P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703
2016,10 (2) :01-20

مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة (JUAPS)

Open Access

التأثير التآزري لزيت السمسم *Sesamum indicum* والمضادات الحيوية في بكتريا *Streptococcus mutans* المعزولة من الأسنان ودوره في تثبيط بعض عوامل ضراوتها

فاطمة عبدالعزيز عواد   ليث مصلح نجيب

جامعة الأنبار – كلية العلوم

معلومات البحث:

تاريخ التسليم: 2017/01/02
تاريخ القبول: 2017/3/07
تاريخ النشر: 29/ 10 / 2017

DOI: 10.37652/juaps.2016.132595

الكلمات المفتاحية:

زيت السمسم ،
Streptococcus mutans ،
تآزري،
عوامل الضراوة.

الخلاصة:

تضمنت الدراسة جمع 52 عينة سريرية (Dental swabs) من مرضى يعانون من خمج الاسنان، وأجريت الاختبارات المجهرية والكيموحيوية، واستخدمت الأوساط الانتقائية لتشخيص العزلات البكتيرية المعزولة من الأسنان، فأظهرت نتائج هذه الدراسة وجود بكتريا *Streptococcus mutans* بنسبة اصابة (30.7%). دُرس تأثير أربعة عشر مضاداً حيوياً على كافة العزلات البكتيرية المعزولة، والبالغ عددها 46 عزلة بطريقة الانتشار حول الأقراص، وتم اختيار العزلة الأكثر مقاومة للمضادات الحياتية حيث ظهر أنها تمتلك نمط المقاومة المتعددة تجاه (11– 12) مضاداً حيوياً. تم التحري عن عوامل الضراوة للبكتريا المدروسة، وأوضحت النتائج قابلية البكتريا على تكوين الغشاء الحيوي، وانتاج الهيمولايسين، والبكتريوسين، والانزيم المحلل للبروتين، والسايدروفور، والانزيم المحلل للجيلاتين. جُمعت بذور السمسم وشُخصت، وتم تحضير الزيت منها وتقدير السمية الخلوية والدالة الحامضية له، وتم اختبار الفعالية ضد الميكروبية له بطريقة الانتشار حول الأقراص، أظهرت الدراسة أن زيت السمسم قد امتلك فعالية تثبيطية عالية تجاه بكتريا *Streptococcus mutans*. كما تم اختبار التأثير التآزري لزيت السمسم والمضادات الحياتية تجاه العزلة الأكثر مقاومة، وأظهرت نتائج التحليل الاحصائي وجود فرق معنوي للمضادات الحياتية المتآزرة مع زيت السمسم، وأن العزلات النامية في الوسط الزرعي الحاوي على زيت السمسم بالتركيز المثبط الأدنى قد تغيرت حساسيتها تجاه المضادات الحياتية بالمقارنة مع حساسيتها قبل المعاملة، كما فقدت هذه العزلات قابليتها على إنتاج بعض عوامل الضراوة كالغشاء الحيوي، وانتاج البكتريوسين، والهيمولايسين، والجيلاتينيز وقل إنتاجها للبعض الآخر كالبروتييز، في حين لم يتأثر إنتاج السايدروفور.

المقدمة:

من المشاكل التي تواجه العالم اليوم، هو مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية؛ فمعظم هذه الجراثيم تمتاز بمقاومتها العالية للمضادات الحياتية لامتلاكها العديد من عوامل الضراوة، التي من ضمنها انتاج انزيمات البروتييز Protease، والهيمولايسين Haemolysin، وتكوين الغشاء الحيوي biofilm وانتاج البكتريوسين والسايدروفور (1).

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

من جهة أخرى فإنَّ الاستخدام العشوائي للمضادات الحياتية أدى إلى مقاومة البكتريا لتلك المضادات(2). وعلى الرغم من انتاج العديد منها واستعمالها في الصناعات الدوائية، فقد أظهرت الكثير من سلالات البكتريا مقاومةً للمضادات؛ فكان لا بد من ايجاد بدائل؛ لذلك استخدمت العديد من المستخلصات النباتية لعلاج الامراض وبالأخص الإصابات البكتيرية (3,4).

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

استخدمت زيت السمسم على نطاق واسع لسنوات عديدة لمنع التسوس، ونزيف اللثة، والرائحة الكريهة للفم، وجفاف الحلق، وتشقق الشفاه ولتعزيز وتقوية الأسنان واللثة. ولزيت السمسم نشاط مضاد للجراثيم ضد *Streptococcus mutans*، حيث يحتوي على كميات عالية من الأحماض غير المشبعة (حمض اللينوليك وحمض الأوليك)(6).

تعد بكتريا *Streptococcus mutans* هي المسؤولة عن تسوس الأسنان الذي هو من الامراض المنتشرة على نطاق واسع في العالم، والمؤدية بدورها الى حصول الألم ومن ثم فقدان الأسنان، إذ إن حدوث تسوس الأسنان يرتبط ارتباطاً مباشراً بقدرة الكائنات الحية الدقيقة لاستعمار سطح الأسنان وتشكيل غشاء حيوي أو الترسبات على الأسنان(7).

في السنوات الاخيرة استخدمت عدة مركبات كيميائية ومستخلصات نباتية للوقاية من تسوس الأسنان للقضاء على البكتريا المسببة له، ومن تلك المركبات الكلوروهكسدين وهو الأكثر شيوعاً لمكافحة التسوس؛ إذ يستخدم كمضمضة للفم يعمل على اختزال اللويحة الجرثومية Bacterial plaque وكمضاد لالتهابات اللثة لكونه يعمل ضد مدى واسع من البكتريا والفطريات ويتداخل مع التصاق البكتريا بالأسنان (8)؛ الا انه غير محبب بسبب مذاقه المر وتركه بعض الاثار الجانبية، مثل تصبغات الاسنان اضافة الى غلاء سعره وهذا ما يتسبب في قلة استخدامه من قبل أكثر افراد المجتمع؛ ولذلك استخدمت الكثير من الزيوت لعلاج امراض الفم مثل زيت السمسم وزيت الزيتون وزيت جوز الهند (9).

هدفت الدراسة الحالية إلى عزل بكتريا *Streptococcus mutans* والتحري عن بعض عوامل ضراوتها ودراسة حساسيتها تجاه مجموعة من المضادات الحياتية. ودراسة دور زيت السمسم في زيادة حساسية البكتريا تجاه المضادات الحياتية، ومقارنتها بالمضادات الحياتية لوحدها، إضافة الى دوره في التقليل من ضراوتها.

المواد وطرائق العمل

عزل وتشخيص البكتريا

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

استخدمت مسحات قطنية معقمة (Sterile swabs) لأخذ العينات، وزرعت على وسط Blood agar ووسط Mitis Salrvarius Agar) –تظهر المستعمرات البكتيرية على وسط Mitis Salrvarius Agar زرقاء شاحبة، مرتفعة، محدبة، متموجة، تشبه الزجاج البلوري في مظهرها)- ، حضنت الإطباق عند درجة حرارة 37°م لمدة 24 ساعة. اختيرت المستعمرات المفردة من الأوساط الزرعية الأولى، وأعيد زرعها مرة أخرى على أطباق جديدة من الوسط نفسه، إلى أن تم الحصول على عزلات نقية من البكتريا، واستخدمت الاوساط الانتقائية والخاصة بالبكتريا قيد الدراسة مثل وسط Mitis Salrvarius Bacitracin Agar ووسط Trepticase Yeast extract Cystine Sucrose Bacitracine agar agar(TYCSB) بعدها نقلت هذه المستعمرات إلى وسط الأكار المغذي المائل وحضنت بدرجة 37°م لمدة 24 ساعة، ثم حفظت بدرجة(4) °م لحين إجراء الاختبارات مع مراعاة تجديدها شهرياً بالطريقة ذاتها(10) .

دُرست الصفات المجهرية والزرعية للمستعمرات النامية على الأوساط الزرعية المختلفة وحسب (11). واجريت الاختبارات الكيموحيوية مثل انتاج الكتاليز والاوكسديز واختبار الحركة واختبار فحص الحساسية للاوبتوجين Optochin والبستراسين Bacitracin وحسب (12) و(13).

اختبار الحساسية للمضادات الحياتية sensitivity test Antibiotic

استخدمت عدد من المضادات الحياتية شملت (Chloramphenicol، Ofloxacin، Gentamycin، Lincomycin، Clarithromycin، Clindamycin، Tetracycline، Erythromycin ، Amoxicillin ، Penicillin، Vancomycin، Methicillin، Levofloxacin وNorfloxacin) وذلك باتباع طريقة الانتشار حول الأقراص Disk diffusion method بالاعتماد على طريقة (14). اعتبرت البكتريا مقاومة اذا وصل قطر التثبيط حسب ما مؤشر في المواصفات القياسية الواردة في(2013) CLSI. وتم تشخيص البكتريا الأكثر مقاومةً للمضادات الحياتية باستخدام جهاز الفايتك.

التحري عن بعض عوامل الضراوة للبكتريا قيد الدراسة

تم التحري عن انتاج الهيمولايسين والبروتييز والجيلاتينيز حسب (12)، وانتاج السايدروفور حسب (15)، واستخدمت طريقة (16) للتحري عن العزلات المنتجة للبكتريوسين، واستخدمت طريقتين للتحري عن الغشاء الحيوي حيث اعتمدت طريقة (17) في الكشف عن قابلية تلك البكتريا لتكوين الغشاء الحيوي بطريقة الانابيب وطريقة (18) باستعمال اطباق المعايرة الدقيقة وتمت الحسابات وفق معادلات (19).

تحضير زيت السمسم

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

شُخص السمسم في معشب جامعة بغداد في كلية العلوم.

استخلص الزيت بطريقة التقطير بالبخار باستخدام جهاز السكسوليت soxhlet وحسب (20). حُضر المحلول القياسي الخزين Stock solution للمستخلص الخام بتركيز 0.2 مل $^{-1}$ وذلك باضافة 2 مللتر من الزيت في 10 مللتر من DMSO، وعقم المستخلص بمرشحات قطر فتحاتها 0.22 مايكرومتر.

اتبعت طريقة (21) لتقدير السمية الخلوية لزيت السمسم، وتم تقدير قيمة (pH) باستخدام جهاز pH- meter وحسب (22) .

اختبار الفعالية ضد الميكروبية لزيت السمسم تجاه بكتريا *Streptococcus mutans*

استخدمت طريقة الانتشار حول الأقراص حَسْبَ طريقة(23)، كما تم اختبار محلول **DMSO** كونه مضاداً بكتيرياً ام لا بطريقة الحفر.

اختبار التداخل بين المضادات الحياتية وزيت السمسم

أجري اختبار التداخل للعزلات البكتيرية، إذ نقلت (3-5) مستعمرات من طبق الاكار المغذي إلى أنبوبة معقمة حاوية على5 مل من المرق المغذي، وحضنت الانابيب في الحاضنة لمدة 5 ساعات، بعدها جرى تعديل العكورة بمقارنها مع أنبوبة ماكفرلاند القياسية رقم 0.5 إذ إن عكورة هذه الأنبوبة تمثل عدداً تقريبياً (1×10^{8}) خلية مل $^{-1}$ ، ثم غمرت مسحة قطنية معقمة بالعالق البكتيري، وأزيل الفائض من العالق بتدوير المسحة Swab على الجدران الداخلية للأنبوبة، ثم نشر المعلق البكتيري على وسط مولر هنتون أكار، وتركت الأطباق لمدة (3-5) دقائق لتتشرب بالعالق إلى أن تجف تماما، وبعدها ثبتت أقراص المضادات الحياتية باستخدام ملقط معقم، ثم وضع فوقها 25 مايكروليتر من المحلول القياسي الخزين Stock solution لزيت السمسم، وحضنت الأطباق بدرجة حرارة 37°م ولمدة (18-24) ساعة، وبعدها قيس قطر منطقة التثبيط (ملم) للمضاد مع الزيت.

تحديد التركيز المثبط الادنى لزيت السمسم :(MIC)

استخدمت طريقة Resazurin based microtiter dilution assay (RMDA) مع بعض التحويرات وحسب (24,25) لتحديد التركيز المثبط الأدنى لزيت السمسم.

تنمية العزلات البكتيرية بالتركيز المثبط الأدنى لزيت السمسم في وسط المرق المغذي واختبار حساسيتها تجاه المضادات الحياتية وقدرتها على انتاج عوامل الضراوة التي تم الكشف عنها سابقاً

أُضيف 100 مايكرو ليتر من التركيز المثبط الأدنى للزيت إلى أنابيب تحوي 10 مل من وسط المرق المغذي، ولقحت الأنابيب بالعالق البكتيري بمقدار 100 مايكرو ليتر أيضاً، بعدها حضنت الأنابيب لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37°م وللعزلات الأربع واستخدمت لإجراء اختبار الحساسية باستخدام أقراص المضادات الحياتية، كما في الفقرة السابقة ، وبعدها قيس قطر منطقة التثبيط (ملم) للمضادات وقورنت مع أقطار مناطق التثبيط للعزلات قبل المعاملة.

كما تم التحري عن عوامل الضراوة للعزلات البكتيرية بعد المعاملة بالزيت وبنفس الطرق المذكورة سابقاً، وملاحظة تأثير الزيت على قدرة البكتريا لإنتاج عوامل الضراوة .

التحليل الإحصائي The statistical analysis

تم إجراء التحليل الإحصائي باستخدام برنامج Statistical package of social sciences -Version-22 (SPSS) وفقاً للتصميم العشوائي لمعرفة وجود فرق معنوي ام لا، عند مستوى احتمالية

أقل من 0.05 ($P<0.05$) لدراسة تأثير التركيز المثبط الأدنى لزيت السمسم تجاه البكتريا المستخدمة في الدراسة ودورها في إمراضيتها.

النتائج

العزل والتشخيص Isolation and Identification

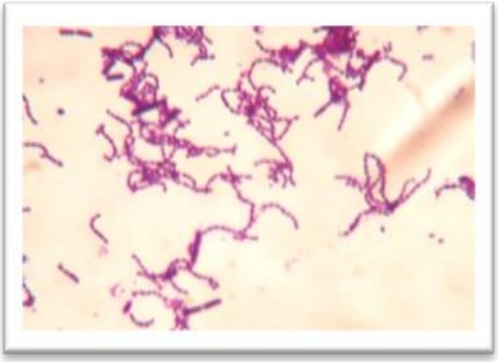
شُخصت العزلات بالاعتماد على نتائج الفحوصات البكتريولوجية والاختبارات الكيموحيوية واستخدام الأوساط الإنتقائية، إذ تم الحصول بعد التشخيص على 46 عزلة تحمل صفات بكتريا *Streptococcus mutans* وبنسبة (30.7%) وكما موضح في الجدول(1).

جدول (1): أعداد العزلات البكتيرية المعزولة ونسبها المئوية

الأجناس البكتيرية	عدد العزلات	النسبة المئوية%
streptococcus mutans	46	30.7
اخرى	104	69.3
المجموع	150	100

تميزت عزلات جنس المكورات السبحية الطافرة *Streptococcus mutans* المعزولة، بمستعمرات كروية صغيرة مرتفعة قليلاً، وعند نموها على وسط الدم الصلب كانت محللة للدم من نوع الفا. وظهرت تحت المجهر الضوئي كريات موجبة لصبغة كرام وبشكل سلاسل قصيرة أو طويلة وكما موضح في الصورة (1). أعطت أنواع هذا الجنس فحصاً سالباً لاختبار الكاتاليز والاوكسديز ومقاومة لمضادي الاوبتوجين optochin والبسترسين bacitracin جدول (2).

كما استخدمت أوساط إنتقائية للتأكد منها، فظهرت المستعمرات زرقاء شاحبة ناعمة صغيرة ملساء، والأخرى مجعدة تحوي على قطرة من متعدد السكريد الخارجي، أو بدون قطرة على وسط Mitis–Salivarius agar Bacitracin (الحاوي على صبغة التريبان الزرقاء) كما في الصورة (2) ، بينما كانت بيضاء على وسط TYCSB agar كما في الصورة (3).



صورة (1) بكتريا *Streptococcus mutans* تحت المجهر الضوئي بالقوة (100x)

جدول (2) نتائج الفحص المجهري والكيموحيوي لعزلات *Streptococcus mutans* المعزولة من خمج الأسنان

الاختبار / اسم العزلة	Gram stain	Motility	Catalase	Oxidase	Optochin resistant	Bacitracin resistant	Colonies shape on Mitis Salivarius Agar
Streptococcus mutans	+	-	-	-	+	+	مستعمرات مرتفعة زرقاء شاحبة اللون، محدبة، متموجة، تشبه الزجاج البلوري في مظهرها.

+ : النتيجة الموجبة
- : النتيجة السالبة

صورة(2) مستعمرات بكتريا *Streptococcus mutans* على وسط MSB الصلب

صورة(3) مستعمرات بكتريا *Streptococcus mutans* على وسط TYCSB الصلب

حساسية العزلات البكتيرية للمضادات الحياتية:

تم اختبار حساسية العزلات البكتيرية لأربعة عشر مضاداً حيوياً، وصنفت العزلات مقاومة (R) أو متوسطة المقاومة (I) أو حساسة (S) اعتماداً على ما ورد CLSI (2013)، وقد سجلت جميع العزلات مقاومة عالية لمضادي Lincomycin و Methicillin وبنسبة (100%)، تليها كل من مضاد Amoxicillin، Penicillin و Vancomycin وبنسبة (91.3%)، (69.5%) و(63%) على التوالي، أما مضادا Tetracycline و Erythromycin فكانت نسبة المقاومة لهما (45.6%) و(41.3%) على التوالي، في حين تساوت نسبة المقاومة لكل من مضادي Clarithromycin و Clindamycin فكانت (32.6%)، ومضادي Chloramphenicol و Gentamycin بنسبة (26%) لكل منهما، وبلغت نسبة المقاومة لمضاد Ofloxacin (23.9%)، في حين كانت حساسة لمضادي Levofloxacin و Norfloxacin جدول (3).

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

المضادات المستخدمة	عدد العزلات والنسبة المئوية للعزلات المقاومة %
	46 *S.mutans*
Amoxicillin	(%91.3) 42
Chloramphenicol	(%26) 12
Clarithromycin	(%32.6) 15
Clindamycin	(%32.6) 15
Erythromycin	(%41.3) 19
Gentamycin	(%26) 12
Levofloxacin	(%0) 0
Lincomycin	(%100) 46
Methicillin	(%100) 46
Norfloxacin	(%0) 0
Ofloxacin	(%23.9) 11
Penicillin G	(%69.5) 32
Tetracycline	(%45.6) 21
Vancomycin	(%63) 29

التحري عن بعض عوامل الضراوة للبكتريا قيد الدراسة:

أُخضعت العزلة البكتيرية الأكثر مقاومة للمضادات الحياتية المذكورة في الفقرة السابقة لدراسة هذه العوامل جدول (4)، وأظهرت النتائج أن بكتريا *Streptococcus mutans* لها القابلية على إنتاج الهيمولايسين Haemolysin من نوع ألفا (α –Haemolysis) على وسط الدم الصلب كما في الصورة (4). وانتاج السايدروفور Sidrophore، كما بينت النتائج قدرة البكتريا قيد الدراسة على انتاج البكتريوسين Bacteriocin تجاه بكتريا *Staphylococcus aureus*صورة (5). وأظهرت النتائج قابلية بكتريا *streptococcus mutans* على إنتاج هذا إنزيم البروتييز Protease وذلك بظهور منطقة شفافة حول جميع المستعمرات بعد انتهاء مدة الحضن من 24 إلى 48 ساعة نتيجة لتحلل بروتين الحليب بتأثير الإنزيم. وكان قطر منطقة التثبيط 12mm. وبينت النتائج أن بكتريا *streptococcus mutans* لها القابلية على انتاج إنزيم الجيلاتينيز Gelatinase، كما أنها تمتلك إنتاجية قوية strongly adherent للغشاء الحيوي، بالمقارنة مع السيطرة السالبة.

جدول (4) قابلية بكتريا *Streptococcus mutans* على إنتاج عوامل الضراوة

عوامل الضراوة / اسم العزلة	Haemolysin Production	Sidrophore Production	Bacteriocin Production	Protease production	Gelatinase production	Biofilm production
S. mutans	α- Haemolysin +	+	+	+	+	‡

صورة (4) إنتاج الهيمولايسين من نوع ألفا من قبل بكتريا *Streptococcus mutans*

صورة (5) إنتاج البكتريوسين من قبل بكتريا ***Streptococcus mutans***

الدالة السمية والحامضية لزيت السمسم

بيّنت النتائج عدم وجود سمية خلوية لزيت السمسم وأنه يمتلك درجة حموضة pH قدرها(7.2).

اختبار الفعالية الضد ميكروبية لزيت السمسم:

سجّل زيت السمسم فعالية عالية في تثبيط نمو بكتريا *streptococcus mutans*، كما موضح في الجدول (5) . في حين لم يُظهر محلول DMSO أي تأثير ضد بكتيري باعتبار أنه مادة غير سامة للبكتريا وتستخدم في بعض الأحيان مذيب لبعض المواد.

تأثير التداخل بين المضادات الحياتية وزيت السمسم على حساسية العزلات البكتيرية

أظهرت نتائج التحليل الإحصائي أن لتداخل زيت السمسم مع المضادات الحياتية تأثيراً معنوياً في زيادة حساسية بكتريا *streptococcus mutans* تجاه المضادات الحياتية، جدول (6).

تحديد التركيز المثبط الادنى لزيت السمسم MIC

أظهرت النتائج أن التركيز المثبط الأدنى لزيت السمسم تجاه بكتريا *Streptococcus mutans* هو 1/4.

تأثير تنمية العزلات في الوسط الزرعي الحاوي على التركيز المثبط الأدنى لزيت السمسم على حساسيتها للمضادات الحياتية

اقتربت نتائج هذا الاختبار مع نتائج الاختبار السابق التي كشفت عن تأثير التداخل بين المضادات الحياتية وزيت السمسم على حساسية العزلات البكتيرية، عدا بعض الاختلافات البسيطة؛ إذ قلَّ تأثير الفعل التآزري لزيت السمسم مع مضاد (MET) حيث أصبح معدل قطر التثبيط (13.9) بعدما كان في التجربة السابقة (26.8) كما في جدول(7)، وقد يعود السبب الى الحاجة الى كمية أكبر من التركيز المثبط الأدنى للزيوت أو تراكيز أعلى كي يكون التأثير فعالاً. والصورة (6) توضح الفعل التآزري لزيت السمسم مع المضادات الحياتية تجاه بكتريا *Streptococcus mutans*.

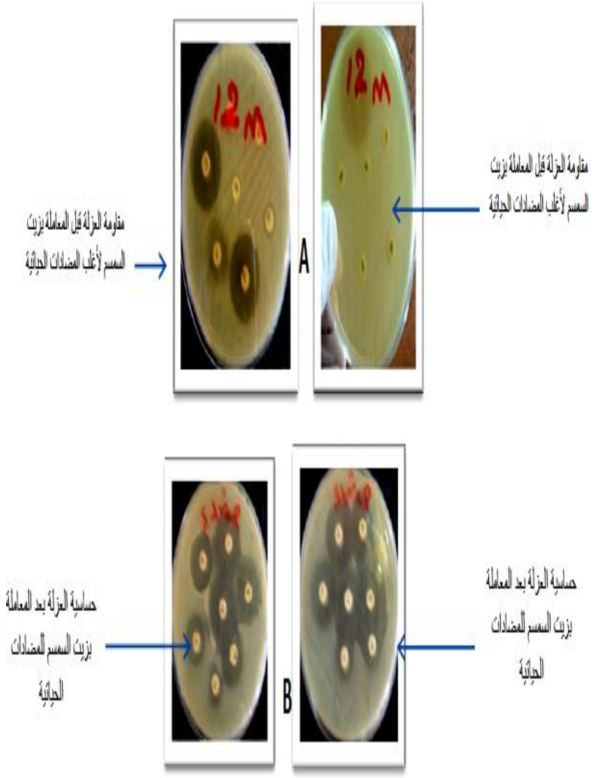
جدول (5) اختبار حساسية بكتريا *streptococcus mutans* لزيت السمسم (معدل قطر التثبيط بالملمتر)

العزلة / اسم المستخلص	زيت السمسم
	قطر التثبيط (ملم)
streptococcus mutans	19

جدول (6) تداخل زيت السمسم مع المضادات الحياتية

العزلة / اسم المضاد	***Streptococcus mutans***	
	معدل قطر التثبيط (ملم)	
	معدل قطر تثبيط المضاد	زيت السمسم مع المضاد
Amoxicilin	**0**	**29.2**
Chloramphenicol	**7.9**	**23.5**
Clarithromycin	**3.5**	**18.8**
Clindamycin	**0**	**14.8**
Erythromycin	**0**	**20.4**
Gentamycin	**8.8**	**24**
Levofloxacin	**21**	**31.6**
Lincomycin	**0**	**24.7**
Methicillin	**0**	**26.8**
Norfloxacin	**27.3**	**28**
Ofloxacin	**20.3**	**28.6**
Penicillin	**0**	**19.8**
Tetracycline	**0**	**22.3**
Vancomycin	**0**	**22.7**

P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703
2016,10 (2) :17-28



صورة (6) الفعل التآزري لزيت السمسم مع المضادات الحياتية تجاه بكتريا *Streptococcus mutans*.

A: اختبار الحساسية تجاه المضادات الحياتية قبل المعاملة بزيت السمسم

B: اختبار الحساسية تجاه المضادات الحياتية بعد المعاملة بزيت السمسم

تأثير زيت السمسم في انتاج عوامل الضراوة

استخدم التركيز المثبط الأدنى لزيت السمسم في تثبيط انتاج عوامل الضراوة لبكتريا *Streptococcus mutans*، وقد تبين بعد اضافة التركيز المثبط الأدنى ان للزيت تأثيراً على انتاج عوامل الضراوة، ذلك من خلال ايقاف انتاجها او تقليل الانتاج جدول(7). أظهرت النتائج أن لزيت السمسم دوراً في تثبيط أو تقليل بعض عوامل ضراوة بكتريا *Streptococcus mutans*، حيث كان مثبطاً لانتاج الهيمولايسين، والبكتريوسين، والغشاء الحيوي، ومقللاً لإنتاج البروتييز، حيث بلغ قطر تثبيط إنزيم البروتييز (8) ملم بعد أن كان (12) ملم، في حين لم يكن له تأثيراً على إنتاج السايدروفور، والشكل(1) يبين تأثير زيت السمسم على عوامل الضراوة لبكتريا *Streptococcus mutans*.أظهر التحليل الإحصائي وجود فروقات معنوية واضحة بمستوى معنوية ($P < 0.05$) في إنتاج الغشاء الحيوي قبل المعاملة بزيت السمسم وبعد المعاملة، بحيث لم تكن هناك فروقات معنوية بين الكثافة الضوئية للعزلات بوجود الزيت وبين معامل السيطرة ، كما موضح في الجدول(8).

جدول (7) تأثير زيت السمسم على انتاج عوامل الضراوة من قبل بكتريا *Streptococcus mutans*

عوامل الضراوة / اسم البكتريا	*Streptococcus mutans* قبل المعاملة	*Streptococcus mutans* بعد المعاملة
إنتاج الهيمولايسين Haemolysin	+	-
إنتاج السايدروفور sidrophore	+	+
إنتاج البكتريوسين Bacteriocin	+	-
إنتاج البروتييز Protease	++	+
إنتاج الجيلاتينيز Gelatinase	+	-
إنتاج الغشاء الحيوي Biofilm	+	-

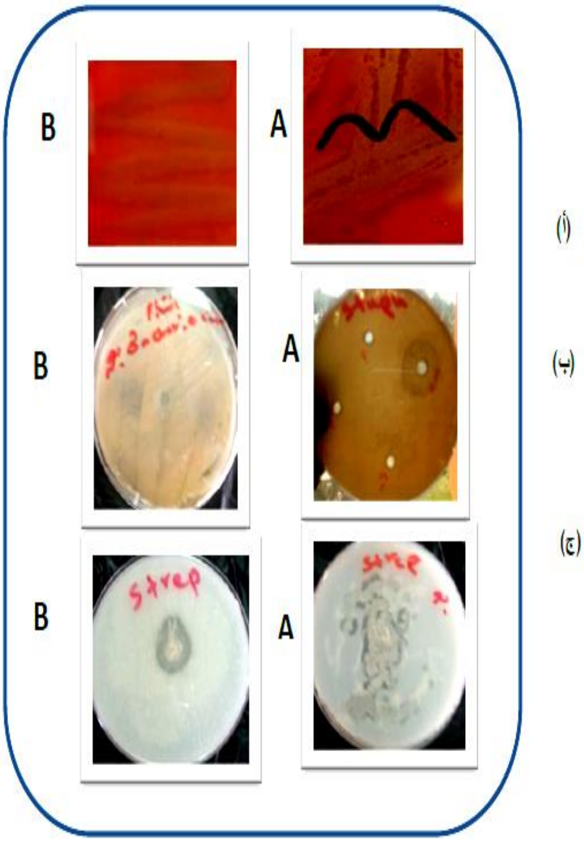
+ منتجة لعامل الضراوة   – غير منتجة لعامل الضراوة

جدول (8) مقارنة بين الكثافة الضوئية (OD) للتحري عن تكون الغشاء الحيوي لبكتريا *Streptococcus mutans* قبل وبعد المعاملة بزيت السمسم

اسم العزلة	الكثافة الضوئية قبل المعاملة	الكثافة الضوئية بعد المعاملة	الكثافة الضوئية للسيطرة السالبة (control)
Streptococcus mutans	0.9625 a	0.1126 b	0.1006 b

* تشير الحروف المتشابهة الى عدم وجود فرق معنوي والمختلفة الى وجود فرق معنوي عند مستوى احتمالية اقل من (0.05).

* بيانات الجدول : هي معدل لقراءة ثلاث مكررات قورنت بالكثافة الضوئية للسيطرة السالبة.



شكل (1) تأثير زيت السمسم على عوامل الضراوة لبكتريا *Streptococcus mutans*

(أ) تأثير زيت السمسم على إنتاج الهيمولايسين من قبل بكتريا ***Streptococcus mutans***

A : قبل المعاملة بزيت السمسم . B: بعد المعاملة بزيت السمسم.

(ب) تأثير زيت السمسم على إنتاج البكتريوسين من قبل بكتريا ***Streptococcus mutans*** .

A: قبل المعاملة بزيت السمسم . B: بعد المعاملة بزيت السمسم.

(ج) تأثير زيت السمسم على إنتاج البروتييز من قبل بكتريا ***Streptococcus mutans*** .

A: قبل المعاملة بزيت السمسم . B: بعد المعاملة بزيت السمسم.

المناقشة:

إن أغلب العزلات قيد الدراسة امتلكت ظاهرة تعدد المقاومة للمضادات الحياتية التي تعد من المشاكل الخطيرة جداً التي تواجه علاج اصابات هذه البكتريا وتجعل عملية ايجاد علاج ملائم مسألة صعبة جداً (26). وهذه المقاومة قد يكون سببها تغير الغشاء الخارجي للجرثومة عن طريق فقدان فتحات الغشاء الخارجي Outside membrane porins والذي يقوم بوظيفة نقل المضاد إلى داخل الخلية (27)، وهو ما يعرف بالضخ الخارجي أو الدفق efflux pump ، وهذا ما أكده (28) أي نظام الدفق، ويؤدي إلى تقليل تراكيز المضادات الحياتية في مواقع الهدف, فضلا عن وجود جينات المقاومة المتعددة للمضادات لدى بعض الأنواع البكتيرية (29).كما وجد (30) أن ازدياد مقاومة البكتريا لعدد من المضادات تزداد بزيادة استهلاك هذه المضادات.

إن العزلات قيد الدراسة يمكن ان تكون لديها اكثر من آلية مقاومة للمضادات الحيوية، كأن تكون قادرة على تكوين الغشاء الحيوي، ولديها حاجز نفاذية يمنع دخول جزيئات المضاد, كذلك ممكن أن تكون قادرة على أنجاز أنظمة الدفق والتي تعمل على تقليل تركيز المضاد في الخلية، أو أنها تعمل على تغيير مواقع الهدف ، وبالتالي عدم تعرف المضاد على الموقع الهدف في الخلية البكتيرية.

إن ارتفاع قابلية بكتريا *Streptococcus mutans* على إنتاج الغشاء الحيوي، يفسر ارتفاع المقاومة من قبل هذه البكتريا تجاه جميع المضادات الحياتية المستعملة، إذ يلعب الغشاء الحيوي دوراً كبيراً في إمراضية البكتريا ومقاومتها للعديد من المضادات الحياتية, لأنها تكون مغمورة في بروتينات المضيف، والطبقة المخاطية الميكروبية, التي توفر بدورها مكاناً مناسباً لنمو البكتريا والكائنات الأخرى، مما يزيد من مقاومتها للعلاج، وهذا بدوره يؤدي إلى خلق مشكلة كبيرة (32,31), وان تراكيز وجرع المضادات الحياتية اللازمة لمنع نمو الأنواع البكتيرية المنتجة للغشاء الحيوي أعلى بكثير من تلك اللازمة لمنع نمو الأنواع الاقل قدرة في الإنتاج، وغير المنتجة للغشاء الحيوي؛ لان التراكيز الاعتيادية للمضادات تؤدي الى قتل الخلايا المحيطة والمكونة للغشاء الحيوي, بينما تبقى الخلايا الموجودة داخل حشوة عديد السكرايد محافظة على حيويتها، وتعمل كبؤرة لإعادة النمو وإعادة الإصابة بشكل دوري .(32)

اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع (6) الذي بين أن زيت السمسم قد خفض نسبة بكتريا *Streptococcus mutans* بشكل ملحوظ عند الشباب في غضون اسبوع واحد مما يدل على قوة فعالية زيت السمسم. وقد تعود فعالية زيت السمسم الضد بكتيرية الى أنه يحتوي على كميات عالية من الأحماض غير المشبعة كحامض اللينوليك وحامض الأوليك.

وقد أظهرت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروقات معنوية واضحة بمستوى معنوية ($P \leq 0.05$)، وأن هنالك تفاوتاً كبيراً في حساسية العزلات للمضادات وحدها من جهة، وتغير حساسيتها عند

استخدام المضادات مع زيت السمسم من جهة أخرى، وهذا يعود إلى الفعل التآزري ما بين الزيت والمضاد الحيوي.

اتفقت نتائج هذه الدراسة مع ما وجده (33) الذي أوضح بأن الفعل التآزري يؤثر في البكتريا المقاومة والحساسة للمضاد المستخدم، وأكد أن للفعل التآزري تأثيراً كبيراً على الأنواع المقاومة والحساسة وبنسب قد تفاوت تبعاً للأنواع.

نستنتج مما سبق أن تداخل المواد الطبيعية والمضادات الحياتية يختزل المقاومة للمضادات، ويتعاون مع المضادات الحياتية لقتل البكتريا، وهذا ما أكده (34) في دراستهما.

كما وتتفق نتائج الدراسة الحالية مع (35) الذي بين ان السموم المكونة للثقوب مثل الـ Hemolysins التي تسهم في عملية الاجتياح وانتشار المرض قد ثبطت بواسطة الزيوت النباتية.

إن التأثير الفعال لزيت السمسم على عوامل الضراوة ربما يعود إلى كونه غنياً بالأحماض الدهنية المشبعة وغير المشبعة، وان الأحماض الدهنية غير المشبعة تعمل على تقليل الأكسدة، وبالتالي التقليل من ضراوة البكتريا، اضافة الى احتوائه على مركبات فعالة فلافونيدية هي **Sesamin** ، **Sesamol** و **Sesamolin** التي لها خصائص مضادة للأكسدة وضد ميكروبية. من جانب آخر فإن هذه النتائج تتفق مع دراسة (7) التي بينت الفعالية الضد مايكروبية العالية لزيت السمسم تجاه بكتريا *Streptococcus mutans* وقابليته على تثبيط الغشاء الحيوي لها.

الاستنتاجات:

- تختلف حساسية عزلات بكتريا *Streptococcus mutans* المسببة لنخر الأسنان تجاه المضادات الحياتية وكانت جميعها حساسة لمضادي Levofloxacin و Norfloxacin وبنسبة 100 %.
- لوحظ أن المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية كانت شائعة بين العزلات قيد الدراسة وامتلكت عدداً من عوامل الضراوة.
- امتلاك زيت السمسم قابلية التأثير التثبيطي لنمو بكتريا *Streptococcus mutans* .
- إن تآزر المضادات الحياتية مع زيت السمسم يقلل من المقاومة البكتيرية ويزيد من فعالية المضادات الحياتية فازدادت حساسية العزلة الأكثر مقاومة تجاه المضادات الحياتية بعد معاملتها بزيت السمسم.
- فُقدت أو اختزلت قابلية بكتريا *Streptococcus mutans* على انتاج عوامل الضراوة بعد معاملتها بزيت السمسم، في حين فقدت قدرتها تماماً على انتاج الغشاء الحيوي.

المصادر:

1. Hansen, D. S. ; Aucken, H. M. ; Abiola, T. and Podschun, .(2004). Recommanded Test Panel For Differentiation Of Klebsiella Species on The Basis Of Trilateral Interlaboratory Evaluation Of 18 Biochemical Tests . J . Clin . Microbiol . 42(8):3665-3669.
2. Graham, J. P.; Price, L. B.; Evans, S. L.; Graczyk, T. K. and Silbergeld, E. K. (2009). Antibiotic resistant enterococci and staphylococci isolated from flies collected near confined poultry feeding operations. Science of the total environment. 407(8): 2701-2710.
3. Dhanavade,M.J.; Jalkute,C.B.; Ghosh,J.S. and Sonawane, K.D.(2011).Study Antimicrobial Activity of Lemon(Citrus lemon L.) peel extract. British Journal of pharmacology and Toxicology.2 (3):119-122.
4. Kwakman, P. H. S.; De Boer, L. ; Ruyter-Spira, C. P. ;Creemers-Molenaar ,T. ; Helsper, J. P. F. G. ; Vandenbroucke-Grauls , C. M. J. E. ; Zaat, S. A. J. and Te Velde A. A. (2011). Medical-Grade Honey Enriched with Antimicrobial Peptides has enhanced activity against antibiotic-resistant Pathogens. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 30(2): 251 –257.

5. DeBoer, H.J.; Kool, A.; Broberg, W.R.; Mziray, I.; Hedberg and Levenfors, J.J. (2005). Antifungal and anti-bacterial activity of some herbal remedies from Tanzanias. J. Ethnopharmacol., 96: 461-469.

6. Asokan, S.; Emmadi P. and Chamundeswari, R.(2009). Effct of oil pulling on plaque induced gingivitis: A randomized, controlled, triple-blind study. Indian J Dent Res.20:47-51.

7. Sroisiri Thaweboon; Jurai Nakaparksin and Boonyanit Thaweboon .(2011) . Effect of Oil-Pulling on Oral Microorganisms in Biofilm Models. Asia Journal of Public Health.2 (2): 62-66.

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

9. Nishu Singla, Shashidhar Acharya, Suganthi Martena and Ritesh Singla (2014). Effect of oil gum massage therapy on common pathogenic oral microorganisms - A randomized controlled trial. Journal of Indian Society of Periodontology. 18(4):441-446.

10.Hawkey, M. and Lewis, A. (1989). Medical Bacteriology : APractical Approach. IRL Press. Oxford.

11.Collee, J.G. ; Marmion, B.P. ; Fraser, A.G. and Simman, A., (1996). Practical medical microbiology.4thed.produced by longman Singapore publishers (pte) LTD:385.

12.Brooks, G.F.; Carroll,K.C; Butel,J.S.; Mores,S.A. and Mietzner,T.A. (2013).Jawetz,Melnich and Adelbergs Medical Microbiology .25th ed.thr McGraw-Hill companies,United states of American.

13.Macfaddin, J.F.(2000). Biochemical Tests For Identification of Medical Bacteria . 3 rd ed. Lippincott , Williams And Wilkins . Philadelphia London .

14.Bauer, A. W.; Kirby, W. M.; Sherries, J. C. and Turck, M. (1966). Antibiotic Susceptibility Tests by A Standarized Single Disk Method. Am. J. Clin. Path. 45:493-496.

15.Hawkey, M. and Lewis, A. (1989). Medical Bacteriology : APractical Approach. IRL Press. Oxford.

16.القصاب، عبدالجبارعمر والخفاجي، زهرة محمود (1992). تأثير الظروف المختلفة على الفعالية التثبيطية للعصيات اللبنية المعوية المسببة للإسهال. مجلة العلوم الزراعية العراقية، المجلد (3)، العدد (1).

17.Christensen, G. D. ;Simson W. A. ;Bisno, A. L. and Beachey ,E. H. (1982). Adherence of slime-producing strains of Staphylococcus epidermidis to smoth surface. Infect.immun. 37:318-326 .

18. Dheepa, M.; Rashme, L.; and Appalaraju, F. (2011). Comparision of biofilm production and multiple drug resistance in clinical isolates of Acinetobacter baumanii from atertiary care hospital in south India.Int J. Pharm. Biomed. Sci. 2(4): 103– 107.

19.Kwiecinska-Piróg, J.; Bogiel, T.; Skowron, K.; Wieckowska, E. and Gospodarek, E. (2014). Proteus mirabilis biofilm - Qualitative and quantitative colorimetric methods-based evaluation. Brazilian Journal of Microbiology. 45(4): 1423–1431.

20.Zhou, Z., Liu, Y. Z., Liu, G. L., and Zhao, Y. Q. (2009). Studies on the smashing tissue extraction and purification process of the total saponins of the basal part of stem and beard from Panax notoginseng. Mod Chin Med.11(3): 34-36.

21.Xin-gup, H. and ursella ,M.(1994).Antifungal compounds from Solamum nigrescens, J. Ethnopharm. 43:173-177.

J.Antimicrob. Agents Chemother. 48(8): 3086-3092.

31.Hsueh, P. P. ; Chen, W. H. and Luh, K. T. (2005). Relationships between antimicrobial use and antimicrobial resistance in Gram – Negative bacteria causing nosocomial infections from 1991 – 2003 at a University Hospital in Taiwan. Int. J. Antimicro. Agents. 26(6):463-472.

32.Hassan, A. ; Usman, J. ; Kaleem, F. ; Omair, M. ; Khalid, A. and Iqbal, M. (2011). Detection and antibiotic susceptibility pattern of biofilm producing gram positive and gram negative bacteria isolated from a tertiary care hospital of Pakistan. Malaysian J. Microbiol. 7(1): 57-60.

33.Saxena, S.; Banerjee, G.; Garg, R. and Singh, M. (2014). Comparative Study of Biofilm Formation in Pseudomonas aeruginosa Isolates from Pationts of Lower Respiratory Tract infection . J. Clin. and Dia. Res. 8(5): 9-11.

34.Braga, L.C.; Leite, A.A.; Xavier, K.G.; Takahashi, J.A.; Bemquerer, M.P.;Chartone-Souza, E. and Nascimento, A.M. (2005). Synergic Interaction between Pomegranate Extract and Antibiotics Against Staphylococcus aureus. Can. J. Microbiol. 51: 541 -547.

35.Abascal, K. and Yarnell, E.(2002). Herbs and Drug Resistance . Potential of Botanical In Drug – Resistant Microbes. Alternative Complementary Therapies.1:237-241.

36.Cotar,A.I; Saviuc,C; Holban,A.M; Banu,O; Grumezescu,A. M and Chifiriuc,M.(2013). Phenotypic and molecular evaluation of Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus virulence patterns in the presence of some essential oils and their Major Compounds. Letters In Applied Nanobioscience. 2(1):91-96.

22.Shihata ,I.M.(1951).A pharmacological study of Anagallis arvensis. M, D. vet. thesis Cairo univ.

23.Jarosz , J. and Lipa , J.J. (1990). Fungistatic an Fungicidial activity of Albarep and garlic juice against phytopathologenic fungi . Rocz . Nauk Rol Ser . E. 20:53-59.

24.Chhillar,A. K.and Gahlaut, A. (2013). Evaluation of antibacterial potential of

25.plant extracts using resazurin based microtiter dilution assay. Int J Pharm Pharm Sci. 5: 372-376.

26.Gallucci , N.; Oliva, M. ; Carezzano, E.; Zygadlo, J. and Demo, M. (2010). Terpenes antimicrobial activity against slime producing and non–producing Staphylococci. Molecular Medicinal Chemistry . 21: 132-136.

27.Saidani, M. ; Boutiba, I. ; Ghozzi, R. ; Kammoum, A. and Benredjebs, S. (2006). Bacteriological profile of bacteremia due to multi – drug resistant bacteria out Charles – Nicolle hospital at Tunisia Med. Mal. Infect. 36(3):163-166.

28.Lambert, O.; Michea- Hamzehpour, M.; Kohler, T.; Chen, F.; Fanrisson, F.; Dautery, Y. And Pechere, J. (2001). Differential Selection of Multi-Drug Efflux Mutants by Trovafloxacin and Ciprofloxacin In An Experimental Model of Pseudomonas aeruginosa Acute Pneumonia In Rats. Antimicrobial Agents Chemotherapy. 44:571-576.

29. Mims, C. A.; Dockrell, H. M.; Goering, R. V.; Roitt, I. M.; Wakeling, D. and Zuckerman, M. (2004). Medical Microbiology. 3thed. Mosby Of Elsevier Limited.

30.Mushtaq , S.; Ge, Y. and Livermore, D.M. (2004). Doripenem versus Pseudomonas aeruginosa invitro Activity against characterized isolates, Mutants and Transconjugants and resistance selection potential.

P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703 (*JUAPS*) مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة Open Access
2016,10 (2) :17-28

The Synergistic Effect of *Sesamum* Oil and Antibiotics on *Streptococcus mutans* Isolated from the Teeth and its Role in Inhibition of Some Virulence Factors

FATMA A. AWAD LAITH. M. Najeeb

E.mail:

Abstract

This study included the collection of 52 dental swabs samples from patients suffering from infection of the teeth, the microscopic and biochemical tests was conducted and a selective media were used for the diagnosis of bacterial isolates that were isolated. The results showed the represented of *Streptococcus mutans* with infection rate 30.7%. The effect of fourteen antibiotics were studied toward 46 *Streptococcus mutans* isolates by disk diffusion method and the most resistant one to antibiotics was selected that was possessed pattern of multiple drug resistance towards(11-12) antibiotic. The virulence factors of the bacteria was investigated and the results showed the ability of these isolates to Biofilm, formation and production of Haemolysin, bacteriocin, protease, gelatinase, and sidrophores. Sesamum seeds were collected and diagnosed, oil was prepared and cellular toxicity and its PH were evaluted and the antimicrobial activity of oil against *Streptococcus mutans* by disk diffusion method was performed. The study showed that the Sesamum oil has a highly inhibition effect against *Streptococcus mutans*. The results of the statistical analysis showed the significant difference to the antibiotic synergistic with Sesamum oil, and developing isolates in the culture media containing Sesamum with minimum inhibition concentration changed their sensitivity towards the antibiotics compared with sensitivity before treatment, the isolate lost its ability to produce biofilm,and production of haemolysin, bacteriocin, and gelatinase, and reduced production for protease, while Sidrophores production was not affected.