



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة كربلاء

كلية التربية للعلوم الصرفة

قسم علوم الحياة

**دراسة تأثير البروبيوتك الفموي لجنس *Streptococcus salivarius*
على البكتريا المرضية المكونة للغشاء الحيوي المعزولة من الفم**

رسالة مقدمة إلى

مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة كربلاء

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة – علم الحيوان

كتبت بواسطة

سيف سمير خليل إبراهيم

بكالوريوس تربية علوم صرفة – علوم حياة 2013

بإشراف

أ.د. ياسمين خضير الغانمي

الإشراف الثاني

أ.م.د. هيام عبد الرضا كريم العواد

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

وَمَا أُوتِيتُمْ مِنَ الْعِلْمِ إِلَّا قَلِيلًا

صدق الله العليّ العظيم

﴿سورة الإسراء / الآية ٨٥﴾

أقرار المشرف على الرسالة

أشهد أن إعداد هذه الرسالة الموسومة: (دراسة تأثير البروبيوتك الفموي لجنس *Streptococcus salivarius* على البكتريا المرضية المكونة للغشاء الحيوي المعزولة من الفم) قد جرى تحت إشرافنا في قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة / علم الحيوان.

التوقيع: 

الاسم : د. هيام عبد الرضا كريم

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

مكان العمل: كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة
كربلاء

التاريخ : 2023/ /

التوقيع: 

الاسم : د. ياسمين خضير خلف

المرتبة العلمية: أستاذ

مكان العمل: كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة
كربلاء

التاريخ : 2023/ /

توصية رئيس قسم علوم الحياة

إشارة إلى التوصية أعلاه من قبل الأستاذ المشرف، أحيل هذه الرسالة إلى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها .



التوقيع:

الاسم : د. نصير مرزا حمزة

المرتبة العلمية : أستاذ


مكان العمل : كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة كربلاء

التاريخ : 2023 / /

إقرار لجنة المناقشة

نحن اعضاء لجنة المناقشة الموقعين أدناه نشهد بأننا قد اطلعنا على الرسالة الموسومة : (دراسة تأثير البروبيوتك الفموي لجنس *Streptococcus salivarius* على البكتريا المرضية المكونة للغشاء الحيوي المعزولة من الفم) المقدمة من قبل الطالب (سيف سمير خليل إبراهيم) كجزء من متطلبات نيل درجة الماجستير قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء، وبعد اجراء المناقشة العلمية وجد انها مستوفية لمتطلبات الشهادة وعلية نوصي بقبول الرسالة بتقدير (امتياز).

رئيس لجنة المناقشة

التوقيع : 

الاسم : د. وفاء صادق محسن

المرتبة العلمية : استاذ

مكان العمل : جامعة كربلاء / كلية العلوم

التاريخ : 2023/ /

عضو لجنة المناقشة

التوقيع : 

الاسم : د. مصطفى رياض محمد

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

مكان العمل : جامعة الأنبار / كلية العلوم

التاريخ : 2023/ /

عضو لجنة المناقشة

التوقيع : 

الاسم : د. قيصر عبد السجاد محمد

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

مكان العمل : جامعة كربلاء / كلية التربية للعلوم الصرفة

التاريخ : 2023/ /

عضواً ومشرفاً

التوقيع : 

الاسم : د. هيام عبد الرضا كريم

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

مكان العمل : جامعة كربلاء / كلية التربية للعلوم الصرفة

التاريخ : 2023/ /

عضواً ومشرفاً

التوقيع : 

الاسم : د. ياسمين خضير خلف

المرتبة العلمية : أستاذ

مكان العمل : جامعة كربلاء / كلية التربية للعلوم الصرفة

التاريخ : 2023/ /

مصادقة عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة

التوقيع : 

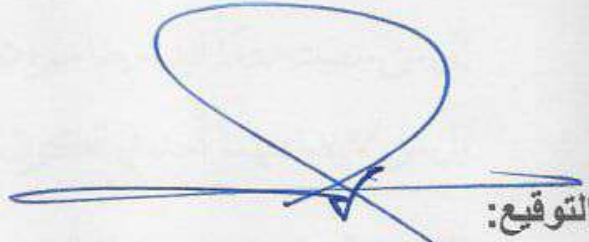
الاسم : د. حميدة عيدان سلمان

المرتبة العلمية : استاذ

التاريخ : 2023/ 11 / 14

إقرار المقوم اللغوي

أشهد أن هذه الرسالة الموسومة بـدراسة تأثير البروبيوتك الفموي لجنس *Streptococcus salivarius* على البكتريا المرضية المكونة للغشاء الحيوي المعزولة من الفم تمت مراجعتها من الناحية اللغوية وتصحيح ما ورد فيها من أخطاء لغوية وتعبيرية وبذلك أصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة بقدر تعلق الأمر بسلامة الأسلوب وصحة التعبير.


التوقيع:

الاسم : د. مشكور حنون الطالقاني

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

مكان العمل : جامعة كربلاء / كلية العلوم الاسلامية

التاريخ: 2023/ /

الإهداء

إلى البشير النذير... والسراج المنير... نينا المخنار أبي القاسم محمد ﷺ

إلى أمتي الأطهار... المصطفين الأخيار ﷺ

إلى بلدي الحبيب... العراق... وإلى شهدائنا الأبرار

إلى من سعيت دوماً لنيل رضاهم، دوناً عن الناس...

إلى من لا يضاهاهما أحد في الكون، إلى من أمرنا الله بغيرهما...

إلى من بدلا الكثير، وقدما ما لا يمكن أن يرد، إليكما تلك الكلمات:

أمي وأبي الغاليان، أهدي لكما هذا الجهد المتواضع؛ فأنما خير داعم لي طوال مسيرتي
الدراسية.

إلى أخوتي الغالين (حسام، ذو الفقار، فاطمة)

إلى من ساندني وقدم الدعم لي... وشاركني في ما أربي من النعب والجهد... إلى زوجتي
الحبيبة.

إلى كل نبضة قلب خفت حباً لي... أهدي جهدي المتواضع

سيف سمير

الشكر والتقدير

الحمد لله على سعة النعم...

والحمد لله على عطائه الذي فاض، وسابغ النعم التي بها جاد، فلك يا رب الحمد على الفضل الذي ساد. والحمد لله الذي لا يضيع تعباً، ويُعطي كرمًا، فأكرمني في مسيرة العلم نجاحاً، ولم ينسَ ألمي، ولم يغفل ما أَلَمَّ بي.

أتقدّم بالشكر والعرفان إلى رئاسة جامعة كربلاء، وإلى عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة، وإلى قسم علوم الحياة لفتح باب طلب العلم، فأتاحوا لنا الفرصة لإكمال مسيرتنا العلمية. والشكر موصول إلى رئاسة قسم علوم الحياة لما قدّموه من جهود كبيرة لتذليل الصعاب أمامنا، وتوجيهنا نحو الصواب.

ولي الشرف أن أسجل جزيل الشكر والعرفان والامتنان العميق إلى أستاذتي الفاضلة الدكتورة ياسمين خضير خلف الغانمي، وأستاذتي الفاضلة الدكتورة هيام عبد الرضا العواد لمواقفهما العلمية، وآراؤهما الرصينة السديدة، وإرشاداتهما الثمينة، ودعمهما اللامحدود في إعداد الدراسة، فبفضل الله سبحانه، والتوجيه القويم؛ تمكّنت من تطوير مهاراتي البحثية، وأنا ممتن لكما لجهودكما الكبيرة في تعليمي.

وأودّ أن أعبر عن شكري وامتناني إلى والدي العزيز لما قدّمه لي من الدعم والتوجيه. وامتناني إلى زملائي الأعضاء على دعمهم الكبير. وشكري إلى الدكتورة نور سلمان التدريسية في جامعة بابل، والست غفران أحمد التدريسية في جامعة أروك، وطبيب الأسنان الدكتور حيدر علي الخفاجي.

كما أتوجه بالشكر العميق والامتنان للأشخاص الذين قدّموا لي المساعدة والدعم خلال رحلة إعداد هذه الدراسة.

سيف سمير

Abstract الخلاصة

أجريت الدراسة الحالية من أجل تقييم تأثير البروبيوتك المستخلص من بكتريا *Streptococcus salivarius* في تثبيط نمو البكتريا المرضية وأغشيتها الحيوية Biofilm المعزولة من منطقة الفم وما حول الاسنان من المراجعين للمركز الصحي في حي العباس/ المركز والمركز الصحي في قضاء الحر والمركز الصحي في ناحية عون وكذلك العيادة التخصصية لطبّ الأسنان في شارع الإسكان في محافظة كربلاء المقدسة، وتمّ الحصول على 83 مسحة فموية Swab من كلا الجنسين، وبأعمار مختلفة تراوحت من (6 – 63) سنة للمدة من 2022 /10 /12 ولغاية 2023/2/12.

وقد تضمنت هذه الدراسة ثلاثة محاور، يتمثل المحور الأول: في عزل *S. salivarius* وتشخيصها، وقد زرعت على وسط Mitis- salivarius agar ووسط HiCrom strep B selective agar وبالإعتماد على صفات المزرعة البكتيرية وبعد التشخيص بجهاز Vitek-2 تمّ الحصول على (19) عزلة من بكتريا *S. salivarius* وشخصت جزئياً باستخدام تقنية تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل PCR بالكشف عن جين *gtfk*.

تمثل المحور الثاني في عزل البكتريا المرضية من المراجعين للمراكز نفسها وتشخيصها، وبالإعتماد على الصفات المظهرية للمزارع البكتيرية وإجراء التشخيص بجهاز Vitek-2 تمّ الحصول على أربع أنواع للبكتريا المرضية وهي كالاتي: *Staphylococcus aureus*، *Staphylococcus epidermidis*، *Klebsiella pneumoniae* و *Enterobacter cloacae*. كما تمّ اختبار قابلية العزلات المرضية على تكوين الغشاء الحيوي Biofilm باستعمال طريقتين وهي طريقة أكار أحمر الكونغو Congo red agar وطريقة صفائح المعايرة الدقيقة Microtiter Plate إذ أظهرت النتائج أنّ جميع العزلات قد كوّنت غشاء حيوي.

تمثل المحور الثالث بدراسة الفعالية التثبيطية لمستخلص البروبيوتك على نمو البكتريا المرضية وبالتخافيف التالية: 75، 150، 300، 600 مايكرو ليتر/مل، إذ بينت النتائج حساسية البكتريا المرضية تجاه المستخلص، وقد أظهر التركيز 600 مايكرو ليتر/ مل أعلى قطر تثبيط في كل الأنواع وعلى النحو الآتي: (7 ملم) *K. pneumoniae*، (10 ملم) *E. cloacae*، (11 ملم) *S. aureus*، (10 ملم) *S. epidermidis* فيما أظهر التركيز 75 مايكرو ليتر أقل قطر تثبيط وعلى النحو الآتي: (0 ملم) *K. pneumoniae*، (0 ملم) *E. cloacae*، (2 ملم) *S. aureus*، (0 ملم) *S. epidermidis*. ودراسة الفعالية المضادة للبروبيوتك على الأغشية الحيوية بسلسلة من التخافيف النصفية من (2 – 1048)

مايكروغرام/ مل وتحديد قيمة التركيز المثبط الأدنى MIC، إذ أظهرت النتائج انخفاضاً كبيراً في قيم الامتصاصية للأغشية الحيوية، وكانت نسب الانخفاض الأكبر في التراكيز (1048، 524، 262) مايكروغرام/ مل، والأقل انخفاضاً في التراكيز (8، 16) مايكروغرام/ مل، فيما لم يظهر تأثير للبروبيوتك على الأغشية الحيوية بتركيز (2) مايكروغرام/ مل. وبلغت قيمة MIC (4) مايكروغرام/ مل والتي لم يلاحظ فيها نمواً بكتيرياً مرئياً.

ووفقاً لما قدمته هذه الدراسة نستنتج أنّ لمستخلص البروبيوتك المعزول من بكتريا *S. salivarius* فعالية عالية تجاه نمو البكتريا المرضية المعزولة من منطقة الفم وما حول الأسنان والمكونة للغشاء الحيوي.

المحتويات

الصفحة	الموضوع	الرقم
V	الإهداء	
V	الشكر والامتنان	
VV VI	الخلاصة	
V	المحتويات	
IX	قائمة الجداول	
X	قائمة الأشكال	
XI	قائمة المختصرات	
XII	الملاحق	
الفصل الأول		
المقدمة		
1	Introduction المقدمة	1
الفصل الثاني		
استعراض المراجع		
4	Oral Diseases أمراض الفم	1 – 2
5	Oral البكتريا الممرضة التي تتواجد في الفم	2 – 2
Pathogenic Bacteria		
6	Streptococcus العقديات	1 – 2 – 2
7	Enterobacteriaceae البكتريا المعوية	2 – 2 – 2
7	Staphylococcus العنقوديات	3 – 2 – 2
8	Lactobacillus العصيات اللبنية	4 – 2 – 2
9	Biofilm الغشاء الحيوي	3 – 2
12	Probiotic البروبيوتك	4 – 2
13	صفات البكتريا المستخدمة كبروبيوتك	1 – 4 – 2
14	معايير اختيار البروبيوتك	2 – 4 – 2

14	بعض أنواع بكتريا البروبيوتك	3 - 4 - 2
14	جنس <i>Lactobacillus</i>	1 - 3 - 4 - 2
15	جنس العقديّة <i>Streptococcus</i>	2 - 3 - 4 - 2
16	جنس <i>Bifidobacterium</i>	3 - 3 - 4 - 2
18	التشخيص الجزيئي للبكتريا Molecular Diagnosis of Bacteria	5 - 2
19	جين <i>gtf</i> (Glucosyltransferase)	6 - 2
الفصل الثالث		
المواد وطرق العمل		
21	المواد والأجهزة المستخدمة Materials and Devices	1 - 3
21	الأجهزة والأدوات المختبرية	1 - 1 - 3
22	المواد الكيميائية المستخدمة Chemical material	2 - 1 - 3
23	الأوساط الزرعية المستخدمة Culture media	3 - 1 - 3
24	طرائق العمل Methods	2 - 3
22	تصميم الدراسة	
25	جمع العينات Sample collection	1 - 2 - 3
25	تحضير الأوساط الزرعية Culture media	2 - 2 - 3
25	تحضير وسط الكونغو الأحمر Congo red agar	1 - 2 - 2 - 3
26	تحضير وسط تربتكيز الصويا السائل - كلوكوز 1% (TSB-glu 1%)	2 - 2 - 2 - 3
26	زرع بكتريا <i>S. salivarius</i> على الأوساط الصلبة	3 - 2 - 3
26	زرع البكتريا المرضية على الأوساط الصلبة	4 - 2 - 3
26	تنقية المزارع البكتيرية	5 - 2 - 3
26	التشخيص بجهاز Vitek-2	6 - 2 - 3
27	التشخيص الجزيئي لبكتريا <i>S. salivarius</i>	7 - 2 - 3
27	استخلاص الحامض النووي DNA	1 - 7 - 2 - 3
29	قياس تركيز ونقاوة الحامض النووي DNA	2 - 7 - 2 - 3

29	تحضير هلام الاكاروز	3 – 7 – 2 – 3
30	الترحيل الكهربائي	1 – 3 – 7 – 2 – 3
30	فحص تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل (PCR)	2 – 3 – 7 – 2 – 3
31	التحري عن قابلية العزلات المرضية على تكوين الغشاء الحيوي Biofilm	8 – 2 – 3
32	طريقة آكار أحمر الكونغو Congo red agar (CRA)	1 – 8 – 2 – 3
32	طريقة صفائح المعايرة الدقيقة Microtiter plate (MTP)	2 – 8 – 2 – 3
32	مستخلص البروبيوتيك لبكتريا <i>S. salivarius</i>	9 – 2 – 3
33	تحضير تراكيز البروبيوتيك اللازمة للكشف عن التركيز المثبط	10 – 2 – 3
33	طريقة تحديد التركيز المثبط الأدنى	11 – 2 – 3
34	اختبار الفعالية التثبيطية Inhibition activity test	12 – 2 – 3
35	التحليل الاحصائي Statistical analysis	13 – 2 – 3
الفصل الرابع		
النتائج		
36	عينات الدراسة Study Samples	1 – 4
39	العزل والتشخيص	2 – 4
40	الكشف عن جين <i>gtfk</i>	3 – 4
41	عزل وتشخيص البكتريا المرضية	4 – 4
42	اختبارات الكشف عن الأغشية الحيوية Biofilm	5 – 4
42	الاختبار بطريقة آكار أحمر الكونغو Congo red agar (CRA)	1 – 5 – 4
43	الاختبار بطريقة صفائح المعايرة الدقيقة Microtiter Plate (MTP)	2 – 5 – 4
44	تحديد قيمة MIC لتركيز البربيوتك على نمو البكتريا المرضية	3 – 5 – 4

45	اختبار قابلية البروبيوتك Probiotic على تثبيط الغشاء الحيوي Biofilm بطريقة صفائح المعايرة الدقيقة Microtiter Plate (MTP)	6 – 4
47	تقدير الفعالية التثبيطية لمستخلص البروبيوتك لبكتيريا <i>S. salivarius</i> على البكتريا المرضية	7 – 4
48	تقدير الفعالية التثبيطية ضد بكتيريا <i>K. pneumoniae</i>	1 – 7 – 4
49	تقدير الفعالية التثبيطية ضد بكتيريا <i>E. Cloacae</i>	2 – 7 – 4
50	تقدير الفعالية التثبيطية ضد بكتيريا <i>S. aureus</i>	3 – 7 – 4
52	تقدير الفعالية التثبيطية ضد بكتيريا <i>S. epidermidis</i>	4 – 7 – 4
الفصل الخامس المناقشة		
54	المناقشة	
54	العزل والتشخيص للبكتريا	1 – 5
55	التشخيص بجهاز Vitek-2 compact	1 – 1 – 5
55	التشخيص الجزيئي	2 – 1 – 5
56	تقدير الفعالية التثبيطية لمستخلص البروبيوتك على الغشاء الحيوي Biofilm بطريقة MTP	2 – 5
59	تقدير فعالية مستخلص البروبيوتك على نمو البكتريا المرضية المعزولة من الفم	3 – 5
الفصل السادس الاستنتاجات والتوصيات		
64	الاستنتاجات	
65	التوصيات	
الملاحق		
66	الملاحق	
المصادر		
77	المصادر	

قائمة الجداول

رقم الجدول	الموضوع	الصفحة
1 – 3	الأجهزة والأدوات المختبرية	21
2 – 3	المواد الكيميائية المستخدمة	22
3 – 3	أنواع الأوساط الزرع المستخدمة	23
4 – 3	مكونات مزيج تفاعل PCR للجين الهدف <i>gtfk</i>	30
5 – 3	الغدد الكيميائية المستخدمة	31
6 – 3	البادئ المستخدم في الدراسة	31
7 – 3	الظروف الحرارية المثلى لمراحل PCR للجين <i>gtfk</i>	31
1 – 4	قابلية البكتريا المرضية المعزولة من مرضى الفم على تكوين الغشاء الحيوي Biofilm بطريقة Congo red agar (CRA)	42
2 – 4	تكوين الغشاء الحيوي Biofilm للبكتريا المرضية بطريقة Microtiter Plate (MTP)	44
3 – 4	قيمة MIC لتركيز البروبيوتك على نمو البكتريا المرضية	45
4 – 4	مواقع الفروق بين أنواع البكتريا المرضية	46
5 – 4	قيم الامتصاصية للبكتريا المرضية المكونة للغشاء الحيوي بإضافة البروبيوتك بطريقة صفائح المعايرة الدقيقة (MTP)	47
6 – 4	متوسط مناطق التثبيط للبروبيوتيك على بكتيريا <i>K. pneumoniae</i>	48
7 – 4	متوسط مناطق التثبيط للبروبيوتيك على بكتيريا <i>E. Cloacae</i>	50
8 – 4	متوسط مناطق التثبيط للبروبيوتيك على بكتيريا <i>S. aureus</i>	51
9 – 4	متوسط مناطق التثبيط للبروبيوتيك على بكتيريا <i>S. epidermidis</i>	52

قائمة الأشكال

الصفحة	الموضوع	رقم الشكل
36	توزيع العينات حسب الجنس	1 – 4
37	توزيع العينات حسب الفئة العمرية	2 – 4
37	توزيع العينات حسب مكان الإقامة	3 – 4
38	توزيع العينات حسب الأمراض المزمنة	4 – 4
38	أمراض الأسنان لأفراد عينات الدراسة	5 – 4
39	عدد عزلات بكتريا <i>S. salivarius</i> من عينة الأصحاء	6 – 4
40	مستعمرات بكتيريا <i>S. salivarius</i> على وسط هايكروم	7 – 4
41	الترحيل الكهربائي لنتاج تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل PCR للجين <i>gtfk</i>	8 – 4
43	قابلية البكتريا المرضية على تكوين الغشاء الحيوي Biofilm بطريقة CRA	9 – 4
49	مناطق تثبيط مستخلص البروبيوتك المستخلص من <i>S. salivarius</i> ضد <i>K. pneumoniae</i>	10 – 4
50	مناطق تثبيط مستخلص البروبيوتك المستخلص من <i>S. salivarius</i> ضد <i>E. Cloacae</i>	11 – 4
51	مناطق تثبيط مستخلص البروبيوتك المستخلص من <i>S. salivarius</i> ضد <i>S. aureus</i>	12 – 4
53	مناطق تثبيط مستخلص البروبيوتك المستخلص من <i>S. salivarius</i> ضد <i>S. epidermidis</i>	13 – 4

قائمة المختصرات

المختصر	المصطلح
ALOs	Actinomyces-like organisms
CaCO₃	Calcium carbonate
CoNS	Coagulase negative <i>Staphylococcus</i>
CRA	Congo red agar
DNA	Deoxyribonucleic acid
ESBL	Extended Spectrum Beta-Lactamase
FadA	Fusobacterium adhesin A
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
GP	Gram positive
GN	Gram negative
Gtf	Glucosyltransferas
H₂S	Hydrogen sulfide
HGT	Horizontal gene transfer
ID	Identification
ID – GP	Identification of Gram positive bacteria
ID – GN	Identification of Gram negative bacteria
LSD	Least Significant Difference
MSA	Mitis – Salivarius agar
MTP	Microtiter Plate
NF-κB	Nuclear Factor Kappa B
PCR	Polymerase chain reaction
PH	Measure of how acidic/basic water
TBE	Tris-Borate-EDTA
TSB	Tryptone soya broth
WHO	World Health Organization

قائمة الملاحق

رقم الملحق	العنوان	الصفحة
1	استمارة معلومات جمع العينات	66
2	نموذج استمارة تشخيص بكتريا <i>S. salivarius</i> بجهاز Vitek-2	66
3	نموذج استمارة تشخيص البكتريا المرضية بجهاز Vitek-2	67
4	توزيع العينات حسب الجنس	67
5	توزيع العينات حسب الفئة العمرية	68
6	توزيع العينات حسب مكان الإقامة	68
7	توزيع العينات حسب الأمراض المزمنة	69
8	أمراض الأسنان لأفراد عينات الدراسة	69
9	عدد عزلات بكتريا <i>S. salivarius</i> من عينة الأصحاء	69
10	أنواع البكتريا المرضية قيد الدراسة على الأوساط الزرعية	70
11	قيمة MIC لتركيز البريبوتك على نمو البكتريا المرضية	71
12	مواقع الفروق بين أنواع البكتريا المرضية	71
13	قيم الامتصاصية للبكتريا المرضية المكونة للغشاء الحيوي بإضافة البروبوتك بطريقة صفائح المعايرة الدقيقة (MTP)	72
14	المخطط البياني لتأثير المستخلص ضد <i>K. pneumoniae</i>	72
15	المخطط البياني لتأثير المستخلص ضد <i>E. cloacae</i>	73
16	المخطط البياني لتأثير المستخلص ضد <i>S. aureus</i>	73
17	المخطط البياني لتأثير المستخلص ضد <i>S. epidermidis</i>	74

الفصل الأول

المقدمة

The Introduction

الفصل الأول Chapter One :

المقدمة Introduction

يعدّ تسوس الأسنان (Dental caries) من الأمراض الشائعة، وهو مرض يتوسط الأغشية الحيوية، وتتكون المجموعة البكتيرية التي تسبب تسوس الأسنان، التي تعدّ من المجاميع الفرعية الصغيرة، من عدة أنواع موجودة على سطح الأسنان (Zhang, et al., 2022). يسبب تسوس الأسنان في إتلاف البنية المتكلسة حول مينا الأسنان (Tooth enamel)، وإنّ الضرر الذي يلحق بمينا الأسنان لا رجوع فيه بالرغم من التطور التكنولوجي والمحاولات العديدة لحماية وتحفيز نمو مينا الأسنان (de Sousa, et al., 2023).

أما التهاب اللثة (periodontitis) أحد أكثر أمراض الفم انتشاراً، التي تشمل مجموعة متنوعة من حالات التهاب وأمراض اللثة، ويعدّ مرض بلاك الأسنان أو اللوحة السنية (Plaque) الذي يصيب اللثة مرضاً شائعاً، إذ تتكون طبقة بكتيرية سميكة على اللثة والأسنان، كما وأنّ للتدخين تأثير على أنسجة اللثة ووظائفها، وتجعل الفم عرضة للإصابة بالالتهابات، وأنّ من مسببات التهاب اللثة الرئيسية ارتفاع نسبة السكر والنشويات في النظام الغذائي، مع انخفاض نسبة الماء وفيتامين (C) (Nguyen, et al., 2021). وإذا ما أهمل العلاج المبكر لالتهاب اللثة، وأمراض اللثة فسيؤدي ذلك إلى الإصابة بأمراض اللثة الخطرة، كالإصابة بالتهاب الأنسجة الداعمة، وبدوره قد يؤثر على العظم (Nasiri et al, 2023).

وتصيب رائحة الفم الكريهة نصف السكان البالغين في العالم على الرغم من أنّه لا يعد بشكل عام مصدر قلق طبي، وأنّ هذه الروائح الفمية ناتجة عن العمليات الأيضية للبكتيريا الفموية، وخاصة البكتيريا اللاهوائية الموجودة على ظهر اللسان، ويعتقد أنّ مركبات الكبريت المتطايرة (Volatile sulphur) سابقة على أنّ (Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia, Fusobacterium nucleatum, Micromonas micros, Campylobacter rectus, Eikenella corrodens) (Katarzyna, et al., 2020). ومن جانب آخر تمّ اكتشاف بكتيريا *Streptococcus salivarius* و *Rothia mucilaginosa* هي البكتيريا المسؤولة عن رائحة الفم الكريهة (Marisol, et al., 2019).

إنّ الأغشية الحيوية عبارة عن تجمعات بكتيرية معقدة تتكون من نوع واحد أو أكثر وتكون مغلفة في مصفوفة خارج الخلية تتكون من البروتينات والكاربوهيدرات، إذ يتم حماية البكتيريا الموجودة في الأغشية الحيوية من الاستجابات المناعية والمضادات الحيوية، وتعدّ القدرة على تكوين الأغشية الحيوية من عوامل الفوعة للعديد من الكائنات الحية المجهرية (Guerra et al., 2022). وإنّ الالتهابات المزمنة التي تسببها

الأغشية الحيوية تمثل تحدياً سريراً مهماً، إذ تعد مقاومة الأغشية الحيوية الميكروبية تجاه مضادات الميكروبات والجهاز المناعي السبب الرئيسي لاستمرار العدوى وتكرارها (Ciofu *et al.*, 2022).

يعرّف البروبيوتيك بأنه كائنات دقيقة حية وبصورة أساسية البكتيريا، وهي آمنة للاستهلاك البشري، وعند تناولها بكميات كافية يكون لها آثار مفيدة على صحة الإنسان. وتمت الموافقة على هذا التعريف من منظمة الأغذية والزراعة للأمم المتحدة (FAO) (Food and Agriculture Organization of the United Nations) ومنظمة الصحة العالمية (WHO) (World Health Organization) (Trang, *et al.*, 2021). يعدّ استخدام البروبيوتيك لإحداث تحسن في صحة الفم دون التأثير سلباً على البكتريا الفموية الطبيعية، إذ يعدّ مفهوماً جديداً نسبياً، وأنّ العديد من الأمراض التي تصيب الإنسان مرتبطة إما بشكل مباشر (تسوس الأسنان وأمراض اللثة)، أو بشكل غير مباشر (أمراض القلب والأوعية الدموية) بتطور اختلال التوازن الميكروبي في الفم (Barbara, *et al.*, 2022).

تعدّ بكتيريا المكورات العقدية للعابية *Streptococcus salivarius* هي نوع شائع جداً من بكتريا المكورات العقدية الفموية التي لا يُعرف عنها أي ارتباط بالأمراض في البشر الأصحاء (Huihui, *et al.*, 2017) والتي سبق أن تمّ التحقق منها لدورها في الوقاية من التهاب البلعوم الناجم عن *Streptococcus pyogenes*، تسوس الأسنان، وأمراض اللثة، ورائحة الفم الكريهة (Wang, *et al.*, 2019). وازداد الاهتمام بالبروبيوتيك المنتج من البكتيريا *S. salivarius* الذي من المحتمل أن يكون علاج بديل للسيطرة على تسوس الأسنان لعدم وجود محدّدات الفوعة وقدرتها على الاستعمار، والقدرة على إزاحة البكتيريا المرضية (Francesco, *et al.*, 2022). ومعظم أنواع المكورات العقدية تنتج أنزيمات ناقلة للكلوكوز *Glucosyltransferas (gtf)*، والذي يستخدم السكرورز كركيزة أساسية في تخليق الجلوكان متعدد السكريد خارج الخلية الذي يسهل التصاق الخلايا البكتيرية على أسطح الأسنان (AL-Qazzaz, *et al.*, 2014). وتمّ التحقق من بكتريا *S. salivarius* باستخدام التشخيص الجزيئي للجين *gtfk* (Hoshino *et al.*, 2004). يعدّ تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) هي الطريقة الأمثل لتحديد أنواع المكورات العقدية في الفم والتي يمكن استخدامها لتحديد أنواع البكتريا باستخدام بادئات خاصة بأنواع جين *gtf* (AL-Qazzaz, *et al.*, 2014).

هدفت الدراسة الحالية الكشف عن فعالية البروبيوتيك المستخلص من بكتيريا *Streptococcus salivarius* والمشخصة جزيئياً بطريقة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) للكشف عن جين *gtfk* في البكتريا المرضية المعزولة من مرضى الفم وما حول الاسنان والمكونة للغشاء الحيوي، الذي سيتم تحقيقه عن طريق المحاور الآتية:

1. عزل البكتيريا *Streptococcus salivarius* من الأشخاص الأصحاء، والبكتيريا المرضية من الأشخاص المصابين بأمراض الفم، وتشخيصها باستخدام جهاز Vitek-2 من الأشخاص المراجعين للمركز الصحي في محافظة كربلاء.
2. تشخيص البكتيريا جزيئياً بطريقة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR).
3. اختبار تكوين الغشاء الحيوي للبكتيريا المرضية المعزولة.
4. استخلاص البروبيوتيك من عزلات بكتيريا *Streptococcus salivarius* المعزولة من الأشخاص الأصحاء.
5. اختبار تأثير البروبيوتيك المستخلص في البكتيريا المرضية المعزولة وأغشيتها الحيوية.

الفصل الثاني

استعراض المراجع

The Literatures Review

الفصل الثاني Chapter Two:

2-1: أمراض الفم Oral Diseases

تشتمل الكائنات الحية الدقيقة الموجودة في الفم للفرد على أنواع متنوعة ومختلفة من البكتيريا، إذ يحتوي اللسان على أكبر عدد من الكائنات الحية الدقيقة، والموجودة على ظهر اللسان، بالإضافة إلى العديد من بكتيريا الفم، وخاصة المكورات العقدية (Rudney, et al., 2005). ومن أمراض الفم تشمل تسوس الأسنان tooth decay، والتهاب دواعم السن periodontitis، التي تنتج عن اختلال توازن البكتيريا في الفم. وهناك زيادة في الأنواع الحمضية والمتحولة للأحماض مثل العقديات الطافرة *streptococcus mutans* و *Lactobacilli*، على الرغم من أنه يمكن أيضاً العثور على بكتيريا أخرى لها خصائص مماثلة مثل *Bifidobacterium* (Aas, et al., 2008).

يصاب الفم بحالات مرضية كثيرة، ومنها تسوس الأسنان (dental caries) وهو أكثر الأمراض المزمنة شيوعاً على الرغم من التقدم التكنولوجي الكبير، وإيجاد الحلول المتطورة من قبل إطبائ الأسنان وتبدأ مراحل هذا المرض بانحلال الجزء الخارجي من السن (آفات البقع البيضاء)، ويليه تدمير موضعي للمينا وعاج الأسنان، ثم في النهاية التهاب اللب والأنسجة المحيطة بالأسنان إذا تركت دون علاج، إذ إنّ تسوس الأسنان ونخرها من أكثر المشكلات الصحية شيوعاً بشكل خاص بين الأطفال والمراهقين والبالغين الأكبر سناً، ولكن يمكن لأي شخص لديه أسنان الإصابة بالتسوس بما في ذلك الأطفال (Zarco, et al., 2012).

هناك أربعة عوامل تساعد على تسوس الاسنان وهي سطح السن (المينا أو العاج)، والبكتيريا المسببة للتسوس، والكربوهيدرات القابلة للتخمير (مثل السكروز)، والوقت، ومع ذلك فإنّ هذه العوامل الأربعة لا تكفي دائماً للتسبب في حدوث المرض، ويلزم توفير بيئة محمية تعزز تطوير الأغشية الحيوية المسببة للتسوس، وإنّ درجة التسوس تعتمد على شكل الاسنان، وعادات نظافة الفم، والقدرة التخزينية للعاج، وأنّ بعض أنواع البكتيريا المسببة للتسوس الموجودة في الأغشية الحيوية تنتج الحامض في وجود كربوهيدرات مخمرة مثل السكروز والفركتوز والكلوكوز، ومن أنواع البكتيريا الشائعة التي ترتبط بتجاويف الأسنان هي *S. mutans* و *Lactobacilli* و *Streptococci* ومع ذلك توجد بكتيريا مسببة للتسوس (تلك التي يمكن أن تسبب المرض) في لوحة الأسنان، لكنها عادة ما تكون في تراكيز منخفضة للغاية لا تسبب مشاكل ما لم يكن هناك اختلال في التوازن، ويعزى ذلك إلى عدم الالتزام مثل تناول السكر المتكرر أو عدم تنظيف الاسنان جيداً (Marsh, et al., 2015).

تصنف أمراض اللثة (the gum disease) إلى نوعين، هما: التهاب اللثة، والتهاب دواعم السن، ويتميز التهاب اللثة بالتهاب يقتصر على منطقة اللثة فقط، في حين أن التهاب دواعم السن هو مرض تدريجي يؤثر على جميع الأنسجة الداعمة للأسنان بما في ذلك العظم السنخي Alveolar bone، وأن البكتيريا الرئيسية المرتبطة بأمراض اللثة والتهاب دواعم السن هو (*Porphyromonas gingivalis*) و(*Treponema denticola*) و(*Tannerella forsythus*) و(*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) تمتلك هذه البكتيريا مجموعة من الخصائص المرضية، والتي تتيح لها التواجد تحت اللثة والتسبب في تلف الأنسجة، وتطور المرض بزيادة في كتلة اللويحة السنية (plaque mass) والتحول نحو البكتيريا اللاهوائية والمحللة للبروتين وكثير منها سالبة الغرام (Houle, et al., 2003).

من اسباب مرض التهاب اللثة ترك الأسنان بلا عناية بنظافتها لمدة طويلة مما يؤدي إلى تراكم (البلاك) على الأسنان واللثة الذي يعدّ هو السبب الأساس في حدوث التهاب اللثة وهناك أيضاً عوامل أخرى تزيد من قابلية الإصابة بأمراض اللثة مثل مرض السكري والتدخين والعوامل الوراثية وبعض أنواع الأدوية وأمراض نقص المناعة وعدم العناية بتنظيف الأسنان (Pedroso, et al., 2019).

تعود رائحة الفم (Halitosis) إلى العديد من الأسباب (استهلاك أطعمة معينة، واضطرابات التمثيل الغذائي، والتهابات الجهاز التنفسي)، ولكن في معظم الحالات ترتبط رائحة الفم بخلل توازن البكتيريا في تجويف الفم، وتنتج رائحة الفم الكريهة عن عمل البكتيريا اللاهوائية التي تحلل اللعاب والبروتينات الغذائية لتوليد الأحماض الأمينية، التي تتحول بدورها إلى مركبات كبريتية متطايرة، وبما في ذلك كبريتيد الهيدروجين وكبريتيد ثنائي ميثيل، وتوجد المبيضات البيضاء (*Candida albicans*) وأنواع المبيضات الأخرى بمستويات منخفضة في المجتمعات الميكروبية في تجويف الفم، ويمكن أن تسبب داء المبيضات الفموي والتهاب الفم المرتبط بأطعم الأسنان، وغالباً ما تكون رائحة الفم ناتجة من منتجات استقلابية كريهة الرائحة (خاصة مركبات الكبريت المتطايرة) بواسطة بكتيريا الفم، ولا سيما اللاهوائية سالبة الغرام (Greenman, et al., 2008).

2-2: البكتيريا المرضية التي تتواجد في الفم Oral Pathogenic Bacteria:

يحتوي الفم على أنواع البكتيريا المختلفة، فالفم يعدّ بيئة مثالية لتكاثر عدد لانهائي من الكائنات الحية المجهرية، وقد تكون هذه الكائنات موجودة في أجزاء مختلفة من الفم، كالأسنان، واللسان واللثة وغير ذلك، وهذه الكائنات يكون بعضها مفيداً، وبعضها الآخر قد يُسبب كثيراً من المشاكل، وتغطي هذه البكتيريا جميع

أسطح تجويف الفم، فالبكتيريا الهوائية التي تحتاج إلى الأكسجين للبقاء على قيد الحياة، وتتكاثر من ناحية أخرى، والبكتيريا اللاهوائية التي تنمو وتتطور في غياب الأكسجين (Hyun, et al., 2018).

ويعتمد تركيز ونمو البكتيريا الفموية على أنواع عديدة من العوامل، منها: توافر وتنوع المواد الغذائية ودرجة الحرارة، ونوع اللعاب، ودرجة الحموضة (PH)، أضف إلى ذلك تركيز الأكسجين، وقوة الجهاز المناعي، ومستوى نظافة الأسنان (Coronado, et al., 2013).

2 - 2 - 1 : العقديات *Streptococcus*:

إنّ المكورات العقديّة هي كائنات هوائية تظهر تحت المجهر على شكل مسبحة من العقد مختلفة الأطوال ولذلك سُميت بالمكورات العقديّة، وتتلونّ مختبرياً بصبغة غرام، وهي موجبة لصبغة غرام، وتسبب العديد من الاضطرابات بما في ذلك التهاب البلعوم والالتهاب الرئوي والتهابات الجلد والجروح وتعفن الدم والتهاب الشغاف (Márió, et al., 2020)، من صفات المكورات العقديّة أنّها موجبة لصبغة الغرام وصغيرة الحجم وتتجمع بشكل سلاسل كما انها غير متحركة وأيضاً غير ميوعة ومن الممكن أن تكون لها محفظة لكن ليس دائماً، وهي إمّا تكون هوائية أو لا هوائية (اختيارية)، وتمتلك تفاعل الكتالاز كما أنّها لا تحرر الاندول ولا تحرر H_2S وتخمر السكاكر وتعطي الحوامض أهمها حامض اللبن وممكن أن يكون لها متطلبات غذائية خاصة، إذ تتطلب أوساط غنية تحوي الدم غالباً (Mokhtar, et al., 2021). وقد تكون البكتيريا العقديّة مفيدة وتساعد في حماية الجسم من بعض أنواع البكتيريا الضارة، ولكنّها قد تكون ممرضة أيضاً، مثل: البكتيريا العقديّة الطافرة (*S. mutans*) التي تسبب تسوس الأسنان (Abranches, et al., 2018).

قام Flayyih (2016) وآخرون بجمع 160 عينة من اللعاب والأسنان المتسوسة من مرضى يعانون من تسوس الأسنان بأعمار مختلفة عند مراجعتهم مركز العامةية التخصصي لطب الأسنان ومن طلبة مدرسة أم قصر الابتدائية، شخّصت 15 عزلة (100%) بأنّها (*S. mutans*) بالاختبارات الكيموحيوية ونظام Vitek-2 بينما شخّصت 22 عزلة (100%) باستخدام تقنية سلسلة تفاعل البلمرة PCR وجين *SrRNA 16* بحجم 120 زوج قاعدة، وأثبتت النتائج إنّ هذه العزلات تعود إلى *S. mutans*.

2 - 2 - 2: البكتيريا المعوية *Enterobacteriaceae*

البكتيريا الموجودة في عائلة *Enterobacteriaceae* التي تشمل *Serratia marcescens* و *Escherichia coli* من سكان الجراثيم المعوية ومسببات الأمراض الأساسية للمستشفيات، إذ تعدّ *Enterobacter cloacae* أحد أكثر الملوثات البكتيرية شيوعاً الموجودة في الأطعمة الجاهزة للأكل في العديد من البلدان (Rasha, et al., 2020).

إنّ بكتيريا *Klebsiella pneumoniae* هي بكتيريا سالبة الغرام وغير متحركة وغير مكونة للأبواغ، وهي بكتيريا لاهوائية اختيارية على شكل عصيات كروية وتتواجد في الفم والجلد والأمعاء لحوالي 5% من الأشخاص، وتؤدي إلى التهاب رئوي بكتيري صغير، وأيضاً فإنّها تؤدي إلى عدوى المسالك البولية، وغالباً ما ترتبط *K. pneumoniae* بأمراض تليف الكبد والأمراض الصفراوية والمسالك البولية والتهابات القناة الصفراوية وداء السكري وتجترم الدم. (Vuotto, et al., 2014)

قام Hessianet (2020) وآخرون بدراسة وعزل بكتريا *Klebsiella pneumoniae* و *Enterobacter cloacae* من عينات مصابة بالتهابات تجويف الفم في هذه الدراسة، تم الكشف عن بعض عوامل الضراوة بالطرق المظهرية التقليدية، إذ أظهرت النتائج أنّ *K. pneumoniae* لديها فرط لزوجة مخاطية بينما أظهرت النتائج أنّ *E. cloacae* تحتوي على لزوجة معتدلة، كما تبين أنّ *K. pneumoniae* و *E. cloacae* كانت لديها القدرة على الالتصاق بالخلايا الظهارية، وبالنسبة لتكوين الأغشية الحيوية وجد أنّ بعض العزلات لـ *K. pneumoniae* و *E. cloacae* كانت تكوّن أغشية حيوية قوية، وبعضها تكوّن أغشية حيوية معتدلة.

2 - 2 - 3: العنقوديات *Staphylococcus*

تستطيع المكورات العنقودية (*Staphylococcus*) أن تستوطن تجويف الفم مسببة العديد من الأمراض، ومن أشهر أنواعها: البكتيريا العنقودية الذهبية (*Staphylococcus aureus*) التي قد تسبب الإصابة بخراج الأسنان، وهي أكياس من القيح تتشكّل حول السن بسبب العدوى البكتيرية (Massimo, et al., 2012).

أجريت دراسة في مدينة بنين، نيجيريا إذ تم تحديد البائيات الجزيئية لـ 81 عزلة من *S. aureus*، وتمّ العثور على 47 عزلة (58%) من المكورات العنقودية الذهبية الحساسة لميثيسيلين (MSSA)، بينما

كانت 34 عزلة (42%) من المكورات العنقودية الذهبية المقاومة للميثيسيلين (MRSA) (Osahon, et al., 2020)

إنّ بكتريا *Staphylococcus epidermidis* هي واحدة من المكورات العنقودية موجبة الغرام التي تستعمر جلد الإنسان والإبط والرأس والساقين والذراعين، تنتقل عدوتها عن طريق المستشفيات والتي تنتشر بصورة سريعة ويصعب القضاء عليها، على الرغم من أن هذه البكتيريا (*S. epidermidis*) التي تهدد الحياة نادرة إلا أنّ العلاج يصبح أكثر صعوبة بمجرد الإصابة بهذا النوع من البكتيريا والقدرة على مقاومة المضادات الحيوية تجعل هذه البكتيريا أكثر صعوبة سواء في مراحل العلاج أو الوقاية، إذ تمّ اكتشاف مقاومة هذه المكورات العنقودية السالبة لأنزيم مخثر البلازما (Coagulase negative (CoNS) *Staphylococcus* تجاه العديد من المضادات الحيوية مثل الميثيسيلين والأمينو غليكوزيدات والماكروليد والتتراسيكلين والكلورامفينيكول والكليندامايسين (Otto, et al., 2012). أحد الأسباب الرئيسية التي تساهم في مقاومة المضادات الحيوية هو الإفراط في استخدام المضادات الحيوية من خلال الاستخدام المطول والاستخدام المتكرر للأدوية الموصوفة تصيب هذه البكتيريا غالباً الأطفال الصغار والرضع، وتتغير مقاومة هذه البكتيريا بمرور الوقت، بسبب العديد من العوامل، بما في ذلك سهولة انتقال البكتيريا من شخص إلى شخص آخر، وأيضاً من مكان جغرافي إلى آخر، تتواجد بين السكان الأصحاء أيضاً (Nesher, et al., 2014).

تتركز معظم الأبحاث على المرضى والأطفال ويتوفر القليل جداً من المعلومات حول مقاومة مضادات الميكروبات لهذه البكتيريا بين السكان الأصحاء، هناك احتمالات بأن الأشخاص الأصحاء يمكن أن يكونوا حاملين للبكتيريا المقاومة للمضادات الحيوية، وبدون الاهتمام المناسب، يمكن أن يكونوا الناشر الصامت بين المجتمعات (Cherifi, et al., 2013).

2 - 2 - 4: العصيات اللبنية *Lactobacillus*:

تعدّ العصيات اللبنية (*Lactobacillus*) التي تعيش على سطح اللسان في فم الإنسان، فضلاً عن تواجدها في الجهاز الهضمي، وقد تحمي الأسنان من التسوس في حال كان الفم سليماً فهي تثبّت نمو بعض أنواع البكتيريا الضارة، ولكنها في بعض الأحيان قد تسبب تسوس الأسنان، خاصةً عند تناول كميات كبيرة من السكريات والنشويات (Runjun, et al., 2017)، إذ قام Kadhum (2022) وآخرون بدراسة هذا النوع من *Lactobacillus acidophilus* بروبيوتيك البكتيريا التي يمكن العثور عليها في الفم.

كل أنواع البكتيريا المرضية تمتلك عوامل الفوعة أو عوامل الضراوة (virulence factors) والتي هي عبارة عن جزيئات توجد أو تفرز بواسطة البكتيريا التي تسمح لها بتكوين المستعمرات، ومراوغة الجهاز المناعي ومقاومته والتثبيط المناعي، وأخذ الغذاء من المضيف مثل (السموم الداخلية والخارجية، و الأنزيمات، والمحفظة، ومتعدد السكاريد الدهني، ومتعدد السكاريد الخارجي، والبروتينات الدهنية، وحاملات الحديد، وغيرها)، وإن عوامل الضراوة تكون غالباً مسؤولة عن حدوث الأمراض في جسم المضيف، ومجموعة أخرى من عوامل الضراوة يكون بتكسير الأجسام المضادة، وهذه الأجسام المضادة لها دور كبير في قتل هذه الكائنات الممرضة (Leitão, 2020).

2-3: الغشاء الحيوي Biofilm:

هو عبارة عن مجموعة منظمة من الكائنات الحية الدقيقة التي تعيش داخل مصفوفة ذاتية الإنتاج من مواد بوليمرية خارج الخلية (EPS) متصلة بسطح حيوي أو غير حيوي (Huang *et al.*, 2019; Gupta *et al.*, 2016). ان قدرة البكتيريا على تكوين الأغشية الحيوية هي من عوامل الفوعة للبكتيريا وتختلف الآليات في تكوين الاغشية الحيوية التي تستخدمها البكتيريا، والتي تعتمد في كثير من الأحيان على الظروف البيئية (López and Kolter, 2010) الأغشية الحيوية قد تكون حميدة أو ممرضة، وتطلق منتجات وسموم ضارة، والتي تصبح مغلقة داخل مصفوفة الأغشية الحيوية (Percival *et al.*, 2011).

يسبب تكون الأغشية الحيوية الرقيقة مضاراً في الأنظمة الصحية وأنظمة توزيع مياه الشرب والأغذية والصناعات البحرية وغير ذلك (Muhammad *et al.*, 2020). يتم تكوين الأغشية الحيوية من خلال أربع مراحل مختلفة (Landini *et al.*, 2010). التي تتمثل في ربط الخلايا بالسطح (إما يكون مضيف حيوي أو أي سطح غير حيوي)، والاستعمار وتشكيل الأغشية الحيوية، ونضوج الأغشية الحيوية، وانفصال الأغشية الحيوية (Petrova and Sauer, 2012). ويمكن أن تحمي الأغشية الحيوية الكائنات الحية الدقيقة من الأشعة فوق البنفسجية، ودرجة الحرارة القصوى، ودرجة الحموضة الشديدة، والملوحة العالية، والضغط العالي، وسوء التغذية، والمضادات الحيوية، وما إلى ذلك، من خلال العمل كالملاصق الواقية لها فهي عنيدة للبيئات القاسية (Yin *et al.*, 2019).

إنّ تطور الأغشية الحيوية قد تمت دراستها على نطاق واسع في المختبر وباستخدام العديد من الأجهزة والكائنات الحية الدقيقة المختلفة، اذ يعد الارتباط بالسطح هو المرحلة الأولى من تطور الأغشية الحيوية، على الرغم من وجود الأغشية الحيوية الحرة العائمة، فهي تستثنى من هذا الامر، على عكس الكائنات الحية المتحركة التي قد تصل إلى السطح بطريقة أكثر نشاطاً، وتكتسب المكورات العنقودية القدرة على ملامسة

السطح بشكل فعال، وقد ترتبط المكورات العنقودية مباشرة بالسطوح اللاأحيائية للأجهزة الطبية الساكنة أو الأسطح اللاأحيائية الأخرى في البيئة (Heilmann, 2011). وذكر Flemming and Wingender (2010) ان من أجل تكوين الأغشية الحيوية، تقوم البكتيريا بتوليد مصفوفة خارج الخلية ذاتية الإنتاج Extracellular matrix تتكون من البروتينات والكريبوهيدرات والحامض النووي خارج الخلية Environmental DNA، التي تغلف الخلايا داخل مصفوفة لزجة تسهل البقاء في بيئات قاسية ومعادية. في السنوات الأخيرة، أصبحت الأغشية الحيوية البكتيرية التي تنتجها مسببات الأمراض البشرية ذات أهمية خاصة للدراسة، نظراً لزيادة تمردتها ليس فقط على الجهاز المناعي للمضيف (Otto, 2006) ولكن أيضاً للمضادات الحيوية. (Costerton et al., 1999 ; Donlan and Costerton, 2002) تنمو المستعمرات التي تكونت بعد الارتباط عن طريق التكاثر، اذ تفرز الخلايا البكتيرية جزيئات بوليميرية لتشكيل مصفوفة الأغشية الحيوية، بوليمرات المصفوفة لها طبيعة كيميائية متباينة تشمل البروتينات والسكريات وبعض الاحماض، ويعتقد ان المواد البوليميرية من الخلايا الميتة تساهم في تكوين مصفوفة الغشاء الحيوي من خلال إطلاق الحامض النووي من الخلايا المحتضرة والذي يعرف بالحامض النووي خارج الخلية eDNA (Otto, 2018).

في دراسة أجريت للكشف عن بكتريا *K. pneumonia* المكونة للغشاء الحيوي والمعزولة من اسطح اطعم الأسنان من 30 شخصاً، اذ تم عزل البكتيريا باستخدام وسائط انتقائية وتم تأكيد تشخيصها باستخدام الاختبارات الكيموحيوية وتسلسل SrRNA16، وخضعت البكتيريا لفحوصات تكوين الغشاء الحيوي بطريقة صفائح المعايرة الدقيقة، وتم تصنيف البكتيريا المكونة للغشاء الحيوي على أنها مكونة ضعيفة ومتوسطة وقوية بناءً على قيمة الكثافة البصرية، كتأكيد مرئي للأغشية الحيوية، وتم التقاط صورة الاغشية الحيوية بواسطة المجهر الإلكتروني الماسح (SEM)، وكان متوسط قيمة الكثافة البصرية للأغشية الحيوية لبكتريا *K. pneumonia* هي 0.012 ± 0.8 (Leoney et al., 2020).

في دراسة لتقييم فعالية منظفات الأسنان الحاوية على مضادات بكتيرية على أنواع من البكتريا التي تسبب رائحة الفم الكريهة، تم الحصول على اربع أنواع من البكتريا (*Fusobacterium nucleatum*, *Tannerella forsythia*, *Veillonella atypica* and *Klebsiella pneumoniae*) من عينات اسنان سريرية، تم تقييم تكوين الأغشية الحيوية لها عن طريق التلوين البنفسجي البلوري والفحص المجهرى، احتوى 80% من الأشخاص الذين يعانون من التهاب الفم و 60% في الأفراد الأصحاء على نوع واحد على الأقل من الأنواع المرتبطة برائحة الفم الكريهة في لوحة أسنانهم، وكانت جميع أنواع البكتريا التي تم اختبارها قادرة على تكوين الأغشية الحيوية، وبعدها تم تقييم فعالية منظف الأسنان على الأغشية الحيوية، اذ أظهر قدرته المضادة للأغشية الحيوية (Wu et al., 2015).

وبدراسة قام بها Altayar (2020) وآخرون بالكشف عن بعض عوامل الفوعة بالطرق المظهرية التقليدية (الزرع على الأوساط، التشخيص المظهري اعتمادا على اشكال الخلايا، الفحص بجهاز ال- Vitek 2 لتأكيد التشخيص، والكشف عن عوامل الفوعة التي تتضمن تكوين المحفظة والأغشية الحيوية)، إذ تمّ الحصول على بكتريا *K. pneumoniae* وبكتريا *E. cloacae* معزولة من التهابات تجويف الفم، وتمّ قياس الأغشية الحيوية عن طريق تحديد امتصاص الأغشية الحيوية المصبغة عند 630 نانومتر مع قارئ صفائح المعايرة الدقيقة، أظهرت النتائج أنّ بعض عزلات *K. pneumoniae* و *E. cloacae* تكوّن غشاء حيوي قوي، وبعضها قد أظهر تكوين غشاء حيوي متوسط.

إنّ البكتريا الممرضة *S. aureus* التي تنتج الغشاء الحيوي أصبحت المتسبب الأول في الالتهابات المزمنة بسبب قدرتها على مقاومة العلاج والمضادات الحيوية عن طريق تكوين الأغشية الحيوية على الأجهزة الطبية، (McConoughey et al., 2014); تشير العديد من الدراسات على الأغشية الحيوية إلى أن الأغشية الحيوية لبكتريا *S. aureus* تنتج لتصبح طبقات سميكة من الخلايا يتم عندها تشغيل آليات الانفصال وتنتجت بشكل مجموعات فرعية من الأغشية الحيوية لتكون مستعمرات دقيقة في الكتلة الحيوية المتبقية (Yarwood et al., 2004; Boles and Horswill, 2008; Periasamy et al., 2012) ومثل الأنواع البكتيرية الأخرى، تم اقتراح أن *S. aureus* تمتلك مراحل مماثلة من مراحل تطور الأغشية الحيوية (Otto, 2013; Le et al., 2014).

في دراسة قام بها Khan (2011) وآخرون، إذ فحصت 262 سلالة سريرية من بكتريا *S. aureus* بطريقة صفائح المعايرة الدقيقة وطريقة الكشف بواسطة أجار الكونغو الأحمر لتشكيل الأغشية الحيوية، إذ كشفت طريقة صفائح المعايرة الدقيقة عزلات منتجة لغشاء حيوي قوي، وبعضها متوسط الإنتاج، وبعضها غير منتجة، وأما طريقة أجار الكونغو الأحمر كانت ذات حساسية منخفضة لتكوين الأغشية الحيوية، إذ أنّ بعضها كوّن الأغشية الحيوية والبعض الآخر لم يكوّن.

إنّ المكورات العنقودية *Staphylococci* سالبة التخثر وعلى الخصوص المكورات العنقودية *S. epidermidis* ظهرت كمسببات لأمراض المستشفيات الرئيسية المرتبطة بعدوى الأجهزة الطبية، إذ تعد من البكتريا الأكثر انتشارا في جلد الإنسان والأغشية المخاطية الدقيقة، وتتمثل مشاكلها في تكوين الأغشية الحيوية على الاسطح الحيوية المزروعة، وأن اللاصق المتعدد السكريد خارج الخلية *extracellular polysaccharide adhesin* المحدد الأساس لعوامل الفوعة من هذا النوع؛ لأنه فاعل في تكوين الأغشية الحيوية فيها (O'GARA and Humphreys, 2001).

هدفت دراسة للتحقق من تكوين الأغشية الحيوية وبقاء البكتيريا على فرش الأسنان، إذ استخدم خمسة عشر متطوعاً سليماً فرشاة أسنان عادية وفرشاة أسنان مضادة للبكتيريا بنفس الشكل لفرشتين منفصلتين كل

5 أسابيع، وتمّ الحصول على *Staphylococcus epidermidis* و *Pseudomonas aeruginosa* من كلا النوعين من الفرشاة على مدار 8 أيام، وباستخدام الفحص المجهرى الإلكتروني لمراقبة تكوين الأغشية الحيوية على الفرشاة المضادة للبكتيريا والفرشاة الاعتيادية المستخدمة في أوقات مختلفة، إذ تراوحت أعداد البكتيريا المعزولة من الفرش الاعتيادية والمضادة للبكتيريا من أفراد مختلفين من 8.3×10^3 إلى 4.7×10^6 ومن 1×10^2 إلى 1.2×10^6 وحدة تكوين المستعمرة / مل، على التوالي، وتمّ عزل عدد أكبر من البكتيريا من الفرش الاعتيادية مقارنة بالفرش المضادة للبكتيريا المستخدمة من الأفراد أنفسهم، بينما نجت *S. epidermidis* لمدة 6-8 أيام على الفرش المضادة للبكتيريا وأكثر من 8 أيام على الفرش الاعتيادية، وتمّ الاستنتاج ان فرشاة الأسنان قد تكون مستودعاً لمسببات الأمراض الانتهازية بما في ذلك المكورات العنقودية (Sammons et al., 2004).

2 - 4: البروبيوتيك Probiotic

اشتقت كلمة بروبيوتيك من الكلمة اليونانية (pro- biotic) التي تعني من أجل الحياة (Marianne, et al., 2014)، واستُخدمت لأول مرة في سنة 1965م من Lilly and stillel، إذ وُصفت بأنها مركبات أو مواد تنتج بواسطة البكتيريا، وتحفز نمو الميكروبات الأخرى، وهناك تعريفات كثيرة أخرى للبروبيوتيك، إذ عرّفها باركر (Parker, et al., 1974) بأنها أحياء دقيقة ومواد لها دور بتوازن ميكروفلورا القناة الهضمية. أمّا Fuller (1989) وآخرون فقد عرّفها بأنها ميكروبات حية مدّعمة للغذاء، وتعزز صحة المستهلكين عن طريق تحسين التوازن بين ميكروفلورا القناة الهضمية. وفي تعريف مشابه قدّم بواسطة Mahmoudi (2013) وآخرون عرّفها بأنها عبارة عن مزرعة وحيدة أو مختلطة من البكتيريا الحية ذات فائدة صحية بواسطة تحسين الميكروفلورا الطبيعية في القناة الهضمية. وعُرّفت حديثاً بواسطة (FAO/WHO) بأنها عبارة: عن كائنات حية دقيقة (تشمل بشكل أساس بكتيريا، وبشكل ثانوي خمائر) تعطي عند تناولها بكميات مناسبة فوائد صحية للمستهلك، ومن أجل أن تعطي فوائدها الصحية لا بدّ أن تتواجد بصورة حية، وبأعداد كبيرة بحيث لا يقلّ عددها في الغذاء عند استهلاكه عن (106) خلية/غم، وأن يستهلك الغذاء المحتوي عليها بشكل يومي بمعدل (100) غم (Pedersen, et al., 2005).

إنّ غالبية الكائنات الحية الدقيقة التي تحتوي على البروبيوتيك بشكل أساسي تنتمي إلى أجناس *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*، وإنّ *Bifidobacterium* يقمّ أكبر جنس من بكتيريا حمض اللاكتيك *lactic acid* التي تشتمل على عصيات موجبة لصبغة غرام، وسلبية الكتالاز، وإنّ العصيات اللبنية توجد بشكل شائع في بيئات متنوعة، مثل: منتجات الألبان، والأسطح المخاطية البشرية، كذلك في

النباتات، وقد جذب بروبيوتيك بكتيريا حمض اللاكتيك الكثير من الاهتمام للخصائص المعززة للصحة لبعض الأنواع، وأنّ العديد من هذه الخصائص ضرورية عند اختيار سلالات الكائنات الحية المجهرية المحتملة التي يجب أن تكون غير مسببة للأمراض (Shah, et al., 2005)، ومن الأنواع الأخرى من بروبيوتيك (*Streptococcus*, *Escherichia coli*, *Bacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Saccharomyces Propionibacterium* and (Sullivan, et al., 2002).

أثبت البروبيوتيك فعاليته العلاجية في العديد من الحالات، منها؛ تحفيز جهاز المناعة من خلال تعزيز المناعة الفطرية والمكتسبة في جسم الإنسان، بواسطة زيادة نشاط الخلايا القاتلة الطبيعية (Natural Killer cell) الموجودة في الجسم، مثل: خلايا الدم البيضاء التي تلتهم الجراثيم، وزيادة مستويات الغلوبولين المناعي (Immunoglobulin)، إذ أثبتت دراسة قام بها Gibson (2008) وآخرون أنّ السلالتين *B. lactis* و *L. rhamnosus* كانت لها خصائص في تعزيز المناعة الطبيعية عند البشر، وأحد فوائده العلاجية في التهابات الجهاز التنفسي (Askandar, et al., 2020). في حين أثبتت دراسة أجراها Askandar (2020) وآخرون، وكذلك Sarkar (2007) وآخرون على تأثير البروبيوتيك في حماية الجهاز التنفسي من الأمراض التنفسية من خلال تعزيز الاستجابات المناعية، وتقليل حساسية المسالك التنفسية، وبخاصة الحساسية الناتجة عن مرض الربو، وتخفيض عدوى الجهاز التنفسي. ويمتلك البروبيوتيك أيضاً خصائص علاجية للمرضى الذين يعانون من أمراض التهابات الأمعاء، إذ أثبتت دراسة طبية لـ Sarkar فاعلية البروبيوتيك ضد مرض التهاب الأمعاء، والقولون، ومرض Crohn (Li, et al., 2012).

2 - 4 - 1: صفات البكتيريا المستخدمة كبروبيوتيك Characteristics of bacteria used as probiotic

تمتلك سلالات البكتيريا المستعملة كبروبيوتيك صفات فسيولوجية عديدة، منها؛ أن تكون آمنة، وخالية من أية خصائص ممرضة، وغير مفرزة للسموم، وغير مسببة للحساسية وللطفرات الوراثية للخلايا، ويعتقد أنّ معظم أنواع البروبيوتيك المستعملة تمتلك تاريخ طويل آمن (Osullivan, et al., 2001). وأن يكون لها المقدرة على إنتاج مواد مضادة لنمو الميكروبات المرضية، ويفضل أن يكون مصدر بكتيريا البروبيوتيك الإنسان، ويعتقد أنّ البروبيوتيك المعزولة من الإنسان تمتلك فعالية أفضل للإنسان من تلك المعزولة من الحيوان؛ بسبب وجود تفاوت مناعي معها (Gibson, et al., 2008).

2-4-2: معايير اختيار البروبيوتيك **Criteria for selecting probiotic**

يتم اختيار البروبيوتيك على حسب معايير عديدة، منها: النمط الظاهري، واستقرار النمط الجيني، وأنماط استخدام الكربوهيدرات والبروتينات، وتحمل الحمض والصفراء، والبقاء والنمو، وخصائص التصاق الظهارة المعوية، وإنتاج مواد مضادة للميكروبات؛ أي أنماط مقاومة المضادات الحيوية، والقدرة على تثبيط مسببات الأمراض المعروفة، إذ تعدّ القدرة على الالتصاق بالغشاء المخاطي المعوي أحد أهم معايير الاختيار بالنسبة للبروبيوتيك؛ لأنّ الالتصاق بالغشاء المخاطي المعوي يعدّ شرطاً أساسياً للاستعمار (Sanders, et al., 2008).

من الأهمية أن تتمكن سلالة الكائنات الحية المجهرية من البقاء على قيد الحياة في الموقع الذي يفترض أن تكون نشطة فيه؛ لنشاط أطول، وربما أعلى، ومن الضروري أن تتكاثر السلالة وتستعمر في هذا الموقع المحدد، ومن المحتمل أن السلالات الميكروبية الخاصة بالمضيف فقط هي القادرة على التنافس مع البكتيريا الأصلية، واستعمار المنافذ، بالإضافة إلى ذلك؛ يجب أن يتحمل الجهاز المناعي سلالة الكائنات الحية المجهرية، ولا تتكون أجسام مضادة ضد سلالة الكائنات الحية المجهرية، ولذلك يكون المضيف مقاوماً تجاه البروبيوتيك، ومن ناحية أخرى؛ فإنّ البروبيوتيك يمكن أن يكون كعامل مساعد ومحفّز لجهاز المناعة ضد الكائنات الحية الدقيقة المسببة للأمراض، وأن البروبيوتيك يجب أن يكون غير ضار للمضيف، وأن لا تكون هناك تفاعلات مسببة للأمراض أو حساسية أو طفرة مسببة للسرطان يمكن تسببها الكائنات الحية الدقيقة نفسها أو منتجات التخمر (Tamime, et al., 2002).

2-4-3: بعض أنواع بكتيريا البروبيوتيك **Some types of probiotic bacteria**

2-4-3-1: جنس *Lactobacillus*

هو الجنس الأساس لعائلة Lactobacillaceae لاحتوائه على العديد من الأنواع، التي تعدّ أهم عوامل التخمر اللبني، والتي تشارك في العديد من الصناعات، وتكون عصيات طويلة ورفيعة ومنحنية أحياناً، وغالباً ما يتمّ تجميعها في سلاسل، وهي غير متحركة، وسلبية الكاتلاز، وتنمو عند درجة حرارة مثالية تتراوح بين (30-40) درجة مئوية، وتحتوي العصيات اللبنية على متطلبات غذائية معقدة للغاية من الأحماض الأمينية والفيتامينات والأحماض الدهنية والنيوكليوتيدات والكربوهيدرات والمعادن، وتمّ تقسيم هذا الجنس بواسطة Orla-Jensen إلى ثلاث مجاميع مهمة (Paster, et al., 2001).

قام Tebyanian (2017) وآخرون بدراسة النشاط المضاد للبروبيوتيك المنتج من العصيات اللبنية ضد بعض العزلات البكتيرية السريرية، إذ تمّ اختبار منتج العصيات اللبنية المتوفر تجارياً والذي يحتوي على سلالات *Lactobacillus acidophilus* و *Lactobacillus Plantarum* لنشاطهم المضاد للبكتيريا ضد العزلات البكتيرية السريرية *Escherichia coli* و *Klebsiella pneumoniae* و *Pseudomonas aeruginosa* و *Staphylococcus aureus* باتباع طريقة الانتشار بالحفر، إذ أظهر بروبيوتك العصيات اللبنية المعزولة في هذه الدراسة نشاطاً ملحوظاً في مجال مضادات الميكروبات ضد البكتيريا المسببة للأمراض.

في هذه الدراسة قام Rossoni (2018) وآخرون بتقييم العزلات لسلالات *Lactobacillus* المعزولة من أشخاص لا يعانون من التسوس واختبار فيما اذا كانت هذه البكتيريا تمنع *S. mutans* وهي واحدة من أهم البكتيريا لتسوس الأسنان، إذ تمّ فحص 22 عزلة من سلالة *Lactobacillus* بحثاً عن نشاط مضاد للجراثيم ضد *S. mutans* وأظهرت جميع سلالات *Lactobacillus* الـ 22 التي تمّت دراستها (100%) نشاطاً مضاداً للبكتيريا، بالإضافة إلى اختبار سلالات *Lactobacillus* مع قابليتها على إنتاج الغشاء الحيوي *S. mutans*.

يوضح Khalil (2018) وآخرون دراسة التأثير المضاد للميكروبات لبكتيريا *Lactobacillus* باعتبارها بروبيوتيك ضد بعض البكتيريا الممرضة، وعزلت سلالات بكتيريا *Lactobacillus* من نوعين من الزبادي في مدينة بعقوبة بالعراق، إذ تمّ استخدام 60 عينة زبادي من مصدرين (30 زبادي محلي و 30 زبادي منتج تجاري) ولعزل بكتيريا بروبيوتيك التي تمّ التعرف عليها من الناحية المظهرية والكيميائية الحيوية، و كانت 30 (100%) من عينات الزبادي المنتجة محلياً تحتوي على بكتيريا بروبيوتيك بينما تمّ احتواء 12 (40%) نوعاً تجارياً من عينات الزبادي على بروبيوتيك، تمّ استخدام طريقة صفائح المعايرة الدقيقة لتحديد النشاط المضاد للبكتيريا بين عزلات العصيات اللبنية، كما أشارت النتائج إلى أنّ تأثيراتها المضادة للبكتيريا والتي تباينت ضد العزلات البكتيرية المرضية المختارة *Staphylococcus aureus* و *Escherichia.coli* كانت نتائج هذه الدراسة تشجع الناس على استهلاك المزيد من منتجات الألبان الحاوية على بروبيوتيك كوسيلة وقائية بدلاً من استخدام المضادات الحيوية التي تؤدي إلى مشاكل صحية، كما تشجع الصناعة المحلية على إنتاج منتجات الزبادي الحيوي.

2-4-3 - 2: جنس العقديّة *Streptococcus*:

إنّ المكورات العقديّة هي من العقديات التي يتمّ تضمينها في المجال البكتيري تحت قسم Firmicutes وتخصيصها للفئة Bacilli إنّها تنتمي إلى بكتيريا حمض اللاكتيك Lactic Acid bacteria أو

Lactobacillus وتدرج تحته في عائلة Streptococcaceae إنَّ الجنس المكور العقدي يشمل العديد من الأنواع البكتيرية، وأنَّ جميع الأنواع في الجنس تظهر سلوك موجب لصبغة غرام، ويوجد نوع واحد من المكورات العقدية نشطة غير متحركة، وهي من الأنواع قصيرة السلسلة (*Streptococcus salivarius*)، في السابق تمَّ التعرف على بكتيريا *Streptococcus thermophilus* باعتبارها نوعاً فرعياً من هذا النوع، والتي كانت تسمى بعد ذلك *Streptococcus salivarius subsp*، وتستقر *S. salivarius* على لوحة الأسنان بعد الولادة لمدة وجيزة، إذ تنتج بيئة مثالية للمكورات، تشكل هذه المكورات ما يسمى بالبكتيريا الأولية في تجويف الفم؛ فإنَّه يشكل بيئة لاهوائية تمنع البكتيريا الهوائية الدخيلة من استعمار البلعوم الفموي، ونظراً لأنَّ بكتيريا النوع *S. salivarius* تعدّ في النهاية البيئة للبكتيريا الفموية الصحية فإنها تفيد البشر، إذ تفوق فوائد *S. salivarius* مضارها (Burton, et al., 2010).

قام Kaci (2014) وآخرون بدراسة وتقييم القدرة المضادة للالتهابات في *Streptococcus salivarius* لأول مرة في المختبر على الخلايا الظهارية المعوية البشرية وخلايا الدم وحيدة النواة البشرية المحيطية، ولقد اثبتوا أنَّ سلالات *S. salivarius* الحية تمنع تنشيط مسار NF-κB على الخلايا الظهارية المعوية، ووضحوا أيضاً أنَّ سلالة *S. salivarius* JIM8772 الحية في نماذج الفئران قد ثبتت بشكل كبير الالتهاب الشديد والمتوسط من التهاب القولون، مما يشير إلى الاستجابة الوقائية مع البكتيريا ذات النشاط الأيضي. درس Chen X (2020) وآخرون وجود الكائنات الحية الدقيقة المسرطنة والتي ترتبط ببدء وتطور تسوس الأسنان، ومن الكائنات الحية الدقيقة المسرطنة هي العقدية الطافرة *Streptococcus mutans*، وتمَّ عزل البكتيريا من فم الإنسان واستخراج القواطع العلوية لدراسة مسببات تسوس الأسنان، وتمَّ استخدام *S. mutans* كسلالة مرجعية واختيار أربع سلالات يحتمل أن تكون مسرطنة، ومن ثمَّ تمَّ تحديد السلالات المختارة على أنَّها *Streptococcus salivarius*، *Streptococcus anginosus*، *Leuconostoc mesenteroides* و *Lactobacillus sakei* من خلال تحليل تسلسل الجين *16rRNA* توفر هذه الدراسة معلومات مفيدة حول دور بكتيريا حمض اللاكتيك من الأطعمة المخمرة والمكورات العقدية المتعايشة التي تؤخذ عن طريق الفم في تسوس الأسنان.

2- 3 - 3 : جنس *Bifidobacterium*

تتكون بكتيريا حمض اللاكتيك من مجموعة غير متجانسة من بكتيريا موجبة لصبغة جرام، وغالباً ما تظهر في شكل عصيات، وتكون غير مكونة للأبواغ، وغير متحركة، وسلبية الكتلاز، وخالية من السيتوكروم، كما أنَّها مقاومة للأحماض، ومقاومة للرطوبة، وموجودة بشكل طبيعي في الأمعاء التي تستعمرها خلال الأسبوع الأول بعد الولادة (Tuomola, et al., 2001).

قام عدد من الباحثين بدراسة توضيحية لدور الجراثيم المعوية البشرية التي تؤدي دوراً مهماً في صحة الإنسان، ومن المعروف أيضاً أنّ الحالة المرضية غالباً ما تكون خللاً في ميكروبات الأمعاء، ويمكن أن يمثل البروبيوتيك علاجاً بديلاً للاضطرابات المعوية والأمراض البشرية غير المرتبطة على ما يبدو بالجهاز الهضمي، وتستخدم سلالات بعض الأنواع على نطاق واسع في طبّ الأطفال *Bifidobacterium breve* منها هو هذا النوع السائد في أمعاء الأطفال الذين يرضعون رضاعة طبيعية، كما تمّ عزله من لبن الأم، إذ كان له نشاط مضاد للميكروبات ضد مسببات الأمراض البشرية، وتصف هذه الدراسة تطبيقات سلالات *B. breve* بشكل أساسي للوقاية وعلاج أمراض الأطفال، إذ تتراوح الأمراض المستهدفة من أمراض الأمعاء المنتشرة بما في ذلك الإسهال ومغص الرضع، إلى الداء البطني والسمنة والاضطرابات التحسسية والعصبية، بالإضافة إلى استخدام سلالات هذا النوع للوقاية من الالتهابات الجانبية عند الخدج وأثناء العلاج بالمضادات الحيوية أو العلاج الكيميائي (Bozzi, et al., 2018).

كما تمّ دراسة *Bifidobacteria* وهي البكتيريا الأكثر وفرة في ميكروبات الأمعاء البشرية عند الرضع الأصحاء الذين يرضعون من الثدي، إذ يشكل *Bifidobacterium bifidum* واحدة من أكثر أنواع البكتيريا شيوعاً التي يمكن العثور عليها في جسم الثدييات، وقد أثبت أنّ لها ميزات فسيولوجية ووراثية ملحوظة تشمل الالتصاق بالظهارة وكذلك استقلاب الكلوكوز من المضيف إلى متعدد السكاريد الذي يطلق عليه (Glycans)، وتناقش الدراسة خصائص بيولوجية معينة لأنواع *B. bifidum* في الأمعاء البشرية وأثارها في دعم صحة المضيف (Turroni, et al., 2019).

ودرس Almjawi (2020) وآخرون تقدير تأثير المشتت الحيوي السطحي Biosurfactant المستخلص من بكتريا *Bifidobacterium spp* على الغشاء الحيوي لبعض أنواع المسببات المرضية من ضمنها (*E. cloacae*، *K. pneumoniae*، *S. epidermidis*، *S. aureus*) المعزولة من المرضى المراجعين إلى وحدة قسرة القلب والشرابين في مستشفى الإمام الحسين (ع) التعليمي في محافظة كربلاء المقدسة، إذ تمّ دراسة الفعالية التثبيطية لراشح المشتت السطحي، وشملت الدراسة تأثير ثلاثة تراكيز مختلفة من المشتت السطحي ضد البكتريا المرضية، واستنتجت الدراسة انخفاضاً ملحوظاً في تثبيط الأنواع الممرضة، وأيضاً في تكوين الأغشية الحيوية بمناطق تثبيط وأقطار مختلفة حول الحفر، إذ تمّ الاستنتاج إنّ للمشتت السطحي فعالية تثبيطية واضحة ضد البكتريا المرضية المعزولة.

5-2: التشخيص الجزيئي للبكتيريا (Molecular Diagnosis of Bacteria)

تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل (Polymerase chain reaction) هو تقنية تضخيم الحمض النووي التي طورت الأبحاث البيولوجية وهي طريقة مهمة في البيولوجيا الجزيئية والهندسة الوراثية، فباستخدام PCR يمكن للباحثين إنشاء عدد لا نهاية له من نسخ أجزاء الحمض النووي والجينات من نسخة واحدة من النسخة الأصلية، إذ تمّ تطويره في منتصف الثمانينيات، وأصبح منذ ذلك الحين أحد أكثر الطرق السريعة والمنخفضة التكلفة شيوعاً بسبب المدة الطويلة والتكلفة الباهظة للترحيل الكهربائي للهلام النابض (Pulsed-field gel electrophoresis)، وهو أهم التطورات البيولوجية في القرن العشرين (Al Zahrani, 2011).

تعتمد هذه التقنية على التكرار الدوري لثلاث خطوات رئيسية: (1) مرحلة التسخن والتي تتم عند درجات حرارة حوالي 95 درجة مئوية؛ (2) مرحلة التلدين التي ترتبط فيها أزواج البادئات بمناطق معينة في ssDNA الناتج - يتم استخدام درجة حرارة تتراوح بين 50 درجة مئوية و65 درجة مئوية، على النحو الذي يحدده تكوين البادئات؛ (3) مرحلة الاستطالة والتي يتم فيها رفع درجة الحرارة إلى ~ 70 درجة مئوية لتخليق الحمض النووي، ويتطلب البوليميريز وجود القواعد dNTPs و Mg^{2+} من أجل تضخيم قالب الحمض النووي بما فيه الكفاية للكشف عن طريق التصبغ بصبغة بروميد الإيثيديوم، يلزم 20 - 40 دورة: 30 دورة تولد حوالي مليار نسخة من الجين الهدف (jung et al., 2018). وتمّ استخدام تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل لسنوات عديدة للكشف عن مسببات الأمراض في العينات السريرية، ولكن تم اعتماده مؤخراً كأداة للتشخيص الجزيئي، وهناك أربع مجموعات رئيسية من التقنيات المعتمدة على تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل التي تستخدم للتمييز بين العزلات البكتيرية، وهي تشمل: (1) AP-PCR (التعسفي) الذي يستخدم للكشف عن الاختلافات الجينية بين الكائنات الحية باستخدام بادئات عشوائية قصيرة لتضخيم مناطق عشوائية من الجينوم، (2) RFLP-PCR (تعدد أشكال النيوكلووتيدات) وتستخدم لتحديد تعدد أشكال النيوكلووتيدات بناء على التعرف على مواقع التقييد وكذلك تستخدم لرسم خرائط الجينات وفحص النسب للجينات، (3) REP-PCR (تقنية المتناوب المتكرر) هي طريقة لبصمات النمط الجيني والتي تستخدم لتتبع تكرار السلالات داخل الخلايا، (4) Riboty-PCR (النسخ العكسي) وتستخدم في المختبرات للكشف عن الحامض النووي الريبي المستهدف لتشخيص مسببات أمراض معينة (Bogdan et al., 2023).

2 - 6: جين *gtf* (Glucosyltransferase):

معظم أنواع المكورات العقدية تنتج الجلوكوسيل ترانسفيريز (*gtf*) Glucosyltransferas، الذي يستخدم السكرورز كركيزة أساسية في تخليق الجلوكان متعدد السكريد خارج الخلية وهو عامل ضروري في بناء الأغشية الحيوية للوحة الأسنان مما يسهل التصاق الخلايا البكتيرية على أسطح الأسنان، لذلك فإن اكتساب هذه القدرة على إنتاج متعدد السكريد من السكرورز، أي تشفير الجين *gtf*، هو المفتاح التطوري الأساس للمكورات العقدية في تكوين الأغشية الحيوية في الأسنان (Xu, et al., 2018).

تم التعرف على أربع أنواع من *gtf* في بكتريا *S. salivarius* وهي *gtfL*, *gtfK*, *gtfJ* و *gtfM*، إذ كشف فحص انزيمات *gtf* بأن كل من *gtfB* و *gtfC* في بكتريا *Streptococcus mutans* و *gtfI* في بكتريا *Streptococcus downei* و *gtfI* في بكتريا *Streptococcus sobrinus* و *gtfJ* و *gtfL* في بكتريا *Streptococcus salivarius* جميعها تقوم ببناء الجلوكان غير القابل للذوبان في الماء -water insoluble glucans (Nanbu, et al., 2000).

إنّ *gtf* لكل أجناس *Streptococcus* ترجع إلى أصل واحد، وإنّ جين *gtf* من *Streptococcus* المحتمل قد تمّ الحصول عليه من بكتريا حامض اللاكتيك lactic acid bacterium عن طريق نقل الجينات الأفقي (HGT) وبذلك أصبحت هناك أنواع مختلفة من جين *gtf* باختلاف أجناس *Streptococcus* (Hoshino, et al., 2012). إنّ تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) هي الطريقة الأمثل لتحديد أنواع المكورات العقدية في الفم والتي يمكن استخدامها بنجاح في التجارب السريرية لتحديد البكتريا المسببة للأمراض المرتبطة مع أمراض الفم المعدية باستخدام بادئات خاصة بأنواع جين *gtf* التي في الغالب تستهدف الطول الكامل للجين الذي يتمّ تحليله لتحديد أنواع الخلايا البكتيرية (Al-Qazzaz, et al., 2014).

قام Hoshino (2004) وآخرون باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) في دراستهم للكشف عن العقديات الفموية عن طريق استخدام بادئات خاصة بالأنواع للكشف عن جينات الكلوكوزيل ترانسفيريز *glucosyltransferas*، وقد بينت النتائج عدداً من العقديات (*S. mutans*, *S. salivarius* بواسطة جين *gtfk*، *S. oralis*, *S. gordonii*, *S. sanguinis*, *S. sobrinus*) وأيضاً تم الكشف عن البكتريا اللعابية *S.*

وفي دراسة أخرى في الطب الشرعي للكشف عن السلالات البكتيرية الشائعة عن طريق الفم لاختبار وجود اللعاب في عينات الطب الشرعي باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR)، تم اكتشاف وجود البكتريا العقدية اللعابية *S. salivarius* والبكتريا العقدية الطافرة *S. mutans* وأشارت النتائج أنّ بكتريا

S. salivarius أكثر دليل على وجود اللعاب من بكتريا *S. mutans* لأنها وجدت بنسبة 100%، وأيضاً وجدت في جميع عينات اللعاب التي أختبرت بالـ PCR (Nakanishi *et al.*, 2009).

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل

Materials and Methods

الفصل الثالث Chapter Three:

المواد وطرائق العمل

1-3: المواد والأجهزة المستخدمة Materials and Devices:

1-1-3: الأجهزة والأدوات المختبرية:

استخدمت مجموعة من الأجهزة والمواد المختبرية كما في الجدول (3 – 1).

جدول (3 – 1): الأجهزة والأدوات المختبرية

الشركة المصنعة والمنشأ	الأجهزة والادوات	ت
Omark- India	أطباق بترى بلاستيكية plastic pitridish	.1
Favorgen- Korea	أنابيب FABG colnmn	.2
Biofil- India	أنابيب اختبار Eppendrof tubes	.3
GLM- disposable	أنابيب بلاستيكية plain tubes	.4
Huamao- China	ثاقب فليني Cork borer	.5
Hitachi-Japan	الثلاجة refrigerator	.6
Analytik- German	جهاز PCR	.7
Biomerieux-France	جهاز Vitek-2 compact system	.8
Wisepin- Korea	جهاز الطرد المركزي centerfuge	.9
Bioneer- Korea	جهاز ترحيل الحامض النووي Gel electrophoresis system	.10
Labtech- Korea	جهاز تقطير الماء Distillator device	.11
Densichek- USA	جهاز قياس العكورة McFarland	.12
Binder-German	حاضنة Incubator	.13
Labconco- USA	حاضنة مبردة biosafety cabinet	.14
Genex-USA	حاضنة هزازة Incubator shaker	.15
Biofil- India	دورق مخروطي Conical flask	.16
BDH- England	شريط شمعي لاصق Parafilm	.17
Biomerieux-France	عدة تشخيص نظام الفايترك Vitek-2 kits	.18
Himedia- India	عروة ناقلة Loop	.19

Memmert- German	Oven فرن حراري	20.
LG- Korea	Microwave فرن مايكروويف	21.
Heidolph- German	vortex مازج	22.
Watsonbiolab- Japan	micropipetes ماصات دقيقة	23.
Meheco-China	Syringes محاقن بأحجام مختلفة	24.
Medicoswab- China	cotton swab مسحات قطنية معقمة	25.
Hoverlabs- India	Benzene burnner مصباح بنزن	26.
Para Medical - Italy	ELISA منظومة الاليزا	27.
Wisd- Korea	Autoclave مؤصدة	28.
Kern- German	Sensitive balance ميزان حساس	29.
Heidolph- German	Shaker هزاز	30.

3-1-2: المواد الكيميائية المستخدمة :Chemical material

استخدمت مجموعة من المواد الكيميائية في هذه الدراسة كما في الجدول (3 – 2).

جدول (3 – 2): المواد الكيميائية المستخدمة

الشركة المصنعة والمنشأ	المادة
Promega- USA	Nuclease- Free Water
Sterile- France	Saline solution
Himedia- India	TBE buffer
Condalab- Spain	Agarose اكاروز
Favorgen- Korea	Ethanol ايثانول
Biotech- Canada	Ethidium bromide ايثيديوم برومايد
Himedia- India	Yeast extract خلاصة الخميرة
Himedia- India	CaCO ₃ كاربونات الكالسيوم
Alpha chemika- India	Glycerol كليسيرول

3-1-3: الأوساط الزرعية المستخدمة :Culture media

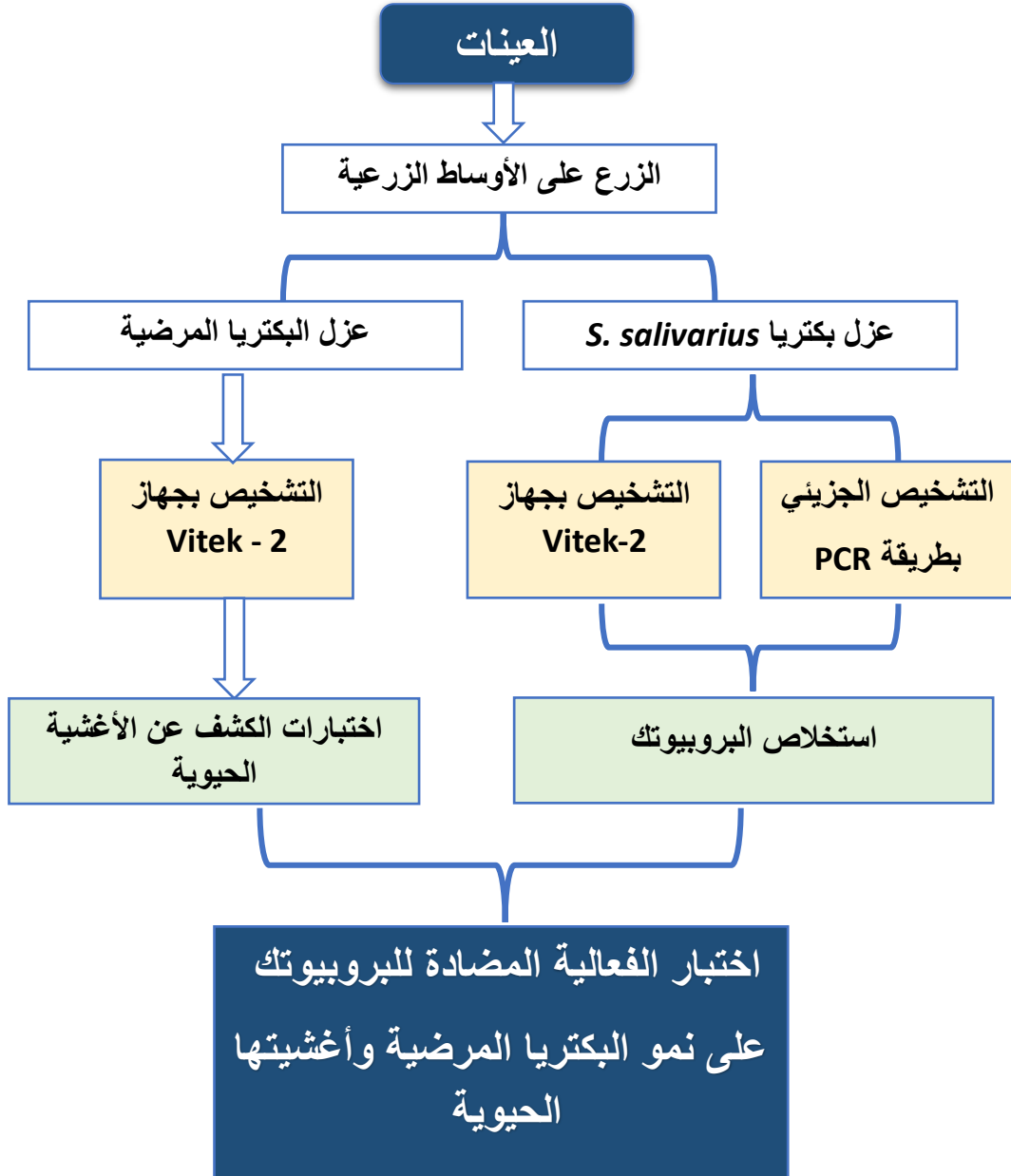
الأوساط الزرعية التي استخدمت في هذه الدراسة كما في الجدول (3 - 3).

جدول (3 - 3): أنواع الأوساط الزرعية المستخدمة

الغرض منه	الشركة المصنعة والمنشأ	الوسط الزرع
عزل بكتريا <i>S. salivarius</i>	Himedia - India	Mitis – Salivarius agar
تنشيط وعزل بكتريا <i>S. salivarius</i>	Himedia - India	HiCrom strep B Selective agar
وسط اغنائي لكل أنواع البكتريا	Himedia - India	Blood agar
عزل البكتريا المرضية السالبة لصبغة غرام	Himedia - India	MacConkey agar
اختبار حساسية العزلات البكتيرية لمستخلص البروبيوتيك	Himedia - India	Mueller – Hinton agar
عزل بكتريا <i>S. aureus</i>	Himedia - India	Mannitol salt agar
استخلاص البروبيوتيك من بكتريا <i>S. salivarius</i>	Himedia - India	Tryptone soya broth (TSB)
نقل العينات الى المختبر	Himedia - India	Brian-Heart infision broth
لحفظ وتنمية العزلات البكتيرية النقية	Himedia - India	Nutrient agar media
للتحري عن قابلية البكتريا على تكوين الأغشية الحيوية	Himedia - India	Congo red ager

2-3: طرائق العمل Methods:

تصميم الدراسة:



1-2-3: جمع العينات Sample collection

تمّ جمع 83 مسحة Swab من منطقة الفم وما حول الاسنان من 83 مراجع للمركز الصحي في حي العباس/ المركز والمركز الصحي في قضاء الحر والمركز الصحي في ناحية عون وكذلك العيادة التخصصية لطبّ الأسنان في شارع الإسكان في محافظة كربلاء المقدسة للمدة من 12/10/2022 ولغاية 12/2/2023 وتراوحت أعمارهم بين (6-63) سنة، وأخذت العينات من منطقة الفم وما حول الأسنان بمسحات قطنية معقمة وتحت إشراف طبيب أسنان مختص (الذي شخص الأصحاء والمرضى)، ثمّ نقلت المسحات إلى المختبر وزرعت على الأوساط الزرعوية الصلبة في درجة حرارة 37 م° ولمدة 24 ساعة ونقلت المستعمرات البكتيرية التي تمتلك صفات *S. salivarius* إلى الأوساط الانتخابية ثمّ تشخيصها بجهاز (Vitek-2 compact system) ثمّ حفظت بدرجة 4 م° ونقلت المستعمرات التي تحمل صفات البكتريا المرضية إلى الأوساط الانتخابية لتأكيد التشخيص، وتمّ تشخيصها أيضا بجهاز (Vitek-2 compact system).

2-2-3: تحضير الأوساط الزرعوية Culture media

حضرت الأوساط الزرعوية الجاهزة بحسب تعليمات الشركات المصنعة، وعقمت بجهاز المؤصدة بدرجة حرارة 121م° وضغط 15 باوند/ انج² لمدة 15 دقيقة، مثل وسط Blood agar.

1-2-2-3: تحضير وسط الكونغو الأحمر Congo red agar

حضر هذا الوسط من المواد الآتية:

37 غم	Brain Heart Infusion Broth	مرق نقيع القلب والدماغ
50 غم	Sucrose	سكروز
10 غم	Agar – Agar	آكار – آكار
0,8 غم	Congo Red	صبغة أحمر الكونغو
900 مل	D. W	ماء مقطر

أذيبت جميع هذه المواد وأكمل الحجم إلى 900 مل من الماء المقطر باستثناء صبغة أحمر الكونغو التي حضرت بإذابتها بـ 100 مل من الماء المقطر، وعقّم كل من الوسط وصبغة أحمر الكونغو بالمؤصدة، ثمّ

ترك الوسط بدرجة 55 م°، وأضيف له صبغة أحمر الكونغو، وصبّ بأطباق معقمة (Freeman *et al.*, 1989; Sultan & Nabil, 2018).

3-2-2: تحضير وسط تربتكيز الصويا السائل – كلوكوز 1% (TSB-glu 1%):

حضر هذا الوسط حسب تعليمات الشركة المصنعة وعقّم بالمؤصدة، وبعد التعقيم ترك الوسط ليصل إلى درجة حرارة 45 – 50 م°، ثم أضيف إليه نسبة 1% من سكر الكلوكوز بعد تعقيمه في مرشحات دقيقة (Mireles *et al.*, 2001).

3-2-3: زرع بكتريا *S. salivarius* على الأوساط الصلبة:

زرعت العينات على الوسط الانتخابي هايكروم اكار بإضافة 5 مل من المضاد الحيوي G C N- Selective supplement المكون من (Colistin 10 ملغم, Nalidixic Acid 10 ملغم, Gentamicin 2 ملغم) لتأكيد التشخيص وحضنت بدرجة حرارة 37 م° ولمدة 24 ساعة.

3-2-4: زرع البكتريا المرضية على الأوساط الصلبة:

زرعت العينات على الأوساط الزرعية Blood agar, Mannitol salt , MacConkey agar وحضنت بدرجة حرارة 37 م° ولمدة 24 ساعة.

3-2-5: تنقية المزارع البكتيرية:

تم انتقاء المستعمرات البكتيرية النامية، ثم نشرها بطريقة التخطيط، وقد كررت العملية ثلاث مرات لغرض الحصول على مستعمرات نقية.

3-2-6: التشخيص بجهاز Vitek-2:

استعملت بطاقة تشخيص البكتريا الموجبة لصبغة غرام (Gram Positive) GP ID card وبطاقة تشخيص البكتريا السالبة لصبغة غرام (Gram Negative Identification card) وبطاقة تشخيص البكتريا السالبة لصبغة غرام (GN ID card) وبطاقة التشخيص الخاصة بهما، وصممت البطاقات الخاصة بهذا النظام للتشخيص

الأوتوماتيكي للأنواع الموجبة والسالبة لصبغة غرام ويعتمد التشخيص بها على الطرق الكيموحيوية وهناك 43 اختبار كيموحيوي مختلف يكشف بها عن استهلاك مصادر الكربون والفعالية الأنزيمية والمقاومة ونتيجة التشخيص النهائي تستغرق من 6-8 ساعات، تحتوي البطاقة على 64 حفرة تحتوي على أوساط زرع خاصة حاوية على مواد أساس خاصة بالاختبارات الكيموحيوية (Mahmoud *et al.*, 2020).

خطوات التلقيح:

- 1- استخرجت البطاقة ID من غلافها وسجل رقم النموذج على السجل الخاص بالجهاز.
- 2- حُضِر العالق البكتيري بأخذ عدد كافي من مستعمرات المزرعة النقية ومزجها بـ 3.0 مل من محلول Normal saline في أنابيب بلاستيكية شفافة ورقمت (1).
- 3- قيسست عكورة هذا العالق البكتيري بجهاز العكورة الخاص بجهاز Vitek-2 compact (Densichek™)، إذ كانت ما بين 0.5 – 0.63.
- 4- عُمرت أنبوبة النقل بجزئها الطويل المتصل بالبطاقة ID في أنبوبة الاختبار رقم (1) ووضعت على حامل الأنابيب (Cassette) يدوياً.
- 5- نُقل الحامل إلى داخل الجزء المخصص لتلقيح البطاقات (Vaccum chamber) داخل الجهاز، إذ لقت البطاقة وتُحري عن تلقيحها بصورة صحيحة وهي بداخله، إذ عمَل الجهاز على قطع انبوبة النقل، ثم نُقلت البطاقة إلى داخل الحاضنة الخاصة بالجهاز لغرض حضنها بدرجة 35.5 م°، وقُرأت النتيجة خلال 8 ساعات أو أقل.
- 1- عمل الجهاز خلال فترة الحضانة على تحليل وخرن الأنماط الكيموحيوية بصورة ذاتية وبعد مدة الحضانة حللت برمجيات الجهاز هذه الأنماط وتمت طباعة تقرير التشخيص لكل بطاقة موجودة داخل الـ Reader incubator (Pincus, 2006).

3-2-7: التشخيص الجزيئي لبكتريا *S. salivarius* :

3-2-7-1: استخلاص الحامض النووي DNA:

تمّ استخلاص الحامض النووي DNA باستخدام عُدّة الـ FavorPrep™ Blood/Cultured Cells Genomic DNA Extraction Mini Kit المجهزة من قبل شركة Favorgen (Korea) كما في الخطوات التالية:

1. أخذ 1 مل من العالق البكتيري ووضع في أنبوبة ابندروف وبعدها نقل إلى جهاز الطرد المركزي بسرعة 18000 دورة/ الدقيقة لمدة دقيقة واحدة.
2. التخلّص من الطافي واخذ المترسب وأضيف له 200 مايكرو ليتر من محلول lysozyme buffer الذي يعمل على تحطيم الخلايا وعمل رج مستمر له باستخدام الـ vortex لمدة دقيقة واحدة.
3. ترك الخليط في درجة حرارة الغرفة لمدة 10 دقائق مع التقليب كل 2-3 دقائق خلال هذه المدة.
4. أضيف 200 مايكرو ليتر من محلول (FABG buffer) إلى العينة وعمل رج له باستخدام الـ vortex لمدة 5 ثواني.
5. حُصّن الخليط لمدة 10 دقائق بدرجة حرارة 70 م° مع تقليب الانبوبة كل 3 دقائق خلال مدة الحضانة.
6. وضع محلول Elution buffer في الفرن الحراري على درجة 70 م° وبقى لحين الانتهاء من العمل.
7. أضيف 200 مايكرو ليتر من الايثانول المطلق إلى الانبوبة وعمل رج لها باستخدام الـ vortex لمدة 10 ثواني لعمل الغسل الاولي.
8. نقل عمود الـ FABG (FABG column) إلى الانبوب الجامع (collection tube) ونقل إلى جهاز الطرد المركزي بسرعة 18000 دورة/ دقيقة لمدة دقيقة واحدة.
9. التخلّص من الأنبوب الجامع ووضع في أنبوب جديد.
10. أضيف 400 مايكرو ليتر من محلول (W1 buffer) إلى العمود ووضع في جهاز الطرد المركزي بسرعة 18000 دورة/ دقيقة لمدة 30 ثانية والتخلص من المحلول والتخلص من الأنبوب الجامع لعمل الغسل الثاني.
11. وضع بأنبوب جامع جديد واطيف 600 مايكرو ليتر من محلول (Wash buffer) إلى العمود ووضع بجهاز الطرد المركزي بسرعة 18000 دورة/ دقيقة لمدة 30 ثانية ثم التخلص من المحلول لإتمام الغسل الثالث.
12. وضع العمود في جهاز الطرد المركزي لمدة 3 دقائق وبسرعة 18000 دورة/ دقيقة للتجفيف والتخلص من الرواسب في حال وجدت.
13. وضع العمود في أنبوبة ابندروف، وأضيف إليه 100 مايكرو ليتر من محلول (Elution buffer) ويضاف مباشرة على الفلتر لضمان نزول الحامض النووي في الابندروف.
14. حُصّن بدرجة حرارة 37 م° لمدة 10 دقائق.
15. نُقل المحلول إلى جهاز الطرد المركزي لمدة دقيقة واحدة وبسرعة 18000 دورة/ دقيقة لاستخراج الحامض النووي بصورة نقية.

3-2-7-2: قياس تركيز ونقاوة الحامض النووي DNA:

تمّ الكشف عن الحامض النووي DNA باستخدام جهاز Spectrophotometer Uv-1900i بتحديد تركيز الحامض النووي DNA ملغم/مل وقياس نقاوته من خلال قراءة الامتصاصية بدرجة (260/280) كما يأتي:

- 1- تشغيل جهاز Spectrophotometer Uv-1900i ثم اختيار برنامج قياس الحامض النووي DNA.
- 2- تصفير الجهاز بوضع 2 مايكرو ليتر من (Free nuclease water) على سطح ركيزة المقياس وصفرت ثم نظفت بأوراق التنشيف لقياس العينات.
- 3- أخذ 1 مايكرو ليتر من المستخلص ووضع على ركيزة القياس.
- 4- حدّدت نقاوة العينة لمستخلص DNA من خلال قراءة الامتصاصية بجهاز Spectrophotometer Uv-1900i على طولين موجيين (260/280 نانو ميتر)، إذ يعدّ الحامض النووي نقياً عندما تكون قيمة الامتصاصية (1.8 ± 0.2) .

3-2-7-3: تحضير هلام الاكاروز:

حُضِر هلام الاكاروز وفق الخطوات الآتية:

- 1- وزن الاكاروز في ورق مخروطي (1.5 غم).
- 2- أضيف 100 مل من دارى الترحيل الكهربائي TBE المخفف الى الدورق.
- 3- اذيب الخليط في جهاز المايكرو ووف مع مراعاة عدم غليان الخليط.
- 4- ترك الخليط ليبرد بدرجة حرارة الغرفة لحين وصوله لدرجة 60 م°.
- 5- أضيف إلى الخليط صبغة الايثيديوم برومايد بحجم 6 مايكرو ليتر وتحريك الدورق ليتجانس وترك ليبرد بدرجة حرارة الغرفة.
- 6- وضع المشط في قالب الهلام.
- 7- صبّ الخليط في قالب الهلام وترك ليتصلب بدرجة حرارة الغرفة.
- 8- أزيل المشط من القالب بحذر لمراعاة عدم تلف الحفر (AL-Khalaf, 2021).

1-3-7-2-3: الترحيل الكهربائي:

تم أخذ حجم واحد من المحلول المخزن مقابل 9 حجوم من الماء المقطر لتحضير 10 ml TBE buffer، إذ يعدّ الترحيل الكهربائي لهلام الاكاروز هي الطريقة الأمثل لفصل أجزاء الحامض النووي (Prifer, 1984).

2-3-7-2-3: فحص تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل (PCR):

أجري فحص الـ PCR لعينات الـ DNA باستخدام عدة 2 × GoTaq® Green Master Mix المجهزة من شركة بروميغا الأمريكية (جدول 3-4) وكما يأتي:

أ- تحضير مزيج تفاعل PCR للجين الهدف (*gtfk*) حسب جدول (3 – 4):

جدول (3 – 4): مكونات مزيج تفاعل PCR للجين الهدف *gtfk*

PCR master mix	Volume
Green Master Mix × 2	12.5 µL
forward	2 µL
reverse	2 µL
Nuclease free water	4.5 µL
DNA template	4 µL
Total	25 µL

ب- أضيفت المكونات التي ذكرت في الجدول أعلاه الى انابيب PCR وحركت باليد لمزج المكونات، وبعدها نقلت الأنابيب إلى جهاز المدور الحراري Thermal cycler وطبقت الظروف الحرارية Thermocycler condition على العينات كما في الجدول (3 – 5).

جدول (3 - 5): العُدَد الكيمائية المستخدمة

ت	اسم العُدّة	الشركة المصنعة والمنشأ
1	FavorPrep™ Blood/Cultured Cells Genomic DNA Extraction Mini Kit	Favorgen (Korea)
2	GoTaq® Green Master Mix × 2	Promega (USA)

جدول (3 - 6): البادئ المستخدم في الدراسة

البادئ	التسلسل (5' → 3')	الحجم
<i>gtfk</i> (AL-Qazzaz et.al.,2014)	F GTGTTGCCACATCTTCACTCGCTTCGG	544 bp
	R CGTTGATGTGCTTGAAAGGGCACCATT	

F: البادئ الامامي (Forward)

R: البادئ الخلفي (Reverse)

جدول (3 - 7): الظروف الحرارية المثلى لمراحل PCR للجين *gtfk*

Step	Temperature	Time	Cycles no.
Initial denaturation	95 م°	2 min	× 40
Denaturation	95 م°	30 sec	
Annealing	66 م°	45 sec	
Extension	72 م°	40 sec	
Final extension	75 م°	5 min	

3-2-8: التحري عن قابلية العزلات المرضية على تكوين الغشاء الحيوي Biofilm:

تمّ التحري عن قابلية العزلات المرضية على تكوين الغشاء الحيوي بطريقتين:

3-2-8-1: طريقة آكار أحمر الكونغو (CRA) Congo red agar:

نُميت المستعمرات البكتيرية على وسط آكار احمر الكونغو المحضّر في الفقرة (3 - 2 - 2 - 1)، وحضّنت هوائياً لمدة 24 - 28 ساعة، بدرجة حرارة 37 م°، إذ تعدّ النتيجة موجبة عندما تظهر المستعمرات سوداء اللون، مع كثافة بلورية جافة، أمّا بقاء المستعمرات وردية اللون فنتيجتها سالبة (Mathur *et al.*, 2006 ; Freeman *et al.*, 1989).

3-2-8-2: طريقة صفائح المعايرة الدقيقة (MTP) Microtiter plate:

استخدم الفحص الكمي quantification لتكوين الغشاء الحيوي وذلك بتلقيح الحفر wells الحاوية على 175 مايكرو ليتر من وسط 1% TSB-glu بـ 25 مايكرو ليتر من مزارع البكتريا المرضية قيد الدراسة كلاً على انفراد، ملأت 4 من الحفر بالوسط 1% TSB-glu المعقم دون لقاح بكتيري، واستخدمت للسيطرة، ثمّ حركت الصفيحة بهدوء وغطيت بشريط شمعي لاصق Parafilm، حضنت الصفيحة لمدة 18-24 ساعة بدرجة حرارة 35 م°، سكب المزروع البكتيري، وغسلت الأنابيب بمحلول بفر (PH 7.3)، ثمّ جففت بدرجة حرارة الغرفة، وصبغت بـ 200 مايكرو ليتر من صبغة البنفسج البلوري 1% لمدة 20 دقيقة ثمّ غُسلت عدة مرات بماء مزال الأيونات Deionized water وجففت بدرجة حرارة الغرفة لمدة 15 دقيقة بعدها أضيف 200 مايكرو ليتر من الإيثانول 95%، ويفضل تكرار كل عينة مرتين Duplicate واستخدمت القياسات المناعية المباشرة Direct ELISA وبعد ظهور النتائج يؤخذ المتوسط، وقرأت النتيجة باستخدام جهاز الاليزا ELISA reader لتقدير الكثافة الضوئية (OD) Optical density على طول موجي 570 نانوميتر، وقيست الكثافة الضوئية للغشاء الحيوي Biofilm حسب المعادلة الآتية:

$$\text{Mean OD (control)} - \text{Mean OD (test)} = \text{OD Biofilm}$$

(Christensen *et al.* 1985; Mireles *et al.*, 2001).

3-2-9: مستخلص البروبيوتيك لبكتريا *S. salivarius*:

حضّر المستخلص بتنشيط البكتريا على وسط هاي-كروم اجار وحضنت بدرجة حرارة 37°C لمدة 24 ساعة، ثمّ اخذت منها مستعمرة نامية بواسطة ناقل الى وسط تربتون-سويا بروت Tryptone soya broth (TSB) المحور والذي تمّ تحضيره بإضافة خلاصة الخميرة Yeast extract بنسبة 13 غم/مل وكاربونات الكالسيوم CaCO₃ بنسبة 1.4 غم/مل وتم تعديل الرقم الهيدروجيني PH إلى 7 لمدة حضن 24 ساعة عند درجة حرارة 37 م°، ثمّ رج المستخلص بواسطة جهاز الطرد المركزي بمعدل (8000

3. حضر اللقاح البكتيري بنقل مستعمرات مفردة ونقية من البكتريا إلى أنبوبة تحوي 5 مل من المحلول الملحي الفسلجي وتمت مقارنة عكورته مع عكورة أنابيب ماكفر لاند رقم 0.5 للحصول على عالق بكتيري 1.5×10^8 خلية/مل.
4. اعتبرت الانوبتان رقم 1 ، ورقم 12 أنابيب سيطرة موجبة وسالبة، تحوي الأولى على الوسط الزراعي والعالق البكتيري، وتحوي الثانية على الوسط الزراعي فقط.
5. أضيف 0.1 مل من العالق البكتيري المحضّر بالخطوة السابقة إلى الأنابيب من 2 – 11.
6. رجّت جميع الأنابيب وحضّنت بدرجة 37 درجة مئوية ولمدة 24 ساعة، وبعد انتهاء مدة الحضان فحست الأنابيب لوجود أو عدم وجود العكورة Turbidity.
7. حدّد تركيز المثبط الأدنى (MIC) Minimum Inhibitory Concentration بعد الحضان والذي يمثل أقل تركيز من البروبيوتك لم يلاحظ فيه نمواً بكتيرياً مرئياً.

3-2-12: اختبار الفعالية التثبيطية Inhibition activity test

استخدمت طريقة الانتشار بالحفر Well diffusion للكشف عن الفعالية التثبيطية للمستخلص المائي للبكتريا اللعابية *S. salivarius* ضد الأنواع البكتيرية المرضية *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *S. aureus* و *S. epideridis*.

- 1- خفّفت العزلات بالمحلول الفسيولوجي للوصول إلى عكورة أنبوبة ماكفر لاند القياسية (5).
- 2- نشرت العزلات بواقع 100 مايكروليتر لكل طبق بواسطة مسحات قطنية معقمة، وتركت لمدة 20 دقيقة لغرض الامتصاص.
- 3- استخدم ثاقب فليبي لعمل ثقب قطرها 9 ملم على سطح الاكار المزروع ثم ملئت كل حفرة بواقع 100 مايكروليتر من كل تركيز من التراكيز (75 ، 150 ، 300 ، 600) وبمعدل حفرة لكل تركيز مع حفرة في الوسط للماء المقطر Distilled water بوصفه معامل السيطرة وحضر بمعدل ثلاث مكررات لكل تركيز.
- 4- حضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 م° ولمدة 24 ساعة.
- 5- قيست مناطق التثبيط حول الحفر وقورنت مع معامل السيطرة الحاوي على الماء المقطر.

3-2-13: التحليل الاحصائي Statistical analysis:

تمّ استخدام اختبار تحليل التباين Anova table لاختبار معنوية الفروق بين المجموعات التجريبية، وكذلك تمّ استخدام اختبار الفرق المعنوي الأصغر Least Significant Difference LSD عند مستوى احتمالية 0.05 لبيان مواقع الفروق بين المجموعات التجريبية (Williams, 2010).

الفصل الرابع

النتائج

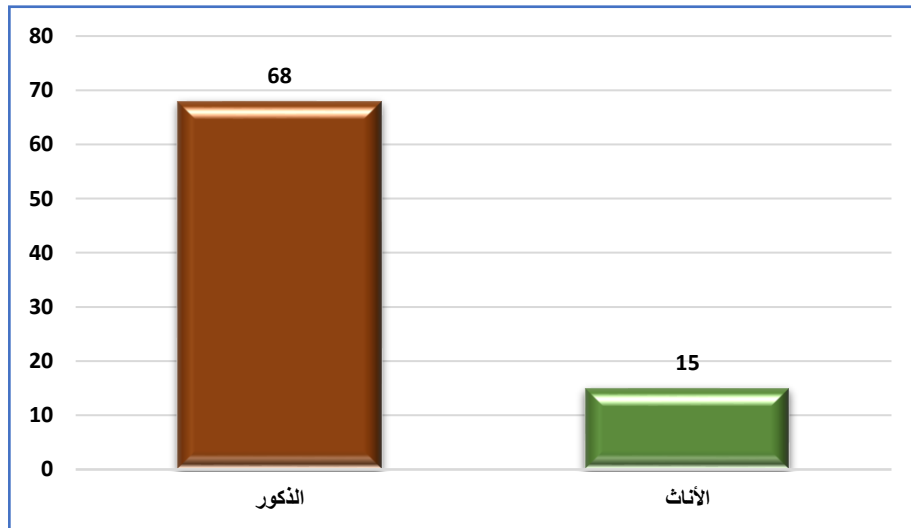
The Results

الفصل الرابع :Chaper Four

4 – 1: عينات الدراسة :Study Samples

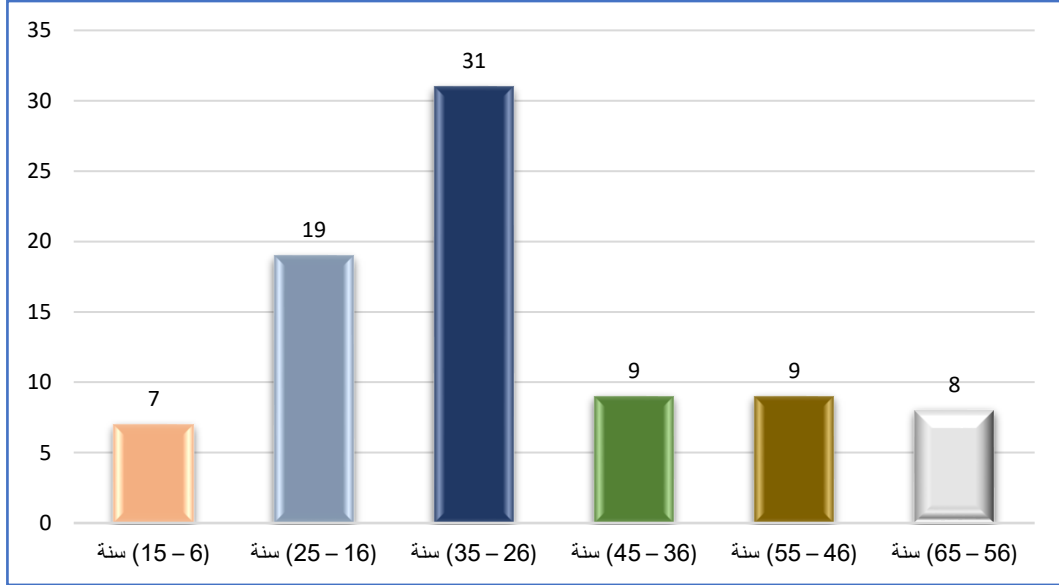
يتمثل مجتمع الدراسة الحالية الأفراد الأصحاء، والأفراد المصابين بتسوس الأسنان، وبواقع (83) شخصاً، ومن مناطق متفرقة في محافظة كربلاء المقدسة، وهم يمثلون الأشخاص المراجعين للمراكز الصحية، والعيادات التخصصية لطب الأسنان، فضلاً عن مرافقين المرضى لتلك المراكز والعيادات، إذ تم أخذ العينات من المراكز الصحية، وهي: (المركز الصحي في حي العباس/ المركز، والمركز الصحي في قضاء الحر، والمركز الصحي في ناحية عون). وكذلك العيادات التخصصية لطب الأسنان في عيادات (حي الأسكان، ومركز المحافظة، حي المعلمين). ونظمت استمارة معلومات لكل عينة منهم الملحق (1).

شملت عينات الدراسة من الذكور (68)، وشكل نسبة (81,9%). فيما بلغ عدد الإناث (15)، وبما يشكل نسبة (18,1%) من عينات الدراسة، وكما موضح في الشكل رقم (4 – 1) وملحق (4).



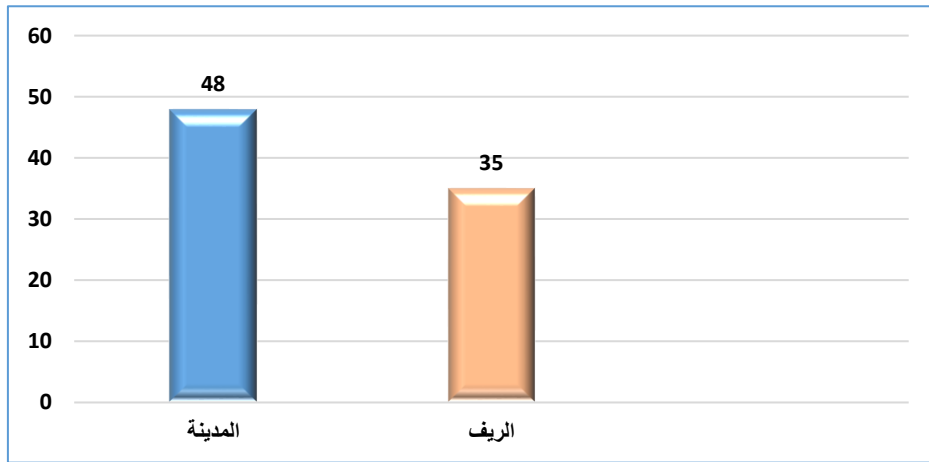
الشكل (4 – 1): توزيع العينات حسب الجنس

إنّ غالبية عينات الدراسة للفئة العمرية (26 – 35) سنة، وبلغ عددهم (31)، ونسبتهم (37,4%) من عينات الدراسة، وتلتها الفئة العمرية (16 – 25) سنة، وبلغ عددهم (19) ونسبتهم (22,9%)، وكما موضح في الشكل رقم (4 – 2)، وملحق (5).



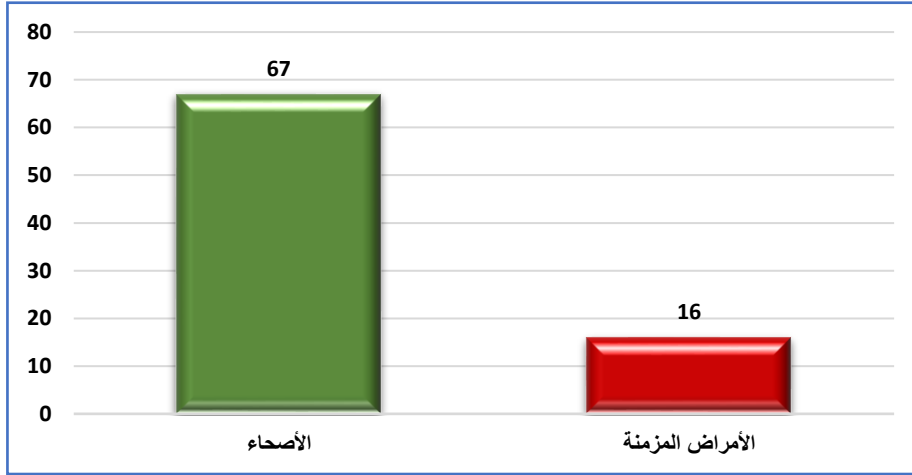
الشكل (4 – 2): توزيع العينات حسب الفئة العمرية

و غالبية عينات الدراسة من سكنة المدينة فقد بلغ عددهم (48) ونسبتهم (57,8%)، وسكنة الريف (35) ونسبتهم (42,2%)، وكما موضح في الشكل رقم (4 – 3)، وملحق (6).



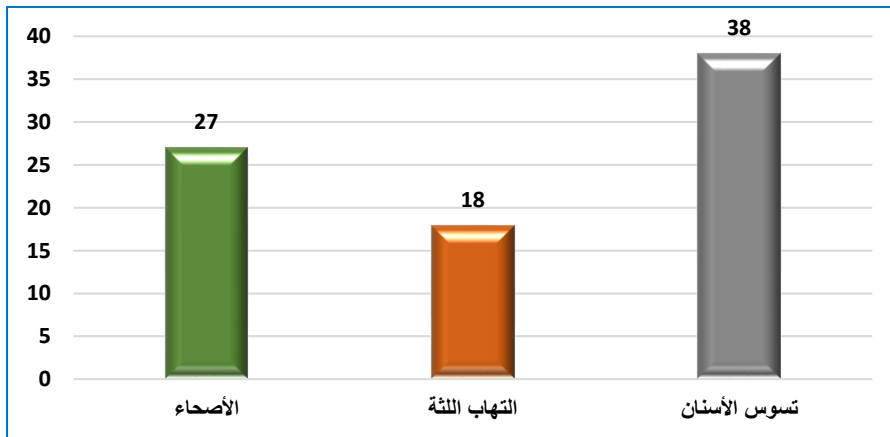
الشكل (4 – 3): توزيع العينات حسب مكان الإقامة

وأظهرت عينات الدراسة أنّ غالبيتهم من الأصحاء غير المصابين بأمراض مزمنة كأعراض ضغط الدم المزمن، ومرض السكري، إذ بلغ عددهم (67) ونسبتهم (80,7%) من عينات الدراسة. فيما بلغ عدد الأفراد المصابين بالأمراض المزمنة (16) ونسبتهم (19,3%). كما موضح في الشكل رقم (4 - 4)، وملحق (7).



الشكل (4 - 4): توزيع العينات حسب الأمراض المزمنة

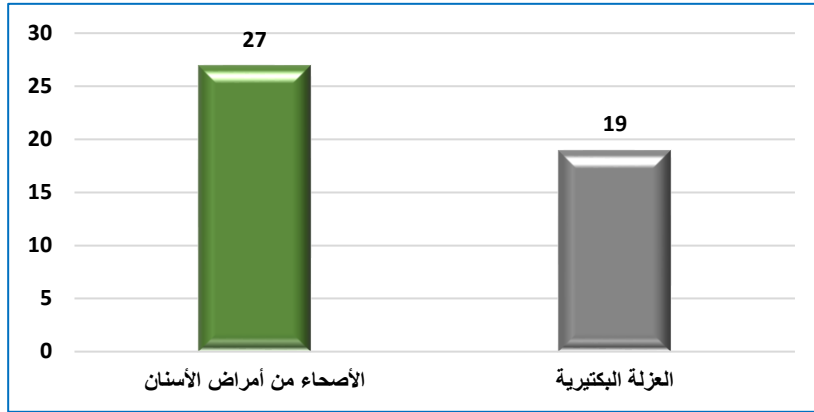
إنّ غالبية أفراد عينات الدراسة من المصابين بمرض تسوس الأسنان، إذ بلغ عددهم (38)، وبلغت نسبتهم (45,8%)، وبلغ عدد المصابين بالتهاب اللثة (18) وشكّلت نسبتهم (21,7%). فيما بلغ عدد الأفراد غير المصابين بتسوس الأسنان، أو التهاب اللثة (27)، وشكّلت نسبتهم (32,5%). كما موضح في الشكل رقم (4 - 5)، وملحق (8).



الشكل (4 - 5): أمراض الأسنان لأفراد عينات الدراسة

4 - 2: العزل والتشخيص:

تمّ الحصول على (19) عزلة بكتيرية من البكتريا اللعابية *S. salivarius* من منطقة الفم، وما حول الأسنان، وذلك من عينة الأفراد الأصحاء فقط (الذين لا يشكون من أمراض الأسنان) والذكور دون الإناث ومن الفئة العمرية المحصورة بين (16 - 35) سنة، ومن سكنة الأرياف، وكان عددهم (27)، ونسبتهم (32,5%) من عينات الدراسة، وبالتالي قد شكّلت العزلة البكتيرية ما نسبته (70,4%) من الأفراد الأصحاء الذين أشرنا لهم سلفاً، وكما يوضح ذلك الشكل رقم (4 - 6)، وملحق (9).



الشكل (4 - 6): عدد عزلات بكتريا *S. salivarius* من عينة الأصحاء

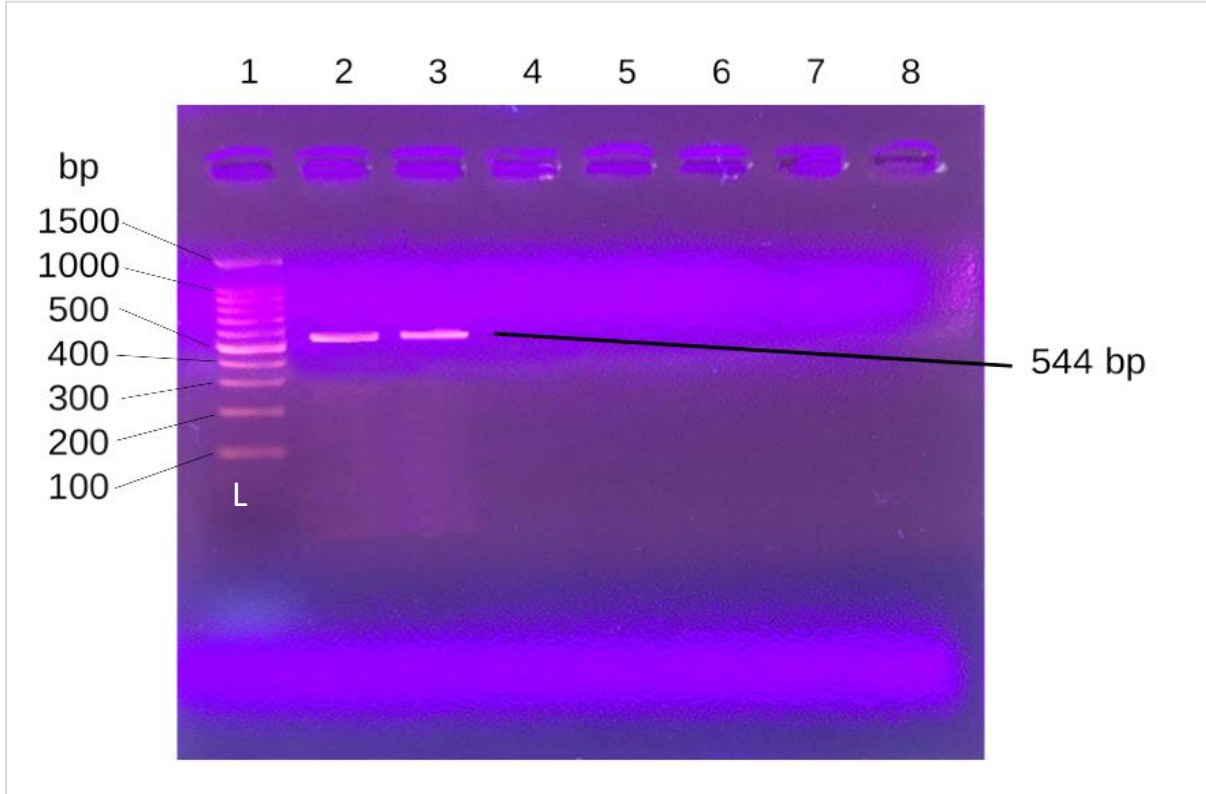
استخدمنا وسط مايتس سالفارس اكار (MSA) ووسط هايكروم آكار (HSA) لعزل البكتريا *S. salivarius*، إذ تسمح هذه الأوساط بنمو أنواع المكورات العقدية، وتنشيط نمو الكثير من أنواع البكتريا الموجودة في الفم بسبب صفاتها الانتقائية والتفاضلية الخاصة والمفيدة في عزل العقديات والمكورات المعوية من المصادر التي تحتوي على الكائنات المتعايشة Normal flora، إذ إنّ البكتريا اللعابية تعمل على استقلاب السكر الذي يعدّ مصدر طاقة الكربون وتتطور بشكل مستعمرات في الوسط. وظهرت البكتريا اللعابية بلون أزرق بشكل كروي، وبسلاسل أو على شكل أزواج، وكما يوضحه الشكل رقم (4 - 7).



الشكل (4 - 7): مستعمرات بكتيريا *S. salivarius* على وسط هايكروم

4 - 3: الكشف عن جين *gtfk* :

شخصت عزلات *S. salivarius* (19 عزلة) بشكل نهائي، وباستعمال البادئ النوعي للجين *gtfk* للكشف عن جين *gtfk* في جينومها لتأكيد التشخيص، وبتقنية تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل PCR باستخدام جهاز ال-PCR. وبينت النتائج أنّ (2 عزلة) كانت موجبة من (19 عزلة)، وتمّ تشخيصها على أنّها *S. salivarius* لاحتوائها على الجين *gtfk* (544 زوج قاعدة)، وكما موضح في الشكل (4 - 8).



الشكل (4 - 8): الترحيل الكهربائي لنتائج تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل PCR للجين *gtfk* (544 زوج قاعدة) لعزلات بكتريا *S. salivarius* بفرق جهد 75 فولت لمدة 35 دقيقة، هلام الاكاروز بنسبة 1.5%. المسار (L) يمثل دليل الحجم Ladder (100 - 1500) زوج قاعدة، المسارات (2، 3) تمثل العينات الموجبة، والمسارات (4 - 8) تمثل العينات السالبة.

4 - 4: عزل وتشخيص البكتريا المرضية:

استخدمت الأوساط Blood agar كوسط اغثائي لكل أنواع البكتريا، ووسط MacConkey agar كوسط لعزل البكتريا المرضية السالبة لصبغة غرام، ووسط Mannitol salt agar كوسط عزل بكتريا *S. aureus*، وتم الحصول على أربعة أنواع من البكتريات المرضية *S. aureus*، *S. epidermidis*، *K. pneumoniae* و *E. cloacae* من الأفراد غير الأصحاء (المصابون بالتهاب اللثة، أو تسوس الأسنان) والبالغ عددهم (56) شخصاً، وبنسبة (67,5%). وتم الحصول على 7 عزلات بكتيرية من بكتريا *S. aureus* و 4 عزلات بكتيرية من بكتريا *K. pneumoniae*، و 3 عزلات بكتيرية من بكتريا *E. cloacae*، وعزلة بكتيرية واحدة من بكتريا *S. epidermidis*. وتم الحصول على عزلة بكتيرية نقية واحدة لكل نوع، والتي تم تشخيصها بجهاز Vitek - 2، ملحق (10).

4 - 5: اختبارات الكشف عن الأغشية الحيوية Biofilm:

تمّ الكشف عن تكوين الأغشية الحيوية باختبارين، هما:

4 - 5 - 1: الاختبار بطريقة أكار أحمر الكونغو (CRA) Congo red agar:

خلال مدة 24 ساعة من الحضان ظهرت مستعمرات سوداء اللون على وسط أحمر الكونغو، للبكتريا السالبة والموجبة لصبغة غرام، وعند زيادة مدة الحضان إلى 48 ساعة زاد ظهور المستعمرات السوداء اللون، وتعدّ هذه المستعمرات مؤشراً على قابلية البكتريا المرضية المعزولة من مرضى الفم على تكوين الغشاء الحيوي. كما موضحة في الجدول (4 - 1)، والشكل (4 - 9).

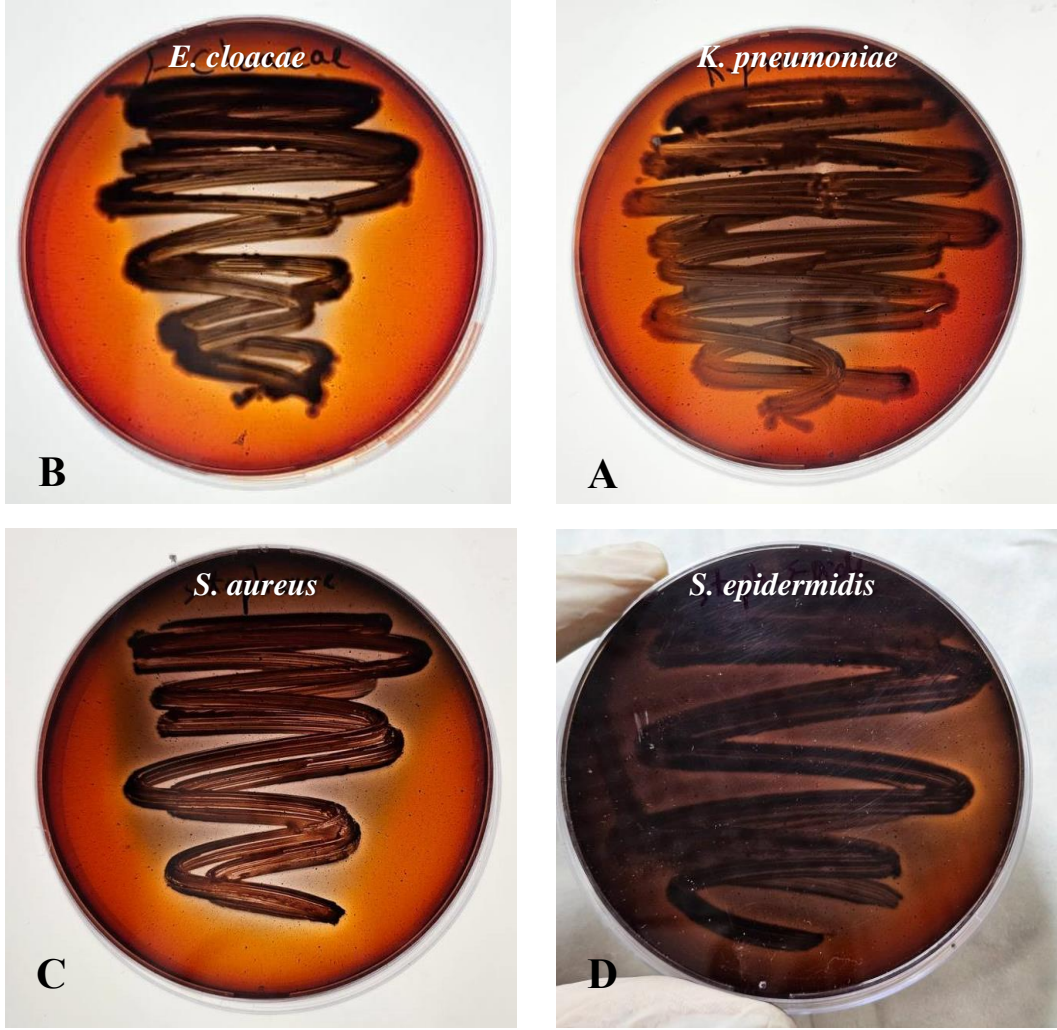
جدول (4 - 1): قابلية البكتريا المرضية المعزولة من مرضى الفم على

تكوين الغشاء الحيوي Biofilm بطريقة Congo red agar (CRA)

المسبب المرضي	24 ساعة	48 ساعة
<i>K. pneumoniae</i>	+	++
<i>E. cloacae</i>	+	++
<i>S. epidermidis</i>	+	++
<i>S. aureus</i>	+	++

(+) نتيجة موجبة مدة 24 ساعة

(++) نتيجة موجبة مدة 48 ساعة



الشكل (4 – 9): قابلية البكتريا المرضية على تكوين الغشاء الحيوي Biofilm بطريقة CRA

A: (*K. pneumoniae*), B: (*E. cloacae*), C: (*S. aureus*), D: (*S. epidermidis*).

4 – 5 – 2: الاختبار بطريقة صفائح المعايرة الدقيقة (MTP) Microtiter Plate:

تمّ الكشف عن تكوين الغشاء الحيوي بطريقة صفائح المعايرة الدقيقة Microtiter Plate، إذ اختبرت قابلية العزلات المرضية على إنتاج الغشاء الحيوي بواسطة الاختبار الكمي بصفائح المعايرة الدقيقة باستخدام جهاز الاليزا بالاعتماد على قياسات الكثافة الضوئية Optical density على طول موجي 570 نانوميتر (Sultan and Nabel, 2019).

صنفت العزلات المرضية وفقاً لتكوينها للغشاء الحيوي اعتماداً على المعايير التي نصّ عليها من قبل (Bose et al., 2009): أقل من (0.120) غير منتجة للغشاء الحيوي، و(0.120 – 0.240) منتجة ضعيفة

أو متوسطة للغشاء الحيوي، وأكثر من (0.240) منتجة قوية للغشاء الحيوي، وتمّ حساب قابلية تكوين الغشاء الحيوي وفق المعادلة الآتية:

$$\text{Mean OD (control)} - \text{Mean OD (test)} = \text{OD Biofilm}$$

علماً إنّ السيطرة تساوي 0.123، فقد أظهرت النتائج إنّ جميع العزلات منتجة قوية للغشاء الحيوي باستثناء ثلاثة عزلات كانت منتجة ضعيفة أو متوسطة للغشاء الحيوي، وكما موضح في الجدول (4 – 2).

الجدول (4 – 2): تكوين الغشاء الحيوي Biofilm للبكتريا المرضية بطريقة Microtiter Plate (MTP)

OD	S.D±Mean	Bacteria
0.17	0.03±0.30	<i>K. pneumoniae</i>
0.25	0.14±0.37	<i>E. cloacae</i>
0.16	0.04±0.28	<i>S. aureus</i>
0.07	0.06±0.20	<i>S. epidermidis</i>
	0.05	P.V
	0.12	LSD

السيطرة = 0.123

0.120 > OD غير منتجة للغشاء الحيوي

0.240 – 0.120 منتجة ضعيفة أو متوسطة للغشاء الحيوي

0.240 < OD منتجة قوية للغشاء الحيوي

4 – 5 – 3: تحديد قيمة MIC لتركيز البربيوتك على نمو البكتريا المرضية:

بيّنت نتائج الدراسة الحالية إنّ قيمة التركيز المثبط الأدنى MIC والذي يمثّل أقل تركيز من البروبيوتك لم يلاحظ فيه نمواً بكتيرياً مرئياً، إذ بلغت قيمته 4 مايكروغرام/ مل للأصناف البكتيرية المرضية الأربعة قيد الدراسة (*S. epidermidis*، *S. aureus*، *E. cloacae*، *K. pneumoniae*). كما موضح في الجدول (4 – 3)، وملحق (11).

الجدول (4 - 3): قيمة MIC لتركيز البروبيوتك على نمو البكتريا المرضية

قيم MIC للبروبيوتك مايكروغرام/ مل	الأنواع البكتيرية
4	<i>K. pneumoniae</i>
4	<i>E. cloacae</i>
4	<i>S. aureus</i>
4	<i>S. epidermidis</i>

4 - 6: اختبار قابلية البروبيوتك Probiotic على تثبيط الغشاء الحيوي Biofilm بطريقة صفائح المعايرة الدقيقة (MTP) Microtiter Plate:

تم اختيار أربع عزلات من البكتريا المرضية المنتجة القوية للغشاء الحيوي بطريقة (MTP) وذلك لاختبار قابلية البروبيوتك على تثبيط الغشاء الحيوي المتكون من قبل البكتريا المرضية المعزولة من الفم. وقد استخدمت الطريقة الكمية بواسطة صفائح المعايرة الدقيقة للكشف عن قابلية البكتريا على تكوين الغشاء الحيوي باستخدام جهاز ELISA reader لحساب الكثافة الضوئية على الطول الموجي 570 نانوميتر لمعرفة الكمية المتكونة للغشاء الحيوي، إذ تم حساب كمية الغشاء الحيوي مقارنة بمعامل السيطرة الحاوية على وسط 1% TSBglu بدون مزرع بكتيري (Sultan and Nabel, 2019).

وأظهرت النتائج وجود فروق غير معنوية بين أنواع البكتريا المرضية عند مستوى احتمالية $0.05 \geq P$ ، بينما توجد فروق معنوية بين كل نوع بكتيري والسيطرة عند مستوى احتمالية $P \leq 0.05$ ، وكانت قيمة أقل فرق معنوي LSD (0.43)، إذ أظهرت بكتريا *K. pneumoniae* بمعدل (0.35 ± 0.21) ، وبكتريا *E. cloacae* بمعدل (0.24 ± 0.17) ، وبكتريا *S. aureus* بمعدل (0.30 ± 0.25) ، وبكتريا *S. epidermidis* بمعدل (0.29 ± 0.19) ، كما موضح في الجدول (4 - 4)، الملحق (12).

الجدول (4 - 4): مواقع الفروق بين أنواع البكتريا المرضية

S.D±Mean	Bacteria
0.35±0.21	<i>K. pneumoniae</i>
0.24±0.17	<i>E. cloacae</i>
0.30±0.25	<i>S. aureus</i>
0.29±0.19	<i>S. epidermidis</i>
0.00±0.90	control
0.00	p.v
0.43	LSD

وفيما أظهرت النتائج انخفاضاً ملحوظاً في تكوين الغشاء الحيوي بعد إضافة البروبيوتك، وقد بينت النتائج عدم وجود فروق معنوية بين التركيز الأول إلى التركيز السابع عند مستوى احتمالية $P \geq 0.05$ ، وكانت قيمة أقل فرق معنوي LSD (0.14)، إذ كانت أعلى قيمة امتصاصية كانت (0.01±0.01) بتركيز (1048 µg) و(0.02±0.01) بتركيز (524 µg)، و(0.02±0.01) بتركيز (262 µg)، وبلغت قيمة الامتصاصية (0.04±0.05) بتركيز (131µg)، و(0.04±0.06) بتركيز (65 µg)، و(0.04±0.07) بتركيز (32 µg) و(0.04±0.12) بتركيز (16 µg)، و(0.07±0.22) بتركيز (8 µg). بينما يوجد فرق معنوي عند مستوى احتمالية $P \leq 0.05$ ، إذ كانت قيمة الامتصاصية (0.09±0.61) بتركيز (4 µg)، و(0.13±0.86) بتركيز (2 µg) التي كانت أقل قيمة امتصاصية، وكما وضح في الجدول (4 - 5)، الملحق (13).

الجدول (4 – 5): قيم الامتصاصية للبكتريا المرضية المكونة للغشاء الحيوي بإضافة البروبيوتك بطريقة صفائح المعايرة الدقيقة (MTP)

S.D±Mean	Concentration µg
0.01±0.01	1048
0.02±0.01	524
0.03±0.02	262
0.04±0.05	131
0.04±0.06	65
0.04±0.07	32
0.04±0.12	16
0.07±0.22	8
0.09±0.61	4
0.13±0.86	2
0.16±0.83	control
0.00	p.v
0.14	LSD

4 – 7: تقدير الفعالية التثبيطية لمستخلص البروبيوتك لبكتيريا *S. salivarius* على نمو البكتريا المرضية:

تم اختبار الفعالية التثبيطية لمستخلص البروبيوتك لبكتيريا *S. salivarius* على (أربعة) أنواع من البكتريا المرضية قيد الدراسة، والتي تم زراعتها على الأوساط الزرعية Blood , MacConkey agar , Mannitol salt agar، وحصنت بدرجة حرارة 37 م°، ولمدة 24 ساعة. واستعملت تقنية التخفيف المتسلسل لتحديد نشاط البروبيوتيك، إذ تم استخدام طريقة الانتشار بالحفر لقياس الفعالية التثبيطية للبروبيوتيك على نمو أنواع البكتريا المرضية في كل تخفيف في الطبقة الزرعي، حسب التخفيف (75، 150، 300، 600) مايكرو ليتر/ مل من المحلول المخزن (100 مل)، وقد تم تكرار التجربة (ثلاثة) مرات لتأكيد الفعالية التثبيطية.

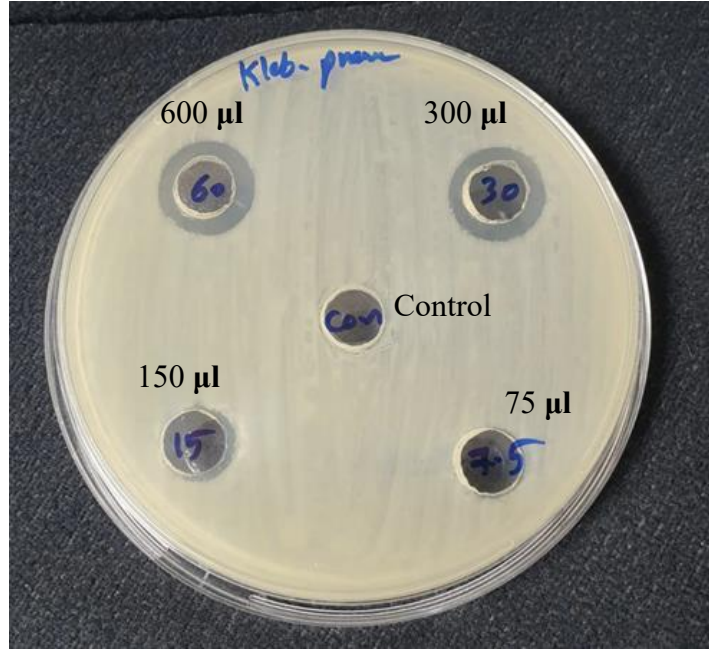
1-7-4: تقدير الفعالية التثبيطية على بكتيريا *K. pneumoniae* :

بيّنت نتائج الدراسة الحالية إنّ المناطق المثبّطة الناتجة عن مستخلص البروبيوتك، متفاوتة بأقطار التثبيط حسب التركيز، إذ بلغ قطر مناطق التثبيط لثلاث مكررات للتركيز 600 مايكرو لتر/ مل (7 ، 6 ، 5) ملم على التوالي، وعند المعاملة بالتركيز 300 مايكرو لتر/ مل بلغت (4 ، 4 ، 4) ملم على التوالي، وعند المعاملة بالتركيز 150 مايكرو لتر/ مل بلغت (3 ، 3 ، 2) ملم على التوالي، وعند المعاملة بالتركيز 75 مايكرو لتر/ مل بلغت (0 ، 0 ، 0) ملم على التوالي، كما في الشكل (4 - 10).

وقد أشارت نتائج التحليل الاحصائي إلى وجود فروق معنوية إحصائية بين التراكيز مقارنة بالسيطرة عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.05$)، وكانت قيمة أقل فرق معنوي LSD (0.83)، إذ كان الفرق الأكبر بين التركيز الأعلى (600 مايكرو لتر/ مل) والسيطرة، إذ بلغ متوسط منطقة التثبيط (1.00 ± 6.00) في التركيز (600) مايكرو لتر/ مل وأظهر منطقة تثبيط واضحة وذات دلالة معنوية عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.05$) دلالة على فعالية نشاط البروبيوتيك على نمو هذه البكتيريا، فيما بلغ متوسط منطقة التثبيط (0.00 ± 4.00) في التركيز (300) مايكرو لتر/ مل، وبلغ (0.58 ± 2.67) في التركيز (150) مايكرو لتر/ مل، ولم يلاحظ وجود فروقات إحصائية على نمو هذه البكتيريا مقارنة بالسيطرة في التركيز (75) مايكرو لتر/ مل، إذ بلغ متوسط منطقة التثبيط (0.00 ± 0.00). ويعني ذلك أنّ فعالية نشاط البروبيوتيك تزداد بازدياد التركيز، وتكون فعالية المستخلص في التثبيط أو إبادة البكتيريا أكبر، كما موضح في الجدول رقم (4 - 6)، الملحق (14).

الجدول (4 - 6): متوسط مناطق التثبيط للبروبيوتيك على بكتيريا *K. pneumoniae*

LSD	S.D±Mean	Concentration (µL/ml)
0.83	0.00±0.00	75
	0.58±2.67	150
	0.00±4.00	300
	1.00±6.00	600
	0.00±0.00	control



الشكل (4 – 10): مناطق تثبيط مستخلص البروبيوتك المستخلص من *S. salivarius* ضد *K. pneumoniae*

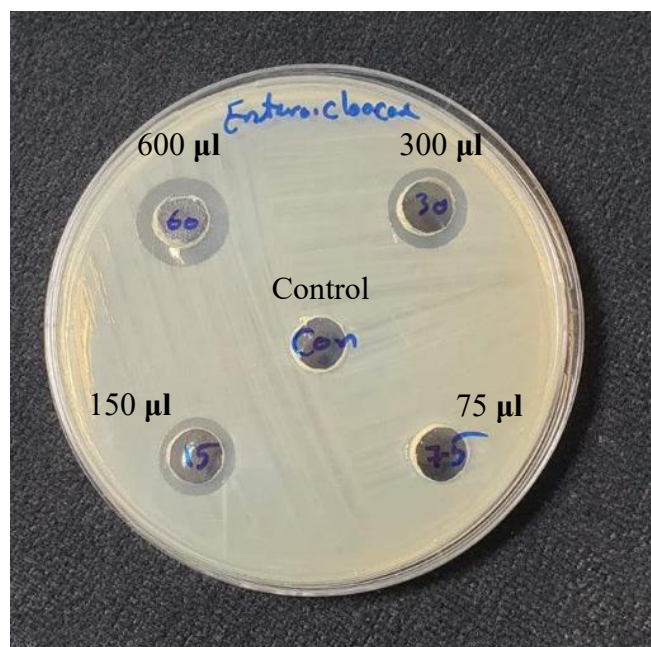
2-7-4: تقدير الفعالية التثبيطية ضد بكتيريا *E. cloacae*:

بيّنت نتائج الدراسة الحالية إنّ المناطق المثبّطة الناتجة عن مستخلص البروبيوتك، متفاوتة بأفطار التثبيط حسب التركيز، إذ بلغ قطر مناطق التثبيط لثلاث مكررات للتركيز 600 مايكرو لتر/ مل (6 ، 5 ، 10) ملم على التوالي، وعند المعاملة بالتركيز 300 مايكرو لتر/ مل بلغت (3 ، 3 ، 7) ملم على التوالي، وعند المعاملة بالتركيز 150 مايكرو لتر/ مل بلغت (2 ، 2 ، 5) ملم على التوالي، وعند المعاملة بالتركيز 75 مايكرو لتر/ مل بلغت (1 ، 0 ، 0) ملم على التوالي، كما في الشكل (4 – 11).

وقد أشارت نتائج التحليل الاحصائي إلى وجود فروق معنوية إحصائية بين التراكيز مقارنة بالسيطرة عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.05$)، وكانت قيمة أقل فرق معنوي LSD (1.70)، إذ كان الفرق الأكبر بين التركيز الأعلى (600 مايكرو لتر/ مل) والسيطرة، إذ بلغ متوسط منطقة التثبيط (1.00 ± 6.00) في التركيز (600) مايكرو لتر/ مل وأظهر منطقة تثبيط واضحة وذات دلالة معنوية عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.05$) دلالة على فعالية نشاط البروبيوتيك على نمو هذه البكتيريا، فيما بلغ متوسط منطقة التثبيط (1.73 ± 4.00) في التركيز (300) مايكرو لتر/ مل، وبلغ (1.15 ± 2.67) في التركيز (150) مايكرو لتر/ مل، ولوحظ انخفاض متوسط منطقة التثبيط في التركيز (75) مايكرو لتر/ مل، إذ بلغ متوسط منطقة التثبيط (0.58 ± 0.33)، كما موضح في الجدول رقم (4 – 7)، الملحق (15).

الجدول (4 - 7): متوسط مناطق التثبيط للبروبيوتيك على بكتيريا *E. cloacae*

LSD	S.D±Mean	Concentration (µL/ml)
1.70	0.58±0.33	75
	1.15±2.67	150
	1.73±4.00	300
	1.00±6.00	600
	0.00±0.00	control



الشكل (4 - 11): مناطق تثبيط مستخلص البروبيوتيك المستخلص من *S. salivarius* ضد *E. Cloacae*

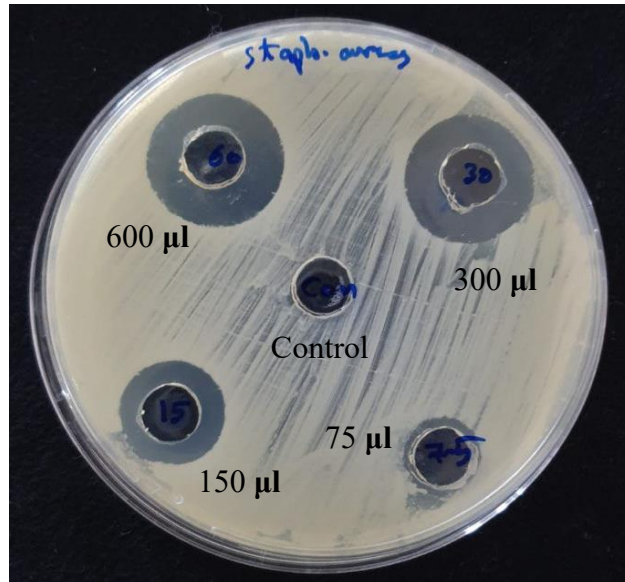
4-7-3: تقدير الفعالية التثبيطية ضد بكتيريا *S. aureus*:

بيّنت نتائج الدراسة الحالية إنّ المناطق المثبطة الناتجة عن مستخلص البروبيوتيك، متفاوتة بأقطار التثبيط حسب التركيز، إذ بلغ قطر مناطق التثبيط لثلاث مكررات للتركيز 600 مايكرو لتر/ مل (10 ، 11 ، 11) ملم على التوالي، وعند المعاملة بالتركيز 300 مايكرو لتر/ مل بلغت (7 ، 10 ، 10) ملم على التوالي، وعند المعاملة بالتركيز 150 مايكرو لتر/ مل بلغت (5 ، 7 ، 6) ملم على التوالي، وعند المعاملة بالتركيز 75 مايكرو لتر/ مل بلغت (3 ، 2 ، 3) ملم على التوالي، كما في الشكل (4 - 12).

وقد أشارت نتائج التحليل الاحصائي إلى وجود فروق معنوية إحصائية بين التراكيز مقارنة بالسيطرة عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.05$)، وكانت قيمة أقل فرق معنوي LSD (1.55)، إذ كان الفرق الأكبر بين التركيز الأعلى (600 مايكرو لتر/ مل) والسيطرة، إذ بلغ متوسط منطقة التثبيط (0.58 ± 10.67) في التركيز (600) مايكرو ليتر/ مل وأظهر منطقة تثبيط واضحة وذات دلالة معنوية عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.05$) دلالة على فعالية نشاط البروبيوتيك على نمو هذه البكتيريا، فيما بلغ متوسط منطقة التثبيط (1.73 ± 9.00) في التركيز (300) مايكرو ليتر/ مل، وبلغ (1.00 ± 6.00) في التركيز (150) مايكرو ليتر/ مل، وفي التركيز (75) مايكرو ليتر/ مل بلغ متوسط منطقة التثبيط (0.58 ± 2.67)، كما موضح في الجدول رقم (4) – (8)، الملحق (16).

الجدول (4 – 8): متوسط مناطق التثبيط للبروبيوتيك على بكتيريا *S. aureus*

LSD	S.D±Mean	Concentration (µL/ml)
1.55	0.58±2.67	75
	1.00±6.00	150
	1.73±9.00	300
	0.58±10.67	600
	0.00±0.00	control



الشكل (4 – 12) مناطق تثبيط مستخلص البروبيوتك المستخلص من *S. salivarius* ضد *S.*

aureus

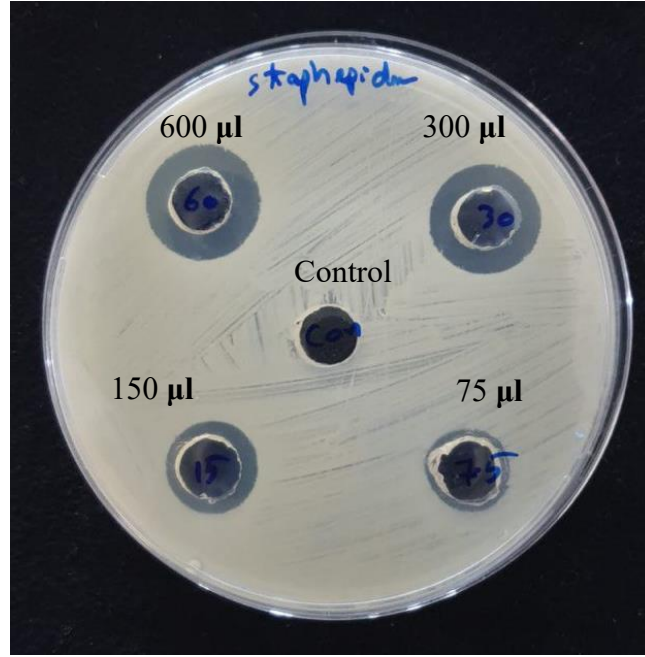
4-7-4: تقدير الفعالية التثبيطية ضد بكتيريا *S. epidermidis*:

بيّنت نتائج الدراسة الحالية إنّ المناطق المثبّطة الناتجة عن مستخلص البروبيوتك، متفاوتة بأقطار التثبيط حسب التركيز، إذ بلغ قطر مناطق التثبيط لثلاث مكررات للتركيز 600 مايكرونتر/ مل (10 ، 9 ، 8) ملم على التوالي، وعند المعاملة بالتركيز 300 مايكرونتر/ مل بلغت (8 ، 7 ، 6) ملم على التوالي، وعند المعاملة بالتركيز 150 مايكرونتر/ مل بلغت (5 ، 4 ، 5) ملم على التوالي، وعند المعاملة بالتركيز 75 مايكرونتر/ مل بلغت (2 ، 0 ، 2) ملم على التوالي، كما في الشكل (4 - 12).

وقد أشارت نتائج التحليل الاحصائي إلى وجود فروق معنوية إحصائية بين التراكيز مقارنة بالسيطرة عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.05$)، وكانت قيمة أقل فرق معنوي LSD (1.37)، إذ كان الفرق الأكبر بين التركيز الأعلى (600 مايكرونتر/ مل) والسيطرة، إذ بلغ متوسط منطقة التثبيط (1.00 ± 9.00) في التركيز (600) مايكرو لیتر/ مل وأظهر منطقة تثبيط واضحة وذات دلالة معنوية عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.05$) دلالة على فعالية نشاط البروبيوتيك على نمو هذه البكتيريا، فيما بلغ متوسط منطقة التثبيط (1.00 ± 7.00) في التركيز (300) مايكرو لیتر/ مل، وبلغ (0.58 ± 4.67) في التركيز (150) مايكرو لیتر/ مل، وفي التركيز (75) مايكرو لیتر/ مل بلغ متوسط منطقة التثبيط (1.15 ± 1.33)، كما موضح في الجدول رقم (4 - 9)، الملحق (17).

الجدول (4 - 9): متوسط مناطق التثبيط للبروبيوتيك على بكتيريا *S. epidermidis*

LSD	S.D±Mean	Concentration (µL/ml)
1.37	1.15±1.33	75
	0.58±4.67	150
	1.00±7.00	300
	1.00±9.00	600
	0.00±0.00	control



الشكل (4 - 13) مناطق تثبيط مستخلص البروبيوتك المستخلص من *S. salivarius* ضد *S. epidermidis*

لقد أظهرت نتائج الدراسة الحالية أنّ التراكيز العالية (600 مايكروليتر/مل) و (300 مايكروليتر/مل) من البروبيوتك لها نشاط مضاد للجراثيم، مع اختلاف كبير بين التركيز الأعلى والتركيز الأدنى (75 مايكروليتر/مل). والأخذ بنظر الاعتبار مقدار الجرعة، فقد أظهرت النتائج وجود علاقة طردية بين البروبيوتك والتركيز فكلما زاد التركيز تزداد الفعالية المضادة للبروبيوتك على نمو البكتريا المرضية. كما أظهرت نتائج الدراسة الحالية أنّ لمستخلص البروبيوتك تأثيراً مضاداً أكبر على البكتريا الموجبة لصبغة غرام، مقارنة مع البكتريا السالبة لصبغة غرام.

الفصل الخامس

المناقشة

Discussion

Chapter Five الفصل الخامس

:Discussion المناقشة

5 – 1: العزل والتشخيص للبكتيريا:

تمّ جمع العينات من 83 شخص، (27) منهم أصحاء والباقي (56) مرضى، وتمّ عزل بكتريا اللعابية *S. salivarius* بواقع (19) عزلة من منطقة الفم، وما حول الأسنان، ومن الأفراد الأصحاء فقط والذكور دون الإناث، ومن سكنة الأرياف، فكانت نسبة حصولنا على العزلات تمثل 70,4%. وقد يعزى سبب عدم وجود البكتريا *S. salivarius* في الأصحاء جميعاً قيد الدراسة إلى اختلاف الجنس، أو العمر، أو مناطق سكناهم.

وتوافقت نتائج الدراسة الحالية مع ما توصل إليه العديد من الباحثين الذين أكدوا أنّ *S. salivarius* تستعمر تجويف الفم البشري في الأفراد الأصحاء (Burton et al., 2009 ; Wescombe et al., 2009 ; Li et al., 2021 ; Fairiska (2017) وآخرون على أنّ بكتيريا *S. salivarius* موجودة في اللعاب وعلى ظهر اللسان لدى البالغين الأصحاء.

وفي نتائج الدراسة الحالية تمّ الحصول على (19) عزلة لبكتريا *S. salivarius* من الذكور فقط، فيما حصل Anukam & Agbakoba (2017) على عزلات من الإناث فقط، غير أنّه يمكن الحصول عليها من الذكور والإناث كما أشار إلى ذلك (Whitten & Mahon, 2005).

وأظهرت نتائج الدراسة الحالية وجود بكتريا *S. salivarius* في الفئة العمرية المحصورة بين (16 – 35) سنة، واتفق ذلك مع ما أشار إليه Morou-Bermudez (2011) وآخرون إلى أنّ مستويات اليورياز Urease في اللعاب، والذي تنتجه بكتيريا *S. salivarius* بشكل أساس يزداد مع تقدم العمر. فيما لم تتفق نتائج دراستنا الحالية مع بعض الدراسات التي أكدت عدم وجود فروق بين الفئات العمرية المختلفة أو لا يتأثر وجود مستعمرات بكتريا *S. salivarius* بالعمر (Colombo et al., 2017; Bánóczy et al., 1985).

كما أظهرت نتائج الدراسة الحالية وجود بكتريا *S. salivarius* في الأشخاص الأصحاء الذين يسكنون الأرياف. واتفق ذلك مع ما توصل إليه Brito (2016) وآخرون في دراسة الجينات المتنقلة إلى وجود اختلافات كبيرة في محتوى الجينات المتنقلة بين الميكروبيوم في فيجي وأمريكا الشمالية، وأشاروا إلى أنّ وفرة الأنواع البكتيرية يعزى إلى الاختلاف البيئي. وأكدت دراسة Jussiaux (2021) وآخرون أنّ التركيب الميكروبي اللعابي للأشخاص الذين لديهم مستويات مختلفة من *S. salivarius* يعدّ مؤشراً حيوياً لتحديد مناطق المعيشة للأفراد المعزولة منهم.

أما البكتريات المرضية *S. aureus*، *S. epidermidis*، *K. pneumoniae* و *E. cloacae* التي تمّ الحصول عليها من المرضى (المصابون بالتهاب اللثة، أو تسوس الأسنان). وتمّ الحصول على 7 عزلات بكتيرية من بكتريا *S. aureus* و 4 عزلات بكتيرية من بكتريا *K. pneumoniae*، و 3 عزلات بكتيرية من بكتريا *E. cloacae*، وعزلة بكتيرية واحدة من بكتريا *S. epidermidis*. وتمّ الحصول على عزلة بكتيرية نقية واحدة لكل نوع. ويعزى سبب وجود بكتريا *S. aureus* لاستعمارها تجويف الفم المصاب. وتمّ الحصول على أربع عزلات بكتيرية من بكتريا *K. pneumoniae*، وثلاث عزلات بكتيرية من بكتريا *E. cloacae* التي تتواجد في تجويف الفم المصاب بالالتهابات. وعلى الرغم من أنّ بكتريا *S. epidermidis* تستعمر جلد الإنسان والأبط والرأس والساقين والذراعين، فإنّ وجود عزلة بكتيرية واحدة من بكتريا *S. epidermidis* في تجويف الفم يعزى سبب ذلك إلى التلوث. وأنّ وجود هذا التنوع البكتيري في تجويف الفم لدى المرضى يعزى إلى النظام الغذائي، والسكن، واتفق ذلك مع ما توصّل إليه Lassalle (2017) وآخرون بدراساتهم لعينات اللعاب لمجموعة الصيادين والمزارعين التقليديين الذين يعيشون على مقربة من الفلبين، واستنتجوا أنّ التحولات الرئيسية في النظام الغذائي أدّى على الأرجح إلى ظهور مسببات الأمراض الفموية الحديثة.

5 – 1 – 1: التشخيص بجهاز Vitek-2 compact:

في نتائج الدراسة الحالية تمّ تشخيص البكتريا الموجبة لصبغة غرام بجهاز Vitek-2 باستخدام بطاقة ID- GP، والبكتريا السالبة لصبغة غرام باستخدام بطاقة ID-GN، إذ يعدّ التشخيص بجهاز Vitek-2 ناجحاً ودقيقاً لتحديد أنواع البكتريا بما في ذلك البكتريا المتعايشة والمرضية، وهذا ما أكّده Kareem (2022) وآخرون أنّ جهاز Vitek-2 ذات دقة عالية بتشخيص سلالات البكتريا بما في ذلك البكتريا الموجبة لصبغة جرام. وأكّد Pantel (2018) وآخرون أنّ دقة Vitek-2 كانت 100% لتشخيص البكتريا السالبة لصبغة غرام.

5 – 1 – 2: التشخيص الجزيئي:

أظهرت نتائج دراستنا الحالية ومن خلال استخدام تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل PCR وجود جين *gtfK* في بكتريا *S. salivarius* بحجم 544 زوج قاعدة، وهذا ما وجدته (AL-Qazzaz, et al., 2014). وكذلك تمّ تشخيص جين *gtfK* من بكتريا *S. salivarius* بالاعتماد على بادئ خاص بالنوع الذي يشفر *gtf* الذي يصنع منتجاً قابلاً للذوبان في الماء، ويعدّ جين *gtfK* في *S. salivarius* مهماً لأنّه يشفر أنزيم الكلوكوزيل ترانسفيراز الذي يصنع منتجاً قابلاً للذوبان في الماء (GTF-S) (Hyun-& Hye-Ji, 2022)

(Jun). ويشترك *gtfk* في بلمرة السكروز إلى كلوكان، وهي مكونات أساسية للويحات على سطح السن (Banas, et al., 1994).

إن قدرة *S. salivarius* على توليف الكلوكان القابل للذوبان يساهم في الوقاية من تسوس الأسنان، إذ ثبت أن الكلوكان القابل للذوبان له خصائص الالتصاق التي تساعد على إزالة البكتيريا الأخرى من تجويف الفم (Jeffrey et al., 1994). كما يؤدي جين *gtfk* أيضاً دوراً في تحديد الأنواع، إذ يمكن تضخيم منطقة التباين العالي داخل الجين بشكل انتقائي واستخدامها لتمييز سلالات *S. salivarius* (Setsuko & Inoue, 1991).

5 – 2: تقدير الفعالية التثبيطية لمستخلص البروبيوتك على الغشاء الحيوي Biofilm بطريقة MTP:

تم اختبار أربعة عزلات منتجة قوية للغشاء الحيوي بطريقة MTP لاختبار الفعالية التثبيطية للبروبيوتك على تكوين الأغشية الحيوية، إذ استخدمت الطريقة الكمية بواسطة صفائح المعايرة الدقيقة MTP للكشف عن قابلية البكتيريا في تكوين الأغشية الحيوية باستخدام جهاز ELISA reader لتقدير الكثافة الضوئية على طول موجي 570 نانومتر لمعرفة كمية الغشاء الحيوي المتكون، وقد تم حساب كمية الغشاء الحيوي مقارنة بمعامل السيطرة الحاوية وسط 1% TSBglu بدون مزرع بكتيري.

وبيّنت النتائج أن جميع العزلات الأربعة المختارة كانت منتجة قوية للغشاء الحيوي وفق المعايير المنصوص عليها من قبل (Bose et al., 2009). وتم حساب نسبة انخفاض الأغشية الحيوية من خلال المعادلة الآتية:

$$\text{Biofilm inhibition (\%)} = \frac{(\text{OD of untreated control}) - (\text{OD of treated sample})}{\text{OD of untreated control}} \times 100$$

وقد أظهرت النتائج انخفاضاً في تكوين الأغشية الحيوية بإضافة البروبيوتك لامتلاكه نشاطاً قوياً مضاداً للميكروبات، وخصائص قوية مضادة للأغشية الحيوية مما يجعله فعالاً في تثبيط تكوين الأغشية الحيوية، وهذا ما أكدته (Choudhary et al., 2023). وقد كانت أعلى نسبة انخفاض في تكوين الأغشية الحيوية بتركيز 1048 مايكروغرام من البروبيوتك (100%)، وأقل نسبة انخفاض في تكوين الأغشية الحيوية بتركيز 2 مايكروغرام، وكانت (0.12%). واتفقت نتائج الدراسة الحالية مع ما تم التوصل إليه Gong (2023) وآخرون، إذ أظهر البروبيوتك لـ *S. salivarius* فعاليته في تثبيط الغشاء الحيوي لبكتيريا *S.*

mutans بنسبة 99%، ويبيّن أنّ البروبيوتك المستخلص يمكن استخدامه في الوقاية من تسوس الأسنان لامتلاكه النشاط المضاد للبكتيريا المرضية، وخصائص قوية في تثبيط الأغشية الحيوية.

وتعدّ طريقة صفائح المعايرة الدقيقة (MTP) من الطرق المعتمدة التي يمكن أن تحدّد قابلية البكتيريا على تكوين الأغشية الحيوية، إذ تعتمد هذه الطريقة على منظومة ELISA reader في تحليل نتائج الأغشية الحيوية الموجبة والسالبة، بينما يعتمد اختبار CRA على العين المجردة، وتوافق ذلك مع ما وصى به كل من (Bose et al., 2009; Oliveira & Cunha, 2010).

وتتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما توصّل Stašková (2021) وآخرون إلى أنّ البروبيوتك لسلالة *S. salivarius* K12 يقضي على تكوين الأغشية الحيوية، ومنع نمو البكتيريا المرضية *Schaalia odontolytica* و *Enterobacter cloacae* في الفم. وأيضاً انخفض عدد الخلايا في الأغشية الحيوية لـ *C. albicans* عند زراعتها مع بروبيوتك *S. salivarius* K12، ولوحظ أيضاً تثبيط نموها (Mokhtar et al., 2021). وكذلك اتفقت مع نتائج دراسة Frickmann (2018) وآخرون لتقييم آثار البروبيوتك لبكتيريا *S. salivarius* K12 على النمو وتشكيل الأغشية الحيوية للمكورات العنقودية *S. aureus* و *S. epidermidis* في المختبر اعتماداً على الوقت والتركيز، بيّنت النتائج أنّ *S. salivarius* K12 تمنع نمو البكتيريا المرضية بشكل كبير لكلا النوعين وتثبط تكوين الأغشية الحيوية لها.

ويعزى سبب فعالية *S. salivarius* على تثبيط الأغشية الحيوية إلى كونها تنتج ساليفاريسين *salivaricin* A2 و B والتي تنتمي إلى مجموعة المضادات الحيوية، (Barbour et al., 2020)، إذ تظهر المضادات الحيوية آليتين للعمل أولها أنّها تمنع تخليق الببتيدوكليكان Peptidoglycan وتساهم في تكوين المسامات في الغشاء الساييتوبلازمي (Simons et al., 2020).

وبيّن Suzuki (2011) وآخرون في النتائج التي توصّلوا إليها أنّ بروبيوتك بكتيريا *Enterococcus faecium* قد منع تكوين الأغشية الحيوية بنسبة 90.0% (10/9) من سلالات *S. mutans* السريرية و100% (3/3) من سلالات *S. sobrinus* السريرية، وأقترح أنّ بروبيوتك *E. faecium* يعمل كمثبط بكتيري لتشكيل الأغشية الحيوية العقدية المسرطنة.

ويعود السبب في ذلك إلى عدم امتلاكه أي عوامل فوعة وغير قادر على الالتصاق بالخلايا الظهارية، وربّما لوجود البلازميدات المستجيبة للفيرمون *pheromone-responsive plasmids*.

وأظهرت نتائج دراسة أخرى أنّ البكتيريوسين الخام المنتج لسلالة بكتيريا *Lactobacillus brevis* DF01 قد خفّض تكوين الأغشية الحيوية عندما تم تحضينه مع بكتيريا *E. coli* و *S. Typhimurium* باستخدام طريقة صفائح المعايرة الدقيقة *microtiter plate method*، وأشارت الدراسة إلى أنّ

البكتريوسين DF01 يمكن تطبيقه للتحكم في تكوين الأغشية الحيوية للنوعين المشار لهم (Kim et al., 2019). وتوصلَ Chopra (2015) وآخرون إلى أنّ البكتريوسين الذي تنتجه *Bacillus sonorensis* MT93 كان قادراً على تقليل نمو الخلايا للمكورات العنقودية الذهبية *S. aureus*، ويمنع ارتباط الأغشية الحيوية وتكوينها، وأيضاً يسبب ترقق الأغشية الحيوية الناضجة.

ويعزى سبب فعالية البكتريوسينات إلى نشاطها المضاد للميكروبات الواسع النطاق مما يسمح لها بتثبيط مجموعة واسعة من البكتيريا المرضية والمقاومة للأدوية المتعددة (Huang et al., 2021). وتعمل بشكل أساسي على الغلاف الخلوي للكائنات الحية المستهدفة، مما يؤثر على التعبير الجيني وإنتاج البروتين داخل الخلايا (Negash et al., 2020).

واستنتجت دراسة تقدير تأثير المشتت الحيوي السطحي Biosurfactant المستخلص من بكتريا *Bifidobacterium spp* في الغشاء الحيوي لبعض أنواع المسببات المرضية من ضمنها (*S. aureus*، *S. epidermidis*، *K. pneumoniae*، *E. cloacae*) انخفاضاً ملحوظاً في تكوين الأغشية الحيوية بسبب كون المشتت الحيوي السطحي يعمل كمضاد للالتصاق وتثبيط الغشاء الحيوي للبكتيريا المرضية نتيجة لما تمتلكه هذه البكتريا من فعالية تثبيطية قوية للبكتريا الموجبة والسالبة لصبغة غرام (Almjalawi et al., 2020). ولتقييم قدرة المشتت الحيوي السطحي المستخلص من ثلاث سلالات لبكتريا *Lactobacillus acidophilus* على تثبيط الأغشية الحيوية لنوعين من المكورات العنقودية (*S. aureus* و *S. epidermidis*)، أوضحت نتائج دراسة انخفاضاً في عدد الخلايا الملتصقة لكلا النوعين بعد مدة 3 ساعات من الحضانة المشتركة مع المشتت الحيوي السطحي بالاعتماد على السلالة والجرعة، وأيضاً تثبط المشتت الحيوي السطحي تكوين الأغشية الحيوية لـ *S. epidermidis* وبدرجة أقل في بكتريا *S. aureus*، وقد أدى إضافة المشتت الحيوي السطحي إلى الأغشية الحيوية الناضجة المشكلة إلى تسريع تشتتها، وتغيير معالمها (Walencka et al., 2008). وأثبت Tahmourespour (2011) وآخرون أنّ المشتت الحيوي السطحي المشتق من *Lactobacillus Fermentum* يقلل بشكل كبير من قدرة *S. mutans* على إنتاج السكرول باستخدام ناقل الجلوكوز (GTs)، ويمنع نمو الأغشية الحيوية، وأظهر أيضاً انخفاضاً في التعبير الجيني للجين *gtfB* وجين *gtfC*. وذكر Yan (2019) وآخرون أنّ المشتت الحيوي السطحي يقلل بشكل كبير من التصاق البكتيريا وتوليد الأغشية الحيوية للبكتيريا بطريقة تعتمد على زيادة التركيز.

وأظهرت نتائج دراسة أخرى أنّ العصيات اللبنية *Lactobacilli* التي تنتج المشتت الحيوي السطحي Biosurfactant خصائص مضادة للميكروبات ومضادة للالتصاق وقدرته على تثبيط تكوين الأغشية الحيوية المسببة للأمراض (Gomaa, 2013). وأثبتت نتائج Yan (2019) وآخرون أنّ المشتت الحيوي السطحي Biosurfactant المستخلص من بكتريا حمض اللاكتيك (*Pediococcus acidilactici*) و

Lactobacillus plantarum) يمنع الالتصاق وتكوين الأغشية الحيوية للمكورات العنقودية الذهبية *S. aureus* بطريقة تعتمد على زيادة التركيز.

ويعزى السبب في فعالية المشتت الحيوي السطحي Biosurfactant لامتلاكه فعالية تثبيطية ضد البكتريا المرضية، وكذلك لما يحتويه من مواد مثبطة مثل البكتريوسين والحوامض (Hamilton-Miller, 2004).

أما النتائج التي توصل إليها Valdez (2021) وآخرون أوضحت أنّ لبكتريا *Bifidobacterium lactis* و *Bifidobacterium infantis* فعالية مضادة ضد البكتريا المسببة لأمراض اللثة مزدوج، ولها تأثير مضاد على الأغشية الحيوية لمسببات أمراض اللثة هذه في فترات زمنية مختلفة.

ووفقاً لما تقدّم اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع نتائج الدراسات التي أشرنا إليها سلفاً في فعالية البروبيوتك في تثبيط تكوين الأغشية الحيوية للبكتريا المرضية قيد الدراسة.

5 – 3: تقدير فعالية مستخلص البروبيوتك على نمو البكتريا المرضية المعزولة من الفم:

أظهرت نتائج الدراسة الحالية أنّ وسط TSB الذي يحتوي على خلاصة الخميرة و كربونات الكالسيوم أنتج كمية كبيرة من البروبيوتك. واتفقت النتائج مع Barbour (2013) الذي أكد أنّ وسط TSB الذي يحتوي على خلاصة الخميرة و كربونات الكالسيوم قد أنتج كمية كبيرة من البروبيوتك لبكتيريا *S. salivarius* والذي اتفق معه (AL-Saeedi, et al., 2018) الذي حقّق أعلى إنتاج للبروبيوتك في درجة الحموضة PH 7 في وسط TSB الذي يحتوي على خلاصة الخميرة و كربونات الكالسيوم.

لقد أظهرت نتائج اختبارنا على الأنواع الأربعة من البكتريا المرضية الموجبة والسالبة لصبغة جرام، اختلاف أقطار التثبيط في المزارع البكتيرية الناتجة عن مستخلص البروبيوتك لبكتريا *S. salivarius* اختلفت باختلاف التراكيز، مع الأخذ بنظر الاعتبار مقدار تركيز البروبيوتك، إذ كلما زاد تركيز البروبيوتك في تجويف الفم انخفض نمو البكتريا المرضية المسببة لتسوس الأسنان، والتهابات اللثة، ورائحة الفم الكريهة.

وقد اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع نتائج Stašková وآخرون (2021) في أنّ نمو البكتيريا قد تقلص بشكل ملحوظ بالمقارنة مع السيطرة عند ارتفاع التركيز من 15 إلى 60 ملغم/مل. بينما تركيز (7.5) ملغم/مل لم يكن له تأثير مثبت واضح على النمو، وأظهرت نتائج الدراسة الحالية أنّه يمكن استخدام بكتيريا *S.*

salivarius كمصدر لمنع نمو العديد من البكتيريا سالبة الجرام التي تسبب ترسبات على الأسنان، ومشاكل صحة الفم.

كما اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع ما أجراه Moon وآخرون (2016) من اختبار لفعالية *S. salivarius* على (8) أنواع من البكتيريا السالبة والموجبة لصبغة جرام المتواجدة في الفم، بهدف دراسة التأثيرات المضادة للبكتيريا المنتجة للبروبيوتك على بكتيريا الفم، وأظهرت نتائج إن بكتيريا *S. salivarius* أظهرت تأثيرات مضادة للجراثيم، مع زيادة التركيز، إذ بيّن إنه كلما زاد التركيز انخفض معدل النمو البكتيري بالنسبة للبكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة جرام، فعندما زاد التركيز من 40% إلى 70% وجد انخفاضاً معنوياً ملحوظاً، وأكد أنّ *S. salivarius* تمنع بشكل فعال نمو بعض بكتيريا الفم عند وجودها بمستويات كافية.

وقد يرجع السبب في فعالية البروبيوتك المستخلص من البكتيريا اللعابية *S. salivarius* إلى امتلاكه نشاطاً قوياً مضاداً للميكروبات لا سيما ضد *S. mutans*، وهي بكتيريا مرتبطة بتسوس الأسنان (Gong *et al.*, 2023).

وفي دراسة أخرى أخذت عينة من 296 من اللعاب لأطفال تناولوا بروبيوتك *S. salivarius* لمدة شهر واحد لمعرفة ما إذا كان منتج البروبيوتك يؤثر على اختلال توازن البكتيريا المتعايشة في الفم، إذ لاحظ أنّ الأطفال الذين يتلقون المنتج خلال مدة الدراسة، زاد متوسط الوفرة النسبية لبكتيريا *S. salivarius* من (0,9% إلى 2% في اللعاب، وبعد توقف أخذ المنتج انخفض متوسط الوفرة النسبية إلى 0,8% واستنتج أنّ استخدام بروبيوتيك *S. salivarius* آمن لأنه لا يؤثر على البكتيريا المتعايشة لدى الأطفال الصغار على الرغم من وجود استعمار قصير الأمد للبكتيريا اللعابية في اللعاب (Sarlin, *et al.*, 2021). واستخدم Burton وآخرون (2013) البروبيوتك المستخلص من السلالة M18 لبكتيريا *S. salivarius* على 100 طفل مصاب بتسوس الأسنان لمدة ثلاثة أشهر، وبعد الانتهاء من مدة العلاج وجد فرق ملحوظ في درجات التسوس وصحة اللثة وانخفاض في عدد البكتيريا الطافرة *S. mutans* وأشار إلى أنّ النشاط المضاد للبروبيوتك ضد تسوس الأسنان قد يتحسن في حال تمّ تناوله عن طريق الفم.

وقد يعود السبب في ذلك إلى افتقار الـ *S. salivarius* إلى مقاومة المضادات الحيوية ذات الصلة أو محددات الفوعة، مما يجعلها آمنة لتطبيق البروبيوتك في البشر (MacDonald *et al.*, 2021).

طبّق Teughels (2008) البروبيوتك للمكورات العقدية اللعابية للسيطرة على عدوى البكتيريا المتنوعة، بما في ذلك رائحة الفم الكريهة، وتسوس الأسنان، وتشمل التطبيقات المحتملة الأخرى زيادة تنظيم الدفاعات المناعية ضد الالتهابات الفيروسية التنفسية وعلاج داء المبيضات الفموي، وأظهرت نتائج

أنه يمكن استخدام بكتيريا *S. salivarius* كمصدر لمنع نمو العديد من البكتيريا موجبة الجرام التي تسبب ترسبات على الأسنان، ومشاكل صحة الفم.

وفي تجربة على 23 شخصاً مصاباً برائحة الفم الكريهة، وتم إعطائهم البروبيوتك لمدة أسبوع، وقد لاحظ انخفاضاً كبيراً في مركبات الكبريت المتطايرة التي تنتجها البكتيريا المسببة لرائحة الفم الكريهة، وقد أشار إلى استبدال البكتيريا التي تسبب رائحة الفم الكريهة عن طريق استعمار بكتيريا *S. salivarius* يوفر قدرة فعالة في الحد من رائحة الفم الكريهة (Burton, et al., 2006).

وقد يعزى السبب في فعاليتها لعلاج رائحة الفم الكريهة لكونها سلالة بكتيرية موجبة لصبغة غرام وتكافح الروائح الكريهة التي تسببها البكتيريا السالبة لصبغة غرام على اللسان (Franklin, 2013).

وتوصلت دراسة أخرى إلى أنّ 13 سلالة منتجة للبكتريوسين من بكتيريا *S. salivarius* كانت قادرة على تثبيط مسببات الأمراض المختلفة الموجبة لصبغة غرام، من بينها سلالة واحدة هي *S. salivarius* 24SMB، إذ تم اختيارها كبروبيوتيك محتمل عن طريق الفم، وذلك بفضل تقييم السلامة، والقدرة على تثبيط العقديّة الرئوية *S. pneumonia* وغياب جينات الفوعة والمقاومة للمضادات الحيوية (Santagati et al., 2012). واتفق معه Hale وآخرون (2022) من خلال دراستهم لتقييم الفعالية الحيوية لسلالة *S. salivarius* M18 التي تستهدف تطبيقات صحة الفم والأسنان لأنها تفتقر إلى أي مقاومة للمضادات الحيوية أو محددات الفوعة مقارنة مع النموذج المقترح الأولي للبروبيوتك، وهو سلالة *S. salivarius* K12، وأنّ السلالة M18 آمنة بالفعل كأحد تطبيقات البروبيوتك في البشر.

وأكدت دراسات السلامة المكثفة للبروبيوتك على أنها معترف بها عموماً وآمنة، في الولايات المتحدة الأمريكية وفي عام 2001 تم توزيع *S. salivarius* K12 تجارياً من قبل شركة BLIS Technologies LTD النيوزيلندية كنموذج أولي عالمي للبروبيوتك الفموي المنتج لـ K12 (Tagg et al., 2023).

كما اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع دراسة Chen (2021) وآخرون لتأثير المضاد للمكروبات لخمس أنواع من بكتيريا العصيات اللبنية والتي تنتج بروبيوتك معوي ضد مجموعة من بكتيريا العائلة المعوية Enterobacteriaceae ومن ضمنها عشرة عزلات من بكتيريا *K. pneumonia*، إذ أظهرت جميع العزلات فعالية تثبيطية وخفضت من نمو *K. pneumonia* بشكل ملحوظ.

وبيّن Arboleda وآخرون (2023) إنّ توفير البروبيوتك من *S. salivarius* يعزز الحماية المناعية للبكتيريا اللعابية ضد التهابات الجهاز التنفسي العلوي والسفلي، ويقال من معدل الإصابة بالالتهابات عن طريق تثبيط المسارات الالتهابية التي تنشطها البكتيريا عن طريق إفراز الانترلوكين 8.

وفي نتائج دراسة أخرى لتقييم تأثير البروبيوتيك الفموي الذي يحتوي على سلالة *S. salivarius* K12 على مستوى اللعاب من الغلوبولين المناعي الإفرازي A ومعدل إفراز اللعاب، والغشاء الحيوي الفموي، استنتجت الدراسة أنّ تناول البروبيوتك (*S. salivarius* K12) لا يؤثر على معدلات إفراز اللعاب ومستويات الغلوبولين المناعي A اللعابي، ولكنه يظهر تأثيراً إيجابياً على تراكم الترسيبات (Babina et al., 2022).

إنّ هذه الخصائص، جنباً إلى جنب مع قدرتها على منع التنشيط المناعي الناجم عن مسببات أمراض اللثة تجعل من *S. salivarius* مرشحاً واعداً لتطوير البروبيوتيك الفموي (Mansur & Ahmed, 2022).

ويؤثر البروبيوتيك تأثيراً إيجابياً على الأشخاص الذين يعانون من عدم تحمل اللاكتوز بسبب انخفاض مستوى أنزيم β galactosidase لديهم، فتحدث لديهم أعراض مختلفة عند استهلاك الحليب، أو المنتجات الحاوية على اللاكتوز، مثل: الانتفاخ، وآلام وتشنجات في البطن، واسهال، وتفسر فائدته بإحدى اليئين الأولى: أنّ إضافة البروبيوتيك إلى الأغذية الحاوية على اللاكتوز تخفّف من تركيزه بسبب ارتفاع نسبة أنزيم اللاكتاز في البكتيريا، أمّا الثانية: تقوم بكتيريا البروبيوتيك بتحرير الأنزيم النشط في الأمعاء الدقيقة مما يعزّز قدرة الجسم على هضم سكر اللاكتوز (Fenster, et al., 2019). وقد وجد أنّ البروبيوتيك المستخلص من *S. salivarius* بالفعل تطبيقاً ناجحاً لتعديل مفيد لمجموعة واسعة من الجراثيم التي تؤثر على صحة الإنسان، إذ كانت الالتهابات البكتيرية الفموية الرئيسية التي تم تحديدها حالياً والتي تم استهدافها بنجاح عن طريق البروبيوتك هي التهاب البلعوم العقدي، والتهاب الأذن الوسطى، ورائحة الفم الكريهة، وتسوس الأسنان (Bustamante et al., 2020) ; (Hoare et al., 2017).

وفي ضوء ما توصلنا إليه من نتائج، يمكن أن يكون للبروبيوتك الفموي دوراً وقائياً من خلال استعمار تجويف الفم بالبكتيريا النافعة المنتجة للبروبيوتك، ويظهر بروبيوتك *S. salivarius* أيضاً خصائص قوية مضادة للأغشية الحيوية مما يجعله فعالاً في تثبيط تكوين الأغشية الحيوية (Choudhary et al., 2023). يضاف إلى ذلك يمكن لـ *S. salivarius* إفراز الببتيدات المضادة للميكروبات، والتي تساهم في قدرتها على تثبيط نمو مسببات الأمراض (Hale et al., 2022). وبالتالي يمكن أن يكون علاجاً فعالاً لتسوس الأسنان، والتهابات اللثة، ورائحة الفم الكريهة، وصحة الفم بصورة عامة.

إنّ بكتيريا البروبيوتيك تحمي صحة الفم من خلال صراعها مع البكتيريا المرضية المتواجدة في الفم على المغذيات وعوامل النمو وموقع الالتصاق، فبمجرد الالتصاق في تجويف الفم تتراكم بكتيريا البروبيوتيك وتمنع التصاق الكائنات الحية الدقيقة الضارة عن طريق إنتاج البكتريوسينات أو غيرها من المركبات المضادة للميكروبات، ولذا يساعد البروبيوتيك على منع التهاب تجويف الفم، وتدمير أنسجة الفم

عن طريق مسببات الأمراض (Strus, et al., 2001 ; Roberfroid, 2002)، كما ثبت أنّ غسول الفم الذي يحتوي على البروبيوتيك له القدرة على تقليل الإصابة بالتهاب اللثة عند الأطفال من سن 6-8 سنوات (Harini & Anegundi, 2010).

أظهرت نتائج الدراسة الحالية أنّ الفعالية المضادة للبروبيوتك المستخلص من بكتريا *S. salivarius* كانت أكبر على البكتريا الموجبة لصبغة غرام مقارنة بالبكتريا السالبة لصبغة غرام. واتفقت نتائج الدراسة الحالية مع ما توصل إليه Jansen (2021) وآخرون الذي ذكر أنّ مستخلص البروبيوتك من بكتريا *S. salivarius* له تأثير مثبت أعلى على البكتريا الموجبة لصبغة غرام أكثر من تأثيره على البكتريا السالبة لصبغة غرام.

الفصل السادس
الاستنتاجات والتوصيات

Conclusions and recommendations

الفصل السادس Chapter Six:

الاستنتاجات Conclusions :

1. إنَّ بكتريا *S. salivarius* هي أكثر شيوعاً في الأشخاص الأصحاء قيد الدراسة، إذ بلغت نسبة وجودها (70,4%).
2. إنَّ البكتريا المرضية الأكثر انتشاراً في الفم هي *S. aureus* قيد الدراسة.
3. يتأثر تواجد البكتريا اللعابية *S. salivarius* قيد الدراسة في منطقة الفم، وما حول الأسنان، بالجنس، العمر، ومناطق السكن.
4. إنَّ مستخلص البروبيوتك من بكتريا *S. salivarius* له نشاط مضاد للجراثيم وتأثيره طردني أي تزداد فعاليته التثبيطية في البكتريا المرضية بزيادة التركيز.
5. إنَّ لمستخلص البروبيوتك تأثيراً ضد البكتريا المكونة للغشاء الحيوي.

التوصيات:Recommendations

1. التشخيص الجزيئي للبكتريا المنتجة للبروبيوتك باستخدام جينات أخرى لها علاقة بإنتاج البروبيوتك.
2. إجراء دراسة عن تأثير البروبيوتك ضد أنواع بكتيرية مرضية أخرى.
3. التحليل الكيميائي لمكونات البروبيوتك.
4. الكشف عن الفعالية التضادية عند دمج البروبيوتك مع المضادات الحياتية المستخدمة لعلاج أمراض الفم والأسنان.
5. الكشف عن التعبير الجيني لجين فوعة لبكتريا مرضية قبل وبعد استخدام البروبيوتك.
6. تحويل البروبيوتك إلى جسيمات نانوية واختبار فعاليته في البكتريا المرضية.

الملاحق

Appurtenances

استمارة المعلومات

رقم العينة:

الجنس: ذكر أنثىالعمر: سنة (15 – 6) سنة (25 – 16) سنة (35 – 26) سنة (45 – 36) سنة (65 – 56)السكن: المدينة الريفالحالة المرضية: الأصحاء الأمراض المزمنةأمراض الأسنان: الأصحاء التهاب اللثة تسوس الأسنان

الملحق (1): استمارة معلومات جمع العينات

bioMérieux Customer:

مختبر ميديكا التخصصي
Microbiology Chart ReportPrinted November 29, 2022 11:01:40 AM
CST

Patient Name: 11, 11

Patient ID: 1526

Location:

Physician:

Lab ID: 1526

Isolate Number: 1

Organism Quantity:

Selected Organism : *Streptococcus salivarius ssp salivarius*

Source:

Collected:

Comments:	

Identification Information	Analysis Time: 5.97 hours	Status: Final
Selected Organism	95% Probability Bionumber: 161110364313531	<i>Streptococcus salivarius ssp salivarius</i>
ID Analysis Messages		

Biochemical Details																	
2	AMY	+	4	PIPLC	-	5	dXYL	-	8	ADHI	-	9	BGAL	+	11	AGLU	+
13	APPA	+	14	CDEX	-	15	AspA	-	16	BGAR	+	17	AMAN	-	19	PHOS	-
20	LeuA	+	23	ProA	-	24	BGURr	-	25	AGAL	-	26	PyrA	-	27	BGUR	-
28	AlaA	+	29	TyrA	+	30	dSOR	-	31	URE	-	32	POLYB	+	37	dGAL	+
38	dRIB	-	39	ILATk	-	42	LAC	+	44	NAG	+	45	dMAL	+	46	BACI	-
47	NOVO	+	50	NC6.5	-	52	dMAN	-	53	dMNE	+	54	MBdG	+	56	PUL	-
57	dRAF	+	58	O129R	-	59	SAL	+	60	SAC	+	62	dTRE	+	63	ADH2s	-
64	OPTO	+															

الملحق (2): نموذج استمارة تشخيص بكتريا *S. salivarius* بجهاز Vitek-2

bioMérieux Customer:

مختبر ميديكا التخصصي
Microbiology Chart Report

Printed November 12, 2022 9:13:53 AM CST

Patient Name: 35, .

Patient ID: 1471

Location:

Physician:

Lab ID: 1471

Isolate Number: 1

Organism Quantity:

Selected Organism : Staphylococcus aureus

Source:

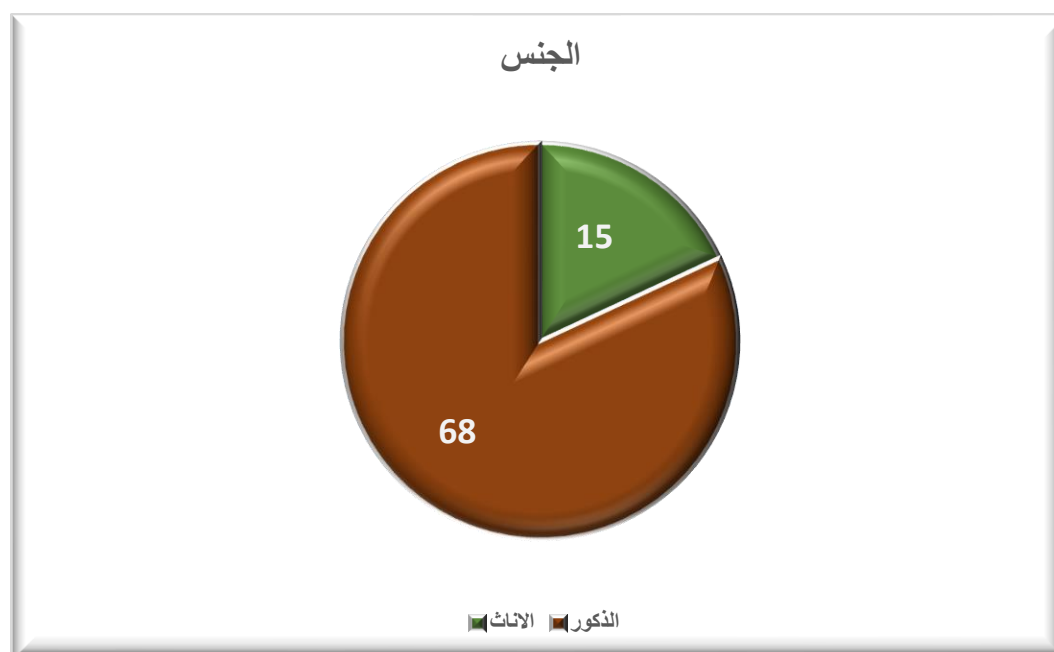
Collected:

Comments:	

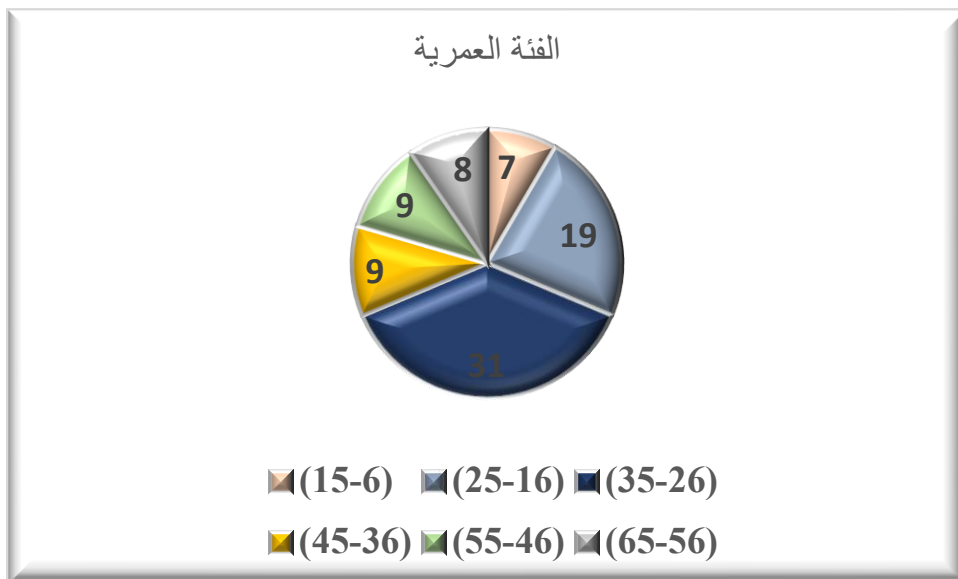
Identification Information	Analysis Time: 7.98 hours	Status: Final
Selected Organism	Staphylococcus aureus	
ID Analysis Messages	Bionumber: 010002021763131	

Biochemical Details																	
2	AMY	-	4	PIPLC	-	5	dXYL	-	8	ADHI	+	9	BGAL	-	11	AGLU	-
13	APPA	-	14	CDEX	-	15	AspA	-	16	BGAR	-	17	AMAN	-	19	PHOS	-
20	LeuA	-	23	ProA	-	24	BGURr	-	25	AGAL	-	26	PyrA	+	27	BGUR	-
28	AlaA	-	29	TyrA	-	30	dSOR	-	31	URE	-	32	POLYB	+	37	dGAL	-
38	dRIB	+	39	ILATk	(-)	42	LAC	-	44	NAG	+	45	dMAL	+	46	BACI	+
47	NOVO	-	50	NC6.5	+	52	dMAN	+	53	dMNE	+	54	MBdG	+	56	PUL	-
57	dRAF	+	58	O129R	(-)	59	SAL	-	60	SAC	+	62	dTRE	+	63	ADH2s	-
64	OPTO	+															

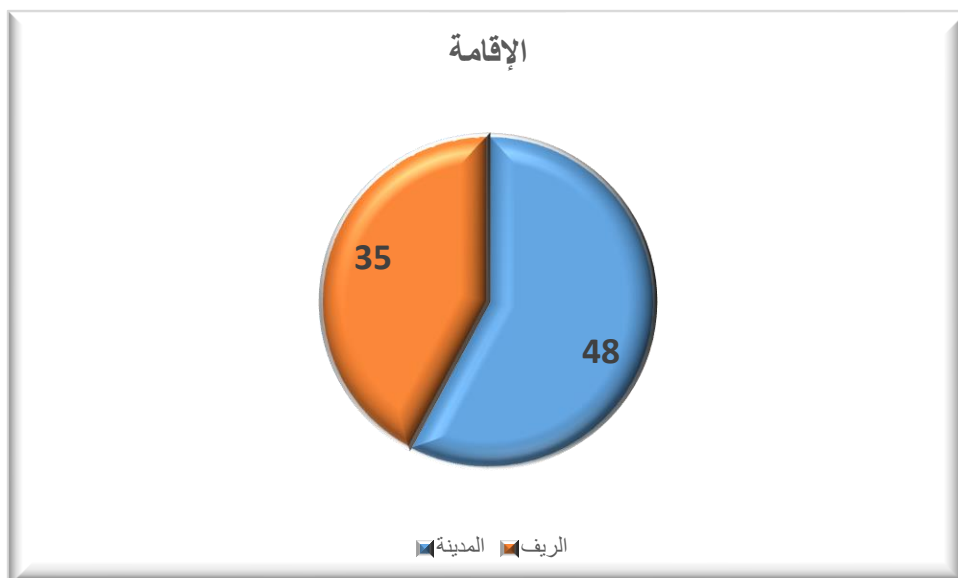
الملحق (3): نموذج استمارة تشخيص البكتريا المرضية بجهاز Vitek-2



الملحق (4): توزيع العينات حسب الجنس

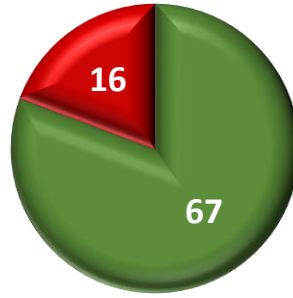


الملحق (5): توزيع العينات حسب الفئة العمرية



الملحق (6): توزيع العينات حسب مكان الإقامة

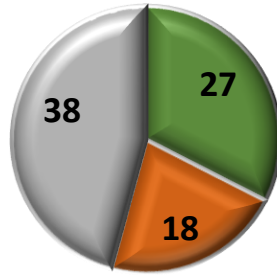
توزيع العينات حسب الأمراض المزمنة



■ الأصحاء ■ الأمراض المزمنة

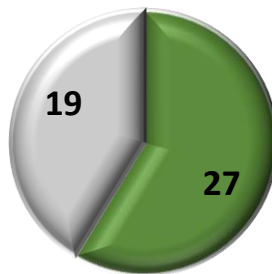
الملحق (7): توزيع العينات حسب الأمراض المزمنة

أمراض الأسنان



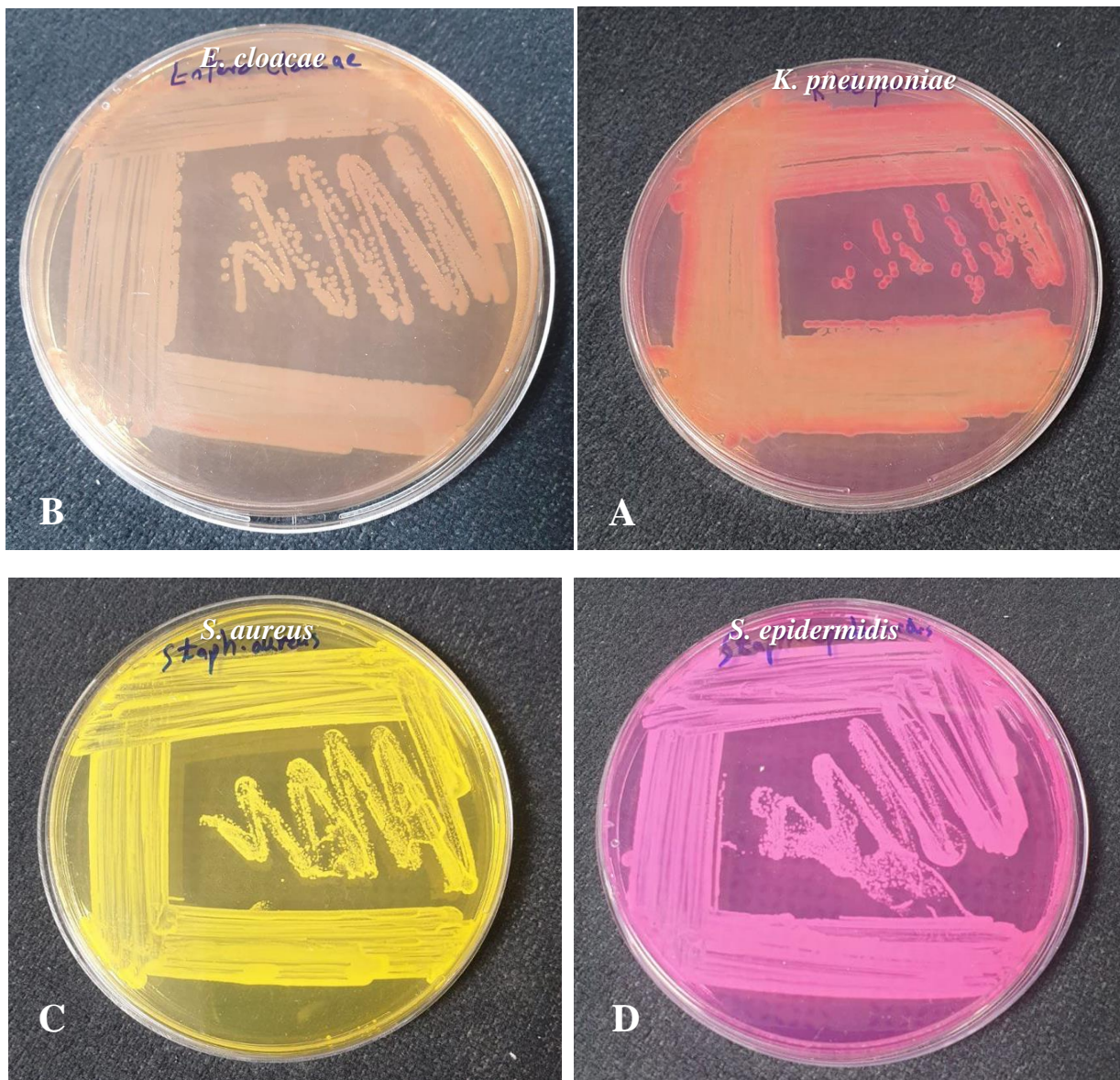
■ تسوس الأسنان ■ التهاب اللثة ■ الأصحاء

الملحق (8): أمراض الأسنان لأفراد عينات الدراسة

عزلات بكتريا *S. salivarius* من عينة الأصحاء

■ العزلة البكتيرية ■ الأصحاء من أمراض الأسنان

الملحق (9): عدد عزلات بكتريا *S. salivarius* من عينة الأصحاء

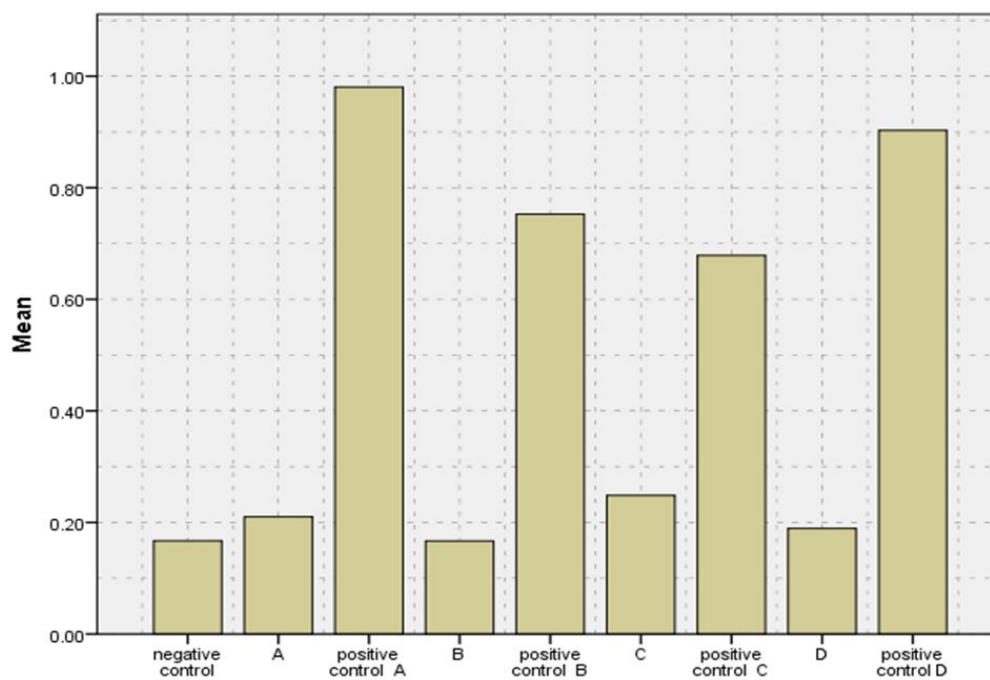


الملحق (10): أنواع البكتيريا المرضية قيد الدراسة على الأوساط الزرعية

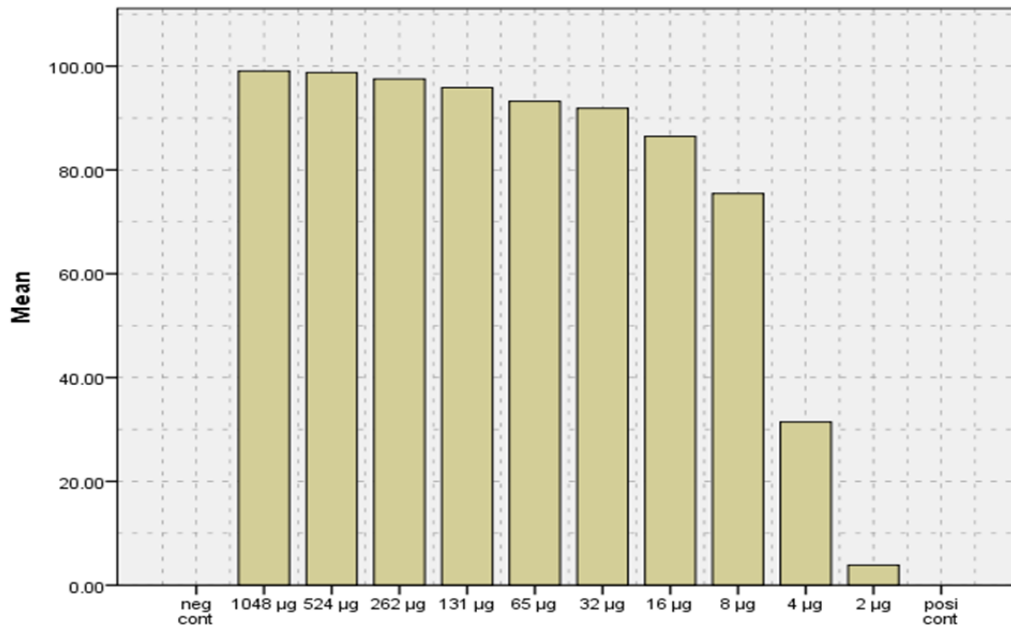
A: (*K. pneumoniae*), B: (*E. cloacae*), C: (*S. aureus*), D: (*S. epidermidis*)

2	4	8	16	32	65	131	262	524	1048	Concentration µg Bacteria
+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>K. pneumoniae</i>
+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>E. cloacae</i>
+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>S. aureus</i>
+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>S. epidermidis</i>

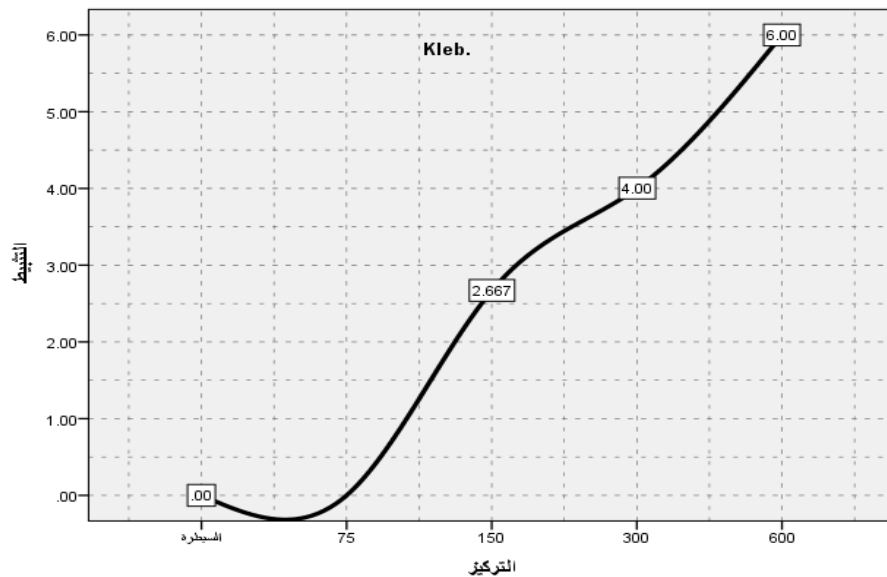
الملحق (11): قيمة MIC لتركيز البربيوتك على نمو البكتيريا المرضية



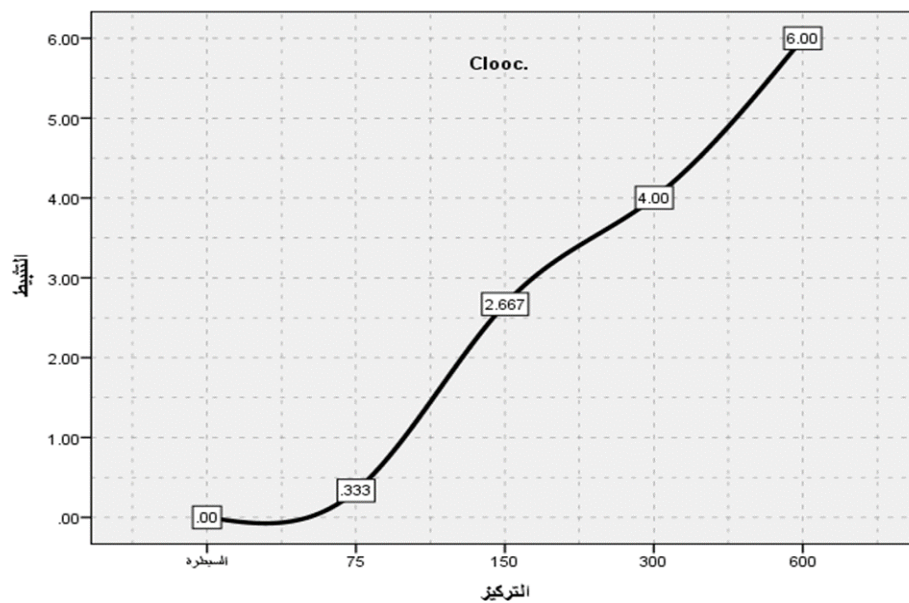
الملحق (12): مواقع الفروق بين أنواع البكتيريا المرضية



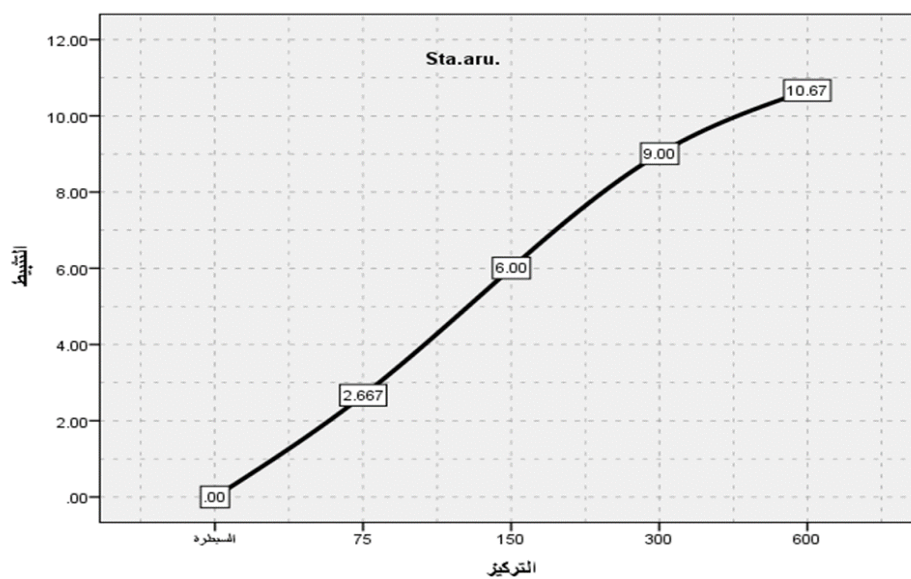
الملحق (13): قيم الامتصاصية للبكتريا المرضية المكونة للغشاء الحيوي بإضافة البروبيوتك بطريقة صفائح المعايرة الدقيقة (MTP)



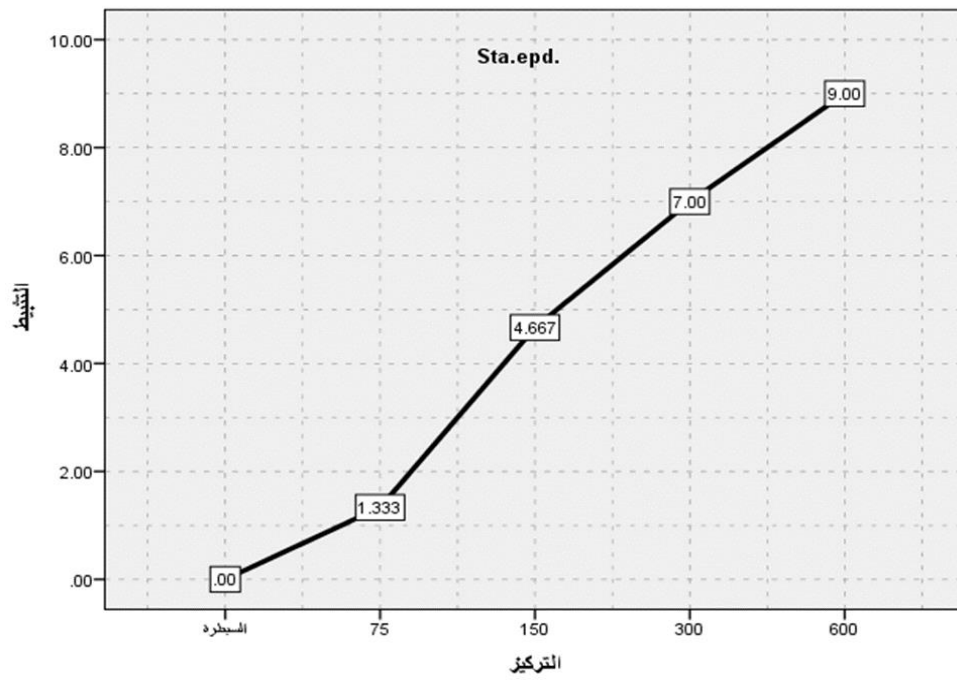
الملحق (14): المخطط البياني لتأثير المستخلص ضد *K. pneumoniae*



الملحق (15): المخطط البياني لتأثير المستخلص ضد *E. cloacae*



الملحق (16): المخطط البياني لتأثير المستخلص ضد *S. aureus*



الملحق (17): المخطط البياني لتأثير المستخلص ضد *S. epidermidis*

المصادر

References

- Aas, J. A.; Griffen, A. L.; Dardis, S. R.; Lee, A. M.; Olsen, I.; Dewhirst, F. E. & Paster, B. J. (2008).** Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *Journal of clinical microbiology*, 46(4), 1407-1417.
- Abranches, J.; Zeng, L.; Kajfasz, J. K.; Palmer, S. R.; Chakraborty, B.; Wen, Z. T.; Richards, V. P.; Brady, L. J. & Lemos, J. A. (2018).** Biology of Oral Streptococci. *Microbiology spectrum*, 6(5), 10.1128.
- Ahmed, R. Z. T.; Hadi, T. F. & Abdullah, R. M. (2020).** Bacteriological and Molecular Study of Klebsiella Pneumoniae Isolated from Patients with Urinary Tract Infections from Several Hospitals in Baghdad. *Medico Legal Update*, 20(4), 2049-2055.
- AL-Khalaf, A.W.A. (2021).** Molecular and Physiological study of inherited red-green color vision deficiency in Al-Najaf Al-ashraf province. M. S. C. theses.; University of Kufa.
- Almjalawi, B. S. A., Al-Awade, H. A. R. K., & Al-Hamil, A. R. H. (2020).** Study the inhibition activity of Bifidobacterium spp. filtrate against some pathogenic bacteria isolated from patients with cardiac catheterization in-vitro. *International Journal Of Research And Development In Pharmacy & Life Sciences*, 5, 2099-2106.
- AL-Qazzaz, H.K.; Al-Amili, W. & Abdul Hussein, N. (2014).** Detection of gtfS Genes with dental caries in some Iraqi diabetic patients. *International journal of advanced biological research*, 4(1), 83-88.
- AL-Saedi, B. S. M. & Luti, K. J. K. (2018).** Bacteriocin from *Streptococcus salivarius* optimized statistically by response surface methodology active against different clinical oral pathogenic Streptococci. *Iraqi Journal of Science*, 463-475.
- Altayar, M. A. H.; Motaweq, Z. Y. & Hussein, L. M. (2020).** Phenotypic study of Klebsiella pneumoniae and Enterobacter cloacae isolated from oral cavity

infections in Najaf Province/Iraq. *Technology Reports of Kansai University*, 62(7), 3945-3952

Al-Zahrani, I. A. (2011). *A novel multiplex PCR-based tool of typing strains of Staphylococcus aureus* (Doctoral dissertation, Newcastle University).

AM, A. Z.; Munirah, N.; EO, M. I.; Abdullah, A. S. & Yusof, H. A. (2020). Antibiotic susceptibility of Staphylococcus epidermidis among undergraduate students in Malaysia Public University Health Campus. *Medicine & Health*, 15(1), 166-176.

Anukam, K. C. & Agbakoba, N. R. (2017). A comparative study of the oral microbiome compositions of healthy postmenopausal, premenopausal, and prepubertal Nigerian females, using 16s rna metagenomics methods. *Nigerian journal of clinical practice*, 20(10), 1250-1258.

Arboleda, V.; Elsouiri, K. N.; Heiser, S. E.; Bernal, I.; Kesselman, M. M.; Beckler, M. D. & Bernal, I. C. (2023). Oral Microbiome as a Tool of Systemic Disease on Cleft Patients: A New Landscape. *Cureus*, 15(2).

Askandar, R. H. & Ebrahimi, N. (2020). The Impact of Probiotics in Respiratory Diseases. *Polytechnic Journal*, 10(1), 148-156.

Awan, S. (2020). Isolation and PCR based identification of staphylococcus Aureus from Oral cavity of diabetic patients in Quetta City. *Pak-Euro Journal of Medical and Life Sciences*, 3(4), 156-167.

Babina, K., Salikhova, D., Polyakova, M., Svitich, O., Samoylikov, R., Ahmad El-Abed, S., & Novozhilova, N. (2022). The effect of oral probiotics (*Streptococcus salivarius* k12) on the salivary level of secretory immunoglobulin a, salivation rate, and oral biofilm: a pilot randomized clinical trial. *Nutrients*, 14(5), 1124.

- Banas, J. A.; Simon, D.; Williams, L. K.; Ferretti, J. J., & Russell, R. R. (1994).** Analysis of a primer-independent GTF-I from *Streptococcus salivarius*. *FEMS microbiology letters*, 123(3), 349-354.
- Bánóczy, J.; Orsós, M.; Pienihäkkinen, K. & Scheinin, A. (1985).** Collaborative WHO xylitol field studies in Hungary IV. Saliva levels of *Streptococcus mutans*. *Acta Odontologica Scandinavica*, 43(6), 367-370.
- Barbour, A.; Wescombe, P. & Smith, L. (2020).** Evolution of lantibiotic salivaricins: new weapons to fight infectious diseases. *Trends in microbiology*, 28(7), 578-593.
- Baron, E. J.; Peterson, L. F., & Finegold, S. M. Bailey and Scott's diagnostic microbiology. (1994).** *Google Scholar*, 171-8.
- Bogdan, I.; Gadela, T.; Bratosin, F.; Dumitru, C.; Popescu, A.; Horhat, F. G. & Marincu, I. (2023).** The Assessment of Multiplex PCR in Identifying Bacterial Infections in Patients Hospitalized with SARS-CoV-2 Infection: A Systematic Review. *Antibiotics*, 12(3), 465.
- Boles, B. R. & Horswill, A. R. (2008).** Agr-mediated dispersal of *Staphylococcus aureus* biofilms. *PLoS pathogens*, 4(4), e1000052.
- Bose, S.; Khodke, M.; Basak, S. & Mallick, S. K. (2009).** Detection of biofilm producing staphylococci: need of the hour. *J Clin Diagn Res*, 3(6), 1915-20.
- Bozzi Cionci, N.; Baffoni, L.; Gaggia, F. & Di Gioia, D. (2018).** Therapeutic microbiology: the role of *Bifidobacterium breve* as food supplement for the prevention/treatment of paediatric diseases. *Nutrients*, 10(11), 1723.
- Brito, I. L.; Yilmaz, S.; Huang, K.; Xu, L.; Jupiter, S. D.; Jenkins, A. P. & Alm, E. J. (2016).** Mobile genes in the human microbiome are structured from global to individual scales. *Nature*, 535(7612), 435-439.

- Brust, F. R.; Boff, L.; da Silva Trentin, D.; Pedrotti Rozales, F.; Barth, A. L. & Macedo, A. J. (2019).** Macrocolony of NDM-1 producing *Enterobacter hormaechei* subsp. *oharae* generates subpopulations with different features regarding the response of antimicrobial agents and biofilm formation. *Pathogens*, 8(2), 49.
- Burton, J. P.; Chilcott, C. N.; Moore, C. J.; Speiser, G. & Tagg, J. R. (2006).** A preliminary study of the effect of probiotic *Streptococcus salivarius* K12 on oral malodour parameters. *Journal of applied microbiology*, 100(4), 754-764.
- Burton, J. P.; Chilcott, C. N.; Wescombe, P. A. & Tagg, J. R. (2010).** Extended safety data for the oral cavity probiotic *Streptococcus salivarius* K12. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 2, 135-144.
- Burton, J. P.; Drummond, B. K.; Chilcott, C. N.; Tagg, J. R.; Thomson, W. M.; Hale, J. D. & Wescombe, P. A. (2013).** Influence of the probiotic *Streptococcus salivarius* strain M18 on indices of dental health in children: a randomized double-blind, placebo-controlled trial. *Journal of medical microbiology*, 62(6), 875-884.
- Burton, J. P.; Wescombe, P. A.; Macklaim, J. M.; Chai, M. H.; MacDonald, K.; Hale, J. D. & Cadieux, P. A. (2013).** Persistence of the oral probiotic *Streptococcus salivarius* M18 is dose dependent and megaplasmid transfer can augment their bacteriocin production and adhesion characteristics. *PloS one*, 8(6), e65991.
- Bustamante, M., Oomah, B., Mosi-Roa, Y., Rubilar, M., and Burgos-Díaz, C. (2020).** Probiotics as an adjunct therapy for the treatment of halitosis, dental caries and periodontitis. *Probiotics Antimicrob. Proteins* 12, 325–334.
- Chen, C. C.; Lai, C. C.; Huang, H. L.; Su, Y. T.; Chiu, Y. H.; Toh, H. S. & Tang, H. J. (2021).** Antimicrobial ability and mechanism analysis of *Lactobacillus* species against carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 54(3), 447-456.

- Chen, X.; Daliri, E. B. M.; Chelliah, R. & Oh, D. H. (2020).** Isolation and identification of potentially pathogenic microorganisms associated with dental caries in human teeth biofilms. *Microorganisms*, 8(10), 1596.
- Cherifi, S.; Byl, B.; Deplano, A.; Nonhoff, C.; Denis, O. & Hallin, M. (2013).** Comparative epidemiology of *Staphylococcus epidermidis* isolates from patients with catheter-related bacteremia and from healthy volunteers. *Journal of clinical microbiology*, 51(5), 1541–1547.
- Chopra, L.; Singh, G.; Kumar Jena, K. & Sahoo, D. K. (2015).** Sonorensin: a new bacteriocin with potential of an anti-biofilm agent and a food biopreservative. *Scientific reports*, 5(1), 13412.
- Choudhary, P.; Kraatz, H. B.; Lévesque, C. M. & Gong, S. G. (2023).** Microencapsulation of Probiotic *Streptococcus salivarius* LAB813. *ACS omega*, 8(13), 12011-12018.
- Christensen, G. D.; Simpson, W. A.; Younger, J. J.; Baddour, L. M.; Barrett, F. F.; Melton, D. M. & Beachey, E. H. (1985).** Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of clinical microbiology*, 22(6), 996-1006.
- Ciofu, O.; Moser, C.; Jensen, P. Ø. & Høiby, N. (2022).** Tolerance and resistance of microbial biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 20(10), 621-635.
- Collee, J. G.; Miles, R. S., & Watt, B. (1996).** Tests for identification of bacteria. *Mackie and McCartney practical medical microbiology*, 14, 131-49.
- Colombo, N. H.; Kreling, P. F.; Ribas, L. F.; Pereira, J. A.; Kressirer, C. A.; Klein, M. I. & Duque, C. (2017).** Quantitative assessment of salivary oral bacteria according to the severity of dental caries in childhood. *Archives of oral biology*, 83, 282-288.

- Coronado-Castellote, L. & Jiménez-Soriano, Y. (2013).** Clinical and microbiological diagnosis of oral candidiasis. *Journal of clinical and experimental dentistry*, 5(5), e279–e286.
- Costerton, J. W.; Stewart, P. S. & Greenberg, E. P. (1999).** Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *science*, 284(5418), 1318-1322.
- Dahlén, G. (2009).** Bacterial infections of the oral mucosa. *Periodontology 2000*, 49(1), 13-38.
- De Sousa Né, Y. G.; Lima, W. F.; Mendes, P. F. S.; Baia-da-Silva, D. C.; Bittencourt, L. O.; Nascimento, P. C. & Lima, R. R. (2023).** Dental Caries and Salivary Oxidative Stress: Global Scientific Research Landscape. *Antioxidants*, 12(2), 330.
- Di Pierro, F.; Iqtadar, S.; Mumtaz, S. U.; Bertuccioli, A.; Recchia, M.; Zerbinati, N. & Khan, A. (2022).** Clinical Effects of *Streptococcus salivarius* K12 in Hospitalized COVID-19 Patients: Results of a Preliminary Study. *Microorganisms*, 10(10), 1926.
- Donlan, R. M. & Costerton, J. W. (2002).** Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews*, 15(2), 167-193.
- Dowarah, R.; Verma, A. K. & Agarwal, N. (2017).** The use of Lactobacillus as an alternative of antibiotic growth promoters in pigs: A review. *Animal Nutrition*, 3(1), 1-6.
- Fairiska, N.; Bachtiar, B. M. & Gultom, F. P. (2017).** Analysis of the inhibitory potential of streptococcus salivarius isolated from adult saliva and the tongue dorsum for the growth of candida albicans. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 9, 3-7.

- Fenster, K.;** Freeburg, B.; Hollard, C.; Wong, C.; Rønhave Laursen, R. & Ouwehand, A. C. (2019). The production and delivery of probiotics: A review of a practical approach. *Microorganisms*, 7(3), 83.
- Flayyih, A. S.;** Hassani, H. H. & Wali, M. H. (2016). Identification of Streptococcus mutans from human dental plaque and dental caries using 16srrna gene. *Iraqi Journal of Science*, 552-557.
- Flemming, H. C. &** Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature reviews microbiology*, 8(9), 623-633.
- França, A.;** Carvalhais, V.; Maira-Litrán, T.; Vilanova, M.; Cerca, N. & Pier, G. (2014). Alterations in the Staphylococcus epidermidis biofilm transcriptome following interaction with whole human blood. *Pathogens and disease*, 70(3), 444-448.
- Franklin, D.** (2013). Good bacteria for bad breath. *Scientific American*, 308(5), 30-33.
- Freeman, D. J.;** Falkiner, F. R. & Keane, C. T. (1989). New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of clinical pathology*, 42(8), 872-874.
- Frickmann, H.;** Klenk, C.; Warnke, P.; Redanz, S. & Podbielski, A. (2018). Influence of probiotic culture supernatants on in vitro biofilm formation of staphylococci. *European Journal of Microbiology and Immunology*, 8(4), 119-127.
- Fuller, R.** (1989). Probiotics in man and animals. *The Journal of applied bacteriology*, 66(5), 365-378.
- Gajdács, M. &** Urbán, E. (2020). The pathogenic role of Actinomyces spp. and related organisms in genitourinary infections: discoveries in the new, modern diagnostic era. *Antibiotics*, 9(8), 524.

- Gibson G. R.;** R. A. Rastall, R. Fuller. (2008). The Health Benefits of Probiotics and Prebiotics. *Journal of Applied Bacteriology*, p:46-58.
- Giffard, P. M.;** Allen, D. M.; Milward, C. P.; Simpson, C. L. & Jacques, N. A. (1993). Sequence of the *gtfK* gene of *Streptococcus salivarius* ATCC 25975 and evolution of the *gtf* genes of oral streptococci. *Journal of general microbiology*, 139(7), 1511–1522.
- Giffard, P. M.;** Simpson, C. L.; Milward, C. P. & Jacques, N. A. (1991). Molecular characterization of a cluster of at least two glucosyltransferase genes in *Streptococcus salivarius* ATCC 25975. *Journal of general microbiology*, 137(11), 2577–2593.
- Giordano-Kelhoffer, B.;** Lorca, C.; March Llanes, J.; Rábano, A.; Del Ser, T.; Serra, A. & Gallart-Palau, X. (2022). Oral Microbiota, Its Equilibrium and Implications in the Pathophysiology of Human Diseases: A Systematic Review. *Biomedicines*, 10(8), 1803.
- Gomaa, E. Z.** (2013). Antimicrobial and anti-adhesive properties of biosurfactant produced by lactobacilli isolates, biofilm formation and aggregation ability. *The journal of general and applied microbiology*, 59(6), 425-436.
- Gonçalves, A. C. S.;** Martins, M. C. N.; Paula, B. L.; Weckwerth, P. H.; Franzolin, S. O. B. & Silveira, E. M. V. (2019). A new technique for tongue brushing and halitosis reduction: the X technique. *Journal of applied oral science : revista FOB*, 27, e20180331.
- Gong, S. G.;** El-Shennawy, S.; Choudhary, P.; Dufour, D. & Lévesque, C. M. (2023). Antimicrobial activity of probiotic *Streptococcus salivarius* LAB813 on in vitro cariogenic biofilms. *Archives of Oral Biology*, 154, 105760.
- Guerra, M. E. S.;** Destro, G.; Vieira, B.; Lima, A. S.; Ferraz, L. F. C.; Hakansson, A. P. & Converso, T. R. (2022). *Klebsiella pneumoniae* biofilms and their role

in disease pathogenesis. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 12, 877995.

Gupta, P.; Sarkar, S.; Das, B.; Bhattacharjee, S. & Tribedi, P. (2016). Biofilm, pathogenesis and prevention—a journey to break the wall: a review. *Archives of microbiology*, 198, 1-15.

Halah Kamal, A. L. & Wia'am Al-Amili, A. (2014). Comparison Between Traditional and PCR Analysis for Identification of Oral Streptococci with Dental Caries in Iraqi Diabetic Patients. *Iraqi journal of biotechnology*, 13(2), 224-236.

Hale, J. D. F., Jain, R., Wescombe, P. A., Burton, J. P., Simon, R. R., & Tagg, J. R. (2022). Safety assessment of *Streptococcus salivarius* M18 a probiotic for oral health. *Beneficial microbes*, 13(1), 47-60.

Hamilton-Miller, J. M. T. (2004). Probiotics and prebiotics in the elderly. *Postgraduate Medical Journal*, 80(946), 447-451.

Hampelska, K.; Jaworska, M. M.; Babalska, Z. Ł. & Karpiński, T. M. (2020). The Role of Oral Microbiota in Intra-Oral Halitosis. *Journal of clinical medicine*, 9(8), 2484.

Han, Y. W. (2015). *Fusobacterium nucleatum*: a commensal-turned pathogen. *Current opinion in microbiology*, 23, 141-147.

Harini, P. M. & Anegundi, R. T. (2010). Efficacy of a probiotic and chlorhexidine mouth rinses: A short-term clinical study. *Journal of Indian society of pedodontics and preventive dentistry*, 28(3), 179-182.

HAYAKAWA, T.; Tanaka, T.; Sakaguchi, K.; Otake, N. & Yonehara, H. (1979). A linear plasmid-like DNA in *Streptomyces* sp. producing lankacidin group antibiotics. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 25(4), 255-260.

- He, L.;** Yang, H.; Chen, Z. & Ouyang, X. (2020). The Effect of *Streptococcus salivarius* K12 on Halitosis: a Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 12(4), 1321–1329.
- Heilmann, C.** (2011). Adhesion mechanisms of staphylococci. *Bacterial Adhesion: Chemistry, Biology and Physics*, 105-123.
- Hemarajata, P. & Versalovic, J.** (2013). Effects of probiotics on gut microbiota: mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation. *Therapeutic advances in gastroenterology*, 6(1), 39-51.
- Hoare, A., Marsh, P. D., and Diaz, P. I.** (2017). Ecological therapeutic opportunities for oral diseases. *Microbiol. Spectr.* 5, 1–24.
- Hoshino, T.;** Fujiwara, T. & Kawabata, S. (2012). Evolution of cariogenic character in *Streptococcus mutans*: horizontal transmission of glycosyl hydrolase family 70 genes. *Scientific reports*, 2(1), 518.
- Hoshino, T.;** Kawaguchi, M.; Shimizu, N.; Hoshino, N.; Ooshima, T. & Fujiwara, T. (2004). PCR detection and identification of oral streptococci in saliva samples using *gtf* genes. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 48(3), 195-199.
- Houle, M. A. & Grenier, D.** (2003). Maladies parodontales: connaissances actuelles. *Médecine et maladies infectieuses*, 33(7), 331-340.
- Huang, F.;** Teng, K.; Liu, Y.; Cao, Y.; Wang, T.; Ma, C. & Zhong, J. (2021). Bacteriocins: Potential for human health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021, 1-17.
- Huang, H.;** Peng, C.; Peng, P.; Lin, Y.; Zhang, X. & Ren, H. (2019). Towards the biofilm characterization and regulation in biological wastewater treatment. *Applied microbiology and biotechnology*, 103, 1115-1129.

- Huang, N.;** Li, J.; Qiao, X.; Wu, Y.; Liu, Y.; Wu, C. & Li, L. (2022). Efficacy of probiotics in the management of halitosis: a systematic review and meta-analysis. *BMJ open*, 12(12).
- Jansen, P. M.,** Abdelbary, M. M., & Conrads, G. (2021). A concerted probiotic activity to inhibit periodontitis-associated bacteria. *PLoS One*, 16(3).
- Jia, G. C.;** Che, N.; Xia, Y. J.; Lai, P. F.; Xiong, Z. Q.; Wang, G. Q.; Zhang, H. & Ai, L. Z. (2019). Adhesion to pharyngeal epithelium and modulation of immune response: *Lactobacillus salivarius* AR809, a potential probiotic strain isolated from the human oral cavity. *Journal of dairy science*, 102(8), 6738–6749.
- Jung, J. Y.;** Yoon, H. K.; An, S.; Lee, J. W.; Ahn, E. R.; Kim, Y. J. & Lim, S. K. (2018). Rapid oral bacteria detection based on real-time PCR for the forensic identification of saliva. *Scientific Reports*, 8(1), 10852.
- Jussiaux, F.;** Miot-Sertier, C.; Nguyen-Lopez, D.; Badet, C. & Samot, J. (2021). Reliability of MALDI-TOF mass spectrometry to identify oral isolates of *Streptococcus salivarius* and *Lactobacillus* spp. *Archives of Oral Biology*, 121, 104983.
- Kaci, G.;** Goudercourt, D.; Dennin, V.; Pot, B.; Doré, J.; Ehrlich, S. D. & Delorme, C. (2014). Anti-inflammatory properties of *Streptococcus salivarius*, a commensal bacterium of the oral cavity and digestive tract. *Applied and environmental microbiology*, 80(3), 928-934.
- Kadhun, F. M.** (2022). Antimicrobial activity of *Lactobacillus acidophilus* against pathogenic *Escherichia coli* isolated from diarrhea patients. *Journal of Bioscience and Applied Research*, 8(3), 173-180.
- Kareem, A.,** Al-Sahlany, S. T. G., Verma, D. K., Thakur, M., Mohapatra, B., Singh, S., ... & Banwo, K. (2022). Trends, Analytical Approaches, and Applications of the VITEK System for Identification and Classification of Bacteria and Yeasts.

In *Quantitative Methods and Analytical Techniques in Food Microbiology* (pp. 255-272). Apple Academic Press.

- Khalil**, I. I.; Fadihl, S. J. & Ali, H. H. (2018). Antimicrobial Effect of Lactobacillus as a Probiotic Isolated from Yoghurt Products Against Staphylococcus aureus and Escherichia. coli. *Ibn AL-Haitham Journal For Pure and Applied Science*, 135-142.
- Khan**, F.; Shukla, I.; Rizvi, M.; Mansoor, T. & Sharma, S. C. (2011). Detection of biofilm formation in Staphylococcus aureus. Does it have a role in treatment of MRSA infections?. *Trends in Medical Research*, 6(2), 116-123.
- Kim**, N. N.; Kim, W. J. & Kang, S. S. (2019). Anti-biofilm effect of crude bacteriocin derived from Lactobacillus brevis DF01 on Escherichia coli and Salmonella Typhimurium. *Food control*, 98, 274-280.
- Kim**, Y. H. & Lee, S. Y. (2015). Identification of non-streptococcal organisms from human dental plaque grown on the Streptococcus-selective medium mitis-salivarius agar. *Archives of oral biology*, 60(2), 267–271.
- Könönen**, E. & Wade, W. G. (2015). Actinomyces and related organisms in human infections. *Clinical microbiology reviews*, 28(2), 419-442.
- Koo**, H.; Andes, D. R. & Krysan, D. J. (2018). Candida-streptococcal interactions in biofilm-associated oral diseases. *PLoS pathogens*, 14(12), e1007342.
- Landini**, P.; Antoniani, D.; Burgess, J. G. & Nijland, R. (2010). Molecular mechanisms of compounds affecting bacterial biofilm formation and dispersal. *Applied microbiology and biotechnology*, 86, 813-823.
- Lassalle**, F.; Spagnoletti, M.; Fumagalli, M.; Shaw, L.; Dyble, M.; Walker, C. & Balloux, F. (2018). Oral microbiomes from hunter-gatherers and traditional farmers reveal shifts in commensal balance and pathogen load linked to diet. *Molecular ecology*, 27(1), 182-195.

- Le, K. Y.; Dastgheyb, S.; Ho, T. V. & Otto, M. (2014).** Molecular determinants of staphylococcal biofilm dispersal and structuring. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 4, 167.
- Lechevallier, M. W.; Cawthon, C. D. & Lee, R. G. (1988).** Factors promoting survival of bacteria in chlorinated water supplies. *Applied and environmental microbiology*, 54(3), 649-654.
- Lee, S. H. & Kim, Y. J. (2014).** A comparative study of the effect of probiotics on cariogenic biofilm model for preventing dental caries. *Archives of microbiology*, 196, 601-609.
- Leitão, J. H. (2020).** Microbial virulence factors. *International journal of molecular sciences*, 21(15), 5320.
- Leoney, A.; Karthigeyan, S.; Asharaf, A. S. & Felix, A. J. W. (2020).** Detection and categorization of biofilm-forming *Staphylococcus aureus*, *Viridans streptococcus*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Escherichia coli* isolated from complete denture patients and visualization using scanning electron microscopy. *Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry*, 10(5), 627.
- Li, J.; Zhang, W.; Wang, C.; Yu, Q.; Dai, R. & Pei, X. (2012).** *Lactococcus lactis* expressing food-grade β -galactosidase alleviates lactose intolerance symptoms in post-weaning Balb/c mice. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96, 1499-1506.
- Li, X.; Fields, F. R.; Ho, M.; Marshall-Hudson, A.; Gross, R.; Casser, M. E. & Naito, M. (2021).** Safety assessment of *Streptococcus salivarius* DB-B5 as a probiotic candidate for oral health. *Food and Chemical Toxicology*, 153, 112277.
- López, D.; Vlamakis, H. & Kolter, R. (2010).** Biofilms. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(7), a000398.

- MacDonald**, K. W.; Chanyi, R. M.; Macklaim, J. M.; Cadieux, P. A.; Reid, G. & Burton, J. P. (2021). *Streptococcus salivarius* inhibits immune activation by periodontal disease pathogens. *BMC Oral Health*, 21(1), 1-16.
- Mahmoud**, E. A., Abd-Alla, A. E. A., Bakhiet, E. K., & Sorour, M. A. (2020). The Optimum Conditions for Producing Fermented Milk Used in the Manufacture of Fayesh Bread. *Egyptian Journal of Food Science*, 48(1), 135-145.
- Mahmoudi**, R. (2013). Improvement the hygienic quality and organoleptic properties of bioyoghurt using *Cuminum cyminum* L. essential oil. *J Agroalimentary Process Technol*, 19(4), 405-12.
- Mansur**, R. D. & Ahmed, M. E. (2022). Characteristics Salivaricins producing *Streptococcus salivarius* isolated from gingiva.
- Marrelli**, M.; Tatullo, M.; Dipalma, G. & Inchingolo, F. (2012). Oral infection by *Staphylococcus aureus* in patients affected by White Sponge Nevus: a description of two cases occurred in the same family. *International journal of medical sciences*, 9(1), 47–50.
- Marsh**, P. D.; Head, D. A. & Devine, D. A. (2015). Dental plaque as a biofilm and a microbial community—Implications for treatment. *Journal of oral biosciences*, 57(4), 185-191.
- McConoughey**, S. J.; Howlin, R.; Granger, J. F.; Manring, M. M.; Calhoun, J. H.; Shirtliff, M. & Stoodley, P. (2014). Biofilms in periprosthetic orthopedic infections. *Future microbiology*, 9(8), 987-1007.
- Mireles**, J. R.; Toguchi, A. & Harshey, R. M. (2001). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: surfactin inhibits biofilm formation. *Journal of bacteriology*, 183(20), 5848-5854.

- Mohammed**, Y. J.; Mustafa, J. Y. & Abdullah, A. R. (2020). Isolation and molecular study of some bacterial urinary tract infections of sheep in Basrah province. *The Iraqi Journal of Agricultural Science*, 51(3), 885-893.
- Mokhtar**, M.; Rismayuddin, N. A. R.; Mat Yassim, A. S.; Ahmad, H.; Abdul Wahab, R.; Dashper, S. & Arzmi, M. H. (2021). *Streptococcus salivarius* K12 inhibits *Candida albicans* aggregation, biofilm formation and dimorphism. *Biofouling*, 37(7), 767-776.
- Moon**, Y. M.; Moon, J. E.; Lee, M. R. & Cho, J. W. (2016). Antibacterial effects of *Streptococcus salivarius* K12 on oral bacteria. *International Journal of Clinical Preventive Dentistry*, 12(4), 209-220.
- Morou-Bermudez**, E.; Elias-Boneta, A.; Billings, R. J.; Burne, R. A.; Garcia-Rivas, V.; Brignoni-Nazario, V. & Suarez-Perez, E. (2011). Urease activity in dental plaque and saliva of children during a three-year study period and its relationship with other caries risk factors. *Archives of oral biology*, 56(11), 1282-1289.
- Muhammad**, M. H.; Idris, A. L.; Fan, X.; Guo, Y.; Yu, Y.; Jin, X. & Huang, T. (2020). Beyond risk: bacterial biofilms and their regulating approaches. *Frontiers in microbiology*, 11, 928.
- Nakanishi**, H.; Kido, A.; Ohmori, T.; Takada, A.; Hara, M.; Adachi, N. & Saito, K. (2009). A novel method for the identification of saliva by detecting oral streptococci using PCR. *Forensic science international*, 183(1-3), 20-23.
- Nanbu**, A.; Hayakawa, M.; Takada, K.; Shinozaki, N.; Abiko, Y. & Fukushima, K. (2000). Production, characterization, and application of monoclonal antibodies which distinguish four glucosyltransferases from *Streptococcus sobrinus*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 27(1), 9-15.

- Nasiri, K.;** Masoumi, S. M.; Amini, S.; Goudarzi, M.; Tafreshi, S. M.; Bagheri, A. & Gholizadeh, O. (2023). Recent advances in metal nanoparticles to treat periodontitis. *Journal of Nanobiotechnology*, 21(1), 283.
- Negash, A. W. & Tsehai, B. A.** (2020). Current applications of bacteriocin. *International Journal of Microbiology*, 2020.
- Nesher, L. & Rolston, K. V.** (2014). The current spectrum of infection in cancer patients with chemotherapy related neutropenia. *Infection*, 42(1), 5–13.
- Nguyen, T.; Brody, H.; Radaic, A. & Kapila, Y.** (2021). Probiotics for periodontal health-Current molecular findings. *Periodontology 2000*, 87(1), 254–267.
- Niveditha, S.; Pramodhini, S.; Umadevi, S.; Kumar, S. & Stephen, S.** (2012). The isolation and the biofilm formation of uropathogens in the patients with catheter associated urinary tract infections (UTIs). *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, 6(9), 1478.
- O'sullivan, L.; Ross, R. P. & Hill, C.** (2002). Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie*, 84(5-6), 593-604.
- Obasuyi, O.; McClure, J.; Oronsaye, F. E.; Akerele, J. O.; Conly, J. & Zhang, K.** (2020). Molecular Characterization and Pathogenicity of *Staphylococcus aureus* Isolated from Benin-City, Nigeria. *Microorganisms*, 8(6), 912.
- O'GARA, J. P. & Humphreys, H.** (2001). *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. *Journal of medical microbiology*, 50(7), 582-587.
- Oliveira, A. & Cunha, M. D. L. R.** (2010). Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci. *BMC research notes*, 3(1), 1-8.
- O'Sullivan, D. J.** (2001). Screening of intestinal microflora for effective probiotic bacteria. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(4), 1751-1760.

- Otto, M.** (2006). Bacterial evasion of antimicrobial peptides by biofilm formation. *Antimicrobial peptides and human disease*, 251-258.
- Otto, M.** (2012). Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections. *Seminars in immunopathology*, 34(2), 201–214.
- Otto, M.** (2013). Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annual review of medicine*, 64, 175-188.
- Otto, M.** (2014). *Staphylococcus aureus* toxins. *Current opinion in microbiology*, 17, 32-37.
- Otto, M.** (2018). Staphylococcal biofilms. *Microbiology spectrum*, 6(4), 6-4.
- Paczosa, M. K. & Mecsas, J.** (2016). *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense. *Microbiology and molecular biology reviews*, 80(3), 629-661.
- Pantel, A., Monier, J., & Lavigne, J. P.** (2018). Performance of the Accelerate Pheno™ system for identification and antimicrobial susceptibility testing of a panel of multidrug-resistant Gram-negative bacilli directly from positive blood cultures. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(6), 1546-1552.
- Parker, R.B.** (1974). Probiotics, the Other Half of Antibiotic Story. *Animal Nutrition & Health*, 29, 4-8.
- Paster, B. J.; Boches, S. K.; Galvin, J. L.; Ericson, R. E.; Lau, C. N.; Levanos, V. A. & Dewhirst, F. E.** (2001). Bacterial diversity in human subgingival plaque. *Journal of bacteriology*, 183(12), 3770-3783.
- Pedersen, G.; Andresen, L.; Matthiessen, M. W.; Rask-Madsen, J. & Brynskov, J.** (2005). Expression of Toll-like receptor 9 and response to bacterial CpG oligodeoxynucleotides in human intestinal epithelium. *Clinical & Experimental Immunology*, 141(2), 298-306.

- Pedroso, J. D. F.; Lotfollahi, Z.; Albattarni, G.; Arruda Schulz, M.; Monteiro, A.; Sehnem, A. L. & Jardini, M. A. N. (2019).** Influence of Periodontal Disease on cardiovascular markers in Diabetes Mellitus patients. *Scientific reports*, 9(1), 16138.
- Percival, S. L.; Malic, S.; Cruz, H. & Williams, D. W. (2011).** Introduction to biofilms. *Biofilms and veterinary medicine*, 41-68.
- Periasamy, S.; Joo, H. S.; Duong, A. C.; Bach, T. H. L.; Tan, V. Y.; Chatterjee, S. S. & Otto, M. (2012).** How *Staphylococcus aureus* biofilms develop their characteristic structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(4), 1281-1286.
- Perricone, M.; Bevilacqua, A.; Corbo, M. R. & Sinigaglia, M. (2014).** Technological characterization and probiotic traits of yeasts isolated from Altamura sourdough to select promising microorganisms as functional starter cultures for cereal-based products. *Food Microbiology*, 38, 26-35.
- Petrova, O. E. & Sauer, K. (2012).** Sticky situations: key components that control bacterial surface attachment. *Journal of bacteriology*, 194(10), 2413-2425.
- Pincus, D. H. (2006).** Microbial identification using the bioMérieux Vitek® 2 system. *Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods*. Bethesda, MD: Parenteral Drug Association, 2006, 1-32.
- Pitts, N. B.; Zero, D. T.; Marsh, P. D.; Ekstrand, K.; Weintraub, J. A.; Ramos-Gomez, F.; Tagami, J.; Twetman, S.; Tsakos, G. & Ismail, A. (2017).** Dental caries. *Nature reviews. Disease primers*, 3, 17030.
- Prifer, V. (1984).** Characterization of plasmid DNA by agarose gel electrophoresis. *Advanced molecular genetics*. Springer-erverlage, Berline, 26-37.

- Ragan, M. A. & Beiko, R. G. (2009).** Lateral genetic transfer: open issues. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1527), 2241-2251.
- Reid, G.; Charbonneau-Smith, R. N.; Lam, D.; Kang, Y. S.; Lacerte, M. & Hayes, K. C. (1992).** Bacterial biofilm formation in the urinary bladder of spinal cord injured patients. *Spinal Cord*, 30(10), 711-717.
- Roberfroid, M. B. (2000).** Prebiotics and probiotics: are they functional foods?. *The American journal of clinical nutrition*, 71(6), 1682S-1687S.
- Rossoni, R. D.; dos Santos Velloso, M.; de Barros, P. P.; de Alvarenga, J. A.; Dos Santos, J. D.; dos Santos Prado, A. C. C. & Junqueira, J. C. (2018).** Inhibitory effect of probiotic *Lactobacillus* supernatants from the oral cavity on *Streptococcus mutans* biofilms. *Microbial pathogenesis*, 123, 361-367.
- Ruchi, T.; Sujata, B. & Anuradha, D. (2015).** Comparison of phenotypic methods for the detection of biofilm production in uro-pathogens in a tertiary care hospital in India. *Int J Curr Microbiol App Sci*, 4(9), 840-49.
- Rudney, J. D.; Chen, R. & Zhang, G. (2005).** Streptococci dominate the diverse flora within buccal cells. *Journal of dental research*, 84(12), 1165–1171.
- Sammons, R. L.; Kaur, D. & Neal, P. (2004).** Bacterial survival and biofilm formation on conventional and antibacterial toothbrushes. *Biofilms*, 1(2), 123-130.
- Sanders, M. E. (2008).** Probiotics: definition, sources, selection, and uses. *Clinical infectious diseases*, 46(Supplement_2), S58-S61.
- Santagati, M., Scillato, M., Patane, F., Aiello, C., & Stefani, S. (2012).** Bacteriocin-producing oral streptococci and inhibition of respiratory pathogens. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 65(1), 23-31.

- Sarkar, S.** (2007). Probiotic therapy for gastro-intestinal allergenic infants: A preliminary review. *British food journal*, 109(6), 481-492.
- Sarlin, S.; Tejesvi, M. V.; Turunen, J.; Vänni, P.; Pokka, T.; Renko, M. & Tapiainen, T.** (2021). Impact of *Streptococcus salivarius* K12 on nasopharyngeal and saliva microbiome: a randomized controlled trial. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 40(5), 394.
- Scully, C. & Greenman, J.** (2008). Halitosis (breath odor). *Periodontology 2000*, 48, 66–75.
- Shah, N. P.** (2007). Functional cultures and health benefits. *International dairy journal*, 17(11), 1262-1277.
- Sharma, M.; Wasan, A. & Sharma, R. K.** (2021). Recent developments in probiotics: An emphasis on Bifidobacterium. *Food Bioscience*, 41, 100993.
- Simons, A.; Alhanout, K. & Duval, R. E.** (2020). Bacteriocins, antimicrobial peptides from bacterial origin: Overview of their biology and their impact against multidrug-resistant bacteria. *Microorganisms*, 8(5), 639.
- Singhai, M.; Malik, A.; Shahid, M.; Malik, M. A. & Goyal, R.** (2012). A study on device-related infections with special reference to biofilm production and antibiotic resistance. *Journal of global infectious diseases*, 4(4), 193.
- Stahlberg, A.; Krzyzanowski, P. M.; Egyud, M.; Filges, S.; Stein, L. & Godfrey, T. E.** (2017). Simple multiplexed PCR-based barcoding of DNA for ultrasensitive mutation detection by next-generation sequencing. *Nature protocols*, 12(4), 664-682.
- Stašková, A.; Sondorová, M.; Nemcová, R.; Kačírová, J. & Maďar, M.** (2021). Antimicrobial and Antibiofilm Activity of the Probiotic Strain *Streptococcus salivarius* K12 against Oral Potential Pathogens. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 10(7), 793.

- Strus, M.;** Pakosz, K.; Gościński, H.; Przondo-Mordarska, A.; Rozynek, E.; Pituch, H. & Heczko, P. B. (2001). Antagonistic activity of Lactobacillus bacteria strains against anaerobic gastrointestinal tract pathogens (*Helicobacter pylori*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium difficile*). *Medycyna doświadczalna i mikrobiologia*, 53(2), 133-142.
- Sultan, A. M. & Nabel, Y.** (2019). Tube method and Congo red agar versus tissue culture plate method for detection of biofilm production by uropathogens isolated from midstream urine: Which one could be better?. *African Journal of Clinical and Experimental Microbiology*, 20(1), 60-66.
- Suzuki, N.;** Yoneda, M.; Hatano, Y.; Iwamoto, T.; Masuo, Y. & Hirofuji, T. (2011). *Enterococcus faecium* WB2000 inhibits biofilm formation by oral cariogenic Streptococci. *International Journal of Dentistry*, 2011.
- Tagg, J. R.,** Harold, L. K., Jain, R., & Hale, J. D. F. (2023). Beneficial modulation of human health in the oral cavity and beyond using bacteriocin-like inhibitory substance-producing streptococcal probiotics. *Frontiers in microbiology*, 14, 1161155.
- Tahmourespour, A.;** Salehi, R.; Kermanshahi, R. K. & Eslami, G. (2011). The anti-biofouling effect of Lactobacillus fermentum-derived biosurfactant against Streptococcus mutans. *Biofouling*, 27(4), 385-392.
- Tamime, A. Y.** (2002). Microbiology of starter cultures. Robinson, *RK Dairy Microbiology Handbook*, 3, 261.
- Tebyanian, H.;** Bakhtiari, A.; Karami, A. & Kariminik, A. (2017). Antimicrobial activity of some Lactobacillus species against intestinal pathogenic bacteria. *International Letters of Natural Sciences*, 65.
- Teughels, W.;** Van Essche, M.; Sliepen, I. & Quirynen, M. (2008). Probiotics and oral healthcare. *Periodontology 2000*, 48(1), 111-147.

- Tonetti, M. S.; Eickholz, P.; Loos, B. G.; Papapanou, P.; Van Der Velden, U.; Armitage, G. & Suvan, J. E. (2015).** Principles in prevention of periodontal diseases: consensus report of group 1 of the 11th European Workshop on Periodontology on effective prevention of periodontal and peri-implant diseases. *Journal of clinical periodontology*, 42, S5-S11.
- Turroni, F.; Duranti, S.; Milani, C.; Lugli, G. A.; van Sinderen, D. & Ventura, M. (2019).** Bifidobacterium bifidum: a key member of the early human gut microbiota. *Microorganisms*, 7(11), 544.
- Valdez, R. M. A.; ann Ximenez-Fyvie, L.; Caiaffa, K. S.; Dos Santos, V. R.; Cervantes, R. M. G.; Almaguer-Flores, A. & Duque, C. (2021).** Antagonist effect of probiotic bifidobacteria on biofilms of pathogens associated with periodontal disease. *Microbial Pathogenesis*, 150, 104657.
- Vuotto, C.; Longo, F.; Balice, M. P.; Donelli, G. & Varaldo, P. E. (2014).** Antibiotic Resistance Related to Biofilm Formation in *Klebsiella pneumoniae*. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 3(3), 743–758.
- Wescombe, P. A.; Heng, N. C.; Burton, J. P.; Chilcott, C. N. & Tagg, J. R. (2009).** Streptococcal bacteriocins and the case for *Streptococcus salivarius* as model oral probiotics. *Future microbiology*, 4(7), 819-835.
- Whitten, M. & Mahon, R. (2005).** Misconceptions and constraints. In *Sterile insect technique: Principles and practice in area-wide integrated pest management* (pp. 601-626). *Dordrecht: Springer Netherlands*.
- Williams, L. J. & Abdi, H. (2010).** Fisher's least significant difference (LSD) test. *Encyclopedia of research design*, 218(4), 840-853.
- Wu, T.; He, X.; Lu, H.; Bradshaw, D. J.; Axe, A.; Loewy, Z. & Lux, R. (2015).** Development of in vitro denture biofilm models for halitosis related bacteria and their application in testing the efficacy of antimicrobial agents. *The open dentistry journal*, 9, 125.

- Xu, R. R.; Yang, W. D.; Niu, K. X.; Wang, B. & Wang, W. M. (2018).** An update on the evolution of glucosyltransferase (Gtf) genes in *Streptococcus*. *Frontiers in microbiology*, 9, 2979.
- Yan, X.; Gu, S.; Cui, X.; Shi, Y.; Wen, S.; Chen, H. & Ge, J. (2019).** Antimicrobial, anti-adhesive and anti-biofilm potential of biosurfactants isolated from *Pediococcus acidilactici* and *Lactobacillus plantarum* against *Staphylococcus aureus* CMCC26003. *Microbial pathogenesis*, 127, 12-20.
- Yang, D. & Zhang, Z. (2008).** Biofilm-forming *Klebsiella pneumoniae* strains have greater likelihood of producing extended-spectrum β -lactamases. *Journal of Hospital Infection*, 68(4), 369-371.
- Yarwood, J. M.; Bartels, D. J.; Volper, E. M. & Greenberg, E. P. (2004).** Quorum sensing in *Staphylococcus aureus* biofilms. *Journal of bacteriology*, 186(6), 1838-1850.
- Yin, W.; Wang, Y.; Liu, L. & He, J. (2019).** Biofilms: the microbial “protective clothing” in extreme environments. *International journal of molecular sciences*, 20(14), 3423.
- Zarco, M. F.; Vess, T. J. & Ginsburg, G. S. (2012).** The oral microbiome in health and disease and the potential impact on personalized dental medicine. *Oral diseases*, 18(2), 109-120.
- Zhang, J. S.; Chu, C. H. & Yu, O. Y. (2022).** Oral microbiome and dental caries development. *Dentistry journal*, 10(10), 184.

Abstract

This study was conducted to evaluate the inhibitory effect of probiotics extracted from *Streptococcus salivarius* bacteria on the growth of pathogenic bacteria and their biofilms isolated from the oral cavity and surrounding teeth of patients visiting the health center in Al-Abbas district/center, the health center in Al-Hur district, the health center in Aoun district, and the specialized dental clinic in Al-Iskan Street in Karbala Governorate, Iraq. A total of 83 oral swabs were collected from both genders, with ages ranging from 6 to 63 years, from December 10, 2022 to February 12, 2023.

This study included three axes, at first the isolation and identification of *S. salivarius*. The bacteria were cultured on Mitis-salivarius agar and HiCrom strep B selective agar. Based on the bacterial culture characteristics and after diagnosis with the Vitek-2 device, 19 isolates of *S. salivarius* were obtained and molecularly identified using PCR technique by detecting the *gtfk* gene. Secondly the isolation and identification of pathogenic bacteria from patients visiting the same centers. Based on the morphological characteristics of the bacterial cultures and the diagnosis with the Vitek-2 device, four types of pathogenic bacteria were obtained, as follows: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Enterobacter cloacae*. The ability of the pathogenic isolates to form biofilms was also tested using two methods: The Congo red agar method and the microtiter plate method. The results showed that all isolates formed biofilms. At last the study of the inhibitory effect of the probiotic extract on the growth of pathogenic bacteria at the following dilutions: 75, 150, 300, and 600 microliters/ml. The results showed that the pathogenic bacteria were sensitive to the extract. The concentration of 600 microliters/ml showed the highest inhibitory diameter in all species, as follows: (7 mm) *K. pneumoniae*, (10 mm) *E. cloacae*, (11 mm) *S. aureus*, and (10 mm)

S. epidermidis. The concentration of 75 microliters showed the lowest inhibitory diameter, as follows: (0 mm) *K. pneumoniae*, (0 mm) *E. cloacae*, (2 mm) *S. aureus*, and (0 mm) *S. epidermidis*.

The anti-biofilm efficacy of the probiotic was also studied using a series of half-dilutions from (2 - 1048) micrograms/ml and determining the minimum inhibitory concentration (MIC). The results showed a significant decrease in the adsorption values of the biofilms. The largest decrease rates were at the concentrations (1048, 524, 262) micrograms/ml, and the lowest decrease rates were at the concentrations (8, 16) micrograms/ml. The probiotic showed no effect on the biofilms at a concentration of (2) micrograms/ml. The MIC value was (4) micrograms/ml, at which no visible bacterial growth was observed.

Based on the results of this study, we conclude that the probiotic extract isolated from *S. salivarius* bacteria has high efficacy against the growth of pathogenic bacteria isolated from the oral cavity and surrounding teeth and forming biofilms.



Ministry of Higher Education & Scientific Research

University of Kerbala

College of Education for Pure Sciences

Department of Biology

Study of the effect of oral probiotics of the genus *Streptococcus salivarius* on pathogenic biofilm-forming bacteria isolated from the mouth

A Thesis

Submitted to the Council of the College of Education for Pure Sciences
of Kerbala in partial fulfillment of the Degree of Masters in

Biology – Zoology

Written By:

Saif Sameer Khalil Ibraheem

Bachelor of Education for Pure Sciences- Biology 2013

Supervised By

Prof. Dr. Yasemin Khudiar AL-Ghanimi

Second Supervision

Asst. Prof. Dr. Hiyame Abdul Ridha AL-Awade

September 2023 A. D.

Rabi' al-Awwal 1445 A. H.