اختبار فعالية مستخلص البر وبولس الكحولي في نمو البكتريا *Streptococcus mutans* المسببة لتسوس الأسنان

د.مهدي حسين محيل العمار
كلية العلوم \جامعة الكوفة
قسم علوم الحياة

الباحث:قيس خضير عبدالعباس
مستشفى الصدر التعليمي
شعبة البكتريولوجى

الخلاصة:

تم في هذه الدراسة التحري عن البكتيريا *Streptococcus mutans* المسببة لالتهاب الصفيحة السنية، وعزلت من المرضى المصابين بتسوس الأسنان. اختبرت الكفاءة التضادية لمستخلص البروبولس الكحولي في نمو البكتيريا *St. mutans* بطريقة الانتشار بالأقراص.

وكذلك حدد التركيز المثبط الأدنى لمعرفة الفعالية البايولوجية لمستخلص البروبولس حيث كانت تتراوح مابين 12.5-25mg\ ml. وكذلك اختبر الفعل التازرى للمستخلص مع عدد من المضادات الحيوية ،ولوحظ بانة يمتلك فعالية تازرية عالية مع المضادات (Coloxcillin, Streptomycin) حيث كانت اقطار التثبيط فى النمو البكتيري 23.5-22 mm على التوالى.

وأيضا ، سجل فعالية متوسطة مع المضادات الأخرى،في حين لم يسجل اى فعالية تازرية مع المضاد الحيوي Ampicillin.

المقدمة:

تسوس الاسنان مرض تسببهالعديد من الاحياء المجهرية وخاصه البكتريا والفطريات وهو مرض معد وقابل للانتقال من الاشخاص المرضى الى الاصحاء ، يحدث التسوس نتيجة تحطم موضعي لانسجة السنية بفعل انزيمات البكتيريا (Terry;1994) فالتسوس ينشأ في بادئ الامر في بقعة بيضاء عديمة الالم وتتطور هذه البقعة الى تجاويف مع ظهور صبغات ذات لون بني ، يحدث الالم بسبب التحفيز الحراري او بسبب تناول الحلويات والطعام والشراب الحامض (Consumars;1997).

وتعد البكتريا *Streptococcus mutans* احدى المسببات الرئيسية لتسوس الاسنان وهي بكتريا موجبة لصبغة كرام ،حالة الدم من نوع- β، تتواجد بشكل رئيسي في الحليب والماء والخضر والسبيل المعوي للانسان وهي بكتيريا غير متحركة وغير مكونة للابواغ وتحتاج الى وسط غني بالدم ومصل الدم لغرض النمو(Notte;1982;Gupte;1982) .

ذكر(Liu.Liu,(1996 ان معدل نمو الجراثيم السبيحية *St. mutans* وكميتها عند الاطفال الذين يعانون مرض تسوس الاسنان يختلف معنوياً عن معدل نموها وكميتها في الاطفال الاصحاء، وقد وجدان مركبات الدكسترات الليسثين فى *St. mutans* تساعد على التصاق هذه الكائنات بالاسنان حيث تقوم بتحويل السكريات الى جزئيات طويلة لزجة تساعد على الالتصاق بسطح السن (Consumer;1997;Nolt;1982).

ان الصفيحة السنية عبارة عن مواد تلتصق بسطح السن وتتكون من 60% الخلايا الجرثومية واللعاب بالاضافة النواتج الايضية الجرثومية حيث لا يؤدي تراكم هذه المواد الى الاصابة بامراض السن .ويبدأ تكوين الصفحة السنية بالتصاق ضعيف لخلايا الجرثومية السبحية بمساعدة اللعاب ثم يتبع ذلك التصاق قوي ناتج عن وجود بولميرات اللزجة للكلوكوز Glucose والتي تصنع من قبل الجرثومة من السكريات الغذائية ويشترك في هذه العملية انزيم Glycosyl transferase الموجود على سطح خلايا الجرثومة المكورات السبحية *S. mutans* والذي يؤدي الى تحويل السكروز الى بولميرات الدكسترات والليثينات (Davil ,*et al*. 1990).

تلعب الجرثومة السبحية *S. mutans* وعصيات الحليب Lactobacillus والبكتيريا الخيطية Actinomyces sp. دوراً مهماً في حدوث الاصابة بمزض تسوس الاسنان وتكوين الخراجات الناجمة عن تسوس الاسنان .ومن العوامل المؤثرة على تسوس الاسنان هو النظام الانزيمي في الصفيحة السنية للجراثيم الموجودة على سطح الاسنان مما يجعل الجراثيم قادرة على انتاج حامض Lactic acid من بقايا الكاربوهيدرات القابلة للتخمر ومنها السكروز الذي يسبب تسوس الاسنان من خلال زيادة مسامية الصفيحة السنية ،وعند التخمر يصبح الوسط حامضياً والذي يساعد على زيادة اعداد البكتيريا *St. mutans* (Zero,*et al*, ,1994) .كذلك كما ان نقص هرمون الاستروجين Estrogen يساعد على فقدان الغطاء من الفم بعد انقطاع الطمث menopause مما يؤدى الى تخلخل الاسنان (Grodstein, *et al*,1996).

كما وجد ان زيادة التدخين تؤدي الى انخفاض في نسب تسوس الاسنان وزيادة في التهاب اللثة كذلك تؤدي الى توسع في منطقة الترابط بين الانسجة الرابطة وزيادة حركة الاسنان (Bain,1997,Grossi,*et al*,1994).

وهدفت الدراسة الى اختبار حساسية الجرثومة *S .mutans* السبحية لمستخلص البروبولس الكحولي وكذلك دراسة التداخل مع بعض المضادات الحيوية واختبار فعاليتها اتجاهٍ نمو البكتيريا بعد عزلها من المرضى المصابين بتسوس الاسنان .

المواد وطرق العمل

- **جمع العينات البكتيرية :**تم جمع المسحات البكتيرية (*Streptococcus mutans*) من المرضى المصابين بالتهاب الاسنان والمراجعين الى المستشفى .

- **تحضير الاوساط الزرعية:** تم تحضير الاوساط الخاصة بالبكتيريا (*S. mutans*) حسب تعليمات الشركة المصنعة للاوساط الزرعية الموجودة على العبوة (Difco company).

- **دراسة الخصائص المهجرية والبايوكيميائية :** تم دراسه خصائص المستعمرات وصفاتها المظهريه مثل(الشكل ،الحجم،الارتفاع والقوام والقدره علئ انتاج الصبغات والرائحه) اما في الفحوصات المجهرية تم اخذ مسحةswab من بكتيريا (*S. mutans*)من المرضى المصابين (الصفيحة السنية) بتسوس الاسنان و بعد ذالك اجرى تنشيطها في الوسط الزرعي السائل و من ثم تحضينه لمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة 37 م نقل جزء من المستعمرات الى اوساط زرعية صلبة مثل Blood agar ,Nutrient agar وايضا حضنت في الظروف الاعتيادية . درست الصفات المظهرية والزرعية لبكتيريا الاختبار ومقارنتها مع الصفات القياسية،وايضا درست الصفات البايوكيميائية مثل انتاج الانزيمات وتخمر بعض السكريات وبعض الفحوصات الاخرى مع مقارنتها بالنتائج القياسية للتأكد من هوية عزلات الاختبار(1996 Collee *et.al*).

- **تحضير اقراص المضادات الحيوية :** تم تحضير اقراص المضادات الحيوية حسب تعليمات الشركة العالمية وفق لتراكيزها وانواعها (Laurence,*et al* 2004).

- **فصل وتنقية مستخلص البروبولس Propolis :** تم اضافة 10 غم من البروبولس الخام الى 100 مل كحول اثيلي تركيزه 70 % ولمدة اسبوع مع الرج وبعد ذلك فصل مزيج البروبولس بأستخدام اوراق الترشيح (Whattman No.1) ووضع في حاويات معقمة (Ladd *et al*,1998).

- **تحضير تراكيزمستخلص البروبولس** : حضرت سلسلة من التراكيزمن المحلول القياسي المحضر مسبقاَ حسب طريقة Shihata, 1991 . وذلك بأخذ 0.1 مل من هذا المحلول واضافتة الى 5 مل من وسط Nutrient broth ثم نقل 2.5 من المزيج (وسط+ البروبولس) الى انبوبة اختبار ثانية حاوي 2.5 مل من الوسط الزرعي السائل وهكذا الى ان نصل الى اخر تركيز للحصول على التراكيز الاتية (1.5 ،3.5 ،6.25 ،12.5 ،25 ،50)ملغم/مل.

- **اختبار الفعالية المضادة للبكتريا:**

اختبرت فعالية البروبولس تجاة البكتيريا بطريقة الاقراص على وسط مولر هنتون الصلب Baure, *et al* (1996) باخذ 0.1 ml من العالق البكتيرى 24 ساعة ونشر على الاطباق بالناشر بشكل متجانس ثم تركت لمدة 10 دقائق لكي تجف(وقد زرع 3 مكررات لكل عرله) ثم وضعت الاقراص الحاوية على 0.2ml من كل تركيز بواسطة ملقط معقم وبعدها حضنت الاطباق بدرجة 37 م لمدة 24 ساعة وسجلت النتائج لقياس قطر منطقة التثبيط بالملمتر بواسطة المسطرة (Saxena, *et al*. 1995).

- **قياس قيمة المثبط الادنى MIC** :حدد اقل تركيز مثبط ادنى لمركبات البروبولس حسب ما جاء في (Collee,*et al* ;1996)

- **طريقة مزج البروبولس مع عدد من المضادات الحيوية:** تم مزج 600ug\ml من مستخلص البروبولس مع تركيز محدد من المضادات الحيوية حسب الطريقة المتبعة فى (Laurence,*et al* 2004).

***النتائج والمناقشة**

- التشخيص المختبرى:

شخيصت العزلات البكتيرية النامية على الاوساط الزرعية باستخدام الطرق الروتينية في الفحوصات البايوكيميائية لهذ الغرض معتمدين على أساس الخصائص الزرعية cultural charac teristics من خلال إشكال المستعمرات النامية وخصائصها ونموها على الأوساط الزراعية التفريقية وكذلك الخصائص المظهرية morphological characteristics للبكتيريا من خلال صبغة غرام وذلك لقابليتها على الاصطباغ وعند مقارنة هذه النتائج مع النتائج القياسية جاءت متطابقة ومتوافقة مما يؤكد على نقاوة عزلة الاختبار *S.mutans* جدول (1)(MacFaddim,1979 , Finegold *etal*, 1994 ; lee.*et al*,1996)

جدول رقم (1) الفحوصات البايوكيميائية التأكيدية الخاصة *S. mutans*

Test	Result
Gram stain	G+
Acid product from:	
Mannitol	+
Riffinose	+
Sorbitol glucose	+
Starch	+
NH2 product from arginine	+
Aesculin hydrolysis	+

- تحديد قيمة MIC للبروبولس Minimal inhibitory concentration

تم تعين قيمة MIC وفيها تم مزج مستخلص البروبولس مع الوسط ألزرعي Brain heart infusion broth وعمل تخافيف منه وإضافة المزروع الجرثومي له وتبين بأن الفعالية المضادة للمستخلص الكحولي للبرو بولس تزداد بزيادة تركيزه في الوسط ألزرعي إذا أوضحت النتائج ان قيمة MIC تتفاوت اعتمادا على تركيز المستخلص وفترة التحصين جدول رقم (2) .

حيث وجد ان فيه MIC لمستخلص البروبولس الكحولي على جرثومة *S. mutans* بلغت 12.5 ملغم/مل حيث اثر هذا التركيز على نمو البكتيريا بشكل فعال عند فترة حضانة 24 ساعة وتعزى هذه الفعالية التثبيطية إلى احتواء البر بولس العديد من المركبات الطبية الفعالة مثل caffic acid والفينولات والفلافونات بكميات كبيرة (العمار، 2001) .

كذلك احتواءه على بعض المركبات القلويدية والزيوت الطيارة التي تمتلك فعالية مضادة لنمو الجراثيم (العمار، 2001)حيث تقوم هذه المركبات الفعالة على مسخ البروتين في الكائن ألمجهري وإيقاف فعل الإنزيمات

المسوؤلة عن التفاعلات الايضية الأساسية وبالتالي عدم قدرة الكائن ألمجهري على النمو الاستمرار. (Jawets,*etal*,`2006;,Pyaktin,*etal*;1990.Kirvosheim,1987).

جدول رقم (2) يوضح فيه MIC لمستخلص البربولس الكحولي في نمو البكتريا

3.1mg/ml	6.2mg/ml	12.5 mg/ml	25mg/ml	50mg/ml	Conc..Bacteria
+	+	-	-	-	*St.mutans* growth
+	+	+	+	+	Control

_ -عدم وجود نمو بكتيرى

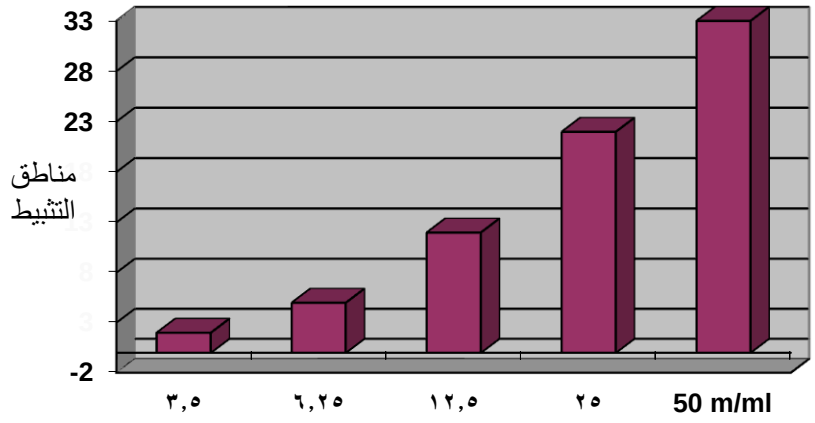
+:وجود نمو

- تأثير مستخلص البر بولس الكحولي في نمو البكتريا *St. Mutans*

لقد تباين تأثير التراكيز المختلفة للمستخلص البروبولس الكحولي في نمو الكتريا *St.mutans* . حيث أبدت بكتريا الاختبار حساسية للمستخلص بالتركيز12.5ملغم/مل وازدادت حيث أصبحت في ذروتها عند التركيز 25 ملغم/مل الذي يعتبر أفضل تركيز لمنع نمو البكتريا بشكل كامل وبفروق معنوية واضحة عند مستوى احتمالية $P < 0.001$ قيمة L.S.D = 0.675. حسب الشكل رقم (1) .

أن التباين الحاصل بين تراكيز المستخلص وبين درجة تأثيره على نمو البكتيريا مرتبط مع زيادة التركيز، حيث كلما زاد تركيز المستخلص زاد تاثير المواد الفعالة فيه وبالتالي زيادة في تثبيط نمو الجراثيم وهذا يتفق مع ما توصل أليه (الذهب ، 1998 ، Taylor,*etal*,1996، العمار،2001) .

يعزى هذا ألتأثير في النمو البكتيري إلى عدم قدرة البكتيريا على مقاومة المواد الفعالة وعدم قدرتها على الحركة وتكوين السبورات التي تعطيها المقاومة كذلك عدم امتلاكها إلى البلازميدات والتراكيب الأخرى التي تساعد احداث الفوعة مما يجعلها حساسة لهذا المستخلص (Gupte,1982,Nolte.1982) .



شكل (1)معدلات اقطار التثبيط لتراكيز محسسه من مستخلص البروبولس الكحولى

- تأثير مزيج المستخلص مع المضادات الحيوية في نمو البكتريا

بعدالحصول على المستخلص الكحولي للبربولس تم تحضير تراكيز مختلفة من المحلول واختير افضل تركيز 600 µg/ml ومزجت بشكل جيد مع عدد من المضادات الحيوية وتم معرفة تأثير المزيج على نمو البكتريا من خلال تثبيط أو زيادة النمو وقد أوضحت النتائج (جدول رقم 3) أن مستخلص البربولس الكحولي عند مزجه مع المضادات الحيوية التجارية أعطى نتائج ايجابية وأخرى سلبية لكن الفعالية تختلف حيث عند مزج البروبولس مع Sreptomucin Coloxcillin اعطى نتائج عالية الفعالية اتجاه النمو البكتيري ،أما عند مزج البروبولس مع Ciproflaxin,Doxycyin,Chlormphencol, Polymixin,Cefradin كانت متوسطة الفعالية التأزرية أما مع Ampecillin لا يعطي نتيجة تأزرية. ويعزى السبب في ذلك إلى فعالية المضاد الحيوي وتأثيره على النمو البكتيري مع شدته على التآزر مع المركبات الفعالة في البر وبولس وإمكانية مقاومة البكتيريا للمضاد الحيوي المستخدم وتزداد تأثير البروبولس مع المضادات أفضل مقارنة بالاستخدام المنفرد نظرا لاحتوائه على مركبات كيميائية ذات فعل تأزري مع عدد من المضادات الحيوية مثل المركبات الفينولية والتربينية مما يجعله ذو كفاءة تثبيطية عالية اتجاه المسببات المرضية وهذا يتفق مع ما توصل اليه (Harsh ،1984;Alammar,2001) &Nag أن طبيعة الجدار الخلوى البكتيريا *S. mutans بانة* غشاء نفاذاً للعوامل المضادة للجراثيم والتى لا تمتلك اساليب المقاومة للعوامل المضادة الميكروبية مقارنة بالجراثيم السالبة لصبغة كرام (Laurence, *etal*,1997) .

أتضح من خلال الدراسة أن البروبولس يمتلك فعالية عالية في نمو البكتريا *S. mutance نظرا* لاحتواءه على بعض المركبات الفعاية ذات التأثير الطبي المعالج مع عدم وجود اثر سمي على الخلايا والانسجة مما يجعل استخدامه أميناً في معالجة الامراض وخاصة امراض تسوس الاسنان ونوصي بتنقية واستخلاص هذا المركبات واستخدامها لاغراض الطبيةالاخرى.

جدول رقم (3) اقطار مناطق لمزيج مستخلص البر وبولس مع عدد المضادات في نمو البكتريا بطريقة الأقراص

Mixed	Inhibitory zone diameter
Ciprofloxacin+EEP	18,5mm
Doxycyin+EEP	16.9mm
Coloxcillin+EEP	23.5mm

Streptomycin+EEP	22.5mm
Chloramphenicol+EEP	19.2mm
Polymyxin+EEP	16mm
Cefradin+EEP	16.5mm
Ampicillin+EEP	---____

EEP:Ethanol Extract Propolis

- تحديد الفعل التازرى للبروبولس مع المضادات الحيوية

- وعند مزج مستخلص البروبولس الكحولى ذو التركيز 600mg\ml مع تراكيز محددة من المضادات الحيوية لوحظ ان هناك تباين فى اقطار مناطق التثبيط فى نمو البكتيريا فى *St.mutans* حيث يعتبر مزيج(Coloxcillin+EEP وStreptomycin+EEP) من افضل المزيجات المستخدمة وكانت اقطار مناطق التثبيط(23.5mm و 22.5mm) على التوالى.

اما تاثير مزيجات كل من (Chloramphenicol+EEP، P.G+EEP ، Doxycyin+EEP , Polymyxin+EEP) فى نمو البكتيريا كانت متوسطة حيث اقطار مناطق التثبيط(19.2mm،18,5mm ، 16mm،) على التوالى. فى حين لم يظهر اى تاثير تازرى لمزيجAmpicillin+EEP فى نمو البكتيريا 0جدول رقم (4)

ويعود السبب فى ذلك الى احتواء البروبولس على العديد من المركبات ذات الفعل التازرى مع بعض المضادات الحيوية، وهناك عوامل مؤثرة فى التازر هى نوع المضاد المستخدم وكذلك نوع البكتيريا.يحتوى البروبولس على مركبات عديدة وبتراكيز عالية مثل المركبات التانينية والتربينية وهى مركبات نيتروجينية ذات خواص قطبية و تمتلك فعل تازرى عال.(Jawets,*et al*,1998;Tayler,*et al*,1996).

جدول (4) الفعل التازرى لمركب البر وبولس مع عدد من المضادات الحيوية

Mg\disc	Antibiotics	Propolis Dose	Synergism
30	Ciprofloxacin	600µg\ml	Moderate
30	Doxycyin	600 µg /ml	Moderate
10	Strepotomycin	600 µg /ml	High
20	Coloxcillin	600 µg /ml	High
30	Chloramphenicol	600 µg /ml	Moderate
20	Polymyxin	600 µg /ml	Moderate
30	Cefradin	600 µg /ml	Moderate

10	Ampicillin	_ 600 µg /ml	Non effect

***References**

-**Baron And Finegold** . (1994). Baily and Scotts Diagnostics Microbiology . 19th Ed. Mosby yearbook .

-**Bauer**, A .W.,Kirby, W.M.M,Sherris,E.G.Jurk, M. (1966).Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method . American Journal of clinical pathology . 45.pp 493-496.

- **Collee**,J.G.; Fraser, A. G; Marmion, B.P.; Simmons, A.(1996):"Maki & MacCartney practical medical microbiology". 14th ed . Chruchill living st U.S.A.

-**Harsh** , M.L. and Nag, T.N.(1984). Antimicrobial principles from in vitro tissue culture of peganum harmala. J of. Nat. Prod. 47(2). 365-367.

-**Jawetz**, E; Melnick, J. L. and Adelberg, E.A.(1998). Medical microbiology. 21.Ed.Appleton and Lang .

-**Laurance**, D.R. Bennet, P.N. and Brown.M.J.(1997). Clinical pharmacology .8th .Ed. Churchill . L.IV. Ingeston.

-**Saxena**,G.; Faemer, S,; Hancock, R.E.W. & Towers, G.H.N.(1995).Antimicrobial compounds from ***Alnus rubra*** . Int. J. of pharmcognosy.

-**Shihata** ,I.M.(1951).Pharmacological study of Analogies arvensis. M.D. vet. Thesis, Cairo University.

-**Taylor**, R.S.L.; Manandhar, N.P.; Hudson, J.B.& Towers, G.H.N.(1996 a).Antiviral activity of Nepales medicinal plants. J.of.Ethnopharmocology.52;pp 157-163.

Abstract :-

Antibacterial activity of the ethanol extract propolis were studied against *streptococcus mutans* which isolated from patients with dental carries, by the disc diffusion method.

The minimum inhibitory concentration were also measured for the biologically active ethanol extract propolis,. The MIC value were within the range of 12.5-25mg\ml.

The combination of EEP with several antibiotics have been used to eradicate this infection.The results showed that the presence of two drugs(Coloxcillin, Streptomycin) are highest synergism activity with EEP, the inhibitory zone were 23.5,22.5mm respectively .

Also, the EEP have ,moderate synergistic activity with other antibiotics ,except Ampicillin were non synergism were observed.