عزل وتشخيص جراثيم Veillonella من حالات تسوس جذور الأسنان

شاكر غازي

قسم علوم الحياة / كلية العلوم

جامعة الموصل

الاستلام **القبول**

١٥ / ١٠ / ٢٠٠٨ ٢٥ / ٠٢ / ٢٠٠٩

ABSTRACT

The present study was coducted to isolate and charactrize the bacterium Veillonella from dental root caries. Fifty (50) samples were collected from caries areas inside the oral cavity from patients with denal root caries visiting teaching hospital of college of dentistry in mosul university. The samples were cultured directly on selective medium (Rogosa agar) which inhibit growth of streptococci & diphtheroids present within the sample because the medium contains the two different antibiotics (Vancomycin & Streptomycin) also the medium support the growth of Veillonella because it contains Sodium Lactate which considered the substrate used for Obtaining energy & growth. fifteen isolates is a rate of (30%) was idenitified as Veillonella Spp. According to morphological features using Gram stain and colony morphology on selective medium when grown under obligate anaerobic condition and was found negative to cytochrome oxidase test, benzidene test and carbohydrate fermentation.

The identification of bacterium was verified by exposing the bacterium to UV radiation (365nm) which resulted in a red flouresence. The isolates were not identified to the species level because it require modern genetic techniques not available to us like PCR-P and DNA-RNA sequence analysis.

الخلاصة:

تضمنت الدراسة محاولة عزل وتشخيص جراثيم Veillonella من حالات تسوس جذور الأسنان dental root caries إذ تم جمع (٥٠) عينة من منطقة التسوس داخل التجويف

الفموي للمرضى المصابين بالتهاب وتسوس جذور الأسنان والمراجعين للمستشفى التعليمي لكلية طب الأسنان في جامعة الموصل، زرعت العينات مباشرة على الوسط الانتقائي Rogosa agar الذي ثبط نمو جراثيم Diphtheroids, Streptococci التي تتواجد ضمن الطبقة الجرثومية السنية لاحتواء الوسط على المضادين Vanomycin و Streptomycin كذلك الوسط يدعم نمو جراثيم Veillonella لاحتوائه على مادة Sodium lactate لأنها تعد المادة الأساس التي تستخدمها الجرثومة لغرض الحصول على الطاقة والنمو، وقد تم تشخيص (١٥) عزلة بنسبة (٣٠%) من جراثيم Veillonella spp. والتي تم تشخيصها إعتماداً على صفاتها الشكلية وتفاعلها مع صبغة كرام وعلى صفات مستعمراتها على الوسط الانتقائي عند نموها تحت الظروف اللاهوائية الإجبارية إذ تمتاز هذه الجراثيم بكونها سالبة لفحص انزيم السايتكروم اوكسديز واختبار benzidene وسالبة لاختبار تخمير السكريات. وتم التأكد من التشخيص بالاعتماد على صفة إعطاء مستعمراتها على الوسط الانتقائي لظاهرة التألق الاحمر Red fluorescence عند تعرضها لأشعة UV عند الطول الموجي (365nm). لم تشخص العزلات الى مستوى النوع لأن التشخيص يتطلب تقانات وراثية حديثة لا تتوفر لدينا من PCR-p وتقانات تحليل تتابعات الحامض النووي DNA و RNA.

المقدمة

تسهم الأحياء المجهرية اللاهوائية الاجبارية بدور رئيس في مرض تسوس الأسنان إذ أشارت العديد من الدراسات بأن الجراثيم تكون سائدة بقنوات الجذور المصابة وتشكل حوالي ٩٠% او اكثر من مجموع الاحياء المجهرية المتواجدة (1).

من الأنواع البكتيرية الأولية المتوطنة في السن هي Neisseria, Actinomyces, Streptococcus Veillonella ثم يعقبها توطن انواع بكتيرية اخرى Fusobactrium. Nucleatum و Prevotella.intermedia أنواع Capnocytophage مع مرور الوقت ترتبط مجموعة اخرى من البكتريا بالمجتمع الميكروبي الملتصق بالسن مثل Campylobacter.rectus و Eikenella corrodens و Actinobacillus actinomycetecomitans و Spirochetes (2). لذا تم التركيز في هذا البحث على عزل وتشخيص جراثيم Veillonella ولأول مرة من حالات تسوس جذور الاسنان لأنها تستهلك الاحماض الكاربوكسيلية (اللاكتيت والسكسنيت) الناتجة عن تخمير الجراثيم الاخرى للسكريات بوصفها مصدراً وحيدا للكاربون مما يزيد من معدل عملية تنخر الاسنان وتسوسها.

ان جراثيم Veilonella هي مجموعة من المكورات السالبة لصبغة كرام اللاهوائية، تم تسمية الجنس (Veillonella) بهذا الاسم من قبل Prevot بعد تسمية الباحثان (Veillon &

(Zuber 1898 اللذان وصفا النوع الأول من هذه الجراثيم (3). صنفت جراثيم *Veillonella* سابقاً ضمن عائلة Veillonellaceae (4)، وفي عام ٢٠٠١ تم ضم هذا الجنس لعائلة Acidominococcaceae (5) وتضم هذه العائلة عشرة اجناس بكتيرية لا هوائية إجبارية تعود لصنف Clostridia.

تم تشخيص ثمانية انواع منها اربعة منها عزلت من القوارض وهي *V.ratti*، *V.caviae*، *V.criceti* ، *V.rodentium* والأربعة الأخرى عزلت من اصابات الانسان وهي *V.parvula* ، *V.atypica* ، *V.montpellierensis* ، *V.dispar* والنوع *V.denticariosi* (6 ,7). وحالياً تم تشخيص نوع جديد هو *V.vogosae* إذ عزل من اللويحة السنية للانسان (8). يبلغ قطر خلاياها 0.4-0.3 مايكرون، غير متحركة، لاهوائية اجبارية Obligate anaerobic وغير مكونة للابواغ. تترتب خلاياها كأزواج diplococci، قد تكون مفردة او على هيئة سلاسل قصيرة او كتل غير منتظمة من المكورات المزدوجة (10,9).

تمتاز مستعمرات هذه الجرثومة بكونها صغيرة يبلغ قطرها ١–٣ ملم عند نموها تحت الظروف اللاهوائية وبدرجة حرارة ٣٧ م^{o} ، ملساء، معتمة، بيضاء، رمادية اللون، دائرية، لها شكل يشبه القلب او المعين، تكون رطبة زبدية القوام (11,9). تنمو جيداً بمدى حراري يتراوح من ٣٠–٣٧ م^{o} وعند قيمة اس هيدروجيني من 8.0-6.5 ولا تنمو بدرجة c^{o} 40 وتكون ضعيفة النمو بدرجة ٢٤ م^{o}. تُقتل عند تعريضها لدرجة حرارة ٦٠ م^{o} لمدة نصف ساعة (9). لا تحتاج الى عوامل مساعدة للنمو مثل الفيتامينات ولكنها تحتاج إلى البايروفيت الذي يدعم النمو بصورة كبيرة، او اللاكتيت، كذلك يحدث النمو بوجود الماليت، الفيوموييت، الاكزالواسيتيت ولا تنمو بوجود السكسنيت او الكاربوهيدرات (12). تتواجد هذه الجراثيم بشكل طبيعي في التجاويف الطبيعية للانسان والحيوان مثل الفم والامعاء والجهاز التنفسي اذ تكون قليلة الضراوة، على الرغم من ذلك فقد عزلت لوحدها من حالات مرضية عديدة فضلاً عن مشاركتها مع الجراثيم الاخرى في احداث الاصابات الميكروبية المختلطة اذ شخصت جراثيم *Veillonella* بوصفها عوامل مسببة لتجرثم الدم في الأشخاص البالغين والمصابين بمرض اللوكيميا كذلك عزلت من الاطفال الرضع المصابين بتجرثم الدم، كذلك عزلت بصورة نقية من المرضى المصابين بتجرثم الدم مع التهاب العظام، فضلاً عن عزلها من مريض مصاب بالتهاب شغاف القلب، سرطان الرئة، التهاب اللوزتين، الحصبة، الحمى القرمزية، التهاب الزائدة الدودية، السيلان الصديدي الرئوي (13,11).

باستخدام المجهر الالكتروني ثم دراسة التركيب الدقيق للجدار الخلوي للجرثومة والذي ظهر على شكل طبقات مكونة من الغشاء الخارجي outermembrane، طبقة ببتيدوكلايكان رقيقة، الغشاء البلازمي الداخلي أي نفس الطبقات النوعية للبكتيريا سالبة الكرام والتي وصفت

مسبقاً لأفراد العائلة Acidaminococacceae (14)، كما تمتلك هذه الجراثيم عددا من الصفات البايوكيميائية المميزة والتي يمكن من خلالها تشخيصها اعتماداً على الصفات الشكلية لخلايا ومستعمرات هذه الجراثيم، ومن هذه الصفات كونها لا هوائية إجبارية اذ تمتلك إنزيم السايتوكروم اوكسديز وتعطي تفاعلاً سالباً لاختبار benzidine ، وتتمتاز بعدم قدرتها على تخمير السكريات. فضلاً عن ذلك تنتج بعض انواع جرثومة Veilonella إنزيم كتاليز غير نوعي اذ لا تحوي نواة البورفرين و لا تنتج الاندول و لا تحلل الجيلاتين و تختزل النترات (9). تنتج هذه الجراثيم غازي Co_2 ,H_2 وحامضي الاسيتيت والبروبيونيت عند نموها بوجود اللاكتيت، أيضاً تستهلك الاوكزالواسيتيت هوائياً ولها القدرة على تأييض البايروفيت، الاوكزالواسيتيت، الماليت، الفيومريت، السكسنيت لا هوائيا منتجة بذلك غاز Co_2 وحامض البروبيونيت (16).

تمتاز مستعمرات جراثيم Veillonella بصفة مهمة ومميزة لها وهي ظاهرة التألق الاحمر عند تعريضها لاشعة UV عند الطول الموجي 365 نانوميتر وهذه الصفة تعد تقانة مفيدة للتشخيص التأكيدي السريع لها، إن هذه الظاهرة تختفي بسرعة بعد تعرض المستعمرات للهواء الجوي (17). جراثيم Veilonella نسبياً يمكن تشخيصها بسهولة الى مستوى الجنس بالاعتماد على الخصائص الشكلية وبعض الصفات البايوكيميائية المميزة المذكورة أنفاً، لكن لعدم وجود اختبارات مميزة للخصائص المظهرية لأنواع Veilonella (18)، فان تشخيص العزلات الى مستوى الانواع يتطلب تقانات جزيئية تعتمد على تحديد تتابعات الجين 16S RNA، كذلك تتطلب تحديد تتابعات الاحماض الامنية لجينات rpoB, dnaK (19).

المواد وطرائق العمل:

جمع العينات:

جمعت (50) عينة من التجويف الفموي للمرضى المصابين بالتهاب وتسوس جذور الأسنان والمراجعين للمستشفى التعليمي لكلية طب الأسنان في جامعة الموصل، أخذت العينات باستخدام مسحات قطنية معقمة من منطقة التسوس Root dental caries ، ثم نقلت إلى قناني صغيرة حاوية على الوسط الانتقالي السائل لعزل جراثيم Veillonella (Lactate yeast extract broth) ، غطيت القناني بالبرافين المعقم لتوفير ظروف لا هوائية تحت ظروف معقمة ثم نقلت القناني إلى المختبر خلال ساعتين وزرعت على الوسط الانتقائي الصلب Rogosa Agar الخاص لعزل جراثيم Veillonella.spp وحضنت بظروف لا هوائية إجبارية باستخدام أنظمة التحضين اللاهوائي (Anaerobic Jar) الحاوية على كيس لتوليد الغاز Gaspak system (المجهزة من شركة Oxoid) بدرجة حرارة $37C^o$ ولمدة 24–72 ساعة وبعد ظهور

النمو البكتيري الذي يمتلك الصفات الشكلية لجراثيم .Veillonella spp تم نقلها على موائل الوسط الانتقائي الصلب وحضنت بدرجة حرارة C^o 4 ، علما ان عملية اخذ العينات المرضية من المرضى تمت تحت إشراف طبيب الاسنان (20).

الاختبارات التشخيصية والكيماحيوية (تشخيص جراثيم Veillonella) :

الزرع على الوسط الانتقائي:

استخدم الوسط الانتقائي الخاص لعزل جراثيم Veillonella لاول مرة لغرض عزلها او تشخيصها من حالات إلتهاب وتسوس جذور الاسنان، وهو وسط عالي الانتخابية لعزل جراثيم Veillonella اذ يشجع نموها ويثبط نمو الجراثيم الاخرى المتواجدة معها والمسببة لتسوس الاسنان وذلك لاحتواء الوسط على Sodium lactate وعلى المضادين الحيويين Vancomycin بتركيز µg/ml 7.5 ، Streptomycin بتركيز µg/ml 5 حيث زرعت العينات المأخوذة على هذا الوسط وحضنت بظروف لا هوائية إجبارية بأستخدام اوعية التحضين اللاهوائي الحاوي على كيس لتوليد الغاز Gaspak system وبدرجة حرارة $37C^o$ ولمدة 24-72 ساعة (22,21).

-مكونات الوسط الانتقائي وطريقة تحضيره:

يتكون الوسط من:

Sodium thioglycollate (750mg), yeast extract (3gm) ,trypticase (5gm), Agar (15gm), (25ml) Sodium lactate (50%), tween 80(1gm), (0.002gm) basic fuchsin ,Vancomycin sulfate, Streptomycin sulfate.

طريقة التحضير: أضيفت المكونات جميعها ماعدا الاكار والمضادين الى فلاسك معقم واضيف اليها الماء المقطر لاكمال الحجم الى ml 900. تم ضبط الأس الهيدروجيني عند 7.4 بعدها أذيب ١٥ غرام من الأكار في ١٠٠ مل من الماء المقطر وأضيف إلى الوسط الكامل وزرع الوسط قبل تصلبه إلى قناني بواقع ١٩ مل لكل قنينة ثم عقم بالموصدة وأضيف المضاد Streptomycin بتركيز ٥ مايكروغرام / مل وذلك بإضافة 1ml من محلول المضاد المحضر بطريقة معقمة إلى كل فيال (يصبح التركيز 5µg/ml)، والمضاد Vancomycin فقد أضيف للوسط بتركيز µg/ml 7.5 بإضافة ١مل من محلول المضاد المحضر أيضاً بطريقة معقمة بتركيز 150µg إلى كل فيال (يصبح التركيز 7.5µg/ml) ثم تم صب الفيالات قبل تصلبها في الأطباق المعقمة لغرض إستخدامها لعزل الجراثيم Veillonella بصورة نقية (22,21).

الفحص المجهري: تم عمل مسحات رقيقة من المستعمرات النامية على الوسط الانتقائي وصبغت بصبغة كرام للتأكد من الصفات الشكلية للجرثومة تحت المجهر الضوئي.

الاختبارات الكيماحيوية: أجريت الاختبارات اللازمة لتشخيص الجراثيم الى مستوى الجنس حسب ما جاء في أنظمة التشخيص (24,23,9) واهم هذه الاختبارات المميزة لجراثيم Veillonella spp. :

1-اختبار الكشف عن انزيم الاوكسيديز:

استدل على قدرة الجرثومة على انتاج الانزيم باضافة 1ml من محلول Dimethyl-p-phenylene diamine hydrochloride على الطبق الحاوي على النمو البكتيري وتم ملاحظة النتيجة بعد 10 ثوان من خلال تغير اللون من الاحمر الى الاسود.

2-اختبار Benzidene :

إختبار Benzidine : استخدم الاختبار للتحري عن إنزيم الكتاليز الذي ينتج من النظام الانزيمي flavoprotein oxidases وعن النظام الانزيمي Cytochrome oxidase اللتان تتواجدان في اغلب البكتريا الهوائية و اللاهوائية الاختيارية، أي ان هذا الاختبار يفرق البكتريا اللاهوائية الاجبارية التي تعطي نتيجة سالبة للاختبار عن البكتريا الهوائية واللاهوائية الاختيارية.

طريقة العمل: طريقة تحضير كاشف benzidine dihydrochloride اذيب 0.5gm من الكاشف في حامض الخليك الثلجي بتركيز ٢%، ثم الماء المقطر بنسبة ٣% ثم سخن المحلول وبرد وبعدها أضيف 50 ml من الكحول الاثيلي بتركيز 95%.

طريقة الاختبار benzidine: أضيف الكاشف إلى الطبق الحاوي على النمو البكتيري الكثيف ثم بعدها أضيف حجم متساوي من 50% من بيروكسيد الهيدروجين ويجب ان يكون الكاشف بتماس مباشر مع المستعمرات البكتيرية قبل اضافة بيروكسيد الهيدروجين، ففي حالة إمتلاك البكتيريا النظام الانزيمي Iron-porphyrin فانه سيتغير لون النمو البكتيري إلى ازرق غامق مما يدل على ايجابية الاختبار وفي حالة عدم تغير لون النمو البكتيري يكون الاختبار سالب (25).

3-إختبار الكشف عن انزيم الكتاليز:

اجري الأختبار بمزج حجم من الخلايا البكتيرية المعلقة بمحلول الملح الفسيولوجي مع حجم مساوي له من محلول ٥% H_2O_2 الحديثة التحضير (حضرت الخلايا البكتيرية المعلقة بعد اخذ مستعمرات من الجرثومة النامية على الوسط الانتقائي الصلب وغسلت بنفس المحلول ثلاث مرات بعملية الطرد المركزي بسرعة ٣٠٠٠ دورة/دقيقة لمدة عشر دقائق) استدل على النتيجة الموجبة بظهور الفقاعات الغازية بعد المزج.

4-اختبار اختزال النترات:

استخدم وسط V_{15} السائل (وهو وسط محور عن وسط Rogosa) الحاوي على 1% من KNO_3 وتم ضبط الاس الهيدروجيني عند 7.5. لقح الوسط تحت الظروف اللاهوائية بالعزلات البكتيرية النقية واستدل على النتيجة من ظهور اللون الاحمر في الوسط بعد اضافة الكاشف.

5-اختبار التحري عن الاندول:

أجري الاختبار باستخدام وسط V_{15} بطريقة كاشف كوفاكس، استدل على النتيجة الموجبة من خلال ظهور اللون الاحمر مباشرة في الوسط الحاوي على النمو البكتيري بعد إضافة قطرات من الكاشف الى الوسط. إن الظهور المتأخر اللون البني او البني المزرق يعد نتيجة سالبة نتيجة لحدوث تفاعلات غير متخصصة وتحلل الكاشف المستخدم.

6-التحري عن انتاج غاز H_2S : استخدم وسط V_{15} السائل والحاوي على 0.5 غرام من Ferric ammonium citrate لكل لتر من الوسط بوصفه دليلاً داخلياً للتفاعل، إجري الاختبار ايضا باستخدام عدد من المركبات مثل Thiosulfate citrate ، thioglycolate ، Cystein بدلا من ferric ammonium citrate، استدل على النتيجة الموجبة بحدوث إسوداد للوسط الملقح بالعزلات النقية والمحضن تحت الظروف اللاهوائية الاجبارية.

7-إختبار قدرة جراثيم Veillonella على استهلاك السكريات (الكلوكوز، الكالاكتوز، الفركتوز، السكروز، اللاكتوز، المالتوز، المانيتول):

حضرت محاليل بتركيز 15% بإذابتها بالماء المقطر وعقمت بالترشيح، تم إضافة 1ml كل محلول سكري إلى 9ml من وسط Cystine trypticase agar وصب الوسط الكامل (10ml) في اطباق معقمة، يمتاز الوسط باحتوائه على Cysteine الذي يعمل على سحب O_2 ويوفر ظروف لاهوائية، لقحت أطباق الوسط بالمستعمرات الفتية من الوسط الانتقائي الصلب Rogosa agar وحضنت لا هوائيا لمدة ٢٤-٤٨ ساعة بدرجة حرارة $37C^o$. تم قراءة النتيجة بملاحظة تغير لون الوسط من الأحمر إلى الأصفر لاحتوائه على كاشف Phenol red.

8- إختبار تحديد ظاهرة التألق الاحمر لمستعمرات الجرثومة Veillonella .

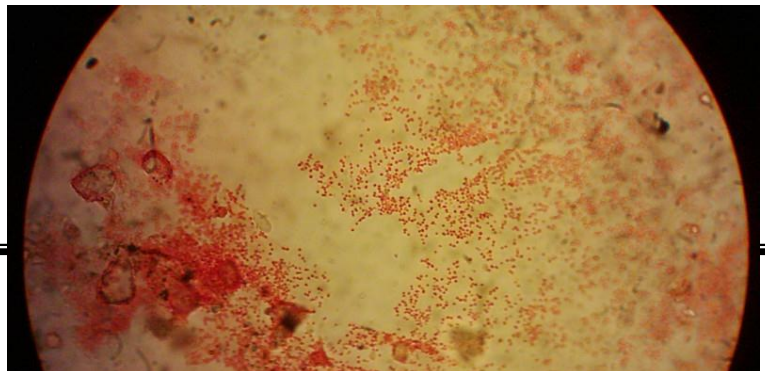
عرضت الأطباق الحاوية على النمو البكتيري تحت ظروف التحضين اللاهوائية وبدرجة $37C^o$ مباشرة للأشعة فوق البنفسجية UV في داخل غرفة مظلمة وفحصت قابلية إظهار المستعمرات لظاهرة التألق الأحمر وصورت الأطباق (17).

النتائج والمناقشة

أظهرت نتائج البحث نسبة عزل بلغت 30% (15عزلة) لجرثومة Veillonella من مجموع خمسين عينة مرضية اخذت من حالات تسوس جذور الاسنان، وتعد هذه النسبة مناسبة ومقاربة نوعاً ما للنتائج التي حصل عليها الباحثين (27,26) الذين عزلوا الجرثومة من المرضى المصابين بالتهاب وتسوس جذور السن بنسبة 25.6% ، 26.7% على التوالي على العكس من ذلك فقد عزلت هذه الجراثيم بنسب عالية بلغت 96% ، 42-100% كل من الباحثين (29,28) على التوالي من حالات تسوس الأسنان. كذلك أظهرت الدراسات الجزيئية نتائج مختلفة ومتنوعة لنسب عزل جراثيم Veillonella، إذ شخص الباحثين انواع Veillonella بصورة غير اعتيادية تمثلت 75 عزلة بكتيرية مختلفة معزولة من 10 افات (30) وفي دراسة الباحثون (31) وجد بان جراثيم Veillonella عزلت بأكبر نسبة من عينات تسوس الأسنان.

إن هذا الاختلاف بنسب العزل لجراثيم Veillonella يعود الى اختلاف الفلورا المايكروبية الموجودة بمنطقة التسوس وذلك إعتمادا على كمية الاغذية السكرية أي النواتج الحامضية التي تنتجها الميكروبات الأخرى المرافقة لجراثيم Veillonella ضمن منطقة التسوس إذ ان جراثيم Veillonella تعد ميكروبات لها القدرة على تأييض الاحماض الكاربوكسيلية قصيرة السلسلة التي تنتجها الفلورا المايكروبية المتواجدة بمنطقة التسوس (32). بسبب قدرة جراثيم Veillonella على تأييض اللاكتيت والسكنسيت فأنها تتواجد بها باعداد متزايدة في مناطق الافات التسوسية وإن تأييضها اللاكتيت يزيد ويشجع حدوث التسوس (33).

شخصت عزلات جراثيم Veillonella إعتمادا على الخصائص الشكلية والبايوكيميائية وخصائص مستعمراتها النامية على الوسط الانتقائي الخاص لعزلها، كذلك اجري تشخيص تأكيدي لهذه الجراثيم من خلال امتلاك مستعمراتها صفة التألق الاحمر عند تعريضها للطول الموجي 365 نانوميتر من الاشعة فوق البنفسجية، إذ ظهرت خلاياها تحت المجهر الضوئي (العدسة الزيتية 100X) بشكل مكورات مزدوجة صغيرة diplococci مفردة وعلى هيئة سلاسل قصيرة واحيانا على هيئة كتل غير منتظمة، سالبة لصبغة كرام، غير متحركة، غير مكونة للسبورات عند تحضير مسحات من المزارع النقية على الوسط الانتقائي Rogosa agar بعد تحضينها تحت الظروف اللاهوائية الاجبارية باستخدام اوعية نظام توليد الغاز Gas pak system والصورة رقم (1).

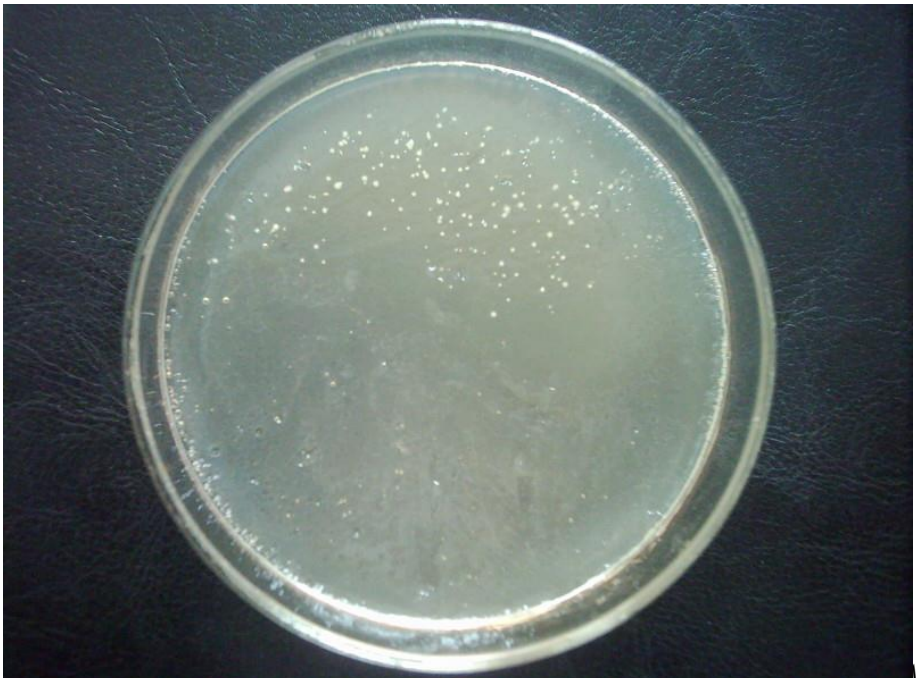


صورة رقم (1): خلايا جرثومة *Veillonella spp.* تحت المجهر الضوئي.

توضح شكل الجرثومة تحت المجهر الضوئي (X1000) عند صبغها بصبغة كرام وجاء هذا مطابقاً لما جاء به العديد من الباحثين (34,11) الذين ذكروا بأن الترتيب الخلوي الأساسي لهذه الجراثيم هي مكورات مزدوجة صغيرة، سالبة الكرام تتواجد بهيئة مفردة او كتل غير منتظمة او سلاسل قصيرة او خليط من هذه الأشكال.

كذلك أعطت عزلات هذه الجراثيم على الوسط الانتقائي Rogosa agar بعد 48 ساعة من التحضين في ظروف لاهوائية إجبارية وبدرجة $37C^{o}$ مستعمرات صغيرة بلغ قطرها 1-3ملم، ملساء، بيضاء-رمادية اللون، معتمة رطبة لها قوام زبدي وذات شكل معيني يشبه شكل القلب وجاء هذا مطابقاً لما جاء به (9, 34).

والصورة رقم (2) توضح مستعمرات جرثومة Veillonella على الوسط الانتقائي.



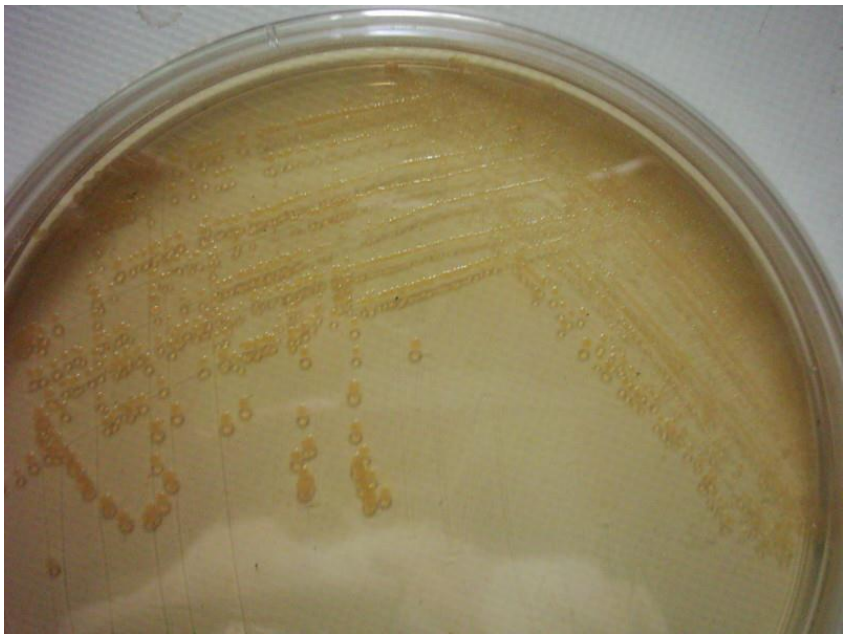
صورة (2): مستعمرات جرثومة *Veillonella spp* على الوسط Regosa agar

ة هذه الجراثيم معقدة التركيب وغير كفوءة في عزل جراثيم Veillonella بصورة نقية، لذا أكد هؤلاء الباحثين على

إجراء دراسات زرعية لغرض تطوير وسط زرعي اكثر ملائمة و اعلى إنتخابية لعزل هذه الجراثيم وتنميتها وإدامتها. ثم جاء بعد ذلك الباحث (36) الذي إستخدم وسط معروف لتنمية ودراسة ايض هذه الجراثيم ولكن الوسط لم يظهركفائته أيضاً.

لهذا ارتاءت الدراسة إستخدام وسط Rogosa الذي يمتاز بكونه عالي الانتخابية لهذه الجراثيم الذي يشجع على النمو الكثيف ويكون ملائماً لعزلها ودراستها بايولوجيا من مصادر مختلفة الإنسان والحيوانات إذ يحوي الوسط على المضاد الحيوي streptomycin بتركيز 5 µg/ml ومضاد Vancomycin بتركيز 7.5µg/ml اللذين يكبحان نمو الجراثيم الأخرى المتواجدة مع جراثيم Veillonella لأنها مقاومة لهذين المضادين، كذلك يحوي الوسط على مادة Sodium lactate التي تعد المادة الأساس المستخدمة من قبل جراثيم Veillonella لغرض الحصول على الطاقة والنمو إذ تعد المصدر الكاربوني الوحيد الذي تستخدمه هذه الجرثومة لذا فأن وجودها بالوسط يكون أساسياً لعزل جراثيم Veillonella (22,21).

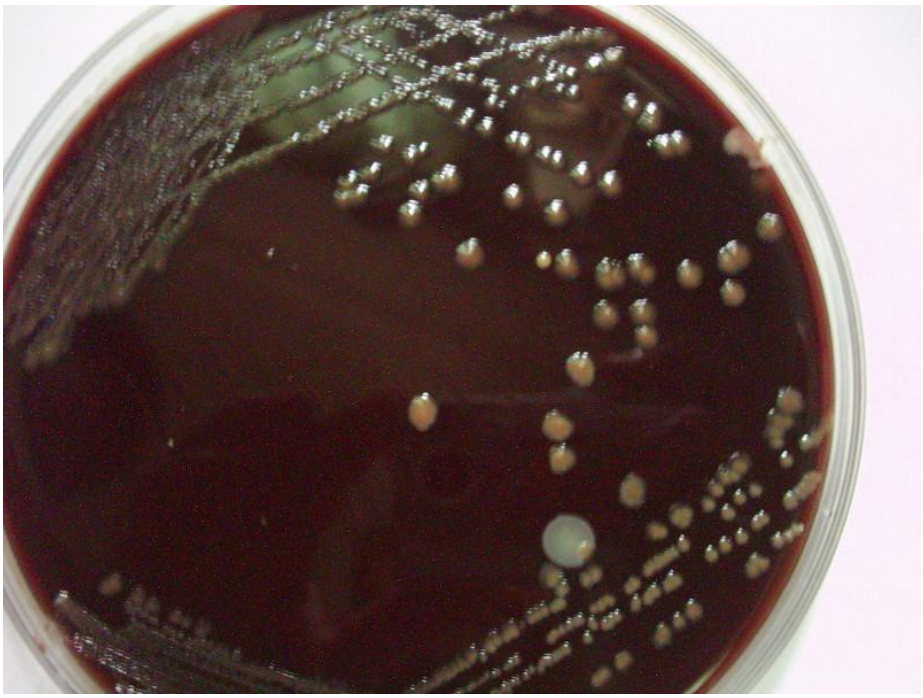
بعد العزل الأولي لجرثومة Veillonella على الوسط الانتقائي تحت الظروف اللاهوائية تم تلقيحها على وسط (نقيع الدماغ والقلب الصلبbrain heart infusion agar) وبعد التحضين اللاهوائي اعطت الجرثومة مستعمرات كبيرة نوعا ما، بيضاء اللون، دائرية، ملساء. والصورة رقم (3) توضح ذلك.



صورة (3): مستعمرات جرثومة *Veillonella* على وسط منقوع الدماغ والقلب الصلب.

أما على وسط اكار الدم وتحت الظروف اللاهوائية فلم تظهر هذه الجراثيم أي نوع من أنواع التحلل الدموي وهذا يعني ان خلاياها من النوع غير المحللة للدم Non-heamlytic،

حيث لا تنتج هذه الجراثيم الذيافانات المحللة لكريات الدم الحمر مثل ذيفان الفا وبيتا والصورة (4) توضح ذلك.



صورة (4): مستعمرات جرثومة *Veillonella* على وسط اكار الدم.

تميزت خلايا جرثومة Veillonella يكونها سالبة لاختبار إنتاج إنزيم الاوكسديز والكتاليز لكونها لاهوائية إجبارية obligate Anaerbic إذ لا تستخدم الاوكسجين لغرض اكسدة المواد العضوية والحصول على طاقة أي ان وجود الاوكسجين يكون ساماً ومميتاً لها بسبب تكون نواتج ومركبات سمية مثل الجذور الحرة وبيروكسيد الهيدروجين نتيجة التنفس الهوائي ولكن تعتمد هذه الجراثيم على استخدام تفاعلات التخمر في حصولها على الطاقة والنمو إذ تحتاج جهد أكسدة–اختزال واطئة جدا لكي تنمو (36).

اعطت جميع السلالات نتيجة سالبة لاختبار benzinide اذ لم يحدث تغير بلون النمو البكتيري بعد اضافة محلول الكاشف benzidine Hcl و H_2O_2.

وفيما يخص إختبار الاندول فان جميع العزلات كانت سالبة تجاه هذا الاختبار، وهذا يدل على عدم إمتلاك الجرثومة Tryptophanase الذي يعمل على تحليل الحامض الاميني التربتوفان الى اندول (9)، كانت جميع العزلات موجبة لأختبار إختزال النترات واتفقت النتيجة مع العديد من الدراسات التي أكدت بان جراثيم Veillonella تمتلك نظام إنزيم nitrate reductase أي ان لها القدرة على اختزال النترات الى الامونيا ثم تمثيل النتروجين ضمن المادة الخلوية للجرثومة (نظام تمثيل النترات nitrate assimilation) ونظام اخر هو نظام nitrate respiratiom أي ان هذه الجراثيم تحصل على الطاقة من خلال نقل الالكترونات الى النترات

أي حدوث تنفس هوائي تسلك النترات فيها بوصفها مستقبلاً نهائياً للالكترون تحت الظروف اللاهوائية. أن انزيم nitrate reductase هو إنزيم دقائقي يستخدم العديد المواد المانحة الالكترون لأختزال النترات (37).

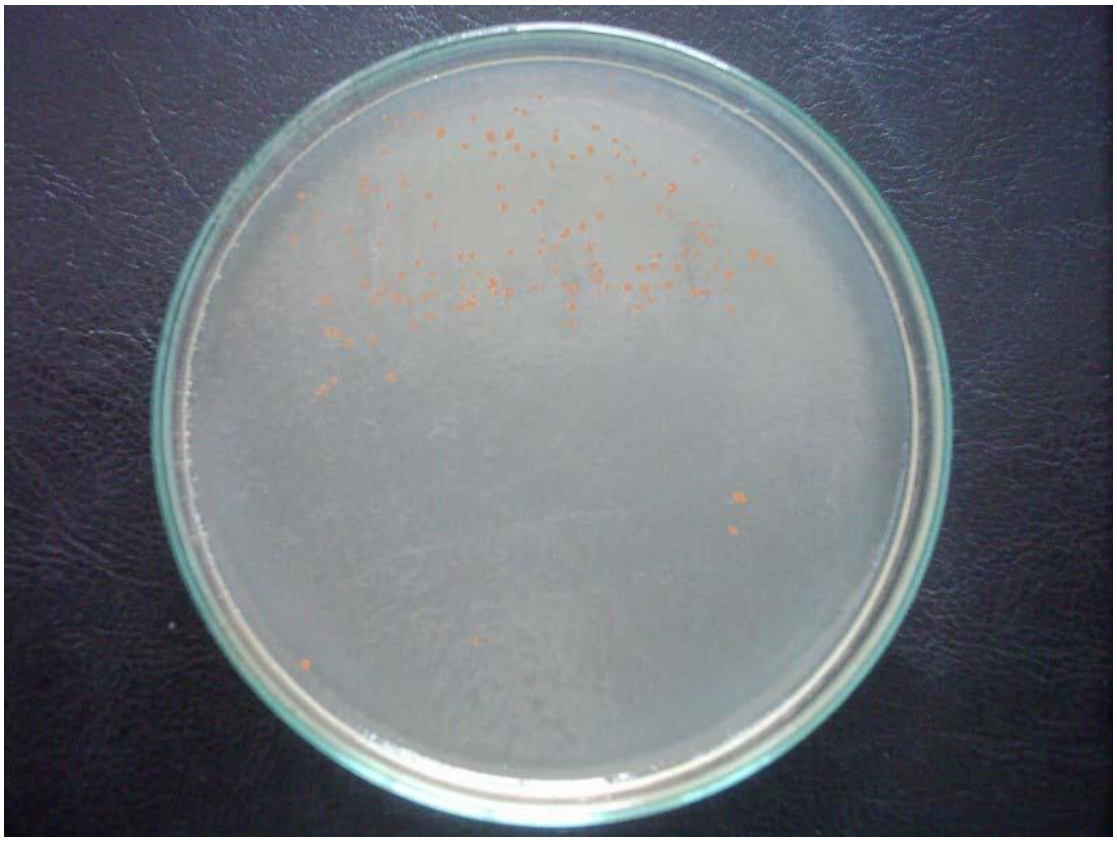
كذلك أعطت خلايا هذه الجراثيم نتيجة موجبة لأختبار إنتاج غاز H_2S بدلالة إسوداد الوسط بعد 48 ساعة من التحضين اللاهوائي وإتفقت النتيجة مع دراسة الباحث (12) الذي وجد ان جميع السلالات المدروسة كانت منتجة لغاز H_2S بعد 24–48 ساعة من التحضين اللاهوائي الوسط الحاوي على Cysteine ، thiosulfate ، thioglycolate.

أظهرت جميع العزلات عدم القدرة على استهلاك السكريات لعدم إمتلاكها لآنزيمي الكلايكوكاينيز Glycokinase والفركتوكاينيز Fructokinase، إذ بقي لون الوسط احمراً لعدم تكون نواتج حامضية التي تخفض الاس الهيدروجيني ومن ثم لم يتغير لون الدليل، إن هذه الخاصية تعد تشخيصية ومميز لهذه الجراثيم إلى جانب خاصية عدم قدرتها على إنتاج إنزيم السايتوكروم اوكسيديز وكونها سالبة لاختبار benzidine الذي يستخدم للتحري عن وجود السايتوكروم في الأنظمة التنفسية للأحياء المجهرية (٩).

الجدول رقم(1): يوضح نتائج الاختبارات الكيموحيوية لجراثيم Veillonella.ssp

اسم الاختبار	النتيجة
اختبار إنتاج إنزيم الاوكسيديز oxidase test	–
اختبار benzidine test	–
اختبار إنتاج إنزيم الكتاليز Catalase test	–
اختبار إختزال النترات nitrate readuction test	+
اختبار انتاج الاندول Indol test	–
اختبار انتاج غاز H_2S	+
اختبار تخمير السكريات المختلفة	–

اعطت جميع السلالات ظاهرة التألق الاحمر عند تعريض مستعمراتها الفتية مباشرة لاشعة ال UV عند الطول الموجي (365nm). وبعد تعريض المستعمرات للهواء الجوي لمدة دقيقتين وإعادة اختبار التحري عن التألق لوحظ إختفاء هذه الظاهرة أي ان جراثيم Veillonella لها القدرة على إعطاء التالق الاحمر عند تعريضها الاشعة UV تحت الظروف اللاهوائية وهذا ما أكده الباحثون(17,38) الذين أشاروا إلى ان إحتفاظ المستعمرات بقدرتها على التألق الأحمر عند حفظها تحت الظروف اللاهوائية الاجبارية لمدة ٤٨ ساعة بعد التعريض الاولي. إن هذه الصفة التي تمتلكها الجرثومة تعد تشخيصية مميزة لها والصورة رقم (5) توضح ظاهرة التألق الأحمر.



صورة (5): ظاهرة التالق الاحمر لمستعمرات جرثومة *Veillonella* على الوسط الانتقائي **Regosa agar**.

Reference

1) Holt, R., Newman, M. G., Kratochvil, F., Jeswani, S., Bugler, M., Khors andi, S., & Sanz, M. (1986) .J Dent Res.65:247, Abst. No.703 (AADR).

2) Thomson, G. (2006). J. Micro & Immun. (50):1-3.

3) Wilson, G. S. & Miles, A. A.(1955). Topley and Wilsons Principles of Bacteriology and Immunity, 4th.ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.

4) Rogosa, M. (1971).. Int. J. Syst. Bact. 21:231-233.

5) Garrtiy, G. M. & Holt, J. G. (2001). Taxonomic Outline of the Archaea and Bacteria. In Bergeys Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edn, Vol.1, pp.155-166. Edited by Boone. D. R. & Castenholz. R. W. New York: Springer.

6) JumasBilak, E., Carlier, J. P., Jean-Pierre, h., Teyssier, C., Gay, B. & Campos, J. (2004). J. Int. Syst. Evol. Microbiol. 54:1311-1316.

7) Mays, T. D., Holdeman, L. V., Moore,. W. E. C., Rogosa, M. & Johonson, J. L.(1982). Int. J. Syst. Bact 32:28-36

8) Arif, A. T., Byun, R., Sheehy, E., Clark, D., Gilbert, S. C. (2008) Int.J.Syst. Evol Microbiol. 58: 581-584.

9) Rogosa. M. (1964). J. Bact. 87(1):162-170.

10) Marchandin, H., Jumas-Bilak, E., Gay, B., Teyssier, C., Jean-Pierre, H., Simeon de Buochberg, M., Carriere, C. & Carlier, J.P. (2003a). Int. J. Syst. Evol. Microbiol.53:547-553.

11) Prevot, A. R. (1933). Ann. Sci. Nat. Ser. Botan.15:23-25.

12) Rogosa, M., & Bishop, F. S.(1946). J. Bacteriol. 87:574-580.

13) Brook, I. (1996). J. Clin. Microbiol. 34(5):1283-1285.

14) Bladen, H. A. & Mergenhagen. S. E. (1964). J. Bacteriol. 88:1482-1492.

15) ..Rogosa, M., Krichevsky, M. I. & Bishop, F. S. (1965). J. Bacteriol. 90:164-171.

16) Johns, A. T. (1951a). J. Gen. Microbiol. 5:317-325.

17) Anthony, W. C., Valerie, P. & Lucien, B. G. (1975). J. Clin. Microbio l.2 (6):546-548.

18) Kolenbrander, P. E & Moore, L. V. H. (1992). The genus Veillonella. In The Prokaryotes, 2nd edn, pp.2034-2047. Edited by Ballows, H. G., Truper, M., Dworkin, W., Harder, W. & Schleifer, K.-H. New York: Springer.

19) Byun, R., Carlier, J-P., Jacques, N. A., Marchandin, H & Hunter, N. (2007). Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57:2844-2848.

20) Ekstrand, K. R., Ricketts, D. N., Kidd, E. A., Qvist, V., Schou, S. (1998). Caries. Res. 32:247-254.

21) Rogosa, M. (19565) J. Bacteriol. 72:533-536.

22) Rogosa, M., Fitzgerald, R. J., Mackintosh, M. E. & Beaman, A. J. (1958). J. Bacteriol. 76:455-456.

23) Society Of American Bacteriologists. (1957). Manual Of Microbiological Methods. McGraw-Hill. Book Co., Inc., NewYork.

24) Rogosa, M.(1961).J.Gen.Microbiol.24:401-408.

25) Deibel, R. H. & James, B. E.(1960).J.Bacteriol.79(3):356-360.

26) Shen, S., Samaranayake, L. P., Yip, H. K., Dyson, J. E. (2002). Oral.Dis. 8:207-2017.

27) Zaremba, M. L., Stokowska, w., Klimiuk, A., Daniluk, T., Rozkiewicz, D., Cylwik-Rokika, D., Waszkeil, D., Tokajuk, G., Kierklo, A., & Abdelrazek, S. (2006). Advances In Med. Scie. 51(1):20-25.

28) Van Houte, J., Lopman, J., Kent, R. (1994). J. Dent. Res. 73:1727-1734.

29) Ellen, R. P., Banting, D. W., Fillery, E. D. (1985). J. Dent.Res. 64:1377-1381.

30) Chhour, K. L., Nadkarni, M. A., Byun, R., Martin, F. E., Jacques, N. A., Hunter, N. (2005). J. Clin.Microbiol.43:843-849.

31) Becker, M. R., Paster, B. J., Leys, E. J., Moeschberger, M. L., Kenyon, S. G., Galvin, J. L. (2002). J.Clin. Microbiol.40:1001-1009.

32) Marsh, P. D. & Martin, M. V. (1999). OralMicrobiology. 4thed.Oxford, UK:Wright,pp.58-81.

33) Van der Hoeven, J. S., Toorop, A. F., Mikxc, F. H. (1978). Caries. Res. 12:142-147.

34) Langford, G. C. Jr., Faber, J. E. Jr. & Pelczar, M. J. Jr. (1950). J. Bact. 59:349-356.

35) Rogosa, M.(1955). J. Den. Res. 34:721-722.

36) Brooks, G. F., Butel, J. S. and Morse, S. A. (2004). Jawetz, Melnick and Adelbergs Medical Microbiology. 22nd ed. Lange Medical Books. McGraw-Hill Medical Publishing Division.pp.53-55.

37) Inderlied, C. B. & Delwiche, E. A.(1973). J. Bacteriol. 114(3):1206-1212.

38) Jonathan, S. B. & Thomas, V. R. (1988). J. Clin. Microbiol. 26(2):383-384.