Liu C. *etal*.,(2011) الى أنَ التعبير الجيني ينخفض بوجود مستخلص الزنجبيل مثل جين *gtfB*و*gtfC*التي تحفز تكوين الكلوكان غير الذائب في الماء من خلال تشفير انزيمات GTFs، وتعد هذه الانزيمات المسؤولة عن تحويل السكروز الى الكلوكان اللزج الذي يحفز التصاق بكتريا*S.mutans* على سطوح الاسنان ، واشار Prabu GR.*etal*.,(2006) الى أنَ الفلافونات خاصة هي التي تقوم بالدور التثبيطي ضد انزيمات GTFs .

إنَ زيادة عملية التسوس ترتبط مباشرة مع زيادة كميات الكلوكان غير الذائب وعملية تثبيط تكوينه تؤدي الى تغيير في مادة عديد السكريد الخارجي التي تعد المادة الاساس للغشاء الحيوي ومن ثمَ يؤدي ذلك الى التصاق غير فعال (Hassan *etal*.,2012) ، إذ إنَ انخفاض الكلوكان غير الذائب يؤدي الى انخفاض في تكوين الغشاء الحيوي الذي سوف يؤثر على امراضية البكتريا من خلال عرقلة عملية الالتصاق بوساطة التأثير على مواقع الارتباط الموجودةعلى سطح الخلية وعلى التفاعلات الكارهة للماء Hydrophobocity بين الخلية البكتيرية والسطح التي تلعب دورا رئيسيا في حدوث هذه العملية (Xu X.*etal*,2011).

اشارت الدراسات السابقة الى أنَ للزنجبيل تأثيرا على جينات اخرى مثل جين *ComDE*الذي يعد جزءا من اكتمال النصاب الحسيquorum sensing لبكتريا *S.mutans*التي تؤدي دورا مهما في تكوين الغشاء الحيوي والتعبير المنخفض لهذا الجين سوف يخفض من كفاءة نظام الاتصالات الداخلية التي تستخدمها البكتريا لتغيير تعبيرها الجيني في حالات استثنائية ،وكذلك جين *brpA* الذي يلعب دورا حاسما في هيكلة الغشاء الحيوي وجين *relA* المعروف بدوره في الاجهاد التأكسدي واليات التحمل الحامضي حيث يؤثر الزنجبيل على قدرة البكتريا على تحمل القيم الحامضية المنخفضة من خلال تأثيره على مضخة البروتونات ATPase-F ، ومن المعروف ان *S.mutans* بكتريا متحملة للحامض وتتمكن من القيام بالتحلل السكري وباقي فعالياتها الحيوية في قيم الاس الهيدروجيني المنخفضة للغاية وهذا يعود الى ان البكتريا قادرة على الحفاظ على التوازن الهيدروجيني عبر غشاء الخلية الذي يحافظ على قاعدية السايتوبلازم ويعزى هذا التحمل الى مضخة البروتونات ATPase-F التي تحافظ على درجة الحموضة المتدرجة عبر الغشاء ومن ثمَ فأن الانخفاض في اداء ATPase-F تساهم في رفع الحموضة مما ينتج عنه انخفاض في التكيف الحامضي ، وحموضة السايتوبلازم تؤدي الى اعاقة عمل الانزيمات المشاركة في العمليات الفسيولوجية مثل التحلل السكري وانتاج عديد السكريد الداخلي

والخارجي وغيرها مما ينتج عنه تأثير فعلي على عملية تكوين الحامض ومن ثمَ على بقاء البكتريا (Hassan *etal*.,2014).

# الاستنتاجات و التوصيات

# Conclusions and Recommendations

## الاستنتاجات

1.إنَ بكتريا *S.mutans* هي الاكثر شيوعا بوصفها مسببا لألتهابات الفم وماحول الاسنان .

2.للزنجبيل تأثير تثبيطي على بكتريا *S.mutans* المعزولة من منطقة الفم وماحول الاسنان إذ يؤدي الى تثبيط تكوين الغشاء الحيوي لها.

3.للمستخلص الكحولي لنبات الزنجبيل تأثير مثبط لجين *gtfB* نتيجة انخفاض مستوى التعبير الجيني لذلك الجين بأستخدام تقنية RT-PCR.

## التوصيات

1.اجراء دراسات واسعة حول الية التأثير التثبيطي للزنجبيل على مسببات بكتيرية أخرى معزولة من مناطق مختلفة من الجسم .

2.اجراء دراسات داخل الجسم الحي على الحيوانات المختبرية بعد اصابتها بأنواع بكتيرية معينة ومحاولة معالجتها بأستخدام الزنجبيل.

3.امكانية استخدام الزنجبيل كعلاج دوائي من خلال دمجه مع المضادات الحيوية وغسولات الفم ومعاجين الاسنان في حالات امراض الفم وماحول الاسنان لكونه ذا طبيعة غير سامة تجعل منه اكثر امانا من استخدام الادوية والعقاقير التي قد تمتلك تأثيرا سلبيا على صحة الفرد.

# المصادر

# References

# المصادر References

## المصادر العربية

**الامام ، محمد محمد طاهر(2007)**.تصميم وتحليل التجارب ،دار المريخ ،السعودية.

**الدعمي، علاء عبد الحسين كريم(2014)**.تنقية وتوصيف حامض الكوجيك المنتج من عزلتين محليتين (*Aspergillus flavus* و *Aspergillus fumigates*).اطروحة دكتوراه، كلية التربية، جامعة القادسية.

## المصادر الاجنبية

**Abdullah**,S.;Abidin,S.A.Z;Murad,N.A.;Makbol,S.;Wan Njah,W.Z. and Yusof,V.A.N. (2010). extract(*Zingiber officinalle* )triggers apoptosis and GO/G1 cells arrest in HCT116 and HT29 colon cancer cell lines.*AJBR*,4(4):134-142.

**Adeshina**,G.O.;Jibo,S.;Agu,V.E.andEhinmidu,J.O.(2011).Antibacterial activity of fresh juices of *Allium cepa* and *Zingiber officinale* against multidrug resistant bacteria.*Int.J.Pharma.Bio.Science*,2:289-295.

**Afzal**,M.;Al-Hadidi,D.;Menon,M.;Pesek,J.;Dhami,M.S.(2001).Ginger: an ethnomedical,chemical and pharmacological reiew.*Drug Metab.Drug intract*,18:159-190.

**Al-bayati**,F.A. and Sulaiman,K.D.(2008).*In vitro* antimicrobial activity of salvadora persical against some isolated oral pathogens in Iraq.*Turk.J.Bi* 32:57-62.

**Ali**,M.(1998).Text Book Of Pharmacognocy.2nd.Edn.CBS publishers and distributors:258-262.

**Almas**,K.(2001).The antimicrobial effect of seven different types of Asian chewing sticks .*Odonto-Stomatologie Tropicale* 96:17-20.

**Ansari**,N.M.;Bhandari,U.andPillai,K.K.(2006).Ethanolic *Zingiber officinale* R.extract pretreatment alleviates isoproterenol induced oxidative mycocardial nicrosis in rats,Indian *J.Exp..Biol*.,44:892-897.

**Anyanwu** CU.(2011).Assessment of the *in vitro* antibacterial activity of Honey on some common pathogens.*J.Res.Bio.*,2:116-121.

**Aoki**,H.;Shiroza,T.;Hayakawa,M.;Sato,S.andKuramitsu,H.K.(1986).Clon ing of a *Streptococcus mutans* glucosyltransferase gene coding for insoluble glucan synthesis.*Infect Immun*.53,587-594.

**Azu**,N.C.;Onyeagba,R.A.;Nworie,O.andKalo,J.(2007).Antibacterial activity of *Allium cepa* (onions) and *Zingiber officinale*(ginger) on *Staphylococcus aureus* and *pseudomonas aeroginosa* isolated from high vaginal swab .*Int.J.Tropical Med*.,3:234-237.

**Badreldin**,A.H.;Blunden;Tanira,M.O.andNemmar,A.(2008).Some phytochemical,pharmacological and toxicological properties of ginger(*Zingiber officinale* Roscoe).Areview of recent research.*Food Chem.Toxicol.*,46:409-420.

**Baljoon**,M.(2003).Dental care habits,oral hygiene and gingival health in sample from Saudi Arabian population.M.Sc.Thesis,College of Dentistry,Riyadh University.

**Baron**,E.J.;Peterson,L.R. and Finegold,S.M.(1994).Bailey and Scott s Diagnostic Microbiology .9th .ed.The C.V.Mosby company, USA.

**Bensky**,D.and Gamble,A.(1993).Chinese Herbal Medicine Materica Medica.Eastland Press Inc,Seattle.

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

**Bhatavadeckar**,N.B.and Williams,R.C.(2009).Modulation of the host inflammatory response in periodontal disease management.

**Bidault**,P.;Chandad,F.and Grenier,D.(2007).Risk of bacterial resistance associated with systemic antibiotic theraby in periodontology .*J.Can.Dent.Assoc*.73:721-5.

**Blackwell**,K.A.;Riasz,L.G.and Pibeam,C.C.(2010).Prostaglandins in bone :bad cop,good cop.Trends .*Endocrinol.Metab*.21:294-301.

**Bowen**,W.H.(2002).Do we need to be concemed about dental caries in the coming millennium?Crit.Rev.*Oral,Biol.Med*.,13:126-131.

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

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

**Cafiero**,C.and Matarasso,S.(2013).Predictive ,preventive,prsonalised and participatory,periodontology the 5Ps age has already starte.The *EPMA J*.4:16.

**Chandra**,J.; Kuhn,D.M.; Mukerjee,P.K.; Hoyer,L.L.; McCormick,T.and Ghannom,M.A.(2001) Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans* : development ,architecture ,and drug resistance.*J.Bacteciol*.83:5385-5394.

**Chessbrough**,M.(2000).District Laboratory Practice in Tropical Countries .Part 2.Cambridge university press,United kingdom,222.

**Christenfen**,G.D.;Simpson,W.A.;Younger,J.A.;Baddour,L.M.;Barrecc,F. F.and Melton,D.M.(1985).Adherence of coagulase negative Staphylococci to plastic tissue culture plate:quantitative model for the adherence of Staphylococci to medical dvices.J.Clin.Microbiol.22:996-1006.

**Colby**,S.M.and Russell,R.R.B.(1997).Sugar metabolism by mutans streptococci.*J.Appl.Microbiol*.83:80-85.

**Cowan**,A.S.(1985).Cowan and Steel Manual For Identification Of Medical Bacteria .2nd .ed.London ,Cambridge university Press.UK.

**Cowan**,M.M.(1999).Plant products as antimicrobial agents .Clin.microbiol.Rev.,12(4):564-582.

**Dallawala**, A.I. ; Chauhanm, H. C. ; Chandelm, B. S. ; Ranaware, P. ; Patel, S. S. ;Khushboo, S. ; Ratod, P. H.; Shah, N. M. and Kher, H. N. (2010). Assessment of *Escherichia coli* isolates for *in virto* biofilm production. *Vet. World*., **3**(8), 364-366.

**Darling**,A.M.(2007).Subgingival microbiological difference between periodontally healthy and diseased sites.*Int. J. of periodont. and restor. dentisitry*,4:27.

**Darveau**,R.P.(2010).Periodontitis : a polymicrobial disruption of host homeostasis .*Nat.Rev.Microbiol*.,8:481-4.

**DeBoer**,H.J.; Kool,A.; Broberg,W.S.; Mziray,I.; Hedberg and Levenfors,J.J.(2005).Antifungl activity of some herbal remedies from Tanzanias.*J.Ethopharmacol*.,96:461-469.

**Desoet**,J.;Nyvad,B.;Kilin,M.(2000).Strain related acid production by oral Streptococci.*Caries Res*.34:486-490.

**Devulapaiie**,K.S.;Goodman,S.D.;Ann,H.Q.andMooser,G.(1997).Knowle dge-based model of a glucosyltransferase from the oral bacterial group of mutans Streptococci.*J.protein science*.6:2489-2493.

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

**Dige**,I.;Nyengaard,J.R.;Kilian,M.and Nyvad,B.(2009).Application of stereological principles for quantification of bacteria in intact dental biofilms.*oral microbial.Immunol*.24:69-75.

**Duailibe**,S.A de.C.;Goncalves,A.G.and Ahid,F.J.M.(2007).Effect of a *propolis* extract on *Streptococcus mutans* counts *in vivo* .*J.Appl oral Scin*.15(5):3-420.

**Dye**,B.A. (2012). Global periodontal disease epidemiology.*J.Periodontal*.2000,58(1):10-25.

**Eid**,M.A;Selim,H.A.and Al-Shammery,A.R.(1990).The relationship between chewing sticks(Miswak) and periodontal health.Part.I.Review of the literature and profile of the subjects.*Quintessence.Int*. 21:013-917.

**Ekwenye**,U.N.and Elegalam,N.N.(2005).Antibacteria activity of ginger (*Zingiber officinale Roscoe*) and garlic(*Allium sativum* L.)extracts on *Escherichia coli* and *Salmonella typhi .J. of molec. and med. and advance. Scien*. ,1(4):411-416.

**ElSharaky**,A.S.;Newairy,A.A,Kamel,M.A.andEweda,S.M.(2009).Protect ive effect of ginger extract against bromobenzene-induced hepatotoxicity in male rats.*Food Chem.Toxicol*.47(7):1584-1590.

**Essam**, F.A.;Hashim M.Z.and Faris A.(2014).Isolation and identification of Streptococcus mutans (H5) produced glucosyltransferase and cell-associated glucosyltransferase isolated from dental caries.*Int.J.Microbiol.App.Sci*.,3(6):850-864.

**Estrela**,A.B. and Abraham,W.R.(2010).Combining biofilm controlling compounds and antibiotic as a promising new way to control biofilm infections.Pharm.,3,1374-1393.

**Facklam**,R.R.(1977).Physiological differentiation of viridians Streptococci.*J.Clin.Microbiol*.5:184-201.

**Fawzi**,E.M.;Khalil,A.A.and Afifi,A.F.(2009).Antifungal effect of some plant extract on *Alternaria alternate* and *Fusarium oxysporum Afric. J. of Biotechnol*.,8(11).

**Fingold**,S.and Baron ,E.(1986).Method Of Identification Of Etiologic Agent Of Infection Disease.In:Bailey and Scotts Diagnostic Microbiology .7th edt.C.V.Mosby,C.St.Louis.P:382.

**Forssten**,S.D.;Bjoroklund,M.andOuwehand,A.C.(2010).*Streptococcus mutans*,caries and simulation models nutrient.2,290-298.

**Fosster**,S.(2000).Ginger your food is your medicine.Steven Foster group.

**Freeman**,J.;Falkiner,F.R.andKeane,C.T.(1989).New method for detecting slime production by coagulase negative *Staphylococci*.*J.Clin.Pathol*.42:872-4.

**Ghosh**,A.K.;Banrejee,S.;Mullick,H.I.and Banerjee,J.(2011).*Zingiber officinale* :a natural gold ,*Int. j. of pharma and bio scien.* ,2,283-294.

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

**Graves**,D.T.;Fine,D.;Teng,Y.T.;Van Dyke,T.E.and Hajishengallis ,G.(2008).The use of rodent models to investigate host-bacteria interactions related to periodontal diseases .*J.Clin.Periodontol*.,35:89-105.

**Gronross**,L.(2000).Quantitive and Qualtitive characterization of Mutans Streptococci in saliva and in the dentition.Academic dissertation,Faculty of medicine of the Univercity of Helsinki for Puplic examination in the main Auditorium of Institue of Dentistry.

**Gupta** and Ravishankar,S.(2005).Acomparison of the antimicrobial activity of garlic,ginger.carrot,and turmeric pastes against *Escherichia coli* O157:H7 in laboratory buffer and ground beef.Foodborne pathogens and disease,2(4),330-40.

**Guthof**,O.(1970).(cited in Fridrich ,J.(1981).The genus Streptococcus and dental disease. In:"prokaryotes Hand book of habitats ,Isolation And Identification Of Bacteria ".Mortimer,P.S.ed.,Berlin,NewYork.1598-1613.

**Han**,J.S.;Jang,I.Y.;Ryu,H.S. and Kim,W.Y.(2010).Similarity with the *Yersinia pestis* plasmid pCRY and integrative conjugative elements.*J.Korean.Soc.Appl.Biol.Chem*.401-406.

**Hanada**,N. and Kuramitsu,H.K.(1988).Isolation and characterization of the *Streptococcus mutans gtfC* gene,coding for synthesis of both soluble and insoluble glucans.*Infect.Immun*.56,1999-2005.

**Hanada**,N.and Kuramitsu,H.K.(1989).Isolation and characterization of *Streptococcus mutans gtfD* gene ,coding for primer-dependent soluble glucan synthesis.*Infect*.*Immun*.53,2079-2085.

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

**Hanning**,C.and Hanning,M.(2009).The oral cavity akey system to understand substratum-dependent bioadhesion on solid surfaces in man.*Clinical oral investigations*.13:123-39.

**Hassan**,A.;Usman,J.;Kaleem,F.;Omair,M.;Khalid,A.andIqbal,M.(2011). Detection and antibiotic susceptibility pattem of biofilm producing Gram positive and Gram negative bacteria isolated from a tertiary care hospital of Pakistan.*Malaysian j. of microbiol*.7(1):57-60.

**Hassan**,S.;Danishuddin,M.;Adil,M.;Singh,K.;Verma,P.K.andKhan,A.U. (2012).Efficacy of E.officinalis on the cariogenic properties of *Streptococcus mutans* :a noval and altimative appoarch to suppress Quorum-sensing mechanism.*PLoS* ,7:e40319.

**Hassan**,S.;Singh,K.;Danishuddin,M.;Verma,P.K.andKhan,A.U.(2014).In hibition of major virulence pathways of *Streptococcus mutans* by Quercitrin and Deoxynojirmycin :A Synergistic appoarch of infection control.*PLoS* ,9:e91736.

**Holt**,J.G.;Keieg,N.R.;Sneath,P.H.A.;Staley,J.T.andWilliams,S.T.(1994). Bergey's Manual Of Determinative Bacteriology .9th ed.William and Wilkins :Balmore,Maryland.20 and 527-558.

**Islam** T.H;Azad A.H.B.;Akter S.and Datta S.(2012) .Antimicrobial activity of medicinal plant on *Streptococcus mutans* acausing agent of dental caries.*J.Eng.Res.Tech*.,1:121:126.

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

**Jennifer**,G.H.(2003)Forensic dentistry:dental indicators for identification.Master of Arts in the Department of Geography and Anthropology.University of Memphis.

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

**Jordan**,R.C.(2004).Diagnosis of periodontal manifestations of systemic diseases .Periodontol 2000 .34:29-217.

**Kalesaraj**,R.(1975).Screening of some indigenous plant for anthelminitic action against human *Ascaris lambricoides*.Part Ii Indian *J.Physiol.Pharmacol*.,19:47-49.

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

**Kato**,A.;Higuchi,Y.;Goto,H.;Kizu,H.;Okamoto,T.;Asano,N.;Hollinshead, J.;Nash,R.J.;Adachi,I.(2006).Inhibitory effect of *Zingiber officinale* Roscoe derived components on aldosreductase activity *in vitro* and *vivo* .*J.Agric.Food chem*.54:6640-6644.

**Kayaoglu**,G. and Qrstavik,D.(2004).Virulence factores of *Entrococcus faecalis*. Relationship to Endodontic disease.*Rev.Oral.Biol.Med*.,15(5):308-342.

**Kenneth**,j.;Ryan,C.;Ray,G.(2004).Sherrismedical microbiology[M].New York:McGraw Hill Medical Pub division,4:9-141.

**Kiuchi**,F.;Iwakami,S.;Shibuya,M.;Hanaoka,F.andSankawa,U.(1990).Pros taglandin and leukotriene biosynthesis by gingerols and diatryl hepatonoids.*Chem.Pharm.Bull*,40:387.

**Kolenbrander**,P.E.;Palmer,R.J.;Rickard,A.H.,Jakubovics,N.S.,Chalmers, N.I. and Diaz ,P.I.(2006)—Baterial In-teractions and successions during plaque development ,ll *periodontology*,42(1): 47-79.

**Koo**,H.,Duarte,S.;Murata,R.;Scott-Anne,K.;Gregori,S.,Watson,J.;Singh,A ;Vorsa,N.(2010).Infuence carenberry proanthocyanidins on formation of biofilm by *streptococcus mutans* on saliva-coated apatiticsurface and on dental caries development *in vivo* .*Caries Res*.44:116-126.

**Kumar**,G.;Kathie,L.;Rao,K.V.B.(2011).Areview on pharmacological and phytochemical properties of *Zingiber officinale* Roscoe (*Zingiberaceae*),*J. of pharma. Res.*,4(9):2963-2966.

**Lennette**,E.H.;Balows,A.;Hausler,J.R.and Shadomy,H.J.(1985).Manual Of Clinical Microbiology 4th. ed.Washington,D.C.

**Levinson**,W.and Jawetz,E.(2000).Medical Microbiology And Immunology Examination And Board Review.Appleton and lange U.S.A.

**Li**,X.J.;Zhong,B.;Xu,H.X.and Wang,X.P.(2010).Comparative effect of maltitol chewing gums on reducing plaque.Hua.Xi.Kou.Qiang.Yi.Xue.ZaZhi.,28:502-504.

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

**Linke**,H.A.B.(1977).New medium for isolation of Streptococci differemtiation from other oral Streptococci.*J. of Clin. microbiol*.P.604-609.

**Liu**,C.;Worthington,R.J.;Melander,C.and Wu,H.(2011).A new small molecule specifically inhibit the cariogenic bacterium *Streptococcus mutans* in multispecies biofilms.Antimicrob agents chemother,55:87-2679.

Livak,K.J. and Schmittegen,T.D.(2001)Analysis of relative gene expression data using real time quantification PCR and the $2^{\wedge-ct}$ method.Mrthods.25(4):402-408.

**Loesche**,W.J.(1986).Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay.*Microbiol.Rev*.50,353-380.

**Loesche**,W.J.(2000).Medical Microbiology Of Dental Decay And The Periodontal Diseases .4th ed.The Univercity of Taxas .Medical branch at Galveston.70:343-380.

**Macfaddin**,J.F.(2000).Biochemical Test For Identification Of Medical Bacteria.3ed.Lippincott Williams and Wilkins.

**Madigan**, M.T. and Martinko, J.M.; Eds.(2006). Brock biology of microorganisms, prentice hall ,Inc. Upper Saddle River,617:618.

**Mahady**,G.B.;Pendland,S.L.;Stoia,A.;Hamill,F.A.;Frabeicant,D.;Dietz,B. M.and Chadwick,L.R.(2005).*In vitro* susceptibility of *Helicobacter pylori* to botanical extracts used traditionary for the treatment of gastrointestinal disordesrs .*Phytoteraby res* .19:988-991.

**Marsh**,D.P. and Martin,.V.M.(2009).Oral Microbiology.St Louis Sydney Toronto,5ed ,46-102.

**Masniari** ,P.(2011).The effect of red ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) extract on the growth of mastitis causing bacterial isolates .Indonesianresearch center for Veterinary Science .

**McGee** and Harold.(2004).On Food And Cooking:The Science And Lore Of Kitchen ,2nd.Edn.,Scribner:425-426.

**Mukasa**,H.;Shimamura,A.and Tsumori,H.(1982).Purification and characterization of basic glucosyltransferase from *Streptococcus mutans* serotype C.Biochemica.Biophysica.Acto.719:81-89.

**Mustafa**,T.;Srivastava,K.C. and Jensen,K.B.(1993).Drug development report:Pharmacology of ginger,*Zingiber officinale.J.Drug Dev*.,6(24).

**Nanjundaiah**,S.M.;Annaiah,H.N.M.andDharmesh,S.M.(2009).Gastropro tective effect of ginger rhizome(*Zingiber officinale*) extract:Role of gallic acid and Cinnamic acid in $H^+$,$K^+$-ATP ase /*Helicobacter pylori* inhibition and antioxidative mechanism.Ecam.1-13.

**Newman**, M.G.; Takei, H.H. and Caranza, F.A. (2001).Clinical periodontology,9th.ed.;W.B.Saundres company.

**Nisengard**,R.J.and Newman ,M.J.(1994).Oral Microbiology Immunology.2nd;W.B.Saundres company.

**Oliveira**,A.and Gunha,M.L.R.(2010).Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative *Staphylocooci*.BMC *J. of res. notes*,3:260.

**Oonmetta**-**Aree**,J. ;Tomoko, S. ; Piyawan, G. and Griangsak, E. (2006). Antimicrobial properties and action of Galangal(Alpinia Galanga Linn)on *Staphylococcus aureus*.LWT-Food Sci.Technol.,39:1214-1220.

**Paesleme**,A.F.;Dalico,R.;Tabchoury,C.P.;DelBelCury,A.A.;Rosalen,P.L. and Cury,J.A.(2004).In situ effect of frequent sucrose exposure on enamel demineralization and on plaque composition after APF application and F dentifrice use.*J.Dent.Res*.13:195-216.

**Park**,K.M.;You,J.S.;Lee,H.Y.;Baek,N.I.;Hwang,J.K.andKuwanon,G.(20 03).An antibacterial agent from the root bark of *Morus alba* against oral pathogens.*J.Ethnopharmacol*.84:181-185.

**Perez**,C.;Pauli,M.and Bazerque,P.(1990).An antibiotic assay by the agar-well diffusion method .Acta Biologiae et Medicine Experimentalis ,15:113-115.

**Pihlstrom**,B.L.;Michalowics, B.S.and Johnson,N.W.(2005).Periodontal diseases.*Lancet*.366:1809-1820.

**Prabu**,G.R.;Gnanamani,A.;Sadulla,S.(2006).Guaijaverin-a plant flavonoid as potential antiplaque agent against *Streptococcus mutans*.*J.Appl Microbiol*.101:487-495.

**Quirynen**,M.;Gizani,S.;Mongardini,C.;Delclerck,D; Vinckier,F.and Van,S.D.(1999).The effect of periodontal therapy on thenumber of cariogenic bacteria in different inter oral niches.*J.Clin.Periodontol*.26:322-327 .

**Rajiv**,S.;Santosh,S.and Sugandha.(2013).A dental microbial infection.*J. of Scien.* Ip:212.126.123.202.

**Roback**,J.;Winder,C.K. and Grygl-ewski,R.J.(2004).Bioactivity of flavonoides.Cir.,93(2):170-177.

**Roberts**,A.P.;Cheah,G.;Ready.Pratten,D.J.;Wilson M.and Mullany,P.(2001)—Transfer of TN916-Like elements in Microcosm dental plaque,ll antimicrobial agents chemotherapy,45(10):2943-2946.

**Sadaf**,H.;Mohd,D. and Asad,U.K.(2015).Inhibitory effect of *Zingiber officinale* towards *Streptococcus mutans* virulence and caries development:*in vitro* and *in vivo* studies.*BMC Microbiol*.,15(1).

**Samaranayake,L.**(2006). Essential Microbiology Of Dentisitry.3rd.ed.Churchill.Livingston.Elesevier.

**Samaranayake**,L.P.(2002).Microbiology of Dental Caries .In essential microbiology of dentistry,London :Churchill Livingstone.217-223.

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

**Selvan** A.K.;Singh R.C.and Prabhu T.(2011).Antimicrobial activity of Beeapropolis against clinical strains of streptococcus mutans and Synergism with chlorohexine.*Int. J. of pharma. Stud. and res. E-ISSN* 2229-4619.

**Sharvari**,S.A. and Chitra P.G.(2012).Evaluation of different detection methods of biofilm formation in clinical isolates of *Staphylococci*.*Int.J. of pharm.Bio.Sci*.3(4):724-733.

**Shi**,J.Y.U.; Jianmuls,E.;Josef and Kakudas,Y.O.(2003).Polyfenolics in seeds biochemistry and functionality.*J.Med.Food*,6:291-299.

**Shklair**,I.L.,Keene,H.J.and Cullen.(1974).The distribution of *Streptococcus mutans* on the teeth of tow groups of naval recruits.*Arch*.*Oral Biol*.19:199-202.

**Siqueira**,C.F.;Cabral,D.L.V.;Sobrihno,S.P.(2012).Levels of tannins and flavonoids in medical plants :evaluating bioprospecting strategies.*Com. and Alt. Med*.7:69-74.

**Stewart**,J.;Wood,M.J.;Wood,C.D.and Mims,M.E.(1991).Effects of ginger on motiom sickness susceptibility and gastric function.*Pharnacol*.,42:111.

**Stookey**,G.and Beiswanger,B.(1995).Topical Fluoride Therapy In:Harris,N. and Christen,A.:primary preventive dentistry.4th ed.UK.

**Syed**,S.A.and Loesche,W.J.(1973).Efficiency of various growth media in recovering oral bacteria flora form human dental plaque.*Appl.Microbiol*.26:459-465.

**Tanabe**,M.;Chen,Y.D;Saits,K. and Kano,Y.(1993),Cholesterol biosynthesis inhibitory componet from *Zingiber officinale* Roscoe.*Chem.Pharm.Bull*,41:710.

**Tanzer**,J.M.;Livingston,J.and Thomson,A.M.(2001).Microbiology of primary dental caries in humans.*J.Dent.Educ*.65(10):1028-1037.

**Thomas**,R.Z.;Vandermei,H.C.;Vanderveen,M.H.;Desoet,J.J.;Huysmans, M.C.(2008).Bacterial composition and red fluorescence of plaque in relation to primary and secondary caries next to composite:an in situ study.*Oral Microbiol.Immun*.23:7-13.

**Thomson**,M.;Al-Qattan,K.K.;Al-Sawan,S.M.;Alnaqeeb,M.A.;Khan,I.;Ali ,M.(2002).The use of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) as a potential anti-inflammatory and antithrombotic agent.*Prostaglandins Leukot Essent Fatty acid*,67:475-478.

**Thornton**, M.and Terry,J.(1994).Investigation of the antimicrobial activity of mouth wash.*J.Bio.Edu*.28(Issue3):181-5.

**Todar** ,K.(2008). Microbial world. (Microbe and Dental disease). University of Wosconsin- Madison-p.375-390.

**Tortora**,G.J.;Funke,B.R.and Case,C.L.(1998).Microbiology an introduction.6th.ed.,Bengamin/Cummings Publishing company.

**Tyler**,V.E.;Lynn,R.B.and James,E.R.(1988).Pharmacognosy.9th ed.Lea and Febiger,Philadelpha.

**VanDyke**,T.E.(2007).Control of inflammation and periodontitis.*Periodontol*.,45:158-166.

**Watnick**,P.and Kolter,R.(2000).Biofilm,city of microbes.*J.Bacteriol*.182,2675-2679.

**Weiner**,A.M.(2004).tRNA maturation:RNA polymerization without a nucleicacidtemplate.*Curr*.*Biol*.14(20):8835.

**Whiley**,R.A.and Beighton,D.(1998).Current classification of the oral streptococci.*Oral Microbiol*.*Immunol*.,13:195-21

**White**,B.(2007).Antibacterial activity of ginger against different microorganisms :*Pysician*.,75,1689-1691.

**William** and Wilkins,(2013).Microbiology.A Wolters Kluwer company.3ed,9:84-86.

**Winston**,A.E.;Sindy,B.S.C.and Bahaskar,D.D.S.(1998).Caries prevention in the 21st Century.*JADA*.129:1579-1587.

**Xu**,X.;Zhou,X.D.and Wu,C.D.(2011).The tea catechin epigallocatechin gallate suppresses cariogenic virulence factores of *Streptococcus mutans .Antimicrob agents chemother*,55:36-1229.

# Sammary

The aim of this study is isolation and identification of *Streptococcus mutans* from oral cavity and periodontitis and assessment of antibacterial activity of ginger (*Zinigber officinale*) methanolic extract against *S.mutans* and biofilm formation.

The study included two concepts :

first concepts : isolation and identification of *S.mutans* from infected patients with oral diseases and periodontitis from healthy dispensary of Al-Hur district and didactic hospital dentistary college,Karbala University.Samples were cultured on blood agar depending on their cultured charastaritics,microscopic and biochemical tests of the cells,18 sample of *S.mutans* were isolated.

Second concepts: assessment of antibacterial activity of ginger extract with the following concentrations (12.5,25,50,100,150) mg/ml .Result showed the bacterial sensitivity towards ginger extract where the concentration of 150mg/ml showed large inhibition zone (23)mm ,the inhibition zones were ranged between(7.6-23)mm, The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was 12.5%.

After that the bacterial ability of biofilm formation was tested by Congored agar method and the result showed that 72.2% of samples were biofilm producing ,11.1 of samples were moderate biofilm producing and 16.6% of samples were non-producing.

Also the antibiofilm activity of ginger extract was tested through quantitative expression of *gtfB* gene befor and after using of ginger extracts,the result showed high antibiofilm activity of the extract where the concentration (25,50,100)% showed noticible inhibition averages,while 12.5 % did not show noticible inhibition averages.The concentration of 100% showed the highest inhibition average followed by the concentrations (50-25)% respectivlly.

The presented study ,it is cocluded that ginger have high antibacterial and antibiofilm activity which made it effective theraby against oral diseases and periodotitis.

**Republic of Iraq**

**Ministry of Higher Education & Scientific Research**

**University of Karbala**

**College of Education for pur sciences**

**Department of Biology**

# Effect of alcoholic extract of *Zingiber officinale* on biofilm formation of *Streptococcus mutans* which isolated form dental caries patients

A Thesis submitted to the College of Education for pure sciences of Karbala University as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Biology-zoology

By

**Azhar Rakib Kadum Al-Fatlawi**

B.Sc.Biology / 2012

Supervised By

**Assist.Prof.Dr.**

**Hiyame Abdul Ridha Kareem AL-Awade**

September 2016 A.D. Thu Al-Huja 1437 A.H.